



**UnB**

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**IDENTIFICAÇÃO DA AUTENTICIDADE DE  
EDULCORANTES NATURAIS COMERCIAIS ATRAVÉS DA  
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E  
MÉDIO E MODELAGEM DD-SIMCA**

**Juliana Fernandes de Sousa**

**Orientadora**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristi Basile Dias

**Co-orientador**

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Brasília, DF

2023



**UnB**

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**IDENTIFICAÇÃO DA AUTENTICIDADE DE  
EDULCORANTES NATURAIS COMERCIAIS ATRAVÉS DA  
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E  
MÉDIO E MODELAGEM DD-SIMCA**

**Juliana Fernandes de Sousa**

*Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Química da Universidade de Brasília  
como parte dos requisitos exigidos para a  
obtenção do Título de Mestre em  
Química.*

**Orientadora:** Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristi Basile Dias

**Co-orientador:** Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Brasília, DF

2023



## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Davi e Francisca e à minha irmã Amanda, minha melhor amiga, obrigada pelo cuidado, pelo carinho e amor. Sou grata por ter vocês como família.

Às amigas que construí no laboratório, Izabella, Maria Vitória e Natália, nossa novata: aprendo muito com vocês e agradeço por todas as horas de risadas, cafés e pelo companheirismo que fazem da nossa bancada um ambiente tão nosso.

Ao meu namorado Igor, obrigada pela escuta, pela ajuda e acolhimento depois de dias ruins.

A minha orientadora, professora Ana Cristi, acima de tudo pela paciência e confiança. Foram muitos ensinamentos ao longo desses cinco anos que formaram a pesquisadora que sou hoje. Ao professor Jez, meu co-orientador, agradeço pelas orientações, dúvidas solucionadas e pelo auxílio, parte significativa do peso desse trabalho se deve à sua expertise.

Agradeço à Fabiana Casarin, pelos direcionamentos nesses anos de pesquisa acadêmica, me inspiro na profissional que você é.

Agradeço ao Instituto de Química - IQ e a Universidade de Brasília – UnB pela oportunidade de pesquisar. Agradeço as agências de fomento (CAPES, CNPQ e FAP-DF) pelos incentivos financeiros e principalmente a CNPQ pela bolsa de pós-graduação.

## RESUMO

A preocupação com a saúde leva muitos consumidores, especialmente diabéticos e portadores de outras comorbidades, a substituir o açúcar por edulcorantes naturais. Entre estes destacam-se stévia e os polióis xilitol e eritritol pelos seus benefícios tais como, propriedades cariostáticas, prolongamento de saciedade e ação antioxidante. Diante da alta demanda e alto valor agregado, esses produtos podem ser alvo de adulteração, com adição indevida de substâncias de baixo custo como os edulcorantes sintéticos. Nesse sentido, esse trabalho tem como objetivo a identificação de autenticidade dos edulcorantes naturais comerciais utilizando espectroscopia de infravermelho médio e próximo combinada a um modelo de classificação *one class* DD-SIMCA. O modelo DD-SIMCA foi construído com amostras comerciais das principais marcas encontradas no mercado da região de Brasília e Goiás e amostras virtuais/simuladas, empregadas a fim de aumentar a representatividade do conjunto de treinamento. O uso de amostras virtuais e a seleção espectral adequada contribuíram para um modelo capaz de classificar corretamente grande parte das amostras de validação (edulcorantes naturais), contendo entre outras, misturas adulteradas com sacarose, acessulfame-K, sacarina e dióxido de silício. Para o xilitol o modelo alcançou taxas de eficiência (TEF) de 97,5% no NIR e 94,5% no MIR, com o eritritol obteve-se TEFs de 95,9% no NIR e 98,0% no MIR. As taxas de eficiência para o edulcorante stévia foram de 76,8% no NIR e 90,3% no MIR, resultado muito positivo dada a composição variável dos glicosídeos de esteviol desse edulcorante que dificultam a construção de um modelo de classificação *one class*. O uso da espectroscopia no infravermelho aliada ao algoritmo DD-SIMCA forneceu uma aplicação promissora para verificar a autenticidade de eritritol, stévia e xilitol.

**Palavras-chave:** Xilitol. Eritritol. Stévia. Adulteração. Espectroscopia no Infravermelho. Amostras virtuais. DD-SIMCA.

## ABSTRACT

Concerns regarding personal health have been taking consumers (especially those with diabetes and other disease comorbidities that depend of dietary) to replace sugar with natural sweeteners. Among this group, stevia along with the polyols xylitol and erythritol stands on for its benefits such as cariostatic properties, satiety prolongation and antioxidant properties. With the increased demand and high market prices, these products are easy targets for adulteration, by illicit addition of low-cost artificial sweeteners in the product. Thus, the aim of this work is to identify the authenticity of the commercial natural sweeteners by near and mid infrared spectroscopy combined with a DD-SIMCA classification model. The *one class* model was built with commercial samples found in Brasília and Goiás and virtual samples employed to increase the representativeness of the training set. The use of virtual samples and proper spectral selection contribute to a model capable of classify correctly most of the validation samples (natural sweeteners), among these were samples adulterated with saccharin, sucrose, acesulfame and silicon dioxide. For xylitol the model reached efficiency rates (EFR) of 97,5% for NIR and 94,5% for MIR, with erythritol were accomplished EFR of 95,9% for NIR and 98,0% for MIR. EFRs for stevia were 76,8% for NIR and 90,3% for MIR, a great result given the variability in the steviol glycosides composition of this sweetener, which is a factor that difficults the construction of a *one class* classification model. The use of infrared spectroscopy combined with the DD-SIMCA algorithm provides a promising alternative to verification of authenticity of erythritol, stevia and xylitol.

**Key-words:** Xylitol. Erythritol. Stevia. Adulteration. Infrared Spectroscopy. Virtual Samples. DD-SIMCA.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O CONSUMO DE EDULCORANTES.....	15
2.2 CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DOS EDULCORANTES DE INTERESSE ....	16
2.2.1 EDULCORANTES NATURAIS .....	16
2.2.2 EDULCORANTES ARTIFICIAIS .....	19
2.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS .....	20
2.3.1 PCA E DD-SIMCA .....	22
2.3.2 AMOSTRAS VIRTUAIS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS .....	26
3.2 REAGENTES E AMOSTRAS .....	26
3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	29
3.3.1. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	29
3.3.2. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO MÉDIO.....	30
3.3.3 PREPARO DAS MISTURAS NÃO AUTÊNTICAS DE VALIDAÇÃO .....	30
3.3.4. PRÉ-PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS IV.....	31
3.3.5 ANÁLISE EXPLORATÓRIA COM PCA.....	31

3.3.6. CONSTRUÇÃO DO MODELO DD-SIMCA E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	32
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA COM PCA.....	33
4.2 VARIABILIDADE DOS EDULCORANTES COMERCIAIS .....	42
4.3 USO DOS PADRÕES VIRTUAIS E CONSTRUÇÃO DO MODELO DD-SIMCA .....	46
4.4 RESULTADOS DA CLASSIFICAÇÃO DE EDULCORANTES POR NIR .....	49
4.5 RESULTADOS DA CLASSIFICAÇÃO DE EDULCORANTES POR MIR.....	59
5.CONCLUSÕES .....	71
6. BIBLIOGRAFIA .....	72



## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ACS	Acessulfame de potássio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
DD-SIMCA	<i>Data Driven Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IV	Infravermelho
MIR	<i>Mid-infrared Spectroscopy</i>
NIR	<i>Near-infrared Spectroscopy</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A	Para Análise
PC	<i>Principal component</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
SAC	Sacarina
SNV	<i>Standard Normal Variate</i>
SVD	<i>Singular Value Decomposition</i>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conjunto de amostras utilizadas para a construção e validação do modelo DD-SIMCA.....	27
Tabela 2: Relação das misturas autênticas utilizadas no treinamento e validação.....	28
Tabela 3. Percentagem de variância capturada pelo modelo PCA com espectros NIR. ....	34
Tabela 4. Percentagem de variância capturada pelo modelo PCA com espectros MIR.....	37
Tabela 5. Taxas de eficiência dos modelos com e sem a utilização de amostras virtuais.....	47
Tabela 6. Figuras de mérito do modelo no NIR e MIR.....	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos polióis eritritol, xilitol, sorbitol e maltitol. <sup>21</sup> .....	17
Figura 2. Glicosídeos esteviosídeo e rebaudiosídeo A e o precursor esteviol <sup>30</sup> .....	19
Figura 3. Edulcorantes sintéticos acessulfame de potássio e sacarina. ....	20
Figura 4. Esquema de uma medida espectroscópica com ATR <sup>43</sup> .....	22
Figura 5. Porta amostra em detalhe utilizado para as medidas no MicroNIR à esquerda, à direita, porta-amostra contendo edulcorante xilitol.....	29
Figura 6: Parte frontal do espectrômetro à esquerda, à direita, o MicroNIR durante uma medida. ....	29
Figura 7. Conjunto de espectros NIR: a) após execução de SNV; b) após execução de SNV e mean center.....	33
Figura 8. Scores em PC 1 e PC 2 obtidos com espectros NIR.....	35
Figura 9. Gráfico de loadings da PC 1 no NIR. ....	36
Figura 10. Gráfico de loadings da PC 2 no NIR. ....	36
Figura 11. Scores em PC 1 e PC 2 obtidos com espectros MIR. ....	38
Figura 12. Gráfico de loadings da PC 1 no MIR.....	38
Figura 13.Região fingerprint ampliada.....	39
Figura 14.Gráfico de loadings da PC 2 no MIR.....	40
Figura 15. Região fingerprint ampliada.....	40
Figura 16. Scores nas três primeiras PCs obtidos com espectros no MIR. ....	41
Figura 17. À esquerda os espectros MIR pré-processados das marcas 14 (rosa), 15 e 16 (azul) de stévia; à direita o gráfico de loadings da PC 3 no MIR. ....	41
Figura 18. Espectros médios no NIR das marcas de treinamento juntamente com espectro do reagente padrão em azul. a) Eritritol, b) Xilitol, c) Stévia.....	43
Figura 19. Espectros médios no MIR das marcas de treinamento juntamente com espectro do reagente padrão em azul. a) Eritritol, b) Xilitol, c) Stévia.....	44
Figura 20. Amostras de treinamento de xilitol, marca 5 do tipo cristal (superior) e marca 8 do tipo refinada (inferior).....	45
Figura 21. Amostras de treinamento de stévia, marca 14 (superior) e marca 15 (inferior).....	46
Figura 22. Conjuntos de treinamento e validação de eritritol no NIR: a) Espectros reais de treinamento em azul e espectros autênticos de validação em vermelho. b) Inclusão dos espectros virtuais de treinamento em ciano. Gráficos de aceitação de treinamento de eritritol: c) Amostras reais d) Amostras reais e virtuais.....	48
Figura 23. Espectros de treinamento médios no NIR.....	50
Figura 24. Gráficos de aceitação dos conjuntos de treinamento no NIR. Em azul escuro amostras de treinamento reais, em ciano amostras de treinamento virtuais.....	51
Figura 25. Gráficos de aceitação da matriz de validação 1 no NIR. ....	52
Figura 26. Gráfico de aceitação da matriz de adulteração no NIR. Amostras adulteradas com acessulfame-K (★), sacarina (×) e sacarose(✱).....	53

Figura 27. Espectros no NIR do edulcorante de stévia puro (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS e b) SAC. ....	54
Figura 28. Espectros no NIR do padrão de eritritol (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS, b) SAC e c) Sacarose. ....	56
Figura 29. Espectros no NIR do padrão de xilitol (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS, b) SAC e c) Sacarose. ....	57
Figura 30. Espectros de xilitol e seus adulterantes no NIR. ....	58
Figura 31. Gráfico de aceitação da matriz de validação 3 no NIR: as amostras da classe-alvo em azul e as amostras de outras classes em vermelho. ....	59
Figura 32. Espectros dos adoçantes no MIR, em destaque, região fingerprint. ....	60
Figura 33. Espectros médios do conjunto de treinamento no MIR de eritritol, stévia e xilitol na região de fingerprint. ....	61
Figura 34. Gráficos de aceitação dos conjuntos de treinamento no MIR. Em azul escuro amostras de treinamento reais, em ciano amostras de treinamento virtuais. ....	62
Figura 35. Gráfico de aceitação da matriz de validação 1 no MIR. ....	63
Figura 36. Gráfico de aceitação da matriz de adulteração no MIR. Amostras adulteradas com acessulfame-K (★), sacarina (×) e sacarose (✱). ....	64
Figura 37. Espectros no MIR do padrão de stévia (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS e b) SAC. ....	65
Figura 38. Espectros no MIR do padrão de eritritol (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS, b) SAC e c) Sacarose. ....	67
Figura 39. Espectros no MIR do padrão de xilitol (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS, b) SAC e c) Sacarose. ....	68
Figura 40. Gráfico de aceitação da matriz de validação 3 no MIR: amostras da classe-alvo em azul e amostras de outras classes em vermelho. ....	69

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A demanda por um estilo de vida mais saudável impulsiona o consumo de produtos que auxiliam no convívio e na prevenção de condições de saúde como hipertensão, colesterol alto e diabetes, as quais são altamente influenciadas pela alimentação. Nessas condições, geralmente há a preferência por alimentos denominados *diet*.

Os alimentos *diet* são formulados para pessoas com restrições alimentares a algum componente<sup>1</sup> que é removido do produto e geralmente substituído por outro com propriedades organolépticas similares. Dentre estes destacam-se os edulcorantes *diet*, aditivos alimentares que substituem a sacarose, devido ao seu dulçor semelhante ou superior à esta, além de serem altamente benéficos para consumidores diabéticos visto que não causam picos glicêmicos e possuem valor calórico baixo ou inexistente.

Pode-se classificar os edulcorantes em naturais ou artificiais, sendo os naturais obtidos por extração de plantas ou produzidos por métodos biotecnológicos e, os artificiais, sintetizados por rotas industriais específicas. Dos edulcorantes naturais destacam-se stévia, xilitol e eritritol, visto que, além dos benefícios já citados, há indícios de que estes edulcorantes são não-cariogênicos e cariostáticos<sup>2,3</sup>. Geralmente são produtos de alto valor agregado devido à fabricação complexa, por isso são os alvos ideais de adulteração.

Vargas<sup>4</sup> identificou fraudes em edulcorantes de stévia, com ciclamato de sódio e sacarina, edulcorantes artificiais de baixo custo e de alto poder edulcorante. No Brasil, Noronha<sup>5</sup> encontrou discrepâncias nos rótulos de edulcorantes de mesa que alegavam composição natural, mas continham sacarina (SAC), ciclamato e acessulfame de potássio (ACS) não informados na embalagem. Ainda, recentemente em Goiânia foi fechada uma fábrica de produtos alimentícios que prometia alimentos sem açúcar, porém foram encontrados embalagens de edulcorantes artificiais no local e, de acordo com funcionários, adicionava-se leite condensado (rico em sacarose) durante a fabricação<sup>6</sup>.

Diante deste cenário, é imperativo atestar a conformidade desses edulcorantes com o rótulo, a fim de que seja assegurado que o consumidor não seja prejudicado por perder os benefícios citados ou por sofrer danos sérios à própria saúde pela adição indevida de outros ingredientes, principalmente a sacarose.

A cromatografia é uma técnica bastante empregada em análises alimentícias para quantificar edulcorantes, geralmente acoplada a detectores com espectrometria de massas

ou fluorescência <sup>7 8</sup>. Essa técnica tem como vantagem a alta sensibilidade, entretanto, requer procedimentos complexos e onerosos de pré-tratamento e preparo de amostra que aumentam o número de incertezas e apresentam alto gasto de reagentes e/ou energia. Como alternativa, têm-se a espectroscopia no infravermelho, técnica vantajosa que permite medidas rápidas sem destruição da amostra, propiciando sua reutilização para análises posteriores. Além disso, essa técnica dispensa preparo de amostra quando se acopla o acessório de reflectância total atenuada (ATR — do inglês *Attenuated Total Reflectance*) no espectrofotômetro. Para permitir a implementação de medidas *in situ*, equipamentos portáteis como espectrofotômetros de infravermelho próximo são uma opção interessante que, no contexto de autenticidade alimentícia, possibilitariam uma ação mais célere das entidades regulatórias.

Devido à frequente sobreposição de sinais nos espectros obtidos na região do infravermelho, ferramentas quimiométricas podem ser aplicadas para simplificar a análise dos dados e construir modelos que extraiam apenas as informações pertinentes para o analista. Nesse sentido, a análise de componentes principais (do inglês PCA — *Principal Component Analysis*) pode auxiliar no reconhecimento de padrões espectrais e modelos de classificação de amostras como autênticas ou não autênticas podem ser desenvolvidos através de abordagens supervisionadas, tais como a Modelagem Independente Flexível por Analogias de Classes Orientada por Dados (do inglês, DD-SIMCA - *Data Driven Soft Independent Modeling of Class Analogies*).

Tendo em vista os aspectos descritos, a presente dissertação de mestrado tem como objetivo principal desenvolver um método para verificar a autenticidade de edulcorantes de mesa sólidos à base de xilitol, eritritol e stévia através da obtenção de espectros na região do infravermelho médio e próximo e modelagem por DD-SIMCA. Como objetivos específicos pretende-se:

- Obter os espectros puros de stévia, xilitol e eritritol no infravermelho próximo e no infravermelho médio e comparar esses perfis espectrais com os obtidos em amostras comerciais;
- Utilizar os espectros obtidos para o desenvolvimento de um modelo de classificação por DD-SIMCA com os métodos de pré-processamento adequados;
- Simular adulterações dos edulcorantes naturais comerciais produzindo misturas destes com sacarose, sacarina e acesulfame-k em proporções pré-estabelecidas;

- Validar o método obtido com amostras comerciais e adulteradas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O CONSUMO DE EDULCORANTES**

Entre 1750 e 1900, com os avanços na escala de fabricação alimentícia promovidos pela revolução industrial, houve um aumento expressivo na produção de sacarose, o açúcar de mesa, que se tornou mais acessível por ter baixo custo de produção, e de fácil distribuição e estocagem<sup>9</sup>. A relação entre a ingestão de açúcar e seus malefícios à saúde só começou a ser demonstrada a partir de 1950, quando o índice de doenças arteriais coronárias cresceu abruptamente na população americana. Neste período, foram encontradas evidências que ligavam a alta ingestão de açúcar ao risco de doenças cardiovasculares. A indústria do açúcar tentou desacreditar esses resultados influenciando e iniciando pesquisas que punham em dúvida os riscos do macronutriente à saúde<sup>10</sup>. Apesar disso, hoje em dia, é bem estabelecido, por evidências robustas, que o excesso de sacarose é prejudicial<sup>11</sup>.

É neste cenário que são estabelecidas diversas diretrizes no Brasil e no mundo para diminuir o consumo de açúcar. O Guia Alimentar para a População Brasileira publicado pelo Ministério da Saúde, recomenda utilizá-lo em pequenas quantidades ao preparar receitas, além de evitar alimentos processados e ultra processados, que têm quantidades elevadas desse macronutriente<sup>12</sup>. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda reduzir a ingestão de açúcar (estando incluído açúcar adicionado pelo fabricante a qualquer tipo de alimento e açúcares naturalmente presentes em mel, xarope e sucos de fruta) a menos que 10% das calorias diárias<sup>13</sup>. Em 2018, o Brasil assumiu como meta reduzir 144 mil toneladas de açúcar dos alimentos industrializados no país, em parceria com setores da indústria alimentícia numa tentativa de conter a obesidade e diabetes na população brasileira<sup>14</sup>. É nesse contexto que os edulcorantes se tornam atrativos, já que promovem o sabor doce sem acarretar nos danos à saúde decorrentes da ingestão de sacarose.

De acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018 do IBGE<sup>15</sup>, os edulcorantes são os alimentos que apresentaram maior crescimento percentual de frequência de consumo em domicílios urbanos, subiu de 0,1% em 2009 para 9,2% em 2018, com uma queda de 5,4% no consumo de açúcar. Esses dados sugerem que a população está mais consciente do papel do açúcar na própria alimentação e disposta a substituí-lo por alternativas menos nocivas.



## **2.2 CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DOS EDULCORANTES DE INTERESSE**

De acordo com a portaria nº 540<sup>16</sup>, os edulcorantes são aditivos alimentares diferentes da sacarose (açúcar de mesa) que conferem sabor doce aos alimentos, esses alimentos podem ser classificados pela sua origem como naturais ou artificiais.

Além da classificação por origem, os edulcorantes podem ser classificados pela sua contribuição calórica, sendo os nutritivos os que possuem baixo valor calórico e os não nutritivos os que fornecem uma quantidade quase nula de calorias. Estes últimos geralmente tem uma intensa capacidade de adoçar, podendo chegar a centenas de vezes a doçura da sacarose, por conseguinte, quantidades mínimas dos edulcorantes não-nutritivos são suficientes para um sabor doce similar ao do açúcar refinado <sup>17</sup>.

### **2.2.1 EDULCORANTES NATURAIS**

Dentre os edulcorantes nutritivos destacam-se a classe dos polióis, compostos orgânicos com múltiplas ligações hidroxila resultantes da hidrogenação de açúcares (Figura 1) os quais possuem doçura semelhante à da sacarose e por isso são adicionados em produtos dietéticos zero açúcar como: edulcorantes de mesa, massa para bolos, gomas de mascar, doces e sorvetes. Devido as semelhanças nas propriedades físicas, podem ser usados para substituir o volume de açúcar em receitas ao contrário de edulcorantes não nutritivos <sup>18</sup>. Os polióis ocorrem naturalmente em frutas e vegetais, mas em baixas quantidades, inviáveis para a demanda em larga escala da indústria, por isso vêm sendo produzidos por rotas industriais microbiológicas ou químicas.

Esses edulcorantes são metabolizados por vias pouco ou nada dependentes da insulina, acarretando na diminuição de picos de açúcar no sangue e na má absorção no intestino, sendo este último um efeito negativo visto que o consumo exagerado pode gerar desconforto abdominal e em casos mais severos diarreia, proveniente da absorção pela microbiota intestinal. A dose máxima sem efeitos colaterais já foi estimada para eritritol (0,46 g/kg de massa corporal para homens e 0,68 g/kg para mulheres e xilitol (0,37 g/kg de massa corporal para homens e 0,42 g/kg para mulheres) <sup>19</sup>.

Adiciona-se às propriedades metabólicas dos polióis: a inércia à reação de Maillard, precursora de substâncias que favorecem complicações vasculares da diabetes e, especificamente para xilitol e eritritol, o estímulo de hormônios de saciedade <sup>20</sup>.

