

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

GABRIEL RADAEL BERNASKI

**AVALIAÇÃO ESPECTRAL DO EFEITO DO AQUECIMENTO EM PROTEÍNA DE
ARROZ E PROTEÍNA TIPO WHEY POR QUIMIOMETRIA**

CAMPO MOURÃO

2022

GABRIEL RADAEL BERNASKI

**AVALIAÇÃO ESPECTRAL DO EFEITO DO AQUECIMENTO EM PROTEÍNA DE
ARROZ E PROTEÍNA TIPO WHEY POR QUIMIOMETRIA**

**Spectral evaluation of the effect of heating on rice protein and whey protein by
chemometry**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Março.

Coorientador: Prof. David Falkowski Junior.

CAMPO MOURÃO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

GABRIEL RADAEL BERNASKI

**AVALIAÇÃO ESPECTRAL DO EFEITO DO AQUECIMENTO EM PROTEÍNA DE
ARROZ E PROTEÍNA TIPO WHEY POR QUIMIOMETRIA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 14/junho/2022

Paulo Henrique Março
Doutorado em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Evandro Bona
Doutorado em Ciência de Alimentos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Leila Larisa Medeiros Marques
Doutorado em Ciências Farmacêuticas
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

CAMPO MOURÃO

2022

Dedico este trabalho aos meus pais,
por todo apoio e auxílio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por estar comigo em todos os momentos de dificuldades, por ter me ajudado a continuar o meu caminho e meu sonho.

Aos meus pais e minha irmã, por todo apoio e auxílio de todo e qualquer tipo, por terem me ajudado e me incentivado a seguir meus estudos e sonhos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Henrique Março, por todos os ensinamentos, ajudas e parceria que teve comigo desde os períodos de iniciação científica, me ajudando nos momentos mais importantes e sendo meu exemplo e inspiração acadêmica.

Ao meu coorientador David Falkowski Junior, pela ajuda na pesquisa e no laboratório, se tornando um grande amigo de pesquisa.

Aos meus amigos da graduação, Igor e Leonardo, por terem me animado e melhorado meus dias nesses longos anos, e principalmente a Pâmela, por todo apoio, incentivo, e companheirismo nos momentos bons e ruins.

A toda a minha família, pelos momentos de ausência e por todo carinho e entendimento das minhas responsabilidades.

Agradeço ao PPGTA por toda a infraestrutura e equipamentos disponibilizados.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento da presente pesquisa.

RESUMO

As proteínas desempenham papel importante no corpo humano através de funções biológicas, sendo que nos alimentos as proteínas podem ser de origem vegetal ou animal. As proteínas de origem animal são empregadas amplamente, enquanto as de origem vegetal vem ganhando espaço graças a apelos que passam por filosofias sobre a vida animal ao desmatamento necessário para expansão da produção agropecuária. Com as duas alternativas de proteínas disponíveis, é de interesse dos consumidores conhecer os limites de uso relacionados a estabilidade destes alimentos, uma vez que são necessários diferentes tratamentos para o preparo de formulações alimentícias enriquecidas de proteínas, tais como o tratamento térmico, que pode levar a desnaturação proteica, resultando na perda das funções biológicas das proteínas. Para tanto, este estudo teve como objetivo avaliar espectralmente na região do infravermelho próximo (NIR) a influência do aquecimento em amostras de proteínas de arroz e de soro de leite (*whey*). No experimento, as proteínas foram aquecidas em temperaturas de 35, 50, 100, 150, 160, 170 e 180 °C. As amostras foram submetidas a aquecimento por períodos de 20, 40 e 60 minutos e os espectros foram obtidos utilizando o equipamento MicroNIR® (VIAVI-JDSU) para medidas entre 900 a 1700 nm. Os espectros obtidos foram alisados e submetidos a segunda derivada com polinômio de segunda-ordem e janela de 7 pontos utilizando-se o algoritmo de Savistky-Golay, sendo na sequência avaliados a partir de resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS). Os espectros recuperados por MCR-ALS indicam que a temperatura de 50 °C promove variações espectrais que são mais acentuadas nas proteínas de origem animal, sendo estas variações mais perceptíveis acima de 100 °C. Observa-se ainda que o aquecimento promove mais alterações no espectro das proteínas tipo *whey* que nas proteínas de arroz. Assim, o estudo sugere que as proteínas de arroz se apresentam mais estáveis do que as proteínas do soro do leite por terem sofrido menor variação espectral. Porém é importante observar que a temperatura limite sugerida a partir da aplicação do MCR-ALS é de 100 °C para ambas as proteínas.

Palavras-chave: proteínas; aquecimento; NIR; MCR-ALS.

ABSTRACT

Proteins play an important role in the human body through biological functions, and in food, proteins can be of vegetable or animal origin. Proteins of animal origin are widely used, while those of plant origin have been gaining attention thanks to appeals that range from philosophies about animal life to deforestation, related to the need to expand agricultural production. Considering these protein alternatives, the consumers need to know about the limits of using these foods, mainly regarding their stability, since different treatments are necessary for the preparation of protein-enriched food formulations, such as heat treatments, which can drive protein denaturation, resulting in the loss of their biological functions. Therefore, this study aimed to spectrally evaluate the influence of heating in samples of rice and whey proteins in the near-infrared region (NIR). In the experiment, the proteins were heated at temperatures of 35, 50, 100, 150, 160, 170, and 180 °C. The samples were heated for 20, 40, and 60 minutes, and the spectra were obtained using the MicroNIR® equipment (VIAMI-JDSU) for measurements between 900 and 1700 nm. The spectra obtained were smoothed and subjected to second-derivative with second-order polynomial and 7-point window using the Savistky-Golay algorithm and subsequently evaluated by multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR-ALS). The spectra recovered by MCR-ALS indicated that the temperature of 50 °C promotes spectral variations that are more pronounced in proteins of animal origin, and these variations were more noticeable above 100 °C. It was also observed that heating promotes more changes in the spectra of whey proteins than rice ones. Thus, the study suggests that rice proteins are more stable than whey proteins because they have suffered less spectral variation. However, it is important to note that the suggested limit temperature considering the application of the MCR-ALS is 100 °C for both proteins.

