UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

DEYSE PEGORINI RODRIGUES

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MODELO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM BEBIDAS COMERCIAIS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Dissertação

PATO BRANCO, 2016

DEYSE PEGORINI RODRIGUES

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MODELO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM BEBIDAS COMERCIAIS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito para obtenção do título de "Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos" - Área do conhecimento: Alimentos.

Professor Orientador: Dr. Edimir Andrade Pereira
Professor Coorientador: Dr. Marcio Barreto Rodrigues

PATO BRANCO, 2016

R696d Rodrigues, Deyse Pegorini.
Desenvolvimento e aplicação de modelo de calibração multivariada para determinação de açúcares e ácidos orgânicos em bebidas comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho/ Deyse Pegorini Rodrigues. – 2016.
119 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira
Coorientador: Prof. Dr. Marcio Barreto Rodrigues
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2016.
Bibliografia: f. 102 – 117.

1. Mínimos quadrados. 2. Espectroscopia de infravermelho. 3. Cromatografia a líquido de alta eficiência. 4. Análise espectral. I. Pereira, Edimir Andradel, orient. II. Rodrigues, Marcio Barreto, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

TERMO DE APROVAÇÃO Nº 42

Título da Dissertação

"DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE MODELO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM BEBIDAS COMERCIAIS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO"

Autora

DEYSE PEGORINI RODRIGUES

Esta dissertação foi apresentada às 08 horas do dia 29 de março de 2016, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Química de Alimentos – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira
UTFPR/PB
Presidente

Prof. Dr. Marcio Barreto Rodrigues
UTFPR/PB
Coorientador

Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima
UTFPR/PB
Examinador

Profa. Dra. Poliana Macedo dos Santos
UTFPR/PB
Examinadora

Visto da Coordenação

Prof. Dra. Cristiane Regina Budziak Parabocz
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde, força física e mental que me conferiu para a concretização desta pesquisa,

À meu marido Marcio pelo amor, paciência, orientação e ajuda que foram essenciais durante esse período,

À meus pais Milton e Lorete pelo apoio e dedicação, amor e confiança prestados em todos os momentos de minha vida,

À meu orientador Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira pela orientação, paciência, pelos ensinamentos e excelente exemplo de profissionalismo,

À Profa. Dra. Marina Leite Mitterer Daltoé pelo apoio prestado na etapa de qualificação, ensinamentos repassados e orientação,

À Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima pela paciência, auxílio na construção dos modelos e estatística,

À Profa. Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni pelo auxílio na etapa de cromatografia e pelos ensinamentos,

À ajuda recebida das colegas Anaclara Prasniewski e Cíntia Boeira Batista na etapa de construção dos modelos e de Mariéli Karling na cromatografia.

À todos os funcionários e estagiários da Central de Análises e dos Laboratórios de Química da UTFPR,

À todos os professores de Química da UTFPR e do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pelos ensinamentos e bom exemplo de profissionais que são,

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela oportunidade ímpar a mim concedida de fazer parte deste excelente time de alunos e de realizar esse trabalho,

Aos amigos pelo otimismo, apoio, lealdade e paciência durante os períodos de dificuldades,

À agência financiadora CAPES pelo auxílio financeiro.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

Theodore Roosevelt

RESUMO

RODRIGUES, Deyse Pegorini. Desenvolvimento e aplicação de modelo de calibração multivariada para determinação de ácidos orgânicos e açúcares em bebidas comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho. 2016. 119f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

As análises de rotina de quantificação dos ácidos orgânicos e açúcares são comumente métodos demorados que envolvem o uso e preparo de inúmeros reagentes, necessitam de profissional treinado, disponibilidade de equipamentos específicos e são onerosos. Neste contexto, tem sido crescente o investimento em pesquisas que tenham como finalidade o desenvolvimento de métodos substitutivos aos de referência, sendo estes mais rápidos, baratos e simples, e a espectroscopia no infravermelho têm se destacado nesse sentido. No presente estudo foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada para a determinação simultânea e quantitativa dos ácidos ascórbico, cítrico, málico, tartárico e dos açúcares sacarose, glicose e frutose, bem como os sólidos solúveis totais em sucos e néctares de fruta e modelos de classificação por ACP. Utilizou-se o método de espectroscopia no infravermelho próximo (*Near Infrared*, NIR) em associação ao método de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS). Foram utilizadas 42 amostras entre sucos e néctares de fruta comercialmente disponíveis no comércio local. Para a construção dos modelos foram realizadas as análises de referência com uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a refratometria para a análise dos sólidos solúveis totais. Posteriormente, a aquisição dos espectros foi realizada em triplicata, na faixa espectral de 12.500 a 4.000 cm^{-1}. Os melhores modelos foram aplicados na quantificação dos analitos em estudo em amostras de sucos naturais e sucos produzidos na Região Sudoeste do Paraná. Os sucos utilizados na aplicação dos modelos também passaram por análises físico-químicas. A validação da metodologia cromatográfica demostrou resultados satisfatórios, visto que as curvas de calibração externa obtiveram R^2 acima de 0,98 e coeficientes de variação (%CV) para repetibilidade e precisão intermediária abaixo de 8,83%. Por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) foi possível separar as amostras de sucos em dois grandes grupos, uva e maçã e tangerina e laranja, enquanto que para os néctares os grupos separaram goiaba e abacaxi de uva e maçã. Diferentes métodos de validação, além de pré-processamentos que foram empregados separadamente e em combinação, obtiveram modelos de calibração multivariados com erros quadráticos médios de previsão (RMSEP) e validação cruzada (RMSECV) abaixo de 1,33 e 1,53 g.100 mL^{-1} respectivamente e R^2 acima de 0,771, exceto para ácido málico. As análises físico-químicas possibilitaram a caracterização das bebidas, incluindo a faixa de pH de trabalho (variação de 2,83 a 5,79) e acidez dentro dos parâmetros da legislação para cada sabor. Os modelos de regressão comprovaram a possibilidade de se determinar simultaneamente os ácidos ascórbico, cítrico, málico e tartárico com sucesso, além da sacarose, glicose e frutose por meio de apenas um espectro, sugerindo que os modelos são economicamente viáveis para o controle de qualidade e padronização de produto na indústria de processamento de sucos de frutas e néctares.

Palavras-chave: PLS, sucos, néctares, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Infravermelho Próximo.

ABSTRACT

RODRIGUES, Deyse Pegorini. Development and application of multivariate calibration model for determination of sugars and organic acids in commercial beverages using infrared spectroscopy. 2016. 119f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

The routine analysis for quantization of organic acids and sugars are generally slow methods that involve the use and preparation of several reagents, require trained professional, the availability of special equipment and is expensive. In this context, it has been increasing investment in research whose purpose is the development of substitutive methods to reference, which are faster, cheap and simple, and infrared spectroscopy have been highlighted in this regard. The present study developed multivariate calibration models for the simultaneous and quantitative determination of ascorbic acid, citric, malic and tartaric and sugars sucrose, glucose and fructose, and soluble solids in juices and fruit nectars and classification models for ACP. We used methods of spectroscopy in the near infrared (Near Infrared, NIR) in association with the method regression of partial least squares (PLS). Were used 42 samples between juices and fruit nectars commercially available in local shops. For the construction of the models were performed with reference analysis using high-performance liquid chromatography (HPLC) and refractometry for the analysis of soluble solids. Subsequently, the acquisition of the spectra was done in triplicate, in the spectral range 12500 to 4000 cm^{-1}. The best models were applied to the quantification of analytes in study on natural juices and juice samples produced in the Paraná Southwest Region. The juices used in the application of the models also underwent physical and chemical analysis. Validation of chromatographic methodology has shown satisfactory results, since the external calibration curve obtained R-square value (R^2) above 0.98 and coefficient of variation (%CV) for intermediate precision and repeatability below 8.83%. Through the Principal Component Analysis (PCA) was possible to separate samples of juices into two major groups, grape and apple and tangerine and orange, while for nectars groups separated guava and grape, and pineapple and apple. Different validation methods, and pre-processes that were used separately and in combination, were obtained with multivariate calibration models with average forecast square error (RMSEP) and cross validation (RMSECV) errors below 1.33 and 1.53 g.100 mL^{-1}, respectively and R^2 above 0.771, except for malic acid. The physicochemical analysis enabled the characterization of drinks, including the pH working range (variation of 2.83 to 5.79) and acidity within the parameters Regulation for each flavor. Regression models have demonstrated the possibility of determining both ascorbic acids, citric, malic and tartaric with successfully, besides sucrose, glucose and fructose by means of only a spectrum, suggesting that the models are economically viable for quality control and product standardization in the fruit juice and nectars processing industry.

Key-words: PLS, Juices, Nectars, High-Performance Liquid Chromatography, Near Infrared

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas dos ácidos orgânicos cítrico, ascórbico, tartárico e málico.....21
Figura 2 - Estruturas químicas dos açúcares sacarose, glicose e frutose.....23
Figura 3 - Sistema do equipamento CLAE.....29
Figura 4 - Diagrama esquemático da validação conjunto-teste.....40
Figura 5 - Diagrama esquemático da validação cruzada.....41
Figura 6 - Relação entre o erro e o número ótimo de variáveis latentes.....42
Figura 7 - Fluxograma das principais etapas realizadas no estudo.....47
Figura 8 – Amostras de sucos de uva, laranja, maçã e abacaxi em *vial*.....51
Figura 9 - Cromatograma obtido a partir de solução de padrões dos ácidos orgânicos com detector DAD em sistema CLAE: cítrico (1), tartárico (2), málico (3), ascórbico (4).....55
Figura 10 - Cromatograma obtido a partir de solução de padrões de açúcares com detector IR em sistema CLAE: sacarose (5), pico não identificado (6), glicose (7) e frutose (8).....56
Figura 11 - Dendograma de dissimilaridade dos sucos.....63
Figura 12 - Gráfico dos *scores* de CP1 x CP2 para os sucos.....64
Figura 13 – Gráfico dos *loadings* da CP1 x CP2 dos sucos.....64
Figura 14 - Dendograma de dissimilaridade dos néctares de uva, maçã, pêssego, tangerina, goiaba, abacaxi e laranja.....66
Figura 15 - Gráfico dos escores de CP1 x CP2 para os néctares.....67
Figura 16 - Gráfico dos *loadings* da CP1 x CP2 para os néctares.....68
Figura 17 - Espectros de infravermelho próximo do conjunto de amostras de calibração.....69
Figura 18 - Determinação do número de variáveis latentes para ácido ascórbico.....71
Figura 19 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o ácido ascórbico com método de validação conjunto de teste. 72
Figura 20 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração do ácido ascórbico com método de validação cruzada.....73
Figura 21 - Determinação do número de variáveis latentes para ácido cítrico.....74
Figura 22 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o ácido cítrico com método de validação conjunto de teste....76
Figura 23 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração do ácido cítrico com método de validação cruzada.....76
Figura 24 - Determinação do número de variáveis latentes para ácido málico.....77
Figura 25 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o ácido málico com método de validação conjunto de teste...78
Figura 26 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração do ácido málico com método de validação cruzada.....79
Figura 27 - Determinação do número de variáveis latentes para ácido tartárico.....80
Figura 28 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o ácido tartárico com método de validação conjunto de teste.81
Figura 29 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração do ácido tartárico com método de validação cruzada.....81
Figura 30 - Determinação do número de variáveis latentes para a sacarose.....82

Figura 31 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para a sacarose com método de validação conjunto de teste 84
Figura 32 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração da sacarose com método de validação cruzada.....84
Figura 33 - Determinação do número de variáveis latentes para a glicose 85
Figura 34 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para a glicose com método de validação conjunto de teste.....86
Figura 35 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração da glicose com método de validação cruzada.....87
Figura 36 - Determinação do número de variáveis latentes para a frutose.....88
Figura 37 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para a frutose com método de validação conjunto de teste.....89
Figura 38 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração da frutose com método de validação cruzada.....90
Figura 39 - Determinação do número de variáveis latentes para sólidos solúveis totais 90
Figura 40 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para os sólidos solúveis totais com método de validação conjunto de teste.....92
Figura 41 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração dos sólidos solúveis totais com método de validação cruzada.....92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composições e parâmetros físico-químicos de sucos e néctares disponíveis comercialmente 20
Tabela 2 - Frutas e seus ácidos orgânicos predominantes 20
Tabela 3 - Composição de açúcares (g.100 mL^{-1}) em bebidas disponíveis comercialmente 24
Tabela 4 - Aplicação de CLAE na análise de ácidos orgânicos 26
Tabela 5 - Aplicação de CLAE na análise de açúcares 27
Tabela 6 - Divisões da região do infravermelho 32
Tabela 7 - Descrição, tempo de retenção e detecção dos padrões de ácidos orgânicos e açúcares utilizados nas análises 49
Tabela 8 - Concentrações da curva de calibração cromatográfica para ácidos orgânicos e açúcares 50
Tabela 9 - Resultados dos parâmetros de validação da análise de ácidos orgânicos e açúcares via CLAE 57
Tabela 10 - Resultados da análise de ácidos orgânicos e açúcares via CLAE em g.100 mL^{-1} e sólidos solúveis totais em °Brix via refratometria 59
Tabela 11 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para ácido ascórbico 71
Tabela 12 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para ácido cítrico 75
Tabela 13 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para ácido málico 78
Tabela 14 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para ácido tartárico 80
Tabela 15 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para sacarose 83
Tabela 16 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para glicose 85
Tabela 17 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para frutose 88
Tabela 18 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para sólidos solúveis totais 91
Tabela 19 - Resultados para aplicação dos modelos desenvolvidos para a determinação de ácidos orgânicos em sucos (g.100 mL^{-1}) 94
Tabela 20 - Resultados para aplicação dos modelos desenvolvidos para a determinação de açúcares em sucos em g.100 mL^{-1} 96
Tabela 21 - Resultados para os parâmetros físico-químicos das amostras de aplicação do modelo 97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação das bebidas utilizadas na construção dos modelos e seus códigos.....48
Quadro 2 - Códigos das amostras utilizadas na aplicação dos modelos.....53

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ACP: do inglês *Principal Components Analysis* (Análise das Componentes Principais)
ATR: Reflectância Total Atenuada
ATT: Acidez Total Titulável
CAL: Calibração
CCD: Cromatografia em Camada Delgada
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG: Cromatografia Gasosa
CV: Validação por Validação Cruzada
CV%: Porcentagem do Coeficiente de Variação
DAD: Detector Arranjo de Diodos
E.D.: Distância Euclidiana
FM: Fase Móvel
HCA: do inglês *Hierarchical Cluster Analysis* (Análise de Agrupamento por método Hierárquico)
IR: do inglês *Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia no Infravermelho)
L1: Lote 1
L2: Lote 2
LQ: Limite de Detecção
LD: Limite de Quantificação
MSC: do inglês *Multiplicative Signal Correction* (Correção Multiplicativa de Sinal)
MIR: do inglês *Mid infrared* (Infravermelho Médio)
ND: Não Detectado
NIR: do inglês *Near infrared* (Infravermelho Próximo)
n VL: Número de Variáveis Latentes
PCR: do inglês *Principal Componente Regression* (Regressão por Componentes Principais)
PLS: do inglês *Parcial Least Squares* (Mínimos Quadrados Parciais)
r: Coeficiente de Correlação
RI: Detector Índice de Refração
RMSEC: Erro médio quadrático de calibração
RMSEP: Erro médio quadrático de previsão
RMSECV: Erro médio quadrático da validação cruzada
RPD: Taxa de Desvio de *Performance*
SST: Sólidos Solúveis Totais
ST: Sólidos Totais
t_r: Tempo de Retenção
TS: Validação por Conjunto de Teste
UV-VIS: Ultravioleta na Região do Visível
UTFPR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná
VAL: Validação
VL: Variáveis latentes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **14**
2 OBJETIVOS **16**
2.1 OBJETIVO GERAL 16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **17**
3.1 MERCADO ATUAL: FRUTAS E SUCOS 17
3.2 SUCOS E NÉCTARES 18
3.2.1 Definição **18**
3.2.2 Composição Química **19**
3.2.2.1 Ácidos Orgânicos **20**
3.2.2.2 Açúcares **22**
3.2.2.3 Sólidos Solúveis totais **24**
3.3 MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E AÇÚCARES EM BEBIDAS 25
3.3.1 Análise de ácidos orgânicos **25**
3.3.2 Análise de açúcares **27**
3.3.2.1 Sólidos Solúveis totais **28**
3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 29
3.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO 31
3.5.1 Infravermelho próximo **33**
3.6 QUIMIOMETRIA 34
3.6.1 Análise Multivariada e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) **34**
3.6.2 Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA) **36**
3.7 PROCESSAMENTO ESPECTRAL 37
3.7.1 Dados Centrados na Média **37**
3.7.2 Normalização **37**
3.7.3 *Straight line subtraction* **38**
3.7.4 Correlação Multiplicativa de Sinal (MSC) **38**
3.7.5 Aplicação da derivada **39**
3.7.6 *Constant offset elimination* **39**
3.8 VALIDAÇÃO DE MODELOS MULTIVARIADOS 39
3.8.1 Métodos de validação **40**
3.8.2 Escolha do número de variáveis latentes **42**
3.8.3 Investigação das amostras anômalas **43**
3.8.4 Parâmetros de previsão **43**
3.9 APLICAÇÃO DE MODELOS DE REGRESSÃO MULTIVARIADA E ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA EM ALIMENTOS 45
4 MATERIAIS E MÉTODOS **47**
4.1 AMOSTRAS 47
4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS 48
4.2.1 Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos e açúcares **48**
4.2.2 Validação do método cromatográfico **49**
4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (FT-NIR) 51
4.4 SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS 52
4.5 ANÁLISE EXPLORATÓRIA 52
4.5 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA 52

4.6 APLICAÇÃO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....53
4.6.1 Análise Físico-química 54
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 55
5.1 AMOSTRAGEM.....55
5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....55
5.3 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS DO CONJUNTO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA A CONSTRUÇÃO DOS MODELOS 62
5.3.1 Conjunto de amostras de sucos.....62
5.3.2 Conjunto de amostras de néctares 65
5.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO - NIR 69
5.4.1 Modelos de Calibração Multivariada no Infravermelho Próximo 70
5.4.1.1 Ácido ascórbico.....70
5.4.1.2 Ácido Cítrico 74
5.4.1.3 Ácido Málico 77
5.4.1.5 Sacarose.....82
5.4.1.6 Glicose.....85
5.4.1.7 Frutose.....87
5.4.1.8 Sólidos solúveis totais 90
5.4 ANÁLISE DE SUCOS NATURAIS E PRODUZIDOS NA REGIÃO SUDOESTE 93
5.4.1 Aplicação dos modelos de calibração.....93
5.4.2 Análise físico-química de sucos naturais e da Região Sudoeste do Paraná.....97
6 CONCLUSÕES.....100
REFERÊNCIAS 102
ANEXOS 118
ANEXO 1 – RELATÓRIO DE DESEMPENHO DE COLUNA AMINEX 119

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores de frutas do mundo e segue ocupando a 3° posição no *ranking* mundial, com produção acima de 40 milhões de toneladas em 2015 (REETZ et al., 2015). Pesquisas apontam que cerca de 47% da produção de frutas foi destinada, no período de 2013, para a indústria de processamento (SANTOS et al., 2013), principalmente para elaboração de sucos, néctares, polpa congelada, sorvetes, doces, compotas e geleias.

O consumo de suco e néctar de fruta, integrantes da indústria de bebidas não alcoólicas, vem crescendo rapidamente com o desenvolvimento de técnicas de processamento. Dentre os fatores que têm influenciado a aceitabilidade destas bebidas pelo consumidor estão à praticidade, o fácil acesso a produtos industrializados devido à grande oferta por parte dos fabricantes e o apelo do *marketing* por alimentação saudável, além do seu valor nutritivo e sabor agradável.

O controle de qualidade e a segurança alimentar na indústria de bebidas são fatores cruciais na etapa de produção, o que consequentemente influencia em sua aprovação junto aos orgões fiscalizadores e pela população consumidora. É exigido um alto nível de qualidade, que inclui higiene na totalidade do processamento, padronização de produto, tempo de prateleira condizente ao prazo de validade referenciado na embalagem, além da qualidade sensorial do produto.

São inúmeras as pesquisas que tratam do desenvolvimento de ferramentas analíticas rápidas e eficazes utilizadas para simplificar as análises de rotina necessárias para o controle de qualidade e caracterização de alimentos (NASCIMENTO et al., 2003; SHIROMA; RODRIGUEZ-SAONA, 2009; CAYUELA; WEILAND, 2010; SANTOS; SANTOS; AZEVEDO, 2014; VALENTE et al., 2014), principalmente se tratando de analisar componentes individuais, tais como, açúcares e ácidos orgânicos, sendo o último indicador de possíveis adulterações em produtos de origem vegetal.

O interesse pela determinação de ácidos orgânicos e açúcares nos alimentos é devido a influência que estes têm sobre algumas características químicas e sensoriais do produto, quando presentes em proporções adequadas, tais como pH, acidez total, doçura, estabilidade microbiana e aceitabilidade global, (CHINNICI et al., 2005).

As metodologias convencionais de análise de açúcares simples, como sacarose, glicose e frutose, são baseadas em métodos clássicos de princípios físicos, químicos e enzimáticos, nos quais é investido longo tempo na preparação dos vários reagentes utilizados e na análise

propriamente dita, sendo também, relativamente suscetíveis a interferentes da matriz e com limites de detecção não aplicáveis a níveis traço. Para a análise de ácidos orgânicos, as principais metodologias são baseadas em princípios cromatográficos, que embora resolvam os problemas relacionados aos interferentes de matriz e alcancem excelentes limites de detecção, também exigem relativo tempo de preparação, analista treinado e disponibilidade de equipamento. Diante disso, torna-se imprescindível o desenvolvimento de metodologias alternativas as comumente utilizadas, a fim se obter técnicas analíticas rápidas, simples, baratas, que não necessitem de exaustiva preparação das amostras e não utilize equipamentos caros, tampouco analistas especializados.

Nos últimos anos, muitos estudos têm abordado sobre o potencial da espectroscopia no infravermelho como um método simples na determinação de constituintes em alimentos (BEULLENS et al., 2006; CAYUELA, 2008; CAMPS et al., 2010; SHETTY et al., 2012; PAN et al., 2015), pois é rápida e requer pouca ou nenhuma preparação de amostra (BUREAU et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2014).

A espectroscopia como análise individual não é capaz de fornecer informações quantitativas através de seus espectros, sendo necessária sua utilização em conjunto com a quimiometria (análise multivariada aplicada aos dados químicos) e análise de referência. Na calibração multivariada, o objetivo principal é a previsão de um ou mais parâmetros, tais como, o teor de glicose no sangue, teor de açúcar na cana-de-açúcar, teor de ácido cítrico em suco de laranja, etc. (ALLEGRINI; OLIVIERI, 2011), a partir do espectro de infravermelho, ultravioleta ou outra matriz de dados complexos gerados a partir de uma amostra. Para essa finalidade é construído um modelo multivariado que é capaz de relacionar os espectros de um determinado grupo de amostras e seus respectivos valores dos parâmetros já determinados através de análises de referências (SOROL et al., 2010).

Com o objetivo de contribuir com o desenvolvimento de metodologias que auxiliam as análises de controle de qualidade e de caracterização de néctares e sucos de frutas, bem como, detectar possíveis problemas de padronização de produtos, tem-se como proposta para este trabalho o desenvolvimento de modelos de calibração para a determinação rápida e não destrutiva de ácidos orgânicos e açúcares em amostras de sucos e néctares comerciais utilizando a Espectroscopia no Infravermelho próximo e regressão PLS (mínimos quadrados parciais). Adicionalmente, pretende-se aplicar o modelo para a caracterização de sucos produzidos na região Sudoeste do Paraná.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos de calibração multivariada baseados em medidas espectroscópicas de infravermelho próximo, combinadas a ferramentas quimiométricas (PLS - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais) para determinação quantitativa de ácidos orgânicos (ácido cítrico, tartárico, málico e ascórbico) e açúcares (sacarose, glicose, frutose e sólidos solúveis totais) em amostras de sucos e néctares comercializados na região Sudoeste do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar a metodologia cromatográfica para a determinação de ácidos orgânicos e açúcares nas amostras;
- Quantificar simultaneamente ácidos orgânicos (cítrico, tartárico, málico e ascórbico) e açúcares (sacarose, glicose e frutose) em amostras de sucos e néctares utilizando como análise de referência a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Quantificar via refratometria o teor de sólidos solúveis totais em amostras de sucos e néctares;
- Analisar por Espectroscopia no Infravermelho próximo (NIR) as amostras de sucos e néctares;
- Desenvolver e validar modelos de calibração utilizando os resultados da Espectroscopia no Infravermelho e Cromatografia em combinação com PLS;
- Aplicar a Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) como análise exploratória;
- Aplicar os modelos a fim de estabelecer um padrão composicional relativo a açúcares e ácidos orgânicos em sucos naturais e produzidos na Região Sudoeste;
- Realizar análises de composição físico-química nos sucos utilizados na aplicação do modelo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MERCADO ATUAL: FRUTAS E SUCOS

A China lidera a produção mundial de frutas, seguida de Índia, Brasil, Indonésia, Filipinas, Estados Unidos, Turquia, México, Irã e Espanha. As espécies frutíferas no Brasil conseguem se adaptar nos 27 estados de nosso território nacional com variedades e cultivares distintas. O segmento no Brasil, permite empregar mais de 5 milhões de pessoas, e é um dos responsáveis pela geração de renda da população do meio rural (SANTOS et al., 2013).

São Paulo é o maior Estado produtor de frutas do Brasil, colhendo o que corresponde a cerca de 40% do total nacional e lidera na colheita de laranja, banana, limão, tangerina, goiaba e abacate. Na segunda colocação, a Bahia trabalha na produção principalmente de coco-da-baía, mamão, manga e maracujá (SANTOS et al., 2013).

As frutas são alimentos apreciados em todo o mundo e seu consumo no Brasil está em ascensão na última década, pois além de contribuir para uma dieta saudável e equilibrada, são ótimas fontes de vitaminas, minerais e carboidratos (MATSUURA; ROLIM, 2002).

O padrão alimentar do brasileiro está em constante mudança, e dentre os motivos mais relevantes estão à busca por uma alimentação saudável e maior disponibilidade de compra dos consumidores (BUENO; BACCARIN, 2012). Pesquisas apontam que a ingestão de frutas, legumes e verduras diminuiu o risco de mortalidade e de diversas doenças (FIGUEIREDO; JAIME; MONTEIRO, 2008; NEUTZLING et al., 2009; CAMPOS et al., 2010).

Apesar de o Brasil ser um dos maiores produtores de frutas do mundo, devido a perecibilidade do alimento, perde grande parte de sua produção em poucos dias, o que têm dificultado a comercialização do produto a longas distâncias (MORAIS; ARAÚJO; MACHADO, 2010). Diante disso, o processamento das frutas na forma de sucos, néctares, polpa congelada, sorvetes, compotas e geleias, diminui a perda gerada em função da deterioração e agrega valor ao produto, permitindo sua durabilidade por vários meses.

Em busca de maior praticidade, o consumidor tem preferido adquirir alimentos “prontos para consumo”, surgindo assim diversas marcas de bebidas industrializadas (LIMA; MÉLO; LIMA, 2000). O elevado consumo se deve não só pela conveniência, mas também por ser um alimento saudável e possuir compostos benéficos a saúde, como antioxidantes, compostos fenólicos (RAPISARDA et al, 2008), vitaminas e minerais (DAHDOUH et al., 2015), além de ser um alimento rico em nutrientes (PICÓ; KOZMUTZA, 2007).

3.2 SUCOS E NÉCTARES

3.2.1 Definição

A legislação que determina os parâmetros para a área de alimentos no Brasil é regulada pelo Ministério da Saúde, intermediado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

De acordo com a legislação vigente para as bebidas, representada pelo Decreto n° 6.871, de 4 de junho de 2009 que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994 dispondo sobre a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas, são pertencentes ao grupo das bebidas não alcoólicas o suco, néctar, água de coco, polpa de fruta, refresco, refrigerante, chá, soda e xarope (BRASIL, 2009).

“Suco ou sumo é bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua preservação e conservação até o momento do consumo”. Nos sucos, é proibida a adição de aromas e corantes artificiais, contudo a legislação prevê a adição de açúcares, desde que sejam respeitadas as quantidades máximas fixadas para cada tipo de suco, logo sua denominação deve ser acrescida da palavra adoçado, no entanto, o suco integral é privado da adição de açúcares (BRASIL, 2009).

Brasil (2009) por meio do Art. 21 do Decreto nº 6.871 define néctar como: "a bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal ou de seu extrato, adicionado de açúcares, destinado ao consumo direto". Como complemento, a Instrução Normativa n° 12, através do Art. 3º impõe que "o néctar cuja quantidade mínima de polpa de uma determinada fruta não tenha sido fixada em Regulamento Técnico específico deve conter no mínimo 30% (m/m) da respectiva polpa, ressalvado o caso de fruta com acidez ou conteúdo de polpa muito elevado ou sabor muito forte e, neste caso, o conteúdo de polpa não deve ser inferior a 20% (m/m)" (BRASIL, 2003). Para o néctar de uva e laranja o teor mínimo de fruta foi modificado para 50% em 2012, entrando em vigor apenas em 2016, teor que já era padrão internacional para este tipo de produto (BRASIL, 2012).

A elaboração de normas e leis nacionais tem como base o *Codex Alimentarius*, englobando regras gerais e específicas, como no caso da Norma Geral do *Codex* para sucos e néctares de frutas (CODEX STAN 247-2005).

3.2.2 Composição Química

Os sucos de frutas são “misturas” aquosas complexas de vários componentes orgânicos voláteis e instáveis, responsáveis pelo aroma e sabor do produto, além de ácidos orgânicos, açúcares, sais minerais e pigmentos. Como resultado da composição rica em ácidos orgânicos, os sucos apresentam valores de pH entre 2,0 e 4,5 (NASCIMENTO, 1999; EVANGELISTA, 2008; SOARES et al., 2011).

Os ácidos orgânicos e os açúcares são componentes importantes responsáveis pelo sabor das frutas e sucos, e juntamente com o aroma, causam forte impacto na qualidade sensorial destes alimentos (BORSANI et al., 2009) e são parâmetros muito estudados em alimentos (SACCANI et al., 1995; RODRIGUEZ-SAONA et al., 2001; CHINNICI et al., 2005; XIE et al., 2009; KELEBEK et al., 2009; LIMA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2014; MA et al., 2015). O teor de ácidos orgânicos geralmente é expresso pela porcentagem (%) de acidez do ácido predominante no produto e os açúcares expressos em sólidos sóluveis totais, açúcares redutores e não redutores.

A composição destas bebidas industrializadas varia de acordo com o fabricante, embora devam respeitar as imposições da legislação vigente. Fazem parte da composição química, os ácidos orgânicos presentes nas frutas que são a matéria-prima destas bebidas, assim como, aqueles adicionados propositalmente como antioxidantes, reguladores de pH, realçadores de sabor, antimicrobianos, etc. A utilização dos açúcares, principalmente a sacarose pelo seu baixo custo, tem como função atuar como espessante e intensifica o sabor do produto (UMBELINO, 2005).

Os açúcares sacarose, glicose e frutose diferem na doçura (DOTY, 1976 apud MA et al., 2015, p. 86), assim como, os ácidos cítrico, málico e tartárico possuem perfis gustativos muito diferentes. Neste contexto, a relação entre os açúcares e os ácidos pode agir como um indicador importante no sabor da fruta (TERRY; CHOPE; BORDONABA, 2007; BORDONABA; TERRY, 2008).

Alguns dos parâmetros da composição físico-química das bebidas relatados na literatura encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Composições e parâmetros físico-químicos de sucos e néctares disponíveis comercialmente

Matriz	pH	SST (° Brix)	ATT (%)	Ratio (SST/ATT)	Referência
Suco de Uva	3,31	16,20	0,78	20,8	Rizzon; Miele (2012)
Suco de Laranja	-	11,01	0,68	16,33	Figueira et al., (2010)
Suco de Caju	3,38	11,00	1,06	10,38	Castro et al., (2007)
Suco de Goiaba	3,29	6,00	0,82	7,32	Castro el al., (2007)
Suco de Abacaxi	3,46	13,50	0,81	16,70	Pinheiro et al., (2006)
Suco de Laranja	3,78	10,88	0,63	17,27	Sugai et al., (2002)
Néctar de Acerola	3,70	15,10	-	-	Chim; Zambiazi; Rodrigues, (2013)
Néctar de Uva	2,92	14,25	0,50	29,70	Rizzon; Miele (2012)

SST: Sólidos solúveis totais; ATT: Acidez Total Titulável; pH: Potencial hidrogeniônico; Ratio: Razão entre SST e ATT

3.2.2.1 Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos também são encontrados em sucos e néctares de frutas e são compostos orgânicos que apresentam um ou mais grupos carboxílicos em sua estrutura. Estão presentes em diversos alimentos de forma natural e o estudo de sua concentração é de grande importância, pois este parâmetro influencia diretamente as propriedades sensoriais do alimento e de seus derivados (SCHERER et al. 2012). Os principais ácidos orgânicos que são encontrados em alimentos são: cítrico, málico, oxálico, succínico, ascórbico e tartárico. Existem outros menos conhecidos, e em menor concentração, mas de igual importância, que são: isocítrico, fumárico, oxalacético e cetoglutárico. Na Tabela 2 são apresentados os ácidos orgânicos predominantes em diversas frutas.

