

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESPECTROSCOPIA POR FLUORESCÊNCIA BIDIMENSIONAL E
FT-IR APLICADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS TOTAIS E CAFEÍNA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Débora Gonçalves Carvalho

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESPECTROSCOPIA POR FLUORESCÊNCIA BIDIMENSIONAL E
FT-IR APLICADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS TOTAIS E CAFEÍNA**

Débora Gonçalves Carvalho

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia

Área de concentração: Pesquisa e
Desenvolvimento de Processos

Linha de Pesquisa: Projeto, Simulação,
Modelagem, Controle e Otimização de Processos
Químicos e Bioprocessos.

Orientadores:

Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler

Prof. Dr. Luciane Ferreira Trierweiler

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação "*Espectroscopia por Fluorescência Bidimensional e FT-IR Aplicadas na Quantificação de Compostos Fenólicos Totais e Cafeína*", elaborada por Débora Gonçalves Carvalho, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Michel José Anzanello - UFRGS



Prof. Dra. Neusa Fernandes de Moura - FURG



Prof. Dr. Vitor Manfredi - UFRGS

Resumo

O consumo regular de polifenóis tem sido associado à prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e problemas neurológicos. A cafeína encontrada em chás (*Camellia sinensis*) apresenta propriedades estimulantes, no entanto o consumo em excesso pode afetar negativamente a saúde humana. Os métodos comumente usados para quantificação desses compostos são destrutivos, requerem pré-tratamento da amostra, longo tempo de análise e uso de solventes. Neste trabalho, investigamos métodos alternativos de quantificação de compostos fenólicos e cafeína baseados em espectroscopia óptica, com foco em viabilizar construção de sensores customizados. Os compostos fenólicos foram investigados em duas matrizes: em cachaças envelhecidas e em extratos de chás. A cafeína foi somente avaliada na matriz de chá, a quantificação da mesma foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A cachaça utilizada neste estudo foi envelhecida em um barril de Amburana e amostras foram coletadas durante um período de 463 dias. As amostras de cachaça e chá foram analisadas com um método analítico tradicional para quantificação fenólica total (Folin-Ciocalteu), com Espectroscopia por Fluorescência 2-D e Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier. Para a modelagem quimiométrica, aplicamos uma metodologia baseada na Otimização de Colônias de Formigas (ACO) para otimizar a seleção de variáveis e o ajuste do modelo para prever o conteúdo fenólico total e cafeína. Nossos resultados demonstraram que a espectroscopia de fluorescência foi mais sensível que o Infravermelho para predição dos compostos fenólicos totais para os modelos globais e locais em amostras de cachaça, com combinação de apenas quatro pares de Excitação / Emissão. Para os chás as técnicas de fluorescência e infravermelho também se mostram eficientes para a predição de compostos fenólicos totais e cafeína.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, cafeína, fluorescência 2D, FTIR, Otimização de colônia de formigas, cachaça, chá.

Abstract

The regular consumption of polyphenols has been linked to the prevention of cancer, cardiovascular disease, diabetes, and neurological problems. Caffeine found in teas (*Camellia sinensis*) has stimulating properties, however, excessive consumption can negatively affect human health. The methods commonly used for quantification of these compounds are destructive, require sample pretreatment, long analysis time and the use of solvents. In this work, we investigate alternative methods for quantifying phenolic and caffeine compounds based on optical spectroscopy, focused on enabling the construction of custom sensors. Phenolic compounds were investigated in two matrices: aged cachaça and tea extracts. Caffeine was only evaluated in the tea matrix, quantification was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The cachaça was aged in an Amburana barrel and the samples were collected during a period of 463 days. The cachaça and tea samples were analyzed with a traditional analytical method for total phenolic quantification (Folin-Ciocalteu), as well as 2-D Fluorescence Spectroscopy and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. For the chemometric modeling, we applied a methodology based on Ant Colony Optimization (ACO) to optimize variable selection and model fitting to predict total phenolic and caffeine content. Our results demonstrated that fluorescence spectroscopy was more sensitive than IR in the quantification of total phenolic compounds for both global and local models, for cachaça samples, with models using combinations of only four Excitation/Emission pairs. For teas, fluorescence and infrared techniques were also efficient for the prediction of total phenolic compounds and caffeine.

Keywords: Phenolic compounds, caffeine, fluorescence 2D, FTIR, Ant Colony Optimization, cachaça, tea

Agradecimentos

A Deus.

Aos meus orientadores, Prof Dr Jorge Otávio Trierweiler e a professora Dr^a Luciane Ferreira Trierweiler por todo o apoio, orientação e ensinamentos durante esta etapa.

Ao Lucas Ranzan por toda ajuda durante a realização deste trabalho.

À professora Dr^a Rosângela Jacques pelo auxílio nas análises de quantificação de cafeína.

Aos meus pais, João e Cristina, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

Aos meus colegas do mestrado e do GIMSCOP, pela amizade e convívio.

À Carol Weber por toda ajuda e convívio no laboratório.

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização desta dissertação.

Aos técnicos, por se mostrarem sempre solícitos.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante a realização desta pesquisa.

À cachaçaria Weber Haus por ceder à cachaça utilizada neste estudo.

E a todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Motivação.....	1
1.2 Objetivos do trabalho.....	2
1.2.1 Objetivo geral	2
1.2.2 Objetivos específicos	2
1.3 Estrutura da dissertação	3
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	4
2.1 Cachaça.....	4
2.1.1 Processo de envelhecimento.....	7
2.2 Chá (<i>Camellia sinensis</i>)	8
2.3 Compostos Fenólicos.....	11
2.3.1 Técnicas convencionais utilizadas na identificação e quantificação de compostos fenólicos.....	12
2.3.2 Compostos fenólicos encontrados em destilados.....	13
2.3.3 Compostos fenólicos encontrados em chás	15
2.4 Cafeína.....	16
2.4.1 Técnicas convencionais para quantificação de cafeína	17
2.5 Métodos ópticos.....	17
2.5.1 Espectroscopia de infravermelho	17
2.5.2 Espectroscopia por fluorescência	20
2.6 Quimiometria	23
2.6.1 Regressão de mínimos quadrados parciais (PLS).....	24
2.6.2 Métodos de seleção de variáveis.....	24
2.6.3 Pré-tratamento dos dados.....	25
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	26
3.1 Obtenção das amostras.....	26
3.1.1 Processo de envelhecimento de Cachaça.....	26
3.1.2 Chá Verde e Chá Preto (<i>Camellia sinensis</i>)	27
3.1.2.1 Extratos Aquosos	27
3.2 Análise de compostos fenólicos totais.....	27
3.3 Medição dos Espectros de Fluorescência	27
3.4 Medição dos espectros no Infravermelho	28
3.5 Análise de Cafeína por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC).....	29
3.6 Quimiometria	29
3.6.1 Tratamento dos dados.....	29
3.6.2 Desenvolvimento de Modelos e seleção de variáveis.....	30
3.6.3 Mínimos quadrados parciais – PLS	31
Capítulo 4 – Estudo de caso: Processo de envelhecimento da Cachaça	32

4.1	Resultados e Discussões.....	32
4.1.1	Teor de compostos fenólicos totais.....	32
4.1.2	Espectroscopia por fluorescência 2D.....	33
4.1.3	Espectroscopia no infravermelho médio.....	35
4.1.4	Desenvolvimento dos modelos de predição de compostos fenólicos	35
Capítulo 5 – Estudo de caso: Análise de compostos fenólicos totais e cafeína em chás (<i>Camellia sinensis</i>).....		42
5.1	Resultados e discussões	42
5.1.1	Quantificação de compostos fenólicos totais.....	42
5.1.2	Quantificação de cafeína	44
5.1.3	Análises dos espectros no infravermelho.....	44
5.1.4	Análises dos espectros por fluorescência.....	46
5.1.5	Desenvolvimento dos modelos quimiométricos	47
Capítulo 6 – Considerações Finais e Sugestões para Trabalhos Futuros		51
Referências		53
Apêndice I – Tabelas com modelos de tamanho 2,3,4 e 5 utilizando o ACO		62
Anexo I – Fases do Algoritmo: Modelagem Quimiométrica com Componentes Espectrais Puros (PSCM).		68

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Fluxograma do processo de produção de cachaça.	5
Figura 2.2: Plantação de <i>Camellia sinensis</i> (GONÇALVES; DINIZ, 2013; SCHWEIKART, 2011) 9	9
Figura 2.3: Fluxograma do processo de produção do chá verde e chá preto.	10
Figura 2.4: Classificação dos compostos fenólicos (Adaptado de MAMEDE; PASTORE, 2004; GRANATO et al., 2016)	11
Figura 2.5: Reação entre ácido gálico e reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico (DE OLIVEIRA et al., 2009).	13
Figura 2.6: Degradação da lignina e formação de compostos fenólicos (Puech, 1981).	14
Figura 2.7: Principais Compostos fenólicos extraídos da madeira no processo de envelhecimento da cachaça (RODRIGUES, 2013).	14
Figura 2.8: Estrutura genérica dos flavonoides	15
Figura 2.9: Estrutura genérica das catequinas (MUKHTAR; AHMAD, 2000).	15
Figura 2.10: Estruturas químicas. (A) Teaflavina e (B) Tearubigina encontradas no chá Preto (MUKHTAR; AHMAD, 2000)	16
Figura 2.11: Estrutura química da cafeína (DE MARIA; MOREIRA, 2007)	16
Figura 2.12: Espectro eletromagnético (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ JR, 2008).	18
Figura 2.13: Tipos de vibrações moleculares (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).	19
Figura 2.14: Esquema do espectrômetro com transformada de Fourier (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ JR, 2008)	20
Figura 2.15: A) Diagrama parcial de energia para um sistema fotoluminescente. B) Estados eletrônicos dos spins nas moléculas. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009)	21
Figura 2.16: Representação esquemática dos componentes de um fluorímetro ou espectrofluorímetro (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009)	22
Figura 3.1: Espectrofluorômetro Fluoromax.	28
Figura 3.2: Espectrofotômetro de absorção molecular com transformada de Fourier na região do infravermelho.	29
Figura 4.1: Teor de compostos fenólicos totais em cachaça envelhecida por 463 dias.	32
Figura 4.2: Espectros de fluorescência. A) Cachaça sem envelhecimento. B) Cachaça envelhecida com concentração de 1561 mg EAG L ⁻¹ de compostos fenólicos totais.	34
Figura 4.3: Espectros de fluorescência: A) Cachaça antes do processo de envelhecimento, B) 5 mg EAG L ⁻¹ , C) 10 mg EAG L ⁻¹ , D) 20 mg EAG L ⁻¹ , E) 25 mg EAG L ⁻¹ , F) 50 mg EAG L ⁻¹ , G) 75 mg EAG L ⁻¹ , H) 100 mg EAG L ⁻¹	34
Figura 4.4: Espectros das cachaças envelhecidas coletadas do barril na região do infravermelho médio.	35
Figura 4.5 : Pares de fluorescência selecionados pelos modelos de tamanho 2 a 5.	37
Figura 4.6: Valores reais versus valores preditos utilizando dados de (A) Fluorescência 2D e (B) Infravermelho.	38
Figura 4.7: Valores medidos vs. preditos para os modelos locais selecionados com base em dados de espectroscopia de fluorescência: SG1A (A), SG2A (B) e SG3A (C) e dados MIR: SG1B (D), SG2B (E) e SG3B (F).	41
Figura 5.1: Cromatograma da cafeína referente a uma amostra de chá verde detectado em 272nm.	44
Figura 5.2: Espectros MIR antes (A) e após (B) o tratamento dos dados com SNV apresentando as bandas identificadas.	45

Figura 5.3: Espectros NIR antes(A) e após (B) o tratamento dos dados com SNV apresentando as bandas identificadas.	46
Figura 5.4: Espectros médios de fluorescência dos chás verde (A, B, C, D, E) e chá preto (F, G, H, I).	47
Figura 5.5: Valores reais versus valores preditos utilizando dados de (A) Fluorescência e (B) Infravermelho médio (C)Infravermelho próximo	48
Figura 5.6: Valores reais versus valores preditos utilizando dados de (A) Fluorescência e (B) Infravermelho médio (C)Infravermelho próximo	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Destinos da Exportação de cachaça no ano de 2018 (Adaptado de IBRAC, 2018).....	5
Tabela 2.2: Composição química e requisitos de qualidade da aguardente de cana e da cachaça estabelecidos pela legislação Brasileira (Brasil, 2005)	7
Tabela 4.1: Métricas para os modelos preditivos baseados na espectroscopia de (A.) fluorescência 2D (B.) e infravermelho médio.....	36
Tabela 4.2: Métricas para os modelos locais com base na (A.) espectroscopia de fluorescência 2D (B.) e infravermelho médio.....	39
Tabela 5.1: Teor de compostos fenólicos presente em chás da <i>Camellia sinensis</i>	43
Tabela 5.2: Métricas para os modelos na espectroscopia de fluorescência, infravermelho médio (MIR) e infravermelho próximo (NIR) para predição de compostos fenólicos totais	48
Tabela 5.3: Métricas para os modelos na espectroscopia de fluorescência, infravermelho médio (MIR) e infravermelho próximo (NIR) para predição de cafeína	49

NOTAÇÃO E SIMBOLOGIA

<i>Aco</i>	Otimização de colônia de formigas
<i>CPS</i>	Ciclos por segundos
<i>ERN</i>	Espécies reativas de nitrogênio
<i>ERRO</i>	Espécies reativas de oxigênio
<i>Ex/Em</i>	Excitação/ Emissão
<i>FTIR</i>	Espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier
<i>HPLC</i>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>IR</i>	Infravermelho
<i>MAPE</i>	Erro percentual absoluto médio
<i>MIR</i>	Infravermelho médio
<i>MSC</i>	Correção Multiplicativa de Sinal
<i>NIR</i>	Infravermelho próximo
<i>PC</i>	Componente principal
<i>PCA</i>	Análise de componentes principais
<i>PCR</i>	Regressão de componente principal
<i>PLS</i>	Regressão de mínimos quadrados parciais
<i>PSCM</i>	Modelagem quimiométrica com os componentes espectrais puros
R^2	Coefficiente de determinação
<i>RMSE</i>	Raiz quadrada do erro médio
<i>SNV</i>	Variação Normal Padrão

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Motivação

Os alimentos e bebidas funcionais são cada vez mais consumidos devido as suas propriedades benéficas à saúde, relacionadas aos compostos bioativos. Esses compostos são muitas vezes utilizados como índice de qualidade nos alimentos, sendo os que mais se destacam os compostos fenólicos, carotenoides e cafeína.

Os compostos fenólicos e cafeína são encontrados em diversos alimentos e bebidas. Nas cachaças envelhecidas, segundo a Instrução Normativa nº13, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento é exigida a presença dos compostos fenólicos na bebida (BRASIL, 2005), assim a quantificação desses compostos é utilizada como requisito para autenticidade da cachaça envelhecida. Outra bebida amplamente consumida que apresenta na sua composição compostos bioativos é o chá (*Camellia sinensis*), que é a segunda bebida mais consumida do mundo, ficando somente atrás da água (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2019). Os compostos bioativos são atribuídos à qualidade sensorial dessas bebidas, como: sabor, cor e aroma, além disso, apresentam propriedades antioxidantes e estimulantes (AQUARONE et al., 2001; SAIGG; SILVA, 2009).

Os métodos comumente utilizados para quantificação destes compostos bioativos são destrutivos envolvem diversas etapas de pré-tratamento da amostra, como: extração, homogeneização, diluição e preparação de curvas de calibração, exigindo elevado tempo de análise além da utilização de reagentes/solventes. As técnicas cromatográficas são amplamente utilizadas, entretanto exigem alta quantidade de solvente, devido ao seu alto custo e à necessidade de operadores qualificados, tornam-se muitas vezes inacessíveis ao uso (BAJOUB et al., 2017).

Assim, o crescimento da indústria de alimentos e o desenvolvimento de novos produtos traz a necessidade de maior rigor no controle de qualidade, gerando um alto número de amostras a serem analisadas, exigindo o desenvolvimento de novas técnicas analíticas que forneçam dados rápidos e confiáveis, e que possam ser utilizadas em linha de produção.

As técnicas espectroscópicas combinadas com ferramentas quimiométricas vêm se destacando como técnicas alternativas para predição de compostos frente aos métodos

clássicos, como é o caso das técnicas baseadas em espectroscopia por fluorescência e infravermelho. Essas técnicas apresentam diversas vantagens, como baixo ou nenhum consumo de amostra, análise rápida, não necessitam de pré-tratamento da amostra, além de fácil operação e redução do uso de solventes, minimizando possíveis impactos ambientais (CHEN et al., 2014a; GALINHA et al., 2012).

As técnicas quimiométricas utilizadas para a predição de compostos normalmente utilizam os espectros completos, no entanto ainda é necessário estudos que visam à utilização de técnicas que facilitem a implementação de sensores em linhas de produção. Para isso podem ser utilizadas as ferramentas quimiométricas de seleção de variáveis, que aumentam a rapidez da coleta de dados, diminuindo a quantidade de informação inútil a ser adquirida na análise auxiliando na construção de sensores customizados para utilização em linha de produção.

Dessa forma, propõe-se investigar métodos não invasivos e rápidos para quantificação de compostos fenólicos totais em cachaças utilizando métodos de seleção de variáveis, facilitando o desenvolvimento e construção de sensores customizados e que podem ser utilizados não apenas com o intuito de verificar se a bebida realmente passou pelo processo de envelhecimento, evitando fraudes e a venda de cachaças de qualidade inferior, como também para acompanhar o processo de envelhecimento de maneira contínua. Além disso, também serão avaliadas a predição de compostos fenólicos totais e cafeína em chás utilizando seleção de variáveis, visando estudar técnicas que possam ser utilizadas para facilitar o controle de qualidade dessas bebidas.

1.2 Objetivos do trabalho

1.2.1 *Objetivo geral*

O presente trabalho tem como objetivo verificar a viabilidade do uso da espectroscopia por fluorescência e infravermelho com transformada de Fourier utilizando ferramenta de seleção de variáveis para predição de compostos fenólicos e cafeína.

1.2.2 *Objetivos específicos*

- Quantificar compostos fenólicos totais nas cachaças envelhecidas e realizar as medições de espectroscopia por fluorescência e no infravermelho.
- Quantificar compostos fenólicos totais e cafeína nos extratos aquosos de chá e realizar as medições de espectroscopia por fluorescência e infravermelho.
- Desenvolver modelo quimiométrico utilizando abordagem de seleção de variáveis para predição de compostos fenólicos em cachaças e em chás separadamente;
- Desenvolver um modelo quimiométrico utilizando abordagem de seleção de variáveis para a predição de cafeína em chás;
- Comparar os modelos de seleção de variáveis com um método de referência, Regressão de mínimos quadrados parciais-PLS.

1.3 Estrutura da dissertação

Neste capítulo foi realizada a apresentação geral desse trabalho, juntamente com os principais objetivos e motivações para o seu desenvolvimento.

O Capítulo 2 apresenta a revisão bibliográfica referente aos conceitos e informações que serviram como base para o andamento desta dissertação.

O Capítulo 3 apresenta a metodologia utilizada para o desenvolvimento dos procedimentos experimentais para as amostras de cachaça e chás.

Nos Capítulos 4 e 5 são apresentados os resultados e discussões referentes ao processo de envelhecimento da cachaça e dos extratos dos chás, respectivamente.

O Capítulo 6 apresenta as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

Este capítulo é constituído por um levantamento bibliográfico dos principais assuntos necessários para o desenvolvimento desse trabalho. Inicialmente serão apresentadas informações relativas à Cachaça e aos chás (*Camellia sinensis*). Na sequência são descritos os compostos encontrados nessas bebidas que serão estudados neste trabalho: os compostos fenólicos e a cafeína, mostrando suas principais metodologias de quantificação. Por fim, são apresentadas as técnicas óticas e ferramentas quimiométricas que estão sendo utilizadas em análise de bebidas e alimentos e que serão investigadas neste trabalho.

2.1 Cachaça

A cachaça tem origem no século XVI com a vinda dos portugueses e as primeiras plantações de cana para produção de açúcar. Nos tempos da escravidão, os negros descobriram que os restos de caldo de cana fermentavam, tornando-se um líquido diferenciado para consumo. Nessa época já se utilizavam as técnicas de destilação para as bebidas fermentadas de uva, e assim aplicaram ao mosto fermentado de cana de açúcar, dando origem ao que hoje chamamos de cachaça (CARDOSO, 2006).

De acordo com a legislação brasileira a cachaça é o produto obtido pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume a 20°C, apresentando características sensoriais peculiares, podendo ser acrescida de até 6 g L⁻¹ de açúcares, expressos em sacarose. Existe ainda a aguardente de cana definida como a bebida com graduação alcoólica de 38% a 54% em volume a 20°C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser acrescida de açúcares até 6 g L⁻¹, expressos em sacarose (BRASIL, 2005).

Estima-se que o Brasil tenha capacidade instalada de produção de 1,2 bilhão de litros de cachaça por ano, no entanto produz anualmente 800 milhões de litros. Em 2018, a cachaça foi exportada para 77 países, gerando receita de US\$ 15,61 milhões, equivalente a 8,41 milhões de litros. Conforme apresentado na Tabela 2.1 os principais países de

destino, expressos em % de valor em US\$ foram Estados Unidos, Alemanha, Paraguai e Portugal (IBRAC, 2019).

Tabela 2.1: Destinos da Exportação de cachaça no ano de 2018
(Adaptado de IBRAC, 2018)

País	Exportação em valor (%)
Estados Unidos	19,80
Alemanha	16,26
Paraguai	12,77
Portugal	8,59
Itália	6,96
França	6,77
Uruguai	3,88
Espanha	3,49
Países Baixos	3,13
Reino Unido	2,52
Outros	15,83

O processo de produção de cachaça é composto pelas etapas de moagem da cana, filtragem e decantação, fermentação e destilação conforme a Figura 2.1. Após a moagem da cana, o caldo passa pelo processo de filtragem e decantação para eliminação das impurezas, seguindo para a etapa de fermentação (VIANA et al., 2008). Na fermentação ocorre a transformação da sacarose e dos açúcares simples glicose e frutose em etanol, pela ação das leveduras. Após a fermentação, o mosto é chamado de vinho e apresenta além do etanol produtos em menores concentrações chamados de compostos secundários e dióxido de carbono. Para a separação dos produtos da fermentação alcoólica, é utilizada a destilação que separa os compostos com base em sua volatilidade (LEA; PIGGOTT, 2002; VIANA et al., 2008).

