



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS: TRINDADE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

LEONARDO VALDERRAMA

**INTEGRAÇÃO DE FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS COM
CROMATOGRAFIA E ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV-
VIS NA AVALIAÇÃO DE SUCOS DE UVA**

Florianópolis

2022

LEONARDO VALDERRAMA

**INTEGRAÇÃO DE FERRAMENTAS QUIMIOMETRICAS COM
CROMATOGRAFIA E ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV-
VIS NA AVALIAÇÃO DE SUCOS DE UVA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química – da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química Analítica.

Orientado: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Valderrama, Leonardo

Integração de ferramentas quimiométricas com
cromatografia e espectroscopia na região do UV-Vis na
avaliação de sucos de uva / Leonardo Valderrama ;
orientador, Eduardo Carasek da Rocha, 2022.
77 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Quimiometria. 3. Análise não alvo. 4.
Cromatografia . 5. Espectroscopia . I. Carasek da Rocha,
Eduardo . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

LEONARDO VALDERRAMA

**INTEGRAÇÃO DE FERRAMENTAS QUIMIOMETRICAS COM
CROMATOGRAFIA E ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV-
VIS NA AVALIAÇÃO DE SUCOS DE UVA**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 19 de Maio de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Juliana Azevedo Lima Pallone, Dr(a)

Universidade Estadual de Campinas

Prof.(a) Poliana Macedo dos Santos, Dr.(a)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.(a) Eduardo Sidinei Chaves, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Luiz Augusto dos Santos Madureira, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título Doutor em Química

Prof. Dr.(a) Giovanni Finoto Caramori

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr.(a) Eduardo Carasek da Rocha

Orientador(a)

Florianópolis, 2022

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a minha família, amigos e professores que me ajudaram durante toda minha vida acadêmica, com apoio, orientações e incentivo.

Um agradecimento especial aos meus pais, por sempre acreditarem e confiarem que seria possível alcançar tudo que eu me propusesse a fazer.

À minha professora, irmã e amiga, Patrícia Valderrama por toda ajuda, confiança, conhecimentos transmitidos, orientação e estar ao meu lado em todo o processo.

À meu orientador Eduardo Carasek, pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa tão unido e competente, além da amizade e confiança. Também a todos os colegas que fiz durante todos os anos que tive convívio, são pessoas que levarei comigo pelo resto da vida.

A minha namorada Natalia, por acreditar em mim e por todo incentivo nessa etapa final da conclusão da tese.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSC, pelos conhecimentos transmitidos durante este curso.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por abrir as portas e possibilitar toda a estrutura, que tornou possível a realização, deste e diversos outros trabalhos.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Campo Mourão, pela parceria no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

Enfim, a todos que, embora não tenham sido mencionados individualmente, mas que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho e desta etapa de minha vida, têm minha gratidão

RESUMO

Este trabalho mostrou a possibilidade de utilizar diferentes ferramentas quimiométricas acopladas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e à espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) para avaliação de sucos de uva da região do Rio Grande do Sul (Brasil). O fungicida carbendazim foi determinado de forma semi-quantitativa em suco de uva a partir da espectroscopia na região do UV por reconhecimento de padrão supervisionado através de mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA), para isso foram divididas as amostras em 3 grupos, 1º sucos sem carbendazin, 2º sucos com adição de carbendazin abaixo do LMR e 3º sucos com carbendazin acima do LMR, foram avaliados os parâmetros de sensibilidade e especificidade para o modelo, obtendo mais de 80% para todas as classes em ambos parâmetros. Os sucos de uva produzidos a partir do sistema de cultivo orgânico, pôde ser distinto do suco de uva produzido em sistemas convencionais através da técnica HPLC em conjunto com carta de controle multivariada baseada no *Q residuals* da análise de componentes principais (PCA), que apresentou uma taxa de acerto de 100% para as amostras de validação externa. Também foi proposto um método para determinação do bioativo resveratrol no suco de uva a partir da espectroscopia UV-Vis e da calibração pseudo-univariada através da resolução de curvas multivariadas com mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS), sendo avaliado a curva analítica recuperada pelo modelo frente a uma curva produzida por HPLC, apresentando serem estatisticamente equivalentes para um nível de confiança de 95%. Em todos os casos, os métodos alternativos propostos apresentam como vantagem um mínimo preparo de amostra que corresponde apenas à diluição do suco de uva. Os resultados alcançados mostram que os métodos propostos são eficientes, podendo contribuir para uma elevada frequência analítica com praticidade e menor custo operacional, uma vez que não faz uso de reagentes ou solventes.

Palavras-chave: MCR-ALS, PLS-DA, cartas de controle, sucos de uva, HPLC, UV-Vis.

ABSTRACT

This work showed the possibility of using different chemometric tools coupled with analytical techniques based on high performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet and visible spectroscopy (UV-Vis) to evaluate grape juices in the region of Rio Grande do Sul (Brazil). The fungicide carbendazim was determined in a semi-quantitative way in grape juice from UV spectroscopy by pattern recognition supervised through partial least squares with discriminant analysis (PLS-DA), for this, the samples were divided into 3 groups, 1st juices without carbendazim, 2nd juices with the addition of carbendazim below the MRL and 3rd juices with carbendazim above the MRL, the sensitivity and specificity parameters for the model were evaluated, obtaining more than 80% for all classes in both parameters. The grape juices produced from the organic cultivation system could be distinguished from the grape juice produced in conventional systems through the HPLC technique in conjunction with a multivariate control chart based on the Q residuals of the principal component analysis (PCA), which showed a 100% hit rate for externally validated samples. It was also proposed a method for the determination of the bioactive resveratrol in grape juice from UV-Vis spectroscopy and pseudo-univariate calibration through the resolution of multivariate curves with alternating least squares (MCR-ALS), being evaluated the analytical curve recovered by model against a curve produced by HPLC, showing to be statistically equivalent for a confidence level of 95%. In all cases, the proposed alternative methods have the advantage of minimal sample preparation, which corresponds only to the dilution of grape juice. The results achieved show that the proposed methods are efficient and can contribute to a high analytical frequency with practicality and lower operating cost, since it does not use reagents or solvents.

Keywords: MCR-ALS, PLS-DA, control charts, grape juices, HPLC, UV-Vis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol (A) e cis-resveratrol (B).....	15
Figura 2 - Organização dos dados instrumentais no formato de uma matriz.....	19
Figura 3 - Decomposição em <i>scores</i> e <i>loadings</i> para matriz X	20
Figura 4 - Decomposição em <i>scores</i> e <i>loadings</i> para o modelo PLS-DA.....	22
Figura 5 - Ilustração da resolução de sinal por MCR-ALS.....	24
Figura 6 - Decomposição da matriz D em concentrações relativas (C) e espectros puros (S^T).....	25
Figura 7 - Restrição de não negatividade (A) e matrizes aumentadas pelas linhas (B) e pelas colunas (C).....	26
Figura 8 - Esquema para realização de calibração pseudo-univariada com MCR-ALS.....	27
Figura 9 - Espectros UV-VIS. Verde: WGJ sem CBZ; Preto: WGJ com CBZ até 0,7 mg L ⁻¹ ; Vermelho: WGJ com CBZ superior a 0,7 mg L ⁻¹	33
Figura 10 - - <i>Outliers</i> . (A) <i>Leverage</i> ; (B) <i>Q Residuals</i> . (●) amostras da classe 1 no treinamento. (○) amostras da classe 1 na validação externa. (▲) amostras da classe 2 no treinamento. (Δ) amostras da classe 2 na validação externa. (■) amostras da classe 3 no treinamento. (□) amostras da classe 2 na validação externa.....	34
Figura 11 - Taxas de erro na validação cruzada em função do número de VLs (A); Variância explicada no bloco Y em função do número de VLs (B).....	35
Figura 12 . Curvas ROC.(A) Classe 1 com 4 VLs; (B) Classe 2 com 4 VLs; (C) Classe 3 com 4 VLs; (D) Classe 1 com 18 VLs; (E) Classe 2 com 18 VLs; (F) Classe 3 com 18 VLs.....	36
Figura 13 - Classificação obtida pelo modelo PLS-DA. (●) amostras da classe 1 no treinamento. (○) amostras da classe 1 na validação externa. (▲) amostras da classe 2 no treinamento. (Δ)	

amostras da classe 2 na validação externa. (■) amostras da classe 3 no treinamento. (□) amostras da classe 2 na validação externa.....	39
Figura 14 – Robustez do modelo PLS-DA. (●) amostras da classe 1 no treinamento. (●) amostras da classe 1 da variedade Bordô. (▲) amostras da classe 2 no treinamento. (■) amostras da classe 3 no treinamento. (■) amostras da classe 3 da variedade Bordô.....	40
Figura 15 - VIP scores. (A) classe 1; (B) classe 2; (C) classe 3.....	42
Figura 16 - Resultados do PLS. Ajuste; (B) Resíduos. (o amostras na calibração; * amostras na validação externa).....	43
Figura 17 - Cromatogramas. (A) cromatogramas brutos; (B) cromatogramas após alinhamento. (—) amostras orgânicas. (—) amostras não-orgânicas.....	47
Figura 18 - Carta de controle multivariada. (●) amostras orgânicas no conjunto de treinamento, (o) amostras orgânicas no conjunto de validação externa, (◆) amostras não-orgânicas.....	48
Figura 19 - Organização dos espectros UV no formato de matriz aumentada.....	52
Figura 20 - Espectros UV. (—) amostras padrão de resveratrol. (—) amostras de sucos de uva.....	53
Figura 21 - Variância explicada pela PCA.....	54
Figura 22 - Resultados do MCR-ALS. Espectros puros recuperados. (B) Concentrações relativas. (—) Resveratrol. (—) interferente 1. (—) interferente 2. (—) interferente 3.....	55
Figura 23 - Curvas analíticas. Curva analítica pseudo-univariada. (B) Curva analítica univariada. (●) amostras na calibração. (*) amostras na validação.....	57
Figura 24 - Concentração de resveratrol nas amostras de suco de uva. (●) orgânicas. (●) não-orgânicas.....	58

LISTA DE SIGLAS

- ANOVA – Análise de variância
- CBZ - Carbendazin
- CE – Eletroforese capilar, do inglês *capillary electrophoresis*)
- CEN – Comitê europeu de normalização
- CF – Compostos fenólicos
- CP – Componentes principais
- DG SANTE - Direção de Saúde e Segurança Alimentar da comissão Europeia
- DI - Imersão direta, do inglês *Direct Immersion*
- EU - União Européia
- GC – Cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*.
- GC-FID - cromatografia gasosa com detetor de ionização de chamas, do inglês *gas chromatography with flame ionization detection*
- GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*
- GC-NPD - Cromatografia gasosa com detetor de nitrogênio-fósforo, do inglês *Gas Chromatography with nitrogen Phosphorous detector*
- HCA - Análise Hierárquica de Agrupamentos, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*
- HPLC - DAD Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detetor por Arranjo de Diodos, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*
- HS - do inglês *Headspace*
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- KNN – K-vizinho mais próximo, do inglês *K-nearest neighbor*
- LC-APCI-MS - Cromatografia Líquida com Fonte de Ionização Química a Pressão Atmosférica acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *liquid chromatography coupled to a source at Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry*
- LLE - Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*
- LMR – Limites máximos residual
- LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- MCR-ALS - Método multivariado de resolução de curvas com mínimos quadrados alternantes do inglês *Multivariate Curve Resolution- Partial least squares*
- MeOH – Metanol
- MLR - Regressão Linear Múltipla, do inglês *Multiple Linear Regression*
- NIR – Infravermelho próximo – near infrared
- NMR-2D - Ressonância magnética nuclear em duas dimensões, do inglês *Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance*.
- PAN – C18-Poliacrilonitrili
- PARAFAC – Análise de fatores paralelos do inglês *parallel factor analysis*
- PCA – Análise de componentes principais do inglês *Principal component analysis*
- PCR - Regressão por Componentes Principais, do inglês *Principal Componentes Regression*
- PDMS – Polidimetilsiloxano
- PLS - Regressão por Quadrados Mínimos Parciais, do inglês *Partial Least Squares*

PLS-DA - Mínimos Quadrados Parciais com Análise Discriminante, do inglês *Partial Least Squares with Discriminant Analysis*.

R – Coeficiente de correlação

R^2 – Coeficiente de determinação

RMN – Ressonância magnética nuclear, do inglês *Nuclear magnetic resonance*

RMSECV - Erro médio quadrático de validação cruzada, do inglês Mean squared error of cross validation

RMSEP - Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão, do inglês *Root Mean Square Error of Prediction*.

SENA – Sensibilidade analítica

SIMCA -

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

SVD - decomposição em valores singulares, do inglês *decomposition into singular values*

TF-SPME - Microextração em fase sólida com filme fino, do inglês *Thin Film -Solid Phase Microextraction*

UV-Vis – Ultravioleta visível

VL – Variáveis latentes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Suco de Uva.....	14
2.2. Agrotóxicos	16
2.3. Análise não alvo.....	Erro! Indicador não definido..18
2.4. Quimiometria.....	18
2.4.1. Análise de componentes principais (PCA).....	19
2.4.2. Cartas de controle multivariadas baseado na PCA.....	20
2.4.3. Mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA).....	21
2.4.4. Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes.....	24
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. Modelo semiquantitativo por reconhecimento de padrões supervisionado (PLS-DA) na avaliação de carbendazim em sucos de uva.....	29
4.1. Objetivo	29
4.2. Materiais e métodos.....	29
4.2.1. Amostras.....	29
4.2.2. Procedimentos	29
4.2.3. Desenvolvimento do modelo semiquantitativo	30
4.3. Resultados e discussões	32
4.4. Conclusão da aplicação I.....	44
5. Uma proposta ecológica ao integrar impressões digitais cromatográficas e cartas de controle multivariada em uma análise não-alvo para avaliar sucos de uva orgânico.....	45
5.1. Objetivos.....	45
5.2. Amostras.....	45
5.3. Procedimento	45
5.4. Resultado e discussões.....	46
5.5. Conclusão da aplicação II.....	50

6. Espectroscopia na região do ultravioleta e calibração pseudo-univariada na determinação de resveratrol em sucos de uva.....	51
6.1. Objetivos.....	51
6.2. Materiais e métodos.....	51
6.2.1. Amostras padrão de resveratrol.....	51
6.3. Resultado e discussões.....	52
6.4. Conclusão da aplicação.....	58
7. Conclusões Gerais	59
8. REFERENCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

No Brasil o consumo de suco de uva vem aumentando de forma acentuada, sendo que em um período de 10 anos houve um aumento de cerca de 570% [1]. Associado ao aumento do consumo, vem aumentando também o interesse a respeito dos benefícios à saúde associados ao consumo da uva, devido aos seus compostos bioativos que proporcionam atividades biológicas, propriedades antioxidantes e anticancerígenas [2]. Dessa forma, a preocupação com a qualidade da uva e seus produtos aumenta.

A qualidade da uva e seus produtos visa não apenas o controle dos componentes que trazem um efeito benéfico à saúde, mas também a determinação de componentes cuja presença é controlada ou proibida, como alguns agrotóxicos. Sabe-se que estes agrotóxicos desempenham um papel importante para agricultura, ajudando a combater pragas e fungos, mas também tem um efeito direto na saúde humana quando usado em excesso ou de maneira impropria [3].

Contudo, os métodos de referência utilizados para determinação dos parâmetros de caracterização e composição dos sucos de uva apresentam algumas limitações, como necessidade de uma etapa de preparo de amostra, utilização de solventes tóxicos, geração de resíduos, sendo laboriosas, destrutivas e com alto valor agregado [4]. Assim o desenvolvimento de novos métodos analíticos para a determinação de agrotóxicos e avaliação dos sucos de uva se faz cada vez mais necessária. Entretanto, antes da proposição de um novo método analítico é preciso levar em conta diversos fatores como: a compatibilidade da amostra com o equipamento a ser utilizado, a disponibilidade do analito na matriz, seletividade e sensibilidade do método, uma vez que, a matriz alimentícia é uma matriz complexa e seus constituintes estão presentes em baixas concentrações. [5].

Nesse sentido, técnicas rápidas e não destrutivas, como a espectroscopia molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) podem trazer informações que possibilitem estabelecer uma espécie de impressão digital (*Fingerprint*) da amostra e são uma possibilidade atrativa para amostras líquidas, uma vez que apresentam vantagens de análises simultâneas, simplicidade, alta frequência analítica, baixo custo e não destruição da amostra, indo de encontro com diversos fatores propagados pela química verde. Além disso, o *fingerprint* cromatográfico produzido através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) em análises não-alvo (*non target analysis*) pode também produzir métodos alternativos interessantes com vantagens que se alinham aos requisitos da química

verde. Contudo, com ambas as técnicas, para uma melhor interpretação dos resultados produzidos por essas técnicas, se faz necessário a utilização de métodos quimiométricos.

A quimiometria pode ser aplicada a partir de diversas frentes de pesquisa, como, planejamento e otimização de experimentos, no processamento de sinais analíticos, reconhecimento de padrões e classificação de dados, calibração multivariada e resolução de sinais [6]. Desta forma, este trabalho propõe o desenvolvimento de novos métodos analíticos a partir da espectroscopia na região do UV-Vis e do *fingerprint* cromatográfico, aliados às ferramentas quimiométrica, na avaliação de sucos de uvas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUCO DE UVA

O consumo de uvas tem aumentado exponencialmente e pode ser atribuído a fatores intrínsecos (sabor e aroma), disponibilidade comercial, preço, ou a fatores nutricionais. Diferentes produtos podem ser produzidos a partir da uva, além do vinho que é o produto obtido da uva que é mais consumido, o suco de uva vem se destacando por não conter álcool e apresentar uma considerável quantidade de compostos bioativos, que apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e cardioprotetor [7,8].

O suco de uva pode ser definido pela legislação brasileira como uma bebida não fermentada, obtida por esmagamento ou prensagem de uvas maduras, frescas e saudáveis, com teor alcoólico não superior a 0.5° GL (Gay-Lussac). Os sucos de uva podem ser classificados como: (i) suco integral, no qual não ocorre a remoção de água, ou seja, o suco puro; (ii) concentrado, este sendo parcialmente desidratado; (iii) néctar, tem-se a adição de açúcar e água; (iv) orgânico, cuja procura vem aumentando, pois este tem no cultivo da uva a não utilização de agrotóxicos, portanto sendo ditos como mais saudáveis [9]. Desta forma, nesta tese o termo ‘suco de uva’ é usado para o suco de uva com a classificação integral.

