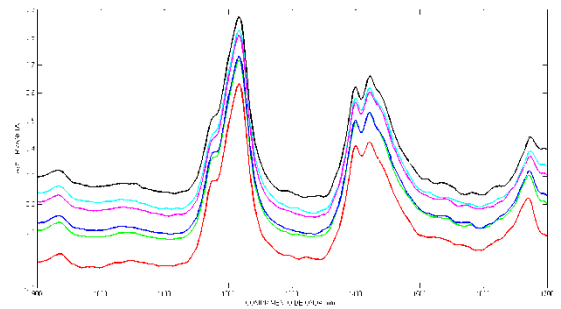
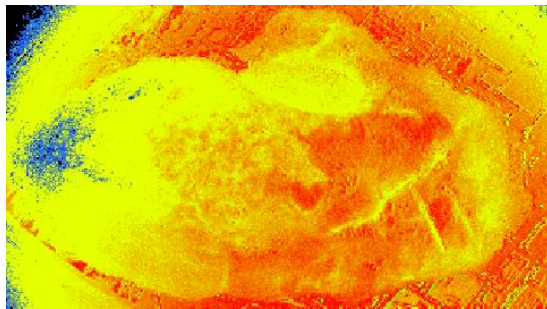




Técnicas de espectroscopia VIS/NIR aplicadas à artroscopia e a óleos alimentares

Diogo Marcelo Esterlita Nogueira

Mestrado em Física Médica

Departamento de Física

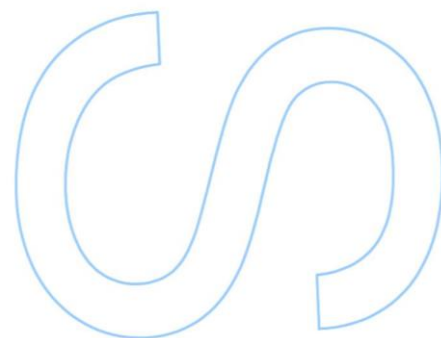
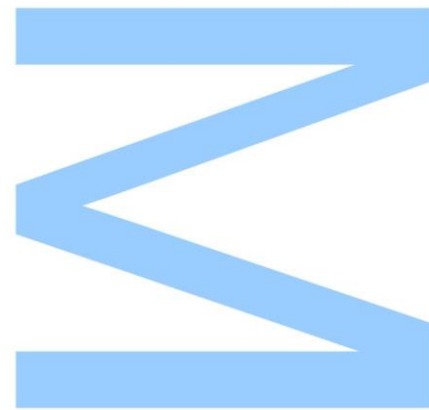
2014

Orientador

Carla Rosa, Professora Doutora, INESC TEC – CAP, FCUP

Coorientador

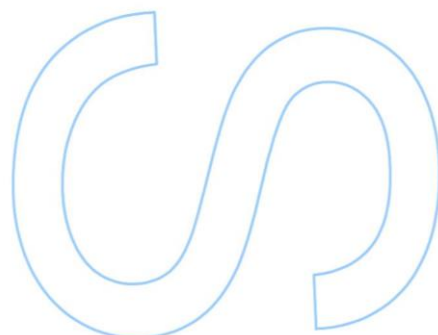
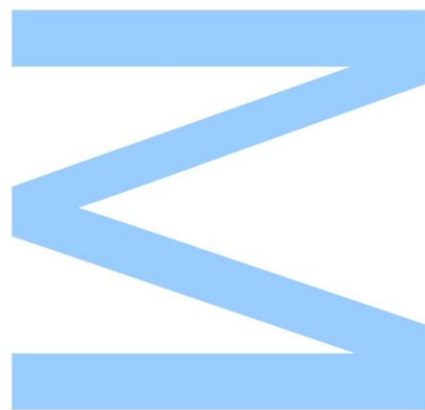
Manuel Ferreira, Coordenador I&D, Enermeter





Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,



Agradecimentos

O trabalho que aqui se apresenta só foi possível graças à colaboração e apoio de algumas pessoas, às quais não posso deixar de prestar o meu reconhecimento. Em primeiro lugar expresso o meu agradecimento aos meus orientadores:

À Professora Doutora Carla Rosa, pelo interesse que demonstrou na realização deste trabalho, pelo acompanhamento prestado ao longo deste, pelos ensinamentos que me proporcionou ao longo da sua realização, pelo bom ambiente de trabalho e por toda a disponibilidade e paciência demonstrada.

Ao Doutor Manuel João Ferreira por todo o apoio e dedicação do seu escasso tempo à orientação deste trabalho, pelo conhecimento e conselhos transmitidos e por toda a ajuda prestada.

Em segundo lugar gostaria de agradecer ao Doutor Carlos Vilela (ICVS-Uminho, I3B) pelo aconselhamento no âmbito dos estudos preliminares direccionados para a artroscopia.

Fico também agradecido à empresa Ambifood por me ter facultado as amostras de óleo alimentar. Este trabalho não seria possível, sem a matéria-prima que me foi gentilmente concedida.

O meu muito obrigado à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e ao INESC TEC / CAP por me terem proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, colegas e companheiros, pois sem eles teria sido mais difícil.

À Andreia Silva, minha namorada, amiga e companheira dos bons e maus momentos, por todo apoio e incentivo dado ao longo da realização desta dissertação.

Por último gostaria de agradecer à minha família por todo apoio, confiança e estabilidade que me proporcionaram ao longo destes anos de estudante.

A todos, uma vez mais, o meu muito obrigado.

Resumo

A espectroscopia é um ramo da Física e da Química que estuda a interação da luz ou qualquer radiação eletromagnética com a matéria. Ondas diferentes transportam diferentes quantidades de energia levando a diferentes interações. Esta técnica é usada para avaliar a concentração ou a quantidade de uma determinada espécie química (atômica, molecular, ou iónico). O rápido progresso dos espectrómetros e dos métodos de análise espectral permitiram um enorme desenvolvimento da espectroscopia nos últimos 20 anos, tendo surgido aplicações nomeadamente, na medicina, na indústria alimentar, na agricultura, na indústria petrolífera, na indústria farmacêutica, entre outras. As principais vantagens da utilização da espectroscopia são o facto de possibilitar uma análise não destrutiva da composição estrutural de diversos materiais, ter um tempo de análise muito curto e permitir a análise das amostras sem que seja necessária uma preparação prévia das mesmas.

Este trabalho está dividido em duas partes, a primeira na qual se aplicam técnicas espectroscópicas no estudo da cartilagem articular, com o objetivo de as utilizar como complemento à artroscopia, no sentido de auxiliar na diferenciação do nível das lesões da cartilagem; e a segunda parte do trabalho, na qual se usam técnicas espectroscópicas no estudo de óleos de fritura de alimentos, na tentativa de relacionar as medidas espectroscópicas efetuadas com a percentagem de compostos polares totais (CPT) dos óleos. Neste trabalho foi utilizada a espectroscopia da região do Visível (400 a 1000 nm) e do Infravermelho próximo (900 a 1700 nm), pois são as regiões mais úteis para efetuar uma análise quantitativa, qualitativa e estrutural de diversos tipos de amostras. Assim, utilizou-se a espectroscopia nestas regiões do espectro eletromagnético, com o objetivo de analisar amostras que possuem composições químicas diferentes, mas que têm um aspeto muito semelhante.

Palavras chave: Espectroscopia, visível, infravermelho próximo, artroscopia, cartilagem, óleo, compostos polares totais.

Abstract

Spectroscopy is a branch of physics and chemistry which studies the interaction of light or electromagnetic radiation with matter. Different waves transport different amounts of energy leading to different interactions. This technique is used to measure the concentration or quantity of specific chemical species (atomic, molecular, or ionic). The fast progress of spectrometers and methods of spectral analysis allowed a huge development of spectroscopy in the last 20 years, having arisen varied applications in the fields of, medicine, food industry, agriculture, oil industry, pharmaceutical industry, among others. The main advantages of the use of spectroscopy are that it allows a non-destructive analysis of the structural composition of various materials, having a very short analysis time without requiring any prior sample preparation.

This work is divided into two parts, the first where spectroscopic techniques are applied in the study of articular cartilage, with the main goal of using it as a complement to arthroscopy in order to help in the differentiation level of cartilage lesions; and the second part of the work is the spectroscopic study in food frying oils in an attempt to correlate the spectroscopic measurements made with the percentage of polar compounds in oils. In this work the spectroscopy of the visible region (400 to 1000 nm) and near infrared (900 to 1700 nm) were used, because they are the regions most useful to perform a quantitative or qualitative and structural analysis of different samples. As a result, we used spectroscopy in these regions of the electromagnetic spectrum, with the aim of analyzing samples that have different chemical compositions, but which have a very similar appearance.

Keywords: spectroscopy, visible, near infrared, arthroscopy, cartilage, cooking oil, total polar compounds.

Conteúdo

1. Introdução	21
2. Princípios de Espectroscopia	25
2.1. Métodos de recolha dos espectros óticos	27
2.2. Espectroscopia de Luz Visível	29
2.3. Espectroscopia de Luz Infravermelho Próximo	31
2.3.1. Contexto Histórico	31
2.3.2. Princípios teóricos	33
2.4. Vibração molecular	35
2.5. Quimiometria	41
2.5.1. Pré-Processamento Espectral	42
2.5.1.1. Centralização da Média	43
2.5.1.2. Auto-Normalização	43
2.5.1.3. Derivadas	44
2.5.1.4. Correção Multiplicativa de Sinal	44
2.5.1.5. Variação do Padrão Normal	45
2.5.1.6. Outros exemplos de Pré-Processamento	46
2.5.2. Métodos de Análise Multivariada	46
2.5.2.1. Análise de Componentes Principais	46
2.5.2.2. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais	48
3. Detecção ótica de lesões de cartilagem para artroscopia	51
3.1. Contexto histórico	52
3.2. Artroscopia nos dias de hoje	54
3.3. Anatomia do joelho	58
3.3.1. Cartilagem articular	60
3.4. Patologias mais comuns	61
3.4.1. Classificação das lesões	62

3.4.2. Técnicas de deteção das lesões intra-articulares e desafios atuais	63
3.5. Avaliação da aplicabilidade da espectroscopia na análise de cartilagem	
articular	67
3.5.1. Amostras	67
3.5.2. Instrumentação utilizada	68
3.5.3. Pré análise da informação espectral	72
3.5.4. Processamento de informação espectral	72
3.5.4.1. Análise dos espectros da região do infravermelho próximo	75
3.5.4.2. Análise dos espectros da região do visível	76
3.5.5. Aquisição e análise de imagens	81
3.5.6. Conclusões	85
4. Aplicação a Óleos Alimentares	89
4.1. Contexto	89
4.2. Fritura	91
4.2.1. Temperatura	92
4.2.2. Efeito da fritura no óleo	93
4.2.3. Efeito da fritura nos alimentos	95
4.2.4. Implicação da fritura na saúde	95
4.3. Quando se deve Mudar o Óleo	96
4.4. Monitorização da qualidade de óleo alimentar	97
4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares	101
4.5.1. Amostras	102
4.5.2. Instrumentação utilizada	104
4.5.3. Processamento de informação dos espectros de absorvância	106
4.5.4. Análise	108
4.5.4.1. Características principais das curvas de absorvância de luz Visível	108
4.5.4.2. Características principais das curvas de absorvância NIR110	
4.5.4.3. Relação da absorvância com a Percentagem CPT	112
4.5.4.4. Teste para aferir a repetibilidade e efeito da temperatura nas medições	129
4.5.5. Conclusões	130

5. Conclusões Finais e Perspetivas Futuras	133
5.1. Conclusões	133
5.2. Perspetivas Futuras	135
Bibliografia	137
A. Anexos	147
A.1. Imagens recolhidas das amostras de cartilagem articular	147
A.2. Principais características das 32 amostras de óleo que compõem o grupo 1	148
A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares	149
A.3.1. Espectros da região do visível dos conjuntos de amostras 1 e 3.	149
A.3.2. Gráficos da análise da absorvência absoluta dos espectros de IV em função da percentagem de CPT	152
A.3.3. Gráficos da análise das regiões da baseline dos espectros de IV em função da percentagem de CPT	154
A.3.4. Gráficos da análise das diferenças dos espectros de IV em função da percentagem de CPT	156
A.3.5. Curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos restantes espectros	161
A.3.6. Análise das amplitudes das curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos restantes espectros	162
A.3.7. Análise das <i>baselines</i> das Curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos restantes espectros - Conjunto 3	165
A.3.8. Dinâmica Relativa da Absorvência, pelas medidas ΔY 1, $\bar{Y}$ para o conjunto de amostras 3	168

Lista de Figuras

2.1. Espectro eletromagnético completo.	26
2.2. Métodos de recolha dos espectros mais utilizados: (a) - transmitância; (b) - transflectância; (c) - reflectância difusa; (d) - transmitância através de espalhamento do meio.	28
2.3. Esquema ilustrativo da experiência de Herschel, através do qual descobriu a região do Infravermelho Próximo.	31
2.4. Bandas de absorção que ocorrem na região do NIR e a respetiva localização das mesmas.	35
2.5. Efeito da absorção de fótons sobre a energia potencial e a amplitude de vibração interatômica.	38
2.6. Funções de potencial para o oscilador harmónico - A (lei de Hooke) e anarmónico - B (Lei de Morse) de uma molécula diatómica.	40
3.1. Alguns dos artroscópios inicialmente desenvolvidos. Em (a) está representado o artroscópio N ^o 1 desenvolvido por Kenji Takagi; e em (b) está representado o artroscópio N ^o 21 desenvolvido por Masaki Watanabe.	53
3.2. Figura que ilustra a disposição do artroscópio e do instrumento cirúrgico durante uma artroscopia.	55
3.3. Diagrama de blocos dos vários constituintes utilizados nas artroscopias.	56
3.4. Constituição do tubo artroscópico: (a) disposição das fibras de iluminação e do sistema de lentes; (b) sistema de lentes que era utilizado antigamente e o sistema de lentes cilíndricas que é utilizado atualmente.	57
3.5. Superfícies superior e inferior da cavidade do joelho, nomeadamente o côndilo femoral (a) e o menisco (b).	59
3.6. Ligamento Cruzado Anterior (LCA) (a), Ligamento Cruzado Posterior (LCP) (b), e Ligamentos Colaterais (c).	60
3.7. Sistema de Classificação ICRS.	64
3.8. Pormenor da recolha de espectros de uma das amostras de cartilagem (a) e esquema da montagem experimental (b).	69

3.9. Espectro “branco” corresponde ao espectro da reflectância que ocorre na ponta da fibra ótica: (a) VIS; (b) NIR.	71
3.10. Esquema da montagem experimental para a recolha das imagens da cartilagem. . .	71
3.11. Espectros não normalizados dos diversos graus de lesão: (a) da região do visível e (c) da região do infravermelho próximo; e espectros normalizados dos diversos graus de lesão: da região do visível (b) e da região do infravermelho próximo (d).	73
3.12. Representação da média dos espectros do infravermelho próximo apresentados na Figura 3.11 (d).	76
3.13. Na sub-figura (a) está representada a média dos espectros do visível apresentados na Figura 3.11 (b), sendo as sub-figuras (b) e (c) zonas ampliadas dos espectros representados na sub-figura (a).	78
3.14. Resultados de ΔY recolhidos dos diversos espectros relativos aos quatro graus de lesões (a); Em (b) são apresentados os mesmos valores de ΔY mas desta vez divididos pela média de todas as amostras recolhidas.	79
3.15. Resultados de $\bar{Y}$ recolhidos dos diversos espectros relativos aos quatro graus de lesões (a). Em (b) são apresentados os mesmos valores de $\bar{Y}$ que também são divididos pela média de todas as amostras recolhidas.	80
3.16. Três imagens que foram registadas, referentes à amostra n°4, sendo (a) a referente a I_1 , (b) a referente a I_{ref} , e por ultimo (c) a referente a I_2	82
3.17. Interface desenvolvida em LabVIEW para a classificação das imagens recolhidas e apresentação dos indicadores ΔY e $\bar{Y}$	84
4.1. Registo fotográfico do conjunto de amostras estudadas.	103
4.2. Montagem experimental para a análise das amostras (a) e respetivo diagrama de blocos (b).	105
4.3. Pormenor do espectro de absorção do Visível, que mostra as diferentes posições do início do registo da absorvância, para os diferentes óleos.	109
4.4. Variação da posição do limiar de absorvância dos espectros do VIS, em função da % CPT, dos óleos dos conjuntos 1, 2 e 3. A série de resultados identificada como “Conjunto 3 (1)” refere-se às amostras do conjunto 3 analisadas à temperatura ambiente, enquanto o “Conjunto 3 (2)” refere-se às amostras do conjunto 3 analisadas após serem aquecidas no banho-maria a 60°C.	110
4.5. Representação de alguns dos espectros referentes a amostras com diferentes percentagens de CPT, na gama NIR: (a) espectros do conjunto 1; (b) espectros do conjunto 2.	111

4.6. Conjunto de espectros NIR de óleos de fritura.	113
4.7. Gráficos da análise da absorvância absoluta dos espectros em função da % CPT das amostras do conjunto 2: (a) absorvância registada aos 1176 nm; (b) absorvância registada aos 1400 nm.	116
4.8. Espectro da região NIR referentes ao conjunto 3, medidos sob diferentes condições: (a) medição à temperatura ambiente sem homogeneizar as amostras; (b) medição à temperatura ambiente após homogeneizar as amostras; (c) medição após aquecer as amostras em banho-maria a 60°C, sendo estas homogeneizadas antes da análise.	117
4.9. Análise da absorvância absoluta nos 1400 nm, em função da % CPT das amostras do conjunto 3: (a) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente sem homogeneização; (b) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (c) análise dos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas. Em (b) e (c) as amostras foram medidas duas vezes.	119
4.10. Análise da média da absorvância, em regiões da <i>baseline</i> (1300 nm) em função da % CPT: (a) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (b) análise dos espectros medidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.	121
4.11. Identificação dos λ utilizados para o cálculos das diferenças 3 e 4. A diferença 3 é dada pela seguinte subtração: $[A(1400nm) - A(1409nm)]$ e a diferença 4 é dada por: $[A(1421,9nm) - A(1409nm)]$	122
4.12. Curvas resultantes da subtração do espectro de absorvância do óleo novo aos restantes espectros das amostras analisadas. Estas curvas são provenientes da aplicação deste procedimento nos espectros que foram recolhidos à temperatura ambiente sem homogeneização.	123
4.13. Análise da absorvância aos 1440 nm nas curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras: (a) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (b) análise dos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.	124
4.14. Análise da absorvância aos 1653 nm nas curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras: (a) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (b) análise dos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.	125
4.15. Medida de ΔY_2 para (a) $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$, à temperatura ambiente sem homogeneização; (b) $\lambda'_1, \lambda_2, \lambda_3$, à temperatura ambiente após homogeneização e (c) $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$, após aquecimento e homogeneização.	127

4.16. Gráficos de ΔY_1 (a) e $\bar{Y}$ (b), em função da % CPT, calculados para as posições indicadas.	128
4.17. Medidas da repetibilidade efetuadas com as amostras à temperatura ambiente: (a) espectros recolhidos da amostra com 18,9 % de CPT; (b) espectros recolhidos da amostra com 30,1 % de CPT.	129
4.18. Medidas da repetibilidade efetuadas após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas: (a) espectros recolhidos da amostra com 20,3 % de CPT; (b) espectros recolhidos da amostra com 35,1 % de CPT.	130
4.19. Medidas ΔY_2 com sugestão gráfica (retas) de um possível método de classificação da qualidade das amostras.	131

Lista de Tabelas

2.1. Regiões do espectro eletromagnético e excitações que cada tipo de radiação promove nas moléculas.	27
3.1. Características das amostras utilizadas neste trabalho.	68
3.2. Gama dinâmica informação registada a partir das quatro amostras estudadas na ferramenta de análise.	87
4.1. Temperaturas de degradação dos diversos tipos de óleos e gorduras. . .	93
4.2. Resultados da análise dos espectros do infravermelho próximo que compõem o conjunto 2.	114
4.3. Resultados da análise dos espectros do infravermelho próximo que compõem o conjunto 3.	115

Lista de Abreviaturas

CCD	Charge-Coupled Device
CPT	Compostos Polares Totais
CT	Computed Tomography
FIR	Infravermelho Longuínquo
HPLC	High Performance Liquide Chromatography
ICRS	International Cartilage Repair Society
IR	Infrared
LCA	Ligamento Cruzado Anterior
LCP	Ligamento Cruzado Posterior
MIR	Infravermelho Médio
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MSC	Multiplicative Scatter Corretion
NIR	infravermelho próximo
NIRS	Near-Infrared Spectroscopy
OA	Osteoartrite
OCT	Optical Coherence Tomography
PCA	Principal Component Analysis
PDNV	Produtos de Decomposição Não Volátil

PDV	Produtos de Decomposição Volátil
PLS	Partial Least Squares
SNV	Standard Normal Variate
USDA	United States Department of Agriculture
UV-VIS	Ultravioleta - Visível
VIS	Visível

1. Introdução

A Espectroscopia ótica é um método eficaz e comprovado, utilizado na análise (de forma não destrutiva) da composição estrutural de diversos materiais, incluindo os de origem biológica. Entre as diversas regiões do espectro eletromagnético, algumas das mais utilizadas na espectroscopia são a região visível (VIS) e infravermelho próximo (NIR). Estas regiões são das mais úteis para efetuar uma análise qualitativa, quantitativa e estrutural de diversos tipos de amostras.

A análise qualitativa funciona como se se procedesse à recolha da “impressão digital” da amostra, permitindo agrupar amostras com as mesmas características, através da análise dos espectros de cada uma delas. Quanto à análise quantitativa, para se efetuar esta análise é necessário recorrer a algumas técnicas de quimiometria, de forma a relacionar os dados obtidos em cada espectro com valores de referência de parâmetros previamente definidos. Para novas amostras é possível estimar esses parâmetros por análise multivariada.

A utilização da espectroscopia nos últimos 20 anos conheceu uma enorme evolução, surgindo aplicações no controlo de qualidade tanto na área alimentar, como nas áreas farmacêuticas e petroquímicas (refinação). Outra das áreas em que começaram a ser efetuadas pesquisas utilizando técnicas de espectroscopia foi na caracterização funcional e estrutural da cartilagem articular. Esta técnica tem como principais vantagens o facto de esta ser não destrutiva, não precisar de preparação prévia da amostra, e possuir um tempo de análise muito curto. Estes factos favorecem a possível utilização de técnicas com princípios espectroscópicos aplicados na clínica em tempo real, como auxiliar da cirurgia ortopédica.

Assim, o objetivo da primeira parte do nosso trabalho é efetuar um estudo espectroscópico da cartilagem articular, baseado nas regiões VIS e NIR, de forma a avaliar o potencial de aplicação da técnica de espectroscopia no estudo de lesões de cartilagem. O estudo foi direcionado para o desenvolvimento de uma solução complementar ao diagnóstico artroscópico atual, com especial atenção para a deteção de lesões de baixo grau.

A segunda parte do trabalho desenvolvido, consiste na aplicação de princípios espectroscópicos no estudo da degradação de óleos de fritura de alimentos. A utilização dos óleos de fritura repetidamente e a elevadas temperaturas, desencadeia diversas reações que promovem a sua degradação. Assim, o controlo de qualidade dos óleos utilizados na fritura de alimentos é essencial, pois a sua incorreta utilização pode gerar o aparecimento de produtos indesejáveis que se formam durante o processo de fritura, representando riscos para a saúde dos consumidores. Existem diversos métodos para avaliação da degradação dos óleos (com maior ou menor precisão). Entre os diversos métodos, existem alguns fatores (tempo, custo, fiabilidade) que os tornam mais ou menos atrativos. Uma das técnicas que tem sido utilizada no estudo do nível de degradação dos óleos é a espectroscopia, sendo os estudos realizados em laboratório. Existem alguns estudos realizados que mostram que a utilização da espectroscopia na região do infravermelho próximo pode ser uma técnica muito útil para aferir a qualidade dos óleos, através da medição dos níveis de oxidação dos mesmos, e da determinação do índice de iodo e dos níveis de ácidos gordos livres presentes nas amostras de óleo degradado [1, 2]. A legislação portuguesa tem como indicador da qualidade dos óleos a % compostos polares totais (CPT). No presente trabalho correlaciona-se a % CPT de diversas amostras de óleo com as características espectroscópicas obtidas nas regiões VIS e NIR. Após serem estudadas um elevado número de amostras, com diferentes características (marca de óleo, históricos de fritura, tipos de alimentos fritos, etc.), o objetivo é identificar alguns comprimentos de onda onde esteja patente a relação entre a % de CPT da amostra e as suas características espectroscópicas de forma a construir um sensor simples e de pequenas dimensões que possa ser utilizado na cozinha, e que constitua um método para avaliação do nível de degradação dos óleos de fritura, que permita uma análise fiável.

Esta dissertação encontra-se dividida em 5 capítulos.

O capítulo 1 corresponde à Introdução. No capítulo 2 é apresentado o estado da arte relativo aos princípios da espectroscopia, nomeadamente a espectroscopia VIS e NIR, sendo ainda apresentadas algumas técnicas de quimiometria utilizadas no tratamento dos espectros obtidos. No capítulo 3, é apresentada a primeira parte do trabalho, que consiste na aplicação de princípios espectroscópicos como complemento à artroscopia, no estudo da cartilagem articular. Ao longo do capítulo 3 é apresentado o contexto histórico da artroscopia, as potencialidades da técnica nos dias de hoje, sendo ainda referidas as lesões mais comuns e alguns trabalhos que utilizam a espectroscopia no estudo da cartilagem. É ainda apresentado o trabalho realizado, a metodologia usada

na análise das amostras, os resultados obtidos e a respetiva discussão dos mesmos. No capítulo 4, é exposto o trabalho desenvolvido na aplicação de princípios espectroscópicos no estudo da degradação de óleos de fritura de alimentos. Ao longo desse capítulo, é exposto o estado da arte relativo ao processo de fritura dos alimentos, e os efeitos que este acarreta nos óleos e nos alimentos, sendo ainda efetuado um levantamento dos diversos métodos existentes para efetuar a análise da qualidade dos óleos. É ainda apresentado o trabalho que foi desenvolvido no estudo das amostras de óleo, a metodologia de análise das amostras, os resultados obtidos e a sua discussão. No capítulo 5 estão descritas as conclusões principais e propostas para trabalhos futuros.

2. Princípios de Espectroscopia

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria.

A radiação eletromagnética consiste na propagação no espaço, da variação ondulatória de um campo elétrico e de um campo magnético, ortogonais entre si. Por razões de simplicidade costuma referir-se apenas um destes campos. As principais características de um fenómeno ondulatório deste tipo são a velocidade de propagação v , o comprimento de onda λ , e a frequência ν , sendo possível definir entre eles uma relação, $v = \frac{\lambda}{h} \nu$. A frequência é única para cada radiação, enquanto o comprimento de onda varia com o meio, devido à variação da velocidade. A frequência aqui considerada é uma frequência temporal, ou seja, o número de vezes que se verifica um ciclo completo de vibração durante um intervalo de tempo unitário.

Sendo a velocidade de propagação da radiação eletromagnética característica para um determinado meio de propagação, conhecendo λ conhece-se ν e vice-versa. Consequentemente quer o comprimento de onda, λ , quer a frequência, ν , caracterizam individualmente uma onda de radiação eletromagnética. Frequentemente também se faz a identificação da radiação pelo inverso do seu comprimento de onda, que se designa por número de onda k , $k = 1/\lambda$. Esta grandeza é uma frequência espacial. Corresponde ao número de ciclos que ocorrem por unidade de comprimento, e exprime-se usualmente na unidade cm^{-1} . Na figura 2.1, estão representadas as várias secções que compõem o espectro eletromagnético, com especial destaque para a zona da luz visível. Observando a figura é possível encontrar uma escala de frequência e comprimento de onda para todo o espectro.

Uma molécula é constituída por um conjunto de átomos dispostos ordenadamente em posições do espaço, determinadas por condições de estabilidade, isto é, correspondentes a um estado de energia mínima. A energia de um estado molecular E_{total} , pode descrever-se como sendo aproximadamente o somatório de diversos componentes [4], nomeadamente a energia contida nos núcleos sob várias formas, incluindo:

- a energia relativa aos diferentes níveis energéticos das orbitais que os eletrões podem ocupar (energia eletrónica), E_{elect} ,

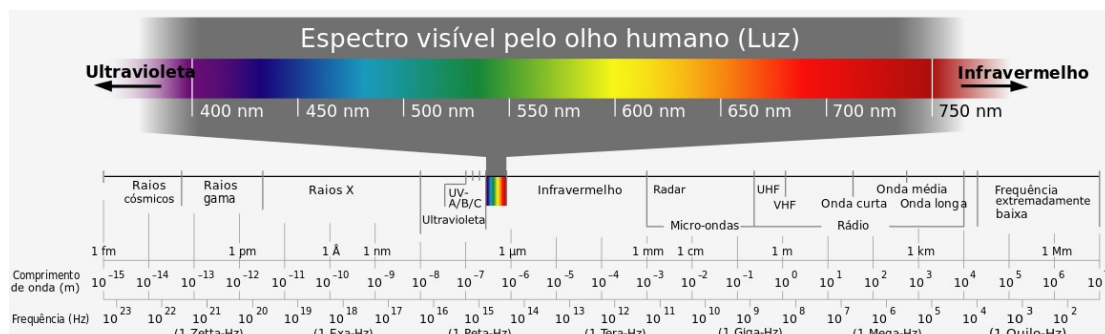


Figura 2.1.: Espectro eletromagnético completo [3].

- a energia relativa aos diferentes níveis vibracionais da estrutura (energia vibracional), E_{vib} ,
- a energia relativa aos níveis energéticos rotacionais (energia rotacional), E_{rot} ,
- a energia relativa à orientação de spin nuclear referenciada a um campo externo (energia de spin nuclear), E_{sn} ,
- e a energia relativa à orientação do spin eletrónico, E_{se} ,

sendo então a energia do estado molecular obtida pela equação 2.1:

$$E_{total} = E_{elect} + E_{vib} + E_{rot} + E_{sn} + E_{se} \quad (2.1)$$

Na realidade, isto trata-se uma aproximação, sendo o sistema globalmente mais complexo do que esta divisão em parcelas. O estado fundamental da molécula, quando esta se encontra em repouso é caracterizado por possuir todas as parcelas energéticas no nível energético mínimo.

Podem ocorrer transições entre níveis de energia característicos do sistema, através da interação da radiação eletromagnética com uma determinada molécula. A absorção da radiação eletromagnética pela molécula leva a transições de um nível energético inferior para outros mais elevados. Esse fenómeno vai ocorrer se se verificar que a energia de um quantum dessa radiação é igual à diferença de energia, ΔE , que existe entre os dois níveis energéticos, ou seja, é necessário que se verifique a seguinte igualdade $h\nu = \Delta E$. O fenómeno inverso, a relaxação, no qual ocorre a transição de um nível de energia mais elevado para outro inferior, pode processar-se de diversas formas, uma das quais é através da emissão de radiação eletromagnética.

2.1. Métodos de recolha dos espectros óticos

Região λ	Energia de Excitação (kJ/mol)	Tipo de excitação
Raios-X 10 - 50 nm	> 600	Transições eletrónicas (eletrões de níveis internos)
UV Longínquos 50 - 200 nm		Transições eletrónicas (eletrões de valência em átomos e moléculas)
UV Próximo 200 - 400 nm	300 - 600	Transições eletrónicas (eletrões de valência em átomos e moléculas)
Visível 400 - 800 nm		Transições eletrónicas (eletrões de valência em átomos e moléculas)
IV Próximo 800 nm - 20 μm	6 - 150	Transições vibracionais
IV Longínquo 20 μm - 1 mm	0,1 - 6	Transições rotacionais
Micro-Ondas 1 - 100 mm	$\sim 10^{-4}$	Transições rotacionais
Ondas Rádio 100 mm - 1 m	$\sim 10^{-6}$	Transições de spin nuclear e eletrónico

Tabela 2.1.: Regiões do espectro eletromagnético e excitações que cada tipo de radiação promove nas moléculas [4].

A interação da radiação com as moléculas promove diferentes tipos de excitação. Na tabela 2.1 identificam-se, para as diferentes zonas do espectro, a energia de excitação para cada uma delas e o tipo de excitação provocado nas moléculas.

2.1. Métodos de recolha dos espectros óticos

O estado físico das amostras é um dos parâmetros de maior importância e que influenciam a recolha dos espectros. Por norma, para as amostras no estado líquido são mais frequentes as medições por transmitância. Para as amostras que se encontrem no estado sólido, a medição por reflectância difusa é mais utilizada. Existem outros métodos, que se encontram representados na figura 2.2, onde I_p representa o feixe incidente, I_s o feixe emergente da amostra, S representa a amostra e R a superfície refletora.

Na transmitância, figura 2.2 (a), a luz incide num dos lados da amostra, atravessando-a até chegar ao detetor que se encontra do outro lado. Estas medidas são normalmente efetuadas para amostras líquidas em cuvettes de vidro / quartzo com caminhos óticos típicos, que podem variar de 1 a 50 mm.

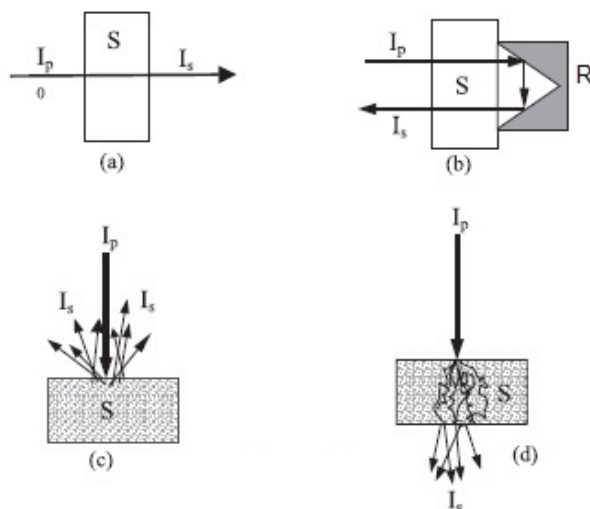


Figura 2.2.: Métodos de recolha dos espectros mais utilizados: (a) - transmitância; (b) - transfectância; (c) - reflectância difusa; (d) - transmitância através de espalhamento do meio. (Adaptado de [5]).

A Figura 2.2 (b) ilustra uma forma especial de se obter a medição da transmitância, que é denominada de transfectância. Este modo de medição é frequente quando são utilizados *bundles* de fibra ótica. A principal diferença em relação à medição da transmitância simples é que neste caso o feixe de radiação passa duas vezes através da amostra, aumentando para o dobro o caminho ótico. Esta técnica é utilizada no estudo de emulsões.

Na medição da reflectância difusa das amostras sólidas, Figura 2.2 (c), a dispersão e absorção por grânulos sólidos provoca alterações na intensidade do sinal. Kubelka e Munk estabeleceram um tratamento rigoroso dos sinais obtidos neste tipo de medidas. O tratamento matemático resultou na equação 2.2 que deve substituir a lei de Beer-Lambert 2.5, que é válida apenas para materiais homogêneos e com baixas concentrações, e estabelece uma relação entre a concentração C e a reflectância difusa R :

$$f(C) = \frac{(1 - R)^2}{2R} \quad (2.2)$$

A reflectância é obtida por:

$$R = \frac{I_R}{I_{R0}} \quad (2.3)$$

onde I_R é a intensidade da radiação refletida pela amostra e I_{R0} a mesma quantidade refletida por um material não-absorvente em toda a gama espectral de medição. A medição de I_R e I_{R0} requer a recolha de radiação dispersa por uma esfera de integração, uma referência de reflexão perfeita (100% em todos os comprimentos de onda) e, devido a isso, raramente é utilizada. Na verdade, a equação de Kubelka-Munk raramente é utilizada, no entanto, pode ser substituída por uma mais prática (equação 2.4), pese embora já não se verifique a linearidade da mesma:

$$f(C) = \text{Log} \left(\frac{1}{R} \right), \quad (2.4)$$

a equação 2.4 é muito utilizada para o desenvolvimento de métodos analíticos baseados em medições de reflectância.

A relação não se afasta muito da predição de Kubelka-Munk, e para pequenas mudanças na reflectância R (que são comuns em muitas aplicações) pode ser assumido que esta apresenta um comportamento linear com a concentração da substância a analisar [6].

A Figura 2.2 mostra ainda um outro método de recolha de espectros utilizados na espectroscopia. O método da transmitância, Figura 2.2 (d), aplica-se na análise de amostras líquidas densas, com percursos óticos na ordem dos 10 mm. Recentemente, foi descoberto que este tipo de medição pode ser apropriada para a determinação quantitativa do princípio ativo de comprimidos farmacêuticos, pois o caminho ótico mais longo, resultante da dispersão interna, pode fornecer informações que se correlacionam melhor com o teor médio da amostra, comparativamente com o sinal da reflectância difusa da superfície. A luz difusa constitui uma grande preocupação quando se utiliza transmitância através de amostras sólidas, isto porque apenas uma fração muito pequena da radiação incidente chega ao detetor [6].

2.2. Espectroscopia de Luz Visível

A espectroscopia na faixa do ultravioleta e visível (UV-VIS) é uma técnica consolidada e amplamente utilizada, durante os últimos 50 anos, permitindo análises qualitativas e quantitativas de misturas moleculares, sendo utilizada na determinação de compostos orgânicos e inorgânicos, como por exemplo, na identificação de princípios ativos de fármacos.

A espectroscopia de absorção molecular é bastante útil na identificação dos grupos

funcionais na molécula. Mais importante ainda são as aplicações da espectroscopia de absorção UV-VIS para a determinação quantitativa de compostos que contêm grupos absorventes.

A absorção na região da luz visível depende, entre outros fatores, do número e do arranjo dos eletrões presentes nas moléculas ou iões absorventes. Assim, é possível correlacionar o tipo de ligações que existem na amostra a ser estudada, com os picos de absorção que se obtêm no espectro. A região do visível situa-se entre os 400 e 800 nm, situando-se a energia de excitação molecular correspondente a essa região entre os 72 e 36 kcal/mol.

Do ponto de vista prático, um dos aspetos mais importantes é a determinação da quantidade de luz que é absorvida pela amostra. Isto é descrito pela lei de Beer-Lambert, que relaciona a intensidade da luz incidente na amostra (I_0), com a intensidade da luz que atravessa a amostra (I).

$$\text{Log} \left(\frac{I_0}{I} \right) = A = \epsilon cl \quad (2.5)$$

onde A representa a absorvância, ϵ representa a absorvidade molecular ou coeficiente de extinção, c representa a concentração do material absorvente e l a espessura da amostra estudada que é atravessada pela luz [7].

Outra das utilidades da espectroscopia na região do visível é a identificação de grupos funcionais que são responsáveis pelo desenvolvimento de cor em materiais, os chamados grupos cromóforos. A cor de um determinado material resulta da capacidade que este tem para absorver e refletir radiação eletromagnética de um determinado comprimento de onda. Assim sendo, é possível caracterizar as cores através de médias de reflectância na região visível do espectro. A faixa do comprimento de onda em que uma determinada substância reflete a radiação pode ser facilmente relacionada com as cores do espectro da luz visível, que se pode observar na figura 2.1, que mostra em pormenor a região do visível, com as diferentes cores e respetivos comprimentos de onda que a compõem [8].

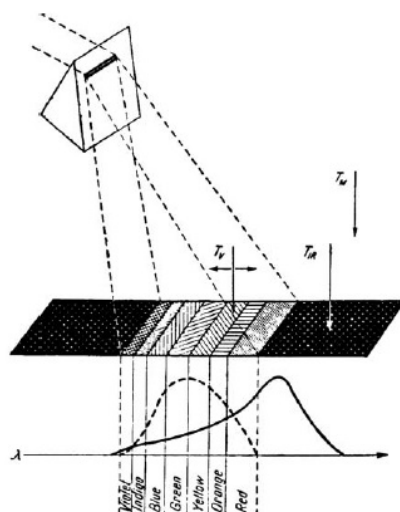


Figura 2.3.: Esquema ilustrativo da experiência de Herschel, através do qual descobriu a região do Infravermelho Próximo [6].

2.3. Espectroscopia de Luz Infravermelho Próximo

2.3.1. Contexto Histórico

A descoberta da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) é atribuída a Herschel em 1800, ao executar uma experiência na qual investigava qual a cor da radiação solar que produzia mais calor, utilizando para isso um prisma de vidro, transparente à radiação, que decompunha a luz solar, tal como mostra a figura 2.3. Com auxílio de um termómetro, verificou que ocorria um aumento inesperado ao colocar o termómetro na zona logo acima da região vermelha do espectro. Herschel utilizou termómetros escurecidos e prismas de vidro transparentes para ondas curtas de radiação NIR e relatou o fenómeno observado, referindo-se esta região como "raios caloríficos" encontrados além do vermelho. Esta região foi mais tarde denominada de infravermelho [6].

Embora a radiação do infravermelho próximo tenha sido descoberta antes do infravermelho médio, foi esta última região espectral que primeiro ganhou ampla aceitação após o trabalho iniciado em 1900 por Coblentz, que foi o primeiro investigador a obter espectros de absorção de substâncias puras e a verificar a sua utilidade para a identificação de grupos orgânicos funcionais. Enquanto a espectroscopia no infraver-

melho médio ganhou ampla aceitação e teve um enorme progresso tanto teórico como instrumental, a espectroscopia NIR foi deixada de parte pelos espectroscopistas que, durante muito tempo, não encontraram qualquer interesse adicional nesta região espectral, que era preenchida por bandas de absorção largas, sobrepostas e de baixa amplitude. Na verdade, este ostracismo precoce foi claramente demonstrado num artigo escrito por Wetzel cujo título sugestivo é "Análise da Reflectância do Infravermelho próximo - técnicas espectroscópicas adormecidas", publicado em 1983 [6].

Na década de 40 do século XX foram publicados vários artigos que referiam a recolha de espectros na região próxima do Infravermelho. Nas décadas de 40 e 50 do mesmo século a técnica foi ganhando cada vez mais atenção, sendo usada sobretudo no estudo das ligações de hidrogénio. No entanto, o progresso desses estudos foi bastante lento, provavelmente devido ao reduzido número de espectrómetros da região NIR existentes à data, mas também devido às dificuldades na análise dos espectros recolhidos [9].

Barchewitz foi o primeiro a aplicar a espectroscopia NIR para o estudo de combustível. Muitas outras contribuições podem ser encontradas nos primeiros tempos da espectroscopia NIR, todos eles tentavam identificar comprimentos de onda associados a uma determinada ligação molecular, que pudessem ser utilizado para a determinação quantitativa dos compostos dessa ligação, esperando que a lei de Beer fosse respeitada. Verificaram-se esforços para o desenvolvimento de métodos instrumentais para aplicação na agricultura, iniciadas pelo USDA (*United States Department of Agriculture*), o que levou ao reconhecimento do modo de medição da reflectância difusa como o mais adequado para o tipo de amostra em que eles estavam interessados [6]. Em 1960, um engenheiro agrónomo, de nome Karl Norris, pertencente à USDA, utilizou a espectroscopia NIR para estudos de caracterização de produtos agrícolas e alimentares [9]. Simultaneamente, abriu caminho para uma conquista mais ambiciosa, que foi o uso de reflectância difusa como uma medida não destrutiva na região do NIR, o que torna possível analisar diretamente a amostra, sem qualquer pré-tratamento [6]. Karl Norris, foi então o pioneiro na utilização da espectroscopia NIR, que juntamente com o desenvolvimento dos computadores nas décadas de 1960 e 70, abriram caminho para a aplicações das práticas da espectroscopia NIR. Surgiram entretanto aplicações em agricultura, engenharia alimentar, ciências médicas, indústria petrolífera, indústria farmacêutica e na análise ambiental [10].

O rápido progresso dos espectrómetros NIR e dos métodos de análise espectral permitiram um enorme desenvolvimento da espectroscopia NIR como princípio espec-

troscópico na década de 1990. Com o aumento de publicações sobre o tema, surgiu em 1993, o *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, o primeiro periódico inteiramente dedicado a esta temática [6].

Hoje em dia a espectroscopia NIR possui diversas aplicações clínicas. Através dela é possível medir o teor de água, de oxigénio, de hemoglobina [11], de glucose [12], de lípidos [13], de proteínas e outras substâncias constituintes dos tecidos, comida, sangue ou urina [14, 15]. É ainda utilizada na determinação da oxigenação do cérebro [16, 17], fígado [18], pele [19] e músculos [20]. Em oncologia, o método é utilizado na diferenciação de tecidos normais e patológicos na mama [21] e na próstata [22]. Possibilita também determinar os níveis de glucose no sangue por via percutânea [23, 12]. Na indústria alimentar, tem sido utilizada na determinação da qualidade de diferentes produtos, existindo já diversos estudos de determinação de humidade, proteínas e gorduras [24].

2.3.2. Princípios teóricos

O termo espectroscopia designa métodos analíticos, em que se estuda a interação de radiações eletromagnéticas com as moléculas. A ligação de dois átomos em moléculas envolve diferentes tipos de energia, tais como energia translacional, vibracional e eletrónica. Na região do VIS as bandas visualizadas têm origem em transições eletrónicas, enquanto na região NIR observam-se bandas resultantes, sobretudo, de transições vibracionais [9]. Assim, esta espectroscopia deteta a radiação que é absorvida pelas ligações vibracionais moleculares, absorção essa que pode ser causada por três mecanismos diferentes: sobreposições de vibrações fundamentais; combinações de vibrações fundamentais e ainda absorções eletrónicas, gerando no espectro NIR bandas de absorção com baixa seletividade [10].

Para que uma molécula absorva radiação é necessário que a radiação que incide sobre esta provoque a excitação dos modos vibracionais de forma a que a sua energia corresponda à diferença de dois níveis energéticos vibracionais. Assim, as absorções ocorrem a um determinado comprimento de onda, que corresponda à energia que permite a transição. As absorções na região NIR são muito fracas, ao contrário das absorções no infravermelho médio (MIR) e longínquo (FIR), o que significa que os espectros de NIR podem ser obtidos diretamente a partir das amostras, sem ser necessário recorrer a diluições. Isso torna possível a análise direta a amostras sólidas através da medição da reflexão difusa. Visto a intensidade de uma banda de absorção

ser proporcional à concentração do componente que lhe dá origem, é possível determinar a quantidade de um composto existente numa amostra através de uma curva de calibração (intensidade da banda versus concentração) que pode ser construída a partir da análise de amostras com concentrações conhecidas do composto em questão [25].

A espectroscopia de infravermelho próximo gera espectros que apresentam sobreposições e bandas de combinações, o que não acontece com a espectroscopia MIR, isto porque nesta região ocorrem apenas transições de vibração fundamental, dando origem a espectros com picos bem definidos que permitem uma interpretação direta. No caso da espectroscopia NIR os espectros obtidos são mais complexos, devido às absorções de menor intensidade e ao facto de ocorrerem sobreposições e combinações das ligações *CH*, *OH* e *NH* (ver figura 2.4) dos vários grupos funcionais, sendo por isso necessário recorrer a métodos estatísticos, efetuando uma calibração multivariada, que usa diversos comprimentos de onda para a determinação de uma propriedade [10].

A região NIR pode ser dividida em região I (800 - 1200 nm), a região II (1200-1800 nm) e a região III (1800-2500 nm). As fronteiras das três regiões não são rigorosas. A região I é particularmente original, sendo conhecida de diversas formas: "a região das ondas curtas NIR (SWNIR)", "região próxima do NIR (NNIR)", ou "região de Herschel". Esta é uma região em que são observadas bandas, devido a transições eletrónicas e devido a sobreposições e combinações de vibrações fundamentais. Todas as bandas que aparecem nesta região são muito fracas. Assim, a região I apresenta uma elevada transparência. Existem diversas aplicações biomédicas e aplicações para produtos agrícolas que foram construídas utilizando esta região. Tem ainda a vantagem de se poder utilizar um *charge-coupled device* (CCD) como detetor nesta região, o que faz com que os instrumentos utilizados na região I sejam muitas vezes diferentes daquelas que são utilizados nas outras duas regiões. Na região II, é possível observar bandas que surgem a partir das primeiras sobreposições de vibrações fundamentais de *OH*, *CH*, *NH* e vários tipos de combinações dessas vibrações fundamentais. A região III é uma região dominada pelas combinações de vibrações. A "permeabilidade" da região III é comparativamente mais pobre. Alguns estudos realizados, tais como as ligações no hidrogénio e as interações solvente-soluto utilizam principalmente estas as regiões II e III [9].

Outras ligações podem contribuir para o espectro NIR, entre elas as ligações *CC*, *CO*, *CN* e *PO*, embora o seu sinal seja fraco quando comparado com as ligações

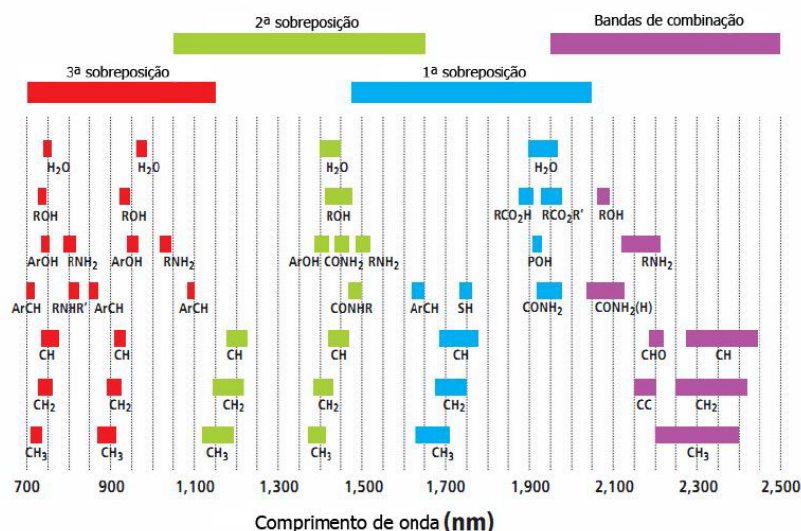


Figura 2.4.: Bandas de absorção que ocorrem na região do NIR e a respetiva localização das mesmas. Adaptado de [26].

com o átomo de hidrogénio e por isso a sua contribuição é muito pequena, não sendo significativa [24].

