

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Utilização da RMN
aliada a Métodos Quimiométricos
na Análise de Méis e Aguardentes”**

Elisangela Fabiana Boffo*

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

*** Bolsista CAPES**

São Carlos – SP

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B673ur

Boffo, Elisangela Fabiana.

Utilização da RMN aliada a métodos quimiométricos na análise de méis e aguardentes / Elisangela Fabiana Boffo. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

177 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Ressonância magnética nuclear. 2. Quimiometria. 3. Mel de abelha. 4. Aguardente. I. Título.

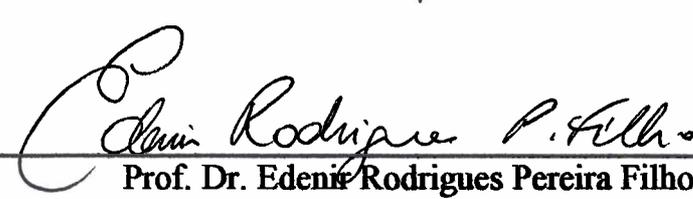
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Elisangela Fabiana Boffo**, realizada em 17 de fevereiro de 2009:*



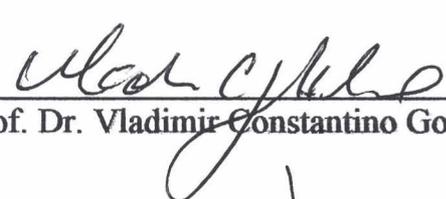
Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira



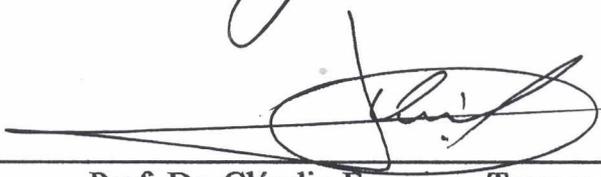
Prof. Dr. Edenis Rodrigues Pereira Filho



Profa. Dra. Maria Inês Bruno Tavares



Prof. Dr. Vladimir Constantino Gomes Heleno



Prof. Dr. Cláudio Francisco Tormena

Dedico este trabalho aos meus pais,
Antonio e Nercilha,
aos meus irmãos e cunhado,
Denilson, Elaine e Valdecir
e aos amores da minha vida,
Camilly e Caroliny.

Recomeçar

"Não importa onde você parou
Em que momento da vida você cansou
O que importa é que sempre é possível e necessário "Recomeçar".
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo
É renovar as esperanças na vida e o mais importante
Acreditar em você de novo.
Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado...
Chorou muito? Foi limpeza da alma...
Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia...
Sentiu-se só por diversas vezes? É porque fechaste a porta até para os anjos...
Acreditou que tudo estava perdido? Era o início da tua melhora...
Pois é... agora é hora de reiniciar... de pensar na luz
De encontrar prazer nas coisas simples de novo.
Que tal
Um corte de cabelo arrojado... diferente?
Um novo curso... ou aquele velho desejo de aprender pintar, desenhar, dominar o computador... ou qualquer outra coisa.
Olha quanto desafio... quanta coisa nova nesse mundo de meu Deus te esperando!
Tá se sentindo sozinho? Besteira! Tem tanta gente que você afastou com o seu "período de isolamento" ...
Tem tanta gente esperando apenas um sorriso teu para "chegar" perto de você.
Quando nos trancamos na tristeza...
Nem nós mesmos nos suportamos... Ficamos horríveis...
O mau humor vai comendo nosso fígado... Até a boca fica amarga.
Recomeçar... hoje é um bom dia para começar novos desafios.
Onde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto... Queira o melhor do melhor!
Queira coisas boas para a vida...
Pensando assim trazemos prá nós aquilo que desejamos.
Se pensamos pequeno, coisas pequenas teremos...
Mas se desejarmos fortemente o melhor e principalmente lutarmos pelo melhor.
O melhor vai se instalar na nossa vida.
E é hoje o dia da faxina mental...
Joga fora tudo que te prende ao passado...
Ao mundinho de coisas tristes... fotos... peças de roupa, papel de bala...
ingressos de cinema, bilhetes de viagens...
e toda aquela tranqueira que guardamos quando nos julgamos apaixonados...
jogue tudo fora... mas principalmente: esvazie seu coração,
fique pronto para a vida... para um novo amor...
Lembre-se somos apaixonáveis...
somos sempre capazes de amar muitas e muitas vezes...
Afim de contas... Nós somos o "Amor" ...
Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura".

Agradeço...

... à Deus pela minha vida,
... aos meus familiares pelo apoio e por compreenderem que a distância muitas
vezes é necessária,
... ao Prof. Dr. Antonio G. Ferreira, pela sabedoria, amizade, dedicação e
confiança. Muito obrigada, por acreditar em mim!!!
... aos amigos de laboratório, pelos momentos vividos, nunca os esquecerei...
Alexandre, Alviélér, Andersson, Angela, Aurélio, Cristina, Eduardo, Francisco,
Glaucia, Katyúscya, João, Leila, Luciana, Luciano, Lucinéia, Maiara, Mário, Paulo,
Regina, Ricardo, Vladimir, Vitor e Walmir,
... a todos os colegas que passaram pelo DQ-UFSCar ao longo destes anos,
... a todos os amigos que passaram pela minha vida nestes anos e que continuarão
para sempre,
... a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste
trabalho,
... aos professores do DQ-UFSCar, pelos ensinamentos transmitidos,
... à Profa. Dra. Márcia M. C. Ferreira, do IQ-UNICAMP, pelo auxílio nas análises
quimiométricas,
... ao Prof. Antonio C. T. Tobias, pelo fornecimento das amostras autênticas de
mel,
... à Profa. Dra. Maria Inês B. Tavares, do IMA-UFRJ, pelos ensinamentos sobre
RMN, principalmente sobre RMN de sólido e baixo campo, e pela amizade,
... à CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos o meu Muito Obrigada!!!

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AQ (AT)	Tempo de aquisição (<i>Acquisition</i> ou <i>Acquisition Time</i>)
CAM	Termo aplicado para denotar a rota metabólica para assimilação do CO ₂ durante a fotossíntese seguida pelas plantas que realizam o metabolismo do ácido crassuláceo (<i>Crassulacean Acid Metabolism</i>)
C ₃	Termo aplicado para denotar a rota metabólica para assimilação do CO ₂ durante a fotossíntese seguida pelas plantas que realizam o ciclo de Calvin
C ₄	Termo aplicado para denotar a rota metabólica para assimilação do CO ₂ durante a fotossíntese seguida pelas plantas que realizam o ciclo de Hatch-Slack
<i>d</i>	<i>Dubleto</i>
<i>dd</i>	<i>Duplo dubleto</i>
d1	Tempo de espera antes das aquisições
F1	Eixo vertical no espectro bidimensional
F2	Eixo horizontal no espectro bidimensional
<i>g</i> COSY	<i>gradient - COrrrelation SpectroscopY</i>
<i>g</i> HMBC	<i>gradient - Heteronuclear Multiple Bonds Correlations</i>
<i>g</i> HSQC	<i>gradient - Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
(² H/ ¹ H) _I	Número de átomos de deutério em relação ao número de átomos de hidrogênio no sítio da metila do etanol – Relação isotópica deutério/hidrogênio no sítio da metila do etanol
(² H/ ¹ H) _{II}	Número de átomos de deutério em relação ao número de átomos de hidrogênio no sítio do metileno do etanol – Relação isotópica deutério/hidrogênio no sítio do metileno do etanol
HCA	Análise de Agrupamentos Hierárquicos (<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KNN	<i>K-Nearest Neighbor</i>
LB	Multiplicação exponencial, com fator de alargamento de linha, aplicada no FID para que seja aumentada a relação sinal/ruído do espectro (<i>Line Broadening</i>)
<i>m</i>	<i>Multiplete</i>
NS (NT)	Número de aquisições (<i>Number of Scans</i> ou <i>Number of Transients</i>)
P1 (PW)	Duração do pulso de 90°, com alta potência, aplicado no canal f1

PCA	Análise por Componentes Principais (<i>Principal Components Analysis</i>)
PL9	Atenuação do pulso de pré-saturação (<i>Power Level</i>)
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
PRESS Cal	<i>Predicted Residual Error Sum of Squares of Calibration</i>
PRESS Val	<i>Predicted Residual Error Sum of Squares of Validation</i>
rCal	<i>Coefficient of determination of calibration</i>
rVal	<i>Coefficient of determination of validation</i>
rf	Radiofrequência
RG (gain)	Ganho do receptor (<i>Receiver Gain</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN de ² H	Ressonância Magnética Nuclear de deutério
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
SEC	<i>Standard Error of Calibration</i>
SEV	<i>Standard Error of Validation</i>
SI (FN)	Número de pontos utilizados no processamento do espectro (<i>Size</i> ou <i>Fourier Number</i>)
SI(F1)	Número de pontos utilizados no processamento ao longo de F1 no espectro de RMN bidimensional
SI(F2)	Número de pontos utilizados no processamento ao longo de F2 no espectro de RMN bidimensional
SIMCA	<i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
SNIF-NMR	<i>Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance</i>
SW	Janela espectral utilizada nos espectros (<i>Spectral Width</i>)
SW(F1)	Janela espectral em F1 no espectro de RMN bidimensional
SW(F2)	Janela espectral em F2 no espectro de RMN bidimensional
t	<i>Tripleto</i>
TD (NP)	Número de pontos utilizados na aquisição do espectro (<i>Time Domain Data Size</i> ou <i>Number of Data Points</i>)
TD(F1)	Número de experimentos ao longo de F1 no espectro de RMN bidimensional
TD(F2)	Número de pontos utilizados na aquisição ao longo de F2 no

	espectro de RMN bidimensional
TMS	Tetrametilsilano
TMSP	Trimetilsilil-2,2,3,3-d ₄ -propionato de sódio
TMU	<i>N,N,N,N</i> -tetrametiluréia
TOCSY	<i>T</i> Otal <i>C</i> orrelation <i>S</i> pectroscop <i>Y</i>
δ	Deslocamento químico (em ppm)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1-1.	Produção mundial de mel, de 2002 a 2006.....	4
TABELA 1.1-2.	Produção nacional de mel, de 2002 a 2006.....	5
TABELA 1.1-3.	Exportações e importações brasileiras de mel, de 2004 a 2007.....	6
TABELA 1.1-4.	Exportações brasileiras de mel, de janeiro a maio de 2008, e melhor preço em maio de 2008.....	7
TABELA 1.2-1.	Valores das exportações nacionais de cachaça, de 2002 a 2007.....	9
TABELA 1.2-2.	Maiores compradores de cachaça brasileira, em 2007.....	10
TABELA 2.2-1.	Identificação, classe e origem dos méis analisados.....	31
TABELA 2.2-2.	Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^2H (Bruker).....	34
TABELA 2.2-3.	Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Bruker).....	36
TABELA 2.2-4.	Classe e número de amostras usadas na construção e na validação externa dos modelos de classificação e na previsão das classes dos méis comerciais do estado de São Paulo.....	38
TABELA 2.2-5.	Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C usados na elucidação estrutural dos compostos presentes no mel Lar13.....	39
TABELA 2.2-6.	Parâmetros de aquisição e processamento utilizados nos espectros TOCSY, gCOSY, gHSQC e gHMBC usados na elucidação estrutural dos compostos presentes no mel Lar13.....	39
TABELA 2.3-1.	Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ calculada para a metila ($^2\text{H}/^1\text{H}$) _I e a metilena ($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{II} do etanol obtido pela fermentação dos méis.....	43
TABELA 2.3-2.	Tabela de variâncias para a análise dos diferentes tipos de méis do estado de São Paulo.....	54
TABELA 2.3-3.	Previsão das amostras de treinamento pelos três modelos KNN.....	61

TABELA 2.3-4.	Número de componentes principais usado na construção dos três modelos SIMCA.....	61
TABELA 2.3-5.	Resíduo entre as classes, silvestre (1), eucalipto (2) e laranjeira (3), para os três modelos SIMCA.....	62
TABELA 2.3-6.	Distância entre as classes, silvestre (1), eucalipto (2) e laranjeira (3), para os três modelos SIMCA.....	63
TABELA 2.3-7.	Previsão das amostras de treinamento pelos três modelos SIMCA.....	64
TABELA 2.3-8.	Parâmetros otimizados na construção dos três modelos PLS-DA.....	65
TABELA 2.3-9.	Previsão das amostras de treinamento pelos três modelos PLS-DA.....	66
TABELA 2.3-10.	Previsão da classe das amostras de validação externa utilizando-se os três modelos KNN.....	67
TABELA 2.3-11.	Previsão da classe das amostras de validação externa utilizando-se os três modelos SIMCA.....	67
TABELA 2.3-12.	Previsão da classe das amostras de validação externa utilizando-se os três modelos PLS-DA.....	68
TABELA 2.3-13.	Previsão da classe dos méis comerciais pelos três modelos KNN.....	69
TABELA 2.3-14.	Previsão da classe dos méis comerciais pelos três modelos SIMCA.....	70
TABELA 2.3-15.	Previsão da classe dos méis comerciais pelos três modelos PLS-DA.....	71
TABELA 2.3-16.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H}-^1\text{H}$ e $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ para os carboidratos do mel Lar13.....	100
TABELA 2.3-17.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H}-^1\text{H}$ e $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ para o etanol (G), ácido cítrico (H), 5-hidróximetilfurfural (I) e ácido fórmico (J).....	107
TABELA 2.3-18.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações $^1\text{H}-^1\text{H}$ e $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ para a tirosina (K), fenilalanina (L), ácido láctico (M), alanina (N) e ácido acético (O).....	114
TABELA 3.2-1.	Descrição e origem das aguardentes comerciais analisadas..	121
TABELA 3.2-2.	Descrição dos padrões de aguardentes analisados.....	121
TABELA 3.2-3.	Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .	124

TABELA 3.3-1.	Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ calculada para a metila ($^2\text{H}/^1\text{H}$) _I e a metilena ($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{II} do etanol presente nas aguardentes.....	126
TABELA 3.3-2.	Dados de RMN de ^{13}C para os carboidratos das aguardentes e da literatura.....	158

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.4-1.	Representação esquemática do ciclo C ₃	17
FIGURA 1.4-2.	Representação esquemática do ciclo C ₄	18
FIGURA 1.5-1.	Esquema ilustrativo dos métodos quimiométricos aplicados aos dados de RMN.....	20
FIGURA 1.5-2.	Um exemplo simples de gráficos de (A) <i>scores</i> e (B) <i>loadings</i> . O gráfico de <i>scores</i> mostra dois grupos de amostras e uma anômala (<i>outlier</i>). No gráfico de <i>loadings</i> pode-se ver que a variável a é importante para a discriminação das amostras localizadas no canto direito superior do gráfico de <i>scores</i> ; as variáveis d , e e f são características para as amostras no canto inferior esquerdo; já as variáveis b e c estão próximas a origem do gráfico de <i>loadings</i> e, portanto, têm uma pequena influência na discriminação.....	22
FIGURA 2.3-1.	Espectros de RMN de (A) ¹ H e (B) ² H do etanol produzido a partir de um mel silvestre.....	42
FIGURA 2.3-2.	Mecanismo da glicólise e formação do etanol. O destino dos hidrogênios é ilustrado para os hidrogênios H-1, H-2 e H-6 da glucose. A numeração dos átomos de carbono segue aquela da glucose. G6P, glucose 6-fosfato; F6P, frutose 6-fosfato; F1,6dP, frutose 1,6-difosfato; DHAP, dihidróxi acetona fosfato; G3P, gliceraldeído 3-fosfato; 1,3dPG, 1,3-difosfoglicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato; 2PG, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato.....	45
FIGURA 2.3-3.	Espectros de RMN de ¹ H, com supressão do sinal da água, dos méis silvestres, de eucalipto e de laranja (D ₂ O).....	50
FIGURA 2.3-4.	Ampliações das regiões de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros de RMN de ¹ H, com supressão do sinal da água, dos méis silvestres, de eucalipto e de laranja (D ₂ O).....	51
FIGURA 2.3-5.	Gráfico de linhas correspondente aos espectros de RMN de ¹ H dos méis do estado de São Paulo, mostrando em cinza as regiões de exclusão.....	53
FIGURA 2.3-6.	Gráfico da variância explicada versus o número de PCs, para os méis do estado de São Paulo.....	55
FIGURA 2.3-7.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ¹ H dos méis silvestres, de eucalipto e de laranja (41,2 %); ◇ - replicatas e ◆ - média das replicatas.....	56
FIGURA 2.3-8.	Comparação feita entre os espectros de RMN de ¹ H dos méis durante a análise quimiométrica mostrando os compostos responsáveis pela discriminação obtida na figura 2.3-7; vermelho – méis silvestres, preto – eucalipto e verde –	

	laranjeira.....	56
FIGURA 2.3-9.	Dendrograma dos dados de RMN de ^1H dos méis silvestres, de eucalipto e de laranja (similaridade: 0,215).....	57
FIGURA 2.3-10.	Primeira ampliação do dendrograma mostrado na figura 2.3-9	58
FIGURA 2.3-11.	Segunda ampliação do dendrograma mostrado na figura 2.3-9	58
FIGURA 2.3-12.	Gráfico do Kth vizinho mais próximo versus o número de erros cometidos na previsão das amostras de treinamento para os dados de RMN de ^1H dos méis.....	60
FIGURA 2.3-13.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H dos méis usados nos modelos de classificação, de assa-peixe, açúcar e adulterados (45,5%).....	73
FIGURA 2.3-14.	Ampliação do gráfico de <i>scores</i> mostrado na figura 2.3-12, mostrando a discriminação entre os méis de eucalipto, laranjeira, assa-peixe e açúcar (45,5%).....	73
FIGURA 2.3-15.	Ampliações de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão da água, dos méis de eucalipto, laranjeira, assa-peixe e cana-de-açúcar (D_2O).....	75
FIGURA 2.3-16.	Gráfico de linhas correspondente aos espectros de RMN de ^1H dos méis analisados no estudo da influência da regionalidade, mostrando em cinza as regiões de exclusão.....	77
FIGURA 2.3-17.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H dos méis analisados no estudo da influência da regionalidade (24,1%).....	78
FIGURA 2.3-18.	Ampliações das regiões de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, dos méis de jataí e silvestres (D_2O).....	79
FIGURA 2.3-19.	Ampliação da região de δ 2,50 a 6,00 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, dos méis de melato, de jataí e da amostra Glu1 (D_2O).....	80
FIGURA 2.3-20.	Ampliações das regiões de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão da água, dos méis de melato, de jataí e da amostra Glu1 (D_2O).....	81
FIGURA 2.3-21.	Dendrograma obtido do HCA dos dados de RMN de ^1H dos méis (similaridade: 0,393).....	83
FIGURA 2.3-22.	Ampliação do ramo D do dendrograma mostrado na figura 2.3-21.....	83
FIGURA 2.3-23.	Ampliação dos ramos E e F do dendrograma mostrado na figura 2.3-21.....	84

FIGURA 2.3-24.	Ampliação do ramo G do dendrograma mostrado na figura 2.3-21.....	84
FIGURA 2.3-25.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H dos méis analisados no estudo da regionalidade, após exclusão de amostras (23,7%).....	85
FIGURA 2.3-26.	Ampliações das regiões de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, dos méis Silv44 e Silv46 (D_2O).....	86
FIGURA 2.3-27.	Ampliação de δ 60,0 a 110,0 dos espectros de RMN de ^{13}C dos méis de eucalipto, laranjeira e silvestre (D_2O).....	87
FIGURA 2.3-28.	Gráfico de linhas correspondente aos dados de RMN de ^{13}C dos méis, espectros processados com SI=32k; mostrando em cinza as regiões de exclusão.....	88
FIGURA 2.3-29.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos dados de RMN de ^{13}C dos méis; espectros processados com SI=32k (57,4%).....	89
FIGURA 2.3-30.	Dendrograma dos dados de RMN de ^{13}C dos méis; espectros processados com SI=32k (similaridade: 0,485).....	90
FIGURA 2.3-31.	Gráfico de linhas correspondente aos dados de RMN de ^{13}C dos méis; espectros processados com SI=64k, mostrando em cinza as regiões de exclusão.....	91
FIGURA 2.3-32.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos dados de RMN de ^{13}C dos méis; espectros processados com SI=64k (63,3%).....	92
FIGURA 2.3-33.	Dendrograma dos dados de RMN de ^{13}C dos méis; espectros processados com SI=64k (similaridade: 0,545).....	92
FIGURA 2.3-34.	Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de TOCSY do mel Lar13, evidenciando os sinais dos carboidratos (D_2O).....	94
FIGURA 2.3-35.	Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de <i>g</i> HSQC do mel Lar13, evidenciando os sinais dos carboidratos (D_2O).....	95
FIGURA 2.3-36.	Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de <i>g</i> HMBC do mel Lar13, evidenciando os sinais dos carboidratos (D_2O).....	96
FIGURA 2.3-37.	Ampliação de δ 82,0 a 108,0 do espectro de RMN de ^{13}C do mel Lar13 (D_2O).....	97
FIGURA 2.3-38.	Ampliação de δ 73,5 a 79,3 do espectro de RMN de ^{13}C do mel Lar13 (D_2O).....	98
FIGURA 2.3-39.	Ampliação de δ 69,7 a 73,3 do espectro de RMN de ^{13}C do mel Lar13 (D_2O).....	98
FIGURA 2.3-40.	Ampliação de δ 62,5 a 68,0 do espectro de RMN de ^{13}C do mel Lar13 (D_2O).....	99

FIGURA 2.3-41.	Espectro de RMN de ^{13}C do mel Lar13, evidenciando o sinal em δ 216,0 (D_2O).....	99
FIGURA 2.3-42.	Estruturas dos carboidratos presentes no mel Lar13.....	101
FIGURA 2.3-43.	Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de <i>g</i> COSY do mel Lar13, evidenciando os sinais do etanol (G) e do ácido cítrico (H) (D_2O).....	102
FIGURA 2.3-44.	Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de <i>g</i> HSQC do mel Lar13, evidenciando os sinais do etanol (G) e do ácido cítrico (H) (D_2O).....	103
FIGURA 2.3-45.	Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de <i>g</i> HMBC do mel Lar13, evidenciando os sinais do etanol (G) e do ácido cítrico (H) (D_2O).....	103
FIGURA 2.3-46.	Correlação ^1H - ^1H observada no experimento de <i>g</i> COSY do mel Lar13, evidenciando os sinais do HMF (I) (D_2O).....	104
FIGURA 2.3-47.	Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de <i>g</i> HSQC do mel Lar13, evidenciando os sinais do HMF (I) e do ácido fórmico (J) (D_2O).....	105
FIGURA 2.3-48.	Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de <i>g</i> HMBC do mel Lar13, evidenciando os sinais do HMF (I) (D_2O).....	106
FIGURA 2.3-49.	Estruturas dos compostos que apresentaram sinais menos intensos no espectro de RMN de ^1H do mel Lar13.....	106
FIGURA 2.3-50.	Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de <i>g</i> COSY do mel Jatai2, evidenciando os sinais da tirosina (K) e da fenilalanina (L) (D_2O).....	108
FIGURA 2.3-51.	Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de <i>g</i> HSQC do mel Jatai2, evidenciando os sinais da tirosina (K) e da fenilalanina (L) (D_2O).....	109
FIGURA 2.3-52.	Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de <i>g</i> HMBC do mel Jatai2, evidenciando os sinais da tirosina (K) e da fenilalanina (L) (D_2O).....	110
FIGURA 2.3-53.	Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de <i>g</i> COSY do mel Jatai2, evidenciando os sinais do ácido láctico (M), da alanina (N) e do ácido acético (O) (D_2O).....	111
FIGURA 2.3-54.	Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de <i>g</i> HSQC do mel Jatai2, evidenciando os sinais do ácido láctico (M), da alanina (N) e do ácido acético (O) (D_2O).....	112
FIGURA 2.3-55.	Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de <i>g</i> HMBC do mel Jatai2, evidenciando os sinais do ácido láctico (M), da alanina (N) e do ácido acético (O) (D_2O).....	113

FIGURA 2.3-56.	Estruturas dos compostos identificados no espectro de RMN de ^1H do mel Jatai2.....	113
FIGURA 3.3-1.	Espectros de RMN de ^1H da aguardente de cana-de-açúcar PC1 sem e com supressão dos sinais do etanol e da água (D_2O).....	129
FIGURA 3.3-2.	Ampliação da região de δ 0,00 a 1,80 dos espectros de RMN de ^1H da aguardente de cana-de-açúcar PC1 (A) sem desacoplamento dos núcleos de carbono-13 e sem supressão do sinal da metila do etanol e (B) com desacoplamento e com supressão (D_2O).....	130
FIGURA 3.3-3.	Espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de uva, cana-de-açúcar, banana e mel (D_2O).....	131
FIGURA 3.3-4.	Gráfico de linhas correspondente aos espectros de RMN de ^1H das aguardentes, mostrando em cinza as regiões excluídas durante a análise quimiométrica.....	133
FIGURA 3.3-5.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H das aguardentes (40,1%).....	134
FIGURA 3.3-6.	Ampliação da região de δ 1,80 a 6,00 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de mandioca, cana-de-açúcar e mel (D_2O).....	135
FIGURA 3.3-7.	Ampliação de δ 1,80 a 6,00 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de pêssigo, abacaxi, banana e coco (D_2O).....	137
FIGURA 3.3-8.	Dendrograma dos dados de RMN de ^1H das aguardentes (similaridade: 0,504).....	138
FIGURA 3.3-9.	Ampliação dos ramos A, B e C do dendrograma mostrado na figura 3.3-8.....	139
FIGURA 3.3-10.	Ampliação do ramo D do dendrograma mostrado na figura 3.3-8.....	139
FIGURA 3.3-11.	Ampliação do ramo E do dendrograma mostrado na figura 3.3-8.....	140
FIGURA 3.3-12.	Ampliação dos ramos F e G do dendrograma mostrado na figura 3.3-8.....	140
FIGURA 3.3-13.	Ampliação do ramo H do dendrograma mostrado na figura 3.3-8.....	141
FIGURA 3.3-14.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H dos diferentes tipos de aguardentes, após a exclusão das aguardentes PC10 e PT (39,1%).....	142

FIGURA 3.3-15.	Ampliação de δ 1,80 a 6,00 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de cana-de-açúcar e milho (D_2O).....	143
FIGURA 3.3-16.	Ampliação de δ 1,8 a 6,0 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de cana-de-açúcar e uva (D_2O).....	144
FIGURA 3.3-17.	Ampliação de δ 1,8 a 6,0 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de banana (D_2O).....	145
FIGURA 3.3-18.	Dendrograma dos dados de RMN de ^1H das aguardentes, após exclusão das aguardentes PC10 e PT (similaridade: 0,502).....	146
FIGURA 3.3-19.	Ampliações dos ramos A e B do dendrograma mostrado na figura 3.3-18.....	146
FIGURA 3.3-20.	Ampliações dos ramos C e D do dendrograma mostrado na figura 3.3-18.....	147
FIGURA 3.3-21.	Ampliações dos ramos E e F do dendrograma mostrado na figura 3.3-18.....	148
FIGURA 3.3-22.	Ampliação de δ 0,0 a 120,0 dos espectros de RMN de ^{13}C das aguardentes de uva, cana-de-açúcar, banana e mel (D_2O).....	150
FIGURA 3.3-23.	Gráfico de linhas correspondente aos dados de RMN de ^{13}C das aguardentes, as regiões excluídas na análise quimiométrica estão marcadas em cinza.....	151
FIGURA 3.3-24.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos dados de RMN de ^{13}C das aguardentes (43,8%).....	152
FIGURA 3.3-25.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos dados de RMN de ^{13}C das aguardentes; mais amostras (43,2%).....	153
FIGURA 3.3-26.	Dendrograma dos dados de RMN de ^{13}C das aguardentes (similaridade: 0,551).....	154
FIGURA 3.3-27.	Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos dados de RMN de ^{13}C dos méis, após exclusão das aguardentes PC10 e PT (48,7%)	155
FIGURA 3.3-28.	Dendrograma dos dados de RMN de ^{13}C das aguardentes, após exclusão das aguardentes PC10 e PT (similaridade: 0,405).....	156

RESUMO

UTILIZAÇÃO DA RMN ALIADA A MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA ANÁLISE DE MÉIS E AGUARDENTES. A apicultura no Brasil tem-se expandido muito nos últimos anos, tornando este país um dos maiores exportadores mundiais de mel. A cadeia produtiva de aguardente também encontra-se em expansão, firmando esta bebida como um importante produto do agronegócio brasileiro. Por isto, o controle de qualidade destes produtos é indispensável. O presente trabalho descreve o uso da técnica SNIF-NMR e de métodos quimiométricos aplicados aos dados de RMN de ^1H objetivando-se verificar as diferenças químicas relacionadas à autenticidade das amostras. Utilizando-se a técnica SNIF-NMR, observou-se que a relação isotópica da metila do etanol ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i refletiu a origem biossintética dos carboidratos produzidos pelas plantas (mecanismos C₃, C₄ ou CAM usados na fixação do CO₂). Na análise dos méis, houve uma boa diferenciação entre aqueles produzidos a partir de plantas C₃ (eucalipto, laranjeira, assa-peixe, jataí e silvestres), com valores de ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_i próximos a 100 ppm (partes por milhão) e os obtidos de plantas C₄ (cana-de-açúcar), com valores aproximadamente 12 ppm maiores. Algumas amostras comerciais apresentaram valores próximos aos dos méis de cana-de-açúcar. Na análise das aguardentes observou-se também uma discriminação em torno de 12 ppm entre aquelas originadas das plantas C₃ (uva, banana e mandioca) e C₄ (cana-de-açúcar e milho). As aguardentes obtidas de plantas CAM (abacaxi) apresentaram valores intermediários. As de mel mostraram-se similares às de plantas C₃, enquanto que as comerciais de coco, banana, pêssego e abacaxi (plantas C₃) apresentaram valores próximos àqueles obtidos para as de cana-de-açúcar. A aplicação da quimiometria aos espectros de RMN de ^1H distinguiu os méis de eucalipto, de laranjeira e silvestres produzidos no estado de São Paulo. Aqueles com comportamento anômalo também discriminaram-se, mostrando sinais de ácido cítrico e HMF. Os métodos de classificação KNN, SIMCA e PLS-DA forneceram bons resultados na atribuição da classe dos méis comerciais. Os méis das diferentes regiões brasileiras não puderam ser discriminados, pois mostraram-se semelhantes. Já aqueles adulterados e de diferentes tipos foram discriminados. Na análise dos espectros de RMN de ^1H das aguardentes os diferentes tipos foram separados. As aguardentes de cana-de-açúcar com limão e de mandioca discriminaram-se. Os espectros de ^1H das aguardentes adulteradas de banana, coco, pêssego e abacaxi são semelhantes, sugerindo que foram produzidas usando a mesma matéria-prima.

ABSTRACT

NMR AND CHEMOMETRICS ON HONEYS AND *AGUARDENTES* ANALYSIS. Apiculture has been increasing a lot in the last years in Brazil, which already is one of the greatest exporters of honey. Productive chain of *aguardentes* has also risen, and both products are considerably important in Brazilian agribusiness. Therefore, the quality control of these products is essential. The present work describes the use of SNIF-NMR technique and chemometric methods applied to ^1H NMR data aiming to evaluate chemical differences that are related to samples authenticity. Using SNIF-NMR technique, it was observed that the isotopic ratio of the methyl group from ethanol ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_I is related to the biosynthetic origin of carbohydrates produced by plants (C_3 , C_4 and CAM mechanisms used to CO_2 fixation). In honeys analysis, was observed a good discrimination between those produced by C_3 plants (eucalyptus, citrus, assa-peixe, Jataí and wildflowers) and those from C_4 plants (sugarcane). C_3 plants showed ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_I values near 100 ppm (parts per million) and from C_4 plants showed higher values, in approximately 12 ppm. Some commercial samples presented ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_I values near those determined for sugarcane honeys. In *aguardentes* analysis, a discrimination of approximately 12 ppm between those from C_3 (grape, banana and cassava) and C_4 (sugarcane and maize) plants was also observed. *Aguardentes* from CAM plants (pineapple) showed intermediate values. ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_I data of honey *aguardentes* were similar to those of C_3 plants. For banana, peach, coconut and pineapple commercial samples (from C_3 plants), ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_I values were similar to those of sugarcane *aguardentes*. Chemometrics applied to ^1H NMR spectra data allowed the discrimination among honeys from eucalyptus, citrus and wildflowers, which were produced in São Paulo state. Moreover, honeys, which showed anomalous behaviour, were discriminated due to citric acid and HMF presence. KNN, SIMCA and PLS-DA methods were suitable for classification of commercial honeys from this state. Honeys from different Brazilian regions could not be discriminated since they showed very similar characteristics. However, adulterated and different types of honeys were discriminated. PCA and HCA analyses applied to ^1H NMR spectra of *aguardentes* allowed to discriminate the different types of such samples. Sugarcane with lemon *aguardentes* and cassava *aguardentes* were distinguished. Adulterated *aguardentes* from banana, peach, coconut and pineapple showed ^1H NMR spectra quite similar, what suggested that they were made from the same raw material.

Sumário

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – O Mel	3
1.1.1 – Produção de mel	4
1.2 – A aguardente	7
1.2.1 – Produção de aguardente.....	8
1.3 – Ressonância Magnética Nuclear – RMN	10
1.3.1 – <i>Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance</i> – SNIF-NMR	12
1.3.1.1 – Espectroscopia de RMN de ² H.....	13
1.3.1.2 – Verificação da autenticidade dos méis.....	14
1.3.1.3 – Verificação da autenticidade das aguardentes.....	15
1.4 – Os Mecanismos Biossintéticos de Fixação do CO ₂	15
1.4.1 – A Fixação do CO ₂ em Plantas C ₃	16
1.4.2 – A Fixação do CO ₂ em Plantas C ₄	17
1.4.3 – A Fixação do CO ₂ em Plantas CAM.....	18
1.5 – Análise Quimiométrica em dados de RMN	19
1.5.1 – Análise Exploratória de Dados	21
1.5.1.1 – Análise por Componentes Principais – PCA	21
1.5.1.2 – Análise por Agrupamentos Hierárquicos – HCA	22
1.5.2 – Classificação de Amostras	24
1.5.2.1 – <i>K-Nearest Neighbor</i> – KNN	24
1.5.2.2 – <i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i> – SIMCA	25
1.5.2.3 – <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> – PLS-DA	25
CAPÍTULO 2 – MÉIS.....	27
2.1 – OBJETIVOS.....	29
2.2 – MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.2.1 – As amostras	30
2.2.2 – Verificação da autenticidade dos méis comerciais empregando- se a técnica SNIF-NMR.....	33
2.2.2.1 – Fermentação dos méis e preparo das amostras	33

2.2.2.2 – Aquisição dos espectros de RMN de ^2H e ^1H	34
2.2.2.3 – Cálculo da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$	35
2.2.3 – Análise Quimiométrica dos dados de RMN dos méis	35
2.2.3.1 – As amostras	35
2.2.3.2 – Medidas espectroscópicas	36
2.2.3.3 – Tratamento quimiométrico.....	37
2.2.4 – Elucidação estrutural.....	38
2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
2.3.1 – Verificação da autenticidade dos méis comerciais empregando-se a técnica SNIF-NMR.....	41
2.3.2 – Análise Quimiométrica dos dados de RMN dos méis	47
2.3.2.1 – Otimização das condições experimentais e de processamento dos dados de RMN de ^1H para utilização dos métodos quimiométricos	48
2.3.2.2 – Classificação dos méis comerciais do estado de São Paulo por RMN de ^1H	49
2.3.2.3 – Discriminação dos méis de assa-peixe, cana-de-açúcar e adulterados com relação aos méis autênticos do Estado de São Paulo	72
2.3.2.4 – Estudo da influência da regionalidade sobre amostras de méis por RMN de ^1H	76
2.3.2.5 – Discriminação dos tipos de méis por RMN de ^{13}C	87
2.3.2.5.1 – Espectros de RMN de ^{13}C processados com 32768 pontos.....	88
2.3.2.5.2 – Espectros de RMN de ^{13}C processados com 65356 pontos.....	90
2.3.3 – Elucidação estrutural dos metabólitos presentes nos méis usando a Espectroscopia de RMN	93
2.3.3.1 – Elucidação dos carboidratos presentes nos méis	93
2.3.3.2 – Atribuição dos sinais menos intensos no espectro de RMN de ^1H do mel Lar13.....	101
2.3.3.3 – Elucidação de outros compostos presentes nos méis	107
2.4 – CONCLUSÕES.....	115

CAPÍTULO 3 – AGUARDENTES	117
3.1 – OBJETIVOS.....	119
3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS	120
3.2.1 – As amostras	120
3.2.2 – Verificação da autenticidade das aguardentes comerciais empregando-se a técnica SNIF-NMR.....	122
3.2.2.1 – Aquisição dos espectros de RMN de ^2H e ^1H	122
3.2.2.2 – Cálculo da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$	122
3.2.3 – Análise Quimiométrica dos dados de RMN das aguardentes	123
3.2.3.1 – As amostras	123
3.2.3.2 – Medidas espectroscópicas.....	123
3.2.3.3 – Tratamento quimiométrico.....	124
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
3.3.1 – Verificação da autenticidade das aguardentes comerciais empregando-se a técnica SNIF-NMR.....	125
3.3.2 – Análise Quimiométrica dos dados de RMN das aguardentes	128
3.3.2.1 – Discriminação das aguardentes comerciais por RMN de ^1H	128
3.3.2.2 – Discriminação das aguardentes comerciais por RMN de ^{13}C	148
3.3.3 – Identificação dos compostos presentes nas aguardentes usando a Espectroscopia de RMN	157
3.4 – CONCLUSÕES.....	159
 Capítulo 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	 161
 Capítulo 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 165

Capítulo 1

Introdução

1.1 – O mel

A apicultura no Brasil tem-se expandido muito nos últimos anos, o que resultou no reconhecimento do país como um dos maiores exportadores mundiais de mel, com vendas para vários países da Europa, além de Estados Unidos e Japão (SEBRAE AGRONEGÓCIOS, 2006). Devido a isto, é importante ter um controle da qualidade do produto e, principalmente, saber exatamente o que está sendo oferecido ao mercado internacional, certificando e agregando valores aos méis nacionais, de tal forma que o Brasil não seja somente um fornecedor de matéria-prima para as indústrias alimentícia e farmacêutica.

A legislação brasileira atual, que é regida pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, define o mel como sendo: “O produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre suas partes vivas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias e deixam madurar nos favos da colméia” (BRASIL, 2000).

O néctar das flores é a matéria-prima para a produção de méis florais, sendo estes os mais apreciados e que alcançam os maiores valores no mercado. O mel floral pode ser monofloral, quando o néctar é coletado de uma única espécie vegetal; polifloral, se mais de uma espécie de plantas contribui com o néctar; ou silvestre, que caracteriza-se por ser um mel polifloral produzido quando várias espécies nativas contribuem com o néctar (MOREIRA e DE MARIA, 2001).

O mel de melato é obtido, principalmente, a partir das secreções das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas (BRASIL, 2000), diferindo do mel floral em vários aspectos: possui menores teores de glucose e de frutose, maiores teores de oligossacarídeos, compostos nitrogenados e sais minerais e maior pH (CAMPOS *et al.*, 2003).

A composição do mel é bastante variável e tem relação direta com a solução de carboidratos que a abelha coletou para produzi-lo. Seus componentes principais são os monossacarídeos glucose e frutose, que juntos compõem cerca de 70% do total, e são facilmente assimiláveis; mas também existem pequenas quantidades de dissacarídeos, predominantemente a sacarose e a maltose; e 17% a 20% de água (ESTI *et al.*, 1997 e DE MARIA e MOREIRA, 2003).

Segundo DE MARIA e MOREIRA (2003), o mel apresenta propriedades medicinais, como propriedades antioxidante e antisséptica, que geralmente estão relacionadas à presença de compostos fenólicos e à enzima glucose oxidase, a qual catalisa a oxidação da glucose, com concomitante produção de peróxido de hidrogênio, um forte agente oxidante que ataca o envoltório de microrganismos.

1.1.1 – Produção de mel

Na tabela 1.1-1 estão relacionados alguns dos maiores produtores mundiais de mel, de 2002 a 2006. Estes dados foram fornecidos pela Organização para a Alimentação e a Agricultura das Nações Unidas (FAO-ONU, 2008).

TABELA 1.1-1. Produção mundial de mel, de 2002 a 2006

País	Toneladas/Ano				
	2002	2003	2004	2005	2006
China	267.830	298.197	301.465	303.439	306.500
Estados Unidos	77.890	82.431	83.272	72.927	70.238
Argentina	83.000	75.000	87.690	93.415	93.415
Espanha	35.722	35.279	36.695	27.230	30.000
Canadá	37.072	34.602	34.241	36.109	43.033
Brasil	23.995	30.022	32.290	33.750	33.750

Fonte: FAO-ONU, 2008.

A China mantém o posto de maior produtor de mel (306,5 mil toneladas em 2006), com uma quantidade nove vezes maior que a do Brasil (33,75 mil toneladas no mesmo ano). No entanto, analisando-se a produção dos demais países apresentados na tabela 1.1-1, observa-se que eles também produzem quantidades muito menores que a da China, estando mais próximas a do Brasil.

Segundo a FAO-ONU (2008), a produção nacional de mel teve um aumento significativo do ano de 2002 para o de 2003, tendo crescimentos menores de 2003 para 2004 e de 2004 para 2005. Além disto, a produção em 2006 manteve-se igual a de 2005. Entretanto, as informações fornecidas pelo Instituto Brasileiro de

Geografia e Estatística (IBGE, 2008) mostram números diferentes para o ano de 2006, como pode ser verificado na tabela 1.1-2.

Tabela 1.1-2. Produção nacional de mel, de 2002 a 2006

Grandes Regiões e Unidades da Federação	Toneladas/Ano				
	2002	2003	2004	2005	2006
Brasil	23.995	30.022	32.290	33.751	36.193
Norte	371	510	519	654	674
Rondônia	192	194	102	111	130
Acre	3	5	4	4	4
Amazonas	1	1	1	1	1
Roraima	12	70	122	202	160
Pará	92	149	200	224	261
Tocantins	71	91	90	112	118
Nordeste	5.562	7.968	10.401	10.911	12.103
Maranhão	158	286	436	517	559
Piauí	2.222	3.146	3.895	4.497	4.196
Ceará	1.373	1.896	2.933	2.312	3.053
Rio Grande do Norte	247	373	515	448	585
Paraíba	41	59	73	88	264
Pernambuco	577	653	883	1.029	1.162
Alagoas	15	86	116	184	164
Sergipe	56	50	55	61	73
Bahia	873	1.419	1.495	1.775	2.047
Sudeste	5.101	5.335	5.187	5.272	5.805
Minas Gerais	2.408	2.194	2.134	2.208	2.482
Espírito Santo	276	312	353	333	403
Rio de Janeiro	360	375	367	335	378
São Paulo	2.057	2.454	2.333	2.396	2.542
Sul	12.278	15.357	15.266	15.816	16.422
Paraná	2.844	4.068	4.348	4.462	4.612
Santa Catarina	3.829	4.511	3.601	3.926	3.990
Rio Grande do Sul	5.605	6.778	7.317	7.428	7.820
Centro-Oeste	683	852	917	1.098	1.189
Mato Grosso do Sul	334	407	366	451	485
Mato Grosso	175	241	300	375	365
Goiás	155	179	225	245	308
Distrito Federal	19	25	26	27	31

Fonte: IBGE, 2008.

Segundo o IBGE (2008), de 2002 a 2006 a produção brasileira de mel aumentou 50,84%. Este crescimento representa a grande expansão da atividade no Nordeste, que evoluiu de uma participação de 23,18% para 33,44% do total nacional e a grande produção do Sul, que representava 51,17% em 2002 e que em 2006 produziu 45,37% do total nacional, mas que continua sendo a maior região produtora. As outras regiões também apresentaram um aumento na produção, mas de forma menos significativa.

O valor das exportações do mel nacional em 2001 era de apenas 2,8 milhões de dólares, o que não era suficiente para que o Brasil aparecesse na lista dos maiores exportadores mundiais (com pouco mais de 1% do total). Já em 2002, o país surge com um lucro nas exportações de 23,1 milhões de dólares, sendo um reflexo da valorização do mel brasileiro (Aliceweb, MDIC, 2008).

Entretanto, a partir de 2005 as exportações de mel diminuíram como consequência do embargo europeu que exigiu um maior controle de qualidade do mel nacional (tabela 1.1-3). Observa-se também que as importações de mel mantêm-se em um número pequeno quando comparado com as exportações.

Tabela 1.1-3. Exportações e importações brasileiras de mel, de 2004 a 2007

Mel	Ano							
	2004		2005		2006		2007	
	Ton.	Mil US\$						
Exportações	21.029	42.303	14.442	18.940	14.602	23.373	12.907	21.194
Importações	38	98	18	24	18	43	4	9

Fonte: CONAB, 2008.

No entanto, em maio de 2008, o valor das exportações nacionais de mel, US\$ 4,15 milhões, foi o maior dos últimos quatro anos. O valor médio pago pelo mel exportado, US\$ 2,46/kg, foi recorde e vem acumulando altas sucessivas desde janeiro de 2008. O balanço das exportações de mel nos primeiros cinco meses deste ano também continua positivo, em relação ao mesmo período de 2007, sendo que a receita das exportações, US\$ 14,01 milhões, cresceu 57,6% e as quantidades comercializadas, 6,52 mil toneladas, aumentaram 14,4% (SEBRAE, 2008).

Apesar da suspensão do embargo do mel já ter sido oficializada no Diário Oficial da União Européia do dia 14/03/2008, até o mês de maio o Brasil não

realizou nenhuma exportação para a Europa. Por isto, em maio de 2008, o principal destino das exportações nacionais de mel era o mercado americano, que gastou US\$ 3,76 milhões em importações, representando quase 91% do valor total comercializado com o mercado externo. Nos primeiros cinco meses de 2008, as exportações para os EUA totalizaram US\$ 12,43 milhões, equivalentes a 5,79 mil toneladas de mel, representando um aumento de mais de 55,1%, em relação ao mesmo período do ano anterior (SEBRAE, 2008).

Em maio de 2008, o estado de São Paulo continuou sendo maior exportador de mel, com US\$ 1,69 milhões exportados, respondendo, sozinho, por 40,7% das exportações brasileiras. No acumulado dos cinco primeiros meses deste ano, os cinco estados que mais exportaram foram: São Paulo, Paraná, Ceará, Rio Grande do Sul e Piauí (tabela 1.1-4). Nesta tabela também está mostrado o melhor preço pago pelo mel comercializado por estes estados em maio de 2008.

Tabela 1.1-4. Exportações brasileiras de mel, de janeiro a maio de 2008, e melhor preço em maio de 2008

Estado	Exportações (Mil US\$) janeiro a maio 2008	Melhor preço (US\$/Kg) maio 2008
São Paulo	4.889	2,35
Paraná	2.417	2,37
Ceará	2.170	2,79
Rio Grande do Sul	2.167	2,50
Piauí	1.623	2,52

Fonte: SEBRAE, 2008.

1.2 – A aguardente

Nos últimos anos a cadeia produtiva nacional de aguardente encontra-se em expansão, firmando esta bebida como um importante produto do agronegócio brasileiro. Embora detenha uma pequena participação no total, ela vem adquirindo espaço crescente nas exportações. Por isto, o controle de qualidade da aguardente torna-se indispensável, sendo um critério importante para aumentar o interesse do mercado internacional pelo produto.

O termo aguardente foi regulamentado pelo artigo 90 do Decreto Presidencial nº 2.314, de 04 de setembro de 1997, definindo-a como: “A bebida com graduação alcoólica de trinta e oito a cinquenta e quatro por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pelo rebaixamento do teor alcoólico do destilado alcoólico simples, ou pela destilação do mosto fermentado” (BRASIL, 1997), sendo que o último é o método mais usado para a sua fabricação.

No entanto, em 02 de outubro de 2003 foi criado um novo Decreto Presidencial, de nº 4.851, que rege que a aguardente terá a denominação da matéria-prima de sua origem (BRASIL, 2003). Este decreto auxiliou na regulamentação de aguardentes como as de banana, abacaxi, pêssago e outras, cuja produção está aumentando e que com a definição anterior não eram bem regulamentadas.

A legislação brasileira limita em 5 mg L^{-1} o teor de cobre em bebidas destiladas, entretanto a legislação de outros países não tolera mais que 2 mg L^{-1} de cobre nos destilados alcoólicos (CARDOSO *et al.*, 2003), uma vez que o cobre conduz à contaminação do destilado por íons cúprico (LIMA-NETO *et al.*, 1994). Embora na concentração de 5 mg L^{-1} o cobre não possa ser considerado tóxico, a sua presença contribui para ressaltar o sabor ácido na bebida.

Em um estudo recente, ANDRADE-SOBRINHO *et al.* (2002) observaram uma tendência à correlação entre o teor de carbamato de etila e o material do alambique, indicando a participação do cobre na formação de carbamato de etila. No entanto, NEVES *et al.* (2007) desenvolveram um método simples e eficiente para eliminar o cobre das aguardentes fazendo-se um tratamento com CaCO_3 ou MgCO_3 . Além disto, os principais compostos orgânicos voláteis das aguardentes destiladas em destiladores de cobre e de aço inox (aldeídos, acetona, ácidos carboxílicos, álcoois e ésteres) foram analisados quantitativamente por NASCIMENTO *et al.* (1997).

1.2.1 – Produção de aguardente

De acordo com o Instituto Brasileiro da Cachaça (IBRAC, 2008) e a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE, 2008), o Brasil reúne cerca de 40 mil fabricantes, aproximadamente quatro mil marcas e tem capacidade para produzir 1,2 bilhões de litros de cachaça por ano. O estado de São Paulo é o mais produz,

representando 44% do total nacional, seguido por Ceará (12%), Pernambuco (12%), Minas Gerais (8%) e Paraíba (8%). Desse total, 70% são representados pela cachaça industrial (980 milhões de litros) e 30% pela cachaça de alambique (SEBRAE, 2008).

São Paulo tem uma longa tradição na produção de aguardente. No estado operam 850 empresas distribuidoras, com faturamento anual estimado em R\$ 5,0 bilhões. O intenso programa de pesquisas em cana-de-açúcar, desenvolvido em função de demandas do próprio setor sucro-alcooleiro, e o caráter industrial da atividade fazem com que a produtividade da aguardente paulista alcance a média de 150 litros por tonelada de cana, contra 100 litros por tonelada obtidos em Minas Gerais (SEBRAE, 2008).

No território nacional, o mercado de bebidas, em relação ao volume, está dividido entre cerveja (88,8%) e a cachaça (6,6%), ficando o restante do mercado para as demais bebidas (4,6%) (ABRABE, 2008).

A quantidade de cachaça exportada cresceu de 5,5 milhões de litros em 1998 para 14,5 milhões de litros em 2002 (tabela 1.2-1) e, se comparada à produção nacional, corresponde a apenas 1% do que é produzido anualmente. Comparando-se as vendas de janeiro a maio de 2007 e o mesmo período em 2008, houve um crescimento de aproximadamente 37% em valor (US\$ 6,9 milhões) e 46% em volume (4,6 milhões de litros). A previsão para o restante do ano de 2008 é que o crescimento continue (IBRAC, 2008).

Tabela 1.2-1. Valores das exportações nacionais de cachaça, de 2002 a 2007

Ano	Quantidade (Mil L)	Valor (Mil US\$)	Preço médio (US\$/L)
2002	14.535	8.722	0,60
2003	8.664	9.008	1,04
2004	8.607	11.072	1,29
2005	10.343	12.412	1,20
2006	11.323	14.400	1,27
2007	9.052	13.830	1,53

Fonte: Aliceweb, MDIC, 2008.

Na Tabela 1.2-1 observa-se, também, uma trajetória crescente para o valor exportado pelo Brasil. De um total de US\$ 8,72 milhões registrados no ano de

2002, passou para um montante igual a US\$ 13,83 milhões em 2007. Este aumento no valor exportado é um reflexo do valor pago pelo litro de cachaça, que aumentou consideravelmente, devido às estratégias de venda do governo brasileiro indicando-a como bebida típica do Brasil e, com a regulamentação da sua qualidade.

Com relação ao destino internacional da cachaça brasileira, a Alemanha encontra-se no topo do *ranking* dos países importadores da bebida, com 22,1% da quantidade total exportada em 2007 (tabela 1.2-2). No total, a bebida foi exportada para mais de 50 países (IBRAC, 2008).

Tabela 1.2-2. Maiores compradores de cachaça brasileira, em 2007

País	Quantidade (%)
Alemanha	22,1
Paraguai	11,6
Uruguai	9,2
Portugal	8,8
França	7,3
EUA	7,1
Espanha	4,4

Fonte: Aliceweb, MDIC, 2008.

1.3 – Ressonância Magnética Nuclear – RMN

Alimentos, como o mel e a aguardente, são produtos susceptíveis a adulterações utilizando-se matérias-primas de baixo custo para aumentar a quantidade do produto de maior valor comercial. Por isso, é de extrema importância que sejam garantidas as suas qualidades e para isto é indispensável a utilização de ferramentas analíticas que possam fazer este controle.

Os trabalhos até então desenvolvidos a respeito do controle da qualidade do mel dão especial atenção a uma determinada substância ou grupos de substâncias. LEITE *et al.* (2000) mostraram as proporções de dez oligossacarídeos em 70 méis autênticos brasileiros de diferentes origens florais. COTTE *et al.*, 2003 analisaram os carboidratos presentes nos méis utilizando-se duas técnicas (cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa), e fazendo-se uso

de métodos quimiométricos detectaram a adição de xaropes industriais aos méis. MOREIRA e DE MARIA (2001) fizeram uma revisão sobre a composição, origem e importância dos carboidratos presentes nos méis. WEIGEL *et al.* (2004) observaram pela primeira vez compostos 1,2-dicarbonilados (3-desoxiglucosulose, metilgloxal e gloxal) em 21 amostras de méis.

Além disto, várias técnicas analíticas têm sido aplicadas com sucesso na investigação dos constituintes químicos dos méis, tais como: condutometria (DEVILLERS *et al.*, 2004), espectroscopia na região do infravermelho (PARADKAR e IRUDAYARAJ, 2001 e SIVAKESAVA e IRUDAYARAJ, 2001) e infravermelho próximo (WOODCOCK *et al.*, 2007), espectrometria de massas (GIRADON *et al.*, 2000 e PADOVAN *et al.*, 2003), cromatografia líquida de alta eficiência (KOSHIO e MURADIAN, 2003), entre outras (RUIZ-MATUTE *et al.*, 2007).

Com relação às aguardentes, algumas técnicas também têm sido utilizadas na análise de sua composição química, como a cromatografia líquida de alta eficiência (TFOUNI *et al.*, 2007), cromatografia gasosa (CARDOSO *et al.*, 2003 e CARDOSO *et al.*, 2004), espectroscopia na região do infravermelho (LACHENMEIER, 2005; LACHENMEIER *et al.*, 2005 e LACHENMEIER, 2007), espectroscopia de plasma acoplada indutivamente - ICP (KOKKINOFTA e THEOCHARIS, 2005).

A RMN de alta resolução é a uma técnica que dispensa processos, como extração e purificação das substâncias durante o processo de preparação da amostra, sendo um procedimento fácil, rápido e não degradativo (CAZOR *et al.*, 2006 e CALIGIANI *et al.*, 2007). Além disto, ela é muito usada para obter informação estrutural de compostos orgânicos, podendo ser útil na investigação de misturas complexas, como os alimentos (GIL *et al.*, 2000 e PETRAKIS *et al.*, 2005).

A aplicação da RMN na identificação dos constituintes químicos em alimentos sem o seu prévio isolamento tem sido de grande sucesso. SANDUSKY e RAFTERY (2005) utilizaram a técnica TOCSY seletivo para identificar os compostos minoritários do mel, tais como os aminoácidos. CALIGIANI *et al.* (2007) elucidaram as diferentes classes de compostos presentes nos vinagres, em particular vinagres balsâmicos italianos, realizando espectros de RMN de ^1H dos vinagres e dos compostos puros.

Em 2005, SOBOLEV *et al.* aplicaram as técnicas de RMN de ^1H , COSY, TOCSY, HSQC, HMBC e DOSY na identificação dos metabólitos presentes

em folhas de alface. Um grande número de metabólitos solúveis em água, tais como carboidratos, polióis e aminoácidos, e em solventes orgânicos, como esteróis, ácidos graxos, carotenóides, entre outros, foi identificado.

1.3.1 – *Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance* – SNIF-NMR

A Ressonância Magnética Nuclear pode contribuir significativamente para a determinação da autenticidade quanto à origem geográfica e/ou biossintética dos alimentos, através das medidas da relação isotópica, $^2\text{H}/^1\text{H}$, em abundância natural, para sítios moleculares específicos. Esta verificação é feita empregando-se uma técnica conhecida como SNIF-NMR, que foi desenvolvida para detectar a adição de carboidratos não declarados no vinho, com o objetivo de aumentar o seu teor alcoólico, em um processo que é chamado de enriquecimento ou *chaptalization* (MARTIN *et al.*, 1988 e PIONNIER *et al.*, 2003).

A técnica SNIF-NMR também tem sido utilizada para verificar a autenticidade de outros alimentos, como por exemplo, sucos de frutas (MARTIN *et al.*, 1995; OGRINC *et al.*, 2003 e MARTIN, 2005), vinagres (HERMANN, 2001 e BOFFO e FERREIRA, 2006), cafés (DANHO *et al.*, 1992) e tequila (BAUER-CHRISTOPH *et al.*, 2003).

Na verificação da autenticidade de méis e aguardentes o composto analisado é o etanol e que possui três isotopômeros monodeuterados observáveis em abundância natural (MARTIN *et al.*, 1983). O deutério (**D**) pode estar localizado nos sítios metílico (I), metilênico (II) ou hidroxílico (III) do etanol:



Devido à baixa abundância natural do deutério em relação ao hidrogênio, a probabilidade de se ter uma espécie bideuterada é muito pequena e pode ser ignorada (COLQUHOUN e LEES, 1998).

As razões $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{I}}$ e $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{II}}$, associadas aos sítios metílico (I) e metilênico (II) do etanol, são medidas por RMN utilizando-se um padrão de conteúdo isotópico conhecido e podem ser calculados com base na equação 1 (ZHANG *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 1991).

$$\left(\frac{{}^2\text{H}}{{}^1\text{H}}\right)_i^A = \frac{I_i^A}{I^P} * \frac{P^P}{P_i^A} * \frac{m^P}{m^A} * \frac{M^A}{M^P} \left(\frac{{}^2\text{H}}{{}^1\text{H}}\right)^P \quad \text{equação 1}$$

em que:

$\left(\frac{{}^2\text{H}}{{}^1\text{H}}\right)_i^A$: Relação isotópica no sítio i do composto de estudo, A.

$\left(\frac{{}^2\text{H}}{{}^1\text{H}}\right)^P$: Relação isotópica do padrão.

I^P e I_i^A : Área dos sinais de RMN de ${}^2\text{H}$ do padrão e do sítio i de A, respectivamente.

P^P e P_i^A : Número de hidrogênios do padrão e do sítio i de A, respectivamente.

m^P e m^A : Massa do padrão e de A, respectivamente.

M^P e M^A : Massa molar do padrão e de A, respectivamente.

Um padrão interno ideal é aquele que está disponível em uma forma altamente pura, que é estável e quimicamente inerte em relação ao solvente e à amostra. É importante que ele seja não volátil, não higroscópico e solúvel no solvente de escolha. Preferencialmente, deve apresentar um singlete intenso em uma região livre de sinais, mas que esteja suficientemente próximo e não se sobreponha aos sinais de interesse no espectro de RMN (LEYDEN e COX, 1977 e RIZZO e PINCIROLI, 2005).

A tetrametiluréia (TMU) é um solvente excelente para a dissolução de substâncias orgânicas, particularmente compostos aromáticos. Semelhante à piridina é miscível em todas as proporções não somente em água, mas em todos os solventes orgânicos comuns (LÜTTRINGHAUS e DIRKSEN, 1964). Além disto, ela apresenta uma relação isotópica conhecida, 135 ppm, o que é indispensável para a utilização da técnica SNIF-NMR (MARTIN *et al.*, 1988).

1.3.1.1 – Espectroscopia de RMN de ${}^2\text{H}$

A RMN de ${}^2\text{H}$ é consideravelmente menos sensível que a RMN de ${}^1\text{H}$ devido à baixa abundância natural do deutério, 0,015%, com relação ao hidrogênio (CLARIDGE, 1999 e ROBINS *et al.*, 2003).

O núcleo de deutério, que é caracterizado por possuir um número quântico de *spin* igual a 1, possui um momento quadrupolar elétrico ($2,8 \times 10^{-31} \text{ m}^2$), portanto, sua relaxação nuclear é governada por um mecanismo quadrupolar (BRAUN *et al.*, 1996), que é responsável pelo alargamento de linha no seu espectro.

No entanto, a predominância deste mecanismo é favorável do ponto de vista quantitativo, uma vez que as contribuições dipolares são desprezíveis e não há nenhum aumento da intensidade dos sinais pelo efeito Overhauser nuclear quando o desacoplamento do hidrogênio é aplicado. Desta forma, as áreas dos sinais medidas no espectro convenientemente desacoplado são proporcionais ao número de átomos de deutério. Este comportamento é uma vantagem para a medida da razão isotópica exata do hidrogênio (MARTIN *et al.*, 1992).

A obtenção dos espectros de RMN de ^2H em condições quantitativas requer cuidados especiais em relação aos parâmetros de aquisição e de tratamento dos dados. Um dispositivo para estabilização da frequência do campo magnético, geralmente um *lock* de ^{19}F , é requerido para evitar deslocamentos do campo magnético e subsequente alargamento dos sinais. Além disto, o desacoplamento de banda larga é aplicado para remover o desdobramento dos sinais referentes às interações $^2\text{H} - ^1\text{H}$, já que a probabilidade de existirem espécies bideuteradas em abundância natural é extremamente baixa e, portanto, o acoplamento $^2\text{H} - ^2\text{H}$ pode ser ignorado (COLQUHOUN e LEES, 1998).

No entanto, quando o deutério não está disponível para corrigir as variações do campo magnético (*lock*), por exemplo, quando deseja-se observar este núcleo, é necessário adquirir os dados sem *lock*. A realização destes experimentos é possível dentro de um intervalo de tempo limitado, que depende da velocidade de deslocamento do campo magnético (*drift*) do espectrômetro (CLARIDGE, 1999).

1.3.1.2 – Verificação da autenticidade dos méis

Uma forma de aumentar a produção de mel e que pode ser facilmente executada é a alimentação das abelhas com uma solução aquosa de sacarose quando elas estão fazendo a coleta do néctar. Outra forma é a adição de açúcar diretamente ao mel, fazendo com que a quantidade produzida seja aumentada. No entanto, a instrução normativa nº 11 do Ministério da Agricultura rege que “ao mel não podem ser adicionados açúcares e/ou outras substâncias que alterem a sua composição original” (BRASIL, 2000). Portanto, estes atos se configuram em adulterações.

Além disto, a distribuição de deutério em uma molécula de carboidrato varia em função do mecanismo biossintético usado na sua síntese, da quantidade de

HDO (ou seja, hidrogênio, deutério e oxigênio) consumida pela planta, e das condições ambientais onde a planta foi cultivada (CROSS *et al.*, 1998). Por isso, as plantas que sintetizam os carboidratos pelo ciclo C_4 (ciclo de Hatch–Slack) distribuem o deutério diferentemente das plantas que utilizam o ciclo C_3 (ciclo de Calvin) (OGRING *et al.*, 2001).

Desta forma, o conteúdo isotópico da metila do etanol, obtido através da fermentação do mel, está diretamente relacionado àquele da planta de onde o néctar foi coletado pela abelha (MARTIN *et al.*, 1986), sendo que estas plantas podem seguir, predominantemente, os metabolismos biossintéticos C_3 e C_4 (PADOVAN *et al.*, 2003 e COTTE *et al.*, 2007). Portanto, a alimentação excessiva da abelha com o açúcar da cana-de-açúcar (uma planta C_4) causa um aumento no valor da relação isotópica da metila, quando comparado àquele de um mel produzido a partir do néctar de uma planta C_3 (LINDNER *et al.*, 1996).

1.3.1.3 – Verificação da autenticidade das aguardentes

Um tipo de adulteração que pode ser realizado com relação ao aumento da produção dos diferentes tipos de aguardentes é fazer uma aguardente de cana-de-açúcar e a ela adicionar essências e corantes, que caracterizarão um outro tipo de aguardente, como as de banana, mel e grapa. No entanto, este ato desobedece ao Decreto Presidencial nº 4.851 (BRASIL, 2003).

Como para o mel, o conteúdo isotópico da metila do etanol, obtido através da fermentação dos carboidratos no processo de produção da aguardente, está diretamente relacionado àquele da planta que o deu origem. Desta forma, obtêm-se informações a respeito do tipo de matéria-prima foi usado na produção da aguardente, sendo que elas podem pertencer às classes de plantas que fixam o CO_2 atmosférico através dos metabolismos biossintéticos C_3 , C_4 e CAM (MARTIN *et al.*, 1986).

1.4 – Os Mecanismos Biossintéticos de Fixação do CO_2

As características das plantas com relação ao seu mecanismo de fixação do CO_2 têm levado a classificação das mesmas a três grupos distintos:

plantas C₃, C₄ e CAM. Os dois primeiros grupos são nomeados com base em estudos realizados expondo-se as plantas ao dióxido de carbono radioativo, formando compostos de três ou quatro átomos de carbono marcados isotopicamente, dando o nome aos grupos. O terceiro grupo refere-se às plantas que realizam o metabolismo do ácido crassuláceo (CAM).

1.4.1 – A Fixação do CO₂ em Plantas C₃

Os pesquisadores M. Calvin, J. Bassham e A. Benson traçaram a rota metabólica da radioatividade do ¹⁴CO₂ em culturas de células de algas, entre 1946 e 1953. A análise das algas após cinco segundos de exposição ao ¹⁴CO₂ mostrou que o primeiro composto radioativo estável formado foi o ácido 3-fosfoglicérico (*3-phosphoglyceric acid* – 3PGA) (RABINOWITCH e GOVINDJEE, 1969), que foi inicialmente marcado somente no seu grupo carboxila. A rota completa é conhecida como ciclo de Calvin ou ciclo redutivo das pentoses-fosfato (VOET *et al.*, 2006).

A fixação do CO₂ pelo ciclo de Calvin (apresentada esquematicamente na figura 1.4-1, página 17) ocorre em três estágios:

O primeiro estágio é a reação de três moléculas de CO₂ com três moléculas do receptor de cinco átomos de carbono, a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP), para formar seis moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (3PGA), com três átomos de carbono. Esta reação é catalisada pela enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco).

No segundo estágio, as seis moléculas de 3PGA são reduzidas para formar seis moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (18 átomos de carbono). A reação se dá em duas etapas: a primeira é uma fosforilação do 3PGA, que acontece adicionando-se um fosfato do ATP; e a segunda é uma redução do ácido 1,3-bifosfoglicérico, utilizando o NADPH. Uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato pode ser empregada na produção de energia via glicólise e ciclo do ácido cítrico, ou condensado em hexoses-fosfato, para ser utilizada na síntese do amido ou da sacarose.

No terceiro estágio, cinco moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são empregadas para regenerar três moléculas de RuBP. Assim, o processo global é cíclico e permite a contínua conversão do CO₂ em triose e hexose-fosfato.