As propriedades benéficas à saúde, oriundas do suco de uva, são atribuídas aos compostos fenólicos (CF), o grupo de fito químicos de maior ocorrência nas uvas, com importância morfológica e fisiológica nas plantas, devido ao seu importante papel no crescimento e reprodução, além de atuar na proteção contra patógenos e predadores, nas características sensoriais e na coloração dos frutos [10].

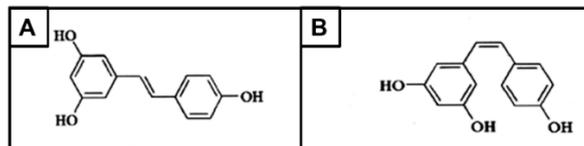
Os compostos fenólicos são definidos quimicamente como substâncias que possuem em sua estrutura pelo menos um anel aromático e um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais [11]. Essas substâncias apresentam características antioxidantes, que trazem um grande benefício a saúde, uma vez que, atuam na eliminação e inibição de espécies reativas de oxigênio e neutralização de radicais livres [12]. Dessa forma, a uva atua como uma rica fonte natural de compostos fenólicos para a dieta humana.

Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinas, flavonóis e taninos), os estilbenos (resveratrol) e os ácidos fenólicos [13]. Dentre os flavonóides, tem-se um grande interesse no resveratrol, sendo este mencionado pela primeira vez em 1939 [14].

O Resveratrol pode exercer atividades farmacológicas com efeitos antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos, antioxidantes e cardioprotetores [15, 16], sua síntese é realizada

naturalmente na planta sob duas formas isômeras trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) [17], conforme Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol (A) e cis-resveratrol (B).



Fonte: Adaptado de Seutter et al (2005) [18]

Existem relatos de estudos sobre metabolismo e efeitos fisiológicos das formas do resveratrol, sendo que a absorção do glucosídeo de resveratrol proveniente do suco de uva pode ocorrer no intestino delgado, assim como dos glucosídeos de flavonóides [19]. Nesse sentido, a atividade antioxidante gerada pelo resveratrol, pode ser empregado de modo similar ao estrogênio no efeito da pré-menopausa [20]. Já a atividade anti-inflamatória do resveratrol é explicada pela inibição da transcrição e atividade da ciclooxigenase (COX-a e COX-2) e atuando também como anticoagulante pela inibição da síntese de tromboxinas [19,21].

O Resveratrol, também apresenta efeitos anticancerígenos de diversas maneiras como na inibição da proteína C-quinase, que explica seu efeito quimiopreventivo [22], em induções do apoptose (morte programada de células) atuando como um agente antiproliferativo de alguns tipos de tumores [20,23] e na inibição da cascata do ácido araquínase [24]. No entanto, a biodisponibilidade do resveratrol ainda permanece sem esclarecimentos [25].

Muitos métodos já foram reportados para a determinação de resveratrol, principalmente em vinho e derivados de uva, estes utilizando principalmente de técnicas de separação como a HPLC, a cromatografia em fase gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*), e a eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) [26, 27]. Por outro lado, técnicas de quimioluminescência [28], eletroquímica [29] e fluorimetria [30, 31] também já foram reportadas na determinação do resveratrol. Contudo, algumas limitações podem ser citadas na determinação de resveratrol, como baixas concentrações, complexidade da amostra, e muitas vezes é necessária uma conversão química do analito devido às propriedades do resveratrol. Sendo assim, torna-se necessário uma etapa que anteceda a análise, conhecida como preparo de amostra, que tem por objetivo acoplar a pré-concentração com a extração, e algumas vezes a derivação e limpeza em um único processo, e que esteja de acordo com alguns princípios da

química verde como a redução do consumo de reagente, baixa geração de resíduo e pouco consumo de energia [26].

Dentre estes estudos que tem como foco o controle de qualidade do suco de uva, pode-se destacar a determinação de sólidos solúveis, pH, teor de vitamina C e níveis de açúcares redutores, não redutores e totais para três diferentes marcas brasileiras [32], a influência do cultivo na composição do suco de uva [33], a relação dos ácidos orgânicos com o cultivo e características de sabor, uma vez que, estes estão diretamente associados à qualidade, autenticidade e processo biológico de sucos de uva e vinhos [34], além de contaminação por ocratoxina A [35]. Dessa forma, os estudos apontam que as características do cultivo (manejo orgânico ou tradicional) podem afetar a composição de compostos bioativos na uva e no suco de uva. Nesse sentido, alguns estudos reportam o emprego do *fingerprint* espectroscópico, associado às ferramentas quimiométricas, na avaliação de alimentos oriundos da agricultura orgânica e tradicional [36-38]. Por outro lado, a espectroscopia molecular em análise não alvo, aliadas à quimiometria, vem sendo utilizada na avaliação de alimentos nas mais diferentes vertentes [33, 34, 39]. No entanto, a utilização do *fingerprint* cromatográfico obtido por HPLC em matrizes alimentares apresenta algumas vantagens quando comparada a outras técnicas, como maior precisão e possibilidade de obtenção de resultados para marcadores, fornecendo assim informações composicionais [35].

2.2 AGROTÓXICOS

Agrotóxicos são, por definição, produtos químicos sintéticos usados para matar insetos, larvas, fungos, entre outros, sob a justificativa de controlar as doenças provocadas por esses vetores e de regular o crescimento da vegetação. Os agrotóxicos podem ser utilizados tanto no ambiente rural quanto urbano [40].

Sabe-se que os agrotóxicos desempenham um papel importante no cultivo de uva, atuando no combate de pragas e doenças. Portanto uma grande variedade de pesticidas, especialmente fungicidas e inseticidas são aplicados frequentemente durante o seu cultivo. Contudo, em alguns casos, práticas inadequadas são utilizadas no processo de aplicação desses produtos nos vinhedos. Como consequência, o nível de resíduos de pesticidas no momento da colheita é superior ao nível permitido pela regulamentação [41], podendo acarretar além do risco ambiental, prejuízo à qualidade das uvas e riscos à saúde do consumidor.

Portanto um monitoramento dos níveis de agrotóxicos se faz necessário. Nesse sentido, a União Europeia, no regulamento nº 396/2005 estabelece os limites máximos residuais (LMR) de pesticidas autorizados em produtos de origem vegetal ou animal destinado a consumo humano [42]. Os LMRs para resíduos de pesticidas em uva variam principalmente entre 0,01 mg/kg e 5 mg/kg, dependendo do pesticida [43].

No Brasil, de acordo com o Programa de Análise de Resíduos de Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em seu relatório de avaliação de 2017 e 2018 o carbendazin – CBZ (carbamaro de metil-2-benzimidazol) é um dos pesticidas mais detectados em amostras de uva, tendo seu LMR de 0,7 ppm (mg L^{-1}) [44]. O CBZ é um fungicida sistêmico de uso comum em vinhedos desempenhando um importante papel no controle de doenças, especificamente na inibição do crescimento de fungos [45].

A absorção do CBZ por humanos ocorre pelas vias respiratória, oral e dérmica, com diversos efeitos, como irritação cutânea e ocular, dermatite e queimaduras na pele. Além disso, estudos apontam que o CBZ causa alterações hormonais e no processo de reprodução, com toxicidade significativa nos testículos humanos [46]. Além disso, uma análise estatística de parâmetros eletrônicos obtidos por cálculos de química quântica mostrou evidências de atividade carcinogênica para o CBZ [47]. Dessa forma, métodos analíticos rápidos para a avaliação e controle de qualidade dos LMRs de CBZ em amostras de alimentos tornam-se necessários.

Diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas para a determinação de CBZ [48]. Recentemente, métodos eletroquímicos foram propostos [49,50], bem como a técnica de HPLC associada a técnicas de preparo de amostra [51]. No entanto a utilização de técnicas cromatográficas apresenta algumas limitações, consumo de reagentes de alta pureza, alguns deles sendo tóxicos, geração de resíduos, além de serem técnicas normalmente demoradas, prejudicando assim frequência analítica.

Visando contornar essas limitações, novos métodos vêm sendo propostos utilizando a técnica de espectroscopia UV-Vis para determinação de pesticidas em alimentos [52-54]. Nesses métodos a quimiometria pode não estar presente [52], especialmente nos casos em que a amostra passa por preparo através da derivação do pesticida para a obtenção de um composto colorido. Por outro lado, nos métodos que consideram a quimiometria na extração de informações a partir dos espectros, o preparo de amostra torna-se dispensável [53,54].

2.3 ANÁLISES NÃO-ALVOS

As análises não-alvo (*non-target analysis*) consistem em avaliações realizadas sem o intuito de identificar propriamente os potenciais analitos, ou se restringindo a um número limitado destes [55]. Nesse sentido, os métodos qualitativos, atualmente em ascensão, podem ser empregados em análises não-alvo identificando adulterações em produtos com grande potencial de triagem. Essa estratégia emprega uma impressão digital (*fingerprint*) da amostra e vem ganhando cada vez mais espaço no controle de qualidade de alimentos [56].

Análises não-alvo são reportadas empregando espectroscopia molecular na região do infravermelho médio (MIR) [57] ou no ultravioleta e visível [58,59]. Entretanto, a técnica cromatográfica HPLC pode ser interessante no contexto das matrizes alimentares devido à sua maior seletividade em relação às espectroscopias MIR e UV-Vis, podendo contribuir na identificação de possíveis marcadores químicos que possam trazer informações acerca da composição da amostra em estudo. Além disso, o *fingerprint* cromatográfico obtido por HPLC, quando avaliado por ferramentas quimiométricas, permitem avaliar a qualidade e as adulterações em alimentos [60].

2.4 QUIMIOMETRIA

É cada vez mais frequente em laboratórios de química a busca por métodos que gerem menos resíduos, que forneçam maior quantidade de informação, e que sejam rápidos. Assim, uma possibilidade seria a utilização de métodos instrumentais mais sofisticados, uma vez que estes métodos geram uma maior quantidade de informações sobre uma amostra e em diversos níveis de complexidade. A quantidade e a riqueza dos dados adquiridos nesses instrumentos tornam possível o entendimento de processos químicos e a análise de espécies de interesse em sistemas complexos [61]. Outra possibilidade seria a utilização de ferramentas quimiométricas para maior interpretação dos resultados gerados pelos equipamentos convencionais como UV-Vis, NIR e Cromatógrafos.

Em ambos os casos a análise dessa grande quantidade de dados pode ser um desafio, que foi contornado com o surgimento de uma área de conhecimento que utiliza procedimentos multivariados para auxiliar na extração de informações. Esta área, atualmente conhecida como quimiometria, é definida como a pesquisa e utilização de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos, de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos [62].

As ferramentas quimiométricas podem ser utilizadas em diversas aplicações distintas, dependendo do objetivo do estudo. Assim, a quimiometria pode ser subdividida em diversas frentes de pesquisas e aplicações como o processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados e calibração multivariada [6].

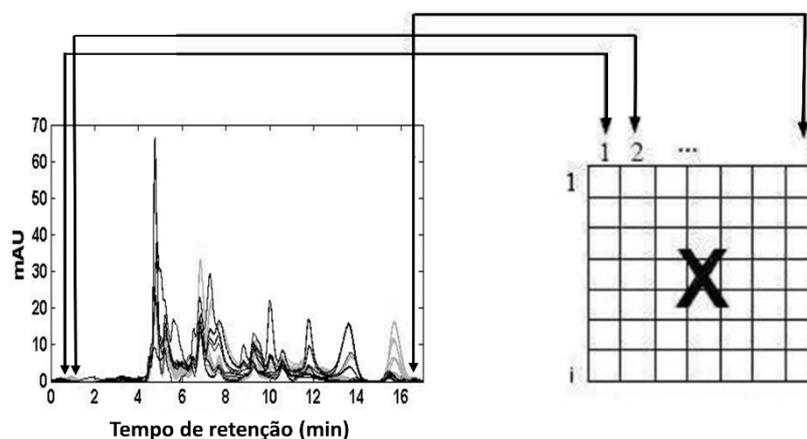
Dentre as ferramentas quimiométricas para avaliação de alimentos, destaca-se a análise de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*), promovendo análises não-supervisionadas ou exploratórias para controlar a qualidade e monitorar processos [63]. Essa ferramenta é a base para muitas outras utilizadas na quimiometria, como por exemplo, as calibrações multivariadas por mínimos quadrados parciais (PLS – *Partial Least Squares*), também com diferentes aplicações em determinações quantitativas no setor alimentício [64].

2.4.1 Análise de Componente Principal (PCA)

PCA é uma ferramenta quimiométrica de reconhecimento de padrão não-supervisionado ou exploratório que visa transformar dados complexos para que as informações mais importantes e relevantes sejam realçadas [65].

Na PCA os dados instrumentais como espectros e cromatogramas, por exemplo, são organizados no formato de uma matriz (Figura 2), normalmente denominada como \mathbf{X} . As linhas dessa matriz correspondem aos espectros ou cromatogramas de cada uma das amostras, enquanto as colunas correspondem à absorvância nos diferentes comprimentos de onda, ou às intensidades dos picos nos diferentes tempos de retenção.

Figura 2. Organização dos dados instrumentais no formato de uma matriz.

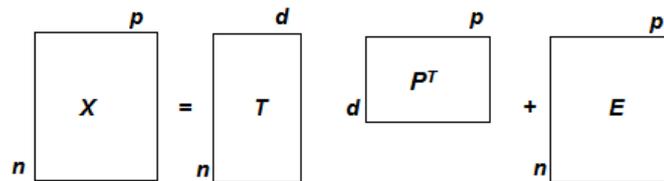


Fonte: Autoria própria.

Os dados organizados no formato da matriz \mathbf{X} são decompostos em um produto de duas matrizes (Equação 1 e Figura 3): os *scores* (\mathbf{T}) e os *loadings* (\mathbf{P}), juntamente com uma matriz de erros (\mathbf{E}) [66].

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

Figura 3. Decomposição em *scores* e *loadings* para matriz \mathbf{X} .



Fonte: Adaptado de [6].

O conjunto de *scores* e *loadings* é denominado de componentes principais (PCs - *Principal Components*) e trata-se de uma combinação linear das variáveis originais sem alterar a relação entre as amostras nesta transformação [64]. Estas matrizes permitem uma exploração mais significativa do conjunto de sinais instrumentais a partir de gráficos informativos acerca da similaridade entre as amostras (*scores*) e as variáveis responsáveis por essa similaridade através dos *loadings* [67]. Por outro lado, a matriz de erros (\mathbf{E}) retém as informações não explicadas pelas PCs ou podem também se relacionar ao ruído instrumental [67].

2.4.2 Cartas de Controle Multivariadas baseadas na PCA

As informações obtidas a partir da decomposição dos dados instrumentais por PCA podem ser utilizadas na implementação de cartas de controle multivariadas. Dessa forma, apesar da PCA ser uma ferramenta não-supervisionada, é possível implementar um critério de supervisão utilizando, por exemplo, o *Q residuals* [63].

A partir do *Q residuals* é possível medir a diferença (ou o resíduo) da projeção de uma amostra nos ' k ' PCs retido no modelo PCA. Assim, pode-se dizer que se trata de uma avaliação estatística de falta de ajuste que pode ser usada para indicar quão bem o modelo pré-estabelecido está descrevendo uma amostra. Ainda, em outras palavras, o resultado de *Q residuals* mostra quão bem cada amostra está em conformidade com o modelo previamente desenvolvido. A Equação 2 mostra como este parâmetro é estimado para a *i-ésima* amostra em \mathbf{X} denominada \mathbf{x}_i [63]:

$$Q_i = e_i e_i^T = x_i (I - P_k P_k^T) x_i^T \quad (2)$$

Em que, e_i é a i -ésima linha da matriz E ; I é uma matriz identidade de tamanho apropriado ($n \times n$); P_k é a matriz de *loadings* considerando os k PCs utilizados na obtenção do modelo PCA.

Na implementação das cartas de controle baseadas na PCA somente as amostras do grupo alvo (por exemplo amostras de origem de cultivo orgânico) são utilizadas no desenvolvimento do modelo PCA. Para essas amostras alvo os valores de Q residuals são determinados e um valor limite (*threshold*) é estabelecido [68]. A partir de então, quando o sinal instrumental de novas amostras é projetado no espaço das componentes principais do modelo PCA, o valor do Q residuals é calculado para esta amostra e, esta amostra, será então enquadrada como pertencente à classe (grupo) alvo ou não pertencente.

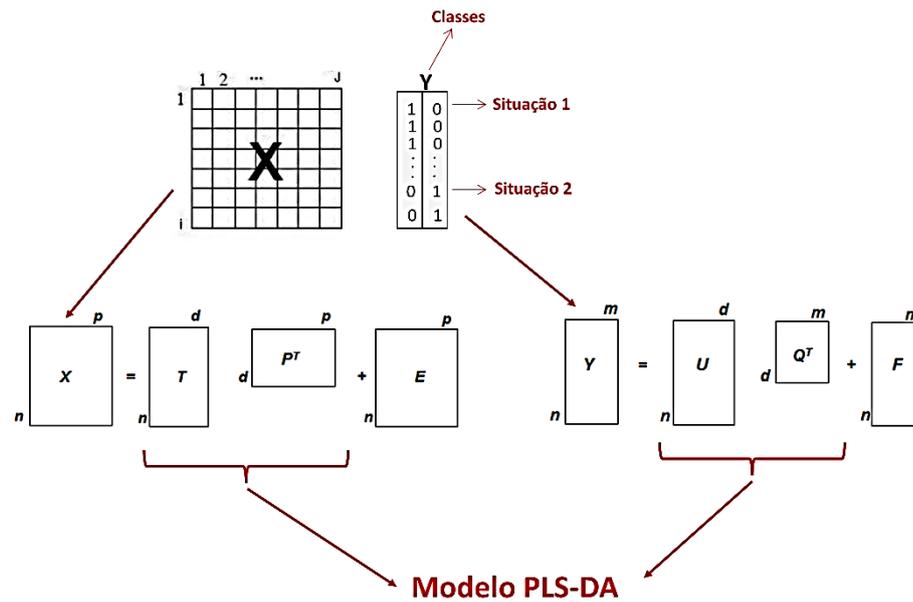
As cartas de controle baseadas na PCA, especificamente empregando os Q residuals, são reportadas na literatura a partir de dados de espectroscopia Raman para controle *on-line* de fermentação da glicose por *Saccharomyces cerevisiae* [69], e a partir de espectros nas regiões do infravermelho próximo (NIR) [63,70] e médio (MIR) [63] na avaliação de adulteração em polpa de açaí liofilizada. Nesta tese, as cartas de controle baseadas em Q residuals foram implementadas, a partir do *fingerprint* cromatográfico obtido por HPLC, na avaliação de sucos de uva orgânicos e não-orgânicos.