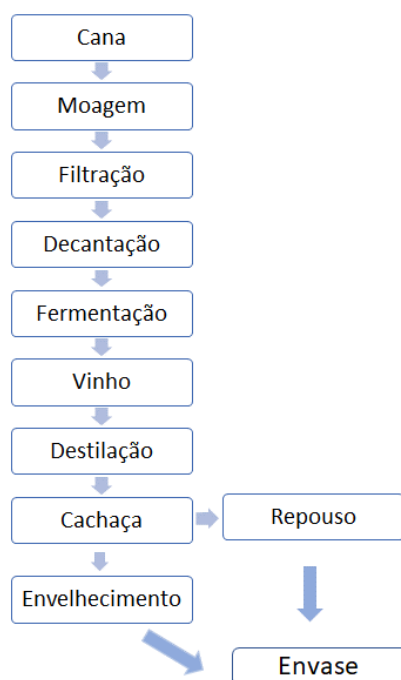


Figura 2.1: Fluxograma do processo de produção de cachaça.

A destilação pode ser realizada de forma descontínua (alambiques/destilação em batelada) ou contínua (colunas de destilação contínuas) utilizada em produções de grande escala. Na destilação ocorre a separação do vinho em três frações denominadas “cabeça”, “coração” e “cauda” sendo a fração “coração” mais importante para o destilado, pois é rica em etanol e contém quantidades menores de impurezas (LEA; PIGGOTT, 2002; VIANA et al., 2008).

Ao final do processo de destilação, o produto destilado passa por um período de descanso de dois a três meses em recipientes e locais protegidos, com o objetivo de melhorar a qualidade do aroma, adquirido durante o processo de produção da cachaça (CHAVES; FERNANDES; SILVA, 2003). A bebida então pode ser envasada ou ainda passar pelo processo de envelhecimento para agregar mais valor ao destilado. Na Tabela 2.2 estão descritos os requisitos estabelecidos pela legislação brasileira para o controle de qualidade da cachaça e aguardente de cana.

O reconhecimento da cachaça no ano de 2012, como produto exclusivo Brasileiro pelos EUA, trouxe novas oportunidades de mercado, valorizando o produto nacional (BRASIL, 2019). Os consumidores têm se tornado cada vez mais exigentes fazendo com que os produtores necessitem de maior controle e padronização das técnicas dentro da cadeia produtiva da bebida, produzindo cachaça de melhor qualidade (CARDOSO et al., 2012). Para agregar valor à bebida, o método utilizado é o envelhecimento do destilado em barris de madeira. De acordo com a legislação brasileira, uma cachaça envelhecida é a bebida que contém pelo menos 50% de cachaça envelhecida em um recipiente de madeira, com capacidade máxima de 700 litros, por um período não inferior a um ano (BRASIL, 2005).

Além dessa denominação, na legislação também são descritas a cachaça Premium sendo a cachaça que contém 100 % de cachaça envelhecida em recipiente de madeira de no máximo 700 litros, por no mínimo 1 ano e a cachaça Extra Premium envelhecida por no mínimo 3 anos. Assim como a cachaça a aguardente de cana também recebe as denominações de Envelhecida, Premium e Extra Premium. Além dos requisitos apresentados na Tabela 2.2, para as cachaças envelhecidas, a legislação exige a presença de compostos fenólicos totais na bebida, sendo o único diferencial para autenticidade desta bebida comparado com as outras cachaças.

Tabela 2.2: Composição química e requisitos de qualidade da aguardente de cana e da cachaça estabelecidos pela legislação Brasileira (Brasil, 2005)

Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Gradação alcoólica aguardente de cana	% em volume de álcool etílico a 20°C	38	54
Gradação alcoólica cachaça	% em volume de álcool etílico a 20°C	38	48
Acidez volátil, em ácido acético	mg 100 ml ⁻¹ de álcool anidro	-	150
Ésteres totais, em acetato de etila	mg 100 ml ⁻¹ de álcool anidro	-	200
Aldeídos totais, em acetaldeído	mg 100 ml ⁻¹ de álcool anidro	-	30
Furfural e Hidroximetilfurfural	mg 100 ml ⁻¹ de álcool anidro	-	5
Álcoois Superiores*	mg 100 ml ⁻¹ de álcool anidro	-	360
Congêneres**	mg 100 ml ⁻¹ de álcool anidro	200	650
Álcool metílico	mg 100 ml ⁻¹ de álcool anidro	-	20
Carbamato de etila	mg L ⁻¹ da bebida	-	150
Acroleína (2-propenal)	mg 100 ml ⁻¹ de álcool anidro	-	5
Álcool sec-butílico (2-butanol)	mg 100 ml ⁻¹ de álcool anidro	-	10
Álcool n-butílico (1-butanol)	mg 100 ml ⁻¹ de álcool anidro	-	3
Cobre (Cu)	mg L ⁻¹ da bebida	-	5
Chumbo (Pb)	µg L ⁻¹ da bebida	-	200
Arsênio (As)	mg L ⁻¹ da bebida	-	100

*Álcoois superiores=soma dos álcoois isobutílico, isoamílicos (2-metil-1butanol e 3-metil-1 butanol) e n-propílico (1-propanol).

**Congêneres= soma da acidez volátil, aldeídos, ésteres totais, furfural e hidroximetilfurfural e álcoois superiores.

2.1.1 Processo de envelhecimento

A etapa de envelhecimento da cachaça contribui para formação do sabor e aroma da bebida, tornando-se um passo essencial no processo de produção do destilado (MOSEDALE; PUECH, 1998). O envelhecimento do destilado é realizado em recipientes e tonéis de madeira, sendo o carvalho a madeira tradicional utilizada para envelhecimento de bebidas destiladas como uísque e conhaque (AYLOTT; MACKENZIE, 2010; ZACARONI et al., 2014).

Devido ao custo de aquisição dos tonéis de carvalho, por ser uma madeira típica do Hemisfério Norte, estudos com diferentes madeiras nativas do Brasil vêm sendo realizados. Dentre as espécies estudadas estão: amburana, amendoim, cedro, jatobá, ipê, freijó, grábia, bálsamo, peroba e jequitibá (SANTIAGO; CARDOSO; NELSON, 2017; ZACARONI et al., 2011).

A madeira é composta majoritariamente de lignina, celulose e hemicelulose. Os compostos encontrados em menores concentrações variam em função dos fatores ambientais e genéticos da planta. Quando presentes nas madeiras podem ser divididos em duas classes: compostos extrativos e não extrativos. Sendo os compostos extrativos: ácidos graxos, óleos voláteis, esteroides, compostos insaponificáveis, álcoois polihidroxilados, carboidratos solúveis e compostos fenólicos. Já os compostos não

extrativos são os compostos inorgânicos, proteínas e substâncias pécticas (AQUINO, 2004).

A lignina é solúvel em soluções alcoólicas, por esse motivo ocorrem diversas reações entre a madeira e o destilado no processo de envelhecimento, causando alterações na cor, odor e sabor da bebida, além de promover uma diminuição significativa do sabor alcoólico com aumento da doçura e sabor amadeirado. Tais alterações são causadas por: extração direta de compostos de madeira; decomposição de macromoléculas de madeira como celulose, hemicelulose e lignina pela ação do etanol e da água; reações entre componentes de madeira e constituintes originais do destilado; reações envolvendo apenas extrativos de madeira; reações envolvendo apenas os componentes do destilado e evaporação de compostos voláteis (CARDELLO; FARIA, 2000; NISHIMURA, K. AND MATSUYAMA, 1989; PUECH, 1981; SHEREV; BRINK, 1980).

Devido à especificidade de cada processo de envelhecimento, diversos fatores influenciam nas características do produto final, a saber: capacidade e histórico do barril, tipo de madeira, intensidade da tosta, temperatura, umidade, tempo de armazenamento e porosidade da madeira. A extração também depende da relação entre superfície e volume. Tonéis de menor capacidade tem maior relação superfície/volume resultando em maior rapidez de extração de componentes (AQUINO et al., 2006; DE MIRANDA et al., 2008). A madeira é semipermeável o que provoca a entrada de oxigênio e saída de água, etanol e outros compostos que favorece a qualidade sensorial da bebida (FILHO, 2010).

Durante envelhecimento da bebida os compostos extraídos do barril que mais se destacam são os compostos fenólicos por suas contribuições para a melhora da qualidade sensorial da bebida, sendo utilizados como forma de verificar a autenticidade da cachaça envelhecida.

2.2 Chá (*Camellia sinensis*)

O chá é a segunda bebida mais consumida do mundo, ficando somente atrás da água. O chá é cultivado e consumido na China e na Ásia há mais de 2000 anos. A denominação “chá” é originalmente utilizada para a folha ou bebida produzida através das folhas de *Camellia sinensis*, no entanto essa denominação ficou popularmente conhecida e utilizada para qualquer bebida produzida através de ervas, neste caso a denominação correta é infusão (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2019; MATSUURA, 2017).

Segundo a RDC nº 277 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o chá é o produto constituído de uma ou mais partes de espécies vegetais inteiras, fragmentadas ou moídas, com ou sem fermentação, tostadas ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás, podendo ser adicionado de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor (ANVISA, 2005).

A *Camellia sinensis* (Figura 2.2) é originária do sudeste da Ásia e pertence à família Theaceae. É um arbusto que pode chegar até 10 m de altura, no entanto normalmente são realizadas podas para aumentar a longevidade e facilitar a colheita, mantendo assim

aspectos de uma plantação de jardim. As folhas são verde-escuras de formato elíptico e com bordas serrilhadas (PONCE; TAYLOR, 1999; TANAKA; KOUNO, 2003).

Os chás podem ser classificados de acordo com o processo de produção, mais especificadamente com a etapa de oxidação, são classificados em: chá Preto (oxidado), Verde e Branco (não oxidado) e Oolong (semi-oxidado) (PONCE; TAYLOR, 1999; TANAKA; KOUNO, 2003). Antigamente as classificações eram feitas utilizando a expressão “fermentado e não fermentado”, no entanto depois de estudos descobriu-se que o processo observado na fabricação dos chás é a oxidação, no entanto ainda são encontrados diversos materiais na literatura com essa denominação (MATSUURA, 2017). Ainda assim existe um outro tipo de chá proveniente da *Camellia sinensis* o Pu-ehr conhecido como chá envelhecido, esse chá passa pelo processo de cozimento, prensagem e posterior armazenamento para envelhecimento durante meses onde ocorre a fermentação.

As folhas de *Camellia sinensis* apresentam uma variedade de constituintes como cafeína, óleos essenciais, aminoácidos, enzimas, pectina, vitaminas, carotenoides e compostos fenólicos, como flavonoides e taninos. Essa composição varia conforme a fisiologia, idade e variedade da planta (FILHO, 2010). A intensidade da coloração, o sabor e o aroma são requisitos utilizados para avaliar a qualidade sensorial dos chás (LE GALL; COLQUHOUN; DEFERNEZ, 2004). Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento da qualidade como: o cultivo, a colheita, processamento, armazenamento e preparação (AHMED; STEPP, 2013).



Figura 2.2: Plantação de *Camellia sinensis* (GONÇALVES; DINIZ, 2013; SCHWEIKART, 2011)

Cada tipo de chá apresenta etapas diferentes no beneficiamento da folha. As etapas de processamento do chá verde e chá preto podem ser observadas na Figura 2.3.

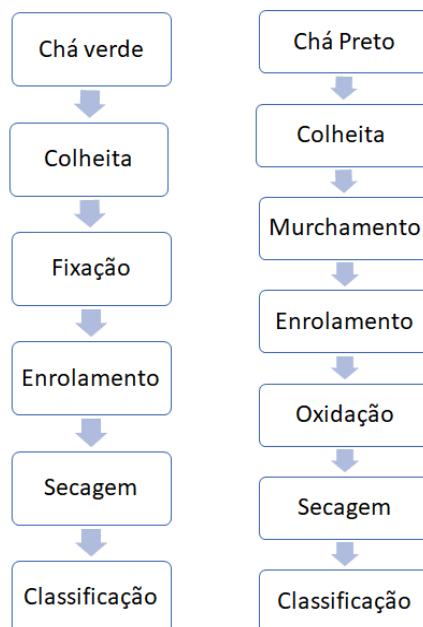


Figura 2.3: Fluxograma do processo de produção do chá verde e chá preto.

As etapas de fabricação do chá verde são: colheita, fixação, enrolamento, secagem, classificação e embalagem. Após a colheita, as folhas de chá são espalhadas sobre esteiras, por uma ou até três horas. Esse processo promove a hidrólise de carboidratos e pectinas não hidrossolúveis, a formação de catequinas, liberando o odor semelhante a grama das folhas de chá frescas e evaporando 30% do teor de umidade (AHMED; STEPP, 2013).

No processamento do chá verde não é realizada a etapa de oxidação diferentemente da fabricação do chá preto. No entanto no segundo passo do beneficiamento da folha ocorre a etapa de fixação, com o objetivo de inativar as enzimas, preservando os compostos bioativos que poderiam ser degradados. As enzimas presentes nas folhas da *Camelia sinensis* são: a polifenol oxidase (PFO), peroxidase, catalase e ascorbato oxidase. O processo de inativação das enzimas é normalmente realizado utilizando aquecimento a vapor por ser o método que preserva melhor os aspectos de coloração, compostos fenólicos e atividade antioxidante (AHMED; STEPP, 2013; NAGALAKSHMI et al., 2005; TANAKA; KOUNO, 2003). As folhas então são enroladas para romper a parede celular e após moldadas são secas, peneiradas, classificadas de acordo com o tamanho e embaladas (AHMED; STEPP, 2013). O chá verde além de apresentar características antioxidantes possui propriedades estimulantes e relaxantes provenientes da presença respectivamente da cafeína e de aminoácidos como a teanina (AHMED; STEPP, 2013).

Após a colheita, a produção do chá preto é composta pelas etapas de murcha, enrolamento, oxidação, secagem e classificação (PONCE; TAYLOR, 1999). Na etapa de murchamento as folhas são espalhadas em camadas finas, em bandejas de sistema aberto por um período de 16 a 20h, o ar quente é soprado e a umidade das folhas é evaporada pelo ar, ocorrendo a secagem. Neste processo ocorrem alterações bioquímicas e fisiológicas nas folhas que facilitam as próximas etapas de enrolamento e oxidação. As alterações decorridas dessa etapa contribuem para a qualidade do chá preto, onde ocorre

o aumento dos níveis de aminoácidos, carboidrato simples e cafeína; atividade máxima da enzima polifenol oxidase; perda da atividade da pectinase e decomposição da clorofila. Após o processo de murchamento, ocorre o enrolamento ou corte da folha e então a mesma é quebrada em pequenos pedaços e peneirada (NAGALAKSHMI et al., 2005).

O processo de oxidação inicia na maceração das folhas. As folhas são espalhadas em camadas finas de 5 a 8 cm de profundidade durante um período entre 45 min a 3 h. No final desse processo, a cor da folha muda de verde para vermelho acobreado, juntamente com desenvolvimento de um aroma característico do chá preto. Geralmente este processo é avaliado pela análise do teor de teaflavina e tearubigina. O teor de taninos diminui durante esse período, de 20% na folha do chá verde para 10% a 12% no chá preto. Após a etapa de oxidação ocorre a etapa de torra. Essa etapa é realizada em um secador especial a alta temperatura, 90°C a 95 ° C por 20 minutos, reduzindo a umidade em 3% a 4% e inativando as enzimas. Após as folhas são quebradas e peneiradas para a classificação (NAGALAKSHMI et al., 2005).

2.3 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são originados pelo metabolismo secundário das plantas, exercendo função protetora em relação a fatores bióticos (ataque de patógenos) e abióticos (temperatura, água, exposição à luz UV) (NACZK; SHAHIDI, 2004). São definidos como substâncias que possuem anéis aromáticos, com um ou mais substituintes hidroxilas. Segundo a literatura, mais de 8000 compostos fenólicos já foram identificados. Eles podem ser divididos em duas grandes classes: flavonoides e não flavonoides conforme a Figura 2.4 (LEA, 2008; LIU, 2004, MAMEDE; PASTORE, 2004; GRANATO et al., 2016).

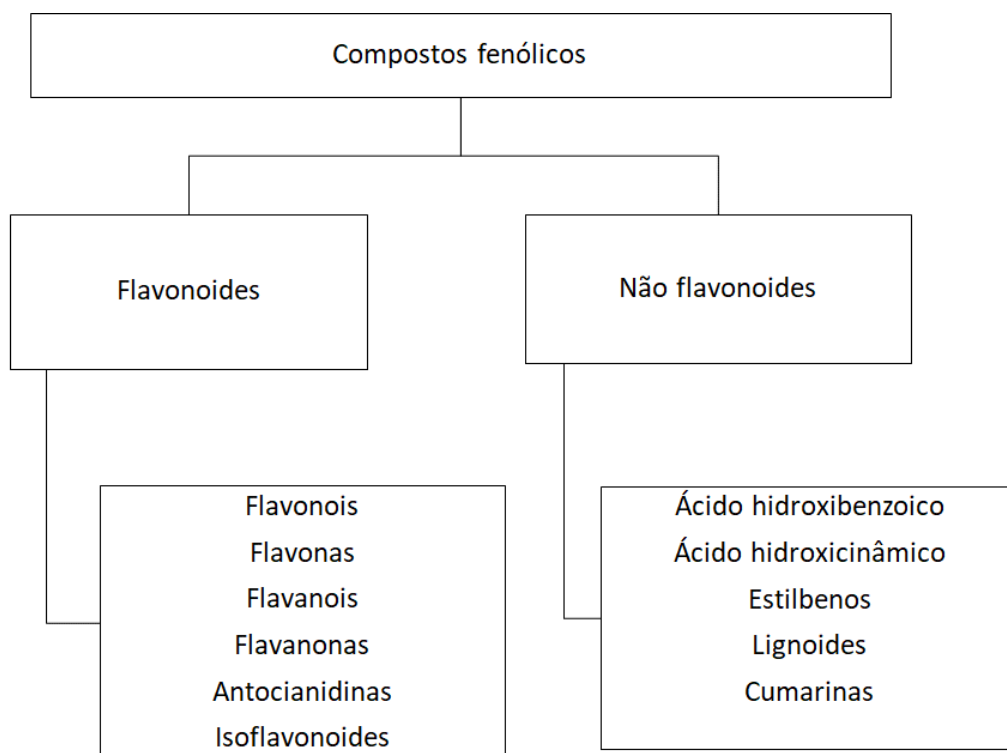


Figura 2.4: Classificação dos compostos fenólicos (Adaptado de MAMEDE;PASTORE, 2004; GRANATO et al., 2016)

As principais fontes de compostos fenólicos são frutas, vegetais e bebidas, sendo que esses compostos contribuem para a qualidade sensorial desses alimentos, incluindo cor, sabor e aroma (ALASALVAR et al., 2001), além de prevenção das reações oxidativas, prevenindo a degradação dos alimentos (AMES; GOLD; WILLETT, 1995). Os compostos fenólicos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes. Estudos têm associado o consumo regular de frutas e vegetais com a prevenção de doenças como o câncer, problemas neurológicos e cardiovasculares, devido à ação antioxidante dos compostos fenólicos na desativação de radicais livres (AMES; GOLD; WILLETT, 1995; MELLO; KUBOTA, 2007).

As reações de oxidação em alimentos são causadas por espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (BOROSKI et al., 2015). O processo de auto-oxidação de lipídios geralmente é iniciado por exposição destes a luz, calor, íons metálicos e enzimas. A via clássica de auto-oxidação de lipídios inclui iniciação (produção radicais livres), reações de propagação e terminação (produção de produtos não radicais) (NACZK; SHAHIDI, 2004). Os antioxidantes fenólicos interferem na oxidação lipídica pela doação rápida de um átomo de hidrogênio aos radicais lipídicos. Na saúde humana os radicais livres estão envolvidos em diversas doenças (NACZK; SHAHIDI, 2004). Ainda não são claramente descritos os mecanismos referentes à ação dos compostos fenólicos na dieta humana, no entanto, estudos recentes vêm avaliando como esses compostos podem exercer ação biológica e prevenir doenças, como problemas cardiovasculares (CROFT et al., 2018; GARCÍA-MORENO et al., 2019).

2.3.1 Técnicas convencionais utilizadas na identificação e quantificação de compostos fenólicos

Estudos vêm avaliando o teor de compostos fenólicos em diferentes matrizes onde o teor pode ser mensurado de forma individual ou total. A identificação de compostos fenólicos individuais é realizada utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatograph*) (BAJOUB et al., 2017; SANTIAGO; CARDOSO; NELSON, 2017). Essa técnica é utilizada em diversos campos da ciência, e é baseada na separação físico-química de uma mistura, onde a amostra é carregada através de uma fase, chamada fase móvel, até a coluna que é a fase estacionária onde ocorre a separação dos compostos. Alguns componentes ficam fortemente retidos pela fase estacionária e movem-se lentamente com o fluxo da fase móvel, conseqüentemente obtendo um tempo de retenção maior, por outro lado, outros componentes são fracamente retidos pela fase estacionária, saindo mais rápido da coluna (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009). A partir dessa técnica é possível identificar o perfil cromatográfico da amostra.

Outra técnica muito utilizada para quantificar esses compostos de forma total é baseada em espectrofotometria, e é conhecida como metodologia de Folin Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI; JR, 1985). O reagente de Folin é composto de uma mistura de sais de tungstato de sódio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em meio de ácido clorídrico concentrado e ácido fosfórico. Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, ocorre a redução dos sais e formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio de coloração azul, nessa fase o estado de oxidação dos metais está entre (V) e (VI), assim a intensidade da coloração permite a determinação da

concentração das substâncias redutoras (BOROSKI et al., 2015). Na Figura 2.5 é apresentada a reação entre o ácido gálico e o reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico. O ácido gálico é utilizado como padrão para construção de curva de calibração desta análise. Na reação ocorre a desprotonação do composto fenólico, gerando ânions fenolatos. Na sequência ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin, onde o molibdênio componente do reagente de Folin sofre redução mudando a coloração do meio reacional de amarelo para azul (SINGLETON; ORTHOFER; ROSA, 1999).

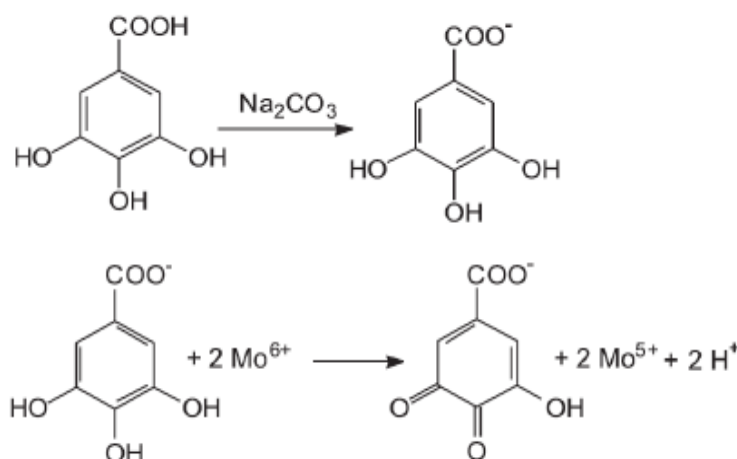


Figura 2.5: Reação entre ácido gálico e reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico (DE OLIVEIRA et al., 2009).