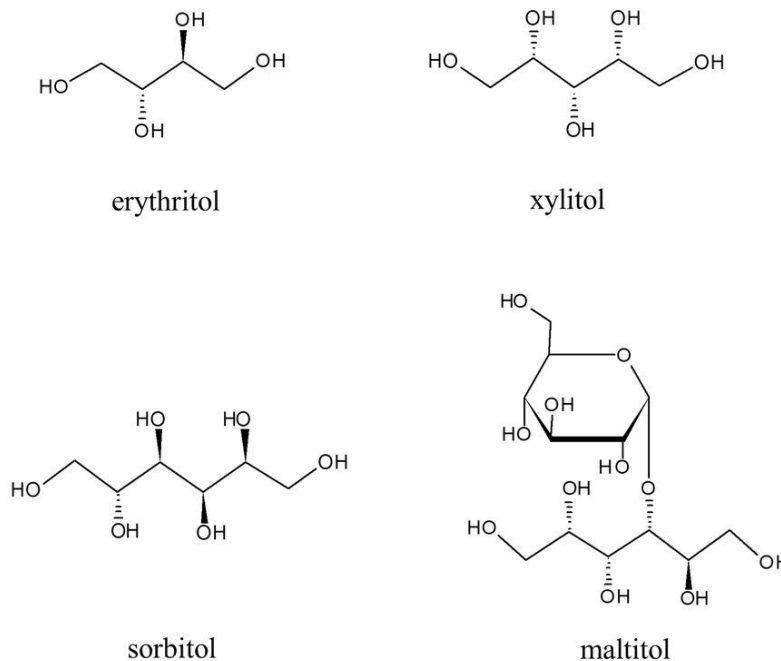


Figura 1. Estruturas dos polióis eritritol, xilitol, sorbitol e maltitol. <sup>21</sup>

O xilitol é um edulcorante de origem natural que pode ser encontrado em frutas, vegetais, cascas de amêndoas, espigas de milho, palha e madeira. Esse poliálcool pode ser obtido por processo químico que consiste na hidrogenação catalítica da xilose pura extraída da madeira e posterior cristalização do produto final. Apesar de ser um processo relativamente rápido, exige temperatura e pressão elevadas e geralmente tem rendimentos em torno de 50 a 60%, por isso, processos microbiológicos são mais vantajosos, pois a conversão da matéria-prima em xilitol se dá pela ação de micro-organismos ou enzimas microbianas, num processo menos custoso e em condições reacionais menos extremas <sup>22</sup>. O xilitol possui valor calórico baixo, próximo de 2,4 kcal/g e se sobressai do grupo dos poliálcoois por ser o mais doce dentre eles, possuindo cerca de 95% da doçura da sacarose <sup>17</sup>. Este edulcorante é adicionado em produtos específicos para saúde oral visto que é capaz de desequilibrar a produção de energia das bactérias (levando à morte celular) e reduzir a formação de placas dentárias e a aderência bacteriana. Tais benefícios são conhecidos desde os anos 1970, quando a primeira goma de mascar a base de xilitol foi produzida na Finlândia para redução de cáries nos consumidores <sup>2</sup>.

O eritritol é usualmente presente em cogumelos e algumas frutas, e se distingue dos outros poli álcoois por ser o único edulcorante do grupo com valor energético virtualmente nulo. Cerca de 90% do eritritol ingerido é excretado em sua forma original, e estudos *in vitro* sugerem que a quantidade restante não é fermentada pela microbiota intestinal, o que justifica a maior dose de consumo sem efeitos adversos em comparação com o xilitol e os outros polióis <sup>23</sup>. Sua capacidade de adoçar é em torno de 70% a da sacarose e este edulcorante absorve calor quando dissolvido na boca, diminuindo a temperatura e resultando num efeito refrescante <sup>19</sup>. Assim como o xilitol, o eritritol apresenta benefícios a saúde oral mostrando similaridades inclusive nos mecanismos de ação contra bactérias associadas à cárie. Ainda há evidências de que possui uma ação antioxidante, como observado em estudos *in vitro* e em ratos, propriedade relevante para pacientes diabéticos já que há indícios de que essa comorbidade é associada a maior produção de radicais no organismo <sup>24</sup>. Neste sentido a adição de eritritol à dieta é benéfica não só por evitar os danos do açúcar, mas também por melhorar ativamente as condições de saúde desses consumidores. A capacidade do eritritol de retardar alterações em alimentos já foi estudada em geleias de cereja e observou-se que, ao adicionar o edulcorante no produto, este foi capaz de manter os níveis altos de polifenóis, substâncias anti-inflamatórias e antidiabéticas da geleia. Além disso, o eritritol também preservou a coloração do produto fresco após seis meses de armazenamento <sup>25</sup>. Sugere-se então que o eritritol além de ser um aditivo para adoçar, pode ser utilizado como um dos conservantes de produtos alimentícios.

*Stevia rebaudiana* Bertoni, popularmente conhecida como stévia, é uma planta encontrada na América do Sul, e dela são extraídos os chamados glicosídeos de esteviol, usados como edulcorantes. Os glicosídeos de esteviol têm em comum na sua estrutura uma molécula de glicose ligada a um grupo carbonila do precursor esteviol (Figura 2), formando assim uma ligação glicolítica. Eles estão presentes principalmente nas folhas de stévia, sendo o esteviosídeo e rebaudiosídeo os glicosídeos majoritários e principais responsáveis pelo sabor doce <sup>26</sup>, que pode chegar a 400 vezes o do açúcar quando de alta pureza <sup>27</sup>. Stévia é, portanto, um edulcorante de alta intensidade ao contrário dos outros edulcorantes naturais já citados. Este edulcorante natural é não nutritivo (sem valor calórico) e pode ser usado como edulcorante de mesa e incorporado a produtos diet como sucos, massas para bolo, gelatinas, etc. Num estudo recente, foi observado que o consumo de stévia diminui o apetite e não causa picos glicêmicos <sup>28</sup>, indicando um papel importante

na prevenção de obesidade e controle de diabetes, apesar do potencial hipoglicêmico da stévia necessitar de estudos *in vivo* mais robustos <sup>29</sup>.

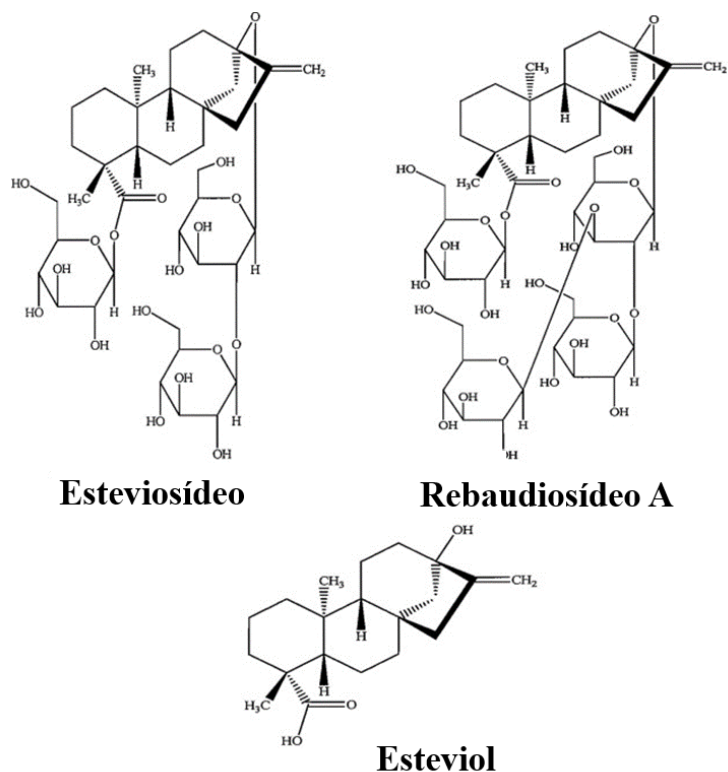


Figura 2. Glicosídeos esteviosídeo e rebaudiosídeo A e o precursor esteviol <sup>30</sup>

### 2.2.2 EDULCORANTES ARTIFICIAIS

Dentre os edulcorantes artificiais, a sacarina (Figura 3) apresenta-se como um dos edulcorantes não nutritivos mais baratos e de alta intensidade. Dado que, seu poder edulcorante é 400 vezes maior que a do açúcar, são necessárias quantidades mínimas para adoçar, mas por possuir sabor residual amargo e metálico, geralmente é combinado com ciclamato de sódio<sup>31</sup>. Há controvérsias sobre os possíveis malefícios da sacarina à saúde humana, pois esta já foi vista como um potencial carcinogênico devido a estudos que correlacionavam seu consumo ao surgimento de tumores em ratos, porém, evidências dessa correlação em humanos não foram encontradas<sup>32</sup>. Apesar disso, outros estudos já apontaram seu consumo associado ao risco acentuado de obesidade e diabetes bem como disfunção renal e no fígado <sup>33</sup>. Por não existirem estudos conclusivos sobre a segurança da ingestão de sacarina, a ANVISA estabeleceu o limite máximo de 0,015 mg/100 (mL ou g) deste edulcorante em produtos alimentícios <sup>34</sup>.

Além da sacarina, o edulcorante sintético acessulfame de potássio é apontado como responsável por efeitos negativos na saúde de roedores como tolerância a glicose prejudicada<sup>35</sup> e indícios de potencial carcinogênico<sup>36</sup>, apesar disso, o ACS é um dos edulcorantes mais frequentemente adicionado a alimentos no Brasil<sup>37</sup>, tendo em vista os riscos e efeitos negativos descritos, ACS também possui limite máximo estabelecido pela ANVISA de 0,035g/100g<sup>34</sup>.

A fim de alcançar análises mais rápidas e simples, a determinação de SAC e ACS pode ser realizada utilizando espectroscopia no infravermelho<sup>38</sup>, método bem-sucedido inclusive na identificação de adulteração alimentícia<sup>39</sup>.

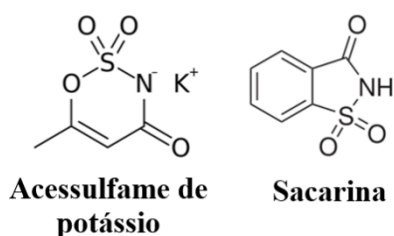


Figura 3. Edulcorantes sintéticos acessulfame de potássio e sacarina.

### 2.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

A espectroscopia de infravermelho baseia-se na absorção de radiação infravermelha por moléculas que estão presentes no material analisado. A absorção de energia no infravermelho só é possível quando a molécula possui momento de dipolo permanente, dessa forma, o campo oscilante do dipolo molecular pode acoplar-se ao campo elétrico da fonte de radiação, alterando a amplitude das frequências vibracionais das ligações. Nessa região do espectro, a radiação é insuficiente para causar transições eletrônicas nas moléculas, porém, é capaz de promover transições de energia entre os estados vibracionais e rotacionais das moléculas. Nas vibracionais, as ligações da molécula passam para um estado excitado de vibração, assumindo maiores frequências de dobramento ou estiramento; nas transições rotacionais a molécula gira em torno do próprio centro de gravidade<sup>40</sup>.

A região do infravermelho pode ser dividida em três intervalos espectrais: infravermelho próximo (12800 a 4000 cm<sup>-1</sup>), infravermelho médio (4000 a 200 cm<sup>-1</sup>) e

infravermelho distante (200 a  $10\text{ cm}^{-1}$ ), sendo que na última predominam as transições rotacionais de menor energia <sup>41</sup>.

Apesar das frequências vibracionais de dois tipos idênticos de ligações em dois diferentes compostos serem iguais, essas ligações estão em dois ambientes moleculares levemente diferentes. Assim, os espectros de infravermelho de duas moléculas distintas nunca serão exatamente idênticos, possibilitando a identificação de moléculas de forma análoga à identificação de pessoas por impressões digitais, especialmente na região entre  $1200$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ , a chamada região de impressão digital.

Os espectrofotômetros de infravermelho modernos geralmente são instrumentos baseados em interferômetros com Transformada de Fourier (FTIR), uma operação matemática que converte o sinal obtido no domínio temporal, para um sinal no domínio de frequência resultando no espectro de infravermelho da amostra. O FTIR é vantajoso pois leva menos de um segundo para registrar um espectro, portanto é possível obter um grande número de espectros rapidamente e, com a soma destes chegar a uma razão sinal/ruído muito melhor que a dos equipamentos dispersivos existentes até o final da década de 1980 <sup>40</sup>.

Pode-se realizar leituras no infravermelho de amostras líquidas, gasosas e sólidas, estas últimas, tradicionalmente, podem ser preparadas para leitura no infravermelho através da maceração com brometo de potássio e posterior prensa dessa mistura, convertendo-a numa pastilha que é inserida em um porta amostra do espectrofotômetro. Também pode-se usar a técnica de Nujol, para transformar a amostra em uma suspensão dispersando-a num óleo mineral e ainda dissolver o sólido em soluções transparentes à radiação, como dissulfeto de carbono ou tetracloreto de carbono <sup>42</sup>. Porém essas técnicas não permitem a reutilização da amostra em análises posteriores e geram resíduos químicos após a análise. Por outro lado, a técnica de reflectância total atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance* ) permite a análise direta de amostras sólidas sem requerer a preparação de pastilhas em KBr, tornando a análise rápida e não destrutiva.

O ATR baseia-se na reflexão interna da radiação IV num cristal de alto índice de refração, que funciona como meio de interação entre a amostra e o feixe de radiação que vem da fonte. A amostra sólida é depositada na superfície do cristal e pressionada contra ele, de tal forma que seja proporcionado o máximo de contato. Quando a radiação da fonte é refletida dentro do cristal, ao atingir a interface entre cristal e amostra ocorre uma pequena

interação com amostra que atenua a radiação devido a absorção de energia pelas moléculas. A radiação atenuada é então refletida de volta para o material cristalino e é incidida novamente na amostra, repetidamente até alcançar o detector <sup>43</sup> (Figura 4). Atualmente existem acessórios com cristais de múltiplas reflexões ou com reflexão única, que interage apenas uma vez com a amostra.

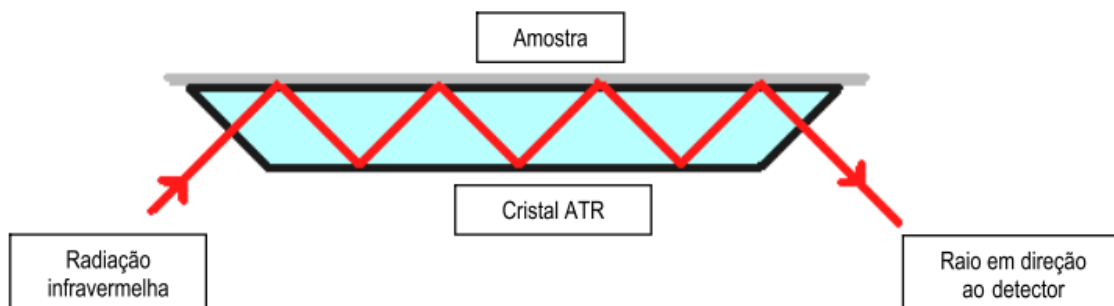


Figura 4. Esquema de uma medida espectroscópica com ATR <sup>43</sup>

Dessa forma, usar um equipamento FTIR-ATR para amostras sólidas permite medidas rápidas com excelente razão sinal/ruído e sem preparo de amostra. Em muitas situações, devido à sobreposição dos sinais espectrais dos constituintes das amostras, se faz necessário o uso da quimiometria a fim de detectar padrões espectrais e determinar qualitativamente ou quantitativamente os analitos em amostras de interesse. A identificação de tendências nos dados e uma redução na complexidade destes pode ser alcançada com diversas técnicas de análise multivariada, sendo uma das mais empregadas a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*)<sup>44</sup>.

### 2.3.1 PCA E DD-SIMCA

A PCA é um modelo de redução de dimensionalidade e de projeção, em que uma matriz de dados contendo várias medidas, cada uma com múltiplas variáveis, é decomposta nas matrizes de escores e pesos, de forma que seja possível reduzir o número de variáveis e preservar a variação/informação dos dados originais.

Em um conjunto de dados, as várias observações/amostras são pontos dispostos num espaço de eixos n-dimensional em que cada eixo corresponde a uma variável, logo, as coordenadas de cada ponto (observação) são determinadas pelo valor de cada variável. Executando-se a PCA, os pontos são projetados num novo espaço com menor número de dimensões/variáveis, construído por eixos que são combinações lineares das

variáveis originais, chamados de componentes principais (PCs). As novas coordenadas dos pontos no espaço definido pelas PCs são chamadas de escores (*scores*) e os coeficientes de combinação das variáveis são os pesos (*loadings*). Assim, os pontos próximos entre si nesse espaço são tidos como similares <sup>45</sup>.

Algebricamente, para um conjunto de espectros dispostos numa matriz **X**, em que cada linha corresponde a um espectro e cada coluna é uma absorbância num comprimento de onda, efetuando-se a PCA têm-se:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que **T** é a matriz de scores, **P**<sup>T</sup> é a matriz transposta dos pesos e **E** é a matriz de resíduos. Enquanto a matriz de scores (**T**) é relacionada as observações, isto é cada espectro da matriz **X**, a matriz de pesos (**P**) diz respeito a contribuição de cada variável (absorbância em determinado comprimento de onda) na construção dos componentes principais do modelo.

O algoritmo utilizado neste trabalho para realizar a PCA é a decomposição de valores singulares (SVD, do inglês *singular value decomposition*) em que a matriz de dados **X** é transformada no produto de três matrizes, conforme a equação a seguir:

$$\mathbf{X} = \mathbf{USV}^T \quad (\text{Equação 2})$$

Onde **U** e **V** são as matrizes contendo os vetores singulares e **S** a matriz dos valores singulares. No qual **V** é correspondente à matriz de pesos **P**, e o produto **US** é igual à matriz de scores **T**.

Com os resultados da PCA, podem ser calculados dois índices para cada amostra/espectro: T<sup>2</sup> de Hotelling e Q. T<sup>2</sup> pode ser definida como a distância da projeção de uma amostra até a origem do espaço definido pelas PCs e Q é a distância entre a coordenada original da amostra e a sua projeção no novo espaço formado pelos PCs, isto é, os resíduos do modelo PCA contidos na matriz **E** <sup>46</sup>.

Esses dois parâmetros são utilizados para construir modelos de classificação supervisionada a partir de PCA, o que dá origem ao modelo DD-SIMCA (do inglês *Data Driven Soft Independent Modeling of Class Analogy*), em que a um determinado nível de



confiança,  $T^2$  e  $Q$  delimitam uma região de aceitação de amostras pertencentes à uma classe alvo. Como o DD-SIMCA utiliza apenas amostras da classe-alvo no treinamento, é tido como um modelo de classificação *one-class*<sup>47</sup>. O número de PCs utilizado para construir o modelo é escolhido de forma a minimizar erros de classificação de amostras de treinamento. Idealmente, novas amostras pertencentes à classe-alvo devem estar compreendidas dentro da área de aceitação, sendo ditas amostras verdadeiro positivo. Por outro lado, amostras pertencentes a outras classes ou não autênticas devem estar fora do limite de aceitação, sendo chamadas de verdadeiro negativo<sup>48,49</sup>. Quando o modelo apresenta erros de classificação tem-se amostras da classe alvo fora da área de aceitação (erros falso negativos) e amostras de outras classes ou não autênticas dentro da área de aceitação (erros falso positivos). Desta forma, o método DD-SIMCA pode ser empregado para identificação de autenticidade dos edulcorantes.

### 2.3.2 AMOSTRAS VIRTUAIS

Muitas vezes a obtenção de amostras de referência que sejam representativas do fenômeno ou produto estudado é extremamente difícil. Isso faz com que a construção de modelos de classificação seja dificultada. Nessas situações, alguns autores tem proposto a utilização de métodos numéricos para a criação de amostras simuladas/virtuais a partir das amostras reais disponíveis<sup>50</sup>. Nesse trabalho especificamente, devido ao número pequeno de marcas distintas disponíveis para construção do modelo DD-SIMCA, a estratégia de gerar amostras virtuais a partir da randomização dos espectros de amostras reais foi empregada para aumentar a representatividade do conjunto de treinamento.

O algoritmo proposto por Barbosa-Patricio et al.<sup>50</sup> foi adaptado de forma a gerar  $z$  amostras virtuais para cada amostra real, utilizando a Equação 3 que provê amostras virtuais através de números randômicos ao redor das amostras reais combinados ao resíduo do modelo PCA obtido a partir das amostras de treinamento.

$$R_{i+z,j} = D_{i,j} + E_{i,j} \cdot U_{z,j} \cdot 2 \quad (\text{Equação 3})$$

Em que  $R$  é o dado (comprimento de onda ou número de onda  $j$ ) virtual proveniente da  $i$ -ésima amostra real na  $j$ -ésima variável,  $D$  é o dado real,  $E$  é o resíduo deste dado com base em um modelo PCA, idealmente, utilizando o mesmo número de componentes

principais utilizado no modelo DD-SIMCA e  $U$  é um número randômico entre 0 e 1. Para esse trabalho  $z$  foi considerado como igual a 10, gerando 10 amostras virtuais para cada amostra real.

Face ao exposto, visando a obtenção de um método para verificar se há adulteração de edulcorantes puros de stévia, xilitol e eritritol comercializados, propõe-se a aplicação de modelos DD-SIMCA construídos a partir de espectros no infravermelho de amostras comerciais e amostras virtuais.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS**

Para as medidas espectroscópicas no infravermelho médio foi usado o espectrofotômetro FTIR-4100 (JASCO) com transformada de Fourier equipado com o acessório de reflectância total atenuada ATR PRO450-S (JASCO) com cristal de ZnSe de uma reflexão. Os espectros de infravermelho próximo foram obtidos com o espectrofotômetro portátil MicroNIR™ 1700 (Viavi Solutions Inc.). A análise dos dados por PCA foi realizado através da PLS Toolbox (versão 8.8.1) disponibilizada por Eigenvector Research Inc, suportada em ambiente MATLAB® (versão 9.2, R2017a). O modelo DD-SIMCA foi construído na interface gráfica DD-SIMCA Toolbox<sup>51</sup>, suportada em ambiente MATLAB® (versão 9.2, R2017a).

As pesagens das massas para misturas foram feitas numa balança analítica com precisão de 0,0001 g, modelo AX200 (Shimadzu Corp.) e numa balança analítica com precisão de 0,01 mg, modelo XS205 (Mettler Toledo).

#### **3.2 REAGENTES E AMOSTRAS**

Os padrões de xilitol, eritritol, acessulfame de potássio, sacarina e glicosídeos de esteviol foram adquiridos da Sigma-Aldrich, grau P.A. As amostras de edulcorantes comerciais rotuladas como puras (sacarose, xilitol, eritritol e stévia) foram adquiridas em supermercados e farmácias de Brasília e Anápolis. A disposição das amostras de treinamento e validação é apresentada na Tabela 1. Cada amostra citada pertence a um lote diferente do produto. Ressalta-se que o conjunto de validação é composto de amostras de marcas diferentes das que foram utilizadas na fase de treinamento.