2.4.3 Mínimos Quadrados Parciais com Análise Discriminante (PLS-DA)

O reconhecimento de padrão supervisionado pode ser realizado a partir da ferramenta de mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA – *Partial Least Squares with Discriminant Analysis*) [71]. O fundamento do PLS-DA é o PLS [72], cuja base, por sua vez, é a PCA [64].

Em PLS-DA a matriz contendo os sinais instrumentais também é decomposta em um produto de duas outras matrizes (*scores* e *loadings*), como na PCA. Entretanto, enquanto o PLS vai empregar essas matrizes de *scores* e *loadings* em uma regressão linear quantitativa em função da concentração de uma propriedade de interesse (y), por exemplo, a PLS-DA fará essa regressão em função de uma matriz (Y), também decomposta em *scores* e *loadings*, e contendo informações acerca das classes às quais as amostras pertencem [73], como ilustra a Figura 4.

Figura 4. Decomposição em *scores* e *loadings* para o modelo PLS-DA.



Fonte: Autoria Própria

A partir das ferramentas multivariadas PLS e PLS-DA, emprega-se a terminologia de variáveis latentes (VLs) pois as PCs sofrem pequenas modificações para encontrar uma máxima covariância entre o bloco das variáveis instrumentais e o bloco contendo a informação (quantitativa no PLS ou qualitativa no PLS-DA) para a regressão linear. Dessa forma, as PCs, inicialmente ortogonais, perdem a sua ortogonalidade com as etapas envolvidas posteriormente em PLS e PLS-DA [72]. As etapas matemáticas do PLS-DA são descritas passo a passo na referência [71].

A escolha do número de VLs pode ser definida com base na avaliação da fronteira de classe em decisão Bayesiana por testes de hipóteses [74, 75]. A decisão Bayesiana minimiza o risco de atribuições incorretas das amostras nas classes consideradas, e é representado como [76]:

$$p(\hat{y}_i/Class1).P(Class1) > p(\hat{y}_i/Class2).P(Class2) \quad (3)$$

Em que, $P(Class1)$ e $P(Class2)$ são as probabilidades de ocorrência, a priori, das amostras nas classes 1 e 2, respectivamente.

Essas probabilidades são calculadas através das equações 4 e 5, assumindo que o número de amostras em cada classe do conjunto de treinamento é representativo da população, tal que $P(Class1) + P(Class2) = 1$ [74-76].

$$P(Class1) = \frac{I_{Class1}}{I_{Class1} + I_{Class2}} \quad (4)$$

$$P(Class2) = \frac{I_{Class2}}{I_{Class1} + I_{Class2}} \quad (5)$$

As funções de densidade de probabilidade $p(\hat{y}_i/Class1)$ e $p(\hat{y}_i/Class2)$ são calculadas a partir dos valores estimados \hat{y}_i para cada classe de conjunto de treinamento, assumindo que eles estão próximos da distribuição populacional esperada para cada classe (Equações 6 e 7, respectivamente) [74-76]:

$$p(\hat{y}_i/Class1) = \frac{1}{s_{Class1}\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\hat{y}_i - \bar{y}}{s_{Class1}}\right)^2} \quad (6)$$

$$p(\hat{y}_i/Class2) = \frac{1}{s_{Class2}\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\hat{y}_i - \bar{y}}{s_{Class2}}\right)^2} \quad (7)$$

Em que: s é o desvio padrão e \bar{y} corresponde à média dos valores previstos.

Por fim, a fronteira entre as duas classes, também denominada como será o valor de \hat{y} quando $p(\hat{y}/Class1).P(Class1) = p(\hat{y}/Class2).P(Class2)$.

A capacidade de classificação do modelo foi avaliada através da sensibilidade (Equação 8) e especificidade, ou seletividade (Equação 9). Esses valores podem assumir resultados de 0 (0%) a 1 (100%) e consideram os resultados (ou número de amostras ' N ') com previsão verdadeiramente positivo (TP) e negativo (TN), e falso-positivo (FP) e negativo (FN) [77,78].

$$Sensibilidade = \frac{N(TP)}{N(TP) + N(FN)} \quad (8)$$

$$Seletividade = \frac{N(TN)}{N(TN) + N(FN)} \quad (9)$$

A sensibilidade do modelo PLS-DA é avaliada por meio da habilidade do modelo em classificar corretamente as amostras de validação pertencentes a uma determinada classe. Assim se o modelo classificar todas as amostras corretamente a sensibilidade para aquela classe será igual a 1. Já a previsão incorreta de amostras está relacionada com a seletividade do modelo. Dessa forma, se o modelo não erra na previsão de uma amostra esse modelo apresenta especificidade igual a 1 [79].

Embora atualmente ocorra na literatura uma vasta discussão acerca das ferramentas para reconhecimento de padrão supervisionado, nomeados como *one-class* e *binary-class* [80], o PLS-DA tem se mostrado eficiente na análise discriminante em avaliações de alimentos ao modelar uma classe em função da outra. Além disso, a literatura científica reforça o interesse de pesquisas na área de sucos destacando algumas aplicações com o uso do PLS-DA aplicado a dados de espectrometria de massa-quadrupolo de tempo de voo para classificar sucos de laranja não concentrados (NFC) daqueles reconstituídos a partir de concentrado (FC) [81]. Da mesma forma, essa ferramenta quimiométrica foi aplicada para classificar sucos de maçã NFC e FC através da fluorescência molecular [82]. Para sucos de abacaxi, o PLS-DA foi utilizado para discriminar as amostras da polpa e as da casca [83]. O PLS-DA também foi empregado na classificação de sucos cítricos e ‘supersucos’ a partir de parâmetros químicos e teores de antioxidantes [84] e, também para traçar a origem geográfica de sucos de limão argentino com base na análise traço de certos elementos [85].

2.4.4 Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos quadrados Alternantes (MCR-ALS)

A resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS - *Multivariate Curve Resolution- Alternating Least Squares*) é uma ferramenta quimiométrica de resolução de sinais, que também pode ser empregada para finalidades quantitativas [86].

MCR-ALS assume que os espectros observados são uma combinação linear dos espectros dos componentes puros no sistema [87], como ilustra a Figura 5.

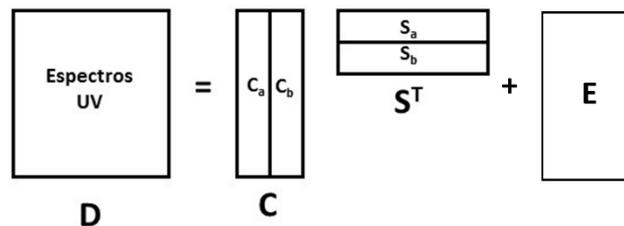
Figura 5. Ilustração da resolução de sinal por MCR-ALS.



Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, a matriz de dados espectrais (**D**) é decomposta, conforme Figura 6, em um produto de duas matrizes (Equação 10): **C** referente a quantidades ou concentrações relativas, e **S^T** que contém os espectros puros. Além disso uma matriz **E** é associada com ruído ou erro experimental [88].

Figura 6. Decomposição da matriz **D** em concentrações relativas (**C**) e espectros puros (**S^T**).



Fonte: Autoria própria

$$D=CS^T+E \quad (10)$$

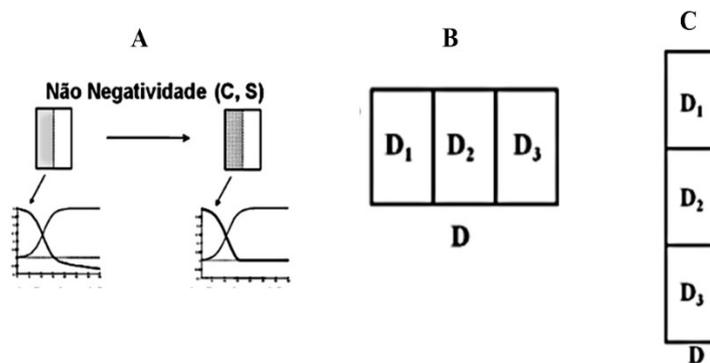
Para a aplicação do MCR-ALS a um conjunto de espectros é necessária alguma informação inicial, como uma estimativa do número de espécies presentes na amostra (*rank*) e uma estimativa inicial dos perfis de concentração para cada constituinte [89]. Como muitas vezes não se tem acesso a tais informações iniciais, pode-se utilizar de estratégias para estimar o *rank* utilizando, por exemplo, da análise exploratória por PCA [86].

Para que o processo de otimização iterativa através de ALS seja realizado é necessário o conhecimento dos sinais (por exemplo, os espectros) ou das concentrações dos componentes puros presentes na matriz de dados. Considerando que essas informações nem sempre estão disponíveis pode-se estimá-las a partir de algoritmos como PCA [90-92]. Na aplicação desta tese, utilizando o MCR-ALS, o espectro puro do analito de interesse estava disponível e foi empregado como estimativa inicial.

Os resultados gerados pela aplicação do MCR-ALS podem ser afetados pelas intensidades das ambiguidades e ou das rotações. Isso implica em possibilidades de combinações de perfis que podem preencher as condições de forma e intensidade requeridas, ajustando de forma otimizada o conjunto de dados **D** [86]. Entretanto, as ambiguidades podem ser apenas parcialmente superadas pelo uso de restrições. Dentre as restrições possíveis destaca-se a restrição de não negatividade para concentração e sinal (Figura 7A). Dessa forma, a utilização das restrições diminui consideravelmente o conjunto de soluções possíveis na

decomposição dos dados [86, 93]. Além disso, problemas de ambiguidades também são reduzidos significativamente com a possibilidade de analisar estruturas mais ricas em informações, tais como dados fundidos através das matrizes de dados aumentadas pelas linhas (Figura 7B) e/ou colunas (Figura 7C) [94, 95]. Dessa forma, matrizes aumentadas podem ser definidas como uma forma de junção entre duas ou mais matrizes de dados bilineares de sistemas diferentes, que partilham de alguns ou de todos os seus compostos [86].

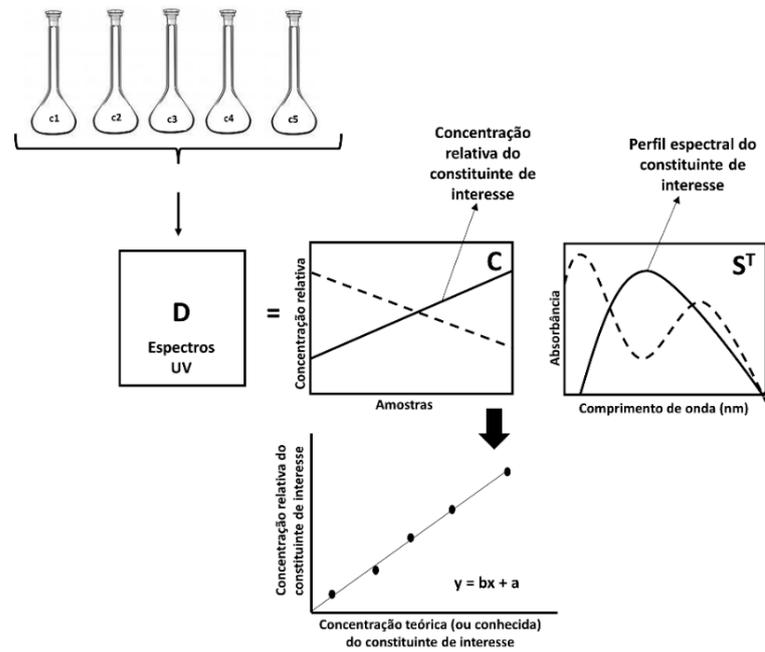
Figura 7. Restrição de não negatividade (A) e matrizes aumentadas pelas linhas (B) e pelas colunas (C).



Fonte: Adaptado de [87].

A proposição de modelos quantitativos a partir do MCR-ALS apresenta vantagens em relação à calibração multivariada convencional. A mais importante de todas é que com MCR-ALS não é necessário nem o conhecimento nem a inclusão de interferentes na etapa de desenvolvimento do modelo de calibração (requisito do PLS, por exemplo). Com isso, é possível alcançar vantagem de segunda ordem (possibilidade de quantificar o analito na presença de interferentes mesmo que esses interferentes não estejam presentes na etapa de calibração) [96] partindo-se de dados de primeira ordem (um vetor de respostas instrumentais) [97,98]. Ainda como uma grande vantagem destaca-se a possibilidade de utilização de uma quantidade reduzida de amostras na etapa de calibração, isso porque os potenciais interferentes não precisam estar modelados como no PLS. Isso ocorre porque a regressão é feita a partir do perfil de concentração relativa (referente ao analito de interesse) recuperado pelo MCR-ALS em função dos valores de concentração conhecidos (ou teóricos) como ilustra a Figura 8. Dessa forma, o modelo assume uma forma matemática mais simples e é considerado pseudo-univariado já que opera de modo semelhante a um modelo univariado, porém, partindo-se de dados multivariados [86].

Figura 8. Esquema para realização de calibração pseudo-univariada com MCR-ALS.



Fonte: Autoria própria.

Aplicações do MCR-ALS em calibrações pseudo-univariadas ainda são escassas em quantificações em matrizes alimentares, destacando-se a avaliação da atividade antioxidante de extratos de chia [99] e de cúrcuma [100].

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver métodos analíticos alternativos utilizando ferramentas quimiométricas para avaliações em sucos de uvas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar um equipamento portátil de espectroscopia UV-VIS acoplado à classificação supervisionada de mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA) no desenvolvimento do modelo semi-quantitativo.
- Desenvolver uma metodologia analítica rápida e inovadora baseada na impressão digital cromatográfica por HPLC dos sucos de uva, com o objetivo de diferenciar os sucos de uvas orgânicos.
- Desenvolver um método de quantificação do resveratrol em sucos de uvas a partir da espectroscopia na região do UV

4. APLICAÇÃO I

Modelo semiquantitativo por reconhecimento de padrões supervisionado (PLS-DA) na avaliação de carbendazim em sucos de uva.

Os resultados desta aplicação estão publicados no periódico científico Food Chemistry < <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130742>>.

4.1 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar, de forma semiquantitativa, o teor de CBZ em suco de uva integral por meio de um equipamento portátil de espectroscopia UV-VIS acoplado à classificação supervisionada de mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Amostras

Foram utilizados sucos de uva integral comerciais provenientes do sistema de cultivo orgânico de três diferentes produtores do Rio Grande do Sul - Brasil. Foram utilizadas 30 amostras diferentes da casta americana e 9 amostras diferentes da casta Bordo. Em relação a essas variedades, quando da utilização para a produção de suco de uva, a colheita em algumas propriedades inicia-se na segunda quinzena de janeiro, enquanto em outras inicia-se na primeira semana de fevereiro.

Todas as amostras foram rotuladas pelo próprio fabricante como sendo orgânicas e certificadas por órgãos certificadores credenciados e fiscalizados pelo Ministério da Agricultura conforme Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003 [101]. Considerando a legislação brasileira, o suco de uva integral implica em um suco sem adição de conservantes, açúcares, água ou corantes, enquanto a origem orgânica significa sem agrotóxicos.

4.2.2 Procedimentos

Dezoito amostras de sucos de uva integral da variedade de uvas americanas, originadas da região da serra gaúcha Brasileira, foram empregados aleatoriamente para preparar amostras

com CBZ (Sigma-Aldrich) enriquecido cobrindo uma faixa de concentração de 0,1 a 1,3 mg L⁻¹. Assim, um total de 126 amostras com CBZ (18 amostras com concentração 0,1mg L⁻¹; 18 amostras com concentração 0,3mg L⁻¹ e assim por diante com 0,5, 0,7, 0,8, 1,0 e 1,3 mg L⁻¹) foram produzidas a partir da adição de uma solução padrão estoque de CBZ de 10 mg L⁻¹ e na sequência foram submetidas a uma diluição de 1:2 v/v (amostra/água) de suco em água ultrapura, de modo a obter as concentrações finais citadas acima.

Da mesma forma, as amostras de sucos de uva integral da variedade de Bordo foram enriquecidas com CBZ nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹. Foram preparadas 18 amostras (9 para cada uma das concentrações 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). Essas amostras foram utilizadas na etapa de avaliação da robustez do modelo semiquantitativo.

Os espectros de UV-VIS foram adquiridos em um equipamento portátil Ocean Optics (USB 650-UV-VIS, fonte de luz de halogênio de tungstênio deutério e operação através do software SpectraSuite) usando uma cubeta de quartzo com um caminho óptico de 1 mm, 32 varreduras, na faixa de 200 - 800 nm e resolução de 1 nm. As amostras foram diluídas com água ultrapura na proporção 1:2 v/v (amostra/água).

A etapa de diluição foi realizada com o objetivo de atingir a absorvância máxima de '1'.

4.2.3 Desenvolvimento do modelo semiquantitativo

Foram realizados alguns procedimentos de pré-processamento aos espectros brutos antes do desenvolvimento do modelo PLS-DA. Esses procedimentos incluíram a correção da linha de base e suavização espectral com algoritmo de Savitzky-Golay (polinômio de primeira ordem para uma janela de 11 pontos) [102].