Tabela 2 - Frutas e seus ácidos orgânicos predominantes

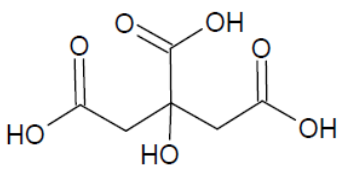
Ácido predominante	Produto
Cítrico	Limão, laranja, groselha, goiaba, abacaxi, morango, figo, framboesa, romã.
Málico	Maçã, damasco, banana, cereja, pêssego, uva, ameixa, pera
Tartárico	Abacate e uva
Isocítrico	Amora

Fonte: Damodaram; Parkin; Fennema (2010).

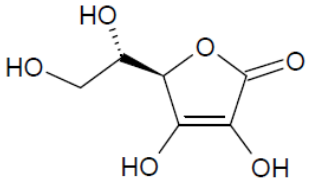
Os ácidos orgânicos são essenciais para o metabolismo respiratório e atuam como compostos de reserva nas frutas e hortaliças. Quando em maiores quantidades aumentam o gosto ácido ou azedo. A grande maioria das frutas e hortaliças frescas é ácida, sendo as frutas mais ácidas do que as hortaliças. Os teores de ácidos variam muito, em milho verde, por

exemplo, é baixo, por outro lado em groselhas, amoras ou espinafres é alto. Frutas, tais como, limão e lima contêm até aproximadamente 3% de ácido em massa fresca total (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010).

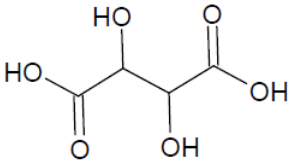
Os ácidos são amplamente utilizados como aditivos alimentares na fabricação de bebidas a base de frutas e vegetais, sendo mais utilizados para este fim os de ocorrência natural como o cítrico, ascórbico, tartárico e málico (Figura 1). Suas aplicações como aditivos possuem também relação com sua ação antioxidante e conservante (ARAÚJO, 2008; SCHERER et al., 2012). Sua ação, geralmente, é dada pelo abaixamento do pH do tecido, minimizando desta forma a velocidade da reação de escurecimento (ARAÚJO, 2008).



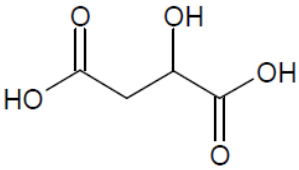
Ácido cítrico



Ácido ascórbico



Ácido tartárico



Ácido málico

Figura 1 - Estruturas químicas dos ácidos orgânicos cítrico, ascórbico, tartárico e málico

O ácido málico é um componente natural encontrado em frutas e sucos e também em células do corpo, em que atua estimulando o metabolismo para aumentar a produção de energia e é um ácido fraco. O ácido cítrico também é um ácido fraco, embora trabalhe como conservante natural é também adicionado a alimentos e bebidas para conferir o sabor ácido ou azedo (XIE et al., 2011).

O ácido tartárico, considerado um ácido forte, atua influenciando diretamente o pH da uva, suco, mosto e vinho e é resistente a respiração oxidativa (RIZZON; SGANZERLA, 2007). O ácido ascórbico é exclusivamente fornecido pela ingestão de alimentos que o contém, como frutas, vegetais e legumes, uma vez que o corpo humano não é capaz de sintetizá-lo, sendo uma vitamina de consumo essencial (CAMPBELL, 2003).

Os ácidos orgânicos desempenham um papel importante na coloração das frutas, pois estabilizam antocianinas e prolongam a vida útil de frutas frescas e de seus produtos processados (MA et al., 2015), como também influenciam o sabor, odor, estabilidade e a manutenção de qualidade.

A identificação e quantificação dos vários ácidos orgânicos contidos nos sucos de fruta tem considerável importância, pois além de estes interferirem no sabor do produto, podem servir como informação no que diz respeito à autenticidade do produto, permitindo identificar a presença de ácidos não característicos ao suco. A presença de picos dos ácidos acético e lático indicam processos de alterações microbiológicas sofridos anteriormente (SACCANI et al., 1995).

Em seu estudo, Nascimento e colaboradores (2003), avaliaram o tratamento térmico na composição química e qualidade de suco clarificado de caju (cajuína), e concluíram que a relação quantitativa entre os ácidos ascórbico e cítrico podem ser utilizados como indicativos no controle de qualidade da cajuína, uma vez que, os teores destes ácidos devem ter uma relação fixa na bebida que não passou por adulteração com água.

Neste contexto, Ogrinc et al. (2003) relatam que as adulterações que ocorrem nos sucos de frutas incluem diluição em água, adição de açúcar, ácido cítrico e tartárico. Ainda, Saavedra, Garcia e Barbas (2000) descrevem também que a adição de suco de uva em suco de laranja pode ser detectada pela presença do ácido tartárico, e o ácido iso-cítrico, que está presente em suco de laranja em pequenas concentrações também pode servir como indicador de fraudes, uma vez que, sua quantidade é sempre constante.

Os níveis de ácidos orgânicos foram estudados por Cen et al., (2007) em que avaliaram e discutiram o potencial de medidas espectroscópicas de VIS e NIR a serem utilizadas para detecção rápida e não destrutiva dos ácidos cítrico e tartárico em suco de laranja, combinado a regressão PLS. Os resultados de previsão foram satisfatórios e os modelos gerados obtiverem R^2 de 0,94 e 0,93.

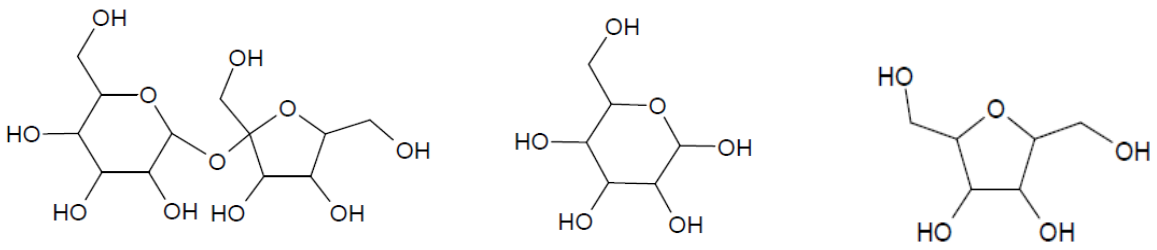
3.2.2.2 Açúcares

Além dos ácidos orgânicos os açúcares também são encontrados em sucos e néctares de frutas. Pertencem ao grupo dos carboidratos e são substâncias muito conhecidas por seu gosto adocicado, sendo que tal característica é responsável pela sua ampla utilização nos alimentos. A sacarose é o açúcar mais consumido em todo mundo, é formado por 2

monossacarídeos, D-glicose e D-frutose originando o α-D-glicopiranosil-β-D-frutofuranosídeo de fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ (MORGANO, 2005).

Os açúcares são utilizados para o consumo humano, como fonte de energia, devido as suas propriedades físicas e ao seu sabor doce, são empregados como componentes em alimentos e bebidas. Ajudam a manter ingredientes de produtos alimentícios e farmacêuticos unidos, devido a sua propriedade de adesividade e viscosidade em solução. Também são utilizados como conservador, quando em elevadas concentrações, inibindo o crescimento de microrganismos, responsáveis por alterações nos alimentos (VETTORAZI; MACDONALD, 1989).

A sacarose, glicose e frutose (Figura 2) são chamados de açúcares simples e são encontrados naturalmente em frutas e derivados.



Sacarose Glicose Frutose

Figura 2 - Estruturas químicas dos açúcares sacarose, glicose e frutose

Alguns alimentos que apresentam sacarose em sua composição possuem também glicose e frutose em maior ou menor quantidade. Os sucos de frutas são alimentos naturais que possuem a mistura desses três açúcares solúveis (DEMIATE et al., 2002).

Trabalhos relevantes da literatura podem demonstrar a concentração de sacarose, glicose, frutose e açúcares totais em sucos/néctares de frutas industrializados (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição de açúcares (g.100 mL^{-1}) em bebidas disponíveis comercialmente

Amostra	Sacarose	Glicose	Frutose	Açúcares totais	Referência
Suco de uva	3,62	5,10	5,45	14,16	Caldas et al. (2015)
Suco de uva concentrado	ND	30,38	32,58	63,40	Caldas et al. (2015)
Suco de maracujá	ND	ND	ND	6,82	Castro et al. (2007)
Néctar de laranja	0,36	ND	ND	3,70	El-Assad et al. (2010)

ND: Não determinado pelo autor

Neste contexto, Pedro e Ferreira (2007) desenvolveram um método simultâneo e não destrutivo para a determinação de sacarose, glicose, frutose e sólidos solúveis totais em produtos de tomate concentrado, empregando NIR e PLS, e observaram que apesar de erros de previsão para os ácidos e açúcares o modelo obteve bons resultados.

3.2.2.3 Sólidos Solúveis totais

O teor de sólidos solúveis totais (SST) é comumente adotado como parâmetro de quantificação de açúcares. E são os açúcares os constituintes que contribuem com grande proporção do Brix, no entanto essa medida expressa todos os SST incluindo açúcares, ácidos orgânicos (BASHA et al., 2012), minerais, entre outros (ANDRÉS; TENORIO; VILLANUEVA, 2015), e pode ser definido como a porcentagem em peso ou volume de sólidos solúveis expressos como sacarose (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007).

A Instrução Normativa n. 01 de 07 de janeiro de 2000 prevê valores de SST como parâmetro de legalidade de sucos, e as bebidas que não respeitam o mínimo estipulado estão em desacordo com a legislação. No entanto, não são determinados para todos os tipos de sucos, os referidos teores de SST estão disponíveis apenas para sucos de maracujá, caju, abacaxi, uva, pera, maçã, limão, lima ácida e laranja (BRASIL, 2000).

De acordo com Cayuela (2008) a maioria das frutas necessita da verificação dos parâmetros de qualidade interna com SST e acidez para assegurar que as frutas e seus derivados tenham um nível mínimo de aceitabilidade perante os consumidores.

Valderrama e colaboradores (2007) construíram e validaram modelos de calibração multivariada (PLS) para determinar o teor de sólidos solúveis totais (Brix) em caldo de cana, utilizando o infravermelho próximo e observaram erros de calibração e previsão de 0,30 e 0,28, respectivamente.

Diversos tipos de sucos de frutas foram usados para a construção de um modelo de calibração multivariada para a determinação de sólidos solúveis totais estudado por Wang e Xie (2014), que trabalharam com infravermelho próximo e aplicaram o método PLS e observaram que o menor R^2 da fase de validação foi de 0,860 e RMSEV de 0,495.

3.3 MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E AÇÚCARES EM BEBIDAS

3.3.1 Análise de ácidos orgânicos

Os métodos tradicionais para a quantificação de ácidos orgânicos geralmente envolvem o uso de métodos enzimáticos, espectrofotométricos, titulométricos e cromatográficos. Os enzimáticos, normalmente requerem *kits* específicos para cada ácido, tornando a análise cara e demorada (SACCANI et al., 1995).

A titulometria também é muito utilizada para determinar ácidos orgânicos, pela determinação da acidez total titulável, que é expressa em porcentagem do ácido predominante por meio de fatores de correção encontrados em tabelas específicas. O método baseia-se na adição de um titulante básico, normalmente o NaOH, sobre a amostra diluída até a neutralização da mesma, sendo possível visualizar o ponto de viragem através do uso de um indicador, ou para amostras fortemente coloridas, a volumetria potenciométrica, com o auxílio de um medidor de pH (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). No entanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens como a percepção errônea do ponto de viragem da analise que pode variar de analista para analista quando não é utilizado o medidor de pH, além do emprego de grande volume do titulante.

Os métodos espectrofotométricos para a análise de ácidos se baseiam na reação do analito com uma determinada substância, que auxilia na produção de uma espécie que absorve na região visível do espectro eletromagnético, originando um composto de cor que pode ser medido em determinado comprimento de onda (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2005).

Para a análise dos ácidos orgânicos utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é indispensável à utilização de padrões autênticos e com alta pureza, que, geralmente, possuem um alto valor comercial, tornando a análise ainda mais cara, visto que o equipamento tem elevado custo e necessita de manutenção constante. Além disso, a

CLAE exige prepração prévia das amostras, sendo que em alguns casos é necessária a extração e purificação dos analitos, consumindo muito tempo. Adicionalmente, a utilização de vários reagentes químicos eleva ainda mais o custo analítico podendo ocasionar problemas de segurança para o experimento (CEN et al., 2007), além da excessiva geração de resíduos.

De acordo com Shukla et al. (2010) e Svecová et al. (2015) os métodos que utilizam cromatografia líquida e gasosa na análise de ácidos orgânicos receberam considerável importância nos últimos anos e estão entre as técnicas mais utilizadas para este fim, por apresentarem vantagens como a rapidez, seletividade, sensibilidade e confiabilidade. Na Tabela 4 são apresentadas algumas aplicações da CLAE e suas respectivas condições na determinação de ácidos orgânicos.

Tabela 4 - Aplicação de CLAE na análise de ácidos orgânicos

	Kelebek et al. (2009)	**Scherer et al. (2012)**	**Lima et al. (2014)**
Matriz	Suco de laranja	Suco de maça, laranja e uva	Suco de uva
Analito	Ácidos cítrico, ascórbico e málico	Ácidos tartárico, málico, cítrico e ascórbico	Ácidos tartárico, málico, cítrico, láctico, succínico, acético e ascórbico
Condições cromatográficas	Coluna Aminex HPX-87H; FM 0,045 M H_2SO_4 com 6% acetonitrila	Coluna C18; FM 0,01 M KH_2PO_4	Coluna C18; FM 0,025 M KH_2PO_4 acidificada com H_3PO_4
Preparação amostra	Centrifugação e filtração	Diluição e filtração	Filtração

Ainda, a avaliação dos ácidos tartárico, málico, ascórbico e cítrico foi estudada por Scherer, Rybka e Godoy (2008) em sucos e polpas de caju utilizando CLAE e coluna fase reversa C18. O método mostrou-se rápido e eficiente, obtendo coeficientes de determinação acima de 0,99.

Rizzon e Sganzerla (2007) também utilizaram de CLAE para quantificar os ácidos málico e tartárico em mosto de uva. Neste caso, foi empregado um método em fase reversa com detector Diode Array, sendo que a fase móvel se constituiu de água ultrapura e ácido fosfórico, tendo sido encontrados resultados satisfatórios demonstrando o alto potencial da cromatografia neste tipo de aplicação.

3.3.2 Análise de açúcares

Diversos métodos analíticos têm sido propostos para a análise quantitativa de açúcares simples (sacarose, glicose e frutose) em alimentos, os métodos mais utilizados são os que envolvem a cromatografia como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em camada delgada (CCD) e a gasosa (CG), pois são considerados rápidos, seletivos, precisos e sensíveis (TAVARES et al., 2010).

Na Tabela 5 são apresentadas resumidamente algumas aplicações da CLAE e suas respectivas condições analíticas na determinação de açúcares.

Tabela 5 - Aplicação de CLAE na análise de açúcares

	Chinnici et al. (2005)	**Kelebek et al. (2009)**	**Rangel et al. (2011)**
Matriz	Sucos de maçã,	Suco de laranja	Suco de lima
Analito	Sacarose, glicose e frutose	Sacarose, glicose e frutose	Sacarose, glicose e frutose
Condições cromatográficas	Coluna Aminex HPX; FM 0,005M de ácido fosforico	Coluna Aminex HPX; FM 0,045 M H_2SO_4 com 6% acetonitrila	Coluna Fase-reversa; FM Água ultrapura com 75% de acetonitrila
Preparação amostra	Diluição e filtração	Centrifugação e filtração	Ultrassom e filtração

No entanto, estes não são métodos disponíveis para a maioria dos laboratórios presentes nas indústrias de alimentos, pois além do alto custo dos equipamentos, as análises também são caras e demoradas, mesmo se tratando de uma análise prática e eficiente.

Outros métodos convencionais mais acessíveis baseiam-se basicamente em análises físicas, químicas e enzimáticas como, por exemplo, as análises de Somogyi-Nelson, Bergmeyer e Bernt, Lane-Eynon, Miller.

A análise colorimétrica de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952) é um exemplo de método químico, em que é possível quantificar sacarose e frutose. O método baseia-se na propriedade redutora dos açúcares sobre o cobre, presente no reativo de Nelson, o qual reduz a reação arsênio-molibídico a óxido de molibdênico cuja coloração é azul, proporcional à concentração dos açúcares.

Dentre os métodos enzimáticos, pode-se citar a metodologia enzimático-colorimétrica descrita por Bergmeyer e Bernt (1974 apud QUEJI, 2008, p.16) para a quantificação de glicose, que utiliza a enzima glicose oxidase, disponível em kits comerciais. Esta enzima, por sua vez, é responsável por catalisar a oxidação da glicose para ácido glucurônico e peróxido

de hidrogênio. Por meio de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase, o peróxido formado reage com um grupo cromóforo doador de hidrogênio e o oxida a um derivado colorido, em que é possível realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro na região do visível.

O método de Lane-Eynon, utilizado para a determinação titulométrica de açúcares redutores, é baseado em reações com sais cúpricos, os quais, em solução tartárica alcalina, podem ser reduzidos a quente por aldoses ou cetoses transformando-se em sais cuprosos vermelhos, que quando precipitam, perdem a coloração azul. A reação do tartarato e o cobre forma um complexo solúvel, que impede a formação de hidróxido cúprico insolúvel que teria lugar se existisse cobre livre na solução alcalina. A positividade da reação é verificada pela formação do precipitado de óxido cuproso de coloração avermelhada (LITWACK, 1960 apud TAVARES et al., 2010, p.805).

O método espectrofotométrico descrito por Miller (1959) também para a análise de açúcares redutores se baseia na redução em meio alcalino, do ácido 3,5–dinitrossalicílico em ácido 3-amino-5-nitrossalícilico, por ação dos açúcares redutores, dando origem a um complexo acastanhado que é dosado espectrofotometricamente a 575nm.

Os carboidratos não redutores também podem ser determinados por meio dos métodos para açúcares redutores, desde que eles primeiro sejam hidrolisados, enzimática ou quimicamente, para se tornarem redutores (TAVARES et al., 2010).

Embora essas metodologias de referência tenham um custo menor de análise, requerem um longo tempo de preparação e análise, pois necessitam de várias soluções e reagentes, além de que a experiência do analista pode influenciar nos resultados finais. Diante disso, trabalhos recentes têm investido no desenvolvimento de técnicas mais rápidas para a análise de componentes essenciais em alimentos, utilizando, por exemplo, a Espectroscopia no Infravermelho.

3.3.2.1 Sólidos Solúveis totais

Os sólidos solúveis totais (SST) dado pela escala do índice de refração (Brix) é um método bastante acessível aos laboratórios de indústrias processadoras de sucos de frutas e é utilizado como parâmetro no controle de qualidade.

É aplicada em amostras de sucos ou polpa de frutas e a presença de sólidos insolúveis não interfere na análise. A medida dos SST pode ser estimada pela medida do índice de

refração da amostra e posterior comparação com tabelas de referência. Baseia-se na leitura de 3 ou 4 gotas da amostra homogeneizada diretamente no prisma do refratômetro (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008).

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Na Cromatografia Líquida é possível separar componentes dentro de uma mistura conforme esta passa através de uma coluna em que a interação entre a amostra, fase estacionária e fase móvel condicionam a velocidade de migração das moléculas. O tipo da fase estacionária determina de que forma os compostos podem ser separadas (tamanho, polaridade, carga, etc.) (CAPUANO; RUTH, 2012).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), é caracterizada pelo uso de elevadas pressões para forçar o acesso do solvente para as colunas que contém partículas finamente empacotadas, podendo efetuar separações de forma eficiente (HARRIS, 2005). Possui características como o alto poder de resolução, separações razoavelmente rápidas, monitoramento de eluente, repetitividade e reprodutibilidade com mesma coluna, rotina automatizada, entre outras (MENDHAM et al., 2002).

O equipamento CLAE (Figura 3) consiste basicamente em um sistema de distribuição de solvente (fase móvel), dispositivo de injeção de amostra, coluna de alta pressão, detector e um computador que dispõe de *software* específico em que são armazenados os resultados, além de toda a programação de método.

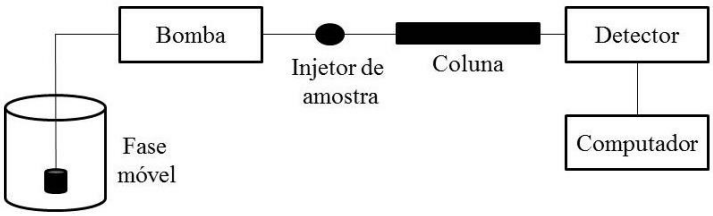


Figura 3 - Sistema do equipamento CLAE

A coluna cromatográfica deve ser escolhida em função da natureza do soluto e levando em consideração as características do analito (PRATHAP et al., 2013). Normalmente é feita de aço ou plástico e possui de 5 a 30 cm de comprimento com 1 a 5 mm de diâmetro interno. O uso de aquecimento na coluna diminui a viscosidade do solvente o que permite maior rapidez no fluxo, diminuiu e melhora a reprodutibilidade dos tempos de retenção e aumenta a resolução, no entanto, pode danificar a fase estacionária e o tempo de vida da coluna pode diminuir. (HARRIS, 2005).

Um elevado número de detectores foi desenvolvido nos últimos anos, baseado em diferentes princípios para conseguir detectar analitos após a separação cromatográfica. No entanto, apenas quatro são os mais eficazes e empregados: detector de fluorescência, detector de condutividade elétrica, detector de índice de refração e detector de ultravioleta (PRATHAP et al., 2013), sendo os dois últimos utilizados neste trabalho.

O detector de índice de refração é sensível a mudanças de pressão e temperatura, porém seu limite de detecção é em média 1000 vezes menor que o ultravioleta. É um detector sensível a quase todos os tipos de soluto e tem resposta universal a todos eles, inclusive a aqueles que possuem baixa absorção no ultravioleta. O detector de ultravioleta é o mais comum usado em CLAE, devido ao fato de que grande parte dos solutos absorvem no ultravioleta. Os equipamentos mais usuais utilizam lâmpadas de deutério, xenônio ou tungstênio e um monocromador, permitindo que se possa escolher o comprimento de onda adequado para cada analito (HARRIS, 2005).

A CLAE é usada frequentemente para a análise de uma imensa variedade de compostos alimentares tais como vitaminas, ácidos orgânicos, hidratos de carbono, aditivos, proteínas, açúcares, entre outros (CAPUANO; RUTH, 2012). As vantagens de sua utilização envolvem alta eficiência, sensibilidade e reprodutibilidade, em contrapartida limita-se a necessidade de profissional treinado e com experiência, solventes altamente puros e altos valores de equipamento e análise (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

Neste contexto, Squina e Mercadante (2003) analisaram por CLAE a composição de carotenoides de cinco linhagens da levedura *Rhodotorula* e determinaram em maiores concentrações, através da coluna C18, os carotenoides: torularrodina, toruleno, γ-caroteno e β-caroteno. Moreschi e Almeida-Muradian (2007) quantificaram ácido pantotênico em fórmulas infantis por meio de CLAE e coluna C18.

Os pesquisadores Lopes et al. (2009) avaliaram taninos em plantas medicinas utilizando CLAE, coluna C18 e fase móvel água e acetonitrila. Ademais, o uso de CLAE em análise de alimentos é extensivamente relatado na literatura (CHINNICI et al. 2005; RIZZON;

SGANZERLA, 2007; SCHERER; RYBKA; GODOY, 2008; LIMA; SCHULER; GUERRA, 2010; RANGEL et al. 2011; LIMA et al. 2014; SANTOS; SANTOS; AZEVEDO, 2014).

3.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Habitualmente, as análises relacionadas à pesquisa de ácidos orgânicos e açúcares em bebidas são eficientes, mas em sua maioria são métodos demorados, onerosos e trabalhosos, limitando assim a caracterização destas bebidas por parte das indústrias e centros de pesquisa. Para tanto, tem sido investigado técnicas de análises rápidas, fáceis e simples para tal caracterização, sendo muito investigada a espectroscopia no infravermelho em diversos fins da área alimentícia.

A espectroscopia estuda a interação que ocorre entre a radiação eletromagnética e a matéria, determina os níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares. A energia corresponde ao movimento dos elétrons em torno do núcleo, sendo os diferentes estágios do movimento conhecidos como estados eletrônicos. Assim, as transições eletrônicas estão relacionadas às mudanças de orbital atômico. Para as moléculas, as transições eletrônicas relacionam-se a mudanças de energia dos elétrons de valência, e também possuem energia vibracional e rotacional (SKOOG; LEARY, 1992).

Foi na Segunda Guerra Mundial que a espectroscopia teve uma de suas primeiras aplicações como ferramenta analítica, pois já se tinha conhecimento que os espectros no infravermelho armazenavam vastas informações sobre a amostra, desta forma, possuía elevado potencial de aplicação nos mais diversos tipos de análises químicas e físicas. Contudo, a extração de dados quantitativos através dos espectros no infravermelho era quase impossível, sendo empregada essencialmente como análise qualitativa e para reforçar hipóteses sobre a estrutura química de espécies (COSTA-FILHO; POPPI, 2002).

A partir dos anos 80, alguns acontecimentos de cunho científico e tecnológico auxiliaram uma grande mudança neste cenário, que proporcionaram a aquisição de grande número de dados de uma mesma amostra de forma simples. Porém, o tratamento desses inúmeros dados se tornou um empecilho, pois tornou os modelos altamente complexos. Tal problema só foi resolvido quando técnicas quimiometricas passaram a ser aplicadas, promovendo a utilização da espectroscopia na química analítica como ferramenta de análise em aplicações qualitativas e quantitativas (COSTA-FILHO; POPPI, 2002).

A radiação infravermelha está situada entre a região do visível e micro-ondas do espectro eletromagnético e é aplicada nas determinações qualitativas e quantitativas de espécies orgânicas e inorgânicas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A região espectral do infravermelho abrange radiação com números de onda na faixa de 12500 a 10 cm^{-1}. Se tratando de uma imensa faixa é subdividida em infravermelho próximo, infravermelho médio e infravermelho distante (Tabela 6) (MENDHAM et al., 2002; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Tabela 6 - Divisões da região do infravermelho

Região do infravermelho	Comprimento de onda (cm^{-1})	Frequência (µm)	Características
Próximo	12500 - 4000	0,8 - 2,5	Região harmônica/ combinação
Médio	4000 - 200	2,5 – 50	Região de vibração rotação
Distante	200 - 10	50 - 1000	Região de rotação

A partir da espectroscopia é possível determinar grupos funcionais presentes em uma amostra, onde cada grupo absorve em frequências diferentes, que podem ser de estiramento ou deformação e correspondem a níveis de energia da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

Os espectros de infravermelho podem ser empregados na identificação de compostos puros ou de impurezas. Sendo os compostos orgânicos passiveis de maiores aplicações, visto que a água absorve fortemente acima de 1,5 µm. Ainda, os compostos de origem inorgânica possuem bandas largas, enquanto os orgânicos têm muitas bandas agudas. Os espectros podem ser visualizados como “impressão digital” do composto. Quando há necessidade de identificar um composto desconhecido seu espectro pode ser comparado com espectros de outras substâncias que possuem alguma propriedade semelhante (MENDHAM et al., 2002).

Os métodos espectroscópicos em geral, são vantajosos em relação a outros, pois são métodos de análise não destrutiva, rápida, confiável e que necessita de pouca quantidade de amostra para a análise (COZZOLINO et al., 2004) e o uso como ferramenta analítica, no estudo de constituintes em alimentos tem se intensificado. O seu emprego resulta em métodos rápidos e exatos, aplicados amplamente no controle de qualidade de produtos alimentícios e em análises químicas (MORGANO et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2014).

3.5.1 Infravermelho próximo

A região espectral do infravermelho próximo abrange radiação com número de onda na faixa de 12.500 a 4.000 cm^{-1} e corresponde a faixa de energia aproximada de 2,65 x 10^{-19} a 7,96 x 10^{-20} J (MENDHAM et al., 2002).

A região do infravermelho próximo está relacionada especialmente a vibrações fundamentais de primeiro, segundo e terceiro sobretons de bandas fundamentais, assim como, bandas de combinações. Os sobretons nada mais são do que transições múltiplas das transições fundamentais, que acontecem do nível vibracional fundamental para os demais níveis (SOUZA et al., 2013).

Essas transições de sobretons são “proibidas”, porém são notadas devido a anarmonicidade dos osciladores reais, e estas bandas são de 10 a 1000 mais fracas do que as fundamentais (MENDHAM et al., 2002) e são obtidas pela soma ou diminuição dos números de onda afim de se obter uma única banda (SOUZA et al., 2013).

A absorção da radiação no NIR ocorre quando a energia do fóton incidente é igual a diferença de energia entre dois níveis vibracionais e o campo elétrico oscilante da radiação incidente interage com a molécula, que acontece se houver mudança no momento de dipolo da molécula ocasionada pelo deslocamento dos átomos na vibração (SOUZA et al., 2013). Por apresentarem momento de dipolo e anarmonicidade, as ligações envolvidas nesses modos de vibração são normalmente C-H, N-H e O-H que são componentes estruturais fundamentais das moléculas orgânicas (COZZOLINO et al., 2006; SKOOG et al., 2011).

A técnica, quando usada para a determinação de um componente em particular, precisa de um conjunto de amostras de calibração, pois a resposta fornecida pelo equipamento não é capaz de revelar a informação desejada. Logo, o parâmetro de interesse é quantificado através de análises que utilizam um método de referência em conjunto com a quimiometria (MORGANO et al., 2007).

Neste contexto, Morgano e colaboradores (2005) trabalharam no desenvolvimento de um método para a quantificação do teor de proteína em amostras de café com o auxílio de infravermelho NIR e método de calibração PLS.

Sauer-Leal, Okada e Zamora (2008) desenvolveram metodologia analítica para auxiliar no controle de qualidade do queijo prato que incluem análises de gordura, proteína, cinzas, extrato seco, pH e umidade empregando infravermelho próximo e PLS.

3.6 QUIMIOMETRIA

A Quimiometria é pertencente a uma área multidisciplinar do conhecimento, em que a matemática e a estatística trabalham em conjunto na análise de dados de processos químicos, de natureza multivariada (FERRÃO et al., 2004).

Dentre as subáreas da quimiometria recebe destaque o planejamento de experimentos, reconhecimento de padrões e a calibração multivariada (SOUZA; POPPI, 2012). Tem sido empregada principalmente na otimização e planejamento de experimentos e aquisição de informações químicas pela análise de dados relevantes (MENDHAM et al., 2002).

Surgiu quando a estatística univariada não era mais capaz de descrever e analisar dados químicos e desde o começo foi descrita como a responsável por vencer as limitações da univariada usando delineamento experimental, classificação multivariada e calibração multivariada, fazendo uso de métodos oriundos da matemática, estatística e computação (GELADI, 2003).