Para aumentar a variabilidade das amostras e consequentemente a representatividade do conjunto de dados, foram preparadas misturas entre as diferentes marcas de treinamento e validação dos edulcorantes naturais, descritas na Tabela 2. Foram preparadas em triplicata as misturas de treinamento de stévia e eritritol e as misturas de validação de xilitol. Por limitação da quantidade de amostra disponível, as demais misturas tinham apenas uma replicata autêntica, mas as leituras no NIR e no MIR foram repetidas cinco e três vezes, respectivamente.

Tabela 1. Conjunto de amostras utilizadas para a construção e validação do modelo DD-SIMCA

<b>Tipo de edulcorante</b>	<b>Conjunto</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Descrição</b>
Xilitol	Validação	50	12 amostras puras das marcas 1, 2, 3 e 4 (3 lotes cada) e 38 misturas entre essas marcas (binárias, ternárias e quaternárias).
	Treinamento	22	11 amostras puras das marcas 5 (4 lotes), 6, 7 (3 lotes cada) e 8 (1 lote) e 11 misturas entre lotes diferentes (binárias, ternárias e quaternárias).
Eritritol	Treinamento	26	7 amostras puras das marcas 9 (apenas 1 lote), 10 e 11 (3 lotes cada) e 19 misturas entre marcas (binárias e ternárias).
	Validação	35	5 amostras puras das marcas 12 (3 lotes) e 13 (2 lotes) e 30 misturas binárias entre lotes diferentes.
Stévia	Treinamento	28	9 amostras puras das marcas 14, 15 e 16 (3 lotes cada) e 19 misturas entre marcas (binárias e ternárias).
	Validação	34	4 amostras puras das marcas 17 (3 lotes) e 18 (1 lote) e 30 misturas binárias entre lotes diferentes.

Tabela 2: Relação das misturas autênticas utilizadas no treinamento e validação.

<b>Edulcorante</b>	<b>Conjunto</b>	<b>Número de misturas</b>	<b>Descrição</b>
Xilitol	Validação	38	Misturas entre as marcas 1, 2, 3 e 4. Seis misturas binárias nas proporções 50:50, 25:75, 75:25, 60:40, 40:60 (m/m) totalizando 30 misturas. Quatro misturas ternárias na proporção 33:33:33 (m/m), quatro misturas quaternárias nas proporções 20:20:20:40 (m/m) alternando a concentração de 40% entre as marcas.
	Treinamento	11	Misturas entre as marcas 5, 6, 7 e 8. Seis misturas binárias na proporção 50% (m/m). As quatro misturas ternárias na proporção 33:33:33 (m/m), por fim, a mistura quaternária foi feita na proporção 25:25:25:25 (m/m).
Eritritol	Treinamento	19	Misturas entre as marcas 9, 10 e 11. Três misturas binárias nas proporções 50:50, 25:75, 75:25, 60:40, 40:60 (m/m) totalizando 15 misturas, quatro misturas ternárias com proporções 33:33:33, 50:25:25, 25:50:25, 25:25:50 (m/m).
	Validação	30	Misturas entre diferentes lotes das marcas 12 e 13. Misturas binárias nas concentrações 50:50, 25:75, 75:25, 60:40, 40:60 (m/m).
Stévia	Treinamento	19	Misturas entre as marcas 14, 15 e 16. Três misturas binárias nas proporções 25:75, 75:25, 60:40, 40:60 (m/m) totalizando 15 misturas, as quatro misturas ternárias tinham proporções 33:33:33, 50:25:25, 25:50:25, 25:25:50 (m/m).
	Validação	30	Misturas entre diferentes lotes das marcas 17,18 e 14 (dois lotes diferentes dos de treinamento). Misturas binárias nas concentrações 50:50, 25:75, 75:25, 60:40, 40:60 (m/m).

### 3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.3.1. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

As amostras foram depositadas num porta amostra circular de Teflon™ com diâmetro de 2,5 cm e 2 mm de profundidade (Figura 5) produzido no nosso laboratório de pesquisa. Uma lâmina lisa lapidada para microscopia (26 x 76 mm) foi utilizada para homogeneizar e aplainar a superfície da amostra.



Figura 5. Porta amostra em detalhe utilizado para as medidas no MicroNIR à esquerda, à direita, porta-amostra contendo edulcorante xilitol.

A parte frontal do espectrômetro (Figura 6), a lâmina e o porta amostra foram limpos com etanol entre cada uma das medidas. Cada espectro foi o resultado de uma média de 200 varreduras com tempo de integração de 2000  $\mu$ s no modo absorvância, na faixa de 900 a 1700 nm em intervalos de 6 nm. Os estudos foram feitos em quintuplicata.



Figura 6: Parte frontal do espectrômetro à esquerda, à direita, o MicroNIR durante uma medida.

### 3.3.2. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO MÉDIO

Os espectros foram obtidos na região entre 650 e 4000 $\text{cm}^{-1}$  em um espectrômetro FTIR Jasco, modelo 4100, no modo transmitância com 64 varreduras e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . A aquisição foi feita em triplicata. Os sólidos em pó foram depositados na superfície do cristal de ZnSe do ATR com o auxílio de uma espátula com colher. O cristal foi devidamente limpo com etanol após cada medida.

### 3.3.3 PREPARO DAS MISTURAS NÃO AUTÊNTICAS DE VALIDAÇÃO

Nas misturas binárias que simulam amostras não autênticas foram adicionados os adulterantes: sacarose, sacarina (SAC) e acessulfame-K (ACS). Stévia, por ser um edulcorante de alta intensidade, não foi adulterada com sacarose. As proporções iniciais foram de 10% a 50% (m/m), porém as massas dos adulterantes foram corrigidas conforme o poder adoçante de cada um, para que se equiparassem com o edulcorante natural conforme a Equação 4, em que  $C_f$  é a massa de adulterante corrigida,  $C_i$  é a massa inicial de adulterante,  $P_N$  é o poder adoçante do edulcorante natural e  $P_S$  é o poder adoçante do adulterante. A massa total das misturas foi mantida constante no valor de 1,5g, completada com  $\text{SiO}_2$ .

$$C_f = \frac{C_i \times P_N}{P_S} \quad (\text{Equação 4})$$

Dessa forma, os adulterantes ACS e SAC foram adicionados a stévia nas proporções de 10% a 50% e 7,5% a 37,5% (m/m) respectivamente, esta última completada com  $\text{SiO}_2$  nas proporções 2,5% a 12,5% (m/m). ACS, SAC e sacarose foram adicionados ao eritritol nas proporções 0,04% a 0,2%, 0,02% a 0,1% e 7% a 35% (m/m), a massa total dessas misturas foi completada com  $\text{SiO}_2$  nas proporções: 9,97% a 49,8%, 9,98% a 49,9% e 3% a 15% (m/m). Por fim, sacarose foi adicionada ao xilitol nas proporções 10% a 50% (m/m) e ACS e SAC nas proporções 0,05% a 0,3%, 0,03% a 0,13% respectivamente, a massa total dessas misturas de ACS e SAC foi completada com  $\text{SiO}_2$  nas proporções 9,95% a 49,75% e 9,98% a 49,88% (m/m).

### 3.3.4. PRÉ-PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS IV

Para o tratamento dos dados requeria-se que todos os espectros estivessem na escala de absorvância (A), para isso, os espectros no infravermelho médio foram convertidos de transmitância percentual para absorvância segundo a Equação 5:

$$A = 2 - \log (T\%) \quad (\text{Equação 5})$$

Os espectros foram submetidos ao pré-processamento, composto por dois métodos: a padronização normal de sinal (SNV, do inglês *Standard Normal Variate*) e centrar os dados na média em relação às colunas (*mean center*). O *mean center* consiste em subtrair de cada valor de absorvância de determinada coluna/variável o valor médio dessa respectiva coluna/variável calculado com a matriz de espectros de treinamento. Esse pré-processamento é empregado a fim retirar a informação do espectro médio e destacar as diferenças entre os perfis espectrais de cada tipo de edulcorante <sup>44</sup>. Já o SNV é um algoritmo de normalização espectral, que subtrai de cada valor de absorvância de um determinado espectro o valor médio desse espectro e divide essa diferença pelo desvio padrão correspondente desse espectro <sup>52</sup>.

### 3.3.5 ANÁLISE EXPLORATÓRIA COM PCA

A análise exploratória permite identificar se há formação de agrupamentos de amostras de mesma classe, indicando a viabilidade da aplicação de um modelo de classificação das amostras<sup>53</sup>. Por isso, a análise de componentes principais foi performada com os espectros de treinamento das amostras puras de xilitol, eritritol e stévia.

O tratamento dos dados por PCA foi realizado através da PLS Toolbox (versão 8.8.1) disponibilizada por Eigenvector Research Inc, suportada em ambiente MATLAB® (versão 9.2, R2017a). O modelo foi construído a um nível de confiança de 95%.



### 3.3.6. CONSTRUÇÃO DO MODELO DD-SIMCA E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O modelo DD-SIMCA foi construído com a ferramenta DD-SIMCA Toolbox, executada em ambiente MATLAB. A validação do método foi realizada com os três conjuntos de dados descritos a seguir:

- Validação 1: o primeiro teste de validação do modelo DD-SIMCA de cada analito consistiu em analisar as amostras de treinamento dos outros dois analitos. Isto é, as amostras de treinamento de stevia e eritritol foram analisadas no modelo de xilitol, as de stevia e xilitol no modelo de eritritol e por fim xilitol e eritritol no modelo de stévia.
- Validação 2: o segundo teste de validação do modelo de cada analito utilizou as misturas que simulam adulteração dos edulcorantes com sacarose, sacarina ou acessulfame-K.
- Validação 3: para o último teste de validação foram utilizadas espectros medidos em amostras de validação da classe alvo (edulcorante que foi modelado na fase de treinamento) e também de amostras das outras classes de edulcorantes empregando marcas que não foram incluídas na fase de treinamento.

Foram calculadas taxa de falso positivo (TFP), taxa de falso negativo (TFN) e a taxa de eficiência (TEF) do método para cada matriz de validação de todos os edulcorantes utilizando as equações abaixo:

$$TFP = \frac{FP}{FP+VN} 100 \quad (\text{Equação 6})$$

A TFP refere-se a taxa de amostras não autênticas erroneamente classificadas como autênticas, FP (falso positivo) é o número de amostras classificadas incorretamente como pertencentes à classe alvo (edulcorante que foi modelado na fase de treinamento) e VN (verdadeiro negativo) são as amostras não autênticas classificadas corretamente como não pertencentes à classe alvo.

$$TFN = \frac{FN}{FN+VP} 100 \quad (\text{Equação 7})$$

TFN refere-se a taxa de amostras autênticas erroneamente classificadas como não autênticas, isto é, fora da área de aceitação do modelo. FN (falso negativo) são amostras da classe alvo classificadas como não autênticas e VP (verdadeiro positivo) são amostras pertencentes à classe alvo que se encontraram dentro da área de aceitação.

$$TEF = \sqrt{\frac{VP*VN}{(VN+FP)*(VP+FN)}} 100 \quad (\text{Equação 8})$$

TEF exprime o desempenho geral do modelo uma vez que é uma média geométrica entre a sensibilidade (amostras que pertencem a classe-alvo corretamente classificadas pelo modelo) e a especificidade (amostras que pertencem a classe não-alvo corretamente classificadas pelo modelo)<sup>54</sup>.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA COM PCA

Na Figura 7 são exibidos os espectros pré-processados no NIR. É possível observar a existência de cinco perfis espectrais diferentes, ao contrário de três perfis (correspondentes as três classes de edulcorantes). A existência de três perfis espectrais de stévia distintos sugere que há diferenças entre as marcas analisadas.

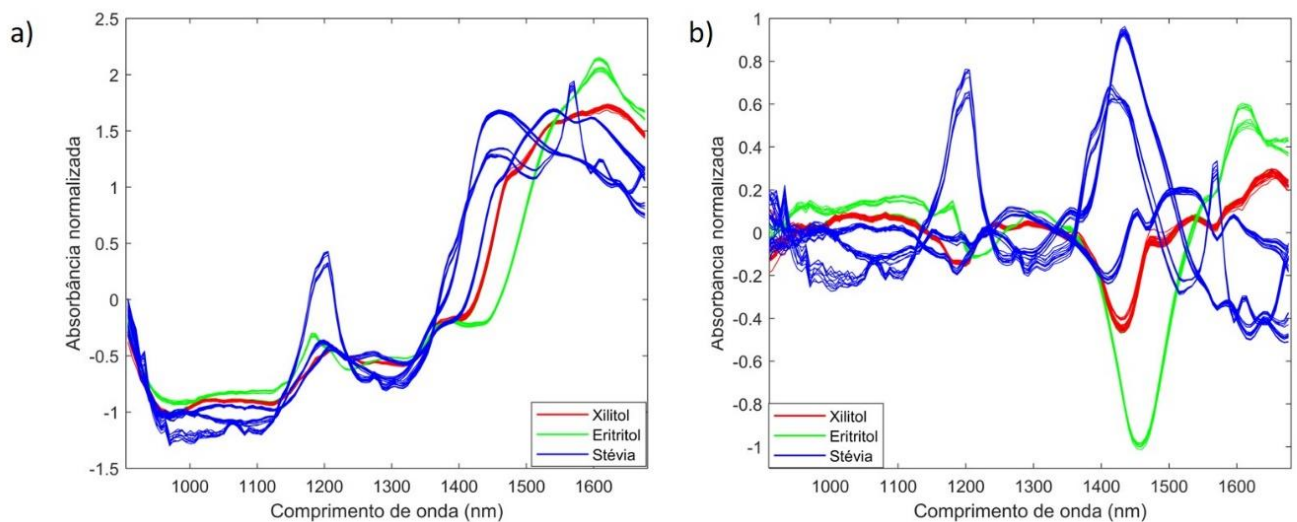


Figura 7. Conjunto de espectros NIR: a) após execução de SNV; b) após execução de SNV e mean center.

Após o cálculo da PCA obtiveram-se as percentagens de variâncias explicadas apresentadas na Tabela 3, sendo que com duas PCs, a percentagem de variância acumulada chegou a 95,50%. A partir da terceira PC já se observa um decréscimo significativo no percentual de variância explicada para cada PC. A sexta PC explica apenas 0,06%, percentagem que pode indicar apenas ruído.

Tabela 3. Percentagem de variância capturada pelo modelo PCA com espectros NIR.

Componente	Variância Explicada (%)	Variância Acumulada (%)
1	82,17	82,17
2	13,32	95,50
3	2,77	98,27
4	1,24	99,51
5	0,35	99,86

A Figura 8 apresenta os scores no plano formado pelas PCs 1 e 2. Houve a formação de grupos bem definidos entre as classes, indicando que é viável a distinção desses edulcorantes pelos dados NIR e PCA. As marcas de stévia dividiram-se em três grupos, essa distinção foi avaliada comparando-se o espectro do reagente grau P.A de glicosídeos de esteviol aos espectros das amostras na seção 4.2.

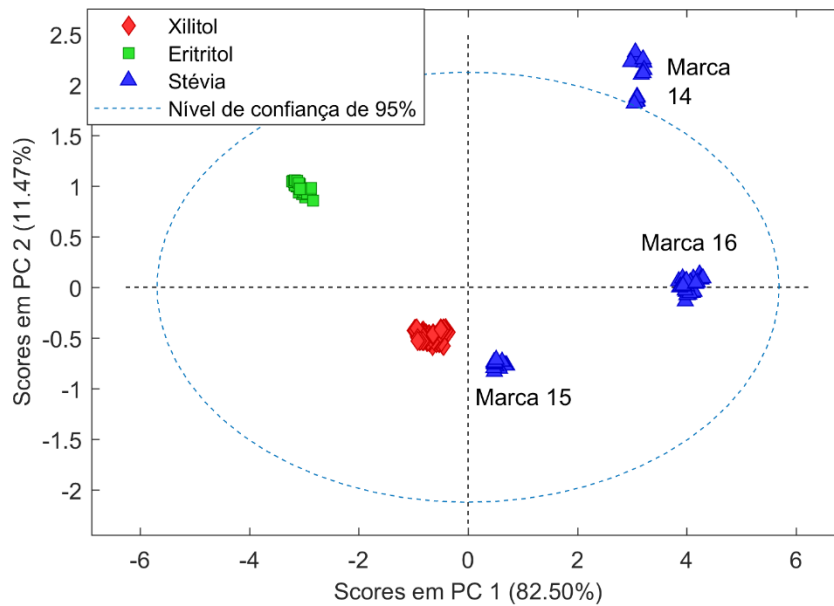


Figura 8. Scores em PC 1 e PC 2 obtidos com espectros NIR.

Através da análise dos *loadings* é possível identificar a região espectral responsável pela variância explicada de cada PC e dessa forma justificar a posição das amostras no gráfico de scores em PC 1 e PC 2<sup>44</sup>. Observa-se pela Figura 9 que a primeira componente principal é formada principalmente pela variância dos dados da banda em 1440 nm decorrente da combinação do primeiro *overtone* das ligações CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub><sup>55</sup>. Nessa banda os espectros pré-processados de stévia apresentam absorvância normalizada intensa, porém para os edulcorantes das outras classes essa absorvância foi negativa (Figura 7c). Por isso, os scores dos espectros de stévia em PC 1 são positivos e xilitol e eritritol têm scores negativos nessa PC (Figura 8).

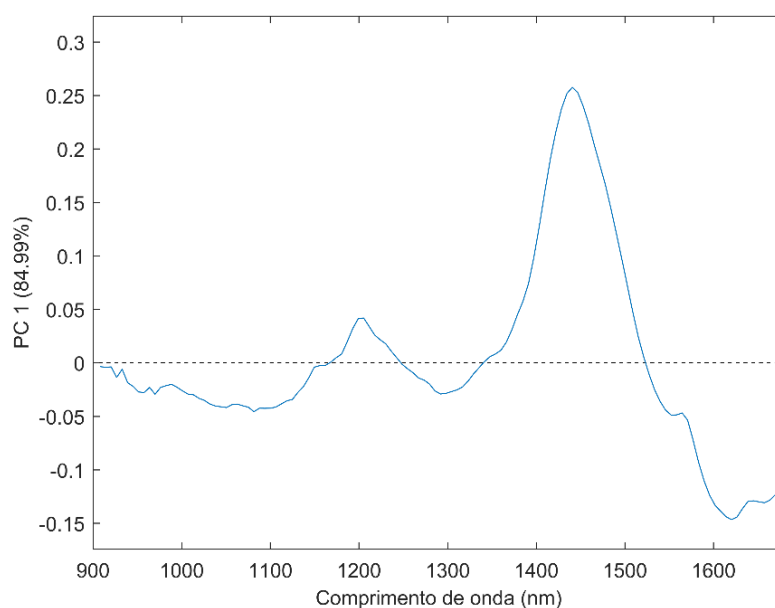


Figura 9. Gráfico de loadings da PC 1 no NIR.

Já para PC 2 (Figura 10) a banda com maior *loading* é em 1200 nm (segundo *overtone* da ligação C-H) seguida da contribuição negativa da banda próxima a 1500 nm (combinação do primeiro *overtone* das ligações CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>). A marca 14 foi a única amostra de stévia que apresentou absorvância normalizada intensa em 1200 nm, por isso apresentou score positivo em PC 2 e localiza-se na porção superior do gráfico de scores da Figura 8. O eritritol também apresentou score positivo em PC 2 devido à absorvância normalizada negativa desse edulcorante em 1500 nm.

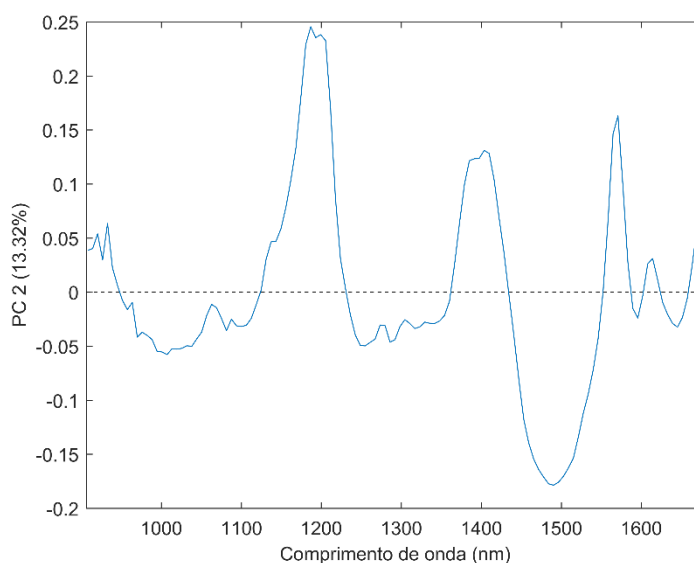


Figura 10. Gráfico de loadings da PC 2 no NIR.

A PCA calculada com os dados do infravermelho médio apresentou uma maior distribuição da variância dos dados entre as componentes principais. Para esses dados as duas primeiras PCs explicaram apenas 81,59% da variância, sendo que a terceira PC ainda explicava mais de 10% da informação. Uma possível explicação para esse resultado é a maior quantidade de informação do espectro MIR. Considerando as cinco primeiras componentes ainda se observava uma variância explicada de 2,1% para a quinta PC e um total de 97,62% (Tabela 4).

Tabela 4. Percentagem de variância capturada pelo modelo PCA com espectros MIR

Componente	Variância Explicada (%)	Variância Acumulada (%)
1	50,21	50,21
2	31,38	81,59
3	11,32	92,91
4	2,62	95,52
5	2,10	97,62

No MIR, considerando apenas as duas primeiras componentes, a distinção entre as marcas de stévia não foi aparente como nos dados do NIR, o que mostrou uma separação mais condizente com a composição supostamente pura desses edulcorantes. Houve uma discriminação satisfatória entre as classes de edulcorantes, cada um numa região diferente do gráfico de scores, diferente do que ocorreu no gráfico de scores dos espectros NIR (Figura 11) em que o grupo de xilitol e o grupo de stévia da marca 15 estão bastante próximos na região onde PC 2 é negativo.

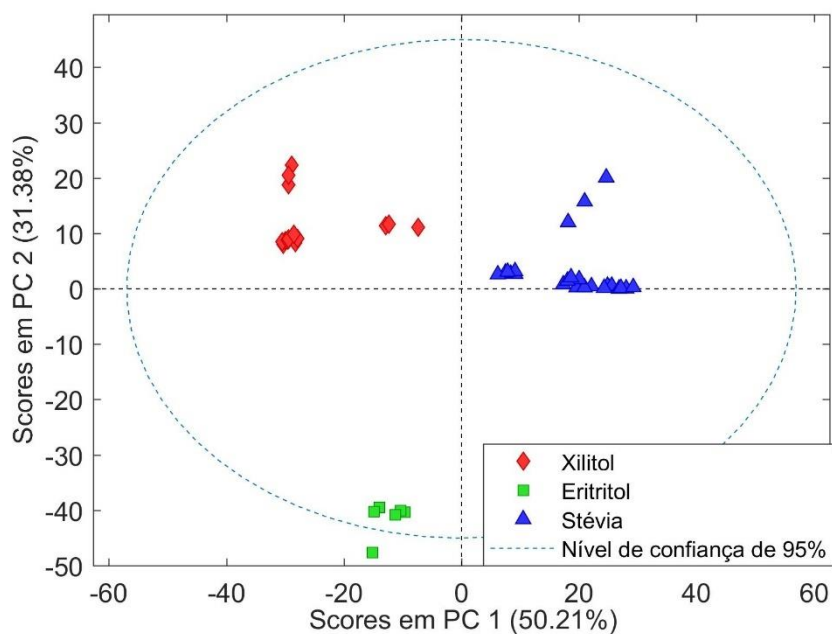


Figura 11. Scores em PC 1 e PC 2 obtidos com espectros MIR.

