



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

MAYARA MARTINS FONSECA

**EXPLORANDO A IMPRESSÃO DIGITAL VOLTAMÉTRICA DE
INFUSÃO AQUOSA DE FOLHAS DE ERVA MATE QUIMICAMENTE
MODIFICADA: ANÁLISE DO MODELO ASCA E DISCRIMINAÇÃO
PLS-DA**

Londrina
2024

MAYARA MARTINS FONSECA

**EXPLORANDO A IMPRESSÃO DIGITAL VOLTAMÉTRICA DE
INFUSÃO AQUOSA DE FOLHAS DE ERVA MATE QUIMICAMENTE
MODIFICADA: ANÁLISE DO MODELO ASCA E DISCRIMINAÇÃO
PLS-DA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dra. Elen Julciléia Romão Sartori Braz

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M467e Fonseca, Mayara Martins.

EXPLORANDO A IMPRESSÃO DIGITAL VOLTAMÉTRICA DE INFUSÃO AQUOSA DE FOLHAS DE ERVA MATE QUIMICAMENTE MODIFICADA: ANÁLISE DO MODELO ASCA E DISCRIMINAÇÃO PLS-DA / Mayara Martins Fonseca. - Londrina, 2024.
58 f.

Orientador: Elen Julciléia Romão Sartori Braz.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Impressão digital voltamétrica - Tese. 2. Erva mate - Tese. 3. ASCA - Tese. 4. PLS-DA - Tese. I. Braz, Elen Julciléia Romão Sartori. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

MAYARA MARTINS FONSECA

**EXPLORANDO A IMPRESSÃO DIGITAL VOLTAMÉTRICA DE
INFUSÃO AQUOSA DE FOLHAS DE ERVA MATE QUIMICAMENTE
MODIFICADA: ANÁLISE DO MODELO ASCA E DISCRIMINAÇÃO**

PLS-DA

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Elen Julciléia Romão
Sartori Braz Universidade Estadual de
Londrina - UEL

Prof^ª. Dra. Andressa Galli
Universidade Estadual do Centro-Oeste –
UNICENTRO

Prof^ª. Dra. Maria Lurdes Felsner
Universidade Estadual do Centro-Oeste –
UNICENTRO

Londrina, 16 de julho de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus, o Orientador e Escritor da minha vida, por todo sustento nos dias difíceis, por sempre me guiar por bons caminhos e por não me desamparar enquanto vivo meus sonhos.

À Prof^a. Dra. Elen Julciléia Romão Sartori Braz pela oportunidade, por toda orientação, ensinamentos e amizade durante esses dois anos.

Ao Dr. Gustavo Galo Marcheafave que foi imprescindível para a realização deste trabalho. Obrigada por toda dedicação, ensinamentos e paciência durante todo esse período.

À Bruna Coldibeli por toda ajuda, ensinamentos e dedicação mesmo quando nem eu mesma sabia o que deveria ser feito.

Aos meus pais, Edson e Marly, que sempre me apoiaram e me incentivaram nos estudos e na vida, sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu esposo João, que sempre acreditou em mim mesmo quando nem eu mesma achava que seria possível. Obrigada por sempre acreditar em mim, me apoiar e nunca soltar a minha mão mesmo nos momentos mais turbulentos.

Aos meus irmão Willian, Amanda e Vinicius, que sempre me incentivaram e apoiaram. Obrigada por tudo.

As minhas avós, Anésia e Noemia, por todo incentivo, apoio e carinho.

Por fim, a todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização desta dissertação e para meu amadurecimento científico, o meu muito obrigada!

RESUMO

FONSECA, Mayara Martins. **Explorando a impressão digital voltamétrica de infusão aquosa de folhas de erva mate quimicamente modificada: análise do modelo ASCA e discriminação PLS-DA.** 2024. 58 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024

A erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae) é amplamente consumida na forma de chimarrão e possui aplicações em diversos setores industriais, incluindo alimentícios e cosméticos. Seu consumo proporciona uma série de benefícios à saúde, auxiliando no controle do colesterol e diabetes, além de possibilitar melhorias na digestão e na concentração, bem como efeitos antioxidantes. No entanto, o consumo em excesso pode resultar em efeitos indesejáveis, como nervosismo e insônia, devido à presença de cafeína e teobromina, tornando-se importante o desenvolvimento de uma metodologia analítica e matemática alternativa para o controle de qualidade de plantas com composição química variada. Em vista disso, este trabalho, apresenta a utilização da voltametria cíclica associada a análise exploratória multivariada dos efeitos do melhoramento genético e níveis de radiação solar nas plantas de erva mate empregando-se modelagem ASCA (do inglês, ANOVA – *Simultaneous Component Analysis*) e discriminação entre erva mate descafeinada e com alta cafeína com modelos PLS-DA (do inglês, *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*) por meio da impressão digital voltamétrica de infusão aquosa das folhas de erva mate. Os parâmetros experimentais, como pré-tratamento da superfície do eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB), eletrólito suporte e pH foram cuidadosamente avaliados, selecionando-se polimento com alumina e solução tampão fosfato (pH 3,0) para as medidas com o EDDB. Os modelos ASCA combinados com os perfis voltamétricos de oxidação, redução e ciclo completo, ofereceram resultados significativos sobre o efeito do melhoramento genético e do sombreamento. Além disso, a interação entre melhoramento genético e sombreamento confirmou as diferenças genéticas entre as plantas quimicamente modificadas nos métodos avaliados. O método ASCA demonstrou ser uma ferramenta robusta para o monitoramento de plantas de erva mate quimicamente modificadas, em conjunto com a voltametria cíclica. A análise multivariada supervisionada de discriminação empregou o método PLS-DA. Todos os modelos de discriminação alcançaram resultados de 100% de sensibilidade, especificidade e taxa de eficiência. Não foram registrados valores para taxas de falso-positivo e falso-negativo. Assim, todas as figuras de mérito avaliadas para discriminação de erva mate com alto teor de cafeína e descafeinada indicaram a construção de um excelente modelo de controle de qualidade para plantas de erva mate com diferentes atributos químicos. Além disso, os resultados obtidos pela voltametria cíclica apresentaram boa precisão intermediária e repetibilidade. O método desenvolvido através da impressão digital voltamétrica de infusões aquosas de folhas de erva mate obtidas de plantas quimicamente modificadas se mostra econômico, rápido e amigável ao meio ambiente.

Palavras-chave: Impressão digital; Voltametria; PLS-DA; ASCA; Eletrodo de diamante dopado com boro.

ABSTRACT

FONSECA, Mayara Martins. **Exploring voltammetric fingerprinting of chemically modified aqueous infusion of yerba mate leaves: ASCA model analysis and PLS-DA discrimination.** 2024. 58 p. Dissertation (Master in Chemistry) – Center of Exact Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae) is widely consumed in the form of chimarrão and has applications in several industrial sectors, including food and cosmetics. Its consumption provides a series of health benefits, helping to control cholesterol and diabetes, as well as enabling improvements in digestion and concentration, as well as antioxidant effects. However, excessive consumption can result in undesirable effects, such as nervousness and insomnia, due to the presence of caffeine and theobromine, making it important to develop an alternative analytical and mathematical methodology for the quality control of plants with varied chemical composition. In view of this, this work presents the use of cyclic voltammetry associated with multivariate exploratory analysis of the effects of genetic improvement and solar radiation levels in yerba mate plants using ASCA modeling (ANOVA – Simultaneous Component Analysis) and discrimination between decaffeinated and high-caffeine yerba mate with PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis) models using voltammetric fingerprint of aqueous infusion of yerba mate leaves. The experimental parameters, such as pre-treatment of the surface of the boron-doped diamond electrode (EDDB), supporting electrolyte and pH were carefully evaluated, selecting polishing with alumina and phosphate buffer solution (pH 3.0) for measurements with the EDDB. ASCA models combined with oxidation, reduction and full cycle voltammetric profiles offered significant results on the effect of genetic improvement and shading. Furthermore, the interaction between genetic improvement and shading confirmed the genetic differences between the chemically modified plants in the evaluated methods. The ASCA method proved to be a robust tool for monitoring chemically modified yerba mate plants, in conjunction with cyclic voltammetry. Supervised multivariate discrimination analysis used the PLS-DA method. All discrimination models achieved results of 100% sensitivity, specificity, and efficiency rate. No values were recorded for false-positive and false-negative rates. Thus, all figures of merit evaluated for discrimination of high-caffeine and decaffeinated yerba mate indicated the construction of an excellent quality control model for yerba mate plants with different chemical attributes. Furthermore, the results obtained by cyclic voltammetry showed good intermediate precision and repeatability. The method developed through voltammetric fingerprint of aqueous infusions of yerba mate leaves obtained from chemically modified plants proves to be economical, fast, and environmentally friendly.

Keywords: Fingerprint; Voltammetry; PLS-DA; ASCA; Boron-doped diamond electrode.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Voltamogramas cíclico obtidos com EDDB em solução tampão fosfato (pH 3,0) empregando polimento com alumina para compostos fenólicos: (A) ácido caféico 10^{-5} mol L⁻¹, (B) ácido clorogênico 10^{-5} mol L⁻¹ (C) ácido ferúlico 10^{-5} mol L⁻¹, xantinas: (D) cafeína 10^{-5} mol L⁻¹, (E) teobromina 10^{-5} mol L⁻¹ e (F) teofilina 10^{-5} mol L⁻¹ e (G) saponinas 10^{-5} mol L⁻¹. Todos os padrões foram preparados nas mesmas condições das infusões aquosas de folhas de erva mate.....30
- Figura 2** – Voltamogramas cíclicos obtidos com o EDDB para 100 µL de infusão aquosa de folhas de erva mate da amostra C2EC40 em solução tampão BR (pH 2,0) a 50 mV s⁻¹, empregando-se PTA, PTC e polimento com alumina.....31
- Figura 3** – Voltamogramas cíclicos de 100 µL de infusão aquosa de folhas de erva mate da amostra C2E40 obtidos com EDDB em solução tampão BR (pH 2,0) a 50 mV s⁻¹, com diferentes valores de pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0.....33
- Figura 4** – Voltamogramas cíclicos (50 mV s⁻¹) obtidos com o EDDB para 100 µL de infusão aquosa de folhas de erva mate da amostra C2E40 registrados em diferentes soluções tampão a pH 3,0: BR, citrato, fosfato e McIlvaine.....34
- Figura 5** – Voltamogramas cíclicos de 100 µL de infusão aquosa de folhas de erva mate da amostra C2E40 obtidos com EDDB em solução tampão fosfato (pH 3,0) empregando polimento com alumina e variando a velocidade de varredura de 10 a 250 mV s⁻¹.....35
- Figura 6** – Voltamogramas cíclicos (50 mV s⁻¹) obtidos com o EDDB para 100 µL de infusões aquosas de folhas de erva mate das amostras: (A) Amostras: C1EC22, C2EC22, C3EC22, C4EC22, C5EC22, em solução tampão fosfato (pH 3,0). (B) Amostras: C1EC40, C2EC40, C3EC40, C4EC40 e C5EC40, em solução tampão fosfato (pH 3,0).....36
- Figura 7** – Gráficos de escores da análise simultânea de componentes (SCA) com resíduos e loadings projetadas para o modelo ASCA de perfil

voltamétrico de oxidação das infusões aquosas de folhas de erva mate. **A)** Efeito de melhoramento genético: (♦) descafeinado e (■) alta cafeína; **B)** Loading do efeito de melhoramento genético; **C)** Efeito do sombreamento: (♦) 0%, (■) 40%, (▲) 51%, (▼) 76% e (●) 82% de níveis de sombreamento; **D)** Loading do efeito de sombreamento; **E)** Efeito de interação (melhoramento genético × sombreamento): (♦) descafeinado sob 0% de sombreamento; (■) descafeinado sob 40% de sombreamento; (▲) descafeinado sob 51% de sombreamento; (▼) descafeinado sob 76 % de sombreamento; (●) descafeinado sob 82% de sombreamento; (♦) alto teor de cafeína sob 0% de sombreamento; (■) alto teor de cafeína sob 40% de sombreamento; (▲) alto teor de cafeína sob 51% de sombreamento; (▼) alto teor de cafeína com 76% de sombreamento; (●) alto teor de cafeína com 82% de sombreamento); **F)** Loading do efeito de interação.....38

Figura 8 – Gráficos de escores da Análise de Componentes Simultâneos (SCA) com resíduos projetados e loadings para o modelo ASCA de perfil voltamétrico de redução das infusões aquosas de folhas de erva mate. **A)** Efeito do melhoramento genético: (♦) descafeinado e (■) alta cafeína; **B)** loading do efeito do melhoramento genético; **C)** Efeito do sombreamento: (♦) 0%, (■) 40%, (▲) 51%, (▼) 76% e (●) 82% dos níveis de sombreamento; **D)** Loading do efeito de sombreamento; **E)** Efeito de interação (melhoramento genético × sombreamento): (♦) descafeinado sob 0% de sombreamento; (■) descafeinado sob 40% de sombreamento; (▲) descafeinado sob 51% de sombreamento; (▼) descafeinado sob 76% de sombreamento; (●) descafeinado sob 82% de sombreamento; (♦) alta cafeína sob 0% de sombreamento; (■) alta cafeína sob 40% de sombreamento; (▲) alta cafeína sob 51% de sombreamento; (▼) alta cafeína com 76% de sombreamento; (●) alta cafeína com 82% de sombreamento); **F)** Loading do efeito de interação.....41

Figura 9 – Gráficos de escores da análise de componentes simultânea (SCA) com resíduos e cargas projetadas para o modelo ASCA de perfil voltamétrico cíclico (oxidação + redução) das infusões aquosas de

folhas de erva mate. **A)** Efeito do melhoramento genético: (♦) descafeinado e (■) alta cafeína; **B)**loading do efeito do melhoramento genético; **C)** Efeito do sombreamento: (♦) 0%, (■) 40%, (▲) 51%, (▼) 76% e (●) 82% dos níveis de sombreamento; **D)**Loading do efeito de sombreamento; **E)** Efeito de interação (melhoramento genético × sombreamento): (♦) descafeinado sob 0% de sombreamento; (■) descafeinado sob 40% de sombreamento; (▲) descafeinado sob 51% de sombreamento; (▼) descafeinado sob 76% de sombreamento; (●) descafeinado sob 82% de sombreamento; (♦) alta cafeína sob 0% de sombreamento; (■) alta cafeína sob 40% de sombreamento; (▲) alta cafeína sob 51% de sombreamento; (▼) alta cafeína com 76% de sombreamento; (●) alta cafeína com 82% de sombreamento); **F)**Loading do efeito de interação.....44