2.3.2 Compostos fenólicos encontrados em destilados

Conforme citado na sessão 2.1.1, no processo de envelhecimento do destilado ocorrem diversas reações, gerando diferentes compostos que contribuem para a qualidade da bebida. Segundo Nishimura (1989), existem quatro mecanismos para a formação de compostos relacionados com a lignina presente na madeira, originando os compostos fenólicos, como: extração de compostos fenólicos formados e liberados da madeira devido ao processamento de tostagem ou queima do barril, extração de monômeros presentes na madeira pelo destilado, formação de aromáticos por etanólise da lignina e conversão dos compostos presentes no destilado (NISHIMURA, K. AND MATSUYAMA, 1989; PUECH, 1981). O processo de queima ou tosta durante ou após a montagem do barril desencadeia o surgimento de compostos monoméricos, seguidos de aldeídos e ácidos aromáticos por meio da etanólise da lignina em meio ácido. Além disso, a presença de oxigênio devido à porosidade da madeira resulta na origem de diversos compostos (PUECH, 1981).

Conforme a Figura 2.6 os ácidos fenólicos são originados pela oxidação de seus aldeídos correspondentes. Os ácidos fenólicos presentes na cachaça podem ser divididos em ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico. Os ácidos benzoicos possuem sete átomos de carbono incluindo os ácidos siríngico, gálico e vanílico. Os ácidos cinâmicos possuem nove átomos de carbono e incluem os ácidos ferúlico, sinápico e p-cumárico, sendo os mais comuns encontrados em destilados (SOARES, 2002). As estruturas dos principais compostos incorporados à cachaça durante o processo de envelhecimento estão apresentadas na Figura 2.7.

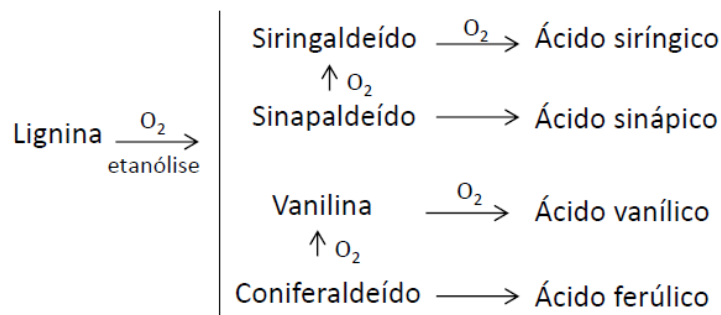


Figura 2.6: Degradação da lignina e formação de compostos fenólicos (Puech,1981).

ZACARONI *et al.* (2014) e SANTIAGO; CARDOSO; NELSON (2017) investigaram a presença de compostos fenólicos em cachaças envelhecidas em diversas madeiras, encontrando perfis diferentes para cada barril. Zancaroni *et al.* (2014) encontraram a predominância de cumarina para barril de jatobá, cumarina e eugenol para amburana enquanto para o carvalho foram predominantes siringaldeído e ácido elágico. Já Santiago *et al.* (2017) encontraram a predominância de ácido vanílico e cumarina em barril de amburana, predominância de ácido gálico, ácido vanílico e siringaldeído no carvalho, ácido gálico e siringaldeído em jatobá. Essas diferenças decorrem de diversos fatores que influenciam no processo de envelhecimento como tamanho do barril, temperatura, umidade e processamento na fabricação do barril.

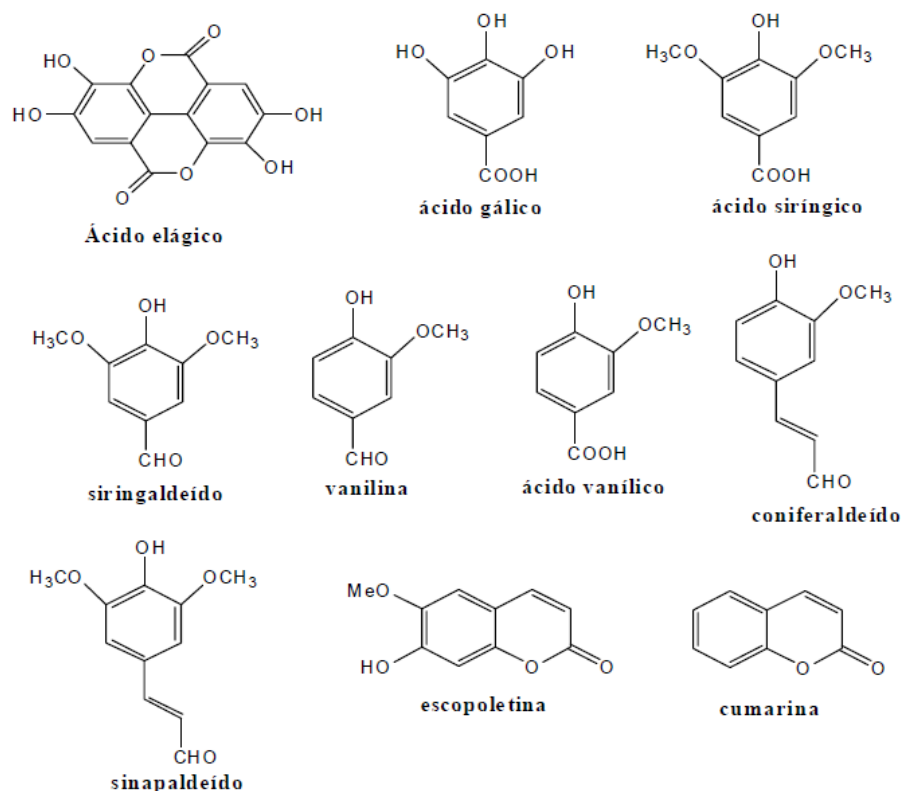


Figura 2.7: Principais Compostos fenólicos extraídos da madeira no processo de envelhecimento da cachaça (RODRIGUES, 2013).

2.3.3 Compostos fenólicos encontrados em chás

O chá é rico em compostos fenólicos principalmente as catequinas, pertencente à classe dos flavonoides, constituindo de 25% a 30% da matéria seca da folha de chá (NAGALAKSHMI et al., 2005). O chá verde apresenta maior quantidade de catequinas comparado ao chá preto devido a diferenças no processamento da folha (AHMED; STEPP, 2013).

A estrutura genérica dos flavonoides (Figura 2.8) é composta por dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel pirano (C). As diferenças na estrutura do heterociclo (C) classificam os flavonoides nas diferentes classes: flavonóis, flavonas, flavanóis (catequinas), flavanonas, antocianidinas, e isoflavonóides (BOROSKI et al., 2015).

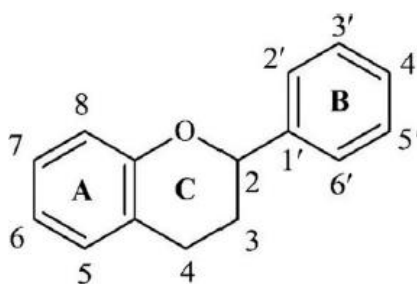


Figura 2.8: Estrutura genérica dos flavonoides

As catequinas são compostos solúveis em água, incolores, responsáveis pela sensação de adstringência e amargor dos chás. Dentre as catequinas (Figura 2.9), as principais encontradas no chá são a galocatequina (GC), a epicatequina (EC), a epigalocatequina (EGC), a epicatequina galato (ECG) e a epigalocatequina galato (EGCG). As catequinas possuem propriedade antioxidante e anti-inflamatória, sendo um dos atrativos para o aumento do consumo de chá (AQUARONE et al., 2001).

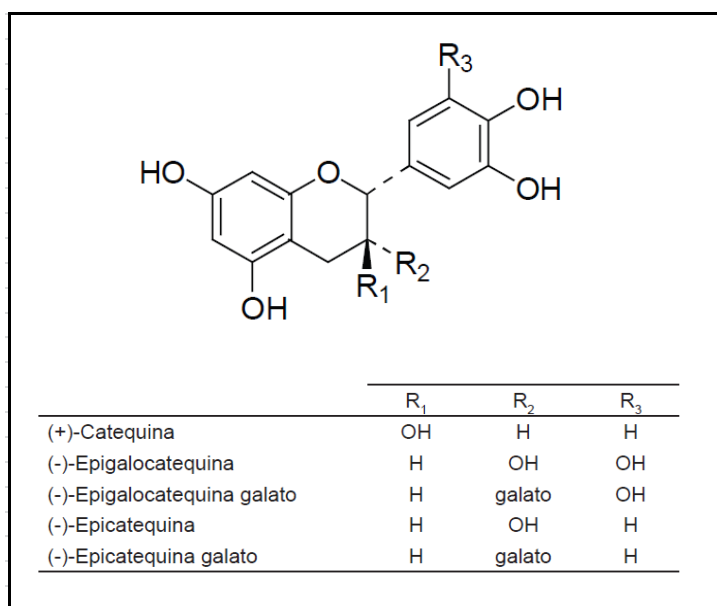


Figura 2.9: Estrutura genérica das catequinas (MUKHTAR; AHMAD, 2000).

O processo de fermentação na fabricação do chá preto resulta na oxidação de polifenóis simples em polifenóis condensados mais complexos responsáveis pela coloração dos chás e sensação de adstringência (HARBOWY et al., 1997). A enzima polifenoloxidase oxida as catequinas, gerando outros compostos fenólicos, como as teaflavinas e tearubiginas (AQUARONE et al., 2001). Na Figura 2.10 estão apresentadas as estruturas da teaflavina e tearubigina.

A teaflavina fornece uma aparência brilhante, vermelho-laranja ao chá e tem sido positivamente correlacionada com valor de mercado do chá, a tearubigina confere cor marrom-avermelhado e são utilizadas como forma de verificar a qualidade do chá preto (NAGALAKSHMI et al., 2005).

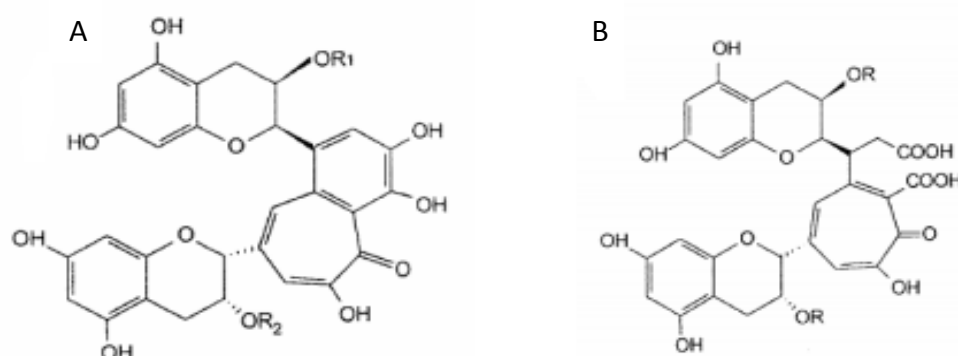


Figura 2.10: Estruturas químicas. (A) Teaflavina e (B) Tearubigina encontradas no chá Preto (MUKHTAR; AHMAD, 2000)

2.4 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é pertencente à classe dos alcaloides que apresentam na sua estrutura pelo menos um átomos de nitrogênio em um anel heterocíclico (NACZK; SHAHIDI, 2004; TAYLOR; HEFLE, 2017). Além da cafeína a teobromina e a teofilina também são encontradas nas folhas do chá, mas em menor quantidade (AQUARONE et al., 2001). Na Figura 2.11 é apresentada a estrutura química da cafeína.

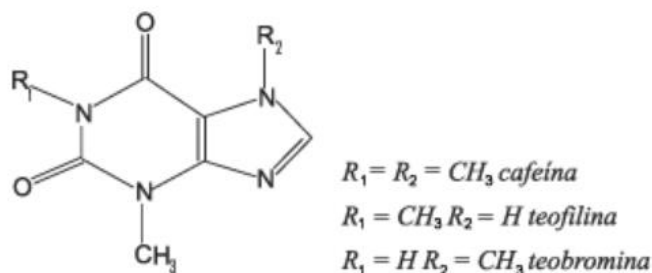


Figura 2.11: Estrutura química da cafeína (DE MARIA; MOREIRA, 2007)

A cafeína é encontrada principalmente em chá (*Camellia sinensis*), cafés, produtos de cacau, frutos do guaraná e bebidas à base de cola (BARRETO ALVES; BRAGAGNOLO, 2002, MURRAY; THINGAN, 2016). Apresenta diversas propriedades como: estimulante,

efeito sobre a função mental e comportamental, euforia, redução da sensação de fadiga e aumento da atividade motora. Em contrapartida, o consumo de cafeína em excesso (acima de 200 mg/dia) pode afetar negativamente a qualidade do sono (RAMALHO et al., 2013; SAIGG; SILVA, 2009). As folhas mais novas da *Camellia sinensis* apresentam mais cafeína que as folhas adultas, a cafeína além de contribuir para efeito estimulante, forma complexo com as teaflavinas, modificando o sabor e contribuindo para o frescor da bebida (OBANDA; OWUOR; TAYLOR, 1997).

2.4.1 Técnicas convencionais para quantificação de cafeína

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para quantificação de cafeína como: gravimetria, espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) sendo a última a mais utilizada (DE MARIA; MOREIRA, 2007). A técnica de HPLC com detecção de UV/Vis é amplamente utilizada para quantificação de cafeína e outros alcaloides. A maioria dos estudos quantificam cafeína em bebidas como chás e bebidas energéticas, utilizando como fase móvel acetonitrila (BARRETO ALVES; BRAGAGNOLO, 2002; SHISHOV et al., 2019). Outros métodos sem a utilização de solventes estão sendo estudados para análises quantitativas e qualitativas desses compostos, devido ao alto número de amostras que precisam ser analisadas em tempo real.

2.5 Métodos ópticos

As técnicas convencionais utilizadas para quantificação de compostos fenólicos e cafeína apresentam diversas desvantagens como: a utilização de solventes, necessidade de operadores qualificados (para a técnica HPLC), natureza destrutiva, além de demandarem alto tempo de análise impossibilitando a obtenção de resposta em tempo real (BERNARDES; DE FIGUEIREDO; BARBEIRA, 2014). Neste contexto, técnicas alternativas vêm sendo estudadas baseadas em métodos espectroscópicos aliados a ferramentas quimiométricas.

As técnicas espectroscópicas se baseiam na interação da radiação eletromagnética com a amostra, onde a radiação pode ser absorvida, transmitida ou dispersa. São técnicas não destrutivas, com nenhum ou mínimo preparo da amostra e permitem a obtenção de uma variedade de informações da amostra em um curto intervalo de tempo (ABBAS; DARDENNE; BAETEN, 2012). Neste trabalho foram utilizadas a Espectroscopia de Infravermelho (IR, do inglês *Infrared*) e Espectroscopia por Fluorescência.

2.5.1 Espectroscopia de infravermelho

O espectro é o conjunto de radiações eletromagnéticas, composto por uma variedade de comprimentos de onda e frequências (número de vibrações por unidade de tempo) (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ JR, 2008). As regiões do espectro eletromagnético são apresentadas na Figura 2.12. Cada região do espectro apresenta um tipo de transição de energia. Os níveis de energia envolvidos nas transições podem ser eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. Geralmente as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas (SALA, 2008).

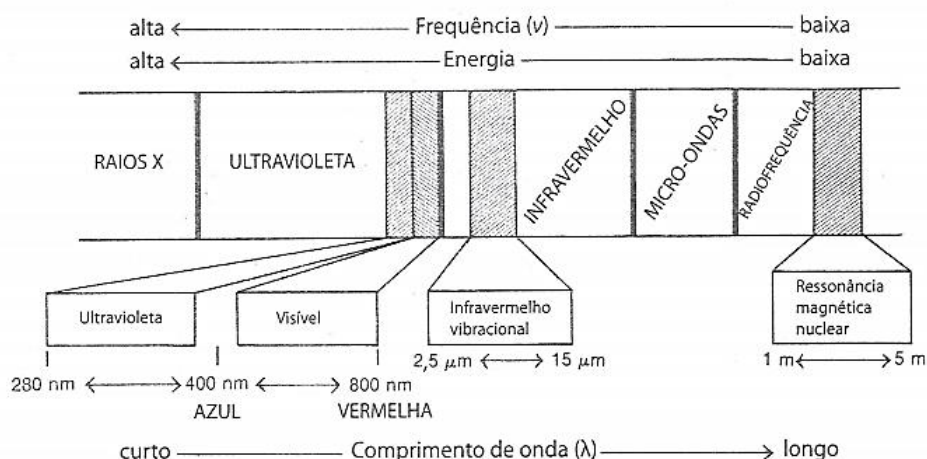


Figura 2.12: Espectro eletromagnético (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ JR, 2008)

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica que utiliza radiação eletromagnética na região infravermelha, descoberta por William Herschel em 1800 (SALA, 2008). O espectro de infravermelho compreende a radiação que varia entre 12800 a 10 cm^{-1} , e é dividido em três regiões, denominadas infravermelho próximo ($12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), médio ($4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$) e distante ($200\text{-}10\text{ cm}^{-1}$) (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Os espectros de absorção, emissão e reflexão no infravermelho podem ser explicados assumindo que se originam de variações de energia produzidas por transições moleculares de um estado de energia vibracional ou rotacional para outro. Para absorver a radiação IR, a molécula deve sofrer variação no momento dipolo durante seu movimento rotacional ou vibracional. Assim, o campo elétrico associado à radiação pode interagir com a molécula. Se a frequência da radiação é igual à frequência de vibração natural, ocorre a absorção da radiação, causando variações na amplitude da vibração molecular (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009). As moléculas normalmente ocupam os níveis mais baixos de energia, os níveis são definidos por números inteiros (0, 1, 2, 3). A transição do nível 0 para 1 leva a uma transição fundamental na molécula, essa transição é encontrada na região do infravermelho médio (MIR). As transições do nível de energia 0 para 2 ou 3 são definidas como primeiro e segundo sobretons (múltiplos da frequência de absorção fundamental), encontrados na região do infravermelho próximo (NIR). Os espectros NIR são constituídos de bandas que surgem da absorção sobreposta e de combinações envolvendo dois ou mais modos vibracionais diferentes de um grupo funcional que ocorrem simultaneamente (ABBAS; DARDENNE; BAETEN, 2012).

Os átomos presentes em uma molécula oscilam continuamente devido as vibrações e rotações de diferentes tipos, que ocorrem nas ligações das moléculas. As vibrações ocorrem de dois modos: vibrações de estiramento e de deformação. Na vibração de estiramento ocorre uma variação contínua na distância inter-atômica ao longo do eixo da ligação entre os dois átomos. Nas vibrações de deformação ocorre uma variação no ângulo entre duas ligações e podem ser classificadas em: deformação simétrica no plano, deformação assimétrica no plano, deformação simétrica fora do plano e deformação assimétrica fora do plano. Na Figura 2.13 estão apresentados os tipos de vibrações moleculares (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Até o início dos anos 80 os espectros de infravermelho eram obtidos com instrumentos dispersivos, onde o processo de varredura era lento. Com o desenvolvimento de espectros interferométricos, utilizando transformada de Fourier a obtenção dos espectros tornou-se mais rápida, fornecendo razões sinal/ruído e limites de detecção cerca de uma ordem de magnitude menor que os instrumentos antigos, ampliando as aplicações dessa técnica (SALA, 2008; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

O espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier é composto por uma fonte de radiação, um interferograma, compartimento para amostra, detector e um computador. A Figura 2.14 apresenta um diagrama esquemático desse equipamento. A radiação proveniente da fonte é dirigida ao interferômetro através dos espelhos. De forma geral o funcionamento do espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier segue as seguintes etapas: a radiação atravessa um divisor de feixes e ocorre a separação em dois feixes; um feixe vai para o espelho “fixo” e o outro para o espelho “móvel” onde ocorre variação da trajetória devido à movimentação do espelho, esses feixes são refletidos de volta para o divisor de feixes e quando se encontram se recombinam; o feixe combinado atravessa a amostra, assim a amostra absorve de forma simultânea todos os comprimentos de onda encontrados em seu espectro infravermelho; o sinal do interferograma chega ao detector e contém a informação sobre a quantidade de energia absorvida em cada comprimento de onda; por fim no computador ocorre a comparação entre o interferograma da amostra com um interferograma capturado por um feixe de laser de referência e o processo matemático de transformada de Fourier é realizado extraindo as frequências individuais que foram absorvidas pela amostra e reconstruindo o espectro que é representação gráfica da resposta (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ JR, 2008).

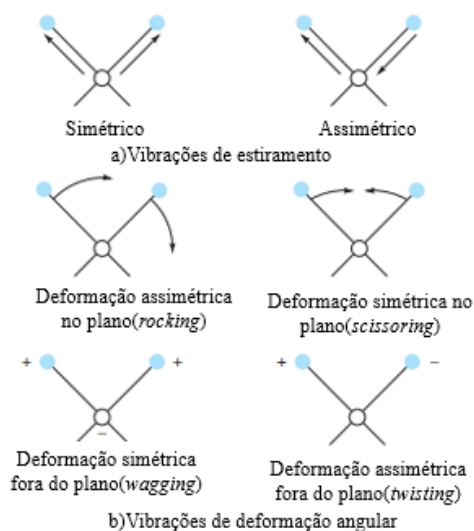


Figura 2.13: Tipos de vibrações moleculares (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009)

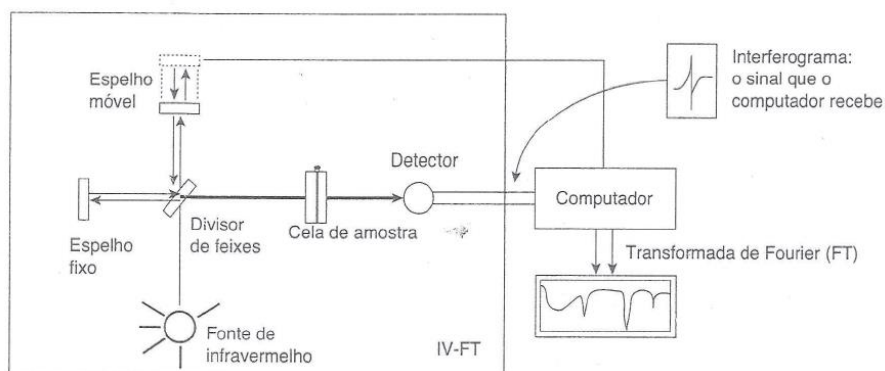


Figura 2.14: Esquema do espectrômetro com transformada de Fourier (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ JR, 2008)

Os espectros no infravermelho são obtidos normalmente medindo a quantidade de luz infravermelha absorvida, cada molécula terá um o espectro diferente, assim o espectro infravermelho serve como uma “impressão digital” da molécula. Os espectros são representados na abscissa pelo número de onda (cm^{-1}) ou comprimento de onda (nm) e na ordenada é apresentada o % de transmitância ou intensidade de absorbância (WELLNER, 2013).