2.4. Vibração molecular

De forma a compreender a origem de um espectro NIR, e para ser capaz de o interpretar e ter uma ferramenta importante para orientar o desenvolvimento de métodos analíticos, deve-se estar familiarizado com os fundamentos da espectroscopia vibracional. O espectro de NIR tem origem a partir da energia da radiação transferida para energia mecânica que se associa ao movimento dos átomos, mantidos juntos pelas ligações químicas nas moléculas [6].

As vibrações moleculares podem ser classificadas em dois tipos, vibração de deformação axial (*stretching*) e vibração de deformação angular (*bending*). As deformações axiais são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos, e as deformações angulares envolvem mudanças dos ângulos entre o plano que contém a ligação e um plano de referência.

Alterações do momento dipolar podem originar transições entre os níveis vibracionais. O momento dipolar pode variar devido à variação da distribuição eletrónica

em redor das ligações, ou seja, quando é aplicado um campo elétrico com energia adequada. Sendo o momento dipolar determinado pela magnitude das diferenças de cargas e a distância entre dois centros de carga, este pode variar sendo para isso necessário que as moléculas diatómicas sejam heteronucleares, podendo dessa forma ser excitadas vibracionalmente [24].

No espectro NIR podem surgir frequências associadas às vibrações normais, sobreposições e combinações. As sobreposições são bandas correspondentes a múltiplos inteiros das vibrações normais, e as combinações são combinações lineares das frequências normais ou de múltiplos inteiros destas. Por exemplo $2\nu_a$ corresponderá a uma sobreposição e $(\nu_a + \nu_b)$, $(2\nu_a + \nu_b)$ corresponderá a uma combinação, sendo ν_a e ν_b frequências de modos normais de vibração [24].

À temperatura ambiente, a maioria das moléculas estão nos seus níveis fundamentais de energia vibracional. Os átomos ou grupos de átomos que participam em ligações químicas estão deslocados um em relação ao outro numa frequência que é definida pela força da ligação e a massa dos átomos individualmente ligados ou os seus grupos. As amplitudes dessas vibrações são de alguns nanómetros e irão aumentar se alguma energia for transferida para a molécula. Esta energia pode ser transferida por um fóton de um determinado comprimento de onda (λ), para o qual a energia (E_p) pode ser dada pela equação 2.6:

$$E_p = hv = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.6)$$

em que h é a constante de Planck, e c é a velocidade da luz no vazio [24].

Para explicar o comportamento vibracional das moléculas existem vários modelos, contudo em geral este comportamento é descrito pelo modelo do oscilador harmónico linear, podendo ser usado o método das perturbações para o corrigir. Este modelo é utilizado por ser o mais simples, e ter uma visão didática da interação da radiação com a matéria. Segundo o modelo do oscilador harmónico, a energia vibracional de um determinado sistema é uma função quadrática da distância entre os átomos e a oscilação entre eles é simétrica. O modelo retrata uma molécula diatómica com duas massas esféricas m_1 e m_2 considerando que a ligação entre os átomos é feita por uma mola, com uma constante de força k . Através da lei de Hooke pode afirmar-se que a energia E do sistema é dada pela equação 2.7 [24]:

$$E = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.7)$$

em que μ é a massa reduzida:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (2.8)$$

A vibração molecular pode ser descrita por um modelo simplificado admitindo um oscilador harmónico para o qual a energia potencial, V , é função do deslocamento dos átomos x , sendo r a distância internuclear e r_e a distância internuclear de equilíbrio, e é dada pela equação 2.9[6]:

$$V = \frac{1}{2}(r - r_e)^2 = kx^2 \quad (2.9)$$

A Figura 2.6 mostra o comportamento da energia potencial em função do deslocamento do átomo da posição de equilíbrio (o mínimo de energia). Esta primeira abordagem é útil para compreender o conceito de energia vibracional. No entanto, esta falha quando um sistema microscópico, como as moléculas, é considerado. O fracasso deve-se ao fato de sistemas moleculares não poderem assumir o perfil de energia contínua previsto pelo modelo clássico "bolas-mola". O sistema molecular apenas pode ter alguns níveis de energia discretos (E_v) definidos na mecânica quântica pela equação 2.10[6]:

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu \quad (2.10)$$

onde v é o número quântico vibracional, E_v é a energia associada ao nível quântico v e ν é a frequência vibracional fundamental. No modelo clássico desta frequência é definida por [6]:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.11)$$

Uma restrição adicional imposta pelo modelo harmónico / quântico é que as transições só podem ocorrer entre níveis adjacentes, $\Delta v = \pm 1$, dado que todos os níveis estão igualmente espaçados, e estas transições têm de respeitar os critérios de simetria. Além disso, para este modelo, a diferença de energia entre dois níveis adjacentes é sempre a mesma, tal como se pode ver pela Figura 2.6.

A energia da radiação eletromagnética que é absorvida, de forma a estimular a

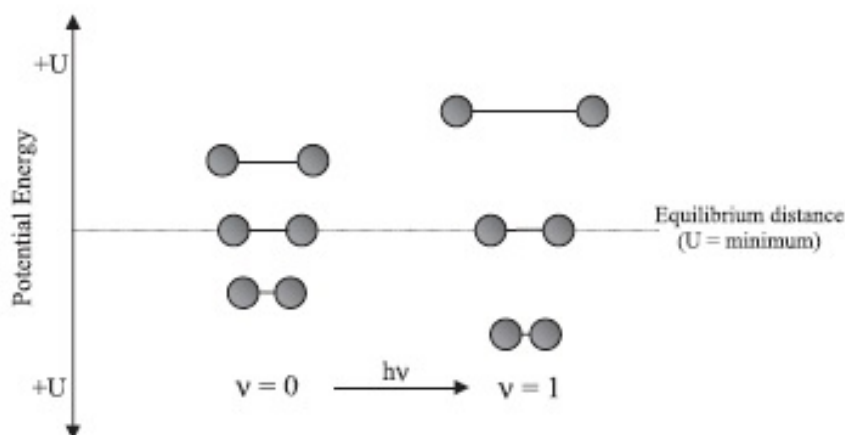


Figura 2.5.: Efeito da absorção de fótons sobre a energia potencial e a amplitude de vibração interatômica [6].

molécula para um nível excitado deve corresponder à diferença entre dois níveis energéticos adjacentes. Portanto, a energia dos fótons deve ser [6]:

$$\Delta E = E_{v2} - E_{v1} = \Delta v h \nu \quad (2.12)$$

Para o oscilador harmónico $\Delta v = 1$ e $E_p = h\nu$, que corresponde à diferença de energia prevista entre um estado de energia e outro imediatamente superior. A Figura 2.5 mostra o efeito da absorção de fótons sobre a energia e a amplitude de vibração.

Embora o modelo harmónico possa ajudar a compreender a espectroscopia vibracional, este possui algumas restrições decepcionantes para a espectroscopia NIR, pois não permite transições onde Δv é maior do que 1. Transições com $\Delta v = 2$ ou superior são proibidas pelo modelo harmónico / quântico e, desta forma, a maior parte dos fenómenos observados na região NIR, as bandas de sobreposição, não deveriam existir. Além disso, as vibrações no modelo harmónico são independentes, o que faz com que segundo as restrições impostas pelo modelo, as suas combinações não existiriam. No entanto, tanto as sobreposições como as combinações de bandas existem [6].

A Figura 2.6 B mostra um modelo mecânico mais realista para uma molécula diatómica. A molécula continua a ser comparada a duas esferas ligadas por uma mola. No

entanto, o modelo tem em consideração alguns comportamentos não-ideais do oscilador, tendo em conta a repulsão entre as nuvens eletrónicas para o caso de núcleos atómicos próximos (de salientar que a energia potencial aumenta mais rapidamente do que no modelo harmónico) e um comportamento variável da força de ligação quando os átomos se afastam um do outro. Na verdade, numa molécula real, o afastamento ("alongamento da mola") dos núcleos atómicos vai causar a rutura da ligação molecular com consequente dissociação dos átomos.

É assumida uma função complexa da energia potencial para descrever o último efeito, que pode ser aproximado pela utilização de termos de deslocamento de ordem superior, conforme ilustra a equação 2.13 [6]:

$$V = k_1x^2 + k_2x^3 + k_3x^4 + \dots \quad (2.13)$$

Uma função que aproxime o comportamento anarmónico de uma molécula diatómica é a função de Morse, que descreve a energia potencial da molécula, utilizando a equação 2.14:

$$V = D_e \left[1 - e^{-a(r-r_e)} \right]^2 \quad (2.14)$$

onde a é uma constante para uma dada molécula, D_e representa a energia de dissociação espectral, r_e é a distância de equilíbrio entre os átomos e o r é a distância entre os átomos, em qualquer instante.

Recorrendo à mecânica quântica para aplicar nos resultados da equação de Morse, os níveis vibracionais são descritos pela equação 2.15:

$$E = h\nu \left(v + \frac{1}{2} \right) - x_m h\nu \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (2.15)$$

em que x_m é a constante anarmónica de vibração, cujo valor varia entre 0,005 e 0,05.

O modelo anarmónico / quântico também impõe algumas restrições sobre os possíveis estados de energia das moléculas. No entanto, prevê a ocorrência de transições entre níveis não adjacentes, ou seja, com $\Delta v = 2$ ou superior, as chamadas sobreposições e transições que envolvam duas vibrações diferentes, ou seja combinações entre vibrações. Estes dois tipos de bandas são as bandas de absorção mais comuns na região espectral do infravermelho próximo. Este modelo prevê ainda que a separação entre os dois níveis de energia adjacentes diminui com v , o número quântico

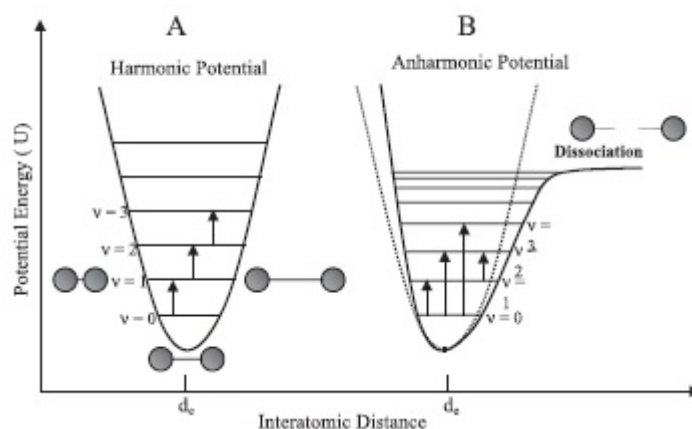


Figura 2.6.: Funções de potencial para o oscilador harmónico - A (lei de Hooke) e anarmónico - B (Lei de Morse) de uma molécula diatómica [6].

vibracional [24].

De acordo com os pressupostos do modelo anarmónico, as vibrações não são independentes umas das outras e podem interagir entre elas. Portanto, a energia vibracional total (E_v) contém termos cruzados referentes a mais do que uma vibração da molécula [6]:

$$E_v = \sum h\nu_r \left(v_r + \frac{1}{2} \right) + \sum \sum h x_{rs} \left(v_r + \frac{1}{2} \right) \left(v_s + \frac{1}{2} \right) + \dots \quad (2.16)$$

para $r \leq s$; em que ν_r e v_r são a frequência fundamental e o número quântico de modo vibracional r , respetivamente, e x_{rs} é a constante de anarmonicidade para a interação dos modos vibracionais r e s .

A anarmonicidade também pode estar presente nas propriedades elétricas de uma molécula. Especificamente, ela afeta o seu momento dipolar, que, num modelo anarmónico, não tem uma dependência linear com a distância interatômica. Este tipo de anarmonicidade pode proporcionar a obtenção de sobreposições e combinações de bandas, que ocorrem mesmo que não seja observado desvio mecânico do modelo harmónico, para um dado sistema [6].

Na Figura 2.6 encontra-se representada a variação da energia potencial para o modelo do oscilador harmónico e para o modelo do oscilador anarmónico, onde se evidencia que as distâncias entre os níveis vibracionais são diferentes em cada modelo,

isto é, no oscilador harmónico a distancia entre cada nível é sempre a mesma, e no modelo do oscilador anarmónico essa distância vai diminuindo. A figura demonstra, também, que para elevadas distâncias nucleares entre os dois átomos presentes na ligação o modelo do oscilador anarmónico prevê a dissociação enquanto o modelo do oscilador harmónico não tem este fator em conta, como anteriormente mencionado [24].

2.5. Quimiometria

A quimiometria pode ser definida como a "ciência que relaciona medidas de um sistema ou processo químico com o estado do sistema através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos" (definição segundo a *International Chemometrics Society*). O termo quimiometria foi utilizado pela primeira vez por químicos, nos anos setenta, intitulando desta forma, aquilo que mais tarde se viria a tornar numa área de estudo e aplicação de métodos matemáticos às ciências químicas[27].

O aparecimento da quimiometria deu um novo impulso à utilização da radiação NIR em aplicações quantitativas e qualitativas. Assim, esta técnica permite desenvolver modelos que estimem propriedades, por análise de outras propriedades [28]. As análises quantitativas realizadas em laboratório (determinação da quantidade de um determinado composto numa amostra) são na maioria dos casos dispendiosas em tempo e dinheiro, estando cada vez mais a ser substituídas por técnicas instrumentais, entre as quais surge a espectroscopia de infravermelho, que geram uma grande quantidade de sinais. Com a crescente sofisticação das técnicas instrumentais de análise química, impulsionada pelo aparecimento de microprocessadores e microcomputadores no laboratório, tornaram-se necessárias novas técnicas de tratamentos de dados mais complexas do ponto de vista matemático e estatístico, de forma a extrair eficientemente a informação que está presente nos espectros, permitindo assim relacionar os padrões espectrais obtidos com a variação das propriedades químicas e físicas das amostras analisadas.

A quimiometria é aplicada em diversas áreas, sendo uma das principais áreas de aplicação a espectroscopia NIR. O uso da quimiometria na espectroscopia NIR consiste, entre outras coisas na aplicação de algoritmos e técnicas quimiométricas no pré-processamento dos espectros, e no desenvolvimento de ferramentas de análise multivariada como por exemplo a análise dos componentes principais, a regressão por mínimos quadrados parciais, entre outros.

2.5.1. Pré-Processamento Espectral

Cada espectro NIR contém uma grande quantidade de informação tanto a nível químico como físico, e tal como já foi mencionado, são espectros complexos. A otimização da extração dessa informação requer a aplicação de técnicas de pré-processamento e de processamento espectral. Pode então definir-se o pré-processamento como sendo a aplicação de métodos corretivos de interferências passíveis de causar variação na aquisição dos espectros. Na maioria dos espectros é necessária a aplicação de pré-processamento de forma a diminuir o a influência de defeitos e de interferências [5]. Podem ocorrer distorções causadas por exemplo pela saturação do detetor ou falhas no varrimento dos comprimentos de onda. Outras fontes de perturbação podem acontecer devido a variações no percurso ótico, sendo que em sólidos podem também surgir efeitos relativos à dispersão de luz no caso de as amostras não estarem bem homogeneizadas, sendo este um fenómeno a ter em conta quando, por exemplo, se pretende avaliar a composição química de uma amostra. Nesses casos é necessário aplicar um método corretivo de forma a eliminar os efeitos dessa interferência física [5].

Na aquisição do espectro NIR, estes são normalmente acompanhados por uma percentagem de ruído (sobretudo eletrónico) que pode ser maior ou menor, dependendo entre outras coisas, do equipamento utilizado. No entanto, este problema pode ser atenuado através do aumento do número de varrimentos de comprimento de onda, embora isso vá aumentar o tempo de análise de cada amostra. Para além desta abordagem, o ruído presente nos espectros NIR pode ainda ser minimizado recorrendo a alguns métodos de pré-processamento. Outro dos fatores que causa interferências nos espectros é a variação nas condições ambientais e na corrente que atravessa o detetor. Essas variações podem levar ao aparecimento de alterações da linha de base dos espectros, sendo novamente necessário recorrer ao pré-processamento espectral para minimizar esta interferência nos espectros [5].

O pré-processamento dos espectros, na grande maioria das ocasiões, melhora os resultados, embora seja necessário compreender o tipo de processamento, e os efeitos que estes provocam, de forma a utiliza-lo da melhor forma possível. A aplicação destes pré-processamentos, tem de garantir no entanto, que da sua aplicação não resultará a perda de informação química e física que seja relevante para o objetivo do estudo.

Descrevem-se de seguida alguns dos pré-processamento que são normalmente utilizados na espectroscopia, mais em concreto na espectroscopia NIR.

2.5.1.1. Centralização da Média

A centralização da média (Mean Centering) é uma operação que se baseia na subtração da absorvância, de um dado comprimento de onda, pela média da absorvância do conjunto de todas as amostras, nesse mesmo comprimento de onda. O princípio descrito pode ser representado pela equação 2.17:

$$X_{MC} = X - I_M * X_M \quad (2.17)$$

da equação 2.17, X é a matriz com os dados dos espectros, X_{MC} são os dados resultantes da centralização da média, X_M é um vetor que contém os valores médios de cada coluna de X e por fim, I_M representa a matriz identidade com dimensão M , sendo M o número de colunas de X .

O objetivo da centralização da média é eliminar dos dados o valor da intensidade de cada variável, focando a nossa atenção apenas nas flutuações dos dados em torno do valor médio. Existem algumas aplicações onde a centralização da média não é aconselhável, pois pode ser vantajoso manter toda a informação dos dados durante a parte de modelação [29].

2.5.1.2. Auto-Normalização

Este método pode ser considerado a continuação do método anterior, isto porque este pré-processamento compreende a operação da remoção da média que se efetua na centralização da média, à qual se segue a divisão pelo desvio padrão das variáveis. Este pré-processamento pode ser descrito pela equação 2.18:

$$X_{as} = \frac{X - I_M * X_M}{S_M} \quad (2.18)$$

Na equação 2.18, X é a matriz com os dados dos espectros, X_{as} representa os dados auto-normalizados, S_M representa a matriz diagonal quadrada que contém os desvios padrão normalizados de cada variável (M é o número de colunas de X).

A auto-normalização, tal como a centralização da média, remove a informação da intensidade absoluta embora também remova a informação da variância total de cada uma das variáveis, colocando cada variável em igualdade de circunstâncias. Por norma, a auto-normalização é utilizada em casos em que os dados a analisar provêm de diferentes tipos de instrumentos ou quando as unidades de medida não são iguais para todas as variáveis. A auto-normalização pode também ser usada em casos em

que os dados provenham dos mesmos instrumentos de medida ou possuam unidades de medida semelhantes para todas as variáveis, embora seja um método a evitar, no caso da informação da variância total ser relevante para o estudo em questão[29].

2.5.1.3. Derivadas

A aplicação deste método consiste na realização da derivada de primeira ou segunda ordem do espectro original, concedendo assim uma maior ênfase aos picos do espectro, permitindo um aumento da sua resolução. Os métodos derivativos são também usados para remover as variações da linha de base entre os espectros das diferentes amostras. Assim, a primeira derivada usa-se na remoção dos efeitos aditivos de linha de base do espectro e é usada também para evidenciar as pequenas características presentes no espectro, de forma a facilitar a análise e avaliação destes pequenos pormenores. Relativamente à derivada de segunda ordem, os espectros podem ser estudados da mesma forma, havendo no entanto uma amplificação do ruído presente no espectro, o que pode mascarar algumas características importantes. Tendo em conta o problema do ruído, pode ser necessária a utilização de filtros que suavizem o ruído, antes da aplicação das derivadas, ou então restringir a aplicação das derivadas a regiões espectrais mais localizadas [30].

2.5.1.4. Correção Multiplicativa de Sinal

O método da correção multiplicativa de sinal (*Multiplicative Scatter Correction* - MSC), tem sido muito utilizado em leituras de reflectância difusa e em outras ocasiões em que ocorrem variações multiplicativas nos espectros obtidos. Em espectroscopia esses fenómenos podem ser causados pelas diferenças no percurso ótico das amostras estudadas, ou devido a processos de dispersão da luz, causados pela falta de homogeneidade da amostra.

As variações multiplicativas que aparecem em certos espectros não podem ser removidas por nenhum dos métodos de pré-processamento descritos atrás. Esta correção é feita de acordo com a equação 2.19.

$$X'_i = a + bX_i \quad (2.19)$$

Na equação 2.19, (X_i) representa cada espectro, onde i diz respeito à amostra, sendo esse espectro transformado de acordo com a equação. X'_i representa o espectro

transformado para a amostra i , e os coeficientes a e b são encontrados de forma a minimizar a diferença entre o espectro transformado e o espectro médio.

O espectro de referência é muitas vezes considerado como o espectro médio de um conjunto de amostras. Contudo, de forma a não remover informação química relevante é necessário selecionar as zonas espectrais cuja variação se deve apenas a efeitos instrumentais e fenómenos físicos. Apenas essa região deve ser utilizada para estimar os coeficientes a e b [30].

2.5.1.5. Variação do Padrão Normal

O método da Variação do Padrão Normal (*Standard Normal Variate Method* - SNV) é um dos algoritmos de normalização mais utilizado, sendo usado com o intuito de minimizar as interferências causadas pela diferenças de densidade das amostras e pelo tamanho das partículas.

À partida, existem dois tipos de informação que podem ser recolhidas de um espectro, que são a sua estrutura e amplitude, nos vários comprimentos de onda. No entanto após se efetuar a normalização dos espectros, a informação relativa à sua amplitude é perdida, restando apenas a informação que se poderá retirar da sua estrutura [30].

O método de pré-processamento SNV é muito semelhante ao método MSC. Este método tem como princípio um ajuste aditivo, através da subtração da média, e um ajuste multiplicativo, através da divisão pelo desvio padrão, para todos os pontos do espectro. Comparativamente ao método MSC, no método SNV a determinação dos ajustes é realizada de forma diferente, e apenas são utilizados dados de um só espectro, ao contrário do método MSC que utiliza dados de um conjunto de espectros.

Este modelo é caracterizado pela equação :

$$X'(i) = \frac{X(i) - m_i}{S_i} \quad (2.20)$$

O espectro transformado X'_i , de uma dada amostra i , é obtido pela equação 2.20, que caracteriza este modelo, na qual X_i representa um espectro de uma dada amostra i , m_i representa a média do espectro da amostra i , e S_i diz respeito ao desvio padrão para esse mesmo espectro. O modelo SNV embora melhore a precisão dos resultados, não simplifica o modelo matemático, e também não reduz as interferências sistemáticas [10].

2.5.1.6. Outros exemplos de Pré-Processamento

Existem no entanto uma grande quantidade de pré-processamento que podem ser utilizados. De seguida descrevem-se resumidamente alguns desses pré-processamentos que não sendo muito complexos, são utilizados em muitas ocasiões.

Deslocamento por subtração de uma constante Este pré-processamento é utilizado na correção de efeitos aditivos da linhas de base. Assim, os espectros são deslocados linearmente de forma a fazer corresponder o mínimo da absorvância a zero [30].

Subtração de uma linha reta Este pré-processamento tem como objetivo a eliminação do declive não nulo da linha de base. Este consiste na subtração de uma linha reta, ao espectro, numa região espectral previamente identificada [30].

Normalização Mínimo Máximo Este método de pré-processamento é muito semelhante, ao método SNV, descrito atrás. Este método consiste na deslocação linear dos espectro de forma a igualar a zero o menor valor de absorvância [30].

2.5.2. Métodos de Análise Multivariada

Em estudos de dados que sejam constituídos por centenas ou milhares de variáveis, embora se possa aplicar um estudo univariado (cada variável é estudada isoladamente e de forma descritiva), este constitui um processo moroso e pouco eficiente. Para se obter uma resposta satisfatória da análise de dados de tais dimensões é necessário recorrer a uma análise multivariada, utilizando algoritmos e noções de quimiometria.

Dentro da análise multivariada existem diversas técnicas, sendo apresentadas de seguida os princípios dos métodos da análise de componente principais, como método qualitativo e a regressão por mínimos quadrados parciais como método quantitativo.

2.5.2.1. Análise de Componentes Principais

A técnica de análise de componentes principais (PCA), foi inicialmente descrita por Karl Pearson em 1901, tendo posteriormente recebido contribuições matemáticas de Hotelling na década de 1930. No entanto, foi necessário esperar pelo aparecimento dos computadores para ser amplamente utilizada no domínio das ciências sociais, naturais e exatas, estabelecendo-se como uma peça base da análise multivariada

("data-mining"). Esta técnica baseia-se na sua capacidade de compressão de dados, reorganizando a informação obtida sem perda de informações relevantes [10].

A transformação é feita de modo a que o conjunto de dados possa ser representado por um número reduzido de novas variáveis chamadas de fatores ou componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais. Com esta análise, a representação de uma amostra com natureza multivariada pode ser visualizada em poucas dimensões. Assim, o primeiro componente principal é calculado por forma a reter a maior quantidade possível de variância, o segundo é calculado da mesma forma tendo sido retirada dos dados originais a variância já contabilizada pelo primeiro componente, e assim sucessivamente.

Depois de ser aplicado o modelo de análise das componente principais, estas novas variáveis são capazes de se correlacionar entre si, sendo combinações lineares das variáveis originais, sendo isso demonstrado na equação 2.21 [10].

$$t = x_1p_1 + x_2p_2 + \dots + x_ip_i \quad (2.21)$$

Geometricamente os componentes principais (t) podem ser vistos como projeções dos dados originais sobre eixos ortogonais (pesos, p) que cobrem o espaço das variáveis, x . Os componentes contêm informação sobre as diferenças que existem ao nível dos objetos (medidas ou observações experimentais).

Para uma análise PCA aplicada à espectroscopia, admitindo que se analisaram n amostras em m comprimentos de onda, estas informações podem ser organizadas na forma de uma matriz de absorvância X , com dimensões $n \times m$. Esta matriz é decomposta nas seguintes matrizes: (T), (P) e (E), de acordo com a seguinte equação:

$$X = T * P^t + E \quad (2.22)$$

O conteúdo da matriz (E) do modelo serão tanto menores quanto maior o número de componentes principais que se usam no modelo, pois, o aumento do número de componentes principais acarreta um aumento da quantidade de informação retida, diminuindo dessa forma a informação restante.

Podem representar-se graficamente os vetores T e P relativos a cada amostra, construindo um mapa de componentes principais, a duas ou três dimensões, isto se a variância for retida apenas nos primeiros componentes principais. Estes mapas permitem o agrupamento de amostras com características semelhantes [31].

Tendo em conta o que foi dito atrás, o método PCA, apresenta como principais

vantagens, a facilidade de extração de informação, a redução do número de variáveis, através de uma combinação linear das variáveis originais e a seleção da informação relevante, excluindo por exemplo variações associadas ao ruído.

2.5.2.2. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

A regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares* - PLS) foi proposta inicialmente por H. Wold. Para a aplicação do algoritmo PLS na espectroscopia são necessários dois conjunto de dados: um conjunto de dados provenientes dos espectros (matriz Y) e outro conjunto de dados independentes, constituído por propriedades químicas das amostras analisadas (matriz X). O objetivo da regressão PLS é estabelecer um modelo que permita a análise de amostras desconhecidas (através da correlação dos dois conjuntos de dados referidos atrás, determinando uma propriedade física ou química a partir da análise do espectro). Este é um modelo que determina correlações quantitativas, servindo por isso para a construção de reta de calibração multivariada. Embora este método seja parecido com o método PCA a forma como as novas variáveis são encontradas diferencia os dois métodos, isto porque no método PCA não se tem em conta os dados das concentrações [5].

Dependendo do objeto de estudo, do tipo de amostras e das quantificações que se pretende realizar, o número de amostras necessárias para o desenvolvimento do método PLS pode variar entre as 20 e as 200 amostras. Quanto maior for a complexidade da amostra, maior será o número de espectros necessário, para serem analisados de forma a validar o modelo [30].

O modelo assenta na definição de um conjunto de variáveis regressoras escolhidas de forma sequencial cujo objetivo é maximizar a covariância entre o conjuntos de dados das matrizes X e Y e que sejam independentes. Uma forma mais simplista de olhar o modelo, pode ser a regressão entre os componentes principais de ambos os conjuntos de dados. Para estimar os coeficientes do modelo PLS (pesos) é utilizado um método iterativo (NIPALS), sendo os componentes estimados de forma sequencial. O modelo PLS pode ser descrito por:

$$X = T * P^t + E_x \quad (2.23)$$

$$Y = U * Q^t + E_Y \quad (2.24)$$

A determinação dos coeficientes P e Q ocorre de forma a maximizar a correlação entre

os componentes T e U . As duas matrizes de componentes podem ser relacionadas por uma regressão linear. No método PLS é utilizado um processo iterativo para gerar a matriz de pesos. A matriz W contém a covariância entre os blocos X e Y para cada componente. Para estimar o vetor regressão para o modelo $PLS(S_{XX} = X^t X$ e $S_{XY} = X^t Y)$, pode utilizar-se a equação:[32]

$$b_{PLS} = W (W^t S_{XX} W)^{-1} W^t S_{XY} \quad (2.25)$$

Para obter estimativas da variável dependente é possível utilizar o vetor de regressão.

$$Y_{NOVO} = X * b_{PLS} \quad (2.26)$$

Ao incluir no modelo PLS a projeção de novos dados espectrais (X_{NOVO}) estes vão dar origem a novos componentes, resíduos e à correspondente previsão (Y_{NOVO}).

$$T_{NOVO} = X_{NOVO} * P \quad (2.27)$$

$$E_{NOVO} = Y_{NOVO} - X_{NOVO} * b_{PLS} \quad (2.28)$$

Apesar de apresentar um modelo matemático um pouco complexo, o método PLS consegue fornecer bons resultados, sendo por isso muito utilizado em análises quantitativas. O método PLS segue as etapas de calibração e validação interna que avalia o erro de previsão de amostras que pertencem ao conjunto de calibração. A etapa de validação é extremamente importante, pois os resultados dessa etapa indicarão se o modelo construído é adequado ou não para efetuar a determinação do parâmetro desejado.

3. Detecção ótica de lesões de cartilagem para artroscopia

Atualmente existe uma grande quantidade de técnicas que são utilizadas no diagnóstico de lesões articulares. Entre todas as técnicas utilizadas, a que é considerada a técnica padrão, é a artroscopia [33]. Na artroscopia a avaliação das lesões é muito subjetiva, pois depende exclusivamente da experiência do cirurgião. Para a realização do diagnóstico é visualizado o interior da articulação num monitor de televisão, sendo ainda possível efetuar um conjunto de testes à cartilagem, utilizando o gancho artroscópico [34]. A identificação das lesões de elevado grau apresenta normalmente bons resultados, existindo diversas técnicas que as conseguem identificar de forma bastante precisa. O mesmo já não acontece na identificação das lesões de baixo grau, pois existe uma grande dificuldade em fazer a distinção entre o tecido saudável e o tecido que possui lesões de baixo grau. Nenhuma das técnicas utilizadas para fazer o diagnóstico das lesões articulares consegue identificar com precisão as denominadas lesões de grau 1, segundo o sistema de classificação desenvolvido pela International Cartilage Repair Society (ICRS) [35].

Como a cartilagem possui uma baixa capacidade para se autorreparar são necessárias técnicas capazes de efetuar a deteção precoce das lesões no seu estado inicial, de forma a possibilitar o seu tratamento nos seus estágios iniciais [36].

Comparando a composição da cartilagem saudável e da cartilagem afetada com uma lesão de grau 1, verifica-se um aumento do conteúdo de água de 60-85 % para mais de 90 % [37]. Para além desta diferença, sabe-se que os tecidos que possuem lesões de baixo grau sofrem alterações complexas na composição da sua matriz, nomeadamente o colagénio, proteoglicanos e como já referido, a água [38]. Esse conjunto de alterações que ocorrem na composição da matriz vão alterar as propriedades biomecânicas da cartilagem, sendo possível correlacionar essas alterações com as propriedades óticas nas regiões VIS e NIR. Assim, a utilização da espectroscopia nas regiões VIS e NIR é uma técnica atrativa, que possui potencial para ser utilizada na diferenciação das lesões articulares, com especial interesse na diferenciação dos te-

cidos saudáveis e dos tecidos que possuem lesões de grau 1 [35].

A técnica da espectroscopia é constituída na maioria dos casos por sistemas óticos à base de fibras óticas, existindo a possibilidade de estas poderem ser integrada nos sistemas dos artroscópios, mesmo nos mais pequenos. A espectroscopia, ao ser incluída no procedimento de rotina de uma artroscopia não acarretaria nenhum risco para o paciente, levando apenas a um prolongamento, de baixa duração, do procedimento cirúrgico, com a possibilidade de analisar em tempo real, o que se poderá passar num futuro próximo [35].

O trabalho aqui apresentado descreve o estudo preliminar realizado para avaliação do potencial de aplicação da técnica de espectroscopia no estudo de lesões de cartilagem. O estudo foi direcionado para o desenvolvimento de uma solução complementar ao diagnóstico artroscópico atual, com especial atenção para a deteção de lesões de baixo grau.

3.1. Contexto histórico

Os primeiros instrumentos que permitiam a visualização do interior do corpo humano foram desenvolvidos durante o século XIX, por pessoas da área da medicina. Estes instrumentos, inicialmente designados por cistoscópios, utilizavam dois tubos que eram iluminados, por velas ou líquidos incandescentes. Esses compostos ao serem incendiados produziam uma luz que seria refletida por um sistema de espelhos de um dos tubos para o interior do organismo, proporcionando a sua visualização através do outro tubo. Com a descoberta da lâmpada feita por Edison em 1879, esses cistoscópios tornaram-se mais seguros [39].

Foi já durante o século XX que se registou a utilização de um cistoscópio para observar o interior do joelho, sendo o procedimento denominado de “Artroscopia”. Durante as primeiras décadas do século XX, o Professor Japonês, Kenji Takagi tentava desenvolver um artroscópio, com dimensões adequadas para permitir a visualização do interior do joelho, sendo apresentado em 1931 o artroscópio N°1, Figura 3.1 (a), instrumento de 3,5 mm de diâmetro que viria a tornar-se o modelo para os artroscópios atuais [39]. Ainda na primeira metade do século XX, um discípulo de Takagi, Masaki Watanabe desenvolveu instrumentos endoscópicos sofisticados, recorrendo ao uso da eletrónica e da ótica. O artroscópio N°21, Figura 3.1 (b), desenvolvido por Watanabe já em 1959, em termos qualitativos era superior a todos os existentes à data, vindo a tornar-se um modelo para produção. No entanto, apesar das melhorias significativas

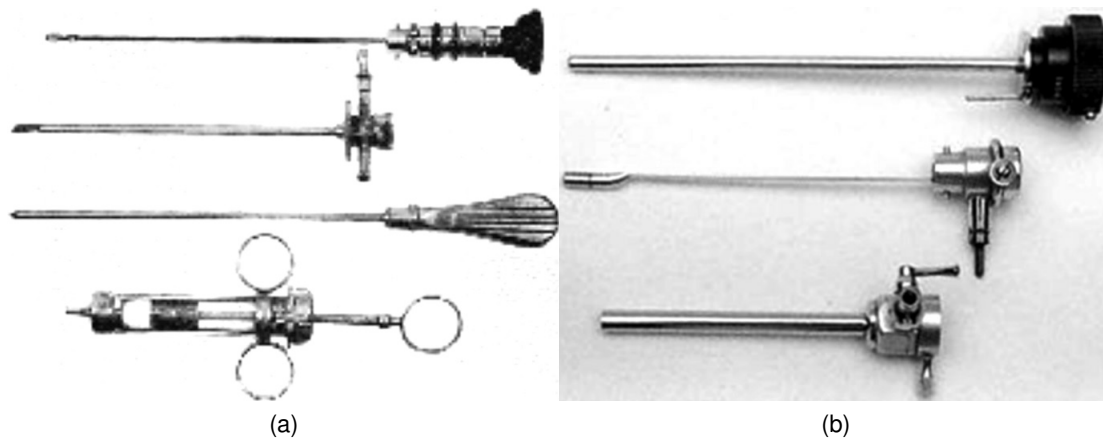


Figura 3.1.: Alguns dos artroscópios inicialmente desenvolvidos. Em (a) está representado o artroscópio N °1 desenvolvido por Kenji Takagi; e em (b) está representado o artroscópio N °21 desenvolvido por Masaki Watanabe [39].

deste artroscópio, continuava a apresentar algumas desvantagens, como por exemplo, a destruição ocasional da lâmpada que poderia levar à contaminação do joelho. Esse problema foi ultrapassado nos anos 70, com o aparecimento da fibra ótica, tornando assim a artroscopia num procedimento mais seguro e confiável [39].

Com o evoluir dos artroscópios, verificou-se uma transição de uma simples ferramenta de diagnóstico para uma modalidade terapêutica, solidificando-se a artroscopia como um tratamento cirúrgico de patologias articulares [39].

Em 1974 foi fundada a Associação Internacional da Artroscopia.

O crescimento da cirurgia artroscópica nos anos 70, está fortemente associado ao desenvolvimento da fibra ótica e à utilização da tecnologia de televisão. As melhorias na visualização, graças ao uso dos cabos de fibra ótica, e o monitor de televisão, permitiu que a imagem do interior do joelho pudesse ser visualizada num ecrã, ao invés da visualização direta com o olho no artroscópio. Com o evoluir da tecnologia, as condições de tratamento foram-se alargando, de tal forma que hoje em dia praticamente todas as articulações do corpo humano podem ser acedidas por via artroscópica [39].

Os anos 80 e 90 anunciavam avanços nos procedimentos e instrumentação artroscópica que permitiam aos ortopedistas tratar doenças e lesões com incisões minimamente invasivas. As principais vantagens seriam a diminuição das complicações, do tempo de recuperação e dos custos médicos no tratamento de pacientes com lesões

músculo-esqueléticas. Desta forma, a cirurgia artroscópica evoluiu para uma importante modalidade terapêutica, ao invés da exclusiva ferramenta de diagnóstico [39].

3.2. Artroscopia nos dias de hoje

O progresso na artroscopia, especialmente na cirurgia artroscópica, tem sido especialmente rápido durante as últimas décadas. O artroscópio mudou drasticamente a abordagem do cirurgião ortopédico no diagnóstico e tratamento de uma grande variedade de doenças articulares. Um alto grau de precisão clínica, combinado com o facto de ser uma técnica pouco invasiva quando comparada com a cirurgia, tem incentivado o uso da artroscopia para auxiliar no diagnóstico e muitas vezes para efetuar o tratamento [40].

Atualmente, existem diversas empresas que fabricam artroscópios, com características variáveis. Os artroscópios são caracterizados pelo seu diâmetro e por duas características óticas principais, que são a direção de visão e o campo de visão [41]. Quanto ao diâmetro físico do artroscópio, hoje em dia são utilizados aparelhos com diâmetros que variam entre os 1,9 e os 4,3 mm. A direção de visão, diz respeito ao ângulo entre o eixo do artroscópio e uma linha perpendicular à superfície das lentes. Existem artroscópios com ângulos de visão que vão desde os 0° até aos 120° , sendo os ângulos mais utilizados os de 25° e 30° . Já os ângulos entre 70° e 90° são úteis para visualizar zonas em torno de cantos, como por exemplo o compartimento posterior do joelho. A utilização destes ângulos de visão mais elevados têm a desvantagem de tornar a orientação do observador bastante difícil [40]. Quanto ao campo de visão dos artroscópios, corresponde simplesmente ao ângulo, que para uma determinada distância pode receber luz do objeto observado. Os valores do campo de visão podem variar entre 65° e 105° [41].

Existem ainda um conjunto de ferramentas utilizadas durante a artroscopia, como por exemplo o gancho artroscópico, instrumentos monitorizados de corte, tesouras, *shavers*, cauterios, instrumentos especiais para suturar, entre outros. O gancho artroscópico permite efetuar a palpação da cartilagem de forma a fazer uma avaliação da sua integridade, enquanto as outras ferramentas permitem agir mecanicamente no interior da articulação, de forma a tentar corrigir possíveis lesões [42].

Atualmente a cirurgia artroscópica do joelho é uma intervenção que pode demorar entre 30 minutos e duas horas, dependendo da complexidade da mesma. O procedimento da intervenção consiste em: [43]

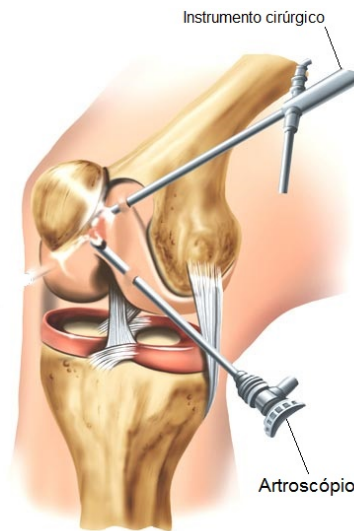


Figura 3.2.: Figura que ilustra a disposição do artroscópio e do instrumento cirúrgico durante uma artroscopia. Adaptado de [44].

- é feita uma pequena incisão acima do joelho, na qual é introduzida uma ferramenta que permite introduzir uma solução estéril, utilizada para melhorar a visualização da articulação do joelho. Essa solução permite expandir a articulação, enxaguando o sangue e a gordura;
- é feita uma segunda incisão, normalmente abaixo ou de um dos lados do joelho, para a introdução do artroscópio. Os artroscópios utilizados atualmente consistem num tubo de diâmetro reduzido baseado na tecnologia de fibra ótica, que possui um sistema de lentes ao qual é possível acoplar uma câmara, e uma fonte de luz. A luz é transmitida através de fibra ótica desde a fonte de luz até ao artroscópio e a imagem é guiada desde a câmara acoplada ao artroscópio até um ecrã de televisão onde aparece ampliada;
- é feita uma terceira incisão que serve para a introdução de outros instrumentos. Esses instrumentos introduzidos através desta incisão permitem a realização de tratamento cirúrgico, como por exemplo remover pedaços de cartilagem ou osso, fazer uma biópsia do tecido ou realizar pequenas cirurgias. A Figura 3.2 ilustra a disposição do artroscópio e do instrumento cirúrgico durante a artroscopia;
- os instrumentos são removidos, e a solução estéril lavada.

Para a realização de uma intervenção artroscópica são necessários um conjunto de

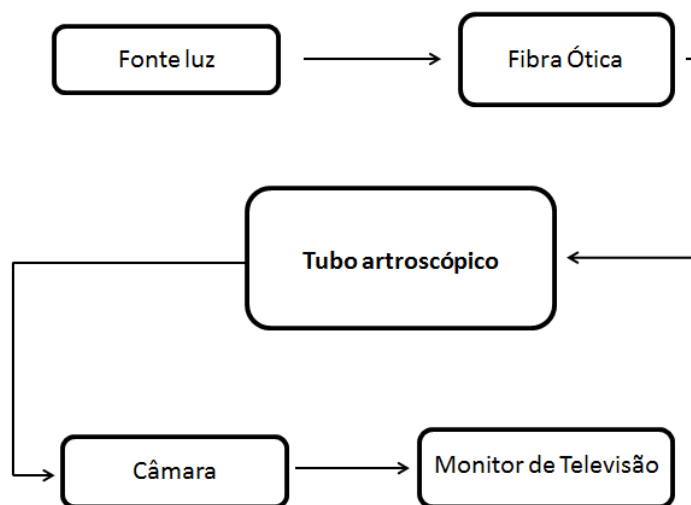
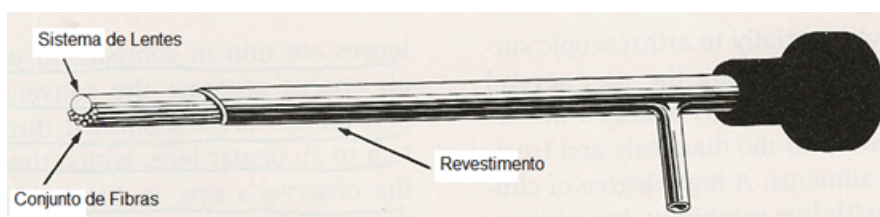


Figura 3.3.: Diagrama de blocos dos vários constituintes utilizados nas artroscopias.

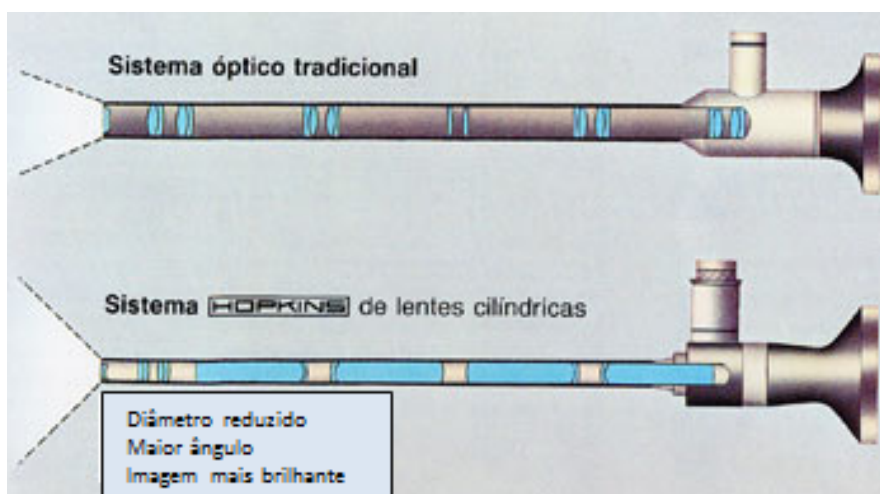
componentes, que se organizam entre si, de acordo com o diagrama de blocos representado na Figura 3.3.

Atualmente trabalha-se com luz branca fria e filtrada, descartando as frequências do infravermelho e do ultra-violeta que não trazem vantagens na produção de imagens. As fontes de luz que produzem uma maior luminosidade são as fontes de Xenon. No entanto as fontes que normalmente são utilizadas são as fontes de Halogéneo com potências que variam entre os 150 e os 500 W, sendo o feixe de luz alaranjado. A ligação entre a fonte de luz e o tubo artroscópico é feita normalmente através de cabos de fibra ótica que possuem dois adaptadores de forma a serem acoplados à fonte e ao tubo artroscópico. Quanto ao tubo artroscópico, este é composto por um revestimento resistente que lhe permite ser esterilizado sem se danificar, um sistema de lentes no seu interior, e um conjunto de fibras que conduzem a luz para o interior da articulação, como é possível observar na Figura 3.4 (a). O sistema de lentes que se usa atualmente, Figura 3.4 (b), tornou possível desenvolver artroscópios de diâmetros ainda mais reduzidos, sendo obtido um maior ângulo de visão e as imagens observadas do interior da articulação são mais brilhantes. Atualmente a configuração ótica dos vários artroscópios existentes é idêntica, variando apenas o ângulo de visão e o campo de visão, tal como já foi referido. No que diz respeito à câmara, esta é acoplada diretamente no artroscópio, utilizando o sistema de lentes do tubo artroscópico para observar o interior da articulação. Atualmente são utilizadas câmaras de alta

resolução (resolução horizontal de mais de 700 linhas), com um sistema de imagem baseado em uma ou mais CCD's. As imagens recolhidas são transmitidas para um monitor de televisão. A qualidade do monitor influencia a qualidade da imagem observada e por consequência a qualidade do diagnóstico, por isso este é um pormenor que deve ser tido em conta. Deve escolher-se um monitor com um tamanho e resolução adequados, de acordo com as características da câmara que está a ser utilizada [43].



(a)



(b)

Figura 3.4.: Constituição do tubo artroscópico: (a) disposição das fibras de iluminação e do sistema de lentes; (b) sistema de lentes que era utilizado antigamente e o sistema de lentes cilíndricas que é utilizado atualmente. (Adaptado de [40]).

A artroscopia apresenta diversas vantagens, quando comparada com a cirurgia aberta, nomeadamente a diminuição de possíveis complicações, possibilitar uma recuperação bastante mais rápida aos pacientes sujeitos à artroscopia e em termos de custos, é mais rentável do que a cirurgia aberta. No entanto, e apesar da constante evolução das ferramentas e dos procedimentos artroscópicos, a técnica continua a ter

algumas limitações. Durante as artroscopias a avaliação das lesões depende exclusivamente da experiência do cirurgião. Embora o diagnóstico de lesões de elevado grau apresente normalmente bons resultados, sendo este tipo de lesões relativamente óbvias, mesmo para cirurgiões sem muita experiência, o mesmo já não acontece para o diagnóstico de lesões de baixo grau. A avaliação clínica das lesões de baixo grau da cartilagem é muito difícil, sendo particularmente difícil a distinção entre as lesões no seu estado inicial e o tecido saudável. A dor, restrição de movimentos, efusão ou crepitação da articulação são sintomas pouco específicos, podendo ocorrer também em outras doenças articulares [35]. Na deteção das lesões de baixo grau durante a artroscopia, realizam-se um conjunto de testes com o gancho artroscópico, entre os quais a palpação e a verificação da resistência mecânica dos tecidos. Os resultados desta palpação são no entanto muito subjetivos, pois dependem, entre outras coisas, da força e direção aplicadas pelo cirurgião durante os testes [45]. Assim, algumas das principais limitações da artroscopia são a subjetividade dos diagnósticos e a dificuldade de identificação dos tecidos que possuem lesões de baixo grau.

3.3. Anatomia do joelho

O joelho é essencialmente constituído por quatro ossos: o fémur, ou osso da coxa, é o osso que liga a anca ao joelho; a tíbia, ou osso da canela, liga o joelho ao tornozelo; o perónio é um osso mais curto e mais fino que a tíbia, sendo-lhe paralelo no seu exterior; a patela (rótula do joelho) é um pequeno osso, que quando o joelho se dobra, fica localizado à sua frente. O joelho é assim uma articulação conjunta, com uma estrutura altamente móvel e complexa. É considerado uma articulação sinovial, o que significa que é revestido por uma membrana sinovial que produz um líquido com o intuito de lubrificar e nutrir o interior da articulação [46].

