

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETERMINAÇÃO DA ADULTERAÇÃO DA ERVA-MATE POR ADIÇÃO DE
SACAROSE EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO
(ATR-FTIR) EM CONJUNTO COM FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**

MANUELLA SCHNEIDER

Porto Alegre, dezembro de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MANUELLA SCHNEIDER

**DETERMINAÇÃO DA ADULTERAÇÃO DA ERVA-MATE POR ADIÇÃO DE
SACAROSE EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (ATR-
FTIR) EM CONJUNTO COM FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão

Porto Alegre, dezembro de 2017

*“Embora frio ou lavado,
Ou que teu topete desande,
Minha alegria se expande
Ao ver-te assim meu troféu,
Quem te inventou foi pra o céu
E te deixou para o Rio Grande.”*

Vitor Ramil

Agradecimentos

Ao meu orientador, Marco Flôres Ferrão, pelos ensinamentos da área de quimiometria, de pesquisa e de vida, pela oportunidade, pela paciência, pela compreensão e flexibilidade.

À UFRGS, UNISC, CAPES e ervateira Valério pelo suporte financeiro, pela estrutura, amostras e instrumentos necessários para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório, pesquisa e mestrado, Natália, Marcelo, Camila, Carla, Juliana, Layane, Fernanda, Fábio, André, Eloísa, Franccesca, Valéria e Jocelene por todas as conversas, risadas, parceria e ajuda.

Aos professores Claudimar, Adilson, Gilson, Valeriano, Cláudia e Rosana, pela contribuição neste trabalho.

Ao meus pais e irmã, Rosana, Fridolino e Carolina, por me ensinarem a lutar pelos meus sonhos e me ajudarem a conquistá-los, pelo apoio emocional e financeiro, por acreditarem em mim, por todo amor e carinho. Especialmente à minha mãe, por todos os conselhos e auxílios científicos.

À tia Fátima e ao tio Milton, por me fazerem me sentir em casa, pelos conselhos, incentivo, conversas, aprendizados, companhia e exemplos de vida.

À minha vó, Eloá, por me ensinar a ser forte.

Ao Dennis, pelo apoio, compreensão de minha ausência, companheirismo e carinho.

Às minhas amigas, por compreenderem minha ausência nas redes sociais e encontros e por sempre me apoiarem.

Ao Shadow, pela companhia e animação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 ERVA-MATE.....	16
3.1.1 Importância da erva-mate.....	16
3.1.2 Propriedades e composição química da erva-mate	17
3.1.3 Processamento da erva-mate	20
3.2 ADULTERAÇÕES EM ALIMENTOS.....	21
3.2.1 Adulteração em erva-mate	22
3.2.2 Adulterações de alimentos com açúcar	24
3.3 AÇÚCAR.....	24
3.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	25
3.5 MÉTODOS MULTIVARIADOS	26
3.5.1 Análise por agrupamento hierárquico	26
3.5.2 Análise por componentes principais	27
3.5.3 Métodos de classificação	29
3.5.4 Métodos de regressão multivariada	30
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	34
4.1 AMOSTRAS.....	34
4.2 INSTRUMENTAÇÕES.....	36
4.3 MATERIAIS E REAGENTES	37
4.4 ATR-FTIR	37
4.4.1 Granulometria	37

4.4.2 1º estudo: distinção entre diferentes formas de processamento da erva-mate	37
4.4.3 2º estudo: avaliação das possíveis formas de adulteração da erva-mate com açúcar	38
4.4.4 3º estudo: concentrações de sacarose adicionadas à erva-mate por regressão multivariada	39
4.4.5 4º estudo: concentrações de sacarose adicionadas à erva-mate por regressão multivariada	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1 GRANULOMETRIA	43
5.2 1º ESTUDO: Distinção entre diferentes formas de processamento da erva-mate	44
5.3 2º ESTUDO: Avaliação das possíveis formas de adulteração da erva-mate com açúcar	45
5.4 3º ESTUDO: Concentrações de sacarose adicionadas à erva-mate por regressão multivariada	48
5.4.1 HCA e PCA	48
5.4.2 Regressão por iPLS	52
5.5 4º ESTUDO: Concentrações de sacarose adicionadas à erva-mate por regressão multivariada	56
5.5.1 PCA	56
5.5.2 iPLS e biPLS	58
6 CONCLUSÕES	64
7 REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto do arquivo pessoal, ilustrando novos produtos à base de erva-mate apresentados no VII Congresso Sul Americano de Erva-mate, III Simpósio Internacional da Erva-Mate e Saúde e I Feira de Tecnologia na Indústria Ervateira.....	16
Figura 2. Principais componentes orgânicos da extração de <i>Ilex paraguariensis</i> . ¹⁴ ...	18
Figura 3. Etapas do processamento da erva-mate.	20
Figura 4. Foto de arquivo pessoal. Recepção da erva-mate em esteiras.	20
Figura 5. Foto de arquivo pessoal. Erva-mate cancheada ensacada.....	21
Figura 6. Estrutura química da sacarose, glicose e frutose.....	24
Figura 7. Localização do plantio das 15 amostras de erva-mate estudadas.	35
Figura 8. Amostras concedidas pela Erva-mate Valério e descrição dos 4 estudos realizados.....	36
Figura 9. Ilustração das amostras de erva-mate provenientes das etapas de processamento para o 1º estudo.....	38
Figura 10. Representação da adição de açúcares em diferentes concentrações em erva-mate.	39
Figura 11. Dappen de silicone (recipiente) usado para secar e homogeneizar a erva-mate com solução de sacarose em estufa.	40
Figura 12. Composição granulométrica representativa da erva-mate após cominuição.	44
Figura 13. Dendrograma das amostras de erva-mate obtidas por diferentes processamentos analisadas por ATR-FTIR.....	44
Figura 14. Gráfico de scores da PC1xPC2 das amostras de erva-mate analisadas por ATR-FTIR.....	45
Figura 15. Dendrograma das 10 amostras e suas replicatas analisadas por ATR-FTIR.	46
Figura 16. Gráfico de escores PC2xPC3 das 10 amostras e suas replicatas analisadas por ATR-FTIR.....	46
Figura 17. Gráfico de pesos da PC3 correspondente às 10 amostras e suas replicatas analisadas por ATR-FTIR.	47
Figura 18. Gráfico de pesos da PC2 correspondente às 10 amostras e suas replicatas analisadas por ATR-FTIR.	48

Figura 19. Faixa do espectro utilizada para a análise multivariada, após suavização, normalização, SNV, primeira derivada e média das triplicatas.	49
Figura 20. Dendrograma da HCA das amostras de erva-mate com adição de 00-30% de sacarose, analisadas por ATR-FTIR.	50
Figura 21. Gráfico de escores das três primeiras componentes principais, PC1 x PC2 x PC3, das amostras de erva-mate com adição de 00-30% de sacarose, analisadas por ATR-FTIR.	50
Figura 22. Gráfico de pesos da PC1 das amostras de erva-mate com adição de 00-30% de sacarose, analisadas por ATR-FTIR.	51
Figura 23. Espectro com 10 divisões, destacando-se o intervalo com menor RMSECV. A linha pontilhada é o RMSECV (7VLs) para modelo global. Os números <i>italicos</i> são as VLs ótimas para cada modelo de cada intervalo.	53
Figura 24. Gráfico dos valores de RMSECV por número de variáveis latentes utilizadas pelo ATR-FTIR/iPLS para determinação da concentração de sacarose em erva-mate.	53
Figura 25. Espectro obtido por ATR-FTIR com destaque para a região selecionada por iPLS entre 10 intervalos: 1197-1098 cm^{-1}	54
Figura 26. Sobreposição dos espectros de frutose (verde), glicose (vermelho) e erva-mate (azul), de 1800-800 cm^{-1}	54
Figura 27. Gráfico dos valores de referência versus valores previstos por ATR-FTIR/iPLS, com 10 intervalos e selecionado número 7, para determinação da concentração de sacarose em erva-mate.	55
Figura 28. Gráfico dos valores de referência versus valores previstos por ATR-FTIR/iPLS, modelo global, para determinação da concentração de sacarose em erva-mate... ..	55
Figura 29. Faixa do espectro utilizada para a análise multivariada, após suavização, normalização, SNV, primeira derivada e média das triplicatas.	56
Figura 30. Gráfico de escores das três primeiras componentes principais, PC1 x PC2 x PC3, das amostras de erva-mate com adição de 00-30% de sacarose, analisadas por ATR-FTIR. Seta indica aumento da concentração de sacarose adicionada às amostras.	57
Figura 31. Gráfico de pesos da PC1 das amostras de erva-mate com adição de 00-30% de sacarose, analisadas por ATR-FTIR.	58
Figura 32. Espectro com 4 divisões, destacando-se o intervalo com menor RMSECV. A linha pontilhada é o RMSECV (5VLs) para modelo global. Os números <i>italicos</i> são as VLs ótimas para cada modelo de cada intervalo.	59

Figura 33. Gráfico dos valores de RMSECV por número de variáveis latentes utilizadas pelo ATR-FTIR/iPLS para determinação da concentração de sacarose em erva-mate.....	60
Figura 34. Espectro obtido por ATR-FTIR com destaque para a região selecionada por iPLS entre 4 intervalos: 1047-800 cm^{-1}	60
Figura 35. Gráfico dos valores de referência versus valores previstos por ATR-FTIR/iPLS, com 4 intervalos e selecionado número 4, para determinação da concentração de sacarose em erva-mate.....	61
Figura 36. Gráfico dos valores de referência versus valores previstos por ATR-FTIR/iPLS, modelo global, para determinação da concentração de sacarose em erva-mate...	61
Figura 37. Gráfico dos valores de referência versus valores previstos por ATR-FTIR/biPLS para determinação da concentração de sacarose em erva-mate, com 20 intervalos, sendo os selecionados números 5, 6, 10 e 18.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de classificação em análise de chás, ervas e cafés a partir de espectros obtidos por FT-IR.....	30
Tabela 2. Métodos de calibração em análise de chás, ervas, café e cacau a partir de espectros obtidos por FT-IR.....	31
Tabela 3. Concentração de sacarose adicionada em cada amostra.....	40
Tabela 4. Concentração de sacarose adicionada em cada amostra.....	41
Tabela 5. Composição granulométrica da erva-mate após cominuição em moinho criogênico.....	43
Tabela 6. Resultados dos modelos de iPLS, de 1 a 10 intervalos, para predição da concentração de sacarose em erva-mate.....	52
Tabela 7. Resultados dos modelos de iPLS, de 1 a 10 intervalos, para predição da concentração de sacarose em erva-mate.....	58
Tabela 8. Resultados dos modelos de biPLS para predição da concentração de sacarose em erva-mate, após prévia seleção dos melhores modelos com menor RMSECV...	62
Tabela 9. Figuras de méritos dos modelos global, iPLS e biPLS.....	63

RESUMO

Espectroscopia na região do infravermelho acoplada a reflectância total atenuada (ATR-FTIR) foi utilizada para avaliar a potencialidade de discriminar e quantificar concentrações de sacarose adicionada à erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Para este objetivo, foram analisadas 15 amostras de erva-mate de diferentes produtores por técnicas quimiométricas. A primeira análise preliminar consistiu na distinção entre diferentes formas da erva-mate em seu processo de produção: pura folha, erva-mate cancheada, palitos, folhas diretamente da árvore, erva-mate beneficiada sem adição de açúcar e erva mate beneficiada com adição de açúcar. Após a aplicação de pré-tratamentos nos dados espectroscópicos, foi realizada a análise por agrupamentos hierárquicos (HCA) e análise por componentes principais (PCA). Os seis grupos de amostras foram discriminados, apontando para o potencial uso do ATR-FTIR para avaliar produtos de erva-mate, inclusive para distinguir amostras com e sem adição de açúcar. A segunda análise preliminar teve por objetivo distinguir diferentes possíveis formas de adulteração de erva-mate com açúcar. Neste estudo, então, avaliou-se a adição de sacarose e glicose/frutose 1:1 em forma de cristal e em solução à erva-mate, após secagem em estufa. Da análise exploratória (HCA e PCA), foi possível distinguir as amostras com adição de glicose/frutose 1:1 das com sacarose. O terceiro e quarto estudo tiveram os objetivos de distinguir as amostras com adição de 0 a 30% de sacarose e também desenvolver modelos de calibração para a previsão de concentração de açúcar adicionado à erva. Em ambos estudos, através das análises exploratórias, foi possível distinguir as amostras conforme a sua concentração de sacarose adicionada. No terceiro estudo, foram contruídos modelos de calibração de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) com seleção de variáveis iPLS. Em comparação ao modelo global, o modelo com 10 intervalos apresentou melhores resultados para previsão de concentração de sacarose em erva-mate. No último estudo, foram comparados as metodologias de seleção de variáveis iPLS e biPLS através dos erros de calibração cruzada (RMSECV), de calibração (RMSEC) e de previsão (RMSEP), coeficientes de determinação (R_{cal}^2 , R_c^2 , R_p^2) e número de variáveis latentes (VLs). Entre os três modelos avaliados, global, iPLS e biPLS, o que apresentou melhores resultados foi o modelo selecionando as variáveis por iPLS. Este apresentou figuras de mérito satisfatórias, indicando a potencialidade de uso de ATR-FTIR para a quantificação de sacarose adicionada como adulterante às amostras de erva-mate.

ABSTRACT

Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) was used to evaluate the potential to differentiate and to quantify sucrose concentrations added as adulterants in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). For this purpose, it was analysed 15 yerba mate samples from different producers by chemometric techniques. The first preliminary analysis consisted in the discrimination between different yerba mate forms in its processing stages: leaves, yerba 'cancheada', stem, leaves directly from the tree, processed yerba mate with and without sugar addition. After the pre-treatments application in the spectroscopic data, it was performed hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). The six sample groups were distinguished, leading for the potential use of ATR-FTIR to evaluate yerba mate products, especially to differentiate samples with to without sugar addition. The second preliminary analysis aimed to distinguish the possible adulteration ways of sucrose in yerba mate. Then, it was evaluated the addition of sucrose and glucose/fructose 1:1 in the crystal shape and in solution, after drying in oven. From the exploratory analysis (HCA and PCA), it was possible to differentiate the samples with glucose/fructose 1:1 addition to the sucrose. The third and fourth study aimed to differentiate sucrose concentrations added to the yerba (0-30%) and also to develop calibrations models to predict the sucrose concentration. In both studies, it was possible to discriminate the samples with different sucrose concentrations through exploratory analysis. In the third study, it was constructed calibration models by iPLS. Comparing to the global model, the iPLS model with 10 intervals presented the best results to predict sucrose concentration in yerba mate. In the last study, it was compared the methodologies of variable selection, iPLS and biPLS, through cross validation error (RMSECV), calibration error (RMSEC), prediction error (RMSEP), coefficient of determination (R_{cal}^2 , R_c^2 , R_p^2) and latent variable (VLs). Between the three evaluated models, global, iPLS and biPLS, the one that presented the best results was iPLS. It presented satisfactory figures of merit, leading to the potential use of ATR-FTIR to quantify sucrose concentrations added as adulterant to yerba mate.

1 INTRODUÇÃO

Adulteração em alimentos são impulsionadas por oportunidades econômicas, baixa probabilidade de detecção e falta de penalidades. ¹ Neste sentido, a erva-mate é um alvo para adulteração devido ao seu baixo prazo de validade e falta de análises para detectar adulterações.

Um dos potenciais adulterantes a ser adicionado em erva-mate é a sacarose uma vez que é barata e mascara o produto vencido. Logo, a sacarose adicionada camufla a má aparência e sabor do produto vencido, aumenta o peso e, conseqüentemente, ocorre o aumento do lucro. ²

Destaca-se que a adição de sacarose em erva-mate é permitida desde que informada no rótulo “erva-mate com açúcar”, segundo a RDC nº 277 de 22/09/2005. ³ A fraude consiste, então, em adicionar sacarose sem a sua designação ou em teores maiores que os informados no rótulo.

As conseqüências dessa adulteração não são somente econômicas, mas também impactam na saúde pública. A não declaração de adição de açúcar em erva-mate ou elevada adição desta é de alto risco para a saúde dos consumidores. Neste sentido, desenvolvimentos de métodos de quantificação e detecção são necessários e de interesse dos consumidores, autoridades regulatórias, indústria alimentícia e agricultores. ⁴⁻⁶

Em comparação a outras técnicas usualmente aplicadas em análise de alimentos, a análise em espectroscopia na região do infravermelho médio acoplado ao acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR) é rápida, versátil, de baixo custo, não destrutiva, de fácil uso e requer mínimo ou nenhum pré-tratamento da amostra. ⁷ Além disso, essa técnica é adequada para uso industrial, uma vez que exige mínimo treinamento do técnico, as análises são rápidas e possui custo relativamente moderado para a compra do equipamento e manutenção. ⁸

As aplicações industriais e regulatórias para assegurar a qualidade e autenticidade dos alimentos através de FTIR têm aumentado uma vez que as análises quimiométricas estão em constante desenvolvimento. ^{9,10}

Métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões, análise por componentes principais (PCA) e análise por agrupamentos hierárquicos (HCA), são frequentemente utilizados com o objetivo de discriminar amostras alimentícias adulteradas. ¹¹ Ainda, algoritmos de regressão multivariada são amplamente utilizados na quimiometria para determinar a

concentração de um determinado analito a partir dos espectros das amostras.¹² No setor alimentício, destaca-se a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)¹³.

2 OBJETIVOS

Avaliar estratégias para detectar e quantificar sacarose, glicose e frutose adicionados à erva-mate beneficiada através da análise em espectroscopia na região do infravermelho médio acoplado ao acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR) em conjunto com técnicas quimiométricas. Aplicar os métodos de análises exploratórias, análise por agrupamentos hierárquicos (HCA) e análise por componentes principais (PCA), e construir modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) com seleção de variáveis através dos métodos iPLS e biPLS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ERVA-MATE

3.1.1 Importância da erva-mate

As propriedades da erva-mate são usufruídas pelos Índios guarani há séculos e foram estes que ensinaram o seu uso aos espanhóis colonizadores. Em contrapartida, os jesuítas iniciaram os primeiros cultivos por volta de 1670, aplicando as primeiras práticas de manejo da *Ilex paraguariensis*.^{14, 15} Historicamente, ela apresenta um importante valor econômico e social, porém, de limitado consumo para além da América do Sul.¹⁵

A mistura de folhas e galhos para chimarrão e tereré é a principal forma de comercialização para o sul do Brasil, nordeste da Argentina e Paraguai.^{16, 17} Contudo, o uso da *Ilex paraguariensis* para outras finalidades é crescente, conforme ilustra a Figura 1. Além de infusões, o extrato das folhas é utilizado para refrigerantes, sucos, cervejas e vinhos; a clorofila e o óleo essencial são utilizados como insumos de alimentos; extrato de cafeína e teobromina em medicamentos; extrato de saponinas e óleo essencial para higiene em geral; extrato de folhas seletivo e clorofila para uso pessoal.^{14, 18} Devido a estas aplicações alternativas desta espécie, exportações são realizadas para os Estados Unidos da América, Ásia e Europa.¹⁹



Figura 1. Foto do arquivo pessoal, ilustrando novos produtos à base de erva-mate apresentados no VII Congresso Sul Americano de Erva-mate, III Simpósio Internacional da Erva-Mate e Saúde e I Feira de Tecnologia na Indústria Ervateira.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura²⁰ (FAO, sigla do inglês Food and Agriculture Organization), foi produzido 931.673 toneladas de erva no Brasil, Argentina e Paraguai em 2014. Diferentemente de anos anteriores, o Brasil foi o maior produtor com 64,7% da massa total entre os três principais produtores, em seguida a Argentina, com 25,4% e Paraguai, com 9,9%.