A análise de *loadings* da PC 1 revela que a variável de maior contribuição é a banda em  $1032\text{ cm}^{-1}$  decorrente do estiramento da ligação  $=\text{C-H}$ , presente nos glicosídeos de esteviol<sup>40</sup> (Figura 12). Contribuem também as bandas em  $744$  e  $856\text{ cm}^{-1}$  com valores negativos.

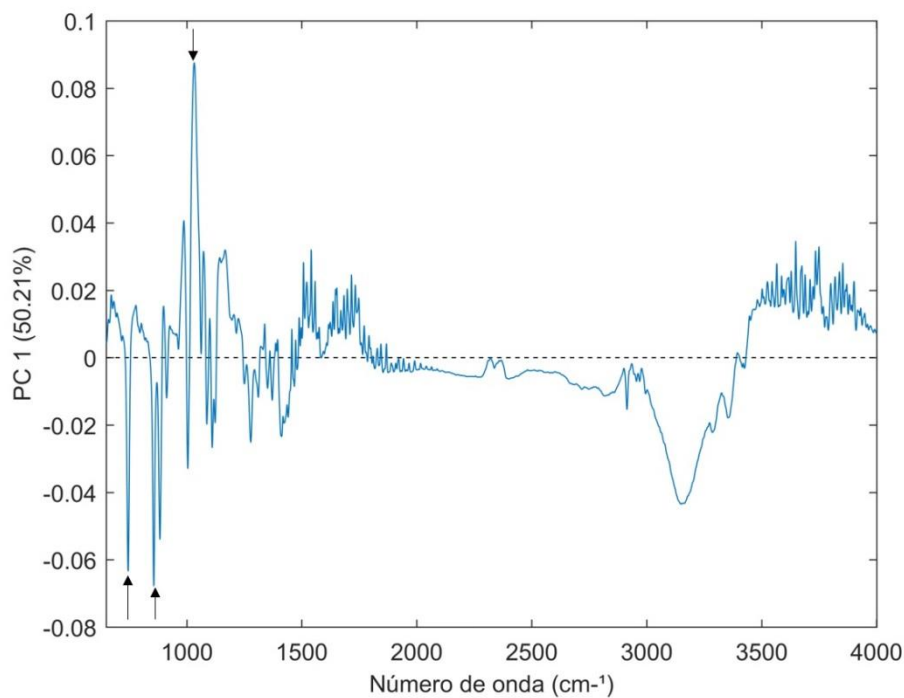


Figura 12. Gráfico de loadings da PC 1 no MIR.

Xilitol e eritritol apresentaram scores negativos nessa componente principal por possuírem valores negativos de absorbância normalizada na banda em  $1032\text{ cm}^{-1}$  (Figura 13).

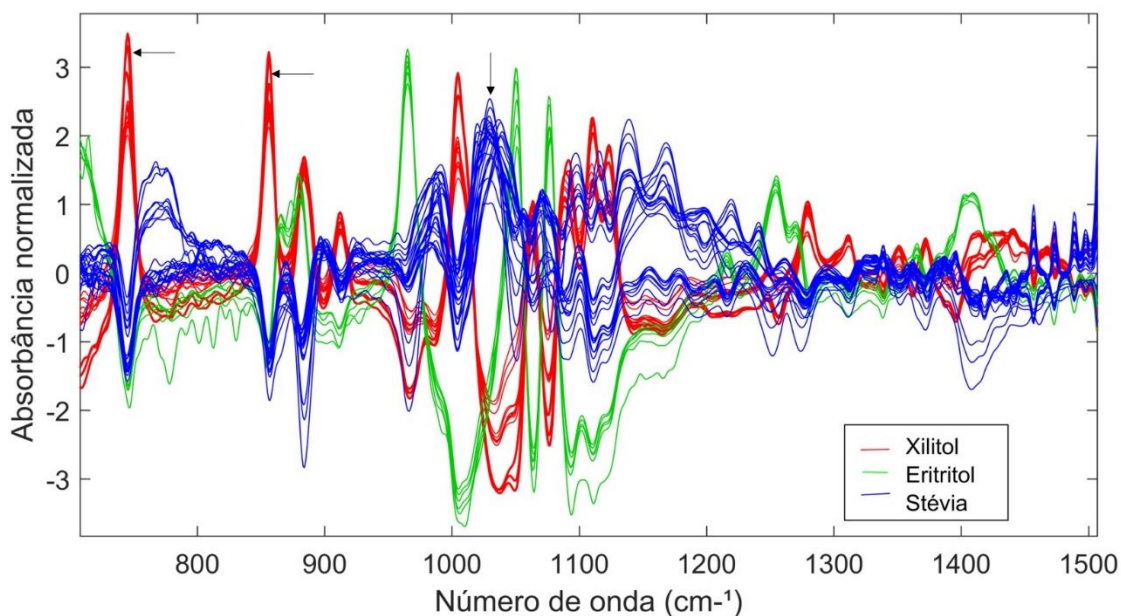


Figura 13.Região fingerprint ampliada.

Em PC 2 a banda em  $1006\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O<sup>40</sup>) foi a de maior peso, seguida pela banda  $1112\text{ cm}^{-1}$  (Figura 14). A única classe com score negativo em PC 2 foi o eritritol que teve absorbância normalizada negativa acentuada em  $1006\text{ cm}^{-1}$ , provavelmente devido a deslocamento da banda de estiramento C-O para um número de onda menor (Figura 15).



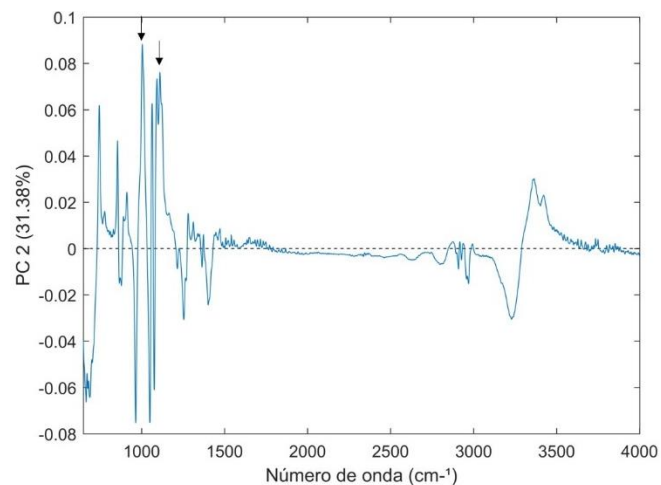


Figura 14. Gráfico de loadings da PC 2 no MIR.

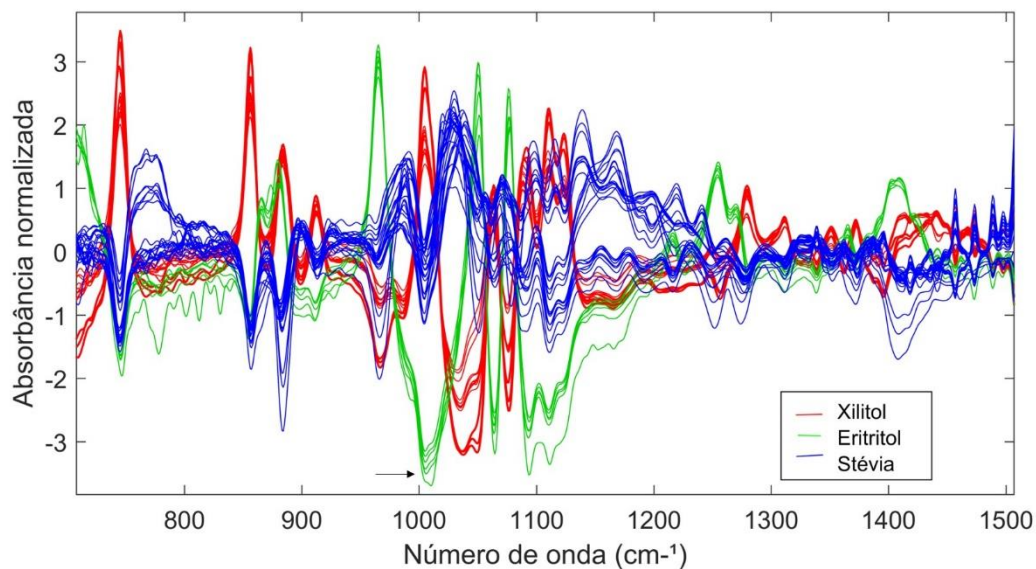


Figura 15. Região fingerprint ampliada.

Na componente principal 3 houve distinção entre a marca 14 de stévia das marcas 15 e 16 (Figura 16), nessa componente ocorre uma divisão do grupo desse edulcorante em que apenas a marca 14 apresentou scores positivos.

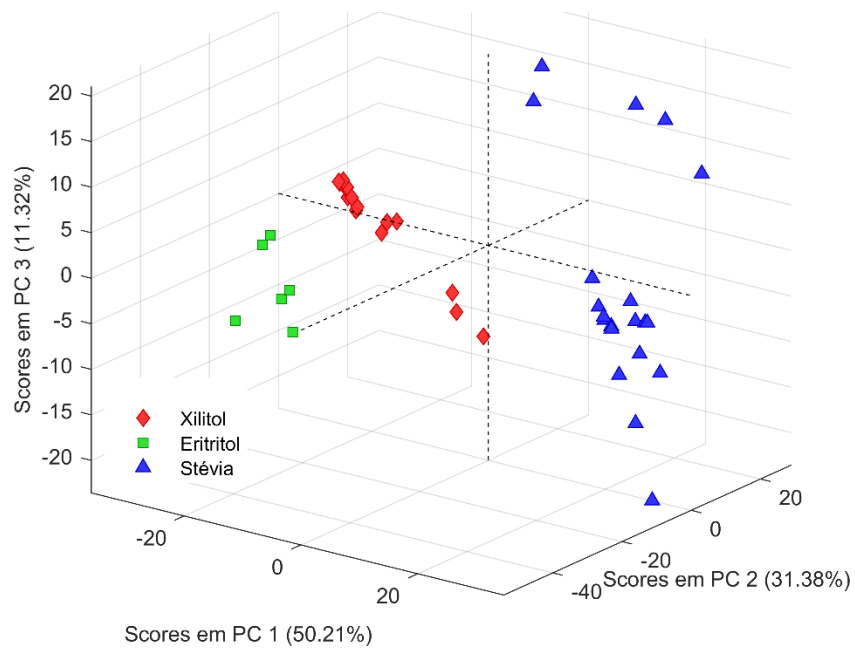


Figura 16. Scores nas três primeiras PCs obtidos com espectros no MIR.

Sugere-se que a banda em  $1542\text{ cm}^{-1}$ , que tem peso negativo na PC 3, foi a responsável por essa distinção (Figura 17), visto que a absorbâncias normalizada da marca 14 nessa banda é negativa e para as marcas 15 e 16 é positiva.

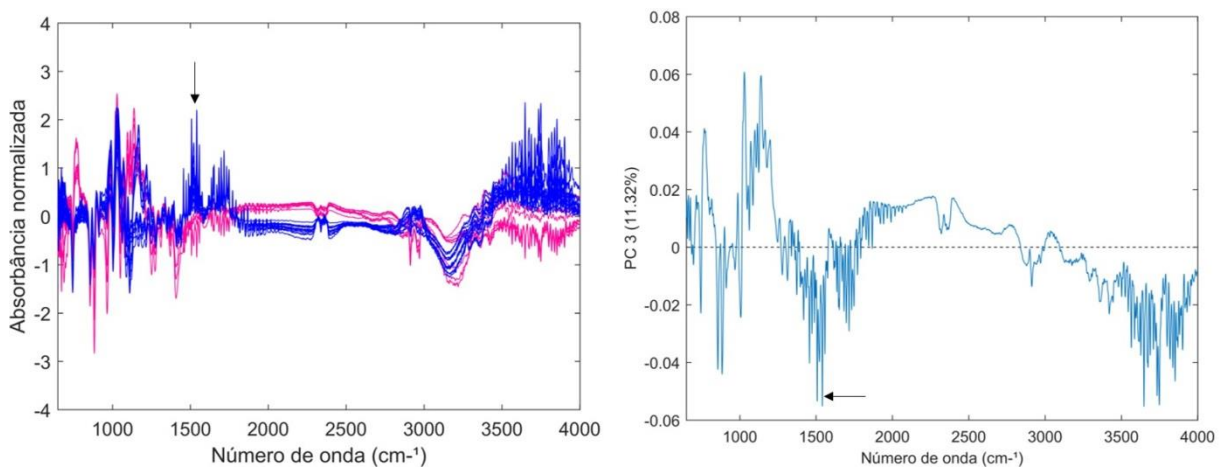


Figura 17. À esquerda os espectros MIR pré-processados das marcas 14 (rosa), 15 e 16 (azul) de stévia; à direita o gráfico de loadings da PC 3 no MIR.

A partir dos resultados da análise exploratória por PCA confirmou-se que é possível desenvolver um método de classificação DD-SIMCA capaz de distinguir as três

classes de edulcorantes naturais utilizando dados espectrais de infravermelho médio e próximo.

#### **4.2 VARIABILIDADE DOS EDULCORANTES COMERCIAIS**

As Figura 18 e 19 apresentam os espectros dos padrões e os espectros médios de cada marca de edulcorante utilizados na fase de treinamento. Observa-se que os espectros no MIR apresentam maior ruído quando comparados ao NIR, isso se deve provavelmente a ranhuras na superfície do cristal de ZnSe e à provável umidade presente nas amostras que produz a banda próxima a  $1700\text{ cm}^{-1}$  e acima de  $3500\text{ cm}^{-1}$  referentes ao dobramento H-O-H e estiramento da ligação OH da água <sup>56</sup>. Nota-se também que os espectros de xilitol e eritritol no NIR e no MIR são muito similares ao espectro do reagente padrão, o que é indicativo da maior pureza desses edulcorantes.

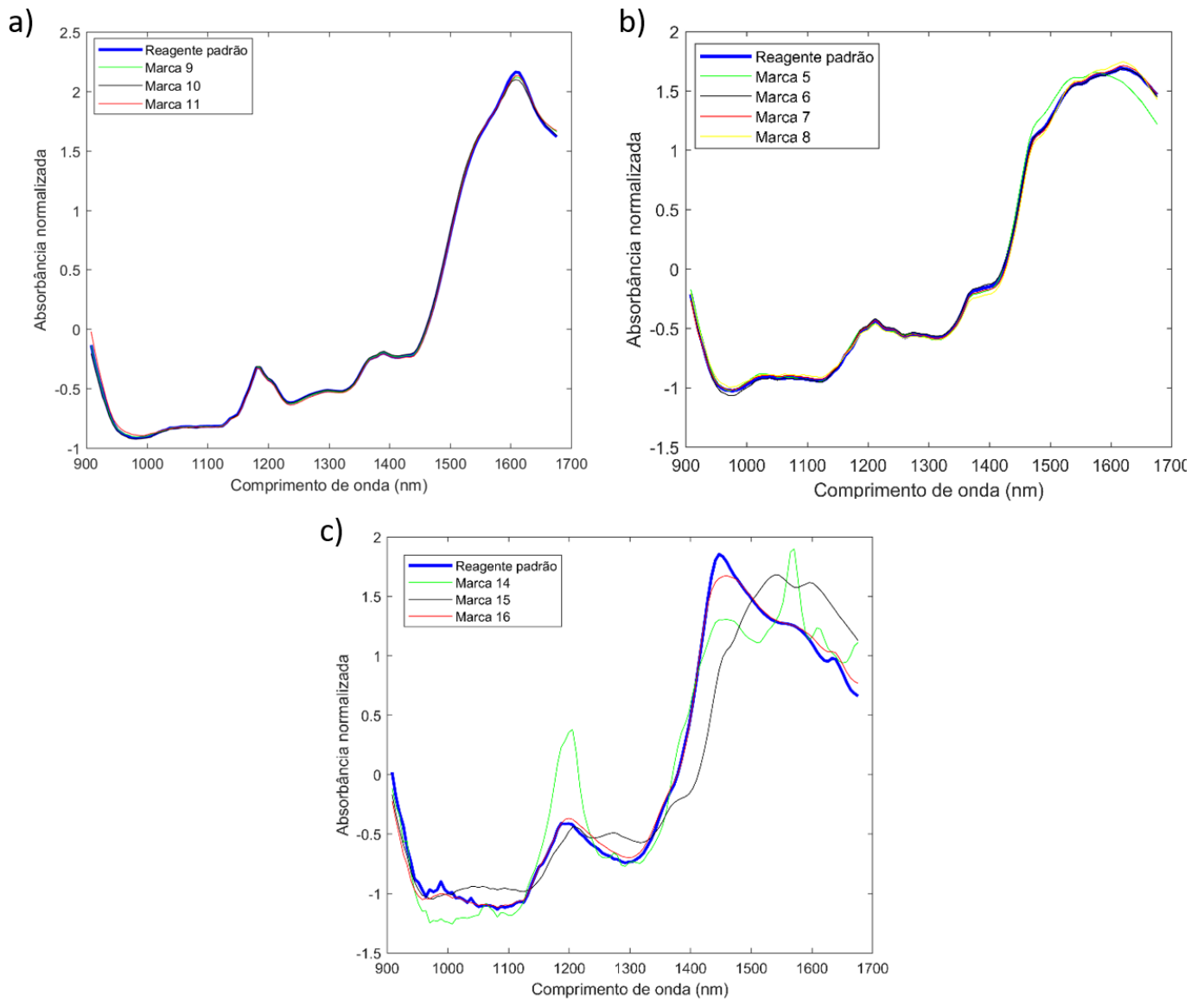


Figura 18. Espectros médios no NIR das marcas de treinamento juntamente com espectro do reagente padrão em azul. a) Eritritol, b) Xilitol, c) Stévia.

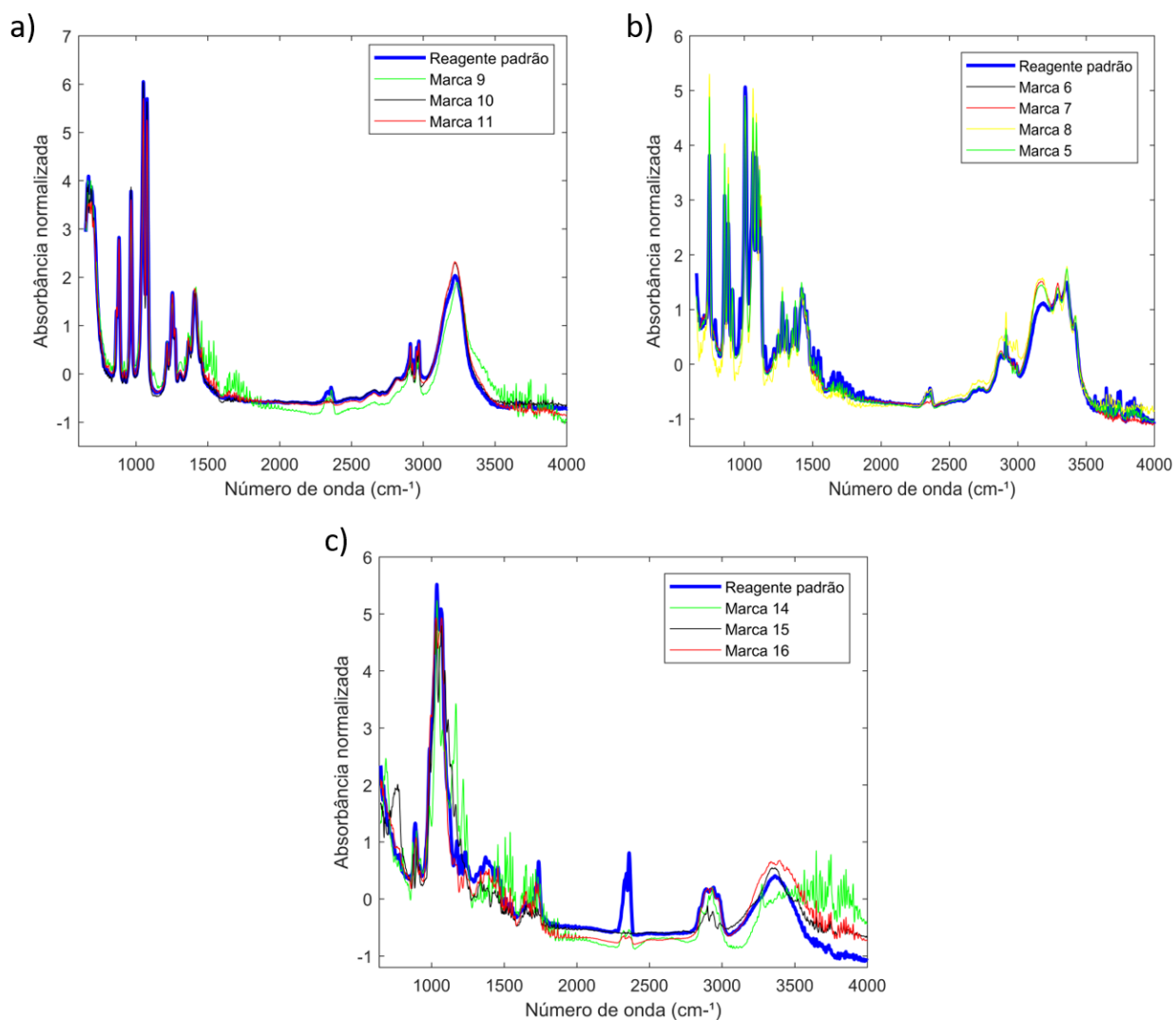


Figura 19. Espectros médios no MIR das marcas de treinamento juntamente com espectro do reagente padrão em azul. a) Eritritol, b) Xilitol, c) Stévia.

Além da maior similaridade espectral entre padrão e amostras, para xilitol e eritritol foi possível obter uma amostragem que fosse mais representativa, visto que o espectro se manteve sem mudanças significativas, mesmo com diferentes marcas e até diferenças no tamanho de partícula, já que as amostras de xilitol possuíam no conjunto de treinamento amostras refinadas e amostras do tipo cristal (Figura 20).



Figura 20. Amostras de treinamento de xilitol, marca 5 do tipo cristal (superior) e marca 8 do tipo refinada (inferior).