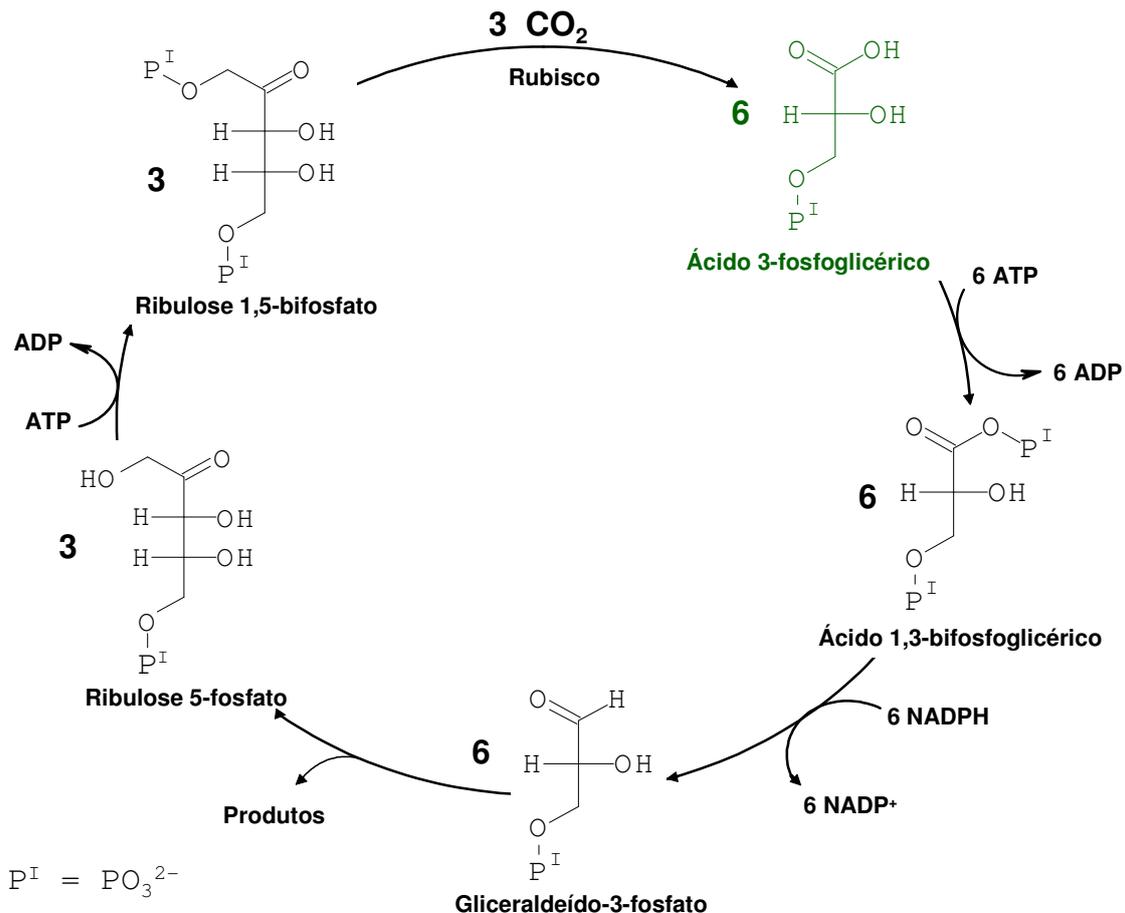


FIGURA 1.4-1. Representação esquemática do ciclo C_3

1.4.2 – A Fixação do CO_2 em Plantas C_4

Em meados da década de 60 descobriu-se que, em algumas plantas, o ácido 3-fosfoglicérico (3PGA) não era o primeiro intermediário no qual o CO_2 radioativo era incorporado. H. Kortschak e depois M. Hatch e C. L. Slack descobriram que, em tais plantas, que incluem a cana-de-açúcar e o milho, os ácidos dicarboxílicos de quatro átomos de carbono (ácidos oxalacético, málico e aspártico) são os primeiros produtos da fixação do CO_2 . Estas plantas são chamadas de plantas C_4 (VOET *et al.*, 2006).

As folhas destas plantas têm uma anatomia característica. Suas veias menores são concêntricamente envoltas por uma camada de células denominadas células da bainha vascular, as quais, por sua vez, são envoltas por uma camada de células do mesófilo.

A figura 1.4-2 (página 18) apresenta esquematicamente o ciclo C_4 .

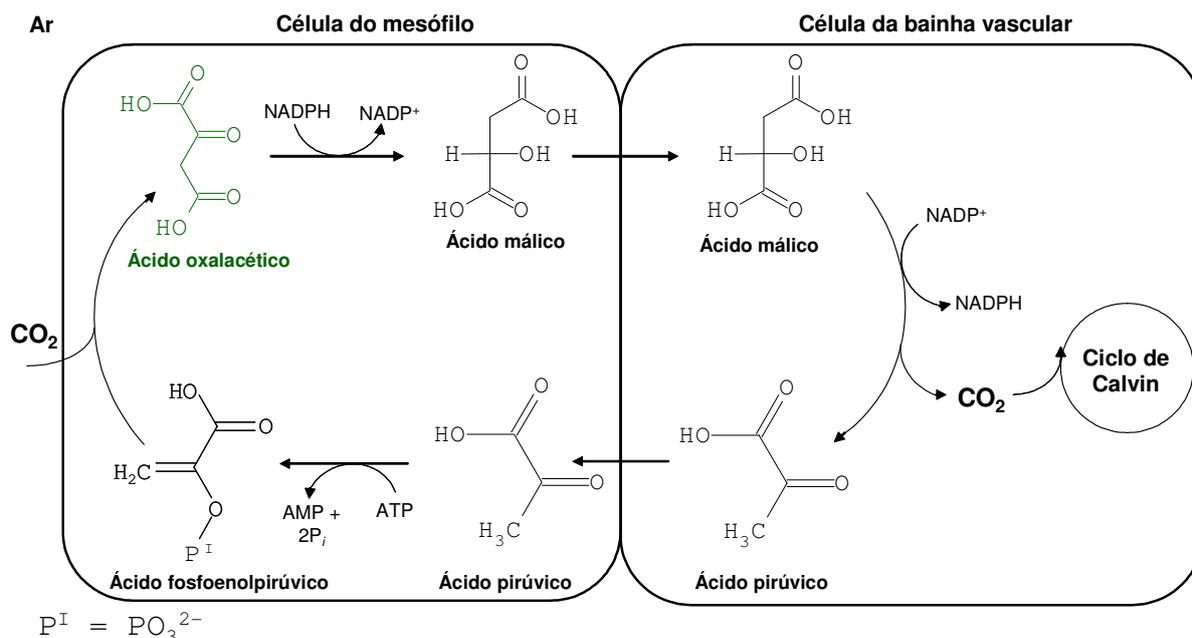


FIGURA 1.4-2. Representação esquemática do ciclo C_4

O ciclo inicia-se quando as células do mesófilo absorvem o CO_2 atmosférico, condensando-o com o ácido fosfoenolpirúvico para formar o ácido oxaloacético, em uma reação catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato-carboxilase (PEP-carboxilase). O ácido oxaloacético é reduzido pelo NADPH ao ácido málico, o qual é transportado até as células da bainha vascular (o nome C_4 refere-se a este ciclo de ácidos de quatro átomos de carbono). Nestas células, o ácido málico é descarboxilado oxidativamente pelo NADP^+ para formar CO_2 , ácido pirúvico e NADPH. O CO_2 concentrado por este processo entra no ciclo de Calvin. Enquanto isto, o ácido pirúvico retorna às células do mesófilo, nas quais é fosforilado para regenerar o ácido fosfoenolpirúvico (LEHNINGER, 2006).

1.4.3 – A Fixação do CO_2 em Plantas CAM

Uma variante do ciclo C_4 , que faz uma separação temporal, em vez de espacial, entre a assimilação do CO_2 e o ciclo de Calvin ocorre em muitas plantas dos desertos, ou *habitats* sujeitos a secas periódicas (PIERCE *et al.*, 2002). Este processo é conhecido como metabolismo do ácido crassuláceo (*Crassulacean Acid Metabolism* – CAM), assim chamado por ter sido descoberto em plantas da família Crassulaceae (HALL *et al.*, 1995).

Estas plantas são caracterizadas por fecharem os seus estômatos (poros das folhas) durante o dia, para minimizar a perda de água por transpiração, assimilando o CO₂ somente à noite e utilizando as reações do mecanismo C₄ (figura 1.3-2) para armazená-lo como ácido málico. A grande quantidade de ácido fosfoenolpirúvico necessária para estocar o suprimento de CO₂ de um dia é obtido pela degradação de amido via glicólise. No decorrer do dia, o ácido málico é degradado a CO₂ e ácido pirúvico. Desta forma, o CO₂ é incorporado ao ciclo de Calvin e o ácido pirúvico é usado para ressintetizar o amido.

As plantas CAM são, portanto, capazes de fazer a fotossíntese com uma mínima perda de água (VOET *et al.*, 2006).

1.5 – Análise Quimiométrica em dados de RMN

A espectroscopia de RMN, que é uma técnica muito empregada na análise de alimentos, apresenta a vantagem de mostrar em um único espectro todas as possíveis classes de substâncias presentes e em quantidades detectáveis (GIL *et al.*, 2003 e LOLLI *et al.*, 2008). Entretanto, a grande quantidade de informações obtida em um espectro de RMN de ¹H pode dificultar a interpretação dos dados quando um número elevado de amostras é analisado. Neste sentido, os métodos quimiométricos têm sido aplicados com sucesso em dados espectrais para reduzir a sua complexidade e evidenciar as informações mais relevantes (DEFERNEZ e COLQUHOUN, 2003).

Desta forma, pode-se dizer que a quimiometria é uma disciplina da química que usa métodos matemáticos e estatísticos para maximizar as informações que podem ser extraídas de um conjunto de dados, apresentando-as de forma mais simplificada.

A RMN aliada à quimiometria tem sido empregada com sucesso na análise de alimentos. Vários trabalhos já foram publicados e, dentre muitas aplicações, encontram-se: a discriminação entre tomates convencionais e geneticamente modificados (LE GALL *et al.*, 2003); a determinação da qualidade de óleos vegetais (PRESTES *et al.*, 2007); o controle de qualidade de cervejas (DUARTE *et al.*, 2002); o estudo de vinhos de mesa (LARSEN *et al.*, 2006); a discriminação entre sucos de *grapefruit* e laranja (CUNY *et al.*, 2007 e CUNY *et al.*,

2008); a diferenciação de vinagres balsâmicos com diferentes períodos de envelhecimento (CONSONNI e GATTI, 2004 e CONSONNI *et al.*, 2008a); a discriminação entre diferentes tipos de méis (BOFFO *et al.*, 2007) e a discriminação entre cafés dos tipos arábica e robusta (TAVARES *et al.*, 2005).

A partir dos espectros de RMN é construída uma matriz de dados, na qual os experimentos (amostras) são transformados em linhas e os parâmetros dos experimentos (variáveis) correspondem às colunas. A matriz de dados originais X é construída por n amostras e m variáveis ($n \times m$). Em um conjunto de dados espectroscópicos, as variáveis são os pontos utilizados no processamento do espectro.

Nesta matriz de dados são aplicados os métodos quimiométricos de análise exploratória (*Principal Components Analysis* – PCA e *Hierarchical Clusters Analysis* – HCA) e de classificação de amostras (*K-Nearest Neighbor* – KNN, *Soft Independent Modelling of Class Analogies* – SIMCA e *Partial Least Squares Discriminant Analysis* – PLS-DA), que estão ilustrados no esquema apresentado na figura 1.5-1.

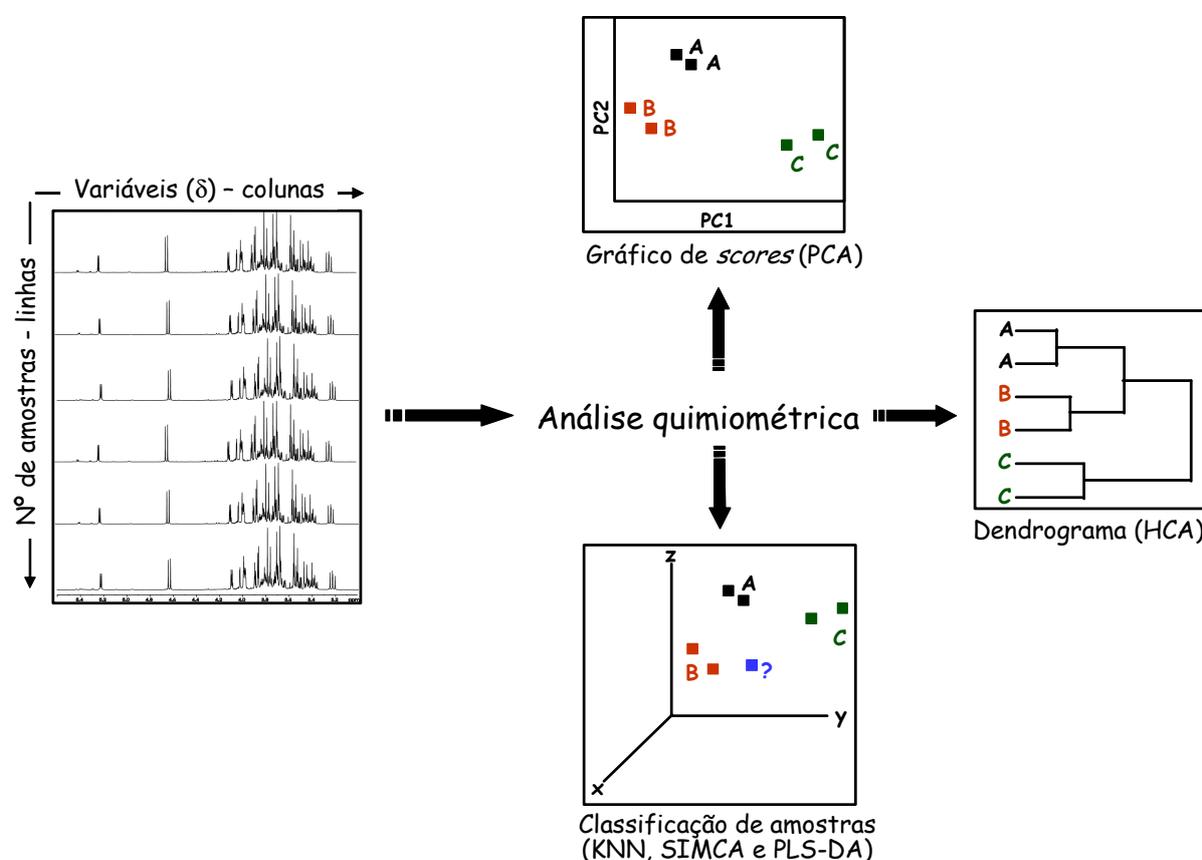


FIGURA 1.5-1. Esquema ilustrativo dos métodos quimiométricos aplicados aos dados de RMN

1.5.1 – Análise Exploratória de Dados

A análise exploratória dos dados destina-se a agrupar as amostras que possuam características comuns a um determinado grupo e distinguí-las daquelas com características diferentes, auxiliando na identificação das que não seguem o padrão das demais, sendo chamadas de não usuais ou *outliers* (FERREIRA *et al.*, 1999). Além disto, as correlações entre as variáveis são analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade maior de informações, muitas vezes impossível de obter-se quando analisa-se variável a variável (BEEBE *et al.*, 1998).

1.5.1.1 – Análise por Componentes Principais – PCA

A análise por PCA é um método de análise multivariada, que consiste em uma manipulação da matriz de dados com o objetivo de projetar dados n -dimensionais em um espaço com poucas dimensões, normalmente duas ou três, sendo obtidas por meio de combinações lineares das variáveis originais. Desta forma, o objetivo principal da análise por PCA é a redução da dimensionalidade dos dados, diminuindo a sua complexidade e ressaltando as informações mais relevantes (DEFERNEZ e COLQUHOUN, 2003).

Neste método, os dados originais são representados por novas variáveis (ou eixos) que são chamadas de componentes principais (*Principal Components* – PCs), sendo ortogonais entre si e construídos de forma que as informações mais relevantes ficam contidas nas primeiras PCs, e as de menor importância, nas últimas. A primeira PC é a combinação das variáveis que explicam a maior quantidade de variação dos dados. A segunda PC contém o máximo da quantidade de variação não explicada pela primeira e é independente dela. O número de componentes principais que pode existir está relacionado ao número de variáveis do conjunto, não podendo ultrapassar esse número (MASSART *et al.*, 2001 e WINNING *et al.*, 2008).

Dois tipos de gráficos podem ser gerados na análise por PCA, gráficos de *scores* e *loadings* (figura 1.5-2, página 22), cujos eixos são as PCs nas quais os dados são projetados. Em um gráfico de *scores* (figura 1.5-2A) cada ponto corresponde a uma amostra. As distâncias entre as amostras são aproximações das

distâncias no espaço multivariado; fazendo com que grupos (*clusters*) de amostras similares possam ser detectados visualmente. No gráfico de *loadings* (figura 1.5-2B) cada ponto corresponde a uma variável, e mostra as similaridades e as correlações entre as mesmas. Além disto, este gráfico evidencia quais variáveis são responsáveis pelas posições relativas das amostras no gráfico de *scores*. Variáveis com valores pequenos de *loadings* estão localizadas perto da origem e têm em média pouca influência sobre a estrutura dos dados. Uma variável com valores elevados de *loadings* para uma PC deslocará a amostra para a região correspondente a esta PC no gráfico de *scores* (JALALI-HERAVI *et al*, 2004).

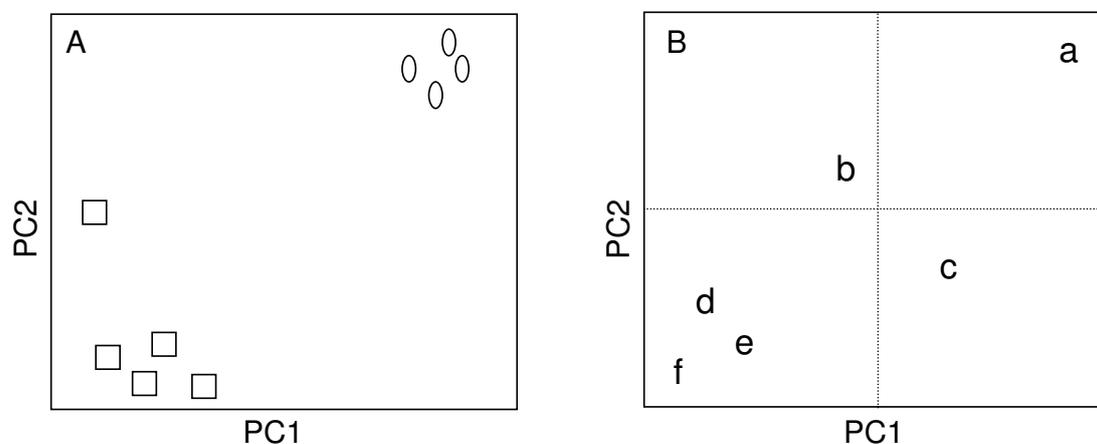


FIGURA 1.5-2. Um exemplo simples de gráficos de (A) *scores* e (B) *loadings*. O gráfico de *scores* mostra dois grupos de amostras e uma anômala (*outlier*). No gráfico de *loadings* pode-se ver que a variável **a** é importante para a discriminação das amostras localizadas no canto direito superior do gráfico de *scores*; as variáveis **d**, **e** e **f** são características para as amostras no canto inferior esquerdo; já as variáveis **b** e **c** estão próximas a origem do gráfico de *loadings* e, portanto, têm uma pequena influência na discriminação

1.5.1.2 – Análise por Agrupamentos Hierárquicos – HCA

Esta é uma ferramenta excelente para análise preliminar dos dados (BEEBE *et al.*, 1998), sendo útil para determinar a semelhança entre amostras e identificar aquelas que apresentam comportamento anômalo.

O método relaciona as amostras de forma que as mais semelhantes são agrupadas entre si com relação às variáveis usadas no processo de agrupamento. Cada amostra é representada como um ponto no espaço de m variáveis e, portanto, a questão fundamental reside em transformar a informação de

um espaço m-dimensional para um espaço bidimensional. O parâmetro usado neste processo é a medida de distância entre as amostras. Estas distâncias, quando visualizadas através de diagramas conhecidos por dendrogramas, indicam as amostras mais semelhantes entre si, ou seja, quanto menor a distância entre os pontos, maior será a semelhança entre as mesmas (MASSART *et al.*, 2001 e BECKONERT *et al.*, 2003).

Para proceder à análise por agrupamentos hierárquicos, é necessário estabelecer o conceito de distância entre duas amostras a e b (d_{ab}) em um espaço de m variáveis. Há várias medidas usuais, entre elas a distância Euclideana, que pode ser determinada pela expressão matemática 2:

$$d_{ab} = \left(\sum_{j=1}^m (x_{aj} - x_{bj})^2 \right)^{1/2} \quad \text{equação 2}$$

em que x_{aj} é a j-ésima coordenada da amostra a.

No método de análise por agrupamento hierárquico as distâncias entre todas as amostras são calculadas e comparadas. Como as distâncias reais entre as amostras mudam com o tipo e o tamanho do conjunto de dados, é necessário transformá-las numa escala de similaridade, que varia de um (amostras idênticas) a zero (amostras sem similaridade) e é calculada segundo a equação 3:

$$s_{ab} = 1 - \{d_{ab} / d_{\max}\} \quad \text{equação 3}$$

em que s_{ab} é a similaridade entre as amostras a e b; d_{ab} é a distância entre as mesmas e d_{\max} é a maior distância entre todas as amostras.

Após o cálculo das similaridades as duas amostras mais próximas são conectadas formando um agrupamento. Este processo é repetido até que todas as amostras sejam conectadas formando um único grupo (BEEBE *et al.*, 1998). Uma vez que as amostras são conectadas pela proximidade entre elas, é necessário definir a distância entre uma amostra e um grupo ou entre grupos de amostras e há várias técnicas para tal. As mais usuais são: conexão pelo vizinho mais próximo (*single linkage* ou *nearest neighbour*); conexão pelo vizinho mais distante (*complete link* ou *farthest neighbour*); conexão pela distância média (*average link*).

Quando a distância entre dois agrupamentos for obtida pela distância média, pode-se utilizar a média aritmética ou ponderada. No primeiro caso, cada agrupamento tem o mesmo peso e no último, o coeficiente de ponderação é

correspondente ao número de elementos nos respectivos agrupamentos (*clusters*) e, neste caso, o método é denominado incremental (MORGANO *et al.*, 1999).

1.5.2 – Classificação de Amostras

Os métodos de classificação de amostras são denominados supervisionados (LAVINE e WORKMAN, 2006), uma vez que as amostras do conjunto de treinamento, que possuem classes conhecidas, são usadas para construir um modelo matemático, que é avaliado utilizando-se um conjunto de validação independente ou externa (BEEBE *et al.*, 1998). Após isto, as amostras desconhecidas são classificadas usando-se os modelos construídos.

1.5.2.1 – *K-Nearest Neighbor* – KNN

O KNN é um método de classificação que determina a classe de uma amostra desconhecida com base na distância entre ela e seus vizinhos mais próximos, cujas classes são conhecidas e que são chamados de amostras do modelo ou amostras do conjunto de treinamento (LINDON *et al.*, 2001).

Neste método, calcula-se a distância entre a amostra desconhecida e todas as amostras do modelo. Por comparação, os K-vizinhos mais próximos desta amostra são escolhidos para votar. Cada um dá um voto para a sua classe e, assim, ela será atribuída à classe com o maior número de votos (BRERETON, 2002). Em caso de empate, a amostra pertencerá à classe com a menor distância acumulada (Pirouette[®], 1985 – 2007).

A validação do modelo é feita usando um novo conjunto (amostras teste), chamado de conjunto teste ou de validação. A classificação de uma amostra teste é feita com base na sua distância aos K-vizinhos mais próximos do modelo. Ela pertencerá à classe com o maior número de votos (BRERETON, 2002).

Após as etapas de construção e de validação do modelo, as amostras desconhecidas poderão ser classificadas.

Uma característica deste método é que ele obrigatoriamente classifica a amostra como pertencente a uma das classes no conjunto de treinamento (Pirouette[®], 1985 – 2007).

1.5.2.2 – *Soft Independent Modeling of Class Analogy* – SIMCA

Em contraste ao KNN, no método SIMCA cada classe do conjunto de treinamento é submetida a uma análise por componentes principais. Em torno das classes são geradas hipercaixas, cujos limites são definidos com relação ao nível de confiança desejado, geralmente usa-se 95% (BRANDEN e HUBERT, 2005).

A amostra desconhecida é comparada a cada modelo de PCA (ALAM e ALAM, 2005) e a sua atribuição é baseada na sua projeção no espaço dos *scores* e na sua distância dos limites das classes. Se o modelo não tiver poder de discriminação suficiente, a amostra pode ser atribuída a mais de uma classe, ou ainda, quando ela for um *outlier* em relação ao conjunto de treinamento, não pertencerá a nenhuma das classes (LINDON *et al.*, 2001).

1.5.2.3 – *Partial Least Squares Discriminant Analysis* – PLS-DA

O PLS-DA é um método da regressão linear que relaciona dois blocos de variáveis, \mathbf{X} (variáveis independentes - conjunto de dados obtidos dos espectros de RMN) e \mathbf{Y} (gerado automaticamente a partir da variável classe já existente – variáveis dependentes) (MASOUM *et al.*, 2006 e MARTINA *et al.*, 2007).

O bloco de variáveis \mathbf{Y} consiste em um conjunto de variáveis binárias. A cada amostra é atribuída um valor, 1 ou 0, dependendo se pertence ou não à classe representada por esta coluna. Portanto, o objetivo do método PLS-DA é encontrar as direções no espaço multivariado \mathbf{X} que separam as classes conhecidas, baseadas no conjunto de treinamento (CIOSEK *et al.*, 2005 e WHELEHAN *et al.*, 2006).

Os valores previstos pelo modelo PLS-DA serão idealmente os valores 0 e 1, entretanto, na prática estes valores se aproximam destes. É calculado um valor limite entre os valores previstos (0,5), onde valores acima deste valor limite indicam que a amostra pertence à classe modelada e valores previstos abaixo deste limite indicam que a amostra não pertence à classe modelada (GAVAGHAN *et al.*, 2002).

Capítulo 2

Méis

2.1 – OBJETIVOS

Os objetivos principais da aplicação da RMN na análise dos méis foram:

2.1.1) Utilizar a técnica SNIF-NMR para verificar a autenticidade das amostras comerciais;

2.1.2) Aplicar os métodos de classificação, KNN, SIMCA e PLS-DA, aos espectros de RMN de ^1H para classificar os méis comerciais do estado de São Paulo nas três categorias: méis silvestres, de eucalipto e de laranjeira;

2.1.3) Aplicar os métodos de análise exploratória, PCA e HCA, aos dados de RMN de ^1H para verificar a influência da regionalidade sobre as amostras de méis e determinar as substâncias responsáveis pela sua diferenciação;

2.1.4) Discriminar os tipos de méis aplicando-se os métodos de análise exploratória dos dados aos espectros de RMN de ^{13}C ;

2.1.5) Elucidar alguns compostos majoritários presentes no mel.

2.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Os espectros de RMN de ^1H , ^2H , ^{13}C (usados na aplicação dos métodos quimiométricos), *g*COSY, *g*HSQC, *g*HMBC e TOCSY foram adquiridos em um equipamento Bruker DRX400 de 9,4 Tesla (400,21 MHz para a frequência do hidrogênio, 61,40 MHz para a do deutério e 100,64 MHz para a do carbono), utilizando-se sondas de 5 mm com detecção direta (BBO) e com detecção inversa (BBI), sendo esta equipada com gradiente de campo no eixo z e a temperatura de 298 K.

Os espectros de RMN de ^{13}C utilizados na elucidação estrutural foram adquiridos em um equipamento Varian UNITYplus de 9,4 Tesla (399,96 MHz para a frequência do hidrogênio e 100,58 MHz para a do carbono), utilizando-se uma sonda de 10 mm com detecção direta e a temperatura de 298 K.

2.2.1 – As amostras

Foram analisados méis de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), de laranjeira (*Citrus* sp.), de assa-peixe (*Vernonia* sp.), silvestres, aqueles produzidos pela alimentação da colméia com sacarose e os coletados em uma plantação de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). As amostras foram adquiridas comercialmente e de fontes confiáveis, ou seja, de apicultores conhecidos e com garantia da procedência das amostras.

A tabela 2.2-1 (página 31) apresenta a descrição dos méis analisados durante a realização dos estudos propostos nesta tese.

A amostra Glu1 é referente a uma mistura de glucose de mandioca e açúcar invertido e foi analisada com o intuito de verificar qual a semelhança entre a sua composição química e a dos méis produzidos pelas abelhas.

O mel de melato (Silv22) foi produzido quando as abelhas coletaram o melato, que é um líquido doce secretado por insetos que alimentam-se do floema das plantas chamadas de bracatingas (*Leguminosae Mimosoideae* Mimoso sp), que são cultivadas no estado de Santa Catarina (CAMPOS *et al.*, 2003).

Os méis de jataí são produzidos pelas abelhas *Tetragonisca angustula* (SAWAYA *et al.*, 2006), que são conhecidas por "abelhas indígenas sem ferrão" por possuírem o ferrão atrofiado sendo, portanto, incapazes de ferroar. Deste tipo de

mel foram analisadas três amostras.

TABELA 2.2-1. Identificação, classe e origem dos méis analisados

Amostra	Classe	Identificação	Estado	Região
Euc1	Eucalipto	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Euc2	Eucalipto	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Euc3	Eucalipto	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Euc4	Eucalipto	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Euc5	Eucalipto	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Euc6	Eucalipto	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Euc7	Eucalipto	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Euc8	Eucalipto	Comercial	São Paulo	Sudeste
Euc9	Eucalipto	Comercial	São Paulo	Sudeste
Euc10	Eucalipto	Comercial	São Paulo	Sudeste
Euc11	Eucalipto	Comercial	São Paulo	Sudeste
Euc12	Eucalipto	Comercial	São Paulo	Sudeste
Euc13	Eucalipto	Comercial	São Paulo	Sudeste
Euc14	Eucalipto	Comercial	São Paulo	Sudeste
Euc15	Eucalipto	Comercial	Minas Gerais	Sudeste
Euc16	Eucalipto	Autêntico	Rio Grande do Sul	Sul
Lar1	Laranjeira	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Lar2	Laranjeira	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Lar3	Laranjeira	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Lar4	Laranjeira	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Lar5	Laranjeira	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Lar6	Laranjeira	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Lar7	Laranjeira	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Lar8	Laranjeira	Comercial	São Paulo	Sudeste
Lar9	Laranjeira	Comercial	São Paulo	Sudeste
Lar10	Laranjeira	Comercial	São Paulo	Sudeste
Lar11	Laranjeira	Comercial	São Paulo	Sudeste
Lar12	Laranjeira	Comercial	São Paulo	Sudeste
Lar13	Laranjeira	Comercial	São Paulo	Sudeste
Lar14	Laranjeira	Comercial	Minas Gerais	Sudeste
Lar15	Laranjeira	Autêntico	Rio Grande do Sul	Sul
Silv1	Silvestre	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Silv2	Silvestre	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Silv3	Silvestre	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Silv4	Silvestre	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Silv5	Silvestre	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Silv6	Silvestre	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Silv7	Silvestre	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Silv8	Silvestre	Comercial	São Paulo	Sudeste
Silv9	Silvestre	Comercial	São Paulo	Sudeste
Silv10	Silvestre	Comercial	São Paulo	Sudeste
Silv11	Silvestre	Comercial	São Paulo	Sudeste
Silv12	Silvestre	Comercial	São Paulo	Sudeste
Silv13	Silvestre	Comercial	São Paulo	Sudeste
Silv14	Silvestre	Comercial	São Paulo	Sudeste
Silv15	Silvestre	Autêntico	Paraná	Sul
Silv16	Silvestre	Autêntico	Paraná	Sul
Silv17	Silvestre	Autêntico	Paraná	Sul

Continua na próxima página

TABELA 2.2-1.

continuação

Amostra	Classe	Identificação	Estado	Região
Silv18	Silvestre	Autêntico	Paraná	Sul
Silv19	Silvestre	Comercial	Rio Grande do Sul	Sul
Silv20	Silvestre	Autêntico	Rio Grande do Sul	Sul
Silv21	Silvestre	Comercial	Rio Grande do Sul	Sul
Silv22	Melato	Autêntico	Santa Catarina	Sul
Silv23	Silvestre	Autêntico	Rio Grande do Sul	Sul
Silv24	Silvestre	Autêntico	Santa Catarina	Sul
Silv25	Silvestre	Comercial	Mato Grosso do Sul	Centro-Oeste
Silv26	Silvestre	Comercial	Goiás	Centro-Oeste
Silv27	Silvestre	Comercial	Goiás	Centro-Oeste
Silv28	Silvestre	Autêntico	Goiás	Centro-Oeste
Silv29	Silvestre	Comercial	Mato Grosso	Centro-Oeste
Silv30	Silvestre	Comercial	Mato Grosso	Centro-Oeste
Silv31	Silvestre	Autêntico	Mato Grosso	Centro-Oeste
Silv32	Silvestre	Comercial	Mato Grosso do Sul	Centro-Oeste
Silv33	Silvestre	Comercial	Mato Grosso do Sul	Centro-Oeste
Silv34	Silvestre	Comercial	Mato Grosso do Sul	Centro-Oeste
Silv35	Silvestre	Comercial	Pernambuco	Nordeste
Silv36	Silvestre	Comercial	Alagoas	Nordeste
Silv37	Silvestre	Comercial	Alagoas	Nordeste
Silv38	Silvestre	Comercial	Rio Grande do Norte	Nordeste
Silv39	Silvestre	Comercial	Ceará	Nordeste
Silv40	Silvestre	Comercial	Ceará	Nordeste
Silv41	Silvestre	Comercial	Roraima	Norte
Silv42	Silvestre	Comercial	Amazonas	Norte
Silv43	Silvestre	Comercial	Amazonas	Norte
Silv44	Silvestre	Autêntico	Amazonas	Norte
Silv45	Silvestre	Autêntico	Amazonas	Norte
Silv46	Silvestre	Autêntico	Amazonas	Norte
Silv47	Silvestre	Autêntico	Amazonas	Norte
Silv48	Silvestre	Autêntico	Roraima	Norte
Silv49	Silvestre	Comercial	Roraima	Norte
Silv50	Silvestre	Comercial	Roraima	Norte
AP1	Assa-peixe	Autêntico	São Paulo	Sudeste
AP2	Assa-peixe	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Jatai1	Jataí	Comercial	Mato Grosso	Centro-Oeste
Jatai2	Jataí	Autêntico	Mato Grosso	Centro-Oeste
Jatai3	Jataí	Autêntico	Paraná	Sul
Açu1	Cana-de-açúcar	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Açu2	Cana-de-açúcar	Autêntico	São Paulo	Sudeste
Açu3	Cana-de-açúcar	Comercial	São Paulo	Sudeste
Glu1	Glucose de mandioca e açúcar invertido	Comercial	Paraná	Sul

2.2.2 – Verificação da autenticidade dos méis comerciais empregando-se a técnica SNIF-NMR

Neste estudo foram analisados 70 méis, sendo que 14 foram de eucalipto (Euc1 a Euc14), 15 de laranjeira (Lar1 a Lar15), 32 silvestres (Silv1 a Silv10, Silv15 a Silv30, Silv35 a Silv37, Silv42 a Silv44), dois de assa-peixe (AP1 e AP2), três de jataí (Jatai1 a Jatai3), três de cana-de-açúcar (Açu1 a Açu3) e a glucose de mandioca e açúcar invertido (Glu1), cuja descrição está mostrada na tabela 2.2-1 (página 31).

A obtenção de um espectro de RMN de ^2H , com uma qualidade satisfatória, com o objetivo de observar a distribuição isotópica de amostras compostas de carboidratos, como o mel, é muito difícil, pois o espectro mostra-se complexo e com muitos sinais sobrepostos. No entanto, quando o carboidrato é fermentado, a distribuição isotópica do etanol resultante mantém as mesmas características da molécula que o originou (ZHANG *et al.*, 1995). Assim, o espectro de RMN de ^2H do etanol será muito mais simples que o do carboidrato e manterá as informações a respeito da fonte do açúcar (CROSS *et al.*, 1998). Desta forma, neste trabalho, os méis foram fermentados e o etanol resultante foi analisado por RMN.

2.2.2.1 – Fermentação dos méis e preparo das amostras

A fermentação dos méis foi feita utilizando-se 10 g de mel, 5 g do fermento utilizado para a produção de pães - *Saccharomyces cerevisiae* (marca fermix - Dona Benta) e 60 mL de água destilada. O período de fermentação foi de 48 horas, e não houve controle da temperatura durante o processo. Em seguida, foi feita uma destilação fracionada da mistura com o intuito de garantir uma concentração de etanol elevada nas amostras, fazendo com que a aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^2H do etanol pudesse ser feita de forma rápida, além de garantir uma boa relação sinal/ruído nos mesmos e, conseqüentemente, tornar as integrais dos sinais mais precisas.

2.2.2.2 – Aquisição dos espectros de RMN de ^2H e ^1H

As amostras foram preparadas em triplicata, adicionando-se 100 μL de tetrametiluréia (TMU) 99%, com conteúdo isotópico conhecido (abundância natural), a 600 μL do etanol destilado, de forma a obter uma intensidade do sinal da metila do etanol versus metila do TMU de aproximadamente 1:1, no espectro de RMN de ^1H .

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos utilizando-se a seqüência de pulsos *zg* (nomenclatura Bruker). Em seguida, foram processados aplicando uma transformada de *Fourier* utilizando-se 65536 pontos, a fase foi ajustada manualmente e foi feita a correção automática da linha de base.

Os espectros de RMN de ^2H foram obtidos logo após os de ^1H e utilizando-se a seqüência de pulsos *zgdc* (nomenclatura Bruker), que é usada para a aquisição dos núcleos de deutério com desacoplamento dos núcleos de hidrogênio. No processamento foi aplicada uma transformada de *Fourier* utilizando-se 8192 pontos e uma multiplicação exponencial, com fator de alargamento de linha (*Line Broadening* ou LB), de 1,0 Hz. Na seqüência, foi realizado o ajuste manual da fase e a correção automática da linha de base.

Os espectros de RMN de ^2H foram adquiridos sem a utilização do *lock* de ^{19}F , pois o equipamento utilizado não possui esse dispositivo.

Os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^2H estão apresentados na tabela 2.2-2.

TABELA 2.2-2. Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^2H (Bruker)

	RMN de ^1H	RMN de ^2H
Tempo de aquisição (AQ)	5,2 s	5,2 s
Tempo de espera antes de cada aquisição (D1)	3,0 s	3,0 s
Número de aquisições (NS)	16	1024
Largura de pulso de 90° (P1)	10,5 μs	17,5 μs
Ganho do receptor (RG)	1,0	16384
Janela espectral (SW)	4664 Hz (16 ppm)	983 Hz (16 ppm)
Número de pontos digitalizados (TD)	65536	10240

2.2.2.3 – Cálculo da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$

O cálculo da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ foi feito utilizando-se a equação 1, apresentada na introdução (página 13).

2.2.3 – Análise Quimiométrica dos dados de RMN dos méis

2.2.3.1 – As amostras

Classificação dos méis comerciais do estado de São Paulo por RMN de ^1H – Neste estudo foram analisados 39 méis, sendo 13 de eucalipto (Euc1 a Euc13); 12 de laranja (Lar1 a Lar12) e 14 silvestres (Silv1 a Silv14), adquiridos comercialmente e de alguns apicultores do estado de São Paulo, conforme está descrito na tabela 2.2-1 (página 31).

Discriminação dos méis de assa-peixe, cana-de-açúcar e adulterados com relação aos méis autênticos do estado de São Paulo – Neste estudo foram analisados dois méis de assa-peixe (AP1 e AP2); um produzido pela alimentação da colméia com sacarose (Açu1) e dois coletados em plantações de cana-de-açúcar (Açu2 e Açu3) conforme está descrito na tabela 2.2-1 (página 31). Estes méis não são produzidos com muita frequência, e conseqüentemente, um número pequeno de amostras foi adquirido. Por isso, não foram incluídos no estudo de classificação, mas foram comparados aos méis autênticos utilizando-se a análise por componentes principais (PCA). Além disto, foram analisados dois méis adquiridos no mesmo local, mas vendidos como tipos diferentes, eucalipto (Euc14) e laranja (Lar13), mas que mostraram-se muito semelhantes na análise dos mesmos pela técnica SNIF-NMR.

Estudo da influência da regionalidade sobre os méis por RMN de ^1H – Foram analisados 14 méis da região Sul (Euc16, Lar15, Silv15 a Silv24, Jatai3 e Glu1); 12 do Centro-Oeste (Silv25 a Silv34, Jatai1 e Jatai2); seis do Nordeste (Silv35 a Silv40); dez do Norte (Silv41 a Silv50) e 33 do Sudeste (Euc1 a Euc7 e Euc14, Lar1 a Lar13, Silv1 a Silv12), totalizando-se 75 amostras, que estão descritas na tabela 2.2-1 (página 31).

Discriminação dos méis por RMN de ^{13}C – Foram analisados quatro méis de eucalipto (Euc1 a Euc3 e Euc14); seis de laranja (Lar1 a Lar5 e Lar13) e

dez silvestres (Silv1 a Silv8, Sil15 e Silv16), em um total de 20 amostras, cuja descrição está mostrada na tabela 2.2-1 (página 31).

2.2.3.2 – Medidas espectroscópicas

As amostras foram preparadas em triplicata, diluindo-se 150 mg de mel em 450 μL de D_2O . Em seguida, adicionou-se uma gota de uma solução do sal trimetilsilil-2,2,3,3- d_4 -propionato de sódio (TMSP) em D_2O (0,16%), cujo deslocamento químico é δ 0,0, para ser utilizado como referência interna dos sinais de ressonância nos espectros.

A seqüência de pulsos utilizada na aquisição dos espectros de RMN de ^1H foi a *zgcppr* (nomenclatura Bruker), com a qual se faz a supressão do sinal dos hidrogênios da água. Em seguida, os espectros foram processados aplicando-se uma transformada de *Fourier* utilizando-se 32768 pontos e um LB de 0,3 Hz.

Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos utilizando-se a seqüência de pulsos *zgpg30* (nomenclatura Bruker), com a qual se faz a aquisição dos sinais dos núcleos de carbono-13 com o desacoplamento dos núcleos de hidrogênio e com NOE, usando pulsos de 30 graus. O processamento foi feito aplicando-se um LB de 1,0 Hz, e transformadas de *Fourier* utilizando-se 32768 e 65536 pontos, respectivamente, para verificar qual dos dois processamentos forneceria a melhor discriminação dos tipos de méis.

Os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados na tabela 2.2-3.

TABELA 2.2-3. Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Bruker)

	RMN de ^1H	RMN de ^{13}C
Tempo de aquisição (AQ)	7,0 s	1,4 s
Tempo de espera antes de cada aquisição (D1)	1,5 s	100,0 ms
Número de aquisições (NS)	64	11264
Largura de pulso de 90° (P1)	8,5 μs	6,0 μs
Atenuação da potência para supressão da água (PL9)	60 dB	---
Ganho do receptor (RG)	32	16384
Janela espectral (SW)	4664 Hz	27027 Hz
Número de pontos digitalizados (TD)	65536	65536

Em todos os espectros, a fase e a linha de base foram ajustadas de forma mais uniforme possível, tanto dentro de cada um quanto entre eles. Os espectros resultantes foram salvos como arquivos no formato ASCII para se fazer, em seguida, a análise quimiométrica dos dados.

2.2.3.3 – Tratamento quimiométrico

Todas as matrizes de dados foram construídas usando-se o programa Origin versão 5.0, e o tratamento quimiométrico foi realizado utilizando-se o programa Pirouette versões 3.11 e 4.0 (InfoMetrix, Woodinville, Washington, USA).

Os parâmetros e a seleção de variáveis em todos os estudos foram otimizados a partir das análises exploratórias dos dados por PCA e, em seguida, foram utilizados nas análises por HCA e nos métodos de classificação. As transformações usadas foram a divisão pela norma um e a primeira derivada, enquanto que o pré-processamento foi o autoescalamento. A distância métrica utilizada no HCA foi a Euclidiana e a conexão incremental. No KNN também foi usada a distância Euclidiana.

Classificação dos méis comerciais do estado de São Paulo por RMN de 1H – A matriz de dados analisada foi composta por 4644 variáveis (dispostas nas colunas) e 117 espectros (dispostos nas linhas – 39 amostras analisadas em triplicata, que estão indicadas pelas letras a, b e c nos gráficos de *scores* e dendrogramas). A este conjunto de dados foram acrescentados os espectros médios das triplicatas (indicados pela letra M) dos méis de eucalipto, laranjeira e silvestres, somando-se mais 39 espectros.

Na aplicação dos métodos de classificação, as amostras foram divididas em três conjuntos, ou seja, aquelas utilizadas na construção dos modelos (amostras de treinamento), na validação externa dos mesmos (amostras com características conhecidas pelo analista, mas desconhecidas pelos modelos, sendo chamadas de amostras teste), e na previsão das classes (amostras comerciais).

Na construção dos modelos foram utilizadas cinco amostras autênticas de cada tipo de mel. Já na validação externa foram usadas duas amostras de cada tipo. Para a previsão das classes das amostras comerciais foram analisados seis méis comerciais de eucalipto, cinco de laranjeira e sete silvestres, conforme está mostrado na tabela 2.2-4 (página 38).

TABELA 2.2-4. Classe e número de amostras usadas na construção e na validação externa dos modelos de classificação e na previsão das classes dos méis comerciais do estado de São Paulo

	Classe	Construção	Validação externa	Previsão
Silvestre	1	5	2	7
Eucalipto	2	5	2	6
Laranjeira	3	5	2	5

Discriminação dos méis de assa-peixe, cana-de-açúcar e adulterados com relação aos méis autênticos do estado de São Paulo – A matriz de dados analisada foi composta por 4644 variáveis (dispostas nas colunas) e 66 espectros (dispostos nas linhas – 22 amostras analisadas em triplicata).

Estudo da influência da regionalidade sobre os méis por RMN de ^1H – A matriz de dados foi composta por 4636 variáveis (dispostas nas colunas) e 225 espectros (dispostos nas linhas – 75 amostras feitas em triplicata).

Discriminação dos méis por RMN de ^{13}C – As matrizes de dados foram compostas por 20 espectros (dispostos nas linhas) e 4589 e 9093 variáveis (dispostas nas colunas), quando os espectros foram processados com 32768 e 65536 pontos, respectivamente.

2.2.4 – Elucidação estrutural

Para a realização dos espectros de RMN de ^1H e bidimensionais, a amostra de mel Lar13 foi preparada diluindo-se 150 mg do mel em 450 μL de D_2O . Em seguida, foi adicionada uma gota de uma solução de TMSP em D_2O (0,16%).

Já para a aquisição do espectro de RMN de ^{13}C a amostra foi preparada diluindo-se 500 mg de mel em 1,5 mL de D_2O e adicionadas cinco gotas de uma solução de TMSP em D_2O (1,60%).

Os parâmetros utilizados na aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados na tabela 2.2-5 (página 39), sendo mostrados os comandos utilizados tanto no equipamento Bruker quanto no Varian. Já os parâmetros usados na aquisição e processamento dos experimentos de RMN bidimensionais estão mostrados na tabela 2.2-6 (página 39).

TABELA 2.2-5. Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C usados na elucidação estrutural dos compostos presentes no mel Lar13

(Bruker/ Varian)	RMN de ^1H	RMN de ^{13}C
Seqüência de pulsos	<i>zgcppr</i>	<i>s2pul</i>
Tempo de aquisição (AQ/ AT)	7,0 s	1,4 s
Tempo de espera antes de cada aquisição (D1)	1,5 s	1,0 s
Número de aquisições (NS/ NT)	64	32768
Largura de pulso (P1/ PW)	8,5 μs (90°)	6,5 μs (45°)
Atenuação da potência para supressão da água (PL9)	60 dB	---
Ganho do receptor (RG/ gain)	32	60
Janela espectral (SW)	4664 Hz	22831 Hz
Número de pontos digitalizados (TD/ NP)	65536	65536
Número de pontos usados no processamento (SI/ FN)	65536	65536
Multiplicação exponencial (LB)	0,3 Hz	1,0 Hz

No experimento TOCSY foi usado um tempo de mistura (*mixing time*) de 120 ms. No *g*HSQC foi utilizado um tempo para evolução do acoplamento a uma ligação de 1,7 ms ($^1J_{\text{CH}}$ igual a 145 Hz) e no *g*HMBC foi usado um tempo para evolução do acoplamento em longa distância de 62,5 ms ($^nJ_{\text{CH}}$ igual a 8 Hz).

TABELA 2.2-6. Parâmetros de aquisição e processamento utilizados nos espectros TOCSY, *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC usados na elucidação estrutural dos compostos presentes no mel Lar13

Bruker	TOCSY	<i>g</i> COSY	<i>g</i> HSQC	<i>g</i> HMBC
Seqüência	<i>mlevphpr</i>	<i>cosygpprqf</i>	<i>hsqcetprgp</i>	<i>hmbcgplpndprqf</i>
TD(F2)	4098	4098	4098	4098
TD(F1)	360	512	512	512
SW(F2)	4664 Hz	4664 Hz	4664 Hz	4664 Hz
SW(F1)	4664 Hz	4664 Hz	22141 Hz	22645 Hz
AQ	439,1 ms	439,1 ms	439,1 ms	439,1 ms
D1	1,2 s	1,2 s	1,0 s	1,0 s
NS	32	32	24	64
PL9	---	60 dB	60 dB	60 dB
SI(F2)	2048	2048	2048	2048
SI(F1)	2048	2048	2048	2048

As seqüências de pulsos usadas na aquisição dos experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC foram as que estão disponíveis no equipamento Bruker, no entanto, foram editadas acrescentando-se uma seqüência que faz a supressão de um sinal, como a *zgpr*, para fazer os experimentos bidimensionais com supressão do sinal da água, como já é utilizado no *g*COSY.

Para o mel Jatai2 foram feitos os mesmos experimentos que para o Lar13, exceto o TOCSY, sendo mantidos os mesmos parâmetros e a forma de preparar a amostra.

2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 – Verificação da autenticidade dos méis comerciais empregando-se a técnica SNIF-NMR

Na figura 2.3-1 (página 42) estão mostrados os espectros de RMN de ^1H (A) e ^2H (B) do etanol obtido pela fermentação de um mel silvestre. No espectro de ^1H podem ser observados os sinais da metila (δ 1,11, tripleto, $J = 7,2$ Hz, correspondente a três hidrogênios), metilena (δ 3,54, quadrupletto, $J = 7,2$ Hz, dois hidrogênios) e hidroxila (δ 5,30, singletto largo, um hidrogênio) do etanol, da metila do padrão TMU (δ 2,74, singletto, 12 hidrogênios) e da água (δ 4,50, singletto largo, dois hidrogênios). Já no espectro de ^2H é possível observar os mesmos sinais, mas como singletos, devido ao desacoplamento dos núcleos de ^1H , já que o acoplamento oriundo de dois átomos de deutério vicinais é pouco provável devido à sua baixa abundância natural.

Para realizar este estudo foi necessário fazer a seleção do padrão interno a ser utilizado, visando-se obter uma medida quantitativa confiável. Nesse sentido, foi feita a escolha pela tetrametiluréia (TMU), que apresenta um singletto entre os dois sinais de interesse no espectro, ou seja, os sinais dos grupos CH_3 e CH_2 do etanol. Assim, todos os sinais (padrão e amostra) passarão por uma correção de fase muito semelhante, o que diminui os erros introduzidos nesse parâmetro de processamento.

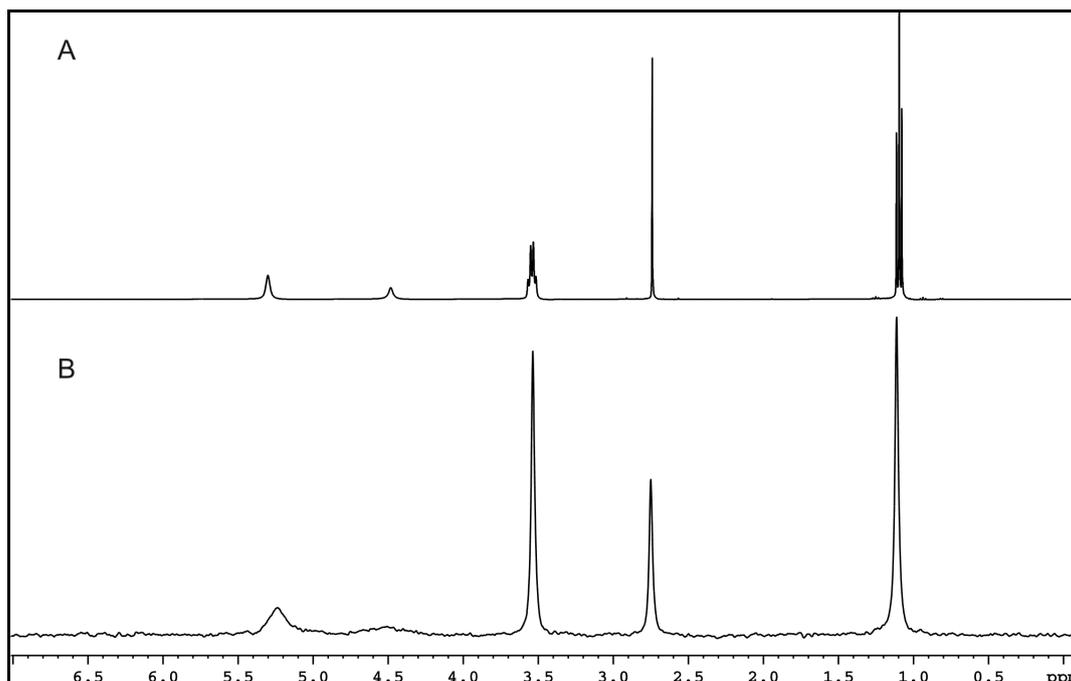


FIGURA 2.3-1. Espectros de RMN de (A) ^1H e (B) ^2H do etanol produzido a partir de um mel silvestre

Os espectros de RMN de ^1H foram calibrados com relação ao deslocamento químico utilizando-se a referência interna tetrametilsilano (TMS), sendo a ele atribuído o valor de δ 0,0, e os de ^2H foram calibrados utilizando-se o valor do deslocamento da metila do etanol, uma vez que os sinais no espectro de ^2H apresentam os mesmos deslocamentos químicos observados no espectro de ^1H (MARTIN *et al.*, 1983).

Os valores da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ calculados para os méis analisados nesse estudo estão mostrados na tabela 2.3-1 (página 43).

TABELA 2.3-1. Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ calculada para a metila ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_I e a metilena ($^2\text{H}/^1\text{H}$)_{II} do etanol obtido pela fermentação dos méis

Amostra	Relação Isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm)*	
	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _I	($^2\text{H}/^1\text{H}$) _{II}
Euc1	99,7 (± 1,0)	129,1 (± 0,5)
Euc2	99,4 (± 0,2)	128,8 (± 0,2)
Euc3	99,2 (± 0,7)	127,5 (± 0,6)
Euc4	98,7 (± 0,5)	128,1 (± 0,5)
Euc5	96,9 (± 1,0)	128,4 (± 0,2)
Euc6	98,0 (± 0,7)	127,3 (± 0,4)
Euc7	96,9 (± 0,1)	128,3 (± 1,1)
Euc8	99,7 (± 0,1)	127,9 (± 0,4)
Euc9	97,3 (± 0,8)	129,6 (± 0,5)
Euc10	99,1 (± 0,2)	127,5 (± 0,3)
Euc11	97,9 (± 0,2)	128,2 (± 0,1)
Euc12	99,7 (± 0,8)	128,8 (± 0,7)
Euc13	98,1 (± 0,4)	128,5 (± 0,2)
Euc14	112,2 (± 0,5)	128,0 (± 0,3)
Lar1	100,5 (± 0,3)	129,1 (± 0,5)
Lar2	101,8 (± 0,4)	128,1 (± 0,6)
Lar3	102,1 (± 0,2)	127,2 (± 0,2)
Lar4	100,9 (± 0,6)	127,3 (± 0,4)
Lar5	100,3 (± 0,1)	127,6 (± 0,3)
Lar6	100,7 (± 0,6)	128,2 (± 0,2)
Lar7	102,4 (± 0,1)	127,6 (± 0,5)
Lar8	101,3 (± 0,9)	128,0 (± 0,5)
Lar9	100,7 (± 0,4)	128,0 (± 0,4)
Lar10	103,4 (± 0,2)	128,1 (± 0,9)
Lar11	101,8 (± 0,3)	127,9 (± 1,1)
Lar12	100,8 (± 0,2)	127,1 (± 0,1)
Lar13	112,0 (± 0,3)	129,2 (± 0,5)
Lar14	102,4 (± 0,3)	128,4 (± 0,4)
Lar15	102,3 (± 0,4)	127,7 (± 0,4)
Silv1	100,5 (± 0,4)	128,4 (± 0,4)
Silv2	100,4 (± 0,6)	127,6 (± 0,6)
Silv3	102,0 (± 0,1)	128,4 (± 0,6)
Silv4	97,1 (± 0,4)	128,9 (± 1,0)
Silv5	98,2 (± 0,1)	127,2 (± 0,1)
Silv6	99,4 (± 0,7)	128,5 (± 0,3)
Silv7	100,1 (± 0,1)	127,5 (± 0,6)
Silv8	100,4 (± 0,7)	129,1 (± 0,7)
Silv9	103,5 (± 0,2)	129,3 (± 0,2)
Silv10	99,4 (± 0,4)	127,7 (± 0,4)
Silv15	98,0 (± 0,4)	128,0 (± 2,0)
Silv16	98,5 (± 1,4)	127,4 (± 2,0)
Silv17	101,1 (± 0,6)	127,7 (± 0,1)
Silv18	98,8 (± 0,0)	127,7 (± 0,4)
Silv19	98,8 (± 0,2)	128,3 (± 0,3)
Silv20	101,1 (± 0,3)	127,7 (± 0,4)
Silv21	98,8 (± 0,3)	127,2 (± 0,4)

Continua na próxima página

TABELA 2.3-1. continuação

Amostra	Relação Isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm)*	
	$(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{I}}$	$(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{II}}$
Silv22	98,6 ($\pm 0,3$)	127,9 ($\pm 0,3$)
Silv23	99,5 ($\pm 0,5$)	127,6 ($\pm 0,3$)
Silv24	99,8 ($\pm 0,1$)	127,6 ($\pm 0,2$)
Silv25	99,3 ($\pm 0,1$)	128,1 ($\pm 0,3$)
Silv26	97,7 ($\pm 0,0$)	128,0 ($\pm 0,3$)
Silv27	98,3 ($\pm 0,2$)	127,9 ($\pm 0,2$)
Silv28	101,7 ($\pm 0,1$)	128,6 ($\pm 0,0$)
Silv29	99,3 ($\pm 0,4$)	128,6 ($\pm 0,1$)
Silv30	111,3 ($\pm 0,0$)	128,2 ($\pm 0,1$)
Silv35	99,8 ($\pm 0,0$)	127,9 ($\pm 0,2$)
Silv36	100,1 ($\pm 0,2$)	128,1 ($\pm 0,4$)
Silv37	99,8 ($\pm 0,5$)	128,2 ($\pm 0,6$)
Silv42	97,4 ($\pm 0,2$)	127,5 ($\pm 0,4$)
Silv43	102,5 ($\pm 0,4$)	127,7 ($\pm 0,4$)
Silv44	98,3 ($\pm 0,3$)	127,5 ($\pm 0,2$)
AP1	101,7 ($\pm 0,1$)	127,9 ($\pm 0,4$)
AP2	101,2 ($\pm 0,1$)	127,8 ($\pm 0,3$)
Jatai1	111,5 ($\pm 0,2$)	128,4 ($\pm 0,2$)
Jatai2	99,9 ($\pm 0,2$)	128,0 ($\pm 0,5$)
Jatai3	100,2 ($\pm 0,2$)	128,3 ($\pm 0,4$)
Açu1	111,8 ($\pm 0,2$)	128,0 ($\pm 0,5$)
Açu2	112,6 ($\pm 0,2$)	127,9 ($\pm 0,1$)
Açu3	112,3 ($\pm 0,1$)	128,3 ($\pm 0,2$)
Glu1	106,3 ($\pm 0,2$)	127,7 ($\pm 0,1$)

* Valores médios das triplicatas

Analisando-se os valores da relação isotópica apresentados na tabela 2.3-1 (página 43) observa-se que os valores da metilena do etanol ($^2\text{H}/^1\text{H}_{\text{II}}$) mantiveram-se entre 127,2 e 129,6 ppm, não tendo muita variação, uma vez que estão relacionados com a água utilizada no processo de fermentação do mel (PIONNIER *et al.*, 2003).

Na figura 2.3-2 (página 45) está apresentado o mecanismo para a glicólise e a formação do etanol. Nesta figura observa-se que os hidrogênios da metilena do etanol têm a sua origem relacionada com o meio de fermentação, sendo provenientes da água e do NADH e justificando a não discriminação dos méis, uma vez que a água utilizada na fermentação dos méis foi a mesma. Além disto, os hidrogênios 3, 4 e 5 da glucose são transferidos para o meio durante o processo, enquanto que os hidrogênios 1, 2 e 6 são transferidos para a metila do etanol, por isso a metila mantém a informação sobre a fonte de carboidratos usada na produção do mel.

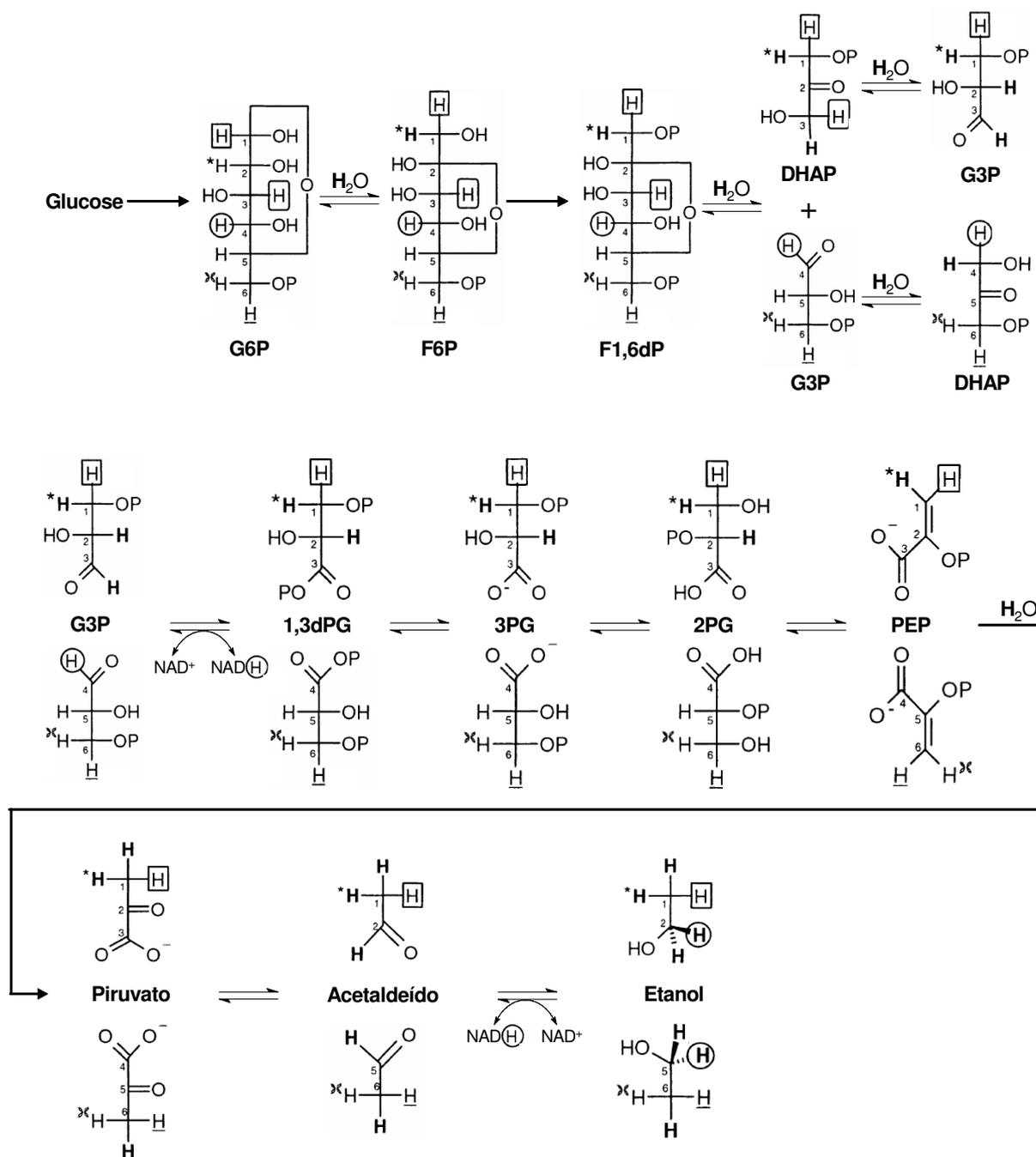


FIGURA 2.3-2. Mecanismo da glicólise e formação do etanol. O destino dos hidrogênios é ilustrado para os hidrogênios H-1, H-2 e H-6 da glucose. A numeração dos átomos de carbono segue aquela da glucose. G6P, glucose 6-fosfato; F6P, frutose 6-fosfato; F1,6dP, frutose 1,6-difosfato; DHAP, dihidróxi acetona fosfato; G3P, gliceraldeído 3-fosfato; 1,3dPG, 1,3-difosfoglicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato; 2PG, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato

Os valores obtidos para a metila do etanol ($^2\text{H}/^1\text{H}$) (tabela 2.3-1, página 43) mostraram-se característicos da origem biossintética de cada tipo de planta, pois o sítio metila do etanol reflete a origem do néctar utilizado para a produção do mel, uma vez que dois dos seus hidrogênios são provenientes da glucose durante o processo de fermentação (COTTE *et al.*, 2007), como pode ser observado na figura

2.3-2 (página 45). Para os méis de eucalipto ficaram menores, mas próximos a 100 ppm; para os méis de laranjeira e de assa-peixe um pouco maiores que 100 ppm. Estes valores são semelhantes e estão próximos a 100 ppm, pois tratam-se de méis obtidos de plantas que fixam o CO₂ utilizando o mecanismo biossintético C₃ (LINDNER *et al.*, 1996).

Para os méis silvestres houve a formação de dois grupos, sendo que, em um deles foram encontrados valores que aproximaram-se mais dos méis de eucalipto e no outro os valores assemelharam-se mais aos dos de laranjeira. Apesar da diferença ser pequena este resultado mostra que os méis silvestres apresentam variações nas suas composições, que estão relacionadas à predominância de certas plantas nos locais onde as abelhas coletaram o néctar.

Os méis Jatai2 e Jatai3 apresentaram valores de (²H/¹H)_I próximos aos obtidos para os de laranjeira e eucalipto, sugerindo que as abelhas coletam o néctar de plantas C₃ para produzi-los.

Os valores de (²H/¹H)_I calculados para o mel produzido pela alimentação indevida das abelhas com sacarose (Açu1) e para aqueles produzidos quando as colméias foram colocadas no meio da plantação de cana-de-açúcar (Açu2 e Açu3) foram de 111,8, 112,3 e 112,6 ppm, respectivamente. Este valor é aproximadamente 10 ppm maior do que o observado para os méis de eucalipto, laranjeira e silvestre. Esta diferenciação ocorreu porque a cana-de-açúcar é uma planta que realiza o ciclo biossintético C₄ para fixação do CO₂ (EDWARDS *et al.*, 2001).

As amostras Euc14, Lar13, Silv30 e Jatai1 apresentaram valores de (²H/¹H)_I em torno de 112 ppm, aproximando-se do valor obtido para os méis Açu1, Açu2 e Açu3. Estes resultados sugerem que estas amostras passaram por algum processo de adulteração utilizando-se o açúcar da cana-de-açúcar.

O mel de Jataí (Jatai1) poderia ter sido produzido por uma colméia próxima a uma plantação de cana-de-açúcar, mas sendo a abelha Jataí muito frágil, ela provavelmente não fez coleta de carboidratos em um canavial, que é muito agressivo para ela. Por isso, este mel provavelmente passou por algum tipo de adulteração.