Para a próxima etapa os espectros pré-processados foram separados em dois conjuntos de dados, compondo as amostras de treinamento e validação externa, pelo algoritmo Kennard-Stone [103]. Este procedimento foi aplicado, separadamente, para as amostras de sucos de uva integral da variedade americana sem CBZ e com CBZ. Em cada concentração foram selecionadas 12 amostras no treinamento e 6 amostras na validação para concentração 0,1 mg L⁻¹, e assim por diante com as amostras nas demais concentrações de CBZ (0,3, 0,5, 0,7, 0,8, 1,0 e 1,3 mg L⁻¹).

Para os sucos de uva integral da variedade americana livre de CBZ foram selecionadas 20 amostras no treinamento e 10 amostras no conjunto de validação. Esse procedimento resultou em 104 amostras na etapa de treinamento e 52 amostras na validação, modeladas pelo PLS-DA em três classes (classe 1 - sem CBZ; classe 2 - com CBZ até 0,7 mg L⁻¹ - ou seja,

LRM permitido no Brasil ; classe 3 - com CBZ superior a 0,7 mg L⁻¹). Além disso, os *outliers* foram avaliados, nos conjuntos de treinamento e validação externa, através do *leverage* e do *Q Residuals*, de acordo com trabalhos anteriores [104-106].

O modelo de classificação multivariado (PLS-DA) foi implementado de forma semiquantitativa, uma vez que as classes foram estabelecidas de acordo com a concentração de CBZ presente na amostra. No modelo PLS-DA, a matriz **X** representada pela resposta instrumental, foram os espectros UV-VIS dos sucos de uva integral, da variedade de uvas americanas, com dimensão de (104x601) sendo 104 linhas, uma para cada espectro das amostras de sucos e 601 colunas, uma para cada comprimento de onda considerado na aquisição espectral (200 a 800 nm). Por outro lado, a matriz **Y** correspondeu às classes das amostras.

Na etapa de desenvolvimento do modelo foi empregado o pré-processamento de centrar na média. Além disso, foi considerada a validação cruzada com blocos contíguos de 3 amostras.

A escolha do número ótimo de variáveis latentes (VLs) foi realizada de acordo com a avaliação da fronteira de classe por decisão bayesiana e teste de hipótese [76,107], considerando as curvas ROC (*Receiver Operation Classification*) e a variância explicada no bloco **Y** [104,108]. Além disso, ainda na escolha do número de VLs, foram consideradas as taxas de erro (ER), estimadas conforme a equação 11 [109]. Esta última abordagem é baseada na média da sensibilidade para cada classe (na validação cruzada, neste caso) e pode-se então selecionar o número ótimo de variáveis latentes como o número associado ao erro mínimo.

$$ER = 1 - \left(\frac{\sum_{g=1}^G S_{ng}}{G} \right) \quad (11)$$

Onde:

G: Corresponde ao número de classes,

S_{ng}: Média de sensibilidade para cada classe na validação cruzada.

O desempenho do modelo semiquantitativo foi avaliado em termos da capacidade de classificação do modelo por meio de suas taxas de sensibilidade e especificidade [104,108], e com base na taxa de erro balanceada (BER – *Balanced Error Rates*) que corresponde à média dos erros em cada classe.

Para avaliar as principais regiões espectrais com importância na modelagem de cada classe foi determinada a importância da variável de projeção (VIP – *Variable Importance in*

Projection), conforme equação 12 [110]. Para tanto, o comprimento de onda que apresenta um valor de pontuação VIP superior a '1' foi considerado uma variável importante na modelagem daquela classe específica [104, 110].

$$VIP_j = \sqrt{N_{\text{vars}} \frac{\sum_{k=1}^F (b_k^2 t_k^T t) (w_{jk} / \|w_k\|)^2}{\sum_{k=1}^F (b_k^2 t_k^T t)}} \quad (12)$$

Em que:

t_k é o vetor de *scores* ao longo da k variáveis latentes, b_k é o vetor de coeficientes de regressão com k variáveis latentes, N_{vars} é o número de variáveis experimentais, w_{jk} são os loadings de cada variável j nas k variáveis latentes, e w_k corresponde ao vetor de loadings para as k variáveis latentes.

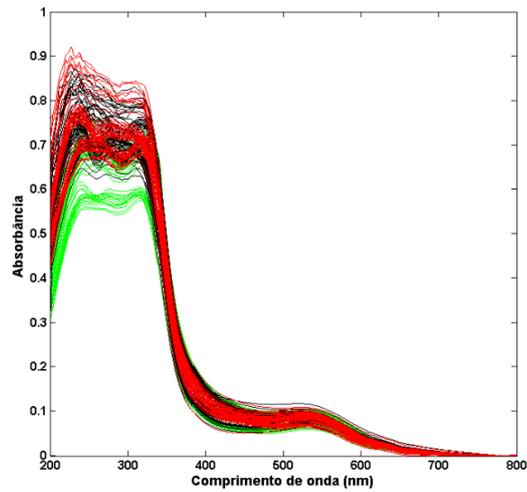
Por fim, um estudo foi realizado para demonstrar que os resultados produzidos pelo modelo semiquantitativo PLS-DA foi mais eficiente do que os resultados que seriam produzidos por um modelo multivariado quantitativo PLS. Assim, foi desenvolvido um modelo PLS, com as mesmas amostras utilizadas na etapa de treinamento do modelo PLS-DA, empregando o pré-processamento de centrar na média e o número de VLs foi escolhido com base nos valores do erro médio quadrático da validação cruzada (RMSECV), realizada por cruzada de blocos contíguos de 3 amostras.

Todos os cálculos foram realizados através do software Matlab versão R2007b (The MathWorks Inc., Natick, EUA) com o auxílio das ferramentas do PLS Toolbox versão 5.2 (Eigenvector Technologies, Manson, Washington).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os espectros na região do UV-Vis de todas as amostras sucos de uva integral são mostrados na Figura 9. Comparando os espectros nas três classes consideradas neste estudo (sucos sem adição de CBZ na 1° classe, sucos com CBZ abaixo do LMR na 2° classe e, sucos com CBZ acima do LMR na 3° classe) é possível notar uma grande semelhança entre eles. Além disso, considerando a falta de seletividade nesta região, é difícil concluir sobre a diferença entre as classes apenas por inspeção visual dos espectros. Dessa forma, a proposição do modelo semiquantitativo por PLS-DA é uma alternativa apropriada.

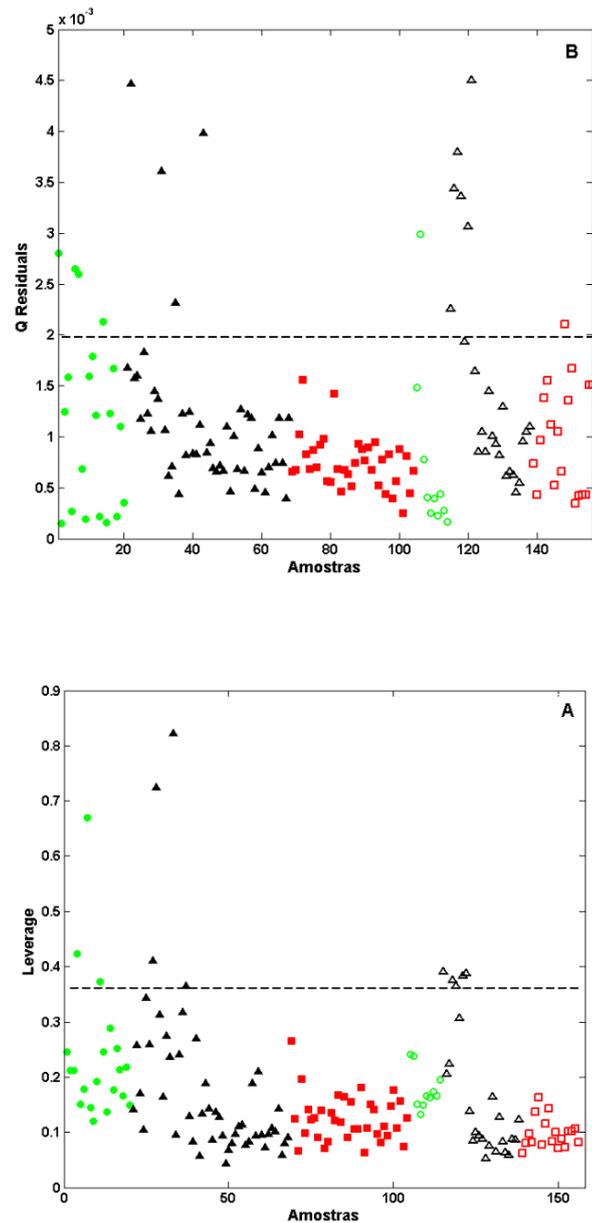
Figura 9 - Espectros UV-VIS. Verde: WGJ sem CBZ; Preto: WGJ com CBZ até 0,7 mg L⁻¹; Vermelho: WGJ com CBZ superior a 0,7 mg L⁻¹.



Fonte: Autoria própria

No desenvolvimento do modelo PLS-DA, o próximo passo consistiu na investigação dos *outliers* com base no *leverage* e no *Q Residuals*. De acordo com os resultados apresentados na Figura 10, um total de 13 *outliers* foram eliminados no conjunto de treinamento (6 *outliers* da classe 1, e 7 *outliers* da classe 2), enquanto 9 *outliers* foram removidos do conjunto de validação externa (1 *outlier* da classe 1, e 8 *outliers* da classe 2).

Figura 10 - *Outliers*. (A) *Leverage*; (B) *Q Residuals*. (●) amostras da classe 1 no treinamento. (○) amostras da classe 1 na validação externa. (▲) amostras da classe 2 no treinamento. (△) amostras da classe 2 na validação externa. (■) amostras da classe 3 no treinamento. (□) amostras da classe 2 na validação externa.

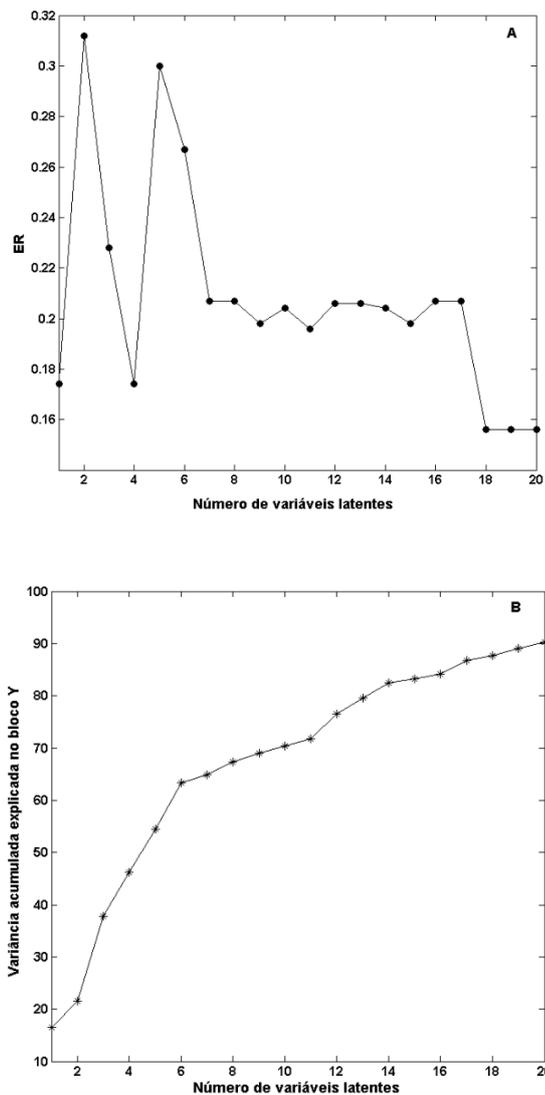


Fonte: Autoria própria.

O modelo PLS-DA, com maior habilidade preditiva, foi obtido com 18 VLs, que foram escolhidos considerando as taxas de erro na validação cruzada (blocos contínuos de 3 amostras), a variância explicada no bloco Y (Figura 11), e a decisão Bayesiana de fronteira de classe. Neste

último caso ocorre uma minimização do risco nos erros de predição, uma vez que a amostra é atribuída a uma determinada classe considerando-se um valor limite (*threshold*).

Figura 11. Taxas de erro na validação cruzada em função do número de VLs (A);
Variância explicada no bloco Y em função do número de VLs (B).



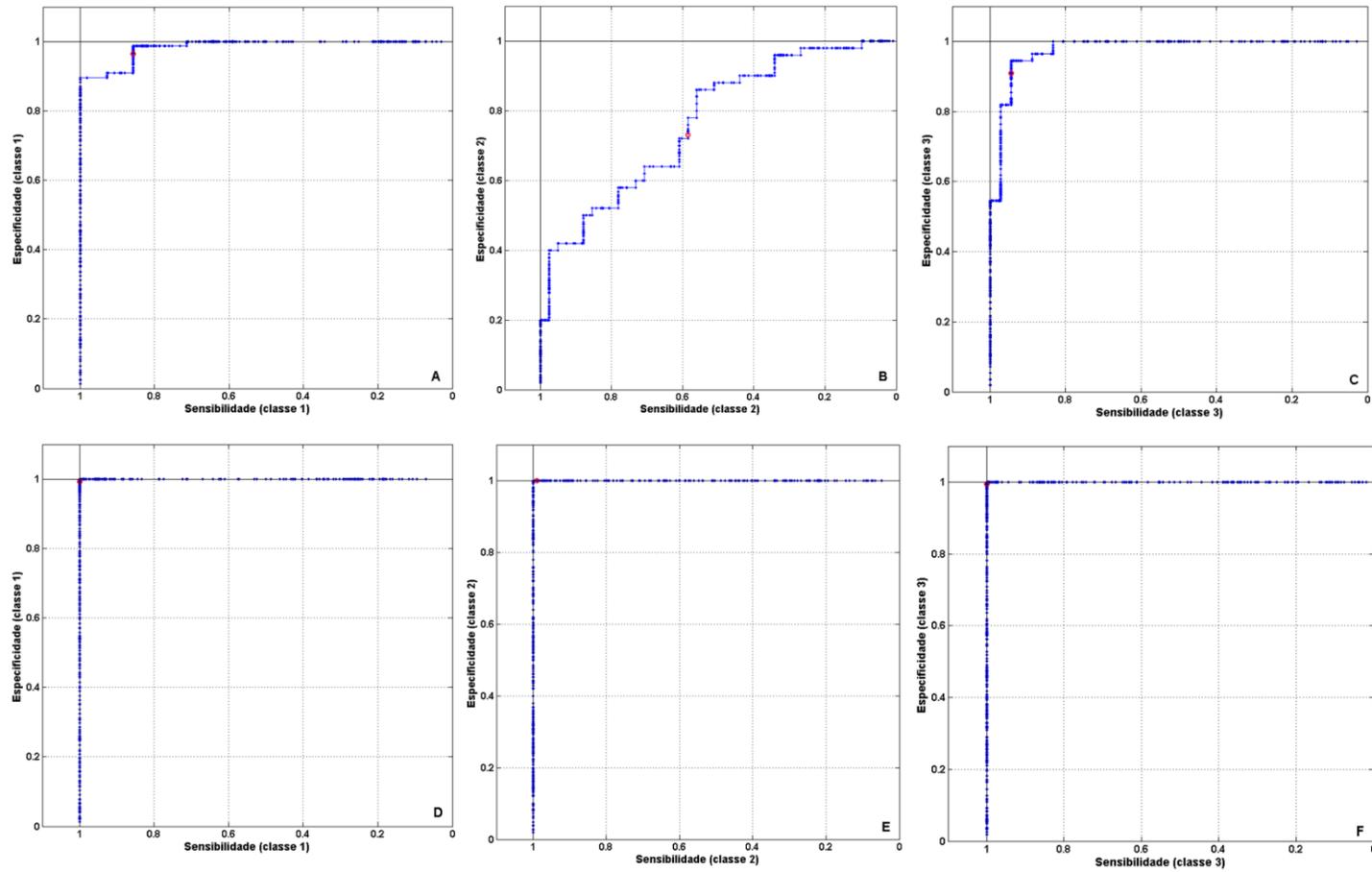
Fonte: Autoria própria.

A partir das taxas de erro na validação cruzada observa-se um valor de 0,174 com 4 VLs, enquanto que com 18 VLs o modelo atinge a taxa de erro mínima. A percentagem de variância explicada pelo modelo, no bloco Y, com 4 VLs é de 46,23%, contra 87,75% com 18 VLs.

Ainda sobre a escolha do número adequado de VLs, as curvas ROC foram consideradas e apresentadas na Figura 12. Essas curvas auxiliam na escolha do número de VLs por levar em

conta os resultados de sensibilidade e especificidade em modelos obtidos a partir de diferentes números de VLs.

Figura 12. Curvas ROC. (A) Classe 1 com 4 VLs; (B) Classe 2 com 4 VLs; (C) Classe 3 com 4 VLs; (D) Classe 1 com 18 VLs; (E) Classe 2 com 18 VLs; (F) Classe 3 com 18 VLs.



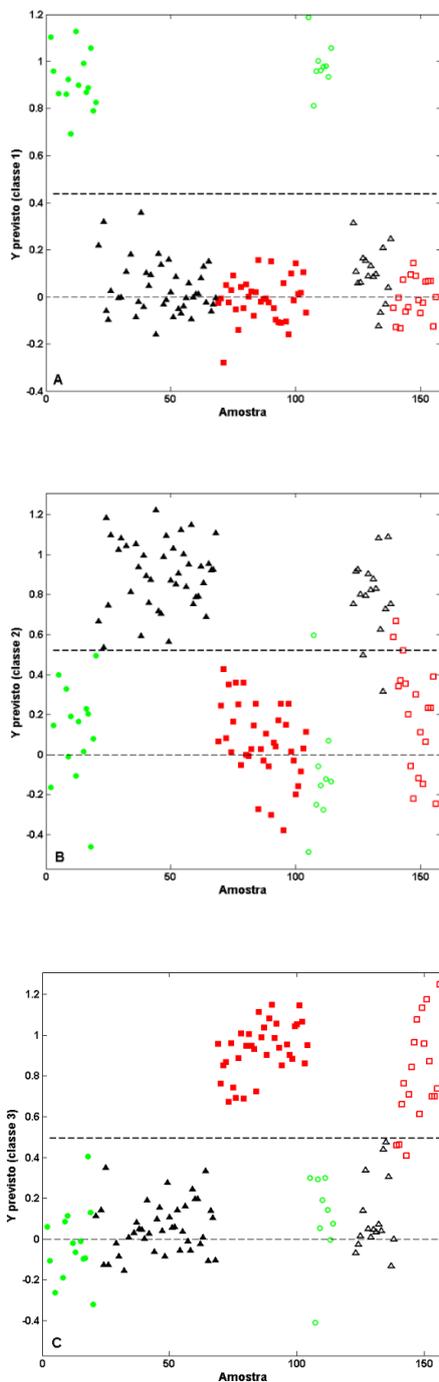
Fonte: Autoria própria.