3.6.1 Análise Multivariada e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Os métodos de calibração multivariada são extensivamente utilizados na química analítica, especialmente quando se deseja determinar um componente em uma mistura, mas através da resposta instrumental não é possível identificar os componentes individuais. O método baseia-se em estabelecer uma relação entre duas matrizes de respostas químicas, em que haja dependência entre suas propriedades (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

A calibração multivariada é composta por duas fases: calibração e previsão. Na calibração, são obtidos “n” espectros de um conjunto de amostras com composição conhecida em “p” valores de comprimento de onda diferentes originando uma matriz X, com “n” linhas e “p” colunas. Ainda uma matriz Y é formada contendo os valores de concentração de diferentes amostras, com “n” linhas e “q” colunas, que referenciam o número de diferentes analitos contidos nas amostras (FERREIRA et al., 1999; NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

Na sequência desenvolve-se um modelo matemático adequado (determinando o vetor dos coeficientes de regressão – b) capaz de reproduzir Y cal através de dados da matriz X cal (Equação 2). Tal modelo é utilizado na fase de previsão com o propósito de estimar as concentrações (Y prev) dos analitos de outras amostras a partir dos seus espectros (X teste)

(Equação 3). Essas metodologias trabalham com matrizes de dados, portanto, para isolar o fator Y da Equação 1 para obtenção da Equação 2, utiliza-se a matriz transposta de X $(Xteste)^t$ (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

$$Xcal = b \times Ycal \qquad \text{Equação 1}$$

$$Yteste = (Xteste)^t \times b \qquad \text{Equação 2}$$

Essa relação entre os espectros e as concentrações dos parâmetros pré-determinados das amostras é expressa através do vetor coeficiente de regressão (b), que pode ser determinado, por diferentes técnicas de calibração multivariada (ALLEGRINI; OLIVIERI, 2011; FERREIRA, 1999). Dentre essas técnicas, se destacam a regressão linear múltipla (MLR), regressão por componentes principais (PCA), redes neurais artificiais (RNA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) (JING; CAI; SHAO, 2010).

A regressão PLS é uma técnica multivariada de dados que combina a análise de componentes principais com a regressão linear múltipla. É utilizada para prever um conjunto de variáveis dependes dentro de um conjunto de variáveis independentes (SHETTY; GISLUM, 2011). Também, o método PLS é utilizado para selecionar variáveis na construção do modelo, que é feita com dados espectrais que contenham mais informação sobre a substância de interesse, assim como menor sobreposição espectral. Portanto, um número limitado de sinais é utilizado e os demais são descartados (SOROL et al., 2010).

Na análise de regressão PLS constrói-se um modelo de calibração responsável por relacionar dados espectrais (matriz X) com as concentrações da propriedade de interesse da amostra (SOROL et al., 2010). Uma vez determinado o coeficiente de regressão, ele pode ser utilizado para prever a concentração de uma nova amostra pelo seu espectro (ALLEGRINI; OLIVIERI, 2011). Com o modelo PLS as decomposições das matrizes X e Y são feitas simultaneamente por meio interativo e acredita-se que a informação contida em Y é transferida para X (FERRÃO et al., 2004).

O modelo deve ser robusto o suficiente para permitir mudanças de matriz, matéria-prima, reagentes químicos (WESTAD; MARINI, 2015).

Gromski et al. (2015) relataram em seu último estudo a crescente popularidade do método PLS nos últimos dez anos e isto se deve principalmente ao fato do PLS ser particularmente interessante pois permite a análise de dados fortemente colineares, ruidosos e com numerosas variáveis, afirmam Wold, Sjostrom e Eriksson (2001).

3.6.2 Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA)

A Análise de Componentes Principais é uma análise exploratória que trabalha na redução da matriz original em uma matriz menor, sem perda das informações importantes. As Componentes Principais são eixos novos obtidos a partir de combinações lineares das variáveis originais (HAIR, 2005).

A ACP é um método que aceita reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados no novo sistema de eixos, logo, permite a observação dos dados multivariados em gráficos bi ou tridimensionalmente (SOUZA; POPPI, 2012). Na ACP a matriz X é decomposta em duas outras matrizes, de escores (T) e pesos/*loadings* (P) e uma matriz de erros (Equação) (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987).

$$X = TP^{T} + E \qquad \text{Equação 3}$$

Os escores são as relações das projeções dos dados nas Componentes Principais, e através delas é possível observar a semelhança entre as amostras (HAIR, 2005). Os *loadings* são os coeficientes da combinação, e informa o quanto cada variável contribui para determinada Componente Principal (SOUZA; POPPI, 2012). A primeira ACP é formada com base no maior comprimento da distribuição das amostras, enquanto a segunda ACP, sendo perpendicular à primeira, e o comprimento da distribuição é o segundo maior (HAIR, 2005).

Pela análise conjugada dos gráficos de escores e *loadings* podem-se observar quais variáveis de resposta são responsáveis pelas diferenças ou semelhanças entre o conjunto de amostras (SOUZA; POPPI, 2012).

A Análise Hierárquica de Agrupamentos é uma técnica que mede a distância entre as variáveis para o conjunto de dados das amostras e exibe essas informações por meio de um gráfico bidimensional conhecido como Dendograma. A partir desta análise é possível observar os agrupamentos, similaridade ou dissimilaridade entre as amostras e variáveis (PARREIRA, 2003).

O gráfico resposta (Dendograma) é desenvolvido levando em consideração a proximidade existente entre as amostras no espaço, medindo a distância de todas as amostras de duas em duas, formando diversos grupos, estes formam dois grupos mais similares e vão se agrupando até a formação de apenas um agrupamento (PARREIRA, 2003).

3.7 PROCESSAMENTO ESPECTRAL

O pré-processamento é uma das etapas determinantes para o sucesso na calibração multivariada, e são aplicados aos dados espectrais do conjunto de calibração com o objetivo de realçar as características dos espectros antes da modelagem, excluir informações não relevantes e reduzir a variabilidade dos dados (RINNAN; ENGELSEN; BERG, 2009). Fazem parte dos pré-processamentos mais utilizados a normalização, dados centrados na média, correlação multiplicativa de sinal, suavização, cálculos de primeira e segunda derivada.

3.7.1 Dados Centrados na Média

Dados centrados na média ou *Mean Centering* é a primeira etapa do pré-processamento e recomendada para quaisquer aplicações práticas (NICOLAI et al., 2007). Baseia-se no cálculo da média das intensidades para todos os comprimentos de onda e subtrai-se cada intensidade do valor médio (Equação 4). Assim, as variáveis passam a possuir média zero, isto é, as coordenadas são movidas para o centro dos dados, e as diferenças nas intensidades relativas das variáveis ficam mais facilmente percebidas (SOUZA; POPPI, 2012).

$$x_{ij\ (centrado\ na\ média)} = x_{ij\ (original)} - \bar{x}_{ij\ (média)} \qquad \text{Equação 4}$$

A técnica de centrar os dados na média na espectroscopia é intensamente utilizada por pesquisadores (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007; GONTIJO et al., 2014), especialmente no infravermelho próximo (NIR), e seu uso independe do tipo da matriz. Wold e colaboradores (2001) recomendam centralizar os dados na média antes da análise, para facilitar a interpretação e estabilidade numérica.

3.7.2 Normalização

A normalização atua na diminuição da influência das variações indesejadas no conjunto espectral e reduz o efeito da intensidade total de perfis de resposta, causado pela alteração do caminho ótico e variação da concentração da amostra. O cálculo (Equação 5)

considera a divisão de cada variável pela soma dos valores absolutos de todas as variáveis para cada amostra (SOUZA; POPPI, 2012).

$$x_{i\ norm} = \frac{x_i}{\sum_{j=1}^{n} |x_{ij}|} \qquad \text{Equação 5}$$

3.7.3 *Straight line subtraction*

Para determinadas faixas de frequência selecionadas, uma linha reta é ajustada no espectro e então é subtraída do mesmo com a utilização de mínimos quadrados parciais. As inclinações de linha base são excluídas (CONZEN, 2006).

3.7.4 Correlação Multiplicativa de Sinal (MSC)

É um dos mais utilizados em espectros oriundos da técnica NIR. Consiste em remover efeitos físicos dos espectros, como tamanho de partícula, opacidade e rugosidade que atuam de forma negativa como no deslocamento da linha base (RINNAN; ENGELSEN; BERG, 2009). É calculado pela Equação 6.

$$\mathrm{x_{ik}}(transformado) = \frac{\mathrm{x_{ik}}(original) - \mathrm{a_i}}{\mathrm{b_i}} \qquad \text{Equação 6}$$

Em que: $\mathrm{x_{ik}}(original)$ e $\mathrm{x_{ik}}(transformado)$ são as absorbâncias antes e depois da correção MSC em k comprimentos de onda; a_i e b_i são constantes estimadas a partir de uma regressão em mínimos quadrados de um espectro individual $\mathrm{x_{ik}}$ com a média de um espectro pertencente ao conjunto de calibração em todos os comprimentos de onda ou em um subconjunto, conforme a Equação 7 (SOUZA; POPPI, 2012).

$$\mathrm{x_{ik}} = \mathrm{a_i} + \mathrm{b_i}\,\bar{x} + \mathrm{e_{ik}} \qquad \text{Equação 7}$$

3.7.5 Aplicação da derivada

Os métodos de alisamento têm a capacidade de remover efeitos multiplicativos nos espectros, sem a redução da relação sinal/ruído (RINNAN; ENGELSEN; BERG, 2009). Também são eficientes na correção de deslocamento e inclinação da linha base e reduzem matematicamente os ruídos (FEUDALE et al., 2002; SOUZA; POPPI, 2012).

3.7.6 *Constant offset elimination*

Ocorre um deslocamento linear nos espectros, de maneira que o valor de y-mínimo seja equivalente a zero e têm como objetivo eliminar deslocamentos da linha base (CONZEN, 2006).

O uso de combinações de métodos distintos de pré-processamento é vasto na literatura e, inicialmente, qualquer associação é válida e possível (RINNAN; ENGELSEN; BERG, 2009). Braga e Poppi (2004) fizeram uso de centragem na média e primeira derivada como pré-processamento em estudo de pureza polimórfica de Carbamazepina em misturas de polimorfos com técnica MIR. Honorato et al. (2007) realizaram um estudo de caso com amostras de milho e aplicaram a derivada e suavização em seus espectros derivados do NIR.

Já os pesquisadres Rohman e Che-Man (2011) utilizaram os pré-processamentos de centragem na média juntamente com a derivação no estudo da adulteração de azeites de oliva com emprego da técnica MIR juntamente com PLS e PCR. Franceschini et al. (2013) aplicaram centragem na média e SNV em espectros de solos oriundos do NIR para construção de modelos de predição dos teores de argila, areia e silte.

3.8 VALIDAÇÃO DE MODELOS MULTIVARIADOS

A validação dos modelos de calibração multivariada é extensamente indicada pela literatura (WOLD; SJOSTROM; ERIKSSO, 2001; GIDSKEHAUG; ANDERSSEN; ALSBERG, 2008; ESBENSEN; GELADI, 2010) e se faz necessário após a construção dos modelos e antes da previsão de amostras desconhecidas.

A validação tem como finalidade avaliar a capacidade preditiva do modelo em estudo. Consiste em testar o modelo, em amostras não utilizadas na sua construção, prevendo suas

concentrações a fim de constatar se o modelo é capaz de inferir o comportamento do analito (FERREIRA et al., 1999).

A validação do modelo permite reconhecer as amostras *outliers*, as faixas de frequências mais adequadas e especialmente o número ótimo de variáveis latentes (CONZEN, 2006). Significa avaliar, comprovar que o desempenho da previsão é válido e garantir que o modelo trabalhará de acordo com a finalidade proposta (ESBENSEN; GELADI, 2010).

3.8.1 Métodos de validação

Segundo Esbensen e Geladi (2010) existem pelo menos quatro métodos de validação distintos: validação conjunto de teste, validação cruzada, validação corretiva e método de reamostragem.

As duas principais formas de validação são a validação interna chamada de validação cruzada (CV - *cross validation)* e a validação externa conhecida como conjunto-teste (TS - *test set validation)* (CONZEN, 2006), as quais foram utilizadas no presente estudo.

3.8.1.1 Conjunto-teste

No método de conjunto-teste (TS) as amostras são divididas em dois conjuntos de dados, um deles contendo 70% e outro 30% dos dados de análise (Figura 4). O conjunto maior é utilizado para construir os modelos através de curva de calibração. Na sequência o conjunto menor é usado para testar os modelos construídos pela diferença entre o valor real, obtido por método de referência, e o valor estimado pelo modelo. A avaliação do teste é fornecida pelo erro de predição (RMSEP) que compara a concordância entre as respostas (KOS; LOHNINGER; KRSKA, 2004).

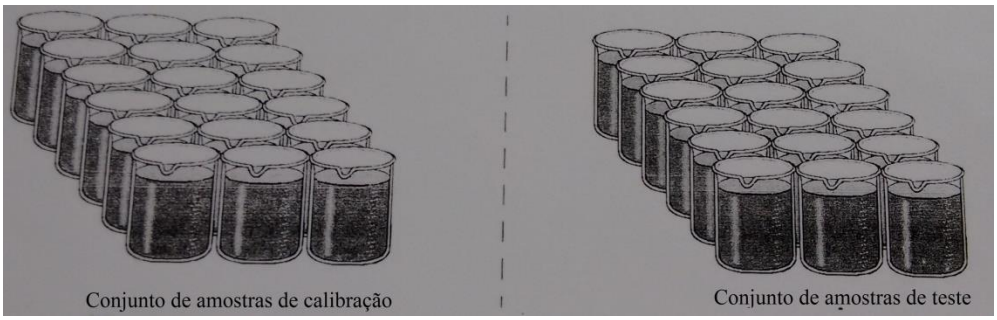


Figura 4 - Diagrama esquemático da validação conjunto-teste
Fonte: CONZEN (2006)

Kos, Lohninger e Krska (2003) abordam em seu estudo, que ao trabalhar com conjunto de amostras maior do que 50, a validação do tipo conjunto-teste é mais indicada, enquanto que para conjunto médios e pequenos é a validação cruzada.

Entretanto, Westad e Marini (2015) defendem que quando se tem como objetivo desenvolver modelos de calibração para a previsão de concentrações desconhecidas em amostras indica-se a validação por conjunto-teste, independentemente do número de amostras total. Ainda, Esbensen e Geladi (2010) relatam que os objetivos da validação conjunto-teste sempre são estruturalmente corretos e completos.

3.8.1.2 Validação Cruzada

Na validação cruzada (CV) um espectro do conjunto de calibração é excluído e o modelo é construído com os outros espectros das outras amostras e realiza-se a previsão do analito em estudo utilizando um número crescente de variáveis latentes (VL). O procedimento é repetido para todas as amostras de calibração e o erro de previsão (RMSECV) é estimado (Figura 5).

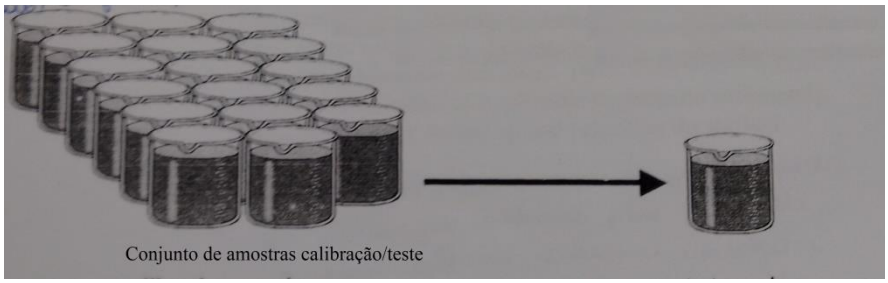


Figura 5 - Diagrama esquemático da validação cruzada
Fonte: CONZEN (2006)

A CV é conhecida como o segundo melhor método de validação, embora em alguns casos seja mais indicada como por exemplo: quando se precisa de todas as amostras para construir o modelo e não se pode deixar 30% das amostras em um conjunto-teste separado (WESTAD; MARINI, 2015). No entanto, na literatura é reportada como a mais simples e é usada na maioria das aplicações da quimiometria (XU; LIANG, 2001).

Xu e Liang (2001) relatam que algumas vezes a CV com "*leave-one-out*" causam *overfitting*, e fornecem um valor subestimado do erro de previsão, sendo que o modelo muitas vezes tem bons resultados na fase de calibração, mas é pobre na previsão.

Cayuela (2008) analisou amostras de laranja e fez uso de validação cruzada para o desenvolvimento de modelos de calibração para a quantificação de sólidos solúveis totais através de PLS. Shi et al. (2012) utilizaram método de validação cruzada "*leave-one-out*" e PLS no estudo do conteúdo de flavonoides em folhas frescas de Ginkco Biloba.

3.8.2 Escolha do número de variáveis latentes

A escolha do número de variáveis latentes a serem incluídas no modelo de calibração é muito importante e o número ótimo a ser utilizado pode ser determinado através da validação cruzada, em que se considera a magnitude dos erros de precisão (FERREIRA et al., 1999; CAYUELA, 2008; HAWKINS; KRAKER, 2010).

Quando a validação é concluída e com o erro de previsão (RMSECV) calculado para cada número de VL, verifica-se o momento em que o erro não varia de forma significativa para determinado número de VL, sendo este o número ideal (SOUZA et al., 2013). Em outras palavras, o número de VL é determinado como aquele que minimiza o erro RMSECV sem aumentar significativamente a complexidade do modelo e ainda sem causar a supervalorização (Figura 6) (NICOLAI et al., 2007).

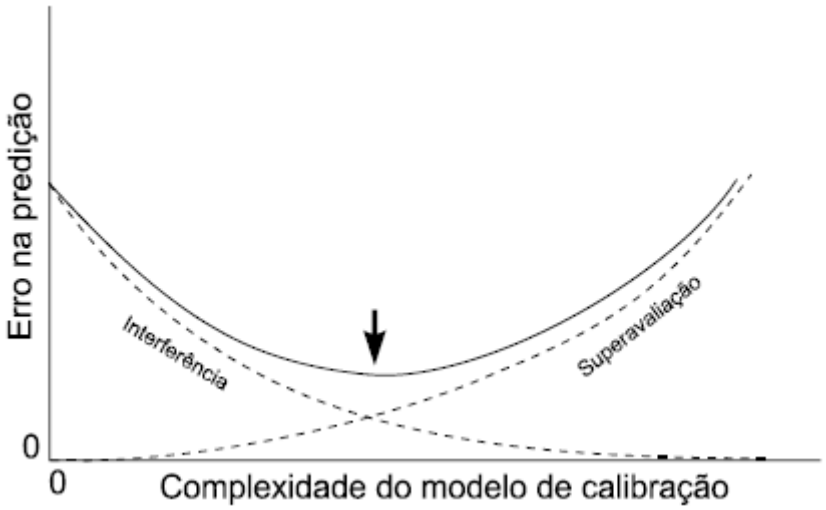


Figura 6 - Relação entre o erro e o número ótimo de variáveis latentes
Fonte: FERRARINI (2004)

A utilização de poucas VL faz com que a estrutura espectral não seja reconhecida suficientemente. A regressão correspondente pode nunca conduzir um resultado de análise satisfatório causando *underfitting* ou dados pouco ajustados. No entanto, se o número de VL for elevado, o ruído espectral pode ser incorporado, também dando origem a resultados não satisfatórios (*overfiting*) (CONZEN, 2006).

3.8.3 Investigação das amostras anômalas

A verificação dos chamados "*outliers*" ou amostras anômalas não é menos importante do que a escolha do número de VL, pois implica na qualidade do conjunto das amostras de calibração, necessitando que estas sejam representativas e homogêneas (FERREIRA et al., 1999), devendo ser retiradas aquelas que têm comportamento espectral diferenciado da média ou se apresentam de forma solitária podendo distorcer o modelo (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

Utiliza-se para a detecção dos "*outliers*" as informações fornecidas pelos resíduos de *Student* e "*leverage*", em que se classifica como amostra anômala, aquela que apresenta altos valores destas duas grandezas (BARTHUS; MAZO; POPPI, 2005).

A "*leverage*" é a medida de quanto à amostra influencia o modelo de regressão. Um valor pequeno indica que a amostra está próxima ao centro de dados e tem pouca influência na construção do modelo, contrariamente, quando se tem valores experimentais diferentes da média das amostras, ou seja, valores de "*leverage*" altos, estes possivelmente influenciaram de forma negativa o modelo (BARTHUS; MAZO; POPPI, 2005).

3.8.4 Parâmetros de previsão

Para verificar a capacidade de previsão dos modelos construídos indica-se a utilização de equações de estimativa de erros, estas podem ser aplicados tanto aos dados de calibração quanto aos de validação, para tanto usa-se ao final da sigla, C para conjunto de calibração, V ou P para validação e ainda CV quando a validação cruzada. O uso do R^2 também é indicado como parâmetro de avaliação, assim como o RPD.

- RMSEC: O erro quadrático médio de calibração (*Root Mean Square Error of Calibration*) descreve o grau de concordância entre os valores verdadeiros usados na

construção do modelo e os valores previstos pelo modelo de calibração. O RMSEC é calculado pela Equação 8.

$$RMSEC = \sqrt{\frac{1}{I - p}\sum_{i=1}^{I}(y_i - \hat{y}_i)^2} \qquad \text{Equação 8}$$

Em que: I é o número total de amostras no conjunto de calibração; p é o número de parâmetros estimados no modelo de calibração; y_i é a concentração da amostra i; e $\hat{y}_i$ é a concentração da amostra i estimada pelo modelo de calibração.

- RMSEP: É utilizado para avaliar os modelos de calibração na fase de validação, em que são utilizadas amostras diferentes das da fase de calibração. O RMSEP (*Root Mean Square Error os Prediction*) ou erro quadrático médio de precisão determina a concordância entre as previsões do modelo para as amostras de validação e os valores reais (Equação 9).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{A}\sum_{a=1}^{A}(y_i - \hat{y}_i)^2} \qquad \text{Equação 9}$$

Em que A é o número de amostras do conjunto de validação, $\hat{y}_i$ é o valor de referência e o y_i valor previsto pelo modelo para a iésima amostra;

- RPD: Conhecido como taxa de desvio de *performance* é definida como a relação existente entre o desvio padrão (DP) da variável resposta e o erro padrão da validação cruzada ou conjunto-teste. O valor de RPD entre 1,5 e 2,0 indica discriminações baixas a partir de valores altos da variável resposta, de 2,0 a 2,5 significa que algumas das previsões feitas pelo modelo podem ser grosseiras, e valores acima de 2,5 indicam uma boa ou excelente predição (Equação 10) (NICOLAI et al., 2007).

$$\text{RPD} = \frac{\text{DP}}{\text{SECV}} \qquad \text{Equação 10}$$

3.9 APLICAÇÃO DE MODELOS DE REGRESSÃO MULTIVARIADA E ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA EM ALIMENTOS

Estudos relevantes têm sido relatados na literatura a respeito da espectroscopia no infravermelho como técnica analítica utilizada em conjunto com técnicas quimiométricas para determinar constituintes em alimentos, análise e caracterização de frutas e bebidas, controle de qualidade, assim como, adulterações em produtos alimentícios.

De Oliveira e colaboradores (2014) compararam métodos espectroscópicos utilizando MIR e NIR, aliado a PLS e PCA, na análise de ácidos orgânicos, açúcares e carotenoides em frutos de maracujá. Obtiveram melhores resultados para a determinação dos ácidos com a utilização de NIR e para açúcares e carotenoides utilizando MIR.

Martelo-Vidal e Vázquez (2014) aplicaram espectroscopia UV-VIS e NIR com PLS e PCR na avaliação de compostos como glicerol, etanol, ácido málico, tartárico e acético em vinhos e observaram bons modelos de previsão e viabilidade para uso dos modelos (PLS e PCR) para a quantificação dos compostos separados.

Chen e colaboradores (2011) avaliaram o potencial da utilização de NIR e PLS para diferenciar mel puro de mel adulterado (xarope de milho). O estudo indicou que foi possível discriminar mel adulterado do não adulterado e a previsão dos resultados foi satisfatória.

Visando substituir método existente para caracterizar amostras de cevada, Cozzolino e Eglinton (2014) trabalharam com infravermelho médio e PLS. O estudo da gelatinização da cevada foi realizado para verificar sua relação com a qualidade da maltagem e os resultados da análise multivariada demonstraram que seu uso pode simplificar e diminuir significativamente o tempo de análise.

Bassbasi et al. (2014) construíram modelos de calibração multivariada para a determinação de gordura em leite usando MIR e ATR. A adulteração de manteiga foi estudada por Koca e colaboradores (2010) através de infravermelho médio e acessório ATR.

Irudayaraj e Tewari (2003) utilizaram a espectroscopia de infravermelho (FT-IR) aliado aos métodos PLS e PCR para a determinação dos açúcares (sacarose, glicose, frutose e sorbitol) e ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido málico) em sucos de maçã. Desenvolveram um método rápido e não destrutivo para monitoramento de rotina dos vários componentes em uma unidade de produção de suco de maçã.

Rodriguez-Saona e colaboradores (2001) desenvolveram uma metodologia para a rápida identificação e quantificação dos açúcares sacarose, glicose e frutose em sucos de maçã

e laranja usando NIR e métodos multivariados, permitindo uma precisa previsão dos resultados.

A utilização das técnicas espectroscópicas em conjunto com as quimiométricas produzem bons modelos que vêm para simplificar e baratear as determinações usuais para diversos tipos de alimentos, facilitando a rotina analítica de laboratórios e indústrias, bem como, pode auxiliar a discriminar alimentos fraudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental do projeto foi desenvolvida nos Laboratórios de Alimentos, Apoio a Pesquisa e na Central de Análises. Ambos os laboratórios localizados na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Pato Branco.

Na Figura 7 é apresentado um fluxograma com as principais etapas que foram realizadas no presente estudo.

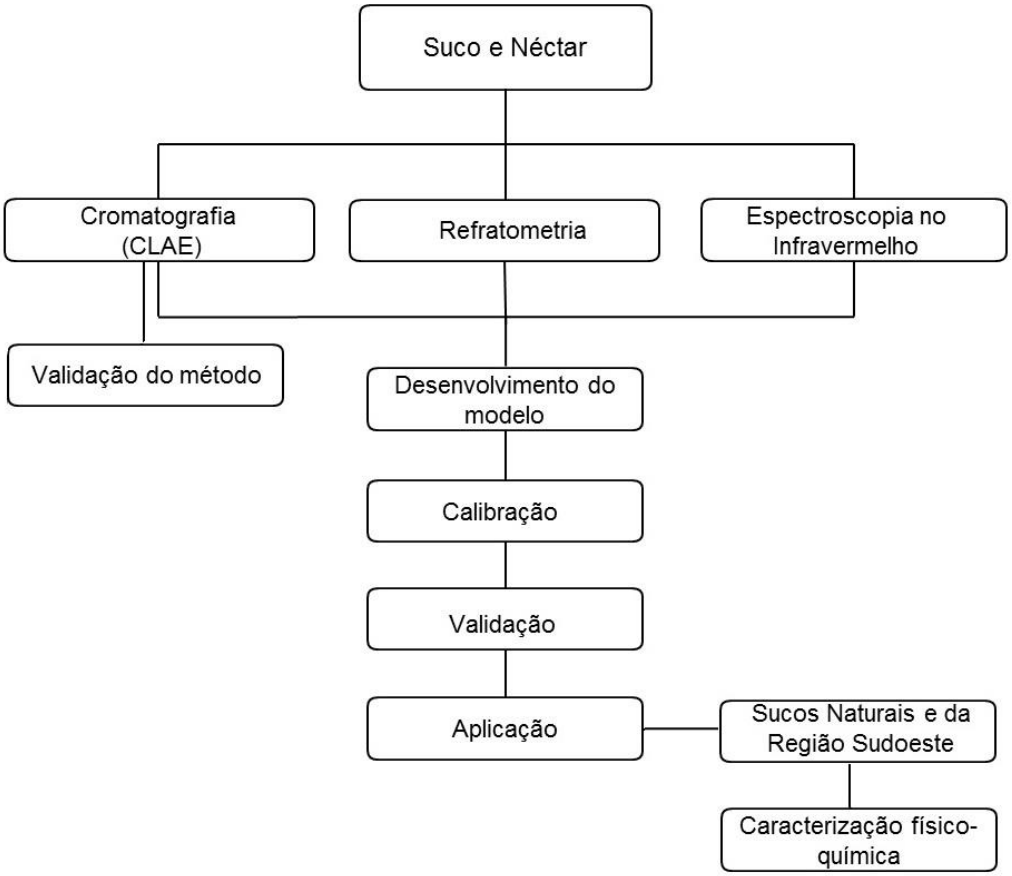


Figura 7 - Fluxograma das principais etapas realizadas no estudo

4.1 AMOSTRAS

As amostras de sucos integrais e néctares foram adquiridas em supermercados na cidade de Pato Branco - Paraná, tendo sido considerado como estratégia de amostragem a coleta de dois lotes diferentes para cada bebida e pelo menos duas diferentes marcas para cada sabor. A escolha (sorteio) dos sabores das bebidas bem como a marca comercial ocorreu após um levantamento inicial sobre a disponibilidade das mesmas em mercados locais.

Foram adquiridas 42 amostras de bebidas comercias que receberam códigos de identificação descritos no Quadro 1, em que é relacionado o tipo de bebida (suco ou néctar), sabor (laranja, uva, uva branca, tangerina, maça, pêssego, abacaxi e goiaba), letra inicial da marca e lote correspondente da bebida (L1 ou L2). Após a identificação, as amostras passaram por procedimentos de análises e foram mantidas sob congelamento a -18 °C.

Amostra	**Código**	**Amostra**	**Código**	**Amostra**	**Código**
Suco de Laranja	SLFL1	Néctar de Laranja	NLDL1	Néctar de Maçã	NMSL1
Suco de Laranja	SLFL2	Néctar de Laranja	NLDL2	Néctar de Maçã	NMSL2
Suco de Laranja	SLNL1	Néctar de Laranja	NLSL1	Néctar de Pêssego	NPSL1
Suco de Laranja	SLNL2	Néctar de Laranja	NLSL2	Néctar de Pêssego	NPSL2
Suco de Uva	SUDL1	Néctar de Uva	NUFL1	Néctar de Pêssego	NPPL1
Suco de Uva	SUDL2	Néctar de Uva	NUFL2	Néctar de Pêssego	NPPL2
Suco de Uva	SUBAL1	Néctar de Uva	NUDL1	Néctar de Abacaxi	NASL1
Suco de Uva	SUBAL2	Néctar de Uva	NUDL2	Néctar de Abacaxi	NASL2
Suco de Uva	SUTAL1	Néctar de Uva	NUBPL1	Néctar de Abacaxi	NADL1
Suco de Uva	SUTAL2	Néctar de Uva	NUBPL2	Néctar de Abacaxi	NADL2
Suco de Tangerina	STDL1	Néctar de Tangerina	NTSL1	Néctar de Goiaba	NGDL1
Suco de Tangerina	STDL2	Néctar de Tangerina	NTSL2	Néctar de Goiaba	NGDL2
Suco de Maçã	SMNL1	Néctar de Tangerina	NTML1	Néctar de Goiaba	NGML1
Suco de Maçã	SMNL2	Néctar de Tangerina	NTML2	Néctar de Goiaba	NGML2

Quadro 1 - Relação das bebidas utilizadas na construção dos modelos e seus códigos

4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

A análise cromatográfica qualitativa e quantitativa dos açúcares: sacarose, glicose e frutose e ácidos orgânicos: cítrico, ascórbico, málico e tartárico foi realizada com o auxílio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando-se um equipamento da marca Varian, modelo 920-LC (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA). Os açúcares e ácidos orgânicos foram quantificados em amostras de sucos e néctares industrializados.

4.2.1 Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos e açúcares

Para a separação simultânea dos analitos nas amostras utilizou-se uma coluna AMINEX HPX-87H (300 mm x 7,8 mm - Bio-Rad, Hecules, CA), e dois detectores, o Índice de Refração (RI) para os açúcares e Arranjo de Diodos (DAD) para os ácidos, sendo a temperatura do forno fixada em 45 ºC.

A fase móvel constituiu-se de uma solução de ácido sulfúrico 0,008 mol.L^{-1} em modo isocrático com fluxo de 0,6 mL.min^{-1}, tais condições de análise foram indicadas pelo fabricante da coluna (Anexo 1). As amostras foram preparadas em triplicata.

Para a quantificação dos açúcares e ácidos orgânicos utilizou-se de padrões autênticos e com elevada pureza. Uma breve descrição dos mesmos pode ser observada através da Tabela 7.

Tabela 7 - Descrição, tempo de retenção e detecção dos padrões de ácidos orgânicos e açúcares utilizados nas análises

Composto	Fórmula molecular	Pureza (%)	Marca	t_r	Detecção*
Ácido L-ascórbico	$C_6H_8O_6$	99,4	SUPELCO	9,53	DAD
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	99,9	SUPELCO	7,83	DAD
D-málico	$C_4H_6O_5$	99,9	SUPELCO	9,32	DAD
D-tartárico	$C_4H_6O_6$	99,2	SUPELCO	8,37	DAD
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	99,5	SIGMA	7,45	RI
Frutose	$C_6H_{12}O_6$	99,0	SIGMA	9,58	RI
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	99,5	SIGMA	8,82	RI

*DAD: Detector Arranjo de Diodos (comprimento de onda de 250 nm para ácido ascórbico e 210 nm para demais ácidos) e RI: Detector Índice de Refração

O procedimento de tratamento das amostras de bebidas na pré-injeção foi a diluição das mesmas em fase móvel (1:20), filtração em filtro CHOMAFIX de 0,45 µm, filtração em cartuchos SEP PACK C18 para a retirada de interferentes e finalmente injeção em cromatógrafo líquido com o volume das injeções fixados em 20 µL.