Keywords: proteins; heating; NIR; MCR-ALS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Média dos espectros (A) Brutos e (B) após processamento, obtidos nas temperaturas entre 35 e 180 °C para as amostras de proteína de arroz.	20
Figura 2 – (A) Espectros processados, (B) espectros recuperados por MCR-ALS após processamento e segunda derivada e (C) respectivas concentrações relativas em função da temperatura/tempo, recuperadas por MCR-ALS para as amostras de proteína de arroz.	21
Figura 3 – Média dos espectros (A) Brutos e (B) após processamento, obtidos nas temperaturas entre 35 e 180 °C para as amostras de proteína de soro de leite (whey).....	22
Figura 4 – (A) Espectros processados, (B) espectros recuperados por MCR-ALS após processamento e segunda derivada e (C) respectivas concentrações relativas, recuperadas por MCR-ALS para as amostras de proteína de soro de leite.	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NIR	<i>Near-InfraRed</i>
MCR-ALS	<i>Multivariate Curve Resolution with Alternating Least-Squares</i>
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo geral.....	12
2.2	Objetivos específicos.....	12
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1	Proteínas	13
3.1.1	Proteínas vegetais e animais	13
3.1.2	Proteína de soro de leite (<i>Whey Protein</i>).....	14
3.1.3	Proteína de Arroz	15
3.2	Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR)	15
3.3	Quimiometria	16
3.4	MCR-ALS	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1	Amostragem.....	18
4.2	Preparo.....	18
4.3	Aquecimento das amostras de proteínas	18
4.4	Condicionamento das amostras	18
4.5	Obtenção dos espectros NIR.....	19
4.6	Análise multivariada.....	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
6	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Proteínas são componentes que estão relacionados praticamente com todas as células vivas. Atuam como catalisadores nas reações químicas nos organismos vivos que envolvem enzimas ou hormônios e trabalham na regeneração de tecidos, auxiliando nas reações imunológicas com os ácidos nucleicos, e tem grande importância nos fenômenos de crescimento e reprodução. As proteínas são formadas basicamente por aminoácidos, que são conectados por ligações peptídicas, e suas propriedades são determinadas a partir do número e do sequenciamento dos aminoácidos (FANI, 2016).

As proteínas podem ser encontradas em alimentos de origem animal e vegetal sendo que as proteínas de origem animal são capazes de suprir a demanda de aminoácidos indispensáveis do corpo humano além de possuírem alta digestibilidade no intestino delgado (BAILEY *et al.*, 2020). Por outro lado, proteínas extraídas de plantas devem ser consumidas de modo a conciliar uma variedade adequada de diferentes vegetais capazes de fornecer quantidades suficientes de aminoácidos essenciais (HEVER, 2016).

O arroz integral ou branco é uma das fontes alternativas de proteína vegetal. O farelo de arroz, os grãos quebrados do arroz e o resíduo da extração do arroz, são derivados do grão (de arroz) que tem menor valor econômico que o endosperma, e são as fontes de obtenção da proteína deste alimento (NADATHUR; WANASUNDARA; SCANLIN, 2016). A proteína do arroz, além de benefícios à saúde, possui propriedades hipoalergênicas, e esta é uma das principais razões para a crescente procura por este produto. Além disso, a proteína de arroz solúvel melhora significativamente as formulações infantis à base de arroz por aumentar a solubilidade associada dos demais compostos (NADATHUR; WANASUNDARA; SCANLIN, 2016).

O produto da proteína derivada de arroz integral tem propriedades como reparação e construção de tecidos musculares, que são semelhantes a proteína whey. A capacidade hipoalergênica e os benefícios para saúde são uma contrapartida com relação a falta de propriedades funcionais deste produto (AXIOM FOODS, [s. d.]).

A proteína denominada “whey” é um produto do soro do leite geralmente utilizado na indústria de alimentos, principalmente por possuir propriedades estabilizantes e emulsificantes (KHOURYIEH *et al.*, 2015). O whey possui características de alto valor nutricional, fácil digestão, alta biodisponibilidade e alto

valor biológico (rica em atividades biológicas), sendo um ingrediente importante na fabricação de produtos alimentícios. Além disso, as proteínas whey são uma excelente fonte de lisina, que é um nutriente indispensável para o crescimento e desenvolvimento humano, e que é o aminoácido limitante em proteínas de arroz (WANG *et al.*, 2019).

Há vários meios em que os aminoácidos essenciais podem mudar o equilíbrio em direção aos processos anabólicos para promover a recuperação do exercício e, teoricamente, melhorar o desempenho de praticantes de atividade física. Grande parte do esforço científico para demonstrar os benefícios das proteínas tem se concentrado em sua capacidade de estimular a síntese proteica muscular (HA; ZEMEL, 2003).

As proteínas, quando submetidas a aquecimento ou agitação, radiação ultravioleta e visível, podem sofrer alterações nas suas propriedades. A desnaturação é um processo que consiste na quebra das estruturas secundária e terciária de uma proteína por romper as ligações que estabilizam a conformação, causando um desenrolamento das cadeias peptídicas e, em consequência, as proteínas se tornam menos solúveis e quimicamente mais reativas. As proteínas nativas solúveis em sais no seu ponto isoelétrico, em geral, se tornam insolúveis quando desnaturadas. O fenômeno da desnaturação não implica necessariamente na diminuição da digestibilidade das proteínas (BRASIL, 2014).

Estudar as temperaturas de uso tem o intuito de simular situações nas quais as proteínas são utilizadas para compor alimentos enriquecidos em proteínas, tais como bolos, pães, cookies, e outras preparações alimentícias que possam sofrer aquecimento em alguma etapa do preparo. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do aquecimento em proteína do tipo whey e proteína de arroz utilizando-se espectroscopia de infravermelho próximo e quimiometria para determinação das temperaturas de transformação destes alimentos. Com isso, pretende-se verificar se existe diferença de comportamento entre as proteínas com relação a origem (vegetal e animal) e, caso exista diferença, qual temperatura é determinante para a mudança de cada uma delas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do aquecimento em proteína comercial de arroz e de soro de leite (*whey*), utilizando espectroscopia de infravermelho próximo com o auxílio de métodos quimiométricos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as diferenças espectrais causadas pelo aquecimento, em estufa de secagem com controlador de temperatura e circulação de ar, em amostras de proteínas de arroz e whey, utilizando temperaturas de aquecimento de 35, 50, 100, 150, 160, 170 e 180 °C.
- Realizar as análises espectroscópicas a partir da técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near-InfraRed*).
- Aplicar o método quimiométrico de Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS) para avaliar a influência do aquecimento a partir das concentrações relativas.
- Comparar a estabilidade das proteínas estudadas a partir de análises quimiométricas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Proteínas

As proteínas são compostos poliméricos complexos que estão presentes em qualquer matéria viva, sendo formadas por moléculas orgânicas, exercendo diferentes funções biológicas no corpo humano, como funções estruturais, catalisadoras, reservas e hormonais. As proteínas são formadas por um aglomerado de aminoácidos que são estruturados a partir de ligações peptídicas. Por conta da sua importância no funcionamento e na estrutura celular, tem-se a necessidade de que as proteínas estejam sempre incluídas nas dietas alimentares. Dentro dessa necessidade, estão os aminoácidos presentes nas proteínas, sendo que os aminoácidos essenciais não são sintetizados pelo organismo humano e devem ser adquiridos a partir de uma dieta específica (RIBEIRO, 2007).