Para a stévia pode-se observar a existência de bandas espectrais diferentes (7c e 8c) entre os espectros do reagente padrão e entre as diferentes marcas. Isso ocorre porque esse edulcorante é o único dos três analitos que é composto por várias moléculas, os glicosídeos de esteviol. O teor dessas moléculas nos extratos de *Stevia rebaudiana Bertoni* pode variar por diferenças no cultivo, colheita da planta e também de acordo com o método de extração empregado<sup>26,57</sup>. Por esse motivo há uma heterogeneidade nas amostras desse edulcorante que exibem não só aspectos físicos distintos (Figura 21) mas também não possuem um único perfil espectral, o que torna a classificação *one-class* mais desafiadora. Ainda assim, a seleção de região espectral e a utilização de padrões virtuais auxiliou na modelagem dos dados de stévia, conforme será detalhado nas seções seguintes.



Figura 21. Amostras de treinamento de stévia, marca 14 (superior) e marca 15 (inferior).

### **4.3 USO DOS PADRÕES VIRTUAIS E CONSTRUÇÃO DO MODELO DD-SIMCA**

A Tabela 5 apresenta o desempenho dos modelos DD-SIMCA, em termos da taxa de eficiência, com e sem o uso de padrões virtuais. De forma geral, foi observado um aumento nas taxas de eficiência com o uso de padrões virtuais.

Tabela 5. Taxas de eficiência dos modelos com e sem a utilização de amostras virtuais.

Classe de edulcorante	Região do infravermelho	Amostras virtuais	Taxa de eficiência (%)
Eritritol	NIR	Não	67,6
Eritritol	NIR	Sim	95,9
Eritritol	MIR	Não	90,0
Eritritol	MIR	Sim	98,0
Stévia	NIR	Não	60,5
Stévia	NIR	Sim	76,8
Stévia	MIR	Não	87,3
Stévia	MIR	Sim	90,3
Xilitol	NIR	Não	98,3
Xilitol	NIR	Sim	97,5
Xilitol	MIR	Não	0,0
Xilitol	MIR	Sim	94,5

Como exemplo para justificar e detalhar esse resultado será utilizado o conjunto de dados de eritritol obtidos no NIR. A Figura 22 apresenta espectros de treinamento reais em azul, espectros de treinamento virtuais em ciano e espectros de validação de eritritol em vermelho. Comparando-se a Figura 22a e 11b pode-se observar um aumento da dispersão proporcionada pelas amostras virtuais. Devido a isso, ambos os limites de aceitação e de outliers aumentaram e a área de aceitação do modelo DD-SIMCA se expandiu. Isso pode ser demonstrado pela comparação das figuras 22c e 22d, em que as amostras reais próximas ao



limite de aceitação na Figura 22c são deslocadas para baixo no gráfico de aceitação da Figura 22d, os limites no gráfico porém não mudam visto que os eixos são normalizados por  $h_0$  e  $v_0$ .

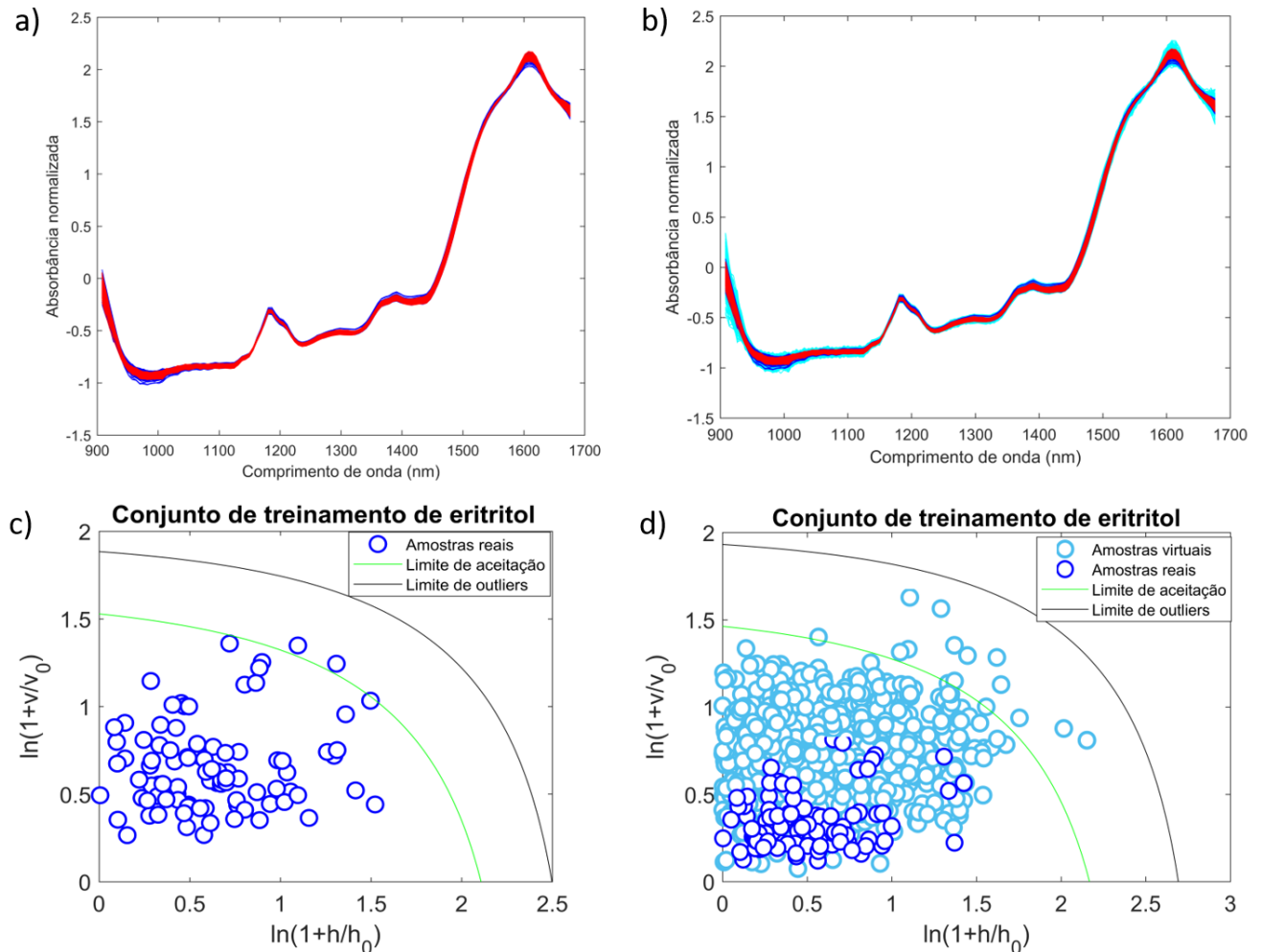


Figura 22. Conjuntos de treinamento e validação de eritritol no NIR: a) Espectros reais de treinamento em azul e espectros autênticos de validação em vermelho. b) Inclusão dos espectros virtuais de treinamento em ciano. Gráficos de aceitação de treinamento de eritritol: c) Amostras reais d) Amostras reais e virtuais.

Como resultado obteve-se a diminuição da TFN para todos os edulcorantes, tanto no NIR quanto no MIR. Para o eritritol no NIR, a redução de TFN contribuiu para um aumento de quase 30% da TEF. Entretanto, como desvantagem da expansão, amostras não autênticas, anteriormente classificadas corretamente, ultrapassaram o limite de aceitação para alguns casos, resultando em um aumento na TFP. Essa situação foi observada para stévia e xilitol no NIR com aumento de TFP para 40% e 8%, respectivamente. Apesar disso, considerando todos os edulcorantes, a inclusão de padrões virtuais resultou em menores erros de classificação. Ademais, dado o contexto de análise forense, a redução da TFN foi

priorizada porque diminui a probabilidade de classificar indevidamente uma amostra autêntica como não autêntica, conclusão que em um caso real de fiscalização poderia levar a autuar uma marca por comercializar produtos fora da conformidade ou não autênticos.

Para a construção dos modelos DD-SIMCA, o número de componentes principais foi escolhido de forma a minimizar o número de amostras extremas no conjunto de treinamento (número de falsos negativos). Duas PCs foram suficientes para xilitol e eritritol, já para a stévia, foram necessárias três PCs, devido a variabilidade na composição dos glicosídeos de esteviol. Todos os modelos foram construídos a um nível de confiança de 99%.

#### **4.4 RESULTADOS DA CLASSIFICAÇÃO DE EDULCORANTES POR NIR**

A Figura 23 mostra os espectros médios na região do NIR de eritritol, xilitol e stévia pré-processados com SNV. Diferenças nas bandas podem ser observadas em 1200 nm (segundo *overtone* da ligação C-H), próximo de 1400 nm (combinação do primeiro *overtone* das ligações CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>) e em 1600 nm (primeiro *overtone* da ligação CH<sub>2</sub>)<sup>55</sup>. Observando todo o conjunto de dados notou-se que os extremos dos espectros apresentaram maior variação aleatória e risco de saturação de sinal (extremos inferior e superior), respectivamente. Por essas razões, para minimizar os erros de classificação, a região entre 995 e 1440 nm foi escolhida para a análise. Além disso, pode-se observar a inexistência de bandas características para cada um dos analitos, o que impede a aplicação de uma análise univariada. Contudo, apesar dessa sobreposição de sinais, os espectros apresentam diferenças significativas que sugerem que uma análise multivariada deve distinguir facilmente esses edulcorantes.

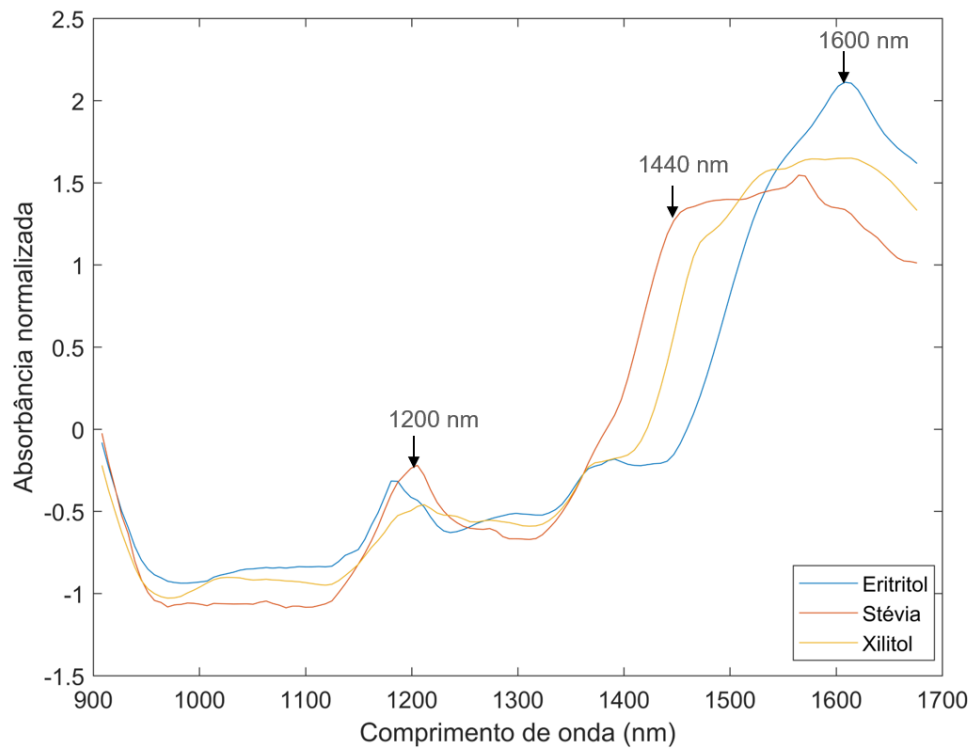


Figura 23. Espectros de treinamento médios no NIR.

Os gráficos de aceitação das matrizes de treinamento são apresentados na Figura 24. Apenas o eritritol apresentou um espectro anômalo (*outlier*) que foi excluído do modelo. Observa-se que as amostras reais em azul escuro estão concentradas na parte inferior do gráfico e que as amostras virtuais em azul claro ampliaram bastante o limite de aceitação (linha verde) por apresentarem maior dispersão e consequentemente maiores  $T^2$  e  $Q$ .

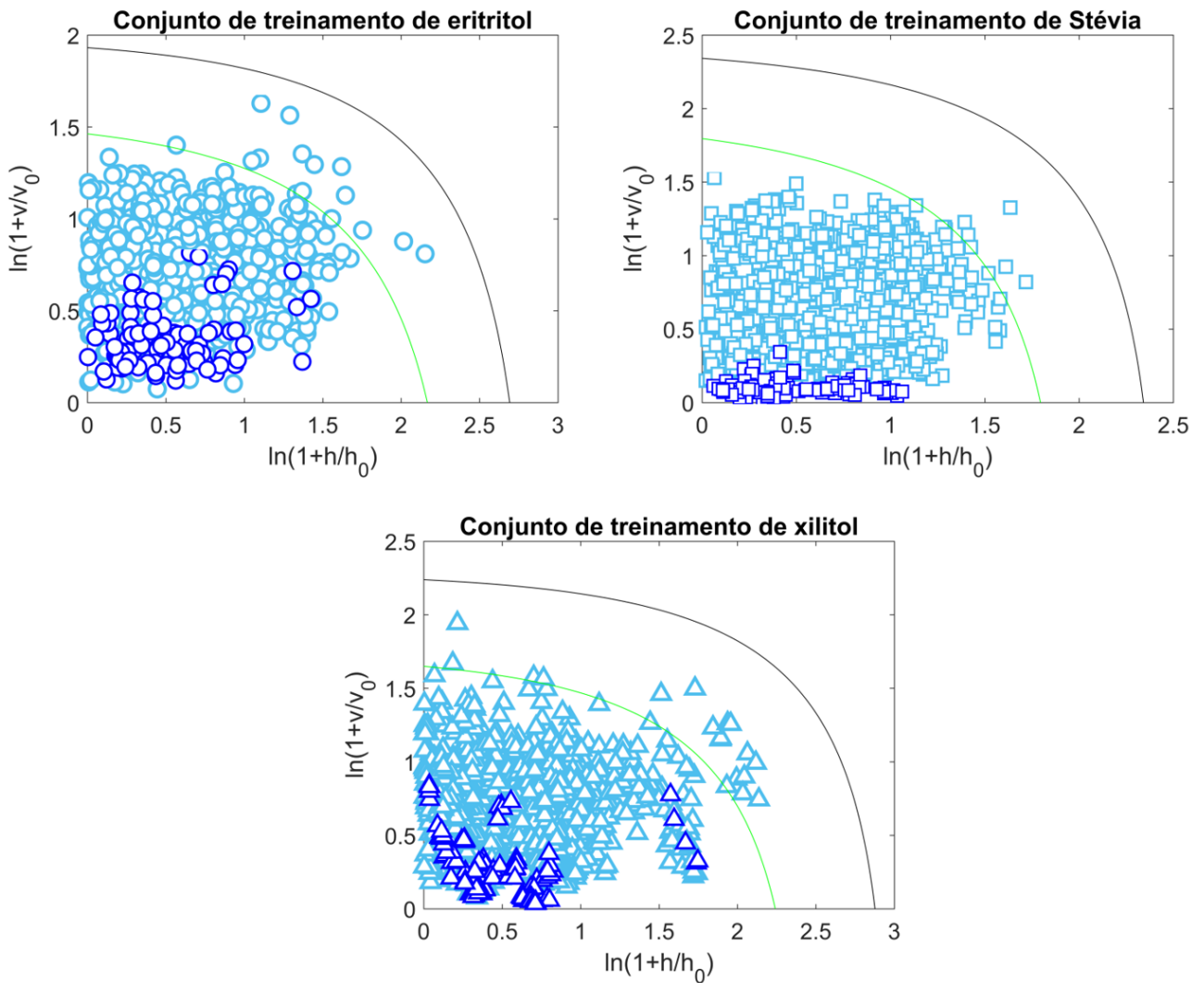


Figura 24. Gráficos de aceitação dos conjuntos de treinamento no NIR. Em azul escuro amostras de treinamento reais, em ciano amostras de treinamento virtuais.

Como descrito anteriormente, o primeiro teste de validação do modelo DD-SIMCA de cada analito consistiu em analisar as amostras de treinamento dos outros dois analitos. Como essas matrizes são compostas por amostras puras de edulcorantes comerciais, e os espectros são relativamente diferentes (Figura 23), essa validação corresponde à situação mais simples. Por essa razão, não foram observados erros falso positivo (Figura 25), todas as amostras foram corretamente classificadas como não autênticas para todos os edulcorantes naturais. No conjunto de stévia é possível ver a divisão de dois grupos de amostras em que o mais distante é o de eritról e o mais próximo do limite de aceitação é o grupo de amostras de xilitol. Essa maior distância das amostras de eritról pode ser atribuída à maior diferença

espectral em relação às amostras de stévia, principalmente na região próxima a 1440 nm (Figura 23).

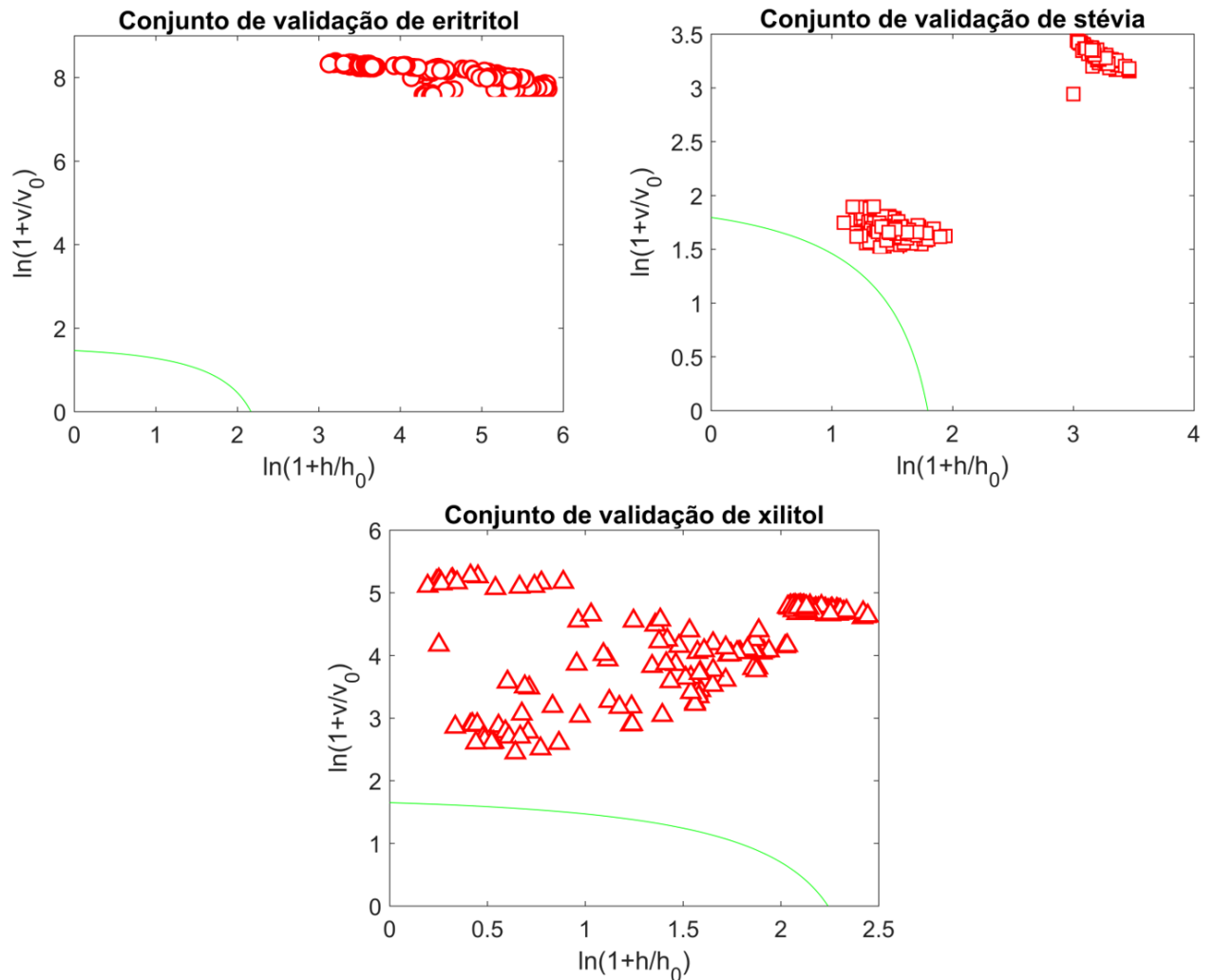


Figura 25. Gráficos de aceitação da matriz de validação 1 no NIR.

A Figura 26 apresenta os gráficos de aceitação do conjunto de validação 2, composto por amostras adulteradas. Esse foi o único conjunto de validação que apresentou erros de falso positivo no NIR. De forma geral, os resultados confirmaram a tendência esperada de que à medida que a concentração do adulterante aumenta, maior é a probabilidade da amostra ser considerada um verdadeiro negativo e ter uma maior distância do limite de aceitação da classe alvo.