As curvas ROC para os modelos com 4 e 18 VLs demonstram que com 18 VLs o modelo pode ser estabelecido com sensibilidade e especificidade adequadas (mais próximo possível do valor 1), para as três classes simultaneamente. Isso implica que o modelo consegue prever corretamente todas as amostras de todas as classes no conjunto de treinamento. Além disso, a partir das curvas ROC, o valor limite (*threshold*) é estabelecido quando o produto entre as funções densidade de probabilidade e as probabilidades de ocorrência *a priori* das amostras pertencentes a uma determinada classe é igual a este mesmo produto para as demais classes [110].

A partir do modelo obtido com 18 VLs foi testada a capacidade de classificação do modelo, demonstrada na Figura 13. É possível observar as amostras de treinamento e validação externas de sucos de uva integral nas classes 1, 2 e 3, respectivamente, separadas pelo *threshold*. Verifica-se que as classes pré-estabelecidas experimentalmente foram consistentes com os espectros na região do UV-Vis obtidos no equipamento portátil.

Para a classe 1, o modelo PLS-DA apresentou sensibilidade e especificidade de 100% para o conjunto de validação externa. Esse resultado significa que todas as amostras de validação externa da classe 1 foram previstas corretamente, e nenhuma amostra das outras classes foi prevista na classe 1. Para a classe 2, a sensibilidade e a especificidade foram de 87,5% e 85,2%, respectivamente. Para a classe 3, a sensibilidade foi igual a 83,3% e a especificidade foi de 100%. Resumidamente, para ambas as classes 2 e 3, a taxa de classificação correta foi maior que 80% nos conjuntos de validação externa, enquanto para a classe 3 nenhuma amostra de validação externa de outras classes foi prevista como sendo desta classe. Além disso, a taxa de erro balanceada foi calculada e apresentou o valor de 0,085, o que significa que a área sob a curva ROC para as amostras de validação externa é de 0,915, ou seja, próxima do valor 1 estando de acordo com as amostras do conjunto de treinamento.

Figura 13. Classificação obtida pelo modelo PLS-DA. (●) amostras da classe 1 no treinamento. (○) amostras da classe 1 na validação externa. (▲) amostras da classe 2 no treinamento. (△) amostras da classe 2 na validação externa. (■) amostras da classe 3 no treinamento. (□) amostras da classe 2 na validação externa.

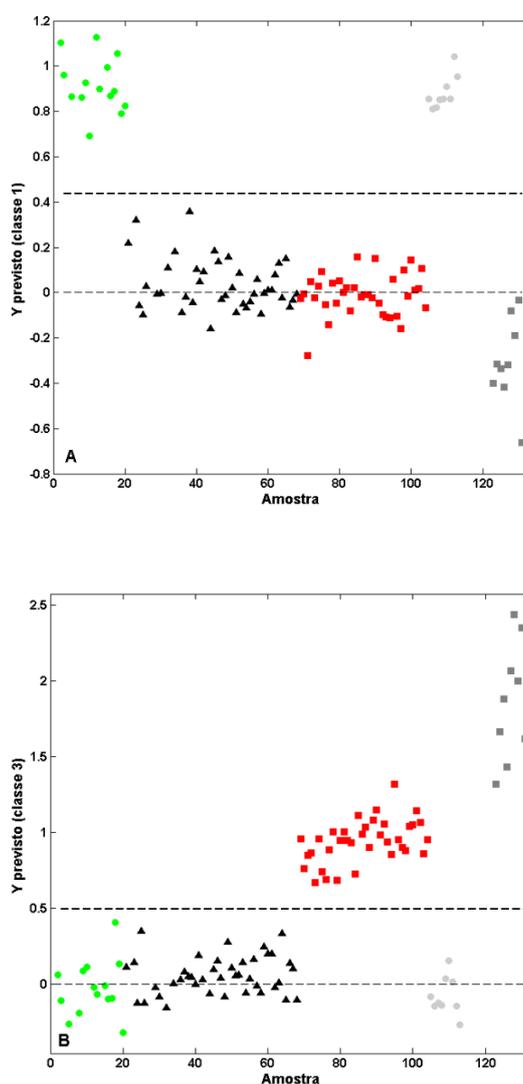


Fonte: Autoria própria.

A robustez do modelo PLS-DA proposto foi avaliada através da influência da variedade de uva, onde amostras suco de uva da variedade Bordo (classe 1: 9 amostras

sem CBZ; e classe 3: 9 amostras com CBZ 1,0 mg L⁻¹) foram previstas no modelo construído previamente com amostras de suco de uva da variedade americana. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 14, de onde verifica-se que, para ambas as classes, a sensibilidade e especificidade foram de 100%, ou seja, todas as amostras foram previstas corretamente.

Figura 14. Robustez do modelo PLS-DA. (●) amostras da classe 1 no treinamento. (○) amostras da classe 1 da variedade Bordô. (▲) amostras da classe 2 no treinamento. (■) amostras da classe 3 no treinamento. (■) amostras da classe 3 da variedade Bordô.



Fonte: Autoria própria

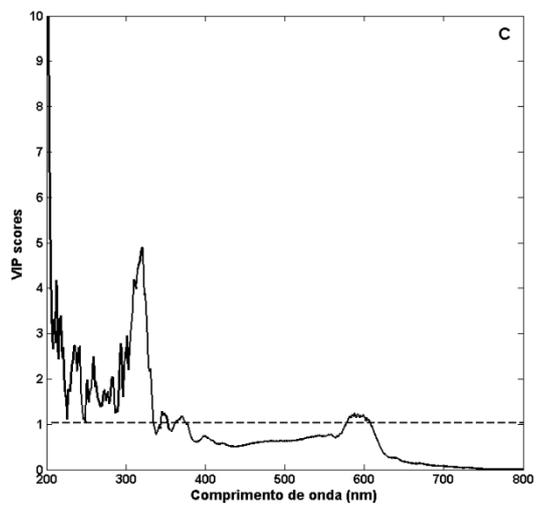
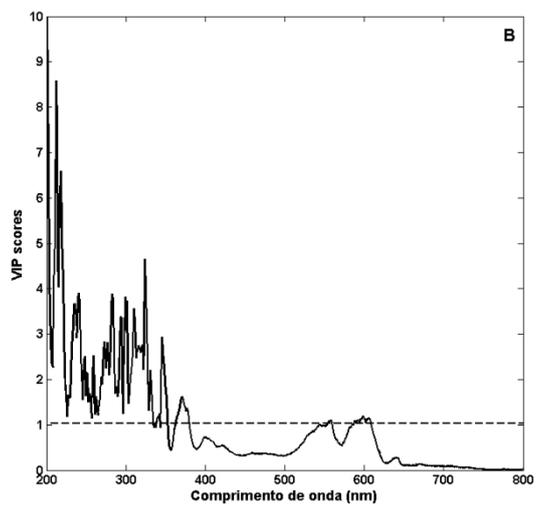
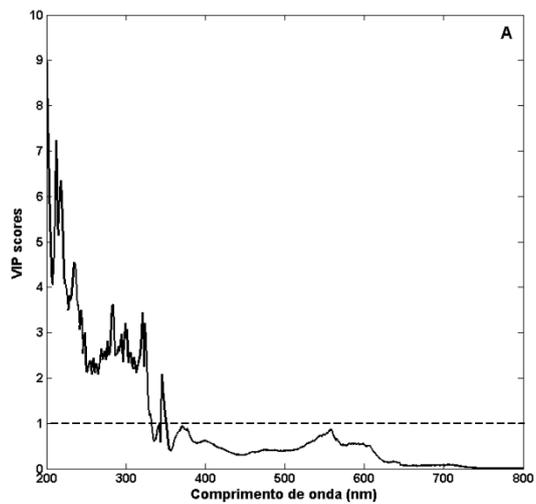
É importante pontuar que ter um grande conjunto de dados, cobrindo amostras reais e suas variações, é essencial para obter um modelo PLS-DA estatisticamente confiável [111]. Certamente, um aumento no número de amostras pode melhorar a

qualidade do modelo. O modelo também pode ser atualizado incluindo amostras de sucos de uva integral da variedade americana de diferentes locais ou incluindo amostras de sucos provenientes de variedades diferentes. No entanto, a robustez demonstrada através do teste realizado com a variedade de uvas Bordô mostra resultados viáveis no desenvolvimento de modelos PLS-DA baseados na espectroscopia UV-VIS para determinar CBZ em sucos de uva de forma semiquantitativa.

Na sequência foram avaliados os *VIP scores*, uma vez que trazem a identificação das variáveis significativas envolvidas na modelagem de cada classe [104, 112 e 113]. Esses gráficos são apresentados na Figura 15, mostrando os comprimentos de onda mais importantes para discriminar amostras no modelo semiquantitativo desenvolvido.

Através do *VIP scores* observou-se mudanças nas variáveis que correspondem aos comprimentos de onda entre 200 e 350 nm, que foi importante na modelagem das três classes. Por outro lado, o comprimento de onda em torno de 380 nm não apresenta importância para a classe 1 (sem CBZ) e foi importante para as classes 2 (com CBZ até $0,7 \text{ mg L}^{-1}$) e 3 (com CBZ superior a $0,7 \text{ mg L}^{-1}$). A região do visível também não foi importante na modelagem da classe 1. No entanto, resultados de *VIP scores* ligeiramente superiores a 1 foram observadas na região do visível para as classes 2 (em torno de 560 e 590 nm) e 3 (em torno de 590 nm). Essas diferenças nas regiões espectrais que mais contribuem para a modelagem das classes se dão, provavelmente, devido às diferenças em grupos cromóforos quando o CBZ está presente no suco de uva.

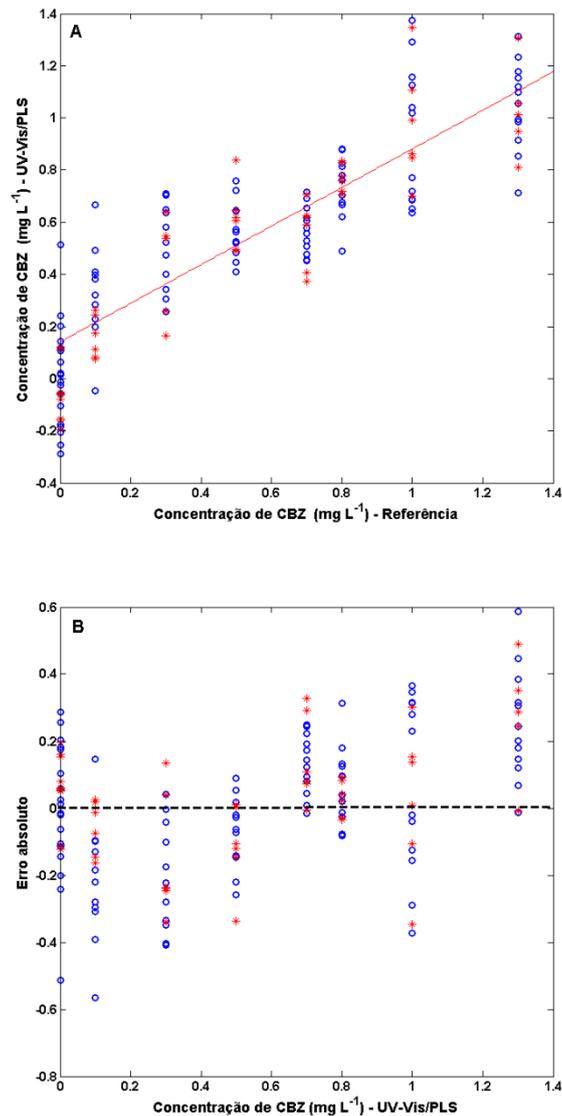
Figure 15. VIP scores. (A) classe 1; (B) classe 2; (C) classe 3.



Fonte: Autoria própria.

Por fim, com o objetivo de comparar e até mesmo justificar a escolha pelo modelo semiquantitativo, um modelo PLS (6VL, centrado na média) foi obtido e os resultados são apresentados na Figura 16 através do ajuste e dos resíduos.

Figura 16. Resultados do PLS. Ajuste; (B) Resíduos. (○ amostras na calibração; * amostras na validação externa).



Fonte: Autoria própria

Os resultados do modelo PLS mostram que não é possível realizar a previsão assertiva das amostras que não contenham CBZ, pois para essas amostras os resíduos são elevados mostrando que a previsão apresenta erros significativos. Resultados semelhantes foram relatados na literatura para a quantificação de adulterantes em leite em pó. No

estudo, os autores mostraram que com o modelo PLS não foi possível uma previsão correta nas amostras que não continham os adulterantes em sua formulação [114,115].

Além disso, o gráfico dos resíduos mostrou um comportamento não aleatório. Os erros absolutos apresentam-se mais negativos para menores concentrações de, enquanto para concentrações maiores de CBZ os erros absolutos apresentam-se mais positivos.

Dessa forma, pode-se sugerir que a espectroscopia UV-Vis, acoplada ao PLS-DA, pode ser usada como método rápido de triagem, de forma semiquantitativa, para indicar quais amostras de suco de uva não apresentam CBZ, quais estão de acordo com o LMR ou acima desse limite.

4.4 CONCLUSÕES DA APLICAÇÃO I

Este estudo mostrou a possibilidade de identificar o fungicida carbendazim em sucos de uva através de um modelo semiquantitativo proposto por espectroscopia na região do UV-VIS em conjunto com a ferramenta quimiométrica de classificação supervisionada PLS-DA.

O modelo obtido com suco de uva da variedade americana mostrou-se robusto ao prever adequadamente amostras de suco de uva da variedade bordô. A metodologia pode auxiliar as indústrias de suco de uva em seu processo de controle de qualidade, apresentando algumas vantagens como rapidez, não fazendo uso de reagentes ou solventes, e com um mínimo preparo da amostra (apenas diluição do suco de uva em água antes da aquisição do espectro).

O método proposto apresenta um menor custo e simples em comparação com os métodos tradicionais de identificação e quantificação de carbendazim e pode ser usado em uma triagem preliminar, reduzindo as análises tradicionais e contribuindo para o controle de qualidade neste setor. Além disso, o modelo pode ser estendido a outros tipos de sucos de frutas.

5. APLICAÇÃO II

Uma proposta ecológica integrando impressão digital cromatográfica e cartas de controle multivariada em uma análise não-alvo para avaliar sucos de uva orgânicos

Os resultados desta aplicação estão publicados no periódico científico, Journal of the Brazilian Chemical Society

<<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210153>>.

5.1 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo a integração da impressão digital cromatográfica, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, com cartas de controle multivariada, em uma análise não-alvo, para diferenciar sucos de uva orgânicos e não-orgânicos.

5.2 AMOSTRAS

Foram analisadas 33 amostras comerciais de suco de uva produzidos no estado do Rio Grande do Sul - Brasil, em um total de 11 marcas diferentes (5 marcas orgânicas e 6 marcas não-orgânicas). Foram adquiridas três garrafas de diferentes lotes para cada marca, totalizando 33 garrafas (15 orgânicas e 18 não-orgânicas).

5.3 PROCEDIMENTOS

O preparo das amostras para aquisição da impressão digital cromatográfica consistiu na diluição de uma alíquota de 500 μ L de suco de uva em 1,0 mL de água ultrapura [116].

Os cromatogramas foram obtidos em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (HPLC-DAD, *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector*) (Dionex Ultimate 3000 HPLC; Thermo Scientific, San Jose, CA).

As condições cromatográficas foram definidas conforme [116] com algumas modificações, principalmente em relação ao mecanismo de separação (ou seja, tipo de coluna) e comprimento de onda de detecção. A partir da amostra previamente diluída, 10 μ L foram injetados no sistema. Não foram utilizadas replicatas.

A coluna utilizada foi uma C18 Hi-Plex H ($300 \times 7,7$ mm) (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) com partículas internas de $8,0 \mu\text{m}$. A temperatura do compartimento da coluna foi mantida a 70°C . O fluxo da fase móvel foi de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ com um tempo de corrida de 17 min (apenas 1 min de corrida após o último pico eluído). A fase móvel foi composta de uma solução $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico (Synth, Diadema, Brasil) em água ultrapura. A detecção foi realizada a 240 nm.

Os cromatogramas foram importados para o Matlab R2007b (The Mathworks Inc., MA, EUA), onde foram alinhados através do algoritmo *icoshift* [117] utilizando quatro intervalos e a média dos cromatogramas como o ‘alvo’ do alinhamento. Este algoritmo é baseado em um modelo de inserção e exclusão de variáveis com o objetivo de alinhar os cromatogramas através de uma transformada de Fourier. Basicamente, um mesmo pico cromatográfico deve estar associado às mesmas variáveis em todas as amostras. Mais informações sobre as etapas matemáticas podem ser encontradas em [118]. Além disso, o código para o algoritmo *icoshift* está disponível para download em <www.models.life.ku.dk/source>.

Os cromatogramas alinhados foram empregados para o desenvolvimento de cartas de controle multivariadas. Um conjunto de dados de validação externa foi usado neste estudo para verificar o desempenho da carta de controle multivariada baseada no *Q Residuals*. Para tanto, as amostras orgânicas foram divididas aleatoriamente e $2/3$ foram usados em um conjunto de treinamento enquanto $1/3$ das amostras foram empregadas em uma etapa de validação externa.