No Brasil, os estados produtores são o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, sendo que no Rio Grande do Sul, há, aproximadamente, 14.000 pequenas propriedades rurais cultivando a erva-mate, distribuídas em 258 municípios e em 35.000 hectares.²¹

3.1.2 Propriedades e composição química da erva-mate

O interesse de aplicação desta planta provém de suas propriedades medicinais e nutricionais. Já foram associadas à erva-mate as seguintes características: tônico, diurético, anti-reumático, colerético (aumento do fluxo biliar), estimulante do sistema nervoso central, analgésico, anti-ulceroso, lipolítico, glicogenolítico, laxante, anti-celulítico, antioxidante, entre outros.^{17, 22-24}

Essas propriedades traduzem-se na presença de compostos bioativos, como metilxantinas, principalmente cafeína e teobrominas; compostos fenólicos, como ácido caféico e ácido clorogênico; flavonóides, como rutina e quercetina; saponinas e aminoácidos^{17, 23, 24} Entre estas substâncias, o ácido clorogênico corresponde a aproximadamente 42% da composição do seu extrato orgânico, conforme Figura 2.¹⁴ Outros compostos presentes são as vitaminas E, C e do complexo B e minerais como cálcio, potássio, magnésio e manganês.²⁴

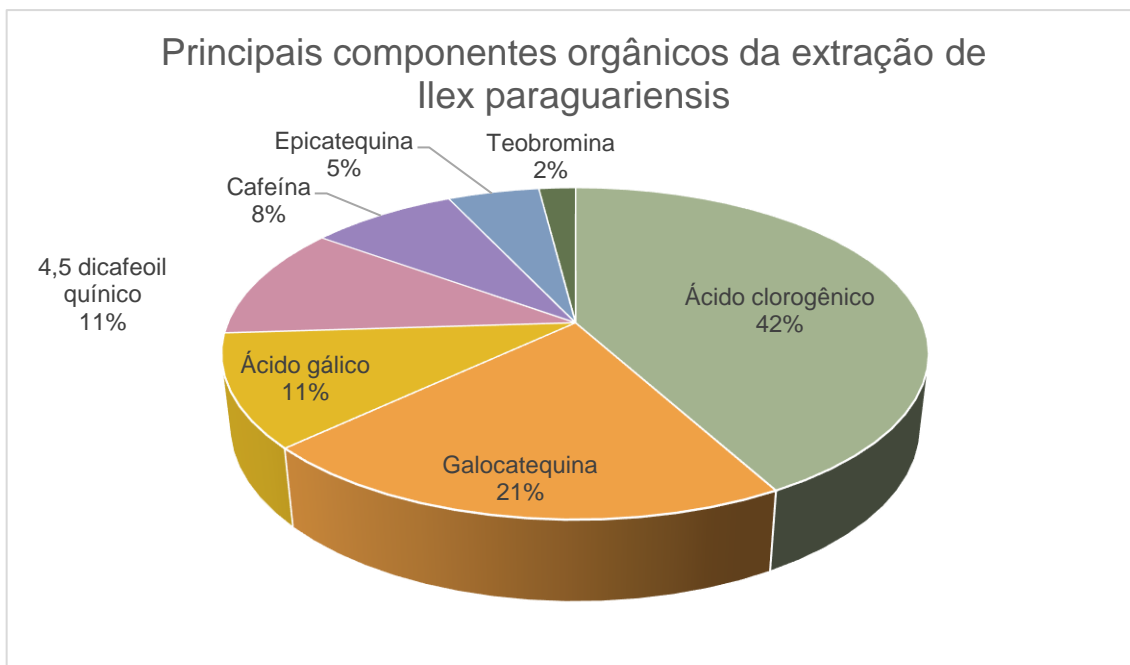


Figura 2. Principais componentes orgânicos da extração de *Ilex paraguariensis*.¹⁴

Metil-xantinas e polifenóis são os principais responsáveis pela ação antioxidante, além de outros estudos também sugerirem que estes têm propriedades anti-inflamatórias e são reguladores do metabolismo energético^{25, 26}. O polifenol ácido clorogênico é reportado como tendo efeitos cardioprotetor, antitumor e neuroprotetor devido a sua capacidade de reagir com as espécies de oxigênio reativos e quelar metais tóxicos.²⁶ O ácido dicafeoil quínico, além da propriedade antioxidante, também indicou atividade antiviral contra o HIV e efeito hepatoprotetor.²⁷ Neste sentido, a erva-mate é uma importante fonte de polifenóis, onde já foram quantificados pelo menos 58 moléculas deste grupo por Mateos e colaboradores²⁸.

Estudos indicam que o flavonóide rutina possui propriedades nutracêuticas, como atividade anticâncer, proteção de vasos sanguíneos, tratamento para artrite como droga anti-inflamatória, entre outros.²⁷

Além disso, variações nas práticas de cultivo, incidência de luz solar, solo ou idade da planta interferem na concentração de cada componente.¹⁷ Por exemplo, luz solar excessiva pode levar a maior produção de polifenóis.²⁹

Uma vez que o presente estudo busca a detecção de açúcares adicionados na erva-mate como forma de adulteração, deve ser considerado que a planta também contém açúcares naturais.

Dartora e colaboradores³⁰ quantificaram sacarose, glicose e frutose nas folhas de erva-mate em dois estágios de crescimento, duas condições de luz solar, assim como dois métodos

de processamento. Após a análise por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, do inglês *ultra performance liquid chromatography*) acoplada a espectroscopia de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS), obtiveram as concentrações de sacarose na faixa de 1,94 a 37,79 mg g⁻¹, glicose de 5,23 a 67,48 mg g⁻¹ e frutose de 6,39 a 48,19 mg g⁻¹. Além disso, concluíram que folhas provenientes do processo de oxidação (equivalente ao realizado para o chá preto) possuíam maior quantidade de carboidratos no total, porém a menor de sacarose. Por outro lado, a análise das folhas processadas para consumo na forma de chimarrão resultou em maior quantidade de sacarose quando comparado à glicose e frutose.

Outra metodologia analítica utilizada para quantificar glicose e sacarose em *Ilex paraguariensis* antes e após a infusão (chimarrão) foi a titulação com reagentes de Fehling.³¹ Braghini e colaboradores observaram que o teor de glicose e sacarose variaram entre 1,74-5,24% e 1,64-4,97%, respectivamente, ao analisar a erva antes da infusão. Entretanto, após a infusão os teores diminuíram para 0,63-3,85% de glicose e 0,50-2,96% de sacarose. Os pesquisadores ainda destacam que esta variação é devido a marcas de erva com adição de açúcar na etapa de processamento.

Moldoveanu e colaboradores³² também analisaram carboidratos presentes na erva-mate através da combinação dos instrumentos GC-MS e LC-MS/MS. Após o desenvolvimento e validação da metodologia, foi possível quantificar frutose, sorbitol, glicose, sacarose, maltose e mio-inositol. A média encontrada para cada um destes foi, respectivamente, 17.450,4; 594,4; 23.290,6; 2.500,6; 222,8 e 4076,0 µg g⁻¹.

Esmelindro e colaboradores³³ analisaram glicose e sacarose em diferentes etapas do processamento da erva-mate. O teor de glicose e sacarose foram obtidos através de titulações. A principal mudança do teor de sacarose foi entre a folha seca e demais etapas do processo devido à sua inversão.

3.1.3 Processamento da erva-mate

O processamento da erva-mate é dividido em 7 etapas básicas (Figura 3).

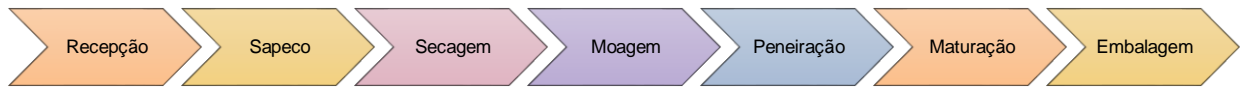


Figura 3. Etapas do processamento da erva-mate.

Após a colheita das folhas, estas são recepcionadas em esteiras (Figura 4), onde ocorre a seleção de folhas e ramos adequados.



Figura 4. Foto de arquivo pessoal. Recepção da erva-mate em esteiras.

O sapeco consiste em um aquecimento rápido realizado com o objetivo de inativar enzimas e aprimorar o sabor. Além disso, a concentração de açúcares diminui enquanto que a de polifenóis e antioxidantes aumenta após esta etapa.

O processo de secagem objetiva aumentar a estabilidade da erva, diminuindo o teor de umidade. Já a moagem é realizada em moinhos até obter-se determinada granulometria e separadas em palitos e folhas e então, ensacadas (Figura 5).



Figura 5. Foto de arquivo pessoal. Erva-mate cancheada ensacada.

Após esta etapa, a erva é denominada cancheada e fica “estacionada” ou em maturação. O tempo que a erva estará pronta para envase dependerá do consumidor final, pois no Brasil a preferência é pela coloração mais verde e sabor menos amargo enquanto que, em outros países, é pela erva mais maturada. Finalmente, folhas e palitos são dosados de acordo com o produto a ser oferecido e embalados.^{34, 35}

3.2 ADULTERAÇÕES EM ALIMENTOS

Adulterações em alimentos são de preocupação crucial para os consumidores, autoridades regulatórias e indústria alimentícia, pois, apesar da motivação ser econômica, o efeito reflete na saúde pública.³⁶ De forma geral, a adulteração de produtos alimentícios objetiva aumentar o valor aparente do produto ou reduzir o seu custo de produção através da adição, remoção ou substituição de ingredientes.^{36, 37}

Além da alteração da composição do produto alimentício, há outras formas de fraudes em alimentos, como informação errônea acerca do alimento em embalagens, replica do produto original ou venda de produto furtado.^{38, 39}

Provavelmente, a primeira tentativa de ilustrar os riscos de adulterações em alimentos foi em 1820, por Frederick Accum¹⁰. Além de outros materiais não alimentícios, ele discutiu em sua publicação adulterações em vinho, água, pães, cervejas, chás, cafés, licores, queijo, vinagre, óleo de oliva, entre outros.⁴⁰

Everstine e colaboradores⁴¹ encontraram 137 adulterações em publicações datadas de 1980 a 2012. Das 11 categorias agrupadas, destaca-se a de chás, os quais são suscetíveis a adulterações por outras folhas já usadas, talos de plantas e outros materiais orgânicos. Além

disso, chás também podem conter folhas de outras plantas, aditivos de cor e serragem colorida.

42

Conforme Cordella e colaboradores ⁴³, há três estratégias analíticas para detectar adulterantes alimentícios. A primeira consiste em determinar a razão entre certos componentes da amostra, assumindo que este é um componente constante do alimento. Logo, a adição de qualquer substância ao alimento provocaria uma mudança nos valores das razões. Outra alternativa fundamenta-se em determinar um marcador específico no produto, como moléculas ou ácidos nucleicos. A terceira possibilidade caracteriza-se pela utilização de técnicas analíticas derivadas de análises físicas, como potencial hidrogeniônico, condutividade, umidade, etc.

Por outro lado, Pustjens e colaboradores ⁴⁴ afirmam que há duas estratégias para detectar fraudes em alimentos. A primeira baseia-se na presença/ausência de um adulterante específico, já a segunda consiste em autenticar a pureza dos constituintes.

Neste estudo, as estratégias utilizadas para detecção de açúcares caracterizar-se-ão pela presença ou não de glicose e frutose convertidas da sacarose adicionada.

Vale frisar que esta forma de adulteração tem como objetivo camuflar a má aparência ou sabor, aumentar o peso e conseqüentemente, aumentar o lucro. ^{2, 45} Inclusive, estudo com chá verde tostado relatou similar ocorrência devido ao aumento da sua comercialização. ⁴⁶

3.2.1 Adulteração em erva-mate

Fraudes no setor ervateiro são impulsionados por oportunidades econômicas, baixa probabilidade de detecção e falta de penalidades. ¹ Neste sentido, a erva-mate é principalmente adulterada devido ao seu curto prazo de validade e carência de análises realizadas por agências regulatórias a fim de detectar adulterações.

Há pelo menos 28 anos, tem-se a preocupação de identificar adulterações da erva-mate com outras espécies *Ilex* e similares. ⁴⁷ Dallago e colaboradores ⁴⁸ analisaram a adulteração da erva mate (*Ilex paraguariensis*) com outras três espécies de *Ilex*, indicando marcadores químicos através da cromatografia gasosa.

A fim de discriminar pelo teor de metil-xantinas, Filip e colaboradores ⁴⁹ utilizaram HPLC com detector ultravioleta e de arranjo de fotodiodos para analisar 7 espécies de *Ilex* e Reginatto e colaboradores ⁵⁰ também analisaram 5 espécies por HPLC com detector ultravioleta.

Com o objetivo de realizar análise metabólica por espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), estudos diferenciaram 11 possíveis espécies adulterantes da erva-mate^{51,52}. De forma semelhante, Alexandre e colaboradores⁵³ utilizaram RMN para distinguir substâncias presentes nas folhas da erva-mate dos seus frutos.

Outro estudo indicou que saponinas poderiam ser utilizadas para autenticar a espécie *Ilex paraguariensis*, uma vez que observaram que há distintos perfis de saponinas para outras espécies de *Ilex*.⁵⁴

Além da relevância econômica, a adulteração em erva-mate também pode acarretar para alterações na saúde do consumidor. Gorzalczany⁵⁵ avaliou a atividade colérica e o efeito de propulsão intestinal da decocção de quatro espécies de *Ilex*. Os resultados encontrados sugeriram que as propriedades terapêuticas da erva-mate seriam afetadas quando presentes pelo menos um dos adulterantes. Além disso, Valduga e colaboradores⁵⁶ constataram que a *I. Dumosa* apresenta saponinas de ação hemolítica e o *P. sellowii*, ácido cianídrico.

Com relação à adição de açúcar em erva-mate, foco desta dissertação, foram encontrados poucos estudos que determinaram a presença de açúcares.

Mendes e colaboradores² verificaram a presença de cristais de açúcar através da técnica de sedimentação em clorofórmio e posterior observação em microscópio e estereoscópio. Destacaram que a presença de açúcar indicou fraude uma vez que este não estava declarado na lista de ingredientes no rótulo.

Braghini e colaboradores³¹ analisaram glicose e frutose em erva-mate efetuando titulação com reagentes de Fehling. Em todas as marcas analisadas, encontraram teores de sacarose e glicose, contudo não descrevem se a adição destes açúcares estava descrita nas suas respectivas embalagens.

Destaca-se que, no Brasil, não há regulamentos relacionados a quantificação de açúcar, somente a sua presença qualitativa⁵⁷. Neste caso, se ocorrer a adição de açúcar em erva-mate, deve ser incluída, na designação, “erva-mate com açúcar” ou “mate com açúcar”, segundo a RDC nº 277, de 22/09/2005.³ Portanto, a adição de açúcares é permitida desde que informado na embalagem aos consumidores.⁵⁸

3.2.2 Adultrações de alimentos com açúcar

Adulterantes como açúcares ou xarope de glicose absorvem água facilmente, aumentando o risco de contaminação microbiológica. ⁴⁶

O resultado do estudo de Luqing e colaboradores ⁴⁶ demonstrou a possibilidade de usar espectroscopia na região do infravermelho próximo para detectar e quantificar adulterantes açúcar e xarope de glicose em chá verde tostado. Estes desenvolveram modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *partial least squares regression*) com exatidão na identificação de até 96% para açúcar e 100% para xarope de glicose.

Da mesma forma, espectros de chá preto foram adquiridos por espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) a fim de detectar concentrações de açúcar adicionadas propositalmente. ⁵⁹

3.3 AÇÚCAR

Compostos de carbono, hidrogênio e oxigênio na proporção de $C_n:H_{2n}:O_n$, os carboidratos são divididos em três grupos principais: monossacarídeos e dissacarídeos, de baixo peso molecular; oligossacarídeos, de médio peso molecular e polissacarídeos, de maior peso molecular. ⁶⁰

Os carboidratos de interesse neste estudo foram os de baixo peso molecular, sacarose, glicose e frutose (Figura 6).

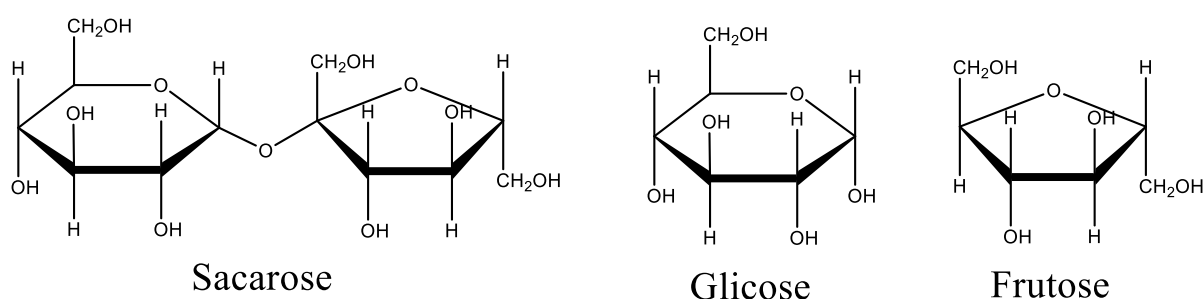


Figura 6. Estrutura química da sacarose, glicose e frutose.

Diferentemente de outros dissacarídeos, a ligação glicosídica da sacarose é formada pelos terminais redutores da glicose e frutose. A hidrólise da sacarose, resultando em glicose e

fructose, também é denominada de inversão uma vez que a sacarose é dextrorrotatória e a mistura de glicose e frutose (açúcar invertido) é levorrotatório. ⁶¹

A importância da determinação individual de carboidratos baseia-se não somente por prover a informação composicional das amostras, mas também, por auxiliar da identificação de adulterantes. ⁶²

Apesar do carboidrato ser um combustível primário de produção de energia para a maioria dos organismos vivos ⁶³, esta também está associada a problemas de saúde pública, como diabetes, obesidade e outras doenças crônicas. ⁶⁴

Neste sentido, desenvolvimentos de métodos de quantificação e detecção são necessários para garantir a qualidade e segurança dos alimentos. A declaração da presença de açúcar nas embalagens alimentícias é igualmente relevante, entre outras prevenções de fraudes, para consumidores, autoridades regulatórias, indústria alimentícia e agricultores. ⁴⁻⁶ Portanto, a não declaração de adição de açúcar em erva-mate é de alto risco para a saúde dos consumidores.

3.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR, do inglês *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*) fundamenta-se na medida de absorção de amostras posicionadas no caminho do feixe infravermelho uma vez que as moléculas absorvem esta radiação quando a frequência vibracional das ligações equivale-se à frequência da radiação infravermelha. ⁶⁵ Além disso, o espectro eletromagnético do infravermelho é dividido em 3 regiões: próximo (14.000–4.000 cm^{-1}), médio (4.000–400 cm^{-1}) e distante (400–50 cm^{-1}). ⁷

FT-IR tem sido uma ferramenta eficiente na análise de alimentos. ⁶⁶ Além de ser uma técnica não destrutiva, requer mínimo ou nenhum pré-tratamento da amostra, possui baixo custo operacional, é rápida, versátil e de fácil uso. ⁷ A sua versatilidade é proveniente da possibilidade de análise de sólidos, líquidos ou gases, macro- ou microscopicamente. ⁶⁷

Entre as técnicas de reflexão no infravermelho médio, destaca-se a de refletância total atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*). A análise empregando este acessório não requer nenhum pré-tratamento e coleta informações relacionadas à superfície da amostra. ⁶⁸ Neste sentido, a amostra é adicionada em contato com a superfície de um cristal (seleneto de zinco, germânio, diamante ou iodeto de tálio) de alto índice de refração. O sistema ATR mede a diferença de intensidade que ocorre internamente pelos repetidos contatos do raio

infravermelho com a amostra. Uma onda denominada evanescente é gerada a partir da refletância do cristal, penetração na amostra, interação com esta e então, caso ocorra absorção, ocorre a atenuação da sua intensidade. Portanto, o espectro é gerado a partir da absorção do comprimento de onda correspondente à atenuação do feixe da onda evanescente.⁶⁹

As revisões realizadas por Karoui e colaboradores⁷⁰, Hong e colaboradores⁶ e Cozzolino e colaboradores⁷¹ exploram estudos referentes à aplicação de FTIR, onde muitos destes utilizaram ATR para analisar laticínios, carnes, óleos, cereais, mel, frutas, vegetais, café, entre outros.

O uso de ATR-FTIR em matrizes similares à erva-mate também foi pesquisado. Black e colaboradores⁷² analisaram adulterações em orégano com folhas de outras espécies e 100% dos resultados foram equivalentes ao segundo método aplicado, cromatografia líquida com espectrômetro de massas de alta resolução.

Varliklioz e colaboradores⁷³ também obtiveram êxito em distinguir adulterações em açafraão por ATR-FTIR em conjunto com análise por componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*). Kokalj e colaboradores⁷⁴ distinguiram 10 ervas medicinais em chás com os espectros adquiridos por ATR-FTIR, PCA e análise discriminante (DA).

A detecção do fármaco sibutramina em chás e café foi estudado por Cebi e colaboradores⁷⁵ através da combinação de ATR-FTIR, PCA e análise por agrupamento hierárquico (HCA, do inglês *hierarchical cluster analysis*). Seus resultados sugeriram que a adulteração com sibutramina pode ser determinada com sucesso na faixa de 0,375-12 mg em 1,75g de chá verde, café verde e chá misto de ervas.

Carboidratos, incluindo os de interesse neste estudo, foram analisados por FT-Raman e ATR-FTIR. Wiercigroch e colaboradores⁷⁶ estudaram os espectros de monossacarídeos, dissacarídeos, trissacarídeos e polissacarídeos e observaram que é possível a sua identificação e correlacionar os espectros com suas estruturas.

3.5 MÉTODOS MULTIVARIADOS

3.5.1 Análise por agrupamento hierárquico

A análise por agrupamento hierárquico tem como finalidade principal reunir os objetos (ou amostras) de forma que os mais similares entre si estejam representadas em um mesmo grupo, maximizando a homogeneidade interna.⁷⁷ No mesmo sentido, as variáveis

(características) responsáveis por agrupar as amostras também são utilizadas para maximizar a heterogeneidade entre os grupos.^{77, 78}

O dendrograma é a representação gráfica, bidimensional, do grau de similaridade das amostras e independente do número de variáveis do conjunto de dados.⁷⁹ A HCA é uma técnica aglomerativa, ou seja, as amostras são agrupadas em um processo iterativo, com base em grupos já definidos em etapas anteriores, até que todas formem um grande e único grupo.