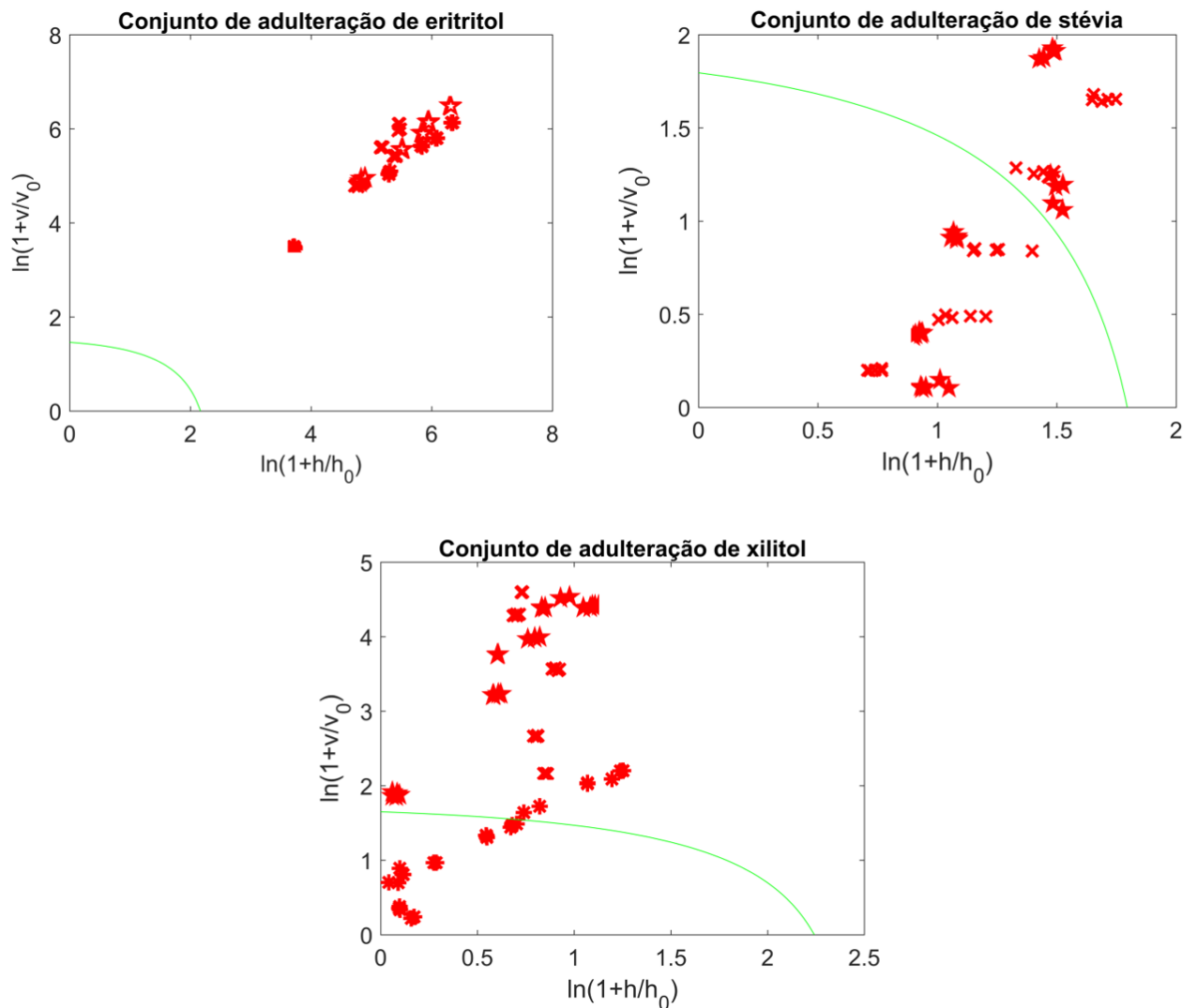


Figura 26. Gráfico de aceitação da matriz de adulteração no NIR. Amostras adulteradas com acessulfame-K (★), sacarina (×) e sacarose(✱)

Por não possuir um perfil espectral único, a stévia foi a classe com piores resultados dessa matriz de validação, com TFP de 60%. Devido a maior variação existente entre as marcas do conjunto de treinamento tem-se um limite de aceitação mais amplo, que acaba permitindo que as concentrações menores de adulterante sejam classificadas como autênticas ou positivo. Metade das amostras adulteradas com sacarina e acessulfame-K apresentaram erros de falso positivo. Especificamente, as amostras com ACS nos três primeiros níveis de concentração, isto é, 10 a 30 % (m/m), de perfil espectral pouco distinto do edulcorante puro (Figura 27a). Também foram incorretamente classificadas amostras com SAC a 7,5, 15 e 22,5% (m/m), apesar da existência de bandas diferentes nas amostras adulteradas (Figura 27b). As demais adulterações de stévia foram se distanciando da área da

aceitação conforme a concentração de adulerante aumentava. Destaca-se que foram adulteradas diferentes marcas de treinamento de stévia, a marca 14 foi adulterada com ACS e a marca 15 foi adulterada com SAC, por essa razão os espectros puros da Figura 27 são distintos.

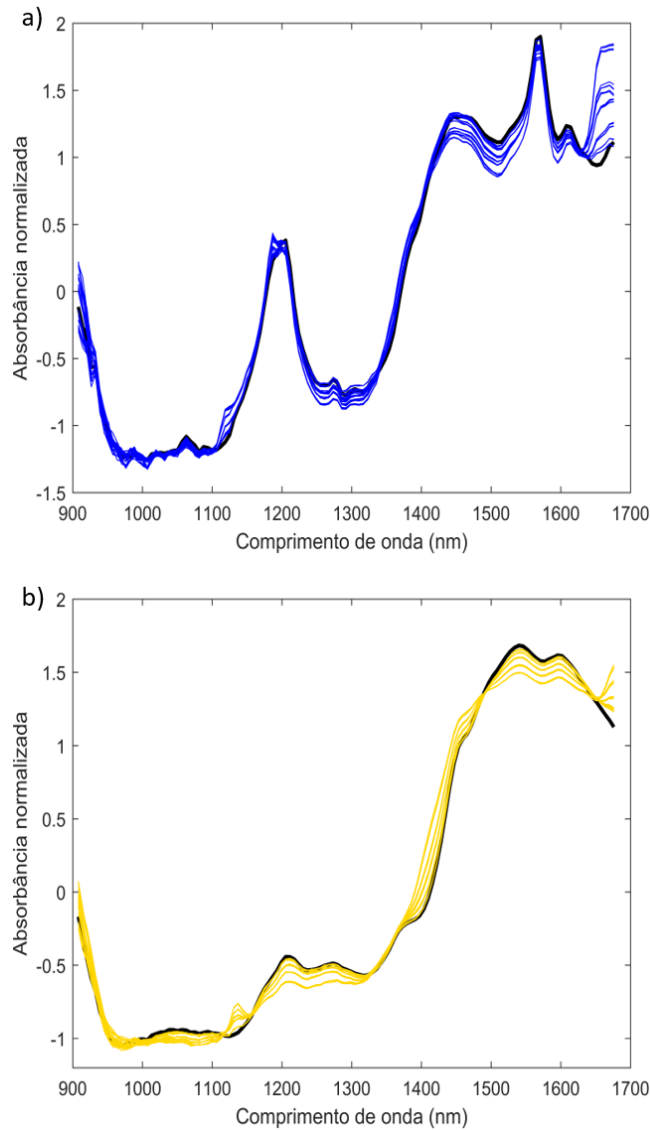


Figura 27. Espectros no NIR do edulcorante de stévia puro (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS e b) SAC.

Todas as amostras de eritritol adulteradas ficaram fora da área de aceitação. Por ser o edulcorante com perfil espectral mais bem definido, qualquer alteração na composição da amostra consegue ser identificada pelo modelo. Já o xilitol apresentou TFP de 27%, sendo que todos os erros se concentraram no adulerante sacarose. Portanto, todas as amostras de xilitol e eritritol adulteradas com ACS e SAC foram corretamente classificadas,

inclusive as que continham baixas concentrações de SAC e ACS, como 0,02% (m/m) de SAC e 0,04% (m/m) de ACS. Contudo, como o espectrofotômetro NIR não é capaz de identificar reagentes com concentrações tão baixas, atribui-se esse resultado à presença do SiO<sub>2</sub>, que completa a massa dessas amostras adulteradas com ACS e SAC. Conforme mostram as Figuras 28 e 29, as amostras adulteradas com SAC e ACS apresentam uma banda próxima a 1420 nm, comparando-se esses espectros com o do dióxido de silício na Figura 30, vê-se que essa é uma banda característica dessa molécula. Portanto, a banda de SiO<sub>2</sub> em 1420 nm é a responsável pela identificação de amostras não puras de eritritol e xilitol contendo SAC ou ACS e SiO<sub>2</sub>.



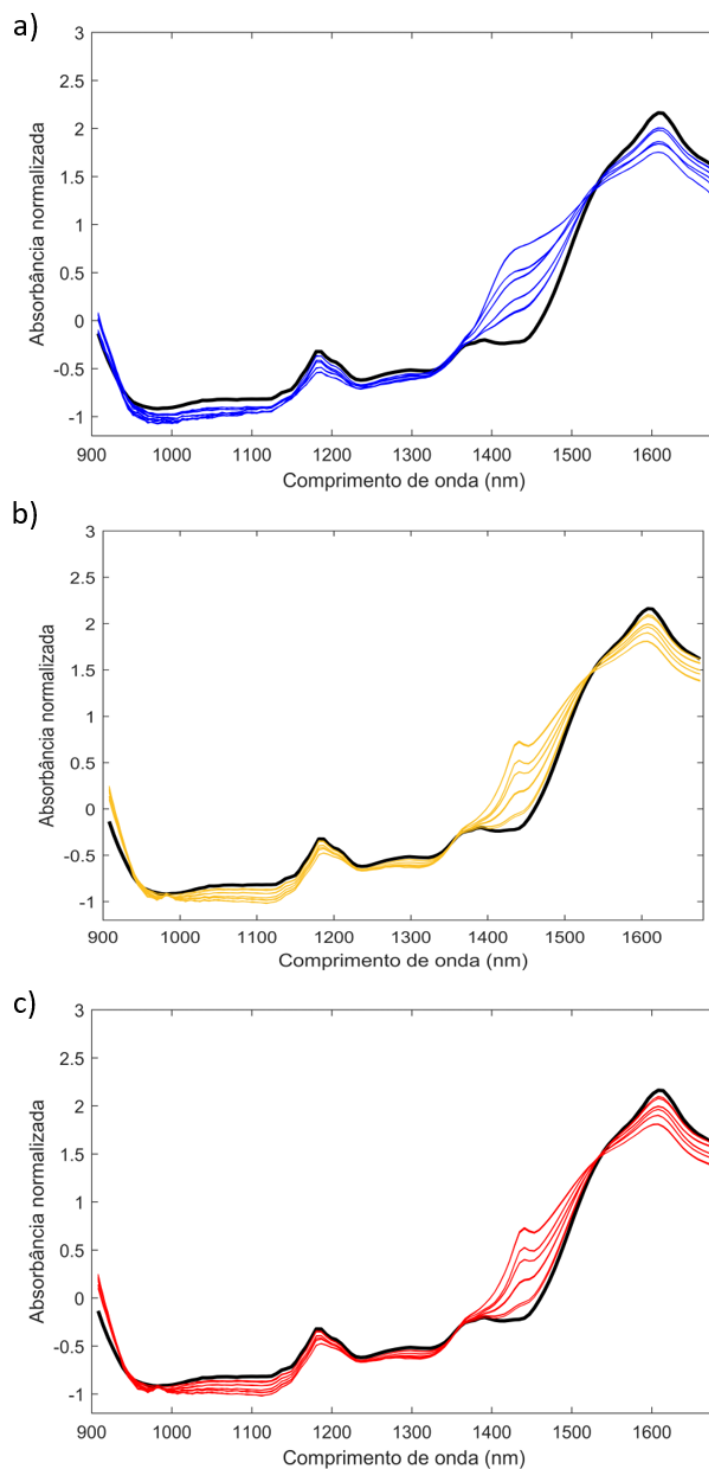


Figura 28. Espectros no NIR do padrão de eritritol (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS, b) SAC e c) Sacarose.

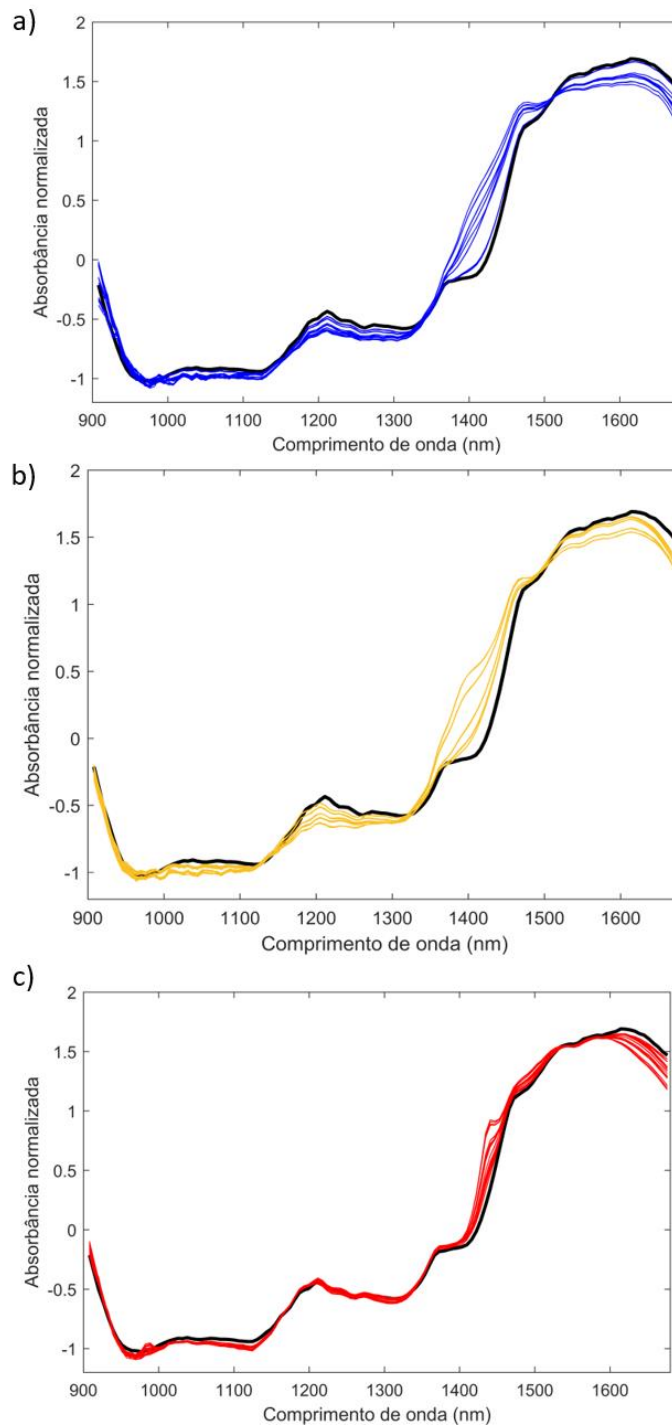


Figura 29. Espectros no NIR do padrão de xilitol (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS, b) SAC e c) Sacarose.

Já o falso positivo da sacarose nas amostras de xilitol, é explicado ao se comparar os perfis espectrais de xilitol e dos adulterantes. Na Figura 30 é possível ver que o ACS apresenta bandas em 1200 e 1400 nm que diferem muito dos sinais de xilitol, a SAC também apresenta um sinal distinto e intenso próximo a 1150 nm. Já a sacarose possui um

espectro mais semelhante ao do xilitol na região entre 995 e 1440 nm, o que facilita a ocorrência de erros FP em menores concentrações desse adulterante.

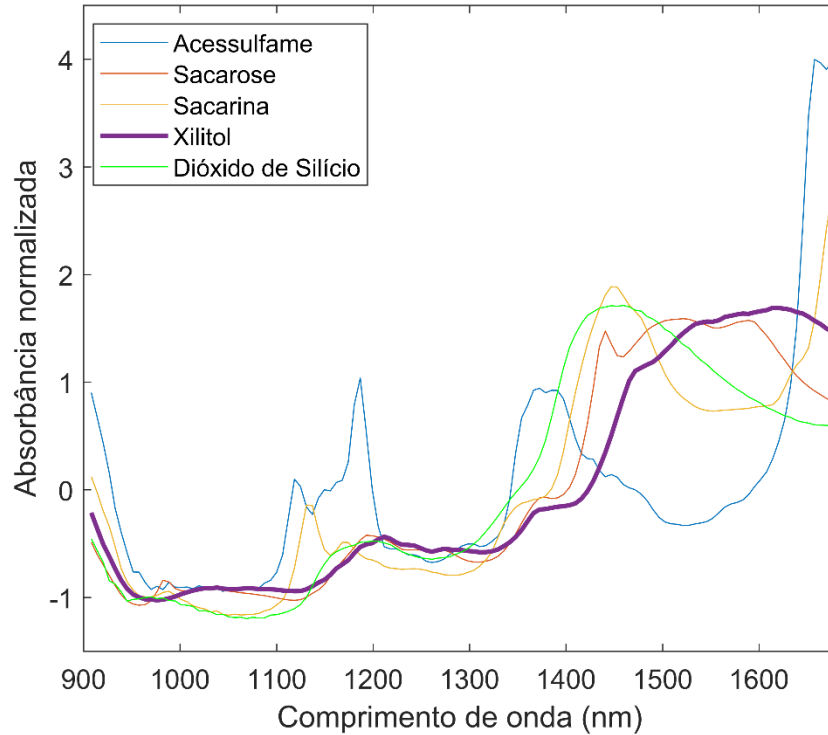


Figura 30. Espectros de xilitol e seus adulterantes no NIR.

Na matriz de validação 3, apenas o xilitol não apresentou erros FN (Figura 31). Esse resultado provavelmente se deve a esse edulcorante ter um conjunto de treinamento com maior número de marcas e que ainda possui duas formas de apresentação, refinadas e cristal. Logo, as amostras de treinamento foram capazes de englobar a variabilidade das amostras de validação autênticas.

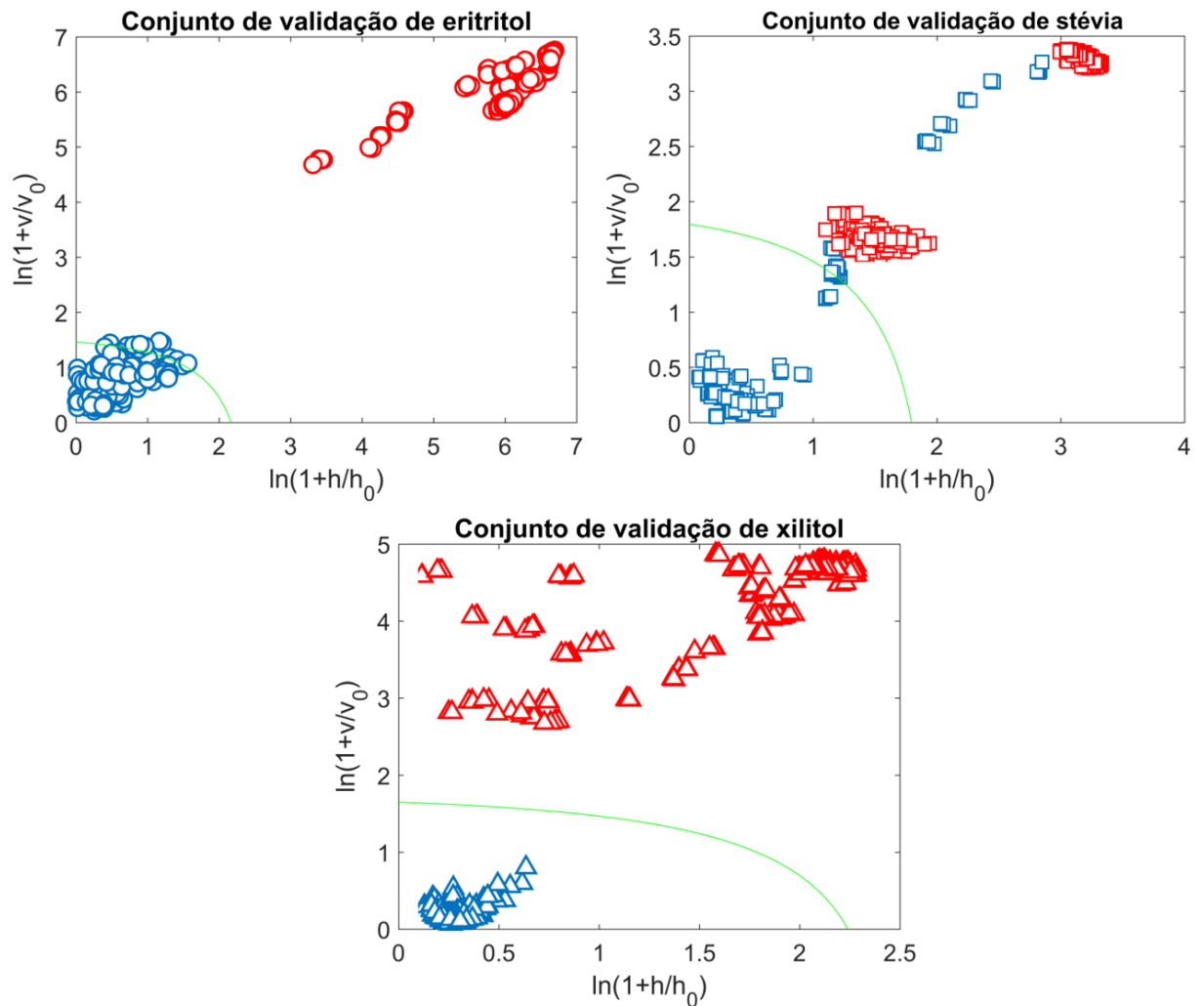


Figura 31. Gráfico de aceitação da matriz de validação 3 no NIR: as amostras da classe-alvo em azul e as amostras de outras classes em vermelho.

O eritrólito apresentou TFN de 8% enquanto que a stévia apresentou uma TFN de quase 36%, o que se justifica pela heterogeneidade das amostras de stévia em razão da variedade de glicosídeos de esteviol como descrito na seção 4.1. Portanto, para o edulcorante stévia é necessário a inclusão de um número maior de marcas na fase de treinamento para garantir que a variabilidade presente nas diferentes marcas existentes no mercado estejam contempladas na base de dados do modelo.

#### 4.5 RESULTADOS DA CLASSIFICAÇÃO DE EDULCORANTES POR MIR

Para as matrizes de stévia a região de *fingerpint* de 800 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 32) foi selecionada, já nas matrizes de xilitol e eritrólito, foi selecionada a região 986 a 1440  $\text{cm}^{-1}$  por apresentar uma maior concordância entre os espectros das marcas utilizadas na fase

de treinamento e maior distinção entre os espectros desses adoçantes com os outros analitos e adulterantes avaliados.

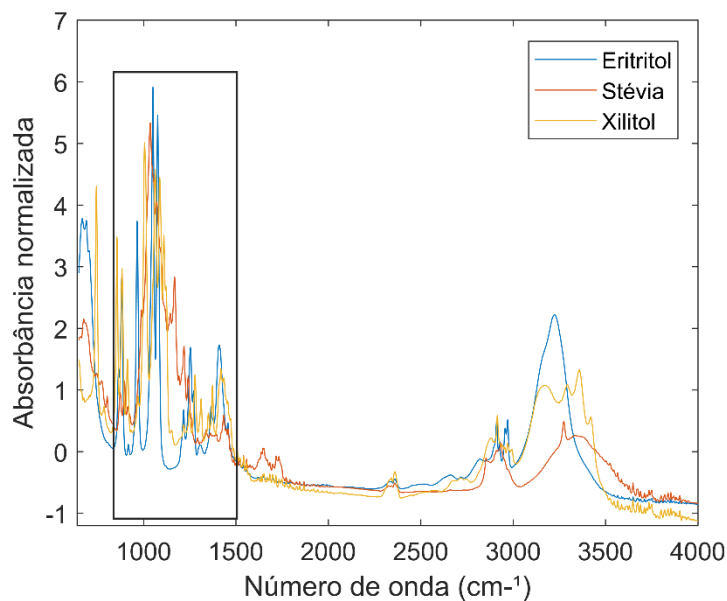


Figura 32. Espectros dos adoçantes no MIR, em destaque, região fingerprint.

Na figura 33 é possível observar as bandas distintas dos adoçantes. Eritritol apresenta absorbância intensa próximo a  $960\text{ cm}^{-1}$  e dois sinais em  $1050$  e  $1071\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-C-O). A stévia possui um sinal intenso em  $1050\text{ cm}^{-1}$  proveniente de estiramento assimétrico C-O-C-O-C e o xilitol tem picos de alta absorbância próximo a  $1000\text{ cm}^{-1}$  e duas bandas em  $1100\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-C-O)<sup>58</sup>. Como esperado, a distinção entre os espectros dos três analitos na região do MIR é bem mais nítida do que a observada no NIR.