Nos dias atuais, um dos focos da área de pesquisa em alimentos está em como pode-se utilizar as proteínas e suas propriedades específicas e físico-químicas de forma que os alimentos possam ter estes ingredientes como propriedades funcionais (ANTUNES JOSE, 2003). A utilização das proteínas em pó ou farinhas, podem ser empregadas como ingredientes nutritivos na produção de alimentos, pois estão relacionadas com benefícios à saúde e bem-estar (ALVES *et al.*, 2020).

Na produção de alimentos funcionais, como exemplo cookies enriquecidos com proteínas, são necessários tratamentos térmicos (GOTTMANNSHAUSEN *et al.*, 2015). Os processos de aquecimento durante a produção dos alimentos podem influenciar no processo de desnaturação proteica, sendo este um efeito que pode ser resultado de diferentes modos, porém a desnaturação térmica tem uma maior importância na produção de alimentos (BUENO MORAIS *et al.*, 2020). A desnaturação acontece quando a proteína perde a sua estrutura secundária ou terciária, tendo sua cadeia peptídica rompida, perdendo funcionalidade e atividade biológica (MELO FILHO; SILVA VASCONCELOS, 2011).

3.1.1 Proteínas vegetais e animais

Atualmente há uma preocupação maior por uma alimentação mais saudável e a base de alimentos verdes, com isso se deu um maior foco na utilização de proteínas vegetais (RAI, 2015). As proteínas vegetais são geralmente encontradas em

proteínas isoladas de soja, ervilha e cereais, como o arroz (NESTERENKO *et al.*, 2013).

A crescente necessidade da utilização das proteínas vegetais como substitutas das proteínas derivadas de animais tem razões importantes de segurança alimentar e a sustentabilidade ambiental (AMAGLIANI *et al.*, 2016).

A produção de alimentos pode causar impactos no meio ambiente desde a produção, transporte e armazenamento, estes impactos podem estar diretamente relacionados na saúde humana a partir dos alimentos, ou nas mudanças climáticas e escassez de recursos hídricos. A produção de alimentos derivados de animais tem grande impacto particular em diferentes pontos importantes para o meio ambiente. Esses impactos podem ser observados nas mudanças climáticas, uso da água, eco toxicidade, uso da terra, eutrofização e perda de biodiversidade. (WALKER *et al.*, 2019).

3.1.2 Proteína de soro de leite (*Whey Protein*)

As proteínas do soro do leite são conhecidas como *Whey Protein*, e são extraídos do leite durante a fabricação do queijo (HARAGUCHI; DE ABREU; DE PAULA, 2006). *Whey Protein* pode ser considerado um dos ingredientes mais importantes atualmente na indústria de alimentos, por possuir um alto valor nutricional e propriedades funcionais (GUO, 2019).

A utilização de *Whey Protein* como um ingrediente na produção de alimentos pode resultar em interações com outros ingredientes dos alimentos, sendo estas realizadas a partir de processos operacionais como aquecimento, mistura e resfriamento. Podendo ajudar na emulsificação de formulações infantis, substituição de proteínas da carne, sopas e sobremesas, porém, deve ser utilizado com algum emulsificante de baixo peso molecular (RICKEY Y, 2017).

Dentro da produção de alimentos funcionais, o *Whey Protein* pode ser utilizado como ingrediente principal na fabricação de diferentes produtos, como barras de alta concentração de proteína, que são misturas de proteína whey em pó com outros ingredientes, como xarope de açúcar e óleo (HOGAN; O'LOUGHLIN; KELLY, 2016).

3.1.3 Proteína de Arroz

Devido as suas propriedades relacionadas à saúde e nutrição, a proteína de arroz tem grande reconhecimento atualmente dentro das proteínas vegetais. Por ser derivado do arroz, as proteínas isoladas de arroz são também reconhecidas como alimentos hipoalergênicos, podendo ser utilizados como uma alternativa para formulações que geralmente são à base de leite, e geram problemas de intolerância (AMAGLIANI *et al.*, 2017).

Detchewa *et al.* (2022) obtiveram resultados significativos na produção de espaguete de arroz sem glúten utilizando a proteína de arroz ao invés da farinha de arroz, foi possível observar que a utilização de proteína de arroz influenciou significativamente a qualidade do cozimento. A diminuição do tempo de cozimento, se deu, pois, a superfície do espaguete ficou porosa, permitindo facilmente a permeação da água.

As proteínas de arroz podem ser empregadas como suplementos para a nutrição esportiva, como alternativa ao soro do leite, que são geralmente utilizadas como ingredientes para a produção de alimentos funcionais (AMAGLIANI *et al.*, 2017; HARAGUCHI; DE ABREU; DE PAULA, 2006).

Joy *et al.* (2013) apresentam resultados para o uso da proteína isolada de arroz semelhantes à proteína isolada do soro do leite em testes de resistência em adultos, tendo como parâmetros a diminuição da massa gorda e aumento de massa corporal magra, hipertrofia do musculo esquelético, potência e força.

3.2 Espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR)

A espectroscopia na região do infravermelho próximo pode ser utilizada para determinar os constituintes relacionados a matéria orgânica a partir da absorção de radiação eletromagnética contida entre os comprimentos de onda entre 800 a 2500 nm (PICÓ, 2012).

O tipo de ligação depende da força da ligação (simples, dupla ou tripla) e da massa dos ligantes envolvidos e da diferença de eletronegatividade, sendo estas mais comumente originadas por vibrações de ligações do tipo C-H, N-H ou O-H. Mesmo sendo possíveis para análises qualitativas, a região do infravermelho próximo é mais comumente utilizada para análises quantitativas (STUART, 2004).

A utilização do NIR como técnica vibracional de análise oferece vantagens por ser uma técnica que permite respostas rápidas e análises diretas, possibilitando análises não-invasivas e não destruindo a amostra (POREP; KAMMERER; CARLE, 2015).

3.3 Quimiometria

A quimiometria pode ser aplicada em inúmeros estudos, principalmente com a utilização de estratégias multivariadas que permitem melhor avaliação e interpretação dos dados adquiridos das amostras. Santos *et al.* (2019), mostraram que a quimiometria vem sendo aplicada em conjunto com uma ampla variedade de técnicas de separação e instrumentação mais robustas, agregando como uma possibilidade para análise de amostras.

As ferramentas quimiométricas permitem a análise de dados multivariados complexos, facilitando a extração das informações relevantes dos dados. Porém, para obter resultados significativos é necessário não somente a análise dos dados, mas também o entendimento dessas análises (KJELDAHL; BRO, 2010).