Primeiramente, é necessário estabelecer a medida de distância entre o par de amostras, a e b (d_{ab}) em um espaço de m variáveis.⁸⁰ Para calcular a distância (ou correlação) entre os objetos, pode-se utilizar as medidas de distância Euclidiana, de Manhattan (ou retilínea) ou Mahalanobis, entre outras. Destaca-se que a medida de distância mais intuitiva e comum é a distância Euclidiana.^{77, 81, 82}

O método de agrupamento é outro critério a ser definido. Os objetos de um grupo podem se ligar a outro de acordo com a distância média entre eles, pela distância mais próxima ou a mais distante. Outros métodos usados menos frequentemente são os de Ward e centroide. O método do vizinho mais próximo, o utilizado neste estudo, consiste em calcular as distâncias entre todos os pares de grupos e o par mais próximo formará um novo grupo e, assim, sucessivamente, até finalização da árvore hierárquica.^{77, 81}

3.5.2 Análise por componentes principais

A análise por componentes principais (PCA) é um dos mais importantes métodos quimiométricos, sendo muito utilizada para fins de redução, classificação, exploração, interpretação, detecção de *outlier* e agrupamento de dados.^{12, 83}

Ao estabelecer novos vetores linearmente independentes, a dimensionalidade do conjunto de dados é reduzida, porém a maior quantidade de informação (variância) é preservada. Estes vetores são denominados componentes principais (PCs) e são ortogonais entre si. A primeira componente principal (PC1) é a combinação linear de máxima variância dos dados originais. Ortogonal à PC1, a PC2 é representativa da variância dos dados originais neste subespaço. As seguintes PCs seguem a mesma lógica, sendo ortogonais às suas precedentes e descrevendo a variância restante.^{77, 79, 84} Neste sentido, a PCA projeta os dados multivariados em um novo sistema de coordenadas, ilustrados em gráficos bi- ou tridimensionais.⁸⁵

As componentes principais são obtidas através da decomposição da matriz X (Equação 1) em duas matrizes,

$$X = T P^T + E \quad (1)$$

onde P^T é a matriz transposta de pesos, T é a matriz de escores e E, a de resíduos. Os gráficos de escores (ou *scores*) projetam as amostras no novo sistema de coordenadas, enquanto que os pesos (ou *loadings*) fornecem informações acerca das variáveis.⁸⁰

Pré-processamentos e tratamento dos dados são essenciais para minimizar fontes irrelevantes de informações, não relacionadas às propriedades de interesse.

Centrar na média significa que, dentro de uma matriz, a média de cada coluna é subtraída dos dados. Dessa forma, é eliminado um fator constante dos dados e transfere os dados para a origem na média. Autoescalamamento consiste em, além de subtrair a média, também dividir os dados pelo desvio padrão de cada coluna. Com o objetivo de dar o mesmo ‘peso’ para cada variável, o resultado é ilustrado de 0 a 1. Portanto, 0 não seria mais a ausência de sinal e sim um sinal ‘médio’.^{82, 83} O objetivo da normalização é igualar a magnitude de cada amostra.⁷⁷ As variáveis são divididas pela raiz quadrada da soma das variáveis ao quadrado.^{82, 86}

Variação normal padrão (SNV, do inglês *Standard Normal Variate*) e correção do espalhamento multiplicativo (MSC, do inglês *multiplicative scatter correction*) foram desenvolvidos com o fim de remover a variabilidade causada pelo efeito de dispersão da luz nos espectros de reflectância. Seus resultados são similares uma vez que o formato de suas equações são semelhantes.⁸⁷ Além disso, removem a influência de efeitos de tamanho de partícula, rugosidade e opacidade.^{88, 89}

A aplicação da primeira e segunda derivadas dos espectros pode corrigir efeitos na linha de base, como deslocamento e inclinação, assim como evidenciar sinais que não são muito visíveis. O polinômio de Savitzky Golay, além de também poder ajustar problemas da linha de base, pode suavizar os espectros aumentando a relação sinal/ruído.⁸⁸

Estes métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões, PCA e HCA, são frequentemente utilizados com o objetivo de discriminar amostras alimentícias adulteradas.¹¹ Neste sentido, pesquisadores têm usado FTIR e análise exploratória para diferenciar espécies de chás^{66, 67, 97-99} e também de acordo com a origem geográfica⁹⁰⁻⁹³.

3.5.3 Métodos de classificação

Divididos genericamente em paramétricos e não-paramétricos, os métodos de classificação referem-se às técnicas em que se tem o conhecimento à priori das categorias que as amostras pertencem.^{77, 90} O modelo de classificação é desenvolvido com base nas informações de um conjunto de treinamento, ou seja, é criada uma regra de classificação. O modelo obtido é avaliado a partir de amostras de um conjunto de teste (ou validação) a fim de conferir se o modelo está prevendo a classe correta das novas amostras.⁷⁷

Os métodos paramétricos são aqueles que modelam as informações usando a distribuição Gaussiana e a abundância de cada grupo que possui uma probabilidade fixa.⁹⁴ Logo, testes não paramétricos não requerem suposições de normalidade ou homogeneidade de variâncias.⁹⁵

Diversos estudos analisaram chás, ervas, cafés e similares a partir da espectroscopia na região do infravermelho e utilizaram métodos de classificação para discriminar suas amostras de interesse, conforme Tabela 1. Entre os métodos de classificação encontrados na literatura, estão a análise discriminante (DA), *soft independent modelling by class analogy* (SIMCA), análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), análise discriminante linear (LDA), método dos k-ésimos vizinhos mais próximos (KNN) e rede neural artificial (ANN). Oliveri e Downey⁴⁵ ainda mencionam os métodos CART (*classification and regression trees*), UNEQ (*unequal dispersed classes*), SVDD (*support vector domain description*), QDA (*quadratic discriminant analysis*) e PFT (*potential functions techniques*) para autenticação de alimentos.

Tabela 1. Métodos de classificação em análise de chás, ervas e cafés a partir de espectros obtidos por FT-IR.

Amostra	Métodos de classificação	Referência
Chás e ervas	DA e PLS-DA	96
	LDA, KNN e ANN	90
	KNN, SIMCA, PLS-DA e SVM-DA	17
	SIMCA	97
	PLS-DA	98
	LDA, ANN, PCA	99
Cafés	LDA, PLS-DA	100
	PLS-DA, LDA	101
	LDA	102
	PLS-DA	103

3.5.4 Métodos de regressão multivariada

Métodos de regressão relacionam os espectros vibracionais às propriedades quantificáveis das amostras. São principalmente baseados em regressão multivariada através de componentes principais (PCR) e pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS).⁶⁷

Algoritmos de regressão multivariada são amplamente utilizados na quimiometria para determinar a concentração de um determinado analito a partir dos espectros das amostras.¹² Envolve duas fases: a de calibração e a de validação. Na fase de calibração, o conjunto de dados de calibração é utilizado para gerar o modelo de calibração que correlaciona os espectros com suas respectivas concentrações conhecidas. Na sequência, este modelo pode ser utilizado para prever a concentração de amostras desconhecidas.

A fim de avaliar o desempenho do modelo construído, podem ser aplicadas figuras de mérito: exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade, linearidade, razão sinal/ruído, limites de quantificação e detecção, robustez, etc. Por exemplo, uma forma adequada de expressar a exatidão é pela raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP, do inglês *root*

mean square error of prediction), ou a capacidade de previsão do modelo pela raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV, do inglês *root mean square error of cross validation*).⁹⁷

No setor alimentício, o método de calibração mais aplicado é o PLS¹³, mas ainda há outras técnicas eficazes que são aplicadas em conjunto com a espectroscopia na região do infravermelho, como PCR, máquina de vetores de suporte (SVM, do inglês *support vector machine*), entre outros. De fato, a pesquisa bibliográfica realizada (Tabela 2) entre matérias primas similares à erva-mate, analisadas através de espectroscopia na região do infravermelho, demonstraram diversas aplicações principalmente por PLS.

Tabela 2. Métodos de calibração em análise de chás, ervas, café e cacau a partir de espectros obtidos por FT-IR.

Amostra	Métodos de calibração	Referência
Chás e ervas	SVM	104
	PLS	46, 97, 105-109
Cafés	PLS, GA	110, 111
	PLS	112, 113
	PLS, PCR	114
Cacau	SVM, PLS	115

Através das análises no ATR-FTIR e HPLC, açúcares presentes no néctar de *Leptospermum scoparium* foram quantificados e correlacionados pelo método PLS¹¹⁶. Luqing e colaboradores⁴⁶ também desenvolveram um método de calibração para detectar e quantificar açúcares em chá verde tostado. Ambos estudos obtiveram resultados com exatidão aceitável.

Neste estudo, o método de calibração utilizado foi o de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Esse método pode realizar a previsão dos parâmetros de interesse

mesmo com a presença de interferentes nas amostras, desde que estes também estejam presentes na construção do modelo de calibração.¹¹⁷

Em comparação à PCA, onde os componentes são desenvolvidos somente a partir dos dados espectrais, em PLS, estes são desenvolvidos para descrever a principal variação tanto nas matrizes com dados espectrais quanto nas matrizes com as composições associadas.¹¹⁸

O PLS baseia-se na decomposição da matriz X e Y em matrizes menores através de análises fatoriais. A Matriz X, constituída de m colunas (sinal espectral para cada comprimento de onda) e n linhas (amostras), é decomposta conforme Equação 2.

$$X = M_1 + M_2 + \dots + M_a + E \quad (2)$$

onde “M” representa o produto dos vetores de escores e pesos, ou seja, são componentes principais ou variáveis latentes (VLs); “a” é o número de fatores e “E” é a matriz de resíduos, relacionada ao número de fatores.

A Matriz Y é decomposta simultaneamente de forma análoga à Equação 2 e finalmente, as variáveis latentes das matrizes menores são correlacionadas.¹¹⁹

O número de variáveis latentes a ser utilizado neste estudo foi determinado pelo procedimento de validação cruzada *leave-one-out*. Neste sentido, uma amostra é retirada do conjunto de calibração e o modelo PLS é construído com as demais amostras, realizando a previsão da propriedade de interesse desta amostra deixada de fora e empregando um número crescente de VLs. Este procedimento é repetido para todas as amostras do conjunto e um erro médio (RMSECV) é calculado para cada número de VLs empregado.¹²⁰

A seleção de variáveis auxilia a identificação de um subconjunto de variáveis que podem gerar um modelo de regressão mais preciso e exato.¹²¹ Logo, faixas espectrais que trazem informações irrelevantes ou que induzem a erros podem ser eliminadas.

Os métodos de seleção de variáveis diferem-se conforme o procedimento utilizado para selecionar a região espectral. Entre muitos usados atualmente, destaca-se os usados neste trabalho: iPLS (do inglês, *interval partial least squares*) e biPLS (do inglês, *backward interval partial least-square*).

O iPLS, desenvolvido por Nørgaard e colaboradores¹²², é uma extensão do PLS onde os modelos são desenvolvidos por subintervalos do espectro de largura equivalentes. O objetivo é promover uma visualização geral dos dados espectroscópicos de forma a selecionar as faixas de espectros mais representativas para a construção do modelo.

Por outro lado, o biPLS baseia-se na exclusão de regiões espectrais após dividir o espectro em intervalos equidistantes. Inicialmente são construídos modelos PLS deixando de fora um intervalo por vez.¹²³ O primeiro intervalo eliminado será aquele que, sendo excluído, minimiza o erro de calibração cruzada (RMSECV, do inglês *root mean square error of cross validation*). Esse procedimento é realizado até que ocorra uma combinação ideal de intervalos, de menor RMSECV.

As amostras de erva-mate foram selecionadas para compor o conjunto de calibração e previsão através do algoritmo Kennard-Stone. O algoritmo começa selecionando as duas amostras com a maior distância euclidiana entre elas no conjunto de dados. Para as amostras restantes, é calculado a distância mínima entre estas duas amostras já selecionadas. Em seguida, a próxima amostra a ser selecionada será a que apresentar a maior distância em relação à anterior e assim sucessivamente até que se tenha o número de amostras desejadas no grupo de calibração.¹²⁴

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 AMOSTRAS

Todas as amostras de erva-mate foram concedidas pela Ervateira Valério, Arvorezinha – Rio Grande do Sul.

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de distinção entre diferentes formas da erva-mate, a empresa primeiramente concedeu amostras das etapas de processamento: folhas colhidas diretamente da árvore, pura folha, palitos, erva-mate cancheada, erva-mate beneficiada sem adição de açúcar e com adição de açúcar. Esses 6 conjuntos de amostras consistiram o primeiro estudo preliminar.

Em agosto de 2016, 6 amostras de erva-mate beneficiadas de diferentes produtores foram enviadas e, em dezembro, mais 7 amostras de outros 7 produtores. Totalizando 15 amostras colhidas em diferentes áreas, localizadas no Rio Grande do Sul, Brasil, conforme mapa em Figura 7. Cada local de colheita teve sua coordenada geográfica registrada pela ervateira e nomeadas de 1-15, estando todas em um raio de 34 km.

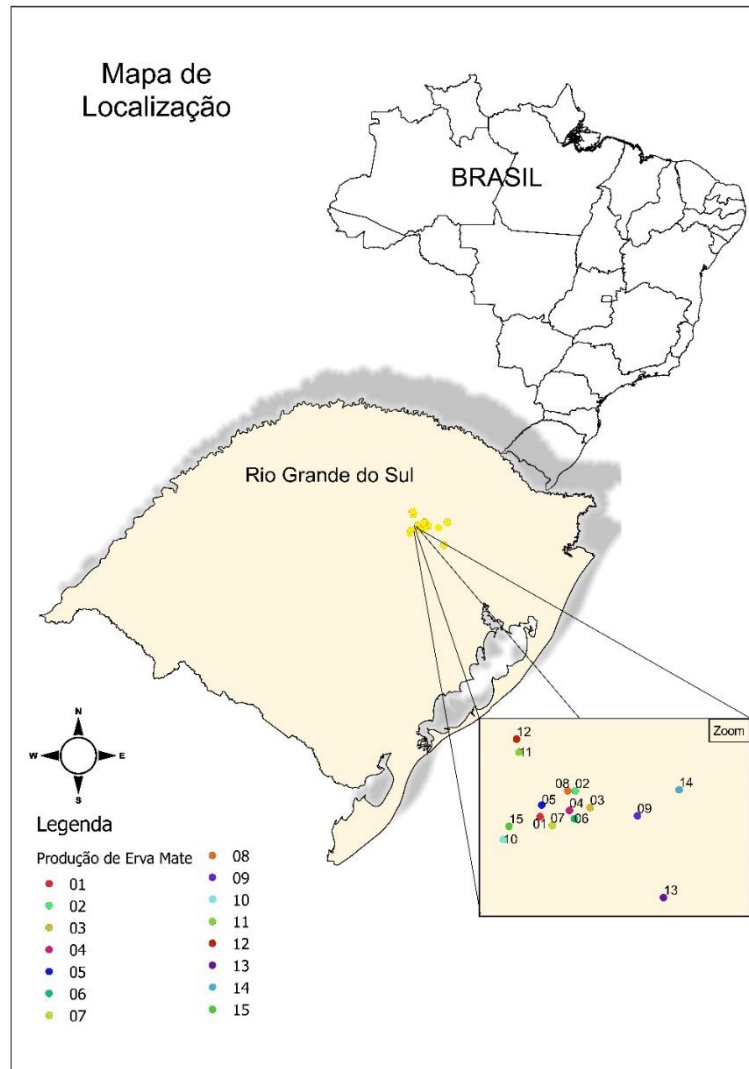


Figura 7. Localização do plantio das 15 amostras de erva-mate estudadas.

Destaca-se que para o segundo experimento preliminar foi utilizada uma das amostras, a de número 13. Somente nos dois últimos estudos o conjunto total de amostras 1-15 foram analisadas. A Figura 8 ilustra as características dos 4 estudos realizados nesta dissertação.

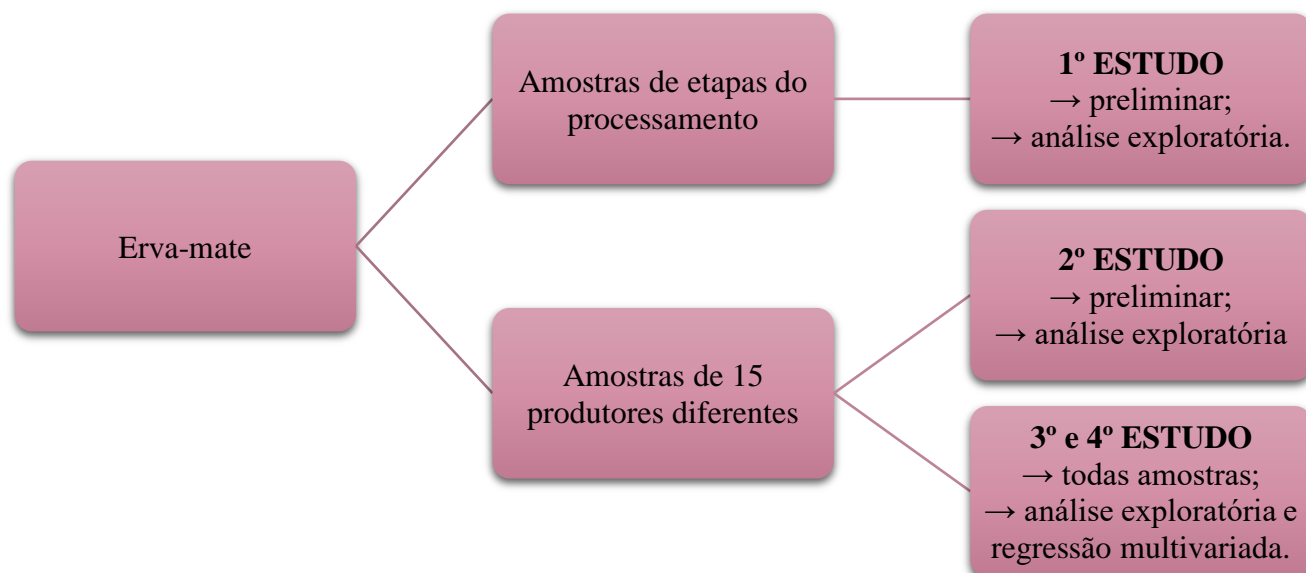


Figura 8. Amostras concedidas pela Erva-mate Valério e descrição dos 4 estudos realizados.

Posteriormente, todas as amostras foram moídas em moinho criogênico MA775 Marconi, onde o tempo total de cada ciclo de moagem foi de 12 min, 4 min de resfriamento e 8 min de moagem com intervalos de 30 s e frequência de 20 Hz.

4.2 INSTRUMENTAÇÕES

Os dois equipamentos de espectroscopia na região do infravermelho utilizados foram os modelos Cary 630 Agilent[®], acoplado com acessório de refletância total atenuada (ATR-FTIR) na faixa de 4000-650 cm^{-1} , resolução 4 cm^{-1} e 16 varreduras; e da Perkin Elmer[®] Spectrum 400, também acoplado com o instrumento de refletância total atenuada (ATR-FTIR) na faixa de 4000-650 cm^{-1} , resolução 4 cm^{-1} e 8 varreduras.

Balança analítica de precisão 0,0001g utilizada foi da marca Edutec[®] e estufa bacteriológica SL101, Solab[®].

Para determinação granulométrica, utilizou-se um agitador de peneiras e peneiras da marca Bertel[®].

4.3 MATERIAIS E REAGENTES

Os padrões utilizados foram dextrose anidra P.A. (Dinâmica), D-(-)-frutose P.A. (Neon) e D(+) sacarose P.A. (Dinâmica)

Em todos os procedimentos, a água utilizada foi ultrapura (Milli-q®).

4.4 ATR-FTIR

4.4.1 Granulometria

Para determinação da granulometria da erva-mate após a moagem por criogenia, utilizou-se uma das amostras entre o conjunto de 15 amostras de diferentes produtores, a amostra de número 13. Foi utilizado um agitador de peneiras para análise granulométrica com conjunto de 5 peneiras com granulometria de 24, 32, 60, 80 e 100 mesh. O tempo de agitação foi de 10 min para 71 g de erva-mate.

4.4.2 1º estudo: distinção entre diferentes formas de processamento da erva-mate

Neste primeiro momento, verificou-se a possibilidade de discriminação entre amostras de erva-mate retiradas de diferentes etapas da produção de erva-mate para chimarrão: folhas diretamente da árvore; erva-mate beneficiada, com e sem adição de açúcar; pura folha, palitos e erva cancheada. A análise foi realizada pelo ATR-FTIR e as análises exploratórias, PCA e HCA na faixa de $1800 - 650 \text{ cm}^{-1}$ no software Chemostat®², aplicando-se os pré-tratamentos de suavização (Savitzky-Golay, 13 pontos), normalização, standard normal variate (SNV) e 1ª derivada (13 pontos). A Figura 9 ilustra as amostras utilizadas e as etapas de análise.

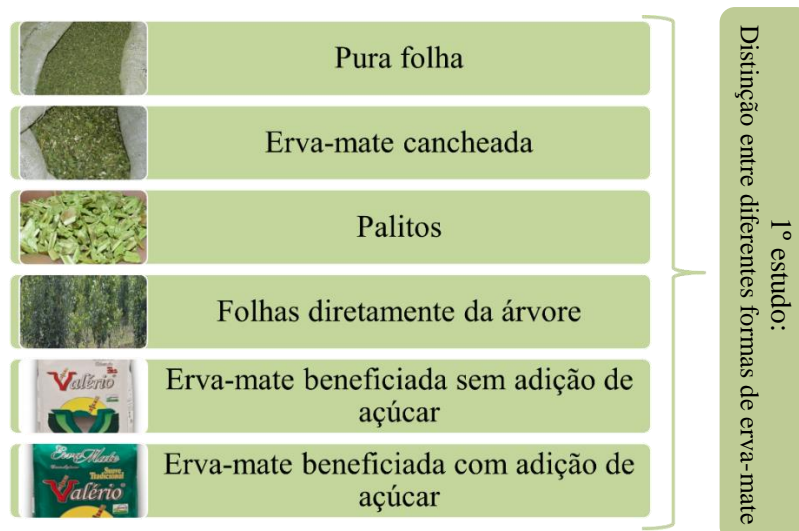


Figura 9. Ilustração das amostras de erva-mate provenientes das etapas de processamento para o 1º estudo.