Figura 10 –Modelos de previsão de análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para infusões aquosas de folhas de erva mate descafeinadas e com alto teor de cafeína. A) Discriminação da infusão descafeinada com base no perfil voltamétrico de oxidação; B) discriminação da infusão com alto teor de cafeína com base no perfil voltamétrico de oxidação; C) discriminação da infusão descafeinada com base no perfil voltamétrico de redução; D) discriminação da infusão com alto teor de cafeína com base no perfil voltamétrico de redução; E) discriminação da infusão descafeinada com no perfil voltamétrico cíclico completo (oxidação +redução); F) discriminação da infusão com alto teor de cafeína com base no perfil voltamétrico cíclico completo (oxidação +redução); (♦) Amostras de treinamento descafeinadas, (▲) Amostras de validação descafeinadas, (■) Amostras de treinamento com alto teor de cafeína, (▼) Amostras de validação com alto teor cafeína e (---) valor limite da discrminação PLS-DA (Threshold).....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da análise ASCA dos perfis voltamétricos de oxidação, redução e cíclicos completos (oxidação + redução) para os efeitos do melhoramento genético, sombreamento e sua interação nas infusões aquosas de folhas de erva mate quimicamente modificadas.....	37
Tabela 2 – Figuras de mérito para o modelo PLS-DA de discriminação das infusões aquosa de folhas de erva mate usando a impressão digital voltamétrica.....	47
Tabela 3 – Estudo de repetibilidade e precisão intermediária para obtenção dos perfis voltamétricos das infusões das folhas de erva mate quimicamente modificadas.....	49
Tabela 4 – Estudo da estabilidade da amostra C2EC40 para obtenção dos perfis voltamétricos das infusões aquosas das folhas de erva mate quimicamente modificadas.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCOVA	Análise de covariância
ASCA	<i>ANOVA – Simultaneous Component Analysis</i>
BR	Britton-Robinson
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Voltametria cíclica
CVCE	<i>Cross-validation classification error</i>
DPR	Desvio padrão relativo
EDDB	Eletrodo de diamante dopado com boro
LV	<i>Latent Variable</i>
NIR	Espectroscopia de infravermelho próximo
PCA	Análise de componentes principais
PLS	Análise de Mínimos quadrados parciais
PLS-DA	<i>Partial LeastSquares – Discriminant Analysis</i>
PTA	Pré-tratamento eletroquímico anódico
PTC	Pré-tratamento eletroquímico catódico
SCA	<i>Simultaneous Component Analysis</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1.	ERVA MATE	16
1.2.	IMPRESSÃO DIGITAL	17
1.2.1	MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE IMPRESSÃO DIGITAL	17
1.3.	VOLTAMETRIA	18
1.3.1	ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO	19
1.4	MODELOS MULTIVARIADOS	20
1.4.1	ANÁLISE DE COMPONENTES SIMULTÂNEOS ASCA	21
1.4.2	MODELO DISCRIMINANTE PLS-DA	22
2	OBJETIVOS	23
2.1.	OBJETIVOS GERAIS	23
2.2.	Objetivos Específicos	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1.	REAGENTES E SOLUÇÕES	24
3.2.	EQUIPAMENTOS E ELETRODOS	24
3.3.	PRODUÇÃO DA PLANTA E AMOSTRAGEM	25
3.4.	EXTRAÇÃO AQUOSA DE METABÓLITOS DAS FOLHAS DE ERVA MATE	25
3.5.	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	26
3.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS E PROGRAMAS	27
3.6.1	MODELOS ASCA	27
3.6.2	CONSTRUÇÃO DE MODELO VIA PLS-DA	28
4	RESULTADOS E DISCUÇÃO	30
4.1.	INVESTIGAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DO EDDB PARA ANÁLISE DAS INFUSÕES DE FOLHAS DE ERVA MATE	30
4.2.	ESTUDO DO PH E ELETRÓLITO SUPORTE	31
4.3.	ESTUDO DA VELOCIDADE DE VARREDURA	34
4.4.	MEDIÇÕES DOS PERFIS VOLTAMÉTRICOS DAS DE FOLHAS DE ERVA MATEeANÁLISE ASCA	35
4.5.	Discriminação PLS-DA	46

4.6.	PRECISÃO E REPETIBILIDADE	47
4.7.	ESTABILIDADE DA AMOSTRA	48
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma planta amplamente cultivada na América do Sul, sendo o sul do Brasil o principal produtor, seguido do Paraguai e Argentina (GAWRON-GZELLA et al., 2021). É consumida principalmente no chimarrão, no qual é preparada uma infusão com as folhas e ingerido quente. Pode ser também utilizada na produção de outras bebidas estimulantes, como o tereré, que é consumido frio e chás. Além disso, a erva-mate é matéria-prima de balas, caramelos, sorvetes, refrigerantes, cosméticos, produtos de higiene, medicamentos, corantes e detergentes. (BONFATTI et al., 2018)

O consumo de erva-mate proporciona benefícios para a saúde, destacando-se na prevenção e combate ao colesterol, diabetes e outras doenças. Ela também auxilia na digestão, na concentração e disposição, no emagrecimento, além de possuir altas concentrações de antioxidantes, que contribui na prevenção do envelhecimento precoce. (CATANDUVAS, 2023)

As propriedades benéficas da erva-mate se dão pela presença de diversos compostos, sendo os principais, os compostos fenólicos, as xantinas e as saponinas. Na classe dos compostos fenólicos encontram-se os derivados de cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico e seus isômeros, responsáveis pela ação adstringente e antioxidante. Nas xantinas têm-se a cafeína, teobromina e teofilina, os responsáveis pela ação ao sistema nervoso central. E por fim, na classe das saponinas encontram-se triterpenóides glicosilados, os ácidos ursólicos e oleanólico, que além de propriedades biológicas, são agentes que causam o amargor e a espuma do mate.

O consumo excessivo da erva mate ou até mesmo seu consumo por pessoas sensíveis a algum de seus componentes, promove o desenvolvimento de sintomas indesejados, como quadros de nervosismo, agitação e tremores, devido à ação da cafeína e teobromina ao sistema nervoso central. Também pode causar insônia, irritabilidade, ansiedade, náuseas, desconforto gastrointestinal e piora em casos de problemas estomacais (FREITAS, 2011), tornando-se imprescindível o controle de qualidade desses compostos presentes na erva-mate (DARTORA et al., 2011).

Em virtude da cafeína presente na erva mate estar relacionada tanto a benefícios como efeitos colaterais, nas últimas décadas tem-se avaliado a produção de plantas quimicamente modificadas, no intuito de variar sua composição química,

como por exemplo, plantas com teores variados de cafeína e até mesmo descafeinada (WENDLING, 2016). Neste tipo de planta é importante a obtenção do perfil metabólico. Neste sentido, estudos sobre a impressão digital de plantas têm sido realizados, no intuito de extrair o máximo de informação sobre o cultivo da erva-mate em diferentes condições ambientais (variação de solo, sombreamento e irrigação), além de abranger a detecção de metabólitos presentes na amostra, como o controle da quantidade de cafeína nas folhas de erva-mate (ALMEIDA et al., 2023).

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção espectrofotométrica tem sido amplamente utilizada para obtenção dessas impressões digitais metabolômicas (DELAROZA et al., 2014). Porém, estudos acerca das impressões digitais eletroquímicas têm-se demonstrado uma excelente alternativa (KING et al., 1980; SILVA et al, 2021).

As técnicas eletroquímicas, como a voltametria, têm sido utilizadas como modo de reconhecimento multidimensional para classificação de plantas (FU et al, 2018). Associado a essas técnicas, o eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) pode ser usado como uma ferramenta para a obtenção da impressão digital. Este eletrodo apresenta propriedades eletroquímicas que se destacam frente a outros eletrodos a base de carbono, que são estabilidade química em meios ácido, básico e orgânicos, fraca adsorção de espécies químicas na sua superfície, ampla janela de potencial de trabalho e facilidade de limpeza da superfície (MARTINS et al., 2011).

Aliado a isto, o uso do modelo de discriminação PLS-DA (do inglês, *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*), aliado a análise de componentes simultâneos ASCA (do inglês, *ANOVA – Simultaneous Component Analysis*), pode trazer informações sobre a presença ou não de cafeína na planta a ser comercializada para consumo humano (TORMENA et al., 2019; MARCHEFAVE et al., 2020). Este tratamento avalia conjuntamente a composição da erva-mate em virtude da condição ambiental em que a planta é exposta, com o processamento (folhas verdes ou torradas) e com as condições de preparo das bebidas (infusão, uso de água quente ou fria).

1.1 ERVA MATE

A erva mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hil.) é produzida por pequenos produtores apenas no Brasil, Argentina e Paraguai, apresentando papel socioeconômico bastante importante nesses países (RESENDE et al., 2000). O alto potencial desta planta, permite que seus insumos estejam presentes em diversas áreas da indústria. A maneira como será consumida pode variar dependendo da região e do processamento a que as folhas foram submetidas. Na Argentina, Brasil e Uruguai é frequentemente consumida a partir de uma infusão das folhas em água quente conhecida como “chimarrão”, “mate” ou “mate cocido”. O “tereré”, preparado com infusão das folhas em água fria, é consumido muitas vezes acrescentando-se limão ou alguma fruta cítrica. Esta bebida é popular no Paraguai e no sudoeste do Brasil. No entanto, a erva mate é apreciada no mundo todo devido ao seu sabor, aroma, efeitos estimulantes e nutricionais que seu consumo pode proporcionar (COLPO et al., 2016; LUTOMSKI et al., 2020).

Inúmeros estudos demonstram que o consumo de erva mate pode trazer benefícios à saúde, como auxiliar no emagrecimento, podendo ser associada no tratamento da obesidade e na prática de esportes, melhorando o desempenho (ALKHATIB, 2014). Puangpraphant et al. afirma ainda que as folhas de erva mate possuem propriedades anticancerígenas e anti-inflamatórias. (PUANGPRAPHANT et al., 2011). Além disso, possui propriedades estimulantes, devido ao teor de cafeína, ao qual se compara a quantidade presente em alguns tipos de cafés, além de auxiliar na eliminação da sensação de fadiga. Entretanto, é importante ressaltar que o consumo em excesso de cafeína pode causar dor de cabeça, enxaqueca e pressão alta em algumas pessoas que são sensíveis ou alérgicas, e especialmente em mulheres grávidas, que devem limitar o seu consumo devido ao risco de aborto espontâneo e baixo peso do bebê ao nascer.

A erva mate possui uma composição química rica, repleta por uma variedade de compostos orgânicos que incluem nutrientes essenciais, tais como carboidratos, proteínas e gorduras. No que diz respeito aos metabólitos secundários, merece destaque a presença de alcaloides purínicos, como a cafeína e a teobromina, além de polifenóis, como ácidos fenólicos e flavonoides, e terpenos, incluindo saponinas e carotenoides. Adicionalmente, a erva mate contém uma combinação de minerais e vitaminas, contribuindo para sua complexa e benéfica composição (BERTÉ et al.,

2011).

Esses componentes são influenciados por fatores genéticos, mas também podem estar sujeitos a modificações na produção de metabólitos secundários devido a influências ambientais (DARTORA et al., 2011). Estímulos do ambiente onde a planta se encontra podem provocar alterações na rota metabólica, resultando na síntese de compostos diversos ou na variação da produção de substâncias específicas. Dentre os fatores relevantes, destacam-se luminosidade, temperatura, quantidade de chuva, condições nutricionais, época e momento da coleta. (DE MORAIS, 2009) Compreendendo essas interações, pesquisas envolvendo plantas com melhoramento genético estão em andamento, visando aperfeiçoar a produção vegetal ao potencializar a expressão fenotípica de características desejadas no contexto da agricultura (RESENDE et al., 2000).

1.2 IMPRESSÃO DIGITAL

Plantas que foram submetidas a alterações metabólicas sob condições controladas podem apresentar alterações entre si. Estudos têm sido realizados visando detectar essas alterações apontando as diferenças entre as amostras. Uma abordagem que vem sendo utilizada são os métodos de impressão digital, que podem ser perfis de separação, espectroscopia de região ultravioleta-visível, espectroscopia de infravermelho médio, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa (MARCHEAFAVE et al., 2020).

A obtenção de impressão digital envolve análise ágil e eficaz dos analitos a serem identificados, seguida por uma avaliação multivariada de diferentes amostras em relação à intensidade dos picos cromatográficos ou sinais nos espectros de massas (ABDELNUR et al., 2014).

1.2.1 Métodos para Obtenção de Impressão Digital

A técnica CLAE com detecção espectrofotométrica tem sido amplamente utilizada para obter as impressões digitais metabolômicas (DELAROZA et al., 2014). Associada a um programa de análise adequado, esta técnica tem se mostrado eficaz na identificação de espécies. No entanto, a utilização da CLAE demanda a separação e purificação da amostra, além de envolver um processo operacional

complexo. Em contrapartida, a análise voltamétrica pode oferecer informações sobre compostos eletroativos nas plantas de maneira mais simples e com menor custo operacional. Portanto, o desenvolvimento de um método sensível baseado em impressões digitais voltamétricas pode se revelar mais prático para a classificação de plantas, inclusive para análises realizadas no local (FU et al., 2018).

Impressões digitais obtidas por meio da espectroscopia de absorção na região do infravermelho próximo (NIR) tem sido divulgado na literatura, como sendo uma técnica efetiva (DE ALMEIDA et al., 2023). No entanto, apesar de ser uma técnica com alta confiabilidade, pode apresentar limitações na quantificação de metabólitos.

Trabalhos da literatura reportam que a voltametria tem sido utilizada como modo de reconhecimento multidimensional para classificação de plantas e obtenção de impressão digital (FU et al., 2018; ZHENG et al., 2020). A eletroquímica tem desfrutado de ampla aplicação na análise e detecção de alvos específicos (FANG et al. 2016; KHATER et al. 2017; LIMA et al. 2018; VANEGAS et al. 2015). Nesse contexto, substâncias eletroquimicamente ativas nas plantas, como flavonoides, polifenóis, aldeídos e alcaloides, tornam-se foco de investigação.

Para alcançar maior sensibilidade nas impressões digitais eletroquímicas das plantas, pode-se utilizar o EDDB como eletrodo de trabalho na detecção amperométrica (FU et al., 2018). Ademais, a análise voltamétrica de impressões digitais, aliada à quimiometria, emerge como uma técnica seletiva, precisa e de fácil aplicação para a classificação e autenticação dessas substâncias (XIAO et al., 2023; ZAMIR et al., 2022).

1.3 VOLTAMETRIA

A voltametria implica na aplicação de um potencial no eletrodo de trabalho ao longo do tempo. Esse processo provoca a oxidação ou redução das substâncias eletroativas presentes na solução, o que gera uma variação na corrente elétrica. Essa variação está diretamente relacionada com a concentração das substâncias analisadas (BRETT e BRETT, 1993; CROUCH, SKOOG e HOLLER, 2007).

A utilização de métodos voltamétricos possui uma série de vantagens, como contribuir para a redução do uso de solventes orgânicos e do tempo e custo de análise. Apresentam alta sensibilidade, podem ser adaptados ao campo por meio da

utilização de equipamentos portáteis, são de fácil operação e as amostras podem ser coloridas, além de serem métodos que podem ser utilizados tanto para a detecção e como para a quantificação de diversos compostos (HOYOS-ARBELÁEZ et al., 2017; PISOSCHI & NEGULESCU, 2011; ŠERUGA et al., 2011).

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica comumente utilizada para a obtenção de dados relevantes sobre o processo eletroquímico em análise (KISSINGER e HEINEMAN, 1983). Eles ajudam a determinar se o processo é reversível, irreversível ou quase-reversível, e permitem estimar a quantidade de elétrons envolvidos na reação eletroquímica na interface do eletrodo, coeficientes de transferência de carga e de difusão do analito na superfície do eletrodo (GOSSER, 1993; BARD e FAULKNER, 2001).

Nas técnicas voltamétricas a escolha do eletrodo de trabalho é de extrema importância. Existem vários tipos de eletrodos de trabalho, cada eletrodo possui uma faixa de potencial de operação definida, na qual o limite inferior é determinado pelos altos valores de corrente devido à oxidação da água, e o limite superior é determinado pela redução da água. Essa faixa pode ser influenciada não apenas pelo material do eletrodo, mas também pela composição da solução na qual está imerso, conhecida como eletrólito suporte (SKOOG et al., 2007). Tem-se como exemplos de eletrodos de trabalho, os eletrodos constituídos por metais inertes, como platina ou ouro; eletrodos a base de carbono, como grafite pirolítico em eletrodos de pasta de carbono, carbono vítreo, EDDB; eletrodos semicondutores, como óxido de estanho ou de índio; metal recoberto com um filme de mercúrio (BRETT e BRETT, 1993).

1.3.1 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro

Na área da eletroquímica, a busca por materiais de eletrodo que possuam alta eficiência, estabilidade e sensibilidade é constante, impulsionada pela demanda por avanços em diversas aplicações, desde a análise química até a detecção de biomoléculas. Nesse contexto, o EDDB tem sido utilizado há décadas na Eletroanálise como uma ferramenta inovadora, oferecendo características únicas que o distinguem dos eletrodos tradicionais. Além disso, associado às técnicas voltamétricas, o EDDB tem se destacado na obtenção da impressão digital voltamétrica (SALAMANCA-NETO et al., 2020).

O BDDE é um eletrodo de diamante que foi dopado com boro de maneira a melhorar significativamente as propriedades condutoras do diamante, além de, ser conhecido por sua excepcional resistência e durabilidade e representa um avanço significativo na tecnologia de eletrodos (LIANG et al., 2013). Essa combinação resulta em um material robusto, com uma ampla faixa de potencial de trabalho e alta estabilidade química e mecânica, características essenciais para diversas aplicações eletroquímicas (BARROS et al., 2005). Este eletrodo de trabalho apresenta estabilidade química em meio ácido, básico e orgânico, fraca adsorção de espécies químicas em sua superfície, ampla janela de potencial de trabalho e facilidade de limpeza da superfície (MARTINS et al., 2011).