As superfícies lisas na extremidade do fémur e da tíbia são denominadas de cartilagem articular. Esta cartilagem tem um papel importante no funcionamento da articulação, proporcionando estabilidade e permitindo o seu correto funcionamento [46].

Existem dois côndilos femorais que cobrem a extremidade arredondada do fémur, como se pode ver na figura 3.5 (a). A sua superfície articular proporciona um deslizamento suave e lubrificado, com um coeficiente de atrito muito baixo, de forma a que o fémur se possa mover facilmente sobre o menisco tibial [47]. Relativamente ao menisco, ilustrado na figura 3.5 (b), as suas porções medial e lateral são constituídos por finas camadas de fibrocartilagem em forma de C, que cobrem a superfície tibial de

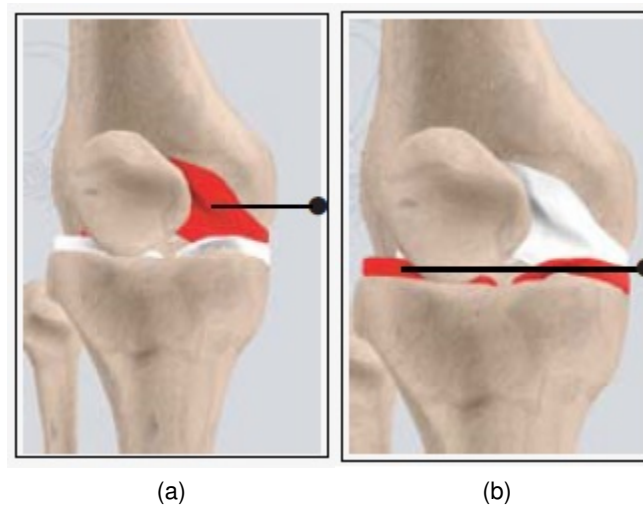


Figura 3.5.: Superfícies superior e inferior da cavidade do joelho, nomeadamente o côndilo femoral (a) e o menisco (b) [46].

forma incompleta, onde esta se articula com o fémur. A maior parte do menisco não é irrigado pelo sangue, e, por essa razão, quando danificado, é incapaz de desencadear um processo de regeneração, como normalmente ocorre nos outros tecidos do corpo. Para além disso, o menisco deteriora-se com a idade, acontecendo frequentemente o desenvolvimento de rasgos degenerativos. Quando o menisco está danificado, existem pedaços rasgados de tecido que se movimentam de forma anormal no interior da articulação [46].

O ligamento cruzado anterior (LCA) (Figura 3.6 (a)), é o principal ligamento estabilizador do joelho. O LCA localiza-se no centro da articulação do joelho, sendo a sua origem no fémur e terminando na tíbia, atravessando desta forma o centro do joelho. O LCA impede o fémur de deslizar para trás sobre a tíbia (ou a tíbia de deslizar para a frente sobre o fémur). Juntamente com o ligamento cruzado posterior (LCP), Figura 3.6 (b), o LCA estabiliza o joelho de uma forma rotativa. Assim, no caso de um desses ligamentos estar significativamente danificado, o joelho tornar-se-á instável, causando-lhe uma curvatura e correndo o risco de ceder. Relativamente ao LCP, pelo facto de as lesões deste ligamento não ocorrerem com tanta frequência, a pesquisa efetuada até agora é muito menor. No entanto, sabe-se que o LCP tem como principal função impedir que o fémur se mova no sentido anterior, sobre a tíbia, sendo portanto um ligamento que serve de estabilizador básico do joelho, tendo este uma resistência quase duas vezes superior ao LCA. Ele fornece ainda um eixo central sobre o qual

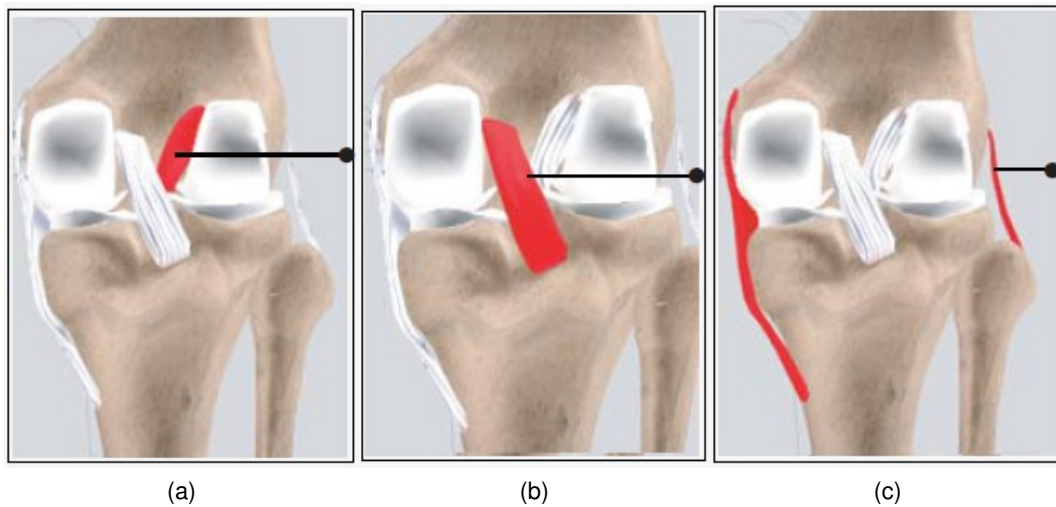


Figura 3.6.: Ligamento Cruzado Anterior (LCA) (a), Ligamento Cruzado Posterior (LCP) (b), e Ligamentos Colaterais (c) [46].

o joelho pode girar. Existem ainda os Ligamentos colaterais, Figura 3.6 (c), que têm como principal função evitar a adução e a abdução, e ainda uma extensão excessiva [46].

3.3.1. Cartilagem articular

A cartilagem articular é constituída por diversas substâncias, contribuindo cada uma delas para a sua integridade global, durabilidade, deformabilidade e capacidade de se reparar a si própria [48]. O principal constituinte da cartilagem é a matriz de colagénio que é rodeado por proteínas e proteoglicanos carregados negativamente. O colagénio existente na cartilagem tem como função ajudar a resistir às forças extrínsecas durante as cargas [48].

A cartilagem encontra-se estruturalmente organizada em camadas, que podem ser divididas em quatro zonas: a zona superficial, a zona central (de transição), a zona profunda e uma zona de cartilagem calcificada. A zona superficial corresponde à superfície da articulação que proporciona um deslizamento suave, tendo no entanto uma resistência enorme. Esta zona possui o maior teor de colagénio de todas as camadas, encontrando-se as fibrilas de colagénio com um alinhamento altamente ordenado (paralelo à superfície articular) e com uma elevada densidade. A zona superficial é ainda caracterizada pelo baixo módulo de compressibilidade, podendo deformar-se aproxi-

madamente 25 vezes mais do que a zona intermédia. A zona central possui o módulo de compressibilidade mais elevado do que a zona superficial e uma menor organização das fibras de colagénio. A zona profunda é constituída por camadas de fibrilas de colagénio com elevados diâmetros, que são perpendiculares à superfície articular. Esta camada tem o maior módulo de compressibilidade. A cartilagem calcificada está apoiada diretamente sobre o osso subcondral [49]. A cartilagem normal de um adulto é composta por 75 por cento de água e 25 por cento de sólidos. Os sólidos correspondem ao colagénio e ao proteoglicano [48].

3.4. Patologias mais comuns

As descobertas mais comuns no decorrer da artroscopia de joelho são defeitos e lesões da cartilagem. Estas lesões, resultam na maioria dos casos da degeneração que existe dentro da articulação, ocorrendo normalmente na fase inicial da osteoartrite (OA). A OA é uma doença músculo esquelética de desativação progressiva, que é caracterizada pela degradação da cartilagem articular [50, 51]. Com o aumento da idade dos pacientes a incidência de lesões da cartilagem articular aumenta [52]. Devido ao aumento da idade e da maturidade esquelética, as camadas basais da cartilagem articular vão-se calcificando, desenvolvendo a denominada marca ondulada. Esta mesma marca ondulada proporciona um plano de maior fraqueza, através do qual podem ocorrer fraturas. Lesões condrais de toda a espessura são mais frequentes em pacientes na faixa etária dos 30 anos. Para idades superiores, o plano de maior fraqueza vai mover-se para zonas da cartilagem mais distantes do osso subcondral, passando a localizar-se assim na cartilagem mais superficial, o que leva a um aumento da incidência de lesões condrais de espessura parcial [52].

Num estudo conduzido nos EUA, entre 1991 e 1995, Walton et al. [53] encontraram uma prevalência de lesões condrais, 31.516 (correspondente a 63%), num total de 19.827 artroscopias de joelho. Foram encontradas no total 53.569 lesões da cartilagem articular durante essas 19.827 artroscopias, uma média de 2,7 lesões por joelho. A média de idade do paciente com lesões foi de 43 anos. As lesões encontradas consistiam em OA dissecante (0,7%), fraturas articulares (1,3%), lesões de grau I (9,7%), lesões de grau II (28,1%), lesões de grau III (41,0%), e lesões grau IV (19,2%). As localizações mais comuns dessas lesões de grau III foram a patela e o côndilo medial do fémur. O côndilo medial do fémur foi o local mais comum para lesões únicas de grau IV. A patela e côndilo lateral do fémur foram os dois locais onde se encontraram

um maior número de lesões. A classificação das lesões era feita de acordo com os sistema de classificação descritos na Secção 3.4.1.

3.4.1. Classificação das lesões

Existem diversos sistemas de classificação das lesões da cartilagem articular, que naturalmente apresentam diferenças entre si, possuindo limitações e deficiências que suscitam diferentes interpretações. Os aspetos fundamentais a ter em conta na classificação das lesões são a aparência da superfície da cartilagem, a localização da lesão, e a profundidade da mesma [54].

Existem alguns sistemas de classificação que foram deixando de ser utilizados pois tinham muitas limitações e em alguns dos casos pressupunham o uso de avaliações quantitativas, que podem ou não ser aplicadas da mesma forma pelos diferentes observadores. De entre esses sistemas de classificação destacam-se o sistema de Bentley, o de Ficat e Hangerford, o de Casscells e o de Insall [54]. Outro sistema de classificação importante é o de Outerbridge. Este sistema foi readaptado ao longo dos anos, de forma a ser utilizado na classificação de lesões condrais [55]. A sua precisão e reprodutibilidade de classificação foi abordada por Cameron et al. [56], quando estes testaram a sua fiabilidade e reprodutibilidade para diversos observadores. Foram comparadas as classificações efetuadas utilizando este sistema, com as classificações obtidas à posteriori através da abertura de articulações de seis cadáveres. A taxa de precisão de classificação variou entre os 22 e 100 por cento, com menor precisão no diagnóstico das lesões de grau inferior, e boa precisão na identificação das lesões de graus mais elevados [56].

Existe ainda outro sistema de classificação, desenvolvido pela ICRS, onde a classificação das lesões da cartilagem é definida como um defeito superficial, com uma espessura parcial ou total [33]. O sistema de classificação ICRS diferencia os diversos graus das lesões através da análise da profundidade da lesão - classificadas de 0 a 4, e da área danificada - classificada desde normal a alteração severa. Neste sistema, a cartilagem que tem um aspeto macroscópico normal, sem defeitos visíveis, é classificada como ICRS 0. Se a cartilagem tem uma superfície intacta, mas apresenta fibrilação e/ ou uma leve perda de rigidez, então será classificada como ICRS 1A, e se adicionalmente existirem lacerações superficiais e fissuras, nesse caso será classificada como ICRS 1B - quase normal [43]. As lesões são mais extensas em profundidade, mas no entanto envolvem menos do que 50 por cento da espessura da

cartilagem são classificados como ICRS 2 - anormal. As lesões que pelo contrário, se estendem em mais do que 50 por cento da espessura da cartilagem são classificadas como ICRS 3 - severamente anormal. No entanto, existem quatro sub-grupos neste grau: 3A, 3B, 3C e 3D, dependendo se a lesão envolve ou não a camada de cartilagem calcificada. O traumatismo de uma articulação pode criar defeitos na sua cartilagem, que caso não sejam tratados podem estender-se ao osso subcondral. Estas lesões osteocondrais que se estendem a toda a espessura da cartilagem são classificadas como ICRS 4 - severamente anormal. [43]. Excluídos desta categoria estão os defeitos que são classificados como osteocondrite dissecante, que possuem um sistema de classificação próprio [33].

Na Figura 3.7 estão representados todos os graus de lesões, e respetivos sub-grupos, que são definidos pelo sistema de classificação ICRS. De entre todos os sistemas de classificação, o que é mais utilizado atualmente é o desenvolvido pela ICRS, pois é aquele que apresenta menos limitações e foi desenvolvido para ir de encontro às necessidades dos cirurgiões artroscópicos [13].

3.4.2. Técnicas de deteção das lesões intra-articulares e desafios atuais

Nas fases iniciais das lesões verifica-se um aumento do conteúdo considerado normal de água, de 60-85% para mais de 90% [37]. Na composição da cartilagem articular o conteúdo em água não é constante, variando com a profundidade sendo superior à superfície e menor em zonas de maior profundidade [58]. As funções primárias da água na cartilagem são a absorção de choques durante cargas, o transporte de nutrientes e a lubrificação [59]. A água existente no interior da cartilagem pode ser agrupada em três conjuntos distintos: a água denominada livre, a água que forma ligações de hidrogénio com a superfície do colagénio, ficando presa entre as suas fibras (fortemente ligada) e, por último, a água que forma ligações de hidrogénio com proteoglicano aniónico (fracamente ligada) [60, 61]. Pensa-se que o aumento de água que ocorre nas fases iniciais das lesões seja devido à desnaturação da rede de colagénio, o que conduz à diminuição do conteúdo de proteoglicanos [62, 63] e por sua vez vai criar um aumento de água na matriz do tecido. Como a cartilagem tem uma baixa capacidade de se autorreparar, fruto da baixa taxa de renovação celular e do facto de ser tecido não vascularizado, são requeridos métodos de deteção precoce da degeneração da cartilagem de forma a evitar o agravar das lesões [36]. Essa deteção precoce é de elevada importância pois possibilitaria um tratamento por intervenção

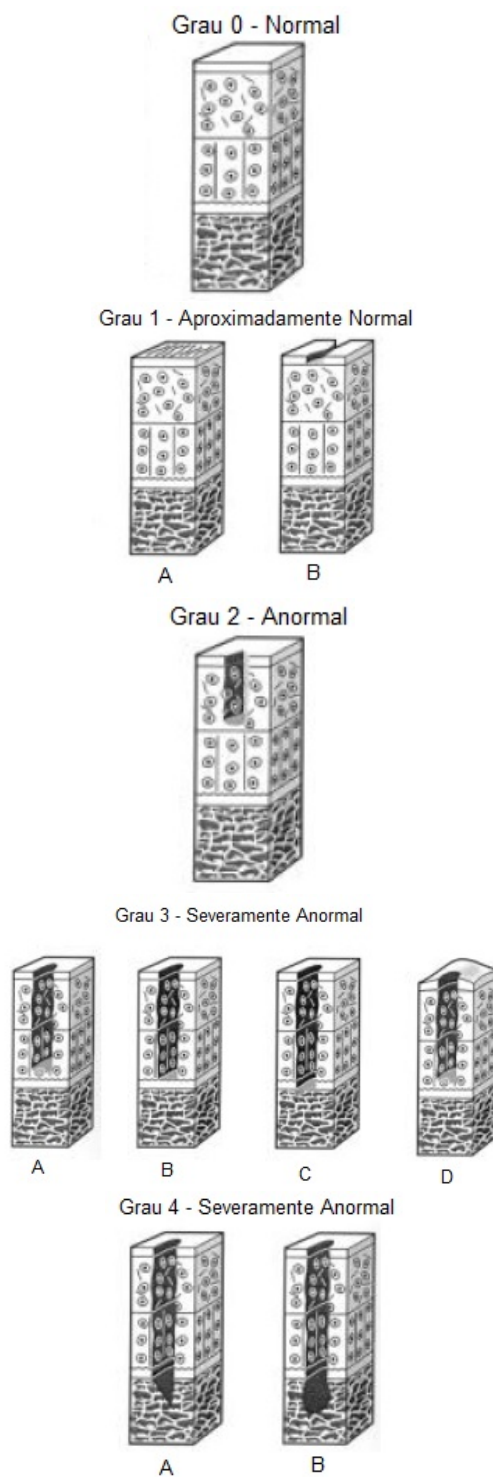


Figura 3.7.: Sistema de Classificação ICRS [57].

médica ou cirúrgica, na altura em que é provável que essa intervenção tenha maior benefício. Recentemente foram desenvolvidos vários estudos que investigam novos métodos para melhorar a deteção de lesões no seu estado inicial, baseados nas alterações do conteúdo de água, das características da matriz e ainda das propriedades mecânicas da cartilagem [64].

Existem diversas técnicas que são utilizadas para o diagnóstico destas lesões articulares. Entre todas as técnicas utilizadas, a que é considerada a técnica padrão, é a artroscopia [33], ainda que, como já foi referido, a artroscopia não seja muito precisa na identificação de lesões no seu estado inicial [45].

A radiografia convencional e a Tomografia Computarizada (CT) também são utilizadas na avaliação das lesões articulares. O exame radiológico de uma articulação recorrendo à radiografia e ou à CT continua a fazer parte de um procedimento de avaliação que se encontra padronizado [35]. Ambas as técnicas possuem resoluções axiais que excedem os 500 μm , o que é insuficiente para a deteção da maior parte das alterações da microestrutura e não é capaz de retratar a cartilagem articular. Assim, recorrendo a estas técnicas, é impossível identificar ou visualizar lesões de baixo grau [65].

A Imagiologia por Ressonância Magnética (MRI), é um dos mais importantes métodos de diagnóstico de lesões na cartilagem, tendo a vantagem de ser não invasiva. Vários estudos demonstraram a alta viabilidade da MRI enquanto técnica de avaliação das lesões condrais do joelho [66, 67]. Esta é uma técnica muito utilizada no diagnóstico de patologias intra-articulares, tais como lesões dos ligamentos ou do menisco, possuindo resoluções superiores a 100 μm . Com o recurso a sequências de impulsos apropriadas, é possível quantificar o volume e a espessura da cartilagem de forma não invasiva, com elevada precisão [68, 69]. No entanto, esta técnica também é relativamente imprecisa na distinção entre lesões de baixo grau e cartilagem intacta [67, 70].

Há alguns anos atrás, outra aplicação de diagnóstico ótico infravermelho (IR) foi introduzido com o intuito de avaliar a microestrutura da cartilagem articular osteoartrítica. A tomografia de coerência ótica (OCT) é uma tecnologia de imagem de alta resolução, na escala micrométrica, em que é medido um sinal interferométrico que é refletido [71]. A resolução microestrutural varia entre 4 e 30 μm e a penetração à qual se conseguem recolher imagens está limitada a aproximadamente 4 mm. A OCT tem capacidade para encontrar defeitos na microestrutura da cartilagem, como a fibrilação, a fibrose e anormalidades na placa óssea subcondral e, portanto, pensou-se que esta

poderia ser uma tecnologia promissora para o diagnóstico precoce de lesões na cartilagem [72]. No entanto, até agora apenas foram realizados estudos *in vitro* ou estudos com grupos de pacientes relativamente pequenos e inconsistentes [73, 74].

Relativamente à espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS), esta é outra das técnicas utilizadas, sendo uma alternativa atrativa, na diferenciação das lesões da cartilagem [64]. O diagnóstico de lesões articulares através da utilização da espectroscopia da região do visível e do infravermelho próximo foi utilizado pela primeira vez por Shaw et al. [75]. Sabe-se que durante a fase inicial da degeneração de cartilagem, esta sofre alterações complexas na composição da sua matriz (água, colagénio e proteoglicanos) [38]. A cartilagem com uma lesão ICRS de grau 1 mostra possuir uma rigidez mecânica significativamente menor e uma maior deformação plástica do que uma lesão ICRS de grau 0 [76], e, outro pormenor muito interessante, estas alterações complexas que ocorrem dentro da composição da matriz e que consequentemente alteram as propriedades biomecânicas do material estão correlacionadas com as suas propriedades óticas na região do visível e do infravermelho próximo. Realizando a espectroscopia VIS e NIR, os resultados obtidos estão significativamente correlacionados com a perda de dureza mecânica e aumento do conteúdo de água [35]. Assim, a espectroscopia que utiliza estas regiões do espectro eletromagnético, pode, num futuro próximo, vir a desempenhar um papel de elevado relevo no diagnóstico e acompanhamento da evolução das lesões, avaliando o sucesso da reparação e/ ou regeneração da cartilagem, utilizando diferentes abordagens terapêuticas [35]. Um dos grandes desafios é encontrar o comprimento de onda específico, que permita estabelecer uma melhor correlação entre os resultados recolhidos pela espectroscopia VIS e NIR e o conteúdo de água, glicosaminoglicanos e colagénio da cartilagem.

Apesar da avaliação das alterações do conteúdo de água na cartilagem poder ser encarada como uma boa estratégia na deteção precoce das lesões da cartilagem, é ainda necessário encontrar e otimizar um método que seja não/ ou minimamente invasivo e que forneça resultados quantitativos válidos [64]. Spahn et al [77, 73, 74] realizaram uma série de estudos, utilizando a espectroscopia NIR, com o intuito de avaliar a utilidade desta técnica na deteção de defeitos da cartilagem. Num dos estudos, foi analisada a banda de absorção da água em NIR (de 1,4 μm a 1,1 μm), resultando na obtenção de uma matriz de absorvância que foi considerada como sendo um indicador do teor de água [77]. O segundo estudo destes mesmos autores mostrou que os dados espectrais NIR obtidos a partir da análise da cartilagem humana tiveram melhor concordância, com vista à predição de lesões iniciais da cartilagem do

que a ressonância magnética e a artroscopia [35]. Por outro lado, Marticke et al. [78] relacionou os dados obtidos através da espectroscopia NIR da análise da cartilagem com as suas propriedades mecânicas, mostrando que existe uma correlação positiva entre os espectros NIR e módulo de *Young* de cartilagem que possui lesões. Todos estes estudos, em conjunto, demonstram o potencial da espectroscopia no auxílio da avaliação das alterações da matriz da cartilagem num ambiente clínico.

3.5. Avaliação da aplicabilidade da espectroscopia na análise de cartilagem articular

Nesta secção apresenta-se o trabalho realizado com o objetivo de desenvolver uma ferramenta simples, possivelmente conciliável com o artroscópios, e que permita a distinção entre os diferentes graus de lesões da cartilagem articular.

Para isso, procedeu-se a um conjunto de estudos:

- caracterização espectroscópica da cartilagem articular, nas regiões VIS (400 - 1000 nm) e NIR (900 - 1700 nm);
- análise dos espectros recolhidos, de forma a identificar bandas de comprimento de onda que apresentem comportamentos diferenciados para os diversos graus de lesão;
- construção de uma ferramenta de análise de imagens com base nos resultados do estudo dos espectros.

A ferramenta desenvolvida tem a capacidade de processar imagens recolhidas em três comprimentos de onda distintos a partir das amostras, e produz uma medida quantitativa que se espera específica dos diferentes graus de lesão presentes nas amostras em análise.

3.5.1. Amostras

Para poder realizar a análise espectroscópica de cartilagem articular, foram recolhidos de um talho alguns fragmentos de joelho de boi. Os fragmentos foram inspecionados por um médico especialista em artroscopia. O estudo espectroscópico analisou uma seleção de amostras que evidenciavam a presença de diferentes graus de lesão. A Tabela 3.1 indica as características principais das amostras selecionadas.

ID	Origem Anatômica	Forma
1	Prato Tíbia	Plano / Côncavo
2	Tróclea	Plano / Côncavo
3	Côndilo	Convexo
4	Côndilo	Convexo
5	Tróclea	Plano / Côncavo
6	Prato Tíbia	Plano/ Côncavo

Tabela 3.1.: Características das amostras utilizadas neste trabalho.

Inicialmente efetuou-se uma sessão de medidas, na qual foram utilizadas as duas primeiras amostras descritas na Tabela 3.1, procedendo-se à recolha de espectros VIS e NIR para os graus de lesão 1, 2, 3 e 4. No total foram recolhidos cerca de quarenta espectros na região do visível, e vinte espectros na região do infravermelho próximo. Os pontos de medida foram escolhidos pelo ortopedista, que indicava a grau da lesão para cada um dos espectros recolhidos, assim como a geometria da superfície (plana, côncava ou convexa) no ponto de recolha do espectro. Posteriormente efetuou-se outra sessão de medidas, na qual foram utilizadas as amostras 3, 4, 5 e 6, com o objetivo de recolher imagens das amostras de cartilagem para serem utilizadas na ferramenta desenvolvida para a classificação de lesões.

3.5.2. Instrumentação utilizada

Na Figura 3.8 (a), ilustra-se o processo de recolha de espectros e na Figura 3.8 (b) o respetivo esquema experimental.

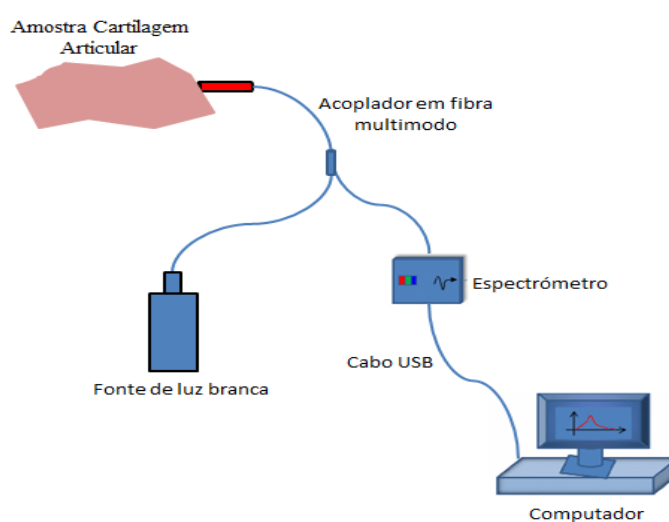
Para a recolha dos espectros foram utilizados dois espectrómetros, um para a região do VIS (USB 2000, Ocean Optics) e outro para a região do NIR (NIR Quest 512, Ocean Optics). Foi ainda utilizada uma fonte de luz (HL-2000, Ocean Optics), e um acoplador em fibra ótica multimodo 1(in) x 2(out) (Split 400 - VIS-NIR, Ocean Optics).

O espectrómetro VIS é bastante versátil, possibilitando a medição da absorção, transmissão, reflectância, emissão, cor, entre outras aplicações. Este espectrómetro possui um sensor linear de silício e um tempo de integração que varia desde 1 ms até 65 s. Existe a possibilidade de configurar o espectrómetro, otimizando a gama de comprimento de onda medida e a resolução espectral, ajustando-se às medições que se pretendem utilizar. No nosso caso, o espectrómetro possui uma fenda de 25 μm e proporciona uma deteção espectral dos 339,33 nm até aos 1025,77 nm com uma resolução espectral de 1.34 nm.

3.5. Avaliação da aplicabilidade da espectroscopia na análise de cartilagem articular



(a)



(b)

Figura 3.8.: Pormenor da recolha de espectros de uma das amostras de cartilagem (a) e esquema da montagem experimental (b).

O espectrómetro NIR tem uma resposta de alto desempenho. Este possui um detector linear de InGaAs e um tempo de integração que varia desde 1 ms até 120 s. Graças à sua optoeletrónica de baixo ruído, este espectrómetro é ideal para aplicações como por exemplo a deteção de humidade, análises químicas de alta resolução e caracterização de lasers e fibras óticas. Possui ainda como principal vantagem a ótima razão sinal ruído de 15000:1, que permite utilizar um tempo de integração maior, sem interferência do ruído, melhorando assim a qualidade dos resultados obtidos. No nosso caso, o espectrómetro de infravermelho próximo proporciona uma deteção entre os 900 e os 1700 nm, com uma resolução espectral de aproximadamente 3 nm.

A lâmpada de Halogéneo utilizada (fonte é de 5 W), emite radiação nas gamas do VIS e do NIR (360 - 2400 nm) e possui um tempo de estabilização de aproximadamente 10 minutos.

Para estabelecer a ligação entre a fonte de luz, as amostras analisadas e os espectrómetros foi utilizado um acoplador em fibra ótica multimodo “1(in) x 2(out)”. Uma das saídas é acoplada à fonte de luz, a outra é acoplada a um dos espectrómetros e a entrada foi utilizada para transportar a luz proveniente da fonte até à amostra e para recolher e focalizar a luz refletida pela amostra, como está esquematizado na Figura 3.8 (b). Nesta montagem experimental utilizou-se inicialmente o espectrómetro do visível, sendo posteriormente substituído na montagem experimental pelo espectrómetro do infravermelho próximo, para recolher os espectros do visível e do infravermelho próximo, respetivamente. Os espectros foram adquiridos através do software de controlo e aquisição de dados SpectraSuite da Ocean Optics. O protocolo de recolha dos espectros consistiu em:

1. Medição de espectros de referência:
 - a) Espectro “branco” corresponde ao espectro da reflectância que ocorre na ponta da fibra ótica, estando representados na Figura 3.9 os espectros “brancos” VIS e NIR;
 - b) Espectro “escuro” corresponde ao espectro quando a excitação luminosa está desligada;
2. Recolha dos espectros que correspondem ao sinal luminoso que é refletido difusamente pela amostra de cartilagem articular;
3. Armazenamento dos espectros VIS e NIR para cada amostra.

Durante a recolha dos espectros, a ponta do acoplador de fibra ótica utilizado para recolher o sinal da reflectância da amostra de cartilagem, Figura 3.8 (a), estava em contacto com a amostra, de forma a minimizar os valores da reflectância que se verificavam em alguns casos. Para além disso, por vezes era ainda necessário adicionar água na região que se pretendia analisar.

Quanto à recolha de imagens, foi utilizada uma câmara AVT Stingray F-504B, que é uma câmara *black and white*, que tem a possibilidade de fornecer imagens com uma profundidade de resolução de 8, 14 e 16 bits. No entanto, o *software* utilizado para a aquisição das imagens não foi o do fabricante da câmara, o que nos dificultou a obtenção de dados de imagem com uma resolução superior a 8 bits. As imagens

3.5. Avaliação da aplicabilidade da espectroscopia na análise de cartilagem articular

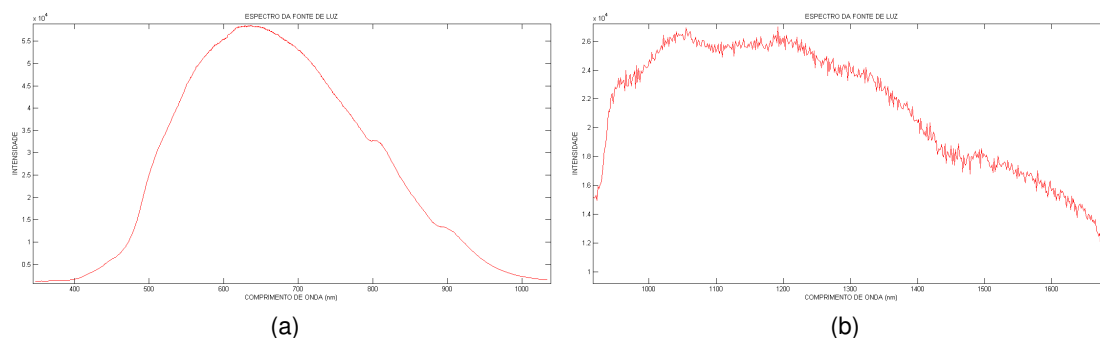


Figura 3.9.: Espectro “branco” corresponde ao espectro da reflectância que ocorre na ponta da fibra ótica: (a) VIS; (b) NIR.

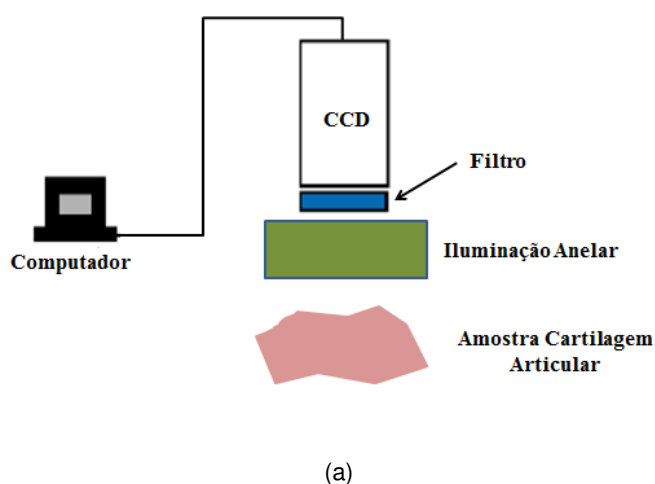


Figura 3.10.: Esquema da montagem experimental para a recolha das imagens da cartilagem.

foram recolhidas com o *shutter* a zero e o ganho a 1375. Juntamente com a câmara, foram acoplados filtros óticos para a captura das imagens. Foi utilizado um kit de filtros passa banda, da “Edmund Optics”, com uma largura de banda de 2 a 5 nm. Este tipo de filtros são utilizados nas mais diversas áreas, entre as quais a espectroscopia, permitindo estes transmitir seletivamente uma janela de comprimentos de onda definida pelo filtro, rejeitando toda a restante gama. Na Figura 3.10 é possível ver o esquema experimental da aquisição de imagens da cartilagem.

3.5.3. Pré análise da informação espectral

Existem diversos fatores que contribuem para a variabilidade da aparência de espectros recolhidos em condições idênticas, quando se trata de amostras com a complexidade dos tecidos biológicos. A fluorescência é um desses fatores, dependendo esta não só da frequência e da intensidade da radiação incidente, como também do tempo de exposição e da localização da zona em estudo, isto porque as amostras são morfológicamente irregulares e quimicamente heterogêneas. Fatores como a rugosidade e a espessura da amostra analisada influenciam a intensidade do sinal recolhido, podendo comprometer a qualidade do espectro, bem como a razão sinal-ruído. É então necessário proceder a uma uniformização dos dados, de forma a poder obter informação útil dos espectros recolhidos, para que seja possível efetuar comparações quantitativas e sistemáticas entre os diversos espectros que foram recolhidos. Assim, todos os espectros sofreram um processo de correção da intensidade através da normalização mínimo máximo, que foi descrita na Secção 2.5.1.6.

3.5.4. Processamento de informação espectral

No estudo sistemático, com vista à caracterização da região espectral dos 400 aos 1700 nm, foram examinados os sessenta espectros que foram recolhidos, relativos a diferentes graus de lesões presentes na cartilagem. O objetivo deste estudo é encontrar alguma evidência espectroscópica (amplitude, posição de picos) que possa ser diretamente relacionada com o grau das lesões que estão presentes nas amostras de cartilagem articular.

A Figura 3.11 mostra um conjunto de espectros que foram recolhidos durante a primeira sessão de medidas, na qual foram utilizadas as duas primeiras amostras descritas na Tabela 3.1. Na Figura 3.11, está um conjunto de espectros VIS (a) e (b) e NIR (c) e (d), referentes aos diferentes graus de lesões.

Na análise dos espectros recolhidos na região do VIS, pretendem-se quantificar os desvios que os espectros das várias lesões apresentam, relativamente ao espectro “branco” que corresponde ao espectro da fonte. Para isso foram realizadas algumas medidas de quantificação:

- estudo da dinâmica relativa da reflectância, considerando três janelas (3 nm) de diferentes comprimentos de onda, de forma a obter uma medida $y_n = \frac{I(\lambda_n)}{I(\lambda_{ref})}$, recolhendo para cada espectro os seguintes valores:

3.5. Avaliação da aplicabilidade da espectroscopia na análise de cartilagem articular

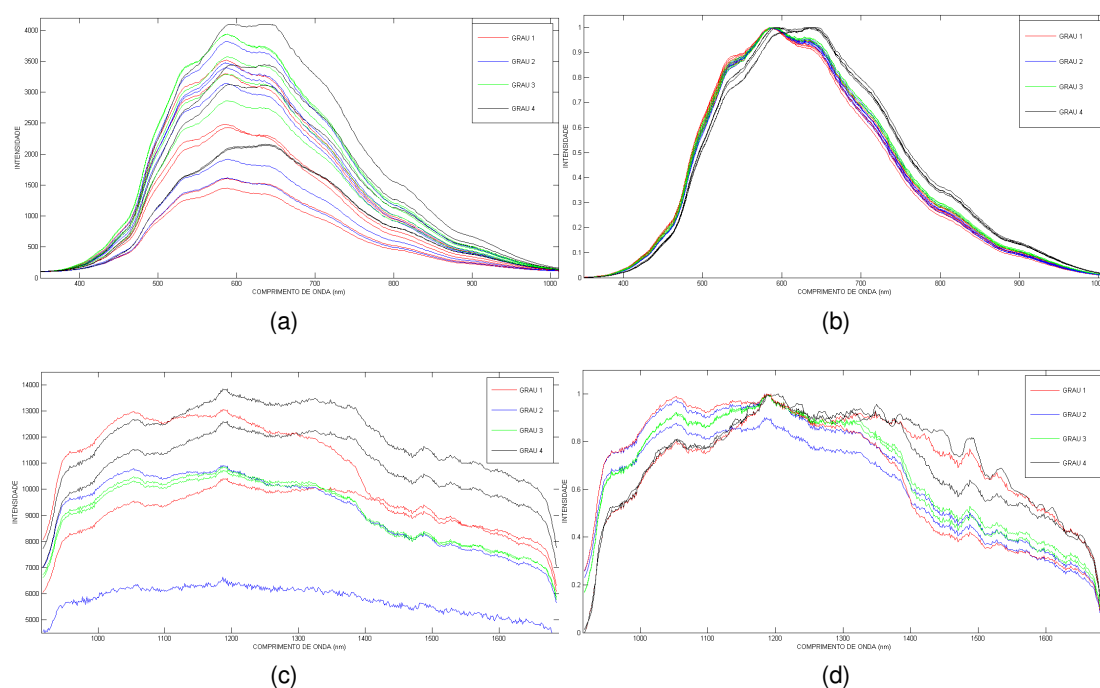


Figura 3.11.: Espectros não normalizados dos diversos graus de lesão: (a) da região do visível e (c) da região do infravermelho próximo; e espectros normalizados dos diversos graus de lesão: da região do visível (b) e da região do infravermelho próximo (d).

$$y_1 = \frac{I(\lambda_1)}{I(\lambda_{ref})}$$

$$y_2 = \frac{I(\lambda_2)}{I(\lambda_{ref})}$$

Utilizando-se depois as seguintes funções de medida que utilizam os valores de y_1 e y_2 para quantificar o grau de lesão:

$$\Delta Y = y_1 - y_2$$

$$\bar{Y} = y_1 + y_2$$

A função de $\bar{Y}$ tem como objetivo dar uma indicação da intensidade média normalizada pela referência, pretendendo apenas ser um indicador de variabilidade da medida, não se esperando alterações significativas deste indicador.

A medida da dinâmica relativa da intensidade espectral tenta quantificar o comportamento dos picos em torno de um ponto de referência, quando se varia o grau das lesões, aferindo as variações de amplitude. A escolha da posição das janelas dos comprimentos de onda λ_1 , λ_2 e λ_{ref} foi feita da seguinte forma: o comprimento de onda de referência (λ_{ref}) foi escolhido numa zona onde as curvas de reflectância de diferentes amostras apresentem comportamento semelhante (não parecem variar com o grau das lesões), os comprimentos de onda para λ_1 e λ_2 foram escolhidos em zonas da curva de reflectância onde existem diferenças visíveis (amplitude) para diferentes graus de lesões. Tendo em conta o que foi dito, são seleccionadas três janelas (3 nm), centradas nos comprimentos de onda indicados, para proceder à análise dos espectros:

- $\lambda_1 = 515 \text{ nm}$;
- $\lambda_{ref} = 632 \text{ nm}$;
- $\lambda_2 = 694 \text{ nm}$.

Foram escolhidas as janelas de comprimento de onda centradas em 515 nm e 694 nm pois é nestas zonas que se verificam as maiores diferenças entre os espectros dos

diferentes graus. Já no caso da janela de comprimento de onda dos 632 nm verifica-se que todos os espectros possuem aproximadamente o mesmo valor de intensidade espectral normalizada, podendo este ser usado como referência.

Na análise dos espectros recolhidos na região do infravermelho próximo, foi estudada a posição dos picos que aparecem nos espectros, verificando se a sua posição se mantinha para os diferentes graus de lesões. Para isso construiu-se um algoritmo em Matlab que efetuava o estudo dos máximos locais dos espectros.

Foram ainda estudado os desvios que os espectros das várias lesões apresentam, relativamente ao espectro “branco” que corresponde ao espectro da fonte, na tentativa de poder correlacionar esses desvios com o grau das lesões das amostras de cartilagem.

3.5.4.1. Análise dos espectros da região do infravermelho próximo

Os espectros recolhidos na região do infravermelho próximo são apresentados na Figura 3.11 (c). Analisando a disposição dos espectros normalizados, Figura 3.11 (d), não se identifica nenhuma tendência ordenada, de acordo com o grau de lesão a que dizem respeito, existindo inclusive um espectro de grau 1 e grau 4 que se sobrepõem durante grande parte da gama que foi estudada.

Embora sejam poucas amostras para poder tirar conclusões, decidiu-se fazer a média dos espectros que são referentes ao mesmo grau de lesão, de forma a minimizar a variância que existe entre os espectros recolhidos. Assim são apresentados, na Figura 3.12, quatro espectros referentes aos quatro graus de lesões, que resultaram da média dos espectros das lesões do mesmo grau.

Analisando a média dos espectros do infravermelho próximo, representados na Figura 3.12, verifica-se que embora exista uma região em que os espectros se ordenam de acordo com o grau das lesões que representam (região dos 950 aos 1100 nm), na restante gama do espectro, apesar de os espectros referentes aos grau 1 e grau 4 se apresentem sempre em extremos opostos, os espectros relativos aos grau 2 e grau 3 praticamente se sobrepõem, apresentando um comportamento muito semelhante na gama dos 1200 aos 1600 nm.

As medidas espectroscópicas efetuadas encontram-se em bom acordo com as que têm sido descritas na literatura. Um trabalho publicado por Padalkar et al [64], no qual é utilizada uma gama de infravermelho mais vasta (1250 - 2500 nm) no estudo de cartilagem proveniente de bovinos, demonstram um perfil espectral muito semelhante

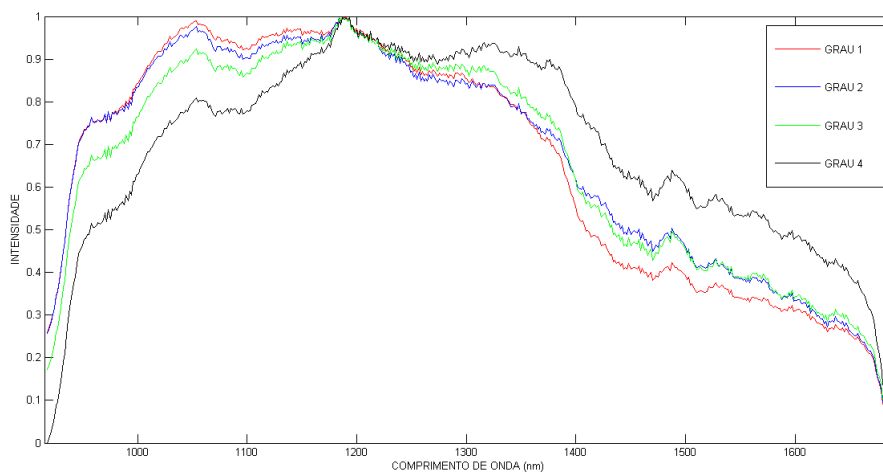


Figura 3.12.: Representação da média dos espectros do infravermelho próximo apresentados na Figura 3.11 (d).

na gama comum ao nosso estudo (1250 - 1700 nm), isto apesar de serem utilizados instrumentos de medição diferentes e a preparação das amostras ser diferente. No estudo publicado por estes autores são apresentados dois picos, na região dos 1900 nm e na região entre os 1400 e os 1500 nm devido ao anormal conteúdo de água da cartilagem, sendo esse facto associado à presença de lesões. No nosso estudo, também observamos a presença do pico na região entre os 1400 e os 1500 nm, que não se verifica no espectro da fonte de luz (Figura 3.9 (b)).

3.5.4.2. Análise dos espectros da região do visível

Os espectros da região do VIS são apresentados na Figura 3.11 (a). Após efetuar a sua normalização são apresentados os resultados na Figura 3.11 (b). As medidas espectroscópicas efetuadas encontram-se em bom acordo com as que têm sido descritas na literatura. Estudos recentes apresentados por Johansson et al [79] e Oberg et al [80] demonstram que os espectros da região do VIS que foram recolhidos para a realização deste estudo possuem um perfil muito semelhante ao apresentado nestes trabalhos, pese embora existam diferenças na preparação das amostras antes das medições e nos instrumentos de medição utilizados. Segundo estes estudos a análise de cartilagem com diferentes espessuras, e consequentemente, com diferentes graus de lesões, produz diferenças espectrais localizadas sobretudo em duas bandas, antes e depois do pico do espectro localizado na região dos 600 nm. Esses resultados

3.5. Avaliação da aplicabilidade da espectroscopia na análise de cartilagem articular

também se verificam no nosso estudo.

Analisando os espectros normalizados é possível verificar que existe uma tendência para que os espectros pertencentes ao mesmo grau de lesão se agrupem, existindo alguma sobreposição entre espectros de graus adjacentes. É possível ainda identificar duas gamas onde existe maior diferença entre os espectros das diferentes lesões e uma outra onde todos os espectros denotam ter o mesmo comportamento. As regiões onde as diferenças entre espectros são máximas são 510 - 550 nm e 670 - 710 nm, e existe um comprimento de onda, no qual todos os espectros apresentam aproximadamente o mesmo valor, após a normalização, verificando-se esse facto aos 632 nm. Da análise desse mesmo conjunto de espectros é ainda possível verificar que existe uma tendência para que os espectros se apresentem ordenados, tendo em conta o seu grau de lesão, sobretudo nas duas regiões onde existem as maiores diferenças.

Embora sejam poucas amostras para poder tirar conclusões, decidiu-se fazer a média dos espectros que são referentes ao mesmo grau de lesão, de forma a minimizar a variância que existe entre os espectros recolhidos. Assim são apresentados, na Figura 3.13 (a), quatro espectros referentes aos quatro graus de lesões, que resultaram da média dos espectros das lesões do mesmo grau.

Observando a Figura 3.13, com especial atenção para as sub-figuras (b) e (c), que representam as regiões do espectro onde as diferenças são máximas, é possível verificar que os diferentes espectros se ordenam de acordo com o grau da lesão que representam. Verifica-se esse fenómeno tanto na primeira região, Figura 3.13 (b), em que para um mesmo comprimento de onda, com o aumento do grau da lesão o valor da intensidade espectral diminui, como na segunda região, Figura 3.13 (c), em que acontece o inverso, ou seja, para um mesmo comprimento de onda, quanto maior o grau da lesão maior o valor da intensidade espectral. A partir destes dados exploraram-se métricas para quantificar estas variações sem ter de depender do espectro da fonte luminosa, propondo-se a métrica descrita na Secção 3.5.4. O estudo da dinâmica relativa dos espectros VIS, utilizando essa métrica de quantificação, resulta nos gráficos das Figuras 3.14 e 3.15 onde são apresentados os resultados de um conjunto de nove espectros para cada um dos graus de lesão, exceto no caso dos espectros relativos ao grau 3, em que apenas foram recolhidos oito espectros.