A amostra Glu1, que é a uma mistura de glucose de mandioca e açúcar invertido, mostrou um valor de (²H/¹H)_I intermediário ao calculado para os méis obtidos de plantas C₃ e C₄ e igual a 106,3 ppm, uma vez que a mandioca utiliza

o ciclo C_3 na fixação do CO_2 (EDWARDS *et al.*, 1990), e também porque o açúcar invertido usado provavelmente foi obtido a partir da cana-de-açúcar ou do milho, que são plantas C_4 .

Considerando-se os resultados obtidos, pode-se afirmar que, na grande maioria dos méis analisados, têm-se amostras comerciais autênticas, com um número de adulterações muito pequeno.

Além disto, pode-se afirmar que a técnica SNIF-NMR é muito eficiente na detecção de adulterações dos méis produzidos a partir do néctar de plantas C_3 (eucalipto, laranjeira, assa-peixe, Jataí e eucalipto) utilizando-se açúcares de plantas C_4 (cana de açúcar). No entanto, ela não permitiu diferenciar os diferentes tipos de méis obtidos de plantas C_3 , por isso torna-se muito importante a utilização dos métodos quimiométricos, na busca de informações que possam diferenciar os tipos de méis.

2.3.2 – Análise quimiométrica dos dados de RMN dos méis

Para analisar os méis utilizando-se os métodos quimiométricos, as amostras foram preparadas somente solubilizando-se os méis em água deuterada, fazendo com que o tempo despendido no preparo de amostras fosse mínimo, o que é muito interessante quando objetiva-se analisar um grande número de amostras.

Além disto, os métodos quimiométricos foram inicialmente aplicados aos espectros de RMN de 1H dos méis, uma vez que são obtidos de forma rápida e permitem que testes possam ser realizados buscando a otimização de algumas condições experimentais e de processamento, que poderiam influenciar no resultado final, como está mostrado no item 2.3.2.1 (página 48).

2.3.2.1 – Otimização das condições experimentais e de processamento dos dados de RMN de ^1H para utilização dos métodos quimiométricos

Para se obter os melhores resultados na aplicação dos métodos quimiométricos aos espectros de RMN de ^1H , algumas condições experimentais e de processamento foram verificadas. As variáveis testadas foram:

- a) Aquisição dos espectros de amostras preparadas em triplicata ou sextuplicata;
- b) Aquisição dos espectros no mesmo dia ou em dias diferentes;
- c) Processamento dos espectros utilizando-se 32768 ou 65536 pontos;
- d) Processamento dos espectros utilizando-se uma multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha (LB) igual a 0,0 ou 0,3 Hz.

Na comparação entre a aquisição dos espectros das amostras preparadas em triplicata ou sextuplicata, verificou-se que não é necessário a preparação das amostras em sextuplicata para se ter uma boa discriminação entre os tipos de méis, sendo que em triplicata já se tem um bom agrupamento entre os espectros de cada amostra, que somente foi repetido quando o número de replicatas foi aumentado. Além disto, obtém-se uma economia no tempo de uso do espectrômetro fazendo-se um número menor de análises.

Quando os espectros adquiridos no mesmo dia e em dias diferentes foram comparados, observou-se uma boa discriminação entre os diferentes tipos de méis, tanto para as amostras analisadas em um único dia, quanto para aquelas analisadas em dias diferentes, mostrando que não existem problemas com a reprodutibilidade das análises. Além disto, o estudo da influência da regionalidade sobre os méis confirma este resultado, pois foram analisadas 75 amostras, sendo que seus espectros foram adquiridos em diferentes dias em um período de três anos e foi obtida uma discriminação razoável, como será mostrado no item 2.3.2.4.

Comparando-se o processamento dos espectros com 32768 ou 65536 pontos, pode-se concluir que o agrupamento das amostras foi semelhante nos dois estudos. Desta forma, o tamanho das matrizes tornou-se um fator importante, pois a

matriz de dados obtida quando os espectros foram processados com 65536 pontos contém o dobro do número de variáveis daquela obtida utilizando-se 32768 pontos, dependendo um tempo muito maior para as análises dos dados, principalmente, quando aumenta-se o número de amostras. Devido a isto, optou-se por utilizar 32768 pontos no processamento dos espectros.

A aplicação da multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha (LB) de 0,3 Hz aos espectros de RMN de ^1H fez com que as replicatas se agrupassem melhor do que quando este processamento não foi usado. Esta função de processamento faz com que a relação sinal/ruído do espectro seja aumentada e, conseqüentemente, os sinais menos intensos se tornam mais facilmente observados. A melhor visualização destes sinais foi muito importante, já que foram os que mais influenciaram na discriminação dos tipos de méis, fazendo-se necessária a aplicação da multiplicação exponencial.

Os parâmetros ajustados durante a análise quimiométrica, como seleção de variáveis, transformações e pré-processamentos, serão discutidos nos próximos itens (2.3.2.2, 2.3.2.3, 2.3.2.4 e 2.3.2.5).

2.3.2.2 – Classificação dos méis comerciais do estado de São Paulo por RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H dos méis foram adquiridos fazendo-se a supressão do sinal da água, pois era o sinal mais intenso do espectro e por atrapalhar a visualização dos outros sinais das amostras.

O estudo da classificação dos méis foi iniciado pela análise visual dos espectros de RMN de ^1H dos méis, com o intuito de verificar as diferenças entre eles, que poderiam ajudar na discriminação dos três tipos. Na figura 2.3-3 (página 50) estão mostrados os espectros de RMN de ^1H de um mel de cada tipo analisado, ou seja, silvestre, eucalipto e laranjeira. Pode-se observar que eles são praticamente iguais, apenas pequenas variações na intensidade dos sinais foram observadas. Como pode ser visto no item 2.3.3.1 estes sinais são pertencentes aos carboidratos presentes no mel, glucose e frutose, e que apresentam uma grande sobreposição de sinais na região de δ 3,10 a 4,20. Os dois *dubletos* na região de δ 5,20 a 5,40 possivelmente são referentes aos hidrogênios anoméricos de outros carboidratos presentes em pequena quantidade nos méis, sendo que o sinal em δ 5,34 (com

constante de acoplamento J igual a 3,8 Hz) provavelmente pertence à sacarose.

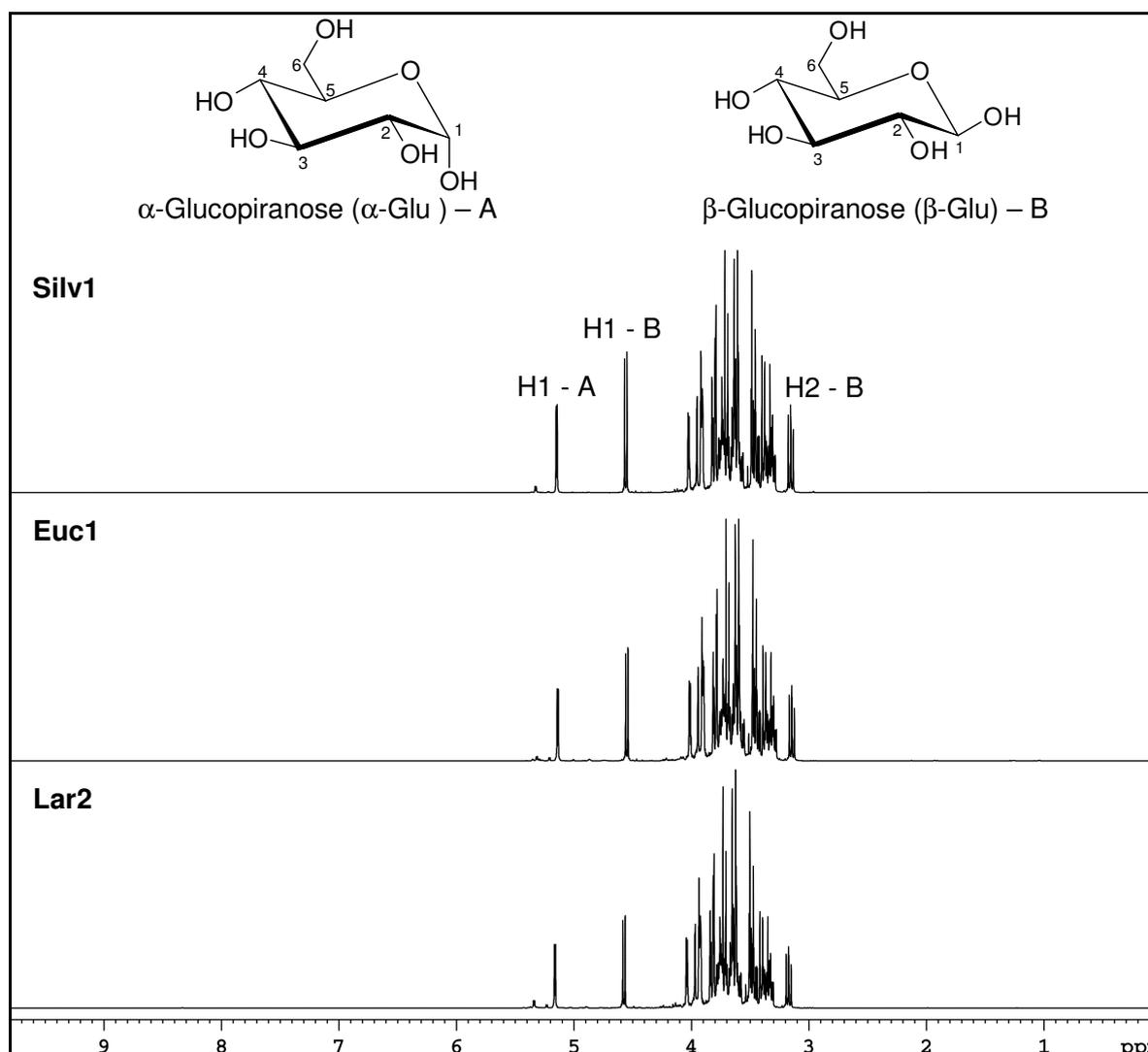


FIGURA 2.3-3. Espectros de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, dos méis silvestres, de eucalipto e de laranja (D_2O)

Na figura 2.3-4 (página 51) estão mostradas as ampliações das regiões de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros apresentados na figura 2.3-3, onde observa-se algumas diferenças entre os constituintes em menor proporção no mel.

Os três méis apresentaram os sinais do hidrogênio do ácido fórmico (**J**), um *singleto* em δ 8,35, das metilas do ácido acético (**O**), um *singleto* em δ 2,00, e da alanina (**N**), um *dubleto* em δ 1,40 ($J = 7,3$ Hz) nos seus espectros de RMN de ^1H . No entanto, na região de δ 7,00 a 7,50 do espectro do mel silvestre foram observados os sinais dos hidrogênios aromáticos da fenilalanina (**L**) e da tirosina (**K**). O mel de eucalipto mostrou uma maior quantidade de ácido láctico (**M**) (*dubleto* em δ 1,30, $J = 6,9$ Hz). A atribuição completa destas substâncias está mostrada nos

itens 2.3.3.2 e 2.3.3.3. Além disto, observa-se a presença de outros sinais, provavelmente de aminoácidos, mas que não foram identificados.

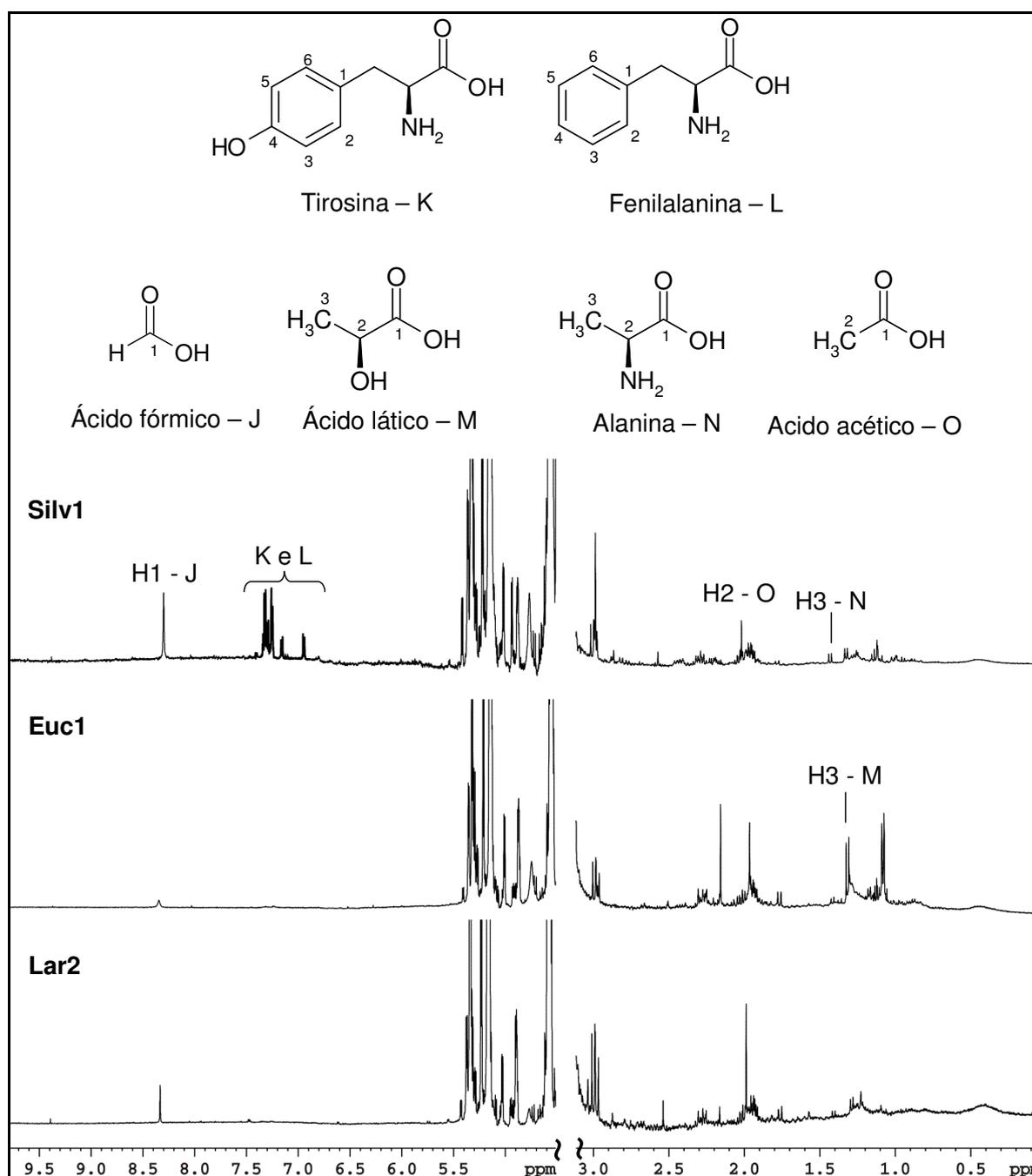


FIGURA 2.3-4. Ampliações das regiões de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, dos méis silvestres, de eucalipto e de laranja (D_2O)

Analisando-se poucos espectros, como está sendo feito nas figuras 2.3-3 e 2.3-4 (páginas 50 e 51), algumas diferenças entre eles são observadas e auxiliam na discriminação entre os tipos de méis. No entanto, quando o número de amostras analisadas aumenta, estas pequenas diferenças não são suficientes para

fazer com que a análise visual dos espectros de RMN de ^1H consiga discriminar os tipos de méis, tornando-se necessária a utilização dos métodos quimiométricos.

Um problema encontrado na análise quimiométrica de dados espectroscópicos está relacionado com a linha de base dos espectros, que deve ser a mesma para todas as amostras dentro de um conjunto de dados. Caso haja variações na linha de base poderá haver uma interpretação equivocada de resultados. Na análise dos dados de RMN há ainda um fator adicional, que é a fase dos sinais. Se a fase não for adequadamente corrigida, acarretará em alterações nas suas intensidades, que não serão devidas à mudanças na composição química das amostras, mas somente pela diferença na fase. Desta forma, a fase e a linha de base dos espectros de RMN de ^1H foram ajustadas o mais próximo possível para todas as amostras, para não influenciarem na discriminação dos méis.

A análise quimiométrica dos dados de RMN de ^1H dos méis iniciou-se pela análise por componentes principais (PCA), que geralmente é usada por ser uma ferramenta eficiente para reduzir a dimensionalidade dos dados, além de fornecer uma melhor forma de visualização do agrupamento natural das amostras. Ela também permite ajustar os parâmetros matemáticos (transformações e pré-processamentos) que podem ser usados para se obter um melhor resultado. Além disto, é possível fazer a seleção das variáveis (regiões espectrais) mais importantes para a discriminação entre os grupos de amostras.

Neste sentido, os espectros das cinco amostras autênticas (fornecidas por um apicultor de confiança) de cada tipo de mel (eucalipto, laranjeira e silvestre), juntamente com um espectro que representa a média das triplicatas, foram analisados. Inicialmente, foram excluídas as regiões dos sinais dos hidrogênios da água ($\text{H}_2\text{O}/\text{HDO}$) e do TMSP-d_4 . Porém, a discriminação obtida entre os diferentes tipos de méis não foi muito boa. Por isso, uma nova análise foi feita mantendo-se somente os sinais referentes aos carboidratos, por serem os mais intensos dos espectros, mas o resultado novamente não foi satisfatório.

A melhor discriminação entre os tipos de méis foi obtida quando foram excluídas as regiões dos carboidratos e ruídos, permanecendo apenas os sinais com baixa intensidade nos espectros, como está mostrado na figura 2.3-5 (página 53).

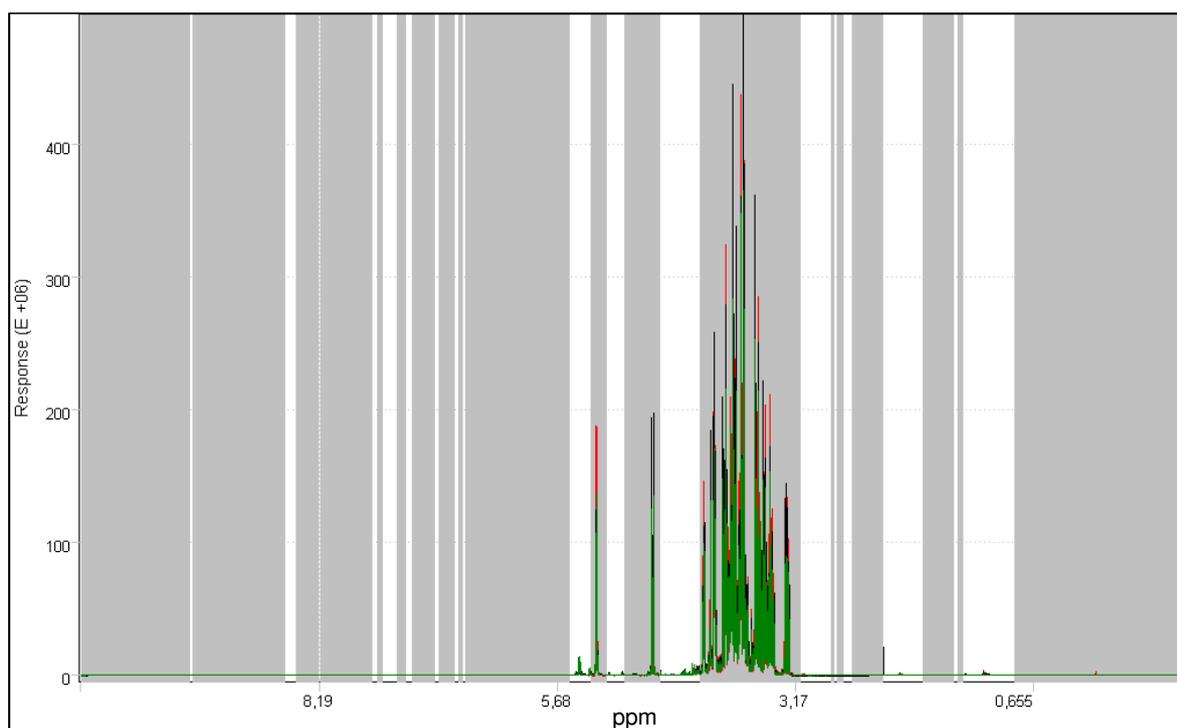


FIGURA 2.3-5. Gráfico de linhas correspondente aos espectros de RMN de ^1H dos méis do estado de São Paulo, mostrando em cinza as regiões de exclusão

Ao mesmo tempo em que as regiões espectrais estavam sendo avaliadas para se obter a melhor discriminação entre as amostras, algumas transformações e pré-processamentos, que poderiam auxiliar na obtenção do melhor resultado, também eram testados.

As transformações são funções matemáticas aplicadas às linhas da matriz, ou seja, aos dados correspondentes aos espectros das amostras e forneceram a melhor discriminação entre elas quando foram usadas a normalização para norma um (a área sob cada espectro é considerada igual a um) e a primeira derivada, em um intervalo de vinte e cinco pontos. A normalização foi utilizada para corrigir eventuais erros nas concentrações das amostras. Já a primeira derivada foi aplicada para corrigir possíveis distorções na linha de base e, principalmente, porque contribuiu no agrupamento entre as replicatas.

O pré-processamento é uma função aplicada às variáveis (BEEBE, 1998) e forneceu a melhor separação quando o autoescalamento dos dados foi feito. O autoescalamento é útil quando os constituintes minoritários são de interesse, pois dá a mesma importância a todos os sinais do espectro. No entanto, é necessário que todas as regiões de ruídos sejam excluídas antes da sua aplicação, para que não seja dada a eles a mesma importância dos sinais.

Na tabela de variâncias (tabela 2.3-2) pode-se verificar a variância dos dados originais explicada por cada componente principal (PC), além da variância cumulativa dada por um número selecionado de PCs. Estas informações ajudam a determinar quantas PCs deverão ser usadas, sendo que nesta análise foram escolhidas oito componentes, descrevendo 82,2% dos dados.

TABELA 2.3-2. Tabela de variâncias para a análise dos diferentes tipos de méis do estado de São Paulo

	Variância	Porcentagem (%)	Cumulativa (%)
PC1	13058,28	24,0	24,0
PC2	9369,17	17,2	41,2
PC3	6573,73	12,1	53,3
PC4	5232,98	9,6	62,9
PC5	3859,54	7,1	70,0
PC6	2761,79	5,1	75,1
PC7	2189,77	4,0	79,1
PC8	1672,55	3,1	82,2
PC9	1584,64	2,9	85,1
PC10	1298,81	2,4	87,5
PC11	781,84	1,4	88,9
PC12	654,64	1,2	90,1
PC13	590,25	1,1	91,2
PC14	516,58	0,9	92,1
PC15	465,63	0,8	92,9

Uma outra forma de verificar estas informações é o gráfico da porcentagem de variância explicada versus o número de PCs, que mostra um decréscimo nítido de variância com o aumento do número de PCs, com isto as componentes principais sucessivas contêm cada vez menos informação a respeito dos dados. Quando a variância deixa de cair bruscamente, o número de PCs correspondente é aquele que deve ser usado na análise. Na figura 2.3-6 (página 55), observa-se que após a oitava PC a variação nos dados é pequena.

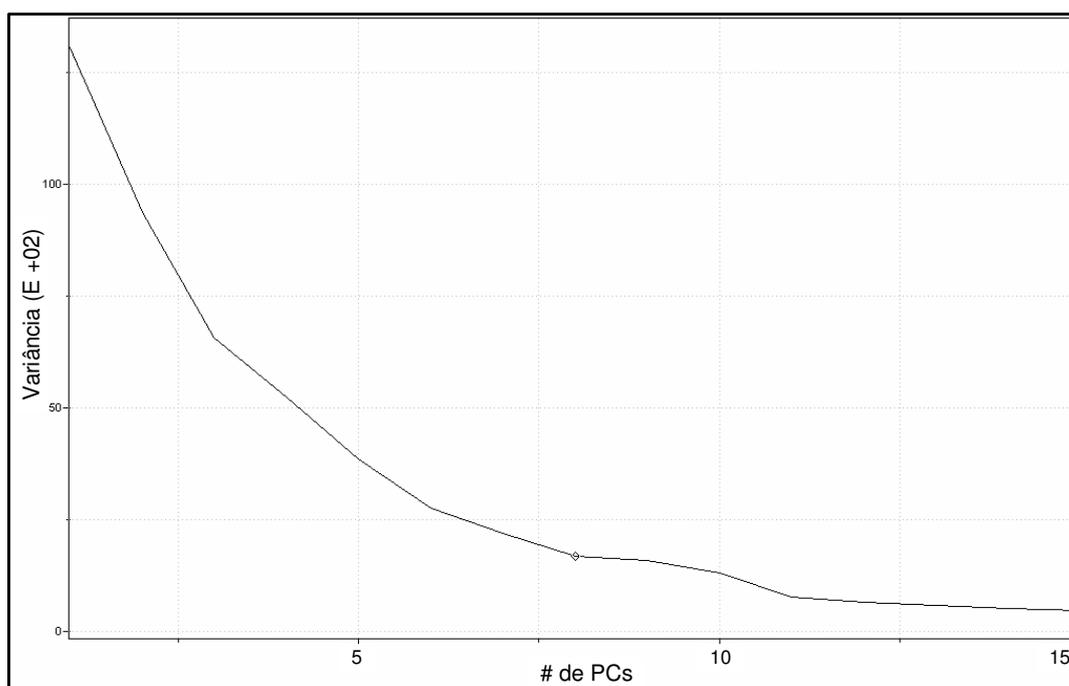


FIGURA 2.3-6. Gráfico da variância explicada versus o número de PCs, para os méis do estado de São Paulo

A figura 2.3-7 (página 56) mostra o gráfico de *scores*, obtido da análise por PCA selecionando-se as duas primeiras PCs. As similaridades ou diferenças entre as amostras podem ser observadas, sendo que as mais similares tendem a formar grupos e as diferentes apresentam grandes distâncias entre si. PC1 descreve 24,0% de variância do conjunto de dados, enquanto que PC2 descreve 17,2%, e as duas PCs juntas descrevem 41,2% da variância total. Neste gráfico cada ponto diz respeito a um espectro de RMN de ^1H , sendo que também foi analisado um espectro que é a média das replicatas feitas para as diferentes amostras de mel. Pode-se ver que as replicatas de cada tipo de mel estão bem agrupadas entre si (indicadas pelas letras a, b e c no final do nome da amostra) e à média delas (indicada pela letra M), mostrando que os dados são reproduzíveis. Embora os três grupos não estejam muito compactos, foi possível fazer a discriminação das amostras em três grupos, ou seja, méis silvestres, de laranjeira e de eucalipto.

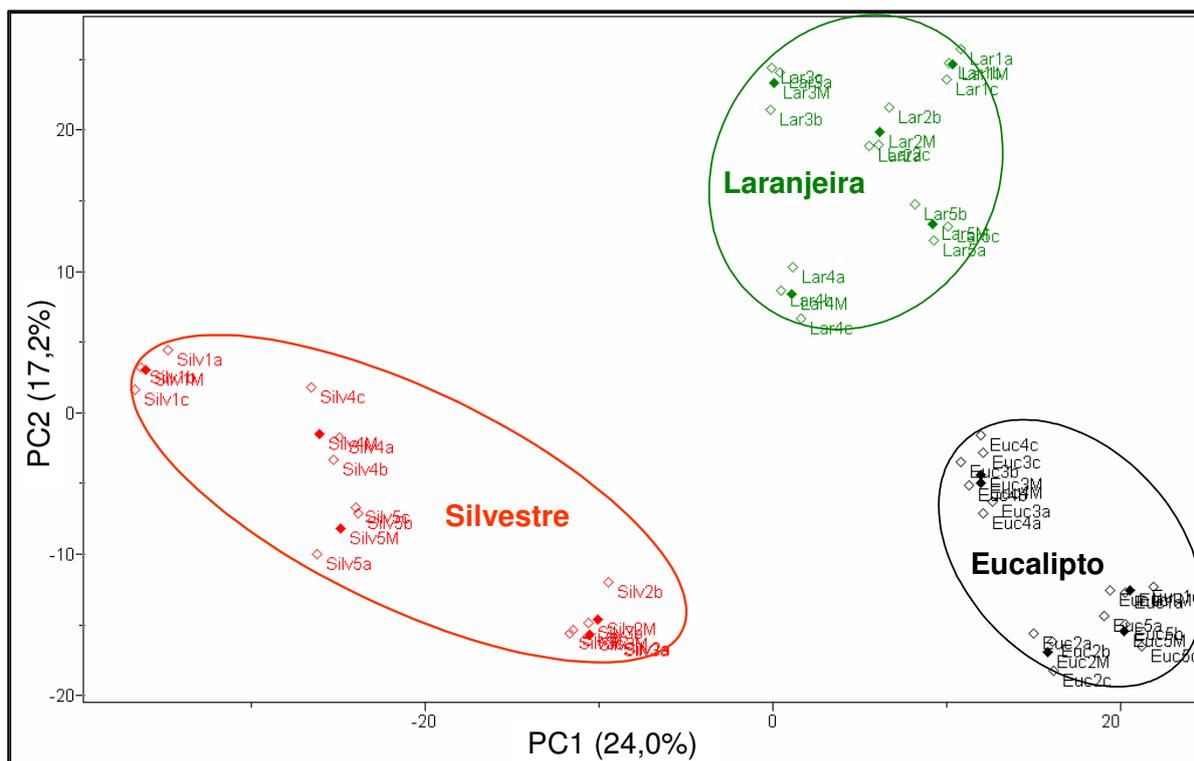


FIGURA 2.3-7. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H dos méis silvestres, de eucalipto e de laranja (41,2 %); \diamond - replicatas e \blacklozenge - média das replicatas

Analisando-se os gráficos de linhas e *loadings* juntamente com os espectros de RMN de ^1H dos méis pode-se relacionar algumas substâncias com a discriminação obtida, como pode ser visualizado na figura 2.3-8.

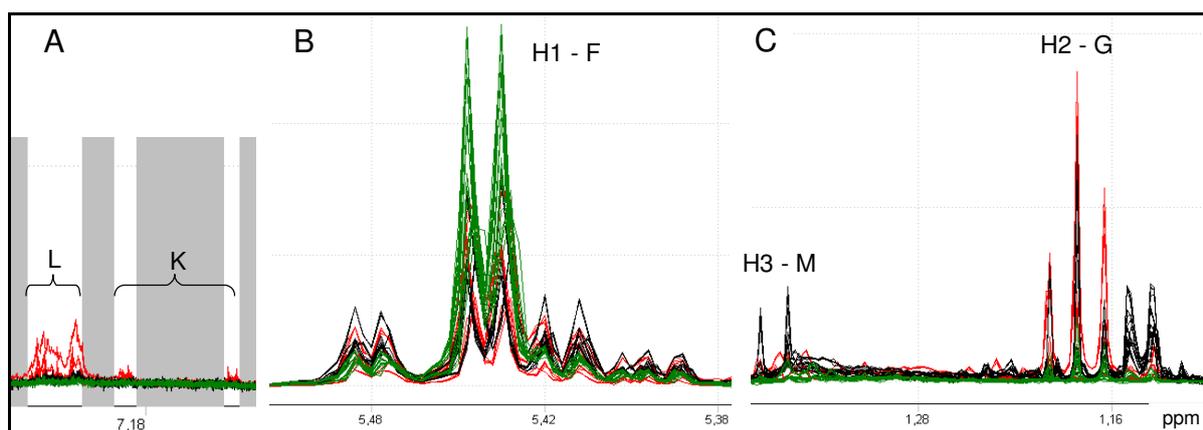


FIGURA 2.3-8. Comparação feita entre os espectros de RMN de ^1H dos méis durante a análise quimiométrica mostrando os compostos responsáveis pela discriminação obtida na figura 2.3-7; vermelho – méis silvestres, preto – eucalipto e verde - laranja

As amostras localizadas em *scores* negativos em PC1 e PC2 do gráfico de *scores*, e que compreendem os méis silvestres, apresentaram maiores

quantidades de fenilalanina (**L**), tirosina (**K**) e etanol (**G**) do que as outras (figura 2.3-8A e C). Já as amostras em *scores* positivos em PC1 e negativos em PC2, ou seja, os méis de eucalipto, mostraram uma quantidade de etanol (**G**) semelhante a dos méis silvestres, mas maiores teores de ácido láctico (**M**) e de um *dubleto* em δ 1,14 (não identificado) (figura 2.3-8C). Por outro lado, os méis de laranja, em *scores* positivos em PC1 e PC2, apresentaram maiores quantidades de sacarose (**F**) e menores de etanol (**G**) do que os outros méis (figura 2.3-8B e C).

Na análise dos méis por HCA foram usados os parâmetros quimiométricos ajustados no PCA. O cálculo da distância entre as amostras foi feito usando a distância Euclidiana e foi usado o método de conexão incremental, o qual utiliza a média ponderada no cálculo da distância entre os grupos. O dendrograma resultante está mostrado na figura 2.3-9, onde a linha pontilhada em um índice de similaridade de 0,215 distinguiu os três diferentes tipos de méis, que estão mostrados nas figuras 2.3-10 e 2.3-11 (página 58) para melhor visualização do agrupamento das amostras.

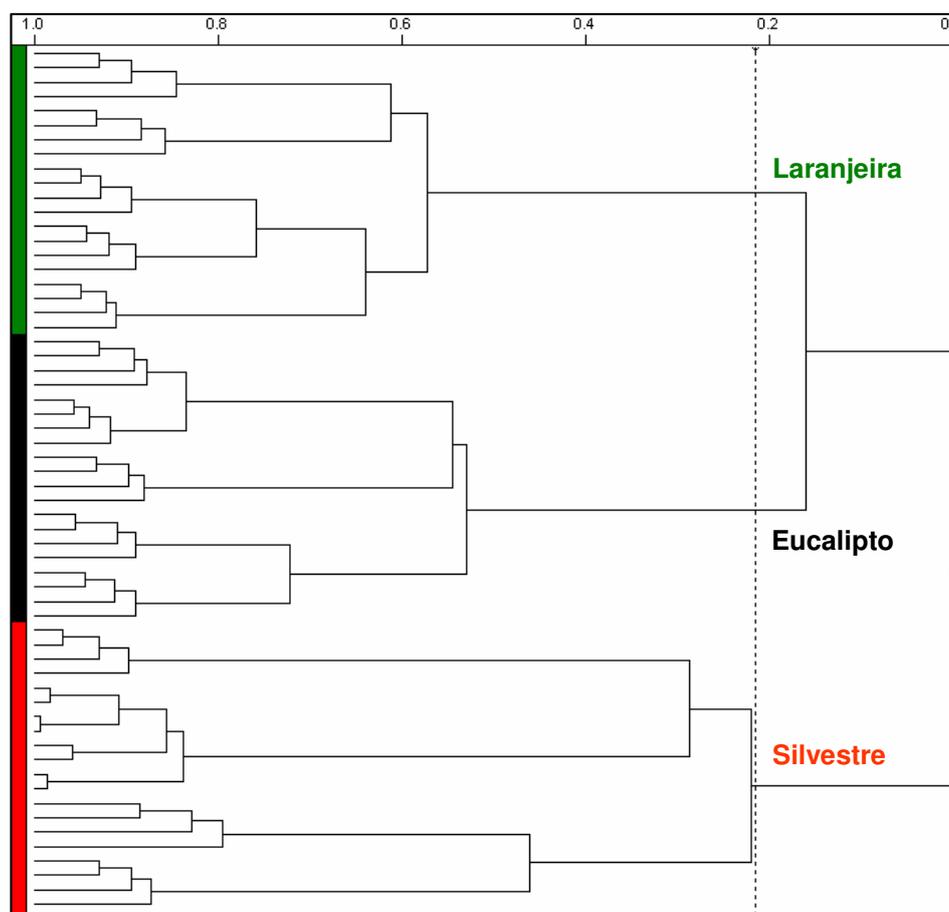


FIGURA 2.3-9. Dendrograma dos dados de RMN de ^1H dos méis silvestres, de eucalipto e de laranja (similaridade: 0,215)

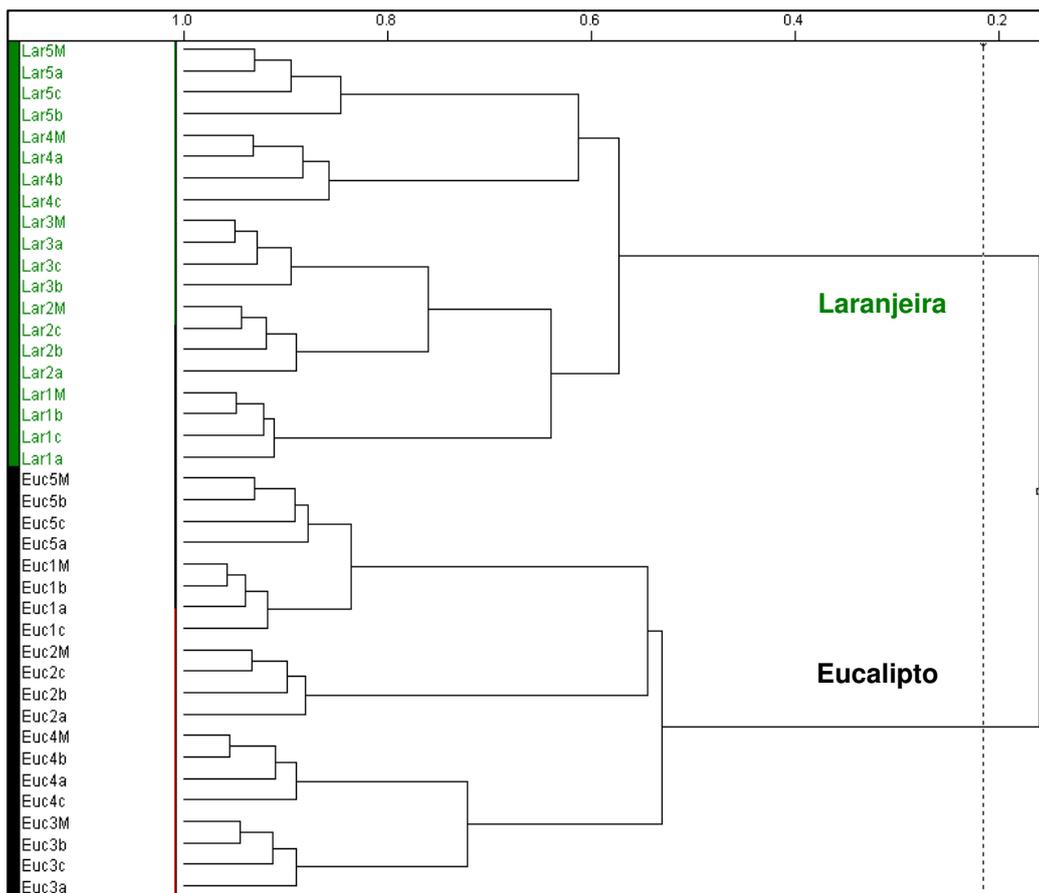


FIGURA 2.3-10. Primeira ampliação do dendrograma mostrado na figura 2.3-9

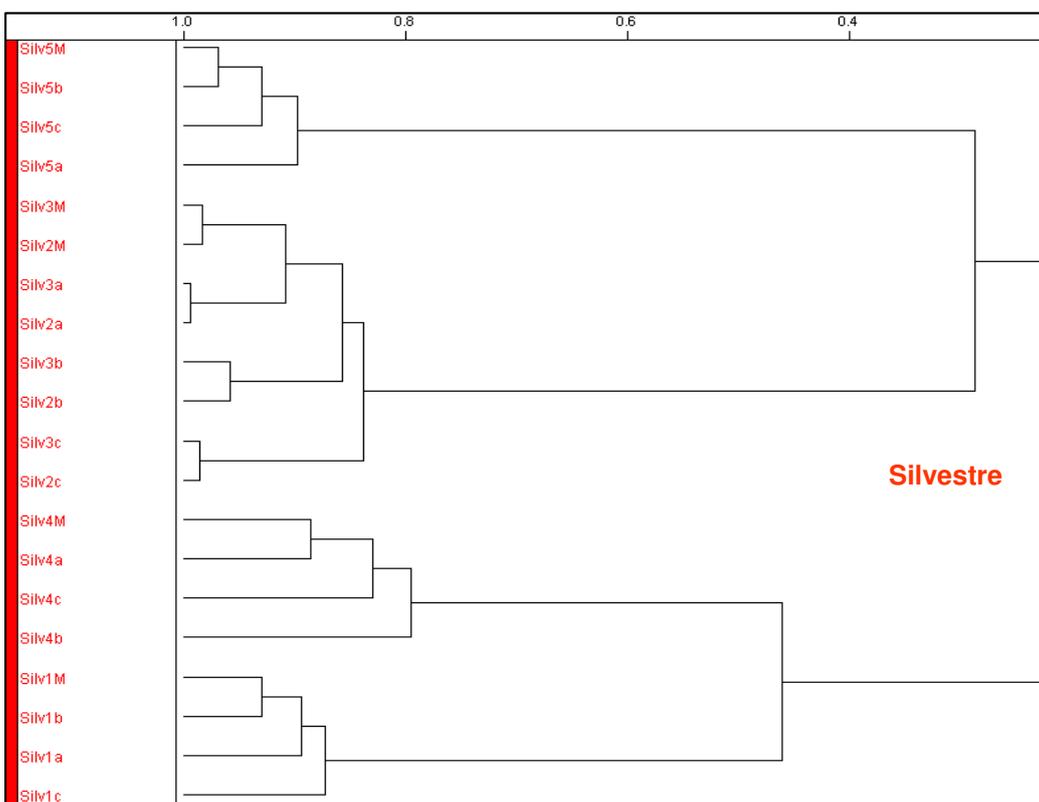


FIGURA 2.3-11. Segunda ampliação do dendrograma mostrado na figura 2.3-9

Para realizar a classificação dos méis comerciais do estado de São Paulo nas três categorias, méis silvestres, de eucalipto e de laranjeira, foram aplicados três métodos de reconhecimento supervisionado de padrões, KNN, SIMCA e PLS-DA.

Na construção destes modelos foram utilizadas as amostras autênticas mostradas na figura 2.3-7 (página 56), a seleção de variáveis e os parâmetros matemáticos ajustados no PCA. A classe 1 foi formada pelos méis silvestres, a classe 2 pelos de eucalipto e a classe 3 pelos de laranjeira.

Cada um dos métodos KNN, SIMCA e PLS-DA foi construído analisando-se três diferentes conjuntos de treinamento:

1º conjunto de treinamento) construído usando-se as três replicatas de cada amostra;

2º conjunto de treinamento) construído com as triplicatas de cada amostra e o seu espectro médio;

3º conjunto de treinamento) construído somente com o espectro médio das replicatas.

Portanto, no total foram construídos nove modelos de classificação para analisar os méis comerciais do estado de São Paulo.

Estes dados foram analisados desta forma na tentativa de verificar se a classificação das amostras comerciais seria diferente em cada uma das situações ou mesmo se o modelo construído utilizando-se o espectro médio forneceria melhores resultados, uma vez que fazendo-se a média evita-se que as pequenas diferenças encontradas entre as replicatas interfiram na análise, pois se elas existirem o algoritmo vai tentar otimizar os modelos de forma que estas diferenças sejam minimizadas, sendo, por isto, necessário usar muitas componentes principais na construção do modelo.

Na construção do modelo KNN, o número ótimo de vizinhos mais próximos K foi selecionado verificando-se o sucesso na classificação das amostras de treinamento quando diferentes valores de K foram usados. A figura 2.3-12 (página 60) mostra o gráfico de erros de previsão ocorridos quando K variou de 1 a 10 para o modelo construído usando-se o 1º conjunto de treinamento. O modelo criado não errou nenhuma vez. Desta forma, o número de vizinhos mais próximos escolhido foi três.

O modelo KNN construído utilizando-se o segundo conjunto de treinamento errou pela primeira vez quando foram utilizados sete vizinhos mais próximos. Desta forma, o número de vizinhos mais próximos escolhido também foi três. Já o modelo construído com o terceiro conjunto não errou quando um vizinho mais próximo foi utilizado, uma vez que foi usado somente um espectro para representar cada amostra, por isso um vizinho mais próximo foi escolhido na otimização deste modelo.

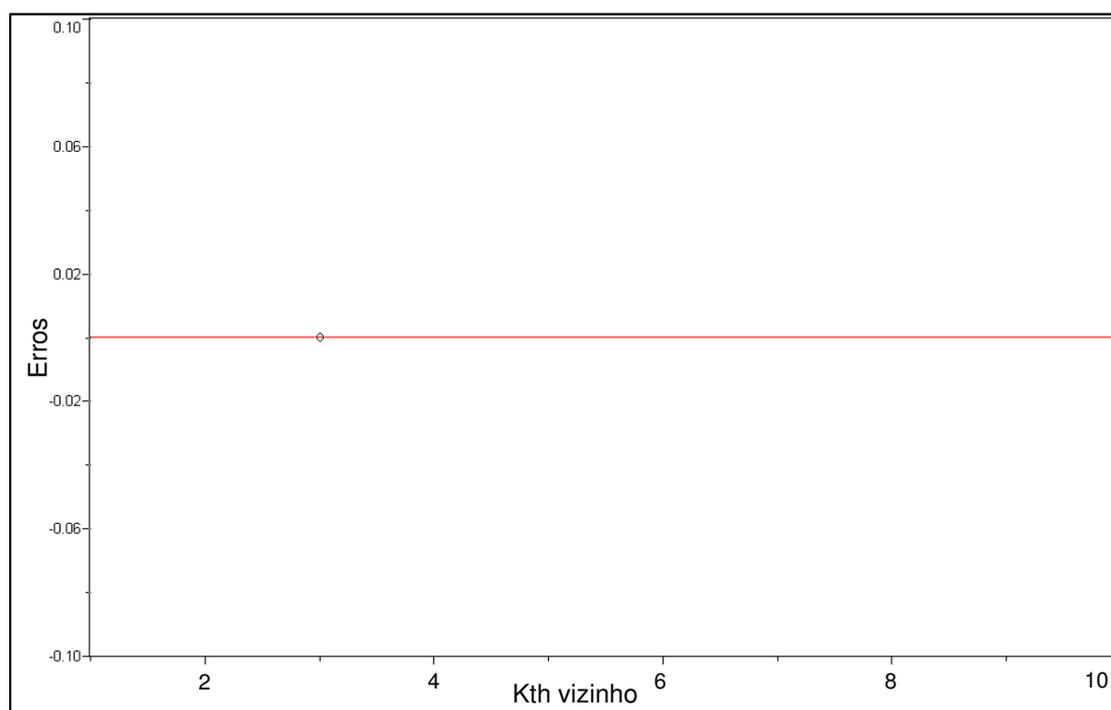


FIGURA 2.3-12. Gráfico do Kth vizinho mais próximo versus o número de erros cometidos na previsão das amostras de treinamento para os dados de RMN de ^1H dos méis

Uma outra forma de verificar o número de erros cometidos pelo método KNN na previsão das amostras de treinamento está mostrado na tabela 2.3-3 (página 61), na qual verifica-se as classes em que as amostras foram classificadas pelos três modelos. Nesta tabela, um único valor foi mostrado para a classificação de cada amostra, uma vez que não houveram erros entre as suas replicatas e o espectro médio. Nas próximas tabelas o resultado da classificação será mostrado da mesma forma.

TABELA 2.3-3. Previsão das amostras de treinamento pelos três modelos KNN

Amostra	Classe	KNN						
		1º modelo			2º modelo			3º modelo
		K1	K2	K3	K1	K2	K3	K1
Silv1	1	1	1	1	1	1	1	1
Silv2	1	1	1	1	1	1	1	1
Silv3	1	1	1	1	1	1	1	1
Silv4	1	1	1	1	1	1	1	1
Silv5	1	1	1	1	1	1	1	1
Euc1	2	2	2	2	2	2	2	2
Euc2	2	2	2	2	2	2	2	2
Euc3	2	2	2	2	2	2	2	2
Euc4	2	2	2	2	2	2	2	2
Euc5	2	2	2	2	2	2	2	2
Lar1	3	3	3	3	3	3	3	3
Lar2	3	3	3	3	3	3	3	3
Lar3	3	3	3	3	3	3	3	3
Lar4	3	3	3	3	3	3	3	3
Lar5	3	3	3	3	3	3	3	3

No método SIMCA foi utilizado um limite de confiança de 98% e cada classe foi autoescalada separadamente (*scope* local). O número de PCs necessário para descrever cada classe foi escolhido individualmente e está mostrado na tabela 2.3-4 para os modelos construídos.

TABELA 2.3-4. Número de componentes principais usado na construção dos três modelos SIMCA

	1º modelo		2º modelo		3º modelo	
	nº PC	Variância	nº PC	Variância	nº PC	Variância
Classe 1	4	78,3%	4	80,4%	4	89,7%
Classe 2	4	70,1%	4	73,1%	4	90,9%
Classe 3	4	64,6%	4	67,8%	4	84,9%

Para verificar o poder de discriminação dos modelos construídos foram utilizados os resíduos e as distâncias entre as classes, os quais representam o

quanto cada classe é compacta e o quão distantes estão uma das outras, respectivamente. Um bom modelo exige que as classes sejam compactas e estejam distantes entre si, pois desta forma a atribuição da classe de uma amostra desconhecida torna-se mais confiável e inequívoca. As tabelas 2.3-5 e 2.3-6 mostram os resíduos e as distâncias entre as classes, respectivamente.

Na tabela 2.3-5 pode-se verificar que as classes são razoavelmente compactas, pois o resíduo dentro de cada classe é menor que os resíduos interclasses, para todos os modelos.

TABELA 2.3-5. Resíduo entre as classes, silvestre (1), eucalipto (2) e laranjeira (3), para os três modelos SIMCA

1º modelo			
	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Classe 1	0,52	3,21	2,89
Classe 2	3,65	0,61	5,98
Classe 3	1,08	1,62	0,67
2º modelo			
	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Classe 1	0,48	3,38	3,02
Classe 2	3,72	0,56	6,26
Classe 3	1,10	1,67	0,62
3º modelo			
	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Classe 1	0,56	4,13	3,59
Classe 2	3,68	0,52	7,13
Classe 3	1,12	1,80	0,67

Analisando-se as distâncias entre as classes (tabela 2.3-6, página 63), observa-se que elas são suficientemente separadas. Segundo consta no manual do software Pirouette® (1985-2007) as classes são consideradas separadas quando apresentam distâncias maior que 3, e neste estudo a distância mínima entre as classes foi de 2,64, mostrando que, provavelmente, um bom resultado será obtido pelos modelos de classificação SIMCA.

TABELA 2.3-6. Distância entre as classes, silvestre (1), eucalipto (2) e laranjeira (3), para os três modelos SIMCA

1º modelo			
	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Classe 1	0,00	5,04	2,64
Classe 2	5,04	0,00	5,85
Classe 3	2,64	5,85	0,00
2º modelo			
	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Classe 1	0,00	5,79	3,11
Classe 2	5,79	0,00	6,76
Classe 3	3,11	6,76	0,00
3º modelo			
	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Classe 1	0,00	6,24	3,31
Classe 2	6,24	0,00	7,61
Classe 3	3,31	7,61	0,00

Na tabela 2.3-7 (página 64) está mostrada a classificação das amostras do conjunto de treinamento obtida usando-se os três modelos construídos pelo método SIMCA. Como foi verificado para o KNN, os modelos SIMCA classificaram-nas 100% corretamente.

TABELA 2.3-7. Previsão das amostras de treinamento pelos três modelos SIMCA

Amostra	Classe	SIMCA		
		1º modelo	2º modelo	3º modelo
Silv1	1	1	1	1
Silv2	1	1	1	1
Silv3	1	1	1	1
Silv4	1	1	1	1
Silv5	1	1	1	1
Euc1	2	2	2	2
Euc2	2	2	2	2
Euc3	2	2	2	2
Euc4	2	2	2	2
Euc5	2	2	2	2
Lar1	3	3	3	3
Lar2	3	3	3	3
Lar3	3	3	3	3
Lar4	3	3	3	3
Lar5	3	3	3	3

Na construção dos modelos PLS-DA foram utilizados os mesmos parâmetros matemáticos ajustados no PCA e a sua otimização é semelhante àquela do modelo PLS, utilizando-se o método de validação cruzada (*leave-one-out*), no qual cada amostra do conjunto de treinamento é excluída uma vez e, em seguida, é classificada pelo modelo construído utilizando-se o restante das amostras. Este processo é repetido até que todas as amostras tenham sido deixadas de fora uma vez.

Além disto, o número ótimo de PCs foi estabelecido avaliando-se alguns parâmetros estatísticos. Foram escolhidos os menores valores da soma dos quadrados dos erros de previsão e de calibração (PRESS Val e PRESS Cal), dos erros padrão de validação e de calibração (SEV e SEC) e os maiores coeficientes de correlação entre a classe real e a classe predita durante a validação (rVal) e durante a calibração (rCal) e, o critério de similaridade obtido a partir da relação SEC/SEV, como está mostrado na tabela 2.3-8 (página 65).

Os três modelos foram comparados com base nestes parâmetros. Primeiramente, os valores dos coeficientes de correlação (rCal e rVal) foram

avaliados, sendo que valores maiores que 0,9 foram obtidos, mostrando que há uma boa concordância entre os valores preditos pelo modelo e os valores experimentais.

O próximo quesito para a análise do ajuste do modelo são os valores de SEC e SEV. Para que um modelo esteja adequadamente ajustado, o conjunto de validação deve produzir um valor de SEV similar ao SEC. Para os dois primeiros modelos, estes valores ficaram entre 0,07 e 0,18. Além disto, as relações SEC/SEV indicaram que todos os modelos foram bem ajustados, uma vez que os valores estão todos no intervalo entre 0,5 e 1,0.

No entanto, no terceiro modelo, valores muito diferentes de SEV e SEC foram obtidos. Valores de SEV muito maior que os de SEC indicam modelos sobreajustados, isto é, a regressão encontrada considera dados que não estão realmente correlacionados, como por exemplo, ruídos, erros sistemáticos, etc. (FERRÃO *et al.*, 2004). A relação SEC/SEV calculada não está no intervalo de similaridade e, por isto, o modelo não pode ser considerado bem ajustado. Mesmo assim, este modelo foi usado na análise das amostras de validação externa, como será mostrado na tabela 2.3-10 (página 67).

TABELA 2.3-8. Parâmetros otimizados na construção dos três modelos PLS-DA

Classe	PCs	Var %	PRESS Val	SEV	rVal	PRESS Cal	SEC	rCal	SEC/SEV
1º modelo									
1	4	42,0	1,90	0,17	0,9302	0,62	0,10	0,9777	0,59
2	4	43,7	0,77	0,11	0,9721	0,27	0,07	0,9904	0,63
3	4	44,3	2,15	0,18	0,9202	0,78	0,12	0,9718	0,67
2º modelo									
1	4	42,7	1,67	0,14	0,9546	0,76	0,10	0,9793	0,71
2	4	44,8	0,70	0,09	0,9812	0,34	0,07	0,9909	0,78
3	4	45,4	2,00	0,15	0,9450	0,96	0,11	0,9740	0,73
3º modelo									
1	4	46,2	3,03	0,38	0,6455	0,11	0,08	0,9884	0,21
2	4	50,5	0,53	0,16	0,9423	0,05	0,05	0,9949	0,38
3	4	50,8	2,80	0,37	0,7260	0,11	0,08	0,9880	0,22

Na tabela 2.3-9 (página 66) está mostrada a classificação das amostras do conjunto de treinamento obtida usando-se os três modelos construídos pelo método PLS-DA. Como foi verificado para os modelos KNN e SIMCA, os dois

primeiros modelos PLS-DA classificaram-nas 100% corretamente. Já o terceiro, cometeu um erro na classificação das amostras do conjunto de treinamento, sugerindo que este apresentará uma eficiência menor na classificação das demais amostras.

TABELA 2.3-9. Previsão das amostras de treinamento pelos três modelos PLS-DA

Amostra	Classe	PLS-DA		
		1º modelo	2º modelo	3º modelo
Silv1	1	1	1	1
Silv2	1	1	1	1
Silv3	1	1	1	1
Silv4	1	1	1	3
Silv5	1	1	1	1
Euc1	2	2	2	2
Euc2	2	2	2	2
Euc3	2	2	2	2
Euc4	2	2	2	2
Euc5	2	2	2	2
Lar1	3	3	3	3
Lar2	3	3	3	3
Lar3	3	3	3	3
Lar4	3	3	3	3
Lar5	3	3	3	3

A eficiência dos três métodos de classificação foi verificada utilizando-se as amostras do conjunto de validação externa. Para os três modelos KNN, os resultados estão mostrados na tabela 2.3-10 (página 67). Os três modelos determinaram a classe correta para 100% das amostras. Estes resultados mostram que eles podem ser utilizados para a previsão da classe de amostras comerciais de méis.

TABELA 2.3-10. Previsão da classe das amostras de validação externa utilizando-se os três modelos KNN

Amostra	Classe	KNN		
		1º modelo	2º modelo	3º modelo
Silv6	1	1	1	1
Silv7	1	1	1	1
Euc6	2	2	2	2
Euc7	2	2	2	2
Lar6	3	3	3	3
Lar7	3	3	3	3

A eficiência dos três modelos de classificação SIMCA também foi verificada utilizando-se as amostras do conjunto de validação externa (tabela 2.3-11). Como foi verificado para os modelos KNN, os três modelos SIMCA classificaram 100% das amostras corretamente.

TABELA 2.3-11. Previsão da classe das amostras de validação externa utilizando-se os três modelos SIMCA

Amostra	Classe	SIMCA		
		1º modelo	2º modelo	3º modelo
Silv6a	1	1	1	1
Silv7a	1	1	1	1
Euc6a	2	2	2	2
Euc7a	2	2	2	2
Lar6a	3	3	3	3
Lar7a	3	3	3	3

A eficiência dos três modelos PLS-DA também foi verificada usando-se as amostras de validação externa (tabela 2.3-12, página 68). Como foi verificado para os modelos KNN e SIMCA, os dois primeiros modelos PLS-DA classificaram 100% das amostras corretamente, enquanto que o terceiro errou na classificação de uma amostra.

TABELA 2.3-12. Previsão da classe das amostras de validação externa utilizando-se os três modelos PLS-DA

Amostra	Classe	PLS-DA		
		1º modelo	2º modelo	3º modelo
Silv6	1	1	1	1
Silv7	1	1	1	1
Euc6	2	2	2	2
Euc7	2	2	2	3
Lar6	3	3	3	3
Lar7	3	3	3	3

Após verificar a eficiência dos modelos de classificação com amostras de validação externa, eles foram utilizados para fazer a previsão das classes das amostras comerciais de méis, sendo que os resultados estão apresentados nas tabelas 2.3-13 a 2.3-15.

Na tabela 2.3-13 (página 69) está mostrada a classificação das amostras comerciais usando-se os três modelos construídos pelo método KNN. O primeiro e o terceiro modelos cometeram três erros durante a classificação das dezoito amostras, com relação a informação fornecida no rótulo do produto comercial, apresentando 83,3% de acerto. Já o segundo modelo errou quatro vezes, apresentando 77,8% de acerto na classificação das amostras comerciais.

Dois méis silvestres (classe 1) foram classificados como de laranja (classe 3) pelos três modelos devido a sua maior proximidade com esta classe, mostrando que podem ter o néctar das laranjeiras como fonte predominante de sua composição. Além disto, um mel de laranja (Lar9) foi classificado como silvestre pelos três modelos, mostrando-se mais semelhante aos méis silvestres.

Comparando-se os três modelos KNN, o segundo, que é o modelo construído utilizando-se os espectros feitos para as três replicatas de cada amostra e a média destes, apresentou a menor eficiência, apesar da diferença entre este e os outros modelos ser pequena. Mesmo assim, ele mostrou uma boa percentagem de classificação das amostras.

TABELA 2.3-13. Previsão da classe dos méis comerciais pelos três modelos KNN

Amostra	Classe	KNN		
		1º modelo	2º modelo	3º modelo
Silv8	1	1	1	1
Silv9	1	1	1	1
Silv10	1	3	3	3
Silv11	1	1	3	1
Silv12	1	3	3	3
Silv13	1	1	1	1
Silv14	1	1	1	1
Euc8	2	2	2	2
Euc9	2	2	2	2
Euc10	2	2	2	2
Euc11	2	2	2	2
Euc12	2	2	2	2
Euc13	2	2	2	2
Lar8	3	3	3	3
Lar9	3	1	1	1
Lar10	3	3	3	3
Lar11	3	3	3	3
Lar12	3	3	3	3

Na tabela 2.3-14 (página 70) está mostrada a classificação das amostras comerciais usando-se os três modelos construídos pelo método SIMCA. O primeiro e o terceiro modelos cometeram quatro erros durante a classificação das dezoito amostras, apresentando 77,8% de acerto. Já o segundo modelo errou cinco vezes, apresentando 72,2% de acerto.

Diferentemente do KNN, o modelo SIMCA pode classificar uma amostra como não pertencente a nenhuma das classes e isto aconteceu para três amostras quando o primeiro modelo foi usado e para quatro amostras utilizando-se o segundo modelo. No entanto, este tipo de classificação não foi observado quando o terceiro modelo foi utilizado. Este resultado reflete o tamanho das hipercaixas formadas. Nos dois primeiros, elas, possivelmente, foram mais compactas que no terceiro. As amostras podem ter ficado próximas, mas não dentro delas para poderem ser classificadas corretamente.

A única classificação errada que concordou entre os três modelos foi um mel de laranjeira (Lar9, classe 3), que foi classificado como sendo silvestre (classe 1). Provavelmente, este mel não seja de laranjeira, uma vez que os modelos KNN mostraram a mesma classificação para ele.

Utilizando-se o terceiro modelo, quatro amostras da classe 3 foram classificadas como pertencentes à classe 1, provavelmente porque houve sobreposição das hipercaixas ou porque a hipercaixa da classe 1 ficou maior quando somente a média dos espectros foi usada para construir os modelos, não sendo uma boa alternativa para a classificação das amostras da classe 3. Porém, esta forma de construir os modelos SIMCA foi a mais eficiente para a classificação das amostras da classe 1, não cometendo nenhum erro. Ponderando-se estes dois resultados deste modelo, pode-se verificar que ele apresentou uma classificação igual à do modelo 1, com relação ao número de amostras classificadas corretamente.

TABELA 2.3-14. Previsão da classe dos méis comerciais pelos três modelos SIMCA

Amostra	Classe	SIMCA		
		1º modelo	2º modelo	3º modelo
Silv8	1	1	1	1
Silv9	1	1	1	1
Silv10	1	0	0	1
Silv11	1	1	1	1
Silv12	1	0	0	1
Silv13	1	1	1	1
Silv14	1	1	1	1
Euc8	2	2	2	2
Euc9	2	2	2	2
Euc10	2	2	2	2
Euc11	2	2	2	2
Euc12	2	2	2	2
Euc13	2	2	2	2
Lar8	3	3	0	1
Lar9	3	1	1	1
Lar10	3	3	3	3
Lar11	3	0	0	1
Lar12	3	3	3	1

Na tabela 2.3-15 está mostrada a classificação das amostras comerciais usando-se os três modelos construídos pelo método PLS-DA. Os três modelos erraram uma vez durante a classificação das dezoito amostras comerciais, apresentando 94,5% de acerto, ou seja, a amostra Silv10 (classe 1) foi classificada como pertencente à classe 3.

Além disto, o terceiro modelo, que não havia apresentado bons resultados durante a sua otimização mostrou-se igualmente eficiente durante a classificação das amostras comerciais.

TABELA 2.3-15. Previsão da classe dos méis comerciais pelos três modelos PLS-DA

Amostra	Classe	PLS-DA		
		1º modelo	2º modelo	3º modelo
Silv8	1	1	1	1
Silv9	1	1	1	1
Silv10	1	3	3	3
Silv11	1	1	1	1
Silv12	1	1	1	1
Silv13	1	1	1	1
Silv14	1	1	1	1
Euc8	2	2	2	2
Euc9	2	2	2	2
Euc10	2	2	2	2
Euc11	2	2	2	2
Euc12	2	2	2	2
Euc13	2	2	2	2
Lar8	3	3	3	3
Lar9	3	3	3	3
Lar10	3	3	3	3
Lar11	3	3	3	3
Lar12	3	3	3	3

Com base nestes resultados, pode-se dizer que os três modelos apresentam uma boa capacidade de classificar os três diferentes tipos de méis estudados do estado de São Paulo, sendo que o método PLS-DA foi o método mais

eficiente, classificando corretamente 94,5% das amostras, ou seja, classificou de forma errada somente uma amostra de mel.

A classificação do mel Silv10 como pertencente à classe dos méis de laranjeira foi a mesma pelos três métodos utilizados, provavelmente, porque ele não é silvestre, podendo ter as flores da laranjeira como flores majoritárias no fornecimento de néctar.

2.3.2.3 – Discriminação dos méis de assa-peixe, cana-de-açúcar e adulterados com relação aos méis autênticos do estado de São Paulo

Os méis de assa-peixe e aqueles produzidos a partir da cana-de-açúcar não são comercializados com muita frequência, por isso foi adquirido um número pequeno deles e, desta forma, não foram utilizados no estudo de classificação dos méis comerciais do estado de São Paulo (item 2.3.2.2, página 49). Mesmo assim, foi feita uma análise por PCA destes méis juntamente com aqueles utilizados nos modelos de classificação. A este conjunto de dados também foram adicionados os méis Euc14 e Lar13, que na análise pela técnica SNIF-NMR foram considerados adulterados.

Para esta análise foram mantidos os mesmos pré-processamentos, transformações e seleção de variáveis que no estudo anterior.

A figura 2.3-13 (página 73) apresenta o gráfico de *scores* das duas primeiras PCs, sendo que 30,3% da variância total dos dados foi descrita por PC1 e 15,2% por PC2. Neste gráfico observa-se uma boa discriminação entre as amostras consideradas adulteradas, em valores positivos de PC1, e as demais. Os méis silvestres também estão bem discriminados, permanecendo em valores negativos de PC1 e PC2. No entanto, não foi possível distinguir satisfatoriamente os méis de eucalipto, laranjeira e assa-peixe.

A figura 2.3-14 (página 73) apresenta uma ampliação da figura 2.3-12, entre os valores de PC1 de -15 a 10 e de PC2 de -8 a 18. Nesta ampliação pode ser observado que, apesar da proximidade, as amostras de méis de eucalipto, assa-peixe e de laranjeira formaram grupos distintos. Tal discriminação pode ser explicada em função do assa-peixe ser uma planta que floresce em um período

intermediário aos de florescimento da laranjeira e do eucalipto. Além disto, verifica-se que os méis produzidos a partir da cana-de-açúcar também se discriminaram.