4.4.3 2º estudo: avaliação das possíveis formas de adulteração da erva-mate com açúcar

Partindo de uma das amostras de erva-mate beneficiada, nove amostras representativas de possíveis formas de adulteração foram elaboradas e secas em estufa por 1 h a 40°C. Neste sentido, em 4 amostras foram adicionadas 0,5 mL de solução 600 mg mL⁻¹ g e de 200 mg mL⁻¹ de sacarose e glicose/frutose 1:1, respectivamente. As mesmas quantidades de açúcar foram adicionadas a outras 4 amostras, mas em sua forma sólida (cristal). Ainda, uma amostra foi seca contendo somente a erva-mate com 0,5 mL de água. Em conjunto com estas 9 amostras, foi obtido o espectro da erva-mate bruta por ATR-FTIR. A Figura 10 apresenta as amostras e concentrações de açúcares adicionadas.

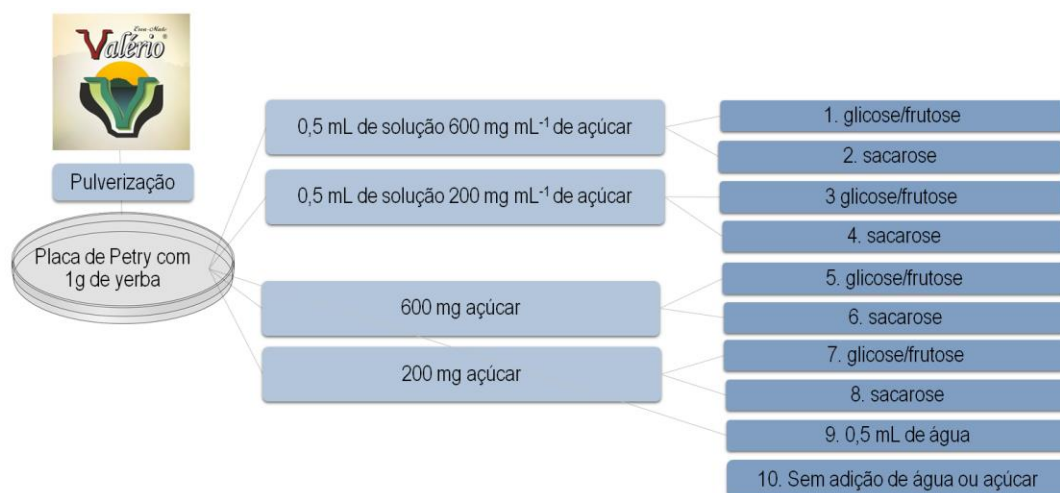


Figura 10. Representação da adição de açúcares em diferentes concentrações em erva-mate.

A obtenção dos espectros foi realizada na faixa de 4000-650 cm^{-1} no espectrômetro ATR-FTIR (Perkin Elmer[®] Spectrum 400) com resolução 4 cm^{-1} e 8 varreduras. Os métodos de análise exploratória empregados foram HCA e PCA no software Chemostat^{®125}.

4.4.4 3º estudo: concentrações de sacarose adicionadas à erva-mate por regressão multivariada

Para o 3º e 4º estudos, foram utilizadas o conjunto total de 15 amostras e para a construção do modelo de regressão multivariada, o método de referência utilizado foi a massa pesada em balança analítica. Destaca-se ainda que estes dois estudos simularam a adulteração por adição de sacarose em erva-mate beneficiada. Uma vez que a sacarose é convertida em glicose e frutose, as análises basearam-se na quantificação destes dois últimos açúcares.

0,5 g de erva-mate beneficiada foram adicionadas a um dappen de silicone (Figura 11) com 0,5 mL de solução de sacarose de diferentes concentrações e secos em estufa por 1h e 30 min a 40°C. A cada 5 min, o dappen foi pressionado e homogeneizado. Esta etapa teve o objetivo de reproduzir a possível forma de adulteração realizada e o dappen de silicone foi utilizado para melhor homogeneização das amostras, visto que é um fator importante para análise em ATR-FTIR.



Figura 11. Dappen de silicone (recipiente) usado para secar e homogeneizar a erva-mate com solução de sacarose em estufa.

As soluções de sacarose foram preparadas com o fim de alcançar de 5-30% da quantidade de erva-mate, totalizando 45 amostras (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração de sacarose adicionada em cada amostra.

Amostras	% sacarose adicionada em 0,5 g erva		
Todas	0		
1, 3, 4, 6, 8, 11, 13, 15	5	15	25
2, 5, 7, 9, 10, 12, 14	10	20	30

Antes e depois de adicionar sacarose à erva, as amostras foram analisadas em ATR-FTIR (Cary 630 Agilent®) na faixa de 4000-650 cm^{-1} , resolução 4 cm^{-1} e 16 varreduras. Os espectros foram obtidos em triplicata para cada amostra.

Primeiramente, foram realizados os métodos de análise exploratória HCA e PCA no software Chemostat®¹²⁵. Os pré-tratamentos estudados para melhorar os resultados obtidos foram MSC, SNV, 1ª derivada (Savitzky Golay, tamanho da janela 13), suavização (Savitzky Golay, polinômio de 2ª ordem e tamanho de janela 13) e normalização (1-0).

Após a seleção dos pré-tratamentos, foi construído o modelo de calibração PLS correlacionado os dados espectrais obtidos por ATR-FTIR com o método de referência, pesagem em balança analítica das massas de sacarose. O software utilizado para a construção do modelo de calibração foi o Matlab R2015a (MathWorks®) e pacote iToolbox.

As amostras de erva-mate foram divididas entre calibração e predição pelo algoritmo Kennard-Stone.

O método de seleção de variáveis utilizado foi iPLS de 1 a 10 divisões do espectro. Para cada divisão, selecionou-se o melhor intervalo de acordo com o menor número de VLs, menor RMSECV e maior R_{cal}^2 .

Já os critérios de seleção do melhor modelo PLS, além destes mencionados, também foram considerados o RMSEP, RMSEC, R_c^2 e R_p^2 .

4.4.5 4º estudo: concentrações de sacarose adicionadas à erva-mate por regressão multivariada

Após a leitura das amostras em ATR-FTIR do estudo anterior, observou-se que a conservação em geladeira não foi suficiente para a quantidade remanescente de água na erva-mate após a secagem. Por este motivo, antes de repetir os procedimentos de adulteração e análise em ATR-FTIR, foi realizado um estudo relacionado ao tempo de secagem em estufa e dessecador. Estes procedimentos foram realizados uma vez que se acredita que a erva-mate adulterada apresenta um baixo teor de umidade para possibilitar a sua comercialização sem a detecção visual por parte dos usuários. Além disso, a umidade também interfere na análise por ATR-FTIR e posteriores análises quimiométricas.

Para este fim, o dappen contendo 0,25 mL de solução de sacarose em 0,5 g de erva-mate foi alternadamente colocado em estufa a 40°C e dessecador até peso constante.

Além disso, pequenas alterações na metodologia foram realizadas em comparação com o estudo anterior. 0,5 g de erva-mate e 0,25 mL de solução de sacarose foram adicionados ao dappen pelo tempo de secagem otimizado: 1h em estufa a 40 °C, 1 h em dessecador, 30 min em estufa a 40 °C e 30 min em dessecador.

Novamente, foram preparadas soluções de sacarose de 5-30% da quantidade de erva-mate (Tabela 4). A leitura em ATR-FTIR foi realizada antes e depois de adicionar a solução de sacarose, nas mesmas condições que o estudo anterior.

Tabela 4. Concentração de sacarose adicionada em cada amostra.

Amostras	% sacarose adicionada em 0,5g erva		
Todas		0	
1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15	5	15	25
2, 4, 6, 8, 10, 12, 14	10	20	30

Os pré-tratamentos e análise por componentes principais foram realizados no Software Chemostat^{®125} enquanto que, para as construções dos modelos de calibração foi utilizando o Matlab R2015a (MathWorks[®]) e pacote iToolbox. As amostras de erva-mate foram divididas entre calibração e predição pelo algoritmo Kennard-Stone.

Os modelos de calibração PLS desenvolvidos foram através dos métodos de seleção de variáveis iPLS e biPLS.

Neste estudo foram desenvolvidos modelos por iPLS de 1 a 10 divisões do espectro, onde selecionou-se o melhor intervalo de cada divisão de acordo com o menor número de VLs, menor RMSECV e maior R_{cal}^2 .

Para o método de seleção de variáveis, biPLS, o espectro foi dividido de 9 a 20 faixas espectrais equidistantes. Após a seleção dos modelos com menores RMSECV, foram analisados os intervalos remanescentes, número de VLs, RMSEC e RMSEP.

Por fim, comparou-se os dois melhores modelos obtidos por cada método de seleção de variável (iPLS e biPLS) através das figuras de mérito R_{cal}^2 , R_c^2 , R_p^2 , RMSECV, RMSEC e RMSEP.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 GRANULOMETRIA

A composição granulométrica da erva-mate beneficiada após a moagem está representada na Tabela 5, com a respectiva massa e composição centesimal para cada mesh.

Tabela 5. Composição granulométrica da erva-mate após cominuição em moinho criogênico.

Peneira	Mesh	Massa (g)	%
1	24	6,94	9,79
2	32	2,95	4,15
3	60	13,27	18,72
4	80	11,54	16,27
5	150	20,57	29,00
6	Fundo	15,64	22,05

Visto que a condição ideal de amostra para análise por ATR-FTIR é homogênea, a composição granulométrica pode justificar divergências entre espectros de uma mesma amostra. Logo, os diferentes tamanhos de partículas podem interferir em leituras no espectrometro até mesmo de uma mesma amostra e é por este motivo que buscou-se a pulverização em moinho criogênico.

Neste sentido, a Figura 12 demonstra esta dispersão de tamanho de partículas, mesmo realizando a cominuição por moinho criogênico.

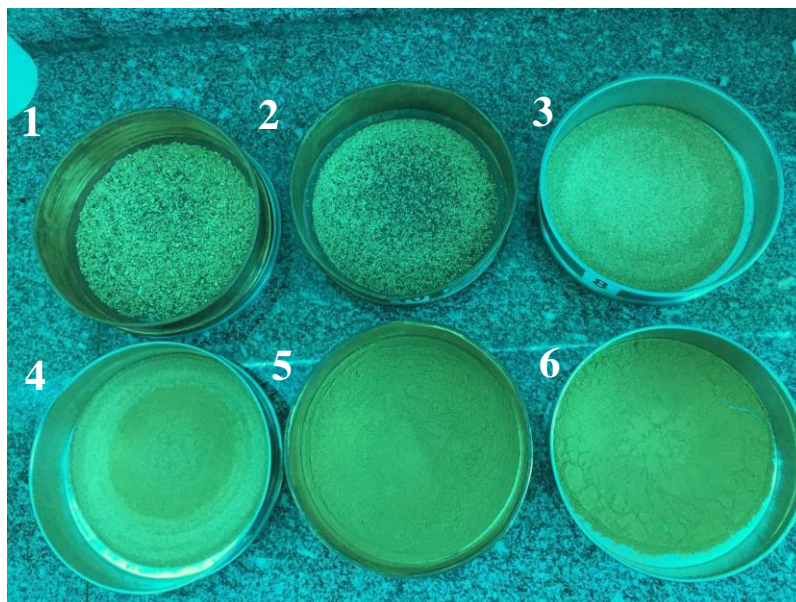


Figura 12. Composição granulométrica representativa da erva-mate após cominuição.

5.2 1º ESTUDO: Distinção entre diferentes formas de processamento da erva-mate

Na análise de HCA, foram observados a distinção dos seis grupos de amostras, conforme Figura 13.

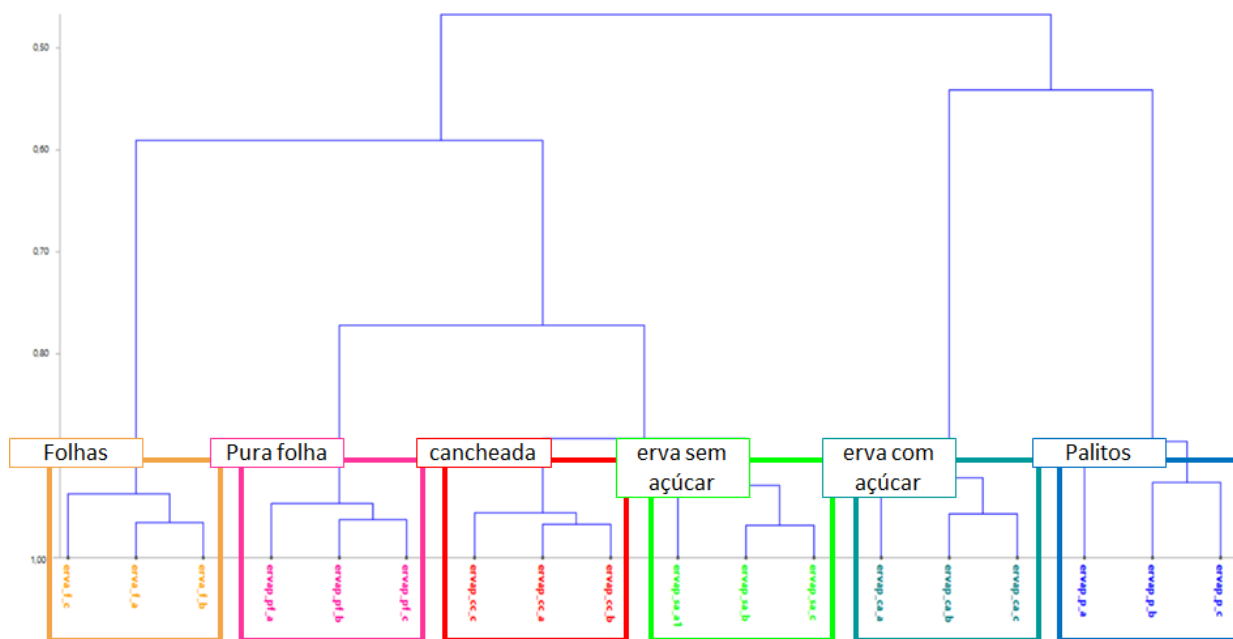


Figura 13. Dendrograma das amostras de erva-mate obtidas por diferentes processamentos analisadas por ATR-FTIR.

O mesmo comportamento foi observado no gráfico de escores da PC1xPC2 (Figura 14), representando 78,75% da variância total.

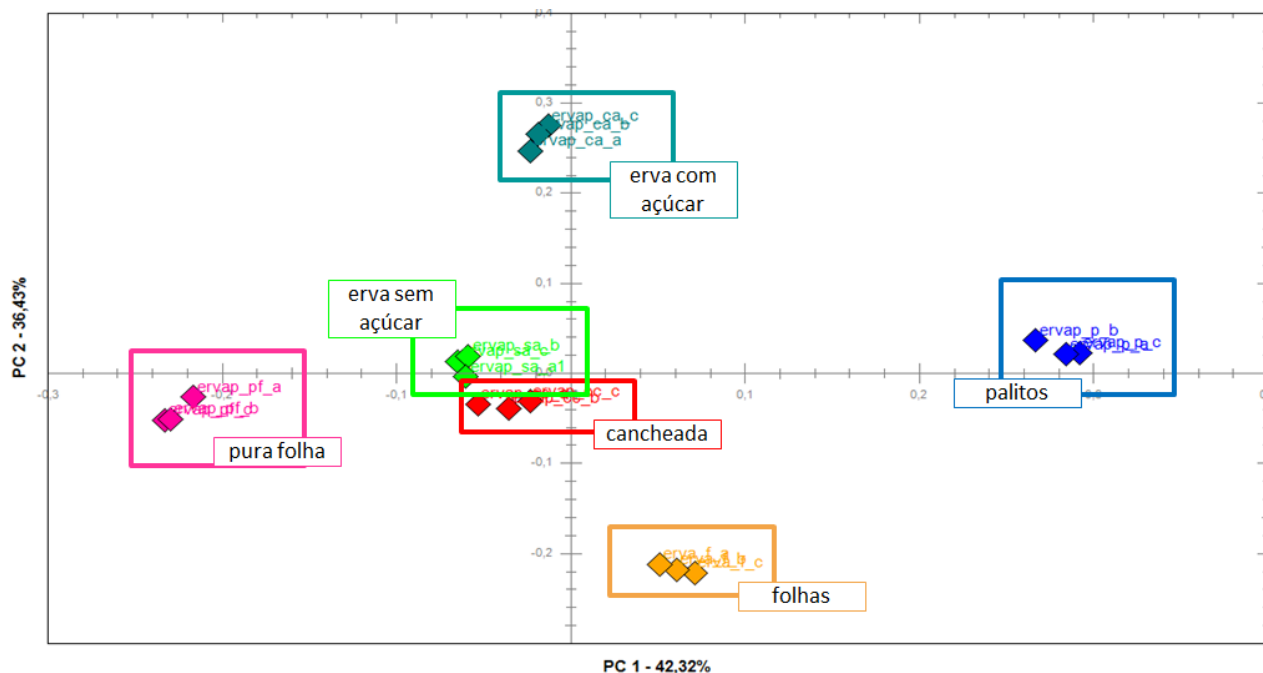


Figura 14. Gráfico de scores da PC1xPC2 das amostras de erva-mate analisadas por ATR-FTIR.

A PC1 (42,32% da variância total) foi a responsável pela distinção dos palitos de erva-mate, com escores positivos, e pura folha, com escores negativos. Já a PC2 (36,43% da variância total) separou a erva beneficiada com adição de açúcar, com escores positivos, das folhas de erva-mate, com escores negativos. As amostras de erva-mate cancheada e beneficiada sem a adição de açúcar localizaram-se próximas devido a maior semelhança química entre estes produtos.

Este estudo preliminar apontou para o potencial uso do ATR-FTIR para avaliar produtos de erva-mate, inclusive distinguindo erva-mate com adição de açúcar dos outros produtos sem adição de açúcar.

5.3 2º ESTUDO: Avaliação das possíveis formas de adulteração da erva-mate com açúcar

Foi selecionada a faixa de 700-1800 cm^{-1} (região da impressão digital) e aplicado os pré-tratamentos de normalização (1-0) e SNV.

Apesar do HCA (Figura 15) ter reunido as replicatas das amostras, a similaridade entre os agrupamentos, de forma geral, não foi conclusiva. De acordo com a Figura 16, o gráfico de escores PC2xPC3 apresentou os melhores resultados, os quais representaram 13,06% da variância total. PC3 foi a responsável por separar as amostras de sacarose, em escores positivos, das misturas de glicose/frutose, em escores negativos.

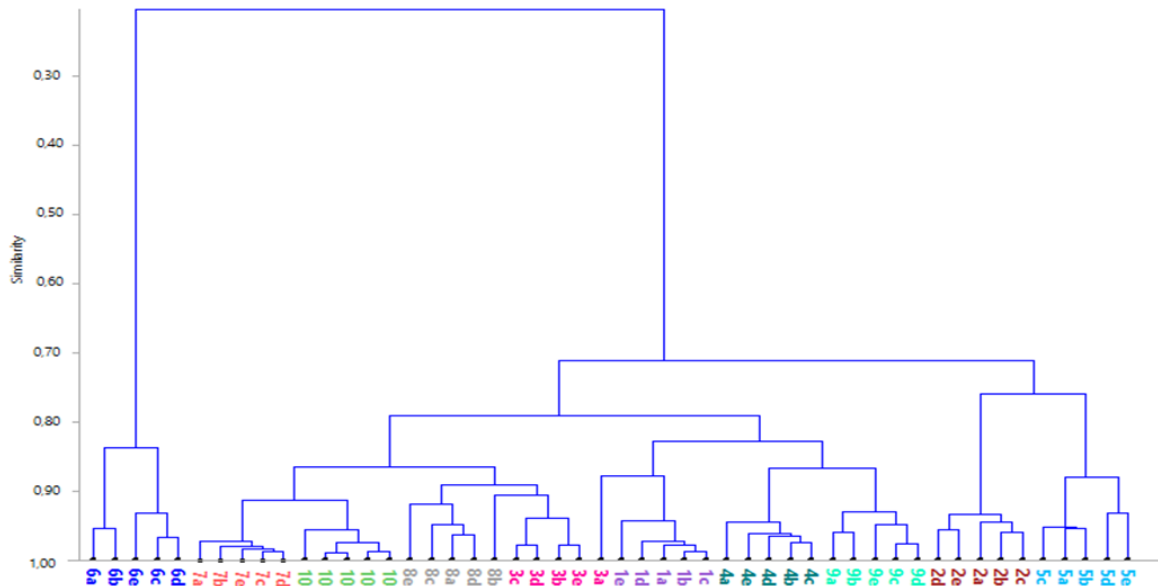


Figura 15. Dendrograma das 10 amostras e suas replicatas analisadas por ATR-FTIR.