De modo resumido, a quimiometria é encarregada pela manipulação dos dados, utilizando-se de ferramentas matemáticas, estatísticas e computacionais (análise multivariada), e é uma facilitadora para a interpretação dos dados (FERREIRA, 2015).

3.4 MCR-ALS

O MCR-ALS é um método quimiométrico utilizado para resolver misturas de sinais, utilizando a recuperação de informações misturadas não seletivas que são provenientes de um instrumento descrito como (**D**) em contribuições reais dos componentes puros no sistema (representados pelos perfis de concentração em **C** e perfis espectrais em **S^T**) (MARÇO *et al.*, 2014).

Assim como a cromatografia se faz necessária devido ao fato de que são poucas as técnicas que são específicas para uma única espécie química, o MCR-ALS busca fazer um papel de cromatografia virtual, recuperando a contribuição do sinal de um analito assim como seu sinal (MARÇO *et al.*, 2014).

A análise de misturas é uma questão que exige ponderação constante em qualquer domínio científico, uma vez que tudo o que é observável ou mensurável em

um sistema real raramente responde a uma única causa ou fonte. As variações em uma resposta coletada em função do tempo, espaço, amostra ou em diferentes condições, sejam elas experimentais, ambientais e ou clínicas, são a expressão global das contribuições de várias fontes individuais de variação que compõem o sistema global. Compreender a natureza e a distribuição dessas fontes individuais para a resposta global e mista disponível é essencial para compreender o sistema em estudo (DE JUAN; TAULER, 2021).

Quando a resposta obtida (o sinal analítico) é uma medição instrumental tal como um espectro, as contribuições individuais do sinal podem ser frequentemente descritas por meio de um modelo. No entanto, quando não se conhece exatamente sobre a relação entre as contribuições individuais das respostas, o princípio da parcimônia justifica o uso do modelo mais simples possível para explicar um fenômeno. Assim, os métodos de Resolução de Curva Multivariada abordam o problema de análise de mistura usando um modelo bilinear, ou em casos de dados multivariados sua extensão multilinear (DE JUAN; TAULER, 2021; TAULER, 1995).

Em geral, em sua formulação mais simples, as respostas coletadas em função de qualquer variável ou conjunto de condições são organizadas em uma tabela de dados D , onde cada linha é a resposta mista global em um determinado estágio. Considerando que as respostas mistas em uma tabela de dados D vêm de n fontes de variação, o modelo de análise de mistura pode ser expresso na equação 1:

$$D = CS^T + E \quad (\text{equação 1})$$

E representaria a variação não explicada pelo modelo. A matriz S^T , com n linhas, conteria os perfis qualitativos das fontes individuais de variação, enquanto a matriz C , com n colunas, conteria os perfis de repartição relacionados. Portanto, a metodologia será empregada após reunirem-se todos os espectros referentes aos tempos de aquecimentos, ou seja, após a concatenação dos sinais para que se possa observar as variações espectrais e de concentração relativa destes (MARÇO *et al.*, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

As proteínas de Arroz e *Whey* foram adquiridas no comércio online, sendo essas proteínas em forma de pó finamente dividido. As amostras foram adquiridas no mês de novembro de 2021, sendo 1 amostra de proteína de arroz e 1 amostra de proteína *whey*, onde estas amostras tinham sabor natural e não possuíam aromatizantes.

4.2 Preparo

Pesou-se uma massa de um grama (1g) para cada proteína (em triplicata) diretamente em placas de petri. Todos os materiais e vidrarias utilizados foram previamente limpos utilizando água destilada e acetona grau P.A., para que fossem eliminados quaisquer possíveis contaminantes (FALKOWSKI JUNIOR *et al.*, 2022).

4.3 Aquecimento das amostras de proteínas

Após a etapa de preparo, as amostras foram levadas para o aquecimento, realizada em estufa de secagem com controlador de temperatura e circulação de ar (Nova Ética). Seguindo a metodologia, as amostras passaram por um tratamento preliminar, onde permaneceram na estufa por um período de 1 hora em temperatura de 35 °C, para retirar a umidade das amostras (FALKOWSKI JUNIOR *et al.*, 2022).

Em seguida, as amostras foram aquecidas nas temperaturas determinadas, sendo elas: 35, 50, 100, 150, 160, 170 e 180° C. Cada tréplica de 1g de amostra permaneceu por um período de 20, 40 e 60 minutos, em cada temperatura.

4.4 Condicionamento das amostras

Após a etapa de aquecimento, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar previamente higienizados. As amostras acondicionadas em frascos âmbar foram armazenados em dessecadores contendo sílica gel, por um período de 24 horas, assim evitando a interferência de umidade nas amostras já aquecidas.

4.5 Obtenção dos espectros NIR

Utilizando o equipamento MicroNIR[®] (VIAVI-JDSU), os espectros das amostras foram obtidos, para as medidas entre 900 a 1700nm. Utilizou-se cubetas de vidro, e o branco foi calibrado a partir do padrão de 99% de refletância (SpectralonTM). A leitura/aquisição dos espectros foi realizada em triplicata.

4.6 Análise multivariada

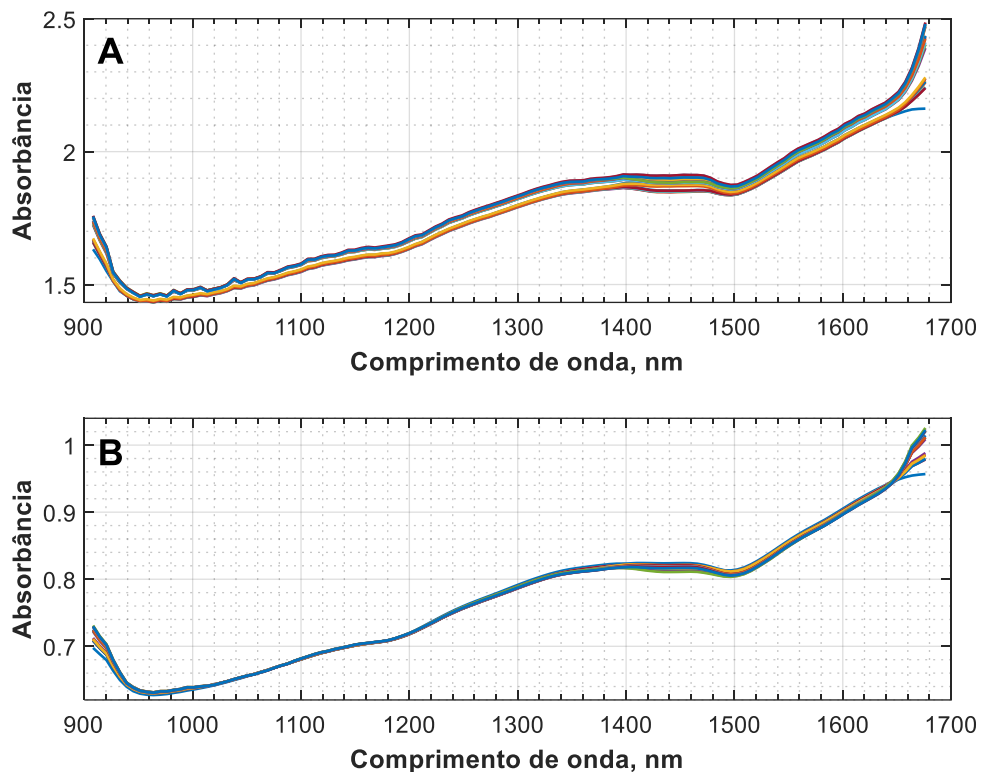
Os espectros adquiridos foram organizados na forma de matrizes, as quais foram processadas para correção de espalhamento multiplicativo e alisamento pelo algoritmo de Savitzki-Golay.