5.4 RESULTADO E DISCUSSÕES

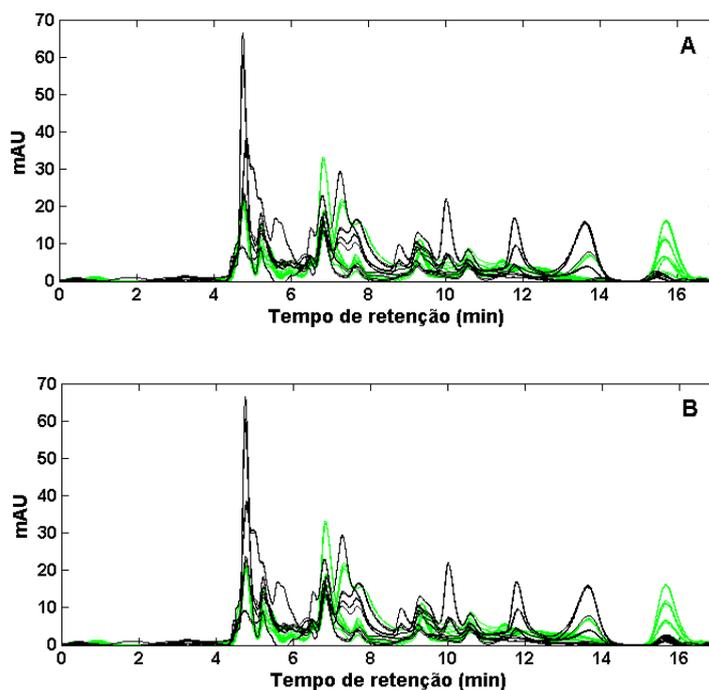
O desenvolvimento de métodos analíticos que estejam de acordo com os princípios da química verde, também nomeado algumas vezes como métodos verdes, vem direcionando a comunidade analítica. Nesse sentido, considera-se a proposição de métodos que não empreguem reagentes ou solventes, ou que o façam em quantidades consideravelmente reduzidas. Neste contexto, a técnica analítica baseada na cromatografia líquida pode apresentar essas características em todas as etapas da análise, desde o preparo da amostra até propriamente a separação [119]. Assim, essa aplicação demonstra essa possibilidade através do acoplamento da impressão digital cromatográfica com a quimiometria, utilizando para tanto, somente a diluição como preparo da amostra

e a água acidificada como fase móvel. Dessa forma, o resíduo gerado pode ser facilmente neutralizado antes do seu descarte.

A inspeção visual dos cromatogramas brutos (Figura 17A) sugere cerca de seis grupos de picos (compostos por um a dois picos) cromatográficos e apresenta variabilidade no tempo de retenção entre as amostras. Esses deslocamentos nos tempos de retenção foram corrigidos através do algoritmo de alinhamento cromatográfico *icoshift* e trata-se de uma etapa crucial como pré-tratamento antes da aplicação de ferramentas quimiométricas. Quando isso não ocorre, mais componentes (fatores) são necessários para explicar a variação adicional e a interpretação química desses componentes e/ou fatores pode ficar comprometida [120].

Os cromatogramas alinhados (Figura 17B) mostram uma correção evidente que pode ser visualmente observada principalmente nos picos em torno de 14 e 16 minutos.

Figura 17. Cromatogramas. (A) cromatogramas brutos; (B) cromatogramas após alinhamento. (—) amostras orgânicas. (—) amostras não-orgânicas.



Fonte: Autoria própria

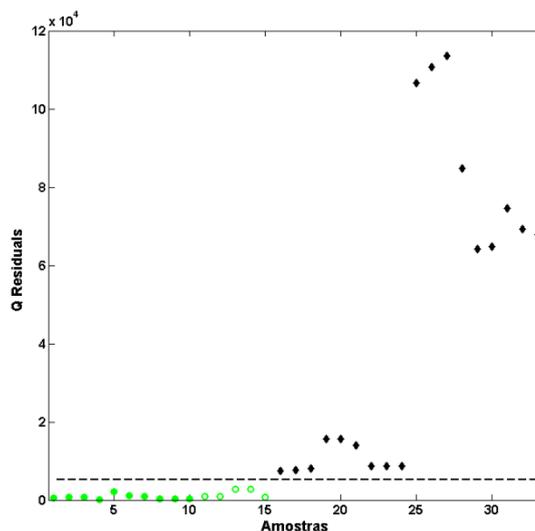
A observação direta dos cromatogramas alinhados, permite concluir sobre as amostras orgânicas e não orgânicas no tempo de retenção de 15,7 min, onde pode ser

observado menor intensidade no pico cromatográfico para as amostras não-orgânicas e um pico mais intenso para as orgânicas. No entanto, considerando o cromatograma até 14 min, torna-se difícil concluir sobre as amostras orgânicas ou não-orgânicas apenas pela inspeção visual. Assim, um método de análise não-alvo foi proposto aqui integrando a impressão digital cromatográfica e as cartas de controle multivariadas baseadas no Q *Residuals*.

Um modelo de PCA (com os dados centrados na média) foi obtido empregando apenas amostras orgânicas no conjunto de treinamento. Um total de 3 componentes principais (PCs) foi utilizado e suficiente para reter 96,61% da variância dos dados. Após, os valores de Q *Residuals* são determinados levando em consideração somente as amostras orgânicas do conjunto de treinamento.

Na sequência, o conjunto de dados de validação externa (com amostras orgânicas e não orgânicas) foram avaliados e seus valores de Q *Residuals* computados. Esses resultados são apresentados na Figura 18, e mostram uma distinção eficiente entre as amostras orgânicas e não-orgânicas com 99% de confiança.

Figura 18. Carta de controle multivarada. (●) amostras orgânicas no conjunto de treinamento, (○) amostras orgânicas no conjunto de validação externa, (◆) amostras não-orgânicas.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 18, uma diferenciação eficaz pode ser observada entre as amostras orgânicas (com resultados de Q *Residuals* abaixo do limite de 99%) e as não-orgânicas

(com resultados de *Q Residuals* acima do limite de 99%). Além disso, é possível, identificar distinção entre as marcas de sucos de uva não-orgânicos.

Embora o objetivo principal fosse conduzir uma análise não-alvo, uma discussão acerca das possibilidades de composição química foi considerada. É sabido que os principais, e mais abundantes, fenólicos em vinhos e sucos de uva pertencem às famílias dos flavonóis e ácidos fenólicos [121-123]. Além disso, estudos mostraram que os sucos de uva orgânicos apresentaram concentrações maiores de polifenóis totais e resveratrol quando comparados aos não-orgânicos [124]. Os polifenóis têm uma estrutura química comum, derivada do benzeno, acoplada a um grupo hidrofílico. Com base no acoplamento deste grupo hidrofílico, os polifenóis são classificados em quatro famílias: flavonóides (flavonas, flavanonas, catequinas e antocianinas), ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (resveratrol). Além disso, nenhuma diferença foi observada para o trans-resveratrol em sucos de uva produzidos no Brasil em diferentes sistemas de cultivo [125]. Então, com base nessas referências, [124,125] pode-se sugerir que os compostos responsáveis pela diferenciação dos sucos de uva orgânicos e não orgânicos não seria o resveratrol.

Outro ponto a ser observado é que o teor total de antocianinas em uvas cultivadas convencionalmente (não-orgânicas) foi significativamente maior em comparação ao encontrado em uvas sob produção orgânica [126]. Os picos cromatográficos iniciais (4-6 minutos) apresentam menor intensidade para os sucos de uva orgânicos quando comparados aos não-orgânicos. Isso pode ser um indicativo de que os compostos, nesses picos cromatográficos, podem ser atribuídos a classe das antocianinas.

As antocianinas mais encontradas em frutas são derivadas principalmente de seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petidina e malvidina. Em sucos de uva produzidos no Brasil, nenhuma diferença foi observada para os conteúdos de malvidina-3-glucosídeo e pelargonidina-3-glucosídeo em sucos de uva orgânicos e não-orgânicos [125]. Além disso, para distinguir entre as classes de antocianidinas em sucos de uva, [127, 128] a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (MS) é utilizada. Então, os resultados alcançados sugerem que um método simples, e menos seletivo, baseado em cromatografia líquida com detecção em apenas um comprimento de onda, quando acoplado à quimiometria, pode fornecer informações valiosas sobre as práticas de cultivo da uva utilizada na produção de sucos, sugerindo que as diferenças ocorram devido ao conteúdo de antocianinas, entretanto, sem a identificação da classe de antocianidinas.

5.5 CONCLUSÃO DA APLICAÇÃO II

Um método cromatográfico ecologicamente correto, em conjunto com a carta de controle multivariada baseada no *Q Residuals*, tornou possível a distinção de sucos de uva orgânicos e não-orgânicos. Este método empregou apenas a diluição na etapa de preparo da amostra e, utilizou água acidificada com ácido sulfúrico como fase móvel. Neste caso, os resíduos gerados são facilmente neutralizados antes do seu descarte.

Embora o método proposto seja uma maneira simples de distinguir, de forma não-alvo, entre sucos de uva orgânicos e não-orgânicos, através do perfil cromatográfico foi possível sugerir que a distinção observada pode ser atribuída a compostos da classe das antocianinas.

6. APLICAÇÃO III

Espectroscopia na região do ultravioleta e calibração pseudo-univariada na determinação de resveratrol em sucos de uva

Os resultados desta aplicação encontram-se em fase de escrita para submissão à publicação em periódico científico.

6.1. OBJETIVOS

Esta aplicação teve por objetivo propor um método alternativo, baseado em espectroscopia ultravioleta (UV) e resolução de curva multivariada com mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS), em um modelo de calibração pseudo-univariado para determinação de resveratrol em sucos de uva.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Amostras padrão de resveratrol

Foram preparadas treze solução padrão de resveratrol em água ultrapura com 0,1% de HCl, em triplicata, cobrindo a faixa de concentração de 0,1 a 1,5 mg L⁻¹. Para essas amostras coletou-se um espectro UV (200 – 400 nm, janela de 1 nm, 32 varreduras) em equipamento portátil (Ocean Optics), e utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm.

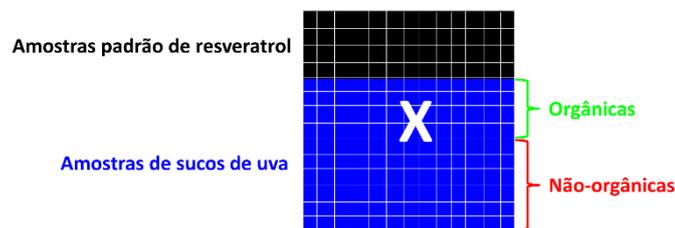
Paralelamente, essas mesmas amostras foram analisadas através de HPLC em equipamento HPLC-DAD (Dionex Ultimate 3000 HPLC; Thermo Scientific, San Jose, CA). As condições operacionais são descritas na referência [2], operou-se em modo isocrático, com injetor automático programado para 10 µL, e detecção em 306 nm. Utilizou-se uma coluna C18 Agilent Hi-Plex H (300 × 7,7 mm) com partículas internas de 8,0 µm. A temperatura do forno da coluna foi mantida a 50°C. A fase móvel foi composta por acetonitrila:água na proporção 25:75 (v/v), em pH 3,0, corrigido com ácido ortofosfórico. A vazão da fase móvel foi de 1,5 mL/min.

Para a análise do suco foram utilizadas 33 amostras, de diferentes marcas comerciais, de suco de uva produzidas no estado do Rio Grande do Sul – Brasil (15 amostras orgânicas e 18 amostras não-orgânicas). Uma alíquota de 10 µL de cada suco foi diluída para 10 mL de

água ultrapura com 0,1% de HCl e o espectro UV foi registrado. Esta etapa foi realizada em triplicata resultando em um total de 45 espectros de sucos de uva orgânicas e 54 espectros de suco de uva não-orgânicas.

Os espectros das amostras padrão de resveratrol, conjuntamente com os espectros UV dos sucos de uva, foram organizados no formato de matriz aumentada pelas colunas, conforme a Figura 19.

Figura 19. Organização dos espectros UV no formato de matriz aumentada pelas colunas.



Fonte: Autoria própria

Os espectros UV na matriz aumentada tiveram a linha de base corrigida através do algoritmo *baseline* (polinômio de primeira ordem). O próximo passo foi a estimativa do *rank* (número de espécies presentes na matriz aumentada) que foi obtido através da PCA com os dados centrados na média.

MCR-ALS, com *rank* definido pela PCA [94], foi aplicado aos dados da matriz aumentada utilizando os espectros das amostras padrão como estimativa inicial e as restrições de não-negatividade para espectros e concentração, resultando em perfis de concentrações relativas e seus espectros puros, respectivamente.

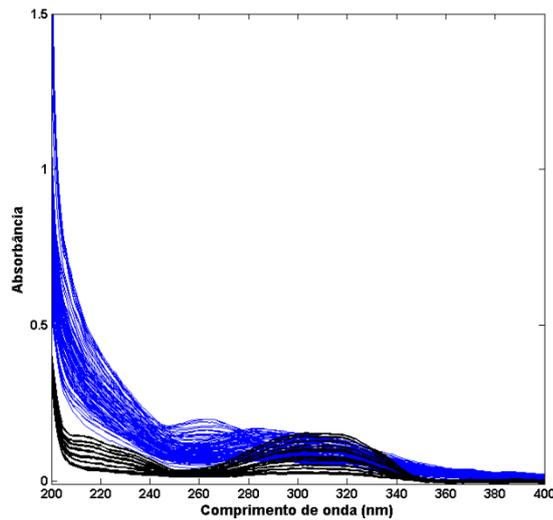
O perfil de concentração relativa, referente às solução padrão de resveratrol, foram empregadas na obtenção de uma curva de calibração pseudo-univariada, em função de suas concentrações teóricas.

Paralelamente, uma curva de calibração univariada convencional foi construída a partir da área do pico cromatográfico em 306 nm, em função da concentração teórica das amostras padrão de resveratrol.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os espectros UV, após correção da linha base, para as amostras padrão de resveratrol e dos sucos de uva são apresentados na Figura 20.

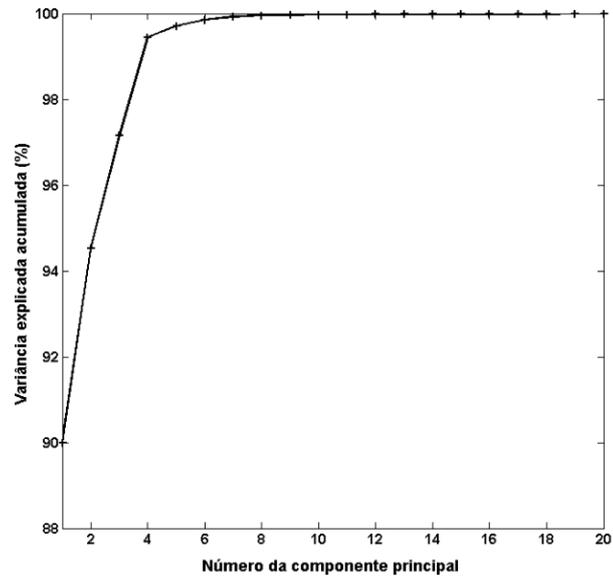
Figura 20. Espectros UV. (—) amostras padrão de resveratrol. (—) amostras de sucos de uva.



Fonte: Autoria própria

Para esses espectros, organizados no formato de matriz aumentada, o rank estabelecido pela PCA foi de 4 com 99,44% da variância explicada, conforme Figura 21. Pode-se observar que a variância explicada é muito baixa nas componentes principais acima de 4. Considerando a seletividade da técnica de espectroscopia na região do ultravioleta, considerou-se que a adição de um rank maior poderia comprometer o resultado esperado.

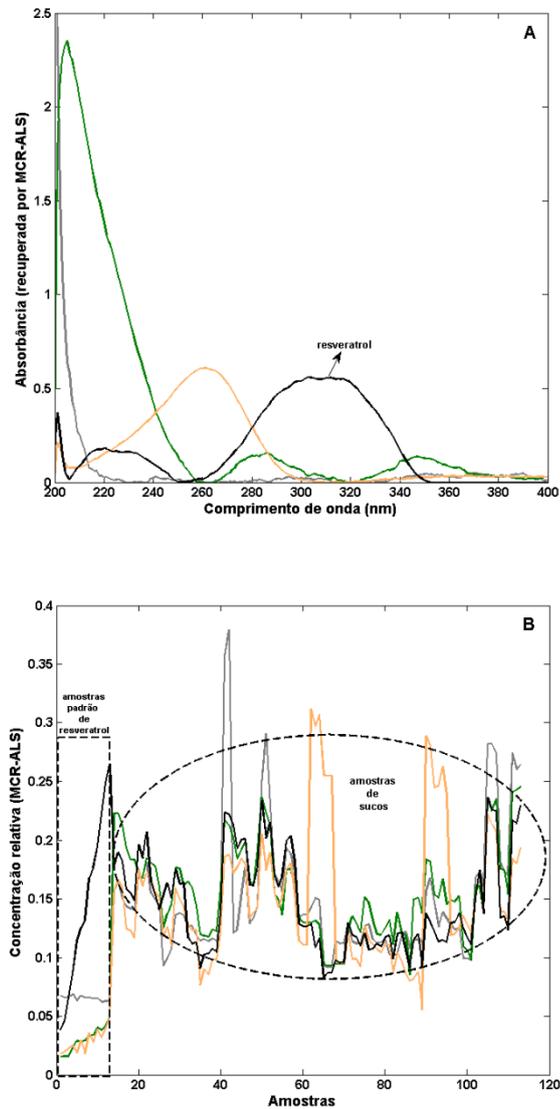
Figura 21. Variância explicada pela PCA.



Fonte: Autoria própria

Na implementação do MCR-ALS para análise da matriz aumentada constituída pelos espectros UV (Figura 21), utilizou-se, portanto, um rank igual a 4 e as restrições de não negatividade para a concentração e os espectros. Além disso, os espectros das soluções padrão de resveratrol foram utilizados como estimativa inicial. Os resultados fornecidos pelo MCR-ALS são apresentados na Figura 22.

Figura 22. Resultados do MCR-ALS. Espectros puros recuperados. (B) Concentrações relativas. (—) Resveratrol. (—) interferente 1. (—) interferente 2. (—) interferente 3.