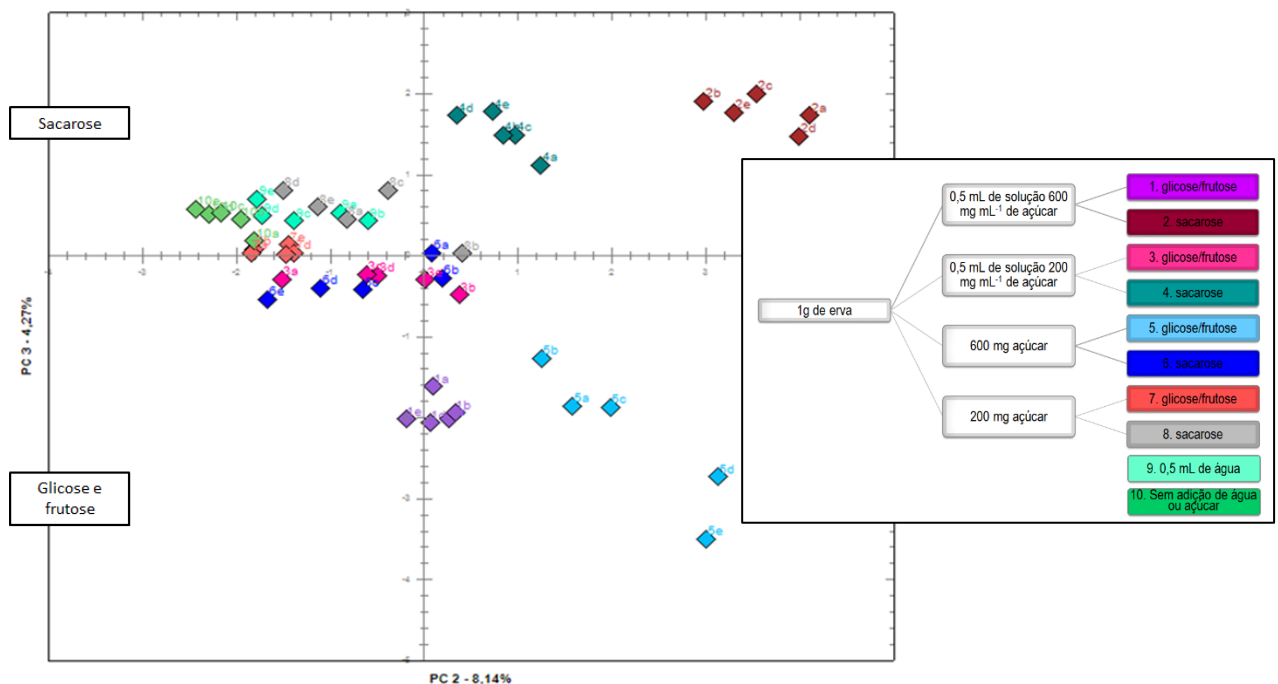


Figura 16. Gráfico de escores PC2xPC3 das 10 amostras e suas replicatas analisadas por ATR-FTIR.

Observando os pesos da PC3 na Figura 17, foi possível determinar que as bandas positivas são correspondentes à região de impressão digital da sacarose (900-1000 cm^{-1}) enquanto que de 1000 a 1100 cm^{-1} os pesos negativos são correspondentes à glicose e frutose. Na PC2 (Figura 18), destaca-se que os pesos negativos na região de 1600 cm^{-1} , os quais estão de acordo com o espectro da erva-mate.

Neste sentido, as amostras de erva-mate bruta (sem adição de açúcares e água), de erva mate secas com adição de água e as duas amostras de erva-mate com 200 mg de sacarose e 200 mg de glicose/frutose 1:1 estão localizadas próximas.

Observou-se, neste estudo, a dificuldade de análise de amostras com adição de sacarose em forma de cristal uma vez que estas não estavam presentes de forma homogênea na amostra. Além disso, esta forma de adição é visualmente detectada e por isso acredita-se que a adulteração seja realizada adicionando sacarose em solução.

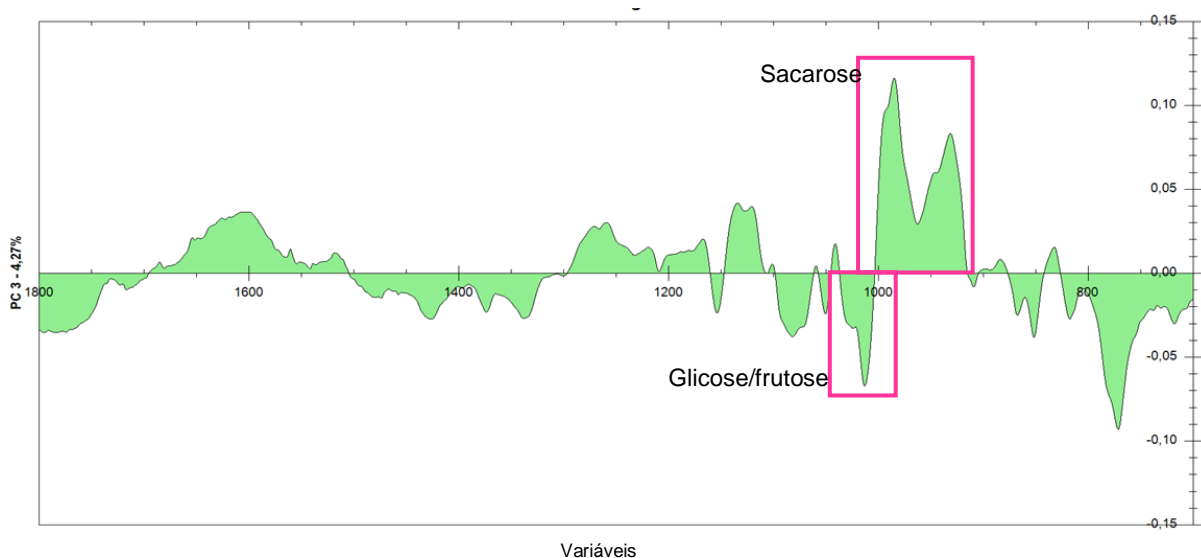


Figura 17. Gráfico de pesos da PC3 correspondente às 10 amostras e suas replicatas analisadas por ATR-FTIR.

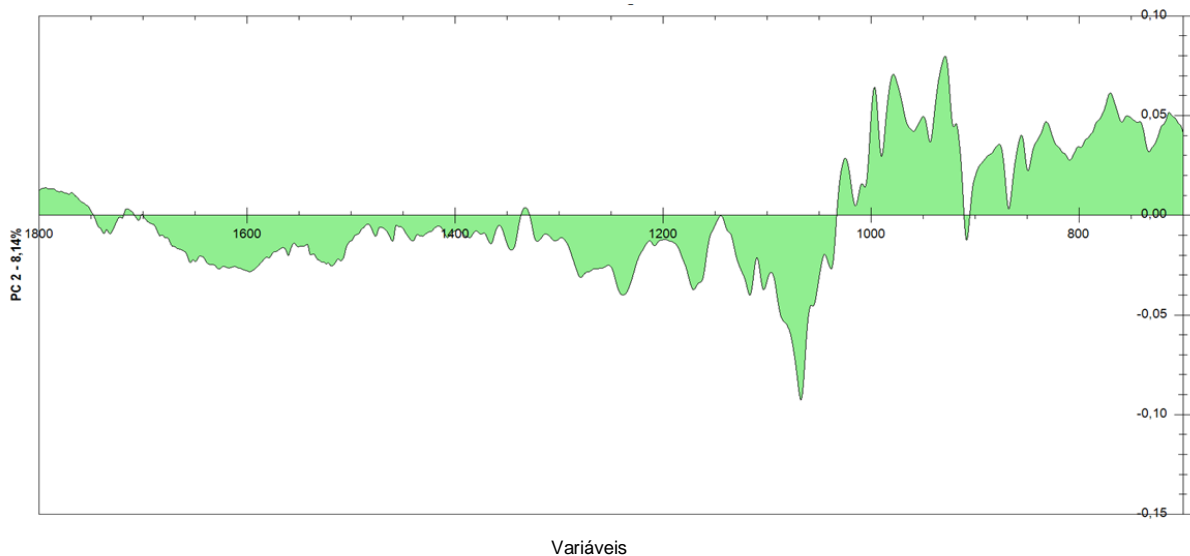


Figura 18. Gráfico de pesos da PC2 correspondente às 10 amostras e suas replicatas analisadas por ATR-FTIR.

5.4 3º ESTUDO: Concentrações de sacarose adicionadas à erva-mate por regressão multivariada

A região de impressão digital foi extraída, 1800-800 cm^{-1} , com o objetivo de evitar interferência da umidade. Os pré-tratamentos aplicados aos dados espectrais foram suavização (Savitzky Golay, polinômio de segunda ordem, tamanho de janela de 13 pontos), normalização (1-0), SNV, 1ª derivada (tamanho de janela de 13 pontos) e por último, foi calculada a média das triplicatas.

5.4.1 HCA e PCA

Distância euclidiana e método do vizinho mais distante foram utilizadas para HCA e o PCA foi centrado na média.

A faixa utilizada do espectro após os pré-tratamentos está ilustrada na Figura 19.

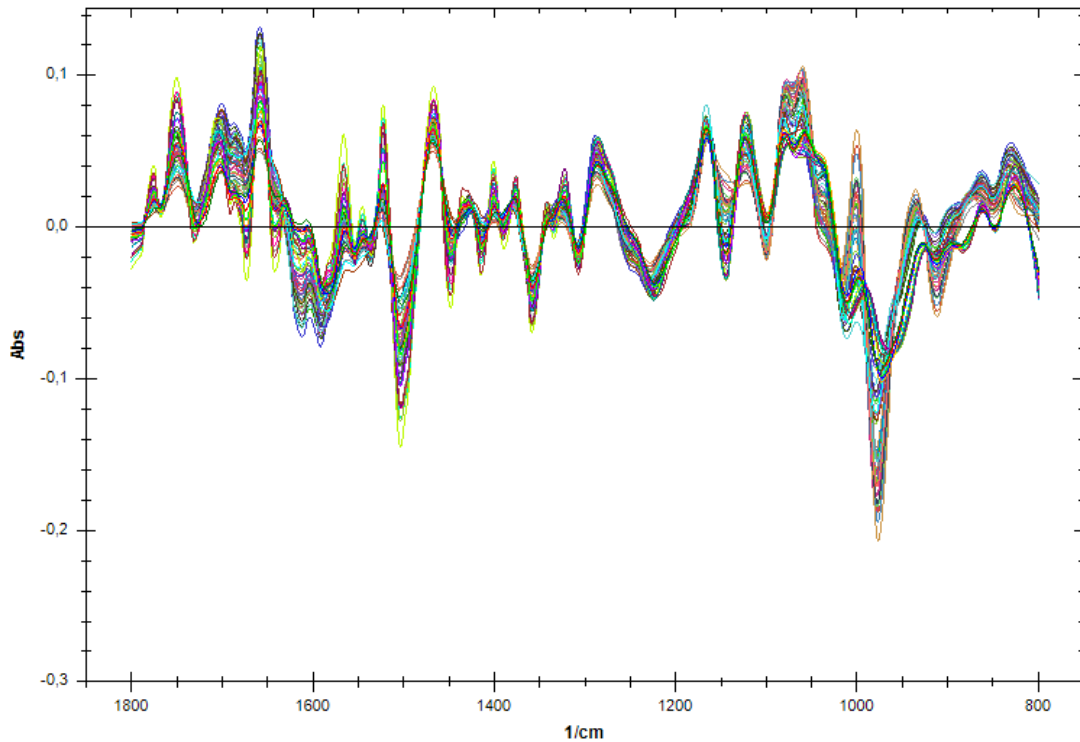


Figura 19. Faixa do espectro utilizada para a análise multivariada, após suavização, normalização, SNV, primeira derivada e média das triplicatas.

O dendrograma resultante da HCA está ilustrado na Figura 20. As amostras sem adição de açúcar estão claramente agrupadas e subdivididas entre as amostras de 1-6 e 7-15, provavelmente devido aos diferentes dias de colheita, logo, podem indicar mudanças sazonais na composição química. Mesmo que os outros dois agrupamentos não tiveram excelentes distinções entre as concentrações de açúcar adicionadas à cada erva-mate, pode-se observar que as amostras de maior concentração de sacarose (25-30%) localizaram-se mais próximas, enquanto que o terceiro grupo reuniu as amostras de menor concentração, 05-20% de sacarose.

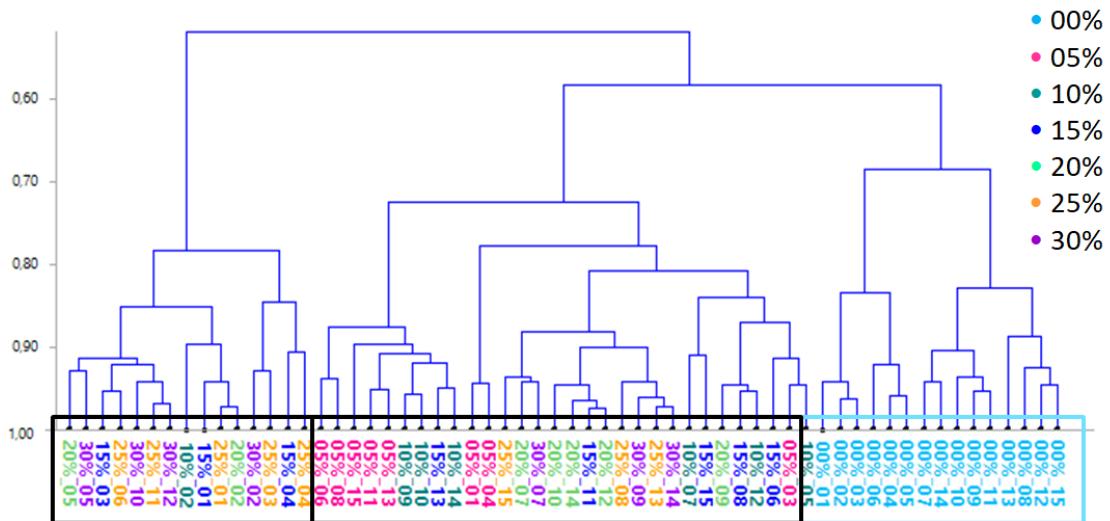


Figura 20. Dendrograma da HCA das amostras de erva-mate com adição de 00-30% de sacarose, analisadas por ATR-FTIR.

O gráfico de escores da PC1 X PC2 X PC3 para as amostras de erva-mate estão na Figura 21. Apesar da interface entre as amostras estar sobreposta, ainda é visível um gradiente de concentração de sacarose. Além disso, há uma clara distinção entre as amostras sem adição de sacarose para as adulteradas.

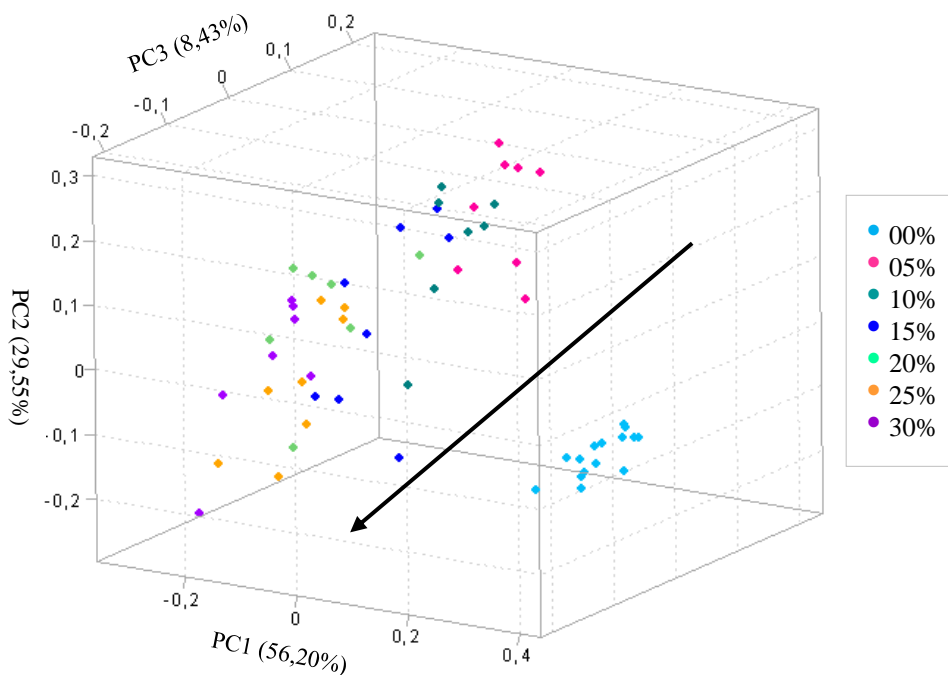


Figura 21. Gráfico de escores das três primeiras componentes principais, PC1 x PC2 x PC3, das amostras de erva-mate com adição de 00-30% de sacarose, analisadas por ATR-FTIR.

A primeira componente, representativa de 56,20% da variância total, foi a responsável por separar as amostras de sacarose das amostras de erva-mate sem sacarose. Os escores positivos são principalmente amostras de erva-mate sem adição de açúcar e, ainda dentro deste conjunto, há a divisão das amostras entre os dois dias de colheita, o que está de acordo com o dendrograma da HCA.

O gráfico de pesos da PC1 está ilustrado na Figura 22. Neste gráfico, destaca-se a região em 1000 cm^{-1} , representativa do estiramento da ligação C-O de moléculas de açúcar^{76, 126}. Neste sentido, as bandas positiva e negativa destacadas estão em conformidade com os escores negativos das amostras contendo sacarose.

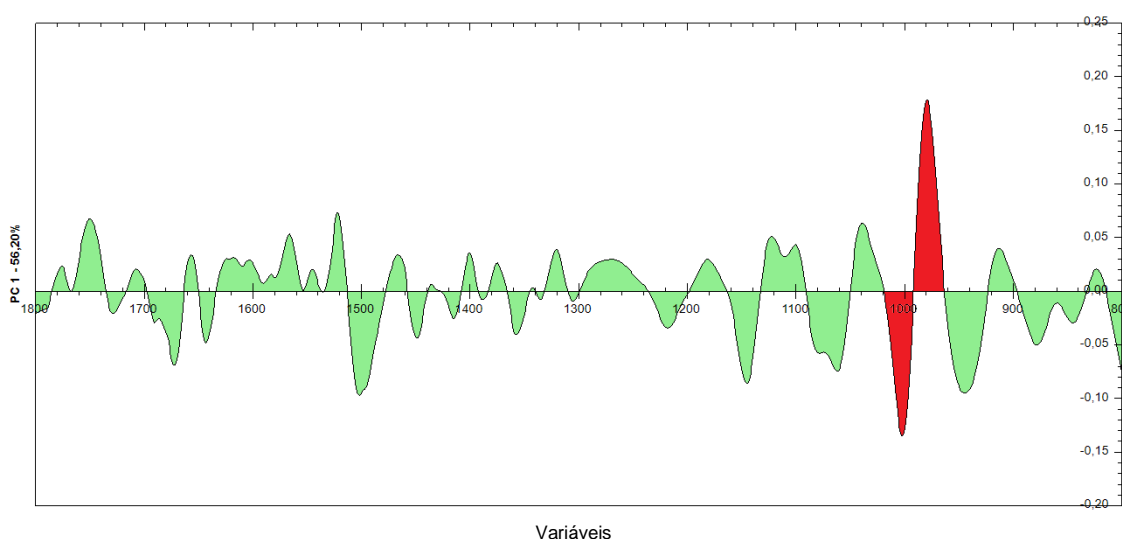


Figura 22. Gráfico de pesos da PC1 das amostras de erva-mate com adição de 00-30% de sacarose, analisadas por ATR-FTIR.

Os estiramentos de C-O mencionados nesta região são típicos para amostras sacarídeas¹¹⁶. Ao analisar mel por ATR-FTIR, Kasprzyk, I. e colaboradores¹²⁷ também observaram que os valores de maior absorvância para as vibrações de C-O e C-C foram nesta mesma região, $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. Também analisando méis através da ATR-FTIR, Svečnjak, L.¹²⁸ encontraram a absorvância máxima em 1026 cm^{-1} , correspondendo a frutose e glicose.

Por sua vez, a PC2 (29,55% da variância total) foi a principal responsável por separar as amostras de erva-mate das menores para as mais altas concentrações de sacarose. As menores concentrações de sacarose estão localizadas nos escores positivos enquanto que as maiores concentrações, nos negativos.

No mesmo sentido, a PC3 também demonstrou uma tendência em agregar as amostras de 20 a 30% de sacarose nos escores negativos.

Em contraste com outros estudos^{90, 91, 93}, não foram encontradas similaridades entre as amostras de acordo com a sua área de cultivo, pois provavelmente elas não se encontram distantes suficientes para demonstrar diferenças regionais em sua composição.

5.4.2 Regressão por iPLS

Os resultados dos modelos iPLS construídos por validação cruzada *leave-one-out* para a predição da concentração de sacarose em erva-mate estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados dos modelos de iPLS, de 1 a 10 intervalos, para predição da concentração de sacarose em erva-mate.

Número de intervalos	Intervalo selecionado	Faixa espectral (cm ⁻¹)	VLs	R _{cal} ²	RMSECV (% g/g)	RMSEC (% g/g)	RMSEP (% g/g)
1	1	1800-800	5	0,9597	3,09	2,42	2,97
2	2	1299-800	5	0,9538	3,06	2,42	2,97
3	2	1465-1333	7	0,9556	3,00	2,17	2,32
4	3	1297-1049	5	0,9555	3,01	2,46	2,60
5	4	1197-999	5	0,9571	2,95	2,36	2,78
6	4	1297-1131	7	0,9579	2,92	2,35	2,57
7	6	1083-941	9	0,9600	2,87	2,00	2,75
8	7	1047-924	7	0,9570	2,95	2,21	2,85
9	6	1241-1131	7	0,9594	2,87	2,35	2,54
10	7	1197-1098	6	0,9601	2,84	2,38	2,34

O modelo apresentando as melhores figuras de mérito foi o contendo 10 intervalos, uma vez que apresenta o maior coeficiente de determinação (0,9601), menor erro de calibração cruzada (RMSECV) e os erros de predição (RMSEP) e calibração (RMSEC) semelhantes.