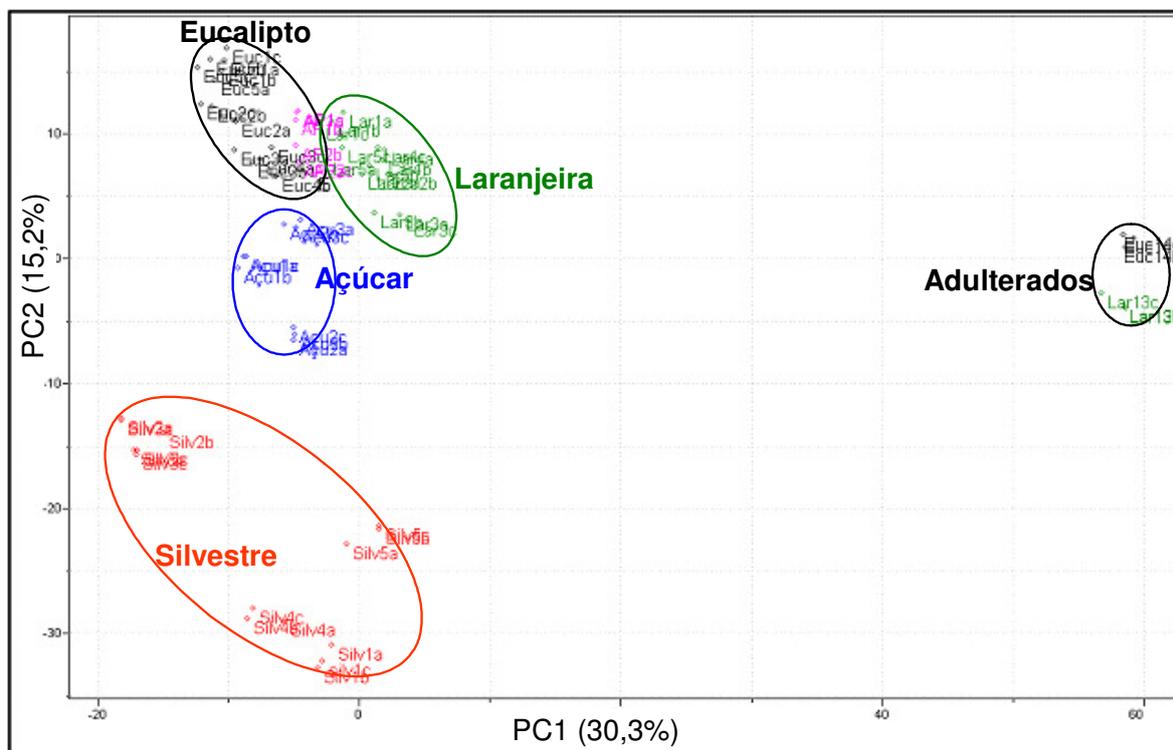


FIGURA 2.3-13. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ¹H dos méis usados nos modelos de classificação, de assa-peixe, açúcar e adulterados (45,5%)

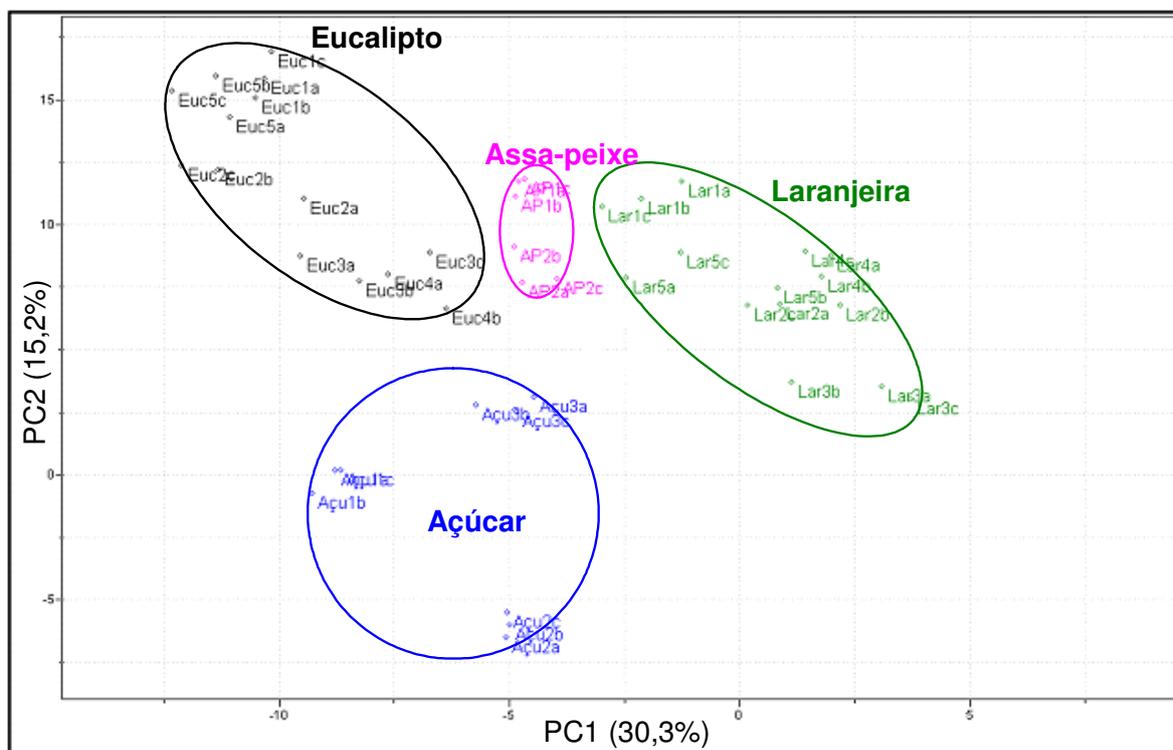


FIGURA 2.3-14. Ampliação do gráfico de *scores* mostrado na figura 2.3-12, mostrando a discriminação entre os méis de eucalipto, laranjeira, assa-peixe e açúcar (45,5%)

As variáveis responsáveis pela discriminação mostrada nas figuras 2.3-13 e 2.3-14 foram identificadas analisando-se o gráfico de *loadings* juntamente com os espectros de RMN de ^1H destes méis. Na figura 2.3-15 (página 75) estão mostradas as ampliações das regiões de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros dos méis Lar13, Lar2, Euc14, Euc1, AP1 e Açú2, mostrando algumas diferenças entre eles, que foram de extrema importância para a discriminação.

Os méis Lar2 e Euc1 apresentaram pequenas diferenças nos sinais presentes em seus espectros, sendo que alguns compostos foram identificados na figura 2.3-4 (página 51), mostrando que possuem algumas diferenças químicas nas suas composições, e justificando a discriminação observada entre os méis de laranjeira e eucalipto. No entanto, as amostras Euc14 e Lar13 apresentaram espectros iguais entre si e muito diferentes dos demais, mesmo tendo sido adquiridas como méis de eucalipto e laranjeira, respectivamente. Estas diferenças foram as responsáveis pela discriminação destas amostras e estão relacionadas com os compostos 5-hidróximetilfurfural (HMF – **I**), ácido cítrico (**H**) e etanol (**G**), cuja elucidação será mostrada no item 2.3.3.2, e com a ausência dos sinais dos aminoácidos encontrados nos outros méis.

O HMF tem sido muito usado como um indicador de adulteração dos méis utilizando-se xarope de sacarose. No entanto, ele também é formado pela exposição do mel a altas temperaturas e durante um período longo, pelo armazenamento em condições inadequadas, variação de pH, entre outros fatores (SANZ *et al.*, 2003; FALLICO *et al.*, 2004; GIDAMIS *et al.*, 2004; TOSI *et al.*, 2004 e ZAPPALÀ *et al.*, 2005). Portanto, o uso do HMF como indicador de adulteração tem sido questionado. Além disto, alguns estudos mostraram que esta substância apresenta efeitos tóxicos e tumorais. Porém, estudos mais recentes sugerem que não apresenta sérios riscos à saúde, mas que ainda é matéria de debates (SPANIO *et al.*, 2006). Já o ácido cítrico pode ter sido adicionado para atuar como conservante, uma vez que estes méis sofreram alguma alteração nas suas composições e poderiam fermentar ou sofrer algum outro processo de decomposição.

Os méis de assa-peixe apresentaram espectros semelhantes aos dos de eucalipto e de laranjeira, justificando o posicionamento intermediário aos grupos destes dois tipos de méis no PCA. Já os de cana-de-açúcar, além de alguns sinais semelhantes aos dos méis de eucalipto e de laranjeira, na região de δ 1,00 a 3,10,

também apresentaram os sinais dos hidrogênios aromáticos dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, como os méis silvestres, explicando o seu agrupamento em valores próximos a zero de PC2.

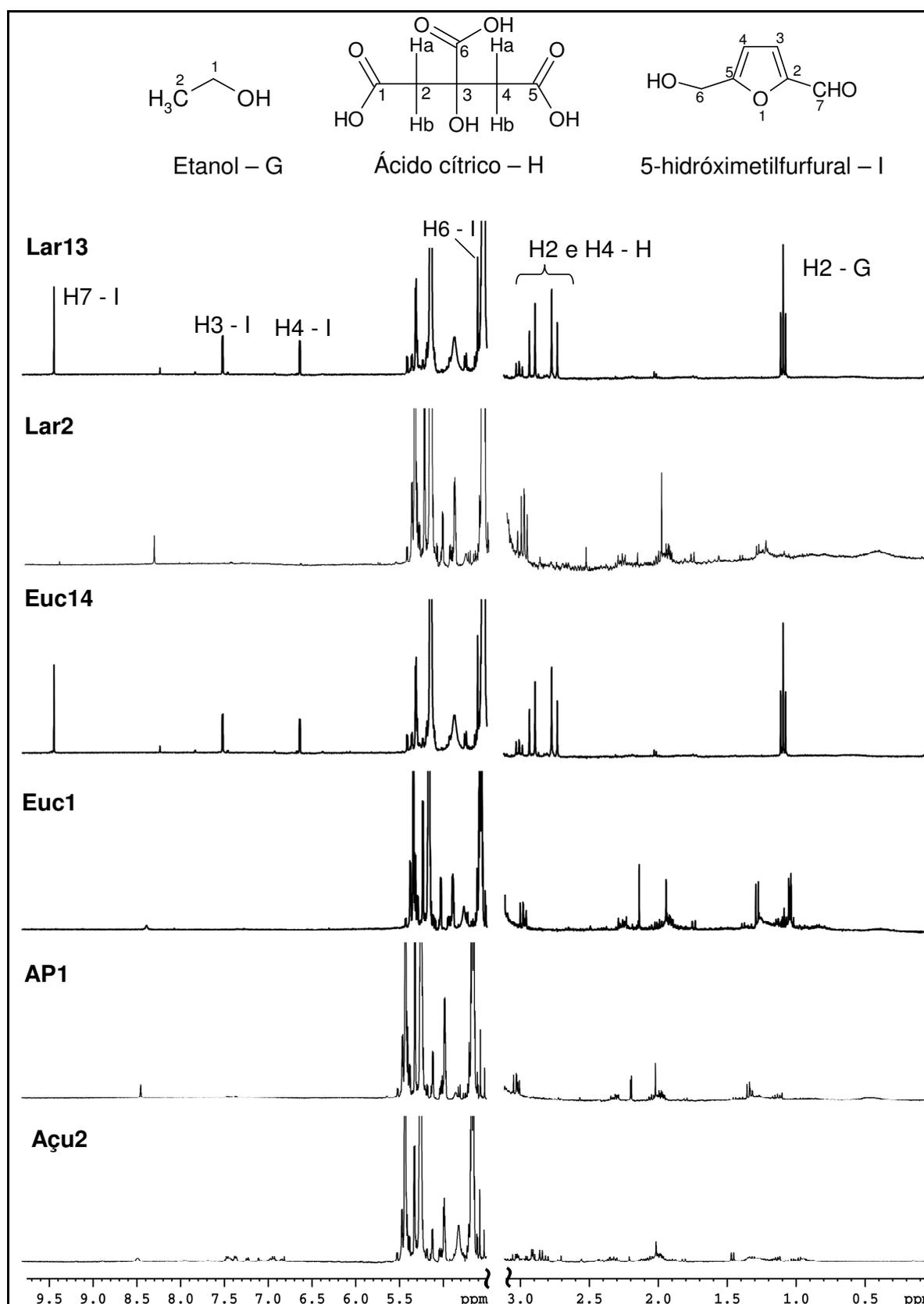


FIGURA 2.3-15. Ampliações de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão da água, dos méis de eucalipto, laranjeira, assa-peixe e cana-de-açúcar (D_2O)

2.3.2.4 – Estudo da influência da regionalidade sobre amostras de méis por RMN de ^1H

O estudo da influência da regionalidade sobre amostras de méis foi realizado para verificar possíveis variações nas composições químicas dos méis com relação à região onde foram produzidos e mostrar quais as substâncias responsáveis por esta variação. Além disto, os méis das diferentes regiões apresentam diferenças significativas com relação ao valor de comercialização, que podem estar relacionadas à uma melhor qualidade do produto, sendo variáveis a serem analisadas. Por isso, foram obtidas amostras das cinco regiões brasileiras, porém não foi possível adquirir um número igual de amostras para todas as regiões. Fatores relacionados à sazonalidade, também, foram avaliados, uma vez que foram coletadas amostras em diferentes épocas entre os anos de 2005 e 2007.

A análise iniciou-se pelo estudo dos méis comerciais de São Paulo, mostrado no item 2.3.2.2 (página 49), no qual foram escolhidos os melhores parâmetros para serem usados na análise quimiométrica.

A figura 2.3-16 (página 77) apresenta o gráfico de linhas com a sobreposição de todos os espectros analisados neste estudo. As regiões de exclusão estão marcadas em cinza e são referentes ao sinal residual da água após a supressão e do TMSP- d_4 , pois não são pertencentes às amostras e foram excluídas a fim de evitar que interferissem na discriminação. Excluíram-se, também, todos os ruídos presentes entre os sinais, para que os dados pudessem ser autoescalados. No entanto, diferentemente do estudo mostrado no item 2.3.2.2 (página 49), a melhor discriminação foi obtida mantendo-se os sinais referentes aos carboidratos.

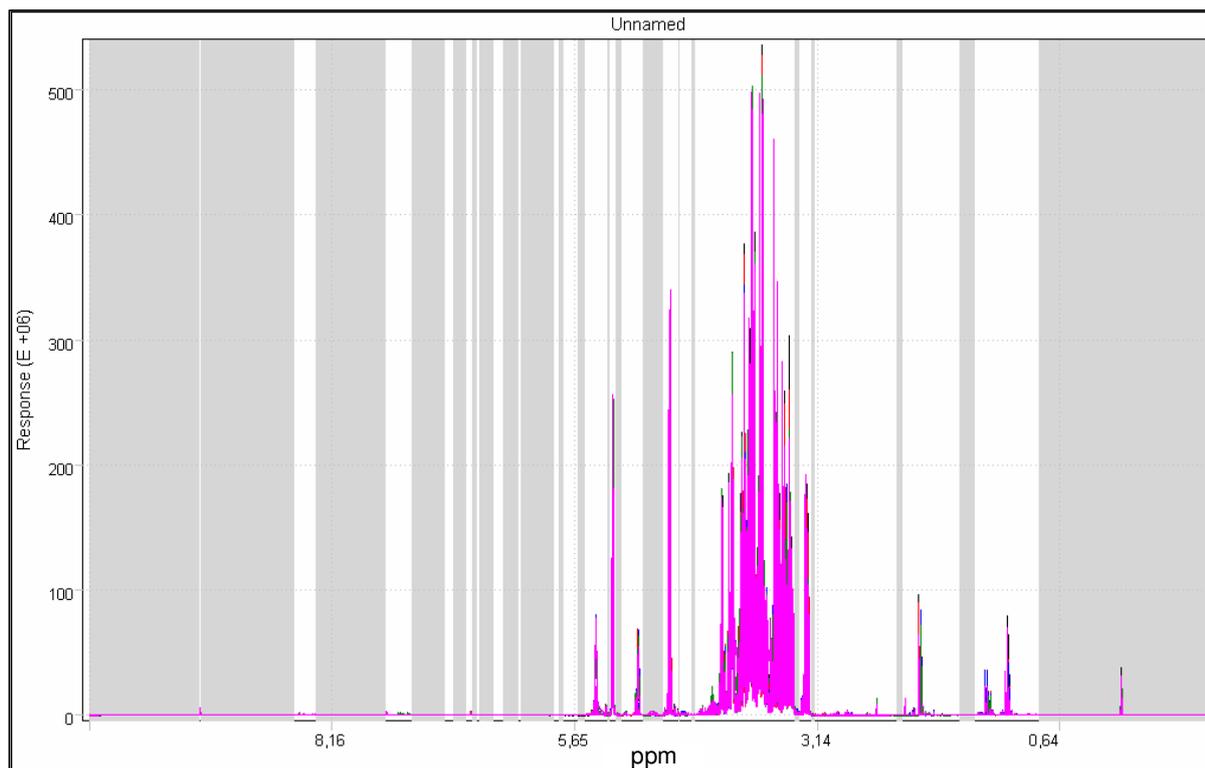


FIGURA 2.3-16. Gráfico de linhas correspondente aos espectros de RMN de ^1H dos méis analisados no estudo da influência da regionalidade, mostrando em cinza as regiões de exclusão

O gráfico de *scores* de PC1 x PC2 de todas as amostras está apresentado na figura 2.3-17 (página 78), representando 24,1% da informação do sistema, sendo que PC1 descreve 14,2% de variância, enquanto que PC2 descreve 9,9%. Embora não tenha sido possível obter uma discriminação entre os méis das cinco regiões, alguns deles discriminaram-se, uma vez que alguns compostos presentes nestes méis mostraram-se importantes para esta separação.

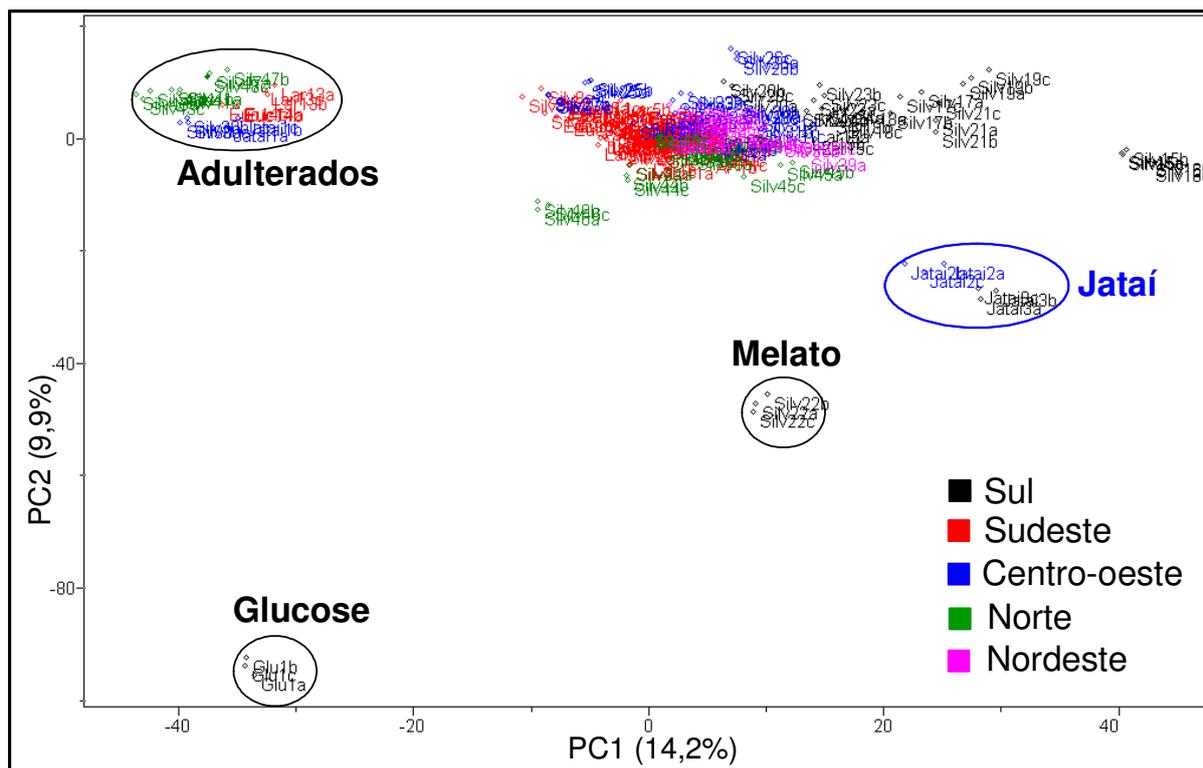


FIGURA 2.3-17. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H dos méis analisados no estudo da influência da regionalidade (24,1%)

Em valores negativos de PC1 e positivos de PC2 estão agrupados os méis que passaram por algum processo de adulteração. Os méis Lar13, Euc14, Jatai1 e Silv30 foram analisados no estudo da autenticidade utilizando-se a técnica SNIF-NMR e aproximaram-se dos méis de cana-de-açúcar, comprovando que possuem a cana-de-açúcar como, pelo menos, uma das fontes de açúcar. Além disto, adicionaram-se a eles, na figura 2.3-17, os méis Silv41, Silv43 e Silv47, pois apresentam características muito semelhantes.

Na figura 2.3-18 (página 79) estão apresentados os espectros de RMN de ^1H dos méis Jatai1, Silv30, Silv41, Silv43 e Silv47, mostrando que todos apresentam os sinais referentes ao HMF e ao ácido cítrico, como foi discutido no item 2.3.2.3 (página 72) para os méis Lar13 e Euc14.

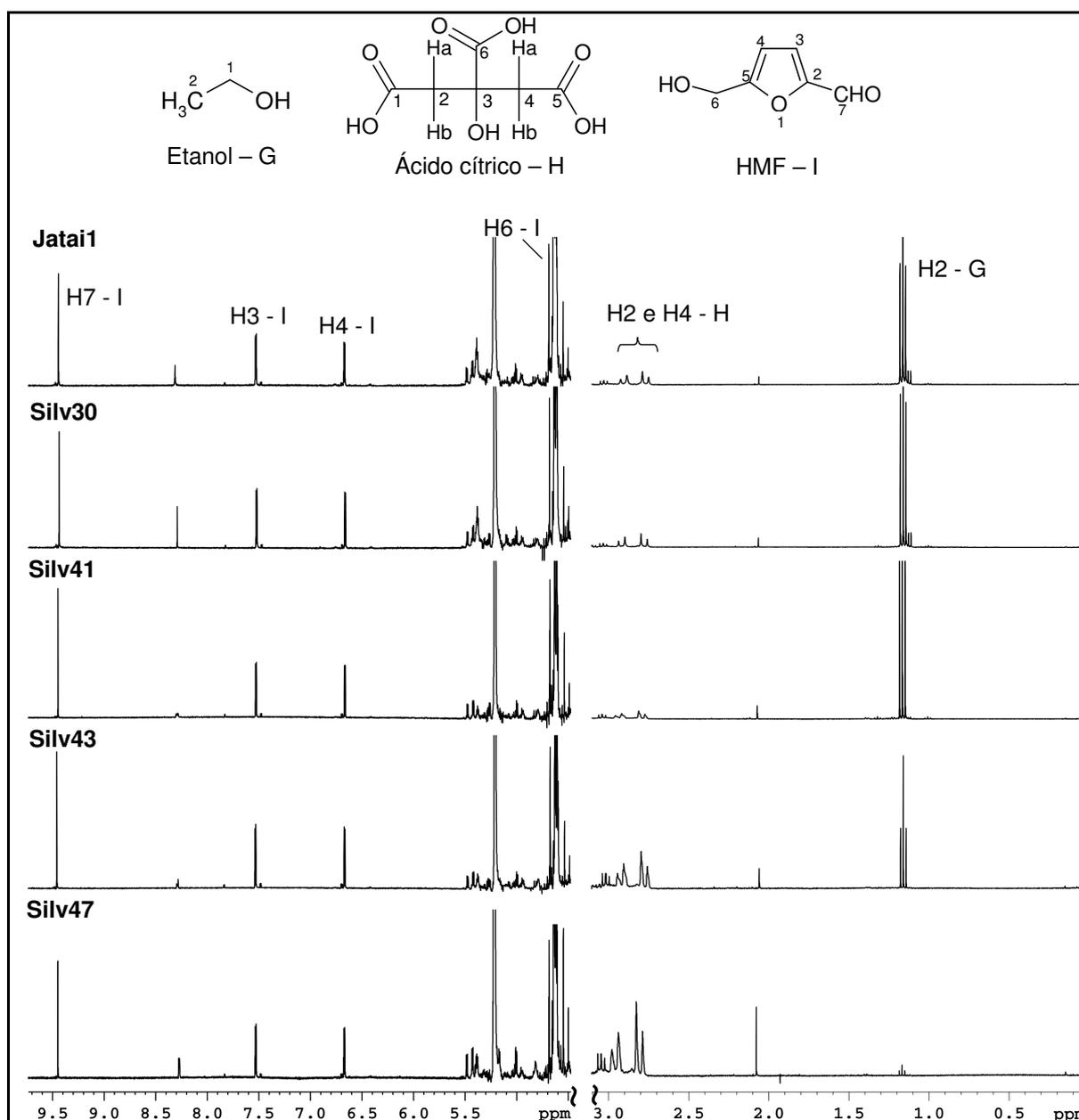


FIGURA 2.3-18. Ampliações das regiões de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, dos méis de jataí e silvestres (D_2O)

A amostra chamada de Glu1, que trata-se de uma mistura de glucose de mandioca e açúcar invertido, também discriminou-se das outras, sendo observada em valores negativos de PC1 e PC2 no gráfico de *scores* (figura 2.3-17, página 78). Esta discriminação pode ser explicada pela presença dos sinais referentes à sacarose no seu espectro de RMN de ^1H , sendo que o hidrogênio anomérico é o mais facilmente identificado em δ 5,40 (*dublete*, $J = 3,8$ Hz). Além disto, os isômeros da frutose apresentaram-se em menor quantidade em relação aos outros méis, os sinais na região de δ 4,08 a 4,12, referente aos hidrogênios H3 e H4 da β -frutofuranose podem ser usados para comparação (figura 2.3-19, página 80).

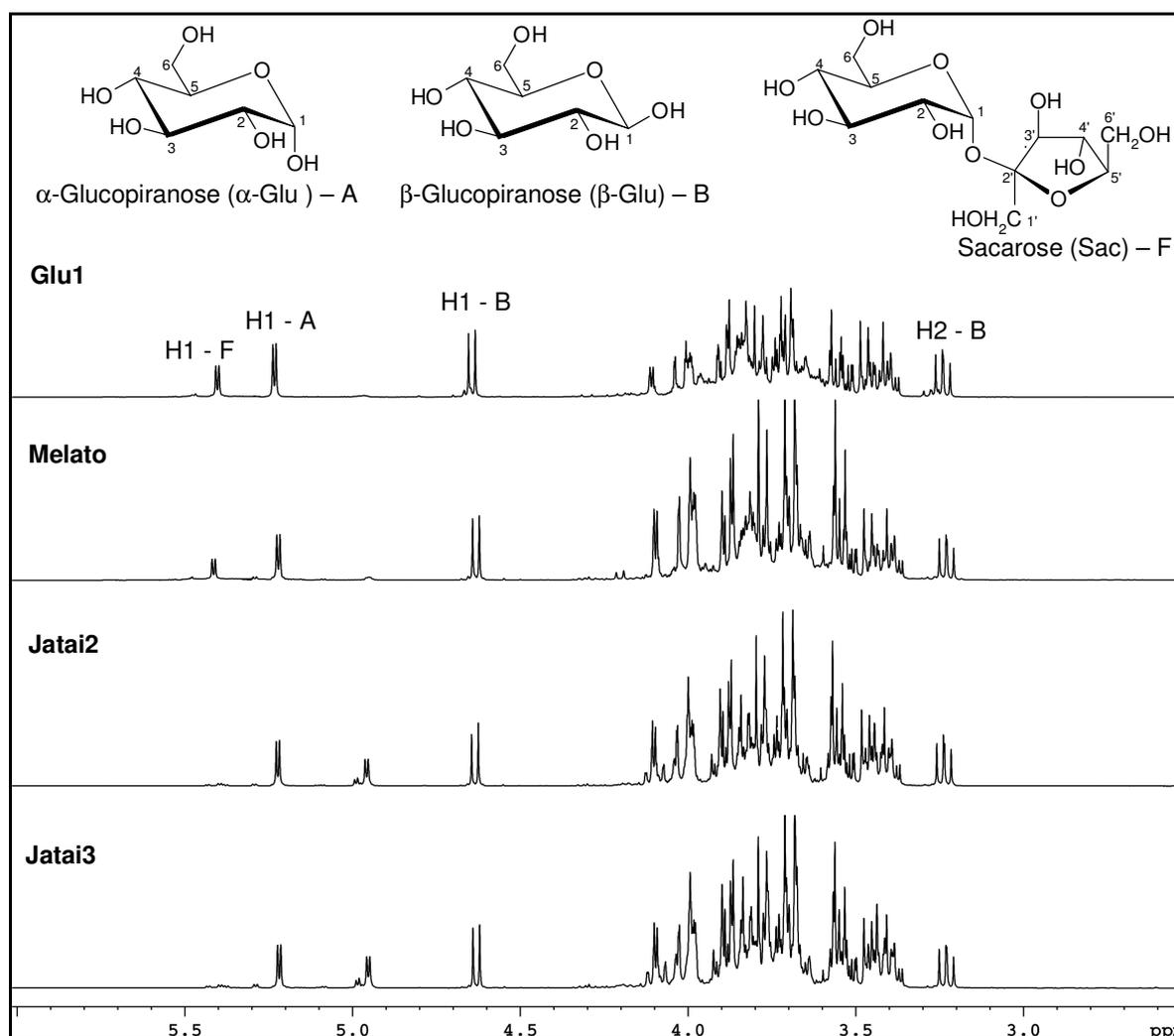


FIGURA 2.3-19. Ampliação da região de δ 2,50 a 6,00 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, dos méis de melato, de jataí e da amostra Glu1 (D_2O)

O espectro de RMN de ^1H da amostra Glu1 apresenta, também, os sinais do HMF (**I**) e dos ácidos fórmico (**J**) e láctico (**M**) (figura 2.3-20, página 81), porém não são visualizados os sinais dos aminoácidos, comumente encontrados nos méis.

Tendo sido encontrado o HMF tanto nos méis chamados de adulterados como na amostra Glu1, pode-se dizer que ele é um dos responsáveis pelo deslocamento destas amostras para valores negativos de PC1.

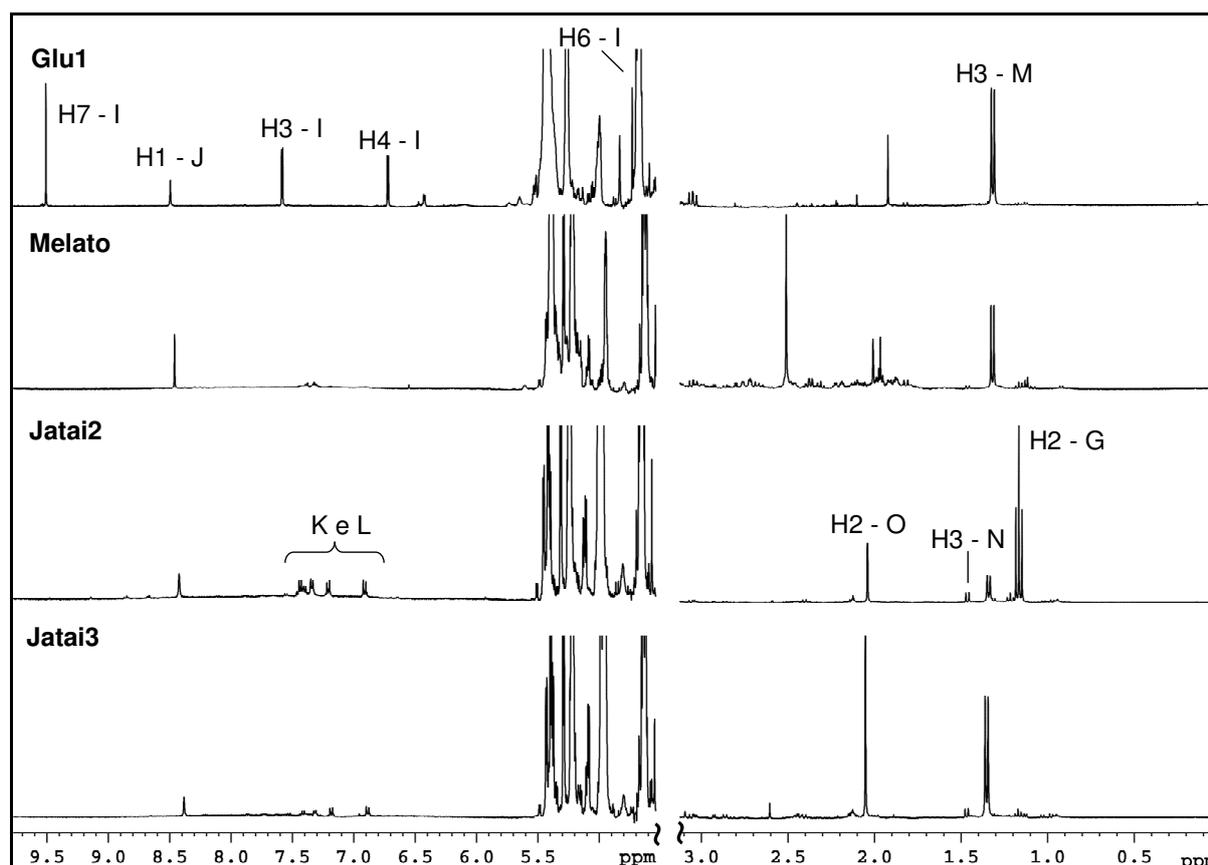


FIGURA 2.3-20. Ampliações das regiões de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão da água, dos méis de melato, de jataí e da amostra Glu1 (D_2O)

O mel de melato (Silv22) também distanciou-se dos outros méis no gráfico do PCA. Esta discriminação pode ser explicada pela presença dos sinais referentes à sacarose no seu espectro de RMN de ^1H (figura 2.3-19, página 80). Segundo CAMPOS *et al.* (2003), o mel de melato difere do floral, pois possui menores teores de glucose e de frutose e um maior teor de oligossacarídeos, dentre eles a sacarose.

As amostras Jatai2 e Jatai3, que são méis produzidos pelas abelhas Jataí, apresentaram dois *dubletos*, em δ 4,95 e 4,99 ($J = 3,7$ e $3,6$ Hz, respectivamente), nos espectros de RMN de ^1H (figura 2.3-19, página 80). Estes sinais não foram observados nos outros méis, e provavelmente são referentes aos hidrogênios anoméricos de outros carboidratos. A discriminação destas duas amostras se deu em função destas diferenças nas suas composições. Além disto, esta separação forneceu resultados que indicam a possibilidade de fazer a discriminação dos méis com relação à espécie de abelha que os produziu, no entanto, para confirmação seria melhor realizar a análise de um número maior de amostras.

Entretanto, foram observados outros sinais nos espectros de RMN de ^1H dos méis de melato, Jatai2 e Jatai3, que devem ter auxiliado na discriminação destas amostras para valores positivos de PC1 e negativos de PC2 do gráfico de *scores*. Diferentemente dos méis que localizaram-se em valores negativos de PC1 eles apresentaram os sinais dos hidrogênios da metila da alanina (**N**). Além disto, nos espectros dos méis de jataí foram observados os sinais dos hidrogênios aromáticos da fenilalanina (**L**) e da tirosina (**K**) (figura 2.3-20, página 81), que fez com que eles se aproximassem dos méis silvestres no gráfico de *scores* obtido na análise por PCA, uma vez que os espectros dos méis silvestres também apresentam estes sinais (figura 2.3-4, página 51).

Os ácidos acético (**O**), fórmico (**J**) e láctico (**M**) não foram importantes para a discriminação, porque foram observados em todos os espectros.

Uma discriminação semelhante à observada na PCA foi obtida na análise por HCA (figura 2.3-21, página 83), realizada com os mesmos parâmetros da PCA, incluindo a distância Euclidiana e o método de conexão incremental. Um índice de similaridade igual a 0,393 discriminou os méis em sete grupos. Os ramos A, B e C do dendrograma correspondem às amostras entre os valores de -20 e 50 em PC1 e -10 e 10 em PC2 do gráfico de *scores* (figura 2.3-17, página 78), em que não houve discriminação. Os grupos D a G são referentes às amostras que se discriminaram e serão mostrados nas figuras 2.3-22 a 2.3-24.

A figura 2.3-22 (página 83) traz a ampliação do HCA correspondente ao ramo D, na qual observa-se o agrupamento entre os dois méis de jataí.

Na figura 2.3-23 (página 84) estão mostrados os ramos E e F, onde observa-se que a amostra Glu1 e o mel de melato formaram grupos distintos. Já na figura 2.3-24 (página 84) está mostrado o ramo G, referente ao agrupamento entre os méis que apresentam os sinais do HMF e do ácido cítrico, ou seja, passaram por algum tipo de adulteração.

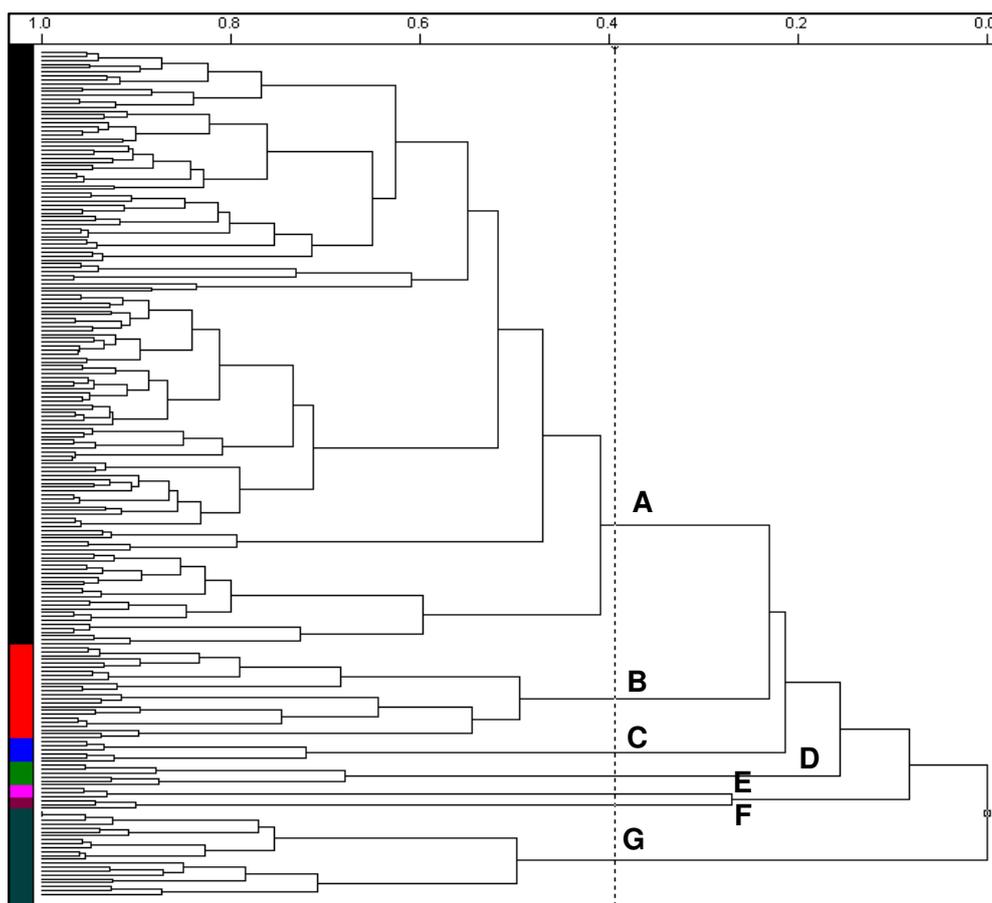


FIGURA 2.3-21. Dendrograma obtido do HCA dos dados de RMN de ^1H dos méis (similaridade: 0,393)

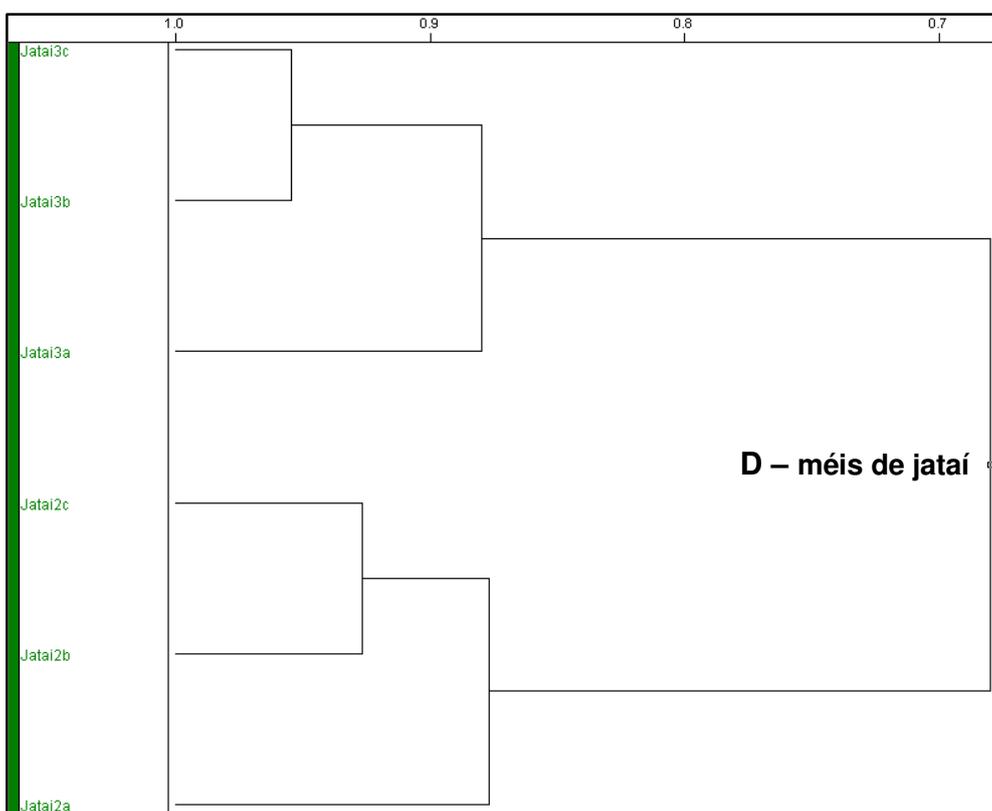


FIGURA 2.3-22. Ampliação do ramo D do dendrograma mostrado na figura 2.3-21



FIGURA 2.3-23. Ampliação dos ramos E e F do dendrograma mostrado na figura 2.3-21

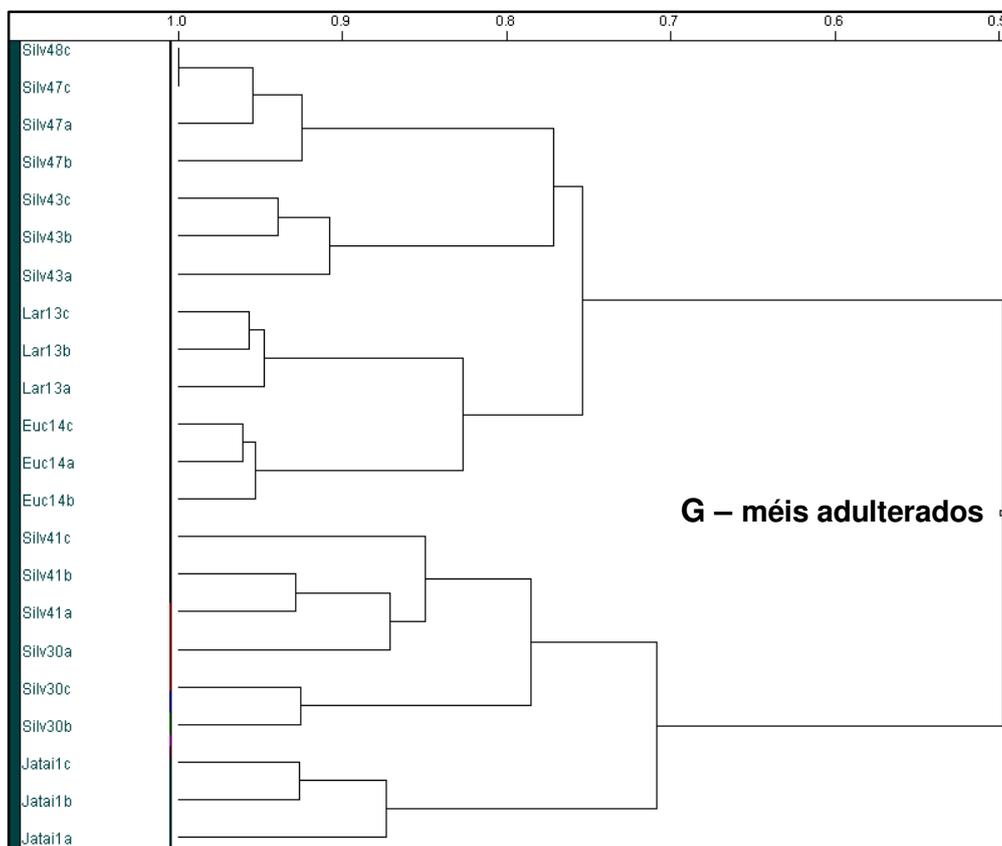


FIGURA 2.3-24. Ampliação do ramo G do dendrograma mostrado na figura 2.3-21

Os méis produzidos nas diferentes regiões brasileiras não foram discriminados, no entanto, houve a discriminação daqueles com características muito diferentes, por isso optou-se por excluí-los da matriz de dados e fazer uma nova análise por PCA. A melhor discriminação foi obtida excluindo-se os sinais dos carboidratos, que tinham sido importantes para a discriminação anterior.

A figura 2.3-25 mostra o gráfico de *scores* obtido selecionando-se as duas primeiras PCs, sendo que PC1 descreve 12,4% da variância do conjunto de dados, enquanto que PC2 descreve 11,3%, e as duas PCs descrevem, juntas, 23,7%. A discriminação obtida não foi muito boa, não sendo obtidos grupos distintos para os méis de cada região, mas foi possível observar uma tendência para a separação. Este resultado mostra que a maioria dos méis coletados nas diferentes regiões do Brasil é muito semelhante, não apresentando diferenças significativas nas suas composições.

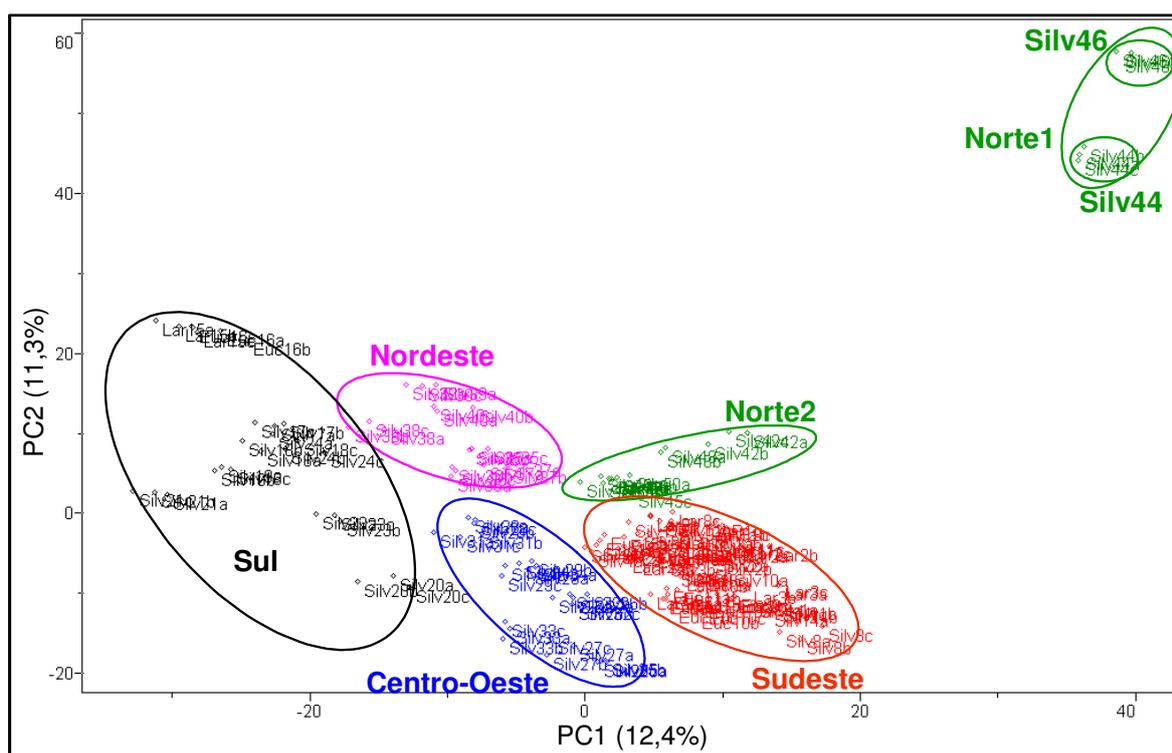


FIGURA 2.3-25. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H dos méis analisados no estudo da regionalidade, após exclusão de amostras (23,7%)

As amostras que formaram o grupo Norte1 apresentaram-se diferentes das demais mostradas na figura 2.3-25, pois mostraram sinais mais intensos das metilas dos ácidos acético (O) e láctico (M) e do etanol (G) no espectro de RMN de ^1H (figura 2.3-26, página 86), quando comparados aos outros méis. Além disto, o mel

Silv46 também apresentou os sinais do HMF (I), mas em menor intensidade do que nos espectros dos méis considerados adulterados, justificando a sua discriminação.

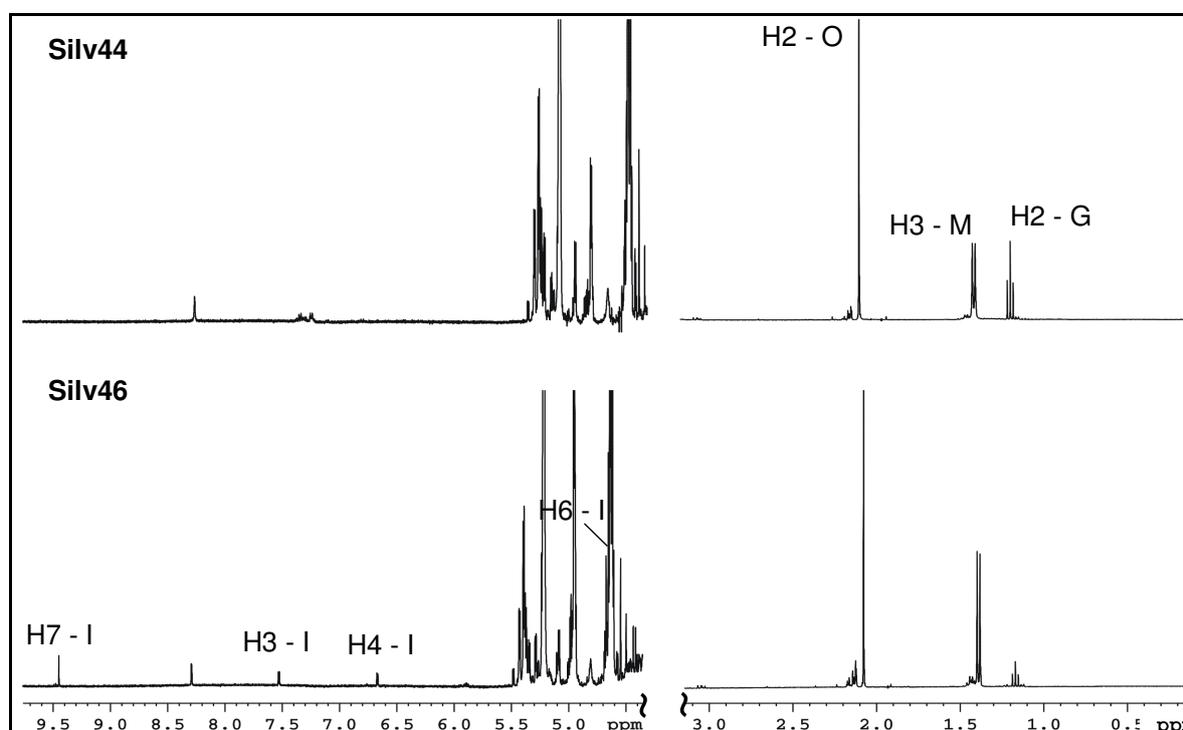


FIGURA 2.3-26. Ampliações das regiões de δ 0,00 a 3,10 e 4,50 a 9,70 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão do sinal da água, dos méis Silv44 e Silv46 (D_2O)

Os resultados mostram que os méis produzidos em todas as regiões brasileiras são muito semelhantes, não sendo possível definir algumas substâncias que sejam responsáveis por uma possível discriminação. No entanto, a separação dos méis dos diferentes tipos foi explicada com base nas substâncias presentes.

Mesmo assim, pode-se dizer que a RMN de ^1H aliada à quimiometria é uma ferramenta com grande potencial para ser usada na discriminação dos diferentes tipos de méis. Isto porque, além de uma boa discriminação entre os tipos de méis, mostra uma tendência para a discriminação dos méis das diferentes regiões brasileiras.

2.3.2.5 – Discriminação dos tipos de méis por RMN de ^{13}C

Na figura 2.3-27 (página 87) está mostrada a ampliação da região de δ 60,0 a 100,0 dos espectros de RMN de ^{13}C dos méis Euc1, Lar1 e Silv1. Comparando-os com os espectros dos vinte primeiros méis analisados pode-se dizer que os sinais majoritários visualizados são iguais para todos e correspondem aos carboidratos, ou seja, α - e β -glucopirranose, α - e β -frutofuranose e β -frutopirranose, como está mostrado no item 2.3.3.1. Por isto, fez-se necessária a utilização dos métodos quimiométricos para a diferenciação entre eles.

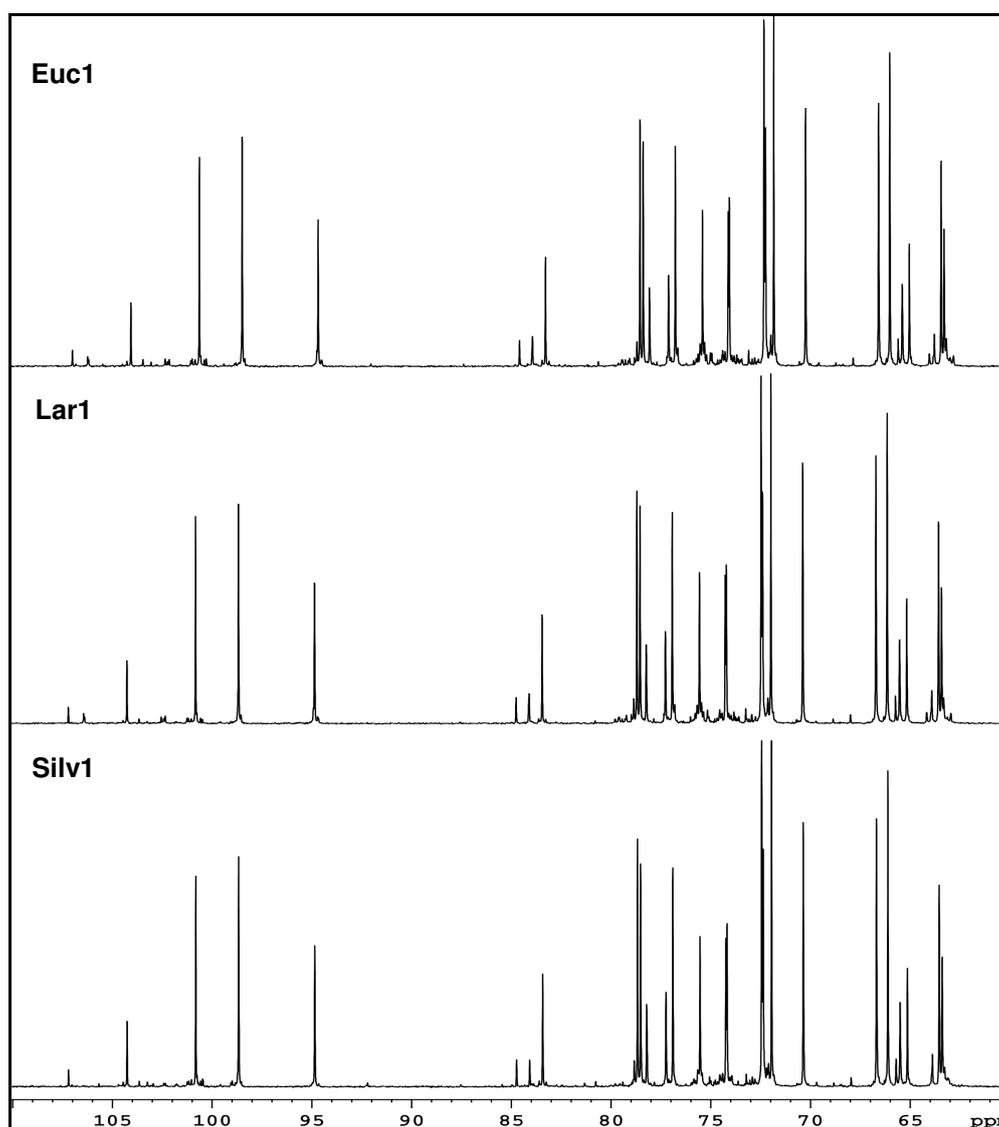


FIGURA 2.3-27. Ampliação de δ 60,0 a 110,0 dos espectros de RMN de ^{13}C dos méis de eucalipto, laranja e silvestre (D_2O)

Em seguida, estão mostrados dois estudos que foram realizados objetivando-se discriminar os méis aplicando-se os métodos de análise exploratória aos espectros de RMN de ^{13}C .

2.3.2.5.1 – Espectros de RMN de ^{13}C processados com 32768 pontos

Inicialmente, os espectros de RMN de ^{13}C dos méis foram processados utilizando-se 32768 pontos (32k) e, em seguida, foram analisados visualmente buscando diferenças que poderiam discriminar os diferentes tipos. No entanto, como pode ser visto na figura 2.3-27 (página 87) as pequenas diferenças observadas estão relacionadas com os compostos minoritários. Desta forma, a análise visual não pôde contribuir para a discriminação proposta, fazendo-se necessário a aplicação dos métodos quimiométricos PCA e HCA aos espectros de RMN de ^{13}C .

No estudo por PCA os parâmetros foram ajustados, iniciando-se pela seleção das variáveis. Na primeira análise foi usado todo o espectro, excluindo-se somente as regiões de ruídos e do TMS- d_4 , aplicando a normalização para a norma um, a primeira derivada e o autoescalamamento aos dados. No entanto, não foi obtida uma boa discriminação entre os tipos de méis. Por isso, o gráfico de *loadings* foi analisado com o intuito de encontrar as variáveis que forneceriam a melhor discriminação e foi verificado que os sinais menos intensos não apresentaram influência para a discriminação. Desta forma, estes sinais foram excluídos, permanecendo somente os dos carboidratos, como pode ser visto no gráfico de linhas mostrado na figura 2.3-28.

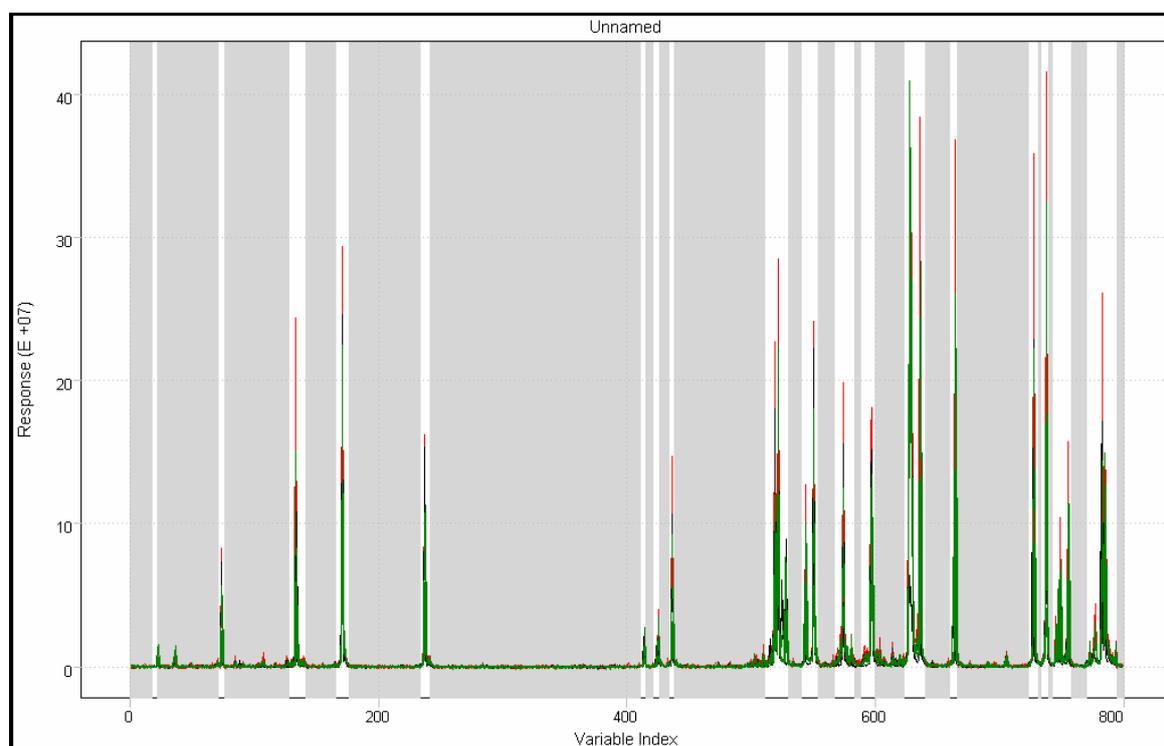


FIGURA 2.3-28. Gráfico de linhas correspondente aos dados de RMN de ^{13}C dos méis, espectros processados com SI=32k; mostrando em cinza as regiões de exclusão

O gráfico de *scores* de PC1 x PC2 obtido na análise por PCA está mostrado na figura 2.3-29 e representa 57,4% da informação do sistema, sendo que PC1 descreve 36,2% de variância total e PC2 descreve 21,2%. Neste gráfico pode ser observada a formação de três grupos distintos. O grupo chamado de Eucalipto, em valores negativos de PC1 e PC2, foi formado por dois méis de eucalipto. No grupo chamado de Silvestre, em valores negativos de PC1 e positivos de PC2, observa-se uma predominância dos méis silvestres, mas verifica-se a presença de um mel de laranjeira e um de eucalipto. O grupo Laranjeira, foi assim denominado, por conter um maior número de méis de laranjeira, os méis silvestres presentes neste grupo podem ter o néctar das flores de laranjeira como fontes predominantes nas suas composições e o mel de eucalipto Euc3 foi agrupado de forma errada.

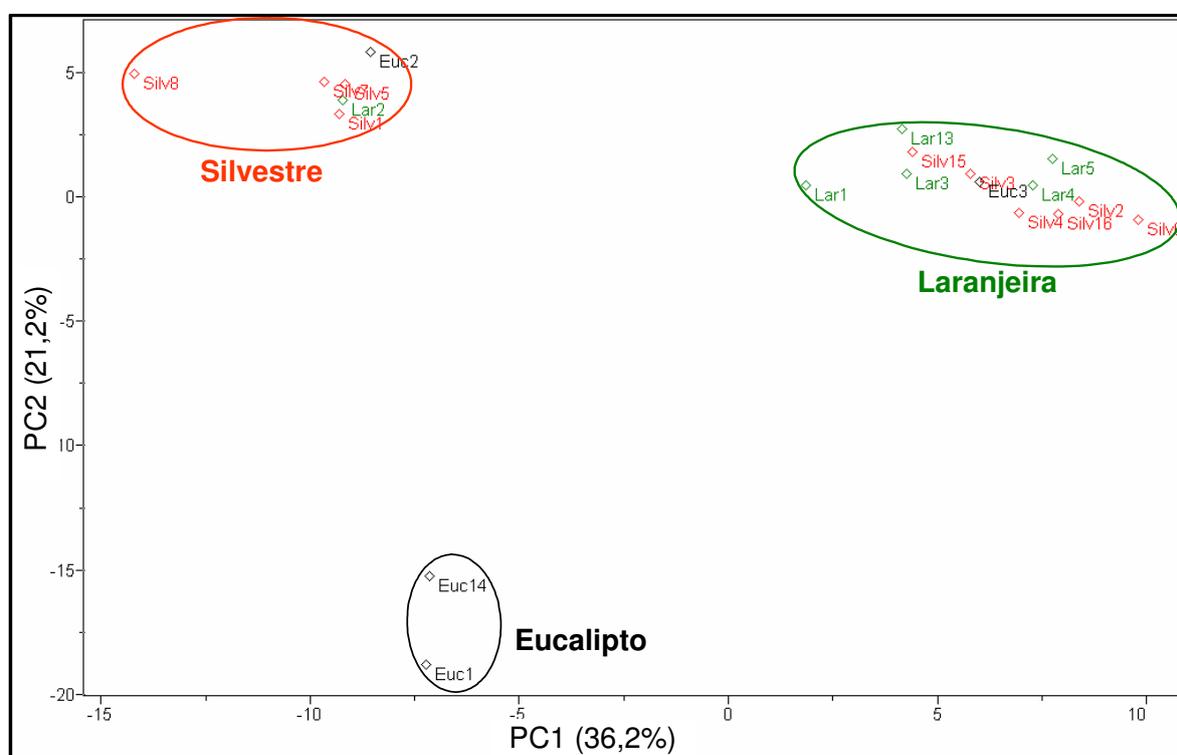


FIGURA 2.3-29. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos dados de RMN de ^{13}C dos méis; espectros processados com SI=32k (57,4%)

O dendrograma obtido da análise por HCA está mostrado na figura 2.3-30 (página 90). A linha pontilhada em um índice de similaridade de 0,485 distinguiu as amostras em três grupos. No grupo Laranjeira houve o agrupamento de um mel de eucalipto, além dos silvestres. No grupo Silvestre observa-se a presença de um de laranjeira e um de eucalipto. No grupo Eucalipto dois méis de eucalipto agruparam-se.

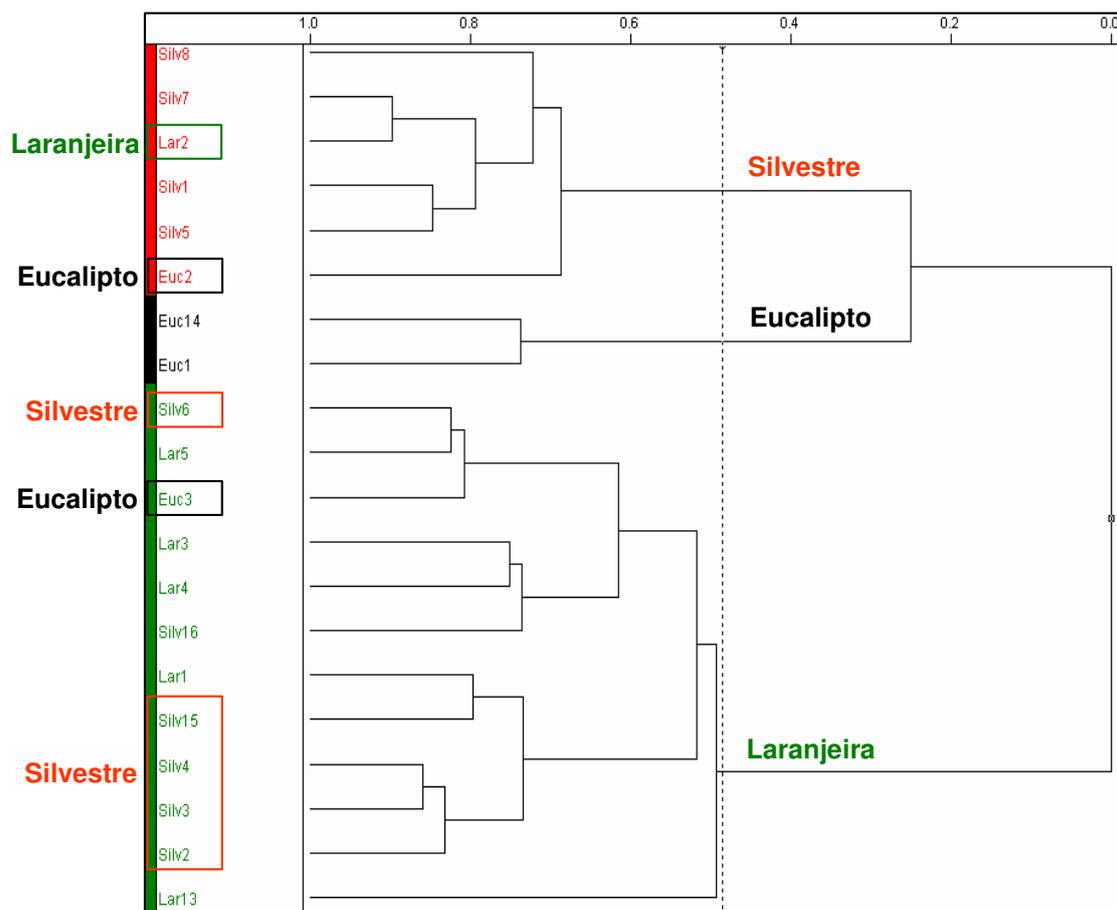


FIGURA 2.3-30. Dendrograma dos dados de RMN de ^{13}C dos méis; espectros processados com SI=32k (similaridade: 0,485)

O resultado obtido aplicando-se os métodos quimiométricos aos espectros de RMN de ^{13}C não foi muito bom, principalmente quando comparado ao obtido com a análise dos espectros de ^1H . Por isso, objetivando-se melhorar esta discriminação mudou-se o número de pontos usados no processamento dos espectros, como será mostrado a seguir.