A divisão dos valores de ΔY e de $\bar{Y}$ pela média dos valores de todas as amostras recolhidas, foi efetuada com o objetivo de enfatizar a ordem de grandeza da variação entre as medidas realizadas. De salientar ainda que os resultados obtidos foram ordenados por ordem crescente para a representação gráfica. Observando os gráficos

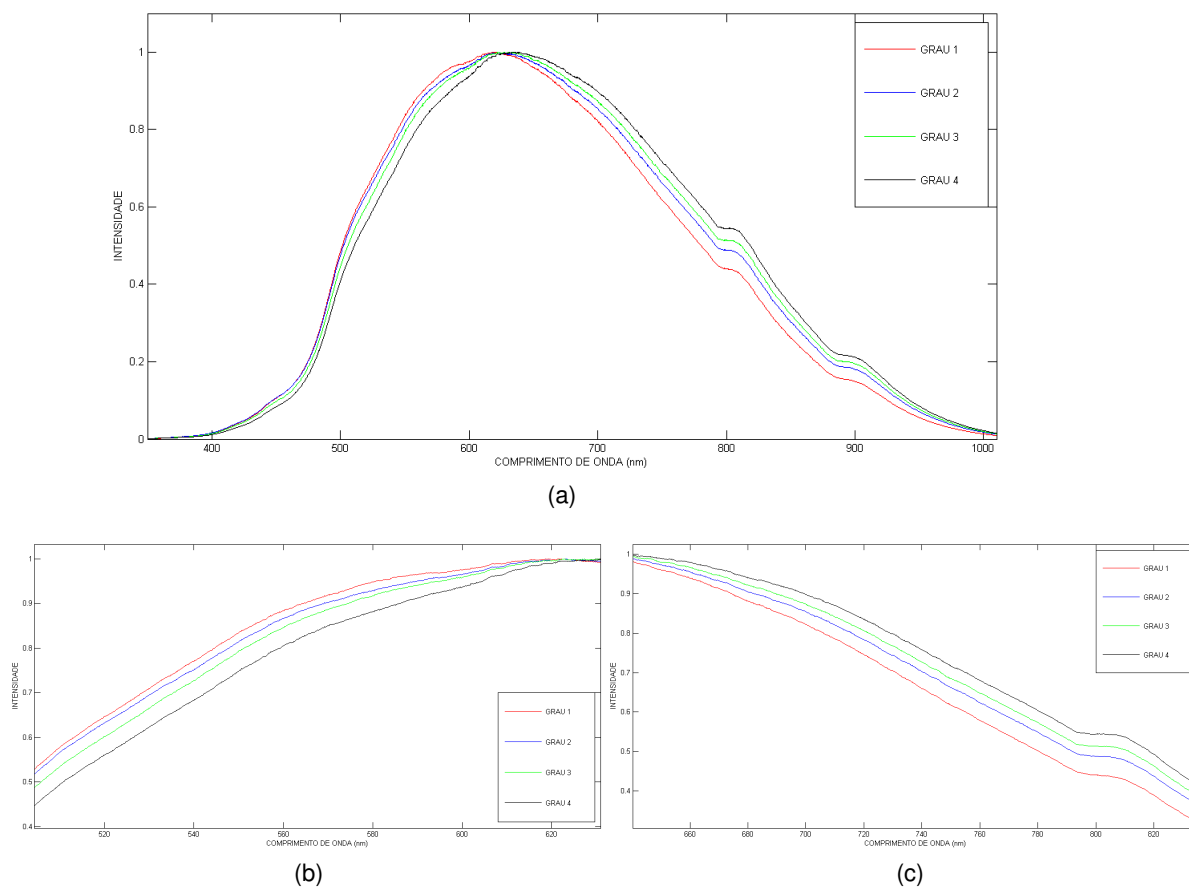
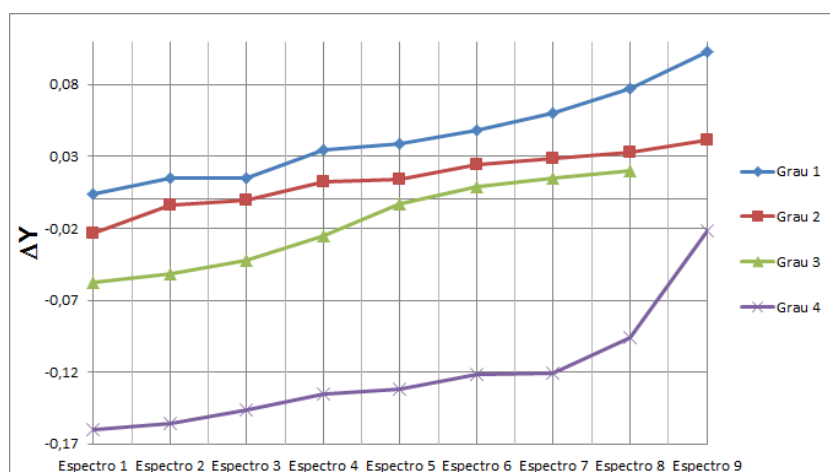
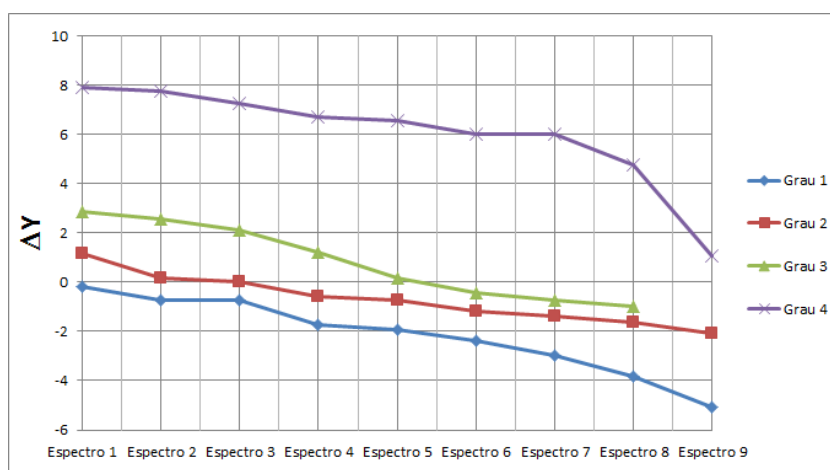


Figura 3.13.: Na sub-figura (a) está representada a média dos espectros do visível apresentados na Figura 3.11 (b), sendo as sub-figuras (b) e (c) zonas ampliadas dos espectros representados na sub-figura (a).

3.5. Avaliação da aplicabilidade da espectroscopia na análise de cartilagem articular

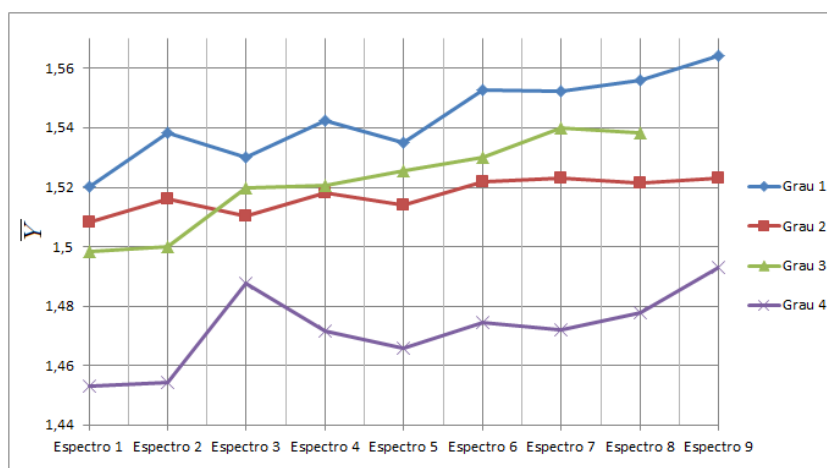


(a)

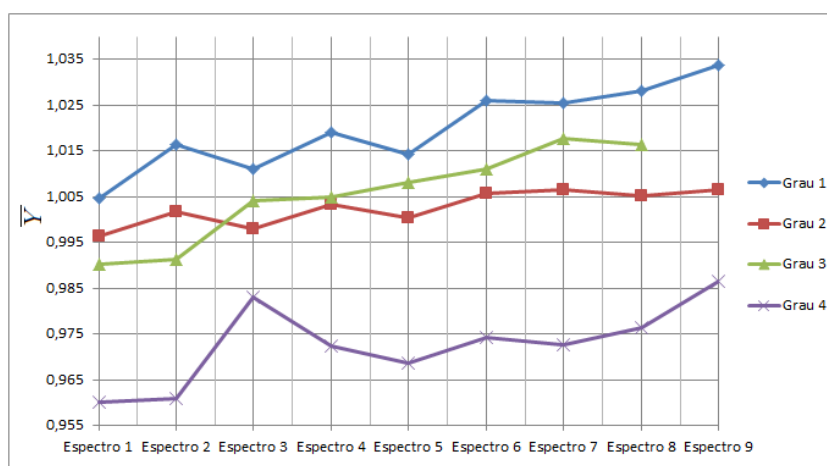


(b)

Figura 3.14.: Resultados de ΔY recolhidos dos diversos espectros relativos aos quatro graus de lesões (a); Em (b) são apresentados os mesmos valores de ΔY mas desta vez divididos pela média de todas as amostras recolhidas.



(a)



(b)

Figura 3.15.: Resultados de $\bar{Y}$ recolhidos dos diversos espectros relativos aos quatro graus de lesões (a). Em (b) são apresentados os mesmos valores de $\bar{Y}$ que também são divididos pela média de todas as amostras recolhidas.

3.5. Avaliação da aplicabilidade da espectroscopia na análise de cartilagem articular

de ΔY e de $\bar{Y}$ apresentados nas Figuras 3.14 e 3.15, existem algumas observações que importam referir, nomeadamente:

- a variação relativa do indicador ΔY encontra-se na gama -5 a 8X;
- a variação relativa do indicador $\bar{Y}$ é de apenas $\pm 4\%$, pequena;
- observa-se a sobreposição já prevista com base na observação dos resultados dos espectros normalizados, Figura 3.11 (b);
- verifica-se a sobreposição dos resultados da análise de espectros em graus de lesão consecutivos, nomeadamente entre o grau 1 e grau 2, e entre grau 2 e grau 3;
- os resultados relativos ao grau 4 aparecem bem separado dos resultados dos outros três graus de lesões, pois já na Figura 3.11 (b) se verificava um isolamento dos espectros de grau 4, quando comparados com os espectros dos restantes graus de lesões.

3.5.5. Aquisição e análise de imagens

A artroscopia é uma técnica que utiliza uma câmara CCD para observar o interior das articulações, guiando a imagem captada até um monitor de televisão, permitindo ao artroscopista uma visão privilegiada do interior da articulação intervencionada. Este facto sugere a utilização da câmara CCD já existente para a recolha da informação necessária ao estudo espectroscópico. Assim, tendo por base os resultados obtidos com o estudo espectroscópico já descrito, foi utilizada uma câmara para recolher imagens de amostras de cartilagem nos três comprimentos de onda de interesse nele identificados. As matrizes de informação resultantes foram posteriormente processadas para o cálculo de ΔY e $\bar{Y}$.

Os comprimentos de onda selecionados, neste caso serviram para selecionar o comprimento de onda dos filtros passa banda, a utilizar na recolha das imagens da cartilagem.

Assim, utilizando a montagem experimental que se encontra representada na Figura 3.10, foram recolhidas imagens de cada uma das amostras 3, 4, 5 e 6:

- imagem registada com filtro a 515nm (I_1);
- imagem registada com filtro a 632nm (I_{ref});

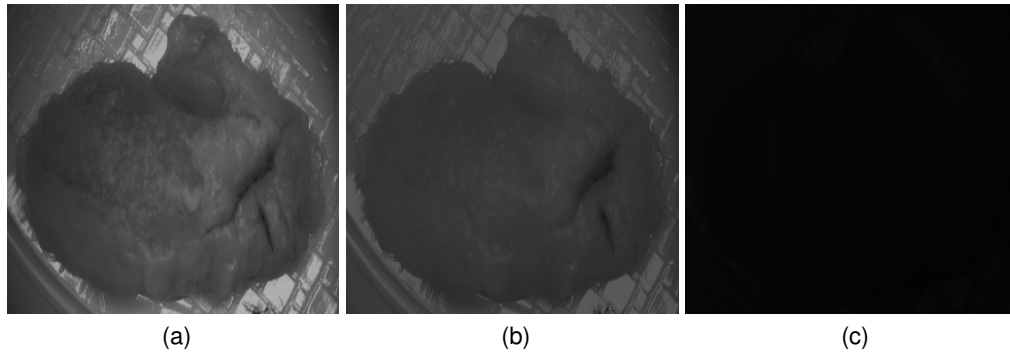


Figura 3.16.: Três imagens que foram registadas, referentes à amostra n°4, sendo (a) a referente a I_1 , (b) a referente a I_{ref} , e por ultimo (c) a referente a I_2 .

- imagem registada com filtro a 694nm (I_2).

Um exemplo dessa recolha está apresentado na Figura 3.16, onde são apresentadas essas três imagens, relativas à amostra n° 4. As imagens relativas às outras amostras são apresentadas no Anexo A.1.

As imagens recolhidas tiveram um processamento similar ao efetuado com os espectros, existindo neste caso um conjunto de operações simples que se realizam para um mesmo pixel (n, m) das imagens I_1 , I_{ref} e I_2 . Assim, foi gerada uma variável de medida $Y(n, m) = I(n, m) / I_{ref}(n, m)$, que se aplica às três imagens que foram recolhidas com os três filtros de seleção de comprimento de onda. Para cada uma das amostras estudadas, é possível gerar as seguintes imagens:

$$Y_1(n, m) = \frac{I_1(n, m)}{I_{ref}(n, m)}$$

$$Y_2(n, m) = \frac{I_2(n, m)}{I_{ref}(n, m)}$$

Através destas duas variáveis, e tal como foi feito no caso do estudo dos espectros, é possível criar uma função de medida que tenta quantificar o grau de lesão: $\Delta Y = Y_1 - Y_2$. Já a função $\bar{Y}$, definida por: $\bar{Y} = Y_1 + Y_2$, serve apenas para dar uma indicação da intensidade média das duas imagens normalizadas pela imagem de referência, e pretende apenas ser um indicador de variabilidade da medida, não se esperando alterações significativas deste indicador.

O processamento das imagens foi feito através de uma interface desenvolvida em

“LabVIEW”, com capacidade para classificar e visualizar as imagens recolhidas e gerar, a partir destas, um mapa de indicadores que quantificam o grau de lesão. A Figura 3.17 mostra a janela da aplicação, na qual estão carregadas as imagens relativas à amostra n° 4. A interface desenvolvida permite carregar as três imagens I_1 , I_{ref} e I_2 , e permite visualizar a imagem fotográfica da amostra em questão. Na imagem superior é mostrado o mapa do indicador ΔY ou $\bar{Y}$ (existe um comando que permite alternar entre um e outro), com uma codificação de cores artificial. Analisando o mapa de cores do indicador presente na Figura 3.17, é possível identificar na amostra diferentes tons que vão desde o amarelo ao vermelho, que correspondem a diferentes valores de ΔY , que neste caso estão a variar entre aproximadamente 0,7 e 2.

O princípio de funcionamento da interface, tem por base a deslocação de um cursor sobre o mapa do indicador ΔY , escolhendo um local da amostra analisada de especial importância, ao qual pode ser atribuída uma classificação de lesão e ainda uma classificação quanto à forma da superfície da amostra. Após cumprir este protocolo, clicando sobre o botão de confirmação, os dados são exportados para um ficheiro “.txt”, no qual estão identificadas as coordenadas (n, m) do pixel em questão, o grau de lesão que está associado a essa zona, a forma da superfície da amostra e ainda os valores de ΔY e $\bar{Y}$. É ainda possível alterar o cabeçalho desse ficheiro “.txt”, através da interface desenvolvida no LabVIEW, sendo possível entre outras coisas identificar a data das medições, qual o comprimento de onda selecionado para a recolha das três imagens, e ainda adicionar algum comentário que possa ser considerado relevante para as medidas em questão.

Estes resultados estão em concordância com os obtidos por alguns estudos similares [35, 34], nos quais se verifica que a identificação de lesões de elevado grau é relativamente fácil, sendo o maior desafio a distinção entre tecido saudável e lesões de baixo grau, e distinção entre as lesões de baixo grau, nomeadamente grau 1 e grau 2.

Os testes efetuados realizaram-se utilizando imagens 8 bit. Um fator que é importante salientar é a gama dinâmica das imagens captadas, que está apresentada no conjunto de Tabelas 3.2. Verifica-se, através da análise das Tabelas 3.2, que sobretudo as imagens $I_2 - 694\text{ nm}$ das quatro amostras possuem uma gama dinâmica muito reduzida (gama dinâmica de aproximadamente 11 níveis em 256 possíveis), sendo por isso imagens muito pobres em termos de informação. Tendo por base estes dados verifica-se que a resolução limitada das imagens disponíveis (em níveis de cinzento) é considerada uma condicionante à capacidade de discriminação das lesões

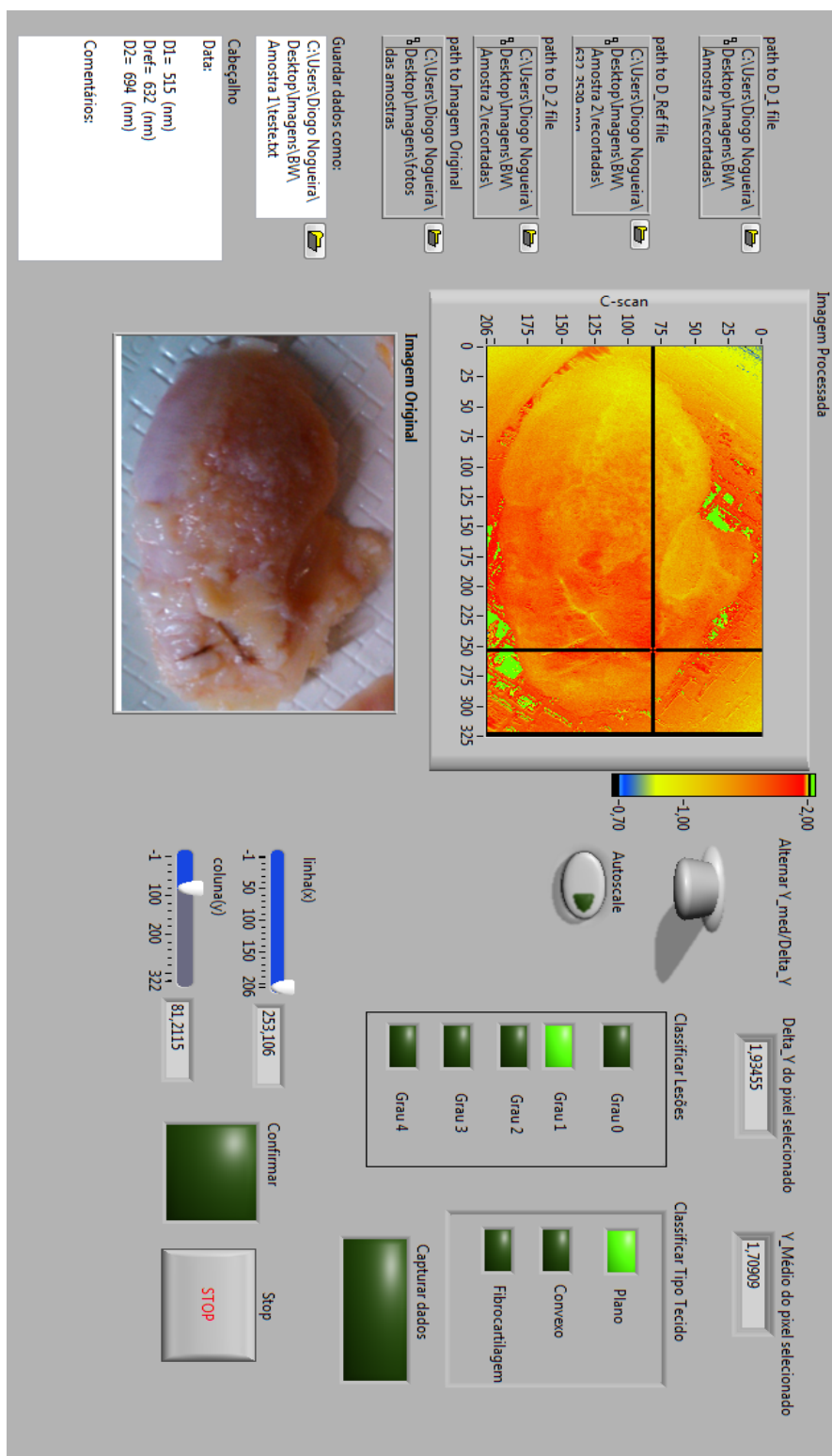


Figura 3.17.: Interface desenvolvida em LabVIEW para a classificação das imagens recolhidas e apresentação dos indicadores ΔY e $\bar{Y}$.

pela ferramenta construída.

3.5.6. Conclusões

O desafio descrito neste capítulo consistiu na avaliação do potencial de aplicabilidade de uma solução espectroscópica para análise de cartilagem articular, que fosse possível conciliar com o artroscópio de forma a permitir a distinção entre os diferentes graus de lesões durante uma artroscopia.

Na primeira parte do trabalho, procedeu-se a um estudo espectroscópico das peças de cartilagem animal. Foram recolhidos um conjunto de espectros VIS e NIR das diversas amostras. Com base nos espectros obtidos com luz visível, foi definida uma métrica de medida, ΔY , para quantificar o grau das lesões presentes na cartilagem. Este fator ΔY utiliza os valores da intensidade espectral de três comprimentos de onda distintos, com o objetivo de quantificar o comportamento de picos do espectro em torno de um ponto de referência, quando se varia o grau das lesões, aferindo as variações de amplitude. Da aplicação desta função de medida obtiveram-se alguns resultados, em consonância com estudos similares, onde é possível observar a sobreposição dos resultados respeitantes a graus de lesões consecutivos, nomeadamente entre o grau 1 e grau 2, e entre o grau 2 e o grau 3. Os resultados relativos ao grau 4 são bem distintos dos restantes graus de lesões.

Com base nas evidências espectroscópicas obtidos com luz visível, desenvolveu-se uma ferramenta em LabVIEW que utiliza várias imagens de cartilagem, capturadas em diferentes comprimentos de onda, com o objetivo de diferenciar os vários graus de lesões presentes nas amostras. O comprimento de onda a que as imagens foram recolhidas corresponde ao comprimento de onda que se utilizou no cálculo de ΔY no estudo dos espectros. O processamento das imagens foi similar ao efetuado com os espectros, existindo neste caso um conjunto de operações simples que se realizam para um mesmo pixel (n, m) das imagens. Na Ferramenta desenvolvida, é apresentado o mapa do indicador ΔY , com uma codificação de cores artificial, com tons personalizáveis que correspondem a diferentes valores de ΔY , que no nosso caso estão a variar entre aproximadamente 0,7 e 2. Verifica-se no entanto, que a gama dinâmica de uma das imagens I_2 registadas a 694 nm é muito reduzida (aproximadamente 11 níveis em 256 possíveis) sendo por isso uma imagem muito pobre em termos de informação, o que constitui uma condicionante à capacidade de discriminação das lesões através da ferramenta construída. A função de quantificação do grau

de lesão ΔY aplicada nos dados espectrais tem uma variação de - 5 a 8 x, enquanto que nas imagens é de 0,7 a 2,1 x. Esta situação poderá ser melhorada de futuro com a aquisição de imagens a 12 ou 16 bits.

Embora as amostras estudadas constituam um conjunto muito reduzido, sendo por isso impossível obter conclusões com peso estatístico, as observações evidenciam potencial na utilização da métrica ΔY na distinção de lesões, ainda que é desejável uma otimização da medida ou controlo das condições em que esta é efetuada para aumentar a especificidade ao grau de lesão e entre a sobreposição das respostas registadas.

Para verificar o funcionamento da interface de análise de imagens desenvolvida, será necessário submete-la à análise de um grande número de amostras. Será possível criar uma base de dados com os resultados de ΔY da análise das amostras, para cada um dos graus de lesão. Se os resultados obtidos forem coerentes, a partir da base de dados criada será viável desenvolver um classificador automático dos graus de lesões presentes nas imagens que são introduzidas na ferramenta de classificação. Estes são estudos com uma duração que não se enquadra numa tese de mestrado, ficando o objetivo de realizar estes estudos futuramente.

3.5. Avaliação da aplicabilidade da espectroscopia na análise de cartilagem articular

Amostra 1			
Imagem	Mínimo	Máximo	Diferença
$I_1 - 515 \text{ nm}$	20	178	158
$I_{ref} - 632 \text{ nm}$	15	92	77
$I_2 - 694 \text{ nm}$	4	15	11

(a)

Amostra 2			
Imagem	Mínimo	Máximo	Diferença
$I_1 - 515 \text{ nm}$	21	179	158
$I_{ref} - 632 \text{ nm}$	21	97	76
$I_2 - 694 \text{ nm}$	3	14	11

(b)

Amostra 3			
Imagem	Mínimo	Máximo	Diferença
$I_1 - 515 \text{ nm}$	20	179	159
$I_{ref} - 632 \text{ nm}$	14	93	79
$I_2 - 694 \text{ nm}$	2	16	14

(c)

Amostra 4			
Imagem	Mínimo	Máximo	Diferença
$I_1 - 515 \text{ nm}$	32	177	145
$I_{ref} - 632 \text{ nm}$	21	99	78
$I_2 - 694 \text{ nm}$	3	14	11

(d)

Tabela 3.2.: Gama dinâmica informação registada a partir das quatro amostras estudadas na ferramenta de análise.

4. Aplicação a Óleos Alimentares

4.1. Contexto

O homem confeciona os alimentos utilizando técnicas de culinária de cozedura, assado, fumado e fritura para os tornar mais agradáveis. A fritura é uma das formas de confeção de alimentos mais antigas e pensa-se que é originária da China, onde se fritavam os alimentos antes de os assar. Nos hábitos alimentares dos Portugueses, aliás comum dos povos Mediterrânicos, está enraizado o consumo de quantidades apreciáveis de géneros alimentícios confeccionados utilizando a fritura, os quais contribuem, obviamente, para a ingestão de quantidades apreciáveis de gorduras [81]. Apesar dos consumidores estarem cada vez mais preocupados com a relação existente entre a alimentação e a saúde, os alimentos fritos fazem parte do regime alimentar dos indivíduos de todo o Mundo, principalmente no Ocidente, motivados por razões sociais e económicas, pois a população dispõe de menos tempo para a preparação dos seus alimentos. Com a evolução do mercado, surgiram os alimentos pré-fritos, que trouxeram ainda mais vantagens ao consumidor atual: não exigem preparação prévia, o tempo de confeção é muito curto, existe uma grande variedade de oferta, e são preferidos pois, geralmente, estão prontos para consumo, no final da fritura. Para além disso, este processamento culinário é vantajoso do ponto de vista da segurança alimentar, pois há destruição de microrganismos devido às elevadas temperaturas a que decorre, e sensorial: são conferidos aos alimentos características únicas de textura, aparência e sabor [82].

Do ponto de vista nutricional, a ingestão adequada de lípidos é crucial para um desenvolvimento saudável. Para além do seu contributo energético, deve ter-se em consideração a importância da sua ingestão para obter os ácidos gordos essenciais e as vitaminas lipossolúveis requeridas diariamente. A ingestão diária recomendada varia em função da idade, do estado de saúde do indivíduo e do estilo de vida. A ingestão de gordura em excesso tem sido relacionada com o aumento do risco de obesidade, doenças coronárias e certos tipos de cancro. Os mecanismos pelos quais

estas doenças se desenvolvem são complexos, variados e em muitos casos não estão ainda totalmente esclarecidos [81].

O crescimento das indústrias que produzem estes alimentos desencadeou o desenvolvimento de novos equipamentos, tanto industriais como domésticos, nos quais uma determinada quantidade de óleo é submetida a aquecimento por longos períodos de tempo. No processo de fritura, o alimento é submerso em óleo / gordura a 180°C , o qual funciona como meio de transferência de calor. Esta forma de aquecimento é mais eficiente do que a cozedura a vapor ou em água, já que as temperaturas alcançadas pelo processo de fritura são superiores. Considerando que uma maior ou menor quantidade do óleo é absorvida pelo alimento, tornando-se assim parte da alimentação, deve manter-se a qualidade do meio de fritura ao longo do processo. Durante o processo de fritura, ocorrem uma série de reações complexas que levam à degradação e formação de uma maior ou menor quantidade substâncias eventualmente prejudiciais para a saúde. O aparecimento dessas substâncias vai alterar as qualidades funcionais, nutricionais e sensoriais, modificando-as de tal forma que passado algum tempo, não é possível continuar a produzir alimentos com qualidade. [83]. Por esta razão, foram regulamentadas normas de qualidade e condições específicas de utilização das gorduras na fritura, com vista a salvaguardar a saúde do consumidor e criar, nos agentes económicos regras e hábitos de produção e comercialização de géneros alimentícios fritos [81].

Segundo o Decreto-Lei n.º 1135/95, da legislação portuguesa, que tem como objetivo estabelecer normas de qualidade para as gorduras e óleos comestíveis utilizados na fritura, bem como condições específicas de utilização desses produtos na preparação e fabrico de géneros alimentícios, com vista a salvaguardar a saúde pública e a criar nos agentes económicos regras e hábitos de produção e comercialização de géneros alimentícios fritos [84]. Este decreto-lei estabelece que:

- na fritura de géneros alimentícios as gorduras e óleos comestíveis utilizados não podem apresentar um teor em compostos polares superior a 25 %.
- na preparação e fabrico de géneros alimentícios sujeitos a fritura, a temperatura da gordura ou do óleo não deverá ultrapassar 180°C .

4.2. Fritura

Entende-se por fritura a utilização de um óleo ou gordura alimentar como meio condutor de calor, sendo este um processo bastante económico, pois utiliza com muita eficiência a energia calorífica. O termo fritura é utilizado em duas situações distintas, nomeadamente: o salteado, confeção em que se utiliza uma pequena quantidade de gordura ou óleo, e a fritura de imersão que, como o próprio nome indica, é uma confeção em que ocorre a imersão total (*deep frying*) do alimento num banho de gordura ou óleo [82].

O processo de fritura pode ser descrito de uma forma simplista por duas fases [81]:

- 1^a fase - desidratação parcial dos alimentos. Durante esta fase, a água de composição e os materiais nela solubilizados são retirados do interior dos alimentos para o exterior.
- 2^a fase - entrada do óleo nos alimentos. O óleo vai ocupar parte do espaço deixado livre pela água o que confere aos alimentos um sabor característico. A profundidade de penetração está condicionada pela humidade, forma e volume do alimento e, ainda, pelo tempo e temperatura de fritura.

Sendo a química da fritura muito complexa, não se consegue, com toda a segurança, quantificar o tipo de alterações que ocorrem nos banhos durante a sua utilização. Sabe-se que as temperaturas elevadas, a presença de oxigénio e a exposição à luz desencadeiam alterações, como o aparecimento de odores, sabores, alterações de cor e de viscosidade muito variadas.

Destacam-se as seguintes alterações durante a utilização dos óleos [85, 81]:

- cor - altera-se devido à transferência dos pigmentos dos alimentos e à oxidação dos mesmos; à medida que o óleo escurece pode transmitir essa cor aos alimentos nele preparados, dando a ideia que já estão fritos quando na realidade não estão;
- oxidação - reação do oxigénio com o óleo, resultando na formação de álcoois e ácidos entre outros produtos, podendo o processo ser acelerado com elevadas temperaturas, que podem resultar no aparecimento abundante de espuma no óleo;
- polimerização - reações que ocorrem nos óleos a temperaturas elevadas com formação de moléculas de grandes dimensões, os polímeros. A manutenção da

temperatura do óleo demasiado elevada durante um período de tempo demasiado longo pode resultar na produção de altos níveis de polímeros;

- hidrólise - reação do óleo com a água com formação de diglicéridos e de ácidos gordos livres. Esta reação está altamente dependente da quantidade de água do alimento, temperatura do óleo, número de utilizações do óleo (aquecimento/arrefecimento) e sujidade no óleo;
- cheiro - aroma desagradável e que traduz uma acidificação mais ou menos avançada;
- sabor - a alteração dos óleos transmite normalmente um sabor desagradável aos alimentos nele confeccionados.

Face ao exposto, o processo de controlo de qualidade do óleo e a sua substituição demonstram ser uma tarefa de elevada importância. O desafio que se coloca reside na determinação do momento exato em que deve ser trocado o óleo, sem correr o risco de o inutilizar ainda em condições para ser utilizado.

4.2.1. Temperatura

As altas temperaturas ($180\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$) são responsáveis pela deterioração acelerada do óleo. Para aumentar a rapidez do processo de fritura, pode haver a tendência de aumentar a temperatura, mas este facto traz desvantagens não só de incumprimento legal, mas também económicas: aumenta a frequência com que o óleo tem de ser renovado e o respetivo custo da operação, há perda de óleo por formação de aerossóis e por penetração no alimento [82]. A tabela 4.1, indica as temperaturas críticas para cada uma das gorduras, isto é, as temperaturas a partir das quais estas se degradam rapidamente [85].

De acordo com os valores da tabela 4.1 constata-se que a maior parte dos óleos não são adequados para preparar os alimentos pois possuem uma temperatura de degradação inferior à temperatura de fritura ($\sim 180\text{ }^{\circ}\text{C}$), verifica-se também que os óleos mais indicados para fritar são o azeite, o óleo de amendoim e o óleo de palma [81].

Durante a fritura, com o aumento da temperatura é transferido calor para o alimento, e ao atingir o ponto de ebulição da água, esta começa a libertar-se sob a forma de vapor. A libertação da água do alimento vai diminuir ligeiramente a temperatura do óleo,

Tipo de Óleo	Temperatura de degradação ($^{\circ}C$)
Óleo de Palma	240 $^{\circ}C$
Óleo de Amendoim	220 $^{\circ}C$
Azeite	210 $^{\circ}C$
Banha de Porco	180 $^{\circ}C$
Óleo de Girassol	170 $^{\circ}C$
Óleo de Soja	170 $^{\circ}C$
Óleo de Colza	160 $^{\circ}C$
Óleo de Milho	160 $^{\circ}C$
Margarina	150 $^{\circ}C$
Manteiga	110 $^{\circ}C$

Tabela 4.1.: Temperaturas de degradação dos diversos tipos de óleos e gorduras. Adaptado de: [81]

enquanto a temperatura do alimento continua a aumentar. Durante este processo assiste-se à desidratação do alimento, ocorrendo a libertação de vapor e existindo movimento de água, das camadas mais internas para as camadas mais externas [86]. A diminuição do teor de água do alimento vai criar um potencial que favorece a absorção de óleo para o seu interior. Essa entrada de óleo é limitada pelo vapor de água, formando-se assim duas zonas distintas durante o processo de fritura: a região da superfície, onde ocorrem a maioria das transformações (perda de água, entrada de óleo) e a zona mais interior do alimento, onde não ocorrem tantas transformações, muito devido ao fato de a temperatura nesta região não ser tão elevada como na superfície (temperatura no interior do alimento ronda os 100 $^{\circ}C$) [87].

É conveniente que o equipamento de fritura possua incorporado um termostato ou outro tipo de aparelho de controlo da temperatura, de forma a que a temperatura do óleo não ultrapasse os 180 $^{\circ}C$ exigidos por lei [81].

4.2.2. Efeito da fritura no óleo

O aquecimento prolongado de óleos a elevadas temperaturas que são utilizadas durante o processo de fritura, quando na presença de oxigénio e humidade libertada pelos alimentos, provoca a oxidação do óleo, o que origina a formação de diversos ácidos e de carbonilos voláteis. Estes provocam o escurecimento do óleo, para além de sabores desagradáveis. Os vários produtos de degradação são classificados como produtos de decomposição voláteis (PDV) e os produtos de decomposição não-voláteis

(PDNV). Os PDV tem um peso molecular menor do que o óleo e são libertados no vapor da fritadeira. Analisando o vapor libertado pela fritadeira foram encontrados mais de 220 componentes diferentes, que formam o fumo e o cheiro de fritura. No entanto, estes componentes também estão presentes no óleo e contribuem para o sabor dos produtos fritos. Já os PDNVs têm origem em oxidações e polimerizações do óleo, formando sedimentos nas regiões laterais das fritadeiras. A polimerização na ausência de oxigénio produz compostos cíclicos e polímeros de elevado peso molecular, que aumentam a viscosidade do óleo [88]. Estes processos provocam a diminuição do coeficiente de transferência de calor de superfície durante a fritura e o aumento da quantidade de óleo que se entranha no alimento. Muitos destes compostos são polares e atrasam a evaporação de água, criando espuma no óleo. No entanto, estes compostos polares também trazem efeitos benéficos para a fritura: são responsáveis por transmitir sabor aos alimentos fritos, contribuem para a cor dourada característica dos fritos, e para a retenção de gordura. O óleo que tenha sido utilizado por um período curto possui melhor desempenho de fritura que óleo de fritar fresco, isto porque os compostos polares formados promovem um melhor contacto entre o óleo e água, tanto a que se encontra na superfície do alimento como a que é libertada do alimento sob a forma de vapor. Isto ajuda a uma melhor e mais uniforme transferência de calor e absorção de sabor. No entanto, a qualidade deteriora-se quando o óleo é usado por um período mais longo. Na utilização comercial, de forma contínua, o óleo que é absorvido pelo alimento é continuamente repostado por óleo novo e os PDNVs são removidos por filtragem, tentando assim manter a qualidade do óleo a um nível ótimo [88].

A oxidação de vitaminas solúveis em gordura resulta na perda de valor nutricional. O retinol, os carotenóides e os tocoferóis são todos destruídos, contribuindo para as alterações de sabor e cor dos óleos. No entanto, a oxidação preferencial dos tocoferóis tem um efeito protetor sobre o óleo (antioxidante). Isto é particularmente importante, pois como a maioria dos óleos de fritura são de origem vegetal, contêm uma grande proporção de gorduras saturadas que são facilmente oxidadas. O ácido gordo essencial (ácido linoleico) é rapidamente perdido, gerando a alteração do equilíbrio de ácidos gordos saturados e não saturados presentes no óleo [88].

4.2.3. Efeito da fritura nos alimentos

O principal objetivo da fritura é criar alimentos com características organoléticas únicas. Estas qualidades alimentares são desenvolvidas por um conjunto de reações que ocorrem durante o processo de fritura e devido à absorção de compostos provenientes do óleo de fritura. Os principais fatores que controlam as alterações de cor e sabor de um determinado alimento, são [88]:

- o tipo de óleo usado no processo de fritura;
- a idade e história térmica do óleo;
- a tensão entre o óleo e o alimento a ser frito;
- a temperatura e o tempo de fritura;
- o tamanho, teor de humidade e características da superfície do alimento.

Cada um desses fatores, em conjunto com algum pré-tratamento, tal como branqueamento ou desidratação parcial, influencia a quantidade de óleo absorvido pelo alimento. Em muitos alimentos fritos, o óleo chega a constituir até 45 % do produto resultante do processo de fritura. O teor de gordura dos alimentos aumenta devido à absorção de óleo, mas a importância nutricional destes é difícil de determinar. Quando os produtos fritos constituem uma grande fração da dieta, o excesso de consumo de gordura pode resultar no aparecimento de problemas de saúde, sendo os principais a obesidade, e doenças cardíacas [88].

4.2.4. Implicação da fritura na saúde

As gorduras, ou lípidos, sofrem alterações bastante complexas, que são aceleradas pela exposição à luz, a temperaturas altas e ao contacto com o ar, podendo originar modificações ao nível do valor nutritivo dos alimentos, com implicações diretas na saúde dos eventuais consumidores [81].

Comparando a fritura com outros métodos de confeção de alimentos, verifica-se que esta possui algumas vantagens nutricionais, pois o tempo de fritura é muito curto, a temperatura no interior do produto (exceto na região da crosta) é inferior a 100 °C, e as vitaminas hidrossolúveis não se dissolvem no óleo. Devido a estes fatores, conseguem-se obter alimentos com um maior teor de vitaminas sensíveis ao calor, em comparação com os cozidos ou assados (nomeadamente a vitamina C) [82].

Se os óleos de fritura não forem utilizados adequadamente, podem formar-se durante o processo de fritura, alguns produtos tóxicos, tais como acrilamida e peróxidos. Além disso, as alterações físicas e químicas dos óleos de fritura podem levar à produção de aldeídos, cetonas, radicais livres e ácidos gordos trans que são incorporados nos alimentos fritos e são prejudiciais à saúde humana. Tais compostos podem causar doenças de natureza cardiovascular, além de cancro, artrite e envelhecimento precoce [89].

Os compostos formados a partir da decomposição de ácidos gordos insaturados, fenómeno que pode ocorrer durante o processo de fritura, afetam a disponibilidade dos ácidos gordos essenciais, responsáveis pela biossíntese de compostos que participam na regulação da pressão arterial, frequência cardíaca, resposta imunológica, nos processos da coagulação sanguínea e no funcionamento do sistema nervoso central. Assim, verifica-se que para além dos efeitos prejudiciais de alguns dos compostos tóxicos gerados devido ao uso inadequado dos óleos, também existe uma diminuição dos efeitos benéficos à saúde, que seria provocada pelos ácidos gordos essenciais presentes nos óleos [89].

Estudos efetuados em óleos que foram aquecidos por longos períodos, a temperaturas elevadas, demonstraram que os produtos resultantes contêm mais de 50 % de compostos polares totais, provocando estes severas irritações do trato gastrointestinal, diarreia, redução do crescimento e, em alguns casos, morte de animais (ratos) em laboratório [89].

4.3. Quando se deve Mudar o Óleo

A correta utilização de óleos alimentares passa pelo controlo de qualidade durante a sua utilização, pelo que é evidente a necessidade de existirem métodos de análise da qualidade do óleo que permitam indicar qual a altura indicada para efetuar a troca do óleo de forma a que se possam minimizar estes efeitos prejudiciais para a saúde que resultam muitas das vezes da incorreta utilização dos mesmos.

Não existe nenhuma receita, que indique qual a altura indicada para a mudança do óleo, uma vez que a alteração dos óleos para além de dependerem do seu tipo e da temperatura de fritura, depende também do tipo de alimento que se frita. Por exemplo, o peixe degrada mais rapidamente o óleo do que a batata. Existem, no entanto, vários aspetos indicativos da alteração dos óleos de fritura, que podem ajudar na tomada de decisão de substituir o óleo por um novo [85]:

- alteração da cor: o escurecimento do óleo indica que este já sofreu reações de oxidação;
- alteração do cheiro: a emissão de odores desagradáveis relaciona-se com a acidificação do mesmo;
- alteração do sabor: a alteração do óleo confere um sabor desagradável devido à sua acidificação;
- aumento da viscosidade;
- libertação de fumos a temperaturas inferiores à temperatura de fritura (170°C);
- formação de espuma abundante resultante das reações de oxidação, aceleradas pelas altas temperaturas.

No entanto, nenhum destes métodos indica de forma precisa qual o momento indicado para efetuar a troca do óleo, a partir do qual a sua utilização começa a ser prejudicial para os alimentos, e como consequência para quem os irá consumir.

4.4. Monitorização da qualidade de óleo alimentar

Existem diversos métodos que permitem avaliar o nível de degradação dos óleos. Esses métodos baseiam-se na determinação de um ou mais parâmetros químicos, ou na medição de variações de propriedades físicas dos óleos. Os vários métodos, diferenciam-se, pelo tempo necessário até se obter um resultado, o custo da implementação do método e a fiabilidade dos resultados.

Das características físicas que têm sido utilizadas para a análise dos óleos pode destacar-se a avaliação organoléptica, a viscosidade, o índice de refração e as alterações da constante dielétrica dos óleos, sendo os métodos descritos abaixo:

- a avaliação organoléptica consiste na avaliação do cheiro e do sabor do óleo. Para minimizar o erro da medição, esta avaliação é efetuada por um conjunto de pessoas com uma maior sensibilidade ao cheiro e sabor. No entanto, este método apresenta como desvantagens a existência do erro humano e a consequente baixa reprodutibilidade do método [90];
- a viscosidade mede a fricção interna entre as moléculas. Com o aumento da temperatura e do tempo de fritura, a quantidade de polímeros existentes no óleo

vai aumentar. Este facto origina um aumento da viscosidade e da quantidade de espuma produzida [91].

- o índice de refração dos óleos também varia de acordo com a qualidade do mesmo, podendo por isso ser utilizado como método de análise para inferir a sua qualidade. Assim, foi verificado que um aumento do índice de refração coincide com a deteção de odores no óleo. Verificou-se ainda que o índice de refração varia com as várias fases da autooxidação lipídica [90].
- a variação da constante dielétrica dos óleos é monitorizada através de um teste de análise rápido, que tem por base essa variação à medida que os óleos se vão degradando. Assim, em estudos realizados, verificou-se que a constante dielétrica diminui quando a temperatura de medida aumenta, isto porque, devido ao aumento da temperatura ocorre uma diminuição da densidade do óleo, o que leva ao aumento na mobilidade das moléculas, facilitando desta forma o efeito do forte campo elétrico interno. Com o tempo de fritura verifica-se o aumento da constante dielétrica, devido ao aumento de compostos polares, que tal como foi dito atrás, aumentam com o aumento da degradação do óleo. Existe no mercado um dispositivo eletrónico denominado “Food Oil Sensor - FOS” que efetua a análise da qualidade dos óleos através da medição da constante dielétrica, tendo por referencia amostras de óleo não usado [92].

Relativamente aos métodos que se baseiam na determinação de um ou mais parâmetros químicos para a análise dos óleos, destacam-se a avaliação do índice de iodo, a temperatura a partir da qual o óleo começa a libertar fumos, o teste dos materiais alcalinos contaminantes e a determinação dos compostos polares totais, sendo os princípios dos métodos descritos de seguida:

- o índice de iodo relaciona-se com a quantidade de duplas ligações presentes na amostra de óleo. Com o aquecimento do óleo verifica-se uma diminuição do número de insaturações. Tendo em conta isto, podem-se comparar índices de iodo de amostras de óleo (do mesmo tipo) usado e não usado, sendo possível estimar o grau de degradação do óleo usado. Este método permite também diferenciar óleos de diferentes tipos, isto porque, cada tipo de óleo tem o seu índice de iodo característico [93]. É recomendada a substituição do óleo quando se verificar uma diminuição do índice de iodo de $16 \text{ g } I_2/100 \text{ g}$ em relação ao índice de iodo do óleo fresco [94];

- relativamente à temperatura, verificou-se que quanto maior é o estado de degradação dos óleos, menor é a temperatura a partir da qual se inicia a libertação de fumos, sendo este um dos métodos que indiciam a necessidade de trocar o óleo [95]. A diminuição da temperatura a que se inicia a libertação de fumos do óleo deve-se à acumulação de compostos voláteis, tais como ácidos gordos livres [91]. Este método tem como desvantagens a falta de reprodutibilidade e o fato de os resultados não refletirem um grau de degradação do óleo. Óleos usados chegam a ter temperaturas de libertação de fumo inferiores em 50 °C, quando comparadas com as temperaturas de libertação de fumo dos óleos novos [94];
- o teste dos materiais alcalinos contaminantes consiste num teste rápido que permite analisar a qualidade do óleo. Nessa análise, este teste tem como princípio a medição do pH. É sabido que os óleos de fritar frescos possuem um pH de aproximadamente 3,0 enquanto os óleos degradados possuem um pH maior ou igual a 6,5. Os materiais alcalinos contaminantes, que são originados a partir de resíduos provenientes dos óleos, dos alimentos e dos produtos de degradação resultantes da fritura, vão aumentar o pH dos óleos [96];
- a determinação dos CPT é outro método importante. Durante o processo de fritura, a degradação do óleo vai aumentando, e verifica-se um aumento da quantidade de CPT [97]. É possível determinar a percentagem de compostos polares totais recorrendo à técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (em inglês: *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), embora este método de análise apresente algumas desvantagens, como por exemplo, um tempo de análise longo, constituindo este processo um método dispendioso em termos de tempo e dinheiro [98].

Para além destas análises de propriedades químicas e físicas das amostras, existe um conjunto de testes colorimétricos com diferentes princípios que permitem uma análise rápida da qualidade dos óleos. De seguida são enumerados três desses testes colorimétricos:

- o primeiro teste, denominado “RAU Test®” contém indicadores redox. Estes indicadores redox utilizados no teste vão reagir com a quantidade total de compostos oxidados que estão presentes na amostra de óleo a analisar. Da mistura da amostra de óleo com os reagentes redox, vai originar-se uma solução com uma cor característica que será comparada com uma escala pré-definida de quatro cores, que terão diferentes significados, onde a cor 1 significa bom, a cor 2

ainda bom, a cor 3 qualidade intermédia e a cor 4 significa mau. Este teste tem como desvantagem o fato de utilizar solventes orgânicos inflamáveis, o que pode ser perigoso se os testes forem realizados na proximidade de uma fritadeira [99];

- o Fritest® é outro teste colorimétrico, sensível à quantidade de compostos carbonílicos presentes no óleo a analisar. Tal como no caso anterior, após a mistura da amostra a analisar com os reagentes do teste colorimétrico desenvolve-se uma cor que é comparada com uma escala pré-definida. Neste teste a escala pré-definida tem três cores possíveis, sendo que 1 significa bom, 2 intermédio e 3 má qualidade [99];
- por ultimo, o terceiro teste colorimétrico, denominado Spot Test®, avalia o grau de oxidação em óleos aquecidos. Este teste é sensível à presença de ácidos gordos livres e funciona como um indicador de ranço. O teste consiste na adição de uma gota de óleo numa placa coberta com sílica gel, placa essa que contém incorporado um indicador ácido/ base. O pH inicial deste conjunto é 7,3, o que vai originar cor azul. Dependendo do nível de ácidos gordos livres existente na amostra, a cor do conjunto pode variar de azul a amarelo [99].

Outra das técnicas que começa a ser utilizada, para o estudo do nível de degradação dos óleos é a espectroscopia. A espectroscopia na região do infravermelho tem sido utilizada na avaliação do ranço, desempenhando um papel particularmente importante na identificação de grupos funcionais não característicos e de compostos que contêm duplas ligações. O aparecimento de bandas próximo dos 2930 nm corresponde à formação de hidroperóxidos, enquanto o desaparecimento de uma banda próxima dos 3200 nm corresponde a uma substituição de um hidrogénio de uma dupla ligação por um radical livre. Um aumento da banda de absorção a 10309 nm indica que ocorreram formação de duplas ligações com configuração trans, e o aparecimento de bandas adicionais próximas dos 5715 nm é um indício da formação de aldeídos, cetonas ou ácidos [100].

Existem alguns estudos realizados, que mostram que a utilização da espectroscopia na região do infravermelho próximo poder ser uma técnica muito útil para aferir a qualidade dos óleos, através da medição dos níveis de oxidação dos mesmos. Nesses estudos realizados, a região espectral NIR que é utilizada para medir o nível de oxidação dos óleos varia entre os 1100 e os 2500 nm. Estudos mais recentes, relatam a utilização da espectroscopia NIR para a determinação do índice de iodo e dos níveis de ácidos gordos livres presentes nas amostras de óleo degradado [1, 2].

Tendo em conta todos os testes de análise da qualidade do óleo que foram descritos, é possível concluir que os testes obedecem a diferentes princípios, com um mesmo objetivo final de avaliar a qualidade do óleo.

De entre todos os testes indicados tem que se destacar a análise feita para determinar os compostos polares totais. Esta análise tem de ser destacada, pois os compostos polares totais constituem o parâmetro de classificação da qualidade do óleo que se encontra definido na legislação (Decreto-Lei n.º 1135/95). O método de HPLC é considerado um dos mais precisos na avaliação da qualidade dos óleos de fritura. No entanto é um processo bastante demorado (demora cerca de 5 a 6 horas) e é também bastante dispendioso, pois são necessárias uma grande quantidade de soluções. No entanto, devido à sua fiabilidade na avaliação da qualidade do óleo, existem diversos países, como por exemplo Portugal, Alemanha, Suíça, França, Itália e Bélgica que estabeleceram quantidades limites de compostos polares totais que os óleos podem conter. O valor em causa, é na maioria dos países de 25%, devendo os óleos serem substituídos quando este limite é atingido. Submetendo óleos novos, a esta mesma análise verifica-se que os óleos novos normalmente contêm uma % CPT que deve variar entre os 0,4 e os 6,4 % [94].