1.4 MODELOS MULTIVARIADOS

A quimiometria é uma área interdisciplinar da química que se concentra na aplicação de métodos matemáticos e estatísticos para analisar e interpretar dados químicos. O termo "quimiometria" deriva de "química" e "matemática" e visa extrair informações úteis e relevantes de conjuntos de dados complexos gerados por técnicas analíticas, como espectroscopia, cromatografia com detecção espectrofotométrica, voltametria, entre outras. Os métodos quimiométricos são amplamente utilizados em diversas áreas da química, incluindo análise de alimentos, análise ambiental, química, clínica e química farmacêutica. Eles permitem a interpretação de padrões, a redução da dimensionalidade dos dados e a otimização de experimentos, contribuindo para a tomada de decisões mais informadas e a extração de informações significativas de conjuntos de dados químicos complexos (FERREIRA, 2015; DEMING e MORGAN, 1998).

Quando se trata de organismos que passaram por modificações químicas, é essencial realizar análises regulares desses materiais para assegurar a qualidade e estabilidade do processo de modificação. Neste contexto, os métodos voltamétricos, juntamente com tratamentos quimiométricos apropriados, como o método ASCA (do inglês, ANOVA – *Simultaneous Component Analysis*) e o método PLS-DA (do inglês, *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*), podem ser empregados tanto para a exploração, quanto para a discriminação, respectivamente. Ambos os métodos são viáveis para a obtenção de uma máxima quantidade de informações contidas nos dados obtidos nas análises voltamétricas. Além disso, o uso da análise de

componentes simultâneos ASCA e do modelo de discriminação PLS-DA, podem fornecer informações sobre o controle de qualidade dessas plantas com diferentes composições químicas que serão comercializadas para consumo humano (MARCHEAFAVE, 2020; TORMENA et al., 2019).

1.4.1 Análise de Componentes Simultâneos ASCA

O método ASCA é uma técnica estatística avançada da quimiometria, especializada na análise de dados multivariados, como os gerados por técnicas analíticas complexas, por exemplo, espectroscopia e cromatografia. A principal finalidade do método ASCA é decompor a variação total dos dados em componentes relacionados a diferentes fatores experimentais, permitindo a identificação de padrões significativos e a compreensão das fontes de variação mais relevantes. Essa abordagem multivariada estabelece o fundamento para a interpretação de conjuntos de dados complexos e tem sido extensivamente utilizada em análises de matrizes alimentares para examinar impactos abióticos, avaliar critérios de qualidade e identificar potenciais casos de fraude (RUST et al., 2021).

Os passos essenciais de aplicação do método ASCA incluem a modelagem da média, a decomposição da variação, a aplicação da Análise de Componentes Principais (PCA) e a utilização da Análise de Covariância (ANCOVA) para avaliar a influência dos fatores experimentais na variação dos dados. A aplicação do ASCA oferece uma abordagem abrangente para a interpretação de padrões e variações específicas associadas aos fatores experimentais, destacando-se como uma ferramenta valiosa na quimiometria para estudos que envolvem múltiplos fatores experimentais e complexidade nas fontes de variação (CHENG et al., 2019).

1.4.2 Método de Discriminação por PLS-DA

O método PLS-DA, integra aspectos da Análise de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e da Análise Discriminante. Amplamente empregada na análise de dados multivariados, especialmente em situações que demandam a discriminação entre diferentes grupos, essa abordagem visa identificar variáveis latentes que explicam a variação nos dados enquanto maximizam a separação entre os grupos em questão. Os passos essenciais incluem a padronização dos dados, a construção

de componentes latentes e a identificação de variáveis relevantes para a discriminação. O classificador opera com entradas numéricas representativas de cada amostra, como entre 0 e 1. A matriz $\mathbf{X}$ é ajustada com base nesses valores, resultando em uma estimativa que o modelo utiliza para determinar a classe de adesão de cada amostra, usando um limiar de decisão específico (BRERETON, 2016).

Validar o modelo é uma etapa crítica para garantir sua robustez e capacidade de generalização para novos conjuntos de dados, avaliando o modelo a partir de uma série de figuras de mérito. O PLS-DA desempenha um papel fundamental em diversas áreas científicas, como ciências alimentares, na Química Analítica e Biologia, onde a discriminação entre grupos é essencial para a interpretação de dados complexos (NUNES et al., 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver modelos de classificação de folhas de erva mate quimicamente modificadas e produzidas em cinco níveis de sombreamento combinando a impressão digital voltamétrica e métodos quimiométricos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar as condições experimentais de obtenção de voltamogramas das infusões aquosas de erva mate por estratégias univariadas.

Obter a impressão digital voltamétrica da infusão aquosa de folhas de erva mate quimicamente modificadas (com alto teor de cafeína e descafeinadas) condicionadas em cinco níveis de sombreamento, pelos perfis voltamétricos de oxidação, redução e cíclicos completos (oxidação e redução).

Construir um modelo de classificação de folhas de erva mate a partir dos dados impressão digital voltamétrica da infusão aquosa de folhas de erva mate quimicamente modificadas e condicionadas a cinco níveis de sombreamento e pela aplicação de técnicas de análise multivariada de dados (ASCA e PLS-DA).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções aquosas foram preparadas com reagentes comerciais de grau analítico e água ultrapura (Resistividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) purificada em sistema Milli-Q® (Merck Millipore Corporation, Alemanha).

Cafeína ($\geq 98\%$), teobromina ($\geq 98\%$), teofilina ($\geq 99\%$), ácido clorogênico ($\geq 95\%$), ácido p-cumárico ($\geq 99,8\%$), ácido caféico ($\geq 98\%$), ácido ferúlico ($\geq 99\%$) e saponinas (100%) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA). Os ácidos acético, bórico e o fosfórico foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil). O ácido cítrico e o hidróxido de sódio foram obtidos da Anidrol (Diadema, SP, Brasil). O fosfato de potássio monobásico foi adquirido da Labsynth (Diadema, SP, Brasil).

As soluções de trabalho de cafeína, teobromina, teofilina, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e saponinas foram preparadas separadamente, em água ultrapura, na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

A solução tampão Britton-Robinson (BR) foi preparada pela mistura de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico, para concentração final de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, sendo o valor do pH de pH 2,0 – 7,0, ajustado com adição de volumes apropriados de solução de NaOH $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. A solução tampão fosfato foi preparada na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com o pH ajustado para 2,0 e 3,0 com ácido fosfórico concentrado.

3.2 EQUIPAMENTOS E ELETRODOS

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula de vidro convencional de compartimento único contendo três eletrodos. O eletrodo auxiliar, que consistiu em uma placa de platina, o eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e o EDDB (3 mm de diâmetro; Windsor Scientific Ltd.) como eletrodo de trabalho. Esta célula foi acoplada a um potenciostato/galvanostato Palm Sens 3

controlado pelo programa PStTrace 5.9.

A superfície do EDDB foi polida com alumina em pano de camurça e, em seguida, enxaguada abundantemente com água ultrapura (DE AGUIAR et al., 2022). O polimento da superfície do EDDB foi realizado a cada 5 medidas.

O pH das soluções foi medido a $25,0 \pm 2,0$ °C utilizando um pHmetro (BEL Engineering W3B) acoplado a um eletrodo de vidro combinado com um eletrodo de referência externo Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

As massas das amostras e padrões analíticos foram mensuradas utilizando balança analítica Shimadzu modelo ATY224 (Shimadzu Corporation; capacidade: 220g e sensibilidade: 0,1 mg).

3.3 PRODUÇÃO DA PLANTA E AMOSTRAGEM

As plantas de erva mate foram cultivadas pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Florestas em Colombo, Paraná, Brasil (25°19'15" S, 49°09'31" W; 934 m), em uma estufa com temperatura média anual de 28 °C e, em um sistema semi-hidropônico e plantados em espaçamento de 15 cm × 15 cm, com irrigação por gotejamento utilizando uma solução nutritiva adaptada de Aguiar et al., 2022. O cultivo incluiu cinco níveis de sombreamento (C1EC40 e C1EC22 – 0%; C2EC40 e C2EC22 – 40%; C3EC40 e C3EC22 – 51%; C4EC40 e C4EC22 – 76% e C5EC40 e C5EC22 – 82%), alcançados por cobertura com telas de polietileno comercial.

A colheita das folhas de erva mate ocorreu em maio de 2021, sendo categorizadas de acordo com os padrões estabelecidos por SCHUHLLI et al., 2019 (alto teor de cafeína > 1,6%, descafeinado < 0,1%) (SCHUHLLI et al. 2019). As plantas C1EC40, C2EC40, C3EC40, C4EC40 e C5EC40 são pertencentes a clones com alto teor de cafeína (genótipos 4–8–3 com 2,35 g 100 g⁻¹ de cafeína). As plantas C1EC22, C2EC22, C3EC22, C4EC22 e C5EC22 são pertencentes a clones descafeinadas (genótipos 7–61–3 com 0,02 g 100 g⁻¹ de cafeína) (WENDLING et al., 2018).

Após serem coletadas, as folhas foram secas em forno de microondas (TOMASI et al., 2021) e armazenadas em ambiente controlado para futuros estudos de melhoramento genético e manejo agrônomo.

3.4 EXTRAÇÃO AQUOSA DE METABOLITOS DAS FOLHAS DE ERVA MATE

A extração dos metabólitos presentes nas folhas de erva mate foi feita de acordo com procedimento descrito por Streit et al., 2007, com algumas modificações. As folhas de erva mate foram trituradas em moinho analítico modelo A11 Basic (Ika) e, em seguida, 5g de folhas foram infundidas em 10 mL água ultrapura à 80 °C, permanecendo nesta infusão até alcançar temperatura ambiente (25 °C). Por fim, as infusões foram filtradas com auxílio de funil e algodão, e os extratos aquosos foram armazenados em freezer sob a temperatura aproximada de -18 °C até posterior análise.

3.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Inicialmente, foram realizados estudos exploratórios sobre o comportamento voltamétrico do extrato aquoso das folhas de erva mate da amostra C2EC40 na superfície do EDDB, bem como avaliação do pH e de eletrólito suporte, empregando-se a VC. Nesses estudos foram adicionados 100 µL de infusão aquosa de folhas de erva mate na célula voltamétrica contendo 10 mL de solução tampão BR (pH 2,0). Feito isso, os voltamogramas cíclicos foram registrados no intervalo de potencial de -0,25 V até +1,75 V. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Escolhida as melhores condições experimentais (pH, eletrólito suporte) e realizado o estudo da velocidade de varredura em diferentes velocidades, realizou-se a obtenção dos perfis voltamétricos das demais infusões de folhas de erva mate para obtenção das impressões digitais. Todas as medidas foram realizadas em dez replicatas.

A precisão do método voltamétrico desenvolvido foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária, nas mesmas condições experimentais. Para isso, a magnitude da corrente de pico dos compostos fenólicos e xantinas de quatro amostras de folhas de erva mate (C3EC40, C5EC40, C3EC22 e C5EC22) foi medida quatro vezes por dia (repetibilidade) durante dias alternados com uma semana de intervalo durante três semanas (precisão intermediária). Os resultados foram comparados por meio do valor do desvio padrão relativo (DPR) obtido.

Por fim, foi avaliada a estabilidade da infusão aquosa das folhas de erva mate referente à amostra C2EC40, nas mesmas condições experimentais. A infusão

aquosa foi dividida em três micros tubos para centrifugação, e a magnitude da corrente de pico dos compostos fenólicos e xantinas foi medida em três dias diferentes, em intervalos de quinze dias. No primeiro dia, a medida foi realizada com a infusão das folhas de erva mate recém preparada; no segundo dia com a infusão armazenada sob refrigeração à -18°C por quinze dias; no terceiro dia com a infusão armazenada sob refrigeração -18°C por trinta dias. As medidas foram realizadas em dez replicatas e os resultados foram comparados por meio do valor do DPR obtido.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E PROGRAMAS

3.6.1 Modelo ASCA

Para construir os modelos ASCA, três matrizes foram geradas a partir das medidas voltamétricas dos extratos aquosos das folhas de erva mate.

A matriz de oxidação + redução, correspondente ao perfil voltamétrico cíclico completo correspondente ao intervalo de potencial de $-0,5\text{ V}$ até $+1,75\text{ V}$ e $+1,75\text{ V}$ a $-0,5\text{ V}$, continha o tamanho de 100×987 . As linhas correspondem às 100 amostras de erva mate (50 amostras com alto teor de cafeína e 50 amostras descafeinadas) nas diferentes condições de luz e as colunas correspondem ao intervalo de potencial utilizado.

A matriz de oxidação, correspondente ao intervalo de potencial de $-0,5\text{ V}$ até $+1,75\text{ V}$, continha 100 medidas (10 medidas para cada diferente condição de luz para folhas descafeinadas e com alto teor de cafeína) contra 494 variáveis correspondentes (100×494). As linhas correspondem às amostras de erva mate (50 amostras com alto teor de cafeína e 50 amostras descafeinadas) nas diferentes condições de luz e as colunas correspondem ao intervalo de potencial.

A matriz de redução, correspondente ao intervalo de potencial entre $+1,75\text{ V}$ até $-0,5\text{ V}$, continha 100 medidas (10 medidas para cada diferente condição de luz para folhas descafeinadas e com alto teor de cafeína) contra 493 variáveis correspondentes (100×493).

O tratamento dos dados e a análise quimiométrica foram realizados com o programa Matlab R2016b[®] (MathWorks, Natick, MA, EUA), usando as ferramentas do PLS_toolbox 8.7[®] da EigenvectorResearch. As matrizes foram centradas na média previamente ao cálculo da modelagem ASCA. Para determinação da

significância estatística ao nível de 95% de confiança ($p_{\text{value}} < 0,05$) dos fatores experimentais (melhoramento genético, sombreamento e interação entre estes fatores) o teste de permutação ocorreu com 10.000 randomizações. Para o cálculo ASCA as amostras foram codificadas de acordo com um planejamento multifatorial que incorporou dois fatores fixos: o fator melhoramento genético com dois níveis correspondentes, a erva mate descafeinada e com alto teor de cafeína, e o fator sombreamento com cinco níveis representando 0%, 40%, 51%, 76% e 82%. Sendo o fator do melhoramento genético codificado como alto teor de cafeína (+1) e descafeinado (-1) e o fator de sombreamento como 0% de sombreamento (-2), 40% de sombreamento (-1), 51% de sombreamento (0), 76% de sombreamento (+1) e 82% de sombreamento (+2).

3.6.2 Construção de Modelo via PLS-DA

O método PLS-DA é baseado em um algoritmo de regressão para construção de modelos que possam maximizar a separação entre classes de objetos. No PLS-DA a matriz **X** (que contém as respostas das propriedades de interesse, neste caso, os voltamogramas) está relacionada a outra matriz, **Y**, ou vetor **y**, contendo informações sobre as classes da amostra. Quando os dados contêm duas classes (erva mate de alto teor de cafeína e descafeinada), a variável **y** será composta de um único vetor que é codificado com 0 para todas as amostras da primeira classe e 1 para todas as amostras da segunda classe.

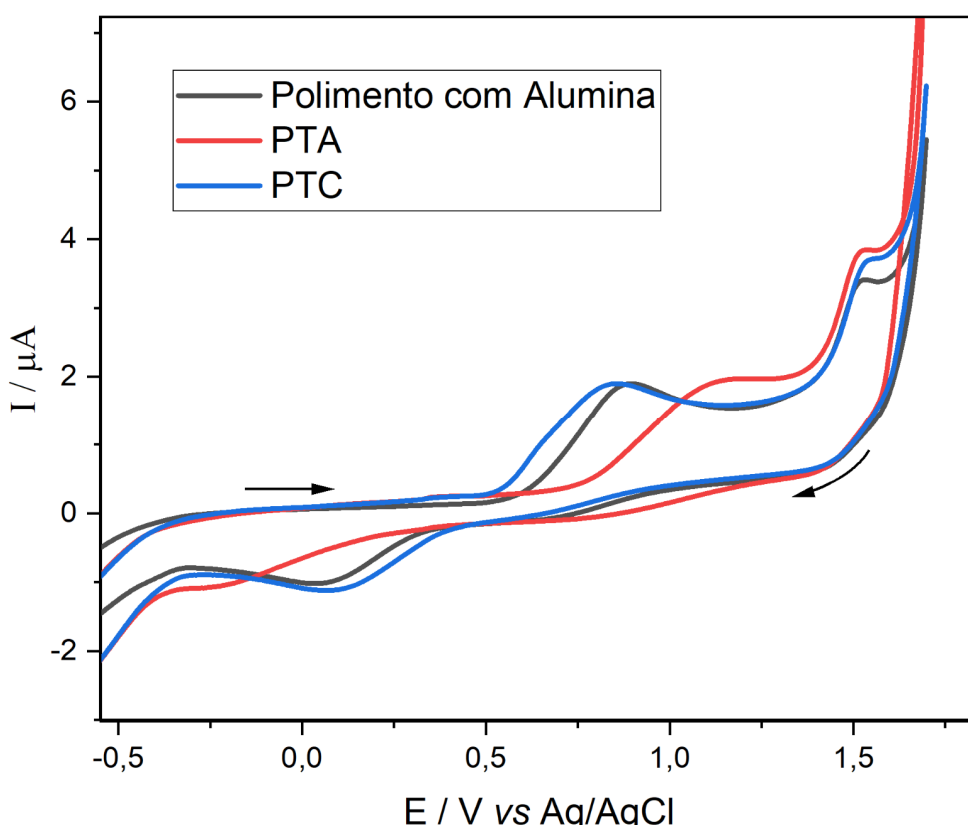
O primeiro procedimento na construção da modelagem PLS-DA é a divisão da matriz principal em dois subconjuntos usando o algoritmo de Kennard-Stone (calibração e predição), separadamente para cada classe. Um conjunto de calibração, representando 76% das amostras, foi utilizado para modelagem e validação interna, ou seja, 38 amostras para cada classe (alta cafeína e descafeinado) nos modelos de perfil voltamétrico de oxidação + redução, perfil voltamétrico de oxidação e perfil voltamétrico de redução. O conjunto de predição contendo 24% ou 12 amostras para cada classe, em cada modelo, foi utilizado para validação externa do modelo desenvolvido. Os dados foram centrados na média e o número de variáveis latentes (LV, do inglês, *latent variable*) foi escolhido com base no menor erro de classificação de validação cruzada (do inglês, *cross-validation classification error*– CVCE).