A espectroscopia no infravermelho tem sido aplicada nas áreas da química, alimentos, farmácia, bioquímica entre outras. Dentre as principais investigações realizadas na área de alimentos e bebidas utilizando IR está a classificação de bebidas de acordo com a origem ou tipo de processamento, como em bebidas derivadas de uva (BICAS et al., 2017), chás e bebidas alcoólicas (ABOULWafa et al., 2019). Chen *et al.* (2006) utilizaram o infravermelho próximo para prever o conteúdo de cafeína e polifenóis em chás utilizando algoritmo de mínimos quadrados parciais (PLS), obtendo resultados promissores.

O infravermelho médio foi empregado por Yucesoy *et al.* (2013) para verificar autenticidade de Raki (um licor derivado de uva), o licor foi adulterado com metanol em diferentes concentrações. Foi elaborado um modelo de previsão de metanol aplicando o método PLS obtendo valores de R^2 igual a 0,98.

2.5.2 Espectroscopia por fluorescência

A fotoluminescência é composta pelos fenômenos de fluorescência e fosforescência, fenômenos baseados na absorção e emissão de energia. A diferença entre a fluorescência e a fosforescência é que as transições eletrônicas associadas à fluorescência não envolvem mudança no spin eletrônico (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Observando a Figura 2.15-A, uma molécula que se encontra no estado eletrônico fundamental de energia (S_0), normalmente encontra-se no estado singleto, onde todos os spins eletrônicos estão emparelhados. Quando a molécula é excitada, pode passar para o estado eletrônico excitado singleto (S_1 e S_2) onde os elétrons no orbital excitado permanecem emparelhados-fenômeno de fluorescência (Figura 2.15-B), entretanto se os

spins tornam-se desemparelhados, o estado eletrônico excitado é denominado tripleto (T1), fenômeno de fosforescência (WILLIAMS; BRIDGES, 1964).

A molécula é promovida do seu estado fundamental para qualquer um dos níveis vibracionais associados com os dois estados eletrônicos excitados através da absorção de energia de uma fonte de excitação. Ao retornar ao estado fundamental a molécula emite radiação na forma de fluorescência. A vida útil de um átomo ou molécula excitada pela absorção de radiação é rápida, pois existem diversos processos de relaxamento como mostrado na Figura 2.15 que possibilitam o retorno ao estado fundamental competindo então com o fenômeno de fluorescência (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

A emissão de energia pode ocorrer sem mudança de frequência comparada com a radiação absorvida, e é denominada como fluorescência de ressonância. No entanto, o tempo de vida dos estados vibracionais excitados é na ordem de 10^{-15} s, menor que os estados eletrônicos excitados 10^{-8} s, o que leva a ocorrência da relaxação vibracional antes da relaxação eletrônica. Em razão disso normalmente a banda de fluorescência é deslocada para uma frequência mais baixa ou comprimento de ondas maiores em relação à absorção esse fato é denominado de deslocamento de Stokes (LAKOWICZ, 2006).

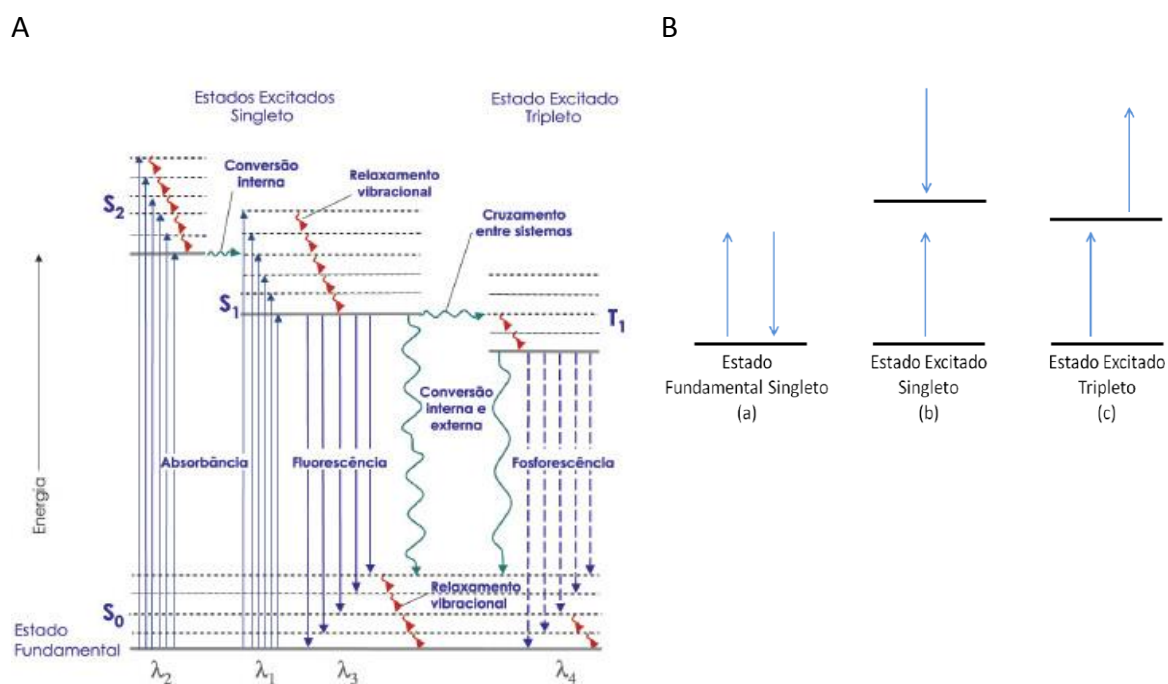


Figura 2.15: A) Diagrama parcial de energia para um sistema fotoluminescente. B) Estados eletrônicos dos spins nas moléculas. (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009)

Para realizar as medições de fluorescência são utilizados fluorímetros e espectrofluorímetros. Os fluorímetros são constituídos de filtros enquanto os espectrofluorímetros utilizam dois monocromadores. A Figura 2.16 mostra o diagrama dos componentes presentes nestes equipamentos. Para excitação da amostra são utilizados lâmpada de xenônio ou lâmpada de vapor de mercúrio. Em resumo a fonte de radiação é dividida em dois feixes. Um deles passa por um seletor de comprimento de onda de excitação e depois pela amostra, a fluorescência é emitida pela amostra em todas as direções, mas normalmente é observada em ângulo reto para evitar efeitos de espalhamento da luz. A fluorescência é separada por um segundo seletor de comprimento de onda de emissão e enviada ao transdutor onde o sinal é convertido em

um sinal elétrico. O outro feixe, denominado feixe de referência, é atenuado antes de passar para o transdutor. Os sinais chegam ao sistema computacional onde é calculada a razão entre a intensidade de fluorescência (S1) e a intensidade do feixe de referência (R1), eliminando efeitos de variação da fonte de excitação no espectro final, neste estudo trabalhamos com o sinal de fluorescência desta forma (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Diferentes espectros podem ser obtidos na técnica de fluorescência. O espectro de emissão é obtido pela varredura do monocromador de emissão em vários comprimentos de onda de emissão, em um comprimento de onda de excitação fixo. Já um espectro de excitação é obtido através da varredura dos comprimentos de onda da excitação, mantendo o monocromador em um comprimento de onda de emissão fixo (PATRA; MISHRA, 2002).

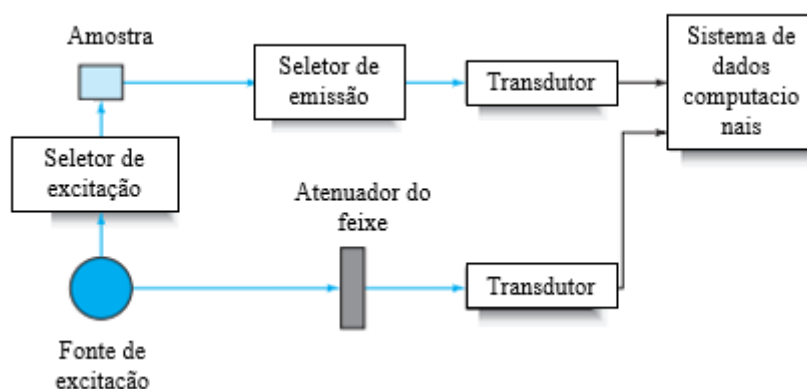


Figura 2.16: Representação esquemática dos componentes de um fluorímetro ou espectrofluorímetro (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009)

Outra forma de observar os dados é pela matriz de excitação-emissão (EEM) que representa uma combinação de comprimentos de onda de excitação e emissão, coletados simultaneamente. Esses gráficos são representados na forma tridimensional ou por gráficos de contorno e fornecem informação sobre a composição fluorescente (COBLE, 1996). Os eixos das medidas de EEM são denominados pela intensidade dada em ciclos por segundos (cps) x excitação (nm) x emissão (nm) (COBLE, 1996).

Outra possibilidade é fazer a varredura de ambos os monocromadores simultaneamente, mantendo uma diferença fixa entre os comprimentos de excitação e emissão o que é chamado de espectroscopia de fluorescência síncrona (SFS) (PATRA; MISHRA, 2002).

As substâncias fluorescentes são chamadas de fluoróforos. A fluorescência ocorre normalmente em hidrocarbonetos poliaromáticos, compostos heterocíclicos e alguns compostos alifáticos altamente insaturados (SIKORSKA; KHMELINSKII; SIKORSKI, 2019). A fluorescência pode ser classificada em intrínseca e extrínseca. Fluoróforos intrínsecos são aqueles que ocorrem naturalmente como: aminoácidos aromáticos, flavinas, clorofila. Os fluoróforos extrínsecos são adicionados a amostra para fornecer fluorescência e alterar propriedades espectrais de uma amostra (LAKOWICZ, 2006).

A fotoluminescência apresenta vantagens na sua utilização, devido a sua sensibilidade, ampla faixa linear de concentração e limites de detecção que são até três ordens de magnitude maiores que aqueles encontrados na espectrometria de absorção. A intensidade de fluorescência possibilita a determinação quantitativa de diversas espécies orgânica e inorgânica em quantidades traço (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Devido à alta sensibilidade, a espectroscopia por fluorescência vem sendo empregada em diversos trabalhos. Jakubíková, Sádecká e Májek (2018) utilizaram matrizes de Excitação-Emissão combinadas com a metodologia PLS para predição do teor de água e etanol em destilado de frutas. Esta técnica também foi utilizada para detecção de adulterantes em méis, utilizando PLS e redes neurais (CHEN et al., 2014b). Squeo *et al.* (2014) exploraram a viabilidade de medições diretas de fluorescência, juntamente com quimiometria, para o desenvolvimento de modelos multivariados para predição de compostos fenólicos em azeite de oliva (SQUEO et al., 2018). A fluorescência foi aplicada para a quantificação direta de vários polifenóis individuais em vinhos tintos (CABRERA-BAÑEGIL et al., 2017). O uso da espectroscopia de fluorescência foi utilizado também nos estudos de autenticidade do café permitindo a discriminação do café verde brasileiro por origem geográfica (BOTELHO; OLIVEIRA; FRANCA, 2017). A técnica de componentes principais (PCA) permitiu uma classificação bem sucedida para discriminação de 11 tipos de chá de diferentes plantações do Sri Lanka através das matrizes de excitação-emissão (SEETHOUL et al., 2013).

2.6 Quimiometria

A quimiometria é definida como a disciplina que aplica métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar procedimentos experimentais de forma otimizada, fornecendo o máximo de informação com a análise de dados químicos (MASSART et al., 1989).

Os métodos quimiométricos podem ser utilizados para identificar a semelhança e diferença entre as amostras. Estes são classificados em métodos supervisionados e não supervisionados. Nos métodos supervisionados, é necessário utilizar informações já estabelecidas da amostra durante a análise de dados. Já os métodos não supervisionados não necessitam de informação prévia da amostra, e assim são agrupados apenas com base na informação espectral (FERREIRA, 2015).

O método mais difundido para análise exploratória dos dados é Análise de Componentes Principais (PCA). Esse método faz a projeção dos dados multivariados em um espaço de dimensão menor, reduzindo a dimensionalidade do espaço original em um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (PC) (DE SOUZA; POPPI, 2012; FERREIRA, 2015). A matriz de dados denominada X é decomposta em um produto de duas matrizes, denominadas escores (T) e pesos ou *loadings* (L). Os escores indicam a relação entre as amostras e os pesos a relação entre as variáveis (FERREIRA, 2015). A finalidade do PCA é encontrar relações entre diferentes parâmetros e a detecção de agrupamentos (*clusters*) nas amostras ou variáveis (SÁDECKÁ; TÓTHOVÁ, 2007).

Além dos métodos de reconhecimento de padrões existem os métodos de calibração multivariada que consistem em construir uma relação entre uma propriedade de interesse utilizando dados espectrais (GELADI, 2003). Os métodos de regressão multivariada regularmente utilizados são a regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) e regressão de componente principal (PCR) (SÁDECKÁ; TÓTHOVÁ, 2007).

Esses métodos são construídos com todas as variáveis espectrais, no entanto existem métodos que fazem a seleção das variáveis que melhor se relacionam com a propriedade de interesse. Neste trabalho foi utilizado a modelagem quimiométrica com componentes espectrais puros (PSCM) e o método PLS foi utilizado como método de referência para comparação.

2.6.1 Regressão de mínimos quadrados parciais (PLS)

O PLS é o método de regressão mais popularmente utilizado na quimiometria. Como já citado anteriormente, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos nas mais diversas áreas utilizando PLS como método de predição associado a técnicas como infravermelho, UV-Vis, fluorescência e Raman (ABBAS; DARDENNE; BAETEN, 2012; CHEN et al., 2014a; COZZOLINO et al., 2004). O objetivo do PLS é prever a variável dependente a partir de um conjunto de variáveis independentes ou preditores. Essa predição é atingida extraído dos preditores um conjunto de fatores ortogonais chamados variáveis latentes (VL) que possuem a melhor predição dos dados. Para cada quantidade de variáveis latentes é calculado o erro, e o que apresentar menor valor será o número de VL sugerido para o modelo (ABDI, 2010). O método PLS faz a decomposição dos dados de forma semelhante ao PCA, entretanto a decomposição é realizada na matriz de dados (X) e na matriz (PLS2) ou vetor (PLS1) de variáveis dependentes (Y), gerando dois novos espaços que possuem máxima covariância possível (FACCHIN, 2005).

2.6.2 Métodos de seleção de variáveis

A seleção de variáveis tem o objetivo de reduzir o número de variáveis independentes utilizadas como entrada de um modelo, selecionando as variáveis mais relevantes em relação à propriedade de interesse (ALNUAIMI et al., 2019). Os métodos de seleção de variáveis podem ser baseados em princípios biológicos como estratégia de otimização de colônia de formigas, colônia de abelhas, algoritmos genéticos (DE SOUZA SERAPIÃO, 2009). Outros métodos como o método de busca exaustiva também é utilizado, com o objetivo de testar todas as possíveis combinações dentre as variáveis de entrada, no entanto, para problemas onde há um alto número de variáveis, esse método é inviável devido ao alto custo computacional (FACCHIN, 2005).

A seleção de variáveis frente às metodologias convencionais utilizadas na quimiometria auxilia a interpretabilidade da resposta devido à redução das variáveis, já que um número menor de variáveis deixa o modelo menos complexo, considerando apenas regiões espectrais de interesse (FERREIRA, 2015), facilitando assim a aplicação industrial através da elaboração de sensores customizados.

Neste trabalho será utilizada a modelagem quimiométrica com componentes espectrais puros (PSCM), que constrói modelos lineares com seleção de variáveis, através do algoritmo de otimização de colônia de formigas.

A otimização por colônia de formigas (ACO, do inglês *Ant Colony Optimization*) é um algoritmo de otimização estocástica, baseada no comportamento de busca de alimentos pelas formigas, relacionado com a comunicação indireta através do feromônio. Inicialmente as formigas seguem por um caminho aleatório, enquanto as formigas

caminham da colônia ao alimento formam uma trilha através do depósito de feromônio, atraindo assim as outras formigas para o caminho mais próximo entre o formigueiro e o alimento (DE SOUZA SERAPIÃO, 2009).

A primeira versão do algoritmo baseado no comportamento das formigas foi desenvolvida por DORIGO; MEMBER; GAMBARDELLA (1997). A otimização de colônia de formigas foi utilizada para resolver o problema do caixeiro viajante, onde o objetivo era determinar o menor caminho passando por todas as cidades programadas para o caixeiro. Assim há uma colônia de formigas, onde cada formiga vai de uma cidade a outra, buscando cidades próximas ou caminhando aleatoriamente. A quantidade de feromônio depositada na trilha é inversamente proporcional ao comprimento total do caminho percorrido pela formiga. As conexões entre cidades que fazem parte da maior quantidade de rotas mais curtas terão uma quantidade maior de feromônio depositado (DE SOUZA SERAPIÃO, 2009).

No nosso estudo, a seleção dos componentes do espectro é feita usando um fator aleatório associado a uma função de densidade de feromônio, que é adicionado a componentes do espectro pelas formigas em função do erro residual entre predição e medição de variáveis de estado. Uma descrição mais detalhada sobre a implementação e características sobre PSCM e ACO pode ser encontrada em RANZAN *et al.* (2014).

Ranzan *et al.* (2014) aplicaram os métodos de PCR, PLS e PSCM para predição de proteínas em amostras de farinha utilizando o infravermelho próximo (NIR), e verificou que uso da técnica de seleção de variáveis funcionou melhor. As vantagens apresentadas pelo PSCM são: a não necessidade de medições espectrais completas, implicando a viabilidade do desenvolvimento de sensores online baseados em análise espectral.

2.6.3 Pré-tratamento dos dados

Os métodos espectroscópicos, assim como muitas outras técnicas analíticas, estão sujeitos a efeitos de escala, o que resulta em distorções positivas ou negativas no espectro real da amostra. Esses efeitos podem ser provocados por uma série de fatores, tais como efeitos de espalhamento, variações na fonte do detector ou efeitos associados à sensibilidade dos instrumentos (SGOOK; HOLLER; CROUCH, 2009). Para remover o efeito de escala dos espectros, é necessário identificar o tipo de distorção e efetuar a correção do sinal (KILLEEN *et al.*, 2013). Os métodos geralmente utilizados para pré-tratamento dos dados são a Variação Normal Padrão (SNV, do inglês *Standard Normal Variate*) e Correção Multiplicativa de Sinal (MSC, do inglês *Multiplicative Scatter Correction*).

Neste trabalho utilizamos o SNV, que corrige efeitos aditivos e multiplicativos e remove interferências de espalhamento (FERREIRA, 2015). Esse método faz o escalonamento dos dados de forma que após a normalização cada espectro apresenta média zero e desvio padrão unitário (SANTANA, 2015).

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Controle e Integração de Processos (LACIP) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.1 Obtenção das amostras

3.1.1 Processo de envelhecimento de Cachaça

A cachaça utilizada neste estudo foi fornecida pela Cachaçaria Weber Haus (Ivoti/RS), sendo denominada “cachaça prata”. O teor alcoólico era de 48% (v/v) e não havia sido submetida ao processo de envelhecimento em barril de madeira até o momento. O envelhecimento da cachaça foi realizado em nosso laboratório, em um barril de amburana novo de 20L, que passou por um pré-tratamento de tosta leve. O barril foi produzido pela tanoaria Mesacaza (Monte Belo do Sul/RS). A cachaça foi envelhecida por um período de 463 dias, durante esse período o barril foi acondicionado em local protegido de vibrações e de variações bruscas de temperatura.

Durante o envelhecimento da cachaça foram coletadas amostras do barril (volume coletado 15ml), totalizando 21 amostras, as quais foram armazenadas em frasco âmbar, protegidas da luz e acondicionadas sob baixas temperaturas (-18°C) para posterior análise de compostos fenólicos totais e análise de espectroscopia por fluorescência 2D e infravermelho.

Para acompanhar o comportamento dos espectros de cachaça em concentrações inferiores às encontradas nas amostras coletadas no barril, uma curva foi construída a partir de uma amostra de cachaça envelhecida com alta concentração de compostos fenólicos (1561,75 mg de EAG L⁻¹) diluída com dois solventes: uma cachaça comprada não envelhecida (mesma marca e produtor que a utilizada anteriormente) e a cachaça original que foi utilizada no barril. Foram preparadas 15 amostras para cada solvente utilizado, com concentrações fenólicas de 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 e 450 mg de EAG L⁻¹. Desta forma, totalizamos 53 amostras de cachaça (a cachaça

comercial não envelhecida, a cachaça não envelhecida original, as trinta amostras diluídas e as vinte e uma amostras envelhecidas coletadas periodicamente do barril).

3.1.2 *Chá Verde e Chá Preto (Camellia sinensis)*

Foram adquiridas 19 amostras de chá nos mercados locais, sendo 15 deles chá verde e 4 chás preto. Para o chá verde foram adquiridos três lotes distintos para cada uma das cinco marcas compradas, para o chá preto foram comparadas 4 diferentes marcas.

3.1.2.1 *Extratos Aquosos*

Foram preparados extratos aquosos de todos os chás, para isso foram pesados 0,1g de chá e o mesmo foi adicionado de 50 mL de água a 100°C, a mistura foi submetida à agitação por 10 minutos, após o extrato foi filtrado e seguiu-se para análise de compostos fenólicos totais e espectroscopia por Fluorescência. A quantidade de chá e solvente utilizado para elaboração do extrato foi baseado em testes prévios.

3.2 Análise de compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI; JR, 1985) com algumas modificações. As amostras de cachaça foram diluídas 20 vezes com água ultrapura obtida por um sistema Milli-Q enquanto as amostras de chá foram diluídas 10 vezes. Para a análise, uma amostra de 200 μL é retirada e homogeneizada com 850 μL de água ultrapura e uma alíquota de 100 μL de reagente Folin-Ciocalteu 2N. No período entre 30 segundos e 8 minutos após a adição de Folin-Ciocalteu, 850 μL de Na_2CO_3 a 7% (m/v) são adicionados. A mistura permanece em repouso por 1 hora a 25°C, protegida da luz e a absorbância é então medida a 765nm em Espectrofotômetro UV-VIS (1600A, Pró-análise).

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando uma curva padrão de ácido gálico com concentrações variando de 0,5 a 8 mg L^{-1} . Os resultados foram expressos em miligrama de Equivalente de ácido gálico por litro de amostra (mg EAG L^{-1}) ou miligrama de Equivalente de ácido gálico por grama de amostra em base seca (mg EAG g^{-1}).

3.3 Medição dos Espectros de Fluorescência

Para coleta dos espectros de fluorescência as amostras foram analisadas na forma “bruta” sem nenhum pré-tratamento.