Os analitos foram identificados e quantificados por comparação do tempo de retenção e absorção característica, com padrões autênticos e através da padronização externa. Todos os reagentes utilizados na análise cromatográfica foram de grau cromatográfico.

4.2.2 Validação do método cromatográfico

A validação do método cromatográfico realizou-se de acordo com as instruções impostas pela legislação através do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (BRASIL, 2003).

4.3.2.1 Parâmetros estimados na validação do método

Os parâmetros levados em consideração na validação do método cromatográfico nas condições descritas no item 6.3 foram: linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção e quantificação.

A linearidade foi obtida em função das curvas de calibração, que por sua vez foram construídas plotando-se a área do pico dos compostos em estudo *versus* a concentração do analito testado, utilizando-se 6 faixas de concentração das soluções padrões. A curva foi construída a partir da adição da massa de cada padrão a 25 mL de água ultra pura, a fim de se obter uma solução estoque onde se encontravam o mix de açúcares e ácidos nas concentrações de 0,5 g.100 mL^{-1} e 0,1 g.100 mL^{-1} respectivamente, tais concentrações foram selecionados com base em antecedentes bibliográficos. A partir da solução estoque foram executadas as diluições para as concentrações subsequentes (Tabela 8) que posteriormente foram injetadas em triplicata.

Tabela 8 - Concentrações da curva de calibração cromatográfica para ácidos orgânicos e açúcares

$V_{PAD\ (mL)}$	$V_{FM\ (mL)}$	$C_{ÁCIDOS}$ (g.100 mL^{-1})	$C_{AÇÚCARES}$ (g.100 mL^{-1})
0,02	9,98	0,0002	0,0010
0,05	9,95	0,0005	0,0025
0,10	9,99	0,0010	0,0050
0,25	9,75	0,0025	0,0125
0,50	9,50	0,0050	0,0250
1,00	9,00	0,0100	0,0500
2,00	8,00	0,0200	0,1000
3,00	7,00	0,0300	0,1500
4,00	6,00	0,0400	0,2000
5,00	5,00	0,0500	0,2500
10,00	0,00	0,1000	0,5000

V_{PAD}: Volume da solução estoque do padrão; V_{FM}: Volume da fase móvel; $C_{ÁCIDOS:}$ Concentração final para os ácidos orgânicos; $C_{AÇÚCARES}$: Concentração final para os açúcares.

A precisão do método foi determinada com base na repetibilidade e precisão intermediária. Para a análise da repetibilidade, também chamada de precisão intra-corrida, foram realizadas 6 (seis) injeções consecutivas do padrão em um mesmo dia com a mesma instrumentação e analista. A precisão intermediária, conhecida como precisão inter-corridas, foi determinada pela injeção de uma amostra com o mesmo instrumento, porém com analistas diferentes, em seis dias. Os resultados expressos em porcentagem de coeficiente de variação (CV%).

O limite de detecção (LD) foi calculado a partir da Equação 11 com base na relação de 3 (três) vezes o sinal do ruído da linha base (SLB). Já o limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir da Equação 8, com base na relação de 12 (três) vezes o sinal do ruído da linha base.

$$LD = SLB \times 3 \qquad \text{Equação 11}$$

$$LQ = SLB \times 10 \qquad \text{Equação 12}$$

4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (FT-NIR)

As análises de infravermelho na região do próximo foram realizadas em um espectrômetro de bancada *Spectrometer* da Brucker modelo MPA (I24310) com transformada de Fourier, empregando o *software* Opus 7.2 quant2 da Brucker.

As medidas foram realizadas em modo transmitância e os espectros foram coletados com resolução espectral de 8 cm^{-1} e com acumulação de 32 varreduras, em número de onda no intervalo de 12.500 a 4.000 cm^{-1}, registrados em triplicata.

Para a aquisição dos espectros as amostras foram inicialmente filtradas em papel filtro qualitativo de 0,45 µm, transferidas para *vial* e inseridas no equipamento para leitura espectral conforme instrução do fabricante (Figura 8).

Figura 8 – Amostras de sucos de uva, laranja, maçã e abacaxi em *vial*

4.4 SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS

A quantificação dos teores de sólidos solúveis totais para a construção de modelos de calibração multivariada foi realizada através de método de referência em que foi utilizado um refratômetro (*Instrutherm* RT-280) com escala variável de 0 a 90 °Brix, seguindo o procedimento 315/IV descrito por Zenebon, Pascuet e Tiglea (2008).

4.5 ANÁLISE EXPLORATÓRIA

Análise Fatorial (AF), Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA) foram aplicadas à matriz de dados para observar as diferenças e semelhanças entre as amostras e suas variáveis dependentes. O pré-processamento utilizado no tratamento das amostras para a análise exploratória foi o auto-escalonamento.

4.5 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A metodologia estatística empregada para o desenvolvimento dos modelos de calibração dos dados do presente estudo foi a regressão por PLS (regressão por mínimos quadrados parciais) (GELADI; KOWALSKI, 1986), a qual foi responsável por relacionar concentração e espectros das amostras.

Na construção dos modelos, foram utilizados 126 espectros (n=126) oriundos das replicatas, organizados em uma matriz de dados, que foram correlacionadas a um vetor que armazena as concentrações médias dos ácidos cítrico, ascórbico, málico e tartárico e dos açúcares sacarose, glicose, frutose e sólidos solúveis totais. Dentre o número total de espectros lidos, aproximadamente dois terços (84) foram empregados na fase de calibração do modelo e um terço (42) para a fase de validação (validação por conjunto de teste).

Os espectros foram inicialmente centrados na média e posteriormente, pelo menos mais um pré-processamento foi utilizado. Para determinar o número ideal de variáveis latentes dos modelos foi aplicado o método de validação cruzada, em que foram avaliados os erros de previsão (Equação 8), sendo escolhido o número de VL que apresentou os menores erros.

Para avaliar o desempenho dos modelos desenvolvidos, as seguintes figuras de mérito foram observadas: erros quadráticos médios (RMSE - *Root Mean Square Error*), de calibração (RMSEC), de validação cruzada (RMSECV) e de previsão (RMSEP), assim como o R^2 e RPD. Já a presença ou ausência de "*outliers*" foi verificada visualmente por meio da utilização dos gráficos de resíduos de *Student versus* "*leverage*", bem como sua presença foi também detectada por meio do *software.*

As amostras utilizadas na calibração e validação dos modelos foram escolhidas pelo próprio programa do equipamento, sendo na sequência os modelos otimizados e assim elegidas as regiões de trabalho, assim como os pré-processamentos que fornecessem os valores mais indicados para as figuras de mérito. Na construção dos modelos de calibração multivariada foi empregado o *software* OpusLab e no desenvolvimento de gráficos e figuras ilustrativas, o *software* Origin 6.0.

4.6 APLICAÇÃO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Para avaliação da capacidade do método em realizar a quantificação dos analitos, foram coletadas amostras de sucos de uva produzidos na região Sudoeste do Paraná (SUAP1, SUAP2, SUAP3, SUAP4, SUAP5), bem como sucos naturais foram elaborados (Quadro 2). Além da caracterização química das amostras via modelo de calibração, determinações físico-químicas foram realizadas.

Sucos da Região Sudoeste	
Sabor	Código
Suco de uva A	SUAP1
Suco de uva B	SUAP2
Suco de uva C	SUAP3
Suco de uva D	SUAP4
Suco de uva E	SUAP5
Suco de uva F	SUAP6
Sucos Naturais	
Suco de laranja	SLN
Suco de laranja lima	SLLN
Suco de abacaxi	SAN
Suco de maçã	SMN
Suco de uva	SUN

Quadro 2 - Códigos das amostras utilizadas na aplicação dos modelos

A preparação dos sucos naturais teve apenas o objetivo de aplicação dos modelos. As frutas utilizadas para a elaboração dos sucos de laranja, laranja lima, abacaxi, maçã e uva foram adquiridas em supermercado local na cidade de Pato Branco – PR, e são cultivadas em diferentes regiões do Brasil. As frutas foram higienizadas, extração em centrifuga de frutas (Philips Walita RI) e posteriormente analisadas.

4.6.1 Análise Físico-química

A caracterização físico-química das amostras para aplicação ocorreu através de análises de umidade, pH, cinzas, acidez titulável, sólidos totais e *ratio*, utilizando os seguintes métodos oficiais pulicados pelo Instituto Adolfo Lutz (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008): 012/IV, 017/IV, 018/IV, 311/IV, 313/IV,315/IV e 316/ IV respectivamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata e seus resultados tratados pelo Teste Tukey para comparação de médias ($p<0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AMOSTRAGEM

As amostras de suco e néctar, no momento da coleta, estavam corretamente acondicionadas em embalagens originais de vidro ou *tetra-pak* (1L), tendo sido descritas as informações exigidas pela legislação, sob as normas da RDC n° 259/2002 (BRASIL, 2002), como data de validade e lote, ingredientes utilizados para a fabricação da bebida, conteúdo, rotulagem nutricional, origem e instrução sobre o consumo do alimento.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A metodologia utilizada como referência para a determinação simultânea dos ácidos orgânicos e açúcares em amostras de sucos e néctares, foi à técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Por meio das Figuras 9 e 10 podem ser observados os cromatogramas de uma solução contendo a mistura dos padrões dos ácidos cítrico, málico, ascórbico, tartárico (0,100 g.100 mL^{-1}) e dos açúcares sacarose, glicose e frutose (0,500 g.100 mL^{-1}) utilizando detectores DAD e IR respectivamente.

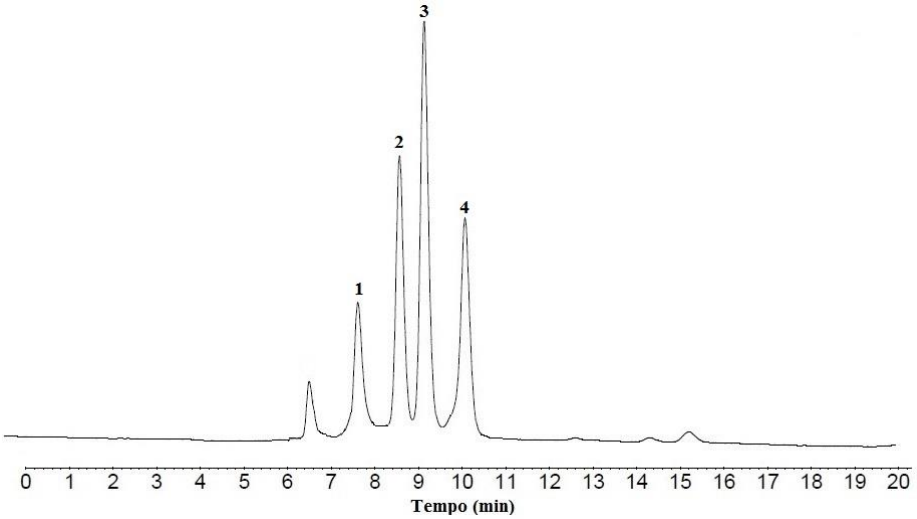


Figura 9 - Cromatograma obtido a partir de solução de padrões dos ácidos orgânicos com detector DAD em sistema CLAE: cítrico (1), tartárico (2), málico (3), ascórbico (4).

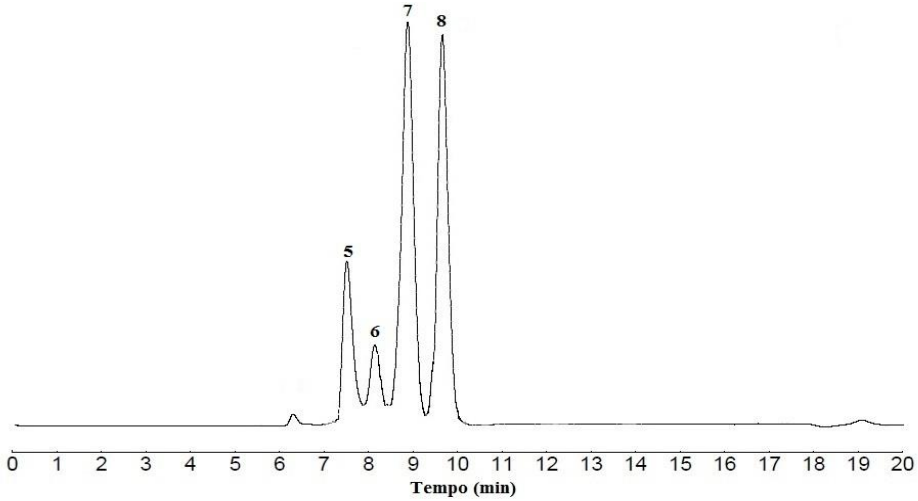


Figura 10 - Cromatograma obtido a partir de solução de padrões de açúcares com detector IR em sistema CLAE: sacarose (5), pico não identificado (6), glicose (7) e frutose (8).

O emprego da coluna de separação aliada a composição e vazão da fase móvel permitiu a adequada separação cromatográfica observada nos cromatogramas, onde se evidenciam os sinais cromatográficos relativos a cada composto estudado: ácidos cítrico, málico, ascórbico, tartárico e açúcares sacarose, glicose e frutose, assim como, os respectivos tempos de retenção, sendo que o tempo total para a análise simultânea dos analitos foi de 20 minutos.

A ordem de eluição dos compostos padrão no cromatograma indicados pelas Figuras 9 e 10 refletem as diferentes interações entre os analitos, fase estacionária e fase móvel. Neste contexto, Sequeira (2012), em seu estudo de análise de açúcares e ácidos orgânicos em bebidas comerciais (sucos, néctares e refrigerantes) obteve a seguinte ordem de eluição: cítrico, málico e ascórbico (detecção DAD) e sacarose, glicose e frutose (detecção IR), portanto, similar ao encontrado neste trabalho, tendo os autores observado também a presença de um pico não identificado, atribuído a uma possível contaminação de padrão, fase móvel ou ainda vidrarias.

As faixas de linearidade para os açúcares foram: 0,0025 a 0,5 g.100 mL^{-1} para frutose e sacarose e para glicose foi de 0,005 a 0,5 g.100 mL^{-1}, para os ácidos orgânicos: 0,0002 a 0,1 g.100 mL^{-1} para cítrico, 0,0002 a 0,04 g.100 mL^{-1} para tartárico, 0,0025 a 0,05 g.100 mL^{-1} para ascórbico e 0,001 a 0,05 g.100 mL^{-1} para málico.

O método cromatográfico foi validado através de parâmetros como linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados de tais parâmetros de validação são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados dos parâmetros de validação da análise de ácidos orgânicos e açúcares via CLAE

Analitos	R^2	Equação da reta	LD (g. 100 mL^{-1})	LQ (g. 100 mL^{-1})	Repetibilidade (%CV)	Precisão Intermed. (%CV)
Ác. Cítrico	0,997	0,029x + 0,269	0,0001	0,0025	6,716	2,530
Ác. Tartárico	0,998	0,046x - 0,011	0,0007	0,0022	1,472	3,682
Ác. Ascórbico	0,993	0,036x - 0,426	0,0020	0,0039	3,716	4,144
Ác. Málico	0,984	0,039x - 0,674	0,0025	0,0043	2,959	8,833
Sacarose	0,994	0,002x - 0,020	0,0139	0,0443	0,207	1,935
Glicose	0,998	0,005x + 0,267	0,0006	0,0147	0,188	3,446
Frutose	0,999	0,005x - 0,027	0,0062	0,0189	0,226	0,424

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; %CV: (desvio padrão/média)x100.

Os valores para o coeficiente de correlação de cada analito apresentaram-se superiores a 0,990, exceto para o ácido málico que foi de 0,984, os quais foram considerados adequados a aplicação para fins analíticos. Os menores valores de LD e LQ foram constatados para os ácidos cítrico e tartárico e demonstram a grande sensibilidade do detector. De maneira geral, nota-se que os açúcares tiveram maiores limites (LD; LQ) do que os ácidos orgânicos, isso se deve provavelmente ao maior nível de ruído do sistema e a utilização de detectores diferentes.

Os valores de coeficiente de variação (%CV) para repetibilidade variaram de 0,188 a 6,716%, enquanto para precisão intermediária de 0,424 a 8,833%. Porcentagens maiores foram encontradas para a precisão intermediária, exceto para o ácido cítrico, e são justificáveis pela realização das análises com analistas diferentes e em dias da semana diferentes, no entanto os valores observados concordam com estudos de mesma finalidade (LEMOS; SANTOS; SANTOS, 2010).

Ainda, ao compararem-se os coeficientes de variação para repetibilidade e precisão intermediaria observa-se valores notavelmente mais elevados para os ácidos orgânicos isto pode ser consequência da estabilidade dos ácidos perante seu manuseio. Contudo, os %CV apresentaram-se abaixo de 8,833% sugerindo elevada precisão do método, já que de acordo com a literatura são aceitáveis valores inferiores a 15% (PINTO; JARDIM, 2000; AQUINO et al., 2004).

Lima, Schuler e Guerra (2010) em seu estudo de determinação de ácidos orgânicos em vinhos, otimizaram e validaram uma metodologia utilizando CLAE e coluna C18 para a detecção simultânea dos ácidos tartárico, málico, lático, cítrico e succínico. Obtiveram coeficientes de correlação também acima de 0,99 e limites de detecção e quantificação máximos na faixa de 0,0054 e 0,0031 g.100 mL^{-1} respectivamente. O parâmetro repetibilidade nos níveis mínimo e máximo, expresso em porcentagem de coeficiente de variação,

assemelha-se aos determinados no presente estudo, com resultados descritos pelos autores de 0,30% a 6,93%.

Santos, Santos e Azevedo (2014) validaram um método para a determinação dos ácidos tartárico, ascórbico, cítrico e fumárico em polpas de frutas congeladas utilizando CLAE em fase reversa. Obtiveram valores de coeficiente de correlação também acima de 0,99 para os quatro ácidos e a repetibilidade variou de 12,6% a 19,6%, enquanto a precisão intermediária teve seu valor máximo em 19,5%.

Corrêa et al. (2013) trabalharam na detecção dos açúcares sacarose, frutose e glicose em suco de uva e vinho utilizando CLAE e coluna Rezex RHM. A validação do método demonstrou bons resultados, os coeficientes de correlação foram acima de 0,99, os limites de detecção foram na faixa de 0,0003 a 0,0005 g.100 mL^{-1} e de quantificação 0,0010 a 0,0015 g.100 mL^{-1}, resultados próximos aos do presente estudo.

Ainda, Scherer, Rybka e Godoy (2008) validaram um método de determinação simultânea dos ácidos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em suco de caju e polpas de caju, acerola e açaí utilizando CLAE. Os resultados foram promissores, uma vez que, o R^2 foi acima de 0,99, e os índices de repetibilidade variaram entre 0,4 e 2,3%, sendo a precisão intermediária entre 1,2 a 5,0%.

A análise cromatográfica foi capaz de identificar e quantificar os ácidos orgânicos e açúcares nas amostras de sucos e néctares do conjunto de calibração, requisito fundamental para na sequência, iniciar a construção dos modelos de regressão. Na Tabela 10 são apresentados os dados da quantificação dos analitos provenientes da análise cromatográfica e refratometrica, sendo que, todas as amostras ficaram acima do limite de detecção e quantificação reportados na análise cromatográfica.

Tabela 10 - Resultados da análise de ácidos orgânicos e açúcares via CLAE em g.100 mL^{-1} e sólidos solúveis totais em °Brix via refratometria

Amostra	Ascórbico	Cítrico	Málico	Tartárico	Sacarose	Glicose	Frutose	SST
NADL1	0,50	0,69	0,00	0,04	6,41	4,49	4,38	7,00
NADL2	0,35	0,60	0,00	0,05	7,89	3,29	3,21	9,10
NAFL1	0,39	0,44	0,00	0,05	4,06	3,83	3,79	12,00
NAFL2	0,47	0,60	0,00	0,07	5,93	5,77	5,70	12,00
NGDL1	0,34	0,57	0,00	0,00	9,37	2,43	2,94	12,70
NGDL2	0,40	0,49	0,00	0,00	9,19	2,79	3,32	12,60
NGML1	0,25	0,22	0,00	0,00	6,54	1,95	2,38	11,00
NGML2	0,42	0,34	0,00	0,00	6,06	1,53	1,96	9,80
NLDL1	0,12	0,54	0,00	0,00	7,63	1,51	1,51	12,00
NLDL2	0,10	0,57	0,00	0,00	7,80	1,75	1,83	13,00
NLSL1	0,00	0,55	0,24	0,00	4,37	4,67	4,42	12,00
NLSL2	0,00	0,52	0,27	0,00	4,15	4,97	4,76	14,80
NMSL1	0,00	0,02	0,28	0,01	2,02	3,67	4,28	10,00
NMSL2	0,00	0,03	0,32	0,02	1,93	3,71	4,43	10,00
NPPL1	0,00	0,16	0,27	0,00	10,10	1,37	1,59	11,00
NPPL2	0,00	0,29	0,18	0,00	7,76	1,57	1,89	13,00
NPSL1	0,00	0,15	0,30	0,02	4,15	4,37	4,59	12,20
NPSL2	0,00	0,16	0,21	0,00	3,76	4,03	4,19	12,00
NTML1	0,00	0,53	0,27	0,00	3,76	3,89	3,72	10,00
NTML2	0,00	0,53	0,29	0,00	3,41	4,27	4,10	11,00
NTSL1	0,00	0,59	0,32	0,00	3,80	4,05	3,81	13,00
NTSL2	0,00	0,84	0,44	0,00	6,84	6,11	5,76	13,00
NUBPL1	0,00	0,16	0,25	0,02	1,80	4,51	6,04	9,00
NUBPL2	0,00	0,40	0,25	0,05	5,76	4,21	6,21	20,00
NUDL1	0,00	0,29	0,24	0,19	4,45	8,09	7,62	14,20
NUDL2	0,00	0,43	0,37	0,14	5,28	7,85	8,04	14,00
NUSL1	0,00	0,30	0,39	0,06	2,41	8,07	7,79	12,00
NUSL2	0,00	0,35	0,31	0,04	1,93	6,69	6,49	12,50
SLFL1	0,10	0,90	0,32	0,01	4,45	3,03	4,27	12,00
SLFL2	0,09	1,20	0,36	0,01	5,10	3,75	5,40	11,00
SLNL1	0,26	0,90	0,19	0,00	3,54	1,53	1,76	10,00
SLNL2	0,26	0,93	0,17	0,01	4,37	1,57	1,79	11,00
SUTAL1	0,00	0,07	0,45	0,60	0,28	8,97	8,96	15,00
SUTAL2	0,00	0,11	0,45	0,63	0,23	7,89	8,42	15,00
SUDL1	0,00	0,01	0,25	0,16	0,23	5,03	6,55	13,00
SUDL2	0,00	0,01	0,33	0,20	0,19	6,77	7,13	13,00
SUBAL1	0,00	0,24	0,38	0,33	0,58	9,93	9,53	17,00
SUBAL2	0,00	0,24	0,39	0,32	0,54	9,87	9,47	16,00
STDL1	0,55	1,27	0,22	0,01	3,89	3,59	3,83	8,00
STDL2	0,46	1,23	0,33	0,01	5,23	3,03	3,21	11,00
SMNL1	0,00	0,00	0,52	0,06	1,80	4,61	10,10	10,00
SMNL2	0,00	0,02	0,53	0,07	2,32	4,61	10,85	9,00

O ácido ascórbico esteve presente em apenas 40% das amostras analisadas, e a faixa de variação de sua concentração nos néctares, quando encontrado, variou de 0,10 a 0,50 g.100 mL^{-1}, enquanto nos sucos de 0,09 a 0,55 g.100 mL^{-1}. Percebeu-se que não houve diferenças acentuadas se compararmos os dois tipos de bebidas e os diferentes sabores analisados. Nos sucos, sua presença foi somente no sabor laranja e tangerina, já nos néctares contém o ácido ascórbico os sabores abacaxi, goiaba e laranja. Nenhuma amostra ficou abaixo dos LD e LQ do método cromatográfico. Barcia et al. (2010) analisaram diversas frutas e constataram a presença de ácido ascórbico em peras (0,061 g.100 mL^{-1}), pêssego (0,217 g.100 mL^{-1}) e maracujá (0,241 g.100 mL^{-1}).

Analisando os teores de ácido cítrico observou-se sua presença em todas as amostras estudadas, exceto a SMNL1. Em relação a concentração de ácido cítrico observou-se uma variação de 0,02 a 0,84 g.100 mL^{-1} e 0,01 a 1,20 g.100 mL^{-1} para néctares e sucos, respectivamente. Todas as amostras se mostraram acima dos limites de detecção e quantificação. O fato de quase 100% das amostras contém o ácido cítrico é indicativo de que as indústrias poderiam estar o adicionando como conservante e acidulante, uma vez que, a presença deste ácido ocorre não somente em bebidas de frutas cítricas. Kelebek e colaboradores (2009) analisaram ácido cítrico em sucos de uva e obtiveram a concentração média de 1,22 g.100 mL^{-1}.

A concentração do ácido málico foi determinada em torno de 76% do total de amostras, sugerindo que o suco de maçã pode estar sendo adicionado em alguns néctares para diminuir os custos do produto, sendo indicado com letras bem pequenas nas embalagens da bebida a denominação de néctar misto. Os teores do respectivo ácido variaram entre 0,18 a 0,44 g.100 mL^{-1} para néctares e para sucos de 0,17 a 0,53 g.100 mL^{-1}, sendo este último maior valor encontrado para o suco de maçã. Os valores da concentração do respectivo ácido nas amostras estão acima dos níveis LD e LQ. Ainda, Kelebek et al. (2009) trabalhando com suco de uva determinaram ácido málico (0,106 g.100 mL^{-1}).

As concentrações do ácido tartárico nos néctares ficaram entre 0,01 a 0,19 g.100 mL^{-1} e nos sucos de 0,01 a 0,63 g.100 mL^{-1}, sendo que nenhuma amostra ficou abaixo dos limites de detecção e quantificação. A detecção do ácido ocorreu em 62% das amostras analisadas. Os teores mais elevados foram encontrados nos sucos de uva (SUBAL1 e SUBAL2), ainda a presença do ácido foi detectada em todas as amostras de suco analisadas e nos néctares de abacaxi, maçã e uva.

A presença da sacarose nos néctares variou de 1,80 a 10,10 g.100 mL^{-1} e nos sucos de 0,19 a 5,23 g.100 mL^{-1}. Nos sucos, os teores mais baixos do açúcar foram encontrados nas

amostras SUTAL1, SUTAL2, SUDL1, SUDL2, SUBAL1 e SUBAL2. Os teores verificados nestas amostras de suco de uva concordam com dados apresentados no trabalho de Ribéreau-Gayon, Maujean e Dubourdieu (2004), em que, os autores afirmam que a sacarose pode estar presente também em sucos integrais de uva, porém em baixas concentrações dependendo das características da videira. A denominação "integral" será privativa do suco sem adição de açúcares e na sua concentração natural. Os açúcares são os principais componentes de sólidos solúveis de sucos cítricos e da doçura do suco de laranja é intrínseca à sua composição em açúcar. Quantitativamente o principal açúcar encontrado nas amostras analisadas por Kelebek et al. (2009) foi a sacarose em relação a glicose e frutose (5,934, 3,230 e 2,855 g.100 mL^{-1}, respectivamente).

O teor de glicose nas amostras obteve uma grande variação, assim como, observado para a sacarose, sendo a variação nos néctares de 1,37 a 8,09 g.100 mL^{-1}, enquanto nos sucos de 1,53 a 9,93 g.100 mL^{-1}. As maiores mensurações do teor de glicose foram observadas para os sucos integrais de uva SUBAL1 e SUBAL2.

Os teores de frutose variaram de 1,51 a 8,04 g.100 mL^{-1} para néctar e 1,76 a 10,85 g.100 mL^{-1} para os sucos. Percebe-se a proximidade entre os valores de glicose e frutose e também que, amostras com baixos teores de sacarose possuem maior concentração de glicose e frutose. De forma geral, as concentrações de frutose e glicose foram maiores nos sucos do que nos néctares, isto se deve pelo fato de os néctares são "diluições do suco natural" apresentando desta forma maior quantidade de água e menor quantidade destes açúcares, os teores elevados de sacarose na bebida pronta para o consumo refletem a adição desse ingrediente na formulação, ou seja, difere dos açúcares naturalmente encontrados nos sucos originais.

Para os sólidos solúveis totais, medidos através de um refratômetro a variação observada foi de 7,00 a 20,00 °Brix nos néctares e 8,00 a 17,00 °Brix nos sucos. O néctar é obtido pela mistura do suco, açúcar e ácido orgânico, em proporções adequadas para a obtenção de um produto pronto para consumo, ou seja, após diluição busca-se reequilibrar a acidez e doçura do produto.

Para fins de comparação direta, a concentração dos açúcares totais (sacarose, frutose e glicose) determinados por CLAE foi comparada com a quantidade de sólidos solúveis totais empregando o refratômetro. Praticamente 90% das amostras analisadas, indicam adequada quantificação por parte das duas técnicas utilizadas. Estudos recentes de Caldas et al. (2015) compararam as medições proporcionadas pelos métodos de CLAE, refratometria e espectrofotometria na análise de sacarose, glicose e frutose e destacaram que a técnica de

espectrofotometria foi a mais destoante das estudadas, enquanto que, através da CLAE e refratometria conseguiram resultados equivalentes, porém com divergências que chegaram a 6 g.100 mL^{-1}.

5.3 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS DO CONJUNTO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA A CONSTRUÇÃO DOS MODELOS

5.3.1 Conjunto de amostras de sucos

A análise fatorial realizada previamente nos dados de concentração do conjunto de amostras utilizadas na construção dos modelos revelou que para os sucos todas as variáveis dependentes (ácidos ascórbico, cítrico, málico, tartárico, açúcares sacarose, glicose e frutose e sólidos solúveis totais) são importantes para a caracterização destas amostras e, portanto foram mantidas para as posteriores análises de ACP e HCA.

Com base nos dados de concentração dos ácidos ascórbico, cítrico, málico, tartárico e açúcares sacarose, glicose, frutose e sólidos solúveis totais em estudo foi possível avaliar por meio das análises de ACP e Clusters, além da homogeneidade das amostras de sucos e néctares, a determinação do padrão destes tipos de matrizes.

Por meio da Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) representada pelo dendograma da Figura 11 é possível observar diferenças e semelhanças entre as amostras de suco no que se referem a concentração de ácidos orgânicos e açúcares.

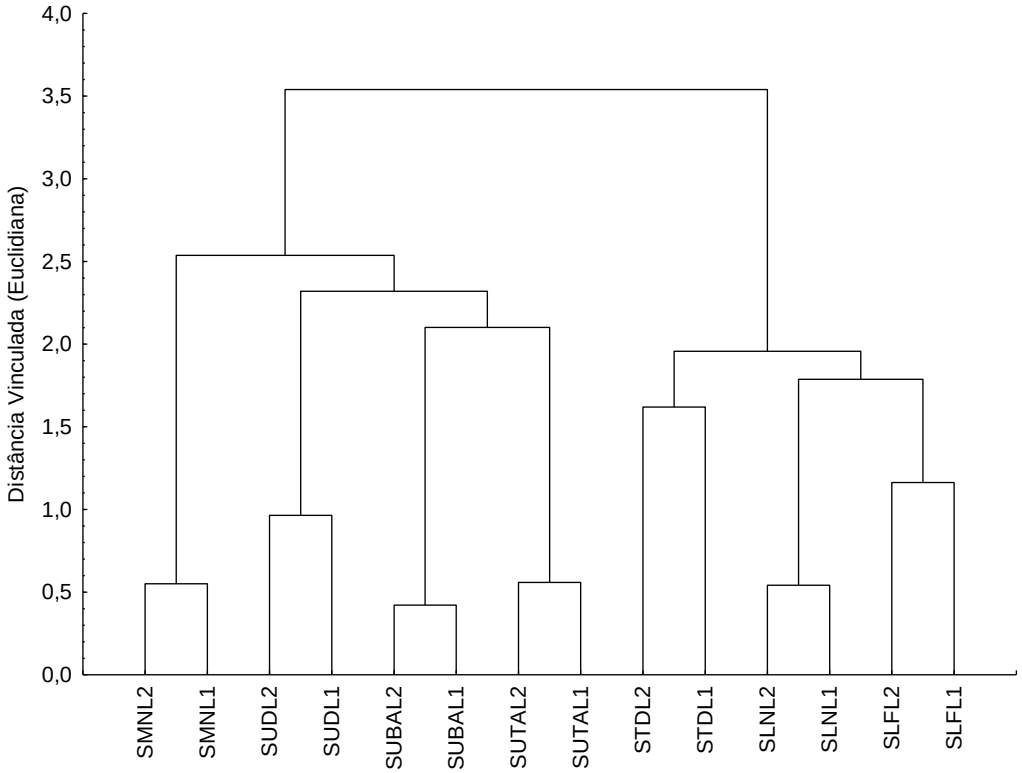


Figura 11 - Dendograma de dissimilaridade dos sucos

Constata-se a formação de dois grandes grupos distintos (nível de corte entre 3,0 e 3,5), sendo o da esquerda formado pelas amostras de suco de uva e maçã e o da direita pelas de suco de tangerina e laranja. A semelhança pode estar relacionada aos níveis de ácidos presentes nas frutas ou matéria prima dos sucos, sendo que uva e maçã se distinguem de tangerina e laranja por não possuírem ou possuírem baixas concentrações dos ácidos cítrico e ascórbico.