Em seguida, as matrizes pré-processadas foram submetidas à avaliação utilizando o algoritmo de Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS, do inglês *Multivariate Curve Resolution with Alternating Least-Squares*), através do software Matlab R2021b.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a amostra de proteína de arroz, a Figura 1 apresenta a média das nonaplicatas (9 réplicas) dos espectros **(A)** brutos e **(B)** após correção de espalhamento multiplicativo, alisamento pelo algoritmo de Savistky-Golay (SAVITZKY; GOLAY, 1964) com janela de 7 pontos, polinômio de 2ª ordem e normalização por altura, para todas as temperaturas avaliadas. Observa-se que as variações espectrais foram bastante sutis, acontecendo principalmente acima de 1360 nm.

Figura 1 – Média dos espectros (A) Brutos e (B) após processamento, obtidos nas temperaturas entre 35 e 180 °C para as amostras de proteína de arroz.

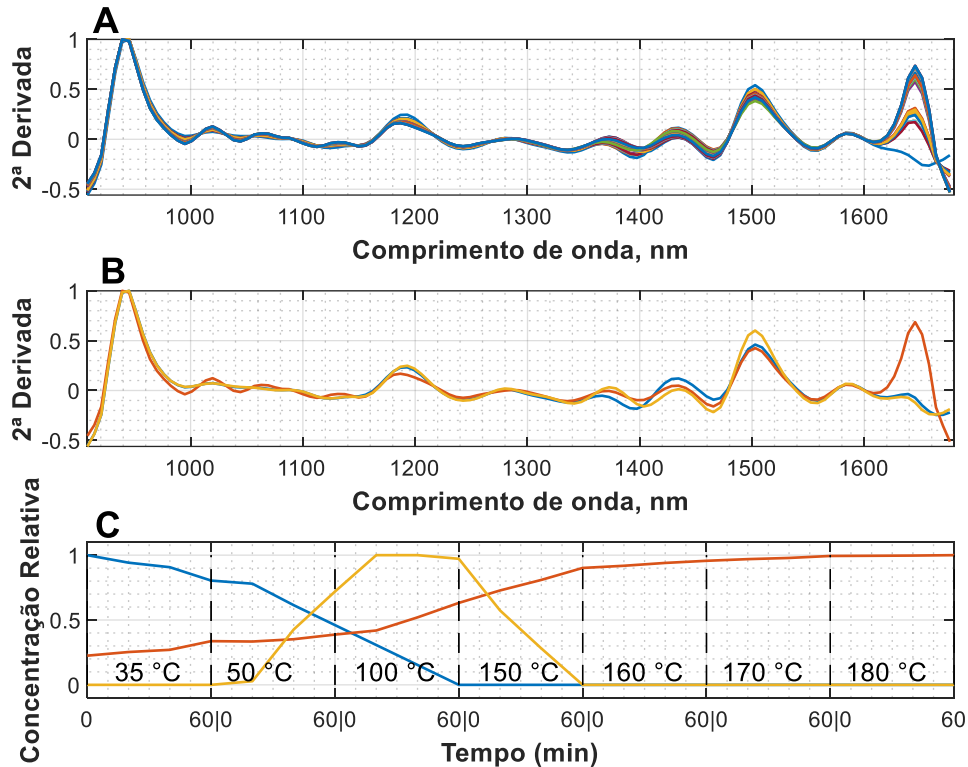


Fonte: Autoria própria (2022)

Para verificação da influência da temperatura, os espectros foram submetidos a derivação, utilizando-se o algoritmo de Savistky-Golay (SAVITZKY; GOLAY, 1964) com janela de 7 pontos e segunda derivada, a fim de se visualizar possíveis sobreposições ou variações espectrais não-triviais. Em seguida, a matriz de dados foi avaliada por aplicação de resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS), e os resultados estão apresentados na Figura 2 – **B** e **C**. Na

Figura 2 – **A** estão apresentados os espectros originais após segunda derivada, para que se possa comparar fielmente as regiões de vibração.

Figura 2 – (A) Espectros processados, (B) espectros recuperados por MCR-ALS após processamento e segunda derivada e (C) respectivas concentrações relativas em função da temperatura/tempo, recuperadas por MCR-ALS para as amostras de proteína de arroz.