Os espectros de fluorescência foram medidos com o equipamento Horiba Fluoromax-4 (Figura 3.1), equipado com uma lâmpada de xenônio de 150 W. As medições foram feitas na faixa de comprimentos de onda de excitação entre 260 e 600 nm e emissão entre 290 e 850 nm, com incremento de 10 nm. Com estes arranjos, cada espectro de fluorescência foi obtido como uma matriz de tamanho 57 \times 35, contendo intensidade de fluorescência de 1995 pares de excitação/emissão. Cada um dos espectros de fluorescência (referente a cada amostra) foi posteriormente desdobrado num vetor de dimensão 1 \times 1995, sendo a linha referente a amostra e as colunas contendo as informações referentes à intensidade de fluorescência dos pares de excitação/emissão. Os espectros de fluorescência foram medidos em triplicata.

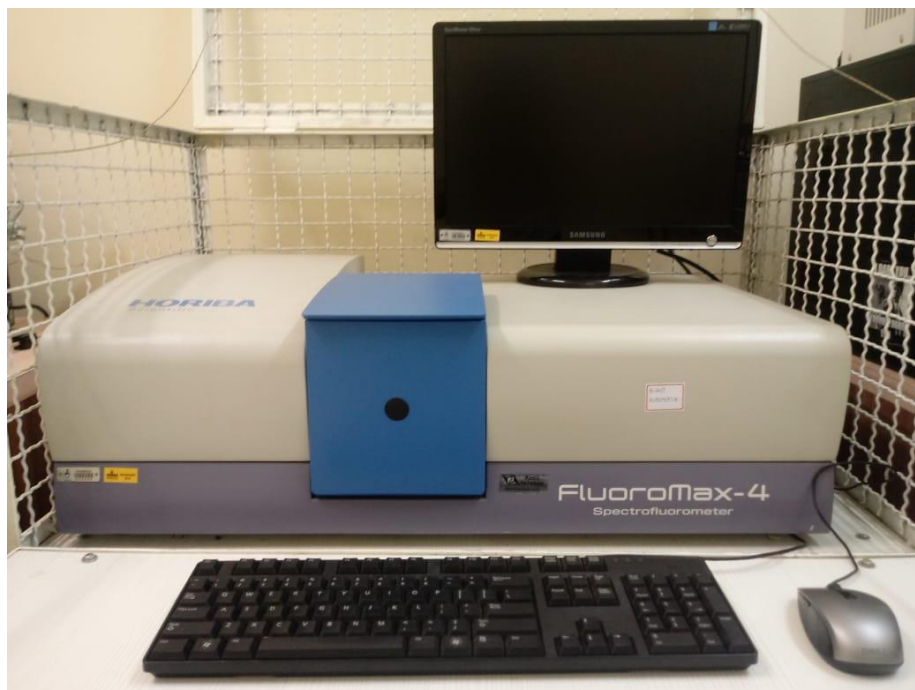


Figura 3.1: Espectrofluorometro Fluoromax.

3.4 Medição dos espectros no Infravermelho

Para coleta dos espectros de infravermelho as amostras de cachaça foram analisadas na forma “bruta” sem nenhum pré-tratamento; as amostras de chá foram analisadas na forma sólida. As amostras de chá foram previamente maceradas utilizando almofariz e pistilo.

Para obtenção dos espectros de infravermelho médio (4000 a 650 cm^{-1}) foi utilizado o espectrofotômetro (Figura 3.2) de absorção molecular com transformada de Fourier (Frontier, Perkin Elmer), equipado com o módulo de Análise Universal de Refletância Total Atenuada (UATR). Assim foi obtido um vetor para cada amostra de tamanho 1×3350 , sendo a linha representando a amostra e cada coluna a absorbância em relação a um número de onda. As amostras de chá foram também analisadas na região do infravermelho próximo ($8000 - 4000\text{ cm}^{-1}$). Para cada espectro foram realizadas 16 varreduras com resolução de 16 cm^{-1} . Para cada amostra foram obtidos um vetor de tamanho 1×2000 , sendo a linha representando a amostra e cada coluna a absorbância em relação a um número de onda.



Figura 3.2: Espectrofotômetro de absorção molecular com transformada de Fourier na região do infravermelho.

3.5 Análise de Cafeína por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC)

Os extratos de chá foram diluídos e filtrados com membrana de nylon de 0,22 μm para posterior análise de cafeína. A determinação de cafeína foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando o cromatógrafo Shimadzu 20-AD, consistindo de uma bomba binária equipada com um degaseificador DGU-20A, um auto amostrador SIL-20A, um forno de coluna CTO-20A e um detector de fotodiodos SPD-M-20 (DAD), de acordo com os métodos aplicados por MALLMANN (2018). Os compostos foram separados em uma coluna Inertsil ODS-3 C18 (5 μm , 250 mm x 4,6 mm, GL Sciences) a vazão de 1 mL/min e temperatura da coluna de 30°C, usando fase móvel que consiste de água acidificada com 0,3% de ácido fórmico (solvente A) e metanol acidificado com 0,3% de ácido fórmico (solvente B). O gradiente da análise foi: 0% fase B em 0 min, 30% B em 16 min, 35% B em 21 min, 40% B em 25 min, 60% B em 41 min, retornando à condição inicial em 43 min e mantendo por 7 min. Os espectros de UV-vis foram obtidos entre 200 e 600 nm, e os cromatogramas foram processados a 272 nm para a cafeína. Os resultados são expressos em miligrama por grama de amostra (MALLMANN, 2018).

3.6 Quimiometria

As ferramentas quimiométricas utilizadas neste trabalho foram desenvolvidas e implementadas na linguagem Python v3.5.4.1 pelo grupo de pesquisa GIMSCOP.

3.6.1 Tratamento dos dados

As matrizes de dados de fluorescência 2D e infravermelho passaram por uma fase de pré-processamento para posterior seleção de variáveis e ajuste do modelo matemático. O pré-tratamento consistiu na normalização dos dados utilizando a Padronização Normal de Sinal (SNV).

Após a normalização o grupo amostral foi dividido em três subgrupos: calibração, validação e teste. Essa divisão foi realizada através do método γ -rank (FACCHIN, 2005), que ordena os dados de forma crescente em relação a variável de interesse e em seguida, começando pela primeira, repete um padrão para alocação das amostras, capaz de garantir porcentagens escolhidas. Neste trabalho, as porcentagens escolhidas foram 60% para calibração, 20% para validação e 20% para teste. Após o tratamento dos dados seguiu-se para o procedimento de seleção de variáveis e desenvolvimento dos modelos quimiométricos para predição de compostos fenólicos totais e cafeína.

3.6.2 Desenvolvimento de Modelos e seleção de variáveis

Neste trabalho foi utilizada a modelagem quimiométrica com componentes espectrais puros (PSCM). Esse método combina modelagem utilizando regressão multilinear e a seleção de elementos espectrais por métodos de otimização estocástica do tipo Otimização de Colônias de Formigas (*Ant Colony Optimization* - ACO) descrito por RANZAN et al. (2014).

Segundo RANZAN *et al.* (2014) o funcionamento do algoritmo pode ser dividido em quatro fases: na primeira fase são definidas as variáveis como dimensão do modelo, número de formigas, número de iterações e rodagens, tipo de modelo, métrica para otimização do modelo, valor inicial da trilha de feromônio (1000), valor do numerador para adição de feromônio (100) e taxa de evaporação de feromônio (10%). Neste trabalho foram utilizados modelos lineares com tamanhos 2, 3, 4 e 5, com 200 formigas, 100 iterações e 50 rodagens, a métrica de otimização utilizada foi a raiz quadrada do erro médio (RMSE), esses parâmetros foram definidos através de experiências anteriores realizadas com o algoritmo. As métricas utilizadas para avaliar a qualidade preditiva dos modelos foram raiz quadrada do erro médio (RMSE), erro percentual absoluto médio (MAPE). O coeficiente de determinação R^2 foi utilizado para medir a qualidade de aderência do modelo aos dados de treinamento. O RMSE, MAPE e R^2 são calculados conforme as equações (3.1), (3.2) e (3.3), onde \hat{y} é a variável predita pelo modelo, y a variável observada, \bar{y} o valor médio de y e n o número de amostras.

Na segunda fase do algoritmo ocorre a seleção do conjunto de elementos de forma aleatória através da resolução da função objetivo. A terceira fase é o núcleo do algoritmo onde em cada rodagem ocorre a seleção das combinações de componentes espectrais baseadas em um fator aleatório e na densidade acumulada de feromônio. Em cada iteração a função objetivo é avaliada e a trilha de feromônio atualizada. A melhor formiga selecionada, ou seja, o melhor modelo é comparado com o melhor modelo global armazenado e, em caso de melhor resultado, o melhor modelo global é substituído. Por fim na quarta fase é apresentado o melhor grupo de componentes espectrais encontrados. O Anexo 1 descreve detalhadamente o método, o qual está baseado em Ranzan *et al.* (2014).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (3.1)$$

$$MAPE = \frac{100\%}{n} \sum_i \left| \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \right| \quad (3.2)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad (3.3)$$

3.6.3 Mínimos quadrados parciais – PLS

O método PLS foi utilizado como metodologia de comparação com os modelos obtidos através de seleção de variáveis utilizando o ACO. As métricas utilizadas para avaliar a capacidade preditiva do método PLS foram as mesmas citadas anteriormente.

Capítulo 4 – Estudo de caso: Processo de envelhecimento da Cachaça

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes às análises realizadas para o acompanhamento do processo de envelhecimento da cachaça.

4.1 Resultados e Discussões

4.1.1 Teor de compostos fenólicos totais

Após as coletas das amostras de cachaça envelhecida, elas foram submetidas à análise de compostos fenólicos totais. Durante o processo de envelhecimento, observou-se um aumento gradual do teor de compostos fenólicos na cachaça "Prata", variando de 523,56 (primeira medida no 7º dia de envelhecimento) a 1561,75 mg EAGL⁻¹ ao final do experimento (463 dias), atingindo um aumento de cerca de três vezes neste período. A quantidade total de composto fenólicos na bebida em relação ao tempo de envelhecimento pode ser vista na Figura 4.1.

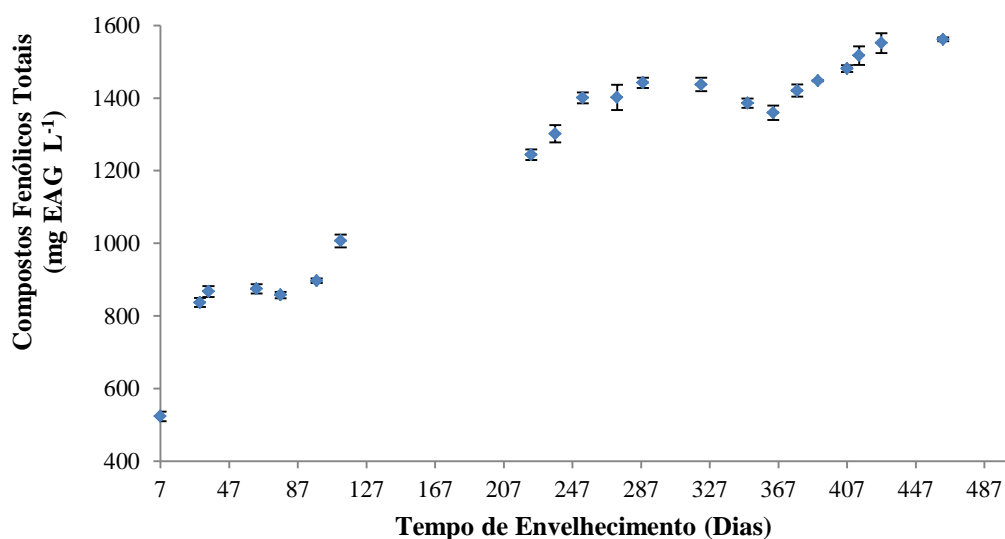


Figura 4.1: Teor de compostos fenólicos totais em cachaça envelhecida por 463 dias.

Diversos fatores podem influenciar a eficiência da extração de compostos da madeira. Segundo Miranda, Horii, Alcarde (2006) alguns desses fatores são: espécies de madeira, idade do barril, tamanho, pré-tratamento do barril, condições ambientais, tempo de envelhecimento e teor alcoólico da bebida. Em relação ao tamanho, quanto menor o volume do barril, melhor a extração de compostos devido à maior superfície de contato (GABRIEL et al., 2012). Neste estudo, utilizamos um barril de amburana novo, de pequeno volume que foi submetido a um processo de tosta leve. Esses fatores podem ter contribuído para as altas concentrações de compostos fenólicos totais que obtivemos.

Bortoleto *et al.* (2016) compararam o teor de compostos fenólicos em cachaças envelhecidas em barris de carvalho francês com tosta média a alta, e carvalho americano com tosta médio e verificaram que as concentrações desses compostos aumentaram com a intensidade do tosta. Bernardes; De Figueiredo; Barbeira (2014), apresentam um método direto para determinação do conteúdo fenólico total por espectroscopia UV-Vis, encontrando no máximo 85,30 mg EAG L⁻¹ de compostos fenólicos totais extraídos durante o envelhecimento utilizando amburana. Santiago; Cardoso; Nelson (2017) quantificaram fenólicos em cachaças envelhecidas em cinco madeiras diferentes por um período de 12 meses, avaliando concentrações semelhantes às encontradas neste estudo, entre 281,85 e 876,98 mg EAG L⁻¹ mas para outro tipo de madeira, Jatobá. Cardoso *et al.* (2008) estudaram a extração de compostos por imersão de serragem de madeira em cachaça por 26 dias e obtiveram altas concentrações para o extrato de cachaça de Jatobá, atingindo 1085 mg EAG L⁻¹.

4.1.2 Espectroscopia por fluorescência 2D

Os espectros de fluorescência foram medidos sem qualquer pré-tratamento da amostra. A Figura 4.2 mostra o espectro de cachaça sem envelhecimento (A) e cachaça envelhecida (B) com concentração de 1561 mg de EAG L⁻¹.

Nestes espectros, é possível observar mudanças significativas nas regiões de fluorescência. A cachaça sem envelhecimento (Figura 4.2A) apresentou maior intensidade de fluorescência que as demais amostras. Duas regiões de emissão de fluorescência são observadas, a de maior intensidade é encontrada em comprimentos de onda de excitação variando de 250 a 300 nm e emissão entre 350 e 450 nm. Outra banda de menor intensidade é encontrada nos mesmos comprimentos de excitação e tem emissão entre 700 e 800 nm.

A cachaça envelhecida (Figura 4.2B) apresentou bandas fortes nas regiões com comprimentos de onda de excitação entre 375 e 550 nm e emissão entre 500 e 700 nm. Essas mudanças nos espectros ocorrem devido aos compostos extraídos do barril durante o processo de envelhecimento da cachaça. Os principais compostos extraídos da madeira do barril pelos destilados são óleos voláteis, fenólicos, açúcares, glicerol, ácidos orgânicos não voláteis e substâncias tânicas (CARDELLO; FARIA, 2000b).

No espectro da cachaça envelhecida, o meio suprimiu completamente as bandas características da cachaça sem o processo de envelhecimento. Esse efeito pode ocorrer devido ao acúmulo de componentes que absorvem energia, não causando emissão de fluorescência nestes comprimentos de onda, resultando no desaparecimento da banda e na redução significativa da intensidade de fluorescência.

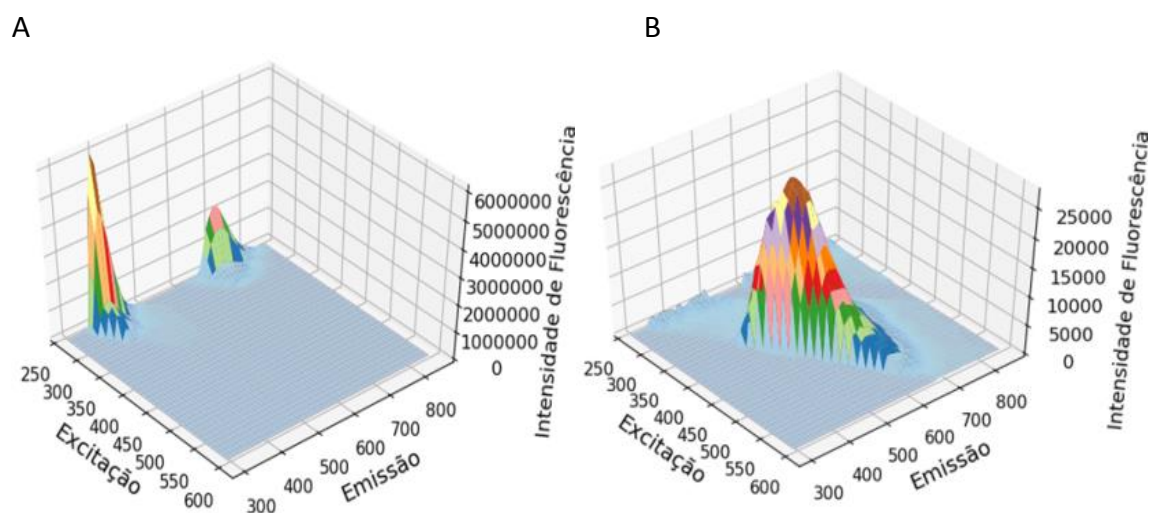


Figura 4.2: Espectros de fluorescência. A) Cachaça sem envelhecimento. B) Cachaça envelhecida com concentração de $1561 \text{ mg EAG L}^{-1}$ de compostos fenólicos totais.

Para acompanhar o comportamento dos espectros de fluorescência em amostras com concentrações mais baixas de compostos fenólicos totais, foram criadas amostras diluídas, conforme descrito no Capítulo 3. Na Figura 4.3 é possível observar as alterações nas bandas de fluorescência. À medida que a concentração de compostos fenólicos aumenta, as bandas da cachaça não envelhecida são gradualmente suprimidas. De fato, acima de 75 mg EAG L^{-1} , tais picos não existem mais. Estes resultados demonstram a mudança nas emissões de fluorescência causadas pela mudança de composição ao longo do processo de envelhecimento.

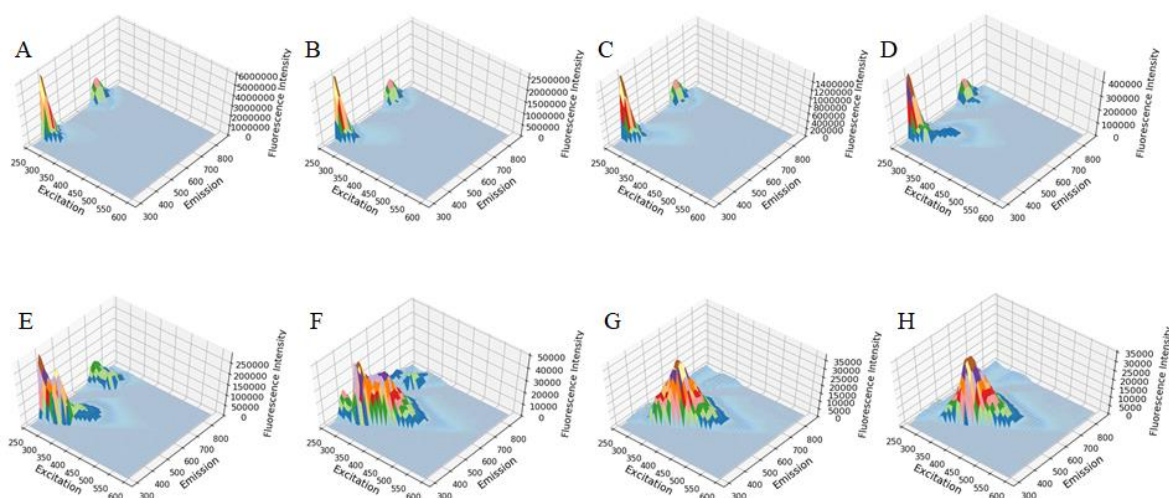


Figura 4.3: Espectros de fluorescência: A) Cachaça antes do processo de envelhecimento, B) 5 mg EAG L^{-1} , C) 10 mg EAG L^{-1} , D) 20 mg EAG L^{-1} , E) 25 mg EAG L^{-1} , F) 50 mg EAG L^{-1} , G) 75 mg EAG L^{-1} , H) $100 \text{ mg EAG L}^{-1}$.

4.1.3 Espectroscopia no infravermelho médio

Na Figura 4.4, são apresentados os espectros de infravermelho de todas as cachaças envelhecidas. Uma sobreposição das curvas pode ser observada, exceto por pequenas diferenças em três regiões. A banda entre $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ caracteriza vibrações em grupos hidroxila, bem como bandas entre 1700 m^{-1} e 1565 cm^{-1} . O pico em $3040-2800\text{ cm}^{-1}$ é atribuído à vibração da ligação C-H. Picos nas bandas entre 1565 e 965 cm^{-1} estão na região de impressão digital, onde vários grupos são designados como ácidos orgânicos, carboidratos e fenóis (OLIVEIRA et al., 2016; YUCESDY; OZEN, 2013). Houve uma alta sobreposição dos espectros, dificultando a visualização das diferenças entre as amostras, de modo que as técnicas quimiométricas podem ser utilizadas para facilitar a interpretação dos dados, selecionando as variáveis que mais se correlacionam com a propriedade de interesse.

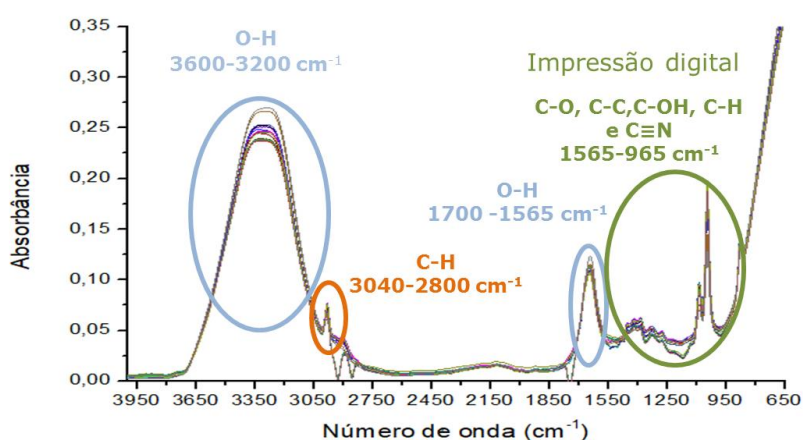


Figura 4.4: Espectros das cachaças envelhecidas coletadas do barril na região do infravermelho médio.

4.1.4 Desenvolvimento dos modelos de predição de compostos fenólicos

A Tabela 4.1 A e B apresenta as métricas para os modelos preditivos baseados em dados de fluorescência e infravermelho, respectivamente. Para esses modelos, todas as amostras disponíveis foram utilizadas, incluindo uma ampla faixa de concentração de $0,1$ a $1561,75\text{ mg EAG L}^{-1}$. Os modelos apresentados fizeram uso de 2 a 5 variáveis $\hat{y} = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots a_kx_k + b$, onde para fluorescência as variáveis selecionadas são pares de excitação/emissão, enquanto que para infravermelho são os números de onda. Quanto menores os valores de RMSE e MAPE, melhor a predição do modelo.