Outra informação importante a ser retirada da Figura 11 é que os dois lotes correspondentes à amostra mais homogênea, com base na menor distância euclidiana (E.D.), é relativo ao suco de uva branca (E.D.<0,5), contrariamente a amostra menos homogênea ou mais divergente é a de suco de tangerina, pois possui dentre todas a maior distância euclidiana.

Por meio da Análise de Componentes Principais (ACP), visualizada por meio das Figuras 12 e 13 que representam os gráficos de *scores* e *loadings*, foi possível avaliar quais analitos são responsáveis pela distinção observada entre as amostras de sucos. Esta análise mostrou-se eficaz ao presente estudo por apresentar um poder de explicação da variabilidade dos dados em 85% (PC1 70,89% e PC2 14,39%).

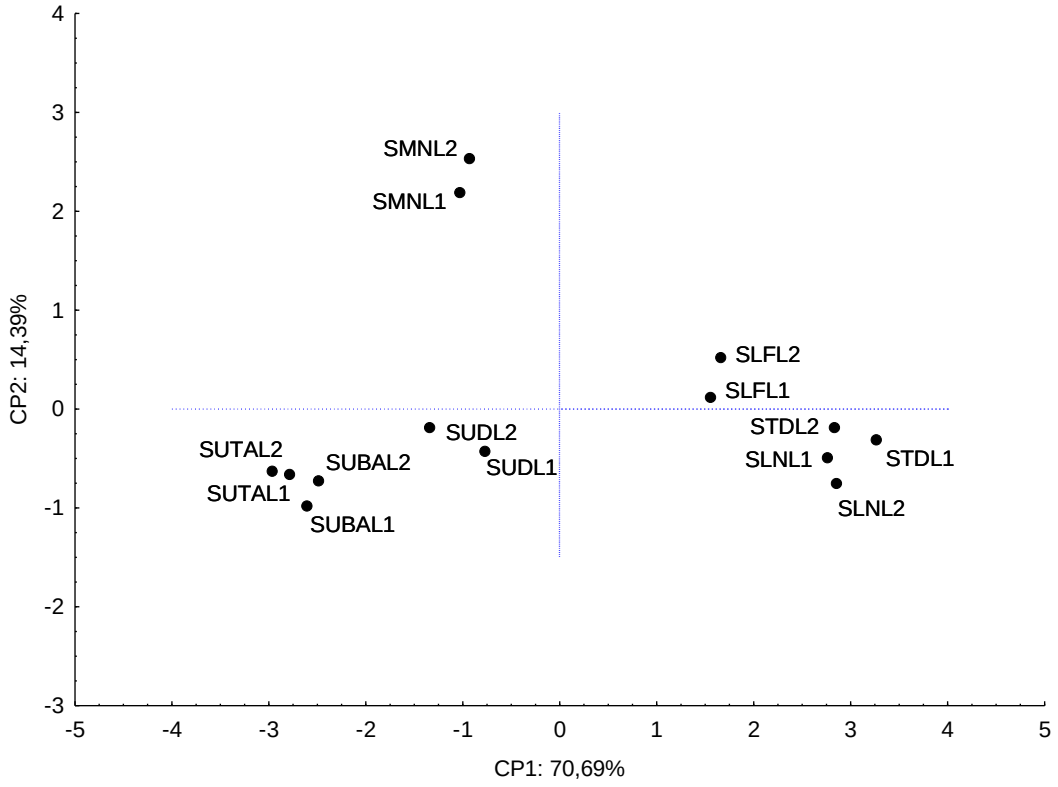


Figura 12 - Gráfico dos *scores* de CP1 x CP2 para os sucos

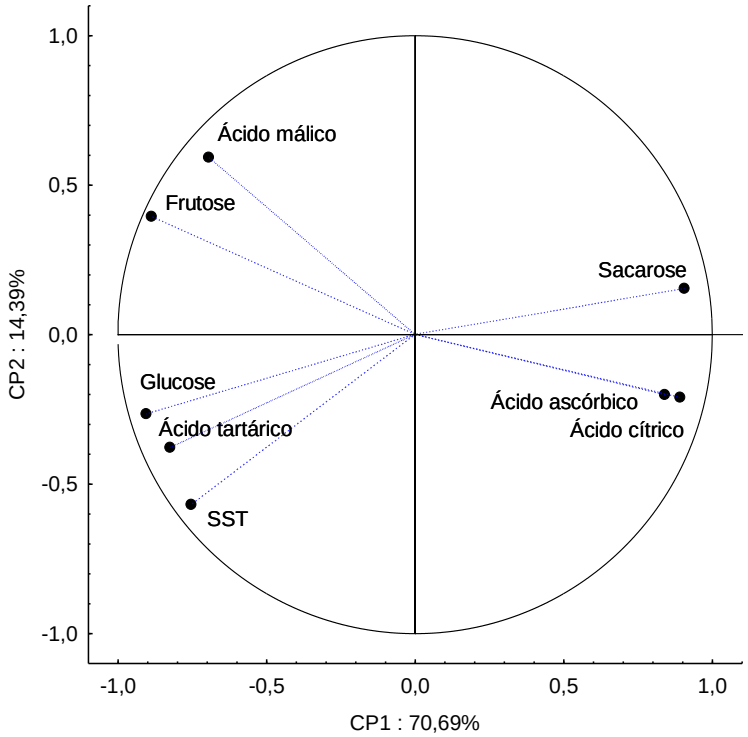


Figura 13 – Gráfico dos *loadings* da CP1 x CP2 dos sucos

A componente principal 1 (CP1), que detém forte poder de explicação sobre a variabilidade dos dados, separa os sucos cítricos de laranja e tangerina, dos sucos de uva e maçã, já a CP2 separa sucos de maçã e laranja dos demais.

O suco de laranja representado pelas amostras SLFL1 e SLFL2 possui vetor mais significativo para sacarose, açúcar que de acordo com a legislação (BRASIL, 2009) não deve ser adicionado em sucos integrais. As amostras SMNL1 e SMNL2 que correspondem ao suco de maçã também se apresentaram de forma isolada, destacando-se pelo conteúdo de frutose e ácido málico, ácido predominante na maçã. Enquanto que, todos os sucos de uva (SUTAL1, SUTAL2, SUBAL1, SUBAL2, SUDL1 e SUDL2), formam um grande grupo devido à concentração dos analitos ácido tartárico, glicose e sólidos solúveis. Por fim, as amostras de suco de laranja e de tangerina SLNL1, SLNL2, STDL1 e STDL2 respectivamente, se sobressaem quanto ao teor dos ácidos ascórbico e cítrico, que predominam em frutas cítricas.

5.3.2 Conjunto de amostras de néctares

Por meio da Análise Fatorial, realizada antes das análises de ACP e HCA, foi possível evidenciar quais variáveis dependentes são mais importantes para caracterizar as amostras de néctares. Neste contexto, a AF indicou que apenas os ácidos ascórbico, málico e tartárico e os açúcares glicose e frutose deveriam ser mantidos para as análises subsequentes.

Na Figura 14 é apresentado o dendograma referente à análise de HCA obtida para as amostras de néctar de uva, maçã, pêssego, tangerina, goiaba, abacaxi e laranja. Quando o corte é feito em 1,8 (distância euclidiana) observa-se a formação de dois grandes grupos, que mostram a distinção dos néctares de goiaba e abacaxi com néctar de uva e maçã.

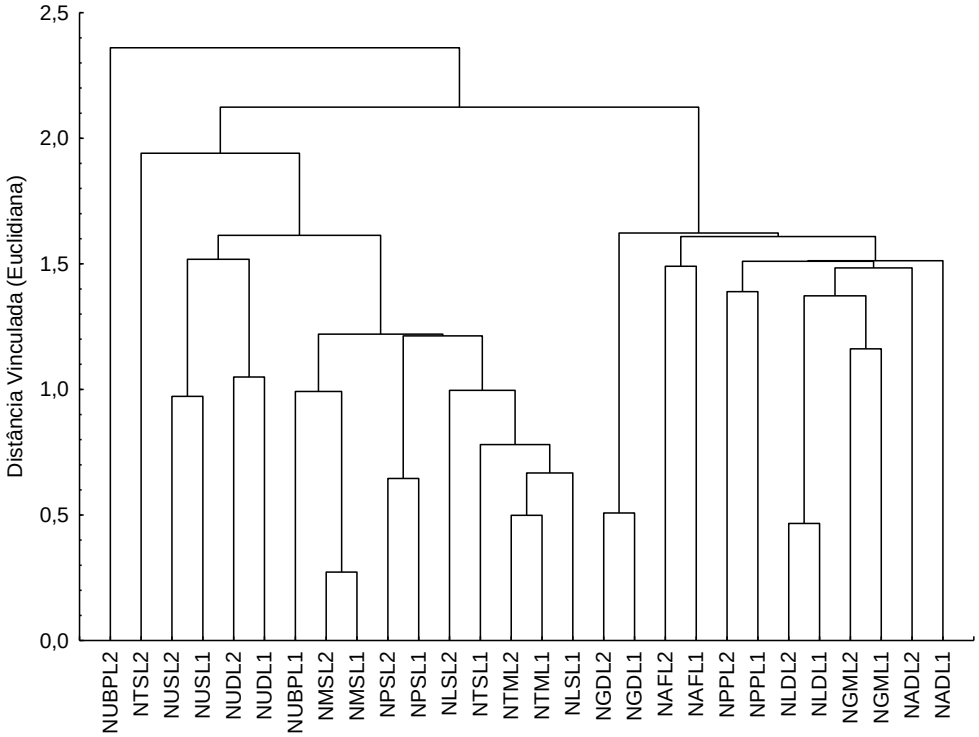


Figura 14 - Dendograma de dissimilaridade dos néctares de uva, maçã, pêssego, tangerina, goiaba, abacaxi e laranja

As semelhanças observadas no dendograma entre os néctares de goiaba e abacaxi dizem respeito aos teores próximos do ácido ascórbico determinado, assim como, as amostras de néctar de laranja, NLDL1 e NLDL2, enquanto que as amostras NPPL1 e NPPL2 participam deste mesmo grupo devido às semelhanças no teor mais elevado de sacarose. Os néctares de uva e maçã, por sua vez, estão contidos no outro grupo, em que a semelhança no teor de ácido málico os aproxima, assim como, as amostras de NPSL1 e NPSL2 se assemelham aos néctares citados anteriormente por conta das baixas concentrações de sacarose (Tabela 10).

Os lotes de néctar de maçã (NMSL1 e NMSL2) são os mais homogêneos, pois tem a menor distância euclidiana. Dentre aquelas que a análise de agrupamento conseguiu relacionar a amostra de néctar de abacaxi (NAFL1 e NAFL2) foi a menos homogênea, entretanto para seis amostras (NUBPL1, NUBPL2, NTSL1, NTSL2, NLSL1 e NLSL2) não foi possível, através da análise, observar semelhanças entre os seus lotes correspondentes, indicando a falta de padronização dentro da indústria, assim como disparidade na matéria-prima.

Quando realizada a Análise de Componentes Principais (PCA) observada através das Figuras 15 e 16, nota-se uma pontual dificuldade de separação das amostras de néctar.

Contudo, a análise revelou-se adequada ao apresentar a variabilidade dos dados com poder de explicação de 63,25% para PC1 e 28,05% para PC2 totalizando 91%.

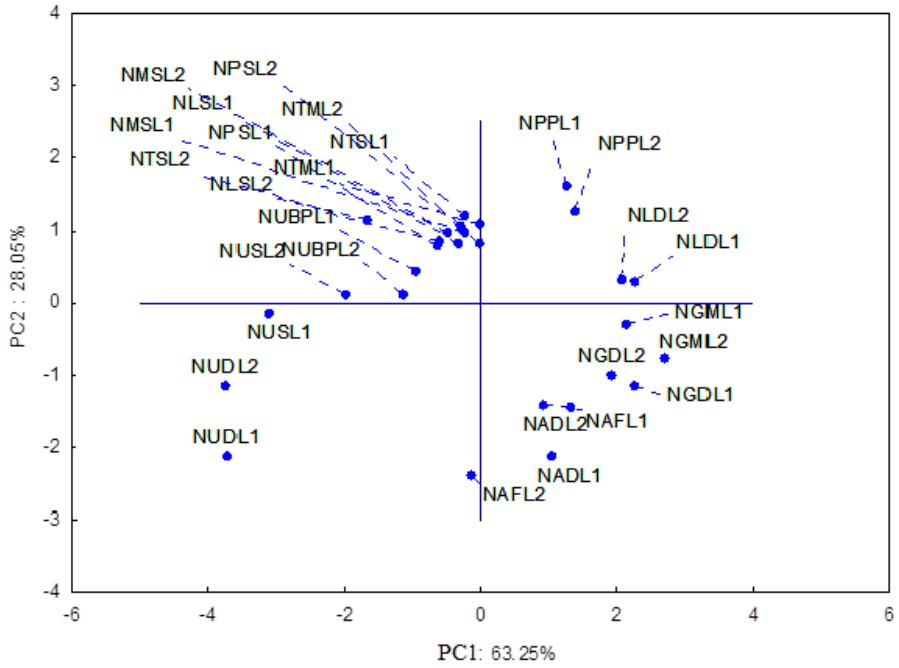


Figura 15 - Gráfico dos escores de CP1 x CP2 para os néctares

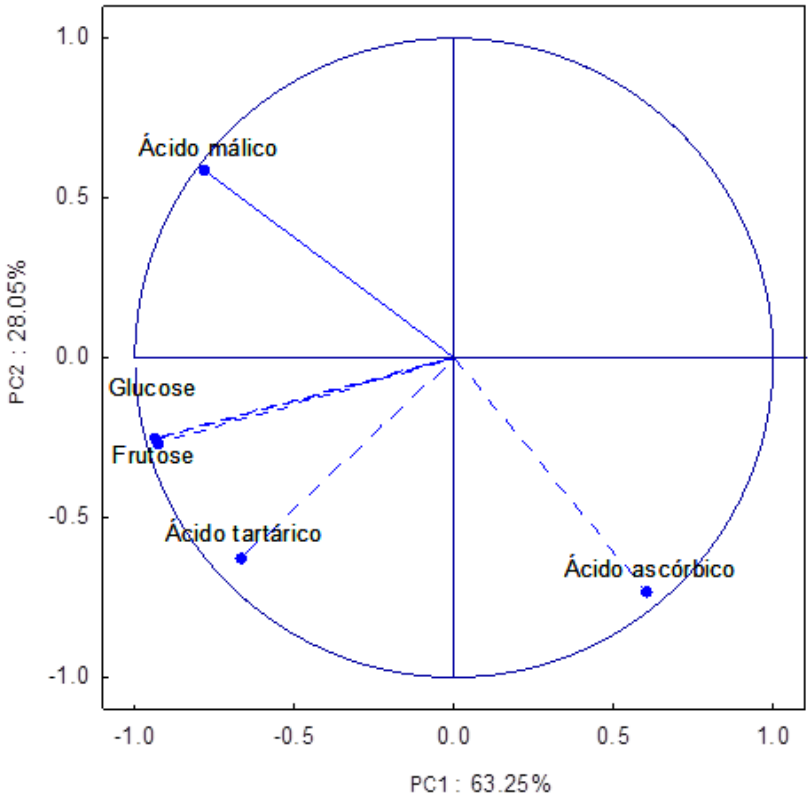


Figura 16 - Gráfico dos *loadings* da CP1 x CP2 para os néctares

Os quatro lotes correspondentes às duas amostras de néctar de abacaxi destacam-se pelo conteúdo do ácido ascórbico, assim como, as amostras NGDL1, NGDL2, NGML1 e NGML2 (néctar de goiaba). As amostras NUDL1, NUDL2 e NUSL1 destacam-se pelo conteúdo de ácido tartárico, ácido predominante em uva, assim como glicose e frutose.

Já o néctar de maçã (NMSL1 e NMSL2) tem vetor positivo para o ácido málico, bem como, algumas amostras de néctar de tangerina, pêssego e laranja, indicando possível adição de suco de maçã nestas bebidas com o objetivo de barateá-las, nas quais não é comum encontrar concentrações mais elevadas deste ácido, exceto para o sabor laranja, pois Kelebek et al. (2009) encontraram em seus estudos pequenas quantidades de ácido málico em suco de laranja. Ogrinc et al. (2003) relatam existir adulteração de sucos integrais com a adição de sucos mais baratos provenientes de outras frutas, como por exemplo a laranja.

Portanto, a heterogeneidade dos analitos em estudo foi frequente nas bebidas analisadas, o que pode ser indicativo de que o controle de qualidade das indústrias não tem dado a atenção devida aos teores de ácidos orgânicos e açúcares adicionados as bebidas, podendo tornar a diferença do sabor de dois lotes adquiridos em dias diferentes perceptível ao consumidor, além da adição indiscriminada de outros tipos de sucos (exemplo suco de maçã e

laranja) para diminuir custos de produção. Também um motivo cabível para tal variação nos constituintes naturais é quanto a variação da própria fruta, no sentido de época de colheita, sazonalidade, local de plantio, fertilidade da terra, variedades da fruta, entre outros (AQUARONE et al., 2001).

5.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO - NIR

Os espectros obtidos para a região de infravermelho próximo (12.500 a 4.000 cm^{-1}) para o conjunto de amostras de sucos e néctares pertencentes ao conjunto de calibração usados na construção dos modelos de regressão são apresentados na Figura 17.

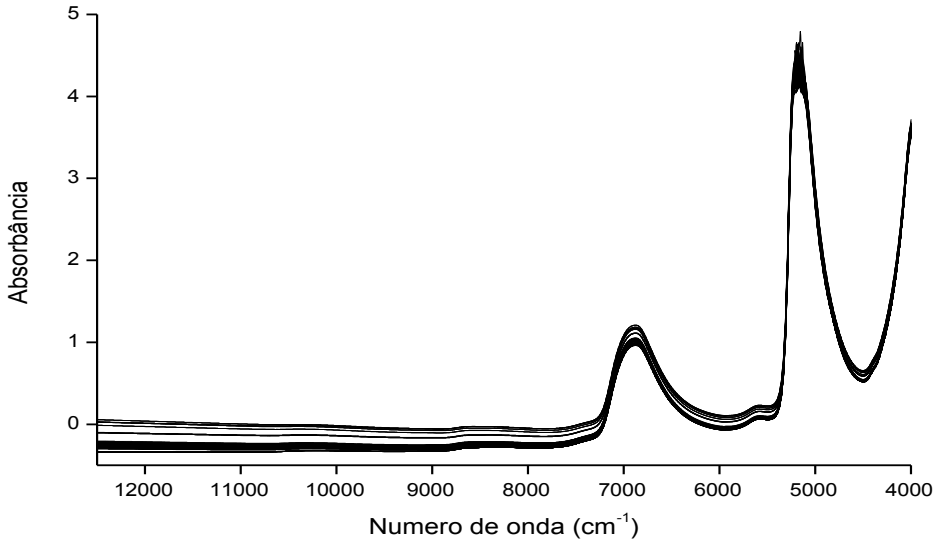


Figura 17 - Espectros de infravermelho próximo do conjunto de amostras de calibração

Sendo a água o componente químico de maior importância nas frutas e vegetais, têm grande absorção no infravermelho próximo, portanto o espectro de frutas e vegetais é dominado pela mesma (NICOLAI et al., 2007). As bandas características da água envolvem comprimentos de onda que variam dentro da faixa de 5180 a 5150, 7270 a 7220 e 6900 a 6850 cm^{-1} (CONZEN, 2006).

É possível observar no conjunto de espectros duas bandas em torno de 6800 e 5000 cm^{-1} sendo estas bandas correspondentes a overtones/combinações das ligações entre hidrogênio e oxigênio (O-H) das moléculas de água (RODRIGUES-SAONA et al., 2006). Já

as bandas correspondentes aos ácidos carboxílicos ou ligações COOH relativas aos ácidos orgânicos podem ser visualizadas entre 5290 a 5210 cm^{-1} e são referentes a alongamento/estiramento da ligação C=O (CONZEN, 2006).

5.4.1 Modelos de Calibração Multivariada no Infravermelho Próximo

Os modelos foram construídos a partir dos valores médios dos teores de ácidos orgânicos e açúcares obtidos pela análise de referência (CLAE e refratometria) e os espectros das amostras de sucos e néctares.

Devido aos efeitos provocados pela não homogeneidade das amostras, decorrentes especialmente do grande leque de concentração amostral, foi necessária a aplicação de métodos de pré-processamentos antes da construção dos modelos. O objetivo principal desta aplicação foi a de destacar características importantes, excluir ruídos e restringir a variabilidade dos dados.

Os modelos foram validados por dois métodos diferentes: o conjunto-teste (TS) e a validação cruzada (*leave one out* - CV) e são apresentados para cada método de validação dois diferentes modelos um sem pré-processamento (apenas centragem na média) e o otimizado.

5.4.1.1 Ácido ascórbico

O número ideal de variáveis latentes para os modelos de calibração multivariada do ácido ascórbico foi determinado por validação cruzada (FERREIRA et al., 1999; CAYUELA, 2008; HAWKINS; KRAKER, 2010). É aquele que em determinado número de variáveis latentes o RMSECV tem seu valor minimizado e não varia de forma significativa (SOUZA et al., 2013).

De tal modo, a melhor relação foi utilizada, indicando o uso de 9 variáveis latentes para o presente modelo (Figura 18).

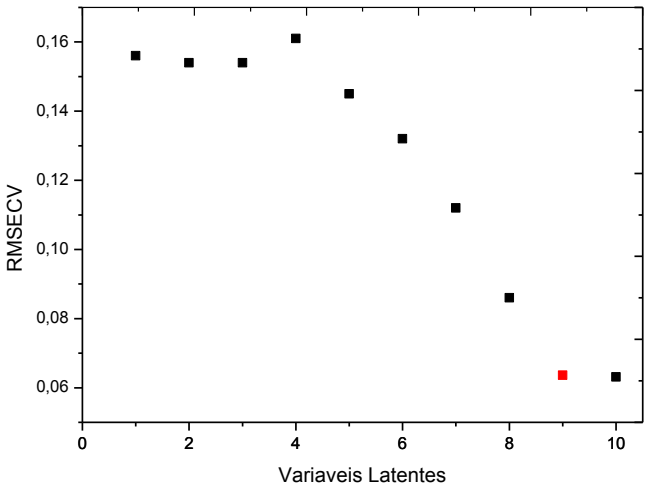


Figura 18 - Determinação do número de variáveis latentes para ácido ascórbico

Determinado o número de variáveis latentes, foi analisada a presença de amostras com comportamento *outliers* e excluídas da construção dos modelos. Para o método TS apenas uma amostra *outlier* foi detectada e retirada do conjunto de dados, no entanto, para os modelos CV foram excluídos cinco espectros com comportamento diferenciado.

Os resultados para a comparação da utilização de diferentes métodos de validação no desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada do ácido ascórbico com 9 variáveis latentes são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para ácido ascórbico

CONJUNTO DE TESTE								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSEP**	**RPD**	**Regiões**
1-ASC-TS	Nenhum	0,697	0,09	1,82	0,247	0,23	1,02	9400-5446.4
2-ASC-TS*	**SNV**	**0,771**	**0,08**	**2,09**	**0,830**	**0,08**	**2,53**	**6102.1-5446.4 4601.7-4424.2**
VALIDAÇÃO CRUZADA								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSECV**	**RPD**	**Regiões**
1-ASC-CV	Nenhum	0,679	0,09	1,17	0,113	0,14	1,06	6102.1-5774.3 4424.2-4246.8
2-ASC-CV	***Constant offset elimination***	**0,905**	**0,05**	**3,25**	**0,808**	**0,06**	**2,29**	**9400-5446,4 4424,2-4246,8**

Para o método de validação TS o menor erro quadrático e o aumento no valor R^2 dos conjuntos de calibração e validação, que indicam melhora na habilidade de previsão,

apresentados no modelo 2-ASC-TS demonstram que o uso da combinação dos pré-processamentos de centragem na média e SNV gera um modelo mais eficiente comparado ao modelo sem nenhum processamento dos dados.

As regiões de trabalho determinadas automaticamente pelo *software* do equipamento, juntamente com o uso do pré-processamento, são responsáveis pelas diferenciações observadas nos modelos 1-ASC-TS e 2-ASC-TS.

Para o modelo 2-ASC-TS observa-se uma correlação regular entre os valores medidos e preditos com um coeficiente de determinação R^2 de validação de 0,830 e erros máximos de 0,08. Os valores de RPD dos conjuntos de calibração e validação que foram de 2,09 e 2,53 são considerados adequados, pois mostram que o modelo é bom e capaz de fornecer boas previsões (DAL ZOTTO et al., 2008).

Entretanto para o método de validação CV o melhor modelo foi 2-ASC-CV, o qual obteve erro máximo de 0,06, combinando os pré-processamentos de centragem na média e *Constant offset elimination*. A diferença de pré-processamento e a região de análise começando em 6102.1 a 5774.3 e 4424.2 a 4246.8 cm^{-1} que o primeiro modelo (1-ASC-CV) implica em resultados para os conjuntos de dados menores que os do segundo modelo (2-ASC-CV), o que corrobora com estudos que afirmam que a variação especialmente da região espectral é muito significativa para a obtenção de bons modelos (OLIVEIRA, et al. 2004).

Na Figura 19 é apresentado o gráfico dos resultados da validação (validação conjunto de teste) para o modelo 2-ASC-TS construído através dos conjuntos de calibração e validação oriundos do NIR para o ácido ascórbico.

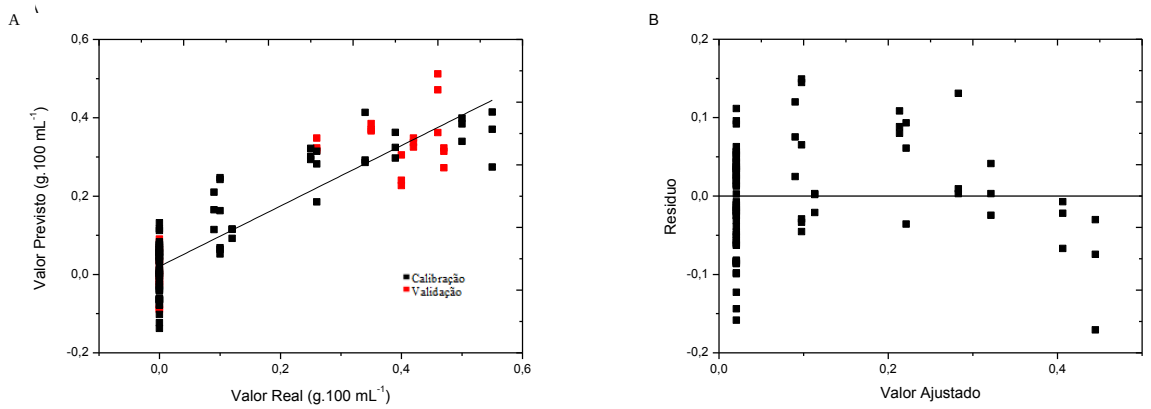


Figura 19 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o ácido ascórbico com método de validação conjunto de teste.

A correlação entre os valores previstos e os valores reais estão próximos a reta linear (Figura 19a), indicando bons ajustes para a previsão, exceto para as concentrações próximas ou iguais a zero. A Figura 19b, que relaciona os resíduos com os valores previstos (ajustados), indica que comportamento da variância dos resíduos é homoscedástica na metade das amostras, sendo a outra metade, que possuiu concentrações menores, passível de se notar uma tendência de pontos sobrepostos e emparelhadas sugerindo comportamento heteroscedástico.

Na Figura 20 são apresentados os gráficos referentes ao método CV para as amostras do conjunto de calibração para o ácido ascórbico.

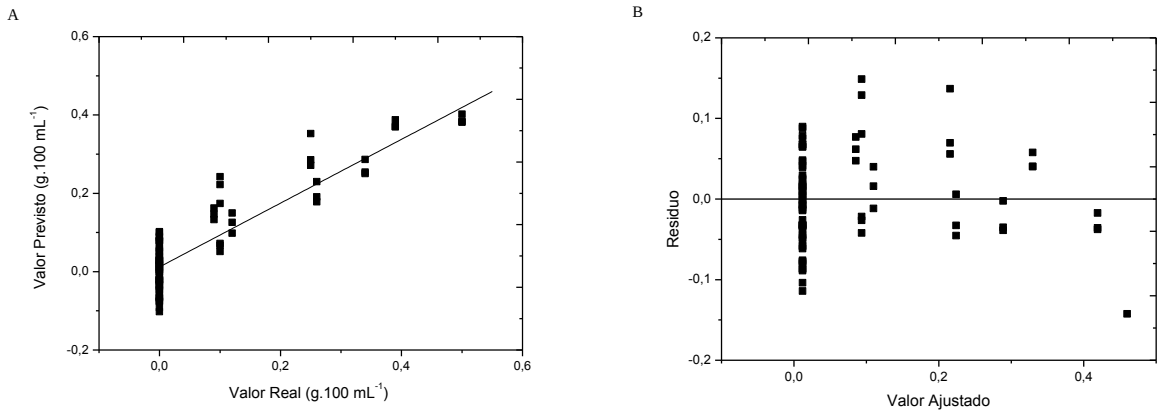


Figura 20 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração do ácido ascórbico com método de validação cruzada

Na Figura 20a é possível analisar a correlação entre valores reais e previstos, que para as amostras que continham pequenas concentrações de ácido ascórbico apresentam comportamento que corrobora com a Figura 19a do método TS. Contudo, o gráfico da Figura 15b mostra a relação entre os valores ajustados (previstos pelo modelo) e os resíduos. A forma com que os pontos estão distribuídos no gráfico, de maneira aleatória, indicaria homocedasticidade dos dados, o que, no entanto, não é percebido para 100% das amostras, sugerindo uma tendência que atua de forma negativa sobre a variância dos erros, causado pela grande quantidade de amostras com baixas concentrações no conjunto de dados.

O modelo responsável pela melhor previsão para amostras externas para a quantificação do ácido ascórbico deve ser aquele que possuiu dentre as figuras de méritos os valores mais adequados. Comparando os modelos 2-ASC-TS e 2-ASC-CV nota-se que para o conjunto de calibração os melhores valores estão para o modelo de validação cruzada, enquanto para a validação o R^2 e RPD do modelo de conjunto-teste são melhores, embora o

RMSEP seja maior. Portanto, o modelo 2-ASC-CV foi estabelecido como o mais indicado para previsões futuras do ácido ascórbico.

5.4.1.2 Ácido Cítrico

O número de variáveis latentes a serem utilizadas nos modelos de calibração do ácido cítrico foi determinado por validação cruzada, e o número ideal no qual o RMSECV foi mínimo foi em 9 VL (Figura 21).

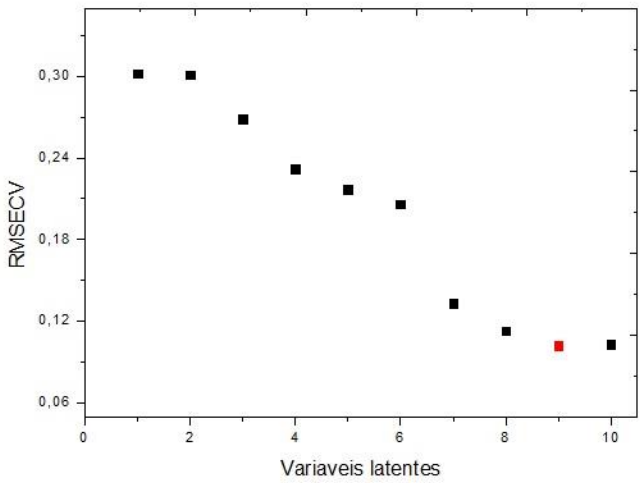


Figura 21 - Determinação do número de variáveis latentes para ácido cítrico

As amostras que apresentaram comportamento anormal, diferenciando-se das demais foram excluídas, sendo neste caso detectados três espectros *outliers* para TS e cinco espectros com método de validação CV.