A avaliação da classificação foi realizada por parâmetros de desempenho através de figuras de mérito como sensibilidade e especificidade. O tratamento dos dados e a análise quimiométrica foram realizados com o programa Matlab R2016b® (MathWorks, Natick, MA, EUA), usando as ferramentas do PLS_toolbox 8.7® da EigenvectorResearch.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INVESTIGAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DO EDDB PARA ANÁLISE DAS INFUSÕES DE FOLHAS DE ERVA MATE

Figura 1. Voltamogramas cíclicos obtidos com o EDDB para 100 μL de infusão aquosa de folhas de erva mate da amostra C2EC40 em solução tampão BR (pH 2,0) a 50 mV s^{-1} , empregando-se PTA, PTC e polimento com alumina.



Fonte: o próprio autor

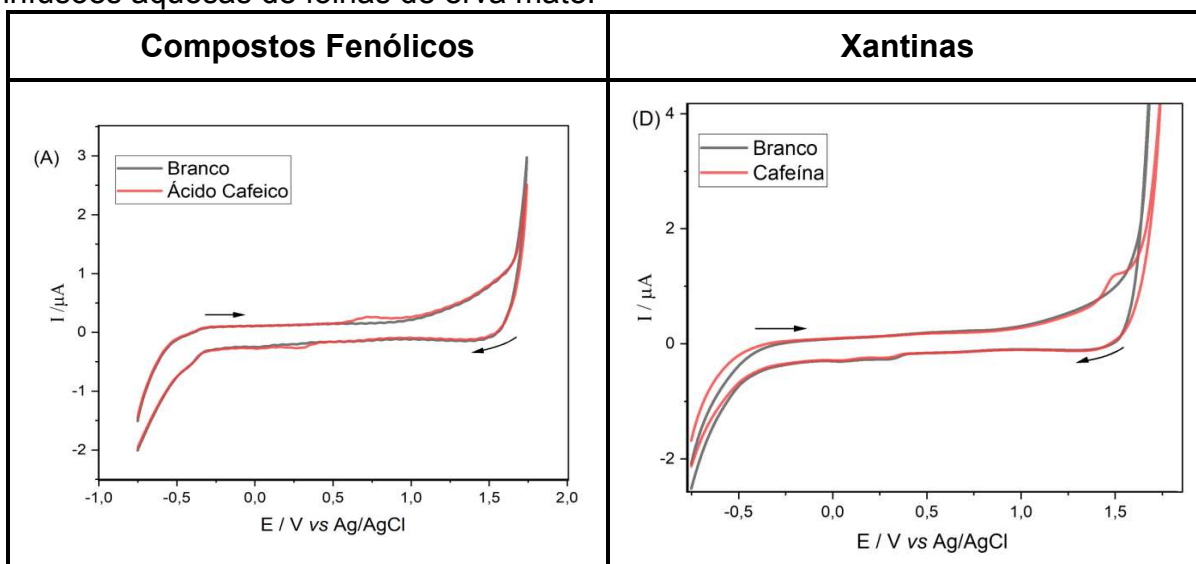
Inicialmente, em virtude de as respostas voltamétricas dos analitos dependerem diretamente da terminação superficial do EDDB, investigou-se o efeito do pré-tratamento catódico (PTC) e do pré-tratamento anódico (PTA) da superfície do eletrodo, bem como do polimento superficial com alumina. A Figura 1 apresenta o perfil voltamétrico das infusões das folhas de erva mate referente a amostra C2EC40 obtidas em solução tampão BR (pH 2,0), empregando-se PTA, PTC e polimento com alumina. Pelos voltamogramas cíclicos obtidos, observa-se, para todos os tratamentos de superfície do EDDB, a presença de dois picos de oxidação ($\sim +0,75 \text{ V}$ e $+1,5 \text{ V}$) no sentido da varredura direta (oxidação), de $-0,5 \text{ V}$ até $+1,75 \text{ V}$ e um pico de redução ($+0,20 \text{ V}$) no sentido da varredura reversa (redução), de $+1,75 \text{ V}$ até

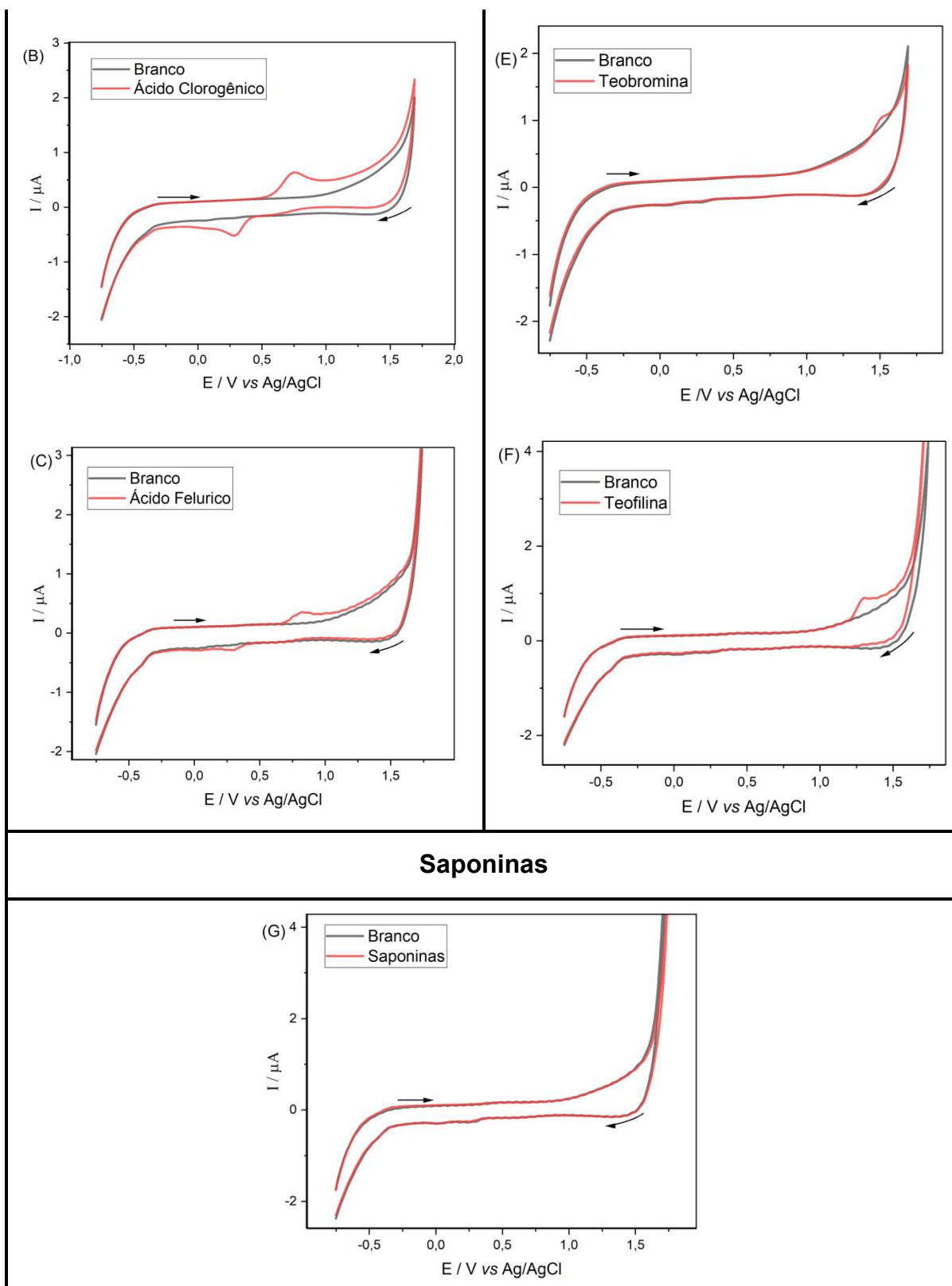
−0,5 V. De acordo com a literatura e experimentos realizados (Figura 2.), os picos observados correspondem a oxidação e redução de compostos fenólicos, tais como: ácido caféico, ácido clorogênico e ácido ferúlico, e de oxidação de xantinas, tais como: cafeína, teobromina e teofilina, presentes nas infusões de folhas de erva mate (SANTOS et al., 2017; SALAMANCA-NETO et al., 2020). Além disso, observa-se também que o polimento com alumina promoveu uma melhor definição e intensidade de corrente dos picos de oxidação e de redução, sendo então, este tipo de tratamento de superfície do eletrodo utilizado para dar continuidades aos estudos.

4.2 ESTUDO DO pH E ELETRÓLITO SUPORTE

O estudo do pH foi realizado no intervalo de 2,0 a 7,0 em solução tampão BR para infusão de folhas de erva mate referente a amostra C2E40, cujos resultados estão mostrados na Figura 3.

Figura 2. Voltamogramas cíclicos obtidos com o EDDB em solução tampão fosfato (pH 3,0) empregando polimento com alumina para os compostos fenólicos: (A) ácido caféico, (B) ácido clorogênico e (C) ácido ferúlico e para xantinas: (D) cafeína, (E) teobromina e (F) teofilina e (G) saponinas. Todos os padrões foram preparados na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e nas mesmas condições experimentais das infusões aquosas de folhas de erva mate.



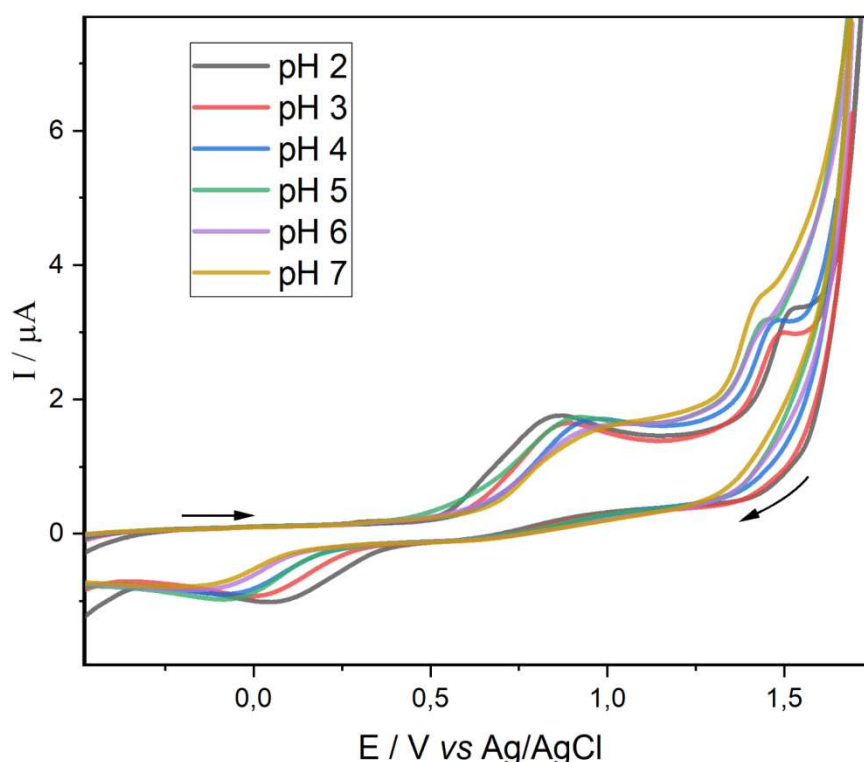


Fonte: o próprio autor

Pode-se observar que, conforme aumenta-se o valor de pH os valores de potenciais para oxidação das xantinas deslocam-se para valores menos positivos. Além disso, nota-se um aumento na intensidade de corrente e baixa definição de

pico de oxidação. Para os compostos fenólicos, o aumento do pH da solução promove a diminuição na intensidade e resolução dos picos. Considerando melhor repetibilidade entre as respostas de corrente e melhor definição de pico, o pH 3,0 foi selecionado para dar continuidade aos demais experimentos. Com relação aos valores de $\text{pH} \geq 8,0$ os valores obtidos de corrente são muito baixos em comparação com os obtidos para valores mais baixos de pH. Por isso, eles não foram adicionados ao gráfico da Figura 3.

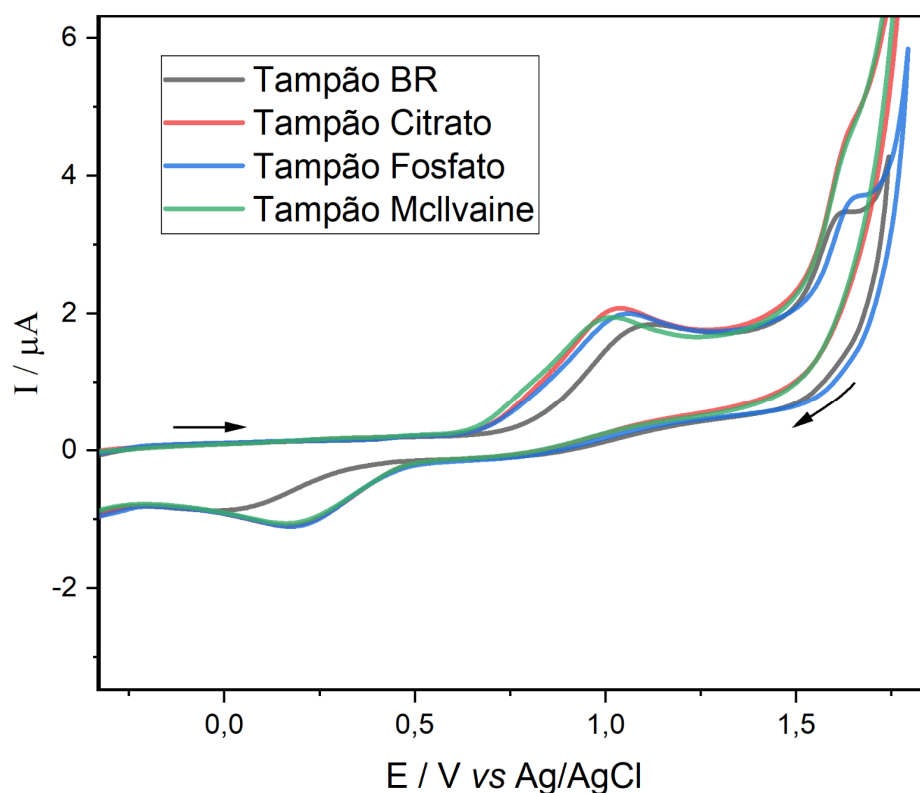
Figura 3. Voltamogramas cíclicos de 100 μL de infusão aquosa de folhas de erva mate da amostra C2E40 obtidos com EDDB em solução tampão BR (pH 2,0) a 50 mV s^{-1} , com diferentes valores de pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0.