Algumas observações podem ser feitas a partir dos resultados apresentados na Tabela 4.1 A (modelos baseados em fluorescência):

- todos os tamanhos de modelos apresentaram um bom ajuste, com R^2 próximo a um;
- os erros MAPE, especialmente no subconjunto de treinamento, foram altamente acentuados devido às amostras com baixa concentração (ambas as cachaças não envelhecidas foram consideradas como contendo $0,1\text{ mg EAG L}^{-1}$), onde pequenos erros absolutos representam altos percentuais;

- os erros RMSEs foram pequenos quando considerado que a maioria das amostras tinham mais de 300 mg EAG L⁻¹, mas ruins quando aplicado às amostras com menos de 50 mg EAG L⁻¹.

Tabela 4.1: Métricas para os modelos preditivos baseados na espectroscopia de (A.) fluorescência 2D (B.) e infravermelho médio.

A. <i>Espectroscopia por fluorescência</i>								
		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE (%)	RMSE (mg GAEL ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAEL ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAEL ⁻¹)
Tamanho modelo	2	0,994	2614,8	46,36	37,78	37,49	16,86	29,93
	3	0,994	1206,7	44,33	64,39	25,99	49,58	27,47
	4	0,996	1000,2	38,71	46,64	23,05	39,26	23,36
	5	0,995	1383,8	41,88	14,16	16,81	18,59	17,71
	PLS VL=5		0,996	1116,2	36,91	47,7	46,82	26,6
Pares selecionados Excitação/Emissão								
Tamanho modelo	2	Ex400/Em590 Ex440/Em550						
	3	Ex400/Em600 Ex460/Em570 Ex590/Em850						
	4	Ex400/Em610 Ex450/Em670 Ex470/Em550 Ex590/Em850						
	5	Ex330/Em480 Ex400/Em590 Ex430/Em650 Ex450/Em550 Ex560/Em820						
B. <i>Espectroscopia no infravermelho Médio (MIR)</i>								
		Calibration			Validação		Teste	
		R ²	MAPE (%)	RMSE (mg GAEL ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAEL ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAEL ⁻¹)
Tamanho modelo	2	0,524	18499,3	404,01	840,4	266,32	508,22	422,43
	3	0,554	15473,9	391,12	843,5	252,11	456,35	417,00
	4	0,586	12189,3	376,66	725,5	233,58	383,47	414,92
	5	0,613	13815,0	364,35	703,3	217,75	308,14	415,35
	PLS VL=7		0,819	19913,0	248,48	823,8	239,940	271,3
Número de onda selecionados (cm ⁻¹)								
Tamanho modelo	2	3798 3765						
	3	3798 3765 3764						
	4	3888 3794 3765 1602						
	5	3888 3798 3794 3765 1602						

Todas essas observações levam à conclusão que os modelos preditivos ajustados funcionaram melhor para regiões com alta concentração fenólica (acima de

300 mg EAG L⁻¹), mas não foram úteis para regiões com uma concentração baixa (menores que 50 mg EAG L⁻¹). Embora os pares selecionados não sejam exatamente os mesmos quando observado os tamanhos dos modelos (de 2 a 5), eles estão na mesma região como pode ser observado na Figura 4.5. Como o método tem uma natureza estocástica, ora um representante de uma das regiões importantes é escolhido, ora outro. Os resultados obtidos pelo método de regressão PLS mostram que, ao usar todas as variáveis espectrais como entradas, o modelo final ajustado apresentou erros RMSE relativamente maiores para os grupos de teste e validação, indicando que muitas das variáveis utilizadas na construção deste tipo de modelo não fornecem informações significativas.

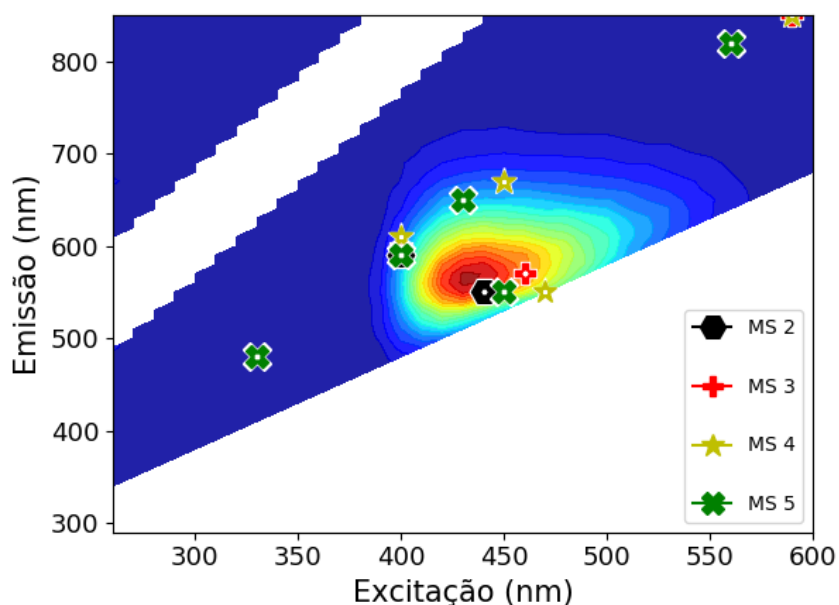


Figura 4.5 : Pares de fluorescência selecionados pelos modelos de tamanho 2 a 5.

Além disso, na Tabela 4.1B foram encontrados valores de R^2 inferiores e RMSE mais elevados quando comparado à Tabela 4.1A. Para o método de seleção de variáveis, aplicado ao grupo de teste, o menor valor de RMSE encontrado foi de 415,35 mg EAG L⁻¹, enquanto o método PLS apresentou RMSE de 318,20 mg EAG L⁻¹. É possível observar que os modelos preditivos baseados em dados de infravermelho médio falharam em representar satisfatoriamente a concentração fenólica das amostras, sendo menos sensíveis quando comparados aos modelos que utilizaram dados de fluorescência. Isto também pode ser observado na Figura 4.6 através do gráfico dos valores observados versus preditos.

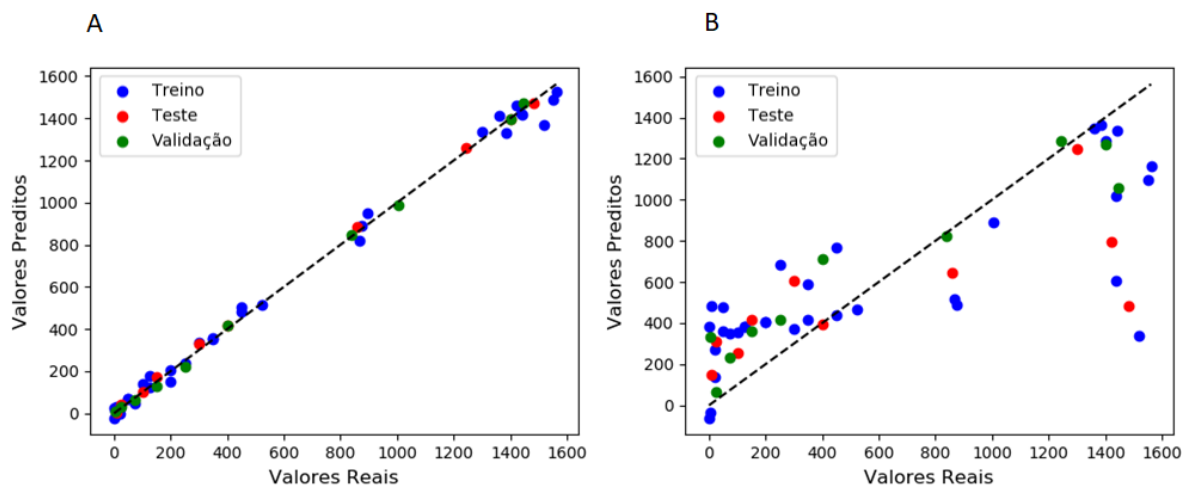


Figura 4.6: Valores reais versus valores preditos utilizando dados de (A) Fluorescência 2D e (B) Infravermelho

Na tentativa de melhorar a qualidade preditiva dos modelos, os dados foram reorganizados, segmentando as amostras em três subgrupos (SG) para o ajuste de modelos locais:

- SG1: concentração abaixo de 200 mg EAG L⁻¹ (22 amostras – cachaças não envelhecidas e diluições);
- SG2: concentração entre 50 a 450 mg EAG L⁻¹ (22 amostras - diluições);
- SG3: concentração entre 523 e 1560 mg EAG L⁻¹ (21 amostras - todas as amostras envelhecidas retiradas do barril).

Os melhores modelos encontrados, e as variáveis selecionadas para os modelos locais são apresentadas na Tabela 4.2 (os resultados completos de todos os modelos avaliados estão disponíveis no Apêndice I). Como anteriormente, os modelos foram ajustados para selecionar de 2 a 5 variáveis de entrada, mas, por um critério parcimonioso, as métricas serão apresentadas para o modelo que tem a melhor combinação entre as três métricas utilizadas levando em consideração os três conjuntos de calibração, validação e teste. Assim, o tamanho do modelo selecionado (MS) foi aquele em que um incremento em uma variável não melhorou significativamente as métricas de predição. Para cada SG, as métricas de regressão PLS também são apresentadas para fins de comparação.

Tabela 4.2: Métricas para os modelos locais com base na (A.) espectroscopia de fluorescência 2D (B.) e infravermelho médio

		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE (%)	RMSE (mg GAEL ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAEL ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAEL ⁻¹)
A. Espectroscopia por Fluorescência								
SG1A	MS 4	0,996	126,5	4,40	16,8	2,30	4,4	2,55
	PLS VL=5	0,998	177,9	2,23	32,1	11,47	10,4	3,93
	Pares selecionados Ex/Em			Ex350/Em540	Ex410/Em760	Ex460/Em660	Ex460/Em700	
SG2A	MS 4	0,998	3,4	5,57	1,4	3,53	2,5	4,08
	PLS VL=4	0,999	1,8	2,53	6,9	13,44	6,1	11,60
	Pares selecionados Ex/Em			Ex370/Em510	Ex450/Em640	Ex480/Em570	Ex600/Em840	
SG3A	MS 4	0,996	1,4	19,04	1,5	18,38	2,9	37,46
	PLS VL=3	0,993	1,6	24,52	5,9	86,50	5,9	77,71
	Pares selecionados Ex/Em			Ex380/Em840	Ex390/Em560	Ex480/Em770	Ex490/Em740	
B. Espectroscopia no infravermelho Médio (MIR)								
SG1B	MS 5	0,656	6693,0	39,72	17,8	8,96	86,2	17,71
	PLS VL=3	0,592	9716,0	43,18	229,6	25,31	84,4	34,88
	Números de onda selecionados			3850	3594	1980	1739	1578
SG2B	MS 5	0,967	17,2	24,55	4,6	6,57	4,1	9,07
	PLS VL=5	0,957	17,7	28,10	10,3	36,57	10,0	32,55
	Números de onda selecionados			3735	1905	1758	1566	1211
SG3B	MS 5	0,904	7,6	94,39	7,0	96,89	11,0	195,14
	PLS VL=3	0,869	7,6	109,99	11,7	143,98	14,0	194,35
	Números de onda selecionados			2279	2131	1966	1561	1084

Comparando as Tabelas 4.1 e 4.2, todos os modelos locais apresentaram erros menores e, conseqüentemente, melhores métricas de predição que o modelo global. Os modelos selecionados fizeram uso de quatro variáveis espectrais ao usar dados de fluorescência e cinco variáveis para MIR, uma redução significativa nas informações necessárias, quando comparado ao conjunto original de pares de Ex/Em (1995) e números de onda (3350). Aplicando espectroscopia por fluorescência, o modelo selecionado para SG1 alcançou RMSE de 4,4, 2,3 e 2,55 mg EAG L⁻¹ (Tabela 4.2 - SG1A) para os conjuntos de treinamento, validação e teste, respectivamente. Para os dados MIR (Tabela 4.2 - SG1B), os erros também diminuíram quando comparados ao modelo global, resultando em valores RMSE 10 vezes menores em relação ao conjunto de calibração. No entanto, os resultados foram considerados insatisfatórios quando comparados ao modelo preditivo ajustado aos dados de espectroscopia por fluorescência. Novamente, a espectroscopia por fluorescência foi mais sensível para a predição de compostos fenólicos totais na cachaça envelhecida em todos os subgrupos testados.

Os resultados obtidos combinando espectroscopia de fluorescência com nossa metodologia de seleção variável são semelhantes aos encontrados por Bernardes, Figueiredo e Barbeira (2014) que estudaram a determinação do conteúdo fenólico total em cachaça envelhecida usando espectros UV-Vis com calibração multivariada e PLS. Eles encontraram erros de predição RMSE de 4,11 mg de EAG L⁻¹ dentro de uma faixa de concentração menor, de 0,73 a 82,34 mg EAG L⁻¹. O ganho no desempenho de nossa metodologia pode ser devido à alta sensibilidade da espectroscopia de fluorescência e ao

uso das técnicas de seleção de variáveis, o que reduz a quantidade de informações desnecessárias no modelo.

Para o SG2, os modelos com seleção de variáveis baseados em fluorescência e MIR foram bem-sucedidos em prever o conteúdo fenólico total nas amostras com MAPE menor que 5% para o subconjunto de teste. Este foi o único SG em que os resultados foram similares entre as duas técnicas espectrais. Essa faixa de concentração, entre 50 e 450 mg EAG L⁻¹, é onde residem a maioria das cachaças comerciais envelhecidas, assim as técnicas mostram potencial para aplicação industrial.

O SG3 consiste em todas as amostras coletadas do barril durante o envelhecimento no período de 463 dias do experimento. O modelo baseado em dados de fluorescência (SG3A) foi capaz de prever o teor de compostos fenólicos com MAPE e RMSE de 2,9% e 37,5 mg EAG L⁻¹, respectivamente (para o subconjunto de teste). O modelo SG3B, por outro lado, não teve um desempenho tão bom no subconjunto de teste quanto nos subconjuntos de treinamento e validação, não sendo capaz de lidar corretamente com dados não calibrados.

A regressão PLS foi utilizada neste trabalho como referência para fins de comparação. Na maioria dos modelos locais testados, o modelo PLS apresentou boas métricas RMSE para calibração, mas não se manteve para os subconjuntos de teste e validação. Nossos resultados demonstraram que a metodologia proposta apresenta vantagens sobre o PLS usual, devido à seleção de somente variáveis relevantes em uma ampla gama de medidas. Alguns modelos locais e globais tiveram métricas de predição comparáveis, no entanto a técnica de seleção de variáveis facilita a construção de sensores customizados que dispensam a necessidade de coletar todo o espectro e que podem ser aplicados na indústria para verificação de qualidade e autenticidade de bebidas.

A Figura 4.7 apresenta os resultados preditos pelos modelos locais selecionados versus as medidas de compostos fenólicos totais realizadas usando a metodologia tradicional de Folin Ciocalteu, para cada subgrupo. Observa-se que, a espectroscopia de fluorescência resultou em melhor predição de compostos fenólicos totais na cachaça envelhecida em todos os subgrupos testados.

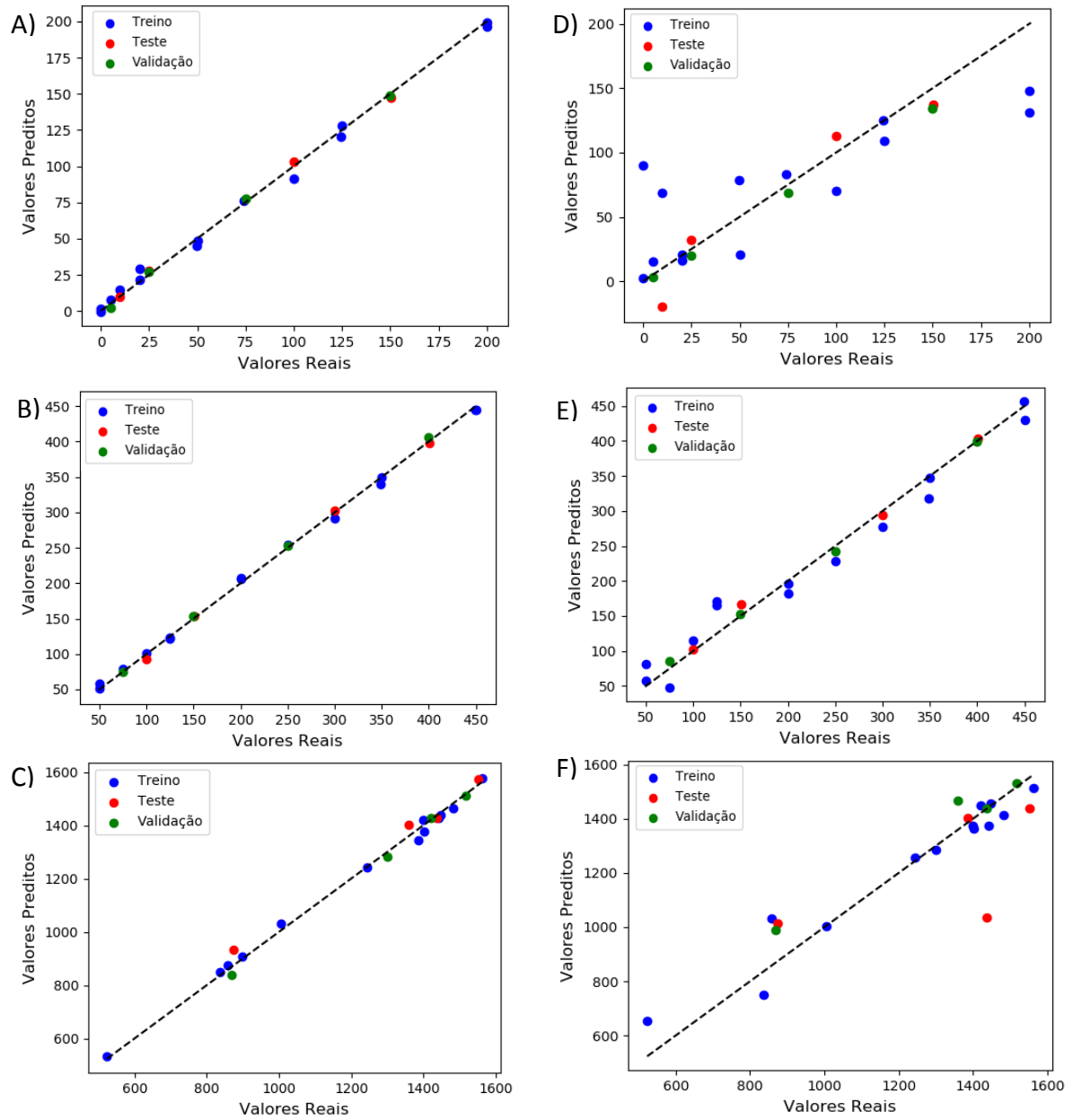


Figura 4.7: Valores medidos vs. preditos para os modelos locais selecionados com base em dados de espectroscopia de fluorescência: SG1A (A), SG2A (B) e SG3A (C) e dados MIR: SG1B (D), SG2B (E) e SG3B (F).

Capítulo 5 – Estudo de caso: Análise de compostos fenólicos totais e cafeína em chás (*Camellia sinensis*)

Este capítulo é destinado aos resultados e discussão das análises realizadas com amostras de chá preto e chá verde.

5.1 Resultados e discussões

5.1.1 Quantificação de compostos fenólicos totais

Os extratos de chá normalmente são elaborados com diferentes tipos de solvente orgânicos, cada solvente apresenta uma determinada extração de compostos. No entanto como as infusões ingeridas pelos consumidores são preparadas com água, neste trabalho utilizamos água como solvente extrator. Após a preparação dos extratos aquosos, eles foram submetidos à análise de compostos fenólicos totais como descrito na subseção 3.3, sendo os resultados expressos em miligrama de equivalente em ácido gálico por grama de amostra em base seca (mg EAG g⁻¹ b.s.).

Na tabela 5.1 são apresentados os teores de compostos fenólicos dos chás, as letras representam a marca do chá, enquanto os números representam o lote adquirido para cada marca. As amostras de A à E são amostras de chá verde, enquanto as amostras de F à I representam as amostras de chá preto. É possível observar diferenças significativas entre as marcas de chá verde e chá preto. Apenas a amostra de chá verde da marca A, não apresentou diferença significativas entre os três lotes analisados (A1, A2, A3). As marcas F1, G1, H1, I1 apresentaram diferenças significativas, como são marcas diferentes de chá preto, diversos fatores podem ter afetado a composição destes chás.

O chá verde apresentou maior teor de fenólicos totais (68,33 e 169,02 mg EAG g⁻¹ b.s.), comparado com o chá preto (46,05 a 83,83 mg EAG g⁻¹ b.s.), assim como no estudo de CHAN *et al.* (2010) que encontraram teores de 141,20 mg EAG g⁻¹ para o chá verde e 74,10 mg EAG g⁻¹ para o chá preto. As diferenças de concentração já eram esperadas visto que esses chás apresentam diferenças no processamento da folha. O chá preto passa pelo processo de oxidação resultando na oxidação de polifenóis simples em polifenóis

condensados mais complexos responsáveis pela coloração dos chás e sensação de adstringência (HARBOWY et al., 1997).

Os lotes B1 e B2 não apresentaram diferença significativa, além disso, algumas marcas de chá verde não apresentaram diferença significativa com o chá preto como é o caso dos lotes B1, B2 e G1 e B3 e F1, o que corrobora com OH *et al.* (2013) que encontraram teores de 82,21 e 82,86 mg EAG g⁻¹ para o chá verde e chá preto respectivamente.

A composição dos chás é dependente de diferentes fatores que incluem desde a etapa de cultivo como fatores climáticos, altitude, temperatura e umidade, bem como as condições utilizadas para beneficiamento das folhas (LIMA et al., 2009) e condições utilizadas no processo de extração, como agitação e temperatura (FIRMINO; MIRANDA, 2015).

Tabela 5.1: Teor de compostos fenólicos presente em chás da *Camellia sinensis*.

Amostras	Compostos Fenólicos Totais (mg EAG g ⁻¹ , base seca)
A1	163,35 ^j ± 4,82
A2	168,25 ^j ± 2,77
A3	169,02 ^j ± 5,32
B1	68,33 ^c ± 3,40
B2	72,90 ^c ± 3,34
B3	80,59 ^d ± 1,16
C1	134,65 ⁱ ± 5,88
C2	133,28 ^{hi} ± 3,01
C3	126,21 ^{gh} ± 4,63
D1	125,75 ^g ± 6,22
D2	105,62 ^e ± 3,63
D3	114,3 ^f ± 5,58
E1	101,06 ^e ± 4,23
E2	121,13 ^f ± 5,61
E3	134,56 ^g ± 6,59
F1	83,83 ^d ± 1,88
G1	71,96 ^c ± 2,77
H1	54,03 ^b ± 1,94
I1	46,05 ^a ± 1,87

Média ± desvio padrão. As médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna são consideradas estatisticamente semelhantes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

A qualidade do chá geralmente é avaliada pela aparência, sabor, e aroma da infusão, e é realizada por provadores treinados, no entanto o resultado da avaliação sensorial é facilmente influenciado pelos fatores físicos ou fisiológicos do provador (ZHAO et al., 2009). A falta de padronização nos parâmetros utilizados para analisar a qualidade das folhas de chás e da infusão, já foi relatada por diversos autores, sendo necessária a fixação de padrões como: qualidade sensorial, físico-química, microbiologia e fitoquímica (BRAGA, 2007). Neste estudo se o teor de compostos fenólicos fosse utilizado para avaliar

a qualidade do chá verde, comparando os lotes analisados, somente a marca A passaria pelo controle de qualidade devido à homogeneidade encontrada entre os lotes analisados.