A Figura 23 apresenta o melhor intervalo quando o espectro foi dividido em 10 regiões. A linha tracejada representa o RMSECV para o modelo global, com 7 VLs, e as barras, o RMSECV para cada intervalo. O intervalo 7 (1197-1098 cm⁻¹) apresentou o menor erro.

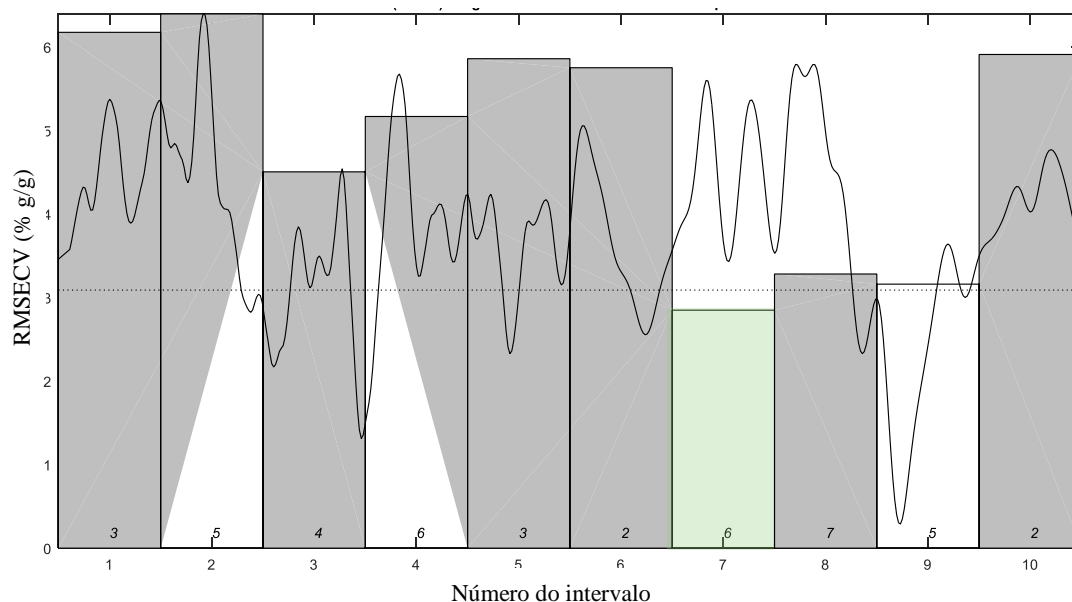


Figura 23. Espectro com 10 divisões, destacando-se o intervalo com menor RMSECV. A linha pontilhada é o RMSECV (7VLs) para modelo global. Os números *italicos* são as VLs ótimas para cada modelo de cada intervalo.

A seleção de 6 variáveis latentes (VLs) justifica-se pela Figura 24, onde não ocorre diminuição do RMSECV ao aumentar o número de variáveis.

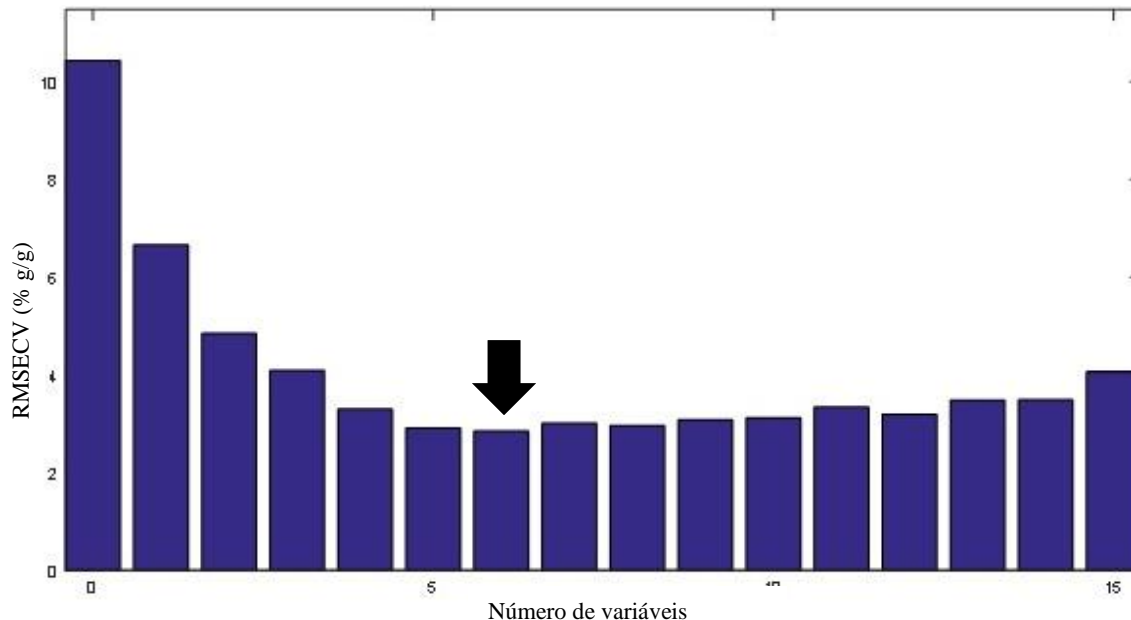


Figura 24. Gráfico dos valores de RMSECV por número de variáveis latentes utilizadas pelo ATR-FTIR/iPLS para determinação da concentração de sacarose em erva-mate.

O intervalo número 7 destacado na Figura 25 corresponde à região espectral representativa de glicose e frutose, conforme bandas nesta mesma região ($1197-1098\text{ cm}^{-1}$) na Figura 26.

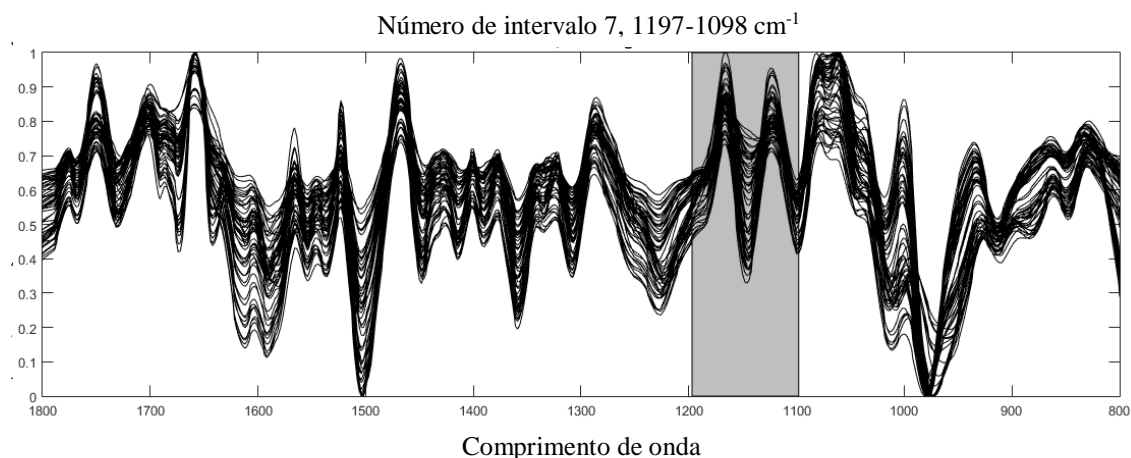


Figura 25. Espectro obtido por ATR-FTIR com destaque para a região selecionada por iPLS entre 10 intervalos: 1197-1098 cm⁻¹.

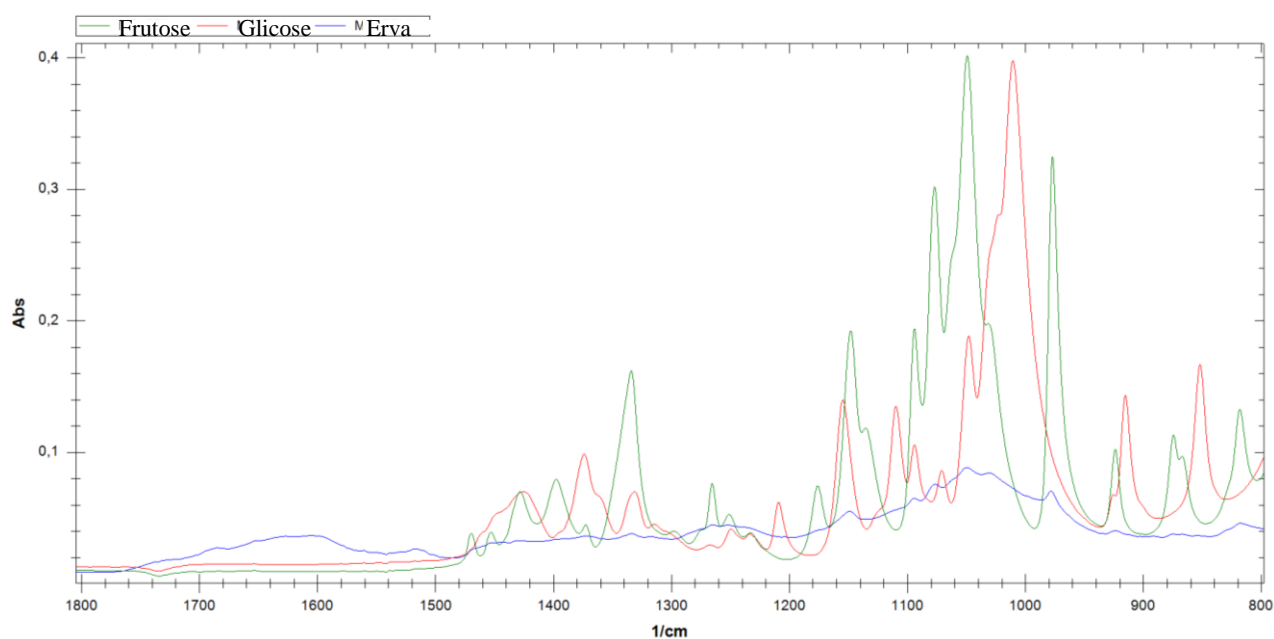


Figura 26. Sobreposição dos espectros de frutose (verde), glicose (vermelho) e erva-mate (azul), de 1800-800 cm⁻¹.

Em comparação ao gráfico do modelo global (Figura 28), a Figura 27 ilustra o gráfico de correlação dos valores de referência obtidos pela pesagem em balança analítica, com os valores obtidos pelo melhor modelo de regressão através de FTIR/iPLS. Pouco discrepantes, os valores de RMSECV e RMSEP em conjunto com o coeficiente de determinação do modelo de número de intervalo 7 são mais satisfatórios quando comparados ao modelo global. Portanto, é possível determinar a concentração de sacarose para a maioria das amostras de erva-mate com desempenho aceitável na faixa espectral 1197-1098 cm⁻¹.

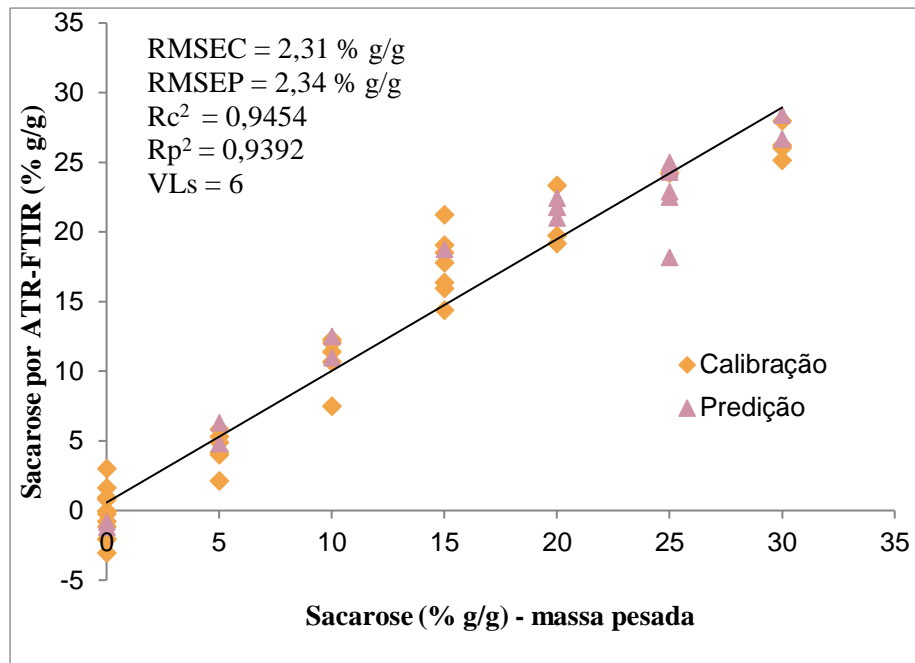


Figura 27. Gráfico dos valores de referência versus valores previstos por ATR-FTIR/iPLS, com 10 intervalos e selecionado número 7, para determinação da concentração de sacarose em erva-mate.

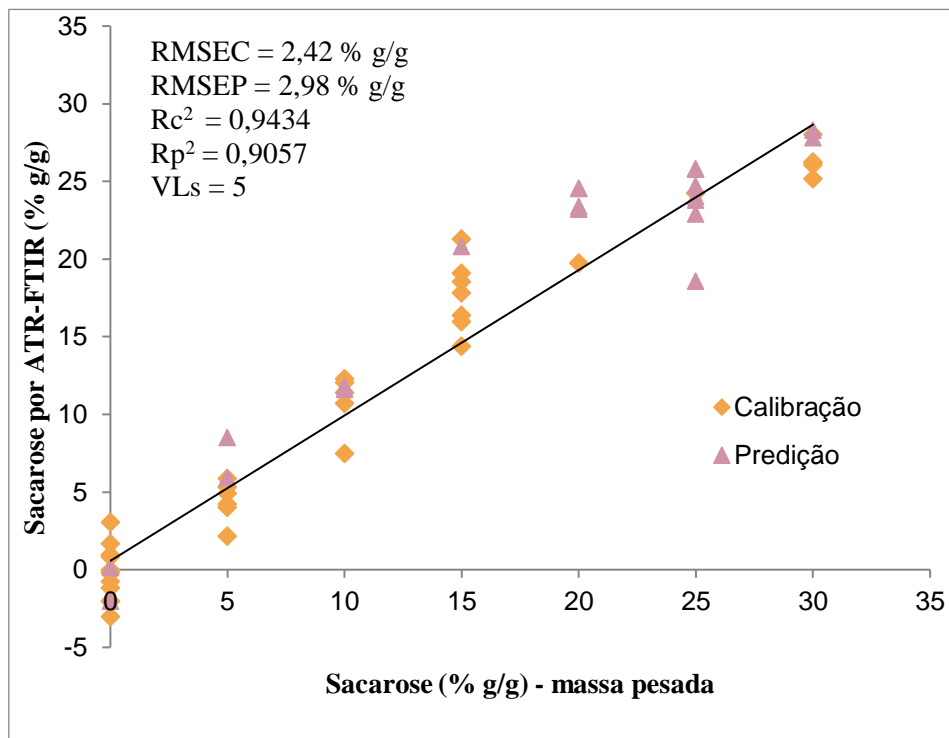


Figura 28. Gráfico dos valores de referência versus valores previstos por ATR-FTIR/iPLS, modelo global, para determinação da concentração de sacarose em erva-mate.

5.5 4º ESTUDO: Concentrações de sacarose adicionadas à erva-mate por regressão multivariada

O tempo necessário para vaporizar a água da solução de sacarose adicionada à erva-mate totalizou 3 h: 1h em estufa a 40 °C, 1 h em dessecador, 30 min em estufa a 40 °C e 30 min em dessecador.

5.5.1 PCA

Os mesmos pré-tratamentos foram aplicados a este novo conjunto de dados: suavização (Satzky Golay, polinômio de segunda ordem, tamanho de janela de 13 pontos), normalização (1-0), SNV, 1ª derivada (tamanho de janela de 13 pontos) e média das triplicatas.

As amostras 3, com 15% e 25% de sacarose, 11, 12 e 13, com 00% de sacarose, foram consideradas como outliers conforme gráfico Hotelling T² para PC1xPC2.

A faixa do espectro (1800-800cm⁻¹) utilizada para PCA e PLS, após exclusão dos outliers e aplicação dos pré-tratamentos, está ilustrada na Figura 29.

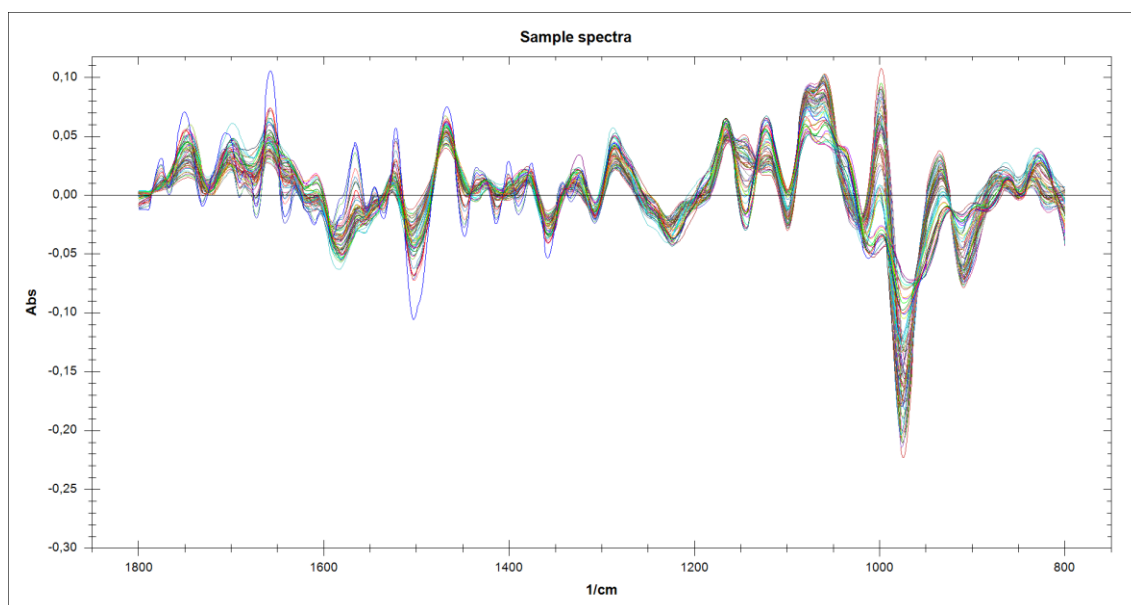


Figura 29. Faixa do espectro utilizada para a análise multivariada, após suavização, normalização, SNV, primeira derivada e média das triplicatas.

A Figura 30 apresenta o gráfico de escores da PC1 x PC2 x PC3, totalizando 94,74% da variância total. De forma similar ao estudo anterior, as amostras foram ordenadas no gráfico de acordo com a concentração de sacarose adicionada.

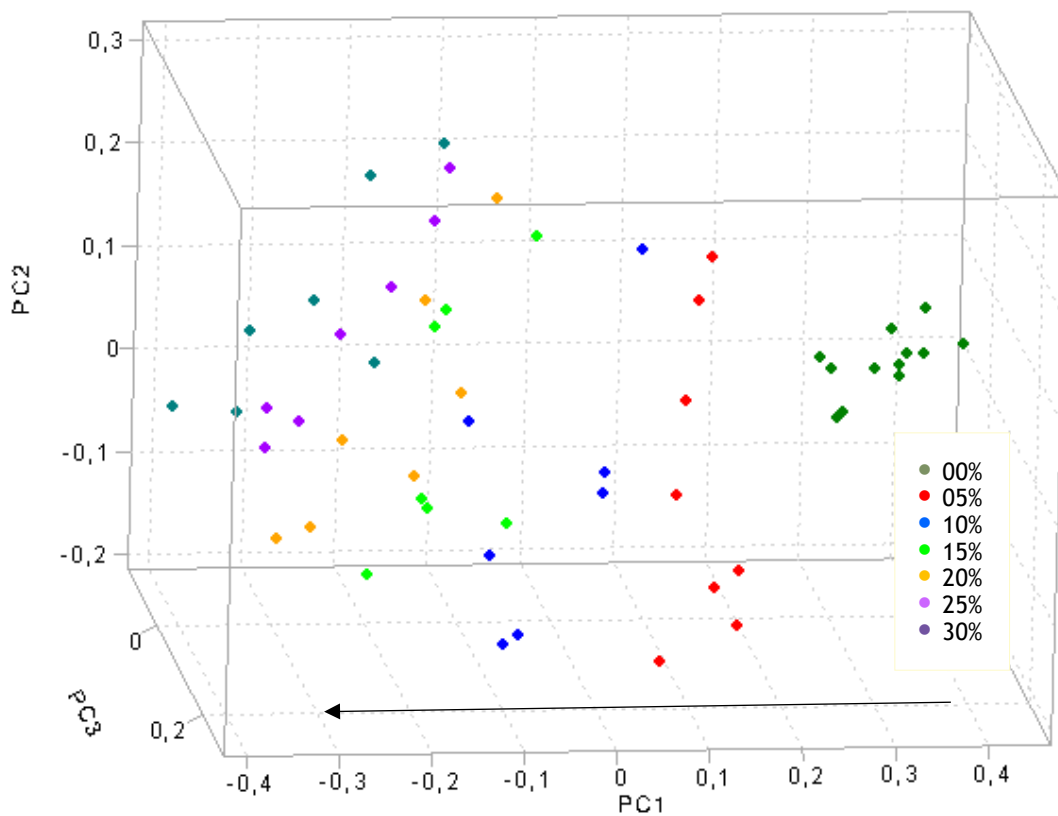


Figura 30. Gráfico de escores das três primeiras componentes principais, PC1 x PC2 x PC3, das amostras de erva-mate com adição de 00-30% de sacarose, analisadas por ATR-FTIR. Seta indica aumento da concentração de sacarose adicionada às amostras.