2.3.2.5.2 – Espectros de RMN de ^{13}C processados com 65356 pontos

O processamento dos espectros de RMN de ^{13}C utilizando-se 65356 pontos (64k) gerou uma matriz de dados com o dobro do número de pontos daquela mostrada na figura 2.3-28 (página 89). A análise foi feita excluindo-se as mesmas regiões espectrais e mantendo-se as mesmas transformações e pré-processamentos que anteriormente, com o objetivo de verificar somente a influência do número de pontos usado no processamento dos espectros sobre a discriminação dos tipos de méis. O gráfico de linhas obtido está mostrado na figura 2.3-31.

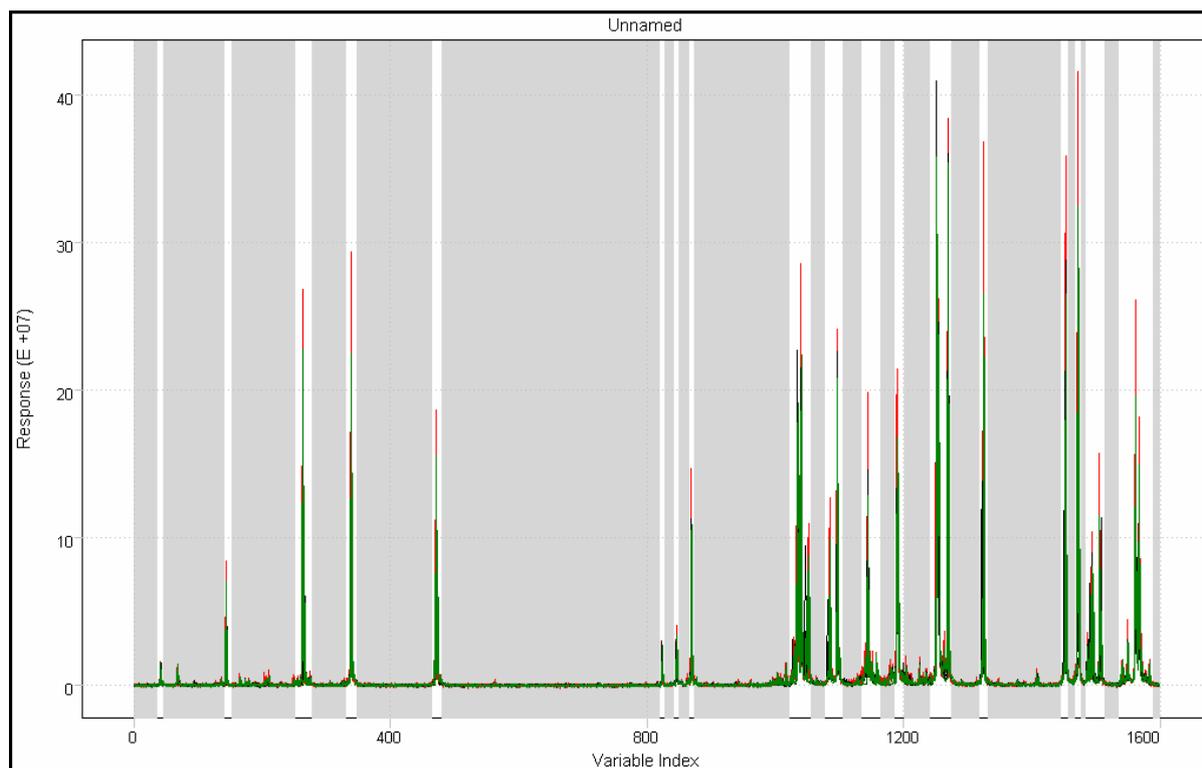


FIGURA 2.3-31. Gráfico de linhas correspondente aos dados de RMN de ^{13}C dos méis; espectros processados com SI=64k, mostrando em cinza as regiões de exclusão

O gráfico de *scores* de PC1 x PC2 obtido na análise por PCA está mostrado na figura 2.3-32 (página 92). PC1 descreve 46,8% de variância do conjunto de dados, enquanto que PC2 descreve 16,5%, e as duas PCs juntas descrevem 63,3% da variância total. Neste gráfico pode ser observado que os méis Lar13 e Euc14 formaram um grupo distinto dos outros, em valores positivos de PC1 e PC2, e este grupo foi chamado de adulterados, sendo um resultado semelhante ao obtido na análise quimiométrica dos espectros de RMN de ^1H . O mel de eucalipto Euc3 distanciou-se dos outros, ficando em valores negativos de PC2. O grupo Silvestre, em valores negativos de PC1 e PC2, foi formado somente por méis silvestres. Já o grupo Laranjeira contém a maioria dos méis de laranjeira e dois méis de eucalipto, que foram agrupados de forma errada, além dos silvestres.

O dendrograma, obtido na análise por HCA, está mostrado na figura 2.3-33 (página 92). Um índice de similaridade de 0,545 distinguiu as amostras em quatro grupos, sendo que somente no primeiro grupo, que é o dos méis de laranjeira, foram observadas amostras agrupadas de forma errada.

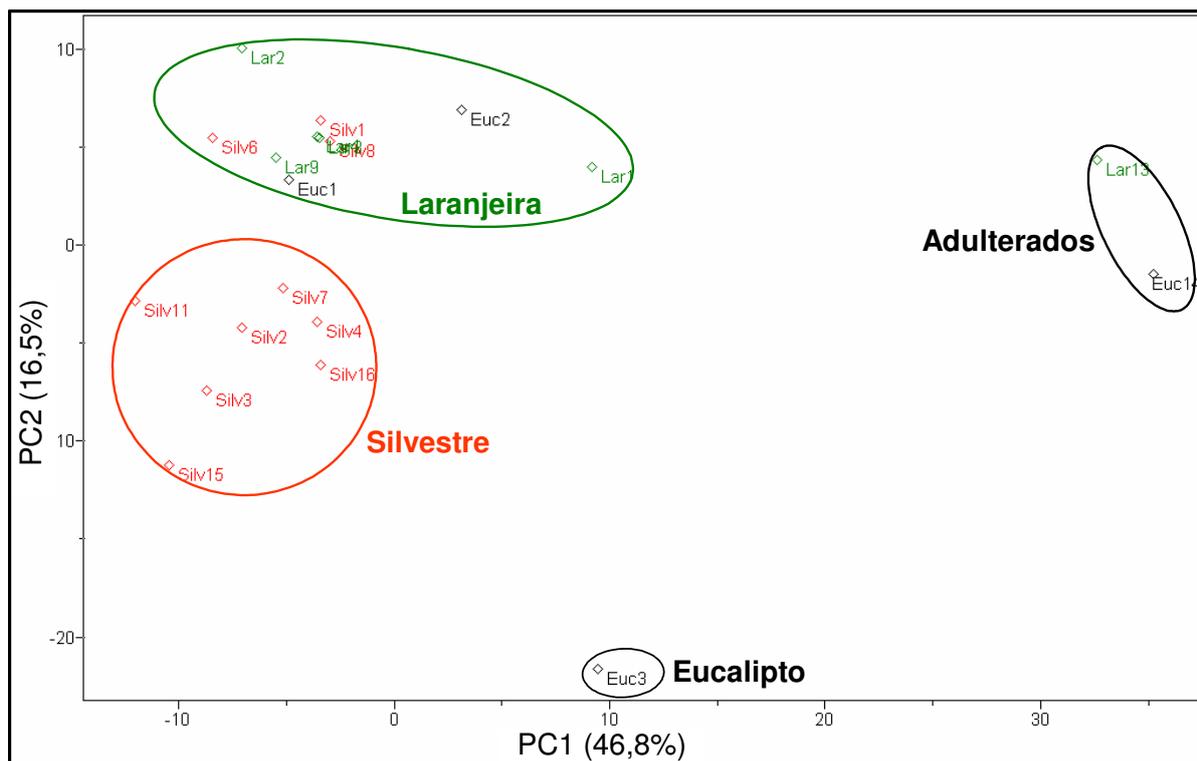


FIGURA 2.3-32. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos dados de RMN de ^{13}C dos méis; espectros processados com SI=64k (63,3%)

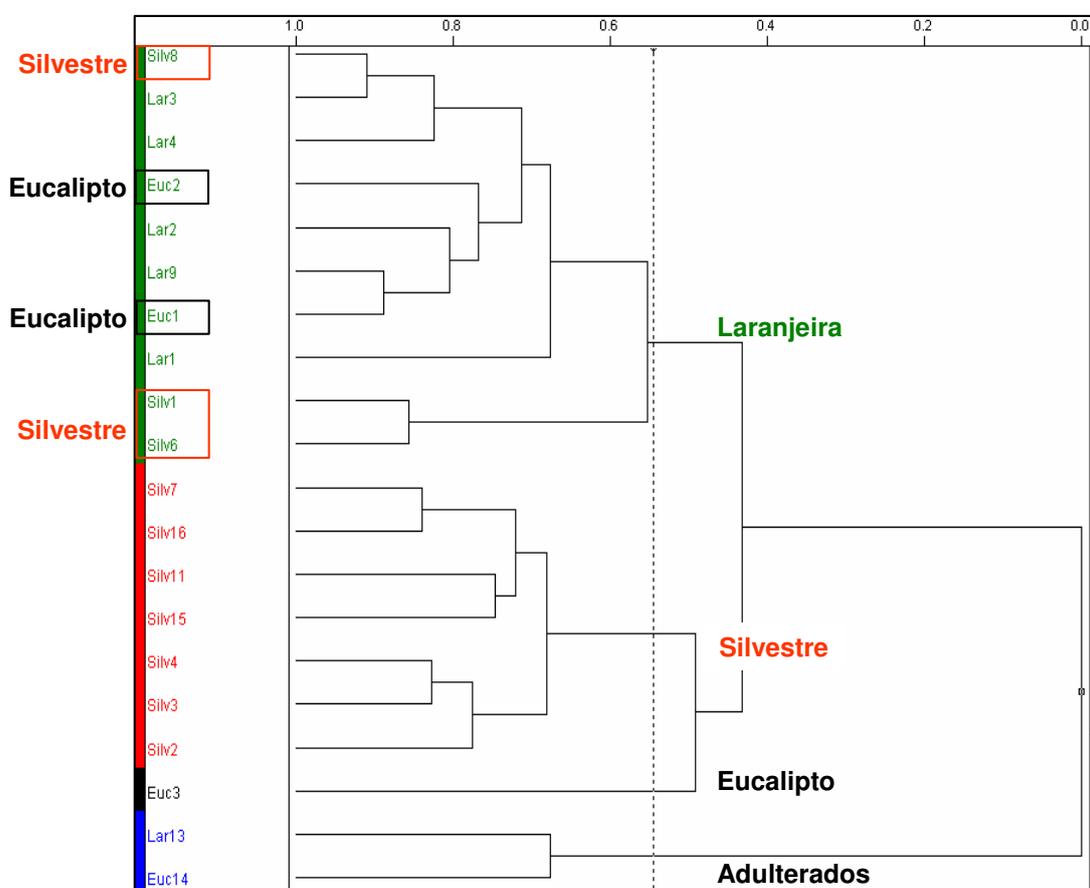


FIGURA 2.3-33. Dendrograma dos dados de RMN de ^{13}C dos méis; espectros processados com SI=64k (similaridade: 0,545)

A discriminação dos tipos de méis obtida quando os espectros foram processados com 64k (figuras 2.3-32 e 2.3-33, página 92) ficou melhor do que a obtida com os espectros processados com 32k pontos (figuras 2.3-29 e 2.3-30, páginas 89 e 90), provavelmente por que a utilização de um número maior de pontos no processamento forneceu uma maior resolução aos espectros, o que possibilitou uma melhor discriminação.

Comparando-se os resultados obtidos aplicando-se os métodos quimiométricos aos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , pode-se dizer que a análise dos dados de ^1H forneceu melhores resultados devido a sua maior sensibilidade quando comparada à de ^{13}C , sendo possível visualizar nos espectros de ^1H os sinais dos compostos minoritários e que foram os responsáveis pela discriminação. Para observar estes sinais com uma relação sinal/ruído satisfatória no espectro de ^{13}C o seu tempo de aquisição seria muito maior, o que tornaria a medida inviável.

2.3.3 – Elucidação estrutural dos metabólitos presentes nos méis usando a Espectroscopia de RMN

A atribuição dos sinais de RMN e a elucidação estrutural das substâncias presentes nos méis foram efetuadas a partir dos experimentos de RMN das amostras intactas, ou seja, sem nenhum processo de isolamento ou purificação. Os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H compreendem a região espectral de δ 0,8 a 10,0.

2.3.3.1 – Elucidação dos carboidratos presentes nos méis

A atribuição dos deslocamentos químicos dos carboidratos foi possível a partir dos experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , TOCSY, *g*HSQC e *g*HMBC realizados para o mel Lar13, e com o auxílio da literatura (FAN, 1996, SOBOLEV *et al.*, 2003; SOBOLEV *et al.*, 2005 e FAN e LANE, 2008).

A realização do espectro de RMN de ^{13}C foi necessária, pois muitos deslocamentos químicos eram muito próximos e a resolução dos experimentos bidimensionais não permitiu a completa atribuição.

A α -glucopirranose (**A**) foi identificada pela presença de um *dubleto* em δ 5,22 no espectro de RMN de ^1H ($J = 3,7$ Hz), referente ao hidrogênio anomérico (H1 – **A**). Já a β -glucopirranose (**B**) foi identificada pela presença de um *dubleto* em δ 4,63 ($J = 8,0$ Hz), também referente ao hidrogênio anomérico (H1 – **B**). O sinal do H2 de **B** foi observado em δ 3,23 como um *duplo dubleto* ($J = 8,0$ e $9,2$ Hz), referentes ao acoplamento com os hidrogênios H1 e H3.

No experimento de TOCSY (figura 2.3-34) foram observadas, principalmente, as correlações dos hidrogênios H1 de **A** e **B**, que correlacionaram-se com todos os outros hidrogênios das moléculas. As correlações dos sinais entre δ 3,20 e 4,20 foram mais difíceis de serem observadas devido à sobreposição no espectro de RMN de ^1H , mas estão descritas na tabela 2.3-16 (página 100).

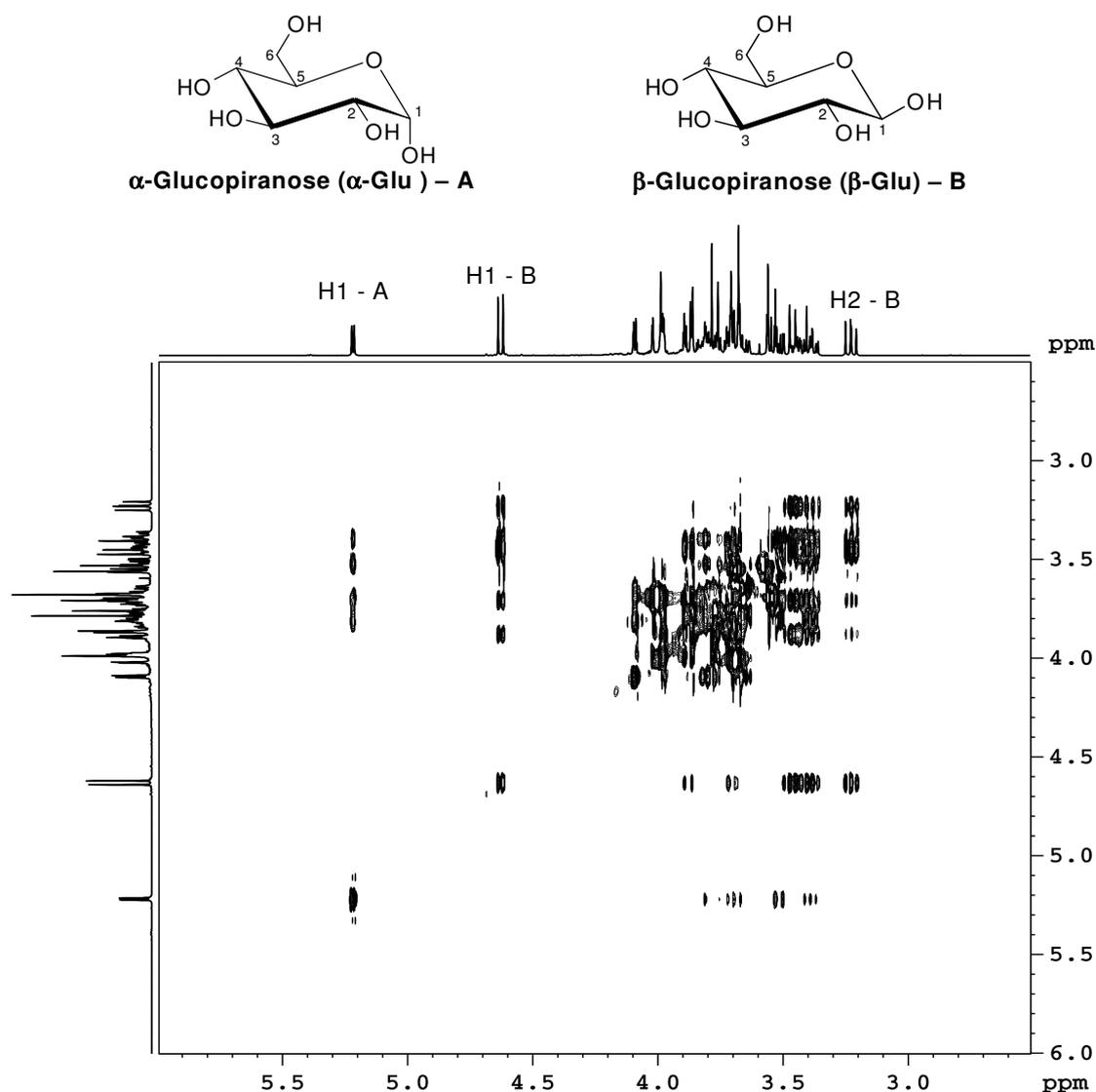


FIGURA 2.3-34. Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de TOCSY do mel Lar13, evidenciando os sinais dos carboidratos (D_2O)

Nos experimentos de *g*HSQC (figura 2.3-35) e *g*HMBC (figura 2.3-36, página 96) puderam ser observadas, principalmente, as correlações para os hidrogênios H1 de **A** e **B**. O sinal em δ 5,22 (H1 - **A**) mostrou correlação $^1J_{CH}$ em δ 94,6 e $^nJ_{CH}$ em δ 74,0 e 75,4, referentes aos carbonos C2 e C3. Já o sinal em δ 4,63 (H1 - **B**) mostrou correlação $^1J_{CH}$ em δ 98,4 e $^nJ_{CH}$ em δ 76,7 e 78,3, também referentes aos carbonos C2 e C3.

As correlações dos hidrogênios entre δ 3,20 e 4,20 foram mais difíceis de serem observadas devido à sobreposição. No entanto, todos os carbonos dos carboidratos puderam ser atribuídos, e estão descritos na tabela 2.3-16 (página 100).

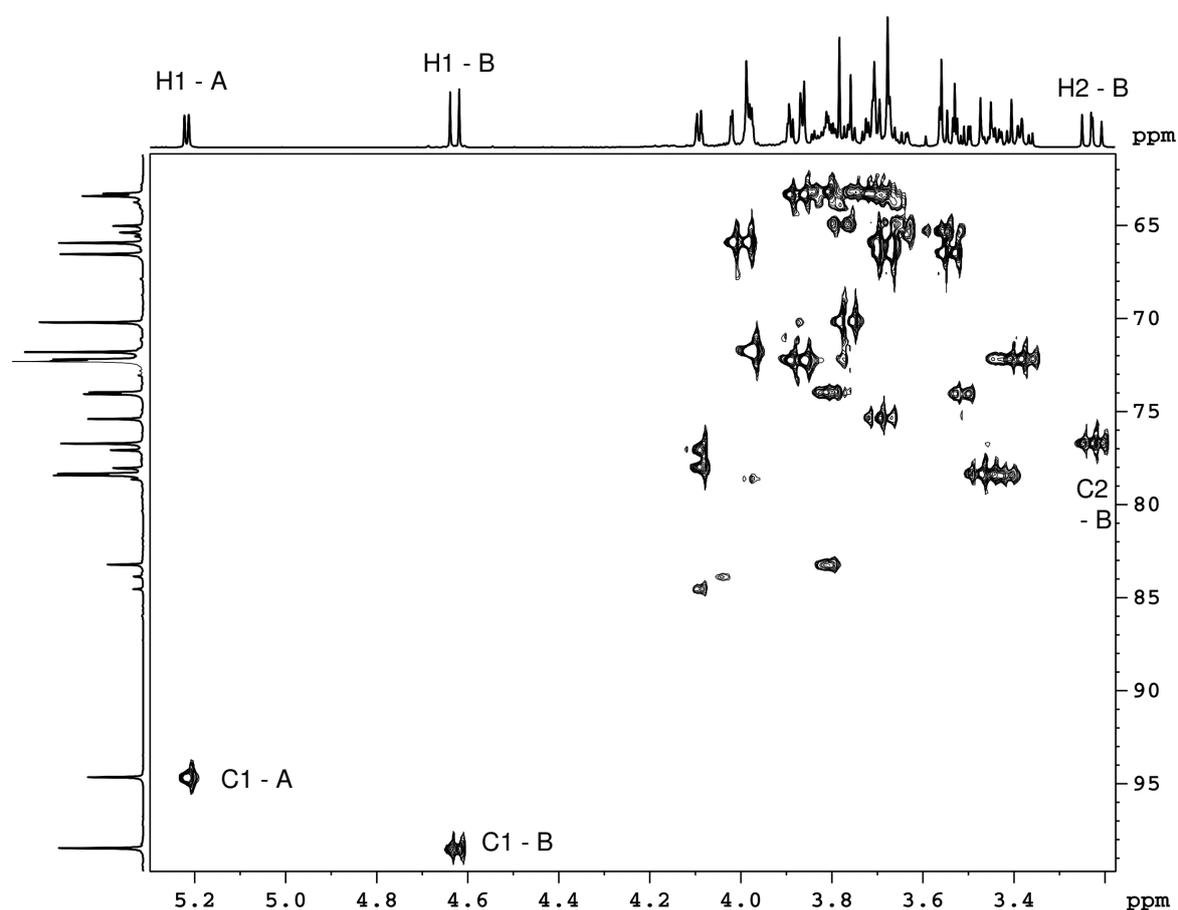


FIGURA 2.3-35. Correlações 1H - ^{13}C observadas no experimento de *g*HSQC do mel Lar13, evidenciando os sinais dos carboidratos (D_2O)

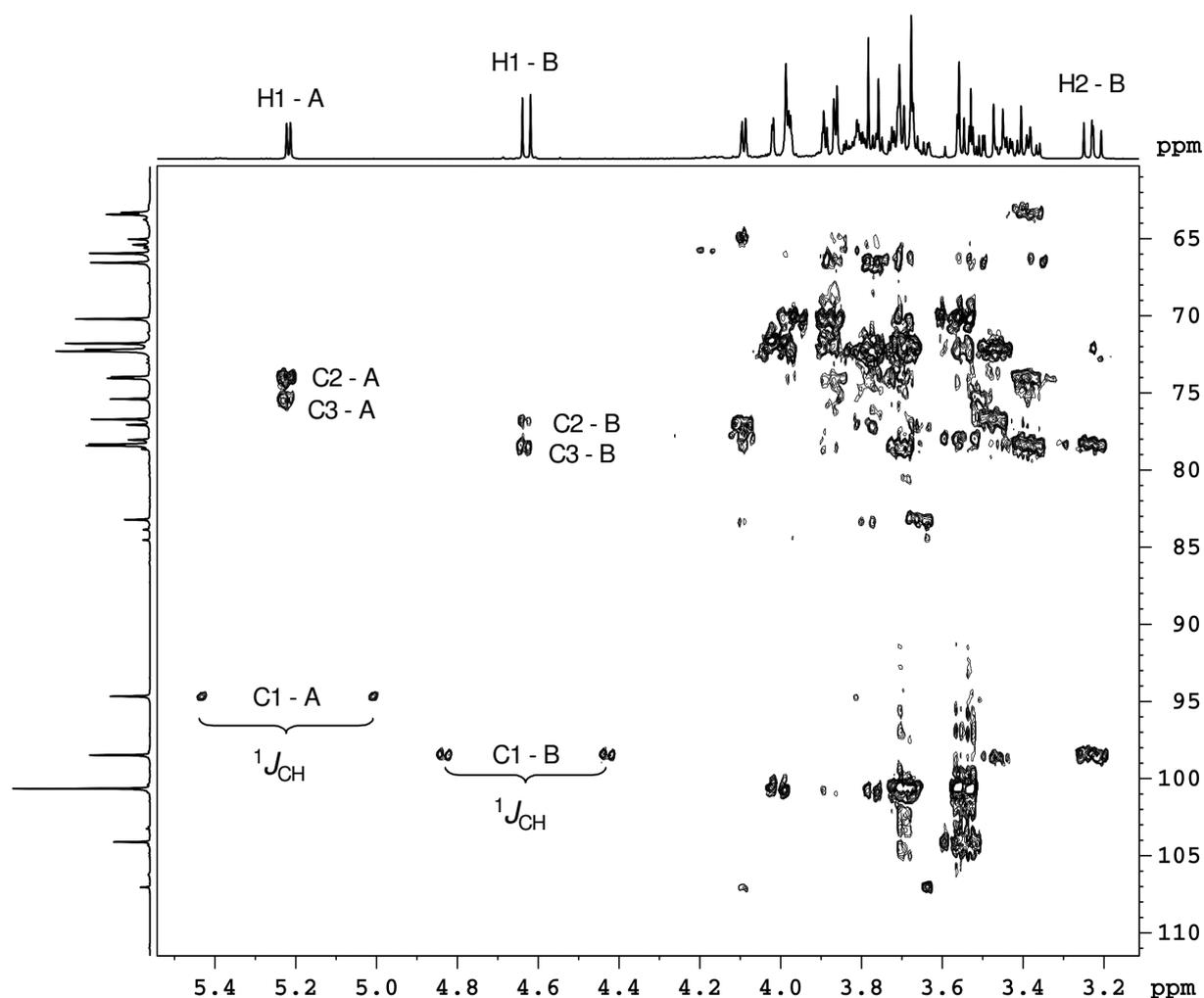


FIGURA 2.3-36. Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de gHMBC do mel Lar13, evidenciando os sinais dos carboidratos (D_2O)

No espectro de RMN de ^{13}C mostrado ampliadamente nas figuras 2.3-37 a 2.3-40 (páginas 97 a 99) estão apresentados os deslocamentos químicos de todos os carbonos dos carboidratos presentes neste mel. Para a glucose foram observadas as formas α e β piranosídicas (α -glucopirranose e β -glucopirranose, respectivamente), enquanto que para a frutose foram observadas as formas α e β furanosídicas e β piranosídica (α -frutofuranose, β -frutofuranose e β -frutopirranose, respectivamente).

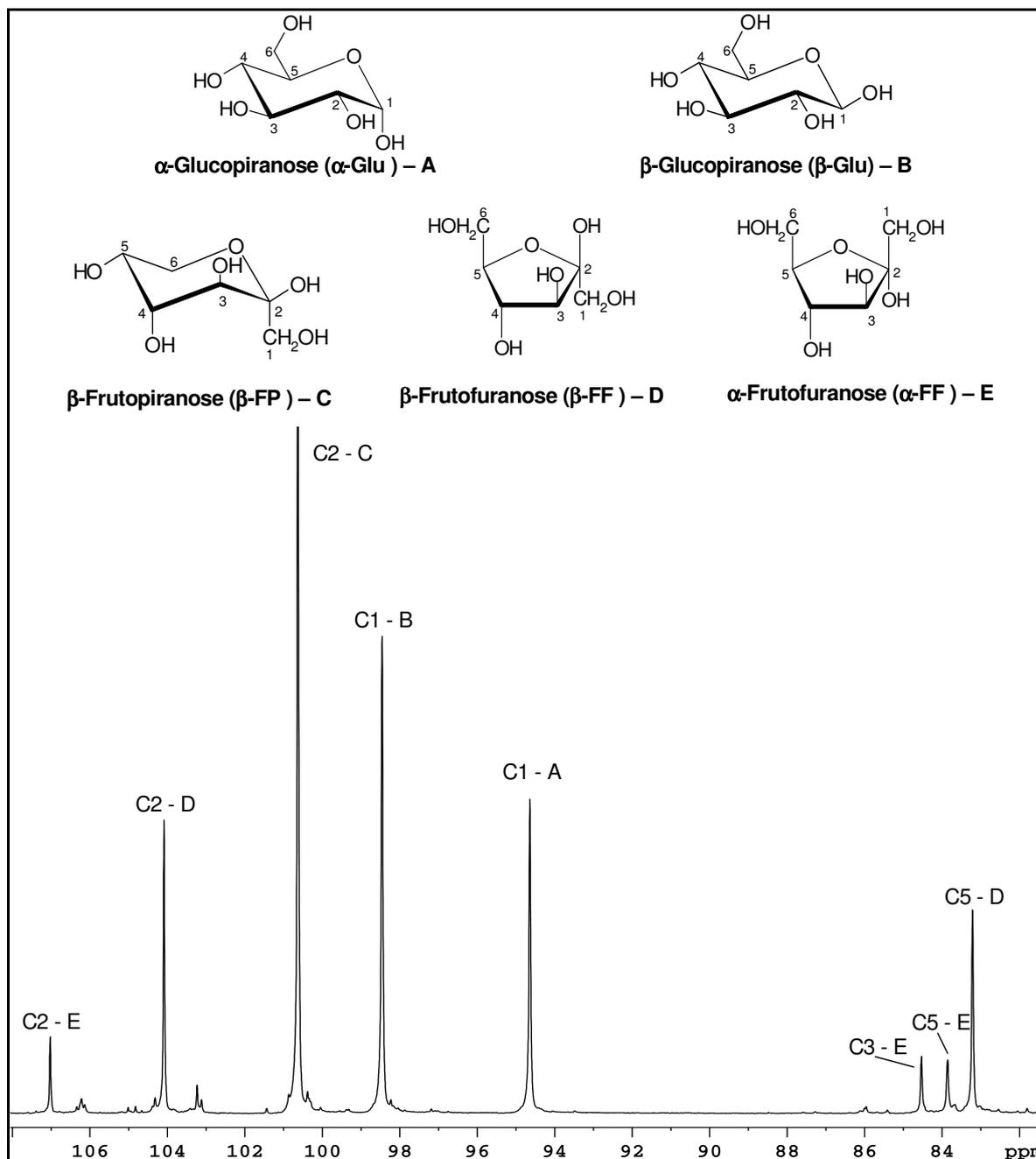
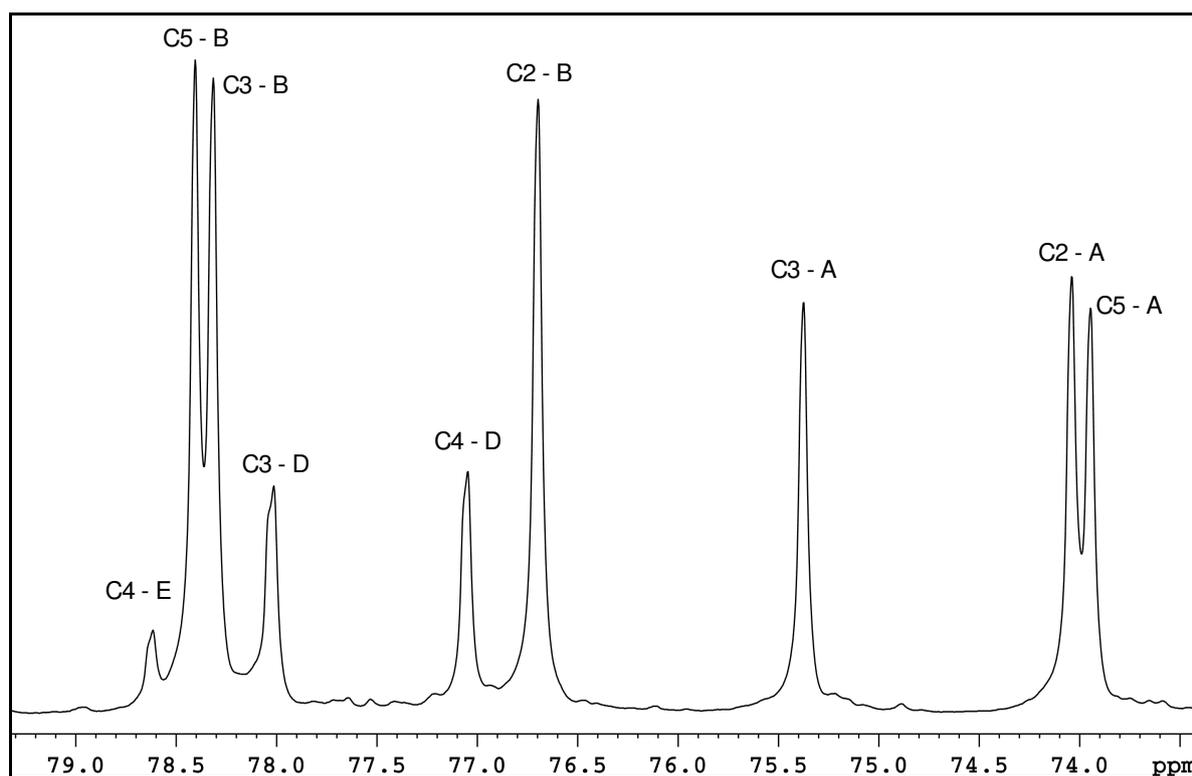
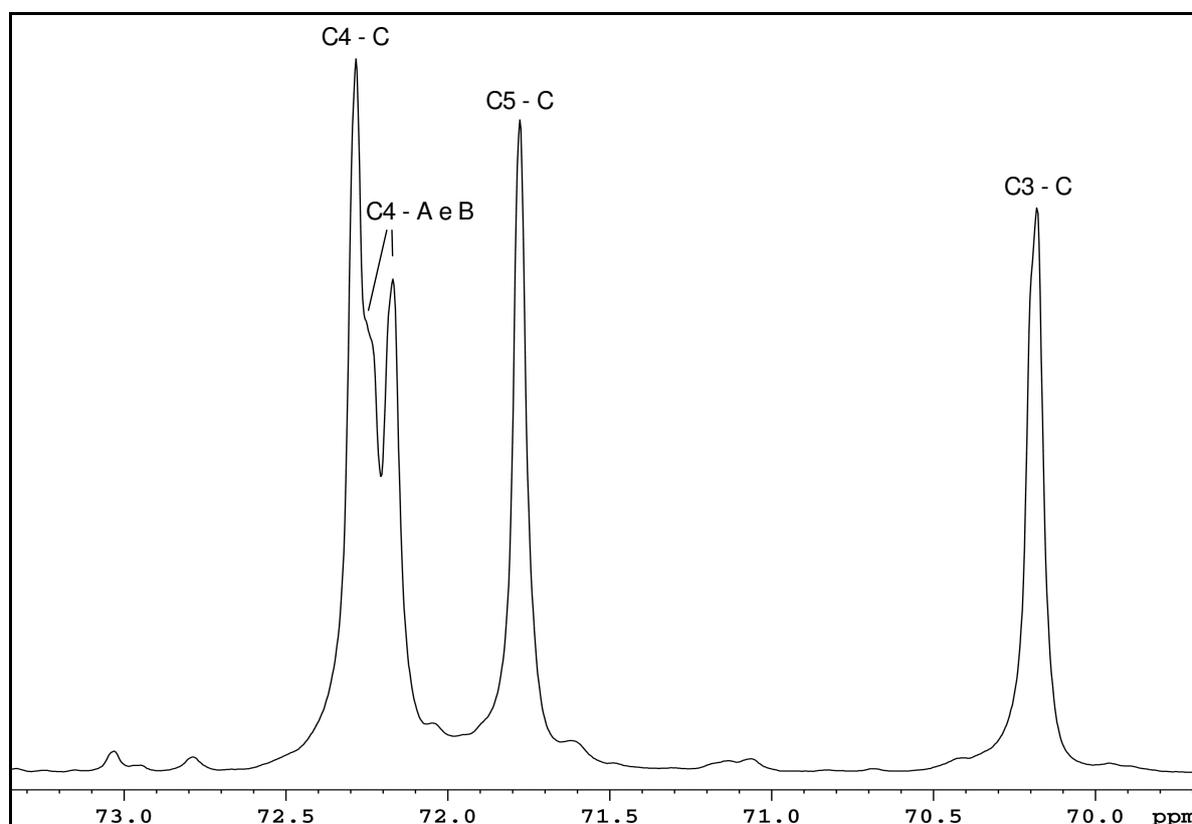


FIGURA 2.3-37. Ampliação de δ 82,0 a 108,0 do espectro de RMN de ^{13}C do mel Lar13 (D_2O)

FIGURA 2.3-38. Ampliação de δ 73,5 a 79,3 do espectro de RMN de ^{13}C do mel Lar13 (D_2O)FIGURA 2.3-39. Ampliação de δ 69,7 a 73,3 do espectro de RMN de ^{13}C do mel Lar13 (D_2O)

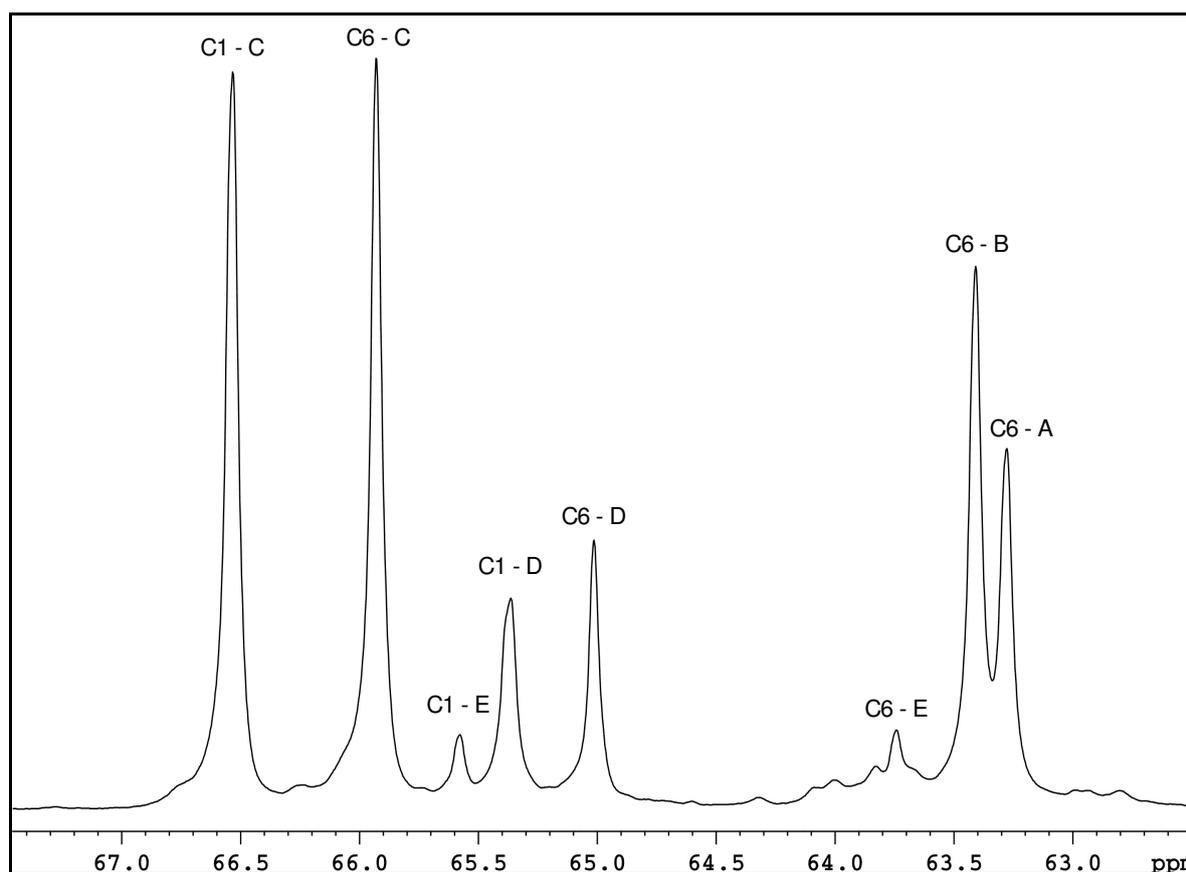


FIGURA 2.3-40. Ampliação de δ 62,5 a 68,0 do espectro de RMN de ^{13}C do mel Lar13 (D_2O)

No espectro de RMN de ^{13}C também foi possível observar um sinal em δ 216,0 (figura 2.3-41), com intensidade muito menor do que os outros sinais, sendo referente ao carbono da carbonila da forma ceto da frutose acíclica (GOUX, 1985).

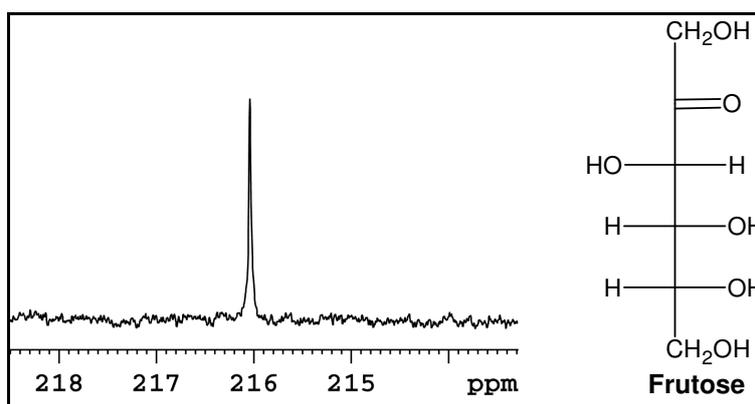


FIGURA 2.3-41. Espectro de RMN de ^{13}C do mel Lar13, evidenciando o sinal em δ 216,0 (D_2O)

Na figura 2.3-42 (página 101) estão apresentadas as estruturas dos carboidratos presentes no mel Lar13.

TABELA 2.3-16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C para os carboidratos do mel Lar13

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J em Hz)	TOCSY	gHSQC	gHMBC
α-Glucopiranoose (α-Glu) – A					
1	94,6	5,22 (d, 3,7)	H2, H3, H4, H5, H6a e H6b	C1	C1, C2 e C3
2	74,0	3,54 – 3,49 m	H1	C2	C3
3	75,4	3,73 – 3,66 m	H1	C3	C2, C4 e C5
4	72,1 ou 72,2	3,42 – 3,35 m	H1	C4	C2 e C5
5	73,9	3,84 – 3,78 m	H1	C5	C4
6a	63,3	3,73 – 3,67 m	H1	C6	C4 e C5
6b	63,3	3,85 – 3,79 m	H1, H2 e H4	C6	C4
β-Glucopiranoose (β-Glu) – B					
1	98,4	4,63 (d, 8,0)	H2, H3, H4, H5, H6a e H6b	C1	C1, C2 e C3
2	76,7	3,23 (dd, 8,0; 9,2)	H1, H3, H5, H6a e H6b	C2	C1, C3 e C5
3	78,3	3,50 – 3,40 m	H1, H2, H6a e H6b	C3	C1, C2 e C4
4	72,1 ou 72,2	3,46 – 3,35 m	H1, H6a e H6b	C4	C3 e C5
5	78,4	3,50 – 3,40 m	H1	C5	C1, C2 e C4
6a	63,4	3,77 – 3,72 m	H2, H3, H4 e H5	C6	C4
6b	63,4	3,90 – 3,85 m	H1, H2, H3, H4 e H5	C6	C3 e C5
β-Frutopiranoose (β-FP) – C					
1a	66,5	3,57 – 3,52 m	H1b	C1	C2, C3 e C4
1b	66,5	3,72 – 3,66 m	H1a	C1	C2, C3 e C4
2	100,6	---	---	---	---
3	70,2	3,79 – 3,74 m	H1a, H1b, H3 e H6b	C3	C1, C2 e C4
4	72,3	3,90 – 3,85 m	H1b, H3 e H6a	C4	C1, C3 e C5
5	71,8	3,99 – 3,97 m	---	C5	C3
6a	65,9	3,72 – 3,65 m	---	C6	C1, C3 e C4
6b	65,9	4,03 – 3,97 m	H1b, H3 e H4	C6	C2 e C5
β-Frutofuranose (β-FF) – D					
1	65,4	3,58 – 3,53 m	---	C1	C2
2	104,1	---	---	---	---
3	78,0	4,10 – 4,07 m	H6a e H6b	C3	C4, C5 e C6
4	77,0	4,10 – 4,07 m	H6a e H6b	C4	C5 e C6
5	83,2	3,85 – 3,77 m	H6a	C5	C2
6a	65,0	3,82 – 3,75 m	H6b	C6	C5
6b	65,0	3,68 – 3,62 m	---	C6	C4 e C5
α-Frutofuranose (α-FF) – E					
1	65,6	3,65 – 3,62 m	---	C1	C2
2	107,0	---	---	---	---
3	84,5	4,10 – 4,07 m	H6a e H6b	C3	C2
4	78,6	4,00 – 3,95 m	---	C4	C3
5	83,8	4,07 – 4,02 m	---	C5	C6
6a	63,7	3,68 – 3,64 m	---	C6	C3 e C5
6b	63,7	3,80 – 3,77 m	---	C6	C5

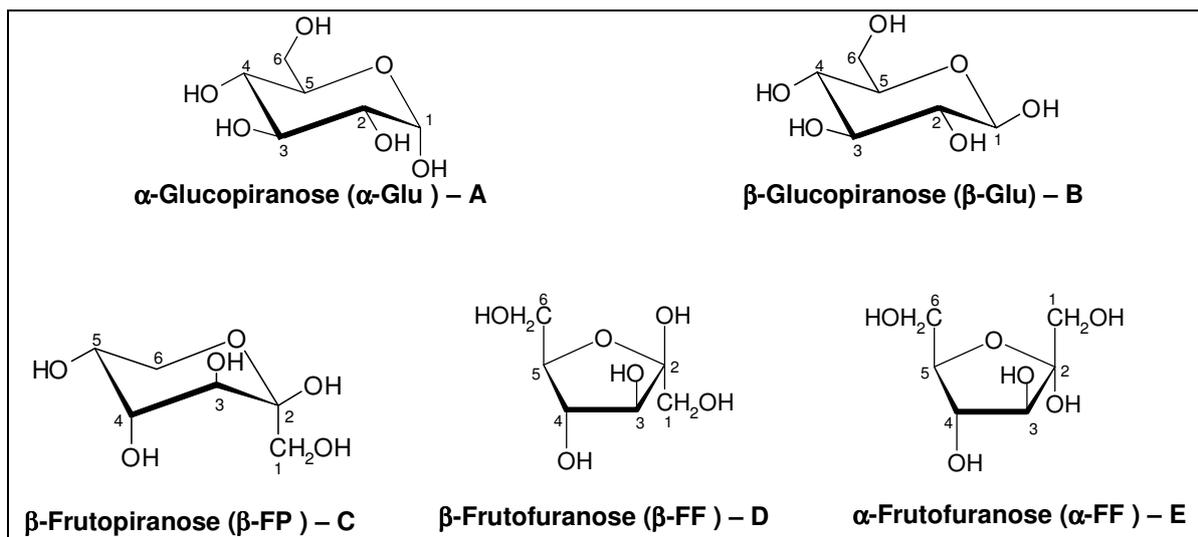


FIGURA 2.3-42. Estruturas dos carboidratos presentes no mel Lar13

2.3.3.2 – Atribuição dos sinais menos intensos no espectro de RMN de ^1H do mel Lar13

Na análise quimiométrica dos méis nacionais (item 2.3.2.4, página 76) foi observado que as amostras Lar13, Euc14, Jatai1, Silv30, Silv41, Silv43 e Silv47 formaram um grupo que discriminou-se das demais amostras. Analisando-se os seus espectros de RMN de ^1H verificou-se que apresentaram sinais iguais entre eles e diferentes das outras amostras (figuras 2.3-15 e 2.3-18, páginas 75 e 79). Por isto, foi proposto identificar os compostos presentes, pois estes foram os responsáveis pela discriminação destes méis na análise por PCA.

O mel Lar13 apresentou sinais de RMN de ^1H característicos dos carboidratos α - e β -glucopiranosose, α - e β -frutofuranose e β -frutopiranosose (**A** a **E**) (item 2.3.3.1, página 93), etanol (**G**), ácido cítrico (**H**), 5-hidróximetilfurfural – HMF (**I**) e ácido fórmico (**J**), confirmados pelos experimentos bidimensionais *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC (figuras 2.3-43 a 2.3-45).

O etanol (**G**) foi identificado pela presença de um *triplete* em δ 1,15 ($J = 7,1$ Hz) no espectro de RMN de ^1H , correspondente aos hidrogênios H2. Já o ácido cítrico (**H**) foi identificado observando-se dois *dubletos* em δ 2,79 (referentes aos hidrogênios H2b e H4b) e 2,94 (H2a e H4a), com $J = 15,5$ Hz.

Na ampliação da região de δ 1,00 a 3,70 do experimento de *g*COSY (figura 2.3-43, página 102) verificou-se uma correlação para o etanol, entre os

hidrogênios H2 e H1. Para o ácido cítrico também foi observado uma única correlação entre os hidrogênios H2a e H4a e os hidrogênios H2b e H4b.

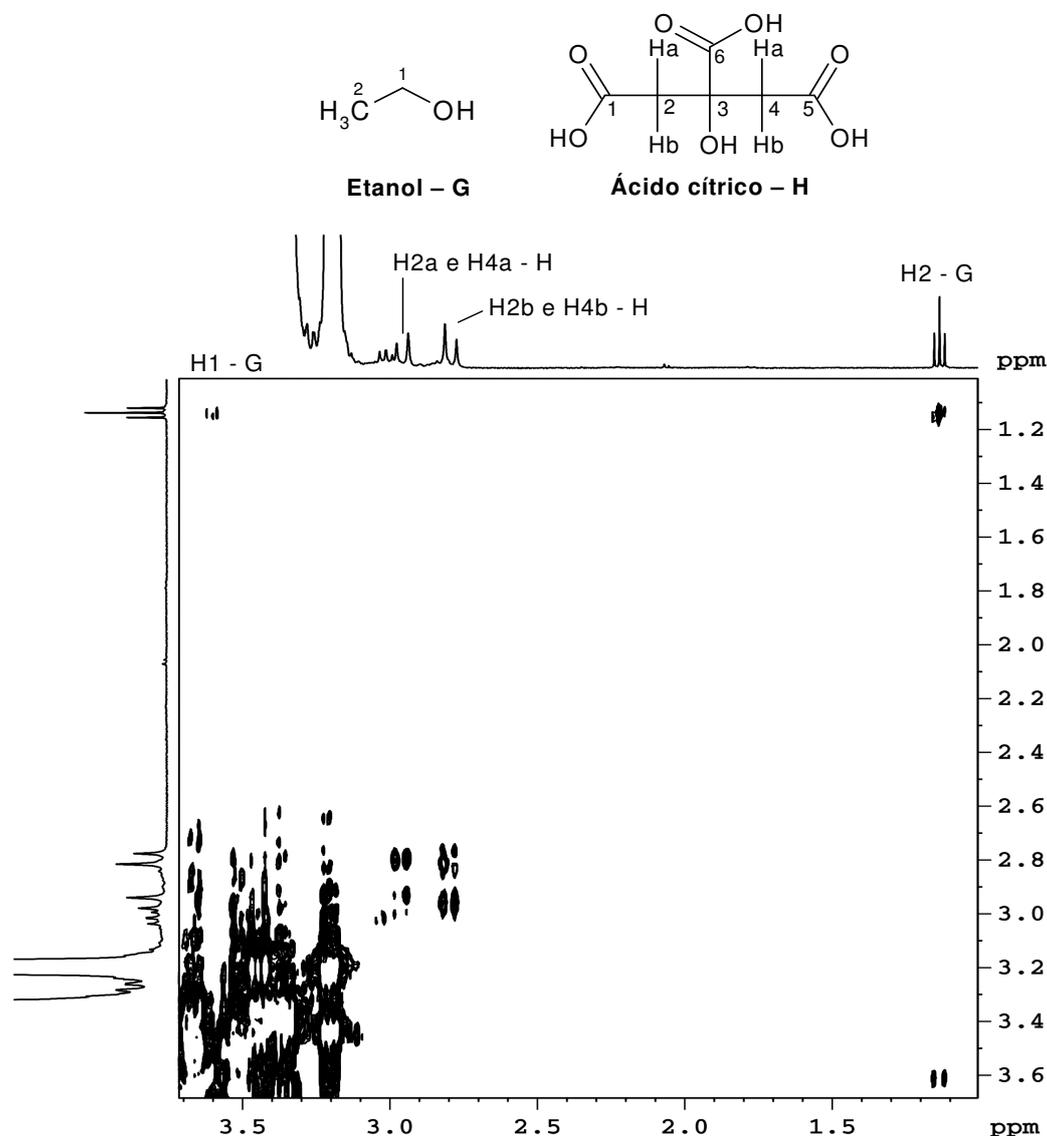


FIGURA 2.3-43. Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de $g\text{COSY}$ do mel Lar13, evidenciando os sinais do etanol (**G**) e do ácido cítrico (**H**) (D_2O)

Nos experimentos de $g\text{HSQC}$ (figura 2.3-44, página 103) e $g\text{HMBC}$ (figura 2.3-45, página 103) foi possível correlacionar os sinais dos hidrogênios com os carbonos das estruturas. O *triplete* em δ 1,15 (H2 – **G**) apresentou correlação $^1J_{\text{CH}}$ em δ 19,6 e $^2J_{\text{CH}}$ em δ 60,1, referente ao C1. Já para o ácido cítrico (**H**), o *dublete* em δ 2,79 mostrou correlação $^1J_{\text{CH}}$ em δ 46,1 e $^nJ_{\text{CH}}$ em δ 76,1; 176,5 e 180,2, referentes aos C3; C1 e C5; e C6, respectivamente. Já o *dublete* em δ 2,94 apresentou correlação $^1J_{\text{CH}}$ em δ 46,1 e $^nJ_{\text{CH}}$ em δ 76,1 e 176,5, referentes aos C3; C1 e C5, respectivamente. A elucidação completa do etanol e do ácido cítrico está mostrada na tabela 2.3-17 (página 107).

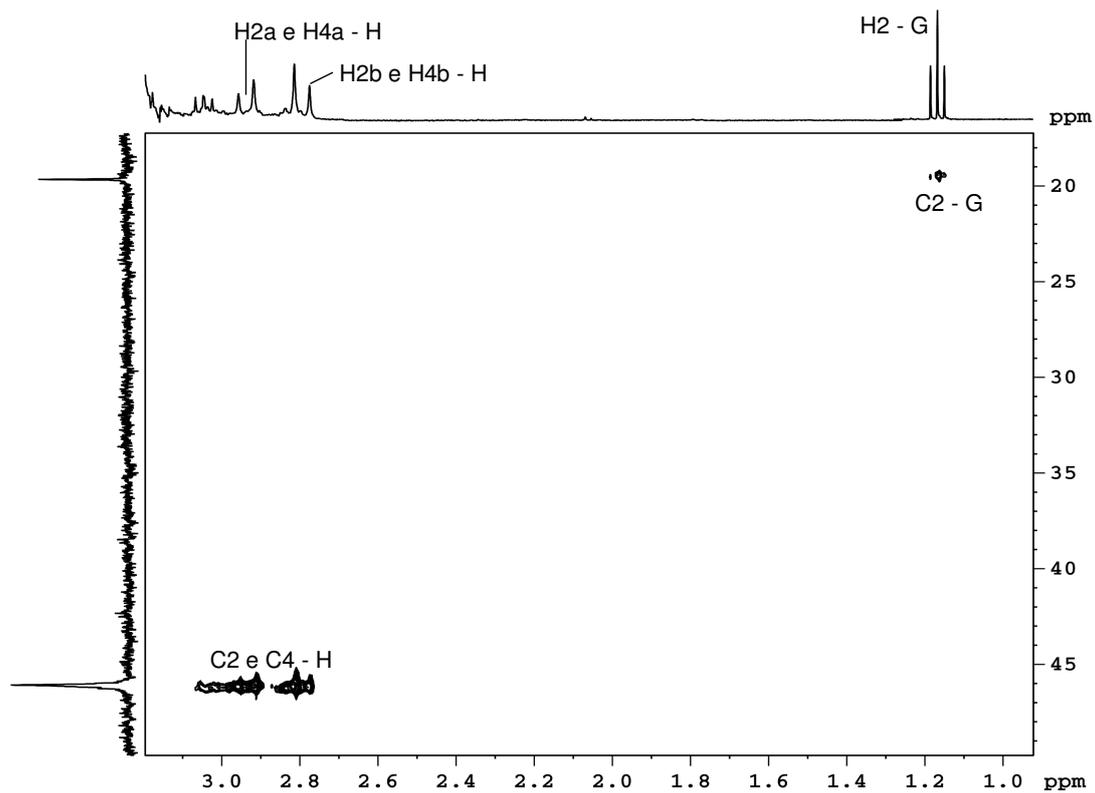


FIGURA 2.3-44. Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de gHSQC do mel Lar13, evidenciando os sinais do etanol (G) e do ácido cítrico (H) (D_2O)

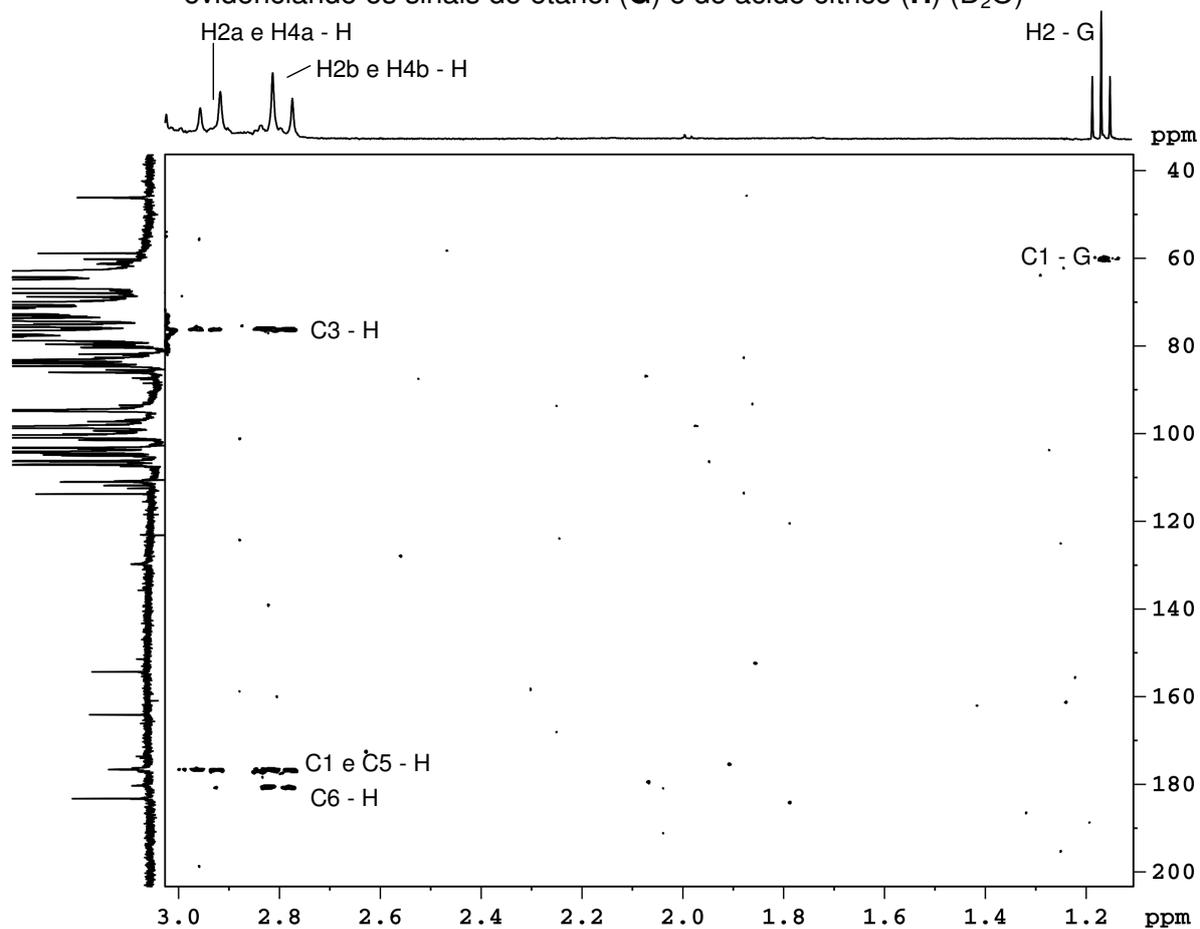


FIGURA 2.3-45. Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de gHMBC do mel Lar13, evidenciando os sinais do etanol (G) e do ácido cítrico (H) (D_2O)

O 5-hidróximetilfurfural (HMF - **I**) foi identificado pela presença de dois *dubletos* em δ 6,68 e 7,54 ($J = 3,7$ Hz) no espectro de RMN de ^1H , referentes aos H4 e H3 do anel furano, respectivamente, e de um *singleto* em δ 9,45, característico de um hidrogênio aldeídico, correspondente ao H7. Já o ácido fórmico (**J**) mostrou um *singleto* em δ 8,45.

Na ampliação da região de δ 4,00 a 9,70 do experimento de *g*COSY (figura 2.3-46) verificou-se uma correlação entre os hidrogênios H3 e H4 do HMF (**I**). O sinal do hidrogênio metilênico H6, em δ 4,69, somente foi localizado através de suas correlações nos experimentos de *g*HSQC (figura 2.3-47, página 105) e *g*HMBC (figuras 2.3-48, página 106), apresentando correlação $^1J_{\text{CH}}$ em δ 58,8 e $^nJ_{\text{CH}}$ em δ 113,7 e 164,1, referentes aos C4 e C5, respectivamente.

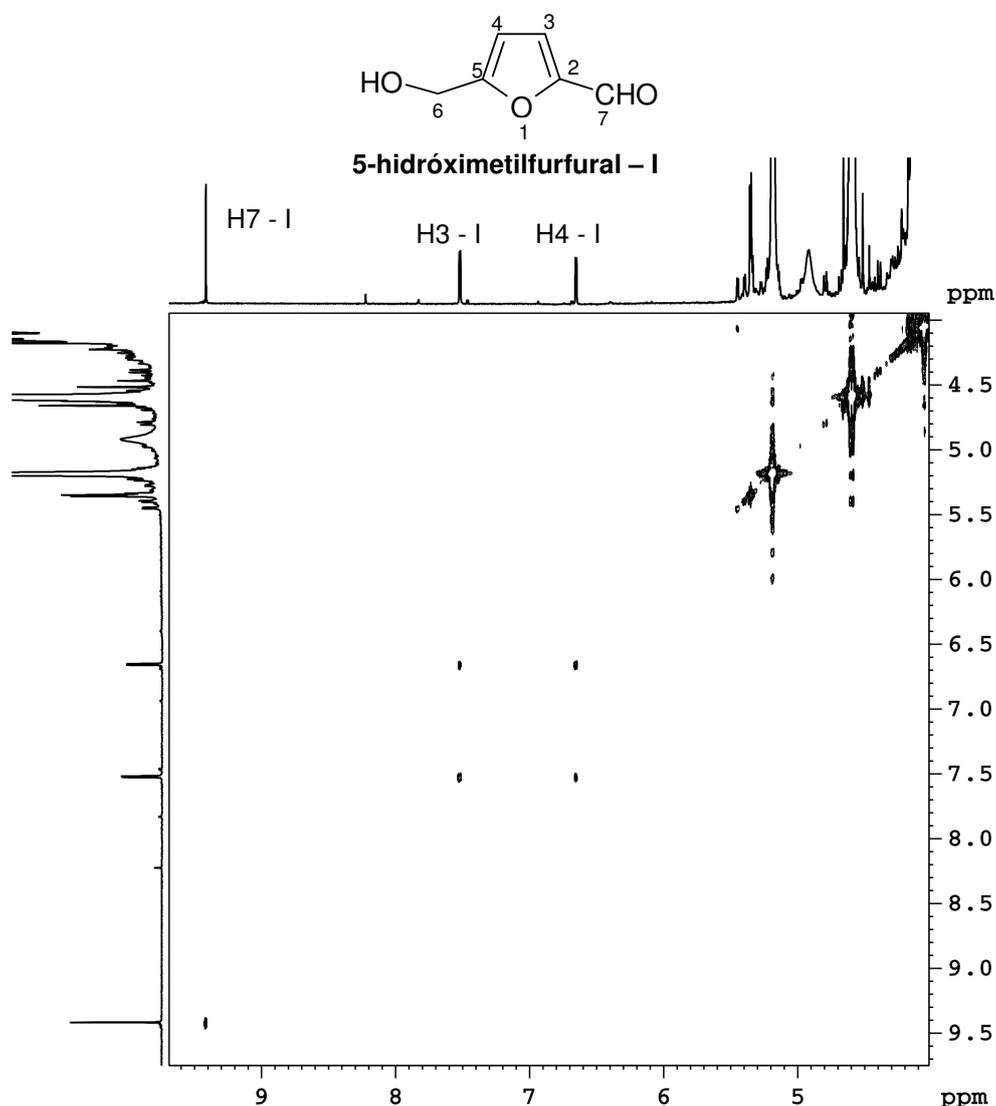


FIGURA 2.3-46. Correlação ^1H - ^1H observada no experimento de *g*COSY do mel Lar13, evidenciando os sinais do HMF (**I**) (D_2O)

Através dos experimentos de RMN bidimensionais (*g*HSQC e *g*HMBC) também foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos outros carbonos ligados aos hidrogênios do HMF (**I**). O hidrogênio H4 apresentou correlação $^1J_{CH}$ em δ 113,7 e $^nJ_{CH}$ em δ 154,3 e 164,1, referentes aos C2 e C5, respectivamente. O H3 mostrou correlação $^1J_{CH}$ em δ 129,7 e $^nJ_{CH}$ em δ 113,7, 154,3 e 164,1, referentes aos C4, C2 e C5, respectivamente. O H7 apresentou correlação $^1J_{CH}$ em δ 183,2 nos dois experimentos. A elucidação completa do HMF está mostrada na tabela 2.3-17 (página 107).

O hidrogênio 1 (H1) do ácido fórmico (**J**) apresentou correlação $^1J_{CH}$ em δ 173,5 (figura 2.3-47).

Na figura 2.3-49 (página 106) estão apresentadas as estruturas dos compostos que apresentaram sinais menos intensos no espectro de RMN de 1H do mel Lar13.