Fonte: o próprio autor

Em seguida, a resposta voltamétrica da infusão aquosa de folhas de erva mate referente a amostra C2E40 foi avaliada utilizando-se as soluções tampão acetato, BR, fosfato e McIlvaine, todas a pH 3,0 (Figura 4). Como pode ser observado, a solução tampão fosfato apresentou melhor resposta voltamétrica, devido a maior intensidade de corrente e melhor resolução dos picos de oxidação e de redução. Assim, para a investigação do perfil voltamétrico das demais infusões de folhas de erva mate se utilizou a solução tampão fosfato (pH 3,0).

Figura 4. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos com o EDDB para $100 \text{ }\mu\text{L}$ de infusão aquosa de folhas de erva mate da amostra C2E40 registrados em diferentes soluções tampão a pH 3,0: BR, citrato, fosfato e McIlvaine.

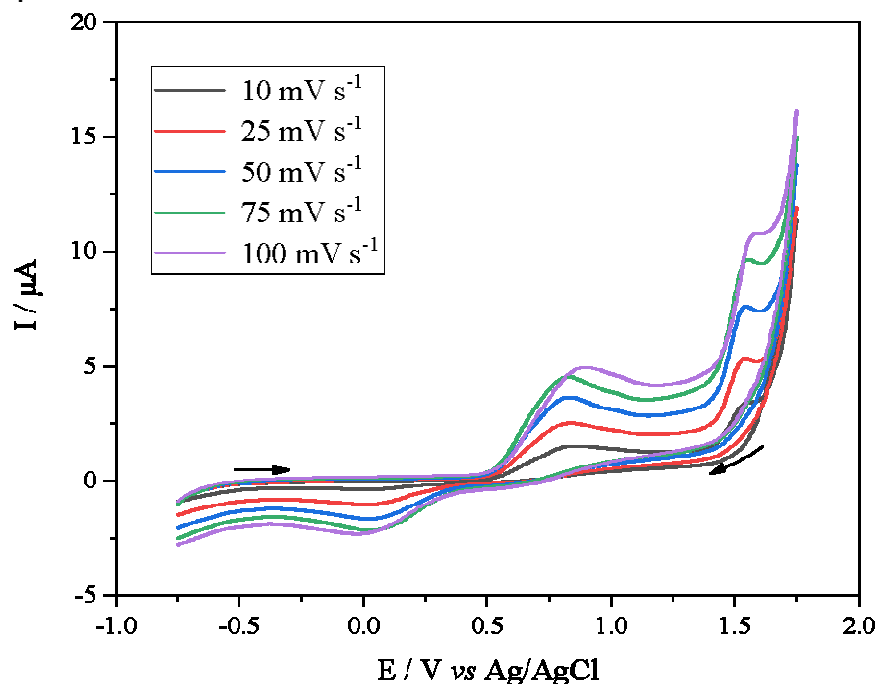


Fonte: o próprio autor

4.3 ESTUDO DA VELOCIDADE DE VARREDURA

O estudo da velocidade de varredura da infusão aquosa de folhas de erva mate foi realizado no intuito de escolher qual a melhor velocidade para o desenvolvimento do método de impressão digital voltamétrica. Para isso, variou-se a velocidade no intervalo de 10 a 100 mV s^{-1} para $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de infusão aquosa de folhas de erva mate referente a amostra C2E40, em solução tampão fosfato (pH 3,0) (Figura 5). Pode-se observar que, quanto maior a velocidade de varredura, maior a intensidade de corrente. Entretanto, na velocidade de 50 mV s^{-1} tem-se repetibilidade e melhor definição dos picos de oxidação e de redução.

Figura 5. Voltamogramas cíclicos de 100 μL de infusão aquosa de folhas de erva mate da amostra C2E40 obtidos com EDDB em solução tampão fosfato (pH 3,0) empregando polimento com alumina e variando a velocidade de varredura de 10 a 100 mV s^{-1} .



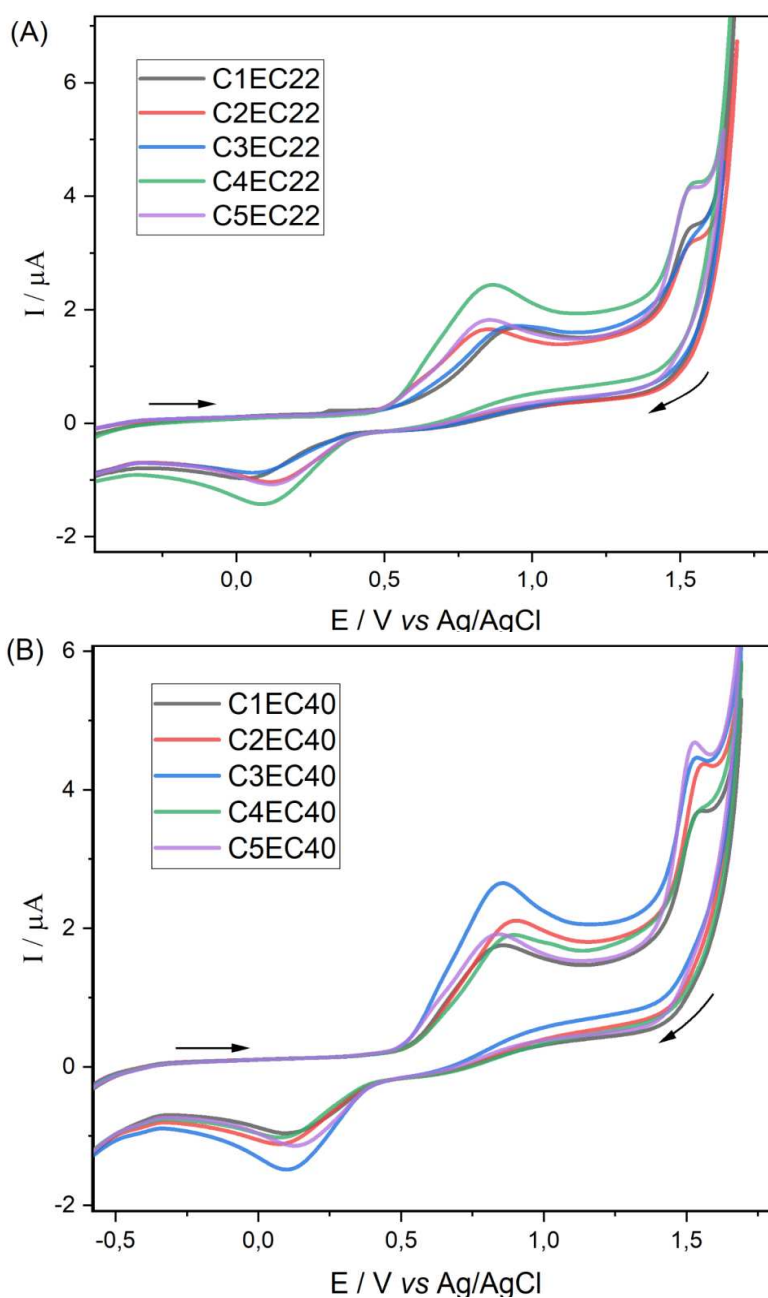
Fonte: o próprio autor

4.4 MEDIÇÕES DOS PERFIS VOLTAMÉTRICOS DAS INFUSÕES DE FOLHAS DE ERVA MATE QUIMICAMENTE MODIFICADAS E ANÁLISE ASCA

Com base nos parâmetros experimentais selecionados, realizou-se a aquisição dos perfis voltamétricos das infusões de folhas de erva mate das demais amostras (Figura 6). A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos da análise ASCA para os perfis voltamétricos de oxidação, de redução e cíclico completo (oxidação + redução) para os efeitos do melhoramento genético, sombreamento e sua interação na infusão de folhas de erva mate. Pelos resultados apresentados na Tabela 1, observa-se que, para o perfil voltamétrico de oxidação, o modelo ASCA mostra que o efeito de melhoramento genético é significativo, ao nível de confiança de 95% com p -valor de 0,0001. O mesmo pode ser observado para os efeitos do sombreamento e da interação do melhoramento genético com o sombreamento, sendo também significativos ao nível de confiança de 95% com p -valor de 0,0001 para cada efeito. Estes resultados demonstram que os efeitos de melhoramento genético,

sombreamento e a interação entre eles ocasionam mudanças relevantes no perfil químico das folhas de erva mate. Para os dados obtidos do perfil voltamétrico de redução, o modelo ASCA, mostra que o efeito do melhoramento genético é significativo ao nível de confiança de 95% com p -valor de 0,0008.

Figura 6. Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) obtidos com o EDDB para $100 \text{ }\mu\text{L}$ de infusões aquosas de folhas de erva mate das amostras: (A) Amostras: C1EC22, C2EC22, C3EC22, C4EC22, C5EC22, em solução tampão fosfato (pH 3,0). (B) Amostras: C1EC40, C2EC40, C3EC40, C4EC40 e C5EC40, em solução tampão fosfato (pH 3,0).



Fonte: o próprio autor

Tabela 1. Resultados da análise ASCA dos perfis voltamétricos de oxidação, redução e cíclicos completos (oxidação + redução) para os efeitos do melhoramento genético, sombreamento e sua interação nas infusões aquosas de folhas de erva mate quimicamente modificadas.

Fatores ASCA	Impressão digital – perfil voltamétrico de oxidação	
	Efeito (%)	<i>p</i> -valor
Melhoramento genético	8,36	0,0001
Sombreamento	51,42	0,0001
Interação (melhoramento genético × sombreamento)	27,70	0,0001
Resíduos	12,52	
	Impressão digital – perfil voltamétrico de redução	
	Efeito (%)	<i>p</i> -valor
Melhoramento genético	4,18	0,0008
Sombreamento	53,42	0,0001
Interação (melhoramento genético × sombreamento)	33,63	0,0001
Resíduos	8,76	
	Impressão digital – perfil voltamétrico cíclico completo (oxidação + redução)	
	Efeito (%)	<i>p</i> -valor
Melhoramento genético	7,06	0,0001
Sombreamento	52,05	0,0001
Interação (melhoramento genético × sombreamento)	29,55	0,0001
Resíduos	11,35	

Fonte: o próprio autor

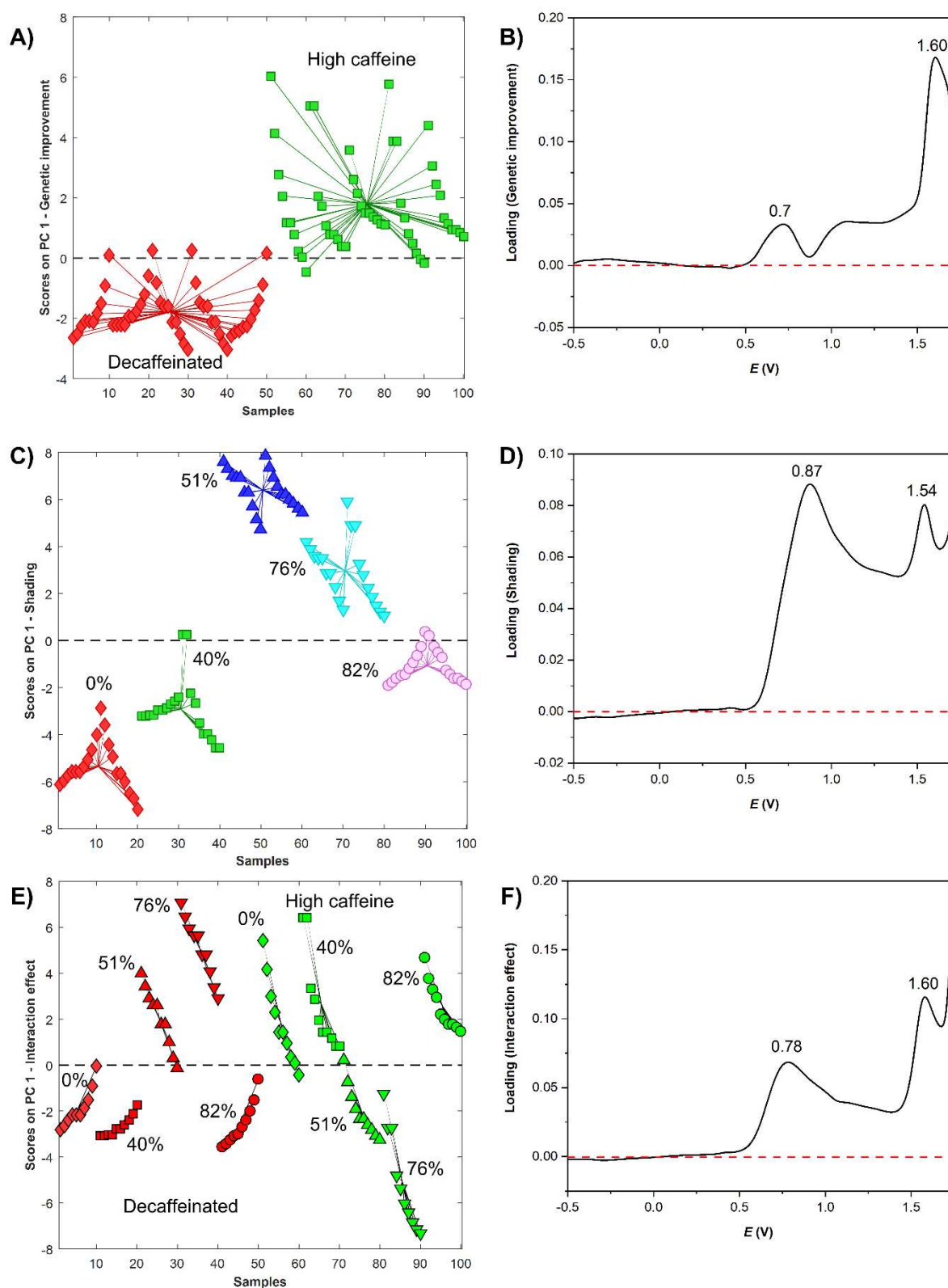
O efeito de sombreamento e de interação do melhoramento genético com o sombreamento ao nível de confiança de 95%, alcançaram um *p*-valor de 0,0001, sendo também significativos e demonstrando que esses efeitos são responsáveis por mudanças no perfil metabólico das folhas de erva mate. No caso do perfil voltamétrico cíclico completo, o modelo ASCA demonstra similarmente a significância do efeito do melhoramento genético, sombreamento e a interação entre estes dois fatores na mudança química das folhas de erva mate, uma vez que, ao nível de confiança de 95%, resultaram em *p*-valores de 0,001.

A Figura 7 apresenta os gráficos de escores da análise simultânea de componentes (SCA, do inglês, *simultaneous component analysis*) com a projeção residual de cada escores e cargas (loadings) para o modelo ASCA aplicado aos perfis voltamétricos de oxidação das infusões aquosas de folhas de erva mate. A

Figura 7A ilustra o impacto do melhoramento genético, exibindo a separação dos escores oriundos dos diferentes níveis de xantinas (caféina) das folhas de erva mate. Os escores referentes às folhas de erva mate com alto teor de caféina se localizaram em sua maioria na região positiva, enquanto a grande maioria das descafeinadas se projetou na porção negativa desse gráfico. Os loadings indicaram que a região de potencial mais influenciada pela variação no melhoramento genético foi em +0,70 V e +1,60 V (Figura 7B), regiões de oxidação de compostos fenólicos e xantinas, respectivamente. A relevância estatística do fator de melhoramento genético das impressões digitais voltamétricas indica que a diferença química entre as plantas de erva mate descafeinadas e com alto teor de caféina é mantida, independentemente das condições de luz. Em outras palavras, a variação genética característica das plantas de erva mate e a preservação da descafeinação são garantidas. Portanto, os perfis voltamétricos de oxidação e os modelos ASCA foram capazes de mostrar se o perfil químico permanece consistente na seleção da erva mate ou se é alterado pelo estresse ambiental. Vale destacar que o perfil voltamétrico de oxidação contém 8,36% da variância total relacionada ao melhoramento genético (Tabela 1).

O impacto do sombreamento pode ser observado na Figura 7C, em que a projeção dos escores evidenciou uma diferenciação entre os níveis de sombreamento de 0%, 40% e 82%, os quais tendiam a concentrar-se na região negativa. Enquanto aquelas com 51% e 76% de sombreamento foram projetadas na região positiva. Os picos de oxidação observados em +0,87 V +1,54 V (Figura 7D) são característicos dos compostos fenólicos e de xantinas, respectivamente.