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares

Nesta secção apresenta-se o estudo realizado para desenvolvimento de um sensor espectroscópico NIR para determinação da % CPT de amostras de óleo. A motivação parte do fato de a legislação portuguesa estabelecer como parâmetro de qualidade dos óleos a quantidade de compostos polares que estes contêm, e o método que permite a análise deste constituinte dos óleos ser um método bastante demorado e dispendioso. Assim, foram realizadas um conjunto de medidas de absorvância de amostras de óleo de fritura, na gama do visível (400 - 1000 nm) e do infravermelho próximo (900 - 1700 nm). O objetivo destas medições passa por identificar potenciais bandas de absorção que possam ser sensíveis ao conteúdo percentual de compostos polares totais, constituindo assim um método indicativo da qualidade do óleo.

O Decreto-Lei n.º 1135/95 estabelece como limite de qualidade uma percentagem de 25% de compostos polares totais. Assim, a gama de interesse para o estudo em questão compreende amostras que possuem % CPT que variam entre os 15 e os

30%. Para todas as amostras estudadas, foram recolhidos espectros de absorvância nas gamas VIS e NIR. Foi ainda realizado um teste para verificar a repetibilidade das medidas, sendo efetuadas 15 medições em duas amostras, uma com uma baixa % CPT e outra com alta % CPT e estudou-se o efeito da temperatura na medida.

4.5.1. Amostras

As amostras utilizadas no desenvolvimento do presente estudo foram fornecidas pela empresa AMBIFOOD, sendo a % CPT de cada amostra conhecida, pois foi previamente determinada através da técnica de HPLC. As amostras em questão foram recolhidas em dias diferentes, sendo sujeitas a diferentes tempos de fritura, diferentes temperatura de fritura, fritura de diversos tipos de alimentos (transformados, carne, peixe, batatas), em diferentes fritadeiras, formando assim um conjunto de amostras com diferentes níveis de % CPT, possuindo algumas delas, valores que encaixam na gama de interesse deste estudo.

Para a realização do estudo, foram analisados três conjuntos distintos de amostras:

- o primeiro conjunto de amostras é constituído por 32 amostras, cujas principais características se encontram resumidas na tabela do Anexo A.2. Este conjunto de amostras é constituído por dois tipos de óleos, FryTop e Frigi, de diferentes lotes. Foram utilizados na fritura de diferentes tipos de alimentos, a diferentes temperaturas e durante períodos de tempo variáveis. A % CPT destas amostras foi determinada recorrendo ao HPLC, apresentando resultados que variam dos 6,9% para a amostra com menor % CPT aos 13,5% para a amostra com maior % CPT. Embora estas amostras não se enquadrem na gama de interesse deste estudo, estas foram analisadas, sendo recolhidos espectros de absorvância da região do VIS e do NIR para cada uma delas. Os espectros foram recolhidos com as amostras à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$);
- o segundo conjunto de amostras é constituído por 13 amostras. Estas amostras resultaram da diluição seriada de um óleo com elevado teor de compostos polares totais com um óleo alimentar novo. A técnica utilizada para determinar a % CPT foi novamente o HPLC, apresentando neste caso resultados que variam entre os 10,8% e os 32,4% de CPT. Neste conjunto de amostras já se obtiveram resultados que se enquadram no intervalo de interesse do estudo. Este conjunto de amostras foi analisado, sendo recolhido um espectro da região do VIS e outro

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares

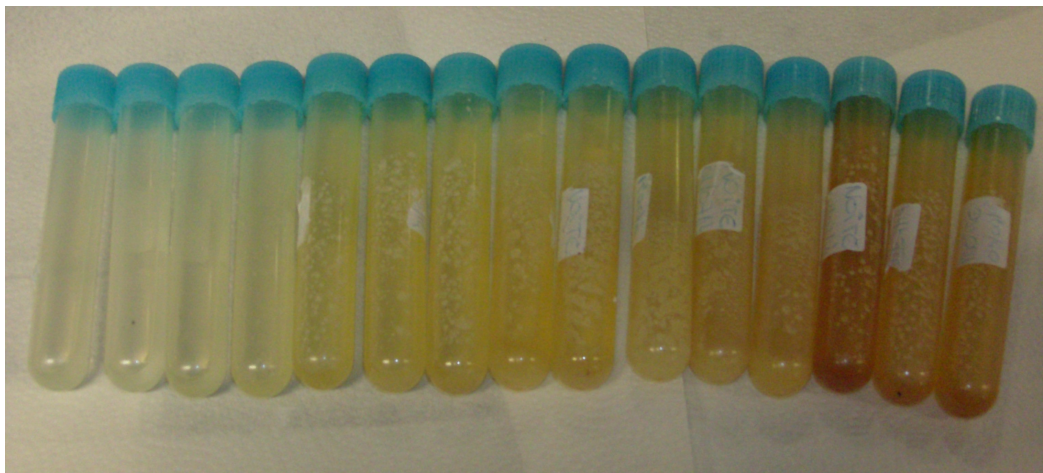


Figura 4.1.: Registo fotográfico do conjunto de amostras estudadas.

da região do NIR, para cada uma das amostras. Os espectros foram recolhidos com as amostras à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$);

- o terceiro conjunto de amostras é constituído por 15 amostras, cujo registo fotográfico é apresentado na Figura 4.1. Estas amostras foram recolhidas de uma única fritadeira, que era utilizada para fritar diferentes tipos de alimentos (batatas e transformados). As amostras foram recolhidas no início do dia, antes de iniciar o processo de fritura, e no final do dia, depois de finalizar o processo de fritura. Foi determinada a % CPT dessas 15 amostras, recorrendo ao HPLC, apresentando resultados que variam entre os 5,4% e os 35,1% de CPT.

O terceiro conjunto de amostras foi analisado mais do que uma vez, sob diferentes condições:

- recolha de espectros para a região do VIS e para a região do NIR, para cada uma das amostras, realizada com as amostras à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$);
- foram recolhidos espectros para as regiões do VIS e NIR, de cada amostra, procedendo-se à sua homogeneização, por agitação, antes da extração do volume a ser analisado. As amostras encontravam-se à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$);
- recolha de espectros para as regiões do VIS e do IV, procedendo-se à homogeneização da amostra por agitação e aquecimento das amostras em banho-maria

à temperatura de 60°C;

- estudo da repetibilidade das medidas, sendo para isso efetuadas 15 medições dos espectros da região do VIS e NIR, em duas amostras, uma com uma baixa % CPT e outra com alta % CPT. Foi realizado um teste com as amostras à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) e um outro com as amostras aquecidas num banho-maria à temperatura de 60°C, sendo as amostras homogeneizadas por agitação em ambos os casos.

4.5.2. Instrumentação utilizada

A Figura 4.2 (a), ilustra a montagem experimental utilizada para a análise das amostras de óleo, sendo apresentado na Figura 4.2 (b) o respetivo diagrama de blocos.

Tal como no estudo efetuado à cartilagem, foram utilizados dois espectrómetros compactos, um para a região do visível (USB 2000, Ocean Optics) e outro para a região do infravermelho próximo (NIR Quest 512, Ocean Optics). A fonte de luz branca (HL-200, Ocean Optics), uma fibra ótica multimodo ($\text{NA}=0,39$, núcleo de $600\ \mu\text{m}$), um acoplador em fibra multimodo 1(in) x 2(out) (Split 400 - VIS-NIR, Ocean Optics), um porta cuvettes (ScanSci) e dois polarizadores.

As amostras líquidas a analisar foram colocadas em cuvettes plásticas, transparentes, de secção quadrada de $1\ \text{cm}^2$, e estas posicionadas no porta cuvettes. O porta cuvettes possui duas lentes que para além de permitirem o acoplamento das fibras óticas efetuam a colimação do feixe de luz, de modo a que o feixe de luz que atravessa a amostra seja um feixe colimado.

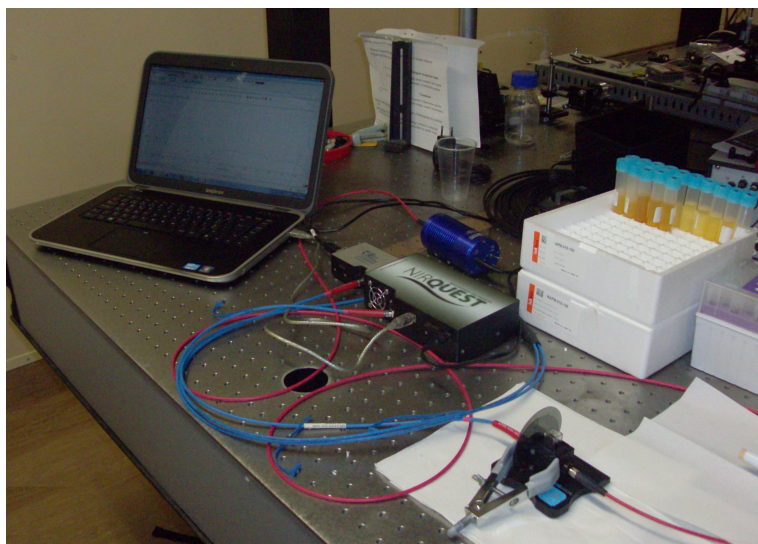
Como pode ser visto na Figura 4.2, para estabelecer a ligação entre a fonte de luz e o porta cuvettes foi utilizada uma fibra ótica multimodo ($\text{NA}=0,39$ e núcleo de $600\ \mu\text{m}$). A luz transmitida pela amostra é recolhida e focalizada num acoplador em fibra multimodo 1(in) x 2(out), com cada uma das duas saídas ligada a um dos espectrómetros. Desta forma, os espetros VIS e NIR são registados em simultâneo. Entre o porta amostras e o acoplador que recolhe a luz transmitida através da amostra são colocados dois polarizadores cruzados que servem para atenuar a intensidade de radiação que é conduzida para os espectrómetros.

Os espectros foram adquiridos através do software de controlo e aquisição de dados SpectraSuite da Ocean Optics.

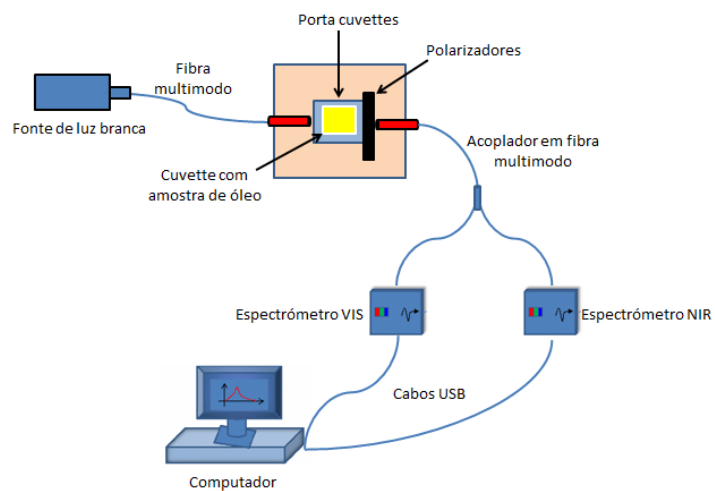
O protocolo de recolha de espectros consistiu em:

1. Medição de espectros de referencia:

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares



(a)



(b)

Figura 4.2.: Montagem experimental para a análise das amostras (a) e respetivo diagrama de blocos (b).

- a) Espectro “branco” $B(\lambda)$, correspondente ao espectro do sinal luminoso transmitido através do sistema ótico e cuvette vazia;
 - b) Espectro “escuro” $D(\lambda)$, correspondente ao sinal do espectrómetro quando a excitação luminosa está desligada;
2. Espectro “sinal” $S(\lambda)$, correspondente ao espectro do sinal luminoso transmitido através do sistema ótico + cuvette + amostra líquida, e corresponde a um percurso ótico de 1 cm (medido no ar);
 3. Conversão das medidas para absorvância, através da expressão:

$$A(\lambda) = -\log \left(\frac{S(\lambda) - D(\lambda)}{B(\lambda) - D(\lambda)} \right), \quad (4.1)$$

conversão feita diretamente no software de aquisição de dados - SpectraSuite;

4. Registo no disco dos espectros VIS e NIR para cada amostra.

4.5.3. Processamento de informação dos espectros de absorvância

No estudo sistemático, com vista à caracterização da região espectral dos 400 aos 1700 nm, foram analisadas as 60 amostras que compõem os três grupos definidos acima. Foram realizadas diversas medidas, sendo recolhidos para o total das amostras, cerca de 150 espectros na região VIS e outros 150 espectros na região NIR. O objetivo deste estudo espectroscópico é encontrar alguma característica, (amplitude, posição de picos de absorvância, diferença de amplitude entre dois comprimentos de onda) que possa ser diretamente relacionada com o conteúdo percentual de compostos polares totais das amostras.

Na análise dos espectros recolhidos na região do VIS, Figura 4.3, verifica-se uma forte absorção na região UV-VIS, ocorrendo o início do registo da absorvância a diferentes comprimentos de onda, de acordo com as características das amostras. Foi estudado esse fenómeno, de forma a verificar se este se correlaciona com a % CPT das amostras. A Figura 4.5, mostra a resposta típica na gama do infravermelho próximo. Seguindo o mesmo princípio de análise, e tentando correlacionar características espectroscópicas com a % CPT das amostras, foram realizadas algumas medidas de quantificação:

- estudo da posição dos picos de absorvância, registando a posição destes em amostras com diferentes percentagens de CPT. O estudo da posição de picos foi

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares

efetuado a partir de um algoritmo Matlab que identifica os máximos locais dos espectros;

- absorvância absoluta (equação 4.1), em diferentes comprimentos de onda (λ) e média de absorvância numa janela de 10 nm de uma zona da linha de base dos espectros;
- absorvância relativa - nesta análise seguiram-se três abordagens. Na primeira efetuou-se a diferença de absorvâncias em dois comprimentos de onda do espectro, sendo avaliadas no total um conjunto de seis diferenças. Na segunda abordagem efetuou-se a subtração do espectro de absorvância do óleo novo aos restantes espectros e analisaram-se as amplitudes das curvas resultantes, em diferentes comprimentos de onda, e numa janela de 10 nm correspondente à zona da *baseline* dos espectros. Na terceira efetuou-se uma medida, denominada de ΔY_2 , que relaciona as absorvâncias de três comprimentos de onda, sendo descrita por:

$$\Delta Y_2 = A_1 + A_2 - A_3,$$

os comprimentos de onda utilizados para o cálculo de ΔY_2 correspondem a comprimentos de onda de interesse, nomeadamente picos de absorção, ou λ onde se verifiquem diferenças entre espectros das várias amostras, de acordo com a sua % CPT.

- dinâmica relativa da absorvância, considerando três comprimentos de onda, no infravermelho próximo, para formar as medidas de ΔY_1 e $\bar{Y}$:

$$\Delta Y_1 = \frac{A_1}{A_{ref}} - \frac{A_2}{A_{ref}},$$

$$\bar{Y} = \frac{1}{2} \left(\frac{A_1}{A_{ref}} + \frac{A_2}{A_{ref}} \right).$$

A medida da dinâmica relativa da absorvância tenta quantificar o comportamento dos picos em torno de um ponto de referência, quando se varia a % CPT, aferindo a deslocação do pico no comprimento de onda, ou variações de amplitude, ou analogamente, a mudança do centro de massa do pico. A escolha da posição dos comprimentos de onda utilizados nos cálculos de ΔY_1 , $\bar{Y}$ foi feita da seguinte forma: o comprimento de onda de referência (λ_{ref}) deverá ser escolhido numa zona onde as curvas de absorvância de diferentes amostras apresentem comportamento semelhante (não parecem

variar com a % CPT), os comprimentos de onda para (λ_1) e (λ_2) são escolhidos em zonas da curva de absorvância onde existam diferenças visíveis (amplitude) para diferentes percentagens de CPT.

4.5.4. Análise

4.5.4.1. Características principais das curvas de absorvância de luz Visível

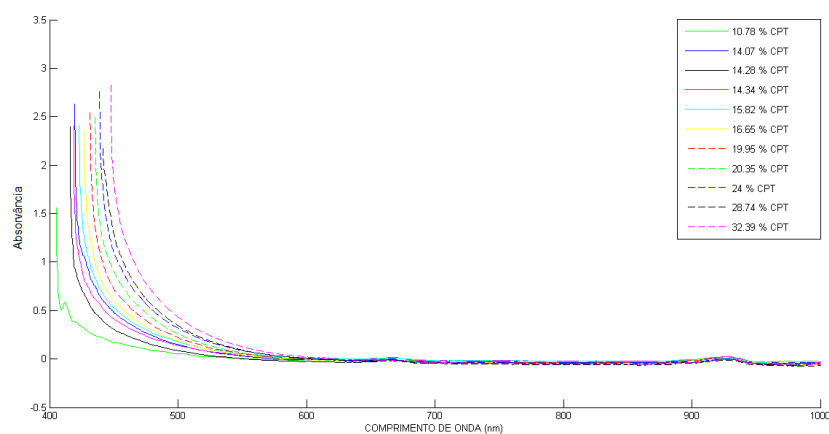
A Figura 4.3 (a) mostra o conjunto de espectros da região do VIS que foram recolhidos do conjunto de amostras 2. A Figura 4.3 (b) mostra em pormenor a zona dos 400 aos 470 nm desses mesmos espectros, indicando-se na legenda das Figuras o valor da % CPT de cada uma das amostras. Nos espectros recolhidos não se evidenciam picos característicos, verificando-se que existe uma forte absorção na zona UV-VIS, e que o início do registo da absorvância não acontece ao mesmo comprimento de onda para todas as amostras. De facto a absorção é tão grande que o espectrómetro não a consegue medir. Podia definir-se um limiar de deteção, mas este varia fortemente com o comprimento de onda, como se pode observar na Figura 4.3 (b). O Anexo A.3.1, contém os espectros da região VIS dos diferentes conjuntos de amostras analisados.

O aumento da concentração de compostos polares totais é normalmente acompanhado de um escurecimento das amostras de óleo, sendo este fator facilmente identificado visualmente. Este efeito também se verifica na medida de absorvância na gama visível, Figura 4.3 (b), ocorrendo um deslocamento gradual do limiar de absorvância das amostras desde os comprimentos de onda do azul para o vermelho. Tentando correlacionar este fenómeno com a qualidade do óleo, efetuou-se um estudo da posição do limiar de absorvância, representando graficamente essa posição (nm) em função da % CPT conhecida para cada uma das amostras. Assim, na Figura 4.4, estão representados os dados provenientes da análise dos espectros da região VIS dos 3 conjuntos de amostras estudadas, identificando-se quatro séries de dados, duas relativas ao conjunto um e dois, respetivamente, e as restantes relativas ao conjunto 3.

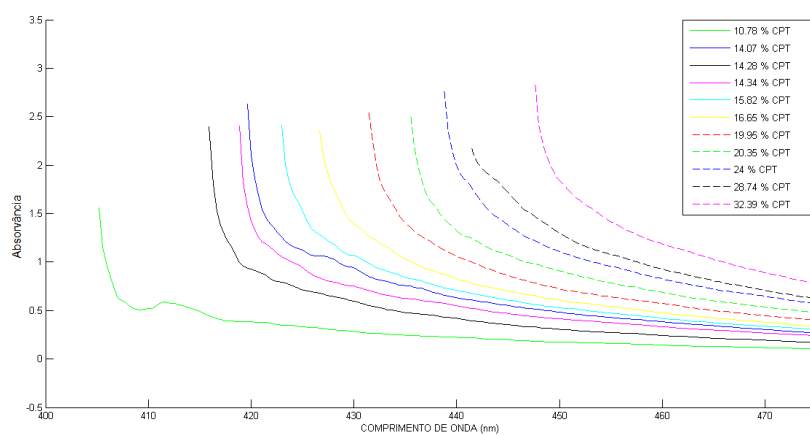
O conjunto 1 aparece com os resultados numa gama de percentagens de CPT que não é de relevo para este estudo, servindo no entanto para comprovar que o limiar da absorvância para amostras com baixa % CPT se situa em λ menores.

Os dados do conjunto 2 mostram uma relação quase linear entre a posição do limiar da absorvância e a % CPT, situando-se o limiar a λ maiores, quanto maior for a % CPT, o que era de esperar pela natureza das amostras (diluição).

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares



(a)



(b)

Figura 4.3.: Pormenor do espectro de absorção do Visível, que mostra as diferentes posições do início do registo da absorvância, para os diferentes óleos.

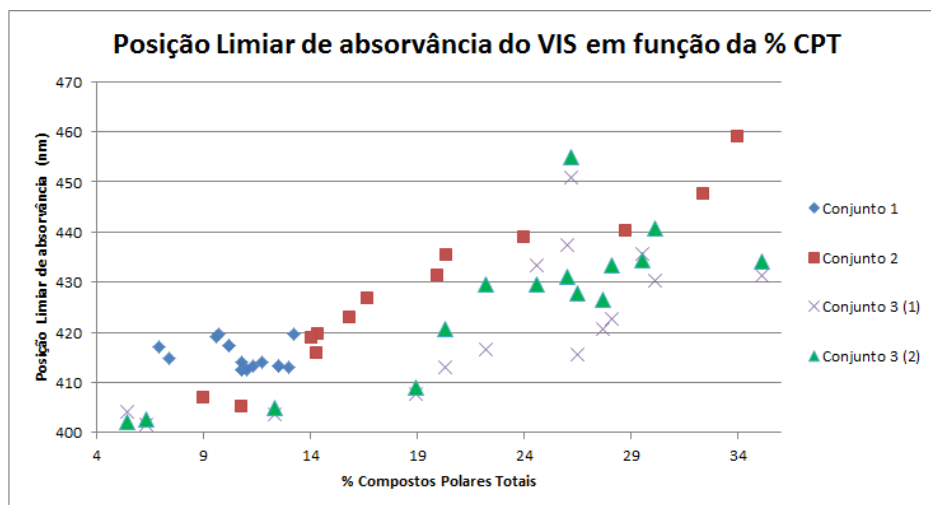


Figura 4.4.: Variação da posição do limiar de absorvância dos espectros do VIS, em função da % CPT, dos óleos dos conjuntos 1, 2 e 3. A série de resultados identificada como “Conjunto 3 (1)” refere-se às amostras do conjunto 3 analisadas à temperatura ambiente, enquanto o “Conjunto 3 (2)” refere-se às amostras do conjunto 3 analisadas após serem aquecidas no banho-maria a 60°C.

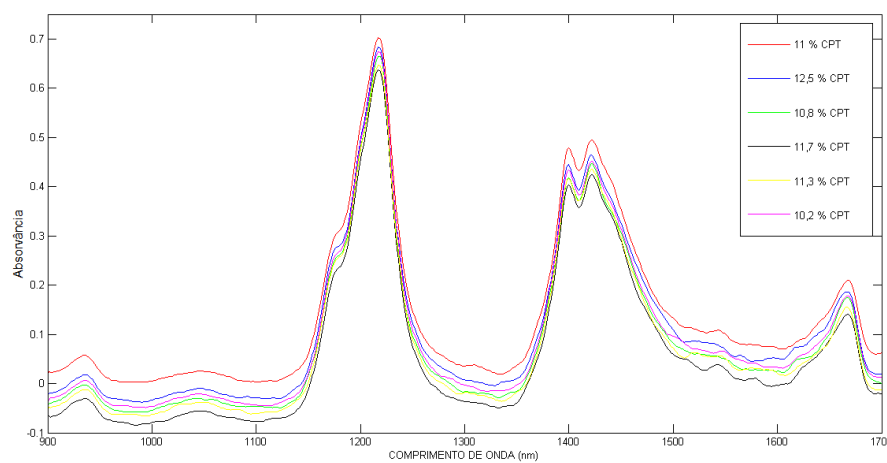
Relativamente aos resultados das duas análises do conjunto 3, a primeira conclusão a tirar é que existe variação da posição do limiar de absorvância, entre as medições efetuadas à temperatura ambiente e as efetuadas com as amostras aquecidas em banho-maria. Essa diferença é quase nula para amostras com baixa % CPT (até aproximadamente 19 %), sendo maior para as amostras com uma % CPT mais elevada. Apesar desta diferença, continua a verificar-se a tendência observada nos resultados do conjunto 2, ou seja, o λ a que está posicionado o limiar de absorvância aumenta com a % CPT, embora neste caso a relação não seja tão linear.

4.5.4.2. Características principais das curvas de absorvância NIR

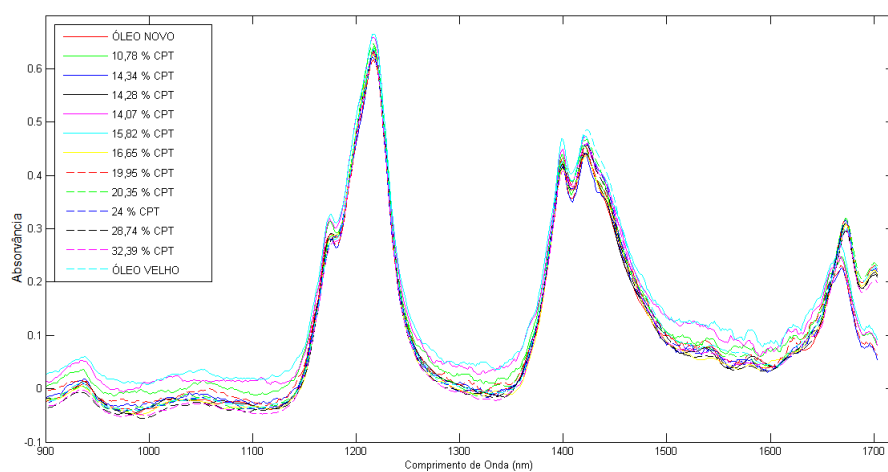
A Figura 4.5, mostra um conjunto de espectros da região do infravermelho próximo que foram recolhidos em amostras pertencentes ao conjunto 1 e 2 respetivamente.

Os resultados das medidas espectroscópicas efetuadas estão de acordo com os que têm sido descritos na literatura. Recentemente foram publicados trabalhos nos quais são estudados óleos alimentares de diferentes origens, recorrendo à utilização da espectroscopia NIR [101], [1, 102]. Embora nos estudos em questão a gama estudada seja mais ampla (1000 nm aos 2500 nm), na região que se sobrepõe ao nosso estudo

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares



(a)



(b)

Figura 4.5.: Representação de alguns dos espectros referentes a amostras com diferentes percentagens de CPT, na gama NIR: (a) espectros do conjunto 1; (b) espectros do conjunto 2.

(1000 nm a 1700 nm), o perfil dos espectros recolhidos é muito semelhante, estando presente em ambos os casos os picos característicos no comprimento de onda de 1200 nm e 1400 nm (aproximadamente 8300 cm^{-1} e 7100 cm^{-1}). A semelhança entre os resultados verifica-se, apesar de existirem diferenças na preparação das amostras, no processo de recolha dos espectros e na instrumentação utilizada. A Figura 4.6 (a) e (b), mostra um conjunto de espectros da região NIR retirados dos estudos referidos, onde é possível comprovar as semelhanças entre estes espectros e os obtidos no nosso estudo.

Analizando os espectros obtidos nas nossas medições, verifica-se a existência picos característicos, localizados na região dos 1200 nm, dos 1400 nm e entre os 1600 e os 1700 nm. Foi efetuado um estudo da posição destes picos característicos para as diversas amostras que compõem o conjunto 2 e 3, sendo os resultados apresentados nas Tabelas 4.2 e 4.3. O estudo da posição de picos foi efetuado a partir de um algoritmo Matlab que identifica os máximos locais dos espectros.

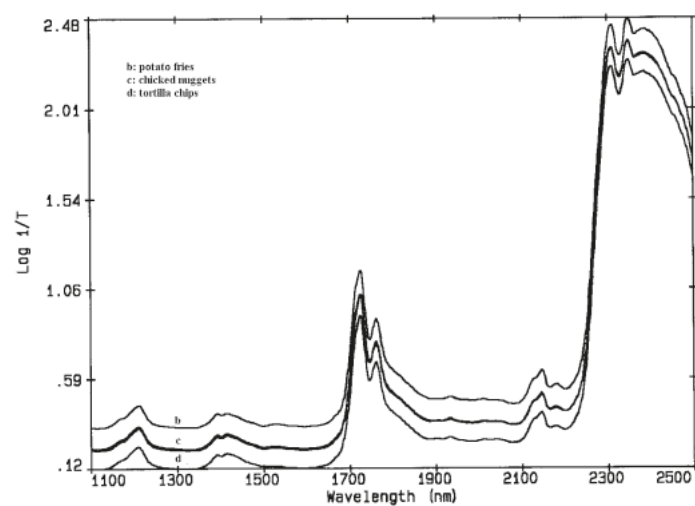
Os picos registados nos espectros do infravermelho próximo têm correlação com a estrutura molecular de constituintes de óleos: o pico observado na região dos 1200 nm deve-se à combinação de bandas e à segunda sobreposição da ligação C-H do metileno da cadeia alifática do óleo, ao passo que os dois picos que se registam na região em torno dos 1400 nm se devem às bandas de combinação C-H do metileno.

Outro dos pormenores a ressaltar tem a ver com a linha de base do espectro, que parece variar com diferentes condições de degradação dos óleos, Figura 4.5 (a). Nos espectros obtidos verifica-se que a linha de base dos espectros se localiza abaixo de zero em determinados comprimentos de onda, resultando isso da comparação da absorvância que é registada nos espectros do “sinal” e nos espectros de referência, que foram definidos na Secção 4.5.2. Observando a Figura 4.6 (a), retirada do estudo publicado por Du et al [101], nela estão apresentados três espectros da região do infravermelho, onde também se verifica a variação da linha de base dos espectros. Os três espectros são recolhidos de amostras de óleo que fritaram alimentos diferentes e possuem um nível de degradação diferente.

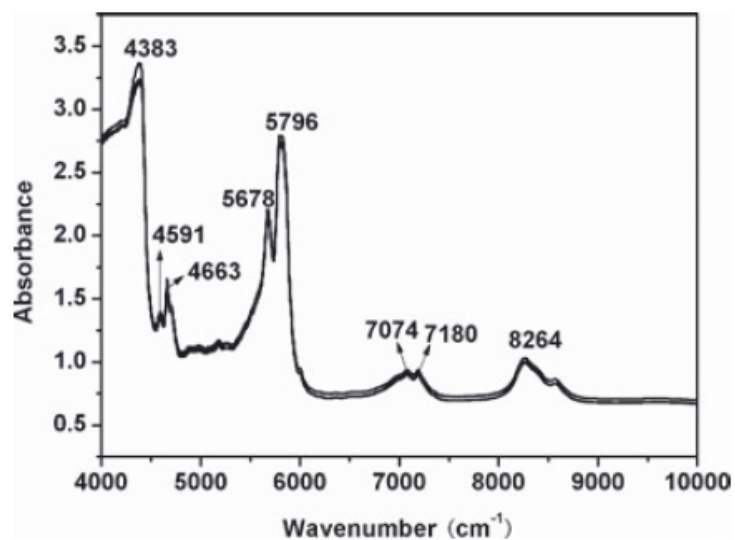
4.5.4.3. Relação da absorvância com a Percentagem CPT

Aplicando os princípios de processamento enunciados na Secção 4.5.3 aos espectros recolhidos do conjunto de amostras 2 e 3, procuram-se características espectroscópicas que possam ser diretamente correlacionadas com o conteúdo percentual de com-

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares



(a)



(b)

Figura 4.6.: Conjunto de espectros NIR de óleos de fritura: (a) adaptado de [101] e (b) adaptado de [102].

Amostra	Pico 1 (nm)	Amp. 1	Pico 2 (nm)	Amp. 2	Pico 3 (nm)	Amp. 3	Pico 4 (nm)	Amp. 4
1	1217,2	0,633	1400	0,433	1421,9	0,44	1673	0,317
2	1217,2	0,642	1400	0,439	1421,9	0,455	1669	0,248
3	1217,2	0,623	1400	0,429	1421,9	0,441	1669	0,226
4	1217,2	0,627	1400	0,414	1421,9	0,441	1673	0,311
5	1217,2	0,659	1400	0,449	1421,9	0,474	1668	0,247
6	1217,2	0,665	1400	0,469	1421,9	0,475	1668	0,27
7	1217,2	0,628	1400	0,412	1421,9	0,437	16734	0,308
8	1217,2	0,617	1400	0,43	1421,9	0,454	1668	0,23
9	1217,2	0,647	1400	0,424	1421,9	0,467	1673	0,319
10	1217,2	0,635	1400	0,417	1421,9	0,459	1673	0,316
11	1217,2	0,631	1400	0,42	1421,9	0,456	1673	0,296
12	1217,2	0,63	1400	0,409	1421,9	0,459	1673	0,3
13	1217,2	0,637	1400	0,427	1421,9	0,486	1674	0,302

Tabela 4.2.: Resultados da análise dos espectros do infravermelho próximo que compõem o conjunto 2.

postos polares totais das amostras. Centrando a análise dos espectros nas posições e amplitudes dos picos característicos referidos atrás, e em outros comprimentos de onda da *baseline* dos espectros (1000, 1300 e 1600 nm), avaliaram-se varias medidas quantitativas das diferentes condições dos óleos de fritura, face às percentagens de compostos polares previamente calculadas por HPLC.

Estudo da posição dos picos de absorvância

Efetuuou-se um estudo da posição dos picos característicos dos dois conjuntos de amostras, sendo registada o comprimento de onda dos picos e a respetiva absorvância. Os resultados estão sumariados nas Tabelas 4.2 e 4.3. Analisando os resultados presentes nas tabelas verifica-se que a posição dos três primeiros picos é a mesma para todas as amostras estudadas. Já o quarto pico, que se localiza na região dos 1670 nm, embora a sua posição não seja a mesma para as várias amostras as oscilações são muito pequenas, variando no máximo 6 nm. Com os resultados obtidos verifica-se que a posição dos picos de absorvância não varia com o nível de degradação dos óleos.

Medidas de absorvância absoluta

No estudo da absorvância absoluta começaram por se analisar os espectros dos diferentes óleos, recolhendo-se a sua amplitude em comprimentos de onda de interesse.

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares

Amostra	Pico 1 (nm)	Amp. 1	Pico 2 (nm)	Amp. 2	Pico 3 (nm)	Amp. 3	Pico 4 (nm)	Amp. 4
1	1217,2	0,652	1400	0,424	1421,9	0,436	1671	0,242
2	1217,2	0,631	1400	0,41	1421,9	0,424	1671	0,221
3	1217,2	0,643	1400	0,422	1421,9	0,45	1671	0,233
4	1217,2	0,781	1400	0,494	1421,9	0,526	1671	0,304
5	1217,2	0,859	1400	0,611	1421,9	0,64	1674	0,426
6	1217,2	0,872	1400	0,621	1421,9	0,66	1674	0,441
7	1217,2	0,906	1400	0,663	1421,9	0,693	1674	0,488
8	1217,2	0,907	1400	0,662	1421,9	0,669	1674	0,479
9	1217,2	0,795	1400	0,558	1421,9	0,593	1673	0,365
10	1217,2	0,865	1400	0,608	1421,9	0,643	1677	0,442
11	1217,2	0,823	1400	0,570	1421,9	0,617	1674	0,39
12	1217,2	0,806	1400	0,564	1421,9	0,602	1673	0,372
13	1217,2	0,853	1400	0,605	1421,9	0,636	1674	0,432
14	1217,2	0,73	1400	0,501	1421,9	0,53	1673	0,319
15	1217,2	0,746	1400	0,509	1421,9	0,539	1673	0,341

Tabela 4.3.: Resultados da análise dos espectros do infravermelho próximo que compõem o conjunto 3.

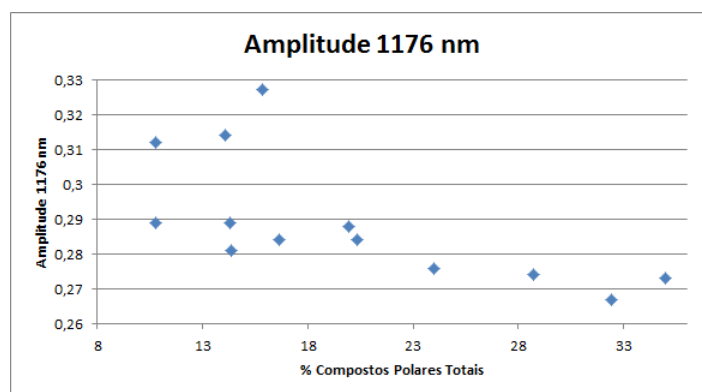
Os valores utilizados neste estudo correspondem aos picos característicos do infravermelho próximo.

Na análise do conjunto 2, foram recolhidas as amplitudes nos comprimentos de onda de 1176 nm e 1400 nm, que correspondem a um pico de absorção, caso dos 1400 nm, e o comprimentos de onda de 1176 nm corresponde ao cotovelo que existe em todos os espectros, antes do pico dos 1217,2 nm, sendo este escolhido pois apresenta variações para as diferentes amostras. Os resultados da análise do conjunto 2 estão representados na Figura 4.7, onde são apresentados os gráficos das medidas de amplitude em função da % CPT.

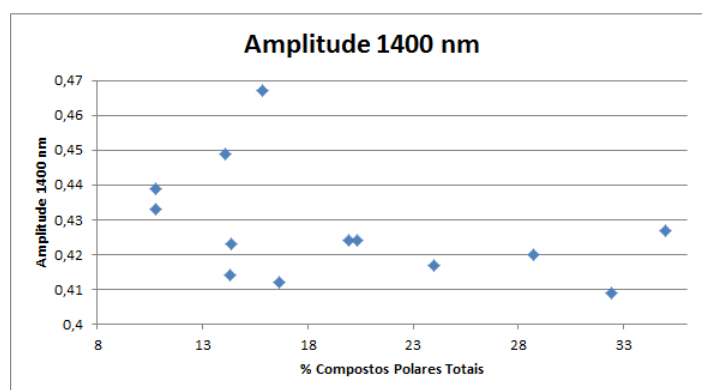
Analisando os gráficos da Figura 4.7 verifica-se um comportamento semelhante nos dois comprimentos de onda, sendo pouco expressivo. Entre as diversas amostras verifica-se que a amplitude é maior para amostras que possuam uma % CPT mais baixa, sendo esse facto mais evidente na análise do comprimento de onda de 1176 nm.

O estudo das amostras do conjunto 3, revela maior diversidade de resultados, Figura 4.8, derivado das diferentes análises realizadas em diferentes condições, descritas na Secção 4.5.1.

Por observação dos espectros representados na Figura 4.8, torna-se evidente que as condições de medida influenciam muito os seus resultados. Os espectros presentes nos gráficos das Figuras 4.8 (a) e (c) embora sejam recolhidos em condições diferentes apresentam resultados similares na linha de base, próxima de zero, que



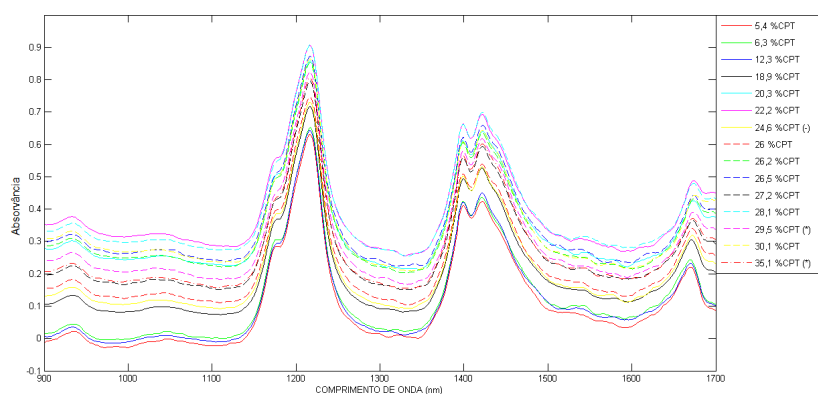
(a)



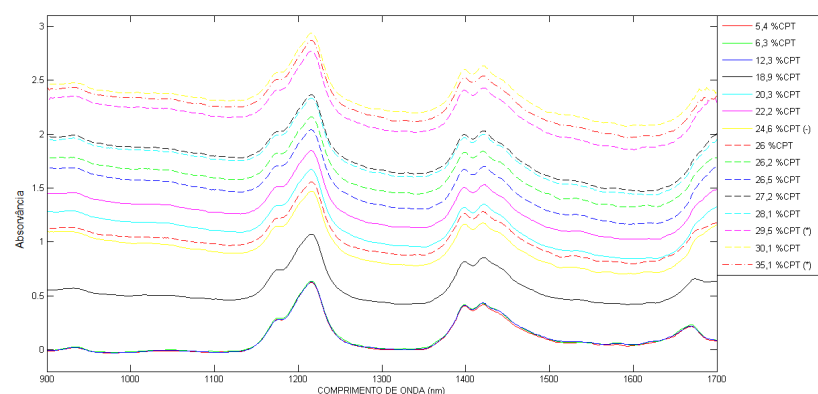
(b)

Figura 4.7.: Gráficos da análise da absorvância absoluta dos espectros em função da % CPT das amostras do conjunto 2: (a) absorvância registada aos 1176 nm; (b) absorvância registada aos 1400 nm.

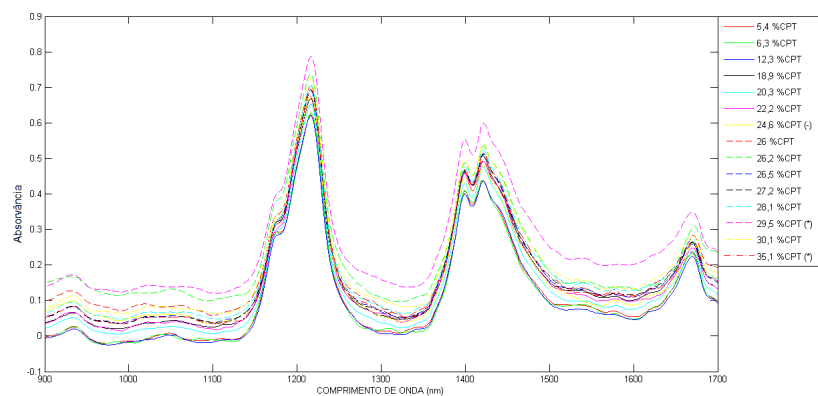
4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares



(a)



(b)



(c)

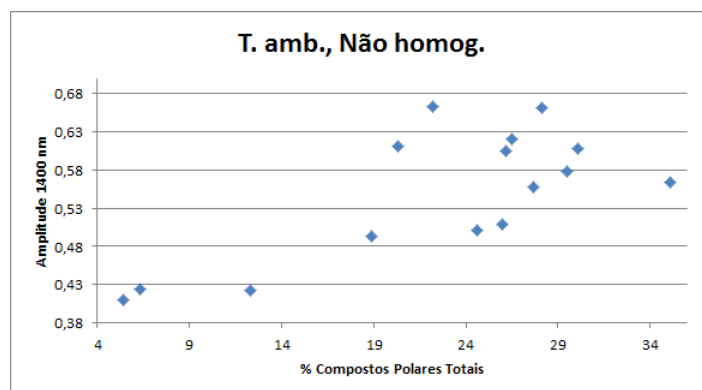
Figura 4.8.: Espectro da região NIR referentes ao conjunto 3, medidos sob diferentes condições: (a) medição à temperatura ambiente sem homogeneizar as amostras; (b) medição à temperatura ambiente após homogeneizar as amostras; (c) medição após aquecer as amostras em banho-maria a 60°C, sendo estas homogeneizadas antes da análise.

tem uma baixa variação com o nível de degradação dos óleos, elevando-se a linha de base para valores de Absorvância na ordem de 0,2 a 0,3. Já no caso dos espectros apresentados na Figura 4.8 (b), verificam-se resultados um pouco diferentes dos outros dois casos: embora o espectro continue a apresentar os picos de absorvância característicos nos mesmos comprimentos de onda, existe um aumento da linha de base para valores bastante elevados, na ordem dos 2,5. Estes resultados podem estar associados a causas simples. No caso da análise das amostras à temperatura ambiente sem proceder à homogeneização da mesma, Figura 4.8 (a), a porção de óleo que é recolhida possui uma baixa quantidade de agregados de partículas e impurezas resultantes da fritura dos alimentos, pois estes encontram-se depositados no *ependorf* onde está armazenado o óleo. Como a porção da amostra estudada possui uma baixa quantidade de agregados vai apresentar valores de absorvância mais baixos, observando-se por isso a linha de base dos espectros próxima de zero. Já no caso da análise das amostras que foram aquecidas em banho-maria a 60°C, Figura 4.8 (c), embora estas sejam homogeneizadas antes da recolha da porção a ser estudada, o banho-maria a altas temperaturas ajuda a dissolver os agregados de partículas que se formam no *ependorf* à temperatura ambiente. Dessa forma a porção da amostra estudada, embora possua conjuntos de agregados e alguns contaminantes que se formam durante a fritura, estes encontram-se dissolvidos, apresentando por isso espectros com baixos valores de absorvância, nos quais as linhas de base estão próximas de zero. Relativamente à análise realizada à temperatura ambiente, Figura 4.8 (b), na qual se procedeu à homogeneização da amostra antes de se recolher uma porção para ser estudada, verificou-se que essa porção continha uma grande quantidade de pequenos agregados que estavam em suspensão no óleo. Esse facto provoca uma maior dispersão da luz por parte da amostra estudada, apresentando por isso espectros com valores de absorvância mais elevados, ocorrendo um aumento da linha de base dos espectros para valores da absorvância da ordem dos 2,5.

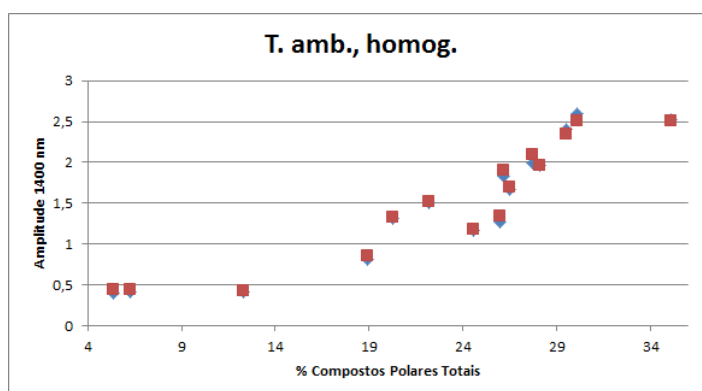
Visto os resultados das três análises ao conjunto 3 serem um pouco diferentes entre eles, a análise da absorvância absoluta em comprimentos de onda de interesse vai apresentar resultados um pouco distintos. Apresenta-se na Figura 4.9, a análise dos espectros do conjunto 3, obtidos segundo as três abordagens descritas, para o comprimentos de onda de 1400 nm.

Analisando os gráficos da Figura 4.9, verifica-se que o gráfico que aparenta estabelecer uma melhor relação entre a amplitude dos espectros aos 1400 nm e a % CPT é o espectro apresentado na Figura 4.9 (b). Analisando esse gráfico é possível verificar

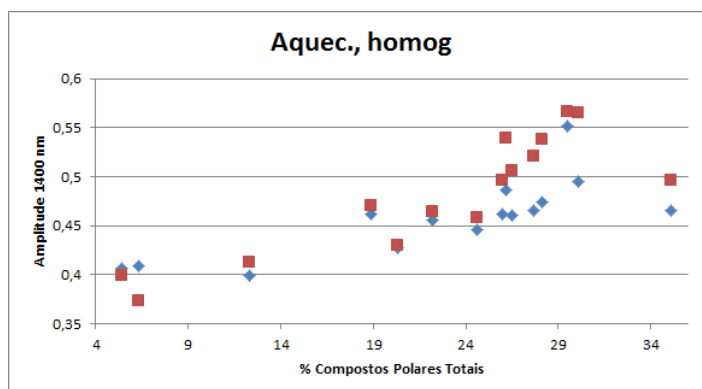
4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares



(a)



(b)



(c)

Figura 4.9.: Análise da absorvância absoluta nos 1400 nm, em função da % CPT das amostras do conjunto 3: (a) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente sem homogeneização; (b) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (c) análise dos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas. Em (b) e (c) as amostras foram medidas duas vezes.

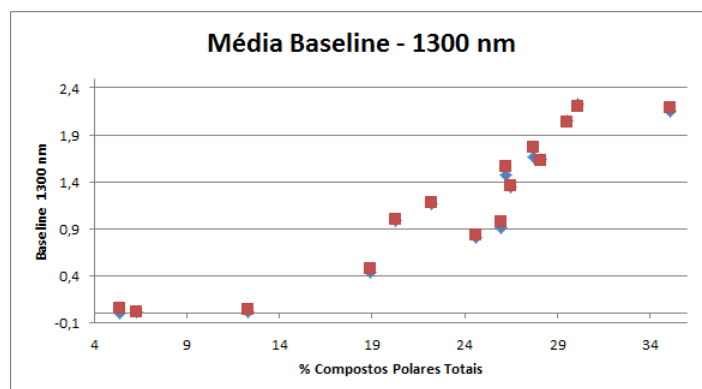
que amplitude dos espectros é baixa e permanece inalterada para amostras com % CPT baixas, até aproximadamente 15%, verificando-se que para valores superiores a 15% a amplitude registada aumenta significativamente com a % CPT, existindo uma relação aproximadamente linear entre eles. Relativamente aos outros gráficos das Figuras 4.9 (a) e (c), verifica-se em ambos uma tendência para que os valores da amplitude aumentem com o aumento da % CPT, embora a relação que exista não seja tão linear como a observada no caso do gráfico (b). É de salientar ainda a gama de variação das amplitudes é muito maior para o gráfico (b), aproximadamente de 0,448 a 2,597, enquanto que no caso do gráfico (a) é de 0,41 a 0,663 e no gráfico (c) é de 0,373 a 0,566.