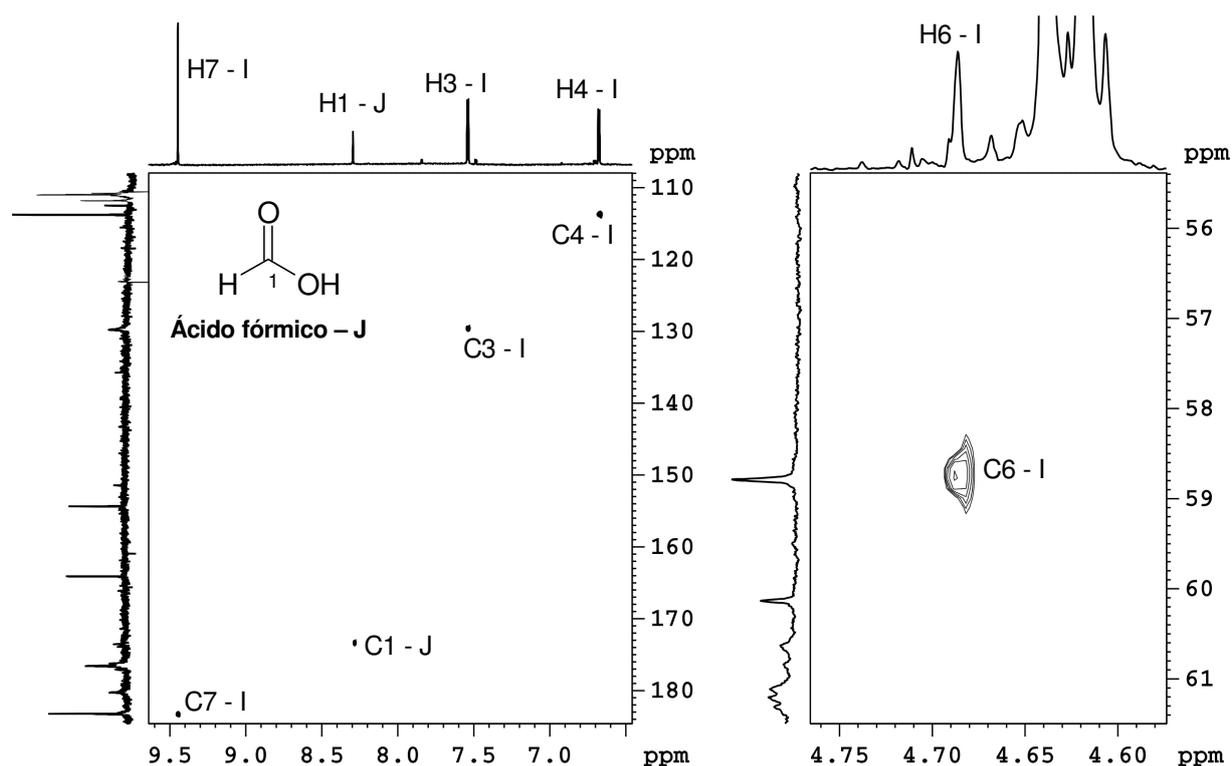


FIGURA 2.3-47. Correlações 1H - ^{13}C observadas no experimento de *g*HSQC do mel Lar13, evidenciando os sinais do HMF (**I**) e do ácido fórmico (**J**) (D_2O)

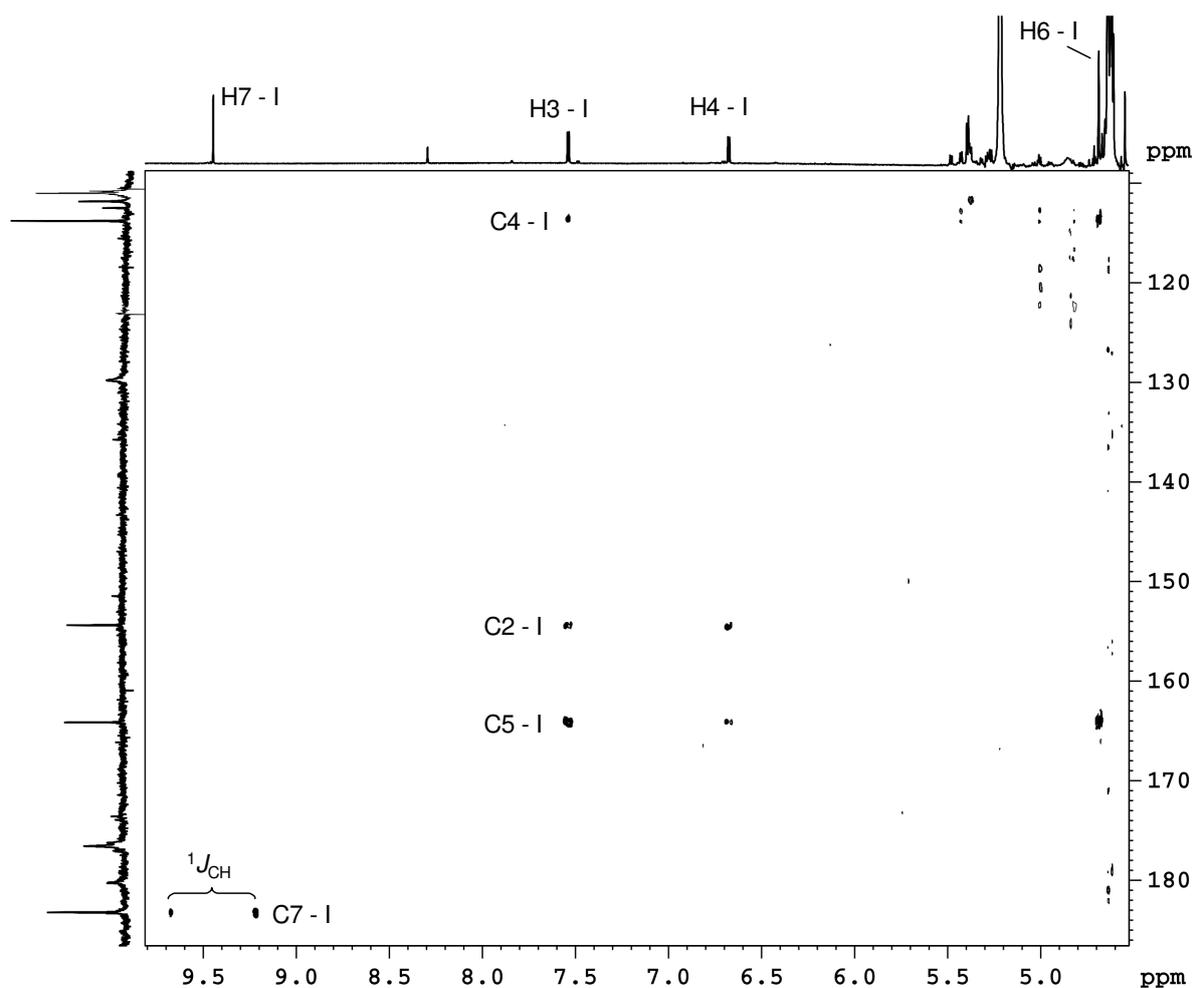


FIGURA 2.3-48. Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de gHMBC do mel Lar13, evidenciando os sinais do HMF (I) (D_2O)

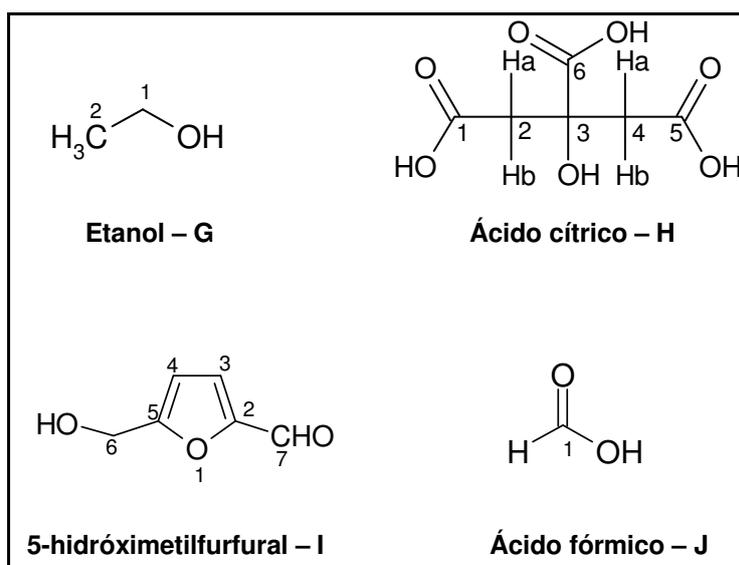


FIGURA 2.3-49. Estruturas dos compostos que apresentaram sinais menos intensos no espectro de RMN de ^1H do mel Lar13

TABELA 2.3-17. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C para o etanol (**G**), ácido cítrico (**H**), 5-hidróximetilfurfural (**I**) e ácido fórmico (**J**)

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J em Hz)	gCOSY	gHSQC	gHMBC
Etanol (G)					
1	60,1	3,56 – 3,66 <i>m</i>	H2	C1	C2
2	19,6	1,15 (t, 7,1)	H1	C2	C1
Ácido cítrico (H)					
1	176,5	---	---	---	---
2a	46,1	2,94 (d, 15,5)	H2b	C2	C1, C3, C5 e C6
2b	46,1	2,79 (d, 15,5)	H2a	C2	C1, C3 e C5
3	76,1	---	---	---	---
4a	46,1	2,94 (d, 15,5)	H4b	C4	C1, C3, C5 e C6
4b	46,1	2,79 (d, 15,5)	H4a	C4	C1, C3 e C5
5	176,5	---	---	---	---
6	180,2	---	---	---	---
5-hidróximetilfurfural (HMF – I)					
2	154,3	---	---	---	---
3	129,7	7,54 (d, 3,7)	H4	C3	C2, C4 e C5
4	113,7	6,68 (d, 3,7)	H3	C4	C2 e C5
5	164,1	---	---	---	---
6	58,8	4,69 (s)	---	C6	C4 e C5
7	183,2	9,45 (s)	---	C7	C7
Ácido fórmico (J)					
1	173,5	8,45 (s)	---	C1	---

2.3.3.3 – Elucidação de outros compostos presentes nos méis

Todos os méis apresentaram os sinais de RMN de ^1H característicos da α - e β -glucopiranosose, α - e β -frutofuranose e β -frutopiranosose (**A – E**) (item 2.3.3.1, página 93). Além disto, foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos de outros compostos presentes nos méis, entre eles a tirosina (**K**), a fenilalanina (**L**), o ácido láctico (**M**), a alanina (**N**) e o ácido acético (**O**),

que foram confirmados pelos experimentos bidimensionais *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC (figuras 2.3-50 a 2.3-55, páginas 108 a 112) realizados para o mel Jatai2.

A tirosina (**K**) foi identificada no espectro de RMN de ^1H pela presença de dois *dubletos* com base alargada em δ 6,88 (H3 e H5; $J = 8,4$ Hz) e 7,18 (H2 e H6; $J = 8,4$ Hz), referentes a um sistema de acoplamento AA'XX' de um anel benzênico para-substituído. Já a fenilalanina (**L**) apresentou dois *dubletos* em δ 7,31 (H2 e H6; $J = 7,2$ Hz) e 7,41 (H3 e H5; $J = 7,2$ Hz), e um *multipeto*, na região de δ 7,35 a 7,39, correspondente ao hidrogênio H4.

Na ampliação da região de δ 6,70 a 7,60 do experimento de *g*COSY (figura 2.3-50) verificou-se uma única correlação para a tirosina, entre os sinais em δ 6,88 e 7,18. Para a fenilalanina também foi verificado uma correlação entre os *dubletos* em δ 7,31 e 7,41.

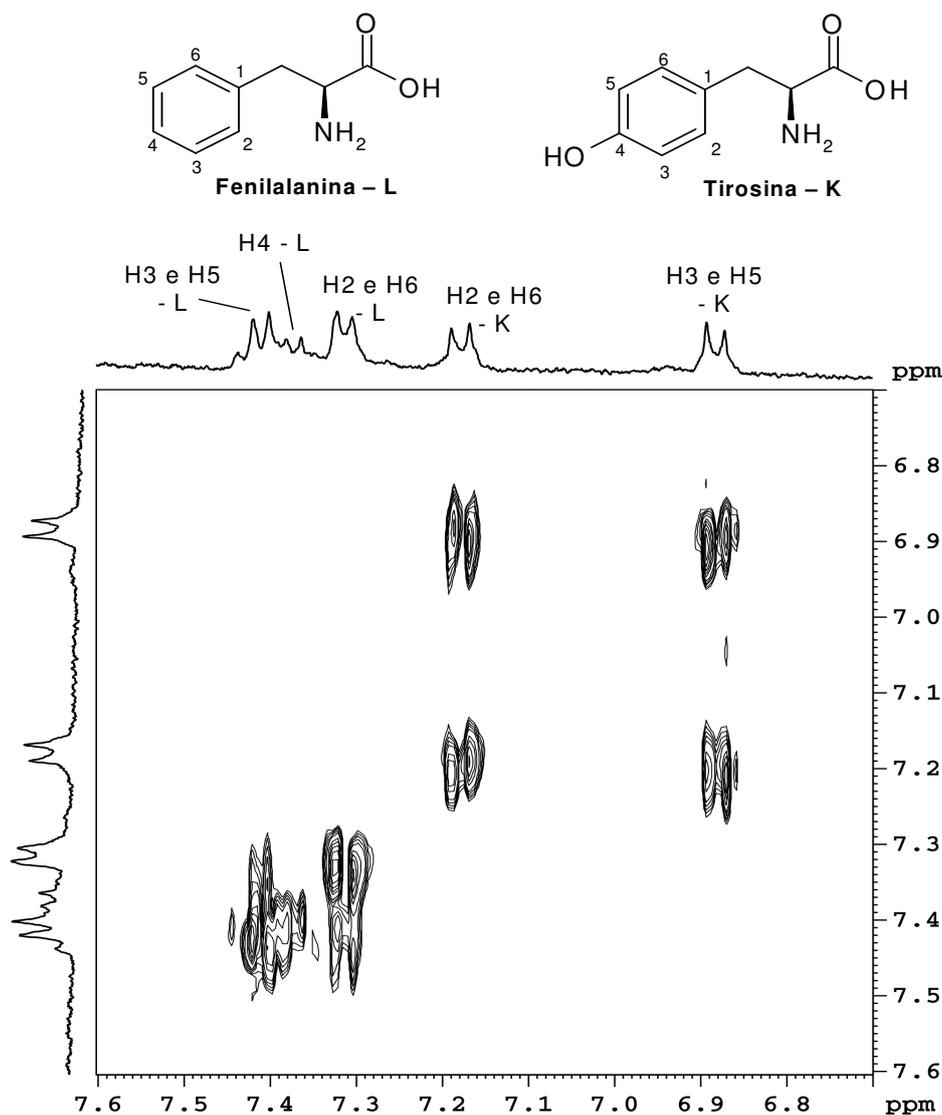


FIGURA 2.3-50. Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de *g*COSY do mel Jatai2, evidenciando os sinais da tirosina (**K**) e da fenilalanina (**L**) (D_2O)

Nos experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC (figuras 2.3-51 e 2.3-52) foi possível correlacionar os sinais dos hidrogênios com os carbonos das moléculas. O *dubleto* em δ 6,88 (H3 e H5) da tirosina (**K**) apresentou correlação $^1J_{CH}$ em δ 118,6 e $^nJ_{CH}$ em δ 129,4, referente ao C1. Já o *dubleto* em δ 7,18 (H2 e H6) apresentou correlação $^1J_{CH}$ em δ 133,5 e $^nJ_{CH}$ em δ 157,5 (C4).

Para a fenilalanina (**L**), o *dubleto* em δ 7,31 (H2 e H6) apresentou correlação $^1J_{CH}$ em δ 132,1 e $^nJ_{CH}$ em δ 130,4 e 131,8, referentes aos carbonos C4, C3 e C5, respectivamente. O *dubleto* em δ 7,41 (H3 e H5) apresentou correlação $^1J_{CH}$ em δ 131,8 e $^nJ_{CH}$ em δ 132,1, referentes aos C2 e C6. O *multiplete* na região de δ 7,35 a 7,39 (H4) apresentou correlação $^1J_{CH}$ em δ 130,4. Os demais carbonos e hidrogênios da tirosina e da fenilalanina não puderam ser observados nos experimentos realizados.

A elucidação completa da tirosina e da fenilalanina está mostrada na tabela 2.3-18 (página 113).

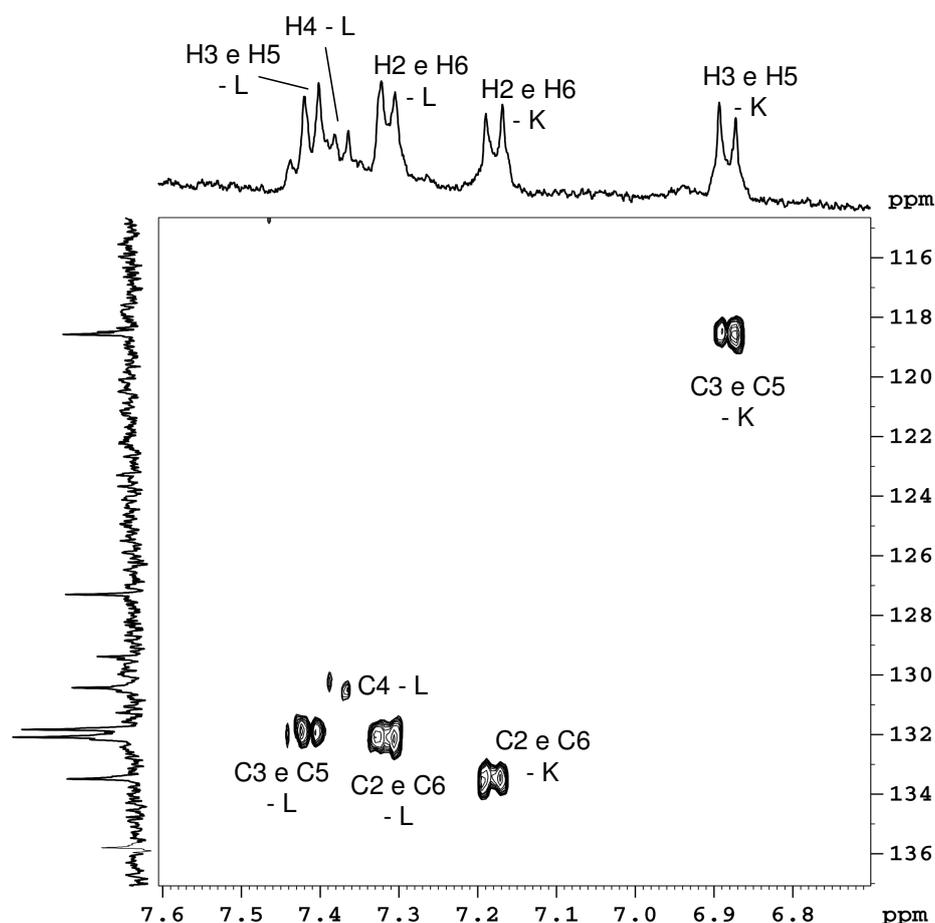


FIGURA 2.3-51. Correlações 1H - ^{13}C observadas no experimento de *g*HSQC do mel Jatai2, evidenciando os sinais da tirosina (**K**) e da fenilalanina (**L**) (D_2O)

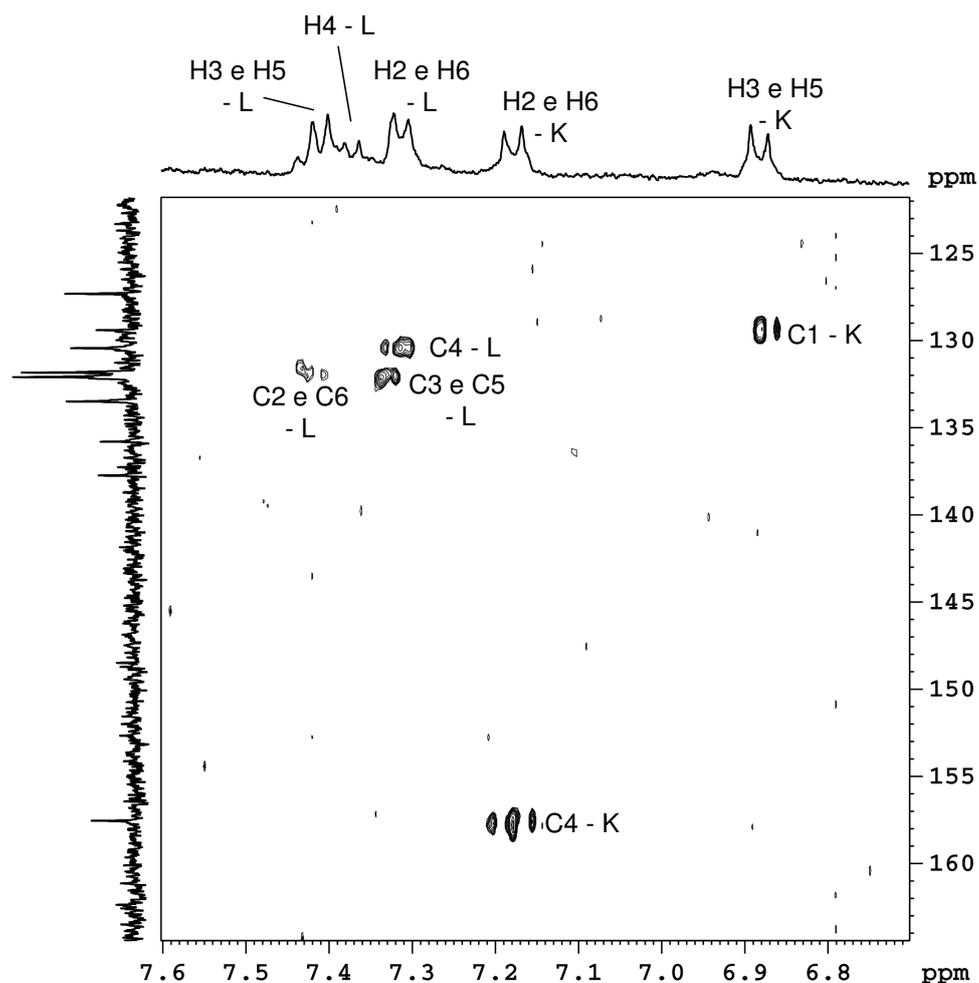


FIGURA 2.3-52. Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de $g\text{HMBC}$ do mel Jataí2, evidenciando os sinais da tirosina (**K**) e da fenilalanina (**L**) (D_2O)

O ácido láctico (**M**) foi identificado pela presença de um *dubleto* em δ 1,35 ($J = 6,9$ Hz) no espectro de RMN de ^1H , correspondente aos hidrogênios da metila H3. A alanina (**N**) foi identificada por mostrar um *dubleto* em δ 1,46 ($J = 7,3$ Hz), correspondente à metila H3. Já o ácido acético (**O**) mostrou um *singleto* em δ 2,05, correspondente aos hidrogênios da metila H2.

Na ampliação da região de δ 1,30 a 4,40 do experimento de $g\text{COSY}$ (figura 2.3-53, página 111), verificou-se uma correlação entre os hidrogênios H2 e H3 de **M** e outra entre os hidrogênios H2 e H3 de **N**.

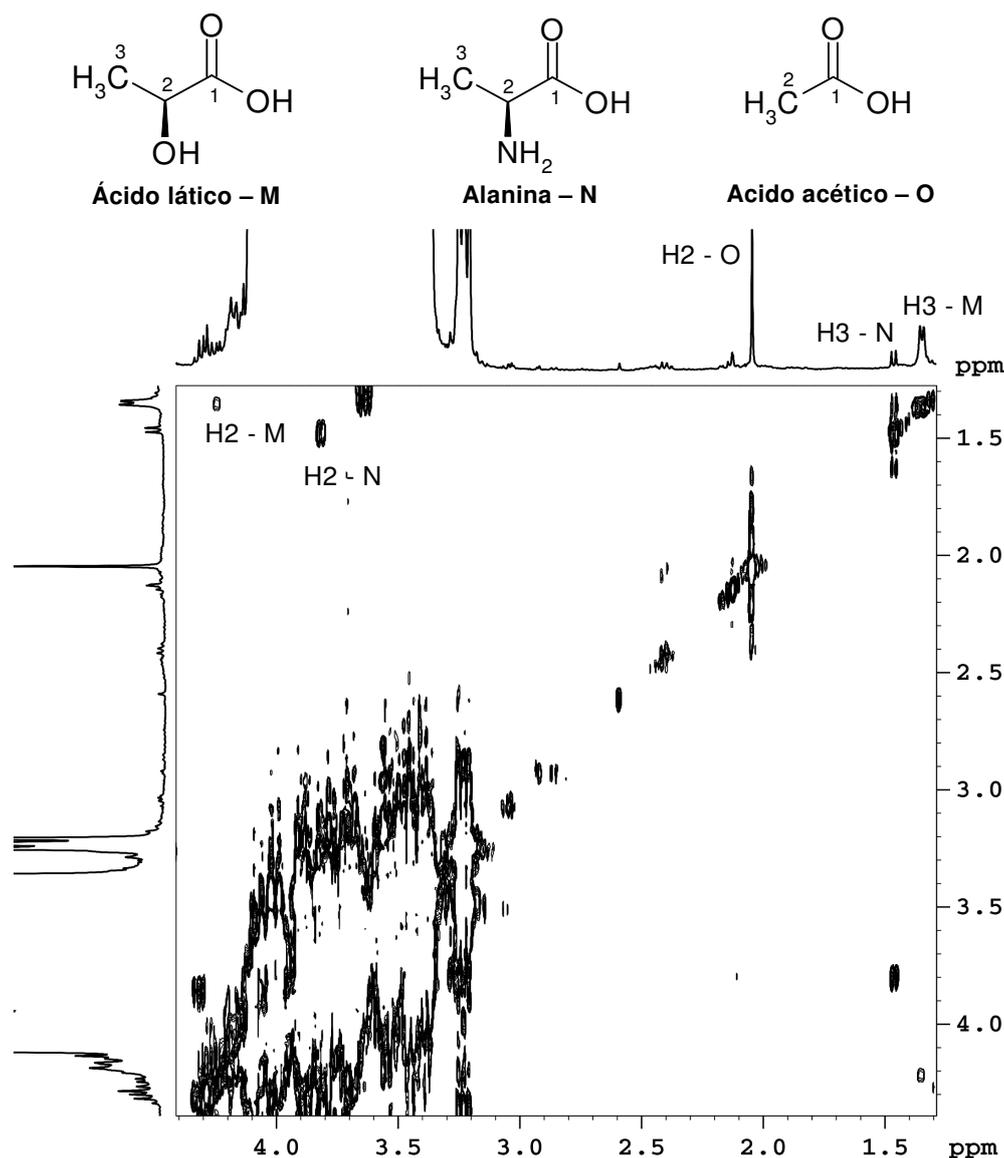


FIGURA 2.3-53. Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de $g\text{COSY}$ do mel Jatai2, evidenciando os sinais do ácido láctico (**M**), da alanina (**N**) e do ácido acético (**O**) (D_2O)

Nos experimentos de $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ (figuras 2.3-54 e 2.3-55, páginas 112 e 113) foi possível ver que a metila (H3) do ácido láctico (**M**) apresentou correlações $^1J_{\text{CH}}$ em δ 22,5 e $^nJ_{\text{CH}}$ com o carbono carbinólico em δ 70,6 (C2) e com a carbonila do grupo ácido em 183,7 (C1). Os hidrogênios da metila (H3) da alanina (**N**) apresentaram correlações $^1J_{\text{CH}}$ em δ 18,9 e $^nJ_{\text{CH}}$ em δ 53,1 e 178,3, correspondente aos carbonos C2 e C1, respectivamente. Já os hidrogênios da metila (H2) do ácido acético (**O**) apresentaram correlação $^1J_{\text{CH}}$ em δ 23,6 e $^2J_{\text{CH}}$ em δ 179,8, correspondente à carbonila do grupo ácido. A elucidação estrutural do ácido láctico, da alanina e do ácido acético está mostrada na tabela 2.3-18 (página 114).

Na figura 2.3-56 (página 113) estão apresentadas as estruturas dos compostos identificados no espectro de RMN de ^1H do mel Jatai2.

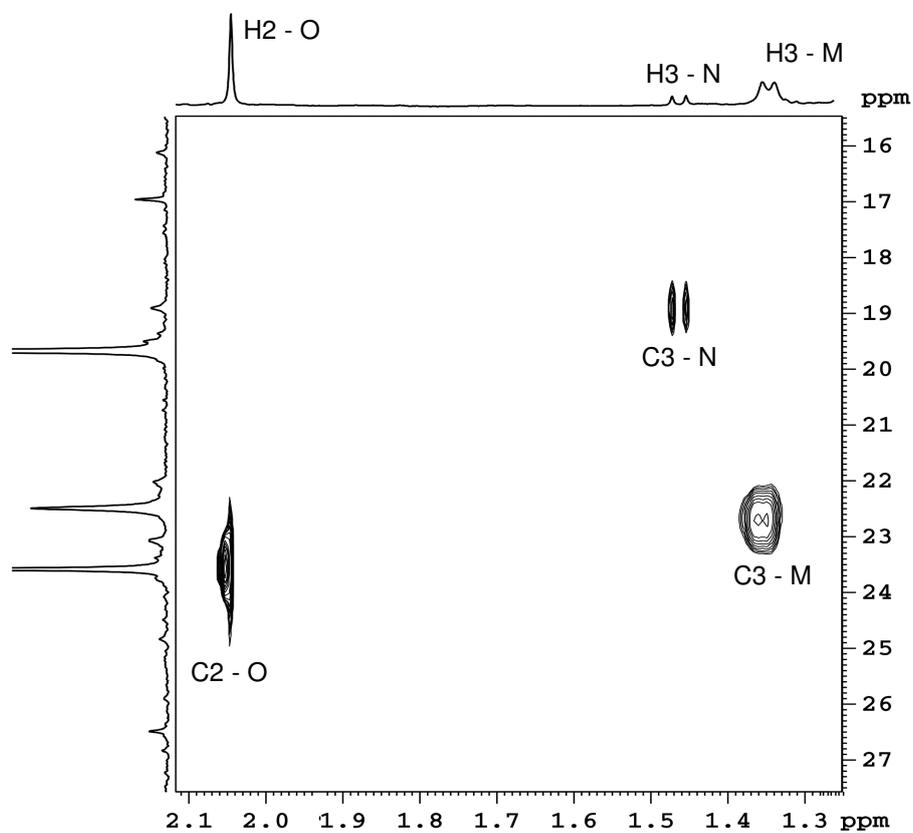


FIGURA 2.3-54. Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de gHSQC do mel Jatai2, evidenciando os sinais do ácido láctico (**M**), da alanina (**N**) e do ácido acético (**O**) (D_2O)

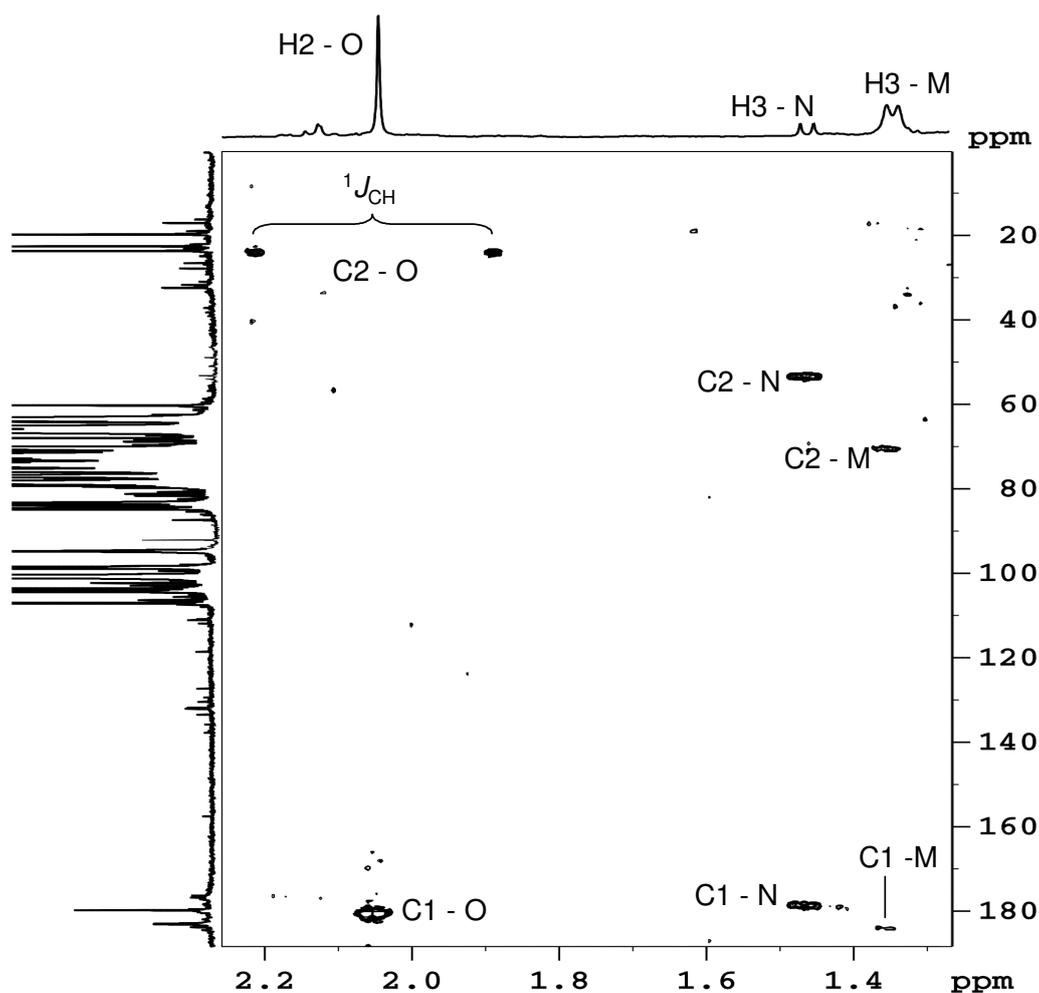


FIGURA 2.3-55. Correlações ^1H - ^{13}C observadas no experimento de gHMBC do mel Jatai2, evidenciando os sinais do ácido láctico (M), da alanina (N) e do ácido acético (O) (D_2O)

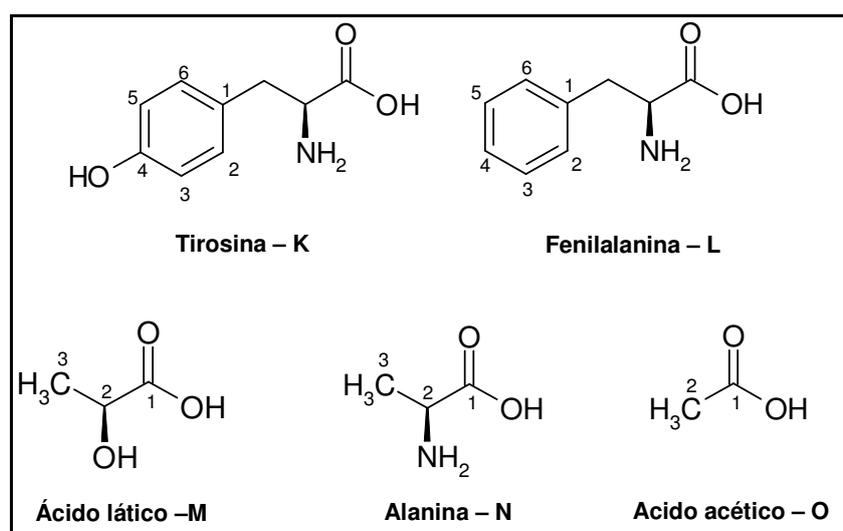


FIGURA 2.3-56. Estruturas dos compostos identificados no espectro de RMN de ^1H do mel Jatai2

TABELA 2.3-18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C para a tirosina (**K**), fenilalanina (**L**), ácido láctico (**M**), alanina (**N**) e ácido acético (**O**)

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multiplicidade, J em Hz)	$g\text{COSY}$	$g\text{HSQC}$	$g\text{HMBC}$
Tirosina (K)					
1	129,4	---	---	---	---
2	133,5	7,18 (<i>d</i> , 8,4)	H3 e H5	C2	C4
3	118,6	6,88 (<i>d</i> , 8,4)	H2 e H6	C3	C1
4	157,5	---	---	---	---
5	118,6	6,88 (<i>d</i> , 8,4)	H2 e H6	C5	C1
6	133,5	7,18 (<i>d</i> , 8,4)	H3 e H5	C6	C4
Fenilalanina (L)					
1	---	---	---	---	---
2	132,1	7,31 (<i>d</i> , 7,2)	H3 e H5	C2	C3, C4 e C5
3	131,8	7,41 (<i>d</i> , 7,2)	H2 e H6	C3	C2 e C6
4	130,4	7,35 – 7,39 <i>m</i>	---	C4	---
5	131,8	7,41 (<i>d</i> , 7,2)	H2 e H6	C5	C2 e C6
6	132,1	7,31 (<i>d</i> , 7,2)	H3 e H5	C6	C3, C4 e C5
Ácido láctico (M)					
1	183,7	---	---	---	---
2	70,6	4,30 – 4,40 <i>m</i>	H3	---	---
3	22,5	1,35 (<i>d</i> , 6,9)	H2	C3	C1 e C2
Alanina (N)					
1	178,3	---	---	---	---
2	53,1	3,75 – 3,85 <i>m</i>	H3	---	---
3	18,9	1,46 (<i>d</i> , 7,3)	H2	C3	C1 e C2
Ácido acético (O)					
1	179,8	---	---	---	---
2	23,6	2,05 (<i>s</i>)	---	C2	C1 e C2

2.4 – CONCLUSÕES

A técnica SNIF-NMR mostrou-se muito eficiente para a verificação da autenticidade dos méis comerciais, permitindo a identificação das amostras que passaram por algum processo de adulteração utilizando-se a sacarose oriunda da cana-de-açúcar, sendo que estas apresentaram uma relação isotópica para a metila do etanol maior do que das amostras autênticas.

A aplicação conjunta da espectroscopia de RMN de ^1H e dos métodos quimiométricos possibilitou discriminar os méis de eucalipto, de laranjeira e silvestres produzidos no estado de São Paulo, permitindo identificar os sinais das substâncias responsáveis pela discriminação.

A utilização dos modelos de classificação permitiu definir de forma mais segura a qual classe pertence cada amostra comercial analisada. Os modelos KNN, SIMCA e PLS-DA atribuíram corretamente a classe para praticamente todas as amostras teste (conjunto de validação externa), somente havendo um erro no terceiro modelo do PLS-DA. No entanto, o método PLS-DA apresentou a maior eficiência na previsão das classes dos méis comerciais com relação à informação obtida no rótulo dos produtos.

A análise por PCA também permitiu discriminar os méis que apresentaram algum tipo de adulteração, mostrando os compostos responsáveis pela separação e corroborando com os resultados apresentados pela técnica SNIF-NMR.

No estudo da influência da regionalidade sobre os méis, a principal discriminação observada está relacionada com aqueles que mostraram diferenças significativas, como os que apresentaram adulterações e os dos diferentes tipos, como jataí e melato. Os méis naturais das cinco regiões apresentaram-se bem próximos, pois não têm diferenças significativas nas suas composições.

A aplicação dos métodos quimiométricos mostrou que os espectros de RMN de ^1H forneceram uma melhor discriminação entre os tipos de méis do que os de ^{13}C , devido à sua maior sensibilidade, o que permitiu a visualização dos sinais referentes aos compostos minoritários dos méis e que foram os responsáveis pela discriminação.

Além disto, foi possível fazer a elucidação estrutural de alguns compostos presentes nos méis.

Capítulo 3

Aguardentes

3.1 – OBJETIVOS

Os objetivos principais da aplicação da RMN na análise das aguardentes foram:

3.1.1) Utilizar a técnica SNIF-NMR para verificar a autenticidade das amostras comerciais;

3.1.2) Discriminar os tipos de aguardentes comerciais aplicando-se os métodos quimiométricos de análise exploratória aos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C ;

3.1.3) Identificar alguns compostos, majoritários, presentes nas aguardentes.

3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Os espectros de RMN de ^1H e ^2H foram adquiridos em um equipamento Bruker DRX400 de 9,4 Tesla (400,21 MHz para a frequência do hidrogênio e 61,40 MHz para a do deutério), utilizando-se sondas de 5 mm com detecção direta (BBO) e com detecção inversa (BBI), equipada com gradiente de campo no eixo z, a temperatura de 298 K.

Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos em um equipamento Varian UNITYplus de 9,4 Tesla (399,96 MHz para a frequência do hidrogênio e 100,58 MHz para a do carbono), utilizando-se uma sonda de 10 mm com detecção direta, a temperatura de 298 K.

3.2.1 – As amostras

As amostras de aguardentes comerciais analisadas foram adquiridas majoritariamente no estado de São Paulo, no entanto, algumas foram obtidas em outros estados, como Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), Minas Gerais (MG), Pernambuco (PE), Ceará (CE) e Maranhão (MA).

A tabela 3.2-1 (página 121) mostra a descrição dos diferentes tipos de aguardentes analisados (uva, banana, mel, milho, abacaxi, pêsego, coco, mandioca e cana-de-açúcar) em todos os estudos relatados nesta tese.

As amostras padrão utilizadas no estudo da autenticidade empregando-se a técnica SNIF-NMR estão descritas na tabela 3.2-2 (página 121). As uvas padrão foram obtidas de um produtor do estado de Santa Catarina e os padrões das aguardentes de mel, de banana e de abacaxi foram produzidos no laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade de São Carlos, São Carlos, SP.

TABELA 3.2-1. Descrição e origem das aguardentes comerciais analisadas

Amostra	Tipo de aguardente	Estado
G1	Uva (grapa)	MG
G2	Uva (grapa)	RS
G3	Uva (grapa)	RS
PB1	Banana	SP
PB2	Banana	MG
PB3	Banana	PR
PB4	Banana	PR
PM1	Mel	SP
PM2	Mel	SP
PMi1	Milho	SP
PA1	Abacaxi	SP
PP1	Pêssego	SP
PCo1	Coco	SP
PT1	Mandioca (Tiquira)	MA
PC1	Cana-de-açúcar	SP
PC2	Cana-de-açúcar	CE
PC3	Cana-de-açúcar	SP
PC4	Cana-de-açúcar	SP
PC5	Cana-de-açúcar	CE
PC6	Cana-de-açúcar	SP
PC7	Cana-de-açúcar	SP
PC8	Cana-de-açúcar	SP
PC9	Cana-de-açúcar	PE
PC10	Cana-de-açúcar	PE
PC11	Cana-de-açúcar	SP
PC12	Cana-de-açúcar	SP
PC13	Cana-de-açúcar	SP
PC14	Cana-de-açúcar	SP
PC15	Cana-de-açúcar	SP

TABELA 3.2-2. Descrição dos padrões de aguardentes analisados

Amostra	Descrição
GP1	Uva (grapa)
GP2	Uva (grapa)
MP1	Mel de eucalipto
MP2	Mel silvestre
MP3	Mel de laranja
BP1	Banana Nanica
BP2	Banana Prata
BP3	Banana Ouro
AP1	Abacaxi Hawai 1
AP2	Abacaxi Hawai 2
AP3	Abacaxi Pérola

3.2.2 – Verificação da autenticidade das aguardentes comerciais empregando-se a técnica SNIF-NMR

Para a verificação da autenticidade, as aguardentes comerciais (descritas na tabela 3.2-1, página 121) passaram por uma destilação fracionada com o intuito de garantir uma maior concentração de etanol nas amostras, fazendo com que a aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^2H pudesse ser feita de forma rápida, além de garantir-lhes uma boa relação sinal/ruído e, conseqüentemente, tornar as integrais dos sinais mais precisas. Nesta etapa também foram analisadas as aguardentes padrão descritas na tabela 3.2-2 (página 121).

As amostras, em triplicata, foram preparadas adicionando-se 100 μL de tetrametiluréia (TMU) 99% aos 600 μL do etanol destilado, obtendo-se uma relação de intensidade entre os sinais da metila do etanol versus o da metila do TMU de aproximadamente 1:1 no espectro de RMN de ^1H .

3.2.2.1 – Aquisição dos espectros de RMN de ^2H e ^1H

Os parâmetros utilizados na aquisição e no processamento dos espectros de RMN de ^1H e ^2H foram os mesmos utilizados no estudo da autenticidade dos méis, e que estão descritos no item 2.2.2.2 (página 34).

3.2.2.2 – Cálculo da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$

O cálculo da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ foi feito utilizando-se a equação 1, apresentada na introdução (página 13).

3.2.3 – Análise quimiométrica dos dados de RMN das aguardentes

3.2.3.1 – As amostras

Discriminação das aguardentes comerciais por RMN de ^1H – Neste estudo foram analisadas todas as aguardentes descritas na tabela 3.2-1 (página 121).

Discriminação das aguardentes comerciais por RMN de ^{13}C – As aguardentes analisadas estão descritas na tabela 3.2-1 (página 121), porém, neste estudo somente nove aguardentes de cana-de-açúcar foram analisadas.

3.2.3.2 – Medidas espectroscópicas

Para a aquisição dos espectros de RMN de ^1H as amostras foram preparadas em triplicata, utilizando 600 μL de aguardente, e adicionando-se três gotas de água deuterada (D_2O) e uma gota da solução do sal TMSP em D_2O (0,16%), para ser utilizado como referência interna.

Para a aquisição dos espectros de RMN de ^{13}C foram utilizados 2 mL de aguardente e cinco gotas da solução de TMSP em D_2O (1,6%).

A seqüência de pulsos utilizada na aquisição dos espectros de RMN de ^1H foi a *zgpsdc* (nomenclatura Bruker). Esta seqüência de pulsos permite fazer a supressão de três sinais, sendo que para este estudo foram escolhidos os sinais dos hidrogênios da água, da metila e da metilena do etanol. O processamento dos espectros foi feito com a aplicação de uma transformada de *Fourier* utilizando-se 32768 pontos e uma multiplicação exponencial com fator de alargamento de linha (LB) de 0,3 Hz.

Os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos utilizando-se a seqüência de pulsos *s2pul* (nomenclatura Varian), com a qual se faz a aquisição dos núcleos de carbono-13 com desacoplamento dos de hidrogênio e sem o efeito nuclear Overhauser. Em seguida, foram processados aplicando-se um LB de 3,0 Hz e uma transformada de *Fourier* utilizando-se 32768 pontos.

Os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados na tabela 3.2-3 juntamente com os comandos utilizados nos equipamentos Bruker e Varian, respectivamente.

TABELA 3.2-3. Parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C

(Bruker/ Varian)	RMN de ^1H	RMN de ^{13}C
Tempo de aquisição (AQ/ AT)	4,1 s	0,7 s
Tempo de espera antes de cada aquisição (D1)	6,4 s	1,0 s
Número de aquisições (NS/ NT)	8	22528
Largura de pulso de 90° (P1/ PW)	8,5 μs	6,5 μs
Ganho do receptor (RG/ gain)	32	60
Janela espectral (SW)	8013 Hz	22831 Hz
Número de pontos digitalizados (TD/ NP)	65536	32768

Em todos os espectros, a fase e a linha de base foram ajustadas o mais uniformemente possível. Os espectros resultantes foram salvos como arquivos do tipo ASCII para fazer-se, em seguida, a análise quimiométrica dos dados.

3.2.3.3 – Tratamento quimiométrico

As matrizes de dados foram construídas utilizando o programa Origin versão 5.0, e o tratamento quimiométrico foi realizado utilizando-se o programa Pirouette versão 3.11 (InfoMetrix, Woodinville, Washington, USA).

Os parâmetros e a seleção de variáveis foram otimizados a partir da análise exploratória de dados por PCA, e, em seguida, foram utilizados no HCA. As transformações foram a divisão pela norma um (a área sob o espectro é considerada igual a um) e primeira derivada em um intervalo de vinte e cinco pontos, enquanto que o pré-processamento foi o autoescalamamento. A distância métrica utilizada foi a Euclidiana e a conexão incremental.

Discriminação das aguardentes comerciais por RMN de ^1H – A matriz de dados foi composta por 3815 variáveis (dispostas nas colunas) e 78 espectros (dispostos nas linhas – 26 amostras analisadas em triplicata, que estão indicados como a, b e c nos gráficos de *scores* e nos dendrogramas).

Discriminação das aguardentes comerciais por RMN de ^{13}C – A matriz de dados foi composta por 26 espectros (dispostos nas linhas – 26 amostras) e 4670 variáveis (dispostas nas colunas).

3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 – Verificação da autenticidade das aguardentes comerciais empregando-se a técnica SNIF-NMR

Os espectros de RMN de ^1H e ^2H do etanol obtido pela destilação das aguardentes são iguais aos mostrados na figura 2.3-1 (página 42), para o etanol produzido pela fermentação de um mel silvestre.

Os valores da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ calculados para as aguardentes analisadas estão mostrados na tabela 3.3-1 (página 126).

Com a análise da relação isotópica observa-se que os valores da metileno do etanol $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{II}}$ mantiveram-se entre 126,0 e 129,7 ppm, não apresentando muita variação. No entanto, uma diferenciação entre os valores de $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{I}}$ para algumas das amostras analisadas pode ser verificada, já que a metila do etanol é o sítio que está ligado com a origem biossintética da planta que gerou o açúcar, fermentado para produzir a aguardente (MARTIN *et al.*, 1986).

Para as aguardentes de uva (grapas) padrão e duas amostras comerciais os valores de $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{I}}$ ficaram entre 101,3 e 102,8 ppm, concordando com os valores obtidos por MARTIN *et al.* (1986). Estes valores são característicos de plantas que realizam a fixação do CO_2 através do mecanismo C_3 .

Para os padrões de aguardente de banana os valores de $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{I}}$ ficaram entre 101,9 a 102,3 ppm, próximos aos encontrados para as de uva, pois também são plantas que fixam o CO_2 através do mecanismo C_3 .

Os padrões de aguardente de mel e as aguardentes comerciais mostraram valores próximos aos dos padrões de uva e banana, estando entre os valores de 99,7 e 103,6 ppm, sugerindo que o néctar utilizado pelas abelhas para fazer o mel foi coletado de plantas C_3 . Estes valores também mostraram-se semelhantes aos obtidos por LINDNER *et al.* (1996) e BOFFO *et al.* (2007) para amostras de mel.

A tiquira é a aguardente de mandioca, que também é uma planta C_3 (ANGELOV *et al.*, 1993), e apresentou um valor de $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{I}}$ igual a 99,7 ppm, que é característico deste tipo de planta, confirmando assim, a sua autenticidade.

TABELA 3.3-1. Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ calculada para a metila $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{I}}$ e a metileno $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{II}}$ do etanol presente nas aguardentes

	Relação Isotópica (ppm)*		Ciclo biossintético
	$(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{I}}$	$(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{II}}$	
GP1	101,3 (\pm 1,2)	127,5 (\pm 0,6)	C ₃
GP2	102,8 (\pm 0,5)	128, 2 (\pm 1,6)	C ₃
G1	106,6 (\pm 0,2)	128,4 (\pm 0,2)	C ₃
G2	101,3 (\pm 0,2)	128,0 (\pm 0,1)	C ₃
G3	102,6 (\pm 0,1)	127,7 (\pm 0,4)	C ₃
MP1	99,7 (\pm 0,8)	128,8 (\pm 0,7)	--
MP2	100,4 (\pm 0,7)	129,1 (\pm 0,7)	--
MP3	101,3 (\pm 0,9)	128,0 (\pm 0,5)	--
PM1	103,6 (\pm 0,2)	126,9 (\pm 1,1)	--
PM2	102,1 (\pm 0,2)	126,9 (\pm 0,2)	--
BP1	101,9 (\pm 0,3)	127,7 (\pm 0,3)	C ₃
BP2	102,2 (\pm 0,2)	127,4 (\pm 0,4)	C ₃
BP3	102,3 (\pm 0,2)	127,2 (\pm 0,3)	C ₃
PB1	112,8 (\pm 0,2)	126,6 (\pm 0,3)	C ₃
PB2	113,9 (\pm 0,1)	128,3 (\pm 0,0)	C ₃
PB3	113,2 (\pm 0,2)	128,1 (\pm 0,2)	C ₃
PB4	111,4 (\pm 0,2)	127,5 (\pm 0,3)	C ₃
PT1	99,7 (\pm 0,3)	128,3 (\pm 0,4)	C ₃
PP1	113,0 (\pm 0,3)	126,9 (\pm 0,1)	C ₃
PCo1	112,2 (\pm 0,1)	127,2 (\pm 0,3)	C ₃
AP1	107,8 (\pm 0,6)	129,0 (\pm 0,3)	CAM
AP2	107,9 (\pm 0,4)	128,0 (\pm 0,3)	CAM
AP3	107,1 (\pm 0,2)	128,6 (\pm 0,3)	CAM
PA1	113,3 (\pm 0,2)	128,5 (\pm 0,4)	CAM
PC1	111,7 (\pm 0,2)	127,8 (\pm 0,2)	C ₄
PC2	111,7 (\pm 0,6)	129,7 (\pm 0,1)	C ₄
PC3	112,3 (\pm 0,4)	126,0 (\pm 0,5)	C ₄
PC4	112,3 (\pm 0,2)	127,5 (\pm 0,2)	C ₄
PC5	112,5 (\pm 0,3)	125,4 (\pm 0,4)	C ₄
PC6	112,6 (\pm 0,2)	128,1 (\pm 0,2)	C ₄
PC7	112,7 (\pm 0,2)	128,2 (\pm 0,2)	C ₄
PC8	112,8 (\pm 0,1)	127,7 (\pm 0,2)	C ₄
PC9	112,8 (\pm 0,4)	125,5 (\pm 0,4)	C ₄
PC10	112,8 (\pm 0,6)	128,5 (\pm 0,9)	C ₄
PC11	113,4 (\pm 1,1)	127,1 (\pm 1,3)	C ₄
PC12	113,4 (\pm 0,4)	127,2 (\pm 1,0)	C ₄
PC13	113,4 (\pm 0,3)	128,4 (\pm 0,4)	C ₄
PC14	113,3 (\pm 0,8)	126,0 (\pm 0,7)	C ₄
PC15	113,6 (\pm 0,7)	127,7 (\pm 1,1)	C ₄
PMi1	113,9 (\pm 0,3)	127,4 (\pm 0,3)	C ₄

* Valores médios das triplicatas

Para as aguardentes de cana-de-açúcar e milho, obtidas de plantas C₄, os valores de $(^2\text{H}/^1\text{H})_i$ calculados ficaram entre 111,7 e 113,6 ppm e mostraram-se diferentes dos obtidos para as aguardentes produzidas a partir de plantas C₃. Uma diferenciação satisfatória entre estas amostras foi possibilitada por uma variação da relação isotópica de 10 ppm (aproximadamente) apresentada entre elas.

Para os padrões de aguardente de abacaxi foram obtidos valores de $(^2\text{H}/^1\text{H})_i$ entre 107,1 e 107,9 ppm, valores intermediários aos das plantas C₃ e C₄, pois o abacaxi é uma planta CAM (ZHANG *et al.* 2002a e ZHANG *et al.* 2002b) e fixa o CO₂ por um mecanismo intermediário ao utilizado por estas duas plantas.

A grapa comercial G1 apresentou um valor um pouco maior que as demais aguardentes de uva e igual a 106,6 ppm, mostrando que sua composição apresenta uma percentagem de açúcar da cana-de-açúcar, que pode ter sido adicionado no seu processo de fermentação.

Nas aguardentes comerciais de abacaxi, banana, pêsego e coco os valores calculados de $(^2\text{H}/^1\text{H})_i$, 111,4 a 113,9 ppm, ficaram próximos aos obtidos para as aguardentes de cana-de-açúcar, mostrando que estas amostras passaram por algum tipo de adulteração, possivelmente uma adição do açúcar de cana-de-açúcar antes da fermentação, isto para aumentar o teor alcoólico. Em algumas situações deve ter havido a adição de corantes e essências à aguardente de cana-de-açúcar, caracterizando-se aguardentes de cana-de-açúcar com adição de corantes e essências, que não poderiam ser vendidas como aguardentes de abacaxi, banana, pêsego e coco.

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que um grande número das aguardentes comerciais passaram por algum processo de adulteração. E ainda, que o processo de adulteração empregado, possivelmente foi o da utilização de aguardentes de cana-de-açúcar, uma vez que há um baixo custo envolvido no seu processo de fabricação.

A utilização da técnica SNIF-NMR no estudo da autenticidade das aguardentes comerciais mostrou-se muito útil, pois permitiu a identificação de amostras adulteradas. Com isto, esta técnica torna-se mais uma ferramenta que pode ser usada na detecção de adulterações e controle de qualidade de amostras comerciais.

No entanto, a técnica SNIF-NMR não permitiu a discriminação das aguardentes que são obtidas de plantas C₃, por isso torna-se muito importante a

utilização dos métodos quimiométricos, objetivando-se discriminar os diferentes tipos de aguardentes.

3.3.2 – Análise quimiométrica dos dados de RMN das aguardentes

3.3.2.1 – Discriminação das aguardentes comerciais por RMN de ^1H

Na análise das aguardentes utilizando-se os métodos quimiométricos, as amostras foram preparadas somente adicionando-se gotas de uma solução de TMSP em água deuterada às aguardentes.

Para a aquisição dos espectros de RMN de ^1H das aguardentes fez-se necessária a utilização de uma seqüência de pulsos que faz a supressão de três sinais, ou seja, os sinais dos hidrogênios da água ($\text{H}_2\text{O}/\text{HDO}$) (δ 4,90, singleto largo), da metila (δ 1,18, tripleto, $J = 7,2$ Hz, correspondente a três hidrogênios) e o da metileno (δ 3,64, quadrupeto, $J = 7,2$ Hz, dois hidrogênios) do etanol. Esta supressão foi importante porque nos espectros de RMN de ^1H sem supressão, apenas os sinais da água e do etanol foram observados. Portanto, sendo estes os mesmos em todas as amostras, não forneceriam informações suficientes para a diferenciação dos tipos de aguardentes.

Com a supressão destes sinais, aqueles dos compostos minoritários passaram a ser visualizados, permitindo verificar algumas diferenças entre os sinais de amostras diferentes, que poderiam estar relacionadas com o tipo de aguardente analisado. Este resultado mostrou-se interessante, pois na análise quimiométrica essas particularidades permitiriam uma boa separação entre as diferentes amostras.

Na figura 3.3-1 (página 129) estão mostrados os espectros de RMN de ^1H sem e com supressão dos sinais da água, da metila e da metileno do etanol. Expandindo-se oito vezes o espectro sem supressão, alguns sinais de pequena intensidade começam a ser visualizados. No entanto, no espectro com a supressão, estes sinais passaram a ser facilmente observados.

Além da supressão também foi necessário fazer a eliminação dos sinais referentes ao acoplamento dos núcleos de hidrogênio com os de carbono-13, que muitas vezes são mais intensos que os sinais de interesse na amostra. Na figura 3.3-2 (página 130) pode-se observar que os sinais dos hidrogênios acoplados ao carbono-13 da metila do etanol são mais intensos que os sinais que estão próximos a eles e que o do padrão TMSP. No entanto, com o desacoplamento do carbono-13 e supressão do sinal do CH₃ estes sinais praticamente desaparecem e os de interesse tornam-se mais evidentes.

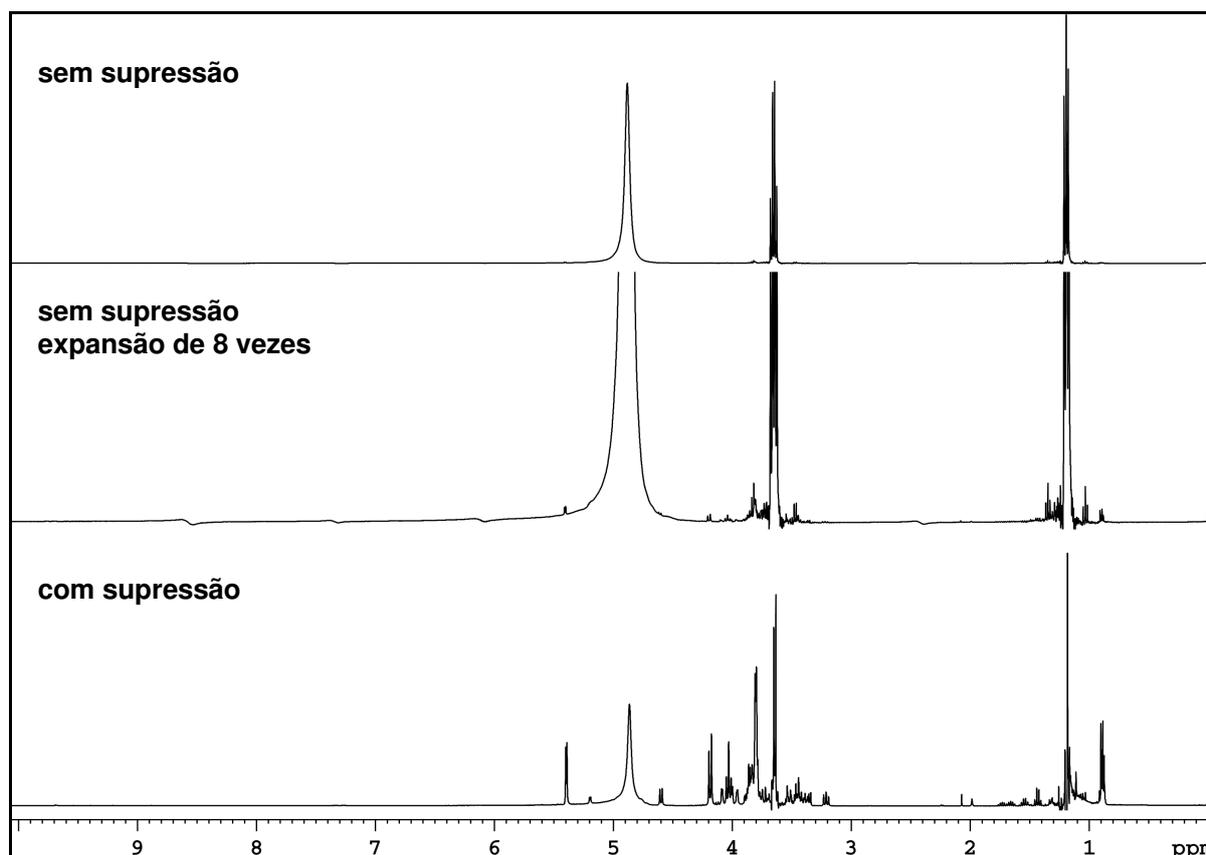


FIGURA 3.3-1. Espectros de RMN de ¹H da aguardente de cana-de-açúcar PC1 sem e com supressão dos sinais do etanol e da água (D₂O)

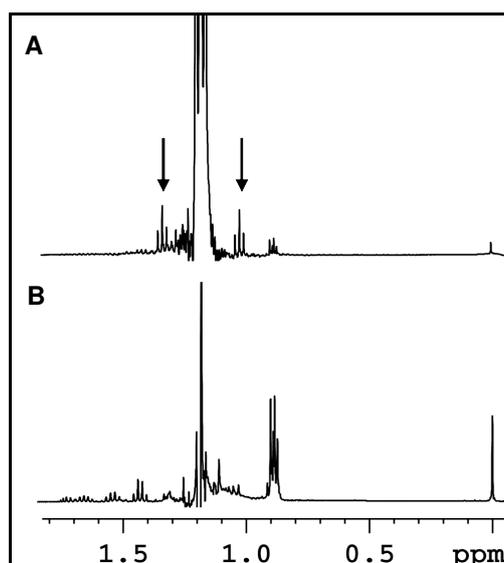


FIGURA 3.3-2. Ampliação da região de δ 0,00 a 1,80 dos espectros de RMN de ^1H da aguardente de cana-de-açúcar PC1 (A) sem desacoplamento dos núcleos de carbono-13 e sem supressão do sinal da metila do etanol e (B) com desacoplamento e com supressão (D_2O)

Os espectros de RMN de ^1H com supressão dos sinais dos hidrogênios da água, metila e metileno do etanol das aguardentes foram comparados entre si, com o objetivo de verificar a existência de diferenças que pudessem ser responsáveis pela discriminação das amostras. A figura 3.3-3 (página 131) apresenta os espectros das aguardentes de uva (G2), cana-de-açúcar (PC1), banana (PB2) e mel (PM2), nos quais pode-se observar algumas diferenças entre os espectros, como por exemplo, no espectro da grapa G2 os sinais mais facilmente identificados foram os dubletos em δ 4,60 e 5,20 ($J = 8,0$ e $3,7$ Hz, respectivamente), correspondentes aos hidrogênios anoméricos da β -glucose (H1 – **B**) e da α -glucose (H1 – **A**), respectivamente.

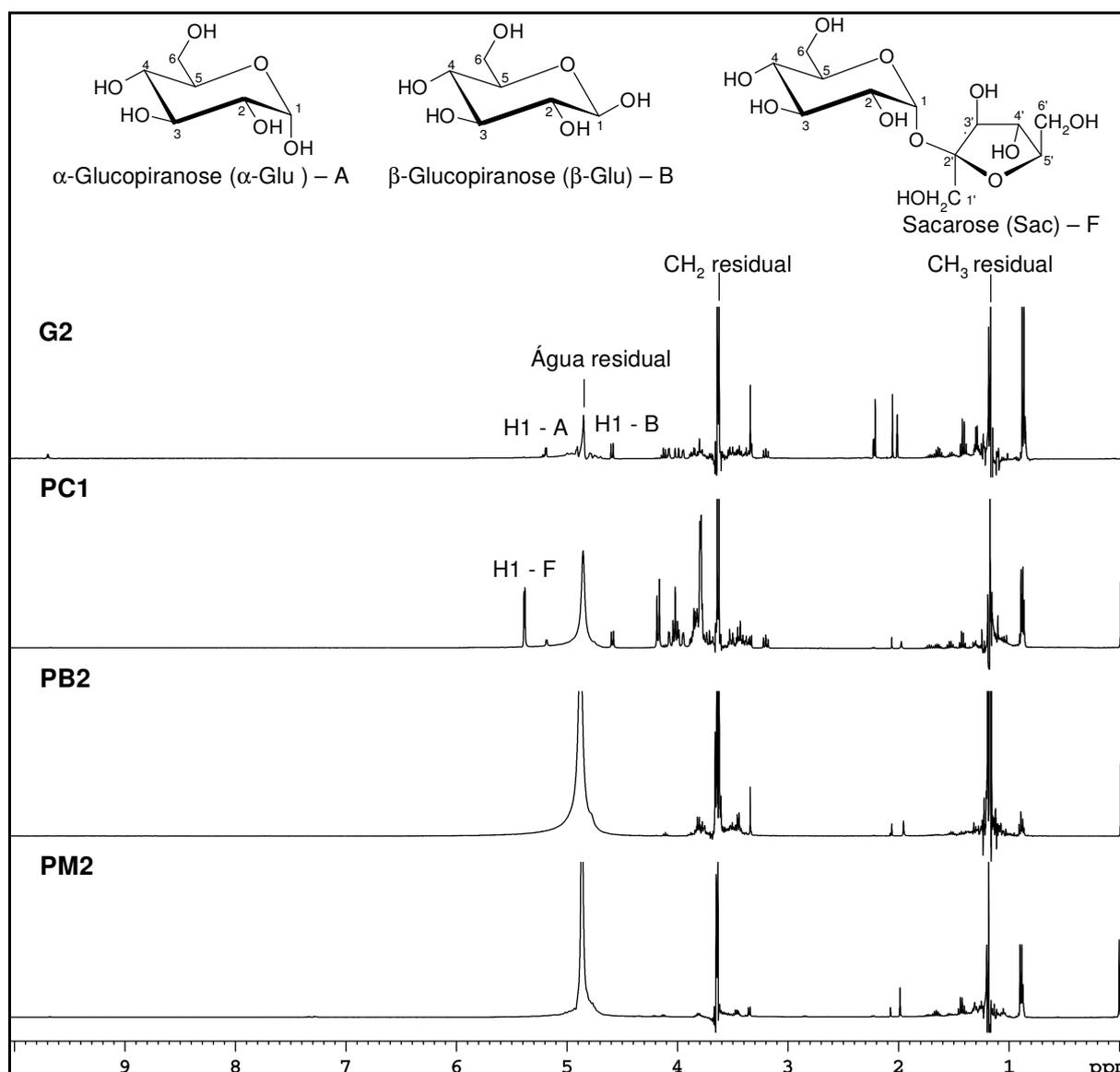


FIGURA 3.3-3. Espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de uva, cana-de-açúcar, banana e mel (D_2O)

No espectro da aguardente PC1, os sinais do H1 – B e do H1 – A também foram observados, mas os da sacarose apresentaram maior intensidade, sendo que o seu hidrogênio anomérico (H1 – F) foi o mais facilmente visualizado, como um *dubleto* em δ 5,40 ($J = 3,8$ Hz). Por outro lado, nos espectros das aguardentes de banana e mel, os sinais referentes aos carboidratos não foram observados.