No eixo da PC1, os escores positivos representam as amostras de erva-mate sem adição de sacarose, com adição de 5% de sacarose e uma parte das amostras com adição de 10%. Logo, as amostras de maior concentração ficaram localizadas negativamente nesta componente principal. Sendo a principal responsável pela separação das amostras conforme suas concentrações de sacarose, o gráfico de pesos da PC1 (Figura 31) ilustra justamente as bandas do estiramento da ligação C-O, na região de 1000 cm^{-1} , representativa de moléculas de açúcar (glicose e frutose).

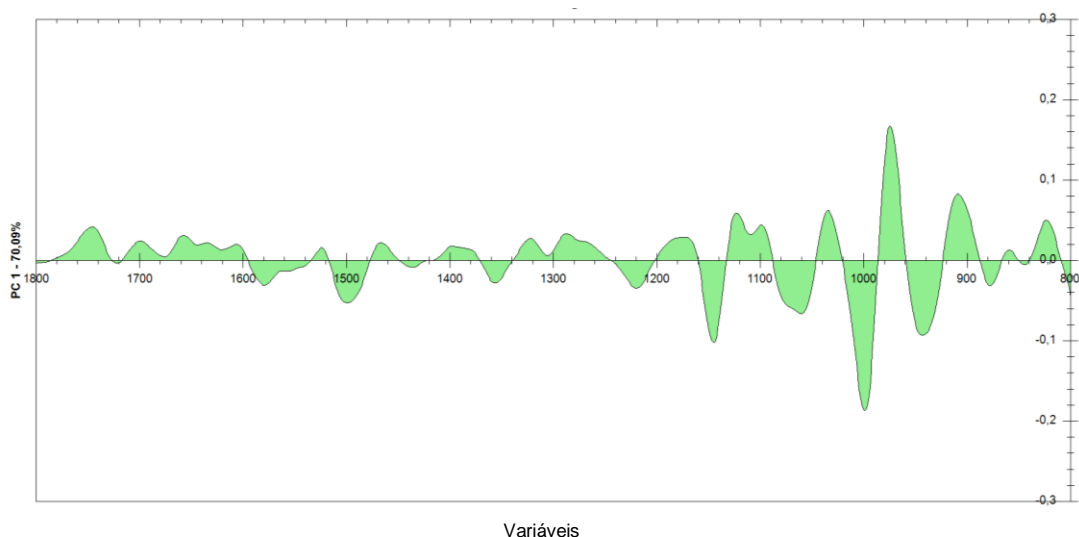


Figura 31. Gráfico de pesos da PC1 das amostras de erva-mate com adição de 00-30% de sacarose, analisadas por ATR-FTIR.

Em contraste com o estudo anterior, não se observou a separação das amostras conforme a temporada de colheita (verão ou inverno).

5.5.2 iPLS e biPLS

Primeiramente, repetiu-se o método iPLS e os resultados dos modelos construídos para a predição da concentração de sacarose em erva-mate estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados dos modelos de iPLS, de 1 a 10 intervalos, para predição da concentração de sacarose em erva-mate.

Número de intervalos	Intervalo selecionado	Faixa espectral (cm ⁻¹)	VLs	R _{cal} ²	RMSECV (% g/g)	RMSEC (% g/g)	RMSEP (% g/g)
1	1	1800-800	5	0,9798	2,14	1,59	2,37
2	2	1299-800	4	0,9793	2,16	1,74	3,12
3	3	1131-800	4	0,9800	2,12	1,73	3,08
4	4	1047-800	4	0,9803	2,11	1,74	2,33
5	5	997-800	3	0,9797	2,14	1,89	3,10
6	6	964-800	3	0,9762	2,31	2,00	3,39
7	7	939-800	4	0,9771	2,27	1,80	2,99

8	6	1172-1049	7	0,9753	2,37	1,84	2,91
9	8	1018-909	6	0,9821	2,01	1,57	2,97
10	9	995-898	6	0,9819	2,02	1,61	3,25

Entre os modelos desenvolvidos por iPLS, o melhor foi o destacado na Tabela 7, o quarto intervalo entre 4 divisões do espectro. Uma vez que o R_{cal}^2 gerado foi muito próximo para todos os intervalos selecionados, a indicação desta faixa espectral baseia-se no menor número de VLs em conjunto com os menores erros encontrados.

O quarto intervalo, como já mencionado, foi o que apresentou menor valor de RMSECV para a divisão do espectro em 4 intervalos, conforme gráfico na Figura 32.

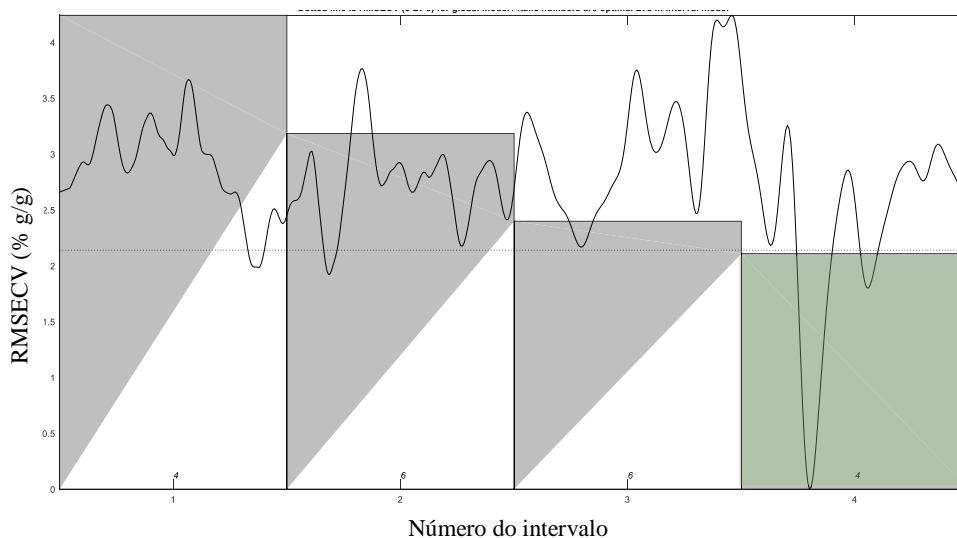


Figura 32. Espectro com 4 divisões, destacando-se o intervalo com menor RMSECV. A linha pontilhada é o RMSECV (5VLs) para modelo global. Os números *1, 2, 3 e 4* são as VLs ótimas para cada modelo de cada intervalo.

A Figura 33 apresenta o gráfico utilizado para a escolha do número de variáveis latentes. Para o quarto intervalo, o número de variáveis latentes ideal foi 4.

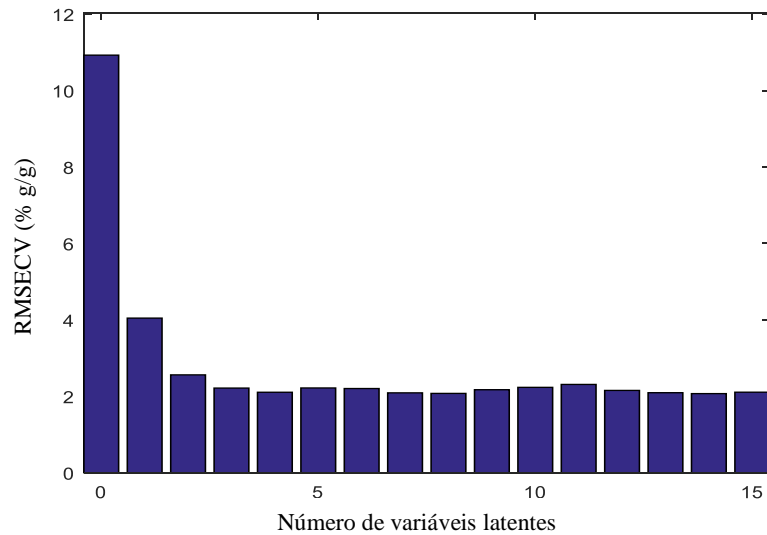


Figura 33. Gráfico dos valores de RMSECV por número de variáveis latentes utilizadas pelo ATR-FTIR/iPLS para determinação da concentração de sacarose em erva-mate.

A faixa espectral selecionada ($1047\text{-}800\text{ cm}^{-1}$), destacada na Figura 34, corresponde às bandas de açúcares glicose e frutose. As bandas correspondentes à erva-mate, são bem menores nesta região, conforme Figura 26.

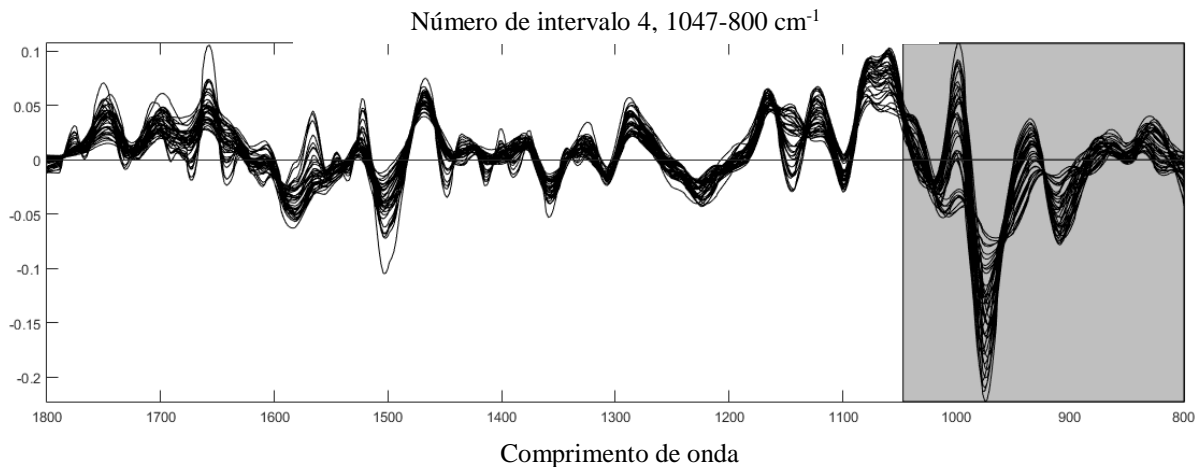


Figura 34. Espectro obtido por ATR-FTIR com destaque para a região selecionada por iPLS entre 4 intervalos: $1047\text{-}800\text{ cm}^{-1}$.

Para a construção do gráfico da Figura 35, foi excluída uma amostra representativa de 10% de sacarose. Apesar dos erros e coeficientes de determinação serem similares para o modelo global e o modelo iPLS selecionado, com 4 intervalos, este último apresenta menor número de variáveis latentes. Neste sentido, o modelo iPLS utilizando a faixa espectral de $1047\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ demonstrou-se mais robusto.

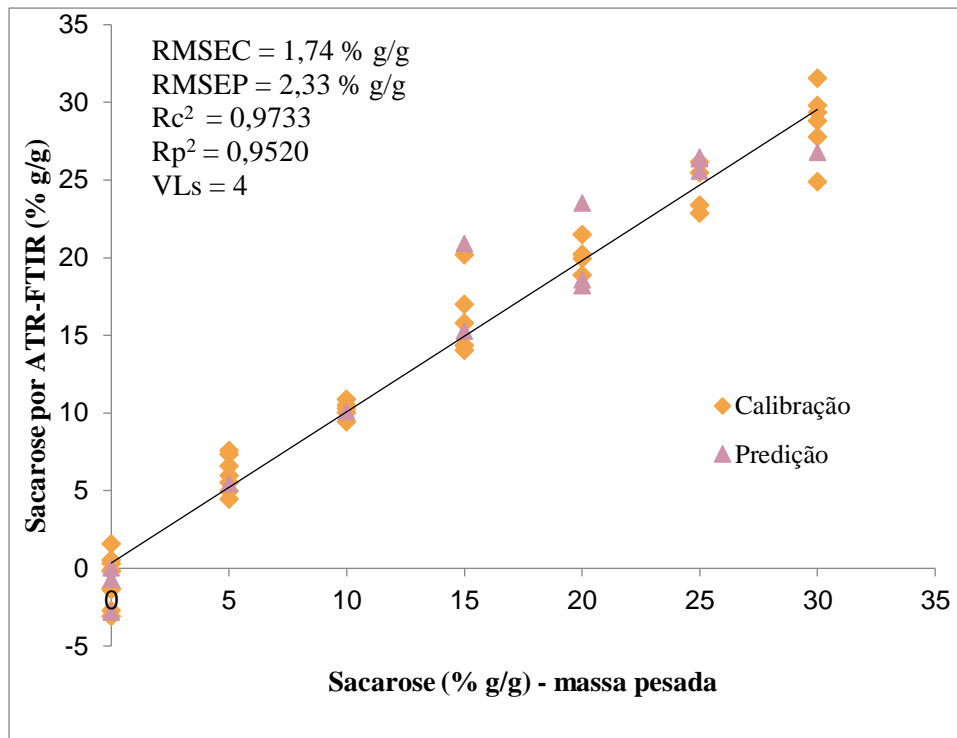


Figura 35. Gráfico dos valores de referência *versus* valores previstos por ATR-FTIR/iPLS, com 4 intervalos e selecionado número 4, para determinação da concentração de sacarose em erva-mate.

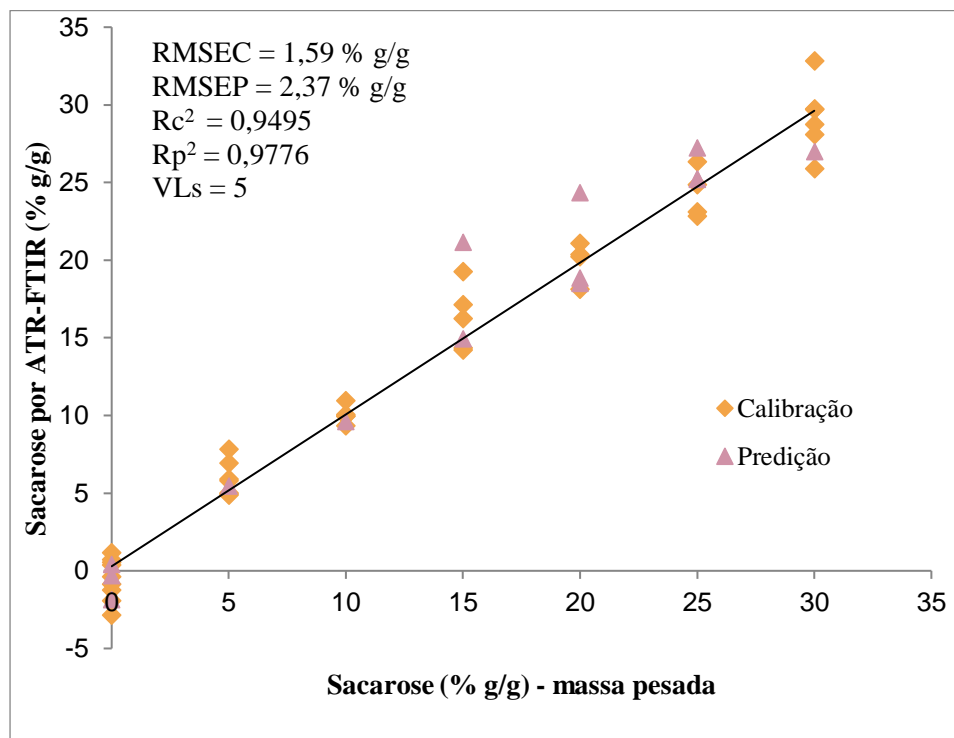


Figura 36. Gráfico dos valores de referência *versus* valores previstos por ATR-FTIR/iPLS, modelo global, para determinação da concentração de sacarose em erva-mate.

Foram analisados os erros de calibração cruzada (RMSECV) para os espectros de 9 a 20 intervalos. Entre os que apresentaram menor RMSECV, foi selecionado o melhor modelo pelo número de variável latente, RMSEC e RMSEP. A Tabela 8 apresenta os resultados de menor RMSECV.

Tabela 8. Resultados dos modelos de biPLS para predição da concentração de sacarose em erva-mate, após prévia seleção dos melhores modelos com menor RMSECV.

Número de intervalos	RMSECV (% g/g)	VLs	RMSEC (% g/g)	RMSEP (% g/g)	Intervalos selecionados
11	1,78	5	1,39	2,94	7 e 10
12	1,78	8	1,81	2,57	2, 6 e 11
13	1,81	6	1,25	3,02	1, 2, 6, 7, 8 e 12
14	1,77	7	1,45	2,81	2, 7, 9 e 13
15	1,61	8	1,20	2,90	6, 7 e 14
16	1,92	5	1,82	3,02	14
17	1,64	11	1,04	3,29	4, 5 e 15
18	1,54	8	1,10	3,09	3, 9, 11 e 16
19	1,57	9	1,09	2,97	3, 9 e 17
20	1,65	8	1,15	2,27	5, 6, 10 e 18

O melhor conjunto de resultados apresentado foi o com 20 intervalos, sendo os selecionados números 5, 6, 10 e 18. A faixa espectral para cada um destes foi, respectivamente: 1605-1554, 1554-1504, 1353-1303 e 950-900 cm^{-1} .

Ao observar a Figura 26, pode-se concluir que os intervalos 5 e 6 correspondem a bandas pertinentes à erva-mate, enquanto que os intervalos 10 e 18 correspondem a bandas de açúcar (glicose e frutose). Acredita-se que a sacarose, após a sua diluição em solução e posterior aquecimento em erva-mate para o fim de adulteração, já está convertida em glicose e frutose. Por isso, as bandas na região de impressão digital são atribuídas aos açúcares glicose e frutose.

Os erros de calibração, predição, R_c^2 , R_p^2 encontram-se no gráfico dos valores de referência *versus* valores previstos na Figura 37.

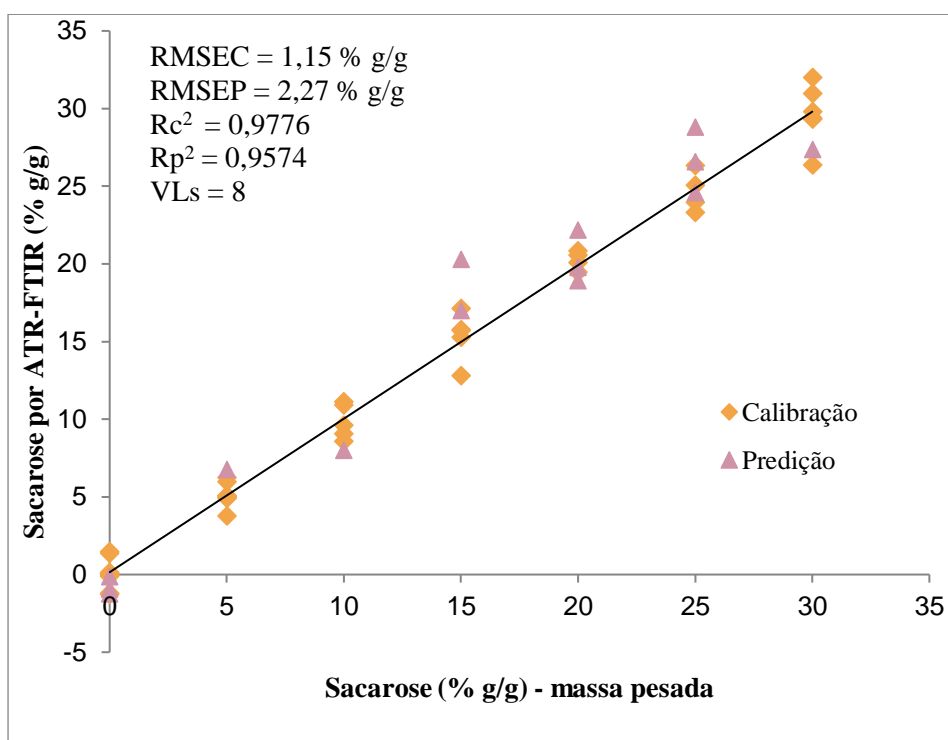


Figura 37. Gráfico dos valores de referência *versus* valores previstos por ATR-FTIR/biPLS para determinação da concentração de sacarose em erva-mate, com 20 intervalos, sendo os selecionados números 5, 6, 10 e 18.

A comparação entre os 2 métodos de seleção de variáveis e o modelo global está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Figuras de méritos dos modelos global, iPLS e biPLS.

Modelos	RMSECV (% g/g)	VLs	RMSEC (% g/g)	RMSEP (% g/g)	R_c^2	R_p^2
Global	2,14	5	1,59	2,37	0,9495	0,9776
iPLS	2,11	4	1,74	2,33	0,9733	0,9520
biPLS	1,65	8	1,15	2,27	0,9776	0,9574

Apesar do modelo biPLS apresentar menores RMSECV e RMSEC, o modelo iPLS utiliza a metade do número de variáveis latentes. Os coeficientes de correlação para os modelos biPLS e iPLS são similares, e portanto, o método iPLS possui resultados superiores ao biPLS, levando à obtenção de modelos mais robustos para a predição de concentração de sacarose em erva-mate.