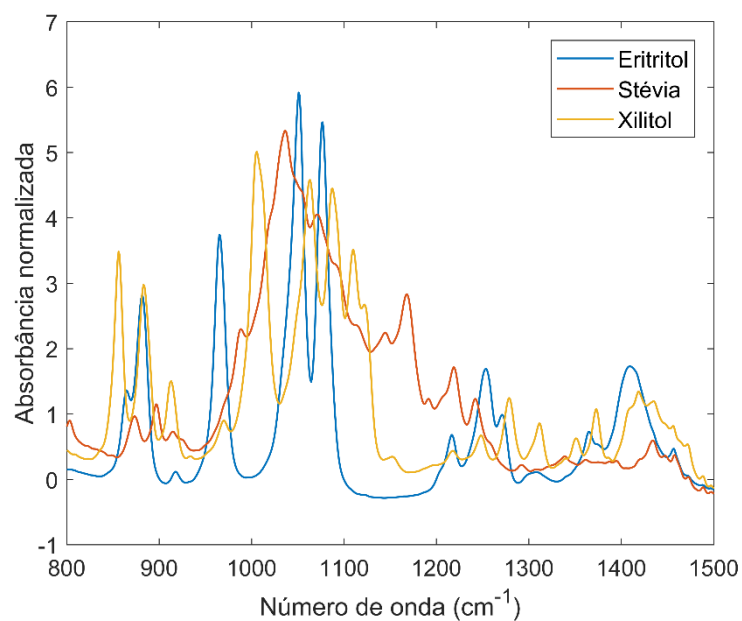


Figura 33. Espectros médios do conjunto de treinamento no MIR de eritritol, stévia e xilitol na região de fingerprint.

Os gráficos de aceitação do conjunto de treinamento são apresentados na Figura 34. Nenhum edulcorante apresentou amostras anômalas. Diferentemente do NIR, nota-se que aqui há mais amostras reais (azul-escuro) classificadas como extremas (amostras fora da área de aceitação mas que não são *outliers*), sugere-se que isso se deve ao maior ruído do equipamento MIR. Como informado anteriormente, esse maior ruído se deve provavelmente a ranhuras no cristal de ZnSe do acessório de ATR.

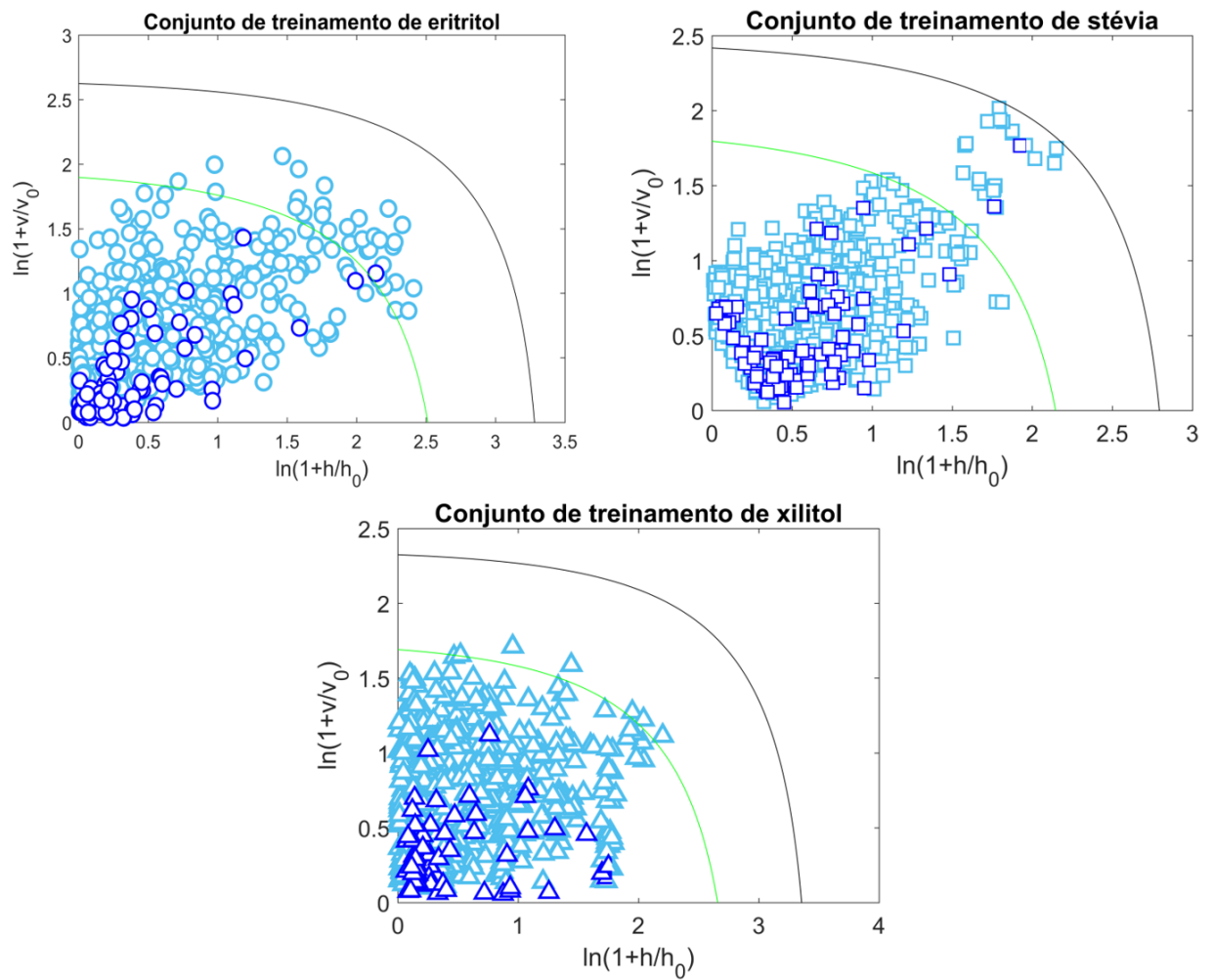


Figura 34. Gráficos de aceitação dos conjuntos de treinamento no MIR. Em azul escuro amostras de treinamento reais, em ciano amostras de treinamento virtuais.

Todas as amostras de validação 1, isto é, amostras de treinamento da classe não-alvo, foram corretamente classificadas fora da área de aceitação (Figura 35), como esperado pela seleção da região espectral.

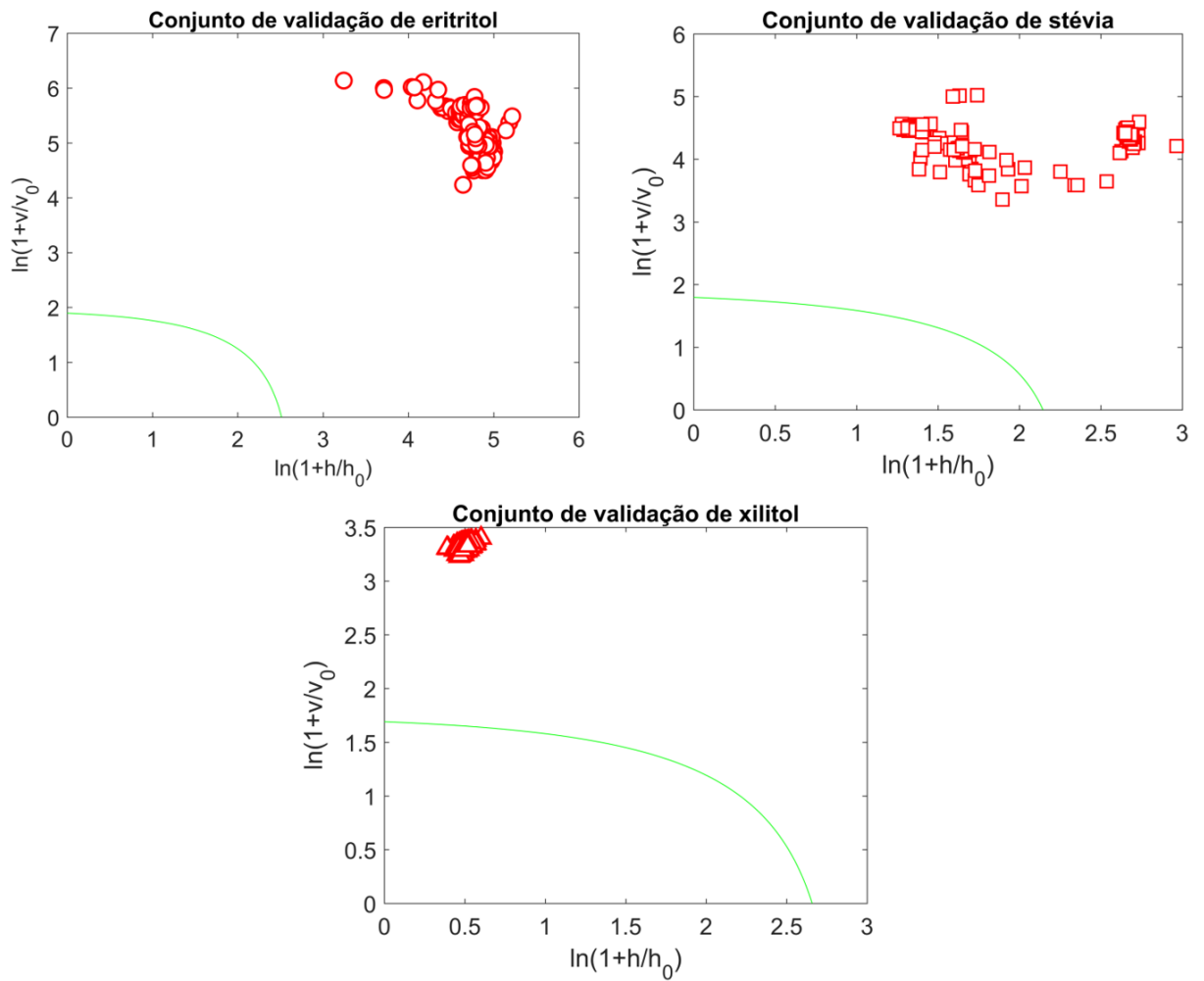


Figura 35. Gráfico de aceitação da matriz de validação 1 no MIR.

No conjunto de adulteração, somente as amostras de stévia apresentaram erros FP (Figura 36), com 50% das amostras adulteradas classificadas incorretamente como autênticas, sendo as misturas com ACS de 10 a 40% (m/m) e a mistura menos concentrada de SAC, 7,5% (m/m).



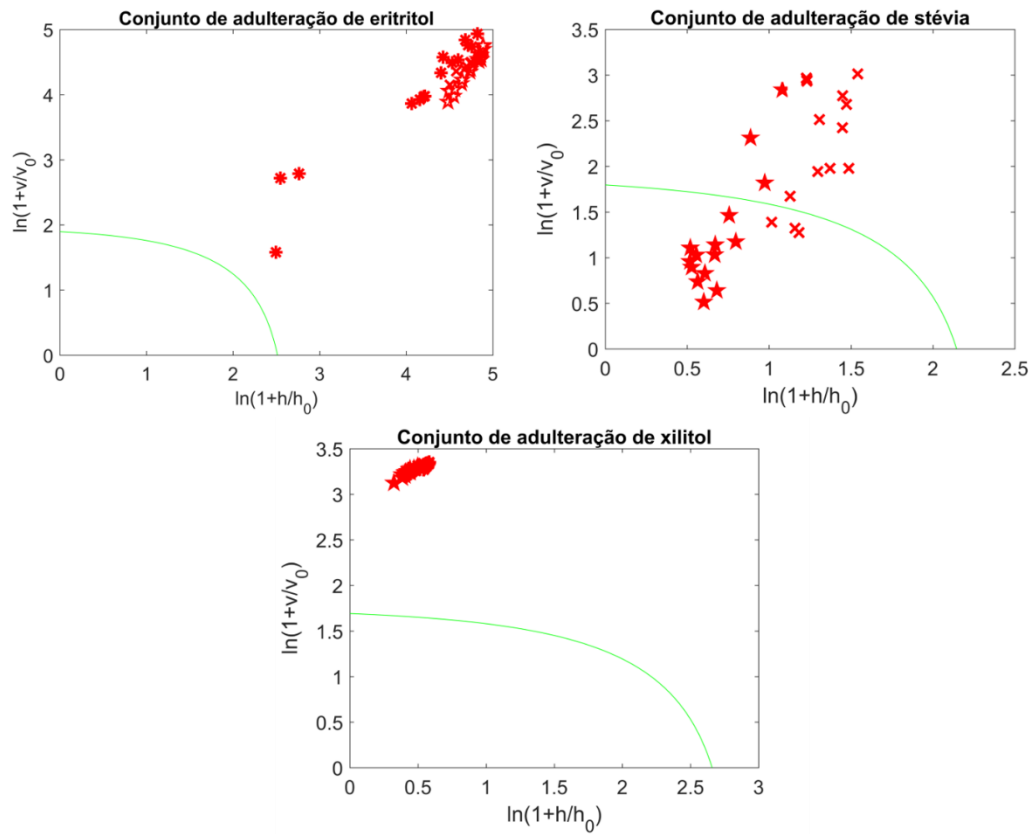


Figura 36. Gráfico de aceitação da matriz de adulteração no MIR. Amostras adulteradas com acesulfame-K (★), sacarina (×) e sacarose (✱).

Nota-se na Figura 37 que a adição de ACS à amostra de stévia não alterou o perfil espectral do edulcorante, já o adulterante SAC, foi capaz de mudar a banda mais intensa da stévia na região fingerprint em  $1000\text{ cm}^{-1}$ , por isso misturas com ACS tiveram maiores resultados FP comparadas as misturas com SAC.

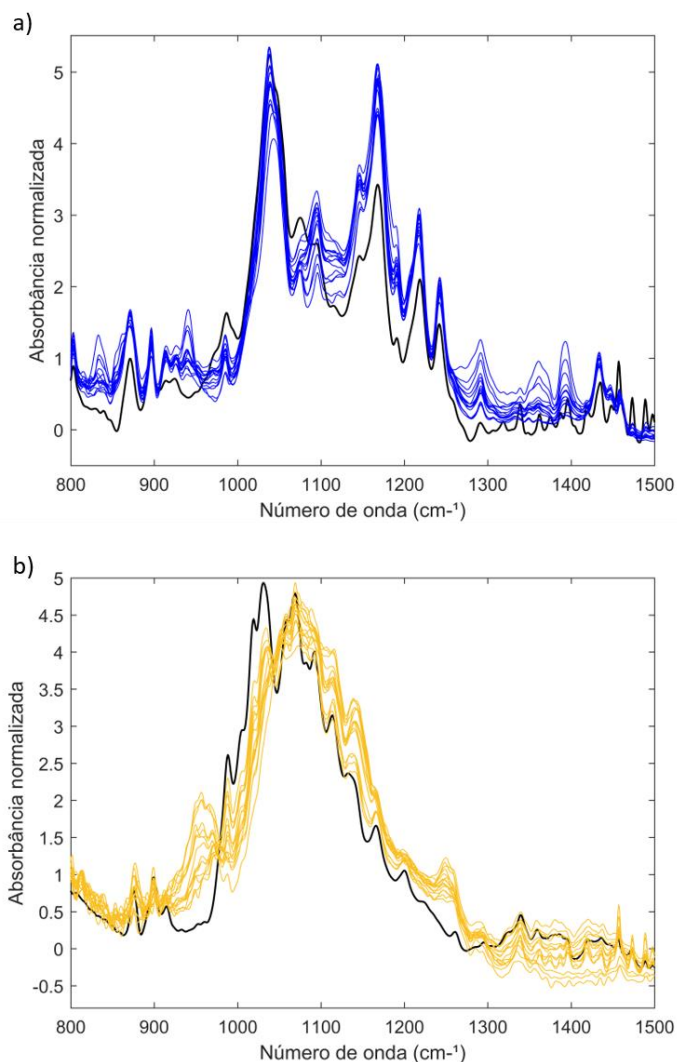


Figura 37. Espectros no MIR do padrão de stévia (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS e b) SAC.

Por outro lado, todas as amostras de xilitol e eritritol adulteradas foram corretamente identificadas pelo modelo proposto em toda a faixa de concentração estudada. Ressalta-se porém que na Figura 36 as amostras de eritritol com sacarose na concentração 7% (m/m) ficaram mais próximas do limite de aceitação, o que indica que amostras com uma concentração menor de adulterante poderiam ser aceitas. Pela Figura 38 pode-se observar que tanto a SAC quanto o ACS adicionados causaram mudanças espectrais nas duas bandas mais intensas de eritritol em  $1051\text{ cm}^{-1}$  e  $1077\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento C-C-O. Contudo, como destacado anteriormente, essas mudanças se devem provavelmente à presença do  $\text{SiO}_2$ . Já a sacarose adicionada não alterou as bandas mais intensas do eritritol na região selecionada,

porém foram responsáveis pelo surgimento de bandas menos intensas como em  $1130\text{ cm}^{-1}$  (Figura 38c).

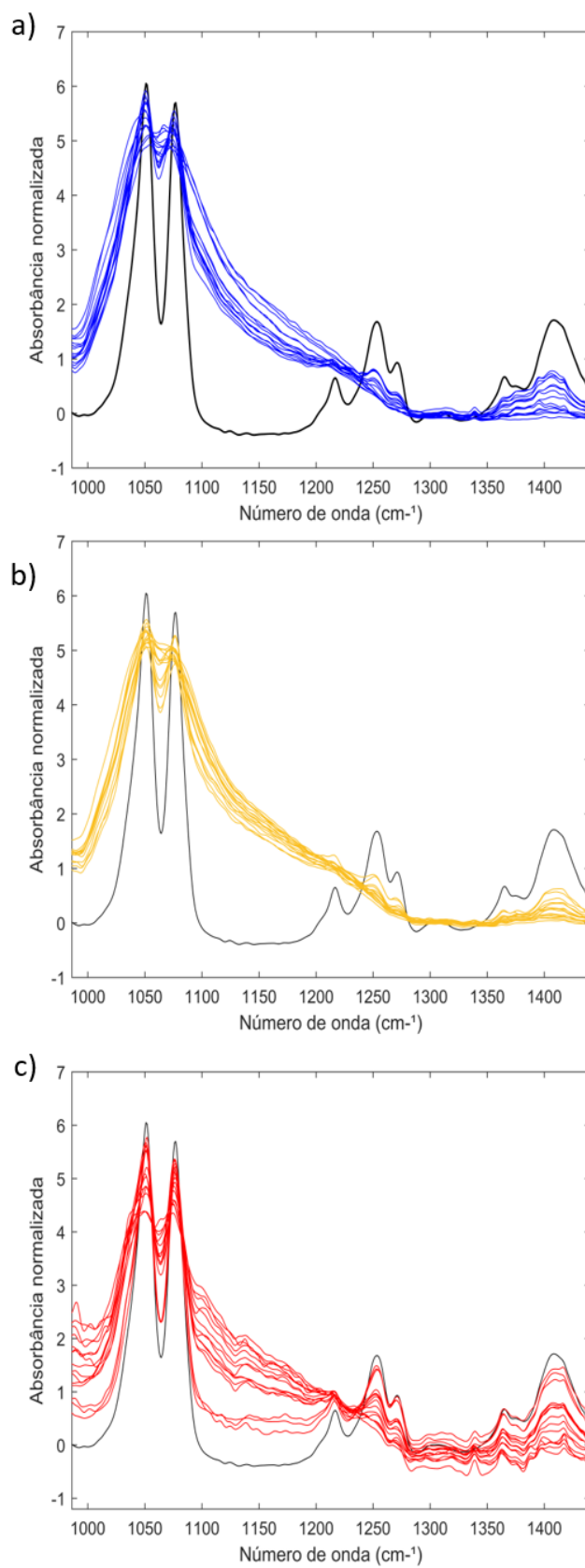


Figura 38. Espectros no MIR do padrão de eritritol (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS, b) SAC e c) Sacarose.

Para o xilitol, nos espectros das amostras contendo sacarose surgiram novas bandas intensas em  $1050\text{ cm}^{-1}$  e  $988\text{ cm}^{-1}$ , que podem ser associadas ao estiramento de ligações C-C e C-O<sup>59</sup>. Nas amostras que continham SAC e ACS houve supressão de uma das bandas em  $1000\text{ cm}^{-1}$  (Figura 39).

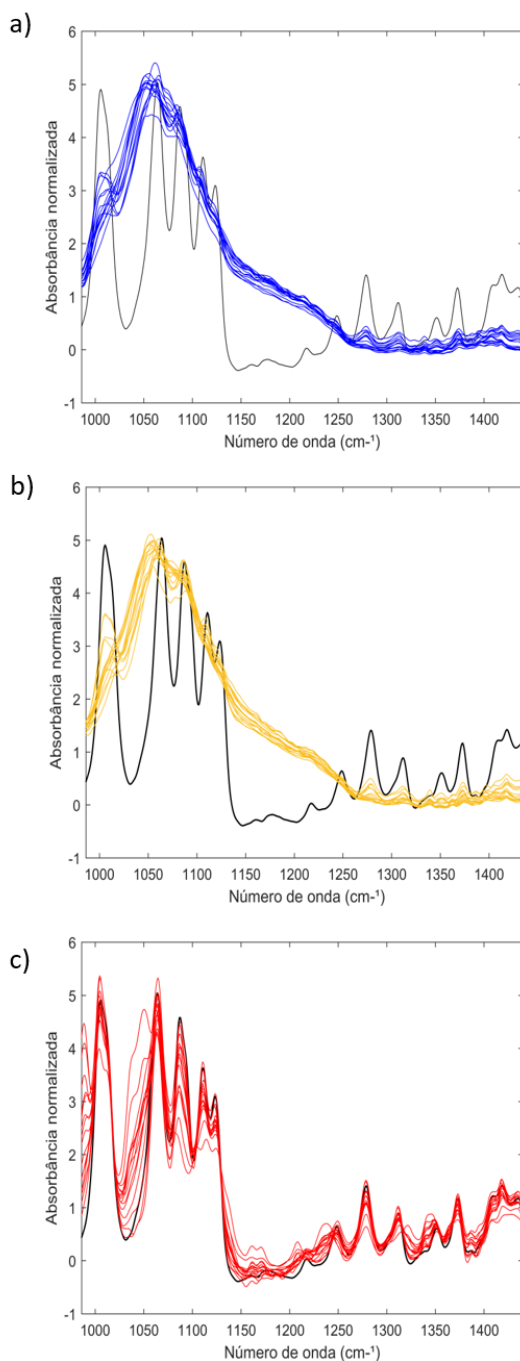


Figura 39. Espectros no MIR do padrão de xilitol (preto) e das misturas adulteradas com a) ACS, b) SAC e c) Sacarose.