5.1.2 Quantificação de cafeína

A cafeína foi determinada utilizando análise por HPLC, a quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, através da correlação da área do pico do composto à curva padrão construída com o padrão avaliado. Na Figura 5.1 é possível observar o cromatograma de uma das amostras de chá verde, onde no tempo de retenção de 21,6 min é possível identificar o pico referente à cafeína.

O teor de cafeína nas amostras estudadas variou entre 7,34 a 29,26mg g⁻¹ para o chá verde e 19,61 a 25,49 mg g⁻¹ para o chá preto. Estudos para a determinação de cafeína em chás de diferentes origens foram realizados, WANG *et al.* (2018) encontraram teores de cafeína mais elevados, entre 25,90-49,90 mg g⁻¹ para o chá verde e 30,90-42,70 mg g⁻¹ para o chá preto. RAMALHO *et al.* (2013) avaliaram o conteúdo de cafeína em chá preto de origem brasileira e britânica, encontrando teores de 53,30mg g⁻¹ para o chá brasileiro e 45 mg g⁻¹ para o chá britânico. A diferença nas concentrações pode estar relacionada com a origem, clima, tipo de processamento, entre outros fatores. Como já citado anteriormente a composição do chá sofre influência desde a etapa de cultivo da folha até o beneficiamento.

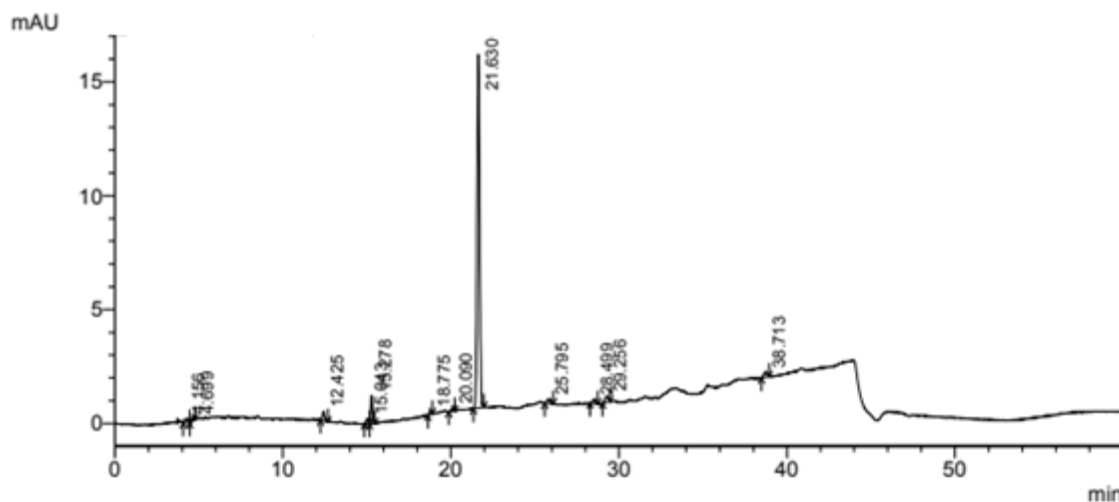


Figura 5.1: Cromatograma da cafeína referente a uma amostra de chá verde detectado em 272nm.

5.1.3 Análises dos espectros no infravermelho

Nas Figuras 5.2 e 5.3 são apresentados os espectros de todas as amostras de chá verde e chá preto, para as técnicas de MIR e NIR respectivamente. Os espectros originais são apresentados em (A). Antes da modelagem os espectros foram normalizados utilizando a técnica SNV para diminuir efeitos de dispersão e inclinação, esses espectros estão representados em (B).

Os espectros na região MIR não apresentaram diferenças entre as bandas encontradas para o chá verde e o chá preto. A banda em 1022 cm^{-1} é característica de estiramento vibracional de C-O encontrados em carboidratos, o pico em 1630 cm^{-1} é atribuído a deformação N-H e estiramento C-N referente a proteínas e teanina presente nos chás (SIVAKUMAR et al., 2014). As bandas entre 2852 a 2923 cm^{-1} são atribuídas as vibrações simétricas e assimétricas de grupos C-H de carboidratos e cafeína (TAVARES et al., 2012). A banda larga presente em 3303 cm^{-1} é correspondente a ligação OH (ROBB et al., 2007). A região da impressão digital entre 1450 cm^{-1} a 825 cm^{-1} representa as ligações referentes aos flavonoides, lignina e pectina (MATSUURA, 2017).

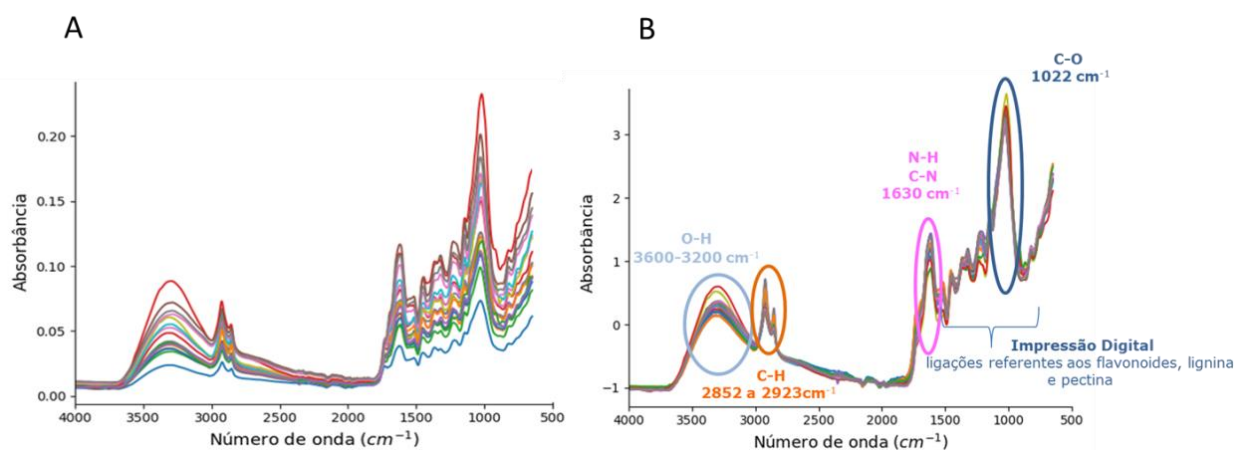


Figura 5.2: Espectros MIR antes (A) e após(B) o tratamento dos dados com SNV apresentando as bandas identificadas.

O espectro NIR é constituído de bandas resultantes de absorção sobrepostas. Essa sobreposição é dependente das substâncias presentes em cada alimento. As amostras em geral apresentaram espectros NIR semelhantes. O espectro NIR é composto por vibração de estiramento ou deformação dos grupos como C-H, O-H e N-H (CHEN et al., 2009).

Nos espectros NIR o pico em torno de 6700 cm^{-1} é atribuído ao primeiro harmônico do alongamento de N-H (PANIGRAHI; BHOL; DAS, 2016) e já foi relacionado a presença de aminoácidos (BIAN et al., 2010). A banda entre 5920 e 5775 cm^{-1} corresponde aos grupos CH_2 e CH_3 , a banda em 5155 cm^{-1} é equivalente ao estiramento e deformação OH atribuídas a molécula de água, bandas por volta de 5350 são atribuídas ao grupo carbonila (CHEN et al., 2006; FIRMANI et al., 2019a). O pico em torno de 4600 cm^{-1} corresponde ao alongamento de N-H (LI et al., 2019). A área em torno de 4250 cm^{-1} foi associada a presença de O-H, N-H e C-O (FIRMANI et al., 2019b).

Li *et al.* (2019) encontraram espectros semelhantes ao deste trabalho para o chá verde produzido na China. Segundo Chen *et al.* (2007) a vibração do grupo carbonila, e as vibrações CH e CH_2 são causadas pela presença de compostos fenólicos, alcaloides, proteínas, ácidos e alguns compostos aromáticos.

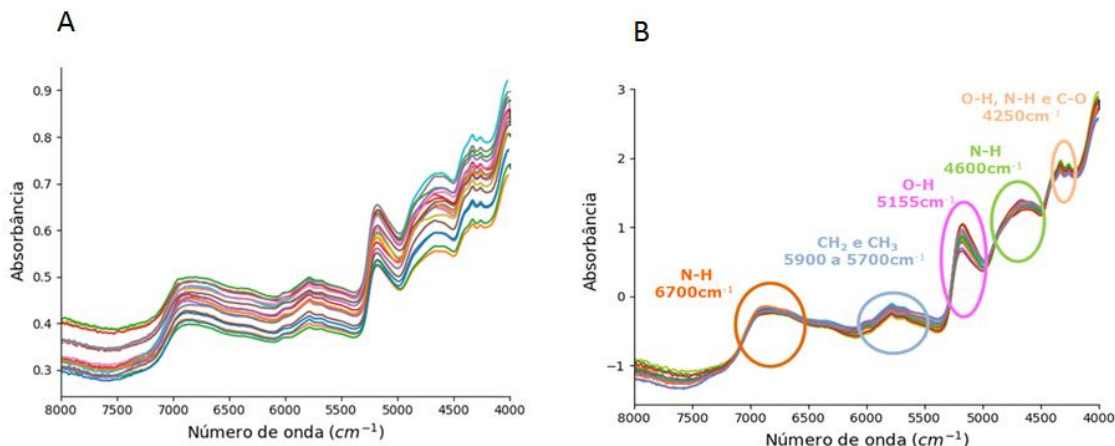


Figura 5.3: Espectros NIR antes(A) e após (B) o tratamento dos dados com SNV apresentando as bandas identificadas.

5.1.4 Análises dos espectros por fluorescência

Os espectros de fluorescência dos chás foram coletados com os seus respectivos extratos aquosos sem qualquer pré-tratamento adicional da amostra. A Figura 5.4 apresenta os espectros médios de fluorescência para cada uma das marcas de chás analisadas.

As marcas de chá verde A, B, D, E apresentaram 3 regiões de fluorescência enquanto a marca C apresentou duas regiões. Todas as marcas de chá preto (F, G, H e I) apresentaram somente uma região com alta intensidade de fluorescência. A primeira região está presente em todas as marcas de chá verde, sendo também encontrada no chá preto, a qual consiste nos comprimentos de excitação entre 275 a 450nm e emissão entre 500 e 700nm. A segunda região se encontra nos mesmos comprimentos de emissão que a primeira, mas com excitação variando de 450 a 525nm, essa banda só foi encontrada para os chás verdes e com intensidade variável. Uma terceira banda foi observada, com alta intensidade somente para o chá verde da marca A, essa banda é encontrada nos comprimentos de excitação de 350 a 450nm com emissão em comprimentos de onda maiores comparado com as outras bandas encontradas entre 700 a 800nm. As diferenças nos espectros de fluorescência podem ser causadas por diferentes conteúdos de aminoácidos, polifenóis e clorofilas presentes nos chás, além disso, cada chá é derivado de origens diferentes de cultivo e beneficiamento (HU; YIN, 2017).

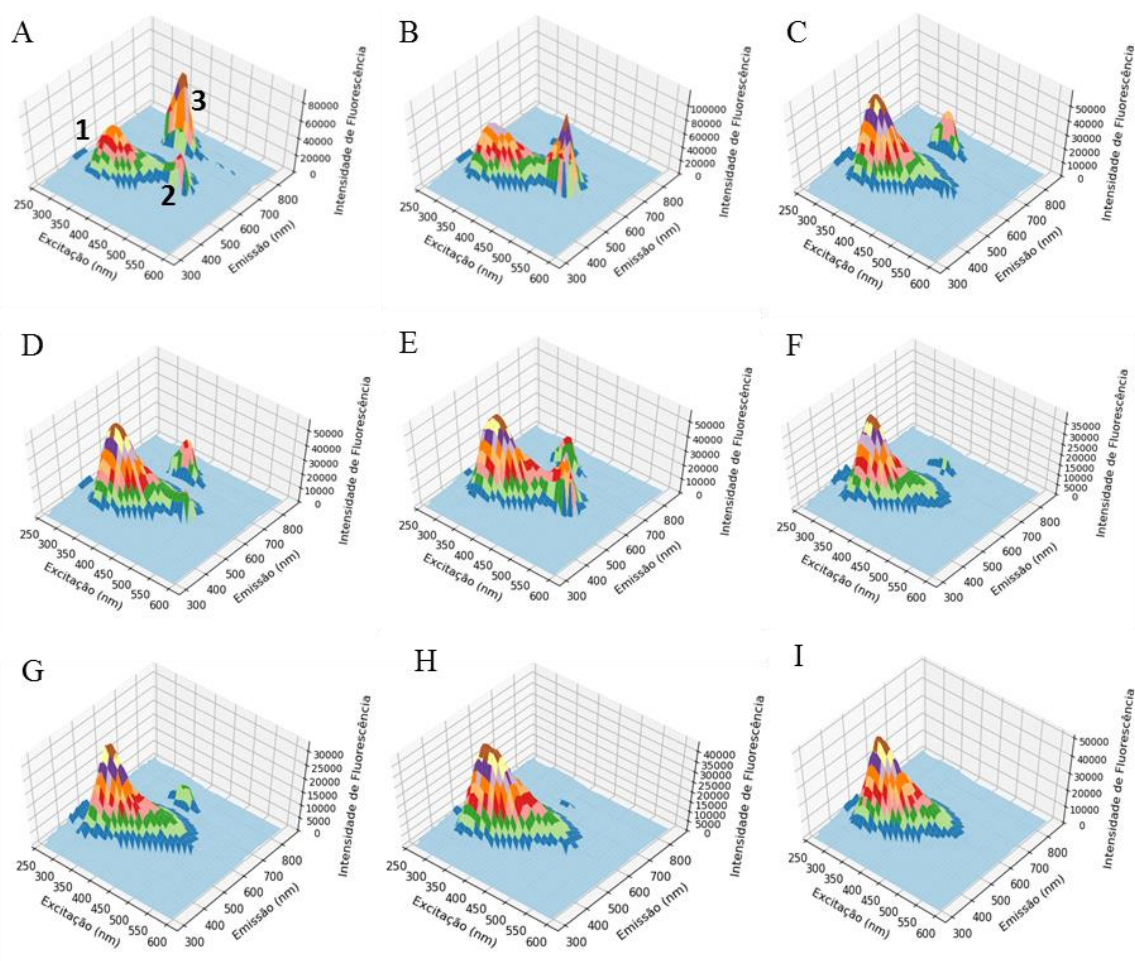


Figura 5.4: Espectros médios de fluorescência dos chás verde (A, B, C, D, E) e chá preto (F, G, H, I).

5.1.5 Desenvolvimento dos modelos quimiométricos

Como no capítulo anterior, os modelos para a predição de compostos fenólicos e cafeína foram elaborados com 2 a 5 variáveis, no entanto serão apresentadas as métricas para os modelos que tiveram a melhor combinação entre as três métricas utilizadas levando em consideração os três subconjuntos: calibração, validação e teste. O tamanho do modelo selecionado (MS) está identificado nas tabelas que serão mencionadas a seguir.

A Tabela 5.2 apresenta as métricas para os modelos elaborados para predição de compostos fenólicos totais, baseados em dados de fluorescência e infravermelho incluindo as variáveis selecionadas pelo ACO e as métricas para o modelo PLS.

Observando o modelo de seleção com 4 variáveis, é possível verificar que todos os modelos elaborados apresentaram R^2 acima de 0,84, para os subconjuntos de treino. O erro percentual ficou abaixo de 5% e RMSE no máximo de 6 mg EAG g^{-1} para o subconjunto de teste, para as técnicas de fluorescência e infravermelho (MIR e NIR) mostrando bom desempenho para predição de compostos fenólicos nos chás. A Figura 5.5 apresenta os resultados preditos pelos modelos selecionados versus as medidas de compostos fenólicos totais, para cada uma das técnicas espectroscópicas avaliadas.

Tabela 5.2: Métricas para os modelos na espectroscopia de fluorescência, infravermelho médio (MIR) e infravermelho próximo (NIR) para predição de compostos fenólicos totais

		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE (%)	RMSE (mg GAE g ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAE g ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAE g ⁻¹)
<i>Compostos fenólicos</i>								
Fluorescência	MS 4	0,94	7,89	8,59	6,27	7,61	3,50	5,82
	PLS VL=4	0,98	3,50	4,83	8,27	9,54	6,63	7,92
Pares selecionados Ex/Em		Ex300/Em440	Ex350/Em500	Ex350/Em630	Ex440/Em800			
MIR	MS 4	0,84	14,00	16,88	3,12	3,28	4,44	5,35
	PLS VL=3	0,90	11,90	13,37	34,21	36,28	14,37	15,03
Número de onda selecionados		2662	2265	1335	1192			
NIR	MS 4	0,88	14,47	9,88	8,67	14,38	2,96	4,62
	PLS VL=5	0,99	3,16	3,16	23,60	28,63	10,09	14,84
Número de onda selecionados		4680	4806	5426	7240			

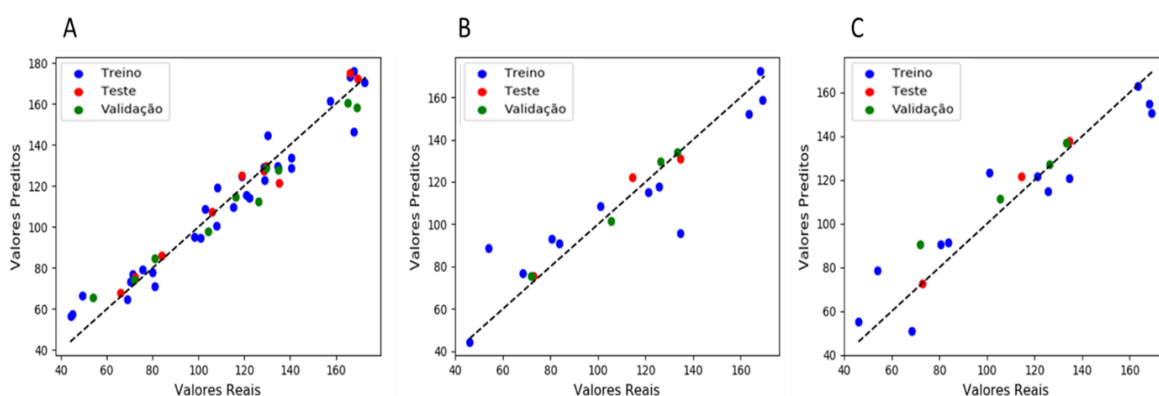


Figura 5.5: Valores reais versus valores preditos utilizando dados de (A) Fluorescência e (B) Infravermelho médio (C) Infravermelho próximo

Em comparação com o método PLS, somente a técnica de Espectroscopia por fluorescência atingiu métricas comparáveis ao método de seleção de variáveis, encontrando MAPE e RMSE de 6,63% e 7,92mg EAG g⁻¹, respectivamente para o subconjunto de teste. Para a técnica de infravermelho, o subconjunto de treinamento teve boas métricas, no entanto, não manteve um bom desempenho para os subconjuntos de teste e validação, obtendo valores elevados de RMSE. No caso da espectroscopia NIR pode se dizer que houve um sobreajuste dos dados de treinamento para o método PLS, o erro RMSE de treino foi de 3,16mg EAG g⁻¹, enquanto para validação e teste foram encontrados erros de 28,63mg EAG g⁻¹ e 14,84mg EAG g⁻¹ respectivamente.

Para a obtenção de modelos PLS com melhores qualidades preditivas, seria necessário o aumento da quantidade de amostras para todos os conjuntos juntamente com uma

etapa de seleção de variáveis antes do PLS, pois devido à utilização dos espectros completos, muitas informações irrelevantes dificultam o ajuste do modelo.

Na Tabela 5.3 são apresentadas as métricas para os modelos elaborados para a predição de cafeína. Em geral os modelos baseados em espectroscopia de fluorescência e NIR apresentam métricas melhores que a espectroscopia MIR no subconjunto de teste. Foram encontrados RMSE para teste de 0,27, 0,90 e 1,79 mg g⁻¹ para as técnicas de NIR, fluorescência e MIR respectivamente. Para os modelos com quatro variáveis selecionadas o menor R² encontrado foi de 0,88 para modelos baseados em espectroscopia na região do infravermelho próximo. Na Figura 5.6 são apresentados os gráficos de valores preditos versus observados para os modelos de predição de cafeína.

Tabela 5.3: Métricas para os modelos na espectroscopia de fluorescência, infravermelho médio (MIR) e infravermelho próximo (NIR) para predição de cafeína

		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE (%)	RMSE (mg g ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg g ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg g ⁻¹)
<i>Cafeína</i>								
Fluorescência	MS 4	0,96	6,38	1,19	3,50	0,88	3,34	0,90
	PLS VL=4	0,98	3,75	0,88	18,97	4,96	11,93	3,26
Pares selecionados Ex/Em				Ex360/Em700	Ex410/Em520	Ex570/Em650	Ex590/Em820	
MIR	MS 4	0,91	9,53	1,81	2,39	0,65	6,32	1,79
	PLS VL=4	0,94	7,45	1,40	26,87	6,41	26,11	5,44
Número de onda selecionados				2962	2509	1746	1054	
NIR	MS 4	0,88	11,24	2,05	3,94	1,04	1,21	0,27
	PLS VL=5	0,94	5,90	1,33	23,21	5,65	13,79	3,00
Número de onda selecionados				4680	4806	5426	7240	

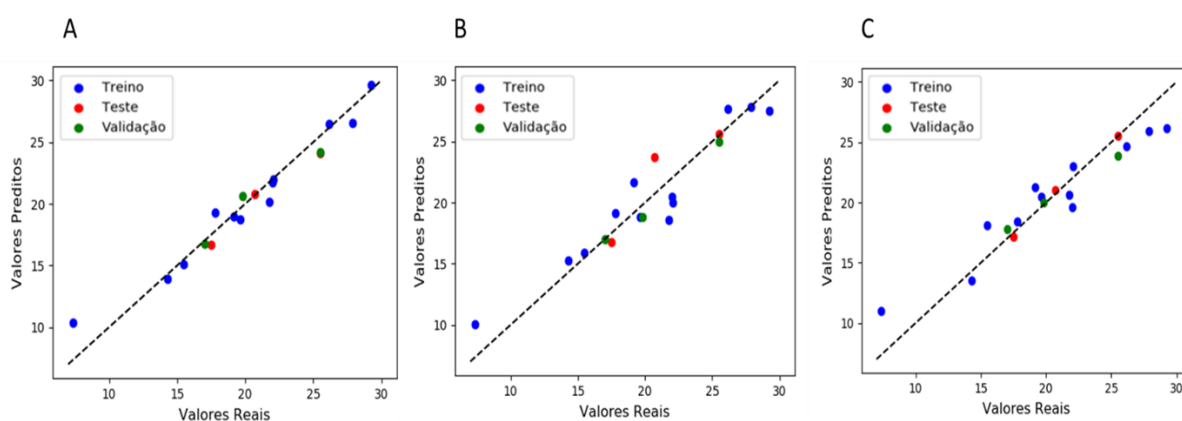


Figura 5.6: Valores reais versus valores preditos utilizando dados de (A) Fluorescência e (B) Infravermelho médio (C) Infravermelho próximo

Novamente, os modelos PLS apresentaram bom desempenho para o subconjunto de calibração, no entanto para os conjuntos de validação e teste os erros foram mais elevados comparado aos modelos de seleção de variáveis. Como no caso anterior, na predição de cafeína também foram encontrados valores RMSE mais elevados que a

abordagem de seleção de variáveis para o subconjunto de teste, isso pode ocorrer devido ao alto nível de informações com redundância inviabilizando um bom ajuste dos modelos. A metodologia de seleção de variáveis utilizada neste trabalho busca a melhor combinação de pares ou números de onda que se obtenham os menores erros, e consequentemente, selecionam as variáveis que melhor se relacionam linearmente com a propriedade de interesse.