Figura 7. Gráficos de escores da análise simultânea de componentes (SCA) com resíduos e loadings projetadas para o modelo ASCA de perfil voltamétrico de oxidação das infusões aquosas de folhas de erva mate. **A)** Efeito de melhoramento genético: (♦) descafeinado e (■) alta caféina; **B)** Loading do efeito de melhoramento genético; **C)** Efeito do sombreamento: (♦) 0%, (■) 40%, (▲) 51%, (▼) 76% e (●) 82% de níveis de sombreamento; **D)** Loading do efeito de sombreamento; **E)** Efeito de interação (melhoramento genético × sombreamento): (♦) descafeinado sob 0% de sombreamento; (■) descafeinado sob 40% de sombreamento; (▲) descafeinado sob 51% de sombreamento; (▼) descafeinado sob 76 % de sombreamento; (●) descafeinado sob 82% de sombreamento; (♦) alto teor de caféina sob 0% de sombreamento; (■) alto teor de caféina sob 40% de sombreamento; (▲) alto teor de caféina sob 51% de sombreamento; (▼) alto teor de caféina com 76% de sombreamento; (●) alto teor de caféina com 82% de sombreamento); **F)** Loading do efeito de interação.



Fonte: o próprio autor

Esses loadings estão relacionados aos níveis de sombreamento de 51% e 76%. De acordo com o modelo ASCA (Tabela 1), 51,42% da variância total dos

perfis voltamétricos de oxidação foi oriunda do efeito de sombreamento, sendo o maior efeito detectado quando comparado com o melhoramento genético e a interação entre os dois fatores.

O efeito da interação entre melhoramento genético e sombreamento foi significativo e pode ser observado na Figura 7E. Os loadings indicaram que a região espectral mais influenciada pela variação na interação entre melhoramento genético e sombreamento foi em +0,78 V e +1,60 V. Esses loadings estão relacionados com o perfil voltamétrico de erva mate descafeínada aos níveis de sombreamento de 51% e 76% e com alto teor de cafeína nos níveis de sombreamento de 0%, 40% e 82%. Os picos de oxidação observados em +0,78 V +1,60 V (Figura 7F) são característicos dos compostos fenólicos e de xantinas, respectivamente.

A intensidade da radiação solar é um elemento crucial no metabolismo secundário da erva mate, e sua relevância pode ser antecipada nos perfis voltamétricos de oxidação, dado que tem sido reconhecido como um fator significativo na variação química das folhas de erva mate (TORMENA et al., 2020). Estudos reportados na literatura referentes a quantificação individual de cafeína demonstraram que há maior concentração desse metabólito em plantas submetidas a maiores níveis de sombreamento, além disso, mostra que os clone EC40 possuem maiores concentrações de cafeína e os clones EC22 maiores concentrações de teobromina (DE AGUIAR et al., 2024). No entanto, estudos realizados em folhas de erva mate, indicam que os níveis de cafeína e teobromina em plantas cultivadas sob alta intensidade luminosa exibem sensibilidades consideráveis quando sujeitos a variações na época de colheita e na estação do ano (PAULI et al., 2019).

Pelos dados apresentados na Figura 6, observa-se que não houve um padrão de resposta ao sombreamento. No entanto, o menor nível de sombreamento (0%) possui as menores concentrações de metabólitos. A não linearidade pode ser explicada devido ao fato de que cada pico pode se referir a um grupo de metabólitos. Para os maiores níveis de sombreamento (76% e 82%), concentrações maiores das xantinas podem ser observadas. Isso pode ser explicado pela teoria do carbono nutriente (BRYANT et al., 1983), em que a fotossíntese e as concentrações de carboidratos diminuem com a diminuição de radiação.

O efeito de interação entre o melhoramento genético e sombreamento revelou as distintas respostas químicas entre as plantas de erva mate descafeinadas e as de alto teor de cafeína quando expostas a diferentes níveis de sombreamento. Além

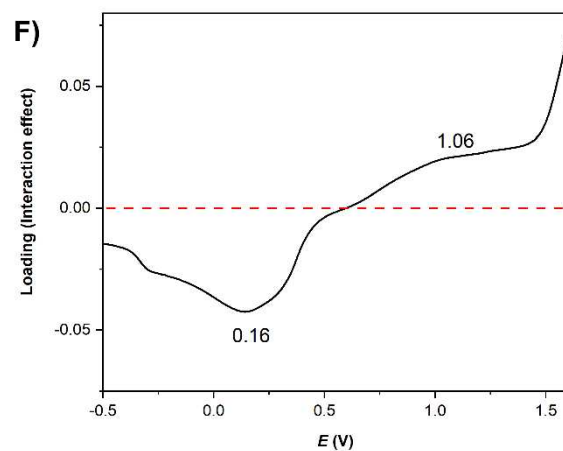
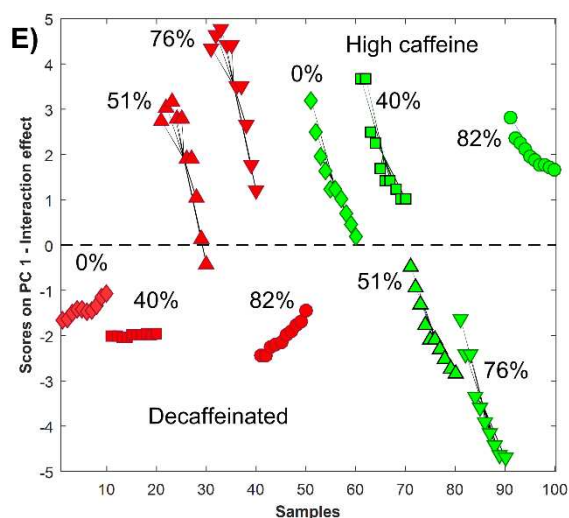
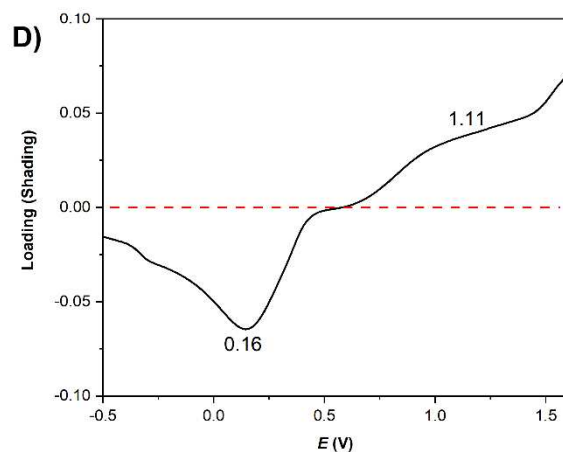
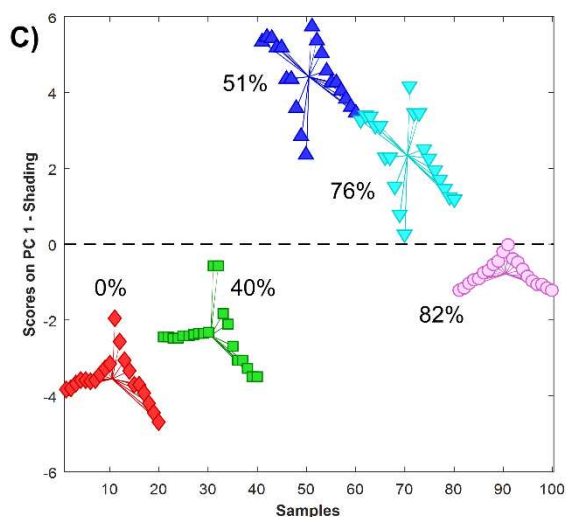
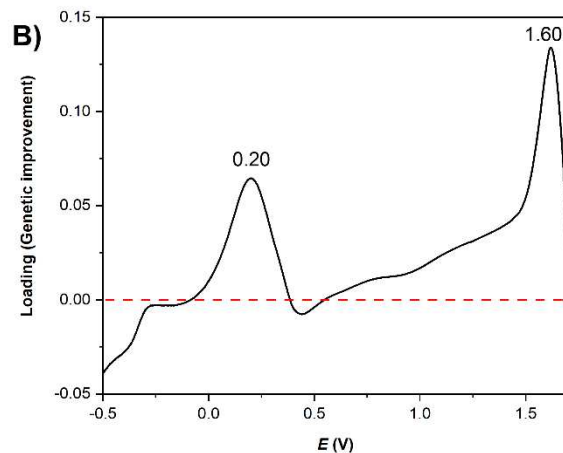
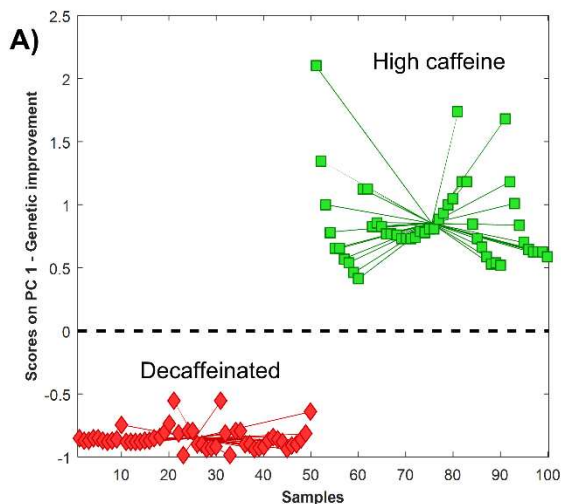
disso, a significância do efeito de interação entre melhoramento genético e sombreamento ressalta a importância do fator 1, evidenciando que ambas as plantas exibiram comportamentos genéticos diferenciados. Esse efeito de interação foi responsável por explicar 27,70% da variância total dos perfis voltamétricos de oxidação (Tabela 1).

Na Figura 8 são apresentados os gráficos de escores da análise simultânea de componentes com a projeção residual individual de cada escore e cargas (loadings) para o modelo ASCA aplicado aos perfis voltamétricos de redução das infusões de folhas de erva mate.

O impacto do melhoramento genético pode ser observado na Figura 8A, que exibe a separação entre os diferentes níveis de cafeína. Observa-se que os escores relacionados às folhas de erva mate com alto teor de cafeína estão todos localizados na região positiva, enquanto as descafeinadas projetaram-se na região negativa do gráfico. A região espectral mais influenciada pela variação do melhoramento genético indicada pelos loadings foi em 0,20 V (Figura 8B), região de redução dos produtos de oxidação dos compostos fenólicos que foram oxidados em potenciais elevados na superfície do EDDB (~1,50 V). Pelo gráfico de loadings, o pico de redução observado em 1,60 V é devido, possivelmente, a algum composto diferente dos estudados ou a impurezas do eletrodo, não havendo relação com os compostos estudados. O modelo ASCA para os perfis cíclicos de redução mostrou que 4,18% da variância total pode ser explicada pelo efeito do melhoramento genético (Tabela 1). Sendo assim, os perfis voltamétricos de redução, estatisticamente, indicam que a diferença química entre as plantas de erva mate descafeinadas e com alto teor de cafeína é mantida, independentemente das condições de sombreamento. Isto demonstra que as impressões digitais voltamétricas e os modelos ASCA foram capazes de prever se o perfil químico permanece consistente na seleção da erva mate ou se é alterado pelo estresse ambiental.

Figura 8. Gráficos de escores da Análise de Componentes Simultâneos (SCA) com resíduos projetados e loadings para o modelo ASCA de perfil voltamétrico de redução das infusões aquosas de folhas de erva mate. **A)** Efeito do melhoramento genético: (♦) descafeinado e (■) alta cafeína; **B)** loading do efeito do melhoramento genético; **C)** Efeito do sombreamento: (♦) 0%, (■) 40%, (▲) 51%, (▼) 76% e (●) 82% dos níveis de sombreamento; **D)** Loading do efeito de sombreamento; **E)** Efeito de interação (melhoramento genético × sombreamento): (♦) descafeinado sob 0% de sombreamento; (■) descafeinado sob 40% de sombreamento; (▲) descafeinado sob

51% de sombreamento; (▼) descafeinado sob 76% de sombreamento; (●) descafeinado sob 82% de sombreamento; (◆) alta cafeína sob 0% de sombreamento; (■) alta cafeína sob 40% de sombreamento; (▲) alta cafeína sob 51% de sombreamento; (▼) alta cafeína com 76% de sombreamento; (●) alta cafeína com 82% de sombreamento); F) Loading do efeito de interação.



Fonte: o próprio autor

A Figura 8C apresenta o impacto do sombreamento, projetando escores que evidenciaram a distinção entre os níveis de sombreamento de 0%, 40% e 82%, os quais concentram-se na região negativa. E na região positiva projetaram-se os níveis de sombreamento de 51% e 76%. Conforme os loadings observados na Figura 8D, o pico de redução em +0,16 V é característico de redução dos produtos de oxidação dos compostos fenólicos que foram oxidados em potenciais elevados na superfície do EDDB (~1,50 V) e se relaciona aos níveis de sombreamento de 0%, 40% e 82%. Já o pico em +1,11 V deve-se, possivelmente, a algum composto diferente dos estudados ou a impurezas do eletrodo, não havendo relação com os compostos estudados, e se relaciona aos níveis de sombreamento de 51% e 76%. A maior variância explicada através do modelo ASCA para os perfis voltamétricos de redução é para o efeito de sombreamento, com 53,42% da variação total (Tabela 1).

A Figura 8E demonstra que o efeito de interação entre o melhoramento genético e o sombreamento foi significativo. A região espectral mais influenciada pela interação do melhoramento genético e do sombreamento indicada pelos loadings foi em +0,16 V (Figura 8F), que está relacionado a redução dos produtos de oxidação dos compostos fenólicos que foram oxidados em potenciais elevados na superfície do EDDB (~1,50 V) e pode ser relacionado com a impressão digital de erva mate descafeínada aos níveis de sombreamento de 0%, 40% e 82% e com alto teor de cafeína nos níveis de sombreamento de 51% e 76%. O pico de redução em +1,06 V deve-se, possivelmente, a algum composto diferente dos estudados ou a impurezas do eletrodo, não havendo relação com os compostos estudados e, está relacionado com a impressão digital de erva mate descafeínada aos níveis de sombreamento 51% e 76% e com alto teor de cafeína aos níveis de 0%, 40% e 82% de sombreamento. O efeito de interação foi responsável por explicar 33,63% da variação total dos perfis voltamétricos de redução na modelagem ASCA (Tabela 1). Assim como observado nos perfis voltamétricos de oxidação, a interação entre melhoramento genético e disponibilidade de luz para a planta de erva mate foi significativa, sustentando o efeito do melhoramento genético. O comportamento distinto observado entre as plantas de erva mate quando submetidas ao mesmo nível de sombreamento evidencia que possuem comportamentos genéticos diferenciados.

A Figura 9 apresenta os gráficos de escores da análise simultânea de componentes (SCA) com a projeção residual de cada escores e cargas (loadings)

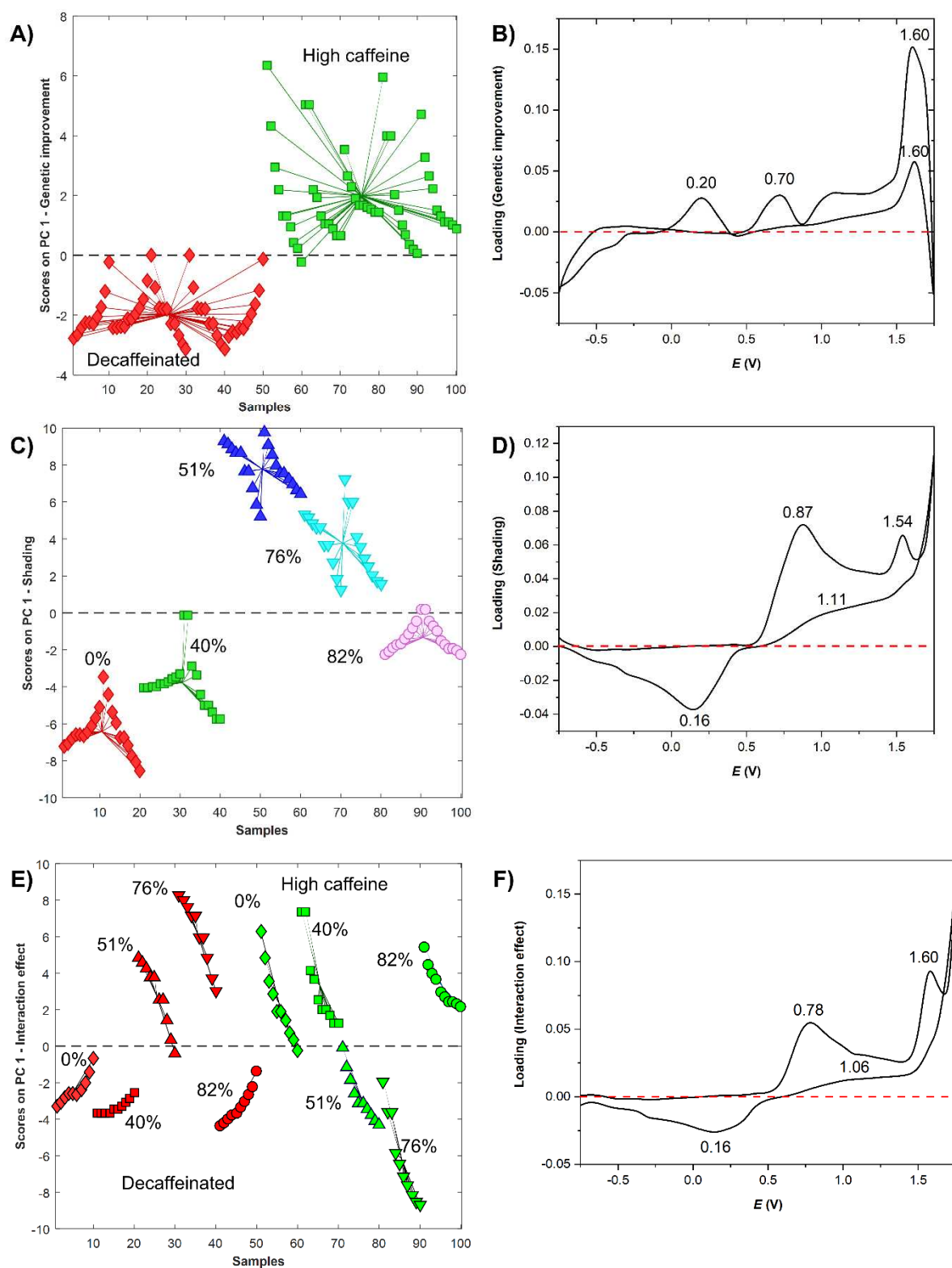
para o modelo ASCA aplicado aos perfis voltamétricos cíclicos completos (oxidação + redução) das infusões de folhas de erva mate.