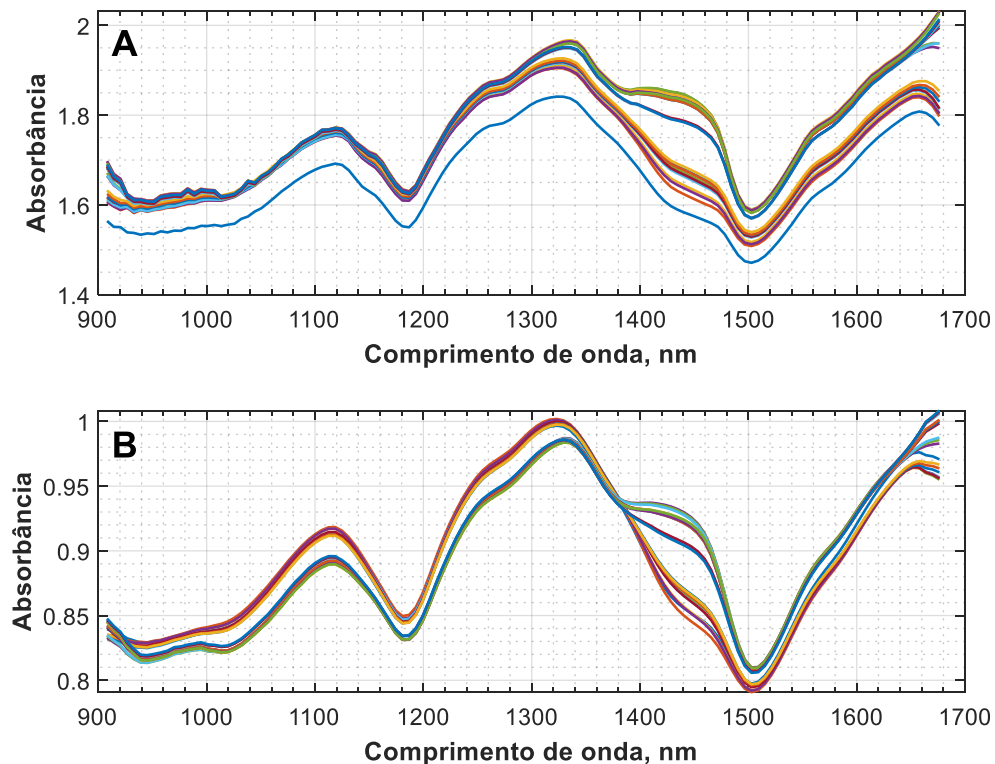


Fonte: Autoria própria (2022)

Para melhor análise, deve-se esclarecer que os sinais apresentados na Figura 2 – **B** se comportam conforme a Figura 2 – **C**. Na Figura 2 – **C** deve-se observar que o intervalo entre uma temperatura e outra compreende o tempo de uma hora, de modo que as linhas tracejadas verticais de fundo, em cor cinza claro, representam intervalos de 10 minutos de aquecimento. Nesta Figura, o sinal em azul pode ser notado até a temperatura de 50 °C, temperatura na qual observa-se pelos espectros ilustrados pela cor azul (—), unânimes no início das medidas até 50 °C, e pela cor laranja (—), que surgem após 50 °C de aquecimento, que as oscilações acontecem na região que vai de 1380 até 1480 nm. Esta região é atribuída ao terceiro sobretom de vibração de grupos C=O, ao primeiro sobretom de vibrações do tipo O-H, podendo ainda ser atribuída ao primeiro sobretom de vibrações N-H primários e secundários (WORKMAN JR.; WEYER, 2012). Para temperaturas acima de 100 °C, observa-se pela Figura 2 –

(C) que o perfil de espectro ilustrado pela cor vermelha (—) ganha importância. Neste caso, a banda anteriormente situada na região em aproximadamente 1195 nm se desloca para aproximadamente 1180 nm, seguida pela variação mais importante, observada em aproximadamente 1645 nm. Esta região é atribuída principalmente ao primeiro sobretom de vibração de estiramento de N-H de amidas primárias e secundárias (WORKMAN JR.; WEYER, 2012). Como os grupos N-H compõe as proteínas, sugere-se que estas vibrações estejam ganhando importância pelo fato de estarem sofrendo processo de desnaturação por aquecimento em temperaturas elevadas. Para se comparar a proteína vegetal com o tipo de proteína mais consumida de forma geral, fez-se o aquecimento de proteínas de origem animal (soro de leite), e a média dos espectros está apresentada na Figura 3 – A para os sinais brutos e (B) para os sinais processados.

Figura 3 – Média dos espectros (A) Brutos e (B) após processamento, obtidos nas temperaturas entre 35 e 180 °C para as amostras de proteína de soro de leite (whey).

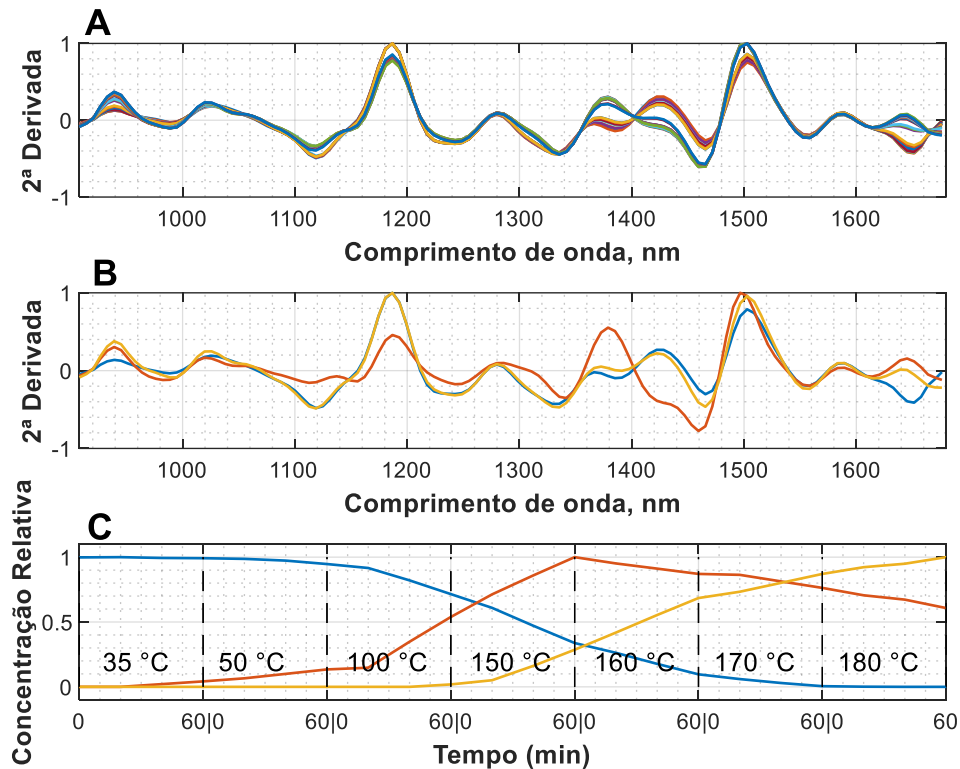


Fonte: Autoria própria (2022)

Com a finalidade de detectar bandas sobrepostas e melhor observar a influência do aquecimento, os espectros foram avaliados por MCR-ALS. Os resultados estão apresentados na Figura 4 – B e C. A Figura 4 – A apresenta o espectro

processado após segunda derivada para que se possa comparar as regiões que sofreram alteração.

Figura 4 – (A) Espectros processados, (B) espectros recuperados por MCR-ALS após processamento e segunda derivada e (C) respectivas concentrações relativas, recuperadas por MCR-ALS para as amostras de proteína de soro de leite.