6 CONCLUSÕES

Nos estudos preliminares, foi estabelecida a possibilidade de distinção entre amostras de erva-mate bruta de amostras com adição de sacarose em forma de cristal e em solução através das análises exploratórias HCA e PCA. Ainda por análise exploratória, foi possível distinguir concentrações de 0-30% de sacarose adicionadas à erva-mate.

Entre os modelos criados comparando as metodologias de seleção de variáveis, o que apresentou melhores resultados foi o iPLS, utilizando a região espectral $1047-800\text{ cm}^{-1}$ do espectro com 4 intervalos. Este apresentou coeficientes de determinação satisfatórios de 0,9733 e 0,9520 para a calibração e previsão, respectivamente.

Portanto, foi desenvolvido uma potencial metodologia para quantificação de sacarose em erva-mate, adicionada com o fim de adulteração. Contudo, para a efetiva implementação desta técnica por agências regulatórias, são necessárias análise com mais amostras de erva-mate, cobrindo uma maior região de produção, de formas de processamento e suas variedades. Além disso, também é desejável a análise de outros adulterante em conjunto com a sacarose para obter um modelo robusto de autenticação dos produtos de *Ilex paraguariensis*.

7 REFERÊNCIAS

1. Kennedy, S.; *Emerging Global Food System Risks and Potential Solutions*, in *Improving Import Food Safety*; John Wiley & Sons: 2012.
2. Mendes, R.M.O.; Quadri, M.B.; Quadry, M.G.N.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. **2007**, 2, 103.
3. ANVISA; RDC nº 277: Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis de 22 de setembro de 2005.
4. Diniz, P.H.G.D.; Gomes, A.A.; Pistonesi, M.F.; Band, B.S.F.; de Araújo, M.C.U.; *Food Anal. Method.* **2014**, 8, 1712.
5. Manning, L.; Soon, J.M.; *Food Policy*. **2014**, 49, 23.
6. Hong, E.; Lee, S.Y.; Jeong, J.Y.; Park, J.M.; Kim, B.H.; Kwon, K.; Chun, H.S.; *J. Sci. Food Agr.* **2017**, 12, 3877.
7. Rodriguez-Saona, L.E.; Allendorf, M.E.; *Annu Rev Food Sci Technol.* **2011**, 2, 467.
8. Reid, L.M.; O'Donnell, C.P.; Downey, G.; *Trends Food Sci. Tech.* **2006**, 7, 344.
9. Ordoudi, S.A.; Pascual, M. M.; Tsimidou, M.Z.; *Food Chem.* **2014**, 150, 414.
10. Ellis, D.I.; Brewster, V.L.; Dunn, W.B.; Allwood, J.W.; Golovanov, A.P.; Goodacre, R.; *Chem Soc Rev.* **2012**, 17, 5706.
11. Rodriguez-Saona, L.E.; Giusti, M.M.; Shotts, M.; *Advances in Infrared Spectroscopy for Food Authenticity Testing*, in *Advances in Food Authenticity Testing*. Woodhead Publishing: 2016.
12. Benaissa, M.; Mbaideen, A.; Ahmad Malik, B.; *Assay of Glucose Using Near Infrared (NIR) Spectroscopy*, in *Dietary Sugars: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. The Royal Society of Chemistry: 2012.
13. Guidetti, R.; Beghi, R.; Giovenzana, V.; *Chemometrics in Practical Applications*. Intech: 2012.
14. Bracesco, N.; Sanchez, A.G.; Contreras, V.; Menini, T.; Gugliucci, A.; *J. Ethnopharmacol.* **2011**, 3, 378.
15. Daniel, O.D.; *Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial*; Ed. da UFGD: 2009.
16. Holowaty, S.A.; Trela, V.; Thea, A.E.; Scipioni, G.P.; Schmalko, M.E.; *J. Food Process Eng.* **2016**, 1, 19.
17. Marcelo, M.C.A.; Martins, C.A.; Pozebon, D.; Ferrão, M.F.; *Anal. Methods.* **2014**, 19, 7621.
18. Brun, G.W.; Tese: Processo de produção de erva-mate descafeinada e de micro/nanopartículas de cafeína usando dióxido de carbono supercrítico. PUC-RS: 2012.
19. Anesini, C.; Turner, S.; Cogoi, L.; Filip, R.; *Food Sci. Tech.* **2012**, 2, 299.
20. FAOSTAT. *Food and Agricultural Organization (FAO) Statistics Division*. 2017.
21. Secretaria da Agricultura, Pecuária e irrigação do RS, *Guia da erva-mate*. 2017.
22. Isolabella, S.; Cogoi, L.; López, P.; Anesini, C.; Ferraro, G.; Filip, R.; *Food Chem.* **2010**, 3, 695.
23. Gerke, I.B.B.; Hamerski, F.; Scheer, A.P.; Silva, V.R.; *Food Bioprod. Process.* **2017**, 102, 204.
24. Heck, C.I.; de Mejia, E.G.; *J. Food Sci.* **2007**, 9, 138.
25. Bastos, D.H.M.; Beltrame, D.; Matsumoto, R.L.T.; Carvalho, P.; Ribeiro, M.; *Yerba mate: Pharmacological properties, research and biotechnology*; 2007.
26. de Lima, M.E.; Colpo, A.C.; Maya-López, M.; Rosa, H.; Túnez, I.; Galván-Arzate, S.; Santamaría, A.; Folmer, V.; *J. Funct. Food.* **2017**, 34, 447.
27. Parapugna, T.L.; Petroselli, G.; Erra-Basells, R.; Lagorio, M.G.; *Photoch. Photobio. Sci.* **2016**, 7, 879.
28. Mateos, R.; Baeza, G.; Sarriá, B.; Bravo, L.; *Food Chem.* **2018**, 232-241.

29. Colpo, A.C.; Rosa, H.; Lima, M.E.; Pazzini, C.E.F.; de Camargo, V.B.; Bassante, F.E.M.; Puntel, R.; Ávila, D.S.; Mendez, A.; Folmer, V.; *Food Chem.* **2016**, 185.
30. Dartora, N.; de Souza, L.M.; Santana-Filho, A.P.; Iacomini, M.; Valduga, A.T.; Gorin, P.A.J.; Sassaki, G.L.; *Food Chem.* **2011**, 4, 1453.
31. Braghini, F.; Carli, C.; Bonsaglia, B.; Santos, J.; Junior, S.; Oliveira, D.; Tramujas, J.; Tonial, I.; *Pesquisa Agropecuária Gaúcha.* **2014**, 7.
32. Moldoveanu, S.; Scott, W.; Zhu, J.; *J. Sep. Sci.* **2015**, 21, 3677.
33. Esmelindro, M.C.; Toniazzi, G.; Waczuk, A.; Dariva, C.; Oliveira, D.; *Food Sci Tech.* **2002**, 199.
34. Hansel, F.A.H.; *Moagem e sapeco/secagem em forno de microondas na classificação sensorial de erva-mate no infravermelho próximo*; Embrapa Florestas: 2008.
35. Perini, F.; Nitzke, J.A.; *Erva-mate, histórias, produtos e processamento*. [citado em 2017; <http://www.ufrgs.br/alimentus1/objetos/erva-mate/#/apresentacao.html>].
36. Spink, J.; Moyer, D.C.; *J Food Sci.* **2011**, 9, 157.
37. López, M.I.; Trullols, E.; Callao, M.P.; Ruisánchez, I.; *Food Chem.* **2014**, 177.
38. Spink, J.; Moyer, D.C.; *Food Tech.* **2013**, 1.
39. Capuano, E.; van Ruth, S.M.; *Fraud control for foods and other biomaterials by product fingerprinting*; InTech: 2012.
40. Accum, F.C.A.; *A treatise on adulterations of food, and culinary poisons*; 1820.
41. Everstine, K.; Spink, J.; Kennedy, S.; *J. Food Protect.* **2013**, 4, 723.
42. Johnson, R.; *Congressional Research Service* **2014**.
43. Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A.C.; Sbirrazzuoli, N.; Lizzani-Cuvelier, L.; *J Agric Food Chem.* **2002**, 7, 1751.
44. Pustjens, A.M.; Weesepeel, Y.; van Ruth, S.M.; *Innovation and Future Trends in Food Manufacturing and Supply Chain Technologies.* **2015**, 3.
45. Oliveri, P.; Downey, G.; *TrAC- Trend. Anal Chem.* **2012**, 74.
46. Luqing, L.; Lingdong, W.; Jingming, N.; Zhengzhu, Z.; *J Near Infrared Spec.* **2015**, 5, 317.
47. GIBERTI, G.C.; *Dominguezia.* **1989**, 1, 22.
48. Dallago, R.M.; Valduga, A.T.; Luccio, M.D.; Benin, S.; Tres, M.V.; *Ciência e Agrotecnologia.* **2011**, 1166.
49. Filip, R.; Lopez, P.; Coussio, J.; Ferraro, G.; *Phytother Res.* **1998**, 2, 129.
50. Reginatto, F.H.; Athayde, M.L.; Gosmann, G.; Schenkel, E.P.; *J. Brazil. Chem. Soc.* **1999**, 443.
51. Choi, Y.H.; Sertic, S.; Kim, H.K.; Wilson, E.G.; Michopoulos, F.; Lefeber, A.W.M.; Erkelens, C.; Prat Kricun, S.D.; Verpoorte, R.; *J. Agr. Food Chem.* **2005**, 4, 1237.
52. Kim, H.K.; Saifullah; Khan, S.; Wilson, E.G.; Kricun, S.D.P.; Meissner, A.; Goraler, S.; Deelder, A.M.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R.; *Phytochemistry.* **2010**, 7, 773.
53. Alexandre, T.C.T.; Eberhard, B.; Eloir, P.S.; *J. Brazil Chem Soc.* **2004**, 2.
54. Pires, V.S.; Guillaume, D.; Gosmann, G.; Schenkel, E.P.; *J Agric Food Chem.* **1997**, 4, 1027.
55. Gorzalczany, S.; Filip, R.; Alonso, M.R.; Miño, J.; Ferraro, G.E.; Acevedo, C.; *J ethnopharmacol.* **2001**, 2, 291.
56. Valduga, E.; Freitas, R.J.S.; Reissmann, C.B.; Nakashima, T.; *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos.* **1997**, 1.
57. ANVISA; Resolução RDC nº 303 de 07 de novembro de 2002.
58. Brasil. *Decreto N° 6.871, de 4 de JUNHO de 2009.* [http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm]

59. Jayawardhane S.A.D.P.S; Gunarathna, N.A.J.C.; Lakshman P.L.N; Jinendra B.M.; Perera G.A.A.R.; Mewan K.M.; Weerakoon N.C.; Fernando M.S.C.; *6th Symposium on Plantation Crop Research*; **2016**, 6.
60. Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E.; Castillo, M., *Advanced Analysis of Carbohydrates in Foods*, in *Methods of Analysis of Food Components and Additives*. CRC Press: 2011.
61. Peris, M.; *Sucrose: Properties and Determination*, in *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press: 2016.
62. Pauli, E.D.; Cristiano, V.; Nixdorf, S.L.; *Quim Nova*. **2011**, 689.
63. Galant, A.L.; Kaufman, R.C.; Wilson, J.D.; *Food Chem*. **2015**, 149.
64. Moreira, L.M.; Lyon, J.P.; Lima, P.; Santos, V.J.S.V.; Santos, F.V.; *Sucrose Chemistry*, in *Dietary Sugars: Chemistry, Analysis, Function and Effects*. The Royal Society of Chemistry: 2012.
65. Cozzolino, D.; *Near Infrared Spectroscopy and Food Authenticity*, in *Advances in Food Traceability Techniques and Technologies*. Woodhead publishing: 2016.
66. Nie, P.; Wu, D.; Sun, D.W.; Cao, F.; Bao, Y.; He, Y.; *Sensors*. **2013**, 10, 13820.
67. Moros, J.; Garrigues, S.; Guardia, M.; *TrAC- Trend. Anal Chem*. **2010**, 7, 578.
68. Reis, N.; Botelho, B.G.; Franca, A.S.; Oliveira, L.S.; *Food Anal. Methods*. **2017**, 8, 2700.
69. Spinosa, B.; Firmino, M.; *Química Forense Experimental*; Cengage do Brasil: 2016.
70. Karoui, R.; Downey, G.; Blecker, C.; *Chem Rev*. **2010**, 10, 6144.
71. Cozzolino, D.; *Appl Spectrosc Rev*. **2012**, 7, 518.
72. Black, C.; Haughey, S.A.; Chevallier, O.P.; Galvin-King, P.; Elliott, C.T.; *Food Chem*. **2016**, 551.
73. Varliklioz, S.; Eksi-Kocak, H.; Yetim, H.; Boyaci, I.H.; *Food Anal. Methods*. **2017**, 5, 1547.
74. Kokalj, M.; Štih, K.; Kreft, S.; *Planta Med*. **2014**, 12, 1023.
75. Cebi, N.; Yilmaz, M.T.; Sagdic, O.; *Food Chem*. **2017**, 517.
76. Wiercigroch, E.; Szafraniec, E.; Czamara, K.; Pacia, M.Z.; Majzner, K.; Kochan, K.; Kaczor, A.; Baranska, M.; Malek, K.; *Spectrochim Acta A*. **2017**, 317.
77. Ferreira, M.M.C.; *Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações*; Editora da Unicamp: Campinas, SP, 2015.
78. Mingoti, S.A.; *Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada*; Editora UFMG: 2005.
79. Correia, P.R.M.; Ferreira, M.M.C.; *Quím Nova*. **2007**, 481.
80. Morgano, M.; Queiroz, S.N.; Ferreira, M.; *Braz. J. Food Tech*. **1999**, 1, 73.
81. Manly, B.F.J.; *Multivariate Statistical Methods: A Primer*; Taylor & Francis: 2004.
82. Berrueta, L.A.; Alonso-Salces, R.M.; Héberger, K.; *J. Chromatogr. A*. **2007**, 1, 196.
83. Bro, R.; Smilde, A.K.; *Anal. Methods*. **2014**, 9, 2812.
84. Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E.; *Quim. Nova*. **2006**, 1401.
85. Varmuza, K.; Filzmoser, P.; *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*; Taylor & Francis: 2009.
86. Morgano, M.A.; *Tese: Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos*. 2005.
87. Fearn, T.; Riccioli, C.; Garrido-Varo, A.; Guerrero-Ginel, J.E.; *Chemometr. Intell. Lab*. **2009**, 1, 22.
88. Souza, A.M.; Poppi, R.J.; *Quím. Nova*. **2012**, 223.
89. Cen, H.; He, Y.; *Trends Food Sci Tech*. **2007**, 2, 72-83.
90. Chen, Q.; Zhao, J.; Lin, H.; *Spectrochim Acta A*. **2009**, 4, 845.

91. Anastasaki, E.; Kanakis, C.; Pappas, C.; Maggi, L.; Campo, C.P.; Carmona, M.; Alonso, G.L.; Polissiou, M.G.; *Eur Food Res Technol.* **2010**, *4*, 571.
92. Dharmaraj, S.; Jamaludin, A.S.; Razak, H.M.; Valliappan, R.; Ahmad, N.A.; Harn, G.L.; Ismail, Z.; *Vib. Spectrosc.* **2006**, *1*, 68.
93. Luykx, D.M.A.M.; Ruth, S.M.; *Food Chem.* **2008**, *2*, 897.
94. Toher, D.; Downey, G.; Murphy, T.B.; *Chemometr. Intell. Lab.* **2007**, *2*, 102.
95. Granato, D.; Calado, V.M.A.; Jarvis, B.; *Food Res. Int.* **2014**, 137.
96. Chen, Y.; Deng, J.; Wang, Y.; Liu, B.; Ding, J.; Mao, X.; Zhang, J.; Hu, H.; Li, J.; *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *5*, 1026.
97. Chen, Q.; Zhao, J.; Zhang, H.; Wang, X.; *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *1*, 77.
98. Fu, X.S.; Xu, L.; Yu, X.P.; Ye, Z.H.; Cui, H.F.; *J. Spectrosc.* **2013**, *7*.
99. Chen, Q.; Zhao, J.; Liu, M.; Cai, J.; *Czech J Food Sci.* **2008**, 360.
100. Fu, H.; Fan, Y.; Zhang, X.; Lan, H.; Yang, T.; Shao, M.; Li, S.; *J. Anal. Methods Chem.* **2015**.
101. Cozzolino, D.; Restaino, E.; Fassio, A.; *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety.* **2010**, *2*, 67.
102. Reis, N.; Franca, A.S.; Oliveira, L.S.; *Food Sci Tech.* **2013**, *2*, 395.
103. Sarraguça, M.C.; Santos, J.R.; Rangel, A.O.S.S.; Lopes, J.A.; *Food Anal. Methods.* **2013**, *3*, 892.
104. Chen, Q.; Zhao, J.; Fang, C.H.; Wang, D.; *Spectrochim Acta A.* **2007**, *3*, 568.
105. Frizon, C.N.T.; Oliveira, G.A.; Perussello, C.A.; Peralta-Zamora, P.G.; Camlofski, A.M.O.; Rossa, Ü.B.; Hoffmann-Ribani, R.; *Food Sci. Tech.* **2015**, *2*, 795.
106. Luypaert, J.; Zhang, M.H.; Massart, D.L.; *Anal. Chim. Acta.* **2003**, *2*, 303.
107. Panigrahi, N.; Bhol, C.S.; Das, B.S.; *J. Food Eng.* **2016**, 101.
108. Ikeda, T.; Kanaya, S.; Yonetani, T.; Kobayashi, A.; Fukusaki, E.; *J. Agr. Food Chem.* **2007**, *24*, 9908.
109. Mazur, L.; Peralta-Zamora, P.G.; Demczuk Jr, B.; Hoffmann Ribani, R.; *J. Food Compos. Anal.* **2014**, *2*, 55.
110. Ebrahimi-Najafabadi, H.; Leardi, R.; Oliveri, P.; Casolino, M.C.; Jalali-Heravi, M.; Lanteri, S.; Talanta. **2012**, 175.
111. Pauli, E.D.; Barbieri, F.; Garcia, P.S.; Madeira, T.B.; Acquaro Junior, V.R.; Scarminio, I.S.; Camara, C.A.P.; Nixdorf, S.L.; *Food Res Int.* **2014**, 112.
112. Pizarro, C.; Esteban-Díez, I.; González-Sáiz, J.M.; *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *2*, 266.
113. Tavares, K.M.; Pereira, R.G.F.A.; Nunes, C.A.; Pinheiro, A.C.M.; Rodarte, M.P.; Guerreiro, M.C.; *Quím. Nova.* **2012**, 1164.
114. Wang, J.; Jun, S.; Bittenbender, H.C.; Gautz, L.; Li, Q.X.; *J Food Sci.* **2009**, *5*, 385.
115. Teye, E.; Huang, X.; Lei, W.; Dai, H.; *Food Res. Int.* **2014**, 288.
116. Nickless, E.M.; Holroyd, S.E.; Hamilton, G.; Gordon, K.C.; Wargent, J.J.; *Vib Spectrosc.* **2016**, 38.
117. Lopes, E.L.; *Tese: Estratégias para a caracterização de amostras brasileiras de óleo de soja empregando ATR-FTIR e HPLC-ELSD aliadas a ferramentas quimiométricas.* Universidade Federal do Rio Grande do Sul: 2015.
118. Downey, G.; Briandet, R.; Wilson, R.H.; Kemsley, E.K.; *J. Agri. Food Chem.* **1997**, *11*, 4357.
119. Ferrão, M.F.; Carvalho, C.W.; Müller, E.I.; Davanzo, C.U.; *Food Sci. Tech.* **2004**, 333.
120. Souza, A.M.; Breikreitz, M.C.; Filgueiras, P.R.; Rohwedder, J.J.R.; Poppi, R.J.; *Quím. Nova.* **2013**, 1057.

121. Teófilo, R.F.; *Tese: Métodos quimiométricos em estudos eletroquímicos de fenóis sobre filmes de diamante dopado com boro*. Universidade Estadual de Campinas: 2007.
122. Nørgaard, L.; Saudland, A.; Wagner, J.; Nielsen, J.P.; Munck, L.; Engelsen, S.B.; *App Spectrosc.* **2000**, 3, 413.
123. Liu, Y.F.; Chen, X.; Zheng, B.; Xu, Z.Y.; He, G.T. *Detection of the Contents of the Ingredient of Food by Using the NIR Spectroscopy and the Backward Interval Partial Least-Squares*. in *Advanced Materials Research*. Trans Tech Publ: 2013.
124. Cunha, C.L.; Luna, A.S.; Oliveira, R.C.G.; Xavier, G.M.; Paredes, M.L.L.; Torres, A.R.; *Fuel*. **2017**, 185.
125. Helfer, G.A.; Bock, F.; Marder, L.; Furtado, J.C.; Costa, A.B.; Ferrão, M.F.; *Quím. Nova.* **2015**, 575.
126. Colthup, N.; *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*; Elsevier Science: 2012.
127. Kasprzyk, I.; Depciuch, J.; Grabek-Lejko, D.; Parlinska-Wojtan, M.; *Food Control.* **2018**, 33.
128. Svečnjak, L.; Biliškov, N.; Bubalo, D.; Barišić, D.; *Agriculturae Conspectus Scientificus.* **2011**, 3, 191.