Além disto, também foram identificados os compostos que apresentaram sinais na região de δ 2,00 da grapa G2, sendo eles o ácido acético, o acetato de etila e a acetona, com os singletos referentes às suas metilas em δ 2,02, 2,07 e 2,22, respectivamente. Nesta amostra ainda foi possível identificar a presença

de metanol, sendo que o sinal da sua metila foi observado como um singleto em δ 3,35. Esta identificação foi feita com adição de padrão, pois os experimentos de RMN bidimensionais não foram realizados, uma vez que os compostos de interesse estão em uma concentração muito pequena nas amostras.

Nas demais aguardentes (como as que serão mostradas na figura 3.3-6, página 135), os sinais próximos a δ 2,00 devem ser referentes ao ácido acético e ao acetato de etila, apresentando pequenas variações de deslocamento químico, provavelmente devido a variações de concentração.

Enquanto o número de amostras é pequeno estas diferenças nos espectros são facilmente visualizadas. No entanto, quando o número de espectros aumenta, a comparação visual para a distinção entre eles torna-se muito trabalhosa, fazendo com que a utilização dos métodos quimiométricos torne-se indispensável, pois todos os espectros são analisados em um único conjunto de dados e comparados simultaneamente. Todas as variáveis são avaliadas e as mais importantes, ressaltadas.

O estudo dos dados de RMN de ^1H das aguardentes iniciou-se pela análise por componentes principais (PCA), que possibilitou a seleção dos melhores parâmetros para a discriminação entre as amostras. Dentre estes parâmetros, pode-se citar: a seleção de variáveis, a escolha dos pré-processamentos e das transformações matemáticas. Neste sentido, foi feita a exclusão dos sinais dos hidrogênios da referência TMSP, das regiões de ruídos e dos sinais residuais da supressão do etanol e da água, para não acarretar erros e por não conterem informações relevantes. Além disto, analisando-se o gráfico de *loadings* foi possível fazer a exclusão de outros sinais que não foram importantes para a discriminação, como os hidrogênios aromáticos de baixa intensidade, na região de δ 6,50 a 8,20, e os sinais dos outros álcoois presentes nas amostras, na região de δ 0,80 a 1,80 dos espectros de RMN de ^1H .

O gráfico de linhas com a sobreposição de todos os espectros analisados está mostrado na figura 3.3-4 (página 133). Neste gráfico, também, verifica-se que os sinais mais importantes para a discriminação das amostras estão na região de δ 1,80 a 5,50 dos espectros.

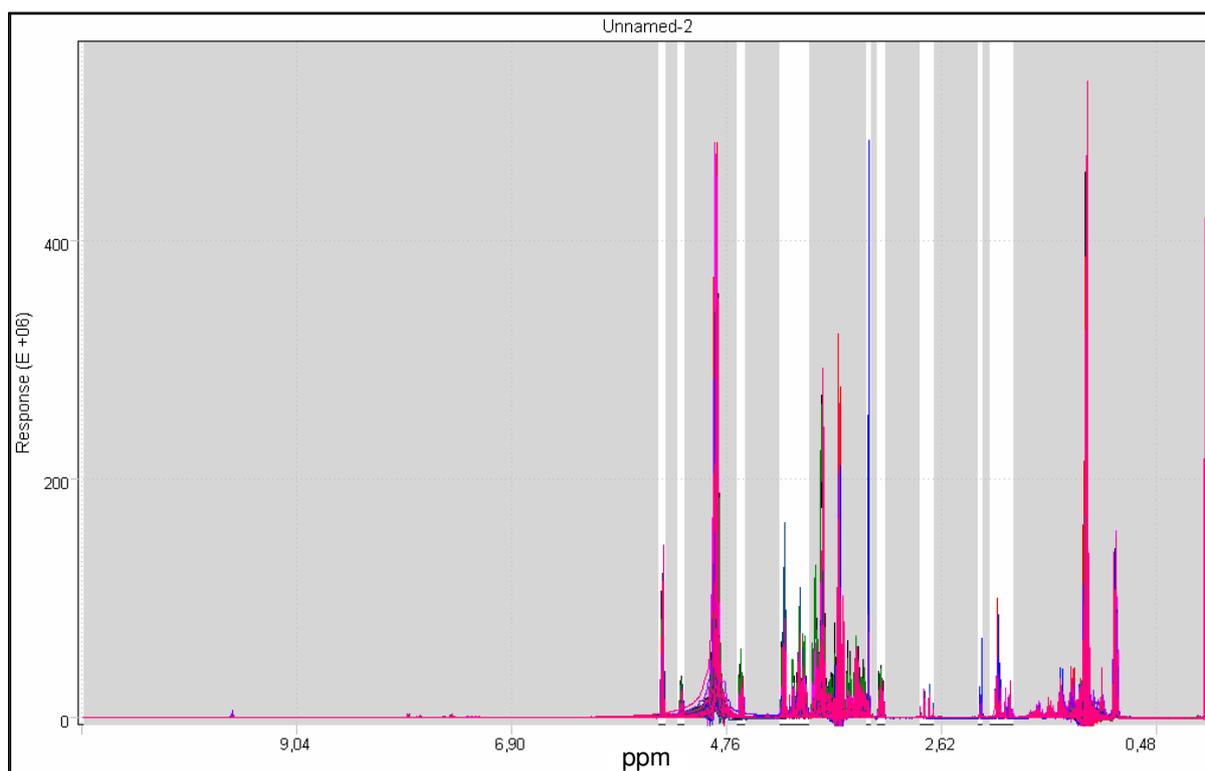


FIGURA 3.3-4. Gráfico de linhas correspondente aos espectros de RMN de ^1H das aguardentes, mostrando em cinza as regiões excluídas durante a análise quimiométrica

A melhor discriminação entre as aguardentes foi obtida quando foram utilizadas as transformações: normalização para norma um, para corrigir eventuais erros nas concentrações das amostras, e primeira derivada, para corrigir pequenas variações na linha de base dos espectros e principalmente porque contribuiu para o agrupamento entre as replicatas.

O autoescalamamento também foi aplicado aos dados. O uso desta função matemática permitiu que os sinais menos intensos nos espectros de RMN de ^1H tivessem a mesma importância que os mais intensos. Quando constituintes minoritários são os de interesse, essa função torna-se útil, pois atribui uma mesma influência a todos os sinais. Porém, o seu uso exige a exclusão de todos os ruídos existentes no espectro, para garantir que eles não sejam considerados importantes e interfiram na discriminação.

O gráfico de *scores* de PC1 x PC2 está mostrado na figura 3.3-5 (página 134). PC1 descreve 25,3% de variância do conjunto de dados, enquanto que PC2 descreve 14,8%, e as duas PCs juntas descrevem 40,1% da variância total. Neste gráfico verifica-se que duas amostras (PT e PC10) apresentaram comportamento muito diferente das demais. A amostra identificada como PT, que é a aguardente de mandioca (tiquira), discriminou-se em valores positivos de PC1 e

negativos de PC2. Já a amostra PC10 (aguardente de cana-de-açúcar, apresentada, porém, pelo rótulo do produto comercial, como um coquetel de aguardente de cana e limão) deslocou-se para valores negativos em PC1 e PC2. Pelo gráfico pode-se verificar também a discriminação das aguardentes de mel, as quais apresentaram valores positivos de PC1 e próximos a zero de PC2.

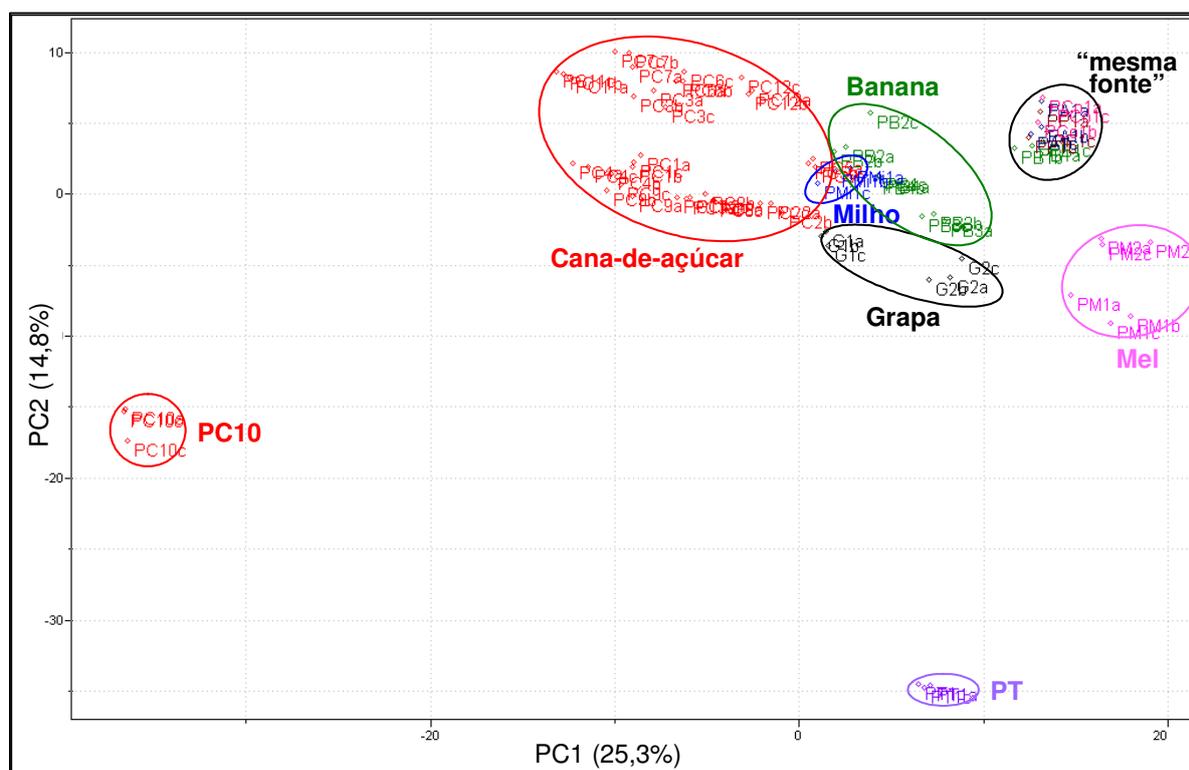


FIGURA 3.3-5. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H das aguardentes (40,1%)

As aguardentes de cana-de-açúcar, milho, banana e as grapas não estão bem discriminadas, mas mostraram uma tendência para a formação de seus grupos. Além disto, em valores positivos de PC1 e PC2 foi formado um grupo pelas aguardentes PCo1 (coco), PA1 (abacaxi), PB1 (banana) e PP1 (pêssego). Estas quatro amostras foram produzidas artesanalmente e fornecidas por um mesmo produtor. Aliado a isto, os resultados encontrados na análise por PCA levaram a considerar a hipótese de que uma mesma matéria-prima possa ter sido utilizada na produção destas aguardentes, justificando o agrupamento encontrado. Por isto, estas amostras passaram a ser chamadas de “mesma fonte”.

A discriminação das amostras PT e PC10 em relação às demais pode ser entendida observando-se a figura 3.3-6, na qual está mostrada a ampliação da

região de δ 1,80 a 6,00 dos seus espectros de RMN de ^1H juntamente com os das aguardentes de cana (PC1), e de mel (PM1 e PM2).

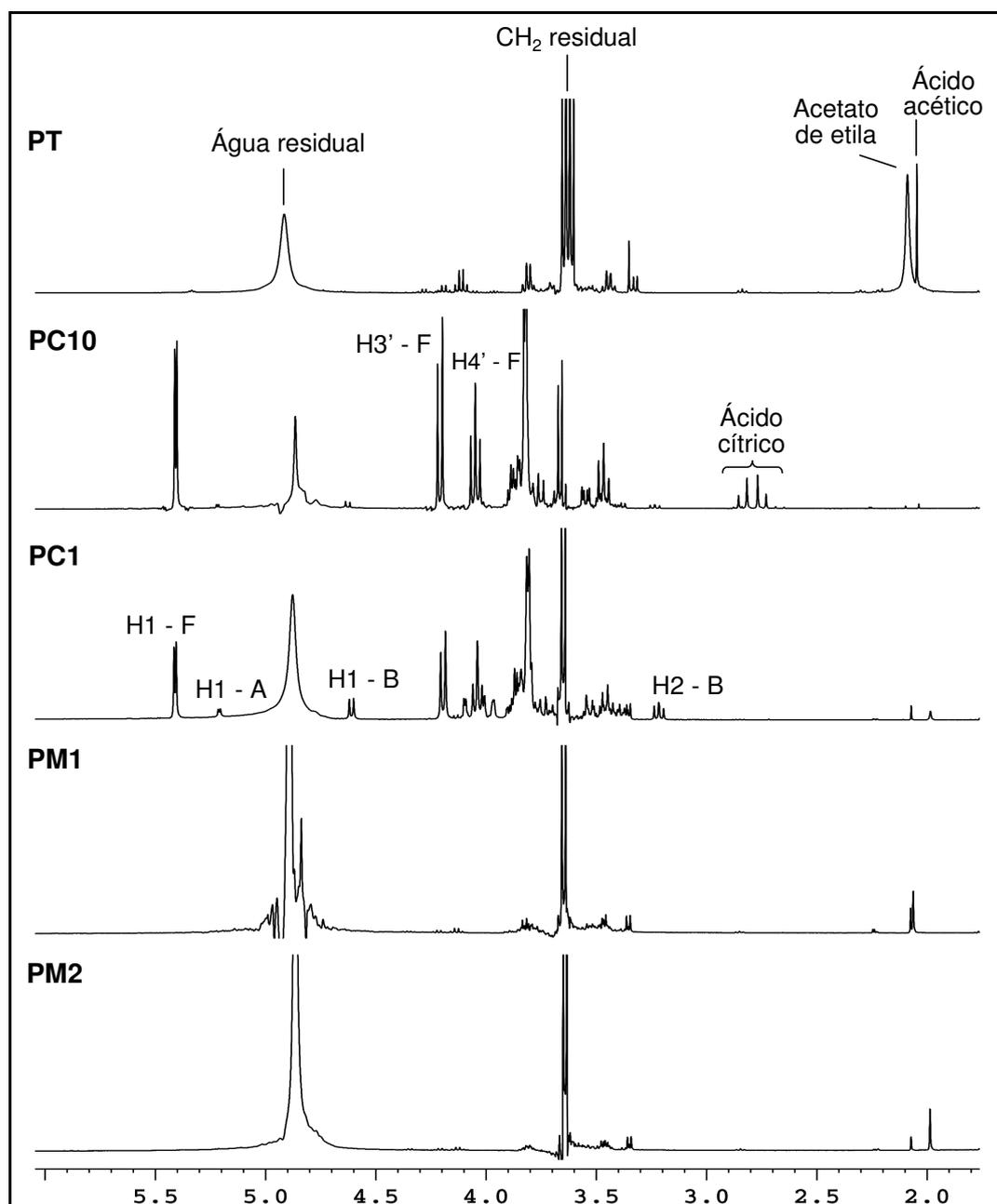


FIGURA 3.3-6. Ampliação da região de δ 1,80 a 6,00 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de mandioca, cana-de-açúcar e mel (D_2O)

O espectro da aguardente PC10 mostrou o *dubleto* do hidrogênio anomérico da sacarose (H1 – F) em δ 5,40. Este também foi observado no espectro da amostra PC1, porém em menor intensidade. Os sinais dos hidrogênios H3' e H4' da sacarose também puderam ser identificados em δ 4,19 (*dubleto*; $J = 8,6$ Hz) e 4,03 (*tripleto*; $J = 8,6$ Hz), respectivamente. No entanto, os *dubletos* correspondentes

aos hidrogênios anoméricos da α - e da β -glucose, em δ 4,60 (H1 – **B**) e 5,20 (H1 – **A**), foram observados em maior intensidade no espectro de PC1. O sinal do H2 da β -glucose (H2 – **B**) também foi observado em δ 3,21 (*duplo dubleto*; $J = 8,0$ e $9,1$ Hz, referentes aos acoplamentos com os hidrogênios H1 e H3). Os outros sinais dos carboidratos não puderam ser observados corretamente devido à sobreposição com o sinal da metilena do etanol, que foi suprimido devido à sua grande intensidade. As amostras PT, PM1 e PM2 não apresentaram os sinais dos carboidratos nos seus espectros de RMN de ^1H .

Como pode ser visto na figura 3.3-6 (página 135), os sinais dos hidrogênios dos carboidratos podem somente ser observados nos espectros de PC1 e PC10 (aguardentes de cana-de-açúcar). Desta forma, pode-se dizer que estes sinais foram os responsáveis pela discriminação das aguardentes de cana-de-açúcar em relação às demais, deslocando-as para valores negativos de PC1 no gráfico de *scores* (figura 3.3-5, página 134). No entanto, a presença de dois *dubletos* em δ 2,72 e 2,81 ($J = 15,5$ Hz) no espectro da amostra PC10 foi a principal responsável por sua discriminação em relação às outras aguardentes de cana-de-açúcar. Estes sinais foram identificados como pertencentes ao ácido cítrico.

No espectro da aguardente PT não foram observados os sinais dos carboidratos, mas foram visualizados dois *singletos* próximos a δ 2,00 com uma intensidade maior que nas demais amostras, sendo referentes ao ácido acético e ao acetato de etila. Estes sinais foram os responsáveis pela discriminação desta amostra em relação às demais, mas não apresentaram muita influência na separação das outras aguardentes.

A figura 3.3-7 (página 137) mostra a ampliação dos espectros de RMN de ^1H das aguardentes PP1, PA1, PB1 e PCo1 (“mesma fonte”) na região de δ 1,80 a 6,00. Uma grande semelhança entre os espectros é facilmente observada, justificando o agrupamento apresentado por estas amostras. Observa-se também que os espectros não apresentam os sinais referentes aos carboidratos, assemelhando-se mais aos espectros das aguardentes de mel (PM1 e PM2) e da tiquira (PT) do que aos das de cana-de-açúcar (PC1 e PC10) (figura 3.3-6), justificando a discriminação observada na figura 3.3-5. Os sinais próximos a δ 2,00 provavelmente são referentes às metilas do ácido acético e do acetato de etila, mas não foram os mais importantes para o agrupamento observado.

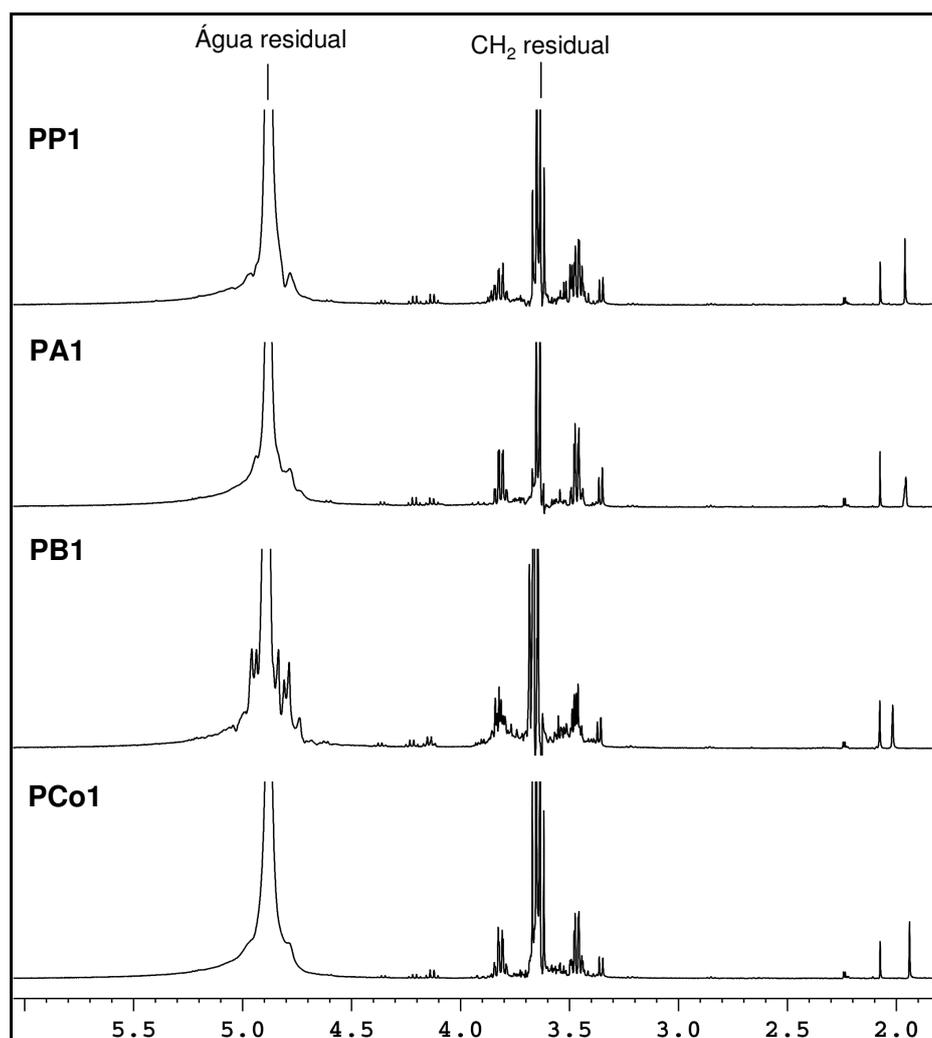


FIGURA 3.3-7. Ampliação de δ 1,80 a 6,00 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de pêsego, abacaxi, banana e coco (D_2O)

O dendrograma resultante da análise das aguardentes por HCA está mostrado na figura 3.3-8 (página 138). Foram usados os mesmos parâmetros da PCA, juntamente com a distância Euclidiana e o método de conexão incremental. Um índice de similaridade igual a 0,504 discriminou o conjunto de dados em oito grupos. Para uma melhor visualização das amostras foram feitas cinco ampliações, mostradas nas figuras 3.3-9 a 3.3-13 (páginas 139 a 141).

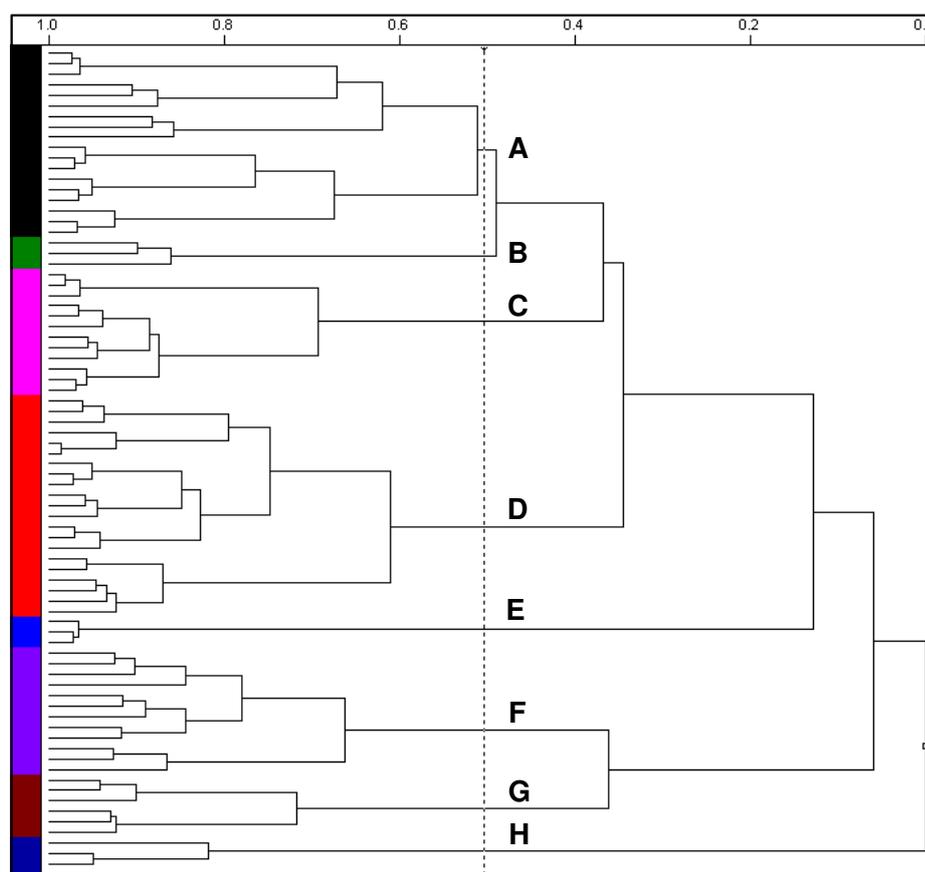


FIGURA 3.3-8. Dendrograma dos dados de RMN de ^1H das aguardentes (similaridade: 0,504)

No grupo A, mostrado na figura 3.3-9, verifica-se o agrupamento das aguardentes de banana, com a presença de duas aguardentes de cana-de-açúcar e uma de milho, que foram agrupadas de forma errada. Já no grupo B (figura 3.3-9) observa-se a grapa G2, pois a G1 mostrou-se mais próxima das aguardentes de cana-de-açúcar, como pode ser visto no grupo D (figura 3.3-10).

Nos grupos C (figura 3.3-9) e D (figura 3.3-10) estão agrupadas as aguardentes de cana-de-açúcar. A amostra PT distanciou-se das outras, formando um grupo isolado (E), mostrado na figura 3.3-11.

As aguardentes PCo1, PA1, PB1 e PP1 (“mesma fonte”) formaram o grupo F (figura 3.3-12). Além disto, foi possível observar a discriminação das aguardentes de mel, formando o grupo G (figura 3.3-12), e da de cana-de-açúcar PC10, grupo H (figura 3.3-13).

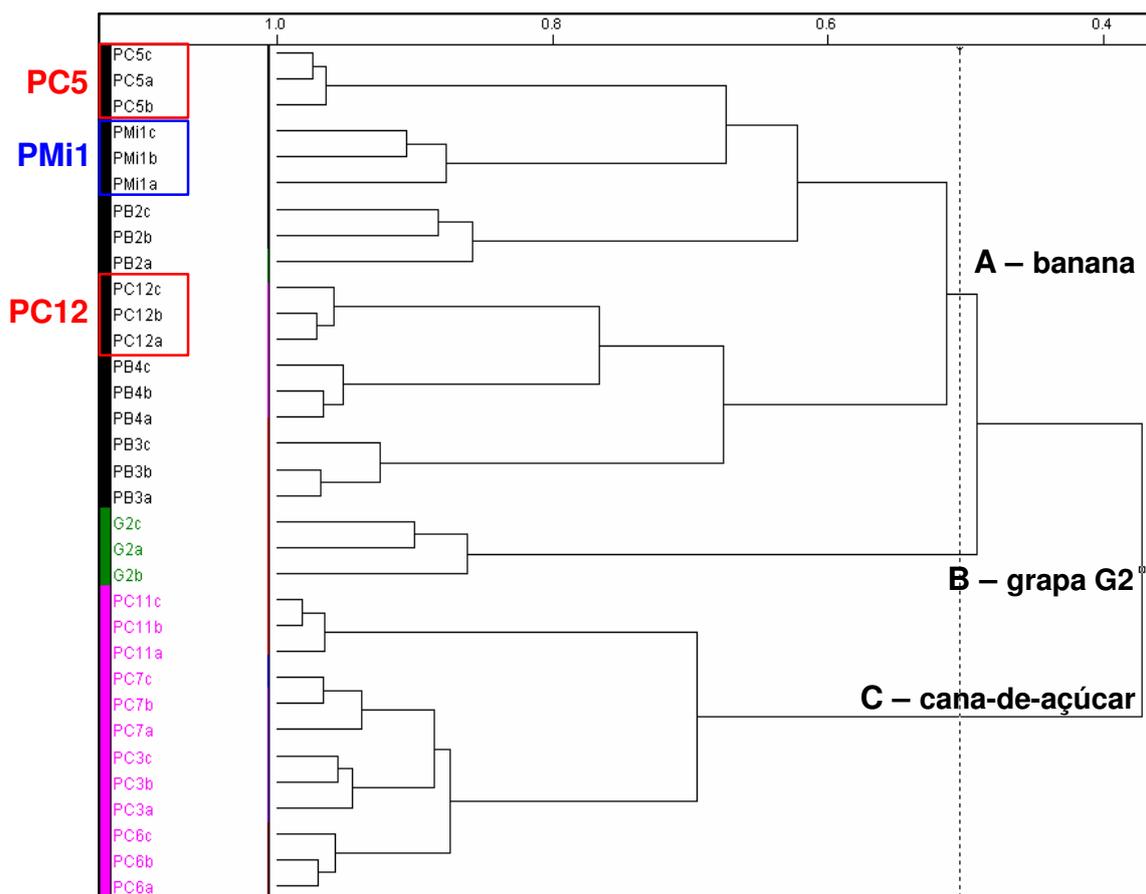


FIGURA 3.3-9. Ampliação dos ramos A, B e C do dendrograma mostrado na figura 3.3-8

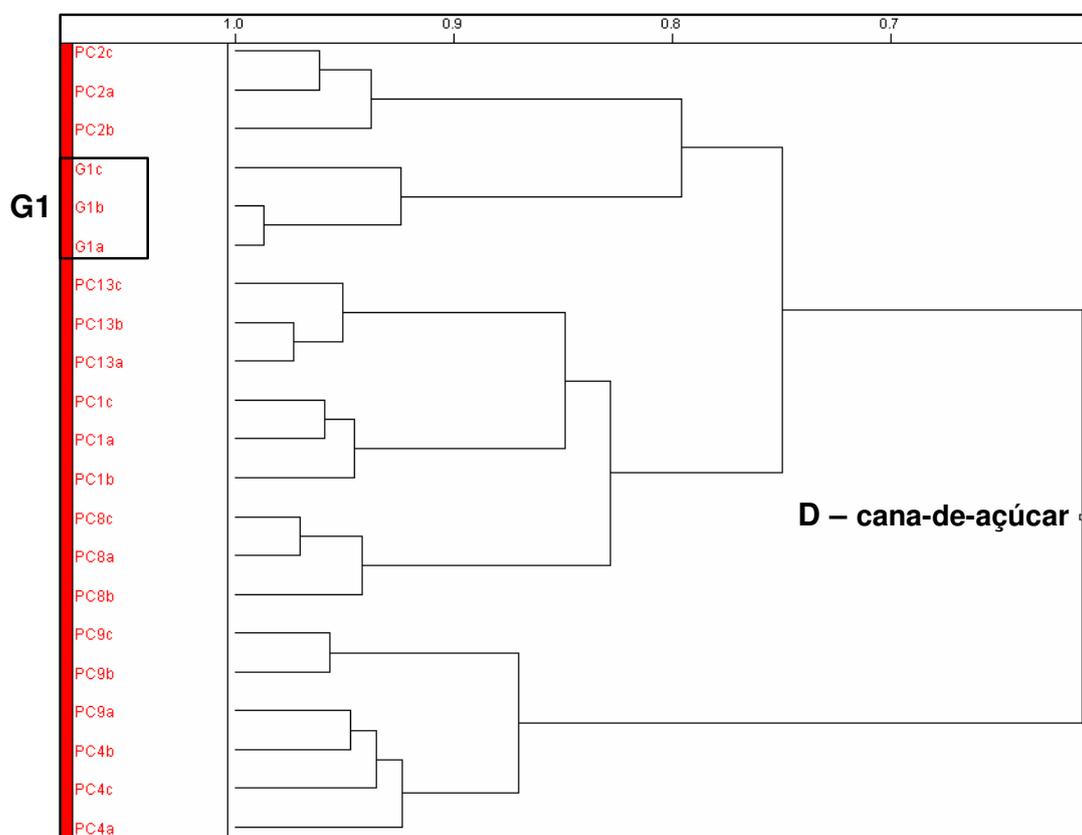


FIGURA 3.3-10. Ampliação do ramo D do dendrograma mostrado na figura 3.3-8

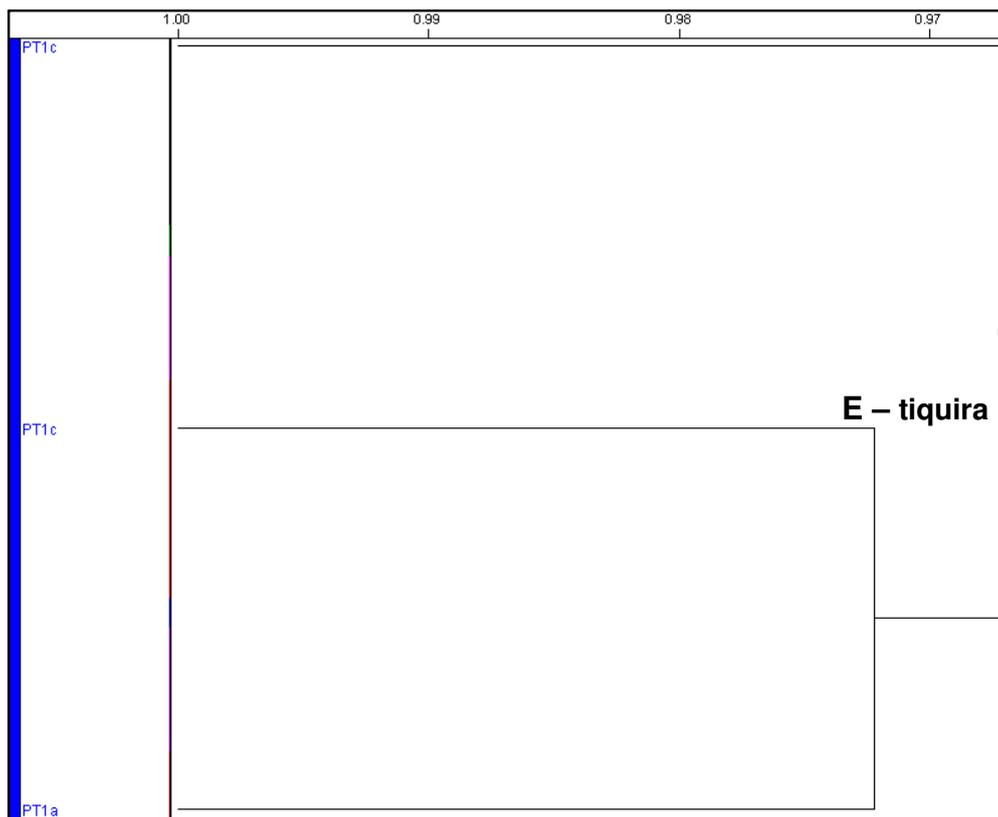


FIGURA 3.3-11. Ampliação do ramo E do dendrograma mostrado na figura 3.3-8

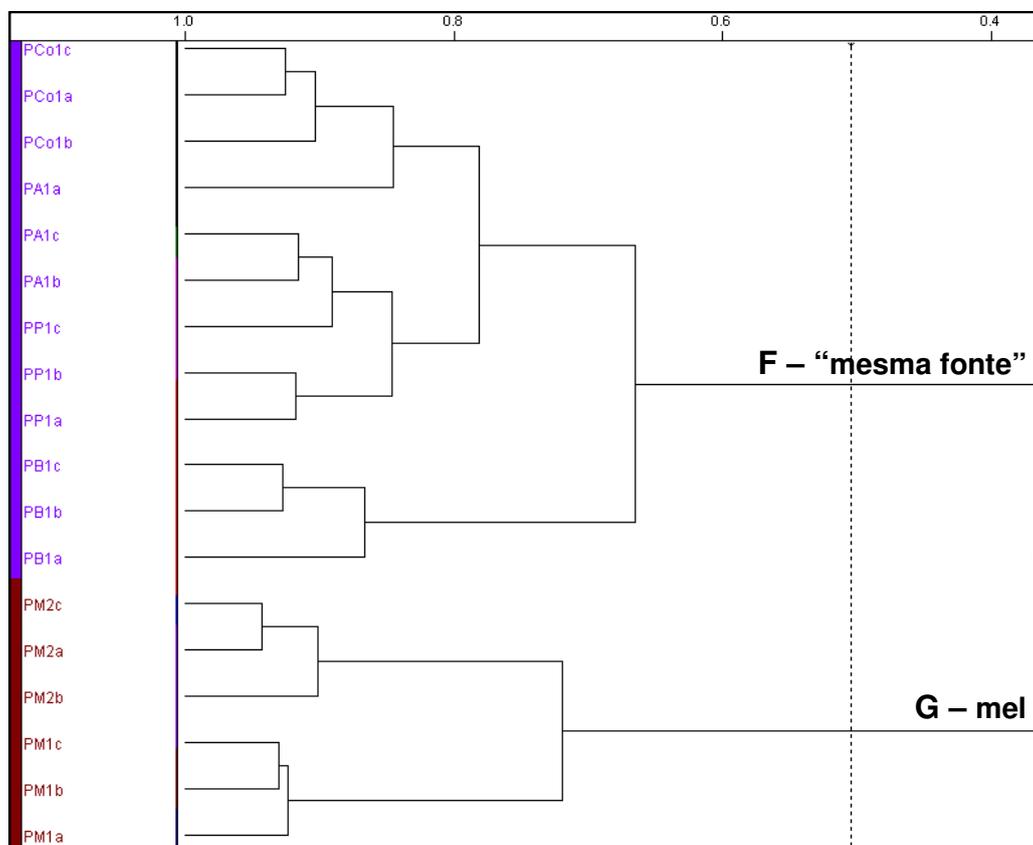


FIGURA 3.3-12. Ampliação dos ramos F e G do dendrograma mostrado na figura 3.3-8

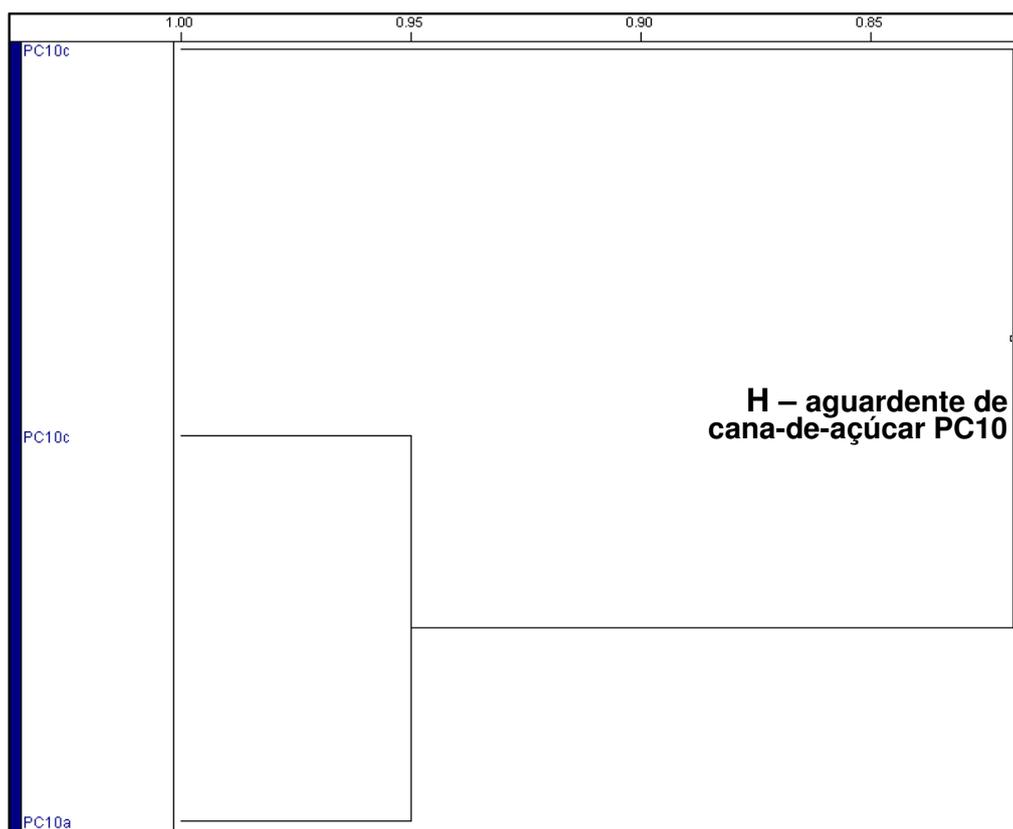


FIGURA 3.3-13. Ampliação do ramo H do dendrograma mostrado na figura 3.3-8

Os resultados obtidos mostraram que as amostras PT e PC10 são muito diferentes das demais, por isso elas foram excluídas do conjunto de dados e a análise por PCA foi realizada novamente, objetivando-se uma melhor discriminação entre os outros tipos de aguardentes.

O gráfico de *scores* de PC1 x PC2 (figura 3.3-14, página 142) representa 39,1% da informação do sistema, sendo que PC1 descreve 26,6% de variância total, enquanto que PC2 descreve 12,5%. Neste gráfico pode-se ver que as replicatas de cada amostra estão bem agrupadas e que as aguardentes de cana-de-açúcar foram discriminadas das demais, permanecendo em valores negativos de PC1. Adicionalmente, observa-se que a aguardente de milho agrupou-se a estas amostras, mostrando que possuem características semelhantes.

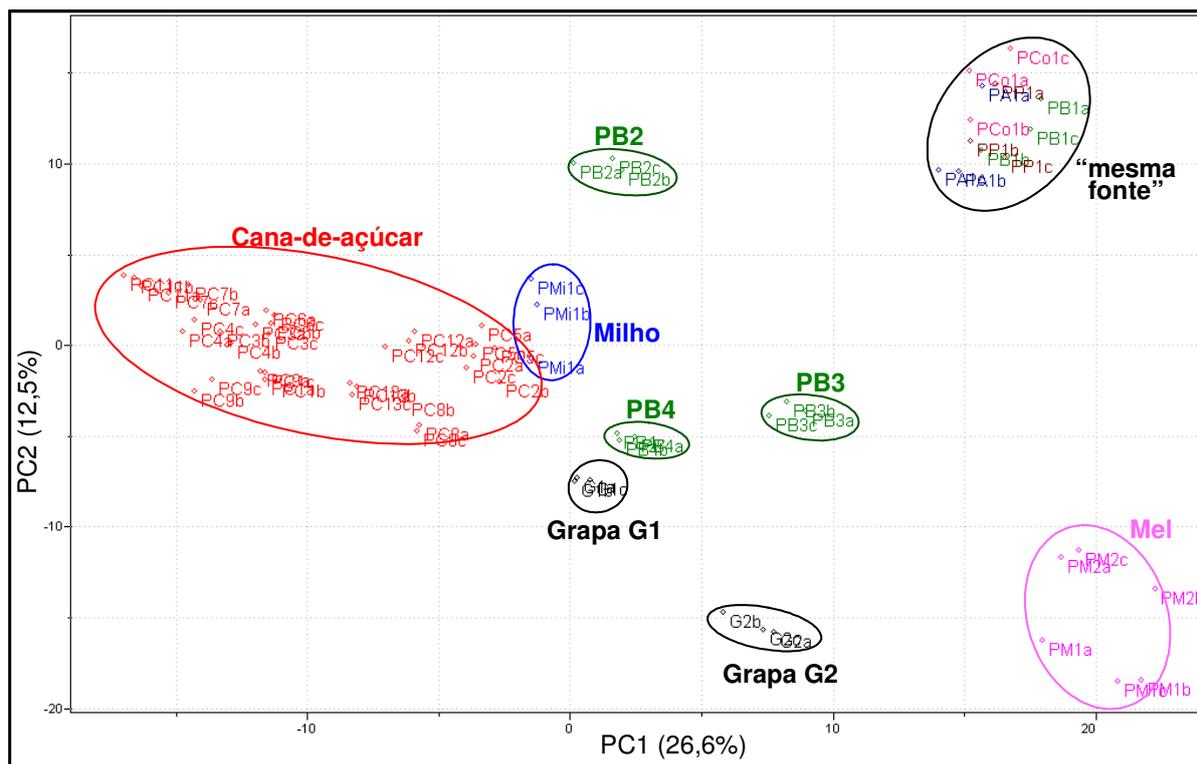


Figura 3.3-14. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos espectros de RMN de ^1H dos diferentes tipos de aguardentes, após a exclusão das aguardentes PC10 e PT (39,1%)

A discriminação mostrada na figura 3.3-14 pode ser entendida analisando-se os espectros de RMN de ^1H das aguardentes. A figura 3.3-15 (página 143) mostra a ampliação da região de δ 1,80 a 6,00 dos espectros de RMN de ^1H obtidos suprimindo-se os sinais do etanol e da água, das aguardentes de cana-de-açúcar (PC1, PC11, PC12, PC8) e de milho (PMi1). Em todos os espectros pode-se observar a presença do sinal do hidrogênio H1 da sacarose (**F**). Entretanto, os espectros das amostras PC8 e PMi1 mostraram os sinais da α - e β -glucose (**A** e **B**) com baixa intensidade. Mesmo assim, elas agruparam-se no gráfico de *scores* (figura 3.3-14), mostrando que o composto responsável por este agrupamento foi a sacarose.

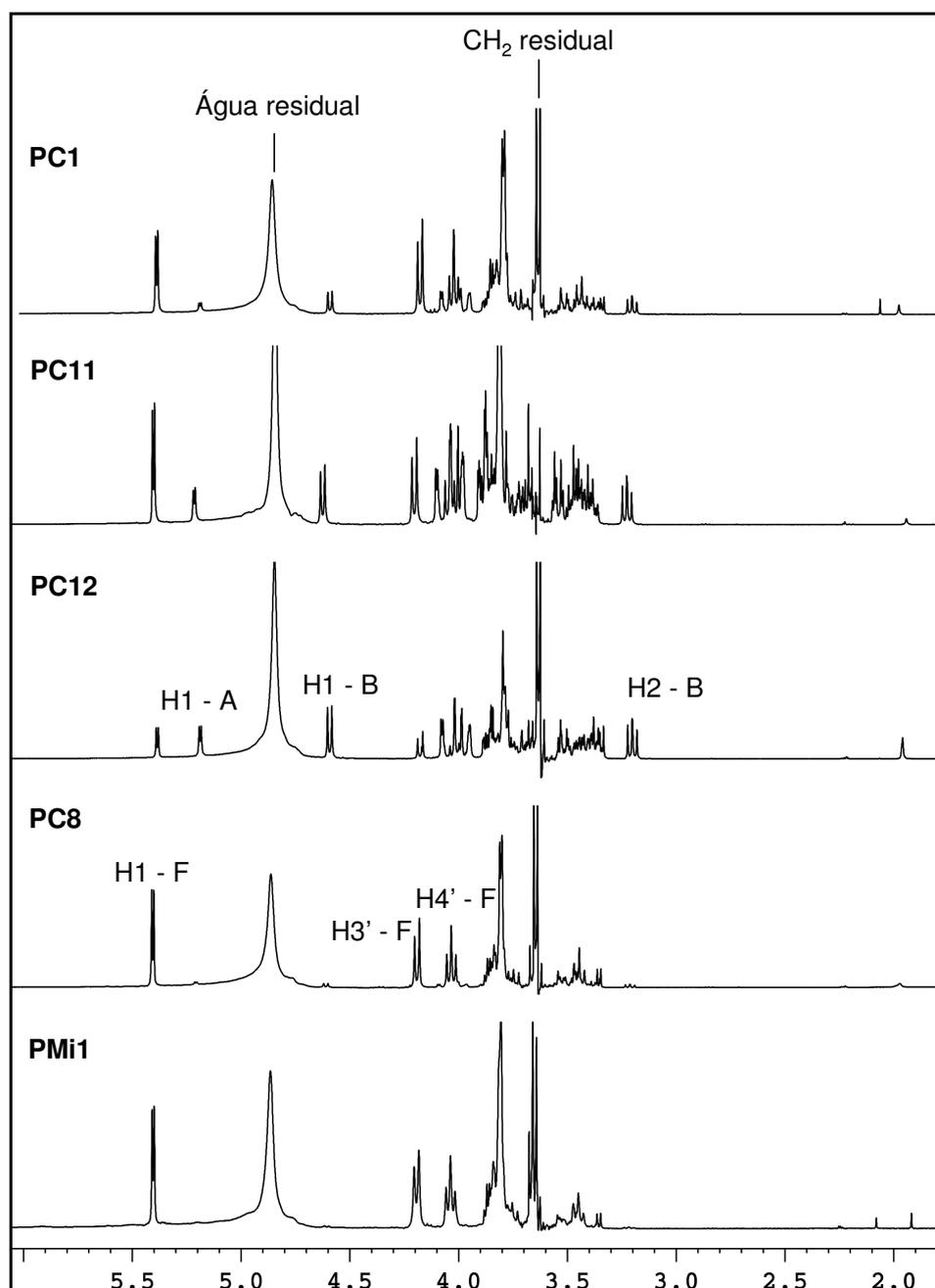


FIGURA 3.3-15. Ampliação de δ 1,80 a 6,00 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de cana-de-açúcar e milho (D_2O)

As aguardentes de uva (G2) e mel (PM1 e PM2) formaram grupos distintos e distantes do grupo das de cana-de-açúcar no gráfico de *scores* (figura 3.3-14). Um resultado que corrobora com esta discriminação foi obtido com a utilização da técnica SNIF-NMR. As aguardentes de uva e mel (plantas C_3) apresentaram valores de $(^2\text{H}/^1\text{H})_i$ diferentes dos obtidos para as de cana-de-açúcar (planta C_4), pois foram obtidas dos açúcares de plantas que fixam o CO_2 por diferentes mecanismos. Além disto, a comparação dos espectros de RMN de ^1H mostra outras diferenças nas suas composições químicas. A figura 3.3-6 (página

135) mostrou a comparação entre os espectros das aguardentes de mel e das de cana-de-açúcar, evidenciando as suas diferenças, que justificaram a discriminação.

Já a figura 3.3-16 compara os espectros das amostras G2, G1 e PC8, mostrando que os espectros das duas grapas são consideravelmente diferentes. Para a grapa G2 foram observados os *dubletos* referentes aos hidrogênios H1 da α -glucose (**A**) e da β -glucose (**B**). Entretanto, no espectro da grapa G1 estes sinais apresentaram-se muito pequenos e o *dublete* do hidrogênio H1 da sacarose (**F**) foi observado com intensidade maior. Este sinal também foi visualizado no espectro da aguardente de cana-de-açúcar PC8, justificando assim, a proximidade de G1 com as aguardentes de cana-de-açúcar obtida na análise por PCA (figura 3.3-14).

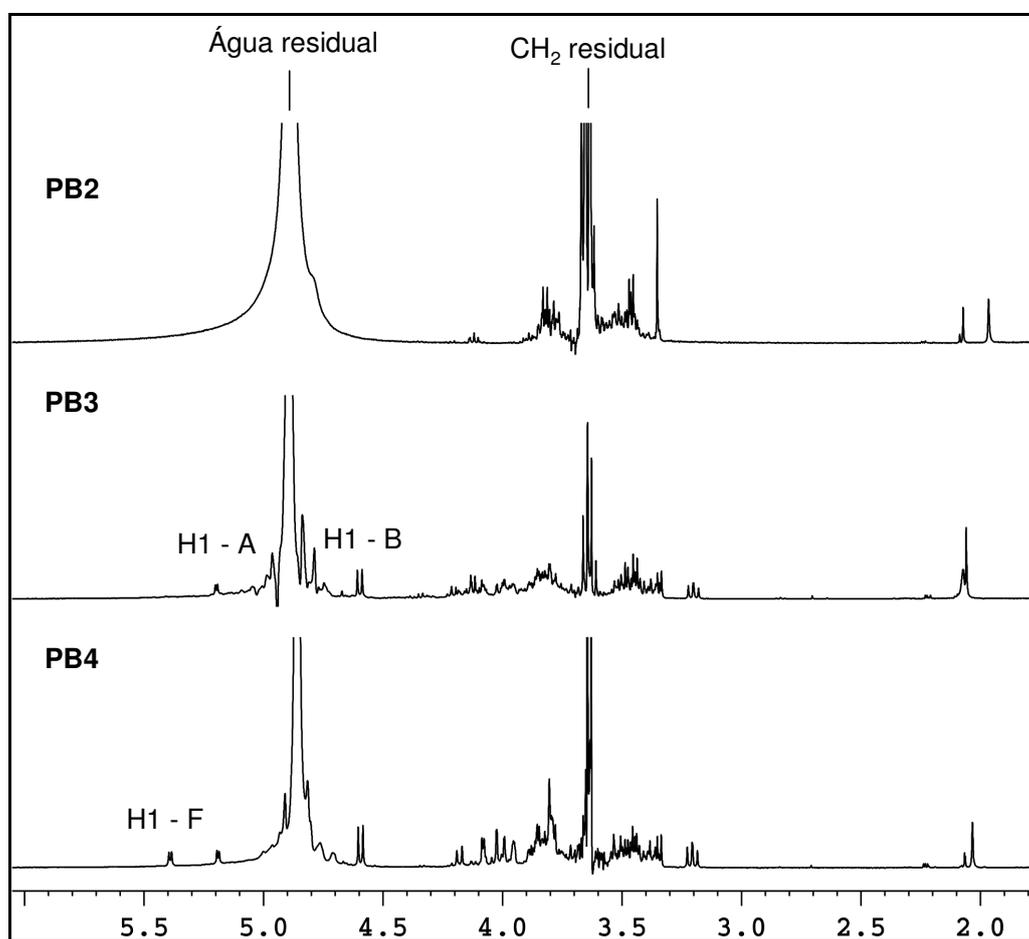


FIGURA 3.3-16. Ampliação de δ 1,8 a 6,0 dos espectros de RMN de ^1H , com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de cana-de-açúcar e uva (D_2O)

As amostras PB2, PB3, PB4 (aguardentes de banana) não agruparam-se, uma vez que apresentaram espectros de RMN de ^1H relativamente diferentes (figura 3.3-17). Para a PB2 não foram verificados os sinais dos carboidratos, já para

a PB3 foi verificada uma pequena quantidade de α - e β -glucose (**A** e **B**), enquanto que o espectro da PB4 mostra os sinais destes compostos e os da sacarose (**F**).

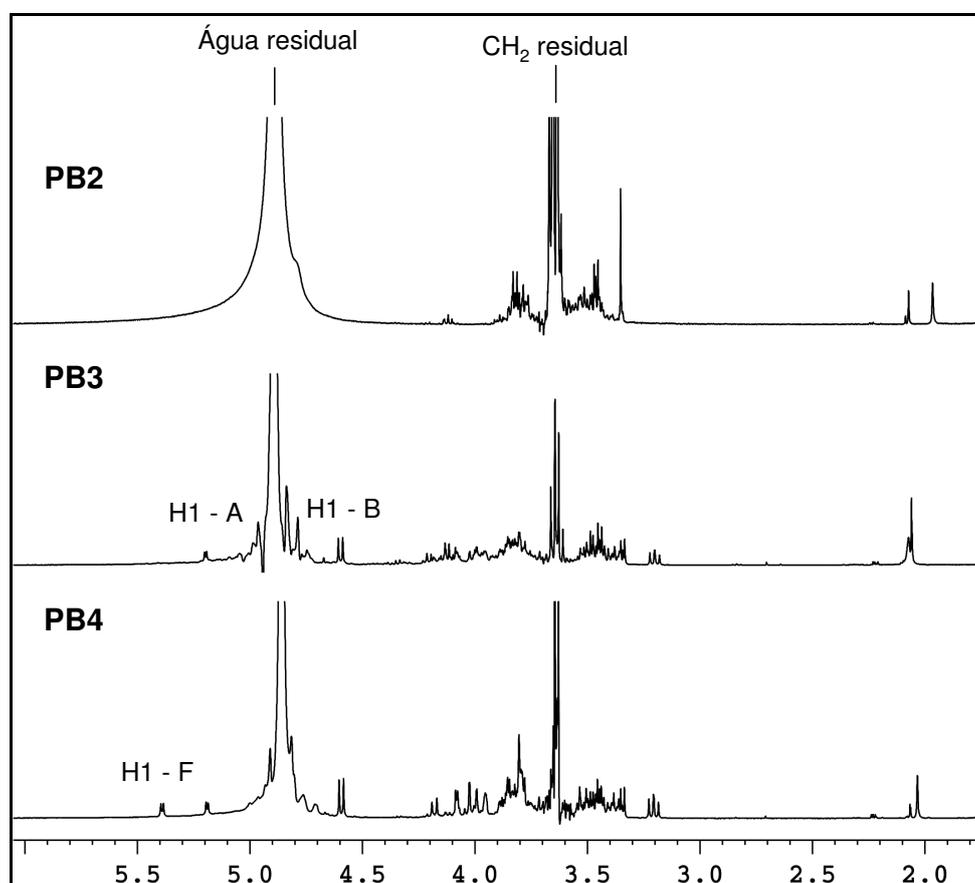


FIGURA 3.3-17. Ampliação de δ 1,8 a 6,0 dos espectros de RMN de ¹H, com supressão dos sinais do etanol e da água, das aguardentes de banana (D₂O)

A figura 3.3-18 (página 146) mostra o dendrograma obtido na análise das aguardentes por HCA, após a exclusão das amostras PT e PC10. A linha vertical, em um índice de similaridade de 0,502, discriminou as amostras em seis grupos, que estão mostrados nas figuras 3.3-19 a 3.3-21.

A figura 3.3-19 (página 146) traz a ampliação do HCA correspondente aos ramos A e B (grupos formados pelas aguardentes de cana-de-açúcar e pela grapa G1).

O grupo C (figura 3.3-20, página 147) foi formado pelas aguardentes de banana, sendo um resultado diferente daquele observado na PCA, no qual este agrupamento não havia sido verificado. Além disso, a aguardente de milho agrupou-se a elas. Na mesma figura verifica-se que a grapa G2 (grupo D) não agrupou-se a nenhuma outra amostra.

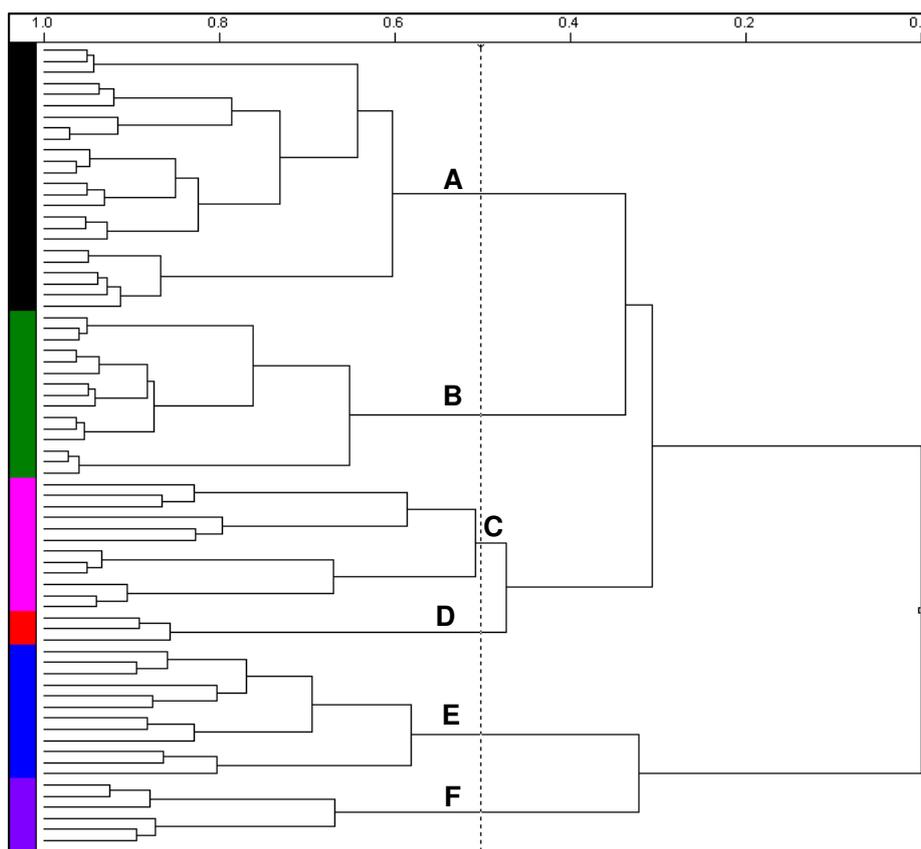


FIGURA 3.3-18. Dendrograma dos dados de RMN de ¹H das aguardentes, após exclusão das aguardentes PC10 e PT (similaridade: 0,502)

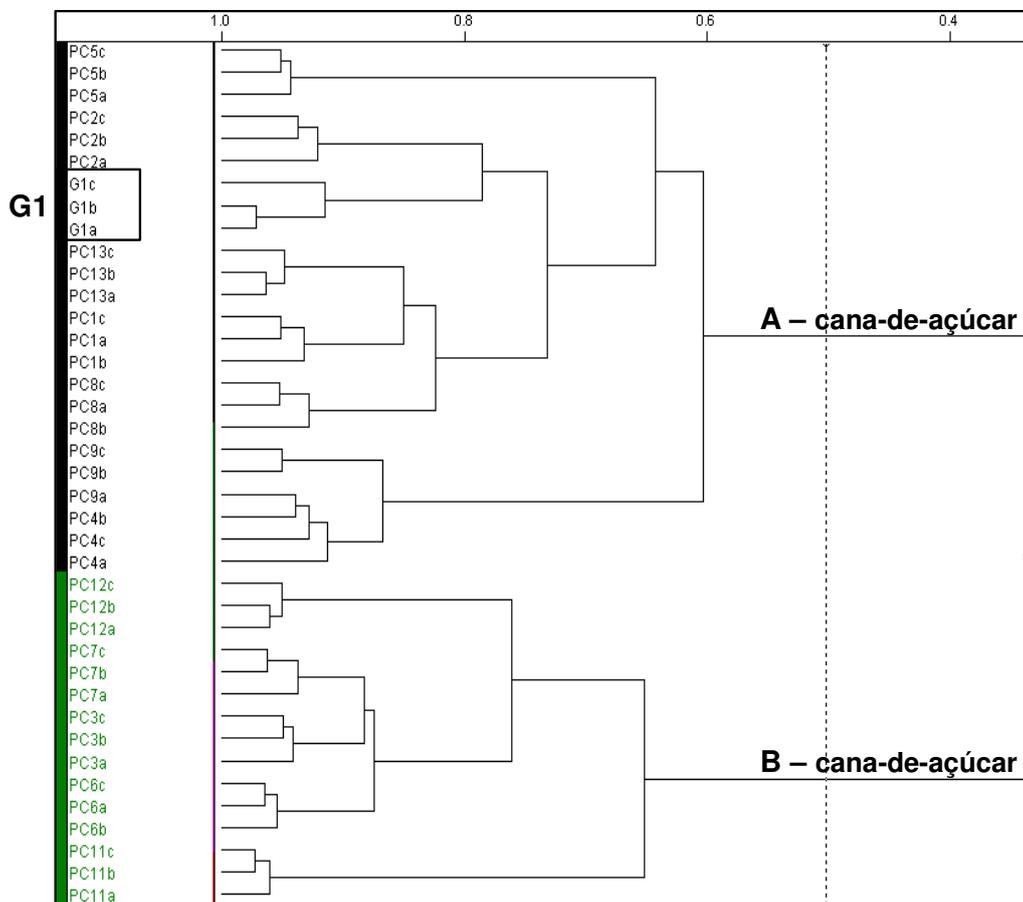


FIGURA 3.3-19. Ampliações dos ramos A e B do dendrograma mostrado na figura 3.3-18

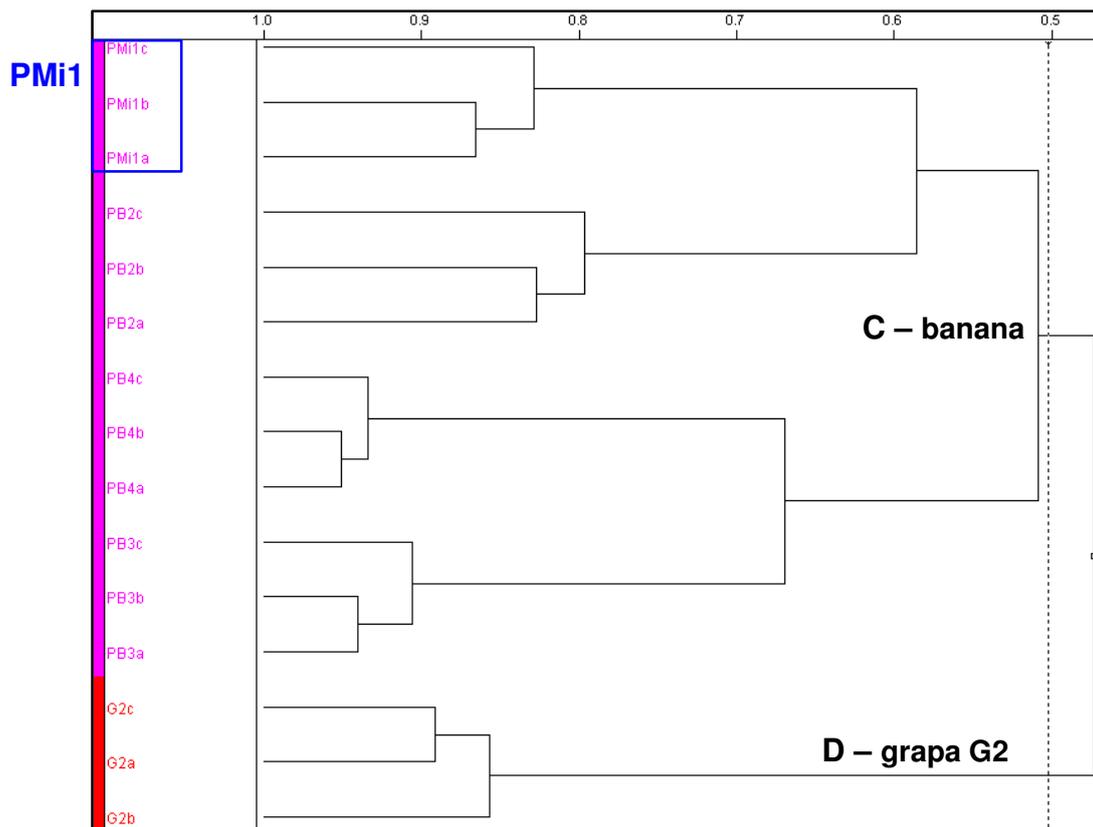


FIGURA 3.3-20. Ampliações dos ramos C e D do dendrograma mostrado na figura 3.3-18

As aguardentes de coco, pêsego, abacaxi e banana, adquiridas do mesmo produtor, formaram um grupo distinto dos demais (grupo E), enquanto que as aguardentes de mel formaram o grupo F (figura 3.3-21, página 148).