Fonte: Autoria própria (2022)

O sinal representado pela linha azul na Figura 4 – B varia de concentração relativa conforme indicado na Figura 4 – C, e o intervalo entre uma temperatura e outra compreende o tempo de uma hora, sendo as linhas tracejadas verticais de fundo, em cor cinza claro, representam intervalos de 10 minutos de aquecimento. Desta forma, as amostras sofreram variação espectral após serem aquecidas por 20 minutos a 50 °C, dando origem ao sinal ilustrado pela linha de cor laranja. Observa-se, porém, que este sinal não prevalece, aparecendo concomitantemente com o sinal ilustrado pela cor vermelha. As diferenças principais entre o sinal prevalecente em temperaturas mais baixas (até 50 °C) e aquele obtido em temperaturas mais elevadas (acima de 160 °C) estão nas bandas que aparecem em 920 nm e 1650 nm, observando-se ainda variações menos intensas nos comprimentos de onda de 1380 nm, 1460 nm e 1500 nm. A região de 920 nm é atribuída ao 4º sobretom vibrações de grupos N-H de

amidas primárias e secundárias, enquanto a região de 1650 nm é atribuída ao primeiro sobretom de vibração destas mesmas ligações. A região de 1380 nm é atribuída ao primeiro sobretom de vibração de ligações O-H de todos os tipos, de modo que é uma banda que não pode ser definida. A região de 1460 nm também pode ser atribuída ao primeiro sobretom de vibração de ligações O-H. Porém, também faz parte desta região o 1º sobretom de vibração de ligações N-H de amidas primárias e secundárias. A região de 1500 nm pode ser atribuída ao 3º sobretom de vibração de grupos amida primários, secundários e terciários, além de ser a região de 1º sobretom de vibração de ligações N-H de amidas primárias e secundárias (WORKMAN JR.; WEYER, 2012).

Comparando-se as cinéticas recuperadas por MCR-ALS, pode-se ter a impressão de que a proteína de origem animal é mais estável que a vegetal. Porém, avaliando-se as varreduras nos espectros recuperados, sugere-se que o aquecimento influencie de forma mais acentuada os sinais espectrais provenientes das proteínas de origem animal, uma vez que as alterações nas proteínas de origem vegetal concentraram-se em 1645 nm. Assim, ainda que a região que mostrou alteração para as proteínas de origem vegetal também se refira a vibração de compostos nitrogenados, o aquecimento se mostrou mais perceptível nas amostras de proteína de soro de leite por alterar mais regiões espectrais. Por outro lado, para que se possam fazer inferências mais aprofundadas, é necessário um estudo mais detalhado, com técnicas mais informativas que permitam a avaliação das substâncias produzidas pelo calor aplicado às amostras.

6 CONCLUSÃO

Observando-se os sinais espectrais obtidos para as amostras de proteína de arroz comparados com os espectros obtidos para as amostras de proteína de soro de leite, sugere-se que as proteínas de arroz se apresentam mais estáveis por terem sofrido menor variação espectral.

A aplicação de MCR-ALS sugere que a temperatura de 100 °C seja limitante para o uso das proteínas tanto de arroz quanto de soro de leite, uma vez que é a partir desta temperatura que se verificam as transformações espectrais mais importantes.

Foi observado que tanto para as proteínas de arroz quanto para as proteínas de soro de leite, com exceção das variações espectrais observadas na região de 1380 nm e 1460 nm, atribuídas à sobretons de vibração de ligações O-H, todas as demais vibrações detectadas podem ser atribuídas as ligações N-H, podendo estar relacionadas com alterações nas proteínas. No entanto, é notável que a alteração espectral mais importante sofrida pela proteína de arroz ocorreu aproximadamente 1645 nm, região é atribuída principalmente ao primeiro sobretom de vibração de estiramento de N-H de amidas primárias e secundárias. No caso da proteína de soro de leite, além desta região (1650 nm), as alterações sofridas em 1380 nm, 1460 nm e 1500 nm foram mais pronunciadas que para a proteína de arroz.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. da S.; SILVA, L. A.; SAQUETI, B. H. F.; ARTILHA, C. A. F.; SILVA, D. de M. B.; SOUSA, L. C. S.; SCAPIM, M. R. da S.; VISENTAINER, J. V. Proteínas vegetais como alimentos funcionais - revisão. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 5869–5879, 2020. Disponível em: <https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/6670>. Acesso em: 17 maio 2022.
- AMAGLIANI, L.; O'REGAN, J.; KELLY, A. L.; O'MAHONY, J. A. Physical and flow properties of rice protein powders. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 190, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877416301935>. Acesso em: 10 maio 2022.
- AMAGLIANI, L.; O'REGAN, J.; KELLY, A. L.; O'MAHONY, J. A. The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 64, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092422441630070X>. Acesso em: 20 maio 2022.
- ANTUNES, J. A. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. **Editora Manole Ltda**, [s. l.], p. 135, 2003.
- AXIOM FOODS. **Protein solutions**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://axiomfoods.com/protein-solutions/>. Acesso em: 23 maio 2022.
- BAILEY, H. M.; MATHAI, J. K.; BERG, E. P.; STEIN, H. H. Most meat products have digestible indispensable amino acid scores that are greater than 100, but processing may increase or reduce protein quality. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 124, n. 1, p. 14–22, 2020. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/most-meat-products-have-digestible-indispensable-amino-acid-scores-that-are-greater-than-100-but-processing-may-increase-or-reduce-protein-quality/8957869BC05B63D10AA8800B8E6E6C79>. Acesso em: 9 maio 2022.
- BRASIL, F. I. Dossiê proteínas. **Food Ingredients Brasil**, [s. l.], v. 28, p. 30–58, 2014.
- BUENO, T.; SCHIASSI, C.; CARVALHO, G.; QUEIROZ, F.; JOSÉ PIMENTA, C. **Desnaturação proteica: importâncias na indústria de laticínios**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/9860/8766>. Acesso em: 17 maio 2022.
- DE JUAN, A.; TAULER, R. Multivariate curve resolution: 50 years addressing the mixture analysis problem – a review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1145, p. 59–78, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267020310771?via%3Dihub>. Acesso em: 11 ago. 2021.
- DETCHEWA, P.; PRASAJAK, P.; PHUNGAMNGOEN, C.; SRIWICHAI, W.; NAIVIKUL, O.; MOONGNGARM, A. Substitution of rice flour with rice protein improved quality of gluten-free rice spaghetti processed using single screw extrusion.

Lwt, [s. l.], v. 153, 2022. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643821016650?via%3Dihub>.
 Acesso em: 20 maio 2022.

FALKOWSKI JUNIOR, D.; BERNASKI, G. R.; GOLDONI, R. J.; VALDERRAMA, P.; MARÇO, P. H. **Comparação espectral entre proteínas de origem vegetal submetidas a aquecimento**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em:
<http://www.periodicoshumanas.uff.br/ecos/article/vie>. Acesso em: 10 maio 2022.