A Figura 9A apresenta o impacto do melhoramento genético, em que, a maioria dos escores relacionados às folhas de erva mate com alto teor de cafeína localizam-se na região positiva e os escores relacionados às folhas de erva mate descafeinadas na região negativa. Os loadings indicam que a região mais influenciada pela variação do melhoramento genético foi nos potenciais de oxidação de +0,70 V e +1,60 V e no potencial de redução de 0,20 V (Figura 9B), ressaltando que o pico de redução em +1,60 V deve-se, possivelmente, a algum composto diferente dos estudados ou a impurezas do eletrodo, não havendo relação com os compostos estudados. Assim, por meio dos perfis voltamétricos cíclicos completos (oxidação + redução), o modelo ASCA determina o efeito do melhoramento genético contribuindo com 7,06% da variância total das impressões digitais. Portanto, estatisticamente, o fator de melhoramento genético dos perfis voltamétricos cíclicos completos (oxidação + redução), indica que, independentemente do sombreamento, as mudanças químicas entre as plantas de alto teor de cafeína e descafeinadas são mantidas, evidenciando a capacidade dos impressões digitais voltamétricas (perfis voltamétricos das infusões de erva mate) e dos modelos ASCA em prever se o perfil químico das folhas de erva mate permanece constante durante a seleção ou se é influenciado por estresses ambientais.

O impacto do sombreamento pode ser observado na Figura 9C, em que os escores revelam a distinção entre os níveis de sombreamento, concentrando-se na região negativa os níveis de 0%, 40% e 82%. E os níveis de 51% e 76%, concentram-se na região positiva do gráfico.

Figura 9. Gráficos de escores da análise de componentes simultânea (SCA) com resíduos e cargas projetadas para o modelo ASCA de perfil voltamétrico cíclico (oxidação + redução) das infusões aquosas de folhas de erva mate. **A)** Efeito de melhoramento genético: (♦) descafeinado e (■) alta cafeína ; **B)** Loading do efeito de melhoramento genético; **C)** Efeito do sombreamento: (♦) 0%, (■) 40%, (▲) 51%, (▼) 76% e (●) 82% de níveis de sombreamento; **D)** Loading do efeito de sombreamento; **E)** Efeito de interação (melhoramento genético × sombreamento): (♦) descafeinado sob 0% de sombreamento; (■) descafeinado sob 40% de sombreamento; (▲) descafeinado sob 51% de sombreamento; (▼) descafeinado sob 76% de sombreamento; (●) descafeinado sob 82% de sombreamento; (♦) alto teor de cafeína sob 0% de sombreamento; (■) alto teor de cafeína sob 40% de sombreamento; (▲) alto teor de cafeína sob 51% de sombreamento; (▼) alto teor de cafeína com 76% de sombreamento ; (●) alto teor de cafeína com 82% de

sombreamento); **F)** Loading do efeito de interação.



Fonte: o próprio autor

Conforme os loadings observados na Figura 9D, o pico de oxidação em +0,87 V e o pico de redução em +0,16 V são característicos dos compostos fenólicos. O

pico de oxidação em +1,54 V é característico das xantinas, resultando que o pico de redução em +1,11 V deve-se, possivelmente, a algum composto diferente dos estudados ou a impurezas do eletrodo, não havendo relação com os compostos estudados. Os níveis de sombreamento de 0%, 40% e 82% estão relacionados ao pico de redução em +0,16V e, os de 51% e 76% de sombreamento estão relacionados aos picos de oxidação em +0,87 V e +1,54V. A modelagem ASCA (Tabela 1) determinou o efeito do sombreamento com contribuição de 52,05% da variância total das impressões digitais para esses perfis voltamétricos cíclicos completos (oxidação + redução).

A Figura 9E demonstra que o efeito de interação entre o melhoramento genético e o sombreamento foi significativo. Os loadings mostram que as regiões espectrais que modelam essa interação são o pico de oxidação em +0,78 V e o pico de redução de +0,16 V (Figura 9F), característicos da oxidação reversível dos compostos fenólicos. E o pico de oxidação em +1,60 V (Figura 9F), característico das xantinas, resultando que o pico de redução em +1,06 V deve-se, possivelmente, a algum composto diferente dos estudados ou a impureza do eletrodo, não havendo relação com os compostos estudados. O pico de redução em +0,16V está relacionado com a impressão digital de erva mate descafeínada aos níveis de sombreamento de 0%, 40% e 82% e com alto teor de cafeína nos níveis de sombreamento de 51% e 76%. E os picos oxidação em +0,78V e +1,60V estão relacionados com a impressão digital de erva mate descafeínada aos níveis de sombreamento de 51% e 76% e com alto teor de cafeína aos níveis de 0%, 40% e 82% de sombreamento. Cerca de 29,55% da variância total das impressões digitais voltamétricas cíclicas foram atribuídas ao efeito de interação (Tabela 1). Assim como nos perfis voltamétricos de oxidação e nos de redução, a interação entre melhoramento genético e disponibilidade de luz na planta de erva mate foi significativa, sustentando o efeito do melhoramento genético. O comportamento distinto observado entre as plantas de erva mate quando submetidas ao mesmo nível de luz evidencia que possuem comportamentos genéticos diferenciados.

4.5 DISCRIMINAÇÃO PLS-DA

O PLS-DA foi utilizado como uma ferramenta de discriminação supervisionada para as impressões digitais voltamétricas de infusões de folhas de erva mate com

alto teor de cafeína e descafeinados a partir dos perfis voltamétricos de oxidação, redução e cíclico completo (oxidação + redução). De acordo com as figuras de mérito apresentadas na Tabela 2, para os três perfis voltamétricos investigados tem-se 100% de sensibilidade, 100% de especificidade e 100% de taxa de eficiência. Além disso, não possuem taxas de falso-positivo e nem de falso-negativo, demonstrando assim, que o método proposto alcança um excelente modelo para a discriminação das amostras de erva mate quimicamente modificadas, podendo ser utilizado como uma modelagem para controle de qualidade destas.

Tabela 2. Figuras de mérito para o modelo PLS-DA de discriminação das infusões aquosas das folhas de erva mate usando a impressão digital voltamétrica.

Impressão digital voltamétrica	Número de variáveis latentes do PLS-DA	Conjunto de dados PLS-DA	Figuras de mérito				
			Sensibilidade	Especificidade	Taxa de falso-positivo	Taxa de falso-negativo	Taxa de eficiência
Perfil voltamétrico de oxidação	4	Conjunto de treinamento	100%	100%	0%	0%	100%
		Conjunto de teste	100%	100%	0%	0%	100%
Perfil voltamétrico de redução	2	Conjunto de treinamento	100%	100%	0%	0%	100%
		Conjunto de teste	100%	100%	0%	0%	100%
Perfil voltamétrico cíclico completo (oxidação + redução)	4	Conjunto de treinamento	100%	100%	0%	0%	100%
		Conjunto de teste	100%	100%	0%	0%	100%

Fonte: o próprio autor

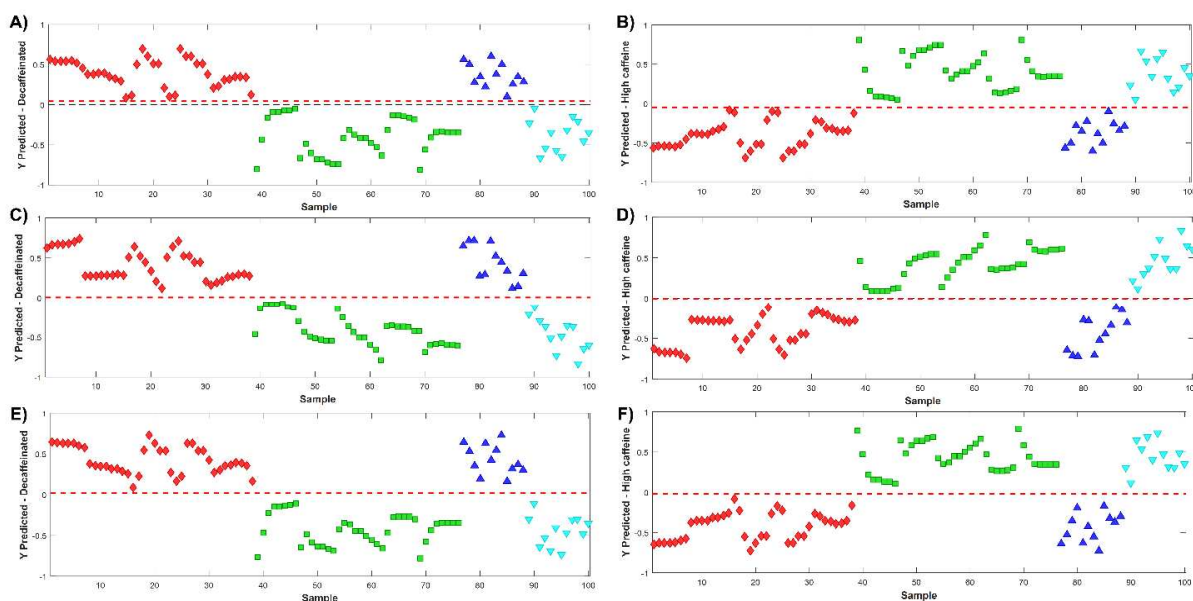
A representação gráfica da discriminação das impressões digitais, apresentada na Figura 10, demonstra uma excelente separação entre os escores em todos os três perfis voltamétricos utilizados. Observa-se que os escores das impressões digitais de treinamento e validação, estão separadas corretamente.

4.6 PRECISÃO E REPETIBILIDADE

A precisão do método para obtenção dos perfis voltamétricos das infusões aquosas das folhas de erva mate quimicamente modificadas foi avaliada em termos

de repetibilidade e precisão intermediária. Sendo realizadas as medidas de quatro amostras, sendo duas descafeinadas (C3EC22 e C5EC22) e duas com alta cafeína (C3EC40 e C5EC40), quatro vezes por dia (repetibilidade) durante três dias alternados (precisão intermediária). Conforme mostrado na Tabela 3, os resultados obtidos de DPR são inferiores a 15% (STÖCKL et al., 2009), demonstrando assim, que o método possui boa precisão intermediária e repetibilidade.

Figura 10. Modelos de previsão de análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para infusões aquosas de folhas de erva mate descafeinadas e com alto teor de cafeína. **A)** Discriminação da infusão descafeinada com base no perfil voltamétrico de oxidação; **B)** discriminação da infusão com alto teor de cafeína com base no perfil voltamétrico de oxidação; **C)** discriminação da infusão descafeinada com base no perfil voltamétrico de redução; **D)** discriminação da infusão com alto teor de cafeína com base no perfil voltamétrico de redução; **E)** discriminação da infusão descafeinada com no perfil voltamétrico cíclico completo (oxidação +redução); **F)** discriminação da infusão com alto teor de cafeína com base no perfil voltamétrico cíclico completo (oxidação +redução); (♦) Amostras de treinamento descafeinadas, (▲) Amostras de validação descafeinadas, (■) Amostras de treinamento com alto teor de cafeína, (▼) Amostras de validação com alto teor de cafeína e (---) valor limite da discriminação PLS-DA (Threshold).



Fonte: o próprio autor

4.7 ESTABILIDADE DA AMOSTRA

A estabilidade da amostra foi avaliada a partir dos perfis voltamétricos das infusões aquosas das folhas de erva mate quimicamente modificadas. Conforme mostrado na Tabela 4, os resultados obtidos de DPR são inferiores a 6%, demonstrando assim, que a amostra permaneceu estável no período avaliado.

Tabela 3. Estudo de repetibilidade e precisão intermediária para obtenção dos perfis voltamétricos das infusões das folhas de erva mate quimicamente modificadas

Amostra	Compostos	DPR (%)	
		Repetibilidade ^a	Precisão Intermediária ^b
C3EC22	Xantinas	2,209	7,156
	Compostos Fenólicos (oxidação)	0,890	3,438
	Compostos Fenólicos (redução)	2,881	4,099
C3EC40	Xantinas	0,413	3,475
	Compostos Fenólicos (oxidação)	0,742	1,765
	Compostos Fenólicos (redução)	3,628	4,390
C5EC22	Xantinas	0,711	5,994
	Compostos Fenólicos (oxidação)	1,095	1,463
	Compostos Fenólicos (redução)	1,862	3,009
C5EC40	Xantinas	1,522	2,894
	Compostos Fenólicos (oxidação)	0,326	1,581
	Compostos Fenólicos (redução)	1,725	2,562

^a N=4

^b N= 4 medidas por dia durante 3 dias

Fonte: o próprio autor

Tabela 4. Estudo da estabilidade da amostra C2EC40 para obtenção dos perfis voltamétricos das infusões aquosas das folhas de erva mate quimicamente modificadas

Amostra	Compostos	DPR (%)
C2EC40	Xantinas	5,170
	Compostos Fenólicos (oxidação)	4,839
	Compostos Fenólicos (redução)	5,719

Fonte: o próprio autor

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado um estudo da impressão digital voltamétrica para o controle de qualidade de plantas de erva mate quimicamente modificadas submetidas a diferentes níveis de sombreamento. O método ASCA associado aos perfis voltamétricos de oxidação, redução e cíclico completos (oxidação + redução) proporcionou a obtenção de resultados significativos para o efeito do melhoramento genético e o efeito de sombreamento em todos os perfis voltamétricos estudados, demonstrando que os efeitos são independentes um do outro. E a interação do melhoramento genético e sombreamento confirmou a diferença genética entre as plantas quimicamente modificadas nos três perfis voltamétricos analisados. A análise multivariada dos dados (modelo de discriminação PLS-DA) aplicados aos perfis voltamétricos selecionados resultou em 100% de sensibilidade, 100% de especificidade e 100% de taxa de eficiência. E para as taxas de falso-positivo e de falso-negativo não foram observados valores. Portanto, todas as figuras de mérito avaliadas para a classificação da erva mate descafeinada e com alto teor de cafeína demonstraram a construção de um excelente modelo para obtenção de impressão digital voltamétrica de plantas de erva mate quimicamente modificadas.

REFERÊNCIAS

ABDELNUR, Patricia V.; CALDANA, Camila; MARTINS, Marina CM. Metabolomics applied in bioenergy. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 22, p. 1-9, 2014.

ALKHATIB, Ahmad. Yerba Maté (*Illex Paraguariensis*) ingestion augments fat oxidation and energy expenditure during exercise at various submaximal intensities. **NutrMetab (Lond)**, v. 11, p. 42, 2014. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-42>.