Foram realizadas análises semelhantes para diferentes comprimentos de onda, sendo apresentados os gráficos com as respetiva análise no Anexo A.3.2. De todas as análises feitas, a realizada nos 1400 nm foi a que apresentou melhores resultados.

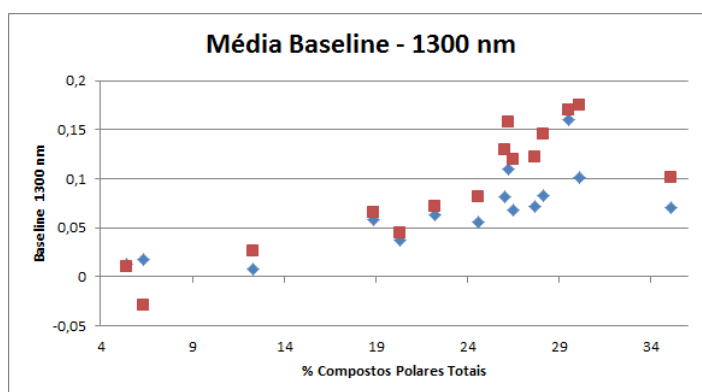
Durante as medidas da absorvância absoluta foi ainda realizada uma média de absorvância numa janela de 10 nm de zonas da *baseline* dos espectros. A janela é centrada neste comprimento de onda, sendo efetuada a média da absorvância em $\pm 5 \text{ nm}$. Na Figura 4.10 estão representadas graficamente essas médias para a *baseline* centrada nos 1300 nm, em função da % CPT das amostras de óleos. O estudo foi realizado para o conjunto de amostras 3, sendo a análise feita para os espectros medidos à temperatura ambiente, após se proceder à homogeneização da amostra e para o caso em que as amostras foram aquecidas em banho-maria e homogeneizadas. A análise das regiões da *baseline* dos espectros do conjunto 3 também foi realizada para os λ de 1000 nm e 1600 nm, cujos gráficos dos resultados são apresentados no Anexo A.3.3.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.10, a amplitude da média registada na janela dos 1300 nm aumenta com o aumento da % CPT. Nas amostras que foram analisadas à temperatura ambiente, Figura 4.10 (a) parece existir uma maior linearidade entre as duas variáveis, existindo também maior concordância entre os resultados das duas medidas efetuadas. Pelo contrário, nos resultados das amostras que foram analisadas após serem aquecidas em banho-maria, Figura 4.10 (b), a concordância entre as duas medidas é menor, verificando-se uma maior variação sobretudo nas amostras com alta % CPT, mas com valores próximos de zero.

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares



(a)



(b)

Figura 4.10.: Análise da média da absorvância, em regiões da *baseline* (1300 nm) em função da % CPT: (a) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (b) análise dos espectros medidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

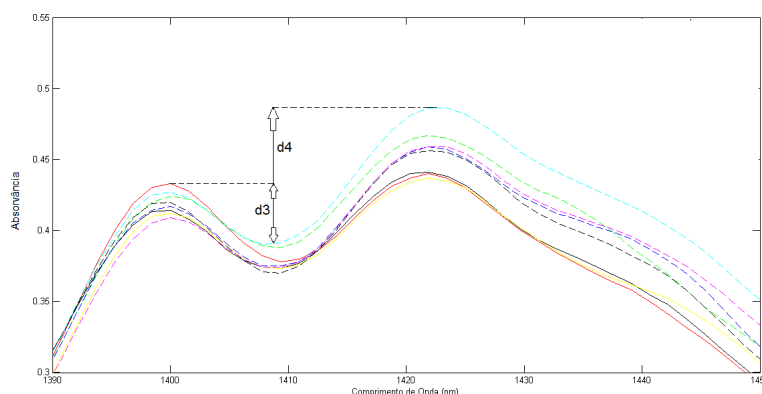


Figura 4.11.: Identificação dos λ utilizados para o cálculos das diferenças 3 e 4. A diferença 3 é dada pela seguinte subtração: $[A(1400\text{nm}) - A(1409\text{nm})]$ e a diferença 4 é dada por: $[A(1421,9\text{nm}) - A(1409\text{nm})]$.

Medida de Absorvância relativa

Na análise da absorvância relativa (Secção 4.5.3) consideraram-se três abordagens.

Na primeira calculou-se a diferença entre absorvâncias a comprimentos de onda característicos, sendo avaliadas, no total, um conjunto de seis diferenças. A Figura 4.11, identifica as diferenças 3 e 4 que foram analisadas. A identificação dos comprimentos de onda e os resultados das diferenças não conduziram a conclusões significativas, mas incluem o Anexo A.3.4.

Na segunda abordagem, efetuou-se a subtração do espectro de absorvância que foi recolhido do óleo novo, aos restantes espectros, com o objetivo de verificar o efeito de frituras consecutivas. Desta forma procurou-se confirmar os comprimentos de onda de maior relevância, onde as diferenças do espectro do óleo novo e usado são de maior amplitude. A Figura 4.12 mostram uma das curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo, para as amostras do conjunto 3, estão as restantes representadas no Anexo A.3.5. Delas, podem destacar-se alguns comprimentos de onda onde se verificam as maiores diferenças, em relação ao espectro do óleo novo, nomeadamente: 1173, 1423, 1440, 1466, 1518 e 1653 nm, confirmando as observações anteriores. O estudo da amplitude das curvas em função da % CPT, é apresentado nas Figuras 4.13 e 4.14 para os comprimentos de onda de 1440 e 1653 nm. Para os restantes casos, os resultados são apresentados no Anexo A.3.6.

Analisando os resultados verifica-se que, tal como em estudos anteriores, o valor das amplitudes aumenta com a % CPT das amostras. Constatou-se ainda, que tal

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares

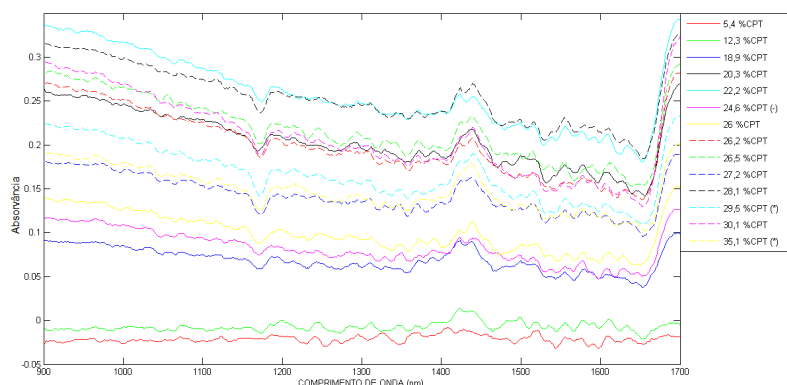


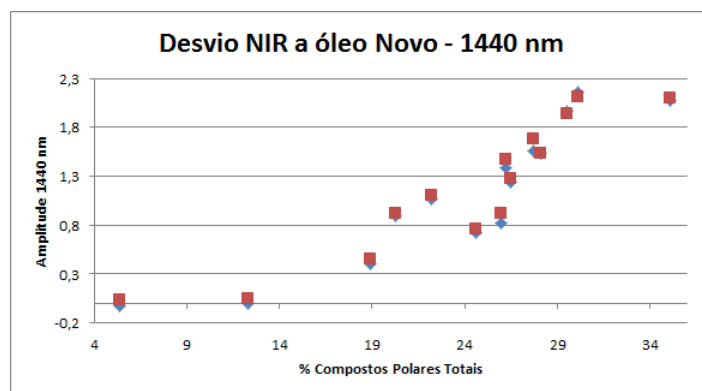
Figura 4.12.: Curvas resultantes da subtração do espectro de absorvância do óleo novo aos restantes espectros das amostras analisadas. Estas curvas são provenientes da aplicação deste procedimento nos espectros que foram recolhidos à temperatura ambiente sem homogeneização.

como em casos anteriores, parece existir uma maior linearidade e concordância entre as duas medidas nos resultados das amostras medidas à temperatura ambiente, comparando com os resultados das amostras que foram medidas após serem aquecidas em banho-maria.

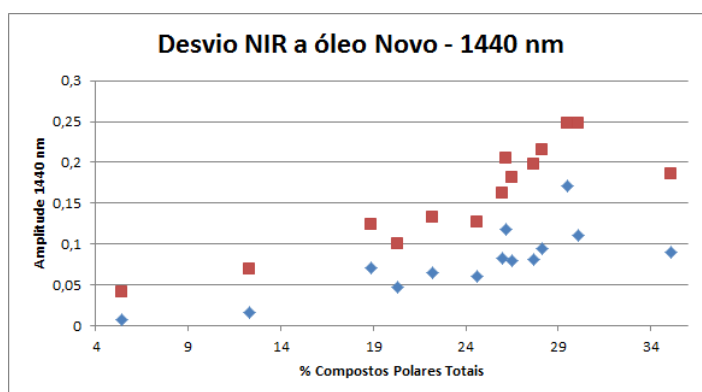
Para além da análise efetuada em comprimentos de onda de interesse, também se estudaram médias de amplitudes em janelas de 10 nm, em zonas de *baseline* dos espectros originais. Os comprimentos de onda selecionados para o estudo do comportamento da *baseline* são os 1000, 1300 e os 1600 nm. A janela é centrada nos comprimentos de onda de interesse, sendo efetuada a média das amplitudes em ± 5 nm. Os resultados desta análise estão expostos no Anexo A.3.7, sendo apresentados em função da % CPT.

Na terceira abordagem utilizou-se a medida de ΔY_2 . Nesta análise foram utilizadas as amostras do conjunto 3, nas medições efetuadas com as amostras à temperatura ambiente e após serem aquecidas em banho-maria. Nas medições à temperatura ambiente foram realizadas duas análises, em que se escolhem diferentes comprimentos de onda, tendo em conta os resultados da Figura 4.12. Para o primeiro caso, os comprimentos de onda utilizados são:

- $\lambda_1 = 1423 \text{ nm}$;
- $\lambda_2 = 1602 \text{ nm}$;



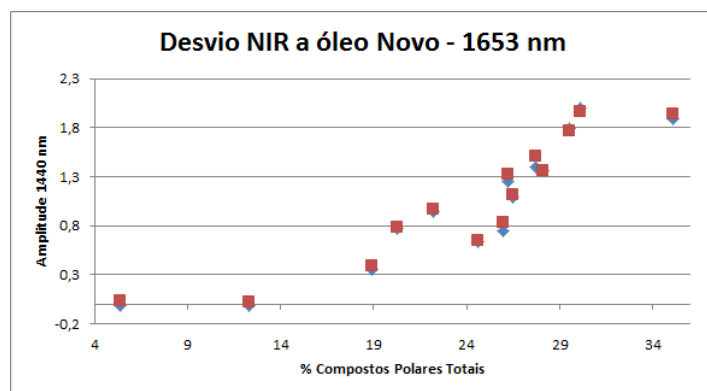
(a)



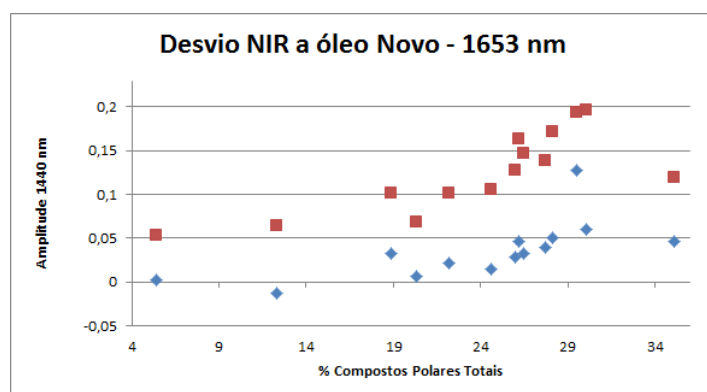
(b)

Figura 4.13.: Análise da absorvância aos 1440 nm nas curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras: (a) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (b) análise dos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares



(a)



(b)

Figura 4.14.: Análise da absorvância aos 1653 nm nas curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras: (a) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (b) análise dos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

- Média baseline ($\pm 5 \text{ nm}$) centrado em $\lambda_3 = 1300 \text{ nm}$;

Já para o segundo caso, apenas se troca o valor do $\lambda_1 = 1423 \text{ nm}$ por $\lambda'_1 = 1445 \text{ nm}$, mantendo-se tudo o resto igual.

A análise das amostras do conjunto 3 medidas após aquecimento em banho-maria, utilizou os mesmos comprimentos de onda do primeiro caso de estudo da análise das amostras à temperatura ambiente. Os resultados da aplicação da medida ΔY_2 nestes comprimentos de onda são apresentados na Figura 4.15, em função da % CPT.

As evidências demonstradas nesta análise, Figura 4.15, parecem estar em concordância com os restantes resultados mostrados até aqui. Verifica-se uma maior concordância entre os resultados das medidas realizadas nos espectros recolhidos à temperatura ambiente, observando-se uma melhor separação dos resultados das amostras, existindo uma relação aproximadamente linear entre a % CPT e as medidas efetuadas. Observando os resultados a medida parece ter sido otimizada com sucesso, após o refinamento dos comprimentos de onda a utilizar.

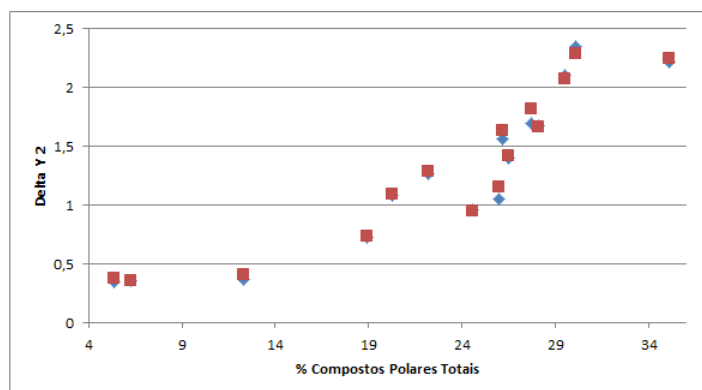
Dinâmica Relativa da Absorvância, pelas medidas $\Delta Y_1, \bar{Y}$

Tendo em conta a natureza das medidas de $\Delta Y_1, \bar{Y}$ (Secção 4.5.3), foram efetuados dois estudos, utilizando o conjunto de amostras 3, onde se escolheram diferentes comprimentos de onda de análise. Para o primeiro caso, os comprimentos de onda eleitos foram:

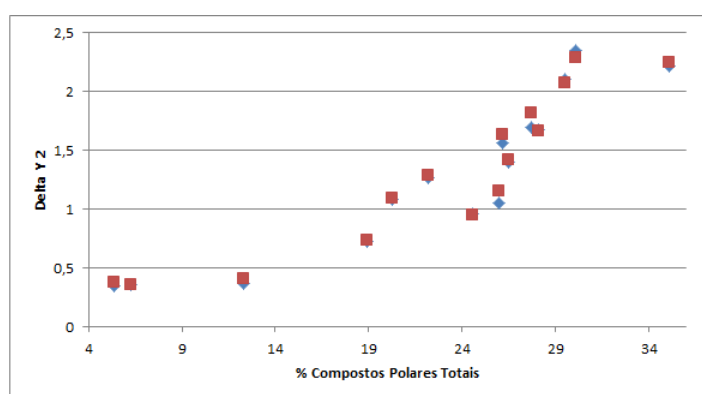
- $\lambda_1 = 1400 \text{ nm}$;
- $\lambda_{ref} = 1409 \text{ nm}$;
- $\lambda_2 = 1421,9 \text{ nm}$;

Utilizando estas medidas no estudo do conjunto de espectros de absorvância que foram recolhidos à temperatura após homogeneização, obtêm-se os resultados apresentados na Figura 4.16. Observando a Figura, verifica-se os gráficos possuem diferentes tendências. No caso do gráfico do ΔY_1 regista-se um ligeiro aumento deste parâmetro com o aumento da % CPT, já no caso do $\bar{Y}$ verifica-se o contrário, ou seja, com o aumento da % CPT o valor de $\bar{Y}$ diminuí. Embora se verifique uma tendência de variação destes parâmetros com a % CPT das amostras estes não conduzem a conclusões muito significativas, pois na gama de interesse do estudo, dos 15 % de CPT aos 30 % de CPT, as variações são muito pequenas.

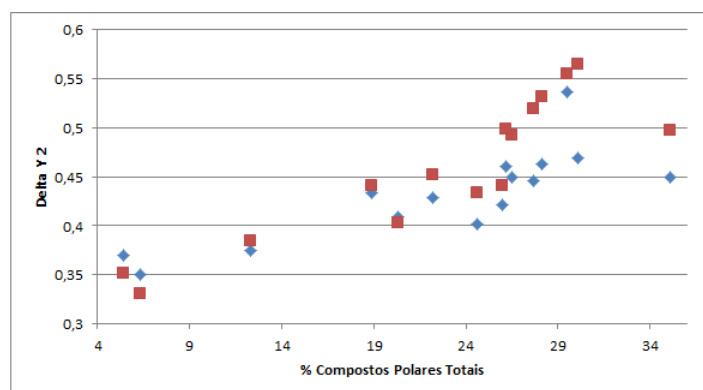
4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares



(a)

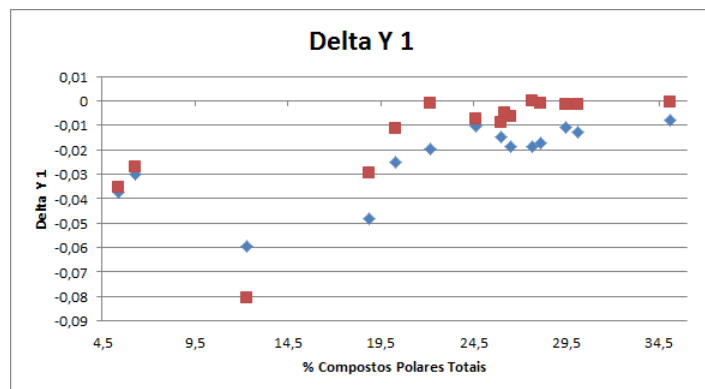


(b)

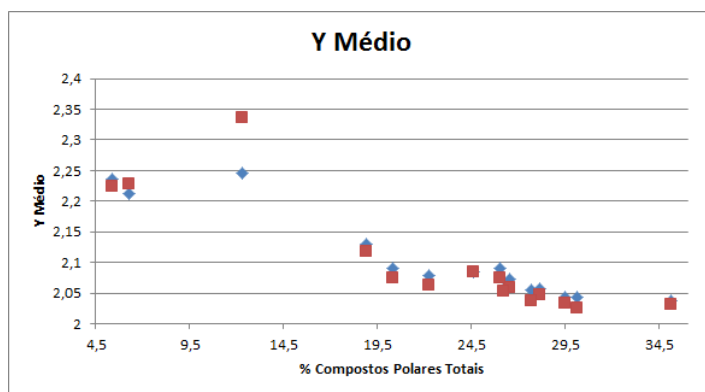


(c)

Figura 4.15.: Medida de ΔY_2 para (a) λ_1 , λ_2 , λ_3 , à temperatura ambiente sem homogeneização; (b) λ'_1 , λ_2 , λ_3 , à temperatura ambiente após homogeneização e (c) λ_1 , λ_2 , λ_3 , após aquecimento e homogeneização.



(a)



(b)

Figura 4.16.: Gráficos de ΔY_1 (a) e $\bar{Y}$ (b), em função da % CPT, calculados para as posições indicadas.

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares

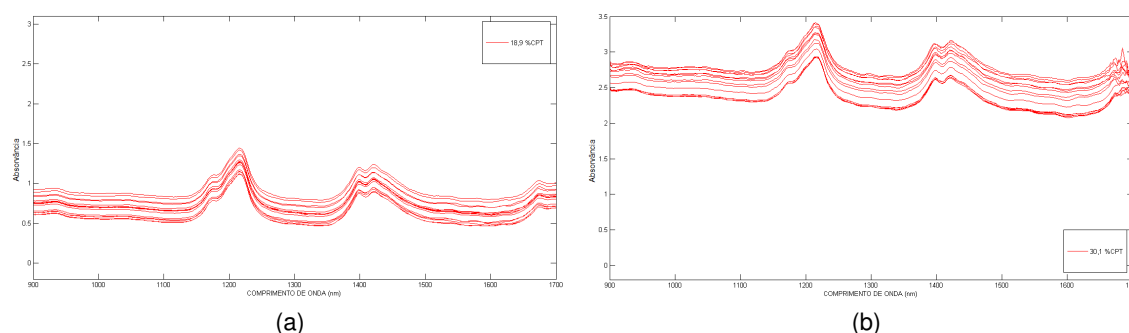


Figura 4.17.: Medidas da repetibilidade efetuadas com as amostras à temperatura ambiente: (a) espectros recolhidos da amostra com 18,9 % de CPT; (b) espectros recolhidos da amostra com 30,1 % de CPT.

Os resultados da aplicação das medidas de ΔY_1 e $\bar{Y}$ para o outro caso estão apresentados no Anexo A.3.8.

4.5.4.4. Teste para aferir a repetibilidade e efeito da temperatura nas medições

Realizaram-se dois testes para aferir a repetibilidade das medidas utilizando amostras do conjunto 3. Um teste com as amostras à temperatura ambiente e um outro com as amostras aquecidas num banho-maria à temperatura de 60°C, sendo as amostras homogeneizadas em ambos os casos.

Para o caso da análise realizada com as amostras à temperatura ambiente, foram utilizadas duas amostras com percentagens de CPT de 18,9 % e 30,1 %, sendo recolhidos 15 espectros de cada uma delas, Figura 4.17.

Para a análise realizada após aquecimento das amostras, foram utilizadas amostras com percentagens de CPT de 20,3 % e 35,1 %, sendo recolhidos 15 espectros para cada uma delas, Figura 4.18.

Analisando os dois testes de repetibilidade realizados verifica-se que existe uma variação intrínseca ao método de medida, ocorrendo variações da linha de base. No caso do teste realizado à temperatura ambiente chega a ser de aproximadamente 0,3, e no caso das amostras aquecidas em banho-maria é de aproximadamente 0,2. Perante este facto, parecem existir evidências de que a análise das amostras após aquecimento em banho-maria produz resultados com maior repetibilidade, do que a análise das amostras à temperatura ambiente.

A maior repetibilidade das amostras analisadas após aquecimento provavelmente

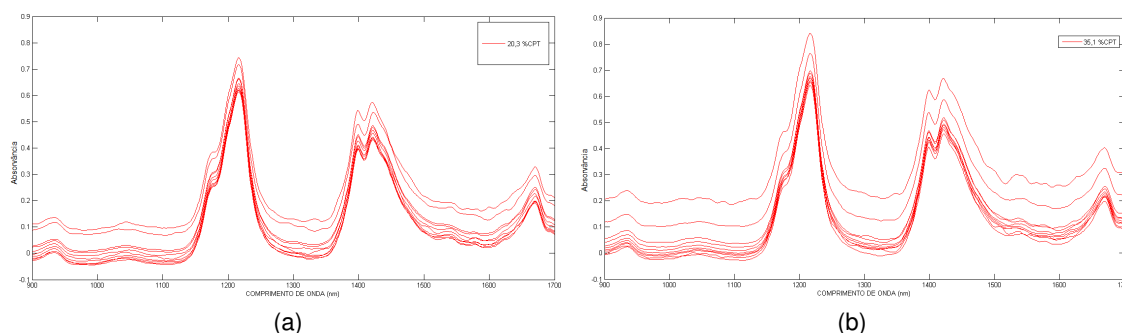


Figura 4.18.: Medidas da repetibilidade efetuadas após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas: (a) espectros recolhidos da amostra com 20,3 % de CPT; (b) espectros recolhidos da amostra com 35,1 % de CPT.

deve-se ao facto de o banho-maria ajudar a dissolver os agregados de partículas e impurezas do óleo, tornando a amostra aproximadamente homogénea. Já no caso das amostras analisadas à temperatura ambiente, como esses agregados de partículas e impurezas do óleo não estão dissolvidos e se encontram em suspensão, tornam a amostra pouco homogénea. Isso faz com que ao retirar consecutivamente uma porção da amostra para ser analisada, a quantidade de partículas em suspensão que são recolhidas possa variar, fazendo também variar os níveis de absorvância do espectro, sendo os resultados visíveis na alteração da posição da linha de base dos espectros.

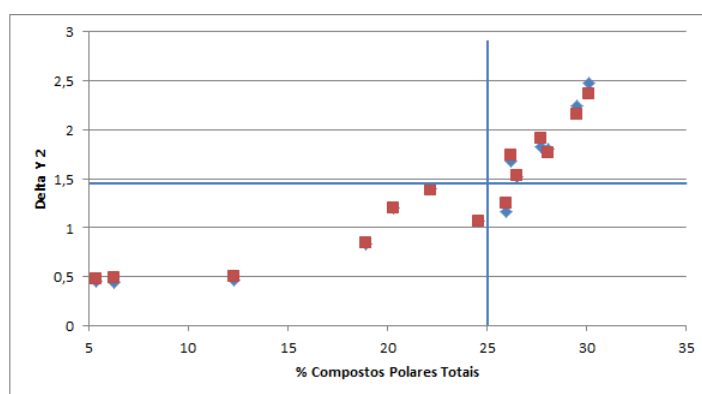
4.5.5. Conclusões

O objetivo deste estudo passa por desenvolver um sensor, de baixo custo, que permita determinar fiavelmente a qualidade do óleo, utilizando a análise da absorvância em comprimentos de onda específicos. Para isso foram realizadas um conjunto de análises espectroscópicas de óleos alimentares tentando estabelecer correlação entre alterações espectrais e a % CPT medidos por HPLC. Foram recolhidos espectros de absorvância VIS e NIR, sendo utilizados sobretudo os espectros NIR.

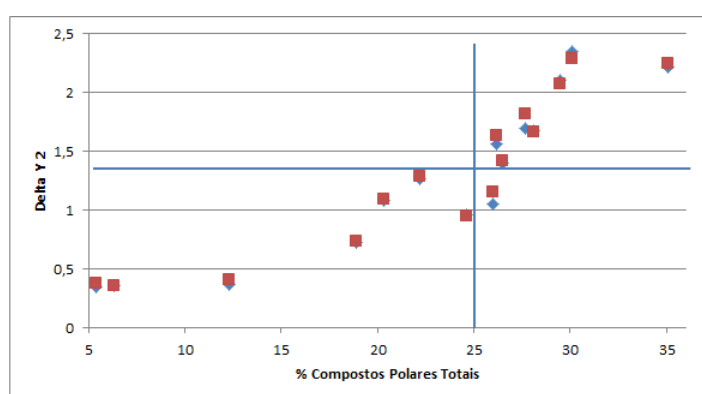
Após a apresentação de todos os estudos efetuados nos conjuntos de amostras 1, 2 e 3, foi possível aferir indicadores espectrais correlacionáveis com a % CPT. Foram testadas três medidas espectrais. Tanto a absorvância relativa como a medida que denominamos dinâmica relativa da absorvância, permitem estabelecer alguma correlação com a % CPT das diferentes amostras. Comparando os tipos de medidas efetuadas no conjunto 3, nomeadamente a análise das amostras à temperatura ambiente e

4.5. Aplicação espectroscópica para análise de óleos alimentares

a análise das amostras aquecidas em banho-maria, verifica-se que as amostras analisadas à temperatura ambiente denotam variações mais acentuadas, apresentando resultados que mais facilmente se correlacionam com a % CPT das amostras. Existem no entanto alguns fatores que parecem provocar a variabilidade das medidas óticas, nomeadamente a presença de agregados e impurezas, a variação da temperatura e a oxidação das amostras. Os resultados da medida da dinâmica relativa da absorvância pelo indicador ΔY_2 parecem os mais promissores.



(a)



(b)

Figura 4.19.: Medidas ΔY_2 com sugestão gráfica (retas) de um possível método de classificação da qualidade das amostras.

Observando o disposto na Figura 4.19, são traçadas duas retas nos gráficos, com um fim puramente indicativo, que poderiam indicar possíveis métodos de classificação das amostras. Uma das retas é colocada alinhada com o limiar da qualidade do óleo, 25 % CPT, e a outra é localizada de forma a melhor separar as amostras consideradas de boa qualidade, com uma % CPT menor que 25%, e as amostras consideradas im-

próprias, com uma % CPT superior a 25%. Segundo a disposição das retas, é possível verificar que perante os dados das quinze amostras apenas uma seria classificada de forma errada, sendo considerada de boa qualidade, quando na verdade já possui uma % CPT superior aos 25%.

É claro que este estudo é preliminar e é baseado num número muito reduzido de amostras. No entanto, é a base de um trabalho em curso, que permitiu estabelecer parâmetros para um protótipo mais direccionado que será testado num grande número de amostras para procurar peso estatístico que possa validar o princípio de medida, e a escolha por uma destas abordagens.

5. Conclusões Finais e Perspetivas Futuras

5.1. Conclusões

Esta dissertação encontra-se dividida em duas partes: a primeira que consiste num o estudo preliminar realizado para avaliação do potencial de aplicação da técnica de espectroscopia no estudo de lesões de cartilagem. O estudo foi direcionado para o desenvolvimento de uma solução complementar ao diagnóstico artroscópico atual, com especial atenção para a deteção de lesões de baixo grau; e a segunda, na qual se usam técnicas espectroscópicas no estudo de óleos de fritura de alimentos, na tentativa de relacionar as medidas espectroscópicas efetuadas com a % CPT dos óleos. As gamas espectrais utilizadas foram dos 400 nm aos 1000 nm para o VIS e dos 900 nm aos 1700 nm para o NIR.

Na primeira parte do trabalho, procedeu-se a um estudo espectroscópico de peças de cartilagem de joelho de boi, recolhidas de um talho. Os fragmentos foram inspecionados por um médico especialista em artroscopia. Foram recolhidos um conjunto de espectros de reflectância difusa a partir das diversas amostras. Com base nos espectros obtidos com luz visível, foi definido uma função de medida, ΔY , para quantificar o grau das lesões presentes na cartilagem. Este fator ΔY utiliza os valores da intensidade espectral de três comprimentos de onda distintos, com o objetivo de quantificar o comportamento de picos do espectro em torno de um ponto de referência, quando se varia o grau das lesões, aferindo as variações de amplitude. Da aplicação desta função de medida obtiveram-se alguns resultados, em consonância com estudos similares, onde é possível observar a sobreposição dos resultados respeitantes a graus de lesões consecutivos, nomeadamente entre o grau 1 e grau 2, e entre o grau 2 e o grau 3. Os resultados relativos ao grau 4 são bem distintos dos restantes graus de lesões.

Com base nos resultados espectroscópicos obtidos com luz visível, desenvolveu-se

uma ferramenta em LabVIEW que utiliza várias imagens de cartilagem, capturadas em diferentes comprimentos de onda, com o objetivo de diferenciar os vários graus de lesões presentes nas amostras. O comprimento de onda a que as imagens foram recolhidas corresponde ao comprimento de onda que se utilizou no cálculo de ΔY no estudo dos espectros. O processamento das imagens foi similar ao efetuado com os espectros, existindo neste caso um conjunto de operações simples que se realizam para um mesmo pixel (n, m) das imagens. Na Ferramenta desenvolvida, é apresentado o mapa do indicador ΔY , com uma codificação de cores artificial, com tons personalizáveis que correspondem a diferentes valores de ΔY , que no nosso caso estão a variar entre aproximadamente 0,7 e 2. Verifica-se no entanto, que a gama dinâmica de uma das imagens, $I_2 - 694\text{ nm}$ é muito reduzida (aproximadamente 11 níveis em 256 possíveis) sendo por isso uma imagem muito pobre em termos de informação, sendo uma condicionante à capacidade de discriminação das lesões através da ferramenta construída.

Embora as amostras estudadas constituam um conjunto muito reduzido, sendo por isso impossível obter conclusões com peso estatístico, as observações evidenciam potencial na utilização da métrica ΔY na distinção de lesões, ainda que é desejável uma otimização da medida ou controlo das condições em que esta é efetuada para aumentar a especificidade ao grau de lesão e entre a sobreposição das respostas registadas.

Para verificar o funcionamento da interface de análise de imagens desenvolvida, será necessário submete-la à análise de um grande número de amostras. Será possível criar uma base de dados com os resultados de ΔY da análise das amostras, para cada um dos graus de lesão. Se os resultados obtidos forem coerentes, a partir da base de dados criada será viável desenvolver um classificador automático dos graus de lesões presentes nas imagens que são introduzidas na ferramenta de classificação.

Na segunda parte do trabalho realizou-se uma análise espectroscópica de óleos alimentares tentando estabelecer correlação entre alterações espectrais e a % CPT medidos por HPLC. Foram recolhidos espectros de absorvância VIS e NIR, sendo utilizados sobretudo os espectros NIR para realizar análises da absorvância absoluta, absorvância relativa e dinâmica relativa da absorvância. O objetivo passa por desenvolver um sensor, de baixo custo, que permita determinar fiavelmente a qualidade do óleo, utilizando a análise da absorvância em comprimentos de onda específicos.

Os resultados obtidos para os diferentes conjuntos de amostras são diferentes, tendo em conta a metodologia utilizada para fazer a sua análise, ou seja, o facto de

se proceder à homogeneização por agitação e aquecimento da amostra em banho-maria vai fazer variar os resultados da análise espectral das amostras. Comparando as medidas efetuadas no conjunto 3, nomeadamente a análise das amostras à temperatura ambiente e a análise das amostras aquecidas em banho-maria, verifica-se que as amostras analisadas à temperatura ambiente denotam variações mais acentuadas, apresentando resultados que mais facilmente se correlacionam com a % CPT das amostras. Alguns dos fatores que parecem provocar a variabilidade das medidas óticas são a presença de agregados e impurezas, a variação da temperatura e a oxidação das amostras.

Efetuada o estudo dos três conjuntos de amostras, e após analisar os resultados obtidos, verifica-se que existem indicadores espectrais que possuem uma melhor correlação com a % CPT das amostras. De entre as várias medidas espectrais abordadas, aquelas que apresentam a melhor correlação são a absorvância relativa e a medida denominada dinâmica relativa de absorvância. Os resultados da medida da dinâmica relativa de absorvância pelo indicador ΔY_2 são mostrados na Figura 4.19. Observando o gráfico da Figura, no qual são traçadas duas retas, com fim puramente indicativo que poderiam indicar possíveis métodos de classificação das amostras. Uma das retas é colocada alinhada com o limiar da qualidade do óleo, 25 % de CPT, e a outra é colocada na posição que permita uma melhor separação das amostras consideradas de boa qualidade, com uma % CPT menor que 25%, e as amostras consideradas impróprias, com uma % CPT superior a 25%. Tendo em conta a disposição das retas, verifica-se que caso se escolhe-se este método para classificar as amostras, obter-se-ia uma precisão de 93,33%, pois no conjunto das 15 amostras apenas uma seria classificada de forma errada, sendo considerada de boa qualidade, quando na realidade já possui uma % CPT superior a 25%.

É claro que este estudo é preliminar e é baseado num número muito reduzido de amostras. No entanto, é a base de um trabalho em curso, que permitiu estabelecer parâmetros para um protótipo mais direcionado que será testado num grande número de amostras para procurar peso estatístico que possa validar o princípio de medida, e a escolha por uma destas abordagens.

5.2. Perspetivas Futuras

Apesar da abordagem global e implementada ao longo desta Dissertação produzir resultados satisfatórios e promissores, a mesma pode ser enriquecida e melhorada,

nomeadamente, nos seguintes pontos:

- Quanto à primeira parte do trabalho:
 - no que diz respeito à ferramenta de análise de imagens da cartilagem articular, visto algumas das imagens possuírem uma gama dinâmica muito reduzida, uma possível solução pode passar pela recolha de imagens com uma profundidade de resolução de 12 bit;
 - num futuro próximo será verificada a eficiência da análise da ferramenta de classificação construída, sendo para isso necessário submeter a mesma à análise de um grande número de amostras;
 - após submeter a ferramenta à análise de um conjunto de amostras considerável será possível criar uma base de dados com os valores de ΔY para cada um dos graus de lesões. Desta forma, e se os resultados forem consistentes será possível desenvolver um classificador automático dos graus de lesões presentes nas imagens que são introduzidas na ferramenta de classificação.
- Quanto à segunda parte do trabalho:
 - é necessário analisar um maior número de amostras de forma a obter um conjunto que permita alcançar resultados com peso estatístico;
 - diversificar as amostras estudadas, utilizando amostras de diferentes marcas de óleo, submetidas a processos de fritura diferentes(temperatura, tempo, alimento, fritadeira);
 - escolher o princípio de medida que apresente melhores resultados de classificação das amostras;
 - construção de um sensor, de pequenas dimensões, que possa ser utilizado na cozinha, e que tenha por base a recolha da absorvância na gama de comprimentos de onda utilizada no princípio de medida que for escolhido.

Bibliografia

- [1] C. L. Ng, R. L. Wehling, and S. L. Cuppett. Method for determining frying oil degradation by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:593 – 597, 2007.
- [2] G. Yildiz, R. L. Wehling, and S. L. Cuppett. Method for determining oxidation of vegetable oils for near-infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78:495 – 502, 2001.
- [3] . <http://fisicasemmisterios.webnode.com.br/products/ondas-eletromagneticas/> [Acedido a 24 de Fevereiro de 2014].
- [4] A. A. R. Gonsalves, M. E. S. Serra, and M. Piñeiro. *Espectroscopias vibracional e electrónica*. Imprensa da Universidade de Coimbra, 2005.
- [5] H. W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, and H. M. Heise. *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*. Wiley-VCH, 2002.
- [6] C. Pasquini. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14:198–219, 2003.
- [7] R. M. Silverstein, G. C. Bassler, and T. C. Morrill. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. LTC, 2000.
- [8] M. E. Carneiro. Classificação de lâminas de madeira de pinus spp por espectroscopia Ótica. Master's thesis, Universidade Federal do Paraná, 2008.
- [9] Y. Ozaki. Near-infrared spectroscopy's versatility in analytical chemistry. *The Japan Society for Analytical Chemistry*, 28:545 – 562, 2012.
- [10] T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, and T. Davies. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications, 2002.

- [11] M. Rendell, E. Anderson, W. Schlueter, J. Mailliard, D. Honigs, and R. Rosenthal. Determination of hemoglobin levels in the finger using near infrared spectroscopy. *Clin. Lab. Haematol.*, 25:93–97, 2003.
- [12] A. Samann, C. H. Fischbacher, K. U. Jagemann, K. Danzer, J. Schuler, L. Papenkordt, and U. A. Muller. Non-invasive blood glucose monitoring by means of near infrared spectroscopy: investigation of long-term accuracy and stability. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 108:406–413, 2000.
- [13] P. R. Moreno, R. A. Lodder, K. R. Purushothaman, W. E. Charash, W. N. OConnor, and J. E. Muller. Detection of lipid pool, thin fibrous cap, and inflammatory cells in human aortic atherosclerotic plaques by nearinfrared spectroscopy. *Circulation*, 105:923–927, 2002.
- [14] T. P. Lin and C.C. Hsu. Determination of residual moisture in lyophilized protein pharmaceuticals using rapid and non-invasive method: near infrared spectroscopy. *Pharm. Sci. Technol.*, 56:196–205, 2002.
- [15] S. Sasic and Y. Ozaki. Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids. 1. quantitative analysis of fat, protein, and lactose in raw milk by partial least-squares regression and band assignment. *Anal. Chem.*, 73:64–71, 2001.
- [16] P.G. Al-Rawi, P. Lombardi, S. Schultz, A. Galindo, E. Coscarella, A. Vasquez, A. Vasquez, and E. Rosenkranz. Near infrared spectroscopy to monitor cerebral oxygen saturation in singleventricle physiology. *J. Thorac. Cardiovasc.*, 131:395–402, 2006.
- [17] M. Ricci, P. Lombardi, S. Schultz, A. Galindo, E. Coscarella, A. Vasquez, and E. Rosenkranz. Near-infrared spectroscopy to monitor cerebral oxygen saturation in single-ventricle physiology. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 131:395–402, 2006.
- [18] G. Naulaers, B. Meyns, M. Miserez, V. Leunens, S. Van Huffel, P. Casaer, and H. Devlieger. Measurement of the liver tissue oxygenation by near-infrared spectroscopy. *Intensive Care Med.*, 31:138–141, 2005.
- [19] S. L. Davis, P. J. Fadel, J. Cui, G. D. Thomas, and C. G. Crandall. Skin blood flow influences near-infrared spectroscopy-derived measurements of tissue oxygenation during heat stress. *J. Appl. Physiol.*, 100:221–224, 2006.

- [20] R. Boushel and C. A. Piantadosi. Near-infrared spectroscopy for monitoring muscle oxygenation. *Acta Physiol. Scand.*, 168:615–622, 2000.
- [21] Y. Gu, W. R. Chen, M. Xia, S. W. Jeong, and H. Liu. Effect of photothermal therapy on breast tumor vascular contents: noninvasive monitoring by near-infrared spectroscopy. *Photochem. Photobiol.*, 81:1002–1009, 2005.
- [22] J. H. Ali, W. B. Wang, M. Zevallos, and R. R. Alfano. Near infrared spectroscopy and imaging to probe differences in water content in normal and cancer human prostate tissues. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 3:491–497, 2004.
- [23] U. A. Muller, B. Mertes, C. Fischbacher, K. U. Jageman, and K. Danzer. Non-invasive blood glucose monitoring by means of near infrared spectroscopy: methods for improving the reliability of the calibration models. *Int. J. Artif. Organs*, 20:285–290, 1997.
- [24] F. M. N. Almeida. Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de fourier (ft-nir) na caracterização de farinhas para alimentação pueril. Master's thesis, Instituto Superior Técnico - Universidade Técnica de Lisboa, 2009.
- [25] T. Davies. The history of near infrared spectroscopic analysis: Past, present and future – From sleeping technique to the morning star of spectroscopy. *ANALYSIS MAGAZINE*, 4:26, 1998.
- [26] Foss. *A guide to Near-Infrared Spectroscopy Analysis of Industrial Manufacturing Processes*. Foss NIR Systems, 2002.
- [27] W.N. Borges. Aplicação de métodos de reconhecimento de padrões para classificação de Óleos vegetais. Master's thesis, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 2001.
- [28] D. Massart, B. Vandeginste, L. Buydens, S. De Jong, P. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Part A*. Elsevier Science, 1997.
- [29] K.A. Bakeev. *Process Analytical Technology*. Blackwell Publishing, 2005.
- [30] J. P. Conzen. *Multivariate Calibration. A Practical Guide for the Method Development in the Analytical Chemistry*. Bruker Optick GmbH, 2006.

- [31] M. Otto. *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Wiley-VCH, 1999.
- [32] J. Lopes. *Supervisão e diagnóstico de processos farmacêuticos com métodos inteligentes de análise de dados*. PhD thesis, Universidade Técnica de Lisboa, 2001.
- [33] M. Brittberg and C. S. Winalski. Evaluation of cartilage injuries and repair. *Journal of Bone and joint surgery*, 85A:58–68, 2003.
- [34] A. Javed, M. Siddique, M. Vaghelaand, and A. C. Hui. Interobserver variations in intra-articular evaluation during arthroscopy of the knee. *J. Bone Joint Surg. Br*, 84:48–49, 2002.
- [35] G. O. Hofmann, J. Marticke, R. Grossstuck, M. Hoffmann, M. Lange, H. K. W. Plettenberg, R. Braunschweig, O. Schilling, I. Kaden, and G. Spahn. Detection and evaluation of initial cartilage pathology in man: A comparison between mrt, arthroscopy and near-infrared spectroscopy (nir) in their relation to initial knee pain. *Pathophysiology*, 17:1–8, 2010.
- [36] A. I. Caplan, M. Elyaderani, Y. Mochizuki, S. Wakitani, and V. M. Goldberg. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 342:254–269, 1997.
- [37] D. Howell. *Etiopathogenesis of osteoarthritis*. Arthritis and Allied Conditions. D. J. McCarty, Philadelphia, 1989.
- [38] K. Gelse, S. Soder, W. Eger, T. Dietmar, and T. Aigner. Osteophyte development - molecular characterization of differentiation stages. *Osteoarthritis Cartilage*, 11:141–148, 2003.
- [39] R. N. Tandogan, G. Mann, and R. Verdonk. *Sports Injuries: Prevention, Diagnosis, Treatment and Rehabilitation*. Springer, 2012.
- [40] R. H. Miller. *General Principles of Arthroscopy*, volume 35. Orthopedic Surgery, 1997.
- [41] www.doc-tools.com [Acedido a 15 de Março de 2014].
- [42] M. D. R. Treuting. Minimally invasive orthopedic surgery: arthroscopy. *The Ochsner Journal*, 2:158–163, 2000.

- [43] M. Riyami. *Modern Arthroscopy*, volume 8. Jason L. Dragoo, InTech, 2011.
- [44] . <http://www.encyclopediasalud.com/categorias/terapias/articulos/artroscopia-y-cirugia-de-la-rodilla> [Acedido a 17 de Março de 2014].
- [45] X. Ayral, A. Gueguen, R. W. Ike, J. P. Bonvarlet, L. Frizziero, K. Kalunian, L. W. Moreland, S. Myers, K. S. O'Rourke, H. Roos, R. Altman, and M. Dougados. Inter-observer reliability of the arthroscopic quantification of chondropathy of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 6:160–166, 1998.
- [46] http://www.capitalortho.com.au/pdf/knee_arthroscopy.pdf [Acedido a 16 de Fevereiro de 2014].
- [47] J. A. Buckwalter and V. C. Mow. Basic science and injury of articular cartilage, menisci, and bone. *Orthopaedic sports medicine principles and practice*, 2:67–87, 2003.
- [48] D. W. Hayes, R. L. Brower, and K. J. John. Articular cartilage anatomy, injury, and repair. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 18:35–53, 2001.
- [49] A. D. Pearle, R. F. Warren, and S. A. Rodeo. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 24:1–12, 2005.
- [50] A. Aroen, S. Loken, S. Heir, E. Alvik, A. Ekeland, O. G. Granlund, and L. Engebretsen. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med*, 32:211–215, 2004.
- [51] W. W. Curl, J. Krome, E. S. Gordon, J. Rushing, B. P. Smith, and G. G. Poehling. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*, 13:456–460, 1997.
- [52] K. P. Speer, C. E. Spritzer, J. L. Goldner, and W. E. Garrett. Magnetic resonance imaging of traumatic knee articular cartilage injuries. *American Journal of Sports Medicine*, 19:396–402, 1991.
- [53] W. Walton, K. Jonathan, G. Stanly, R. Julia, P. S. Beth, and G. P. Gary. Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Journal Arthroscopy*, 13:456–460, 1997.

- [54] F. R. Noyes, F. W. Bassett, and E. S. Grood. Arthroscopy in acute traumatic haemarthrosis of the knee. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 62A:687–696, 1980.
- [55] F. R. Noyes, E. S. Grood, and N. S. Nussbaum. Effect of intraarticular corticosteroids on ligament properties: a biomechanical and histological study in rhesus knees. *Journal of Clinical Orthodontics*, 123:197–207, 1997.
- [56] M. L. Cameron, K. K. Briggs, and J. R. Steadman. Reproducibility and reliability of the outerbridge classification for grading chondral lesions of the knee arthroscopically. *The American Journal of Sports Medicine*, 31:83–86, 2003.
- [57] . www.cartilage.org [Acedido a 20 de Fevereiro de 2014].
- [58] A. R. Poole, T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, and S. Laverty. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 391:26–33, 2001.
- [59] A. Maroudas. Distribution and diffusion of solutes in articular cartilage. *Biophys. J.*, 10:365–379, 1970.
- [60] F. F. Jaffe, H. J. Mankin, C. Weiss, and A. Zarins. Water binding in the articular cartilage of rabbits. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 56:1031–1039, 1974.
- [61] P. A. Torzilli. *Water Content and Solute Diffusion Properties in Articular Cartilage*. Springer-Verlag, 1990.
- [62] D. Platt, J. L. Bird, and M. T. Bayliss. Ageing of equine articular cartilage: structure and composition of aggrecan and decorin. *Equine Vet. J.*, 30:43–52, 1998.
- [63] L. Wei, O. Svensson, and A. Hjerpe. Correlation of morphologic and biochemical changes in the natural history of spontaneous osteoarthritis in guinea pigs. *Arthrit. Rheum.*, 40:2075–2083, 1997.
- [64] M. V. Padalkar, R. G. Spencer, and N. Pleshko. Near infrared spectroscopic evaluation of water in hyaline cartilage. *Annals of Biomedical Engineering*, 41: 2426–2436, 2013.
- [65] J. H. Kellgren and J. S. Lawrence. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 16:494–501, 1963.