Fonte: Autoria própria

Os resultados do MCR-ALS revelam que foi possível recuperar o espectro puro do resveratrol a partir da mistura de espectros dos constituintes das amostras na matriz aumentada. Esse resultado pode ser confirmado pois o perfil de concentração relativa das primeiras amostras que são do padrão de resveratrol (Figura 22B), apresentam concentração crescente. Os resultados dos demais constituintes, nomeados como interferentes 1, 2 e 3, não serão discutidos por não fazerem parte do objetivo do trabalho.

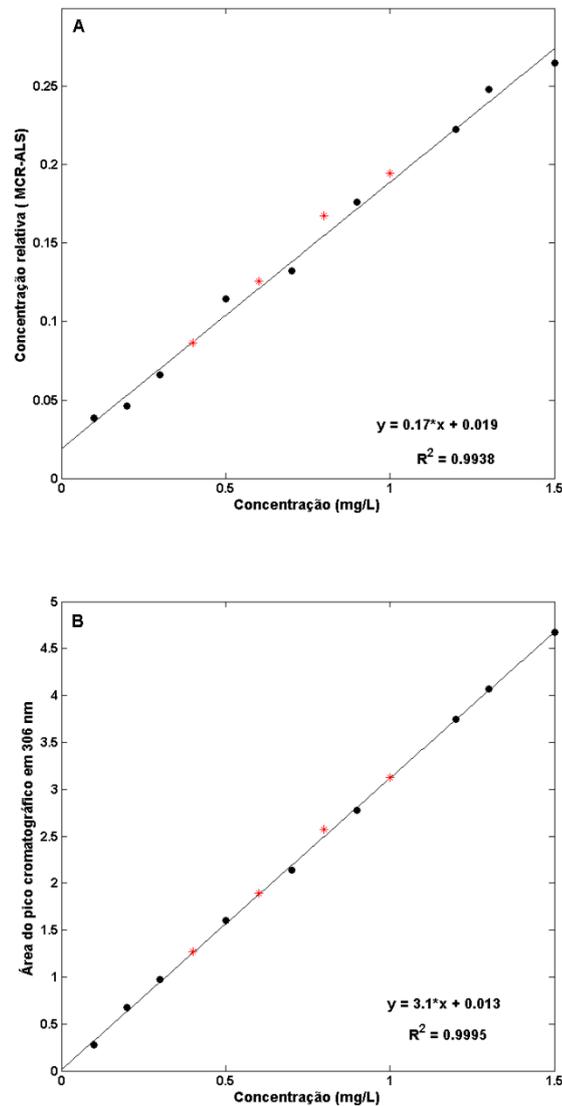
De posse das concentrações relativas obtidas a partir do MCR-ALS, o próximo passo consistiu na obtenção de uma curva de calibração pseudo-univariada. Para tanto, a concentração relativa, para 9 amostras padrão de resveratrol, cobrindo a faixa útil do modelo, foram utilizadas em função da concentração teórica. Um total de 4 amostras padrão de resveratrol foi utilizada em um procedimento de validação.

No mesmo sentido, uma curva de calibração univariada foi empregada com as mesmas 9 amostras padrão de resveratrol, através da área do pico cromatográfico em função da concentração teórica. Da mesma forma, as demais 4 soluções padrão de resveratrol foram utilizadas em uma etapa de validação.

Essas curvas de calibração são apresentadas na Figura 23, de onde se pode observar resultados acima de 0,99 para os coeficientes de correlação em ambos os casos. Além disso, uma correlação de 9,9969 foi alcançada entre os resultados da concentração relativa, obtidas a partir do MCR-ALS, para as amostras padrão de resveratrol na calibração, e as áreas dos picos cromatográficos para as referidas amostras. Ainda, um teste t-pareado mostrou que não existe diferença significativa, no nível de 95% de confiança, para as concentrações das amostras padrão de resveratrol (na etapa de validação), previstas através do método univariado por cromatografia, e pseudo-univariado por UV/MCR-ALS. Dessa forma, os resultados de concentração relativa (obtidos pelo MCR-ALS) para as amostras de suco podem ser utilizados na equação da reta da curva de calibração pseudo-univariada para determinação da concentração de resveratrol nessas amostras.

A partir da calibração pseudo-univariada não é necessário conhecer ou incluir interferências na etapa de desenvolvimento do modelo de calibração, isso permite alcançar vantagem de segunda ordem a partir de dados de primeira ordem [86]. Esta vantagem foi alcançada neste método aqui proposto pois, a etapa de calibração foi desenvolvida apenas com as amostras contendo resveratrol e, posteriormente, a determinação deste analito de interesse foi realizada para as amostras de suco de uva (que contém outros constituintes além do resveratrol). Isto foi possível porque a regressão foi realizada extraíndo-se o perfil de concentração relativa (relacionado ao analito de interesse, nesse caso o resveratrol), recuperado pelo MCR-ALS, contra os valores de concentração conhecidos. Esses modelos são matematicamente mais simples, sendo considerados como modelos de calibração pseudo-univariados devido ao seu uso ser semelhante aos univariados, mas, entretanto, partindo de dados multivariados. Outra vantagem significativa é a utilização de uma quantidade reduzida de amostras na etapa de calibração quando comparadas às metodologias multivariadas baseadas no PLS.

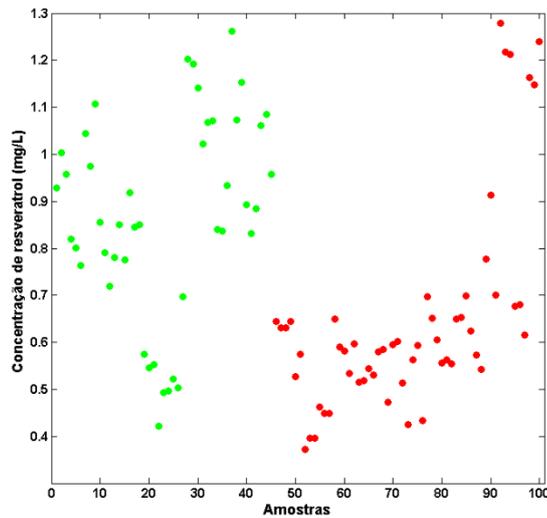
Figura 23. Curvas analíticas. (A) Curva analítica pseudo-univariada. (B) Curva analítica univariada. (●) amostras na calibração. (*) amostras na validação.



Fonte: Autoria própria.

O próximo passo consistiu, portanto, na determinação da concentração de resveratrol nas amostras de suco de uva a partir do método proposto por UV/MCR-ALS. Os resultados alcançados são apresentados na Figura 24 e estão de acordo com resultados obtidos anteriormente para amostras de sucos de uva produzidos no Brasil [129].

Figura 24. Concentração de resveratrol nas amostras de suco de uva. (●) orgânicas. (●) não-orgânicas.



Fonte: Autoria própria

Através da Figura 24 pode-se observar que, na maioria dos casos, os sucos de uva de origem orgânica apresentam concentrações superiores de resveratrol. Os resultados obtidos estão de acordo a literatura [124,125].

6.4 CONCLUSÃO DA APLICAÇÃO III

A espectroscopia ultravioleta (UV) com a calibração pseudo-univariada, a partir da resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS), para a quantificação de resveratrol forneceu resultados estatisticamente equivalentes, no nível de 95% de confiança, entre os métodos de determinação por cromatografia e por UV/MCR-ALS.

O método proposto por UV/MCR-ALS apresenta vantagens em relação às análises cromatográficas convencionais na avaliação do resveratrol em sucos de uva, dentre as quais destaca-se o mínimo preparo de amostras (apenas a diluição), rapidez e ausência de reagentes e solventes. Além disso, a vantagem de segunda ordem foi alcançada a partir de dados de primeira ordem.

7. CONCLUSÕES GERAIS

A integração de ferramentas quimiométrica com as técnicas baseadas em cromatografia líquida de alta eficiência e na espectroscopia na região do UV-Vis possibilitou o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos para avaliação de sucos de uva.

Dessa forma, foi possível identificar o fungicida carbendazim em sucos de uva através da espectroscopia na região do UV-Vis conjuntamente à ferramenta quimiométrica de classificação supervisionada PLS-DA. Por outro lado, a distinção entre amostras de sucos de uva orgânicos e convencionais mostrou-se eficiente a partir da cromatografia líquida de alta eficiência e das cartas de controle multivariadas baseadas no *Q Residuals* da PCA. Ainda, a determinação do bioativo resveratrol foi proposta a partir da espectroscopia na região do UV e calibração pseudo-univariada com MCR-ALS. Os resultados foram validados através de determinações cromatográficas que se mostraram estatisticamente equivalentes no nível de 95% de confiança.

Os métodos propostos apresentam vantagens como por exemplo a demanda por um mínimo preparo de amostra que consiste apenas na diluição do suco de uva. Outras vantagens significativas são a rapidez e ausência de reagentes e solventes.

REFERÊNCIAS

- [1] Ibravin. Pesquisa mapeia hábitos de consumo do suco de uva 100%. Retrieved May 9, 2016, disponível em: <http://www.ibravin.org.br/noticias/245.php>.
- [2] GRANATO, D.; CARRAPEIRO, M. M.; FOGLIANO, V.; VAN RUTH, S. M. Effects of geographical origin, varietal and farming system on the chemical composition and functional properties of purple grape juices: A review, **Trends in Food Science & Technology**. v.52, p.31-48, 2016.
- [3] XUEKE, L.; CHANG, L.; PENG, W.; GUOJUN, Y.; DONGHUI, L.; ZHIQIANG, Z. Effervescence assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on cohesive floating organic drop for the determination of herbicides and fungicides in water and grape juice, **Food Chemistry**. v.17, 653-658, 2017.
- [4] MARINA, N. C. T.; TEIXEIRA, G. H. A.; LIMA, K. M. G.; MORGENSTERN, T. B.; NARDINI, V.; Júnior Cunha, L. C. NIRS and iSPA-PLS for predicting total anthocyanin content in jaboticaba fruit. **Food Chemistry**, v. 174, p. 643-648, 2015.
- [5] CACCIOLA, F.; DUGO, P.; MONTELLO, L. Multidimensional liquid chromatography in food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 96, p. 116-123, 2017.
- [6] OTTO, M. **Chemometrics**. 1. ed. Weinheim: Wiley, 1999.
- [7] ALBERS, A. R.; CARGHESE, S.; VITSEVA, O.; VITA, J. A.; FREEDMAN, J. E. The Antiinflammatory Effects of Purple Grape Juice Consumption in Subjects with Stable Coronary Artery Disease. **Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology**. V. 24, n.11, p.179, 2004.
- [8] FRAGOPOLOU, E.; ANTONOPOULOU, S.; NOMIKOS, T.; DEMOPOULOS, C. A. Structure elucidation of phenolic compounds from red/white wine with antiatherogenic properties. **Biochim Biophys Acta**. v. 1632, p. 90, 2003.
- [9] RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. 1. Ed. Embrapa: Brasília, 2007.

- [10] BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n.1, p.191-203, 2006.
- [11] de la ROSA, L. A.; MORENO-ESCAMILLA, J. O.; RODRIGO-GARCÍA, J.; ALVAREZ-PARRILLA, E. Chapter 12 – Phenolic Compounds. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, p. 253-271, 2019.
- [12] ABDEL-AAL, E. M.; CHOO, T. M.; DHILLON, S.; RABALSKI, I. Free and Bound Phenolic Acids and Total Phenolics in Black, Blue, and Yellow Barley and Their Contribution to Free Radical Scavenging Capacity. **Cereal Chemistry**, v. 89, p. 198-204, 2012.
- [13] COSME, F.; PINTO, T.; VILELA, A. Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: a chemical and sensory view. *Beverages*, v. 4, p. 22, 2018. 55 D'Orazio, G., Fanali, C., Asensio-Ramos, M., Fanali, S. Chiral separations in food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 96, p. 151-171, 2017.
- [14] TAKAOKA, M. Resveratrol a new phenolic compound from *Veratrum grandiflorum*, **J. Chem. Soc. Japan**, v.60, p.1090-1100, 1939.
- [15] RAUF, A.; IMRAN, M.; BUTT, M. S.; NADEEM, M.; PETERS, D. G.; MUBARAK, M. S. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.58, p.1428-1447, 2018
- [16] VESTERGAARD, M.; INGMER, H. Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. **International journal of antimicrobial agents**, v.53, p.716-723, 2019.
- [17] SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, O. A.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.25(3): p.437-442, 2005.

- [18] SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVEZ, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 437-442, 2005
- [19] PACE-ASCIAK, C. R.; ROUNOVA, O.; HAHN, S. E.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subject. *Clinica conspectus Scientificus*. v. 246(1-2) p. 163- 182, 1996.
- [20] RATNA, W. N.; SIMONELLI J. A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. *Life Sciences* . v. 70, p. 1577-1589, 2002.
- [21] ZBIKOWSKA, H. M.; OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; KRAJEWSKI, T. Response of blood platelets to resveratrol. *Platelets (Abingdon)* v. 10, n. 4, p. 247-252, 1999.
- [22] STEWART, J. R.; CHRISTMAN, K. L.; O'BRIAN, C. A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. *Biochemical Pharmacology*, v. 60, n. 9, p. 1355-1359, 2000.
- [23] SCHNEIDER, Y.; VINCENT, F.; DURANTON, B.; BADOLO, L.; GOSSÉ, F.; BERGMANN, C.; SEILER, N.; RAUL, F. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Letters*, v. 158, p.85-91, 2000.
- [24] SUBBARAMAIAH, K.; CHUNG, W. J.; MICHALUART, P.; TELANG, N.; TANABE, T.; INOUE, H.; JANG, M.; PEZZUTO, J. M.; DANNENBERG, A. J. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, n.34, p.21875-21882, 1998.
- [25] FRÉMONT, L. Minireview: Biological effects of resveratrol. *Life Sciences* , v. 66, n. 8, p.663-673, 20

- [26] FABJANOWICZ, M.; PLOTKA-WYSYSLKA, J.; NAMIESNIK, J. Detection, identification and determination of resveratrol in wine. Problems and challenges. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 103, p. 21-33, 2018
- [27] LIA, C.; TANA, S.; TEA, H.; CAO, J.; ZHAO, H. A novel fluorescence assay for resveratrol determination in red wine based on competitive host-guest recognition., **Food Chemistry**. v. 283, p.191-198, 2019.
- [28] ZHOU, H.; CUI, G.H.; WAN, XU, H.; PANG, Y.Q. Direct analysis of trans-resveratrol in red wine by high performance liquid chromatography with chemiluminescent detection **Food Chem**. v.88, p.613, 2004.
- [29] ZHU, Y.X.; HUANG, T.H.; GREGORY, M. LONG, H.; KISSINGER, C. B.; KISSINGER, P. T. Liquid chromatography with multichannel electrochemical detection for the determination of trans-resveratrol in rat blood utilizing an automated blood sampling device. **Journal of chromatography B: Biomedical sciences and applications**. v.740, p. 129, 2000.
- [30] RODRIGUEZ-DELGADO, M.A.; GONZALES, G.; PÉREZ-TRUJILLO, J.P.; MONTELONGO-GARCIA, F. J. *Trans*-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. **Food Chem**. v.76, p. 371, 2002.
- [31] VITRAC, X.; MONTI, J.P.; VERCAUTEREN.; DEFFIEUX, G.; MÉRILLON, J. Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanones in wines with absorbance and fluorescence detection. **Anal. Chim. Acta**. v.458, p.103, 2002.
- [32] SANTANA, M. T. A.; SIQUEIRA, H. H.; REIS, K. C.; LIMA, L. C. O.; SILVA, R. J. L. Characterization of different trading marks of grape juice in two regions of Brazil. **Ciênc. Agrotec**. v. 32, p.882, 2008.
- [33] RIZZON, L. A.; LINK, M.; Composition of homemade grape juice from different varieties. **Ciênc. Rural**, v.36, p.689, 2006.
- [34] MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F.; A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines, **Food Res. Int**. v.38, p.1175, 2005.

- [35] SHOUNDO, L.; ALMEIDA, A. P.; ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; NAVAS, S. A.; LAMARDO, L. C. A.; SABINO, M. Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** V.37, p.533, 2006.
- [36] FERNANDEZ, A. S. T.; BRUNI, A. R. S.; OLIVEIRA, V. M. A. T.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Autenticação de orégano (*Origanum vulgare* L.) Orgânico utilizando espectroscopia NIR e quimiometria. **Quimica Nova.** v.43, p.1500-1504, 2020.
- [37] OLIVEIRA, V. M. A. T.; BAQUETA, M. M.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Authentication of organic sugars by NIR spectroscopy and partial least squares with discriminant analysis. **Analytical Methods.** V.12, p.701, 2020.
- [38] BRUNI, A. R. S.; OLIVEIRA, V. M. A. T.; FERNANDEZ, A. S. T.; SAKAI, O. A.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Attenuated total reflectance Fourier transform (ATR-FTIR) spectroscopy and chemometrics for organic cinnamon evaluation. **Food Chemistry.** v.365, p.130466, 2021.
- [39] SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVE, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determination of resveratrol in grape juice produced in Brazil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.25, p.437, 2005.
- [40] BRASIL. Decreto nº 4.074. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União:** seção 1, Brasília, DF, ano 139, n. 5, p. 1-12, 8 jan. 2002.
- [41] BAKIRCI, G.T.; BAR, Y.; BIL, H. Fast and simple extraction of pesticide residues in selected fruits and vegetables using tetrafluoroethane and toluene followed by ultrahigh-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food Chem.** v.135, p. 1901–1913, 2012.