FANI, M. Proteínas animais e vegetais: tipos e funções. **Aditivos e ingredientes**, [s. l.], 2016. Disponível em:
http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201604/2016040557579001459880082.pdf. Acesso em: 10 mar. 2022.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**, [s. l.], 2015. Disponível em:
<https://books.scielo.org/id/2nc9y>. Acesso em: 24 maio 2022.

GOTTMANNSHAUSEN, T. L.; DE CARLI, G.; LINK LODI, A. C.; GUTKOSKI, C.; BERTOLIN, T. E. **Cookie enriquecido com concentrado proteico de soro de leite e aveia**. [s. l.], 2015.

GUO, M. **Whey protein production, chemistry, functionality, and applications**. Wiley, [s. l.], p. 280, 2019. Disponível em:
https://books.google.com.br/books?id=AymFDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 20 maio 2022.

HA, E.; ZEMEL, M. B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 251–258, 2003. Disponível em:
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286303000305?casa_token=Biw3uA8iwxoAAAAA:P9JJOSNZqTdFKILJs4VsX0c3CvN--s4INBC8pAX2uN77ACXUojbdK3oLFbIp0AXrGzGYsaw77KFS. Acesso em: 7 jul. 2021.

HARAGUCHI, F. K.; DE ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de nutrição**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rn/a/PRpChxDqt3YYYvkn8KFRDmS/?lang=pt>. Acesso em: 20 maio 2022.

HEVER, J. Plant-based diets: a physician's guide. **The Permanente Journal**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 93–101, 2016. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4991921/](https://www.permanentejournal.com/articles/PMC4991921/). Acesso em: 9 maio 2022.

HOGAN, S. A.; O'LOUGHLIN, I. B.; KELLY, P. M. Soft matter characterisation of whey protein powder systems. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 52, p. 1–9, 2016. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694615001417?via%3Dihub>. Acesso em: 20 maio 2022.

JOY, J. M.; LOWERY, R. P.; WILSON, J. M.; PURPURA, M.; DE SOUZA, E. O.; WILSON, S. M.; KALMAN, D. S.; DUDECK, J. E.; JÄGER, R. **The effects of 8 weeks of whey or rice protein supplementation on body composition and exercise performance.** [S. l.: s. n.], 2013. Disponível em: <http://www.nutritionj.com/content/12/1/86>. Acesso em: 1 maio 2022.

KHOURYIEH, H.; PULI, G.; WILLIAMS, K.; ARAMOUNI, F. Effects of xanthan–locust bean gum mixtures on the physicochemical properties and oxidative stability of whey protein stabilised oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 167, p. 340–348, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814614010322?via%3Dihub>. Acesso em: 7 jul. 2021.

KJELDAHL, K.; BRO, R. Some common misunderstandings in chemometrics. **Journal of Chemometrics**, [s. l.], v. 24, n. 7–8, p. 558–564, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/229677390_Some_common_misunderstanding_in_chemometrics. Acesso em: 24 maio 2022.

MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P.; ALEXANDRINO, G. L.; POPPI, R. J.; TAULER, R. Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: descrição, funcionamento e aplicações. **Química Nova**, [s. l.], v. 37, n. 9, p. 1525–1532, 2014.

MELO FILHO, A. B. de.; SILVA V. M. A. da. **Química de alimentos.** [S. l.: s. n.], 2011. *E-book*. Disponível em: http://www.proedu.rnp.br/bitstream/handle/123456789/364/Quim_Alimentos.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 17 maio 2022.

NADATHUR, S.; WANASUNDARA, J. P. D.; SCANLIN, L. **Sustainable protein sources.** [S. l.]: Academic Press, 2016.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 469–479, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/257372239_Vegetable_proteins_in_microencapsulation_A_review_of_recent_interventions_and_their_effectiveness. Acesso em: 18 maio 2022.

PICÓ, Y. **Chemical analysis of food: techniques and applications.** [S. l.]: Academic Press, 2012.

POREP, J. U.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 211–230, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224415002174>. Acesso em: 21 maio 2022.

RAI, V. R. **Advances in food biotechnology.** [S. l.: s. n.], 2015. *E-book*. Disponível em: https://books.google.com/books/about/Advances_in_Food_Biotechnology.html?hl=pt-BR&id=yFq-CgAAQBAJ. Acesso em: 18 maio 2022.

RIBEIRO, E. **Química de alimentos**. [S. l.], 2007. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788521215301/pageid/95>. Acesso em: 11 maio 2022.

RICKEY Y, Y. **Proteins in food processing**. [S. l.], 2017. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=boeZDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Proteins+in+Food+Processing+\(Second+Edition\)&ots=gLBGyXHWbD&sig=naPVgSJa8g_D__PZoo3sapo9UjE#v=onepage&q=Proteins%20in%20Food%20Processing%20\(Second%20Edition\)&f=true](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=boeZDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Proteins+in+Food+Processing+(Second+Edition)&ots=gLBGyXHWbD&sig=naPVgSJa8g_D__PZoo3sapo9UjE#v=onepage&q=Proteins%20in%20Food%20Processing%20(Second%20Edition)&f=true). Acesso em: 20 maio 2022.

SANTOS, C. M.; NASCIMENTO, M. A. P.; GUEDES N. W.; PEREIRA-FILHO R. E.; FILLETTI R. E.; PEREIRA V. M. F. Chemometrics in analytical chemistry – an overview of applications from 2014 to 2018. **Eclética Química**, vol. 44, no. 2, [s. l.], p. 11–25, 2019. Disponível em: <https://www.redalyc.org/journal/429/42958876006/html/>. Acesso em: 24 maio 2022.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964.

STUART, B. H. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. [S. l.: s. n.], 2004.

TAULER, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 133–146, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016974399500047X>. Acesso em: 16 de ago. 2021.

WALKER, C.; GIBNEY, E. R.; MATHERS, J. C.; HELLWEG, S. Comparing environmental and personal health impacts of individual food choices. **Science of the total environment**, [s. l.], v. 685, p. 609–620, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31195322/>. Acesso em: 9 maio 2022.

WANG, R.; XU, P.; CHEN, Z.; ZHOU, X.; WANG, T. Complexation of rice proteins and whey protein isolates by structural interactions to prepare soluble protein composites. **Lwt**, [s. l.], v. 101, p. 207–213, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/328720304_Complexation_of_rice_proteins_and_whey_protein_isolates_by_structural_interactions_to_prepare_soluble_protein_composites. Acesso em: 7 jul. 2021.

WORKMAN JR., J.; WEYER, L. Practical guide and spectral atlas for interpretive near-infrared spectroscopy. *In: Practical guide and spectral atlas for interpretive near-infrared spectroscopy, second edition spectroscopy, second edition*. [S. l.]: CRC Press, 2012. p. i–xvi. *E-book*. Disponível em: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b11894-1>. Acesso em: 20 maio 2022.