A validação dos modelos para ácido cítrico que foi realizada por conjunto de teste e validação cruzada pode ser comparada através dos resultados apresentados na Tabela 12, com a utilização de 9 variáveis latentes.

Tabela 12 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para ácido cítrico

CONJUNTO DE TESTE								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSEP**	**RPD**	**Regiões**
1-CIT-TS*	**MSC**	**0,908**	**0,10**	**3,30**	**0,929**	**0,09**	**3,77**	**8451.2-7498.4 6102.1-5774.3 4424.2-4246.8**
2-CIT-TS	Nenhum	0,845	0,14	2,55	0,318	0,27	2,01	9400-5446.4 4601.7-4246.8
VALIDAÇÃO CRUZADA								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSECV**	**RPD**	**Regiões**
1-CIT-CV	**1ª. derivada + SNV**	**0,965**	**0,06**	**5,37**	**0,884**	**0,10**	**2,95**	**9400-5446.4**
2-CIT-CV	Nenhum	0,778	0,16	2,12	0,419	0,25	1,31	8451.2-7498.4 6102.1-5446.4 4601.7-4246.8

O modelo 1-CIT-TS para ácido cítrico apresentou todos os valores de figuras de mérito melhores do que o 2-CIT-TS, sendo os R^2 de calibração e validação superiores, erros quadráticos menores e RPD com bons valores (> 3,0), que lhe confere maior eficiência para aplicação com adequado poder de predição (NICOLAI et al., 2007). A utilização de MSC e centragem na média e região bem distinta foram determinantes para as diferenças anteriormente observadas, gerando um modelo com bons ajustes.

Quando a comparação é feita entre os modelos de validação cruzada (1-CIT-CV e 2-CIT-CV), o primeiro foi considerado mais eficiente, pois apresenta muitas diferenças para os resultados dos conjuntos de calibração/validação, os coeficientes de correlação são superiores, assim como o RPD e o RMSECV é inferior. As únicas variações existentes para os modelos foi o uso do pré-processamento no modelo 1-CIT-CV que foi a combinação de primeira derivada mais o SNV e a região de absorção, os quais foram possivelmente responsáveis pelas diferenças anteriormente citadas.

Na Figura 22 são mostrados os gráficos da relação entre os valores reais e os valores previstos pelo modelo para conjunto de dados e dos resíduos versus valor previsto para o modelo 1-CIT-TS.

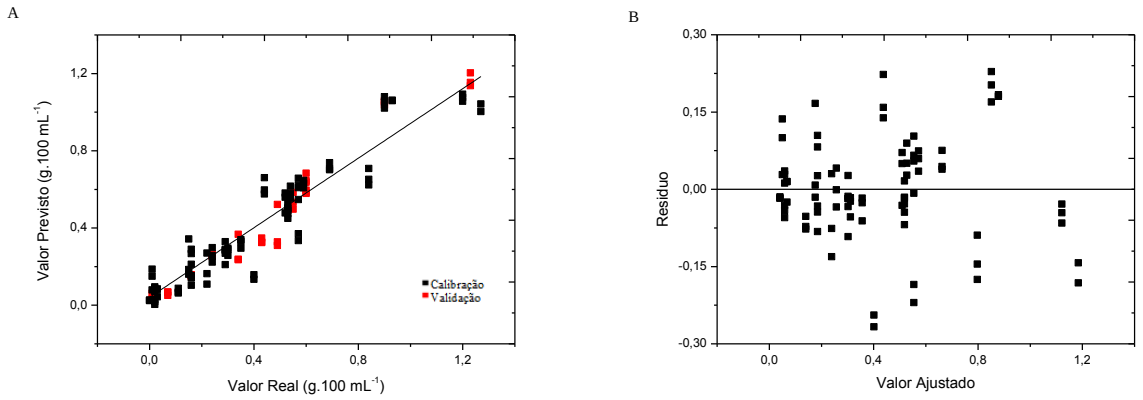


Figura 22 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o ácido cítrico com método de validação conjunto de teste

A correlação entre os valores reais e preditos se aproximam bastante da curva linear, sendo que se nota uma maior quantidade de pontos abaixo da concentração de 0,8 g.100 mL^{-1}, consequência da amostragem. A distribuição dos pontos revela a homoscedasticidade da variância dos erros (Figura 22b).

Para o 1-CIT-CV também se observa boa correlação entre os valores reais e previstos (Figura 23a) assim como boa homoscedasticidade entre as variâncias dos erros (Figura 23b).

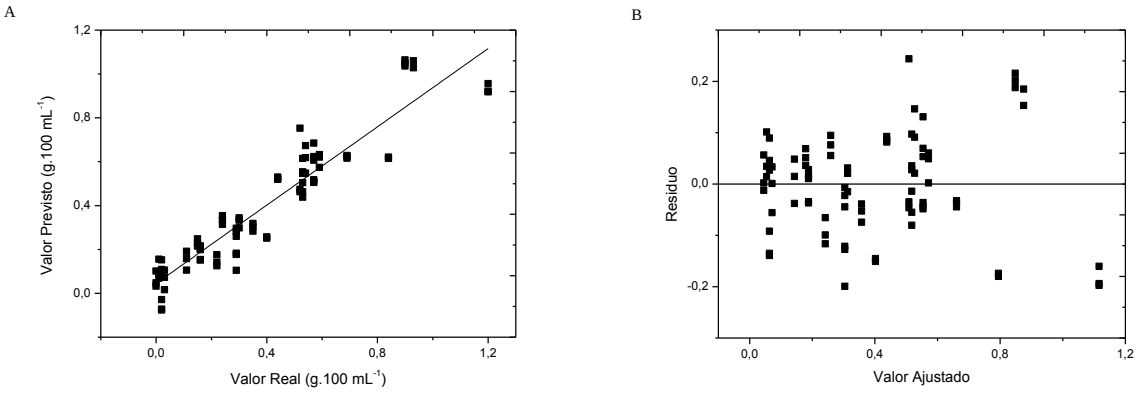


Figura 23 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração do ácido cítrico com método de validação cruzada

Dentre os métodos de validação, o modelo que apresenta maior potencial de previsão para o ácido cítrico e os melhores resultados é o 1-CIT-TS, pois apresenta correlação satisfatória entre os resultados e figuras de mérito indicando maior eficiência. E ainda, é o modelo que possuiu os erros de predição e calibração mais próximos (WESTAD; MARINI, 2015).

5.4.1.3 Ácido Málico

Por meio da validação cruzada foi calculado o número de variáveis latentes a serem incluídas nos modelos de calibração para o ácido málico, sendo 10 o número em que houve o menor valor de RMSECV (Figura 24).

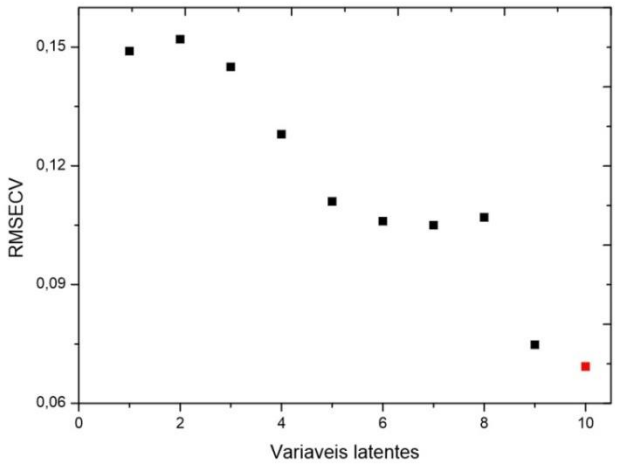


Figura 24 - Determinação do número de variáveis latentes para ácido málico

Algumas amostras *outliers* tiveram que ser subtraídas da construção dos modelos por apresentarem comportamento diferenciado. No conjunto de teste foram três espectros e na validação cruzada quatro espectros.

Os resultados dos parâmetros de avaliação dos modelos validados pelo método de conjunto-teste e validação cruzada para o ácido málico com diferentes formas de pré-processamento estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para ácido málico

CONJUNTO DE TESTE								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSEP**	**RPD**	**Regiões**
1-MAL-TS	**MSC**	**0,878**	**0,06**	**2,87**	**0,692**	**0,09**	**1,80**	**5774.3-5446.4**
2-MAL-TS	Nenhum	0,758	0,08	2,03	0,163	0,15	1,21	3999.9-1249.3
VALIDAÇÃO CRUZADA								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSECV**	**RPD**	**Regiões**
1-MAL-CV*	***Constant offset elimination***	**0,916**	**0,05**	**3,46**	**0,790**	**0,07**	**2,19**	**9400-6098.3 4601.7-4246.8**
2-MAL-CV	Nenhum	0,864	0,06	2,72	0,484	0,11	1,39	5774.3-5446.4

Para TS observa-se grande distinção entre principalmente o R^2 do conjunto de validação dos dois modelos, sendo que sem processamento no modelo 2-MAL-TS o coeficiente foi de 0,163 enquanto com MSC foi de 0,692. A faixa de região analisada, assim como o método de pré-processamento faz com que sejam observadas diferenças nos valores dos parâmetros analisados como resposta, a região para o melhor modelo de TS utilizou apenas os comprimentos de onda de 5774.3 a 5446.4.

Nos modelos de CV o 1-MAL-CV apresentou os melhores resultados e apresentou R^2 de calibração maior que 0,90 e os RMSEC e RMSECV foram menores que 0,069.

A partir da Figura 25 podem ser visualizados os gráficos de correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo, assim como a relação entre resíduo e valor ajustado para o melhor modelo desenvolvido pelo método de validação de conjunto de teste (1-MAL-TS) na validação para o ácido málico.

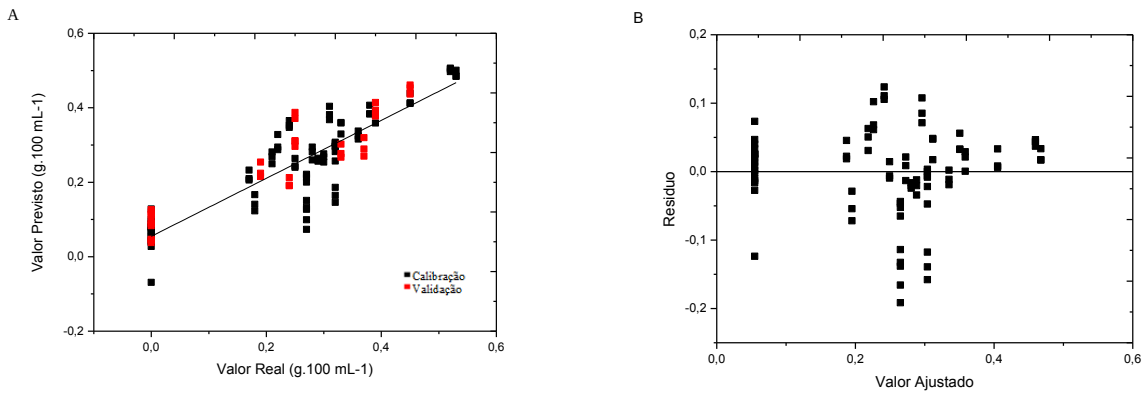


Figura 25 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o ácido málico com método de validação conjunto de teste

Na Figura 26 são apresentados os gráficos que relacionam os valores experimentais das amostras dos conjuntos de calibração e suas respectivas previsões feitas pelo modelo 1-MAL-CV, assim como a relação entre os resíduos e os valores ajustados para método de validação cruzada.

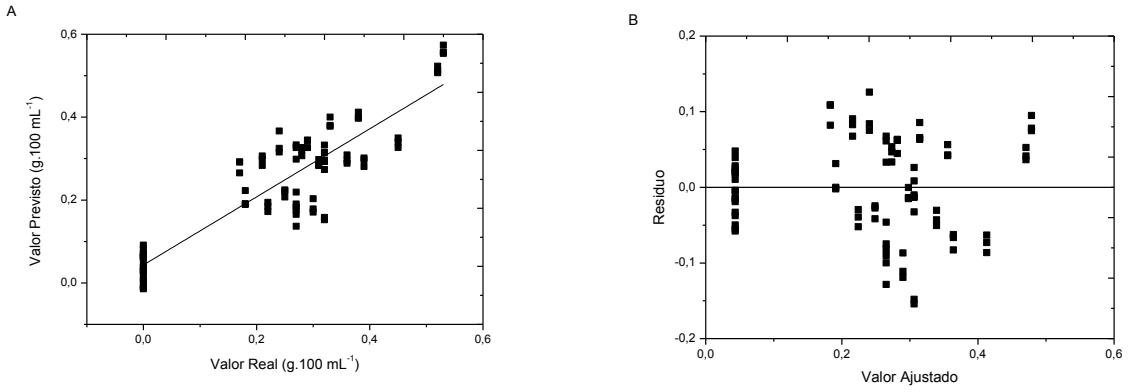


Figura 26 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração do ácido málico com método de validação cruzada

Nota-se para os pontos iguais a zero uma previsão bem distinta para cada amostra (Figura 26a), uma vez que, essa variação vai desde valores abaixo de zero até 0,5 g.100 mL^{-1}, indicando que o modelo para o ácido málico não consegue descrever (prever) com eficiência valores baixos. O mesmo comportamento é possível observar no gráfico da Figura 26b, em que os resíduos dos valores iguais a zero também têm comportamento tendencioso, sendo para estes casos observada baixa homocedasticidade.

5.4.1.4 Ácido Tartárico

Foi possível calcular o número de variáveis latentes para serem usadas nos modelos de calibração para o ácido tartárico através da validação cruzada. O número ideal de VL foi de 8 VL, o qual minimizou o RMSECV (Figura 27).

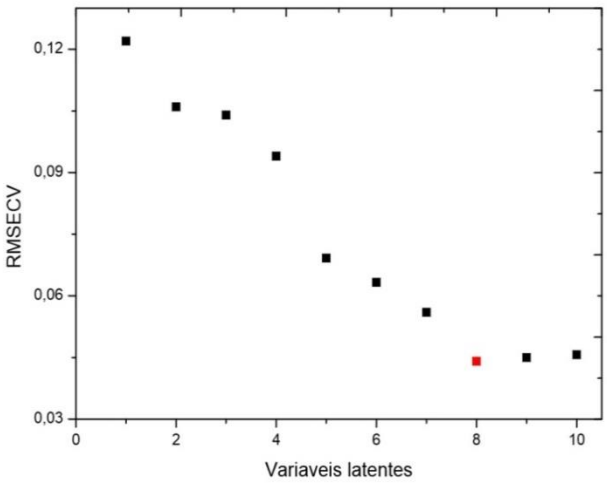


Figura 27 - Determinação do número de variáveis latentes para ácido tartárico

Não houve amostras com comportamento *outliers* nos conjuntos de dados tanto do método de validação conjunto de teste quanto da validação cruzada.

Os resultados das figuras de mérito dos modelos de calibração multivariada para o ácido tartárico com dois métodos de validação (conjunto de teste e validação cruzada) encontram descritos na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para ácido tartárico

CONJUNTO DE TESTE								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSEP**	**RPD**	**Regiões**
1-TAR-TS	Nenhum	0,782	0,06	2,14	0,529	0,12	1,46	9400-5446.4 4424.2-4246.8
2-TAR-TS	***Straight line subtraction***	**0,917**	**0,04**	**3,49**	**0,817**	**0,07**	**2,35**	**7502.3-5446.4 4601.7-4246.8**
VALIDAÇÃO CRUZADA								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSECV**	**RPD**	**Regiões**
1-TAR-CV	Nenhum	0,818	0,06	2,35	0,470	0,09	1,38	7502.3-5446.4 4601.7-4246.8
2-TAR-CV*	***Straight line subtraction***	**0,964**	**0,02**	**5,51**	**0,881**	**0,04**	**2,91**	**6102.1-5446.4**

Nos modelos de TS percebe-se vasta distinção entre os dois modelos, que se diferem pelo uso de pré-processamento (*straight line subtraction*) e região espectral de trabalho, o que influenciaram fortemente em seus respectivos resultados de R^2, erros quadráticos médios de calibração (RMSEC) e de validação (RMSEP/CV) e RPD.

A aplicação da validação cruzada resultou também em dois modelos caracterizados pela grande diferença entre os valores das figuras de mérito. Por sua vez, o modelo 2-TAR-CV apresentou pequenos erros quadráticos (RMSEC e RMSECV) e um alto valor de RPD na calibração (> 5,00), indicando boa calibração segundo Dal Zotto et al. 2008.

Por meio das Figuras 28 e 29 podem ser visualizados os gráficos de correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo, assim como a relação entre resíduo e valor ajustado para os melhores modelos desenvolvidos pelos métodos de validação de conjunto de teste (2-TAR-TS) e validação cruzada (2-TAR-CV) para o ácido tartárico.

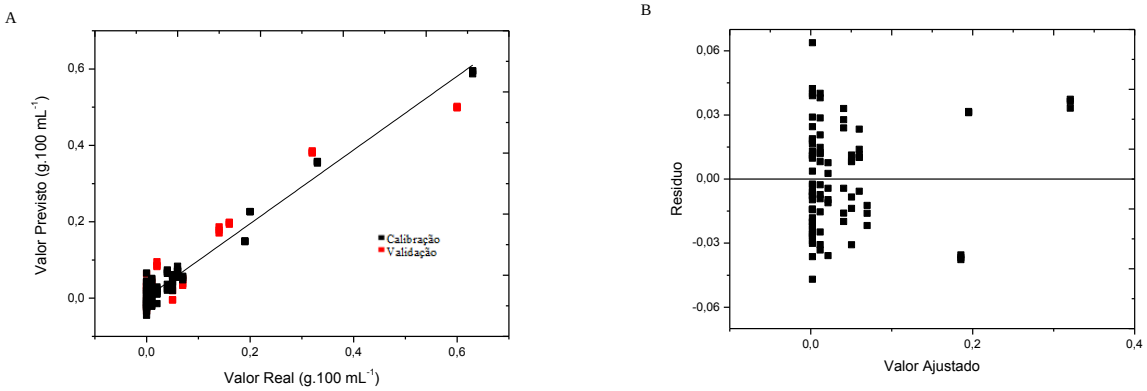


Figura 28 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o ácido tartárico com método de validação conjunto de teste

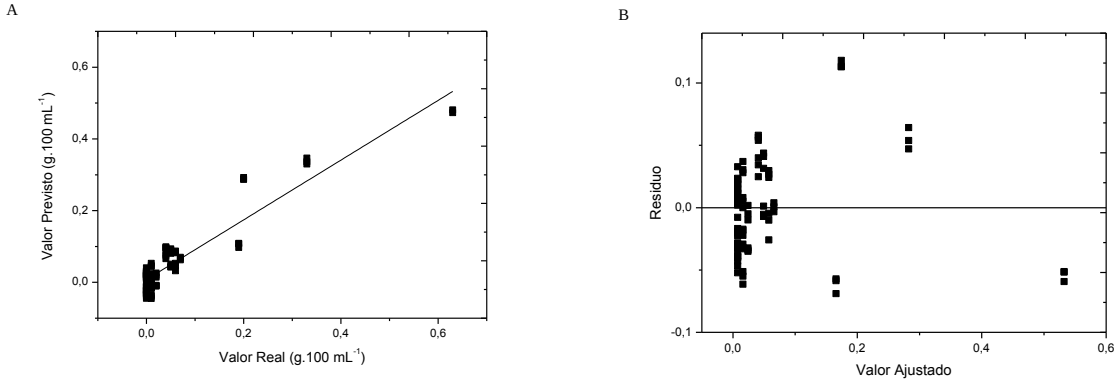


Figura 29 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração do ácido tartárico com método de validação cruzada

5.4.1.5 Sacarose

O número ótimo de variáveis latentes a serem usadas nos modelos de calibração para a sacarose foi calculado através da validação cruzada, sendo seis o número de VL que obteve o menor RMSECV (Figura 30).

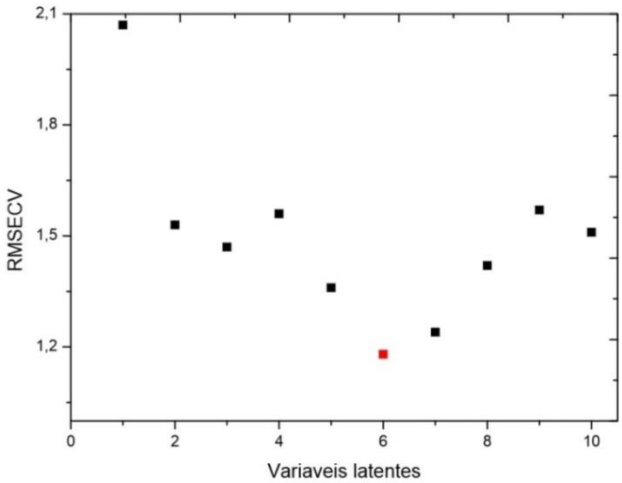


Figura 30 - Determinação do número de variáveis latentes para a sacarose

A remoção das amostras *outliers* é parte substancialmente importante no desenvolvimento de modelos de calibração, pois podem influenciar de forma inadequada a construção do modelo (MARTINS; FERREIRA, 2013). Neste caso, nenhum *outlier* foi detectado para o método de conjunto de teste, mas para validação cruzada três espectros de comportamento atípico foram excluídos.

Os resultados das figuras de mérito (R^2, RMSEC, RMSEP/CV, RPD) dos modelos para sacarose usando ou não pré-processamento e empregando validação cruzada e conjunto-teste são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para sacarose

CONJUNTO DE TESTE								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSEP**	**RPD**	**Regiões**
1-SAC-TS	Nenhum	0,703	0,94	2,21	0,752	1,33	2,05	9400-6098.3
2-SAC-TS*	***Constant offset elimination***	**0,828**	**1,10**	**2,40**	**0,845**	**1,06**	**2,56**	**7502.3-5446.4 4601.7-4246.8**
VALIDAÇÃO CRUZADA								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSECV**	**RPD**	**Regiões**
1-SAC-CV	**1ª. deriv. + MSC**	**0,881**	**0,91**	**2,90**	**0,783**	**1,18**	**2,15**	**9400-7498.4 6102.1-5446.4 4601.7-4246.8**
2-SAC-CV	Nenhum.	0,831	1,13	2,50	0,659	1,53	1,77	7502.3-5446.4 4601.7-4246.8

Nos modelos de conjunto de teste o pré-processamento *Constant offset elimination* influenciou de forma positiva os resultados dos parâmetros de avaliação da qualidade do modelo, uma vez que o R^2 de calibração e validação tiveram um aumento de cerca de 11%, enquanto os valores de *performance* (RPD) do modelo também foram superiores. O mesmo comportamento acontece com modelos da validação cruzada, os R^2 superiores e os RMSEE e RMSECV inferiores sugerem que o uso combinado do pré-processamento 1ª. deriv. + MSC e a inclusão da faixa espectral que compreende de 9400 a 7498 cm^{-1} elevam a eficiência dos modelos.

Ferrão e colaboradores (2007) analisaram sacarose em leite em pó com método de validação cruzada e regressão PLS. Utilizando a técnica de espectroscopia de UV-VIS observaram R^2 de 0,95, RMSEC de 2,80 RMSECV de 2,57 para três VL. Embora, o R^2 tenha sido maior e o número de VL menor, os erros quadráticos médios foram superiores ao dobro dos valores do presente estudo. Já, Li, Goovaerts e Meurens (1996) trabalharam com modelos de calibração multivariada utilizando NIR e PLS para a determinação de sacarose e obtiveram R^2 de 0,96, RMSEC de 0,302 g.100 mL^{-1} com 9 VL. Xie et al. (2009) em modelos de calibração para a sacarose com diferentes pré-processamentos estimaram R^2 0,89, RMSECV 0,58 sem processamento e R^2 0,99 e RMSECV 0,13 para segunda derivada.

As Figuras 31 e 32 apresentam os gráficos de correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo, assim como a relação entre resíduo e valor ajustado para os métodos de validação de conjunto-teste e validação cruzada respectivamente, para os melhores modelos 2-SAC-TS e 1-SAC-CV para a sacarose.

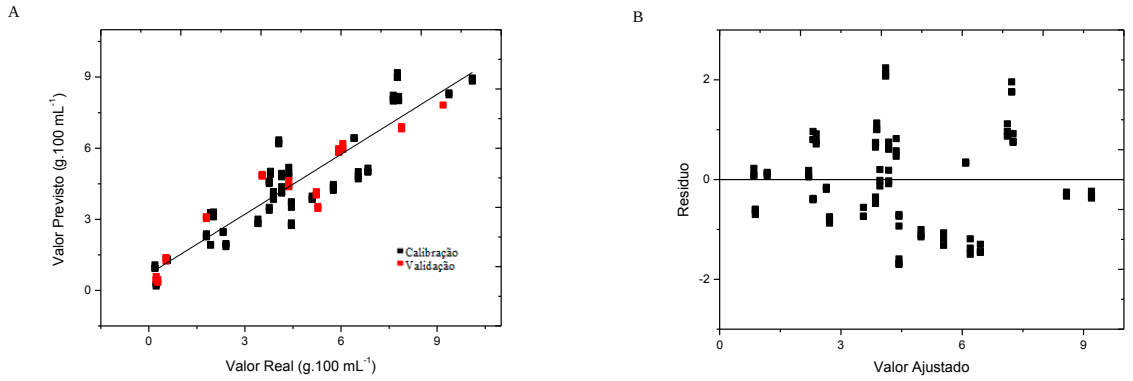


Figura 31 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para a sacarose com método de validação conjunto de teste

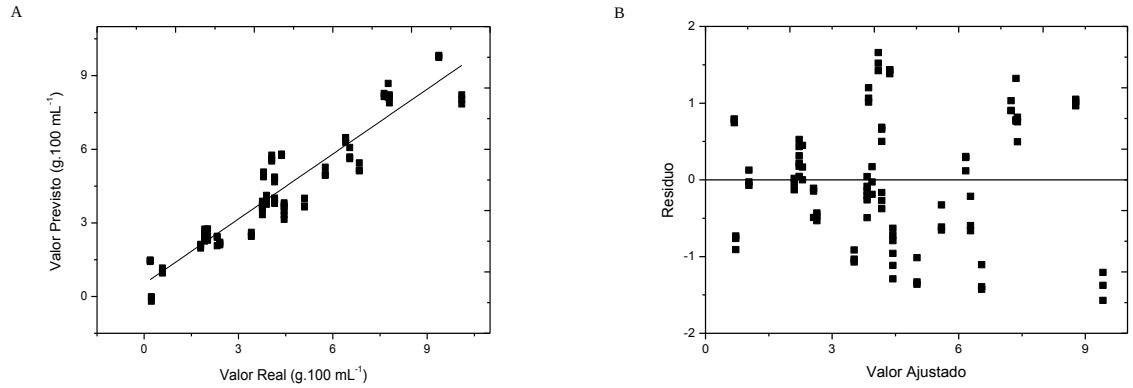


Figura 32 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração da sacarose com método de validação cruzada

Os coeficientes de regressão apresentam-se adequados para ambos os métodos de validação. Porém, percebe-se através das Figuras 31a e 32a que os modelos de método conjunto de teste e validação cruzada apresentam uma média dispersão, tanto para as amostras de calibração quanto de validação, indicando que os modelos não conseguem prever adequadamente na fase previsão para aproximar-se do valor real do analito. Contudo, os gráficos de resíduos apresentam-se de forma independente, sendo homoscedásticos.

5.4.1.6 Glicose

O método usado para a determinação do número ideal de variáveis latentes a serem incluídas nos modelos de calibração para a glicose foi à validação cruzada e de acordo com a Figura 33 o número de VL que minimizou o RMSECV foi cinco.

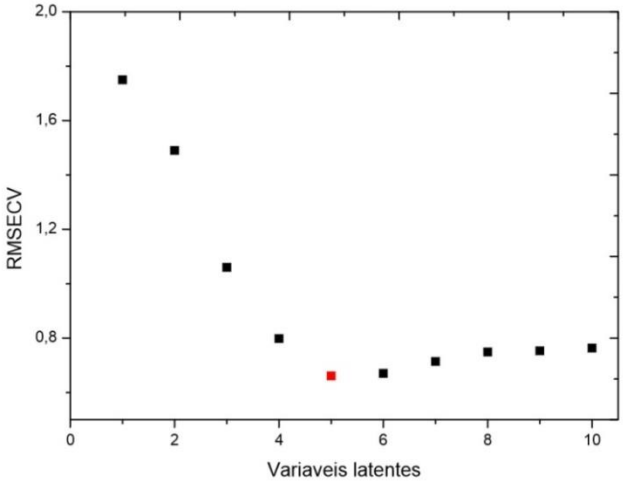


Figura 33 - Determinação do número de variáveis latentes para a glicose

Dois modelos de calibração multivariada foram desenvolvidos para cada método de validação (conjunto de teste e validação cruzada) proposto para a quantificação de glicose e seus resultados encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para glicose

CONJUNTO DE TESTE								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSEP**	**RPD**	**Regiões**
1-GLI-TS	***Constant offset elimination***	**0,892**	**0,73**	**3,05**	**0,806**	**1,16**	**2,30**	**8451.2-7498.4 4424.2-4246.8**
2-GLI-TS	Nenhum	0,811	1,15	2,32	0,820	1,05	3,01	9400-7498.4 4601.7-4246.8
VALIDAÇÃO CRUZADA								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSECV**	**RPD**	**Regiões**
1-GLI-CV*	**2ª. derivada**	**0,951**	**0,49**	**4,55**	**0,906**	**0,66**	**3,27**	**9400-6098.3**
2-GLI-CV	Nenhum	0,861	0,83	2,68	0,787	0,99	2,17	8451.2-7498.4 4424,2-4246.8

A utilização de pré-processamento (*Constant offset elimination*) para o método de validação conjunto de teste não propiciou grandes alterações nos parâmetros de avaliação dos modelos. As regiões espectrais utilizadas também foram parecidas e a maior distinção de valores ocorreu no conjunto de calibração dos modelos, sendo o modelo 1-GLI-TS mais indicado para a previsão de amostras.

Entretanto, na validação cruzada houve significativa melhora no desempenho dos modelos quando usada a segunda derivada. O modelo 1-GLI-CV, que usou somente a região que compreende 9400 a 6098,3 cm^{-1}, obteve R^2 maiores e erros quadráticos médios menores para ambos os conjuntos, além de possuir um RPD de calibração de 4,55 que indica uma boa ou excelente predição.

Li, Goovaerts e Meurens (1996) em seu estudo de desenvolvimento de modelos de calibração multivariada para a quantificação de açúcares utilizando PLS e infravermelho próximo, obtiveram R^2 de 0,92, RMSEP de 0,157 g.100 mL^{-1} com 7 VL para a glicose. Xie e colaboradores (2009) em estudo de modelos multivariados com a glicose observaram R^2 de 0,74, RMSECV de 0,12 e R^2 de 0,85 e RMSECV de 0,12 para modelos sem processamento e com segunda derivada respectivamente. Bellon, Vigneau e Sévila (1994) analisaram o teor glicose em fermentado de suco de uva utilizando PLS, infravermelho médio e como método de referência, a análise enzimática. O resultado para o erro RMSEC foi de 0,34 g.100 mL^{-1}.

Os gráficos da correlação entre valores reais e valores previstos por modelo de calibração e os gráficos que relaciona os valores ajustados e resíduos podem ser visualizados nas Figuras 34 para o modelo 1-GLI-TS e 35 para 1-GLI-CV.