Na matriz de validação 3, que continha amostras de classe-alvo e de outras classes, os conjuntos de stévia e eritritol tiveram erros de FN, com TFN de 14% e 17% respectivamente. Já o xilitol apresentou FP de 10% nesse conjunto (Figura 40).

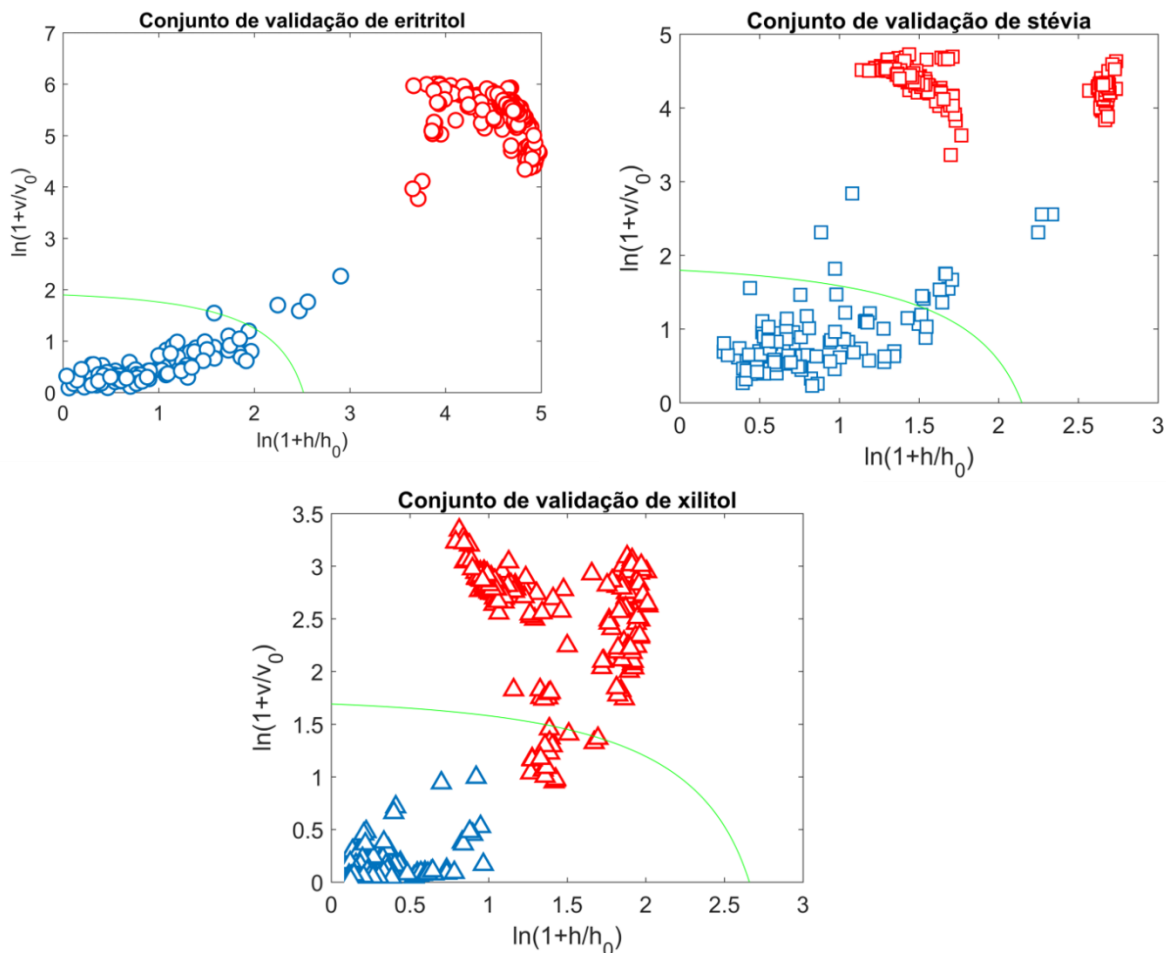


Figura 40. Gráfico de aceitação da matriz de validação 3 no MIR: amostras da classe-alvo em azul e amostras de outras classes em vermelho.

Comparando os resultados obtidos no infravermelho próximo e no médio (Tabela 6), é possível constatar que os resultados são semelhantes para o xilitol e o eritritol, porém, a região do infravermelho médio apresentou resultados muito superiores de modelagem DD-SIMCA para a stévia, ao que parece, as vibrações fundamentais nessa região do infravermelho mostraram-se essenciais para diferenciar esse edulcorante natural dos outros analitos.

Dessa forma, para identificar adulterações nos edulcorantes eritritol e xilitol, ambas as técnicas de infravermelho próximo e médio combinadas ao DD-SIMCA mostraram-

se excelentes, já para a stévia a melhor alternativa para a construção do modelo é a obtenção de espectros no infravermelho médio.

Tabela 6. Figuras de mérito do modelo no NIR e MIR.

Edulcorante	Região no Infravermelho	TFN* (%)	TFP* (%)	TEF (%)
Eritritol	NIR	8	0	95.9
	MIR	3.8	0	98.0
Stévia	NIR	22.1	4.5	76.8
	MIR	13.7	3.5	90.3
Xilitol	NIR	0	2.9	97.5
	MIR	0	5.3	94.5

*\*Valores calculados somando todas as amostras de validação.*

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados indicam o potencial da autenticação de eritritol, xilitol e stévia utilizando espectroscopia no infravermelho combinada ao DD-SIMCA. Com a seleção espectral adequada e o uso de padrões virtuais para aumentar a representatividade do conjunto de treinamento, as taxas de eficiência do modelo atingiram 97%. Amostras de eritritol e xilitol apresentaram perfil espectral consistente e muito similar ao reagente padrão de pureza 99,0%, indicando que essas amostras comerciais apresentam uma pureza elevada. No entanto, o edulcorante stévia apresentou espectros distintos por ser o único dos três edulcorantes composto de um conjunto de moléculas as quais têm teor variável conforme as condições de cultivo e extração.

Amostras de stévia adulteradas com ACS nas concentrações 10 a 30 % (m/m) e SAC nas concentrações 7,5, 15 e 22,5% (m/m) apresentaram erros de falso positivo tanto no NIR como no MIR, porém o modelo conseguiu identificar adulterações nesse edulcorante em concentrações mais altas. Esse resultado mostra que a detecção de adulterações em stévia é mais difícil devido a variação na composição citada anteriormente.

Com os polióis xilitol e eritritol, a grande maioria das amostras adulteradas foi identificada corretamente pelos modelos. No NIR, todas as amostras de eritritol foram corretamente classificadas com todos os adulterantes, enquanto amostras de xilitol apresentaram erros apenas quando adulteradas com sacarose nas concentrações de 10 a 40% (m/m), devido a similaridades nos espectros. No MIR não houve erros de falso positivo inclusive nas concentrações mais baixas de adulterante utilizadas, por exemplo: 0,02% de SAC em eritritol, 0,04% de ACS em eritritol, 0,02% de SAC em xilitol e 0,04% de ACS em xilitol. Esse resultado mostra que o limite de detecção do método para esses adulterantes está abaixo dessas concentrações.

Uma vez que as amostras adulteradas com maior concentração de acessulfame-K, sacarose e sacarina foram classificadas como não autênticas, conclui-se que essa abordagem inovadora é capaz de identificar a adulteração dos edulcorantes naturais.

Além disso, tendo em vista apenas as taxas de eficiência da modelagem DD-SIMCA dos três analitos, o MIR se mostra superior ao NIR. Entretanto, considerando também o custo e a portabilidade do equipamento para as medidas, o NIR seria muito mais vantajoso, afinal, a perda de eficiência é significativa apenas para o edulcorante stévia.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- (1) ANVISA. Portaria N° 29, de 13 de Janeiro de 1998. Diário Oficial da União: Brasil 1998.
- (2) Janakiram, C.; Deepan Kumar, C. V.; Joseph, J. Xylitol in Preventing Dental Caries: A Systematic Review and Meta-Analyses. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* **2017**, *8* (1), 16–21. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.198344>.
- (3) Brambilla, E.; Cagetti, M. G.; Ionescu, A.; Campus, G.; Lingström, P. An in Vitro and in Vivo Comparison of the Effect of Stevia Rebaudiana Extracts on Different Caries-Related Variables: A Randomized Controlled Trial Pilot Study. *Caries Res.* **2014**, *48* (1), 19–23. <https://doi.org/10.1159/000351650>.
- (4) Vargas Jentzsch, P.; Torrico-Vallejos, S.; Mendieta-Brito, S.; Ramos, L. A.; Ciobotă, V. Detection of Counterfeit Stevia Products Using a Handheld Raman Spectrometer. *Vib. Spectrosc.* **2016**, *83* (November 2011), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.01.015>.
- (5) Noronha, I. F. P. C. Determinação De Edulcorantes E Constituintes Inorgânicos Em Adoçantes De Mesa, Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.
- (6) Contaifer, J. Vigilância Sanitária e polícia fecham fábrica da Integralle em Goiânia <https://www.metropoles.com/vida-e-estilo/nutricao/vigilancia-sanitaria-e-policia-fecham-fabrica-da-integralle-em-goiania> (accessed 2022 -02 -15).
- (7) Gardana, C.; Simonetti, P. Determination of Steviol Glycosides in Commercial Extracts of Stevia Rebaudiana and Sweeteners by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Orbitrap Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1578*, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.057>.
- (8) de Queiroz Pane, D.; Dias, C. B.; Meinhart, A. D.; Ballus, C. A.; Godoy, H. T. Evaluation of the Sweetener Content in Diet/Light/Zero Foods and Drinks by HPLC-DAD. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52* (11), 6900–6913. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1816-1>.
- (9) Cole, S.; Hopkins, L. Consequences of Dietary Sugar Consumption: A Historical Perspective. *Nurse Pract.* **2019**, *44* (10), 38–42. <https://doi.org/10.1097/01.NPR.0000580784.74603.a1>.
- (10) Kearns, C. E.; Schmidt, L. A.; Glantz, S. A. Sugar Industry and Coronary Heart Disease Research: A Historical Analysis of Internal Industry Documents. *JAMA Intern.*

- Med.* **2016**, *176* (11), 1680–1685. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.5394>.
- (11) Imamura, F.; O'Connor, L.; Ye, Z.; Mursu, J.; Hayashino, Y.; Bhupathiraju, S. N.; Forouhi, N. G. Consumption of Sugar Sweetened Beverages, Artificially Sweetened Beverages, and Fruit Juice and Incidence of Type 2 Diabetes: Systematic Review, Meta-Analysis, and Estimation of Population Attributable Fraction. *BMJ* **2015**, *351*, 1–12. <https://doi.org/10.1136/bmj.h3576>.
- (12) Ministério da Saúde. Guia Alimentar Para a População Brasileira. *Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção Primária à Saúde Departamento de Atenção Básica, Secretaria de Atenção Primária à Saúde Departamento de Atenção Básica*, 2014, p 156.
- (13) Organization World Health. Guideline: Sugars Intake for Adults and Children. *World Heal. Organ.* **2018**, *57* (6), 1716–1722.
- (14) Portal da Secretaria de Atenção Primária a Saúde <https://aps.saude.gov.br/noticia/4854> (accessed 2022 -02 -13).
- (15) IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: Análise de Consumo Alimentar Pessoal No Brasil. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. 2020, p 120.
- (16) Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria N° 540, de 27 de Outubro de 1997. Diário Oficial da União 1997.
- (17) Carochi, M.; Morales, P.; Ferreira, I. C. F. R. Sweeteners as Food Additives in the XXI Century: A Review of What Is Known, and What Is to Come. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *107*, 302–317. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.046>.
- (18) Favaro-Trindade, C. S.; Rocha-Selmi, G. A.; dos Santos, M. G. *Microencapsulation of Sweeteners*; Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800350-3.00022-4>.
- (19) Rzechonek, D. A.; Dobrowolski, A.; Rymowicz, W.; Mironczuk, A. M. Recent Advances in Biological Production of Erythritol. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2018**, *38* (4), 620–633. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1380598>.
- (20) Wölnerhanssen, B. K.; Cajacob, L.; Keller, N.; Doody, A.; Rehfeld, J. F.; Drewe, J.; Peterli, R.; Beglinger, C.; Meyer-Gerspach, A. C. Gut Hormone Secretion, Gastric Emptying, and Glycemic Responses to Erythritol and Xylitol in Lean and Obese Subjects. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2016**, *310* (11), E1053–E1061. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00037.2016>.
- (21) Coelho, A. G.; de Jesus, D. P. A Simple Method for Determination of Erythritol, Maltitol, Xylitol, and Sorbitol in Sugar-Free Chocolates by Capillary Electrophoresis

- with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. *Electrophoresis* **2016**, 37 (22), 2986–2991. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201600263>.
- (22) Souza, R. M. de. Produção de Xilitol Por Linhagens de Leveduras Do Gênero *Cyberlindnera*, Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.
- (23) de Cock, P. Erythritol Functional Roles in Oral-Systemic Health. *Adv. Dent. Res.* **2018**, 29 (1), 104–109. <https://doi.org/10.1177/0022034517736499>.
- (24) den Hartog, G. J. M.; Boots, A. W.; Adam-Perrot, A.; Brouns, F.; Verkooijen, I. W. C. M.; Weseler, A. R.; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A. Erythritol Is a Sweet Antioxidant. *Nutrition* **2010**, 26 (4), 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.05.004>.
- (25) Nowicka, P.; Wojdyło, A. Stability of Phenolic Compounds, Antioxidant Activity and Colour through Natural Sweeteners Addition during Storage of Sour Cherry Puree. *Food Chem.* **2016**, 196, 925–934. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.019>.
- (26) Kurek, J. M.; Krejpcio, Z. The Functional and Health-Promoting Properties of Stevia Rebaudiana Bertoni and Its Glycosides with Special Focus on the Antidiabetic Potential – A Review. *J. Funct. Foods* **2019**, 61 (February), 103465. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103465>.
- (27) Moriconi, E.; Feraco, A.; Marzolla, V.; Infante, M.; Lombardo, M.; Fabbri, A.; Caprio, M. Neuroendocrine and Metabolic Effects of Low-Calorie and Non-Calorie Sweeteners. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2020**, 11 (July), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00444>.
- (28) Farhat, G.; Berset, V.; Moore, L. Effects of Stevia Extract on Postprandial Glucose Response, Satiety and Energy Intake: A Three-Arm Crossover Trial. *Nutrients* **2019**, 11. <https://doi.org/10.3390/nu11123036>.
- (29) Ahmad, J.; Khan, I.; Blundell, R.; Azzopardi, J.; Mahomoodally, M. F. Stevia Rebaudiana Bertoni.: An Updated Review of Its Health Benefits, Industrial Applications and Safety. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, 100 (March), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.030>.
- (30) Carakostas, M. C.; Curry, L. L.; Boileau, A. C.; Brusick, D. J. Overview: The History, Technical Function and Safety of Rebaudioside A, a Naturally Occurring Steviol Glycoside, for Use in Food and Beverages. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.05.003>.
- (31) Domingues, I. F. F.; Dourado, C. S.; Dias, A. C. B. Otimização Dos Parâmetros Da

- Extração Em Fase Sólida Utilizando Polímero Molecularmente Impresso Para Determinação De Sacarina, Universidade de Brasília, 2019.
- (32) Schiano, C.; Grimaldi, V.; Scognamiglio, M.; Costa, D.; Soricelli, A.; Nicoletti, G. F.; Napoli, C. Soft Drinks and Sweeteners Intake: Possible Contribution to the Development of Metabolic Syndrome and Cardiovascular Diseases. Beneficial or Detrimental Action of Alternative Sweeteners? *Food Res. Int.* **2021**, *142*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110220>.
- (33) Azeez, O. H.; Alkass, S. Y.; Persike, D. S. Long-Term Saccharin Consumption and Increased Risk of Obesity, Diabetes, Hepatic Dysfunction, and Renal Impairment in Rats. *Med.* **2019**, *55* (10). <https://doi.org/10.3390/medicina55100681>.
- (34) ANVISA. Resolução RDC N° 18, de 24 de Março de 2008. Diário Oficial da União 2008.
- (35) Bridge-Comer, P. E.; Vickers, M. H.; Morton-Jones, J.; Spada, A.; Rong, J.; Reynolds, C. M. Impact of Maternal Intake of Artificial Sweetener, Acesulfame-K, on Metabolic and Reproductive Health Outcomes in Male and Female Mouse Offspring. *Front. Nutr.* **2021**, *8* (December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.745203>.
- (36) Majewski, M.; Chruścicka, I.; Buchta, J.; Egierska, D.; Burzyńska, P.; Pietruszka, P.; Perszke, M.; Całkosiński, A. What Do We Know about Sugar Substitutes? *J. Educ. Heal. Sport* **2020**, *10* (4), 90–98. <https://doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.04.011>.
- (37) Nicoluci, Í. G.; Takehara, C. T.; Bragotto, A. P. A. High-Intensity Sweeteners: Trends of Use in Foods and Advances in Analytical Techniques. *Quim. Nova* **2022**, *45* (2), 207–217. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170828>.
- (38) Wang, Y. T.; Li, B.; Xu, X. J.; Ren, H. Bin; Yin, J. Y.; Zhu, H.; Zhang, Y. H. FTIR Spectroscopy Coupled with Machine Learning Approaches as a Rapid Tool for Identification and Quantification of Artificial Sweeteners. *Food Chem.* **2020**, *303* (February 2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125404>.
- (39) Mabood, F.; Hussain, J.; Jabeen, F.; Abbas, G.; Allaham, B.; Albroumi, M.; Alghawi, S.; Alameri, S.; Gilani, S. A.; Al-Harrasi, A.; Haq, Q. M. I.; Farooq, S. Applications of FT-NIRS Combined with PLS Multivariate Methods for the Detection & Quantification of Saccharin Adulteration in Commercial Fruit Juices. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2018**, *35* (6), 1052–1060. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1457802>.

- (40) Pavia, D. L. *Introdução à Espectroscopia*, 4th ed.; Cengage Learning, 2007. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422007000700048>.
- (41) Skoog, D. A. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed.; 2007. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)84936-3](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)84936-3).
- (42) Dutta, A. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*; Elsevier Inc., 2017; Vol. 2, pp 73–93. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2>.
- (43) Souza, R. M. ATR: Avanço Da Espectroscopia de Infravermelho Na Análise de Materiais Plásticos. *Bol. Tecnol. e Desenvol. Embalagens* **2009**, 21 (3), 3.
- (44) de Souza, A. M.; Poppi, R. J. Experimento Didático de Quimiometria Para Análise Exploratória de Óleos. *Quim. Nov.* **2012**, 35 (1), 223–229.
- (45) Trygg, J. Chemometrics Made Easy - Understanding Food Consumption Patterns in Europe with Principal Component Analysis (PCA). *Homepage Chemom.* **2002**, 1–4.
- (46) Ruiz, M.; Mujica, L. E.; Sierra, J.; Pozo, F.; Rodellar, J. Multiway Principal Component Analysis Contributions for Structural Damage Localization. *Struct. Heal. Monit.* **2018**, 17 (5), 1151–1165. <https://doi.org/10.1177/1475921717737971>.
- (47) Brereton, R. G. One-Class Classifiers. *J. Chemom.* **2011**, 25 (5), 225–246. <https://doi.org/10.1002/cem.1397>.
- (48) Mazivila, S. J.; Páscoa, R. N. M. J.; Castro, R. C.; Ribeiro, D. S. M.; Santos, J. L. M. Detection of Melamine and Sucrose as Adulterants in Milk Powder Using Near-Infrared Spectroscopy with DD-SIMCA as One-Class Classifier and MCR-ALS as a Means to Provide Pure Profiles of Milk and of Both Adulterants with Forensic Evidence: A Short Communic. *Talanta* **2020**, 216 (February), 120937. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120937>.
- (49) de Oliveira Moreira, A. C.; Braga, J. W. B. Authenticity Identification of Copaiba Oil Using a Handheld NIR Spectrometer and DD-SIMCA. *Food Anal. Methods* **2021**, 14 (5), 865–872. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01933-x>.
- (50) Barbosa-Patrício, L. C.; Sales, R. de F.; da Silva, N. C.; Fernandes da Silva, M. E.; Rodrigues e Brito, L.; Pimentel, M. F. An Approach Based on Virtual Samples for Gasoline Discrimination Using Physicochemical Properties or Distillation Curves. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2022**, 231 (October). <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2022.104698>.


- (51) Zontov, Y. V.; Rodionova, O. Y.; Kucheryavskiy, S. V.; Pomerantsev, A. L. DD-SIMCA – A MATLAB GUI Tool for Data Driven SIMCA Approach. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2017**, *167*, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.05.010>.
- (52) Da-Col, J. A.; Dantas, W. F. C.; Poppi, R. J. Didactic Experiment of Chemometrics for Pharmaceutical Pellets Mapping Using Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares: A Tutorial, Part IV. *Quim. Nova* **2018**, *41* (3), 345–354. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170149>.
- (53) Mees, C.; Souard, F.; Delporte, C.; Deconinck, E.; Stoffelen, P.; Stévigny, C.; Kauffmann, J. M.; De Braekeleer, K. Identification of Coffee Leaves Using FT-NIR Spectroscopy and SIMCA. *Talanta* **2018**, *177*, 4–11. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2017.09.056>.
- (54) Oliveri, P.; Downey, G. Multivariate Class Modeling for the Verification of Food-Authenticity Claims. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. May 2012, pp 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.005>.
- (55) Akyar, I. *Wide Spectra of Quality Control*; InTech, 2011.
- (56) Mojet, B. L.; Ebbesen, S. D.; Lefferts, L. Light at the Interface: The Potential of Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy for Understanding Heterogeneous Catalysis in Water. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (12), 4643–4655. <https://doi.org/10.1039/c0cs00014k>.
- (57) Goyal, S. K.; Samsher; Goyal, R. K. Stevia (Stevia Rebaudiana) a Bio-Sweetener: A Review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2010**, *61* (1), 1–10. <https://doi.org/10.3109/09637480903193049>.
- (58) Vien-Lin, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasseli, J. G. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*; Academic Press: San Diego, 1991; Vol. 42.
- (59) Cadet, F.; Robert, C.; Offmann, B. Simultaneous Determination of Sugars by Multivariate Analysis Applied to Mid-Infrared Spectra of Biological Samples. *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51* (3), 369–375. <https://doi.org/10.1366/0003702971940224>.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 25 de maio de 2023.

 Documento assinado digitalmente  
JULIANA FERNANDES DE SOUSA  
Data: 25/05/2023 16:21:40-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do/a discente: \_\_\_\_\_

Programa: Programa de Pós Graduação em Química - UnB

Nome completo: Juliana Fernandes de Sousa

Título do Trabalho: Identificação da autenticidade de edulcorantes naturais comerciais através da espectroscopia no infravermelho próximo e médio e modelagem DD-SIMCA.

Nível:  Mestrado  Doutorado

Orientador/a: Ana Cristi Basile Dias