- [66] C. J. Tiderius, L. E. Olsson, P. Leander, O. Ekberg, and L. Dahlberg. Delayed gadolinium-enhanced mri of cartilage (dgemric) in earlyknee osteoarthritis. *Magn Reson Med*, 49:488–492, 2003.
- [67] J. E. Kurkijarvi, M. J. Nissi, I. Kiviranta, J. S. Jurvelin, and M. T. Nieminen. Delayed gadolinium-enhanced mri of cartilage (dgemric) and t2 characteristics of human knee articular cartilage: topographical variation and relationships to mechanical properties. *Magn Reson Med*, 52:41–46, 2004.
- [68] M. A. Bredella, P. F. Tirman, C. G. Peterfy, M. Zarlingo, J. F. Feller, F. W. Bost, J. P. Belzer, T. K. Wischer, and H. K. Genant. Accuracy of t2-weighted fast spin-echo mr imaging with fat saturation in detecting cartilage defects in the knee: comparison with arthroscopy in 130 patients. *AJR Am. J. Roentgenol.*, 172:1073–1080, 1999.
- [69] D. G. Disler, T. R. McCauley, C. G. Kelman, M. D. Fuchs, L. M. Ratner, C. R. Wirth, and P. P. Hospodar. Fat-suppressed three-dimensional spoiled gradient-echo mr imaging of hyaline cartilage defects in the knee: comparison with standard mr imaging and arthroscopy. *AJR Am. J. Roentgenol.*, 167:127–132, 1996.
- [70] A. Williams, L. Sharma, C. A. McKenzie, P. V. Prasad, and D. Burstein. Delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage in knee osteoarthritis: findings at different radiographic stages of disease and relationship to malalignment. *Arthritis Rheum*, 52:3528–3535, 2005.
- [71] X. Li, S. Martin, C. Pitris, R. Ghanta, D. L. Stamper, M. Harman, J. G. Fujimoto, and M. E. Brezinski. High-resolution optical coherence tomographic imaging of osteoarthritic cartilage during open knee surgery. *Arthritis Res. Ther.*, 7:R318–R323, 2005.
- [72] J. M. Herrmann, C. Pitris, B. E. Bouma, S. A. Boppart, C. A. Jesser, D. L. Stamper, J. G. Fujimoto, and M. E. Brezinski. High resolution imaging of normal and osteoarthritic cartilage with optical coherence tomography. *J. Rheumatol*, 26:627–635, 1999.
- [73] G. Spahn, H. Plettenberg, H. Nagel, E. Kahl, H. M. Klinger, T. Muckley, M. Gunther, G. O. Hofmann, and J. A. Mollenhauer. Evaluation of cartilage defects with near-infrared spectroscopy (nir): an ex vivo study. *Med. Eng. Phys.*, 30:285–292, 2008.

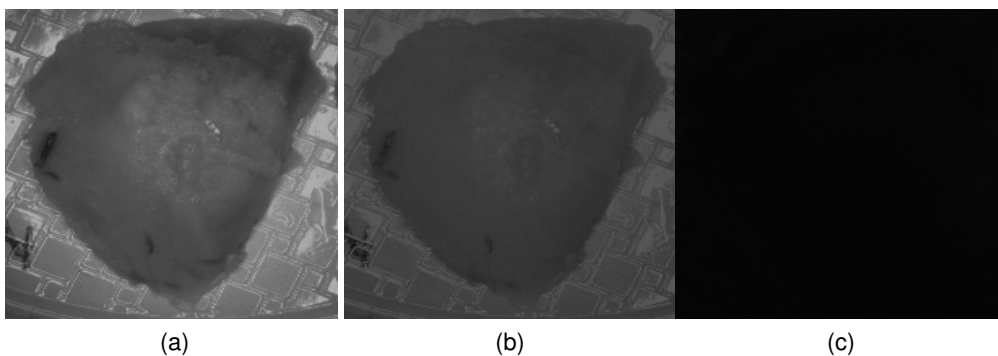
- [74] G. Spahn, H. Plettenberg, E. Kahl, H. M. Klinger, T. Muckley, and G. O. Hofmann. Near-infrared (nir) spectroscopy. a new method for arthroscopic evaluation of low grade degenerated cartilage lesions. results of a pilot study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 8:47, 2007.
- [75] R. A. Shaw, S. Kotowich, H. H. Eysel, M. Jackson, G. T. Thomson, and H. H. Mantsch. Arthritis diagnosis based upon the near-infrared spectrum of synovial fluid. *Rheumatol. Int.*, 15:159–165, 1995.
- [76] G. Spahn, E. Kahl, H. M. Klinger, T. Muckley, M. Gunther, and G. O. Hofmann. Mechanical behavior of intact and low-grade degenerated cartilage. *Biomed. Tech. (Berl.)*, 52:216–222, 2007.
- [77] G. Spahn, H. Plettenberg, H. Nagel, E. Kahl, H. M. Klinger, M. Gunther, T. Muckley, and G. O. Hofmann. Karl fischer titration and coulometry for measurement of water content in small cartilage specimens. *Biomed. Tech.*, 51:355–359, 2006.
- [78] J. K. Marticke, A. Hosselbarth, K. L. Hoffmeier, I. Marintschev, S. Otto, M. Lange, H. K. Plettenberg, G. Spahn, and G. O. Hofmann. How do visual, spectroscopic and biomechanical changes of cartilage correlate in osteoarthritic knee joints? *Clin. Biomech.*, 25:332–340, 2010.
- [79] A. Johansson, T. Sundqvist, J. H. Kuiper, and P. A. Oberg. A spectroscopic approach to imaging and quantification of cartilage lesions in human knee joints. *Physics in Medicine and Biology*, 56:1865–1878, 2011.
- [80] P. A. Oberg, T. Sundqvist, and A. Johansson. Assessment of cartilage thickness utilising reflectance spectroscopy. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 42:3 – 8, 2004.
- [81] . http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/documentos/fritura_alimentos.htm [Acedido a 14 de Julho de 2014].
- [82] S. M. C. Mendes. Controlo de qualidade de Óleo de fritura em restauração colectiva - validação do plano haccp. Master's thesis, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2006.
- [83] T. G. Albuquerque, H. S. Costa, A. S. Silva, and M. B. P. P. Oliveira. Possíveis contaminantes de óleos de fritura. *Riscos e Alimentos*, 7:12–17, 2014.

- [84] <https://www.dre.pt/cgi/dr1s.exe?t=dr&cap=1-1200&doc=19953255%20&v02=&v01=2&v03=1900-01-01&v04=3000-12-21&v05=&v06=&v07=&v08=&v09=&v10=&v11=Portaria&v12=&v13=&v14=&v15=&sort=0&submit=Pesquisar> [Acedido a 10 de Julho de 2014].
- [85] . <http://www.asae.pt/pagina.aspx?f=1&back=1&codigoms=0&codigono=541054845488AAAAAAAAAAAA&back=1&chave=%u00f3leos%20de%20fritura&tema=&advance> [Acedido a 12 de Julho de 2014].
- [86] R. Felisberto, L. Lamas, M. Lopes, P. Sousa, and A. L. Rodrigues. Lipid peroxidation of vegetable oils. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária*, 4: 12 – 17, 2011.
- [87] L. V. Castejon, B. A. Moreira, and J. R. D. Finzer. Estudo da transferência de massa no processo de fritura. *FAZU em Revista*, 7:139 – 144, 2010.
- [88] P. Fellows. *Food Processing Technology. Principles and Practice*. Boca Raton, Second Edition, 2000.
- [89] P. C. M. Freire, J. M. Filho, and T. A. P. C. Ferreira. Major physical and chemical changes in oils and fats used for deep frying: Regulation and effects on health. *Revista de Nutrição*, 26:353–368, 2013.
- [90] J. I. Gray. Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55:539 – 546, 1978.
- [91] S. L. Melton, S. Jafar, D. Sykes, and M. K. Trgiano. Review of stability measurements for frying oils and fried food flavor. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71:1301 – 1308, 1994.
- [92] H. Lawson. *Food oils and fats: technology, utilization and nutrition*. Chapman and Hall, 1995.
- [93] H. D. Belitz and W. Grosch. *Food Chemistry*. Berlin, 1987.
- [94] N. Jorge, B. B. P. Soares, and V. M. Lunardi. Alterações físico-químicas dos Óleos de girassol, milho e soja em frituras. *Química Nova*, 28:947 – 951, 2005.
- [95] K.G. Berger and R.G. Hamilton. *Lipids and oxigen: is rancidity avoidable in practise*. Blackie, Academic and Professional, 1995.

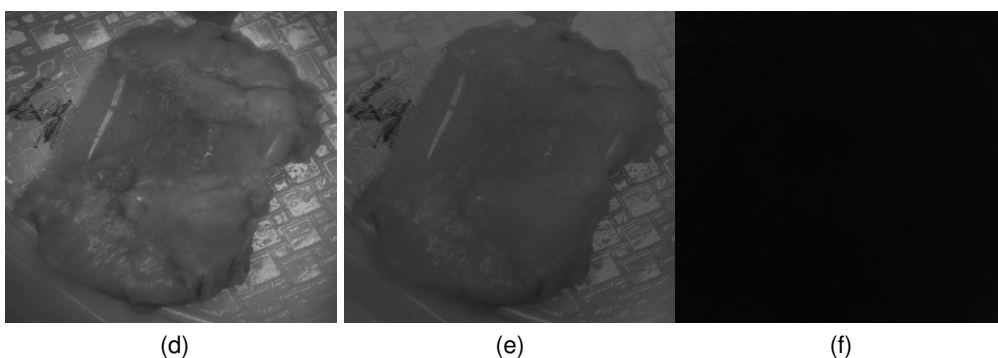
- [96] M. M. Blumenthal, J. R. Stockler, and P. J. Summers. Alkaline contaminant materials in used frying oils: a new quick test. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62:1373 – 1374, 1985.
- [97] G. R. Takeoka, G. H. Full, and L. T. Dao. Effect of heating on the characteristics and chemical composition of selected frying oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45:3244 – 3249, 1997.
- [98] M. Hein, H. Henning, and H. D. Isengard. Determination of total parts with new methods for the quality survey of frying fats and oils. *Talanta*, 47:447 – 454, 1998.
- [99] P. J. White. Methods for measuring changes in deep-fat frying oils. *Food Technology*, 45:75 – 80, 1991.
- [100] F. A. M. Silva, M. F. Borges, and M. Ferreira. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e de capacidade antioxidante. revisão. *Química Nova*, 22:94 – 103, 1999.
- [101] R. Du, K. Lai, Z. Xiao, Y. Shen, W. Wang, and Y. Huang. Evaluation of the quality of deep frying oils with fourier transform near-infrared and mid-infrared spectroscopy. *Journal of Food Science*, 77:261–266, 2012.
- [102] C. L. Ng, R. L. Wehling, and S. L. Cuppett. Near-infrared spectroscopic determination of degradation in vegetable oils used to fry various foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:12286–12290, 2011.

A. Anexos

A.1. Imagens recolhidas das amostras de cartilagem articular



Três imagens que foram registadas, referentes à amostra n°3, sendo (a) a referente a I_1 , (b) a referente a I_{ref} , e por ultimo (c) a referente a I_2 .



Três imagens que foram registadas, referentes à amostra n° 6, sendo (d) a referente a I_1 , (e) a referente a I_{ref} , e por ultimo (f) a referente a I_2 .

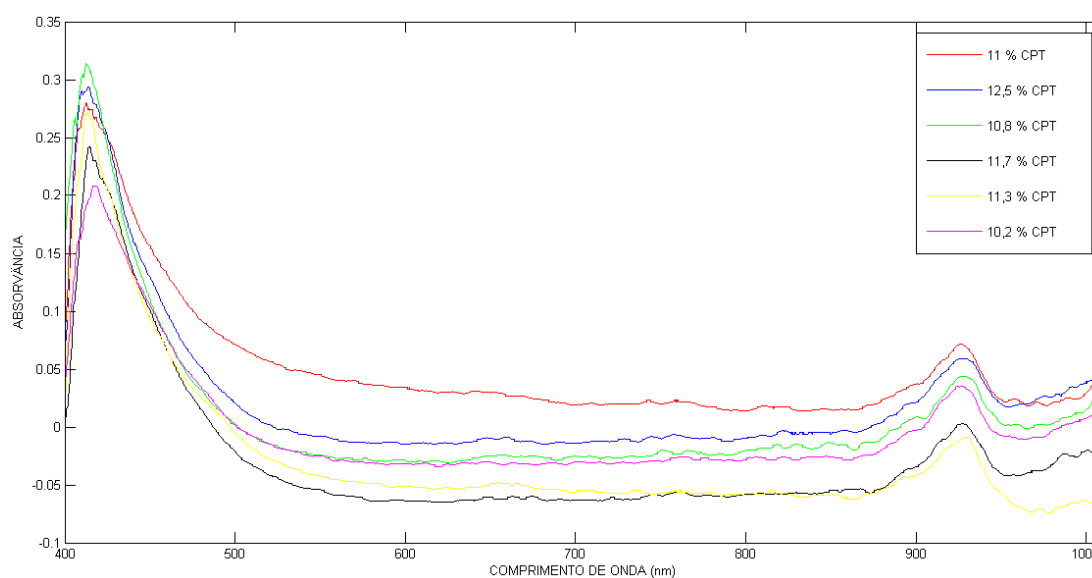
A.2. Principais características das 32 amostras de óleo que compõem o grupo 1

Amostra	Tipo de Óleo	Lote	Temperatura (°C)	Alimento	Tempo de Fritura (min)	% CPT	Data
1	Fry Top	1655-22; 1665-22		Batatas	30	10,8	13-mar
2	Fry Top	1655-22; 1665-22	116,5	Batatas	15	11	13-mar
3	Fry Top	1665-22; 1655-22	164	Batatas	30	13,5	21-mar
4	Fry Top	1665-22; 1655-22	156	Batatas	15	12,8	21-mar
5	Fry Top		146,5	Batatas	15	11,7	27-mar
6	Fry Top	1665-22; 1650-21		Solha (Peixe)		11,9	14-mar
7	Fry Top	1665-22; 1650-21	147	Solha (Peixe)		12,3	14-mar
8	Fry Top	1665-22; 1650-21	177	Solha (Peixe)		9,6	14-mar
9	Fry Top	1665-22; 1650-21	190	Solha (Peixe)		9,7	14-mar
10	Fry Top	1665-22; 1650-21	170	Solha (Peixe)		12,5	14-mar
11	Fry Top	1650-22	166	Transformados - Bolinhos Bacalhau		10,8	14-mar
12	Fry Top	1650-22	167	Transformados - Bolinhos Bacalhau		11,7	14-mar
13	Fry Top	1650-22	176	Transformados - Bolinhos Bacalhau	45	10,8	14-mar
14	Fry Top	1650-22	166	Transformados - Bolinhos bacalhau		12,6	14-mar
15	Fry Top	1650-22	175	Transformados - Bolinhos Bacalhau		10,2	19-mar
16	Fry Top	1650-22	170	Transformados - Croquetes		12,8	12-mar
17	Fry Top	1650-22	177	Transformados - Rissóis de Carne	15	12,1	20-mar
18	Fry Top	1670-22	177	Raia dourada	15	11,7	04-abr
19	Fry Top	1670-22	162	Raia dourada		11,7	04-abr
20	Fry Top	1650-21	165	Filetes de Solha dourados	30	11,4	19-mar
21	Fry Top	1650-21		Filetes de Solha dourados	45	12,5	19-mar
22	Fry Top	1650-21	155	Filetes Dourados		11,3	18-mar
23	Fry Top	1670-22	161	Carapan	15	10,2	02-abr
24	Fry Top		175		15	12,1	18-mar
25	Frygi	052CL430914	165	Solha Frita	15	6,9	28-mar
26	Frygi		160	Solha Frita	30	7,4	28-mar
27	Frygi		147	Solha Frita	15	10,2	28-mar
28	Frygi		159	Solha Frita	60	9,9	28-mar
29	Frygi		160	Transformados - Croquetes	30	11,8	25-mar
30	Frygi	1650-22	175	Transformados - Croquetes	15	13	26-mar
31	Frygi	1650-22	160	Transformados	30	13,2	26-mar
32	Frygi	1655-22; 1665-22	142	Batatas	30	11,4	27-mar

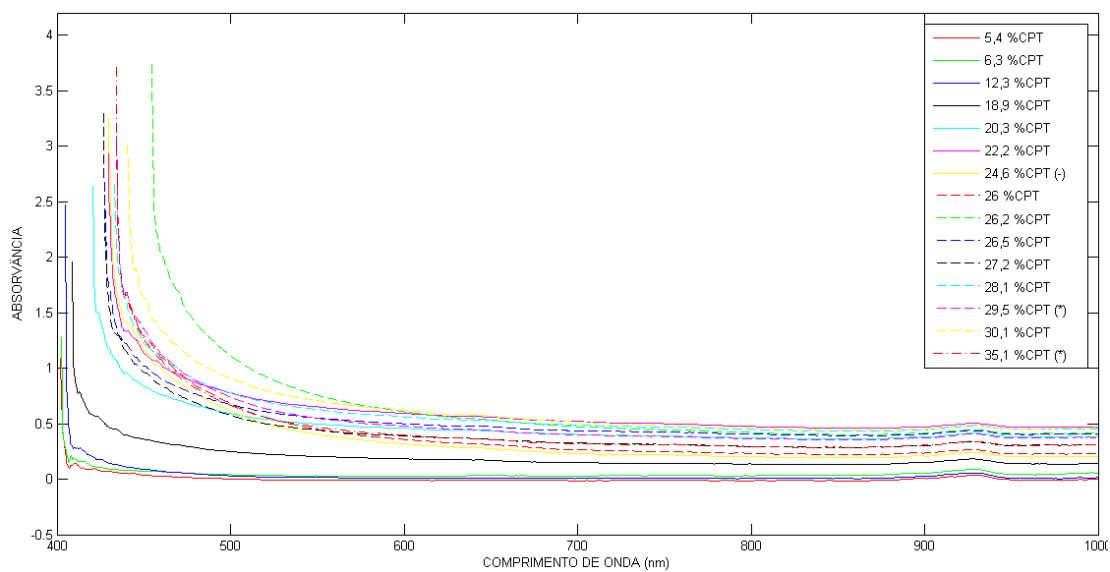
Tabela com as principais características das 32 amostras de óleo alimentar que constituem o conjunto 1. É indicado, o tipo de óleo, o seu lote, algumas condições de fritura, como a temperatura, a duração (minutos) dos banhos de fritura e o alimento que fritaram. É ainda apresentado o valor da % CPT das diversas amostras, assim como a data da sua recolha.

A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares

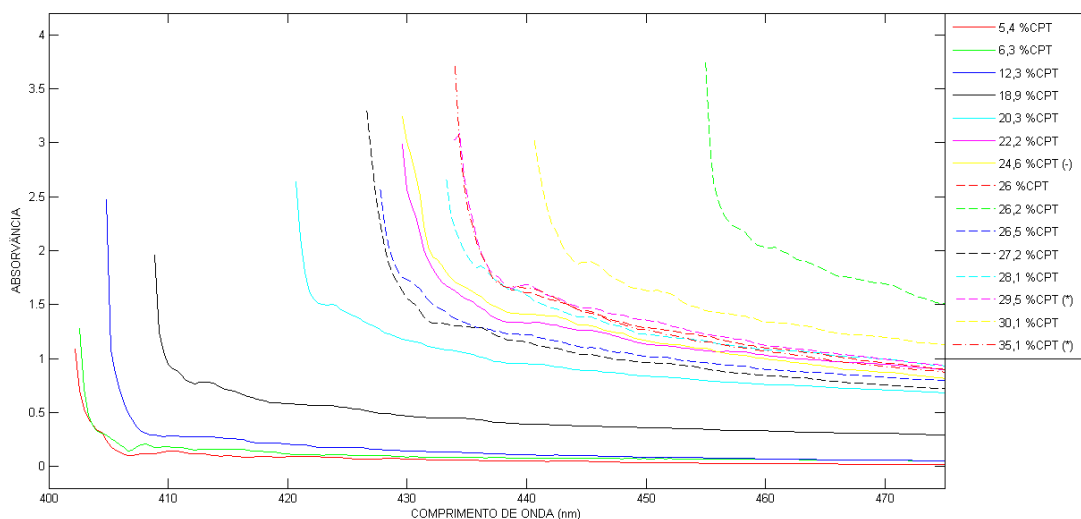
A.3.1. Espectros da região do visível dos conjuntos de amostras 1 e 3.



Espectros da região do visível relativos a uma parte das amostras que compõem o conjunto 1.



(g)

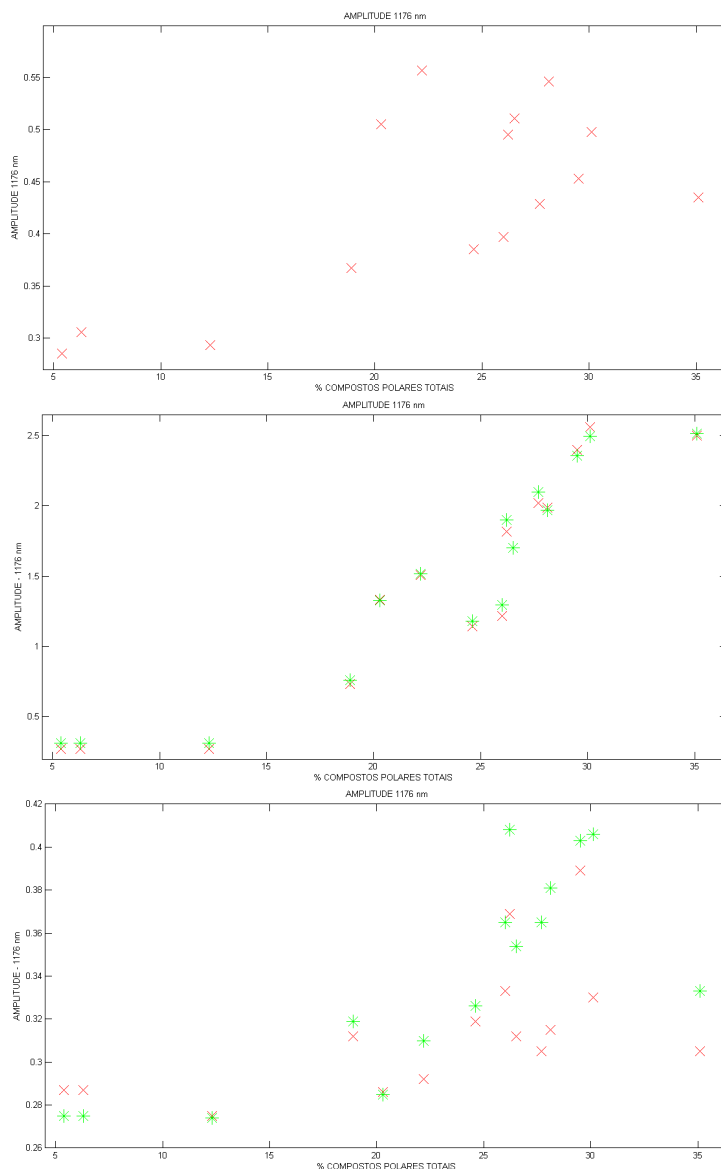


(h)

Em (g) estão representados os espectros da região VIS das amostras do conjunto 3. Em (h) é mostrado o pormenor, onde é possível verificar as diferentes posições do limiar de absorvância, para as diferentes amostras.

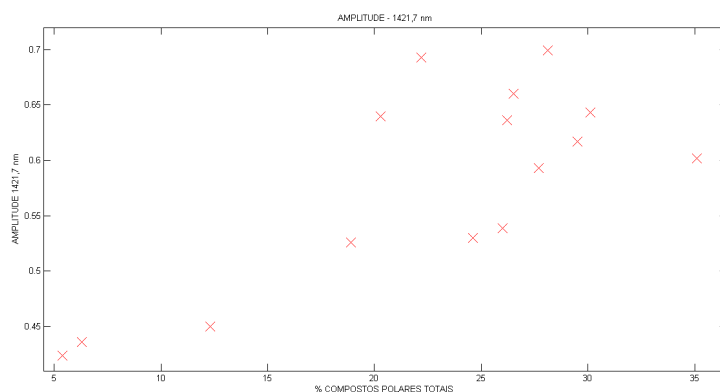
A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares

A.3.2. Gráficos da análise da absorvência absoluta dos espectros de IV em função da percentagem de CPT

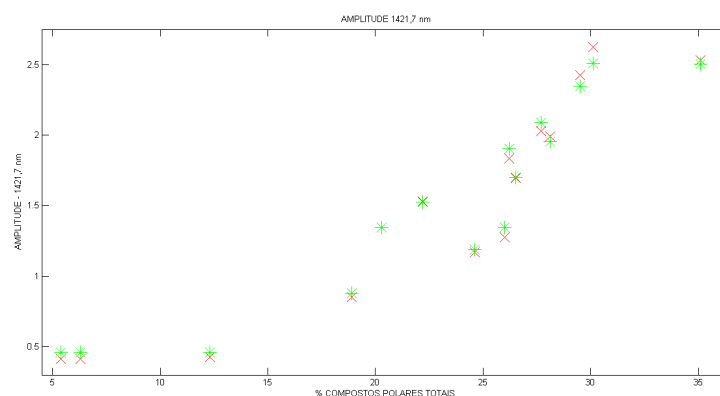


Análise da absorvência absoluta (aos 1176 nm) dos espectros em função da % CPT das amostras do conjunto 3. No primeiro gráfico está a análise dos espectros medidos à temperatura ambiente sem homogeneização, o segundo gráfico corresponde à análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização e o terceiro gráfico contém a análise dos espectros medidos após o aquecimento das amostras em banho-maria, sendo também homogeneizadas. No segundo e terceiro gráficos são apresentadas duas séries de dados pois foram recolhidos dois espectros para cada amostra.

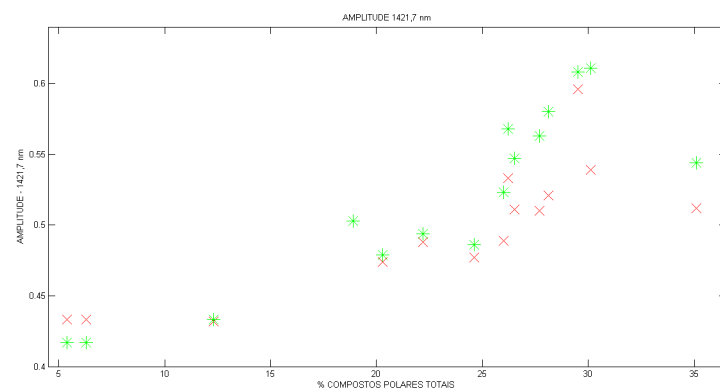
A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares



(i)



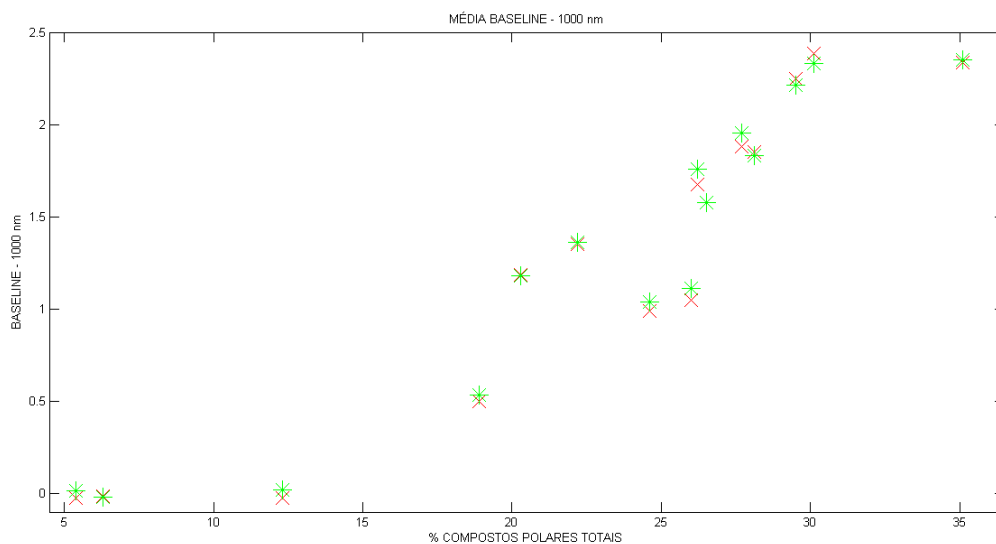
(j)



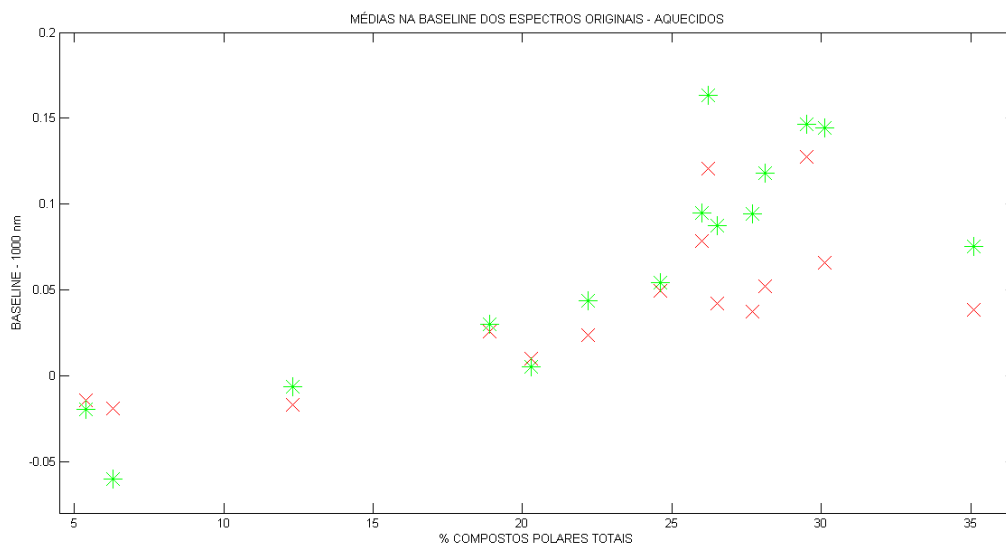
(k)

Análise da absorvância absoluta (aos 1421,7 nm) dos espectros em função da % CPT das amostras do conjunto 3: (i) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente sem homogeneização; (j) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (k) análise dos espectros recolhidos após o aquecimento das amostras em banho-maria e homogeneizadas. Em (j) e (k) são apresentadas duas séries de dados pois foram recolhidos dois espectros para cada amostra.

A.3.3. Gráficos da análise das regiões da baseline dos espectros de IV em função da percentagem de CPT



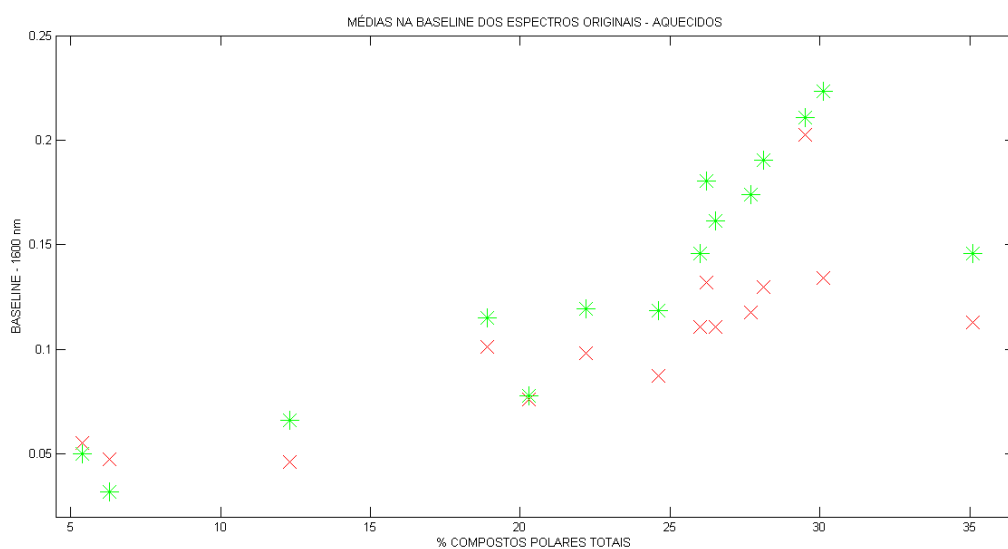
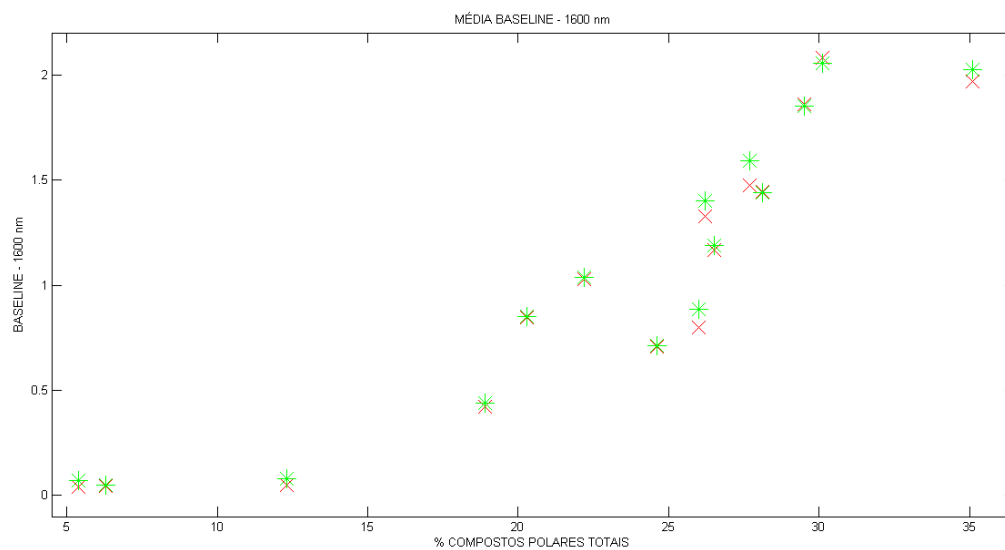
(l)



(m)

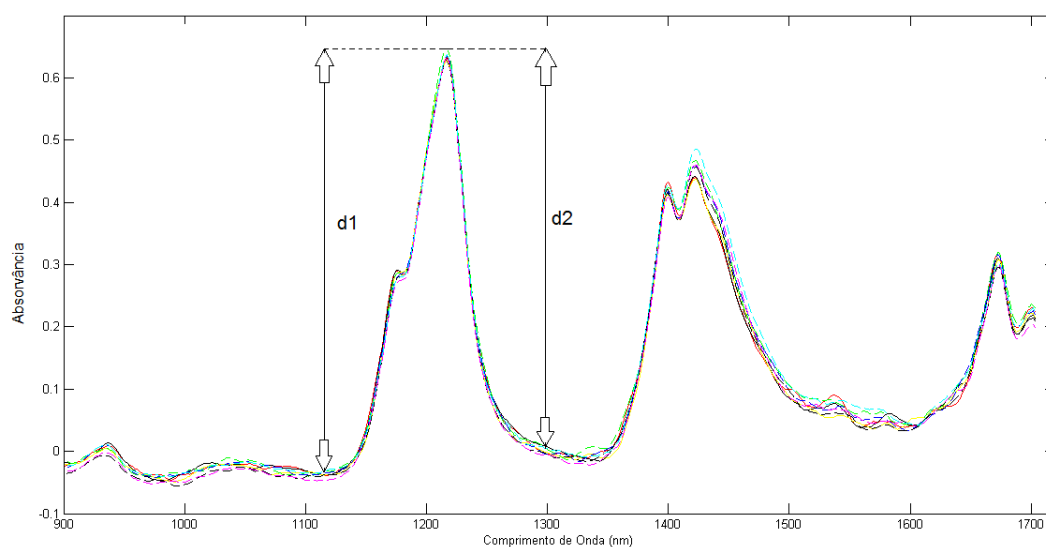
Análise da média da absorvância, em regiões da baseline (1000 nm) em função da % CPT: (l) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (m) análise dos espectros medidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares



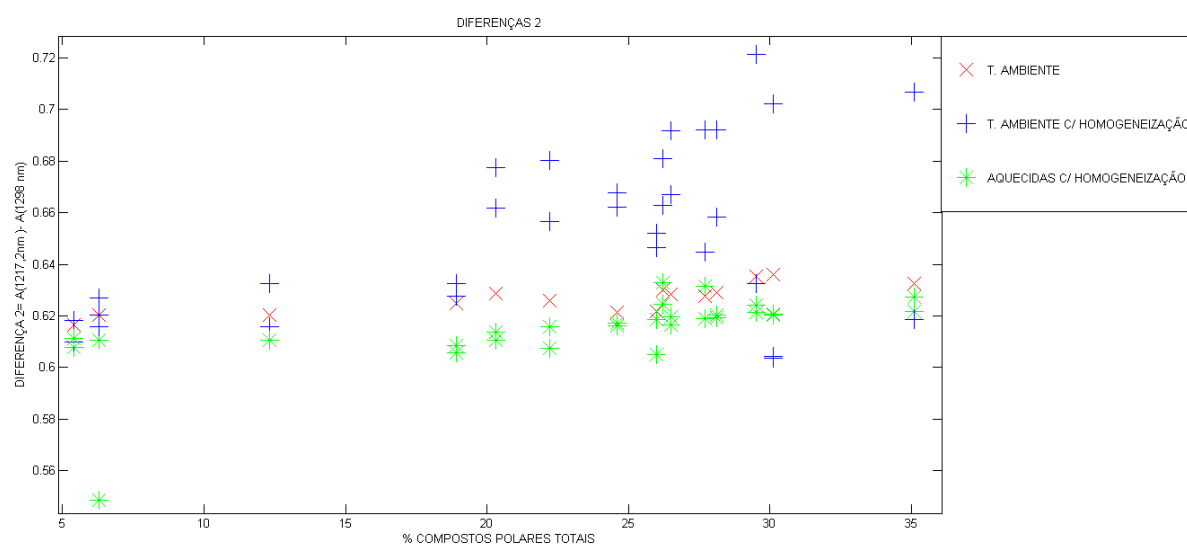
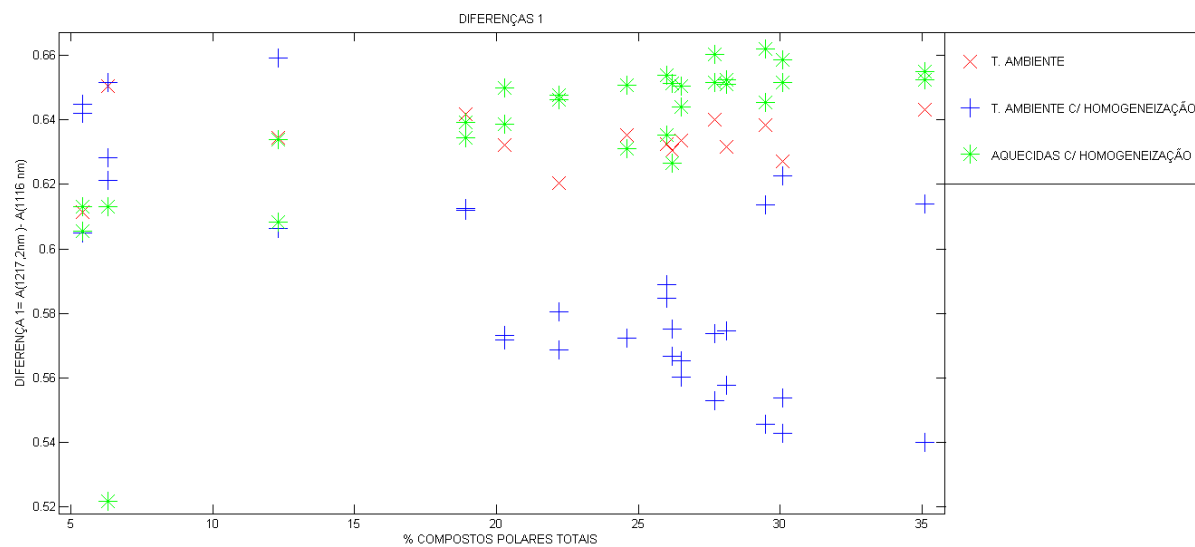
Análise da média da absorvância, em regiões da baseline (1600 nm) em função da % CPT: (n) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (o) análise dos espectros medidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

A.3.4. Gráficos da análise das diferenças dos espectros de IV em função da percentagem de CPT

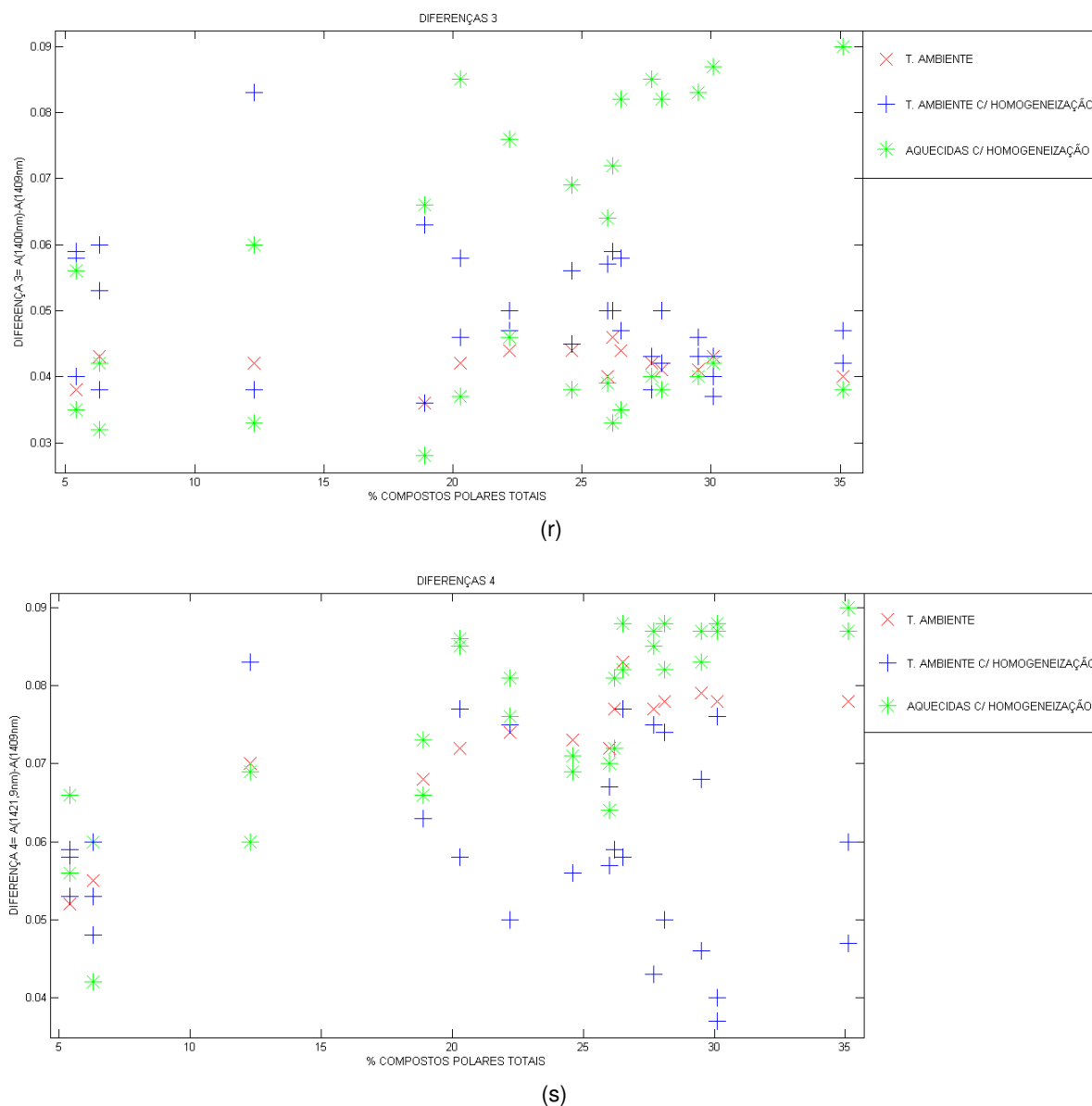


Identificação dos λ utilizados para o cálculos das diferenças 1 e 2. A diferença 1 é dada pela seguinte subtração: $[A(1217,2\text{nm}) - A(1116\text{ nm})]$ e a diferença 2 é dada por: $[A(1217,2\text{nm}) - A(1298\text{ nm})]$.

A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares

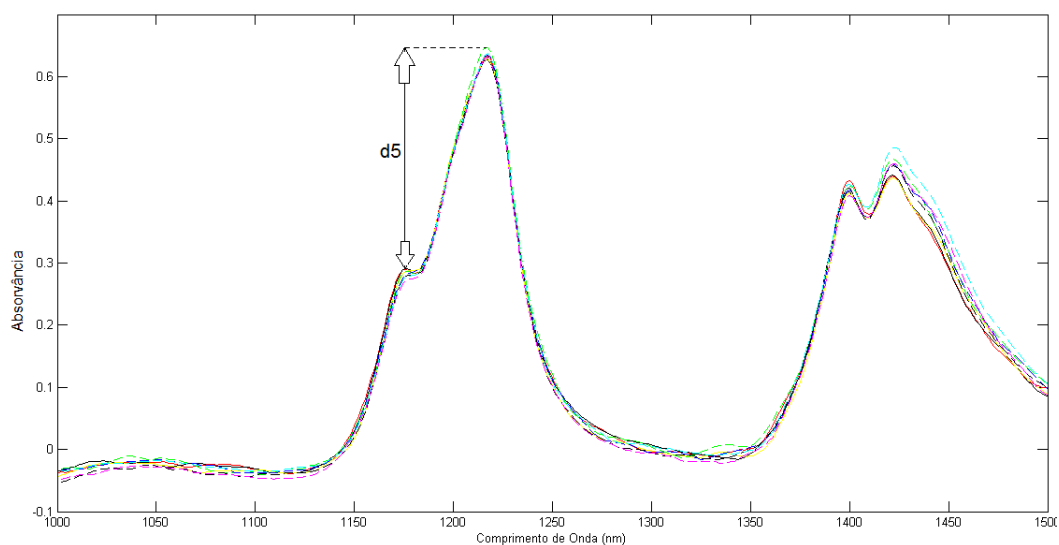


Diferenças de absorvância em função da % CPT. Os resultados são referentes às amostras do conjunto 3: (p) resultados da diferença 1; (q) resultados da diferença 2. São apresentadas três séries de resultados relativos à análise dos espectros medidos à temperatura ambiente, os medidos à temperatura ambiente com homogeneização e os medidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

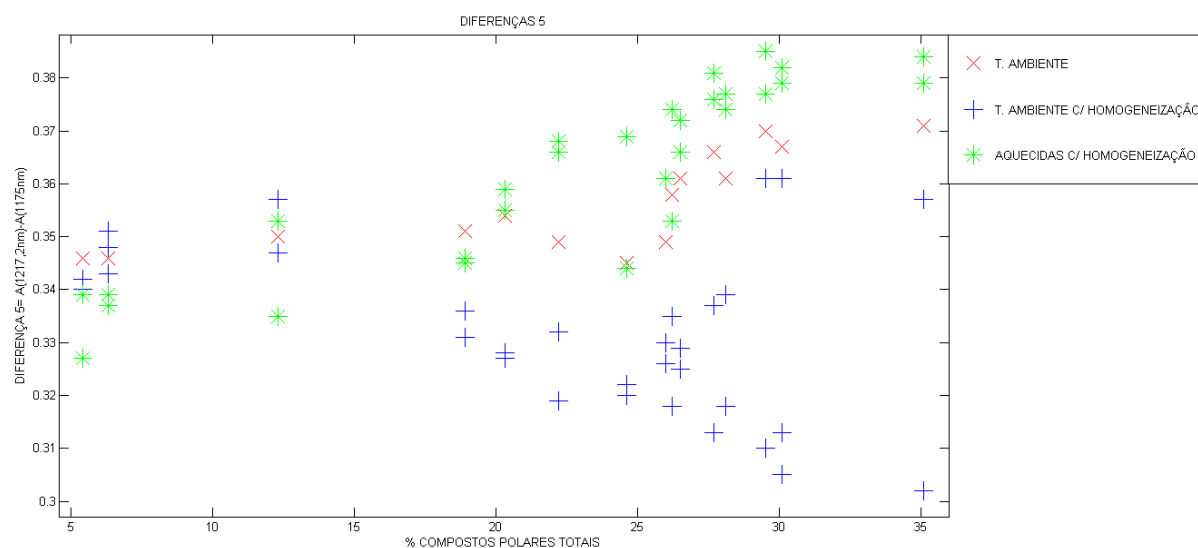


Diferenças de absorvância em função da % CPT. Os resultados são referentes às amostras do conjunto 3: (r) resultados da diferença 3; (s) resultados da diferença 4, identificadas na Figura 4.11. São apresentadas três séries de resultados relativos à análise dos espectros medidos à temperatura ambiente, os medidos à temperatura ambiente com homogeneização e os medidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

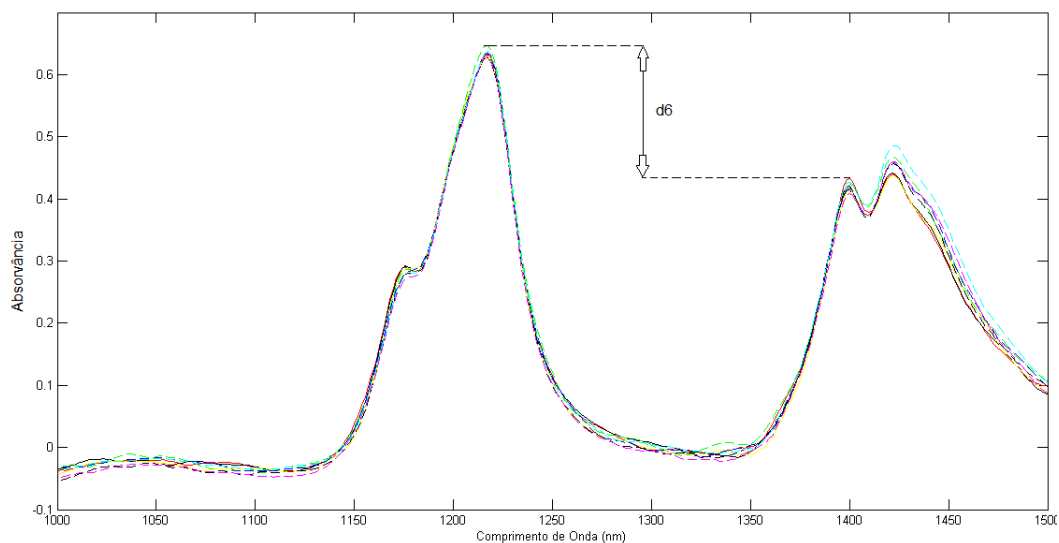
A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares



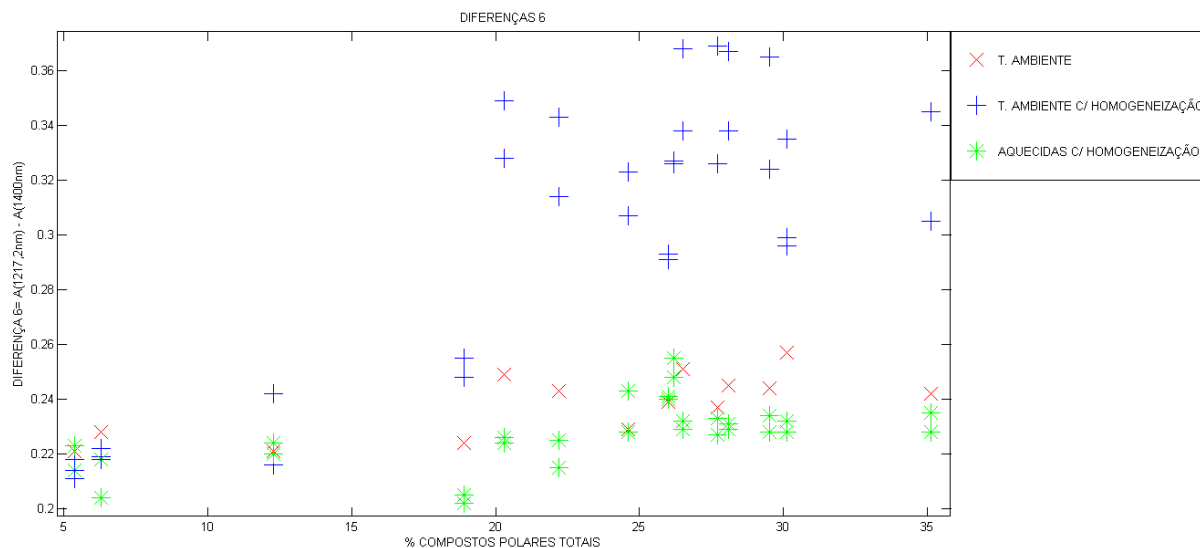
Identificação dos λ utilizados para o cálculos da diferença 5. A diferença 5 é dada pela seguinte subtração: $[A(1217,2\text{nm}) - A(1175\text{nm})]$.