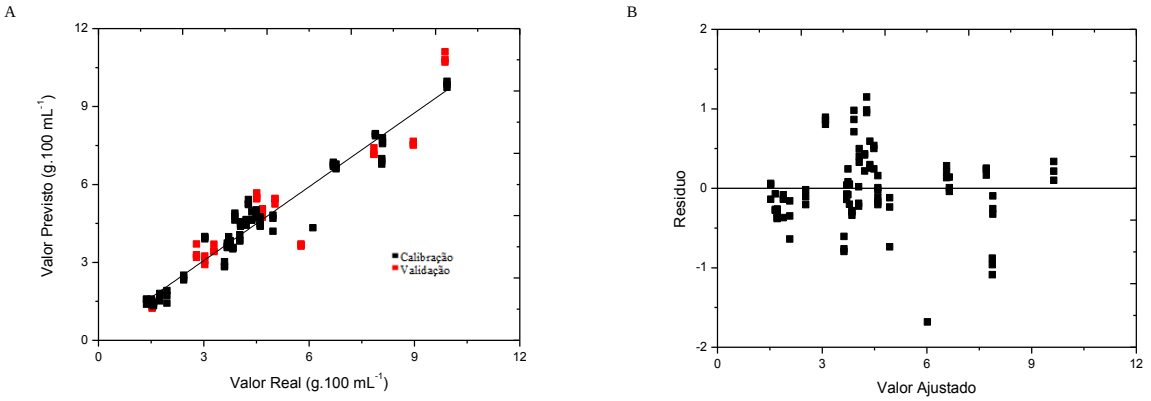


Figura 34 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para a glicose com método de validação conjunto de teste

O modelo 1-GLI-TS apresenta boa correlação quando se comparam os valores reais e os valores que o modelo foi capaz de fazer a previsão das amostras dos conjuntos de calibração e validação (Figura 34a). Os pontos se aproximam bastante da reta exceto para dois pontos próximos a concentração real de 6 g.100 mL^{-1}, que por sua vez, apresentaram uma previsão pessimista a respeito da concentração esperada, que para este caso foram abaixo de 4 g.100 mL^{-1}.

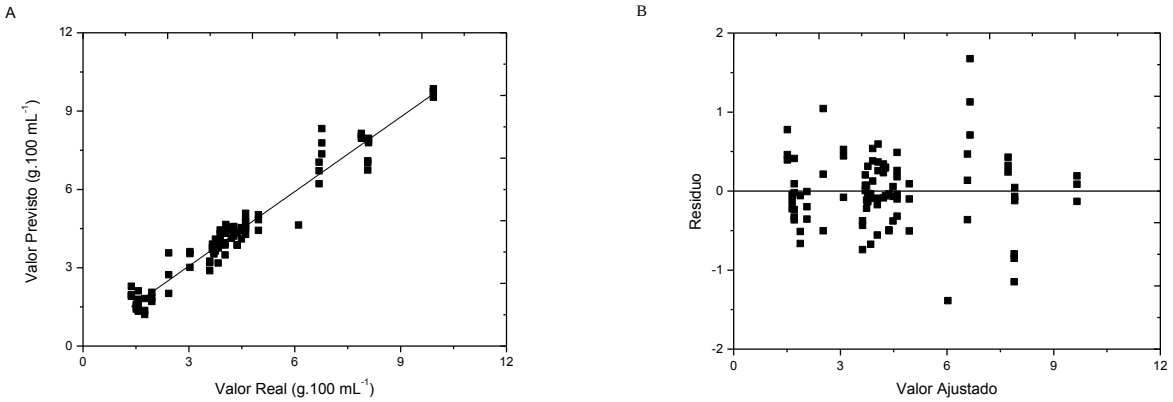


Figura 35 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração da glicose com método de validação cruzada

A Figura 35a apresenta boa correlação entre valores experimentais e previstos pelo modelo, sendo que se nota apenas alguns pontos desajustados. A distribuição dos pontos na Figura 34b e 35b expressa a homoscedasticidade entre a variância dos erros, onde pontos separados são o ideal, perfil semelhantes observado para o método TS e CV. Da mesma forma, o comportamento da reta e o gráfico que expressa a homoscedasticidade dos dados são semelhantes aos do conjunto de teste.

5.4.1.7 Frutose

O número de variáveis latentes a serem incluídas no modelo de calibração multivariada para a frutose foi determinado por meio da validação cruzada, com base no menor número que permite que o erro RMSECV seja o mínimo possível. A análise do gráfico da Figura 36 indica que o número ideal de VL é oito.

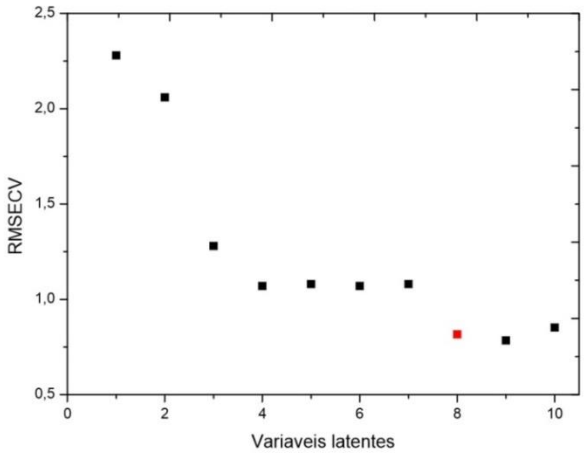


Figura 36 - Determinação do número de variáveis latentes para a frutose

Foram detectados quatro espectros com comportamento anormal para o método conjunto de teste e três para validação cruzada, que foram excluídos dos conjuntos de dados.

Na Tabela 17 são apresentados os resultados para os parâmetros de avaliação dos modelos de calibração para frutose com diferentes pré-processamentos para os métodos de validação por conjunto de teste e validação cruzada.

Tabela 17 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para frutose

CONJUNTO DE TESTE								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSEP**	**RPD**	**Regiões**
1-FRU-TS	***Constant offset elimination***	**0,936**	**0,60**	**3,98**	**0,815**	**1,09**	**2,33**	**6102.1-5446.4**
2-FRU-TS	Nenhum	0,889	0,87	3,01	0,850	0,98	2,61	9400-7498.4
VALIDAÇÃO CRUZADA								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSECV**	**RPD**	**Regiões**
1-FRU-CV*	***Constant offset elimination***	**0,936**	**0,60**	**3,98**	**0,871**	**0,82**	**2,79**	**6102.1-5446.4**
2-FRU-CV	Nenhum	0,918	0,69	3,49	0,841	0,90	2,51	9400-7498.4 4601.7-4246.8

A utilização da *Constant offset elimination* proporcionou resultados satisfatórios para o conjunto de calibração do 1-FRU-TS e valores relativamente inferiores para o conjunto de validação.

Os conjuntos de calibração dos métodos de validação analisados obtiveram exatamente os mesmos resultados, isto porque a região espectral e o pré-processamento otimizados coincidentemente foram os mesmos, a variação se deu nos conjuntos de validação onde cada método trabalha de uma forma distinta, possuindo o TS um conjunto separado para a validação do modelo, enquanto o CV utiliza as amostras do próprio conjunto de calibração.

Para o CV também foi observado que o melhor modelo (1-FRU-CV) fez o uso do pré-processamento de *Constant offset elimination*, embora o R^2 para o modelo 2-FRU-VC tenha se apresentado relativamente melhor.

Neste contexto, Li, Xie et al. (2009) obtiveram como resultados para seus modelos de frutose sem pré-processamento e com segunda derivada R^2 de 0,69, RMSECV de 0,48 e R^2 de 0,96 e RMSECV de 0,45 respectivamente. Bellon, Vigneau e Sévila (1994) analisaram em fermentado de suco de uva a frutose utilizando como método de referência análises enzimáticas e como técnica moderna o infravermelho médio, obtendo RMSEC de 0,33 g.100 mL^{-1}.

Os gráficos de correlação entre valor real e valor previsto por modelo, assim como a relação entre resíduo e valor ajustado para os métodos de validação de conjunto-teste e validação cruzada para a frutose podem ser observados por meio das Figuras 37 e 38.

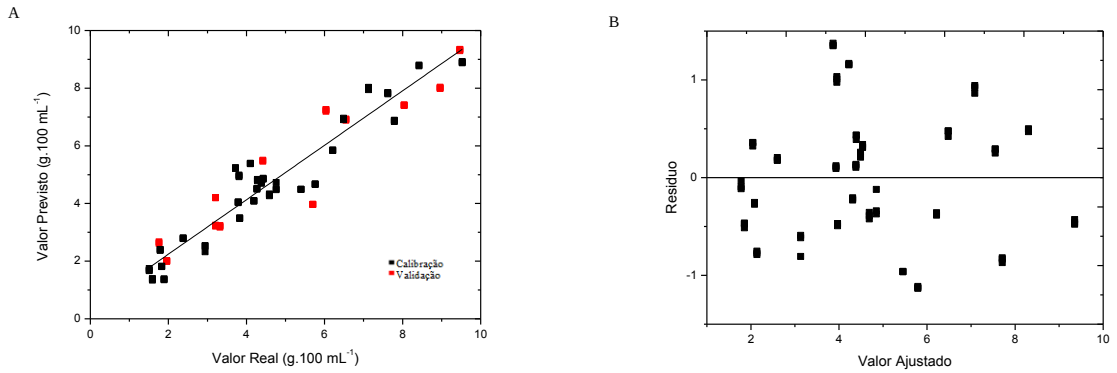


Figura 37 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para a frutose com método de validação conjunto de teste

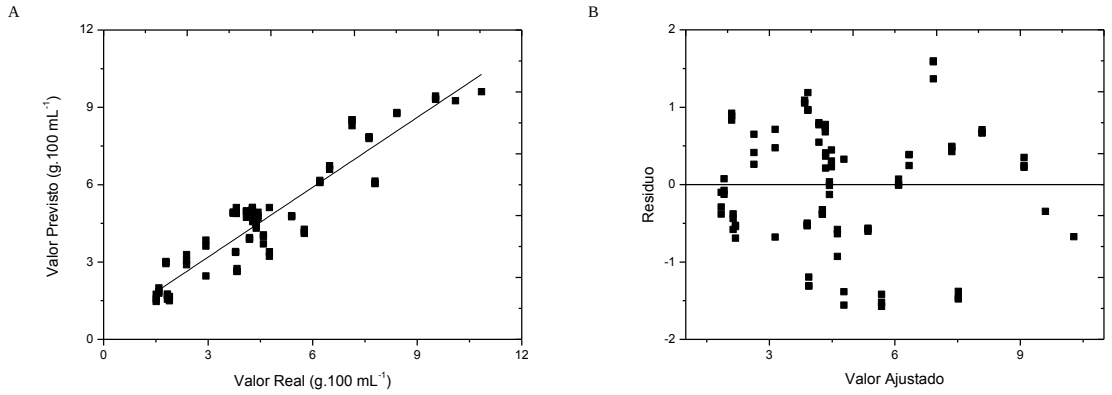


Figura 38 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração da frutose com método de validação cruzada

As Figuras (37a e 38a) representam visualmente o quanto os modelos são capazes de prever a concentração real do analito. Percebe-se, a partir dos resultados, uma correlação satisfatória entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, uma vez que os pontos se aproximam bastante da reta linear. Já os gráficos dos resíduos demonstram que sua distribuição é independente e sobretudo não há tendência entre os pontos.

5.4.1.8 Sólidos solúveis totais

Através da análise da validação cruzada, pode-se determinar o número ideal de variáveis latentes que deveria ser utilizada nos modelos de calibração multivariada para a determinação de sólidos solúveis totais. De acordo com a Figura 39 tem-se que cinco é o número de VL mais indicado, pois é aonde o RMSECV tem seu menor valor.

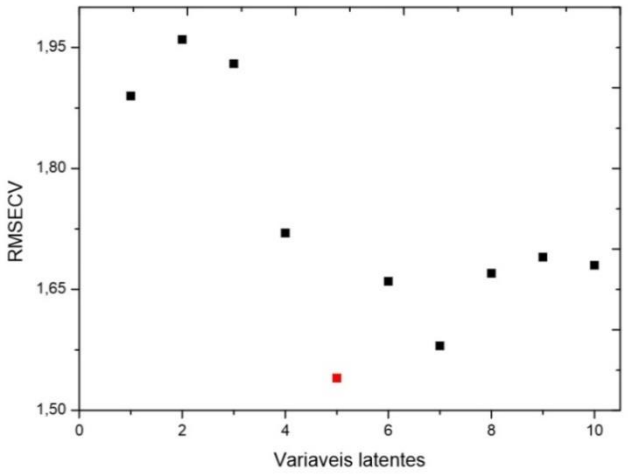


Figura 39 - Determinação do número de variáveis latentes para sólidos solúveis totais

Nos modelos para a previsão de sólidos solúveis totais com TS, cinco espectros foram excluídos do conjunto de dados por apresentarem comportamento anormal. Todavia, no método CV apenas um *outlier* foi detectado e excluído.

Segundo Nicolai et al. (2007) os *outliers* são amostras que fogem do comportamento normal do conjunto de dados, e podem ser atribuídos a erros de digitação e de transferência de arquivos, sensores com defeitos e também por problemas de amostragem. No caso dos modelos para os sólidos solúveis totais, a presença de sete amostras com comportamento anômalo pode indicar um problema relativo a amostragem dos dados, que por sua vez, são amostras com diferentes sabores e heterogêneas quanto aos teores de SST.

Os resultados para os melhores modelos para sólidos solúveis totais empregando validação cruzada e conjunto de teste são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados para os modelos de calibração multivariada para sólidos solúveis totais

CONJUNTO DE TESTE								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSEP**	**RPD**	**Regiões**
1-SST-TS	**1ª. derivada**	**0,600**	**1,31**	**1,58**	**0,513**	**1,56**	**1,44**	**9400-5446.4**
2-SST-TS	Nenhum	0,609	1,49	1,45	0,348	1,69	1,28	7502.3-5446.4 4601.7-4246.8
VALIDAÇÃO CRUZADA								
Modelo	**Proces.**	**R^2 Cal**	**RMSEC**	**RPD**	**R^2 Val**	**RMSECV**	**RPD**	**Regiões**
1-SST-CV	**2ª. derivada**	**0,649**	**1,27**	**1,69**	**0,445**	**1,54**	**1,34**	**9400-7498.4 4601.7-4246.8**
2-SST-CV	Nenhum	0,630	1,31	1,64	0,377	1,64	1,27	9400-7498.4

No caso da comparação dos modelos TS nota-se uma melhora expressiva para o modelo 1-SST-TS que utiliza como pré-processamento a primeira derivada e centragem na média para os parâmetros do conjunto de validação, enquanto o 2-SST-TS usa apenas centragem na média. As diferentes regiões de trabalho também exercem peso sobre os resultados, uma vez que a variação do comprimento de onda de 9400 até 5446.4 cm^{-1} permitiu que as informações químicas necessárias ao modelo estivessem presentes em tal região.

Os modelos 1-SST-CV e 2-SST-CV, da validação cruzada apresentaram valores bem próximos de R^2, erros médios e RDP. Com o pré-processamento de segunda derivada no primeiro modelo, o R^2 de validação obteve um valor superior e o RMSECV foi inferior ao modelo ao modelo apenas com centragem na média.

Os parâmetros avaliados para o conjunto de validação do modelo 1-SST-TS apresentaram elevada melhora nos resultados da validação em comparação com o modelo 1-SST-CV, uma vez que o R^2 e o RPD aumentou.

Através da Figura 40a, que dispõe sobre os resultados referentes ao modelo 1-SST-TS, verifica-se pela curva de correlação entre os valores obtidos pelo método de referência e previstos pelo modelo que tanto as amostras do conjunto de calibração quanto do conjunto de validação apresentam resultados regulares. Também, pela Figura 41b observa-se homoscedasticidade entre as variâncias do erros, possuindo o modelo características reais de previsão.

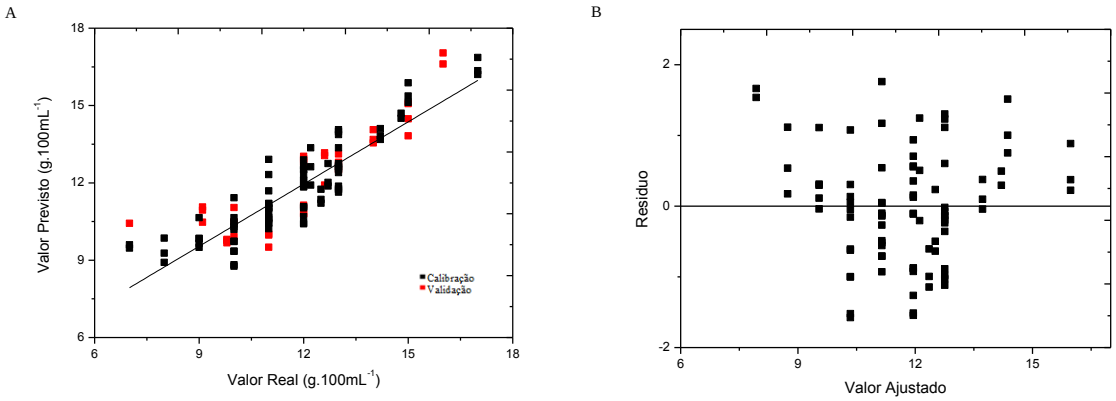


Figura 40 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para os sólidos solúveis totais com método de validação conjunto de teste

Da mesma forma, na Figura 41 podem ser observados os gráficos de correlação e resíduos para o modelo 1-SST-CV para o conjunto de dados de calibração.

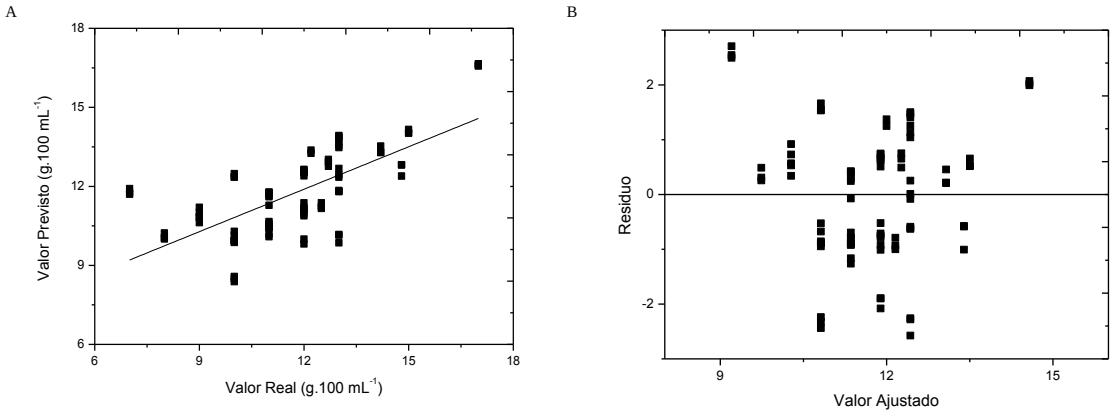


Figura 41 - a) Correlação entre valor real e valor previsto pelo modelo; b) Gráfico dos valores ajustados versus resíduos para o conjunto de calibração dos sólidos solúveis totais com método de validação cruzada

Percebe-se uma maior distância entre os dados e a reta linear, problema que pode ser também percebido pelos baixos valores de R^2, indicando que para alguns pontos as concentrações previstas estão sendo supervalorizadas. Muito embora, o gráfico da Figura 41b revela a presença de homoscedasticidade entre os dados, ou seja, a variância dos erros é muito semelhante.

No entanto, os modelos em questão, apesar de apresentarem algumas figuras de mérito com resultados bons (RMSEC, RMSEP/CV), não permitem a aplicabilidade na previsão de amostras desconhecidas, pois os coeficientes (R^2) tanto da calibração quanto da validação tiveram valores bem baixos (<0,649), e ainda os valores de *performance* ou RPD também se apresentaram de forma insatisfatória.

Os erros de medição relacionam os erros instrumentais e erros analíticos de quantificação dos analitos como nas análises de referência (ESBENSEN; GELADI, 2010). E os erros relativamente regulares que foram obtidos nos modelos apresentados para os oito analitos corrobora com a heterogeneidade das amostras visualizadas através da Análise de Componentes Principais, pois para a idealização de modelos de regressão o conjunto de dados devem ser o mais homogêneo possível.

As amostras de sucos e néctares analisados provem de várias frutas que por sua vez, vem de vários estados brasileiros, de modo que a matriz em si já é passível de diferenciações dentro de um só tipo de fruta. Ademais foram utilizadas marcas distintas para conseguir uma maior variabilidade de concentrações de um mesmo analito, e por fim há uma notável diferença de concentração dos analitos em sucos e em néctares, recebendo este último maior quantidade de adição de açúcares e acidulantes. Portanto, os erros são consequência da amostragem, parte analítica e instrumental.

5.4 ANÁLISE DE SUCOS NATURAIS E PRODUZIDOS NA REGIÃO SUDOESTE

5.4.1 Aplicação dos modelos de calibração

Com o propósito de aplicabilidade nas circunstâncias deste estudo, considerou-se que, com exceção dos modelos gerados para sólidos solúveis totais os demais obtiveram para a maioria das figuras de mérito, como número de VL, R^2, RMSEC, RMSECV, correlação entre valores de reais e preditos e homocedasticidade de resíduos, valores aceitáveis a esta aplicação. Neste sentido, após comparação relativa destes parâmetros de avaliação, os

seguintes modelos foram considerados viáveis e foram empregados na análise de amostras regionais de sucos de frutas: 2-ASC-CV, 1-CIT-TS, 1-MAL-CV, 2-TAR-CV, 2-SAC-TS, 1-GLI-CV e 1-FRU-CV.

A quantificação dos ácidos ascórbico, cítrico, málico e tartárico em sucos de uva produzidos na Região Sudoeste do Paraná e sucos naturais (laranja, laranja lima, abacaxi, maçã e uva) pode ser observada por meio da Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados para aplicação dos modelos desenvolvidos para a determinação de ácidos orgânicos em sucos (g.100 mL^{-1})

Código	Ác. Ascórbico	Ác. Cítrico	Ác. Málico	Ác. Tartárico
		Sucos da Região Sudoeste		
SUAP1	ND	0,01 ± 0,01	0,14 ± 0,05	0,30 ± 0,08
SUAP2	ND	ND	0,15 ± 0,01	0,24 ± 0,08
SUAP3	ND	ND	ND	0,42 ± 0,14
SUAP4	ND	0,02 ± 0,03	ND	0,29 ± 0,06
SUAP5	ND	ND	ND	0,29 ± 0,07
SUAP6	ND	0,03 ± 0,03	0,06 ± 0,04	0,35 ± 0,13
		Sucos Naturais		
SLN	ND	ND	ND	ND
SLLN	ND	ND	ND	ND
SAN	ND	ND	ND	ND
SMN	ND	0,02 ± 0,02	0,35 ± 0,07	ND
SUN	ND	ND	0,12 ± 0,06	0,36 ± 0,03

ND = Não Detectável. Média de três repetições ± desvio padrão.

O ácido ascórbico não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas, os motivos mais relevantes para tal acontecimento podem estar relacionados com fato de a concentração deste ácido nos sucos estar muito baixa em função de possível oxidação do mesmo quando entra em contato com o ambiente. Ainda a faixa analítica de trabalho, construída a partir da concentração das amostras comercias não contemplou as concentrações destas amostras regionais (aplicação), podendo estarem abaixo ou acima da curva de calibração, e por fim, sabe-se que em alguns tipos de frutas não há presença significativa deste ácido, como a exemplo a uva e maçã.

O ácido cítrico foi mensurado em quatro das onze amostras, sendo em três amostras de sucos de uva e no suco de maçã, porém em baixíssimos níveis. O mais surpreendente é que nas amostras de sucos de laranja, laranja lima e abacaxi não foi possível detectar o ácido cítrico, visto que deveriam ser encontradas nestas as maiores concentrações. Provavelmente também ocorreu um dos problemas citados anteriormente, não sendo possível sua

mensuração. Enquanto que nas amostras de uva e maçã a concentração variou de 0,01 a 0,03 g.100 mL^{-1}, sendo possível quantifica-las com êxito.

Quanto ao ácido málico, sua mensuração ocorreu em três amostras de suco de uva e nos sucos naturais de uva e maçã. No suco de maçã foi encontrada a maior concentração do ácido (0,35 g.100 mL^{-1}) sendo a menor (0,06 g.100 mL^{-1}) em um suco de uva da região. É comum encontrar em sucos de uva, mosto e vinho também a presença do ácido málico, como no trabalho de Guerra, Daud e Rizzon (1992) que encontraram aproximadamente 0,16 g.100 mL^{-1} do respectivo ácido em uvas.

Detectados em todas as amostras de suco de uva, a mensuração do ácido tartárico, mostrou-se muito eficiente. Sendo que os teores mínimo e máximo foram respectivamente 0,24 e 0,42 g.100 mL^{-1}, e o suco natural de uva foi o segundo maior valor determinado. As quantidades mensuradas pelo modelo são próximas às determinadas por Guerra, Daud e Rizzon (1992) (0,17 g.100 mL^{-1}).

Em trabalho de Rizzon e Sganzerla (2007) foi estudado os ácidos orgânicos tartárico e málico em mosto de uva de diversos cultivares de uva. A média dos teores de tartárico e málico para os mostos de *Cabernet Sauvignon*, *Cabernet Franc* e *Merlot* foram respectivamente 0,75 g.100 mL^{-1} e 0,45 g.100 mL^{-1}. Ainda, esses pesquisadores determinaram uma razão média entre esses dois ácidos que é de 1,8 vezes. Sendo então, o teor de ácido tartárico superior quase o dobro do que o teor de málico, um indicador que pode auxiliar a avaliar o grau de maturação da uva.

A Tabela 20 traz os resultados para a quantificação dos açúcares sacarose, glicose e frutose em sucos de uva produzidos na Região Sudoeste do Paraná e sucos naturais (laranja, laranja lima, abacaxi, maçã e uva).

Tabela 20 - Resultados para aplicação dos modelos desenvolvidos para a determinação de açúcares em sucos em g.100 mL^{-1}

Código	Sacarose	Glicose	Frutose
	Sucos da Região Sudoeste		
SUAP1	1,60 ± 0,27	6,89 ± 1,54	6,17 ± 0,92
SUAP2	1,43 ± 0,37	8,30 ± 0,75	8,05 ± 0,73
SUAP3	1,08 ± 0,53	1,25 ± 0,21	2,77 ± 0,18
SUAP4	2,02 ± 0,42	6,48 ± 0,54	6,69 ± 0,59
SUAP5	2,76 ± 0,29	4,73 ± 0,42	5,36 ± 0,27
SUAP6	1,43 ± 0,55	8,77 ± 0,76	7,56 ± 0,44
	Sucos Naturais		
SLN	0,49 ± 0,18	3,14 ± 1,32	4,76 ± 1,31
SLLN	0,29 ± 0,06	2,11 ± 0,19	2,61 ± 0,28
SAN	0,30 ±0,08	3,55 ± 1,17	2,46 ± 0,62
SMN	1,03 ± 0,23	2,57 ± 0,70	4,16 ± 0,97
SUN	1,19 ± 0,29	1,38 ± 0,15	2,85 ± 0,61

Média de três repetições ± desvio padrão.

A sacarose, açúcar detectado em todas as amostras, foi encontrada em maiores quantidades nos sucos da Região Sudoeste, indicando possivelmente sua adição nestes sucos ditos como integrais. Já nos sucos naturais a variação deste açúcar foi de 0,29 a 1,19 g.100 mL^{-1}, todavia como foram preparados na hora estes sucos não tiveram em hipótese alguma a adição de sacarose, podendo indicar que o modelo de quantificação tenha superestimado algumas destas concentrações nos sucos naturais, já que o esperado seriam concentrações bem baixas deste açúcar.

Os teores mínimos e máximos para glicose e frutose foram 1,25 e 8,77 g.100 mL^{-1}, e 2,46 e 8,05 g.100 mL^{-1} respectivamente. Os açúcares glicose e frutose possuíram relativamente teores bem próximos uns dos outros para o mesmo suco, o mesmo foi relatado em estudo de Ma et al. (2015) e Etienne et al. (2002). Caldas et al. (2015) determinou em suco de uva em duas diferentes marcas os teores de frutose e glicose respectivamente que foram 5,45 e 5,10 g.100 mL^{-1} e 5,20 e 4,59 g.100 mL^{-1}.

Sucos de manga foram avaliados por Duarte et al. (2002) que desenvolveram modelos de calibração multivariada empregando infravermelho médio e PLS. Os resultados para os açúcares sacarose, glicose e frutose foram respectivamente 0,28, 0,20 e 0,34 g.100 mL^{-1} valores bem abaixo dos que os do presente estudo. No entanto, Kelebek et al (2009) em análises de suco de laranja encontrou valores relativamente superiores aos do presente estudo para sacarose (5,93 g.100 mL^{-1}), para glicose valores próximos (3,23 g.100 mL^{-1}), e menor para frutose (2,85 g.100 mL^{-1}).

A garantia do equilíbrio entre os gostos ácido e doce nos sucos de uva é devido a este possuir altos teores dos açúcares glicose e frutose e ainda elevada acidez, em que são encontrados em conjunto os ácidos tartárico, málico e cítrico (MARZAROTTO, 2005). Ainda, de acordo com Aquarone et al. (2001) o suco de uva possuiu elevados teores de açúcares, glicose e frutose, e variam de 15 a 30% em função do tipo de solo, clima, estádio de maturação e variedade.

5.4.2 Análise físico-química de sucos naturais e da Região Sudoeste do Paraná

A caracterização físico-química das amostras de suco são importantes para se obter maior conhecimento a respeito das particularidades de cada bebida, assim como, parâmetros de controle de qualidade e seus resultados são exibidas através da Tabela 21. O Teste de Tukey ($p<0,05$) foi aplicado separadamente para as amostras dos sucos da Região Sudoeste e para os sucos naturais para melhor comparação das médias.

Tabela 21 - Resultados para os parâmetros físico-químicos das amostras de aplicação do modelo

Código	Umidade (%)	Cinzas (%)	pH	ATT (g. 100 g^{-1})	ST (%)
			Sucos da Região Sudoeste		
SUAP1	$90,64^{a} \pm 0,30$	$0,15^{c} \pm 0,01$	$2,83^{f} \pm 0,01$	$0,38^{cd} \pm 0,01$	$9,52^{d} \pm 0,11$
SUAP2	$88,59^{bc} \pm 0,37$	$0,15^{c} \pm 0,01$	$2,96^{cd} \pm 0,02$	$0,39^{cd} \pm 0,01$	$11,61^{c} \pm 0,07$
SUAP3	$85,52^{e} \pm 0,07$	$0,24^{b} \pm 0,01$	$3,12^{b} \pm 0,01$	$0,37^{d} \pm 0,01$	$14,43^{a} \pm 0,03$
SUAP4	$85,97^{e} \pm 0,27$	$0,21^{b} \pm 0,01$	$2,91^{e} \pm 0,01$	$0,41^{bc} \pm 0,03$	$14,18^{a} \pm 0,12$
SUAP5	$88,02^{c} \pm 0,02$	$1,08^{a} \pm 0,19$	$3,01^{c} \pm 0,02$	$0,62^{a} \pm 0,03$	$11,97^{c} \pm 0,02$
SUAP6	$87,39^{d} \pm 0,09$	$1,19^{a} \pm 0,12$	$3,37^{a} \pm 0,03$	$0,67^{a} \pm 0,01$	$12,57^{b} \pm 0,11$
			Sucos Naturais		
SLN	$93,53^{a} \pm 0,95$	$0,88^{b} \pm 0,01$	$4,21^{b} \pm 0,01$	$0,49^{c} \pm 0,01$	$7,01^{d} \pm 0,01$
SLLN	$92,90^{a} \pm 0,15$	$1,22^{a} \pm 0,11$	$5,79^{a} \pm 0,01$	$0,13^{e} \pm 0,01$	$7,19^{cd} \pm 0,15$
SAN	$92,62^{a} \pm 0,21$	$0,28^{c} \pm 0,01$	$3,35^{d} \pm 0,01$	$0,75^{a} \pm 0,01$	$7,49^{c} \pm 0,02$
SMN	$87,46^{b} \pm 0,17$	$0,31^{c} \pm 0,01$	$3,80^{c} \pm 0,01$	$0,24^{d} \pm 0,07$	$12,45^{a} \pm 0,09$
SUN	$87,96^{b} \pm 0,17$	$0,50^{d} \pm 0,12$	$3,22^{e} \pm 0,01$	$0,67^{b} \pm 0,01$	$11,94^{a} \pm 0,03$

ATT: acidez total titulável; ST: sólidos totais. Média de três repetições ± desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

Os teores de umidade das amostras SUAP2 e SUAP5, SUAP3 e SUAP4, são significativamente iguais perante análise de Tukey, em que foram observadas variações de

85,52% a 90,64%, assim como, SUAP1 e SUAP2, SUAP3 e SUAP4 e SUAP5 e SUAP6 para cinzas, sendo que a maior porcentagem foi de 1,19% e a menor de 0,15%.

O pH nos sucos de uva variou de 2,83 a 3,37, valores próximos aos encontrados por Carneiro et al. (2013) que trabalharam com diferentes marcas de néctar de uva e observaram valores a faixa de 2,85 a 3,31, por Santana et al. (2008) que observaram valores médios de 3,37 em suco de uva de diferentes marcas comercializados nas regiões Sudeste e Centro-oeste do Brasil e por Rizzon e Link (2006) sendo 3,37. Nota-se que o pH foi mantido baixo para todas as amostras o que desfavorece o crescimento de microrganismos, tal ação é aplicado pela indústria processadora de sucos.