BARD, Allen J.; FAULKNER, Larry R.; WHITE, Henry S. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

BARROS, Rita de Cássia Mendes; RIBEIRO, Mauro Celso; AN-SUMODJO, Paulo Teng; JULIAO, Murilo Sérgio da Silva; SERRANO, Sílvia Helena Pires; Ferreira, Neidenê Gomes. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I. Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317–325, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000200024>

BERTÉ, Kleber A. S. ; BEUX, Marcia R.; SPADA, Patricia K. W. D. S.; SALVADOR, Mirian; HOFFMANN-RIBANI, Rosemary. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Illex paraguariensis* A.St.-Hil., *Aquifoliaceae*) Extract as Obtained by Spray Drying. **J Agric Food Chem**, v. 59, p. 5523. 2011. <https://doi.org/10.1021/jf2008343>.

BRERETON, Richard G. **Chemometrics**. Wiley, 2018.

BRETT, Ana Maria Oliveira; BRETT, Christopher M. A. **Eletroquímica princípios, métodos e aplicações**. 1. ed. New York: Oxford University Press Inc., 1993.

BRYANT, John P.; CHAPIN III, F. Stuart; KLEIN, David R. **Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory**. *Oikos*, p. 357-368, 1983.

CAFFEINE INFORMER: **Everything caffeine** - The impact of caffeine on mood, cognitive function, performance and hydration: a review of benefits and risks. The Author Journal compilation, British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin. Disponível em: <https://www.caffeineinformer.com>. Acesso em 12 de novembro de 2023.

CATANDUVAS. **Benefícios da erva mate**, 2023. Disponível em: <http://www.catandugas.com/erva-mate/>. Acesso em: 20 de abril de 2024.

CHENG, Weiwei; SORENSEN, Klavs M.; MONGI, Richard J.; NDABIKUNZE, Bernadette K.; CHOVE, Bernard E.; SUN, Da-Wen; ENGELSEN, Søren B. A comparative study of mango solar drying methods by visible and near-infrared spectroscopy coupled with ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA). **Lwt**, v. 112, p. 108214, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.112>

COLPO, Ana C.; ROSA, Hemerson; LIMA, Maria Eduarda; PAZZINI, Camila Eliza F.; DE CAMARGO, Vanessa B.; BASSANTE, Felipa E. M.; PUNTEL, Robson; ÁVILA, Daiana Silva; MENDEZ, Andreas; FOLMER, Vanderlei. Yerba mate (*Illex*

paraguariensis St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chem**, v. 209, p. 185–195, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.059>

CROUCH, Stanley R.; SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James. **Principles of Instrumental Analysis**. 6th. ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2007.

DARTORA, Nessana; DE SOUZA, Lauro M.; SANTANA-FILHO, Arquimedes P.; IACOMINI, Marcello; VALDUGA, Alice T.; GORIN, Philip A.J.; SASSAKI, Guilherme L. UPLC-PDA–MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1453–1461, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.112>

DE ALMEIDA, Andressa Gomes; PAULI, Elis Daiane; TORMENA, Cláudia Domiciano; WENDLING, Ivar; Rakocevic, Miroslava; BRUNS, Roy Edward; MARCHEFAVE, Gustavo Galo; SCARMINIO, Ieda Spacino. Portable NIR Spectroscopy-Chemometric Identification of Chemically Differentiated Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Clones. **Food Analytical Methods**, v. 16, n. 3, p. 469–477, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02431-y>

DE FREITAS, Guilherme Barroso Langoni; ANDRIOLA, Alessandra; GAUER, Ana Gabriela; IENK, Larize Suelen da Silveira. Erva-mate, muito mais que uma tradição, um verdadeiro potencial terapêutico. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 3, 2011. <https://doi.org/10.5216/ref.v8i3.15966>

DELAROZA, Fernanda; RAKOCEVIC, Miroslava; MALTA, Galileu Bernardes; BRUNS, Roy Edward; SCARMINIO, Ieda Spacino. Spectroscopic and Chromatographic Fingerprint Analysis of Composition Variations in *Coffea arabica* Leaves Subject to Different Light Conditions and Plant Phenophases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1929–1938, 2014. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140172>

DEMING, S.; MORGAN, S. **Handbook of chemometrics and qualimetrics: part A**. Technometrics, v. 40, n. 3, p. 264, 1998.

DE MORAIS, Lilia Aparecida Salgado. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *In*: Congresso Brasileiro de Olericultura, Águas de Lindóia, SP. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299–S3302, ago. 2009. CD-ROM. Suplemento. Trabalho apresentado no 49.

DE AGUIAR, Natalia Saudade; GABIRA, Mônica Moreno; DUARTE, Manoela Mendes; TOMASI, Jéssica de Cássia; HANSEL, Fabricio Augusto; LAVORANTI, Osmir José; DESCHAMPS, Cicero; HELM, Cristiane Vieira; WENDLING, Ivar. How shading levels affect bioactive compounds in leaves of yerba mate clones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 113, p. 104796, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2024.104796>

FANG, Yi; UMASANKAR, Yogeswaran; RAMASAMY, Ramaraja P. A novel bi-enzyme electrochemical biosensor for selective and sensitive determination of methyl

salicylate. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 81, p. 39-45, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.095>

FERREIRA, Márcia Miguel Castro. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Editora da UNICAMP, 2015.

FU, Li; ZHENG, Yuhong; ZHANG, Pengchong; ZHANG, Haoyang; ZHUANG, Weibing; ZHANG, Huaiwei; WANG, Aiwu; SU, Weitao; YU, Jinhong; LIN, Cheng-Te. Enhanced electrochemical voltammetric fingerprints for plant taxonomic sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 120, p. 102–107, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.052>

GAWRON-GZELLA, Anna; CHANAJ-KACZMAREK, Justyna; CIELECKA-PIONTEK, Judyta. Yerba Mate—A Long but Current History. **Nutrients**, v. 13, n.11, 3706, 2021.
<https://doi.org/10.3390/nu13113706>

GOSSER, David K. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993.

HOYOS-ARBELÁEZ, Jorge; VÁZQUEZ, Mario; CONTRERAS-CALDERÓN, José. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1371–1381(2017).
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.017>

JÚNIOR, Eraldo Antonio Bonfatti; LENGOWSKI, Elaine Cristina; JÚNIOR, Aderbal Ludka. Mapeamento do processo produtivo de erva-mate. **Revista Internacional de Ciências**, v.8, n.1, p. 82–98, 2018. <https://doi.org/10.12957/ric.2018.32500>

KHATER, Mohga; DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, Alfredo; MERKOÇI, Arben. Biosensors for plant pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 93, p. 72-86, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.091>

KING, William P.; JOSEPH, Kuriakose T.; KISSINGER, Peter T. Liquid Chromatography with Amperometric Detection for Determining Phenolic Preservatives. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 63, n. 1, p. 137–142, 1980.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/63.1.137>

KISSINGER, Peter T.; HEINEMAN, William R. Cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 702–706, 1983.

LIANG, Yongye; LI, Yanguang; WANG, Hailiang; DAI, Hongjie. Strongly coupled inorganic/nanocarbon hybrid materials for advanced electrocatalysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 6, p. 2013-2036, 2013.
<https://doi.org/10.1021/ja3089923>

LIMA, Alex S.; PRIETO, Kátia R.; SANTOS, Carla S.; VALERIO, Hellen Paula; GARCIA-OCHOA, Evelyn Y.; HUERTA-ROBLES, Aurora; BELTRAN-GARCIA, Miguel J.; DI MASCIIO, Paolo; BERTOTTI, Mauro. In-vivo electrochemical monitoring of H₂O₂ production induced by root-inoculated endophytic bacteria in Agave tequilana leaves. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 99, p. 108-114, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.039>

LUTOMSKI, Piotr; GOZDZIEWSKA, Malgorzata; FLOREK-LUSZCZKI, Magdalena. Health properties of Yerba Mate. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, 2020, 27, 310. <https://doi.org/10.26444/aaem/119994>.

MARCHEAFAVE, Gustavo Galo; TORMENA, Cláudia Domiciano; MATTOS, Lavínia Eduarda; LIBERATTI, Vanessa Rocha; FERRARI, Anna Beatriz Sabino; RAKOCEVIC, Miroslava; BRUNS, Roy Edward; SCARMINIO, Ieda Spacino; PAULI, Elis Daiane. The main effects of elevated CO₂ and soil-water deficiency on 1H NMR-based metabolic fingerprints of Coffea arabica beans by factorial and mixture design. **Science of The Total Environment**, v. 749, 142350, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142350>

MARCHEAFAVE, Gustavo Galo; PAULI, Elis Daiane; TORMENA, Cláudia Domiciano; MATTOS, Lavínia Eduarda; DE ALMEIDA, Andressa Gomes; RAKOCEVIC, Miroslava; BRUNS, Roy Edward; SCARMINIO, Ieda Spacino. Irrigated and CO₂ level effects on metabolism in Coffea arabica beans from mixture design—near infrared fingerprints. **Microchemical Journal**, v. 152, p. 104276, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104276>

MARTINS, Isarita; CARREIRA, Franciely Cristiani; CANAES, Larissa S.; JUNIOR, Francisco Alberto de Souza Campos; CRUZ, Letícia Maria da Silva; RATH, Susanne. Determination of parabens in shampoo using high performance liquid chromatography with amperometric detection on a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 1–7, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.047>

MATTOS, Gabriel J.; MARCHEAFAVE, Gustavo Galo; ROLDÁN, William H.; MATTOS, Miguel J.; DE PAULA, Fabiana M.; GRYSCHKEK, Ronaldo C.B.; SARTORI, Elen R. Serological diagnosis of strongyloidiasis in immunocompetent and immunosuppressed patients based on an electrochemical immunoassay using a flexible device allied to PLS-DA and ROC statistical tools. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 354, p. 131213, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131213>

NUNES, Karen M.; ANDRADE, Marcus Vinícius O.; ALMEIDA, Mariana R.; FANTINI, Cristiano; SENA, Marcelo M. Raman spectroscopy and discriminant analysis applied to the detection of frauds in bovine meat by the addition of salts and carrageenan. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 582-589, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.076>

PAULI, Elis Daiane; SCHEEL, Guilherme Luiz; DELAROZA, Fernanda; RAKOCEVIC, Miroslava; BRUNS, Roy Edward; SCARMINIO, Ieda Spacino. Photodiode array chromatographic-spectrophotometric metabolite quantification for yerba-mate plant sexual dimorphism differentiation. **Microchemical Journal**, v. 151, p. 104218, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104218>

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; NEGULESCU, Gheorghe Petre. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 01, n. 01, p. 106, 2011. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>

PUANGPRAPHANT, Sirima; BERHOW, Mark A.; VERMILLION, Karl; POTTS, Greg; DE MEJIA, Elvira Gonzalez. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hilaire) inhibit NF-κB nucleus translocation in macrophages and

induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells.

Molecular Nutrition Food Research, v. 55, n. 10, p. 1509–1522, 2011.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201100128>.

RESENDE, Marcos Deon Vilela; STURION, José Alfredo; CARVALHO, Américo Pereira; SIMEÃO, Rosângela Maria; FERNANDES, José Sebastião Cunha.

Programa de Melhoramento da ErvaMate coordenado pela Embrapa: **Resultados da avaliação genética de populações, progênie, indivíduos e clones**. Colombo: EmbrapaFlorestas (Ed.), 2000. p. 10-19.

RUST, Alexandra; MARINI, Federico; ALLSOPP, Mike; WILLIAMS, Paul J.;

MANLEY, Marena. Application of ANOVA-simultaneous component analysis to quantify and characterise effects of age, temperature, syrup adulteration and

irradiation on near-infrared (NIR) spectral data of honey. *Spectrochimica Acta Part A*:

Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 253, p. 119546, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119546>

SALAMANCA-NETO, Carlos A. R.; MARCHEFAVE, Gustavo Galo; SCREMIN, Jessica; BARBOSA, Eduardo C. M.; CAMARGO, Pedro H. C., DEKKER, Robert F. H.; SCARMINIO, Ieda S.; BARBOSA-DEKKER, Aneli M.; SARTORI, Elen R.

Chemometric-assisted construction of a biosensing device to measure chlorogenic acid content in brewed coffee beverages to discriminate quality. **Food Chemistry**, v. 315, p. 126306, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126306>

SCHUHLI,Guilherme Schnell; PENTEADO JUNIOR, Joel Ferreira; WENDLING, Ivar.

Descritores mínimos em cultivares de espécies florestais: uma contribuição para erva-mate. Colombo: **Embrapa Florestas**, 2019. p. 22 - (Documentos / Embrapa Florestas, ISSN 1980- 3958 ; 333). Disponível em:

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/item/221>. Acesso em: 20 de abril de 2024.

SANTOS, Anderson Martin; WONG, Ademar; ALMEIDA, Adriana Araújo;

FATIBELLO-FILHO, Orlando. Simultaneous determination of paracetamol and ciprofloxacin in biological fluid samples using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide and nickel oxide nanoparticles. **Talanta**, v. 174, p. 610–618, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.040>

ŠERUGA, Marijan; NOVAK, Ivana; JAKOBEK, Lidija. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1208–1216, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.047>

SILVA, Alexandra Rangel; SANTOS, João Rodrigo; ALMEIDA, P. J., &

RODRIGUES, J. A. Screening of Antioxidant Compounds in Green Coffee by Low-Pressure Chromatography with Amperometric Detection. **Food Analytical Methods**, v. 14, n. 10, p. 2175–2185, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02037-w>

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos da química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

STÖCKL, Dietmar; D'HONDT, Heidi; THIENPONT, Linda M. Method validation across the disciplines—critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2180-2190, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.056>

TOMASI, Jéssica de Cássia; DE LIMA, Gabriel Goetten; WENDLING, Ivar; HELM, Cristiane Vieira; HANSEL, Fabrício Augusto; DE GODOY, RossanaCatie Bueno; GRUNENVALDT, Renata Lúcia; DE MELO, Tamires Oliveira; TOMAZZOLI, Maíra Maciel; DESCHAMPS, Cícero. Effects of different drying methods on the chemical, nutritional and colour of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **International Journal of Food Engineering**, v. 17, n.7, p. 551–560, 2021. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2020-0312>

TORMENA, Cláudia Domiciano; MARCHEFAVE, Gustavo Galo; PAULI, Elis Daiane; BRUNS, Roy Edward; SCARMINIO, Ieda Spacino. Potential biomonitoring of atmospheric carbon dioxide in *Coffea arabica* leaves using near-infrared spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v.26, n. 29, p. 30356–30364, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06163-1>

TORMENA, Cláudia Domiciano; PAULI, Elis Daiane; MARCHEFAVE, Gustavo Galo; SCHEEL, G. L.; RAKOCEVIC, M.; Roy Edward; SCARMINIO, Ieda Spacino. FT-IR biomarkers of sexual dimorphism in yerba-mate plants: Seasonal and light accessibility effects. **MicrochemicalJournal**, v. 158, p. 105329, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105329>

WENDLING, Ivar. Melhoramento de erva-mate: perspectivas. *In*: SEMINÁRIO ERVA-MATE XXI: Modernização no Cultivo e Diversificação do Uso da Erva-Mate. Embrapa Floresta (Ed.), 2016, p. 34 – 37.

WENDLING, Ivar; STURION, José Alfredo; STUEPP, Carlos André; REIS, Cristiane Aparecida Fioravante; RAMALHO, Magno Antonio Patto; RESENDE, Marcos Deon Vilela. Early selectionandclassificationofyerba mate progênies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 3, p. 279–286, 2018. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2018000300002>

XIAO, Qi; ZHOU, Zhenzeng; SHEN, Zijie; CHEN, Jiandan; GU, Chunchuan; LI, Lihua; CHEN Fengnong; LIU, Hongying. Electrochemical fingerprinting combined with machine learning algorithm for closely related medicinal plant identification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 375, p. 132922, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132922>

ZAMIR, Rausan; ISLAM, Nazmul; Kudrat-E-Zahan; ASRAF, Ali; ZAKIRA, Choudhury M. An insight into pathway and health risk assessment of toxic metals in herbal medicine. **Journal of Chemistry**, v. 2022, n. 1, p. 2610852, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2610852>

ZHENG, Yuhong; ZHU, Jiangwei; FU, Li; LIU, Qinghua. Phylogenetic Investigation of Yellow Camellias Based on Electrochemical Voltammetric Fingerprints. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 15, n. 10, p. 9622–9630, 2020. <https://doi.org/10.20964/2020.10.54>