- [42] GRIMALT, S.; DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, p. 1-23, 2016.
- [43] Commission Regulation (EC) 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin, **J. Eur. Union**. L70/1 2005.
- [44] Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Ministério da saúde, ANVISA, Publicado 21/09/2020. Disponível em : <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos>.
- [45] MEDINA, Á.; MATEO, R.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, E. M.; JIMÉNEZ, M. Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v.119(3), p.230–235. 2007.
- [46] RAMA, E. M.; BORTOLAN, S.; VIEIRA, M. L.; GERARDIN, D. C. C.; MOREIRA, E. G. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.69(3), p.476–486, 2014.
- [47] SILVA, R. C.; BARROS, K. A.; PAVÃO, A. C. Carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. **Química Nova**, v.37(8), p.1329–1334, 2014.
- [48] RIBEIRO, G. M.; MADIVADUA, D. A.; CURTI, S. M. M.; PANTEAN, L. P.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Pseudo-univariate calibration based on independent component analysis for determination of the carbendazim concentration in orange juice. **Microchemical Journal**, v.134, p. 114-118, 2017.
- [49] FENG, S.; LI, Y.; ZHANG, R.; LI, Y. A novel electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer modified hollow N, S-Mo₂C/C spheres for highly sensitive and selective carbendazim determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v.142, 2019.
- [50] MAXIMIANO, E. M.; DE LIMA, F.; CARDOSO, C. A. L.; ARRUDA, G. J. Modification of carbon paste electrodes with recrystallized zeolite for simultaneous quantification of thiram

and carbendazim in food samples and an agricultural formulation. **Electrochimica Acta**, 259, p.66–76. 302. 2018.

[51] LEE, H. S.; RAHMAN, M. M.; CHUNG, H. S.; KABIR, H.; YOON, K.-S.; Cho, S.-K.; EL-ATY, A. M. A.; Shim, J.-H. An effective methodology for simultaneous quantification of thiophanate-methyl, and its metabolite carbendazim in pear, using LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v.B1095, p.1–7, 2018.

[52] VALI, Z. S.; FATEMEH, A.; MORTEZA, A.; MOJTABA, S. Simultaneous determination of chlorpyrifos and carbaryl by spectrophotometry and boosting partial least squares. **Journal of Brazilian Chem Soc.** v.10, p.24, 2013.

[53] HEGAZYA, A. M.; ABDELATAHA, R. M.; MAHMOUD, H. M.; ELSAYEDD, M. A. Development and validation of two robust simple chromatographic methods for estimation of tomatoes specific pesticides' residues for safety monitoring prior to food processing line and evaluation of local samples. **Food Chemistry.** v.306. p.125640, 2020.

[54] KUMAR, V.; UPADHAY, N.; WASIT, A. B.; SINGH, S.; KAUR, P. Spectroscopic Methods for the Detection of Organophosphate Pesticides – A Preview. **International Research Journal of Environmental Science.** v.8, p.313-318, 2013.

[55] PADILHA, C. V. S.; MISKINIS, G. A.; de SOUZA, M. E. A. O.; PEREIRA, G. E.; de OLIVEIRA, D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; LIMA, M. S. **Food Chem.** Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. v.228, p.106-115, 2017.

[56] CALLAO, M. P.; RUISÁNCHEZ, I. Na overview of multivariate qualitative methods for food fraud detection, **Food Control**, v.86, p.283-293, 2018.

[57] MOREIRA, I.; SCARMINIO, I. S. Chemometric discrimination of genetically modified Coffea arabica cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. **Talanta**, v.107, p. 416-422, 2013.

- [58] RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. **Rev. Food Sci. Technol.** v.83, p. 467-483, 2011.
- [59] MARCHEAFAVE, G. G.; PAULI, E. D.; TORMENA, C. D.; OORTIZ, M. C. V.; ALMEIDA, A. G.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Factorial design fingerprint discrimination of Coffea arabica beans under elevated carbon dioxide and limited water conditions. **Talanta**, v.209, p.120591, 2020.
- [60] ESTEKI, M.; SHAHSAVARI, Z.; SIMAL-GANDARA, J. Food identification by high performance liquid chromatography fingerprinting and mathematical processing. **Food Research international.** v.122, p.303, 2019.
- [61] SCARMINIO, I. S.; ISHIKAWA, D. N.; BARRETO, W. J.; PACZKOWSKI, E. L.; ARRUDA, I. C. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA SISTEMAS COM BANDAS SOBREPONIDAS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE FATORES DO TIPO Q. **Quim. Nova.** v.21, 590, 1998.
- [62] BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química nova.** Campinas, v.8, n.2, p.13, 1985.
- [63] CAMARÊS, E. T. S.; ALAMAR, P. D.; PALLONE, J. A. L. Detection and identification of açai pulp adulteration by NIR and MIR as an alternative technique: Control charts and classification models. **Food Research International.** v.123, p.704, 2019.
- [64] HEYDER, M.; THEUVSEN, L.; HESPOS-HOLLMANN, T. Investments in tracking and tracing systems in the food industry: A PLS analysis. **Food Policy.** v. 37, p. 102-113, 2012.
- [65] CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. V. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova.** v. 30, p.481-487, 2007.
- [66] WOLD, S; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.** v. 2, n. 1-3, p. 37-52, 1987.

- [67] VALDERRAMA, L.; PAIVA, V. B.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Proposta experimental didática para o Ensino de análise de componentes principais. **Química Nova**, v.39, p.245-249, p.2016
- [68] PHALADIGANON, P.; KIM, S. B.; CHEN, V. C. P, V, JIANG, W. Principal component analysis-based control charts for multivariate nonnormal distributions. **Expert Systems with Applications**. v.40, p.3044-3054, 2013
- [69] ÁVILA, T. C.; POPPI, R. J.; LUNARDI, I.; TIZEI, P. A. G.; PEREIRA, G. A. G. Raman spectroscopy and chemometrics for *on-line* control of glucose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Progress**. v.28, p.1598-1604, 2012.
- [70] LOBATO, K. B. S.; ALAMAR, P. D.; CARAMÊS, E. T. S.; PALLONE, J. A. L. Authenticity of freeze-dried açai pulp by near-infrared spectroscopy. **Journal of Food Engineering**. V.224, p.105-111, 2018.
- [71] BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics, Hoboken**, v. 17, n. 3, p. 166-173, 2003.
- [72] GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.
- [73] VALDERRAMA, L.; GONÇALVES, R. P.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Espectroscopia Uv-Vis e métodos quimiométrico na avaliação de adulterações e frauds em azeite de oliva extra virgem. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**. V.5, p.32-40, 2014.
- [74] KJELDAHL, K.; BRO, R. Some common misunderstandings in chemometrics. **J Chemometr**. v.24, p.558-564, 2010.
- [75] FERREIRA, M. M. C. Quimiometria—Conceitos, métodos e aplicações. Editora Unicamp: Campinas, SP; 2015.

- [76] VALDERRAMA, L.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Model precision in partial least squares with discriminant analysis: A case study in document forgery through crossing lines. **Journal of Chemometrics**, v. 34, p. 1-8, 2020.
- [77] LOPEZ, M.I.; CALLAO, M. P.; ANCHEZ, R. I. A tutorial on the validation of qualitative methods: from the univariate to the multivariate approach, **Anal. Chim. Acta.** v.891, p.62-72, 2015.
- [78] DE SANTANA, F.B.; GONTIJO, L.C.; MITSUTAKE, H.; MAZIVILA, S.J. DE SOUZA, L.M.; NETO, W. B. Non-destructive fraud detection in rosehip oil by MIR spectroscopy and chemometrics, **Food Chem.** v.209, p.228-233, 2016.
- [79] ALMEIDA, M. R.; FIDELIS, C.H.V.; BARATA, L.E.S.; POPPI, R. J. Classification of Amazonian rose wood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. **Talanta**, v. 117, p. 305-311, 2013.
- [80] POMERANTSEV, A. L.; RODIONOVA, O.Y. New trends in qualitative analysis: Performance, optimization, and validation of multi-class and soft models. **Trends in Analytical Chemistry**, v.143, p. 116372, 2021.
- [81] XU, L.; XU, Z.; KELLY, S.; LIAO, X. Integrating untargeted metabolomics and targeted analysis for not from concentrate and from concentrate orange juices discrimination and authentication. **Food Chemistry**, v.329, p.127130, 2020.
- [82] WLODARSKA, K.; KHMELINSKII, I.; SIKORSKA, E. Authentication of apple juice categories based on multivariate analysis of the synchronous fluorescence spectra. **Food Control**, v.86, p.42–49, 2018.
- [83] DIFONZO, G.; VOLLMER, K.; CAPONIO, F.; PASQUALONE, A.; CARLE, R.; STEINGASS, C. B. Characterisation and classification of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) juice from pulp and peel. **Food Control**, v.96, p.260–270, 2019.
- [84] FIDELIS, M.; SANTOS, J. S.; COELHO, A. L. K.; RODIONOVA, O. Y.; POMERANTSEV, A.; GRANATO, D. (2017). Authentication of juices from antioxidant and

chemical perspectives: A feasibility quality control study using chemometrics. **Food Control**, v.73, p.796–805. 2017.

[85] GAIAD, J. E.; HIDALGO, M. J.; VILLAFANE, R. N., MARCHEVSKY, E. J.; PELLERANO, R. G. Tracing the geographical origin of Argentinean lemon juices based on trace element profiles using advanced chemometric techniques. **Microchemical Journal**, v.129, p.243–248, 2016.

[86] MARÇO, P.H.; VALDERRAMA, P.; ALEXANDRINO, G.L.; POPPI, R.J.; TAULER, R. Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: descrição, funcionamento e aplicações. **Quimica Nova**, v. 37, n. 9, p. 1525-1532, 2004

[87] PIQUERAS, S. ; DUPONCHEL, L. ; TAULER, R. ; JUAN, A. Resolution and segmentation of hyperspectral biomedical images by multivariate curve resolution-alternating least squares. **Analytica Chimica Acta**, v.705, p.182–192, 2011.

[88] JUAN, A.; TAULER, R. Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures: Revisiting latest trends in multivariate resolution. **Analytica Chimica Acta**, v.500, p.195–210, 2003.

[89] BRAGA, J. W.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I, C, S, F.; GOICOECHEA, H. C.; OLIVIERI, A, C.; POPPI, R, J. Determination of pesticides and metabolites in wine by high performance liquid chromatography and second-order calibration methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, 2007, p. 200-2010.

[90] GAMPP, H.; MAEDER, M.; MEYER, C. J.; ZUBERBUHLER, A. D. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—IV: Model-free least-squares refinement by use of evolving factor analysis. **Talanta**, v.33, p.943, 1986.

[91] WINDING, W.; GALLAGHER, N. B.; SHAVER, J. M.; WISE, B. M. A new approach for interactive self-modeling mixture analysis. **Chemom. Intell. Lab. Syst.** v.77, p.85-96, 2005.

- [92] CAO, L.; HARRINGTON, P. B.; LIU, J. SIMPLISMA and ALS applied to two-way nonlinear wavelet compressed ion mobility spectra of chemical warfare agent simulants **Anal. Chem.** v.77, p.2575-2586, 2005.
- [93] de JUAN, A.; TAULER, R. Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in Concepts and Applications. **Crit. Rev. Anal. Chem.** v.36, p.163-176, 2006.
- [94] MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S.; TAULER, R. Investigation of the pH effect and UV radiation on kinetic degradation of anthocyanin mixtures extracted from Hibiscus acetosella. **Food Chem.** v.125, p.1020-1027, 2010.
- [95] RUCKEBUSCH, C.; de JUAN, A.; DUPONCHEL, L.; HUVENNE, J. P. Matrix augmentation for breaking rank-deficiency: A case study. **Chemom. Intell. Lab. Syst.** v.80, p.209-214, 2006.
- [96] BOOKSH, K. S.; KOWALSKI, B. R. Theory of analytical chemistry. **Anal. Chem.** v.66, p.782^a-791^a, 1994.
- [97] LÓPEZ, M. B. M.; Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2013.
- [98] MOHSENI, N.; BAHRAM, M.; OLIVIERI, A. C. Second-order advantage obtained from standard addition first-order instrumental data and multivariate curve resolution-alternating least squares. Calculation of the feasible bands of results. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** v.122, p.721-730, 2014.
- [99] LACZKOWSKI, M. S.; GOLÇALVES, T. R.; GOMES, S. T. M.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P.; MATSUSHITA, M. Application of chemometric methods in the evaluation of antioxidants activity from degreased chia seeds extracts. **LWT - Food Science and Technology.** v.95, p.303-307, 2018.
- [100] LACZKOWSKI, M. S.; GOLÇALVES, T. R.; GOMES, S. T. M.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P.; MATSUSHITA, M. Pseudo-Univariate Calibration as an Analytical Tool to Determine Antioxidant Activity: An Alternative to DPPH Method Applied to the Evaluation from Extracts of Turmeric Powder. **Br. J. Anal. Chem.** v. 23, p.45-50, 2019.

- [101] Brazil. (2003). Lei No 464 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/110.831.htm#:~:text=LEI%20No%2010.
- [102] SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least-Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v.36, p. 1627-1639, 1964.
- [103] KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v.11(1), p.137–148, 1969.
- [104] BAQUETA, M. R.; COQUEIRO, A.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Multivariate classification for the direct determination of cup profile in coffee blends via handheld near-infrared spectroscopy. **Talanta**, v.222, p.121526, 2021.
- [105] da SILVA, V. A. G.; TALHAVINI, M.; PEIXOTO, I. C. F., ZACCA, J. J., MALDANER, A. O.; BRAGA, J. W. B. Non-destructive identification of different types and brands of blue pen inks in cursive handwriting by visible spectroscopy and PLS-DA for forensic analysis. **Microchemical Journal**, v.116, p.235–243, 2014.
- [106] XU, S.; LU, B.; BELL, N.; NIXON, M. Outlier Detection in Dynamic Systems with Multiple Operating Points and Application to Improve Industrial Flare Monitoring. **Processes**, v.5, p.28-55, 2017.
- [107] ARMSTRONG, N.; HIBBERT, D. B. (2009). An introduction to Bayesian methods for analyzing chemistry data: Part 1: An introduction to Bayesian theory and methods. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.97(2), p.194–210, 2009.
- [108] FAWCETT, T. (2006). An introduction to ROC analysis. **Pattern Recognition Letters**, v.27(8), p.861–874, 2006.
- [109] MANSOURI, K.; RINGSTED, T.; BALLABIO, D.; TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. Quantitative structure-activity relationship models for ready biodegradability of chemicals. **J Chem Inf Model**, v.53(4), p.867-878, 2013.

- [110] VITALE, R.; BEVILACQUA, M.; BUCCI, R.; MAGRÌ, A. D.; MAGRÌ, A. L.; MARINI, F. A rapid and non-invasive method for authenticating the origin of pistachio samples by NIR spectroscopy and chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.121, p.90–99, 2013.
- [111] ARMSTRONG, N.; HIBBERT, D. B. (2009). An introduction to Bayesian methods for analyzing chemistry data: Part 1: An introduction to Bayesian theory and methods. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.97(2), p.194–210, 2009.
- [112] CHONG, I. G.; JUN, C. H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.78(1), p.103–112. 2005
- [113] DOS SANTOS, V. J.; BAQUETA, M. R.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P.; VISENTAINER, J. V. Human Milk Lactation Phases Evaluation Through Handheld Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Classification. **Food Analytical Methods**. v.14, p.873-882.
- [114] BORIN, A.; FERRAO, M. F.; MELLO, C.; MARETTO, D. A POPPI, R. J. Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk. **Anal Chim Acta**. v. 579, p.25-32, 2006.
- [115] FERRÃO, MARCO. F.; MELLO, C.; BORIN, A; MARETTO, D. A.; POPPI, Ronei. J. LS-SVM: a new chemometric tool for multivariate regression. Comparison of LS-SVM and pls regression for determination of common adulterants in powdered milk by nir spectroscopy. **Quím. Nova**, v.30(4), p.852-859, 2007.
- [116] COELHO, E. M.; PADILHA, C. V. S.; MISKINIS, G. A.; SÁ, A. G. B.; PEREIRA, G. E.; AZEVÊDO, L. C.; LIMA, M. S. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **J. Food Compos. Anal.** v.66, p.160-167, 2018.
- [117] MATLAB, version R2007b; The MathWorks, Inc.: Natick, MA, USA, 2007.

[118] TOMASI, G.; SAVORANI, F.; ENGELSEN, S. B. ;J. icoshift: An effective tool for the alignment of chromatographic data. **Journal Chromatogr. A**, v.1218, p.7832-7840, 2011.

[119] SHAABAN, H. New insights into liquid chromatography for more eco-friendly analysis of pharmaceuticals. **Anal. Bioanal. Chem.** v.408, p.6929-6944, 2016.

[120] TOMASI, G.; SAVORANI, F.; EENGELSEN, S. B. icoshift: An effective tool for the alignment of chromatographic data. **J. Chromatogr A**. v.1218, p.7832-7840, 2011.

[121] LIMA, M. S.; SILANI, I. S. V.; TOALDO, I. M.; CORRÊA, L. C.; BIASOTO, A. C. T.; PEREIRA, G. E.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; NINOW, J. L. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. **Food Chem.** v.161, p.94-103, 2014.

[122] PADILHA, C. V. da S.; MISKINIS, G. A.; DE SOUZA, M. E. A. O.; PEREIRA, G. E.; DE OLIVEIRA, D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; LIMA, M. dos S. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chem**, v.228, p.106-115, 2017.

[123] LEEUW, V. R.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. **J. Food Compos. Anal.** v,36, p.40-50, 2014.

[124] DANI, C.; OLIBONI, L. S.; VANDERLINDE, R.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. **Food Chem. Toxicol**, v.45, p.2574-2580, 2007.

[125] GRANATO, D.; KOOT, A.; SCHNITZLER, E.; VAN RUTH, S. M. Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. **J. Food Sci.** v. 80, p. c584, 2015.

[126] VIAN, M. A.; TOMAO, V.; COULOMB, P. O.; LACOMBE, J. M.; DANGLES, O. Comparison of the Anthocyanin Composition during Ripening of Syrah Grapes Grown Using Organic or Conventional Agricultural Practices. **J. Agric. Food Chem.** v.54, p.5230, 2006.

[128] LI, Y.; MA, R.; XU, Z.; WANG, J.; CHEN, T.; CHEN, F.; WANG, Z.; J. Identification and quantification of anthocyanins in Kyoho grape juice-making pomace, Cabernet Sauvignon grape winemaking pomace and their fresh skin. **Sci. Food Agric.** v.93, p. 1404-1411, 2013.

[129] FABJANOWICZ, M.; PLOTKA-WASYLKA, J.; NAMIESNIK, J. Detection, identification and determination of resveratrol in wine. Problems and challenges. **Trends in Analytical Chemistry.** v.103, p.21-33, 2018.