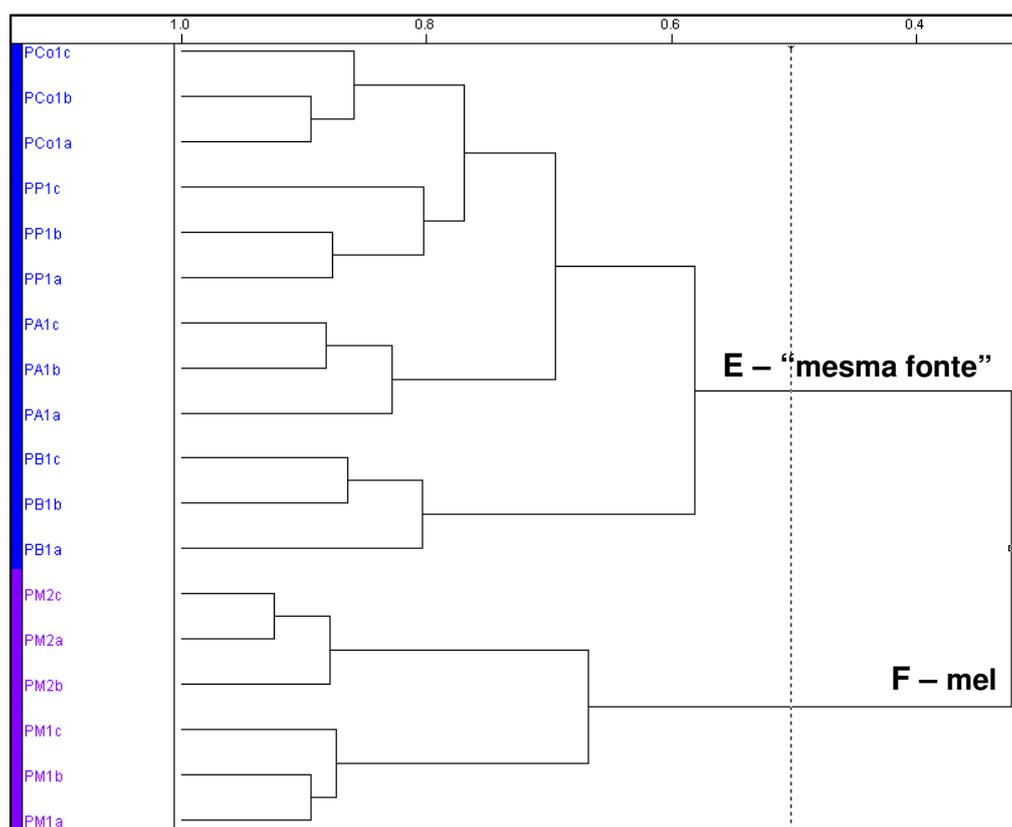


FIGURA 3.3-21. Ampliações dos ramos E e F do dendrograma mostrado na figura 3.3-18

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que a RMN de ^1H , aliada aos métodos quimiométricos PCA e HCA, mostrou-se uma ferramenta muito eficiente na verificação da autenticidade das aguardentes, discriminando as aguardentes produzidas a partir das diferentes matérias-primas.

3.3.2.2 – Discriminação das aguardentes comerciais por RMN de ^{13}C

Os espectros de RMN de ^{13}C das aguardentes foram adquiridos em um equipamento Varian UNITYplus de 9,4 Tesla, utilizando-se tubos de 10 mm. O uso destes tubos possibilitou a análise de uma maior quantidade de amostra e resultou em um tempo de aquisição dos espectros menor do que utilizando-se tubos de 5 mm, como os que são usados no equipamento Bruker. Além disto, este estudo também foi importante porque propiciou o aprendizado de operação em um novo equipamento.

A figura 3.3-22 (página 150) mostra a ampliação da região de δ 0,0 a 120,0 dos espectros de RMN de ^{13}C das aguardentes de uva G2, de cana-de-açúcar PC1, de banana PB2 e de mel PM2. Comparando-se a região de δ 90,0 a 110,0 destes espectros, algumas diferenças entre eles podem ser observadas. Por exemplo, a grapa G2 apresentou os sinais em δ 94,9, 98,8, 100,8, 104,3, 107,2, referentes aos carbonos anoméricos da α -glucopiranosose (C1 – **A**), da β -glucopiranosose (C1 – **B**), da β -frutopiranosose (C2 – **C**), da α -frutofuranose (C2 – **D**) e da β -frutofuranose (C2 – **E**), respectivamente. Enquanto isso, a amostra PC1, além destes, mostrou em maior intensidade os sinais em δ 94,8 e 106,4 referentes aos carbonos C1 e C2' da sacarose (**F**). Por outro lado, os espectros das aguardentes PB2 e PM2 não apresentaram estes sinais.

A análise visual dos espectros de RMN de ^{13}C permitiu a observação de algumas diferenças entre as amostras (como as citadas acima). No entanto, quando o seu número é aumentado, esta comparação torna-se mais difícil, fazendo-se necessária a aplicação dos métodos quimiométricos, cuja utilização possibilita a análise e comparação de todos os espectros ao mesmo tempo. Com isto, possíveis diferenças entre os espectros são detectadas e evidenciadas, explicando assim, a discriminação observada.

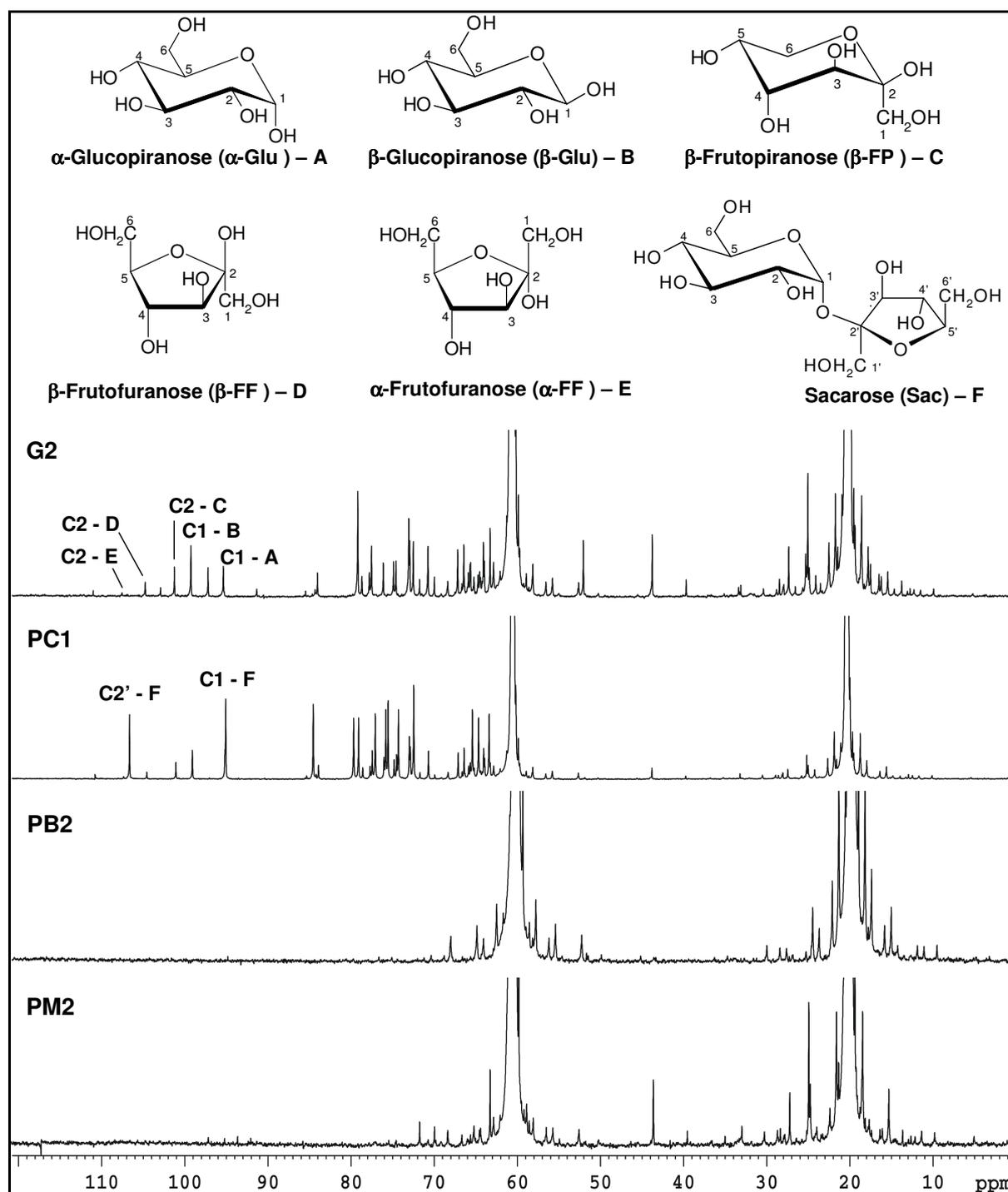


FIGURA 3.3-22. Ampliação de δ 0,0 a 120,0 dos espectros de RMN de ^{13}C das aguardentes de uva, cana-de-açúcar, banana e mel (D_2O)

Na análise por PCA, os parâmetros foram otimizados, iniciando-se pela seleção das variáveis. Foram usados todos os sinais, excluindo-se somente as regiões de ruídos e do TMS- d_4 , como pode ser visualizado no gráfico de linhas mostrado na figura 3.3-23 (página 151).

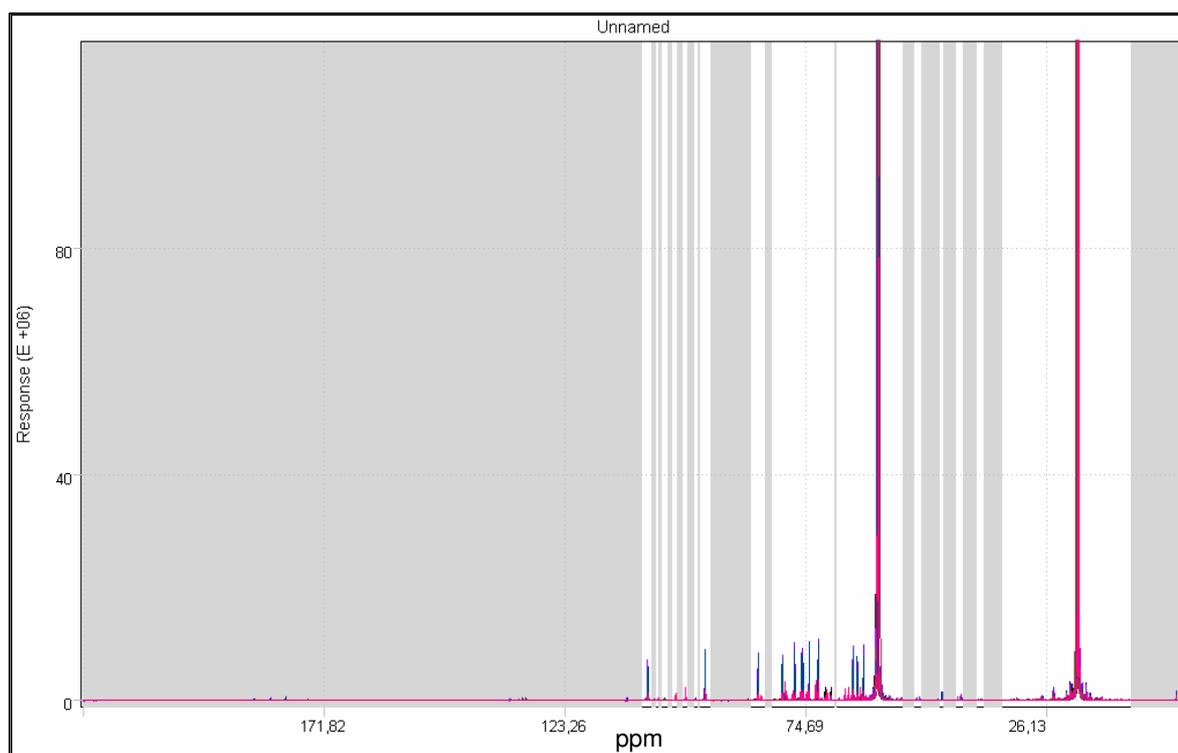


FIGURA 3.3-23. Gráfico de linhas correspondente aos dados de RMN de ^{13}C das aguardentes, as regiões excluídas na análise quimiométrica estão marcadas em cinza

A melhor discriminação foi obtida quando as transformações normalização para norma um e primeira derivada foram aplicadas aos dados, fazendo com que os sinais menos intensos do espectro de RMN de ^{13}C (carboidratos) tivessem a mesma importância que os mais intensos (etanol). Além disto, foi feito o autoescalamento dos dados.

O gráfico de *scores* de PC1 x PC2 está mostrado na figura 3.3-24 (página 152) e representa 39,1% da informação do sistema, sendo que PC1 descreve 26,1% de variância total e PC2 descreve 17,7%. Neste gráfico, as amostras localizadas próximas ao zero, tanto de PC1 quanto de PC2, não apresentaram uma boa discriminação, porém, ocorreu a formação de grupos distintos para a aguardente de mandioca (PT), em valores negativos de PC1 e PC2, e para a aguardente de cana-de-açúcar (PC10), em valores positivos de PC1. É muito provável que a grande diferença de composição destas duas amostras foi a responsável pela não discriminação das demais.

Como na análise dos dados de RMN de ^1H das aguardentes, as amostras PP1, PA1, PB1 e PCo1 (“mesma fonte”) mantiveram-se próximas, mostrando que elas apresentam uma composição química muito semelhante.

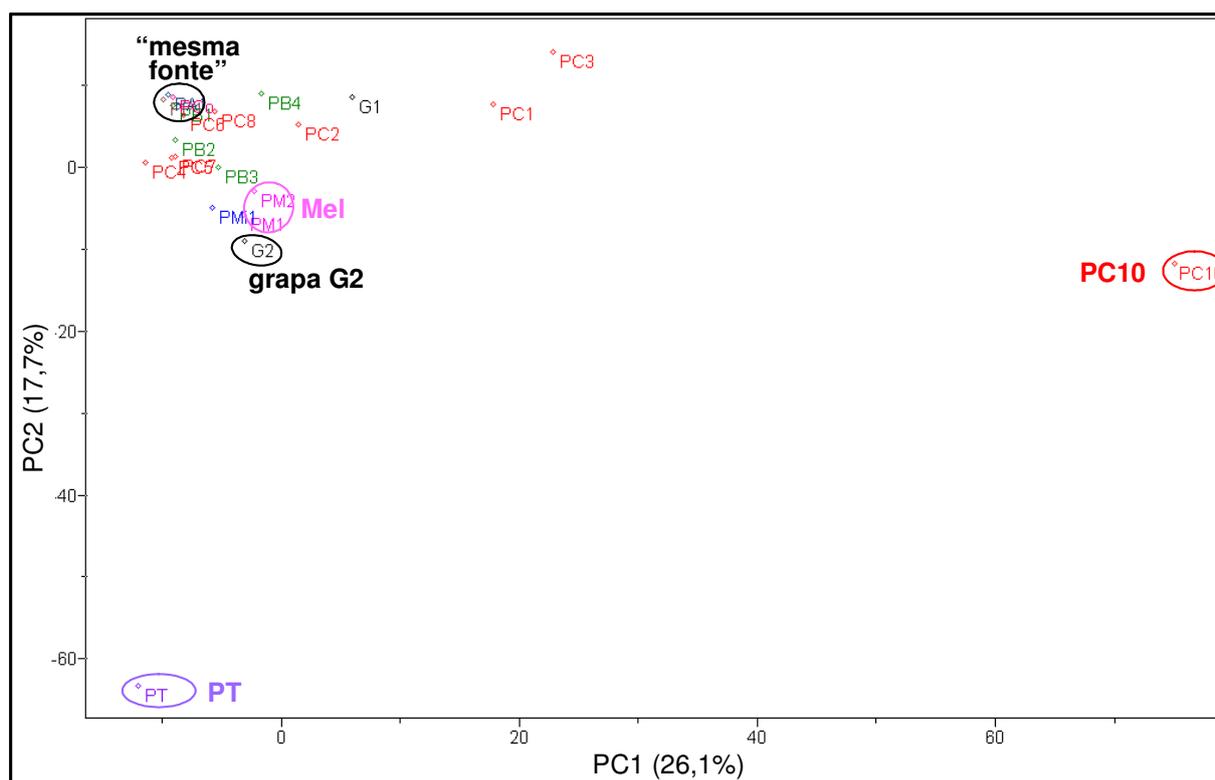


FIGURA 3.3-24. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos dados de RMN de ^{13}C das aguardentes (43,8%)

Para as amostras mostradas na figura 3.3-24, os espectros de RMN de ^{13}C foram adquiridos usando-se 32768 pontos e um período de 12 horas. No entanto, como não foi possível obter uma discriminação satisfatória das amostras, alguns testes foram realizados. O primeiro deles foi a aquisição do espectro de uma aguardente (cana-de-açúcar PC10) usando-se um número maior de pontos, equivalente a 65536 pontos (64k) e, aumentando-se, conseqüentemente, o tempo de aquisição do espectro (18 horas). Essa alteração foi realizada para verificar se o aumento na resolução espectral forneceria uma melhor discriminação das amostras. Além disto, para outras três amostras (grapa G2 e as aguardentes de mel PM1 e PM2) avaliou-se o tempo total de aquisição dos espectros, aumentando-se o mesmo para 48 horas, e mantendo-se o número de pontos igual a 32k.

Em seguida, uma nova análise por PCA foi realizada e, o gráfico de *scores* de PC1 x PC2 está apresentado na figura 3.3-25 (página 153). Nele, observa-se uma discriminação muito semelhante à apresentada anteriormente (figura 3.3-24) e, mais uma vez, o resultado foi seriamente influenciado pelo comportamento das amostras PC10 e PT. Além disto, verificou-se que os espectros da aguardente PC10, adquiridos com 32 e 64k pontos, apresentaram-se muito

semelhantes, demonstrando que o ganho de resolução obtido com o aumento do número de pontos na aquisição do espectro não foi suficiente para a obtenção de uma melhor discriminação. As amostras, cujos espectros foram adquiridos em 48 horas, também, mantiveram-se próximas das que foram adquiridas com 12 horas, mostrando que este tempo foi suficiente para a aquisição dos espectros.

Portanto, a discriminação não foi melhorada, provavelmente, porque não existem grandes diferenças entre os espectros das aguardentes analisadas, exceto as duas amostras PC10 e PT.

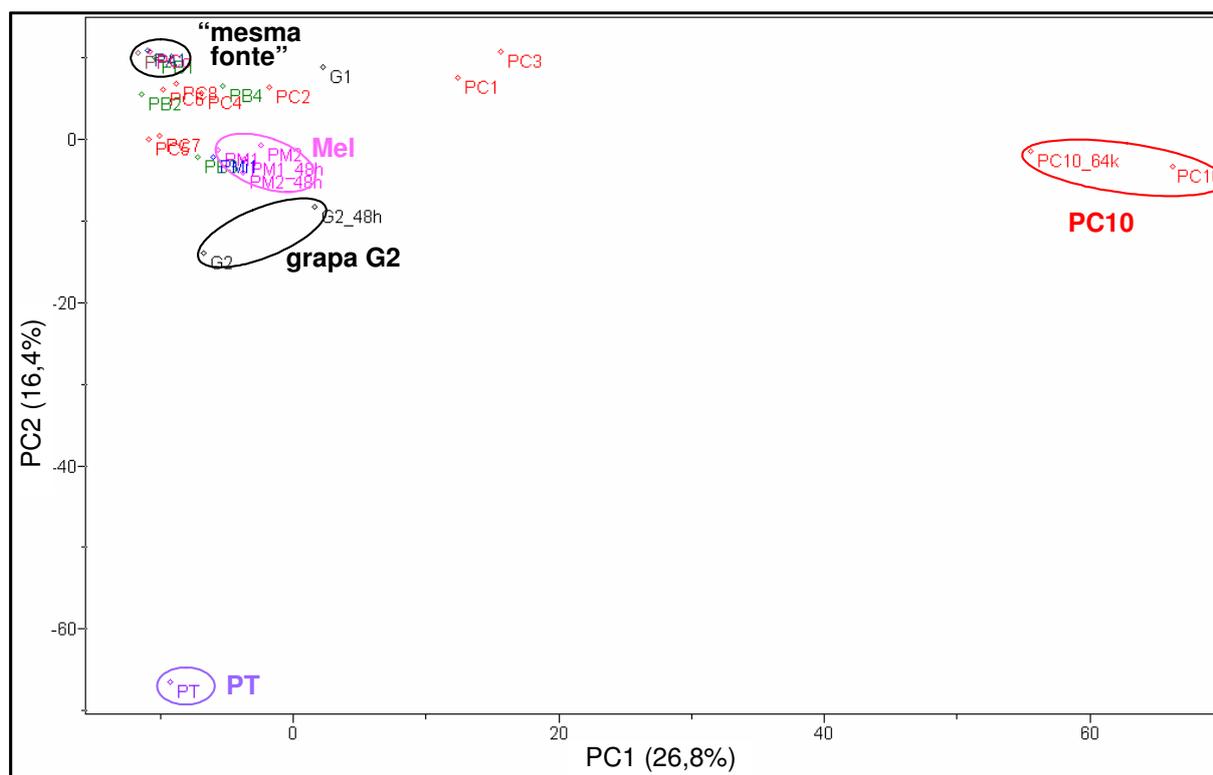


FIGURA 3.3-25. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos dados de RMN de ^{13}C das aguardentes; mais amostras (43,2%)

O dendrograma obtido da análise dos espectros de RMN de ^{13}C das aguardentes por HCA está mostrado na figura 3.3-26 (página 154). A linha pontilhada em um índice de similaridade de 0,551 distinguiu as amostras em seis grupos. As aguardentes PT e PC10 formaram grupos distintos, mas também foram formados grupos para a grapa G2, para as aguardentes de mel, e para as de cana-de-açúcar, com o agrupamento errado de algumas amostras.

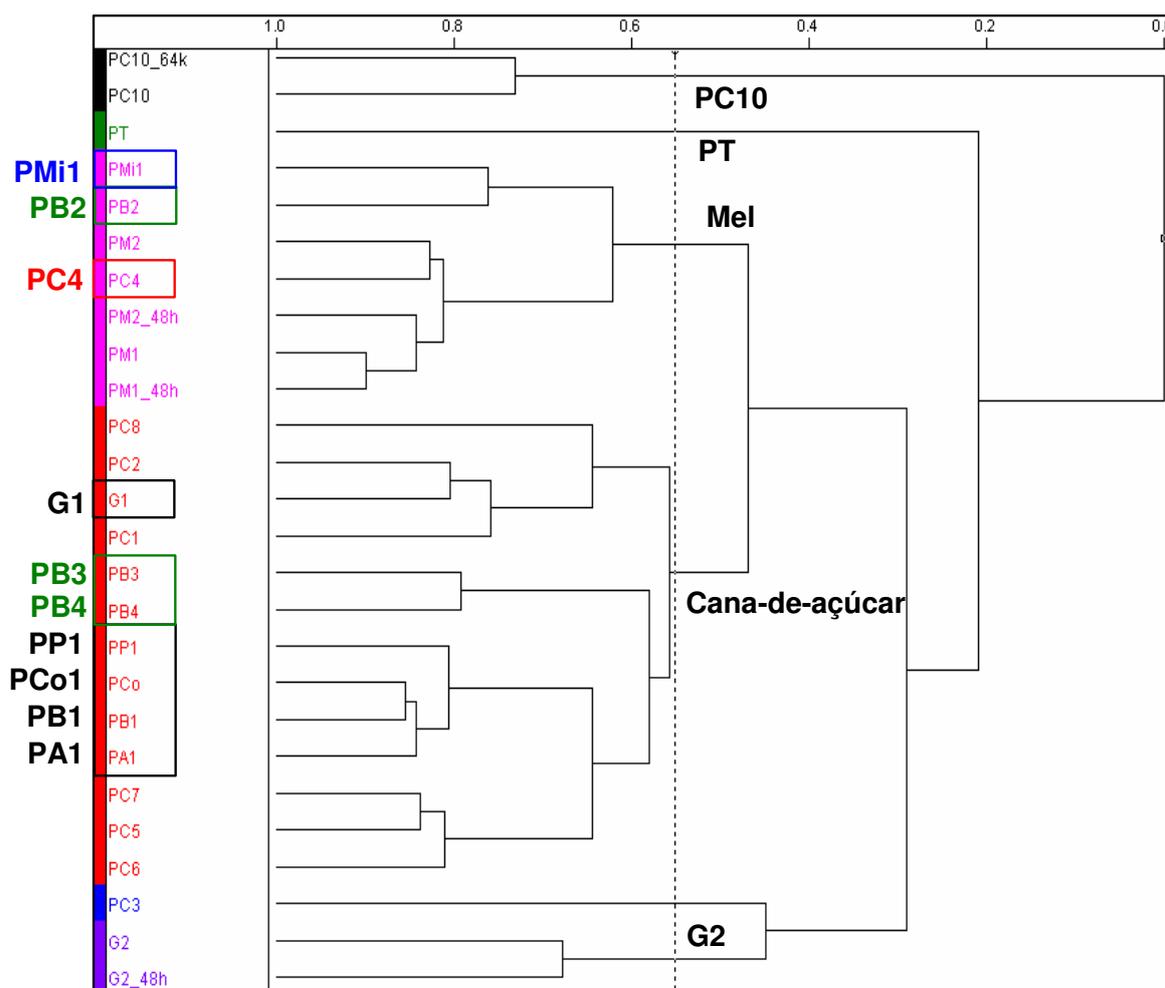


FIGURA 3.3-26. Dendrograma dos dados de RMN de ^{13}C das aguardentes (similaridade: 0,551)

As amostras em valores próximos a zero em PC1 e PC2, no gráfico de *scores* (figura 3.3-25, página 153), podem não ter sido discriminadas devido ao comportamento das aguardentes PT e PC10, que mostraram-se muito diferentes das demais, dificultando a discriminação das que apresentam uma diferença menor na sua composição. Desta forma, objetivando-se uma melhor separação entre os diferentes tipos, as amostras PT e PC10 foram excluídas para que a análise do conjunto de dados por PCA e HCA seja refeita.

O gráfico de *scores* de PC1 x PC2 obtido nesta nova análise por PCA está mostrado na figura 3.3-27 (página 155) e, representa 48,7% da informação do sistema, sendo que PC1 descreve 27,6% de variância total e PC2 21,1%. Neste gráfico pode-se ver que não houve um agrupamento entre as aguardentes de cana-de-açúcar e as de banana, mas observa-se o agrupamento entre as aguardentes de mel e a discriminação da grapa G2. Além disto, verifica-se que os espectros da grapa G2 adquiridos com 12 e 48 horas ficaram próximos. O mesmo pode ser

observado para as aguardentes de mel (PM1 e PM2) que também foram adquiridas nestas condições. Desta forma, como não foi obtida uma melhor discriminação das amostras, pode-se dizer que, o aumento de tempo (48 horas) na aquisição dos espectros não fez-se necessário.

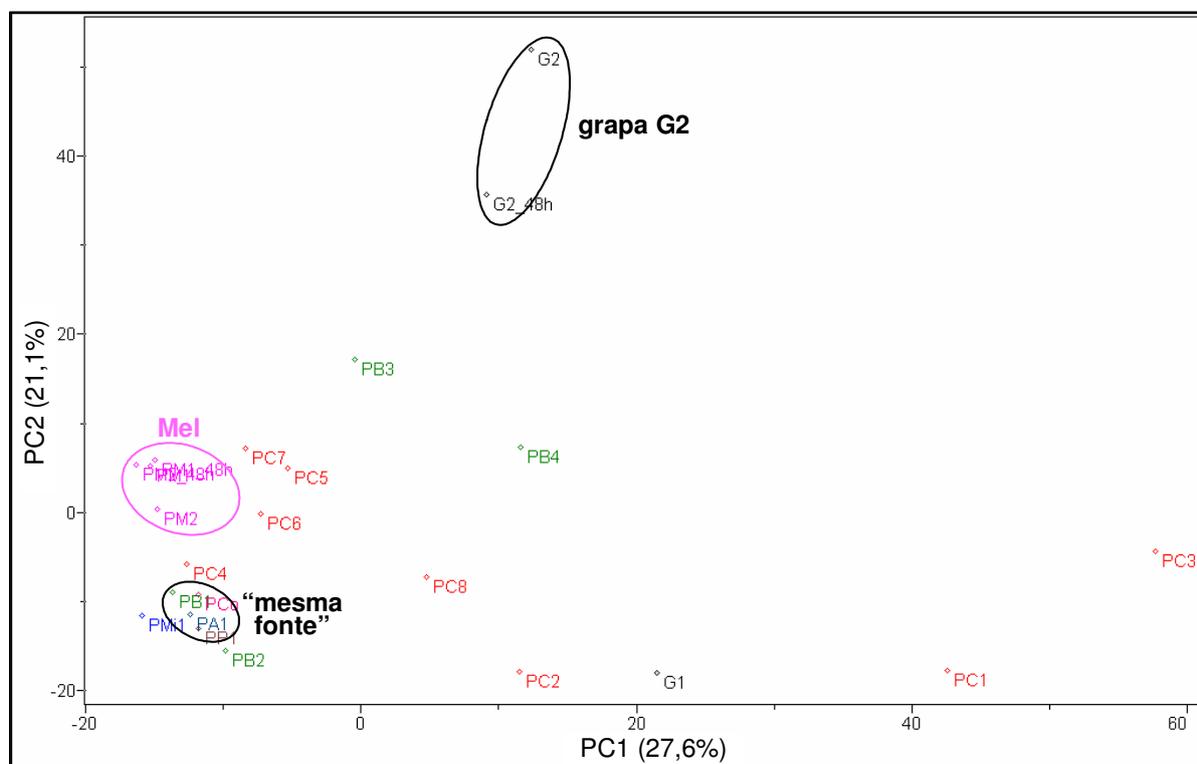


FIGURA 3.3-27. Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos dados de RMN de ^{13}C dos méis, após exclusão das aguardentes PC10 e PT (48,7%)

O dendrograma obtido na análise dos espectros de RMN de ^{13}C das aguardentes por HCA está mostrado na figura 3.3-28 (página 156). Um índice de similaridade de 0,405 distinguiu as amostras em quatro grupos. As aguardentes de cana-de-açúcar formaram dois grupos, sendo que as de milho, banana e as do mesmo produtor agruparam-se no primeiro grupo e a G1 agrupou-se às amostras do segundo. A grapa G2, cujos espectros foram adquiridos com 12 e 48 horas, formou um grupo. As aguardentes de mel também discriminaram-se, com o agrupamento errado de uma aguardente de cana-de-açúcar.

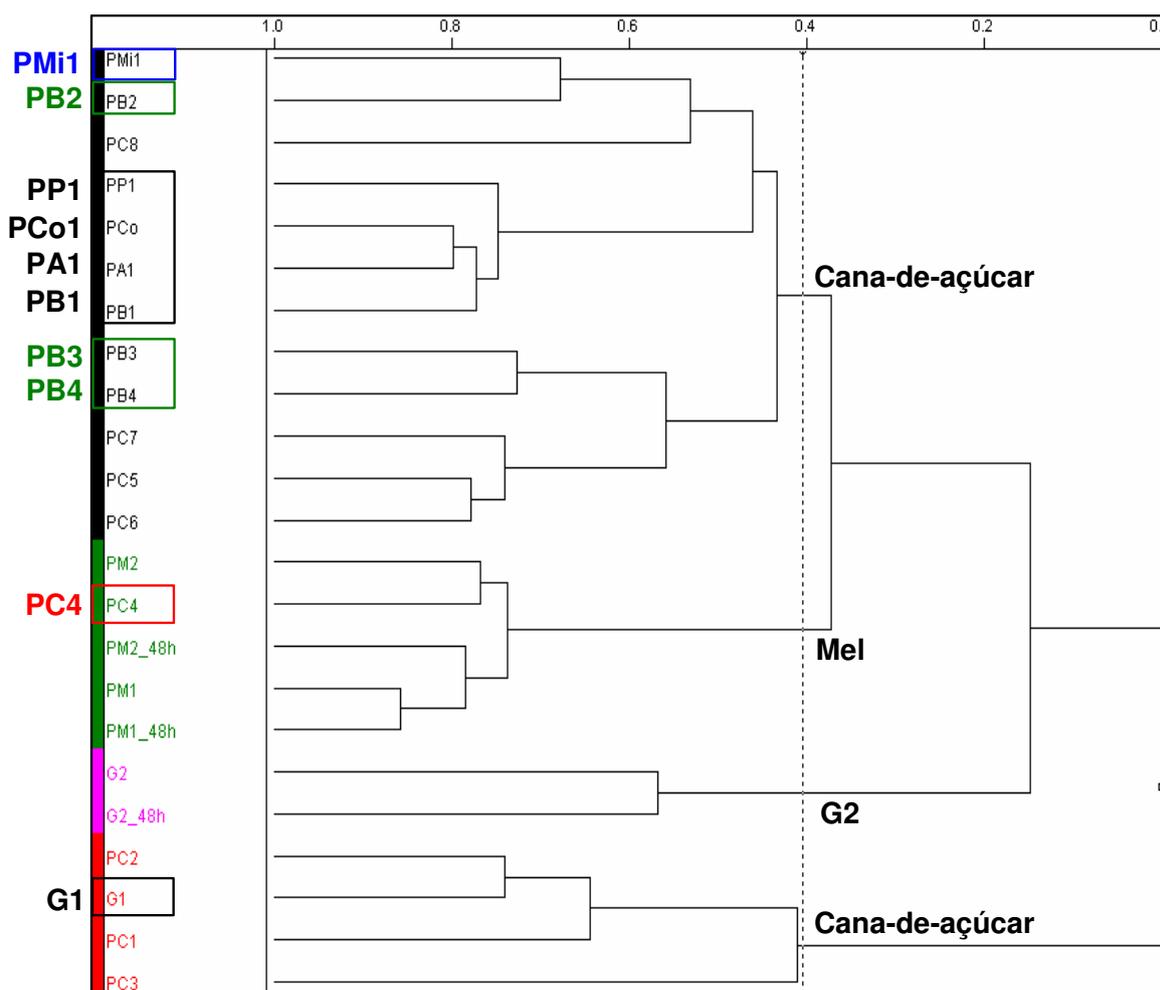


FIGURA 3.3-28. Dendrograma dos dados de RMN de ^{13}C das aguardentes, após exclusão das aguardentes PC10 e PT (similaridade: 0,405)

O resultado obtido na aplicação dos métodos quimiométricos aos espectros de RMN de ^{13}C das aguardentes não foi satisfatório, principalmente quando comparado ao resultado obtido com a aplicação dos mesmos métodos aos espectros de RMN de ^1H , os quais apresentaram a discriminação de todos os tipos de aguardentes, inclusive, daqueles que possivelmente possuíam algum tipo de adulteração. Esta discriminação pode estar relacionada com o maior número de informações obtidas em um espectro de ^1H , o que pode ser exemplificado pela multiplicidade dos sinais. Além disto, a RMN de ^1H torna-se mais atrativa devido ao menor tempo de aquisição dos espectros. Neste tipo de experimento, as medidas são muito rápidas, possibilitando assim a análise de um maior número de amostras.

3.3.3 – Identificação dos compostos presentes nas aguardentes usando a Espectroscopia de RMN

A identificação dos carboidratos presentes nas aguardentes foi realizada por comparação àquela feita nas amostras dos méis e também, pela comparação com a literatura (FAN, 1996; SOBOLEV *et al.*, 2005 e TAVARES, 2007). Devido à pequena concentração destes compostos nas amostras não foi possível realizar os experimentos de RMN bidimensionais, que auxiliariam no processo de identificação. Desta forma, os espectros de RMN de ^{13}C foram de grande utilidade na identificação dos carboidratos presentes nas amostras, como foi observado por CONSONNI *et al.* (2008b) na autenticação de vinagres balsâmicos.

A tabela 3.3-2 mostra os deslocamentos de ^{13}C dos carboidratos identificados nas aguardentes e os dados obtidos na literatura.

No espectro de RMN de ^{13}C também foi possível observar o sinal referente ao carbono da carbonila da forma ceto da frutose acíclica, em δ 217,0.

TABELA 3.3-2. Dados de RMN de ^{13}C para os carboidratos das aguardentes e da literatura

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	
	Aguardente	Literatura
α-Glucopiranosose (α-Glu) – A		
1	94,93	93,1
2	74,4	72,5
3	75,7	73,8
4	72,50 ou 72,55	70,7
5	74,2	72,4
6	63,5	61,7
β-Glucopiranosose (β-Glu) – B		
1	98,8	96,9
2	77,1	75,1
3	78,7	76,9
4	72,50 ou 72,55	70,7
5	78,7	77,0
6	63,6	61,8
β-Frutopiranosose (β-FP) – C		
1	66,8	64,9
2	100,9	99,1
3	70,4	68,5
4	72,6	70,7
5	72,1	70,1
6	66,1	64,4
β-Frutofuranose (β-FF) – D		
1	65,5	63,8
2	104,3	102,4
3	78,2	76,4
4	77,3	75,3
5	83,5	81,9
6	65,3	63,4
α-Frutofuranose (α-FF) – E		
1	65,8	63,8
2	107,2	105,5
3	85,0	82,9
4	78,9	77,0
5	84,0	82,2
6	63,9	61,9
Sacarose (Sac) – F		
1	94,89	93,2
2	73,9	72,1
3	75,5	73,6
4	72,1	70,2
5	75,2	73,4
6	62,9	61,1
1'	64,2	62,3
2'	106,4	104,7
3'	79,3	77,6
4'	76,8	75,0
5'	84,2	82,2
6'	65,2	63,3

3.4 – CONCLUSÕES

A utilização da técnica SNIF-NMR na verificação da autenticidade das aguardentes mostrou que a análise isotópica permite identificar adulterações que não são observadas pelas demais técnicas de análise química, uma vez que o etanol é quimicamente o mesmo, mas diferenças podem ser encontradas analisando-se o deutério em abundância natural. Neste estudo foi possível discriminar as aguardentes padrão obtidas de plantas oriundas dos ciclos biossintéticos C_3 e C_4 . Esta técnica, também, permitiu a diferenciação das aguardentes feitas a partir dos açúcares de CAM (abacaxi) com relação às anteriores. Além disto, foram observadas adulterações em amostras que são comercializadas como oriundas de açúcares de plantas C_3 (uva, banana, coco e pêsego) e CAM (abacaxi), mas na realidade são produzidas a partir dos açúcares de plantas C_4 (cana-de-açúcar e milho).

No entanto, a técnica SNIF-NMR não permitiu a discriminação das aguardentes que são obtidas de plantas C_3 . Mas a aplicação dos métodos quimiométricos PCA e HCA aos espectros de RMN de 1H das aguardentes foi capaz de verificar e distinguir os diferentes tipos de amostras, uma vez que conseguiram detectar as pequenas diferenças em suas composições químicas e evidenciaram as substâncias mais importantes para a discriminação.

A análise por PCA e HCA dos espectros de RMN de ^{13}C das aguardentes mostrou que aquelas amostras com características muito diferentes puderam ser discriminadas. No entanto, a separação das demais aguardentes não foi observada. Além disto, a aplicação da quimiometria aos espectros de RMN de 1H forneceu uma melhor discriminação, além de ser medidas mais rápidas do que a RMN de ^{13}C .

Os carboidratos presentes nas aguardentes puderam ser identificados através da análise dos espectros de RMN de ^{13}C e por comparação com a literatura. Alguns outros compostos, como os ácidos cítrico e acético, a acetona e o acetato de etila também foram identificados por adição de padrão e observação dos sinais que se intensificavam nos espectros de RMN de 1H .

Capítulo 4

Considerações Finais

A RMN mostrou ser uma técnica muito eficiente para ser usada na análise de méis e de aguardentes. A possibilidade de analisá-los sem a necessidade de etapas de extração e purificação da amostra, evitando que haja alterações na sua composição química, é um fator muito importante.

Se comparada a outras técnicas analíticas, outra vantagem da RMN está relacionada à aquisição dos dados, que é feita de forma rápida e fácil: um espectro de RMN de ^1H geralmente é obtido em poucos minutos. Além disto, quando aliado à quimiometria, este espectro mostra informações muito importantes: por exemplo, possibilita a discriminação de cada tipo de mel e aguardente estudado evidenciando, também, os sinais espectrais responsáveis pela separação observada, que podem ser relacionados à estrutura dos compostos utilizando-se as técnicas de RMN bidimensionais, usadas para elucidação estrutural.

A técnica SNIF-NMR mostrou-se capaz de verificar a autenticidade das amostras analisadas, permitindo observar adulterações feitas usando o açúcar oriundo da cana-de-açúcar. Porém, a sua utilização não permitiu a diferenciação das amostras que foram obtidas a partir de açúcares de plantas que realizam o ciclo C_3 para a fixação do CO_2 . Entretanto, analisando-se os espectros de RMN de ^1H pelos métodos quimiométricos esta discriminação foi obtida, fazendo desta uma análise absolutamente necessária.

Estes resultados mostram a importância de se analisar a mesma amostra utilizando-se várias técnicas, uma vez que estas fornecem respostas diferentes, mas que se complementam e fornecem um número maior de informações com relação à autenticidade das amostras.

Devido a estas vantagens, as técnicas de RMN são extremamente úteis na verificação da autenticidade e no controle de qualidade de alimentos, podendo ser aplicadas no estudo de muitos outros. Certamente, para que a técnica de RMN torne-se uma ferramenta analítica possível de ser aplicada comercialmente, faz-se necessária a análise de um número de amostras mais representativo, visando montar um banco de dados que reflita tanto as variações regionais quanto as possíveis variações em função de lotes específicos na produção comercial.

Capítulo 5

Referências Bibliográficas

ABRABE – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS, 2008, disponível em <http://www.abrabe.org.br>, acessado em 27/06/2008.

ALAM, T. M & ALAM, M. K. “Chemometric Analysis of NMR spectroscopy data: a review”. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **54**: 41 – 80, 2005.

Aliceweb, MDIC – SISTEMA DE ANÁLISE DAS INFORMAÇÕES DE COMÉRCIO EXTERIOR VIA INTERNET, SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR DO MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, 2008, disponível em <http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br>, acessado em 27/06/2008.

ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B. S. & FRANCO, D. W. “Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa)”. *Quim. Nova*, **25** (6B): 1074 – 1077, 2002.

ANGELOV, M. N.; SUN, J.; BYRD, G. T.; BROWN, R. H. & BLACK, C. C. “Novel characteristics of cassava, *Manihot esculenta* Crantz, a reputed C3-C4 intermediate photosynthesis species”. *Photosynth. Res.*, **38** (1): 61 – 72, 1993.

BAUER-CHRISTOPH, C.; CHRISTOPH, N.; AGUILAR-CISNEROS, B. O.; LÓPEZ, M. G.; RICHLING, E.; ROSSMANN, A. & SCHREIER, P. “Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses”. *Eur. Food Res. Technol.*, **217**: 438 – 443, 2003.

BECKONERT, O.; BOLLARD, M. E.; EBBELS, T. M. D.; KEUN, H. C.; ANTTI, H.; HOLMES, E.; LINDON, J. C. & NICHOLSON, J. K. NMR-based metabonomic toxicity classification: hierarchical cluster analysis and k-nearest-neighbor approaches. *Anal. Chim. Acta*, **490**: 3 – 15, 2003.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J. & SEASHOLTZ, M. B. *Chemometrics: a practical guide*. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1998.

BELTON, P. S.; COLQUHOUM, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, K. & SPRAUL, M. “Application of chemometrics to the ^1H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties”. *Food Chem.*, **61**(2): 207 – 213, 1998.

BOFFO, E. F. & FERREIRA, A. G. “Determinação da Origem Biossintética de Ácido Acético Através da Técnica SNIF-NMR”. *Quím. Nova*, **29**: 456 - 458, 2006.

BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G.; FERREIRA, M. M. C. & TOBIAS, A. C. T. “Adulteration study in Brazilian honey by SNIF and ^1H NMR”. IN: *Magnetic Resonance in Food Science. From Molecules to Man*. FARHAT, I. A.; BELTON, P. S.; WEBB, G. A. (Eds.). Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007, p. 105 – 113.

BRASIL, Decreto Presidencial nº 2.314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 set 1997.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 out 2000.

BRASIL, Decreto Presidencial nº 4.851, de 02 de outubro de 2003. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 out 2003.

BRANDEN, K. V. & HUBERT, M. "Robust classification in high dimensions based on the SIMCA Method". *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **79**: 10 – 21, 2005.

BRAUN, S.; KALINOWSKI, H.-O. & BERGER, S. *100 and More Basic NMR Experiments. A Practical Course*. New York, VCH, 1996.

BRESCIA, M. A.; CALDAROLA, V.; DE DIGLIO, A.; BENEDETTI, D.; FANIZZI, F. P. & SACCO, A. "Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations". *Anal. Chim. Acta*, **458**: 177 – 186, 2002.

BRERETON, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Chichester, Wiley, 2002.

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F. & GODOY, R. L. "Classificação do mel em floral ou mel de melato". *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **23** (1): 1 – 5, 2003.

CALIGIANI, A.; ACQUOTTI, D.; PALLA, G. & BOCCHI, V. "Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ¹H NMR spectroscopy". *Anal. Chim. Acta*, **585**: 110 – 119, 2007.

CARDOSO, D. R.; LIMA-NETO, B. S. & FRANCO, D. W. "Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. Parte II". *Quim. Nova*, **26** (2): 165 – 169, 2003.

CARDOSO, D. R.; ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; LIMA-NETO, B. S. & FRANCO, D. W. "A rapid and sensitive method for dimethylsulphide analysis in brazilian sugar cane sugar spirits and other distilled beverages". *J. Braz. Chem. Soc.*, **15** (2): 277 – 281, 2004.

CAZOR, A.; DEBORDE, C.; MOING, A.; ROLIN, D. & THIS, H. "Sucrose, glucose, and fructose extraction in aqueous carrot root extracts prepared at different temperatures by means of direct NMR measurements". *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 4681 – 4686, 2006.

CIOSEK, P.; BRZÓZKA, Z.; WRÓBLEWSKI, W.; MARTINELLI, E.; DI NATALE, C. & D'AMICO, A. "Direct and two-stage data analysis procedures based on PCA, PLS-DA and ANN for ISE-based electronic tongue – Effect of supervised feature extraction". *Talanta*, **67**: 590 – 596, 2005.

CLARIDGE, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Oxford, Pergamon Press, 1999.

COLQUHOUN, I. J. & LEES, M. "Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy". IN: *Analytical methods of food authentication*. ASHURT, P. R. & DENNIS, M. J. (Eds.). London, Blackie Academic and Professional, 1998, p. 36 – 75.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB), disponível em <http://www.conab.gov.br>, acessado em 14/04/2008.

CONSONNI, R & GATTI, A. "¹H NMR studies on italian balsamic and traditional balsamic vinegars". *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 3446 – 3450, 2004.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; BENEVELLI, F.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E. & STOCCHERO, M. "NMR and Chemometric methods: A powerful combination for characterization of Balsamic and Traditional Balsamic Vinegar of Modena" *Anal. Chim. Acta*, **611**: 31 – 40, 2008a.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; RINALDINI, S. & INCERTI, A. "Analytical method for authentication of Traditional Balsamic Vinegar of Modena". *Talanta*, **75**, 765 – 769, 2008b.

COTTE, J. F.; CASABIANCA, H.; CHARDON, S.; LHERITIER, J. & GRENIER-LOUSTALOT, M. F. "Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity". *J. Chromatogr. A*, **1021**: 145 – 155, 2003.

COTTE, J. F.; CASABIANCA, H.; LHÉRITIER, J.; PERRUCCHIETTI, C.; SANGLAR, C.; WATON, H. & GRENIER-LOUSTALOT, M. F. "Study and validity of ¹³C stable carbon isotopic ratio analysis by mass spectrometry and ²H site-specific natural isotopic fractionation by nuclear magnetic resonance isotopic measurements to characterize and control the authenticity of honey". *Anal. Chim. Acta*, **582**: 125 – 136, 2007.

CROSS, J. L.; GALLAHER, T. N.; LEARY, J. J. & SCHREINER S. "The Application of Site-Specific Natural Isotope Fractionation – Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR) to the Analysis of Alcoholic Beverages". *The Chemical Educator*, **3** (5): 1 – 9, 1998.

CUNY, M.; LE GALL, G.; COLQUHOUN, I. J.; LEES, M. & RUTLEDGE, D. N. "Evolving window zone selection method followed by independent component analysis as useful chemometric tools to discriminate between grapefruit juice, orange juice and blends". *Anal. Chim. Acta*, **597**: 203 – 213, 2007.

CUNY, M.; VIGNEAU, E.; LE GALL, G.; COLQUHOUN, I.; LEES, M. & RUTLEDGE, D. N. "Fruit juice authentication by ¹H NMR spectroscopy in combination with different chemometrics tools". *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**: 419 – 427, 2008.

DANHO, D.; NAULET, N.; MARTIN, G. J. "Deuterium, carbon and nitrogen isotopic analysis of natural and synthetic caffeine. Authentication of coffees and coffee extracts". *Analisis*, **20** (3): 179 – 184, 1992.

- DE MARIA, C. A. B. & MOREIRA, R. F. A. "Compostos voláteis em méis florais". *Quim. Nova*, **26** (1): 90 – 96, 2003.
- DEFERNEZ, M. & COLQUHOUN, I. J. "Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ^1H NMR spectra". *Phytochemistry*, **62**: 1009 – 1017, 2003.
- DEVILLERS, J.; MORLOT, M.; PHARM-DELEGUE, M. H. & DORÉ, J. C. "Classification of monofloral honeys based on their quality control data". *Food Chem.* **86**: 305 – 312, 2004.
- DUARTE, I.; BARROS, A.; BELTON, P. S.; RIGHELATO, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E. & GIL, A. M. "High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer". *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 2475 – 2481, 2002.
- EDWARDS, G. E.; SHETA, E.; MOORE, B. D.; DAI, Z.; FRANCESCHI, V. R.; CHENG, S. H.; LIN, C. H. & KU, M. S. B. "Photosynthetic characteristics of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), a C₃ species with chlorenchymatous bundle sheath cells". *Plant Cell Physiol.*, **31** (8): 1199 – 1206, 1990.
- EDWARDS, G. E.; FRANCESCHI, V. R.; KU, M. S. B.; VOZNESENSKAYA, E. V.; PYANKOV, V. I.; ANDREO, C. S. "Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C₄ plants". *J. Exp. Bot.*, **52** (356): 577 – 590, 2001.
- ESTI, M.; PANFILI, G.; MARCONI, E.; TRIVISONNO, M. C. "Valorization of honeys from the Molise region through physico-chemical, organoleptic and nutritional assessment". *Food Chem.*, **58** (1-2): 125 – 128, 1997.
- FALLICO, B.; ZAPPALÀ, M.; ARENA, A. & VERZERA, A. "Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys". *Food Chem.*, **85**: 305 – 313, 2004.
- FAN, T. W.-M. "Metabolite profiling by one- and two- dimensional NMR analysis of complex mixtures". *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **28**: 161 – 219, 1996.
- FAN, T. W.-M. & LANE, A. N. "Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR". *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **52**: 69 – 117, 2008.
- FAO-ONU – ORGANIZAÇÃO PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA DAS NAÇÕES UNIDAS, 2008, disponível em <http://www.fao.org>, acessado em 26/06/2008.
- FERREIRA, M. M. C.; FARIA, C. G. & PAES, E. T. "Oceanographic characterization of northern São Paulo Coast: a chemometric study". *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **47**: 289 – 297, 1999.
- FERRÃO, M. F.; CARVALHO, C. W.; MULLER, E. I. & DAVANZO, C. U. "Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS". *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **24**: 333 – 340, 2004.

GAVAGHAN, C. L.; WILSON, I. D. & NICHOLSON, J. K. "Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: use of orthogonal signal correction and PLS-DA". *FEBS Lett.*, **530**: 191 – 196, 2002.

GIDAMIS, A. B.; CHOVE, B. E.; SHAYO, N. B.; NNKO, S. A. & BANGU, N. T. "Quality evaluation of honey harvested from selected areas in Tanzania with special emphasis on hydroxymethyl furfural (HMF) levels". *Plant Foods for Human Nutrition*, **59**: 129 – 132, 2004.

GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; DELGADILLO, I.; COLQUHOUN, I. J.; CASUSCELLI, F.; HUMPFER, E. & SPRAUL, M. "Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy". *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 1524 – 1536, 2000.

GIL, A. M.; DUARTE, I. F.; GODEJOHANN, M.; BRAUMANN, U.; MARASCHIN, M. & SPRAUL, M. "Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance spectrometry and liquid chromatography with nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection". *Anal. Chim. Acta*, **488**: 35 – 51, 2003.

GIRADON, S.; DANZART, M. & MERLE, M. H. "Deuterium Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Stable Carbon Isotope Ratio Analysis/Mass Spectrometry of certain monofloral honeys". *J. AOAC Int.*, **83** (6): 1401 – 1409, 2000.

GOUX, J. W. "Complex isomerization of ketoses: A ^{13}C NMR study of the base-catalyzed ring-opening and ring-closing rates of D-fructose isomers in aqueous solution". *J. Am. Chem. Soc.*, **107**: 4320 – 4327, 1985.

HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOG, R. C. & LONG, S. P. *Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A Field and Laboratory Manual*. New York, Chapman & Hall, 1995.

HERMANN, A. "Determination of D/H isotope ratio in acetic acid from vinegars and pickled products by ^2H -NMR-spectroscopy". *Eur. Food Res. Technol.* **212**: 683 – 686, 2001.

IBRAC – INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA, 2008, disponível em <http://www.ibraccachacas.org>, acessado em 27/06/2008.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008, disponível em <http://www.ibge.gov.br>, acessado em 14/04/2008.

JALALI-HERAVI, M.; MASOUM, S. & SHAHBAZIKHAH, P. "Simulation of ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of lignin compounds using principal component analysis and artificial neural networks". *J. Magn. Reson.*, **171**: 176 – 185, 2004.

KELLY, J. F.; DOWNEY, G. & FOURATIER, V. "Initial study of honey adulteration by sugar solutions using Midinfrared (MIR) Spectroscopy and Chemometrics". *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 33 – 39, 2004.

KOKKINOFTA, R & THEOCHARIS, C. “Chemometric Characterization of the Cypriot Spirit “Zivania””. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5067 – 5073, 2005.

KOSHIO, S. & MURADIAN, L. B. A. “Aplicação da CLAE para determinação do ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) em geléia real e adicionada a mel brasileiro”. *Quím. Nova*, **26** (5): 670 – 673, 2003.

KOSIR, I. J.; KOCJANCIC, M; OGRINC, N. & KIDRIC, J. “Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines)”. *Anal. Chim. Acta*, **429**: 195 – 206, 2001.

LACHENMEIER, D. W. “Rapid screening for ethyl carbamate in stone-fruit spirits using FTIR spectroscopy and chemometrics”. *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**: 1407 – 1412, 2005.

LACHENMEIER, D. W.; RICHLING, E.; LÓPEZ, M. G.; FRANK, W. & SCHREIER, P. “Multivariate Analysis of FTIR and Ion Chromatographic Data for the Quality Control of Tequila”. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2151 – 2157, 2005.

LACHENMEIER, D. W. “Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra”. *Food Chem.*, **101**: 825 – 832, 2007.

LARSEN, F. H.; VAN DEN BERG, F. & ENGELSEN, S. B. “ An exploratory chemometric study of ¹H NMR spectra of table wines”. *J. Chemom.*, **20**: 198 – 208, 2006.

LAVINE, B. & WORKMAN, J. “Chemometrics”. *Anal. Chem.*, **78**: 4137 – 4145, 2006.

LE GALL, G.; COLQUHOUN, I.J.; DAVIS, A. L.; COLLINS, G. J. & VERHOEYEN, M. E. “Metabolite Profiling of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Using 1H NMR Spectroscopy as a Tool To Detect Potential Unintended Effects Following a Genetic Modification”. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 2447 – 2456, 2003.

LEITE, J. M. C.; TRUGO, L. C.; COSTA, L. S. M.; QUINTEIRO, L. M. C.; BARTH, O. M.; DUTRA, V. M. L. & MARIA, C. A. B. “Determination of oligosaccharides in brazilian honeys of different botanical origin”. *Food Chem.*, **70**: 93 – 98, 2000.

LEHNINGER, A. L. *Bioquímica. Biossíntese e a utilização da energia das ligações de fosfato* (Vol. 3). São Paulo, Edgard Blücher, 2006.

LEYDEN, D. E. & COX, R. H. *Analytical Applications of NMR*. New York, Wiley-Interscience Publication, 1977, v. 48.

LIMA-NETO, B. S.; BEZERRA, C. W. B.; POLASTRO, L. R.; CAMPOS, P.; NASCIMENTO, R. F.; FURUYA, S. M. B. & FRANCO, D. W. “O cobre em aguardentes brasileiras: sua quantificação e controle”. *Quím. Nova* **17**: 220 – 223, 1994.

LINDNER, P.; BERMAN, E. & GAMARNIK, B. "Characterization of citrus honey by deuterium NMR". *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 139 – 140, 1996.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. "Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance". *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **39**: 1 – 40, 2001.

LOLLI, M.; BERTELLI, D.; PLESSI, M.; SABATINI, A. G. & RESTANI, C. "Classification of Italian Honeys by 2D HR-NMR". *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 1298 – 1304, 2008.

LÜTTRINGHAUS, A. & DIRKSEN, H. W. "Tetramethylurea as a solvent and reagent [1]". *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **3** (4): 260 – 269, 1964.

MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P. & SEGRE, A., "Olive oil as seen by NMR and chemometrics". *Spectroscopy Europe*, **15** (3), 6 – 14, 2003.

MARTIN, G. J.; MARTIN, M. L.; MABON, F. & MICHON, M. J. "A new method for the identification of the origin of ethanols in grain and fruit spirits: High-field quantitative deuterium Nuclear Magnetic Resonance at the natural abundance level". *J. Agric. Food Chem.*, **31**: 311 – 315, 1983.

MARTIN, G. J.; ZHANG, B. L.; NAULET, N. & MARTIN, M. L. "Deuterium transfer in the bioconversion of glucose to ethanol studied by specific isotope labeling at the natural abundance level". *J. Am. Chem. Soc.*, **108**: 5116 – 5122, 1986.

MARTIN, G. J.; GUILLOU, C.; MARTIN, M. I.; CABANIS, M. T.; TEP, Y. & AERNY, J. "Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines". *J. Agric. Food Chem.*, **36**: 316 – 322, 1988.

MARTIN, M. L.; MARTIN, G. J. & GUILLOU, C. "A Site-Specific and Multi-Element Isotopic Approach to Origin Inference of Sugars in Food and Beverages". *Mikrochimica Acta*, **II**: 81 – 91, 1991.

MARTIN, G. J.; MARTIN, M. L. & ZHANG, B. L. "Site-specific natural isotope fractionation of hydrogen in plant products studied by nuclear isotope fractionation." *Plant Cell and Environment* **15**: 1037 – 1050, 1992.

MARTIN, G.; GUILLOU, C. & MARTIN; Y. L. "SNIF-NMR for detection of sugar addition to fruit juices". *Fruit Processing*, **5** (8): 246 – 254, 1995.

MARTIN, G. "Advances in the authentication of food by SNIF-NMR". IN: *Magnetic Resonance in Food Science. The Multivariate Challenge*. ENGELSEN, S. B.; BELTON, P. S.; JAKOBSEN, H. J. (Eds.). Cambridge, Royal Society of Chemistry, 2005, p. 31 – 38.

MARTINA, V.; IONESCU, K.; PIGANI, L.; TERZI, F.; ULRICI, A.; ZANARDI, C.; SEEBER, R. "Development of an electronic tongue based on a PEDOT-modified voltammetric sensor". *Anal. Bioanal. Chem.* **387**: 2101 – 2110, 2007.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. M.; MICHOTTE, Y. & KAUFMAN, L. *Data Handling in Science and Technology (Vol. 2: Chemometrics: a textbook)*. Amsterdam, Elsevier, 2001.

MASOUM, S.; BOUVERESSE, D. J.-R.; VERCAUTEREN, J.; JALALI-HERAVI, M.; RUTLEDGE, D. N. "Discrimination of wines based on 2D NMR spectra using learning vector quantization neural networks and partial least squares discriminant analysis". *Anal. Chim. Acta* **558**: 144 – 149, 2006.

MOREIRA, R. F. & DE MARIA, C. A. B. "Glicídios no mel". *Quím. Nova*, **24** (4): 516 – 525, 2001.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N. & FERREIRA, M. M. C. "Aplicação da Análise Exploratória na Diferenciação de Vegetais". *Braz. J. Food Technol.*, **2** (1,2): 73 – 79, 1999.

NASCIMENTO, R. F.; MARQUES, J. C.; LIMA NETO, B. S.; KEUKELEIRE, D. E. FRANCO, D. W. "Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages". *J. Chromatogr. A*. **782**: 13 – 23, 1997.

NEVES, E. A.; OLIVEIRA, A.; FERNANDES, A. P. & NÓBREGA, J. A. "Simple and efficient elimination of copper(II) in sugar-cane spirits". *Food Chem.*, **101**: 33 – 36, 2007.

OGRINC, N.; KOSIR, I. J.; KOCJANCIC, M & KIDRIC, J. "Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses". *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 1432 – 1440, 2001.

OGRINC, N.; KOSIR, I. J.; SPANGENBERG, J. E. & KIDRIC, J. "The application of NMR methods for detection of adulteration of wines, fruit juices, and olive oil. A review." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **376**: 424 – 430, 2003.

PADOVAN, G. J.; JONG, D.; RODRIGUES, L. P. & MARCHINI, J. S. "Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio". *Food Chem.*, **82**: 633 – 636, 2003.

PARADKAR, M. M. & IRUDAYARAJ, J. "Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman Spectroscopy". *Food Chem.*, **76**: 231 – 239, 2001.

PAULI, G. F.; JAKI, B. U. & LANKIN, D. C. "Quantitative ^1H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis". *J. Nat. Prod.* **68**: 133 – 149, 2005.

PETRAKIS, P.; TOURIS, I.; LIOUNI, M.; ZERVOU, M. KYRIKOU, I.; KOKKINOFTA, R.; THEOCHARIS, C. R. & MAVROMOUSTAKOS, T. M. "Authenticity of the traditional typriot tpirit "Zivania" on the basis of ^1H NMR spectroscopy diagnostic parameters and statistical analysis". *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 5293 – 5303, 2005.

PIERCE, S.; WINTER, K. & GRIFFITHS, H. "Carbon isotope ratio and extent of daily CAM use of Bromeliaceae." *New Phytologist*, **156**: 75 – 83, 2002.

PIONNIER, S.; ROBINS, R. J. & ZHANG, B.-L. "Natural abundance hydrogen isotope affiliation between the reactants and the products in glucose fermentation with yeast". *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 2076 – 2082, 2003.

PIROUETTE[®], Manual do programa para análise quimiométrica, versão 4.0. Infometrix, Woodinville, 1985-2007.

PRESTES, R. A.; COLNAGO, L. A.; FORATO, L. A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E. H. & CARRILHO, E. "A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds". *Anal. Chim. Acta*, **596**: 325 – 329, 2007.

RABINOWITCH, E. & GOVINDJEE, D. *Photosynthesis*. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1969.

RIZZO, V. & PINCIROLI, V. "Quantitative NMR in synthetic and combinatorial chemistry". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**: 851 – 857, 2005.

ROBINS, R. J.; BILLAULT, I.; DUAN, J.-R.; GUIET, S.; PIONNIER, S. & ZHANG, B.-L. "Measurement of ²H distribution in natural products by quantitative ²H NMR: An approach to understanding metabolism and enzyme mechanism?". *Phytochem. Rev.*, **2**: 87 – 102, 2003.

RUIZ-MATUTE, A. I.; SORIA, A. C.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. & SANZ, M. L. "A new methodology based on GC-MS to detect honey adulteration with commercial syrups". *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 7264 – 7269, 2007.

SANDUSKY, P. & RAFTERY, D. "Use of selective TOCSY NMR experiments for quantifying minor components in complex mixtures: Application to the metabonomics of amino acids in honey" *Anal. Chem.*, **77**: 2455 – 2463, 2005.

SANZ, M. L.; CASTILLO, M. D.; CORZO, N. & OLANO, A. "2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality". *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 4278 – 4283, 2003.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C.; OLIVEIRA RODRIGUES, R. F. EBERLIN, M. N. "Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*". *Apidologie*, **37**: 398 – 407, 2006.

SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR (SECEX)/ MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR (MDIC), 2004, disponível em <http://www.midc.gov.br>, acessado em 02/08/2005.

SEBRAE. Diagnóstico da cachaça de Minas Gerais. Belo Horizonte, 241 p., 2001.

SEBRAE AGRONEGÓCIOS. Desafios da apicultura brasileira. **3**, 10 – 11, 2006.

SEBRAE. BOLETIM MAIO 2008. Disponível em <http://www.sebrae.com.br>, acessado em 27/06/2008.

- SIVAKESAVA, S. & IRUDAYARAJ, J. "A rapid spectroscopic technique for determining honey adulteration with corn syrup". *J. Food Sci.: Food Chem. Toxicol.*, **66** (6): 787 – 792, 2001.
- SOBOLEV, A. P.; SEGRE, A. L. & LAMANNA, R. "Proton high-field NMR study of tomato juice" *Magn. Reson. Chem.*, **41**: 237 – 245, 2003.
- SOBOLEV, A. P.; BROSIO, E.; GIANFERRI, R. & SEGRE, A. L. "Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra". *Magn. Reson. Chem.*, **43**: 625 – 638, 2005.
- SPANO, N.; CASULA, L.; PANZANELLI, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SCANU, R.; TAPPARO, A. & SANNA, G. "An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey". *Talanta*, **68**: 1390 – 1395, 2006.
- TAVARES, L. A. *Utilização de Métodos Quimiométricos Aliados a RMN na Caracterização dos Diferentes Tipos de Cafés Comerciais*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2007. Tese de doutorado, 169 p.
- TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G.; FERREIRA, M. M. C.; CORREA, A.; MATTOSO, L. H. Analysis of blends of raw coffees of Arabica and Robusta varieties by ¹H NMR and chemometric methods. IN: *Magnetic Resonance in Food Science. The Multivariate Challenge*. ENGELSEN, S. B.; BELTON, P. S.; JAKOBSEN, H. J. (Eds.). Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005, p. 80 – 88.
- TFOUNI, S. A. V.; MACHADO, R. M. D.; CAMARGO, M. C. R.; VITORINO, S. H. P.; VICENTE, E. & TOLEDO, M. C. F. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection". *Food Chem.*, **101**: 334 – 338, 2007.
- TOSI, E. A.; RÉ, E.; LUCERO, H. & BULACIO, L. "Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition". *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **37**: 669 – 678, 2004.
- VOET, D.; VOET, J. G. & PRATT, C. W. *Fundamentos de bioquímica*. Porto Alegre, Artmed Editora, 2006.
- VOGELS, J. T. W. E.; TERWEL, L.; TAS, A. C.; VAN DER BERG, F.; DUKEL, F. & VAN DER GREEF. "Detection of adulteration in orange juices by a new screening method using proton NMR Spectroscopy in combination with Pattern Recognition Techniques". *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 175 – 180, 1996.
- WEIGEL, K. U.; OPITZ, T. & HENLE, T. "Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey". *Eur. Food Res. Technol.*, **218**: 147 – 151, 2004.
- WHELEHAN, O. P.; EARLL, M. E.; JOHANSSON, E.; TOFT, M.; ERIKSSON, L. "Detection of ovarian cancer using chemometric analysis of proteomic profiles". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **84**: 82 – 87, 2006.
- WINNING, H.; LARSEN, F. H.; BRO, R. & ENGELSEN, S. B. "Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics". *J. Magn. Reson.*, **190**: 26 – 32, 2008.

WOODCOCK, T.; DOWNEY, G.; KELLY, J. D. & O'DONNELL, C. "Geographical classification of honey samples by near-infrared spectroscopy: a feasibility study". *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 9128 – 9134, 2007.

ZAPPALÀ, M.; FALLICO, B.; ARENA, A. & VERZERA, A. "Methods for the determination of HMF in honey: a comparison". *Food Control*, **16**: 273 – 277, 2005.

ZHANG, B. L.; YUNIANITA & MARTIN, M. L. "Site-specific isotope fractionation in the characterization of biochemical mechanisms. The glycolytic pathway." *J. Biol. Chem.*, **270** (27): 16023 – 16029, 1995.

ZHANG, B. -L.; BUDDRUS, S. & MARTIN, M. L. "Site-specific hydrogen isotope fractionation in the biosynthesis of glycerol". *Bioorg. Chem.*, **28**, 1 – 15, 2000.

ZHANG, B.-L.; BILLAULT, I.; LI, X.; MABON, F.; REMAUD, G. & MARTIN, M. "Hydrogen isotopic profile in the characterization of sugars. Influence of the metabolic pathway." *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 1574 – 1580, 2002a.

ZHANG, B.-L.; BILLAULT, I.; LI, X.; MABON, F.; REMAUD, G. & MARTIN, M. "Influence of the photosynthetic pathway on the hydrogen isotopic profile of glucose". *Nukleonika*, **47** (1): S63 – S65, 2002b.