Diferença de absorvância em função da % CPT. Os resultados são referentes às amostras do conjunto 3, sendo o gráfico em questão relativo à diferença 5. São apresentadas três séries de resultados relativos à análise dos espectros medidos à temperatura ambiente, os medidos à temperatura ambiente com homogeneização e os medidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

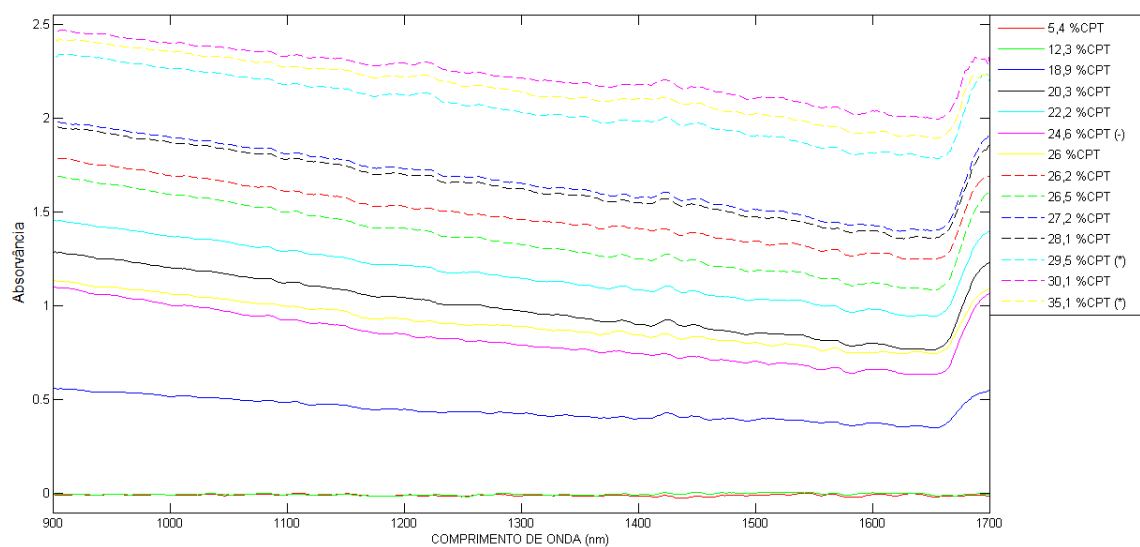


Identificação dos λ utilizados para o cálculos da diferença 6. A diferença 6 é dada pela seguinte subtração: $[A(1217,2\text{nm}) - A(1400\text{nm})]$.

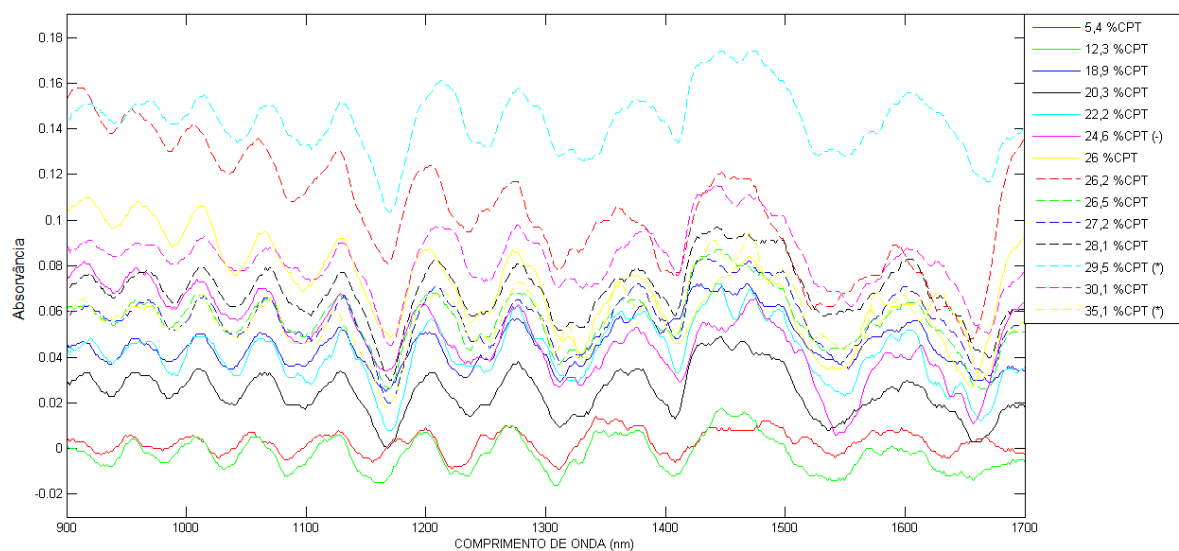


Diferença de absorvância em função da % CPT. Os resultados são referentes às amostras do conjunto 3, sendo o gráfico em questão relativo à diferença 6. São apresentadas três séries de resultados relativos à análise dos espectros medidos à temperatura ambiente, os medidos à temperatura ambiente com homogeneização e os medidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

A.3.5. Curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos restantes espectros



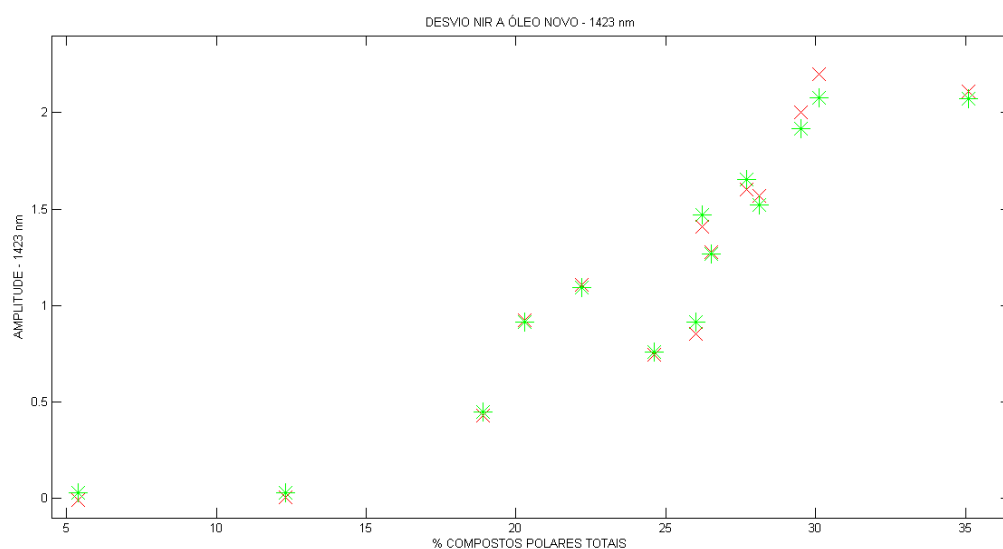
(t)



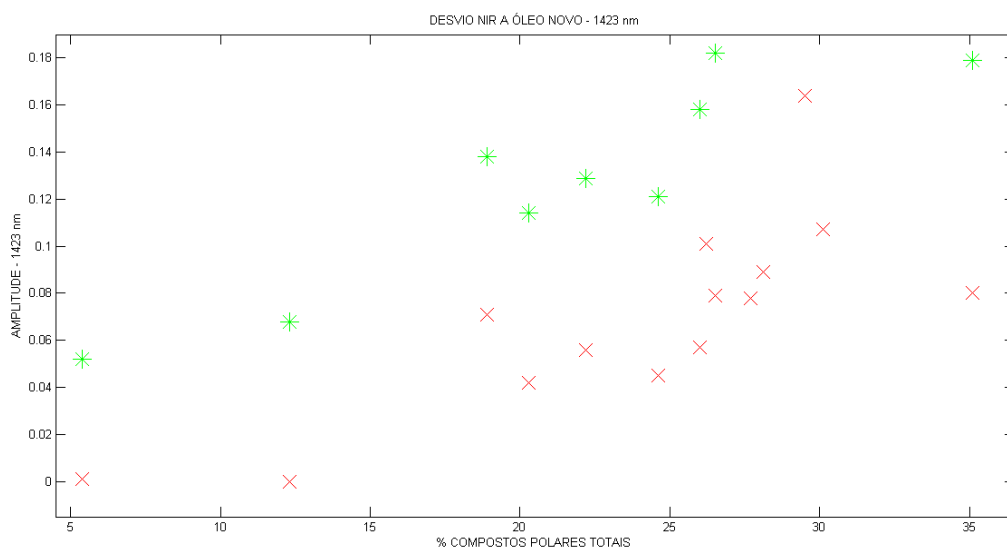
(u)

Curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos restantes espectros das amostras analisadas. Todos os resultados são referentes às amostras do conjunto 3: (t) resultados da aplicação do procedimento nos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (u) resultados da aplicação do procedimento nos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

A.3.6. Análise das amplitudes das curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos restantes espectros



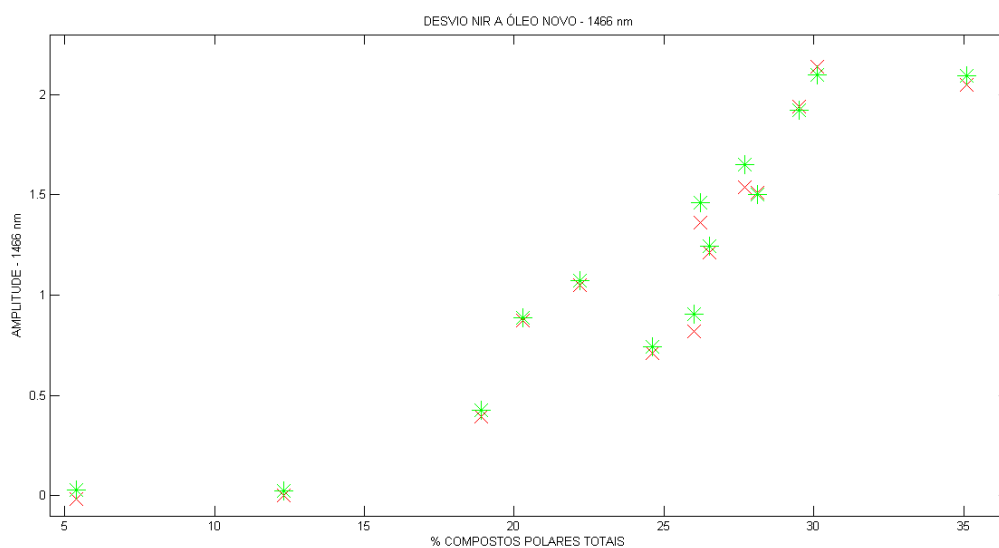
(a)



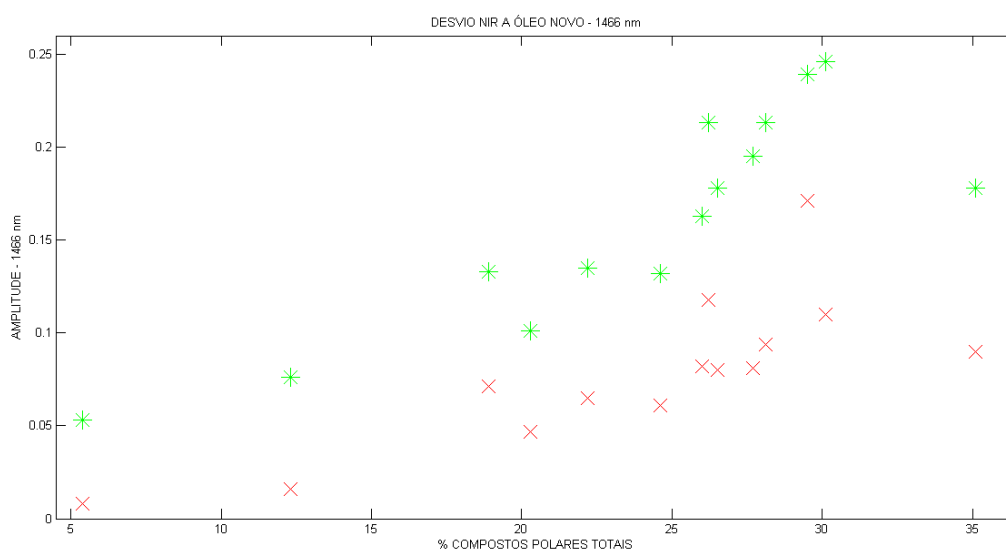
(b)

Análise da absorvância aos 1423 nm nas curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras: (a) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (b) análise dos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares

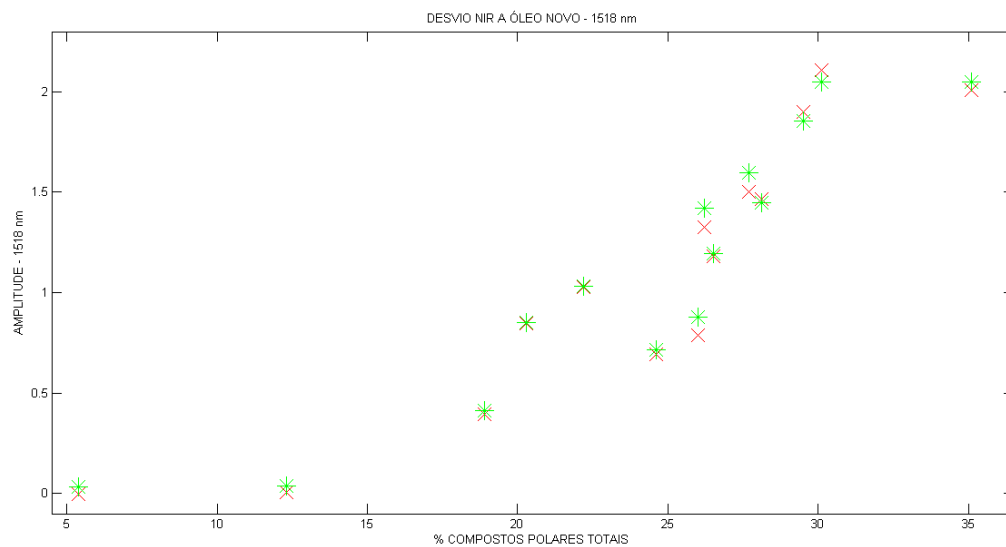


(c)

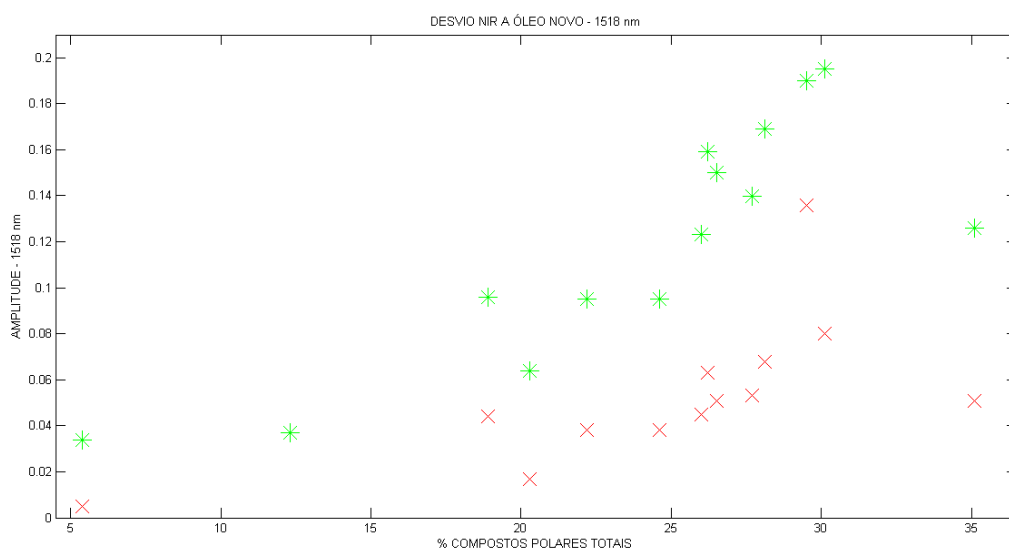


(d)

Análise da absorvância aos 1466 nm nas curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras: (c) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (d) análise dos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.



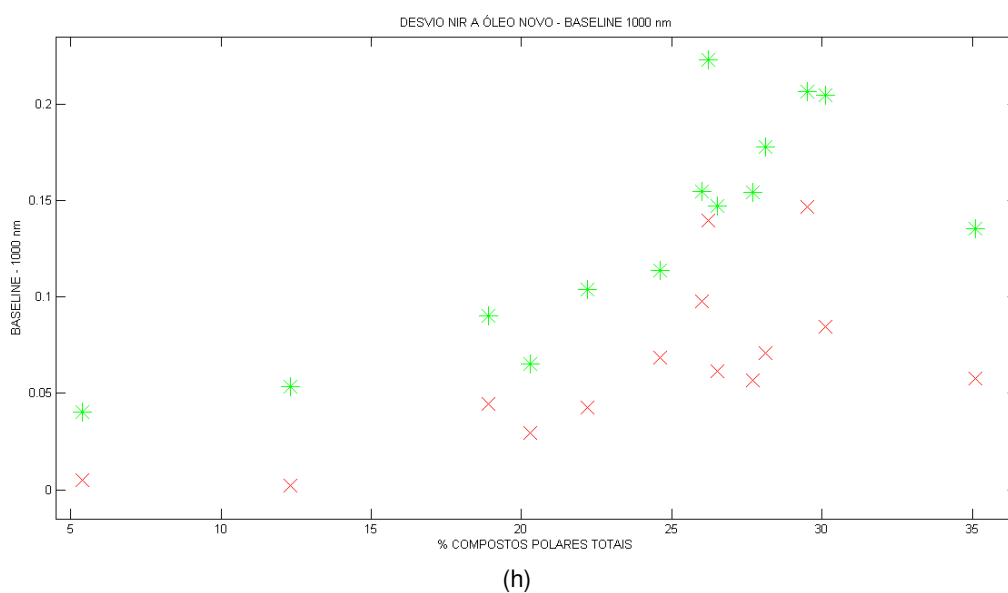
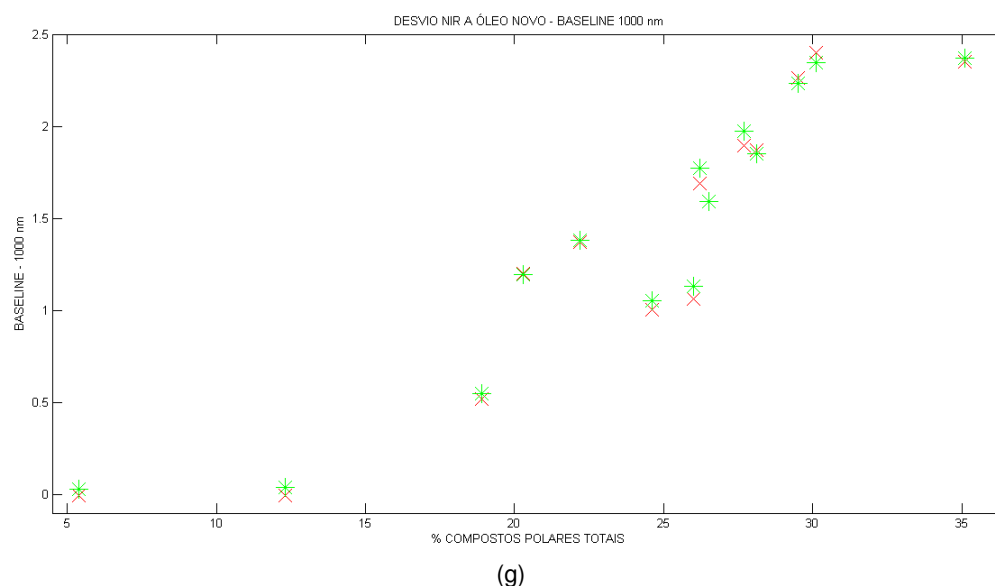
(e)



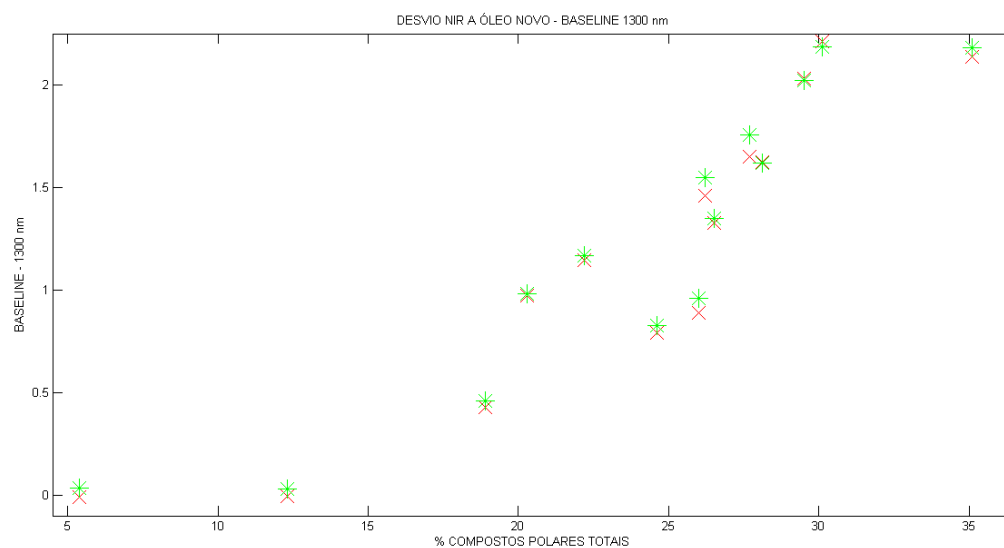
(f)

Análise da absorvância aos 1518 nm nas curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras: (e) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (f) análise dos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

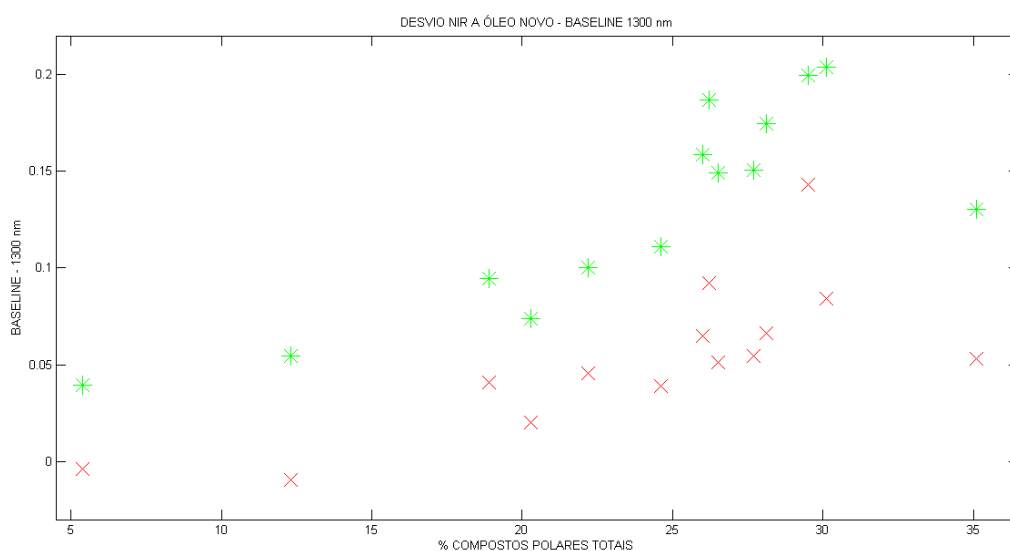
A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares

A.3.7. Análise das *baselines* das Curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos restantes espectros - Conjunto 3

Análise da média de absorvância, em regiões da *baseline* (1000 nm) das curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras: (g) análise dos espectros recolhidos à temperatura ambiente após homogeneização; (h) análise dos espectros recolhidos das amostras aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.



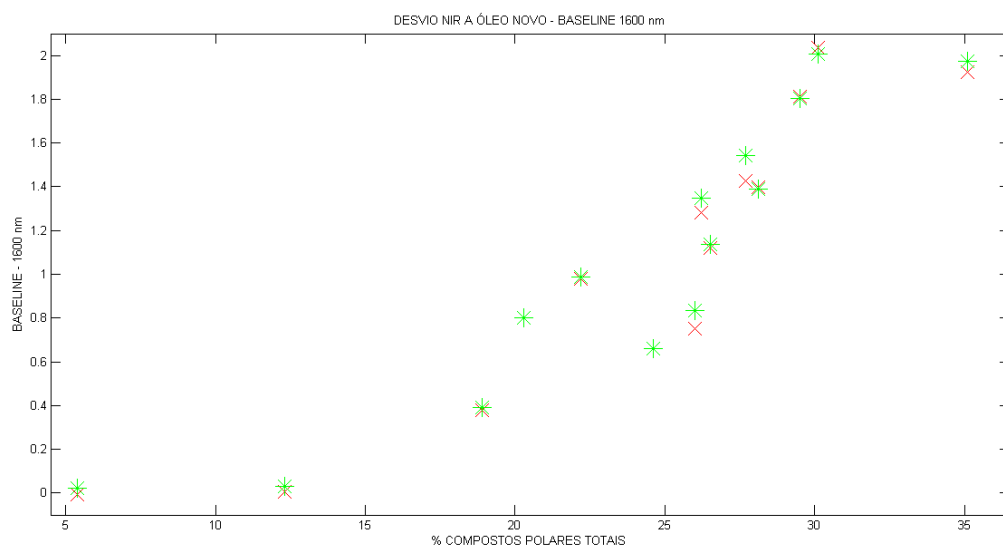
(i)



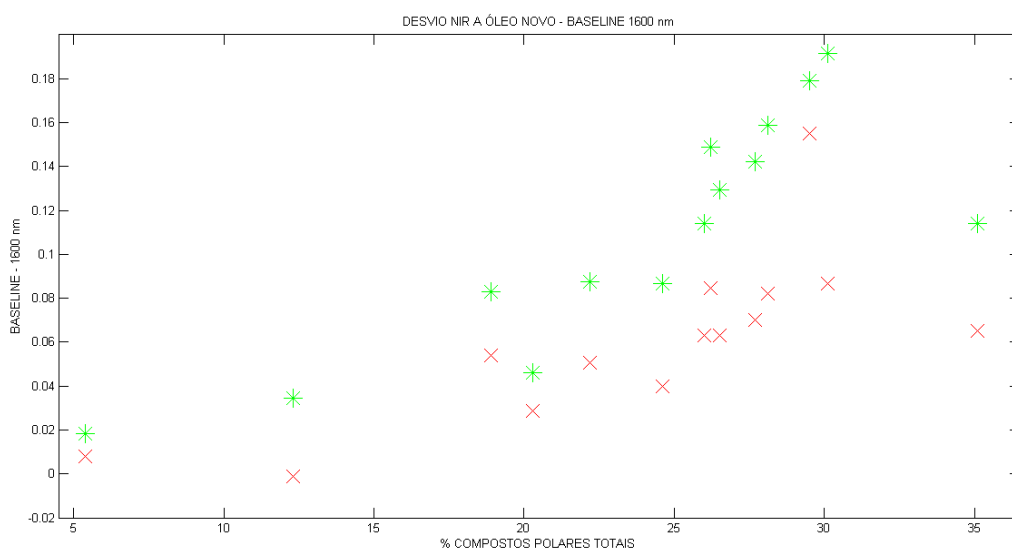
(j)

Análise da média de absorvância, em regiões da *baseline* (1300 nm) das curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras:
(i) análise dos espectros recolhidos à temperatura ambiente após homogeneização;
(j) análise dos espectros recolhidos das amostras aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares



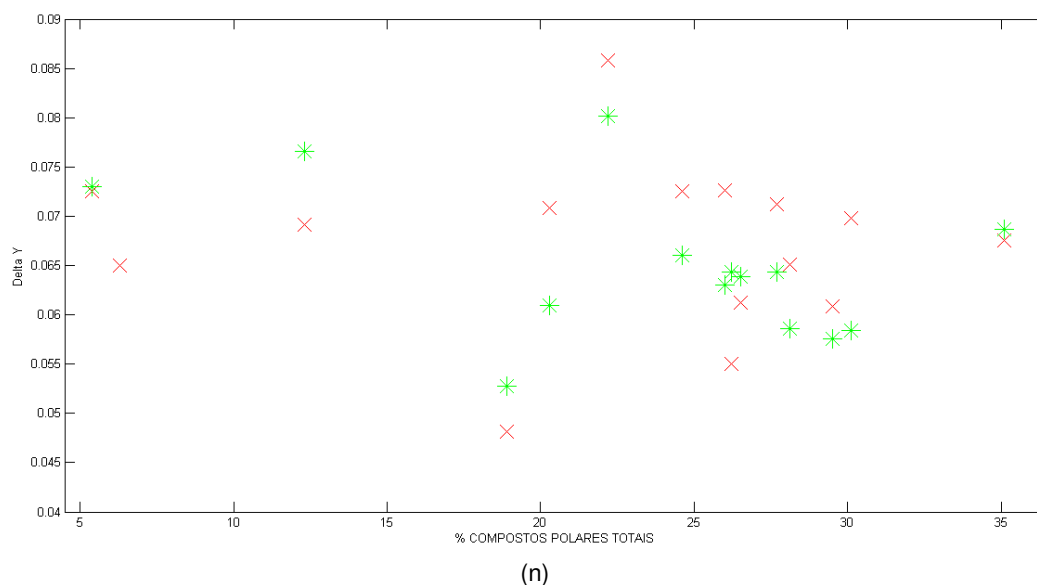
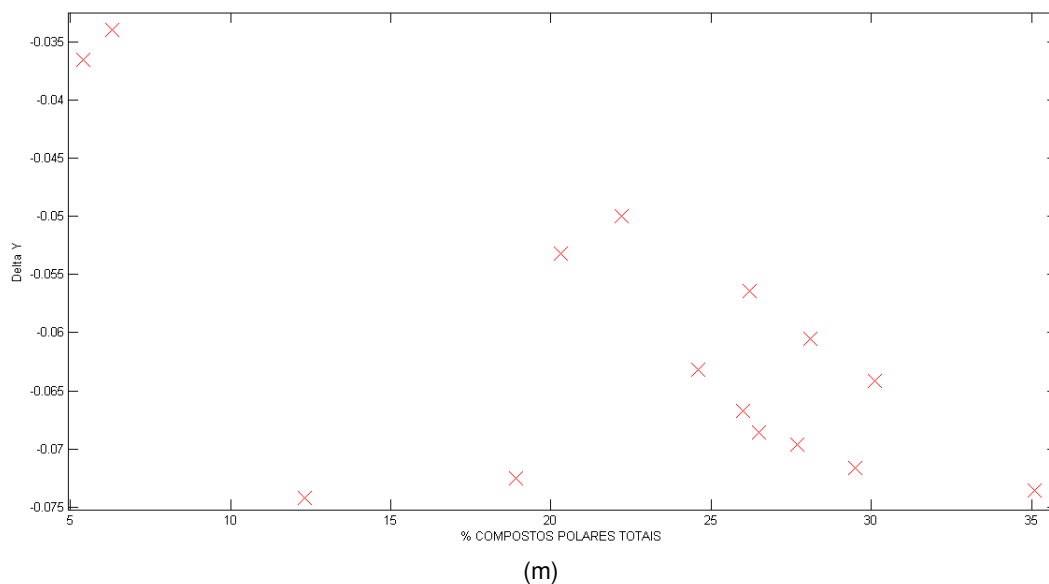
(k)



(l)

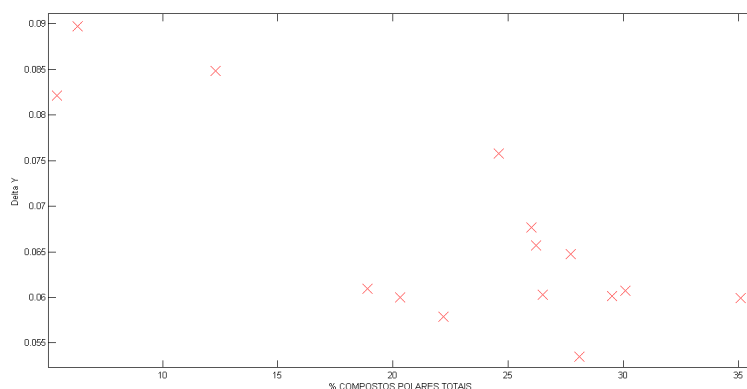
Análise da média de absorvância, em regiões da *baseline* (1600 nm) das curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras: (k) análise dos espectros recolhidos à temperatura ambiente após homogeneização; (l) análise dos espectros recolhidos das amostras aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.

A.3.8. Dinâmica Relativa da Absorvância, pelas medidas $\Delta Y_1, \bar{Y}$ para o conjunto de amostras 3

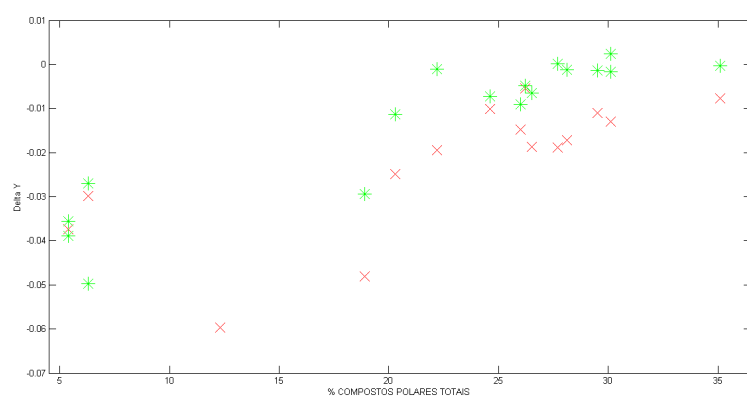


Medida ΔY_1 , em função da % CPT, calculados com os valores da absorvância dos seguintes λ : $\lambda_1 = 1400 \text{ nm}$, $\lambda_{ref} = 1409 \text{ nm}$ e $\lambda_2 = 1421,9 \text{ nm}$: (m) análise dos espectros recolhidos à temperatura ambiente sem homogeneização; (n) análise dos espectros que foram recolhidos das amostras aquecidas e homogeneizadas. Em (n) são apresentadas duas séries de dados pois foram recolhidos dois espectros para cada amostra.

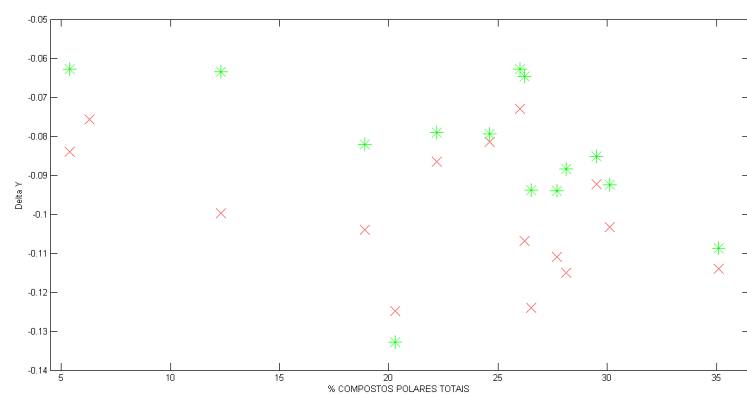
A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares



(o)

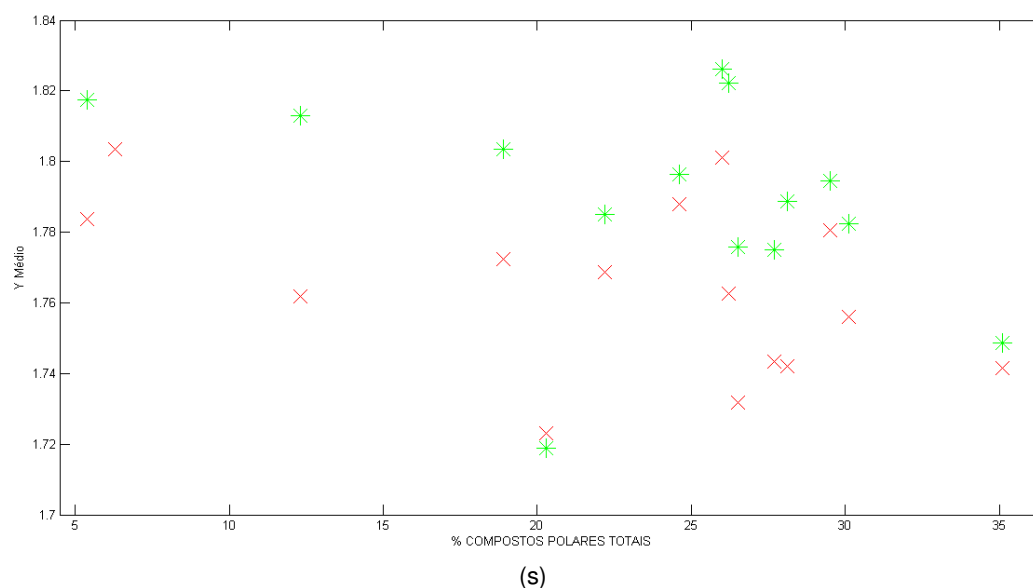
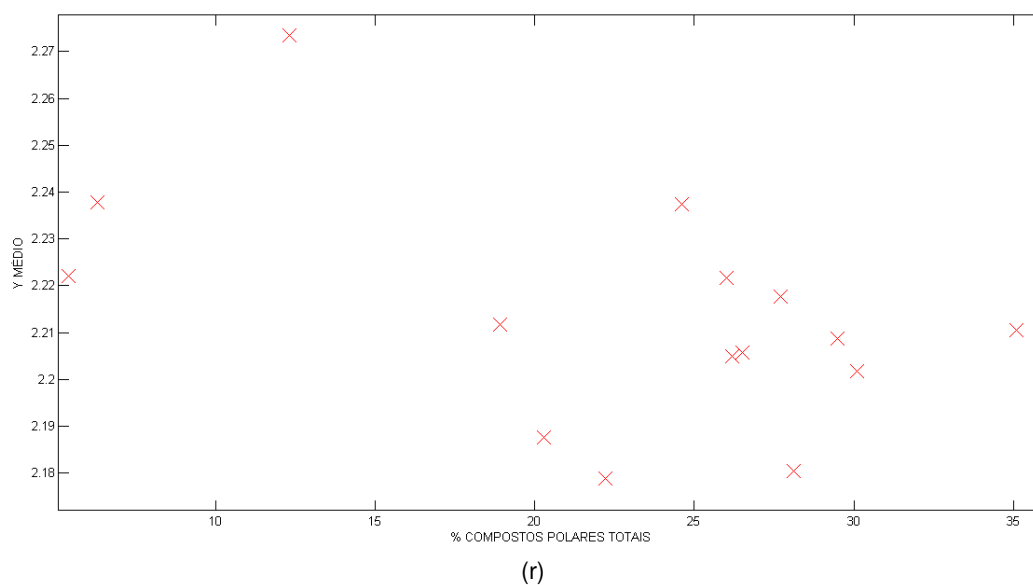


(p)



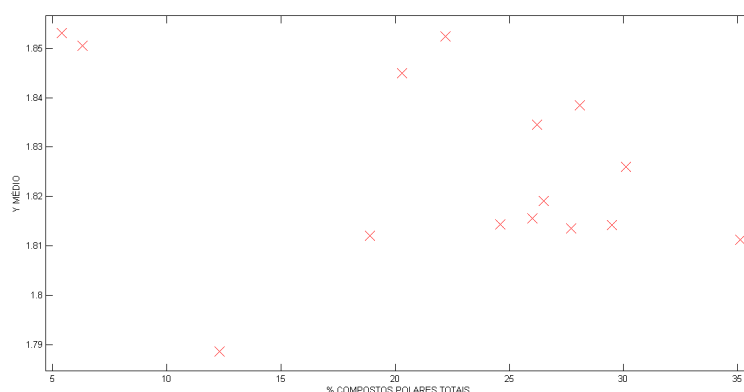
(q)

Medida ΔY 1, em função da % CPT, calculados com os valores da absorvância dos seguintes λ : $\lambda_1 = 1400 \text{ nm}$, $\lambda_{ref} = 1421,9 \text{ nm}$ e $\lambda_2 = 1409 \text{ nm}$: (o) análise dos espectros recolhidos à temperatura ambiente sem homogeneização; (p) análise dos espectros recolhidos à temperatura ambiente após homogeneização; (q) análise dos espectros que foram recolhidos das amostras aquecidas e homogeneizadas. Em (p) e (q) são apresentadas duas séries de dados pois foram recolhidos dois espectros para cada amostra.

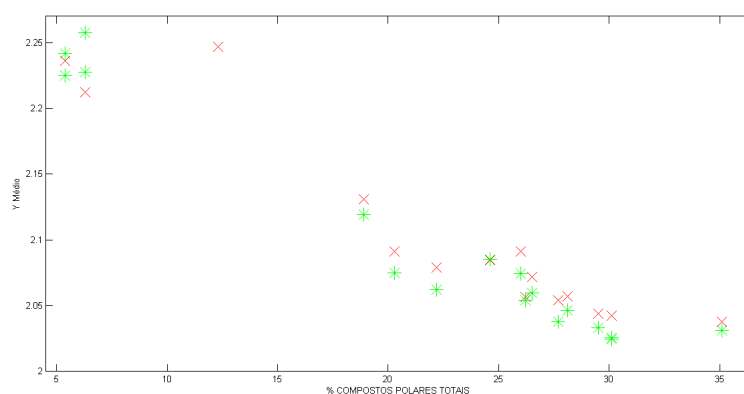


Medida $\bar{Y}$, em função da % CPT, calculados com os valores da absorvância dos seguintes λ : $\lambda_1 = 1400 \text{ nm}$, $\lambda_{ref} = 1409 \text{ nm}$ e $\lambda_2 = 1421,9 \text{ nm}$: (r) análise dos espectros recolhidos à temperatura ambiente sem homogeneização; (s) análise dos espectros que foram recolhidos das amostras aquecidas e homogeneizadas. Em (s) são apresentadas duas séries de dados pois foram recolhidos dois espectros para cada amostra.

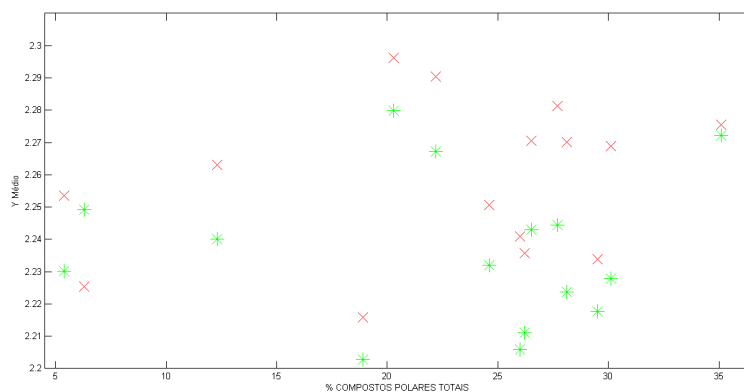
A.3. Resultados complementares da análise espectroscópica dos óleos alimentares



(t)

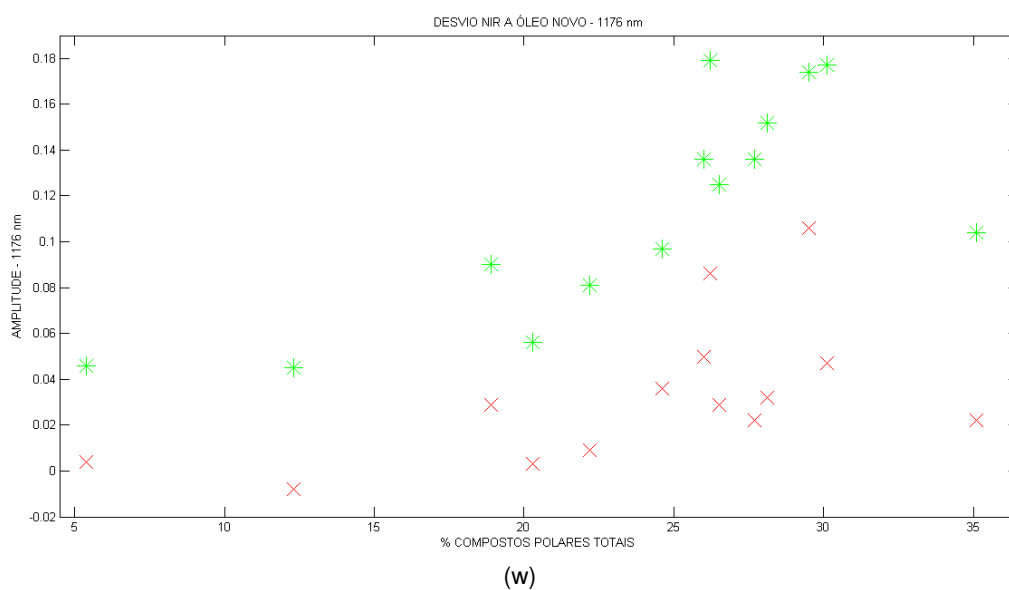
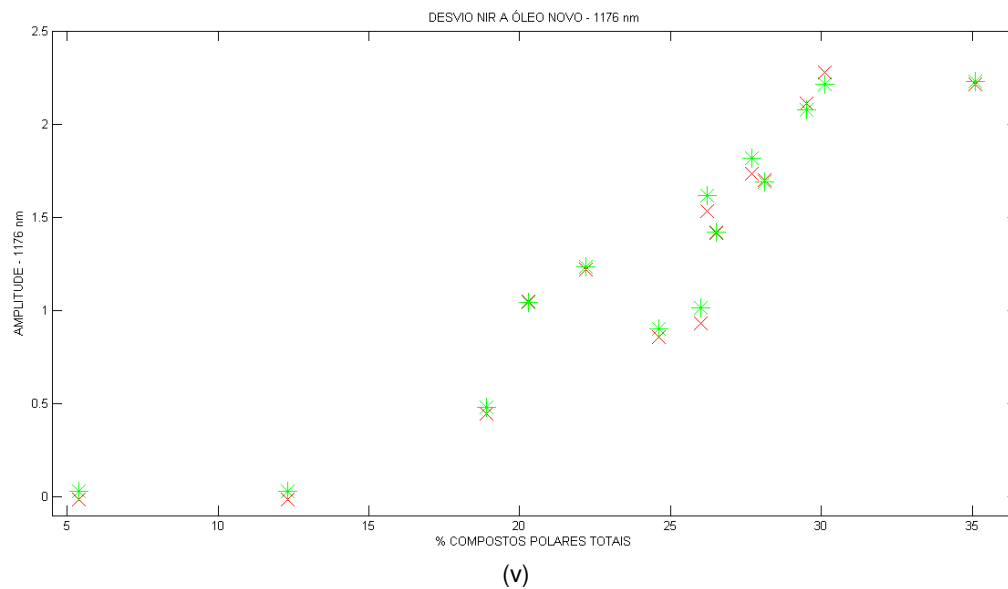


(u)



(v)

Medida $\bar{Y}$, em função da % CPT, calculados com os valores da absorvância dos seguintes λ : $\lambda_1 = 1400 \text{ nm}$, $\lambda_{ref} = 1421,9 \text{ nm}$ e $\lambda_2 = 1409 \text{ nm}$: (t) análise dos espectros recolhidos à temperatura ambiente sem homogeneização; (u) análise dos espectros recolhidos à temperatura ambiente após homogeneização; (v) análise dos espectros que foram recolhidos das amostras aquecidas e homogeneizadas. Em (u) e (v) são apresentadas duas séries de dados pois foram recolhidos dois espectros para cada amostra.



Análise da absorvância aos 1176 nm nas curvas resultantes da subtração do espectro do óleo novo aos espectros das restantes amostras: (v) análise dos espectros medidos à temperatura ambiente após homogeneização; (w) análise dos espectros recolhidos após as amostras serem aquecidas em banho-maria e homogeneizadas.