A acidez se mostrou estatisticamente igual para SUAP1 e SUAP2, SUAP5 e SUAP6. Os teores de ATT para suco de uva variaram de 0,37 a 0,67 g.100g^{-1} os quais são semelhantes aos determinados por Carneiro et al. (2013) cuja variação foi de 0,30 a 0,69 g.100 g^{-1} em néctares de uva, próximos aos determinados por Pinheiro et al. (2009) em suco de uva extraído a vapor que foi de 0,67 g.100 g^{-1}, porém inferiores aos analisados por Santana et al. (2008) que observaram acidez de 0,83 g.100 g^{-1}.

A legislação brasileira (BRASIL, 2000) que impõe sobre os parâmetros de identidade e qualidade para suco de uva determina que a quantidade mínima aceitável para a acidez é 0,41 g.100 g^{-1} em suco de uva. Para tanto, está em desacordo com a lei os sucos SUAP1, SUAP2, SUAP3 que possuem respectivamente 0,38 0,39 e 0,37 g.100 g^{-1}.

Dentre os seis sucos produzidos na Região Sudoeste do Paraná anteriormente discutidos percebeu-se semelhanças de algumas amostras em relação a diferentes parâmetros: as amostras SUAP3 e SUAP4 são semelhantes nos quesitos umidade, cinzas e sólidos totais; já SUAP5 e SUAP6 para cinzas e acidez titulável, podendo estar relacionado ao mesmo cultivar de uva utilizado na preparação dos sucos e ainda a respeito da forma de preparo dos mesmos.

Quanto aos sucos naturais elaborados para a aplicação dos modelos em estudo, a caracterização físico-química mostrou-se de grande aplicabilidade para disseminação dos parâmetros de identidade das bebidas.

O pH dos sucos de laranja e laranja lima são estatisticamente diferentes (4,21 e 5,79) e essa diferença é percebida também sensorialmente, sendo o suco de laranja lima uma bebida mais agradável por possuir menor acidez. Valores inferiores foram relatados por Venâncio e Martins (2012) ao analisarem suco de laranja (3,55), e dois néctares de laranja de marcas diferentes (3,61 e 3,72) produzidos no Estado de São Paulo, também, Kelebek et al. (2009) determinou em sucos de laranja um pH médio de 3,35.

O que corrobora com a menor acidez do suco de laranja lima em comparação ao tradicional de laranja é o teor de ATT que foi respectivamente de 0,13 e 0,49 g. 100 g^{-1}. Venâncio e Martins (2012) em suco de laranja tradicional encontraram acidez de 0,23 g. 100 g^{-1} e em néctar de laranja 0,087 e 0,078 g. 100 g^{-1}, enquanto Kelebek e colaboradores (2009) determinaram ATT bem acima do presente estudo (0,91 g. 100 g^{-1}).

Rizzon, Bernard e Miele (2005) avaliaram suco de maçã com pH 3,74 e cinzas 0,24 g. 100 g^{-1}. Iha et al. (2006) analisaram 17 amostras de sucos de maçãs adquiridos em comercio local e obtiveram resultados médios para pH de 3,7 e acidez em ácido málico de 0,28 g. 100g^{-1}. Os parâmetros de identidade e qualidade para suco de maçã preconizam que o teor mínimo de ATT deve ser de 0,15 g. 100 g^{-1} (BRASIL, 2000).

Dambros et al (2012) analisaram suco de uva e resultados próximos foram encontrados para o parâmetro pH (3,24), contudo para ATT o teor determinado pelos autores foi ligeiramente superior ao presente estudo (1,07 g. 100 g^{-1}). O valor do pH do suco de uva (3,22) está de acordo com Santana et al. (2012) que encontraram 3,27, enquanto a ATT (0,67 g. 100 g^{-1}) é superior 0,52 g. 100 g^{-1}.

Borges et al. (2011) trabalhando com a estabilidade de suco de abacaxi obtiveram um pH de 3,74 e acidez total titulável de 0,43 g. 100 $g^{-1.}$ Pinheiro et al. (2006) estudaram suco de abacaxi integral industrializado e observaram pH de 3,46 e acidez 0,98 g. 100 g^{-1}. A acidez segundo Brasil (2000) deve ser de no mínimo 0,30 g. 100 g^{-1}.

6 CONCLUSÕES

A quantificação e validação cromatográfica que foi utilizada como metodologia de referência revelou-se satisfatória, visto que os resultados alcançados na validação do método foram excelentes, como bons valores de coeficiente de determinação (>0,98), baixos limites de detecção e quantificação, assim como baixos coeficientes de variação para a repetibilidade e precisão intermediária (<8,83) na análise dos ácidos ascórbico, cítrico, málico e tartárico e dos açúcares sacarose, glicose e frutose em sucos e néctares de frutas industrializados. Como consequência da apropriada validação do método, a quantificação dos analitos nas 42 amostras comerciais foi eficiente, confiável e precisa, assim como a mensuração do conteúdo de sólidos solúveis totais determinados via refratometria.

O estudo mostrou ser possível o desenvolvimento de modelos de calibração multivariados para a determinação dos ácidos orgânicos e açúcares, empregando dados da espectroscopia no infravermelho próximo em associação ao método de calibração multivariada (regressão por mínimos quadrados parciais), tendo em vista que gerou seus melhores modelos com R^2 acima de 0,771 exceto para o ácido málico (R^2 0,692).

As vantagens do emprego dos modelos propostos sobre os métodos convencionais são a determinação simultânea de oito analitos por meio de apenas um espectro; após a construção dos modelos, os resultados dependem exclusivamente de uma análise rápida, fácil e não dependente do uso de reagentes químicos, além de não ser destrutiva e não requerer preparação de amostra; e por fim são economicamente viáveis para o controle de qualidade na indústria de processamento de sucos de frutas, bem como na caracterização de produto e no auxílio das análises de rotina.

Apesar de não ter sido possível avaliar a presença de todos os analitos previstos na parte inicial do trabalho nas amostras de sucos da Região Sudoeste e naturais, os detectados apresentaram resultados comparáveis a literatura, incluindo boas figuras de mérito em seus respectivos modelos.

As análises físico-químicas e colorimétricas nos mesmos sucos foram úteis para a disseminação do conhecimento das características comuns entre cada suco, assim como a valorização do produto regional. A faixa de pH das amostras regionais, por exemplo, foi de 2,83 a 5,79, enquanto a acidez de 0,13 a 0,75 g. 100 g^{-1}.

Portanto, os modelos de regressão construídos apresentaram coeficientes de correlação ajustados à aplicação, assim como as figuras de mérito, mesmo sabendo que os últimos obtiveram melhor desempenho para os conjuntos de calibração, os conjuntos de validação

também se adequam a aplicação. Se tratando de um estudo inicial nesta matriz heterogênea (mistura de sabores de sucos e néctares) e devido a grande quantidade de analitos explorados (oito) este estudo precisa ser aperfeiçoado a fim de se obter modelos de calibração ainda mais robustos, com menores erros e maior habilidade preditiva para que, desta forma, melhorem sua aplicabilidade na quantificação dos presentes analitos.

REFERÊNCIAS

ALLEGRINI, F; OLIVIERI, A. C. A new and efficient variable selection algorithm based on ant colony optimization. Applications to near infrared spectroscopy/partial least-squares analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n. 1, p.18-25, 2011.

ANDRÉS, V.; TENORIO, M. D.; VILLANUEVA, M. J. Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages. **Food chemistry**, v. 173, p. 1100-1106, 2015.

AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blucher, 2001.

AQUINO, F. W. B. et al. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 032-038, 2004.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4. ed. Viçosa MG: Ed. UFV, 2008.

BARCIA, M. T. et al. Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 381-390, 2010.

BARTHUS, R. R.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. **Eclética Química**, v. 30, n. 4, p. 51-58, 2005.

BASHA, S. M. et al. Genetic variation in sugar composition among muscadine, Florida hybrid bunch and bunch grape genotypes. **International Journal of Wine Research,** v. 4, p. 15-23, 2012.

BASSBASI, M. et al. FTIR-ATR determination of solid non fat (SNF) in raw milk using PLS and SVM chemometric methods. **Food Chemistry**, v. 146, p. 250-254, 2014.

BELLON, V.; VIGNEAU, J. L.; SÉVILA, F. Infrared and near-infrared technology for the food industry and agricultural uses: on-line applications. **Food Control,** v. 5, n. 1, p. 21-27, 1994.

BEULLENS, K. et al. The electronic tongue and ATR–FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes. **Sensors and Actuators B**, v. 116, p. 107-115, 2006.

BORDONABA, J. G.; TERRY, L. A. Biochemical profiling and chemometric analysis of seventeen UK-grown black currant (Ribesnigrum L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 56, n. 16, p. 7422-7430, 2008.

BORGES, P. R. S. et al. Estudo da estabilidade físico-química de suco de abacaxi 'pérola'. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 742-750, 2011.

BORSANI, J. et al. Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level Modifications. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 6, p. 1823-1837, 2009.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**.Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000.** Aprova o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial nº 6, seção 1, 10 de janeiro de 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União, Poder Executivo, 23 de setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da União, seção 1, 04 de junho de 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução normativa nº 12, de 4 de setembro de 2003.** Regulamento técnico geral para fixação de identificação e qualidade gerais para suco tropical. Diário Oficial da União, seção 1, 09 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução normativa nº 24, de 30 de agosto de 2012.** Regulamento técnico geral para fixação de quantidade mínima de cinquenta por cento de polpa ou suco de uva no néctar de uva. Diário Oficial da União, seção 1, 31 de agosto de 2012.

BUENO, G.; BACCARIN, J. G. Participação das principais frutas brasileiras no comércio internacional: 1997 a 2008. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 424-434, 2012.

BUREAU, S. et al. Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1133-1140, 2009.

CALDAS, B. S. et al. Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica,** v. 7, n. 1, p. 53-63, 2015.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CAMPOS, V. C. et al. Fatores associados ao consumo adequado de frutas, legumes e verduras em adultos de Florianópolis. **Revista Brasileira Epidemiol**, v.13, n. 2, p. 352-362, 2010.

CAMPS, C. et al. Rapid determination of soluble solids content and acidity of Black currant (Ribesnigrum L.) juice by mid-infrared spectroscopy performed in series.**LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1164-1167, 2010.

CAPUANO, E.; RUTH, S. M. V. **QA: Fraud Control for Foods and Other Biomaterials by Product Fingerprinting, Latest Research into Quality Control**, Dr. Mohammad Saber Fallah Nezhad (Ed.), 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/latest-research-into-quality-control/qa-fraud-control-for-foods-and-other-biomaterials-by-product-fingerprinting>. Acesso em: 15 fev. 2016.

CARNEIRO, A. P. G. et al. Avaliação da rotulagem, caracterização química, físico-química e reológica de néctares de uva comercializados na cidade de Fortaleza – CE. **Alimentos e Nutrição**, v. 24, n. 2, p. 241-249, 2013.

CASTRO, M. V. et al. Análise química, físico-química e microbiológica de suco de frutas industrializados. **Diálogos e Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC**. Ano V, n. 12, 2007.

CAYUELA, J. A. Vis/NIR soluble solids prediction in intact oranges (Citrus sinensis L.) cv. Valencia Late by reflectance. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p. 75–80, 2008.

CAYUELA, J. A.; WEILAND, C. Intact orange quality prediction with two portable NIR spectrometers. **Postharvest Biology and Technology**, v**.** 58, p. 113-120, 2010.

CEN, H. et al. Visible and near infrared spectroscopy for rapid detection of citric and tartaric acids in orange juice. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 2, p. 253-260, 2007.

CHEN, L. et al.Determination of Chinese honey adulterated with high fructose corn syrup by near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 1110-1114, 2011.

CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C.; RODRIGUES, R. S. Estabilidade da vitamina C em néctar de acerola sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 321-327, 2013.

CHINNICI, F. et al.Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 2-3, p. 121-130, 2005.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

CODEX *ALIMENTARIUS.* **Norma general del codex para zumos (jugos) y néctares de frutas**. 2005. Codex Stan 247.21 p. Disponível em: http://www.codexalimentarius. net/ download/standards/10154/CXS_247s.pdf. Acesso em: 27 jan. 2015.

CONZEN, J. P. **Multivariate Calibration: A practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry.** Germany: Brucker Opitik, 2006.

CORRÊA, L. C. at al. Determinação de Açúcares em Mosto, Sucos de Uva e Vinho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Semiárido, 2013.

COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio. Determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. **Química Nova**, v.25, n.1, p.46- 52, 2002.

COZZOLINO, D.; EGLINTON, S. R. An attenuated total reflectance mid infrared (ATR-MIR) spectroscopy study of gelatinization in barley. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 266-271, 2014.

COZZOLINO, D. et al. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 73-80, 2004.

COZZOLINO, D. et al. Combining mass spectrometry based electronic nose, visible–near infrared spectroscopy and chemometrics to assess the sensory properties of Australian Riesling wines. **AnalyticaChimicaActa**, v. 563, p. 319-324, 2006.

DAHDOUH, L. et al. Identification of relevant physicochemical characteristics for predicting fruit juices filterability. **Separation and Purification Technology**, v. 141, p. 59-67, 2015.

DAL ZOTTO, R. et al. Reproducibility and Repeatability of Measures of Milk Coagulation Properties and Predictive Ability of Mid-Infrared Reflectance Spectroscopy. **Journal Dairy Science**, v. 91, p. 4103-4112, 2008.

DAMBROS, D. et al. Características físico-químicas do suco de uva da cultivar "Isabel" na zona da mata de Pernambuco para avaliação do potencial de comercialização. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2012, Bento Gonçalves. **Anais**. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130766/1/50546.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2016

DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DEMIATE et al., Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. Publicitário UEPG - **Ciênicas Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 8, n.1, p. 65-78, 2002.

DE OLIVEIRA, G. A. et al. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. **Food Research International**, v. 60, p. 154-162, 2014.

DUARTE, I. F. et al. Application of ftir spectroscopy for the quantification of sugars in mango juice as a function of ripening. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3104-3111, 2002.

EL-ASSAD, A. M. et al. Determinação do pH, capacidade de tamponamento, carboidratos totais e sacarose em sucos de fruta industrializados "zero açúcar" e light. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 7, n. 3, p. 281-286, 2010.

ESBENSEN, K. H.; GELADI, P. Principles of Proper Validation: use and abuse of re-sampling for validation. **Journal Chemometrics**, v. 24, p. 168-187, 2010.

ETIENNE, C. et al. Candidate genes and QTLs for sugar and organic content in peach [Prunus persica (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, n. 1, p. 145-159, 2002.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

FEUDALE, R. N. et al. Transfer of multivariate calibration models: a review. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v**.** 64, p. 181-192, 2002.

FERRÃO, M. F. et al. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIRR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 333-340, 2004.

FERRÃO, M. F. et al. LS-SVM: uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada. Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. **Química Nova**, v. 30, n.4, p. 852-859, 2007.

FERRARINI, H. Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada. 2004. 125f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FERREIRA, M. M. C.et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FIGUEIRA, R. et al.Análise físico-química e legalidade em bebidas de laranja. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 267-272, 2010.

FIGUEIREDO, I. C. R.; JAIME, P; C.; MONTEIRO, C. A.; Fatores associados ao consumo de frutas, legumes e verduras em adultos da cidade de São Paulo. **Revista Saúde Pública**, v. 42, n. 5, p. 777-785, 2008.

FRANCESCHINI, M. H. D. et al. Abordagens semiquantitativa e quantitativa na avaliação da textura do solo por espectroscopia de reflectância bidirecional no VIS-NIR-SWIR. **Pesquisa Agropecuária Brasielira**, v. 48, n. 12, p. 1569-1582, 2013.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 58, p. 767-782, 2003.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial least squares regression: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, n.185, p. 1-17, 1986.

GIDSKEHAUG, L.; ANDERSSEN, E.; ALSBERG, B. K. Cross model validation and optimisation of bilinear regression models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 93, p. 1-10, 2008.

GONTIJO, L. C. et al. Development and Validation of PLS Models for Quantification of Biodiesels Content from Waste Frying Oil in Diesel by HATR-MIR. **Revista Virtual Química**, v. 6, n. 5, p. 1517-1528, 2014.

GROMSKI, P. S. et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, v. 879 p. 10-23, 2015.

GUERRA, C. C.; DAUD, C. E.; RIZZON, L. A. Evolução dos ácidos tartárico e málico durante a maturação de uvas tintas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, n. 3, p. 479-491, 1992.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed., Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HAWKINS, D. M.; KRAKER, J. Deterministic fallacies end model validation. **Journal Chemometrics,** v. 24, p. 188-193, 2010.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HONORATO, F. A. et al. Transferência de calibração em métodos multivariados. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1301-1312, 2007.

IHA, M. H. et al. Avaliação físico-química e microbiológica de suco e néctares de maçã comercializados em cidades do Estado de São Paulo. **Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.)**, v. 65, n. 1, p. 27-31, 2006.

IRUDAYARAJ, J.; TEWARI, J. Simultaneous monitoring of organic acids and sugars in fresh and processed apple juice by Fourier transform infrared- attenuated total reflection spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 57, p. 1599-1604, 2003.

JING, M.; CAI, W.; SHAO, X. Multiblock partial least squares regression based on wavelet transform for quantitative analysis of near infrared spectra. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 100, p. 22-27 2010.

KELEBEK, H. et al. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 2, p. 187-192, 2009.

KOCA, N. et al. Application of temperature-controlled attenuated total reflectance-mid-infrared (ATR-MIR) spectroscopy for rapid estimation of butter adulteration. **Food Chemistry**, v. 121, p. 778-782, 2010.

KOS, G.; LOHNINGER, H.; KRSKA, R. Validation of Chemometric Models for the Determination of Deoxynivalenol on Maize by Mid-Infrared Spectroscopy. **Mycotoxin Research**, v. 19, n. 2, p. 149-153, 2004.

LEMOS, G. S.; SANTOS, J. S.; SANTOS, M. L. P. Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1682-1685, 2010.

LI, W.; GOOVAERTS, P.; MEURENS, M. Quantitative Analysis of Individual Sugars and Acids in Orange Juices by Near-Infrared Spectroscopy of Dry Extract. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2252-2259, 1996.

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, L. S. Avaliação da qualidade de suco de laranja industrializado, **B.CEPPA**, v. 18, n. 1, p. 95-104, 2000.

LIMA, L. L. A.; SCHULER, A., GUERRA, N. B. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.**Química Nova,**v. 33, n. 5, p. 1186-1189, 2010.

LIMA, M. S. et al. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. **Food chemistry**, v. 161, n. 15, p. 94-103, 2014.

LOPES, J. C. et al. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de Stryphnodendron por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, 2009.

MA, B. et al. Comparative assessment of sugar and malic acid composition in cultivated and wild apples. **Food Chemistry**, v. 172,p. 86-91, 2015.

MAMEDE, M. E. O. et al. Avaliação sensorial e colorimétrica de néctar de uva. **Alimentos e Nutrição,** v. 24, n. 1, p. 65-72, 2013.

MARTELO-VIDAL, M. J.; VÁZQUEZ, M. Evaluation of Ultraviolet, Visible, and Near Infrared Spectroscopy for the Analysis of Wine Compounds. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37-47, 2014.

MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. *QSAR Modeling*: um novo pacote computacional *open source* para gerar e validar modelos QSAR. **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 554-560, 2013.

MARZAROTTO, V. Suco de uva. In: Venturini, W. G. F. (Org.) **Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado.** São Paulo: Edgard Blücher, 2005.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F.A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International,** v.38, p. 1175-1188, 2005.

MATSUURA, F. C. A. U.; ROLIM, R. B. Avaliação da adição de suco de acerola em suco de abacaxi visando à produção de um “blend” com alto teor de vitamina C. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 138-141, 2002.

MENDHAM, J. et al. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed., Rio de Janeiro: LTC, 2002.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORAIS, F.A.; ARAÚJO, F. M. M. C.; MACHADO, A.V. Influência da atmosfera modificada sob a vida útil pós-colheita do mamão “formosa”. **Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 4, p. 01-09, 2010.

MORESCHI, E. C. P.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Comparação de métodos de análise para o ácido pantotênico em alimentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 247-252, 2007.

MORGANO, M. A. **Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos**. 2005. 127f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MORGANO, M. A. et al. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 346-350, 2007.

NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-X. **Química Nova,** v. 24, n. 4, p. 531-539, 2001.

NASCIMENTO, A. R. et al. Perfil microbiológico das polpas de acerola (*Malpighiaglaba*L) e abacaxi (*Ananascomosus*), produzidas e comercializadas na Ilha de São Luís, MA. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 62, p. 44-47, 1999.

NASCIMENTO, R. F. et al. Avaliação do tratamento térmico na composição química e na qualidade da cajuína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 217-221, 2003.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry,** v.153, p. 375-380, 1944.

NEUTZLING, M. B. et al. Fatores associados ao consumo de frutas, legumes e verduras em adultos de uma cidade no Sul do Brasil. **Caderno de Saúde Pública,** v. 25, n. 11, p. 2365-2374, 2009.

NICOLAI, B. M. et al. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, p. 99-118, 2007.

OGRINC, N. et al. The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 376, p. 424–430, 2003.

OLIVEIRA, F. C. C. et al. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 218-225, 2004.

PAN, L. et al. Determination of sucrose content in sugar beet by portable visible and near-infrared spectroscopy. **Food Chemistry,** v. 167, p. 264-271, 2015.

PARREIRA, T. F. **Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariada.** 2003. 90 f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PEDRO, A. M. K.; FERREIRA, M. M. C. S. Simultaneously calibrating solids, sugars and acidity of tomato products using PLS2 and NIR spectroscopy. **Analytica Chimica Acta,** v. 595, n. 1-2, p. 211-227, 2007.

PICÓ, Y.; KOZMUTZA, C. Evaluation of pesticide residue in grape juices and the effect of natural antioxidants on their degradation rate. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1805-1814. 2007.

PINHEIRO, A. M. et al. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.1, p. 98-103, 2006.

PINHEIRO, E. S. et al. Estabilidade físico-química e mineral do suco de uva obtido por extração a vapor. Rev. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 3, p. 373-380, jul.-set. 2009.

PINTO, G.M.F.; JARDIM, I.C.S.F. Use of solid-phase extraction and high – performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. **Journal Chromatografic**, v. 869, p. 463-469, 2000.

PRATHAP, B. et al. A Review - Importance of RP-HPLC in analytical method development. **International Journal of Novel Trends In: Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 15-22, 2013.

QUEJI, M. D**. Determinação de açúcares simples, ácido málico e compostos fenólicos totais em bagaço de maça por espectroscopia no infravermelho e método de calibração multivariada**. 2008. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

RAIMUNDO, E. et al. Cor, viscosidade e bactérias lácticas em suco de laranja pasteurizado e submetido ao efeito da luz durante o armazenamento. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.4, p. 449-456, 2007.

RANGEL, C. N. et al. Nutritional value of organic acid lime juice (*Citrus latifolia*T.), cv. *Tahiti.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 918-922, 2011.

RAPISARDA, P. et al. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 348-354, 2008.

REETZ, E.R. et al. **Anuário brasileiro da Fruticultura 2014.** Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, p. 104, 2015

RIBÉREAU-GAYON, P; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU. **Traité d'oenologie**: chimie du vin, stabilization et traitements. 5. éd. Paris: Dunod, 2004.

RINNAN, A.; ENGELSEN, S. B.; BERG, F. W. J. V. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. TrAC. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.

RIZZON, L. A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã gala, golden delicious e fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.4, p. 750-756, 2005.

RIZZON, L. A.; LINK, M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 689-692, 2006.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Analytical characteristics and discrimination of Brazilian commercial grape juice, nectar, and beverage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 32, n. 1, p. 93-97, 2012.

RIZZON, LUIZ A.; SGANZERLA, VÂNIA M. A. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p. 911-914, 2007.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.et al. Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 336, n. 1, p. 63-74, 2001.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E. et al. Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier Transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy**. Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1407-1412, 2006.

ROHMAN, A.; CHE-MAN, Y. B. Simultaneous quantitative analysis of two functional food oils, extra virgin olive oil and virgin coconut oil using FTIR spectroscopy and multivariate calibration. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1231-1235, 2011.

SAAVEDRA, L.; GARCIA, A.; BARBAS, C. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 395-401, 2000.

SACCANI, G. et al. Use of ion chromatography for the measurement of organic acids in fruit juices. **Journal of Chromatography,** v. 706, p. 395-403, 1995.

SANTANA, M. T. A. et al. Caracterização de diferentes marcas de sucos de uva comercializados em duas regiões do Brasil. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 882-886, 2008.

SANTANA, M. S. et al. Caracterização físico-química e sensorial de néctares de uva tradicionais e light. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, p. 229-238, 2012.

SANTOS, C. E. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2013.

SANTOS, J. S.; SANTOS, M. L. P.; AZEVEDO, A. S. Validação de um método para determinação simultânea de quatro ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência em polpas de frutas congeladas. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 540-544, 2014.

SAUER-LEAL, E.; OKADA, F. M.; ZAMORA, P. P. Caracterização físico-química de queijo prato por espectroscopia no infravermelho e regressão de mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1621-1625, 2008.

SCHERER, R. et al. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. **Food Chemistry,** v. 135, p.150-154, 2012.

SCHERER, R.; RYBKA, A. C. P.; GODOY, H. T. Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açaí e caju e avaliação da estabilidade em sucos de caju. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1137-1140, 2008.

SEQUEIRA, C. B. **Análise de açúcares e ácidos orgânicos em sumos comerciais: aplicação de HPLC-SEC-UV-IR e língua eletrônica.** 2012. 79f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2012.

SHETTY, N.; GISLUM, R. Quantification of fruct an concentration in grasses using NIR spectroscopy and PLSR. **Field Crops Research,** v.120, p.31-37, 2011.

SHETTY, N. et al. Development of NIR calibration models to assess year-to-year variation in total non-structural carbohydrates in grasses using PLSR. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 111, p. 34–38, 2012.

SHI, J. Y. et al. Determination of total flavonoids content in fresh Ginkgo biloba leaf with different colors using near infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 94, p. 271– 276, 2012.

SHIROMA, C.; RODRIGUEZ-SAONA, L. Application of NIR and MIR spectroscopy in quality control of potato chips. **Journal of Food Composition and Analysis,** v. 22, p. 596-605, 2009.

SHUKLA, S. et al. Determination of non-volatile and volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2005–2010, 2010.

SQUINA, F. M.; MERCADANTE, A. Z. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 309-318, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 5.ed., Rio de Janeiro: Guarabara Koogan, 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7.ed., Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SKOOG, D. A.; LEARY, J.J. **Principles of Instrumental Analysis**, 4.ed., Saunders: London, 1992.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos da Química Analítica**. 8. ed., São Paulo: Cengage Learning, 2011.

SOARES, U. J. O. et al. Detecção e identificação de leveduras em sucos de laranja natural comercializados. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 4, p. 663-668, 2011.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n 1, p. 19-23, 1952.

SOROL, N. et al. Visible/near infrared-partial least-squares analysis of Brix in sugar cane juice. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 102, n. 2, p. 100–109, 2010.

SOUZA, A. M. et al. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova,** v.36, n.7, p. 1057-1065, 2013.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v.35, n.1, p. 223-229, 2012.

SUGAI, A. Y et al. Análise físico-química e microbiológica do suco de laranja minimamente processado armazenado em lata de alumínio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 22, n. 3, p. 233-238, 2002.

SVECOVÁ, B. et al. Analysis of Czech meads: Sugar content, organic acids content and selected phenolic compounds content. **Journal of Food Composition and Analysis,** v. 38, p. 80–88, 2015.

TAVARES, J. T. Q. et al. Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 805–809, 2010.

TERRY, L. A.; CHOPE, G. A.; BORDONABA, G. J. Effect of water deficit irrigation and inoculation with Botrytis cinerea on strawberry (*Fragaria*x *ananassa)* fruit quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10812–10819, 2007.

UMBELINO, D. C. **Caracterização sensorial por análise descritiva quantitativae análise tempo-intensidade de suco e polpa de manga (*Mangífera indica* L) adoçados com diferentes edulcorantes**. 2005. 190f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validation of Multivariate Calibration Models in the Determination of Sugar Cane Quality Parameters by Near Infrared Spectroscopy. **Journal of the Braziliam Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 259-266, 2007.

VALENTE, A. et al. Development of an orange juice in-house reference material and its application to guarantee the quality of vitamin C determination in fruits, juices and fruit pulps. **Food Chemistry**, v. 154, p.71-77, 2014.

VENÂNCIO, A. A.; MARTINS, O. A.; Análise química de diferentes marcas de néctares e suco de laranja comercializada na cidade de Cerqueira César - São Paulo. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência,** v. 2, n. 3, p. 45-50, 2012.

VETTORAZI, G.; MACDONALD, I. **Sacarose: aspectos nutricionais e de segurança no uso do açúcar.** São Paulo: HUCITEC, 1989.

XIE, L. et al. Prediction of titratable acidity, malic acid, and citric acid in bayberry fruit by near-infrared spectroscopy. **Food Research International**, v. 44, p. 2198-2204, 2011.

XIE, L. et al. Quantification of glucose, fructose and sucrose in bayberry juice by NIR and PLS. **Food Chemistry,** v. 114, p. 1135-1140, 2009.

XU, Q-S.; LIANG, Y-Z. Monte Carlo cross validation. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 56, p. 1-11, 2001.

WANG, A.; XIE, L. Technology using near infrared spectroscopic and multivariate analysis to determine the soluble solids content of citrus fruit. **Journal of Food Engineering**, v. 143, p. 17-24, 2014.

WESTAD, F.; MARINI, F. Validation of chemometric models - A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 893, p. 14-24, 2015.

WOLD, S.; SJOSTROM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, p.109-130, 2001.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

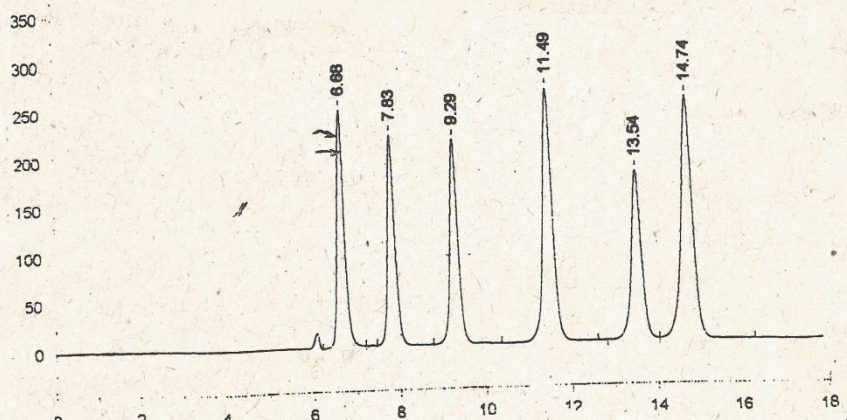
ANEXOS

ANEXO 1 – RELATÓRIO DE DESEMPENHO DE COLUNA AMINEX

PERFORMANCE REPORT
(ACTUAL TEST CHROMATOGRAM)

BIO RAD

COLUMN NAME	Aminex® HPX-87H, 300 mm x 7.8 mm (Catalog #125-0140)
SERIAL NUNBER	422536
TEST CONDITION	Sample Name: Bio-Rad Organic Acid Standard (Catalog #125-0586)
	Injection Volume: 20 µl
	Mobile Phase: 0.008M Sulfuric Acid
	Flow Rate: 0.60 ml/min
	Back Pressure / Temp: 62 Kg/cm² (880 psi) / 35 °C
	Detection: UV @ 210 nm. time constant standard



Peak Name	Ret. Time	Plates	Half-Width	Skew 10%	Resolution
Oxalic Acid	6.68	8421	0.17	1.15	2.27
Citric Acid	7.83	10924	0.18	1.14	1.95
Malic Acid	9.29	13532	0.19	1.04	4.72
Succinic Acid	11.49	13978	0.23	1.01	6.23
Formic Acid	13.54	18886	0.23	0.92	5.28
Acetic Acid	14.74	16552	0.27	0.84	2.80

SPECIFICATIONS	Plates (Succinic Acid):	> 8,000
	Skew (Succinic Acid):	1.00 ± 0.50
	Back Pressure:	< 106 Kg/cm² (1,500 psi)
	Procedure Rev.	F
	Pin No.	9700372
Chrom 2 / Opr. CN	2/6/03 2:51:22 PM	File Name: h:\My Documents\125-0140\B79347\422536.0001.RAW

Page 1 of 1

Printed on 2/6/03 2:52:11 PM

Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 • Phone (510) 741-1000