Capítulo 6 – Considerações Finais e Sugestões para Trabalhos Futuros

Através dos resultados obtidos, foi possível quantificar satisfatoriamente compostos fenólicos totais e cafeína utilizando métodos espectroscópicos combinados com técnicas de seleção de variáveis, sem que haja a necessidade de etapas de preparação da amostra ou uso de solventes.

Para o estudo de caso do processo de envelhecimento da cachaça foram obtidos valores de R^2 acima de 0,996 para todos os modelos locais previstos com dados de espectroscopia de fluorescência usando apenas quatro pares Ex/Em. No entanto, os modelos globais não foram úteis para regiões com uma concentração muito baixa, apresentando erro RMSE de no mínimo 18mg EAG L⁻¹ para teste. Já a espectroscopia no infravermelho médio foi menos sensível quando comparada aos modelos que usaram dados de fluorescência. Isso pode ter ocorrido devido à alta sobreposição de espectros de infravermelho, dificultando a interpretação de informações úteis. Os modelos locais encontrados com o método PLS apresentaram boas métricas para o conjunto de calibração, mas não se mantiveram para os conjuntos de validação e teste, apresentando valores de RMSE mais elevados quando comparado aos métodos de seleção de variáveis.

No estudo de caso dos chás, as técnicas espectroscópicas, fluorescência, MIR e NIR apresentaram métricas comparáveis, atingindo erros menores que 5% para o subconjunto de teste na predição de compostos fenólicos totais, com apenas quatro variáveis. Nestes casos o PLS só foi comparável ao método de seleção de variáveis utilizando espectroscopia de fluorescência. Para a predição de cafeína foram encontrados erros RMSE para o conjunto de teste de 0,27, 0,90 e 1,79 mg g⁻¹ para as técnicas de NIR, fluorescência e MIR, respectivamente. Através do método PLS não foram encontrados modelos com bons ajustes para os subconjuntos de validação e teste, mostrando que a utilização do espectro completo acaba por trazer informações inúteis e redundantes dificultando o ajuste do modelo.

Assim, os resultados demonstraram que a metodologia de seleção de variáveis apresenta vantagens sobre o PLS usual devido à seleção de somente variáveis relevantes em uma ampla gama de medidas, exigindo apenas uma pequena parte do espectro para

modelar o sistema. Essas técnicas aliadas a ferramentas espectroscópicas que tem resposta rápida, não são destrutivas, não usam solventes e não requerem preparação de amostras, revelam potencial de aplicação no monitoramento de processos em linhas de produção, além de facilitar a aplicação e construção de sensores customizados de baixo custo, que dispensam a necessidade de coletar todo o espectro.

Como sugestões para trabalhos futuros, sugere-se a modificação do método ACO para se determinar um par Ex/Em que possa ser utilizado como referência do meio e a utilização da diferença da intensidade medida em relação a esse par, isso permitiria que os ajustes realizados sejam extrapoláveis de forma mais consistente frente as variações do meio. Baseado nos resultados apresentados sugere-se a construção de um sensor customizados de baixo custo para ser colocado em linha visando acompanhar o processo de envelhecimento da cachaça e também a construção de sensores para o controle de qualidade na indústria dos chás.

Referências

ABBAS, Ouissam; DARDENNE, Pierre; BAETEN, Vincent. **Near-Infrared, Mid-Infrared, and Raman Spectroscopy**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384862-8.00003-0>>

ABDI, Hervé. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 97–106, 2010.

ABOULWABA, Maram M. et al. Authentication and discrimination of green tea samples using UV–vis, FTIR and HPLC techniques coupled with chemometrics analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 164, p. 653–658, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.036>>

AHMED, Selena; STEPP, John Richard. Green Tea. In: **Tea in Health and Disease Prevention**. [s.l.] : Elsevier, 2013. p. 19–31.

ALASALVAR, Cesarettin et al. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 1410–1416, 2001.

ALNUAIMI, Noura et al. **Streaming feature selection algorithms for big data: A survey** *Applied Computing and Informatics*, 2019.

AMES, Bruce N.; GOLD, Lois Swirsky; WILLETT, Walter C. The causes and prevention of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 92, n. 12, p. 5258–5265, 1995.

ANJOS, Jeancarlo Pereira Dos. Compostos Fenólicos e Carbamato de Etila: Caracterização e Quantificação em Diferentes Períodos do Envelhecimento da Cachaça em Tonel de Carvalho (*Quercus sp*). [s. l.], p. 153, 2010.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **Resolução Rdc 277 de 22 de Setembro de 2005. Aprova o “regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis”**. Brasília, 2005.

- AQUARONE, Eugenio et al. **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo.
- AQUINO, Francisco W. B. et al. Determinação de marcadores de envelhecimento em cachaças. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 145–149, 2006.
- AQUINO, Wendel. **Dissertação Mestrado Wendel Aquino**. 2004. Universidade Federal do Ceará, [s. l.], 2004.
- AYLOTT, R. I.; MACKENZIE, W. M. Analytical strategies to confirm the generic authenticity of Scotch whisky. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 116, n. 3, p. 215–229, 2010.
- BAJOUB, Aadil et al. Assessing the varietal origin of extra-virgin olive oil using liquid chromatography fingerprints of phenolic compound, data fusion and chemometrics. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 215, p. 245–255, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.140>>
- BARRETO ALVES, Adriana; BRAGAGNOLO, Neura. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 237–243, 2002.
- BERNARDES, Cristina D.; DE FIGUEIREDO, Meliza C. P.; BARBEIRA, Paulo J. S. Developing a PLS model for determination of total phenolic content in aged cachaças. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 116, p. 173–177, 2014.
- BIAN, Meng et al. Reflectance spectroscopy of biochemical components as indicators of tea (*Camellia sinensis*) quality. **Photogrammetric Engineering and Remote Sensing**, [s. l.], v. 76, n. 12, p. 1385–1392, 2010.
- BICAS, Thariane Carvalho et al. Uso da Espectroscopia de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (IV-TF) aliada à quimiometria para classificação de vinhos e suco de uva. **Brazilian Journal of Food Research**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 89, 2017.
- BOROSKI, Marcela et al. **Antioxidantes Princípios e Métodos Analíticos**. 1. ed. Curitiba.
- BORTOLETTO, Aline Marques; CORREA, Ana Carolina; ALCARDE, André Ricardo. Aging practices influence chemical and sensory quality of cachaça. **Food Research International**, [s. l.], v. 86, p. 46–53, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.003>>
- BOTELHO, Bruno G.; OLIVEIRA, Leandro S.; FRANCA, Adriana S. Fluorescence spectroscopy as tool for the geographical discrimination of coffees produced in different regions of Minas Gerais State in Brazil. **Food Control**, [s. l.], 2017.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Instrução Normativa N.13.**, 2005.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **A cachaça no Brasil: dados de registro de cachaças e aguardentes** / Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília:

MAPA,p.27, 2019.

CABRERA-BAÑEGIL, Manuel et al. Front-face fluorescence spectroscopy combined with second-order multivariate algorithms for the quantification of polyphenols in red wine samples. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 220, p. 168–176, 2017.

CARDELLO, Helena M. A. B.; FARIA, João Bosco. Perfil Sensorial e Características Físico-Químicas de Aguardentes Comerciais Brasileiras Envelhecidas e Sem Envelhecer. **Braz. J. Food Technol.**, [s. l.], v. 3, p. 31–40, 2000. Disponível em: <<http://bj.ital.sp.gov.br/artigos/brazilianjournal/2000/p0032.pdf>>

CARDOSO, Maria das Graças. **Produção de aguardente de cana**. 2 ed. ed. Lavras, 2006.

CARDOSO, Maria das Graças et al. Cachaça de Minas Gerais: produção e qualidade. [s. l.], 2012.

CHAN, Eric Wei Chiang et al. Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 185–189, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2009.10.002>>

CHAVES, José Benício Paes; FERNANDES, Aline Regina; SILVA, Carlos Arthur Barbosa Da. PRODUÇÃO ARTESANAL DE CACHAÇA DE QUALIDADE (Capacidade 3000 litros por dia). [s. l.], n. May 2016, 2003.

CHEN, Quansheng et al. Simultaneous determination of total polyphenols and caffeine contents of green tea by near-infrared reflectance spectroscopy. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 42–47, 2006.

CHEN, Quansheng et al. Simultaneous analysis of main catechins contents in green tea (*Camellia sinensis* (L.)) by Fourier transform near infrared reflectance (FT-NIR) spectroscopy. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 113, n. 4, p. 1272–1277, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.042>>

CHEN, Quansheng et al. Determination of rice syrup adulterant concentration in honey using three-dimensional fluorescence spectra and multivariate calibrations. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 131, p. 177–182, 2014. a.

CHEN, Quansheng et al. Spectrochimica Acta Parte A : Molecular e biomolecular Spectroscopy Determinação da concentração do xarope de arroz adulterant em mel utilizando tridimensional espectros de fluorescência e calibrações multivariados. [s. l.], v. 131, p. 177–182, 2014. b.

COBLE, Paula G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. **Marine Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 325–346, 1996.

COZZOLINO, Daniel et al. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 513, n. 1, p. 73–80, 2004.

CROFT, Kevin D. et al. Screening plant derived dietary phenolic compounds for bioactivity related to cardiovascular disease. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 126, n. October 2017, p. 22–28, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.12.002>>

- DE MARIA, Carlos A. B.; MOREIRA, Ricardo F. A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 99–105, 2007.
- DE MIRANDA, Mariana Branco et al. Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 28, n. SUPPL., p. 84–89, 2008.
- DE OLIVEIRA, Alane Cabral et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.
- DE SOUZA, André Marcelo; POPPI, Ronei Jesus. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: UM tutorial, parte I. **Química Nova**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.
- DE SOUZA SERAPIÃO, Adriane Beatriz. Fundamentos de Otimização por Inteligência de enxames: Uma Visão Geral. **Controle y Automacao**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 271–304, 2009.
- DORIGO, Marco; MEMBER, Senior; GAMBARDELLA, Luca Maria. Ant Colony System : A Cooperative Learning Approach to the Traveling Salesman Problem. [s. l.], v. 1, n. 1, p. 53–66, 1997.
- FACCHIN, Samuel. U NIVERSIDADE F EDERAL DO R IO G RANDE DO S UL Técnicas de Análise Multivariável aplicadas ao Desenvolvimento de Analisadores Virtuais Técnicas de Análise Multivariável aplicadas ao Desenvolvimento de Analisadores Virtuais. [s. l.], 2005.
- FERREIRA, Márcia Miguel Castro. **Quimiometria: Conceitos, Método e Aplicações**. 1. ed. São Paulo.
- FILHO, Waldemar Gastoni Venturini. **Bebidas Alcoólicas: ciência e Tecnologia**. 2. ed. São Paulo.
- FIRMANI, Patrizia et al. Near infrared (NIR) spectroscopy-based classification for the authentication of Darjeeling black tea. **Food Control**, [s. l.], v. 100, n. February, p. 292–299, 2019. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.006>>
- FIRMANI, Patrizia et al. Near infrared (NIR) spectroscopy-based classification for the authentication of Darjeeling black tea. **Food Control**, [s. l.], v. 100, n. February, p. 292–299, 2019. b.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Tea - FAO**, 2019.
- GABRIEL, Afra Vital Matos DiasLavorenti et al. Effect of the spontaneous fermentation and the ageing on the chemo-sensory quality of Brazilian organic cachaça. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 918–925, 2012.
- GALINHA, Claudia F. et al. Multivariate statistically-based modelling of a membrane bioreactor for wastewater treatment using 2D fluorescence monitoring data. **Water Research**, [s. l.], v. 46, n. 11, p. 3623–3636, 2012.

GARCÍA-MORENO, Calahorra J. et al. **Tyrosol, a simple phenol from EVOO, targets multiple pathogenic mechanisms of neurodegeneration in a C. elegans model of Parkinson's disease.** [s.l.] : Elsevier Inc., 2019. v. 82 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.07.003>>

GELADI, Paul. Chemometrics in spectroscopy . Part 1 . Classical chemometrics. [s. l.], v. 58, p. 767–782, 2003.

GONÇALVES, Paulo Henrique; DINIZ, Dias. Universidade Federal da Paraíba Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química. Tese de doutorado. Novas estratégias para classificação simultânea do tipo e origem geográfica de chás. [s. l.], 2013.

GRANATO, Daniel et al. Food Science and Technology Graduate Program , State University of Ponta Grossa . Av . **Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.010>>

HARBOWY, Matthew E. et al. Critical Reviews in Plant Sciences Tea Chemistry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 415–480, 1997. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/loi/bpts20%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1080/07352689709701956%5Cnhttp://%5Cnwww.tandfonline.com/>>

HU, Leqian; YIN, Chunling. Development of a New Three-Dimensional Fluorescence Spectroscopy Method Coupling with Multilinear Pattern Recognition to Discriminate the Variety and Grade of Green Tea. **Food Analytical Methods**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12161-017-0798-1>>

IBRAC. **Instituto Brasileiro de Cachaça. Brasil. Mercado interno.**, 2019. Disponível em: <<http://www.ibrac.net/index.php/servicos/estatisticas/mercado-interno>> Acesso em 17 de maio de 2019.

JAKUBÍKOVÁ, M.; SÁDECKÁ, J.; KLEINOVÁ, A. On the use of the fluorescence, ultraviolet–visible and near infrared spectroscopy with chemometrics for the discrimination between plum brandies of different varietal origins. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 239, p. 889–897, 2018.

KILLEEN, Daniel P. et al. Quantitative raman spectroscopy for the analysis of carrot bioactives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 11, p. 2701–2708, 2013.

LAKOWICZ, Joseph R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Baltimore, Maryland, USA.

LE GALL, Gwénaëlle; COLQUHOUN, Ian J.; DEFERNEZ, Marianne. Metabolite Profiling Using 1H NMR Spectroscopy for Quality Assessment of Green Tea, *Camellia sinensis* (L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 692–700, 2004.

LEA, A. Analysis of polyphenol antioxidants in. **Reading Scientific**, [s. l.], 2008.

LEA, Andrew G. H.; PIGGOTT, John R. **Fermented beverage production**. [s.l.: s.n.]. v. 6

LI, Chunlin et al. Rapid and non-destructive discrimination of special-grade flat green tea using Near-infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and**

Biomolecular Spectroscopy, [s. l.], v. 206, p. 254–262, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.07.085>>

LIMA, Juliana Domingues et al. Chá : aspectos relacionados à qualidade e perspectivas
Tea : aspects related to the quality and prospects. [s. l.], p. 1270–1278, 2009.

LIU, Rui Hai. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of nutrition**, [s. l.], v. 134, n. 12 Suppl, p. 3479S-3485S, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15570057>>

MALLMANN, Milena. **Influência do Tipo de Plantio e Etapas do Processo de Industrialização Sobre os Compostos Fenólicos e Metilxantinas da Erva-Mate**. 2018. [s. l.], 2018.

MAMEDE, Maria Eugênia Oliveira; PASTORE, Gláucia Maria. Compostos Fenólicos Do Vinho: Estrutura E Ação Antioxidante. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 233–252, 2004.

MASSART, D. L. et al. **Chemometrics : a textbook**, 1989.

MATSUURA, Eiji Nitta. **Espectroscopia no infravermelho como ferramenta para diferenciação de chá verde agricultura Orgânica e Convencional**. 2017. Universidade do Vale do Paraíba, [s. l.], 2017.

MELLO, Lucilene Dornelles; KUBOTA, Lauro Tatsuo. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. **Talanta**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 335–348, 2007.

MIRANDA, Mariana Branco De; HORII, Jorge; ALCARDE, André Ricardo. Estudo Do Efeito Da Irradiação Gamma (60 Co) Na Qualidade. [s. l.], v. 26, n. 4, p. 772–778, 2006.

MOSEDALE, Jonathan R.; PUECH, Jean L. Wood maturation of distilled beverages. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 95–101, 1998.

MUKHTAR, Hasan; AHMAD, Nihal. Tea polyphenols: Prevention of cancer and optimizing health. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 71, n. 6 SUPPL., p. 1698–1702, 2000.

MURRAY, S. L.; THIMGAN, M. S. Sleep hygiene recommendations. [s. l.], p. 53–80, 2016.

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography. A**, [s. l.], v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15553136>>

NAGALAKSHMI, SRIKANTAYYA et al. Handbook of Postharvest Technology Cereals, Fruits, Vegetables, Tea and Spices. In: [s.l: s.n.]. v. 23p. 1593–1595.

NISHIMURA, K. AND MATSUYAMA, R. 'Maturation and Maturation Chemistry'. in **The Science and Technology of Whiskies (Piggott, J.R., Sharp, R. and Duncan, R.E.B. eds)** Longman Scientific and Technical, London, [s. l.], p. 253–363, 1989.

OBANDA, Martin; OWUOR, P. Okinda; TAYLOR, Sarah J. Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 209–215, 1997.

OH, Jungmin et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 403–409, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.021>>

OLIVEIRA, Renata Nunes et al. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Matéria (Rio de Janeiro)**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 767–779, 2016.

PANIGRAHI, Niranjani; BHOL, Chandra Sekhar; DAS, Bhabani Sankar. Rapid assessment of black tea quality using diffuse reflectance spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 190, p. 101–108, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.020>>

PATRA, Digambara; MISHRA, A. K. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 787–798, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ JR, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. [s.l: s.n.].

PONCE, E.; TAYLOR, A. J. Phenolic Compounds as Astringent Factors in Black Tea Liquors. In: SHAHIDI, Fereidoon; HO, Chi-Tang (Eds.). **Flavor Chemistry of Ethnic Foods**. Boston, MA: Springer US, 1999. p. 197–209.

PUECH, Jean-louis. Extraction and Evolution of Lignin Products in Armagnac Matured in Oak. **Society**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 2007–2007, 1981.

RAMALHO, Suyare Araújo et al. Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. **Food Research International**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 155–161, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.031>>

RANZAN, Cassiano et al. Wheat flour characterization using NIR and spectral filter based on Ant Colony Optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s. l.], v. 132, p. 133–140, 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169743914000203>>

RANZAN, Lucas. Estudo da viabilidade do uso de espectroscopia por fluorescência 2D para quantificar teor de enxofre em óleo diesel. [s. l.], p. 94, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/116717>>

ROBB, Christina S. et al. Journal of Liquid Chromatography & Related ANALYSIS OF GREEN TEA CONSTITUENTS BY HPLC-FTIR. [s. l.], n. February 2013, p. 37–41, 2007.

RODRIGUES, Leonardo Avelar Milani. **Cachaças Envelhecidas Em Diferentes Tipos De Madeiras : Quantificação De Compostos Fenólicos , Atividade Antibacteriana E**. 2013. Universidade Federal de Lavras, [s. l.], 2013.

SÁDECKÁ, Jana; TÓTHOVÁ, Jana. Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics in the

- Food Classification – a Review. **Czech J. Food Sci.**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 159–173, 2007.
- SAIGG, Nayane Lins; SILVA, Maria Cláudia. Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. **Ciência da Saúde**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 69–89, 2009.
- SALA, Oswaldo. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2^o ed. São Paulo.
- SANTANA, Felipe Bachion. Uso de espectroscopia no infravermelho médio e análise discriminante por quadrados mínimos parciais na determinação de adulterações em óleo de Andiroba, Prímula e Rosa Mosqueta. 2015.78p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2015.
- SANTIAGO, Wilder Douglas; CARDOSO, Maria das Graças; NELSON, David Lee. Cachaça stored in casks newly constructed of oak (*Quercus* sp.), amburana (*Amburana cearensis*), jatoba (*Hymenaea caribouril*), balsam (*Myroxylon peruiferum*) and peroba (*Paratecoma peroba*): alcohol content, phenol composition, colour intensity and dry extract. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 123, n. 2, p. 232–241, 2017.
- SCHWEIKART. Chá Verde. [s. l.], 2011. Disponível em: <<https://www.cha-verde.net/>>
- SEETOHUL, L. Nitin et al. Discrimination of Sri Lankan black teas using fluorescence spectroscopy and linear discriminant analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 93, n. 9, p. 2308–2314, 2013.
- SHEREV, R. Norris.; BRINK, Joseph A. **Indústria de fermentação. (Ed.). Indústrias de Processos Químicos**. 4 ed. Rio ed. [s.l: s.n.].
- SHISHOV, Andrey et al. An automated homogeneous liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC-UV determination of caffeine in beverages. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 144, n. October 2018, p. 469–473, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.014>>
- SIKORSKA, Ewa; KHMELINSKII, Igor; SIKORSKI, Marek. **Fluorescence spectroscopy and imaging instruments for food quality evaluation**. [s.l: s.n.].
- SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A.; JR, J. COLORIMETRY OF TOTAL PHENOLICS WITH H A C I D REAGENTS. [s. l.], 1985.
- SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; ROSA, M. Lamuela-Raventós. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. [s. l.], v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.
- SIVAKUMAR, S. et al. FT-IR study of green tea leaves and their diseases of Arunachal Pradesh, North East, India. [s. l.], v. 1, n. 3, p. 17–24, 2014.
- SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. [s.l: s.n.].

- SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutricao**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.
- SQUEO, Giacomo et al. Evaluation of total phenolic content in virgin olive oil using fluorescence excitation – emission spectroscopy coupled with chemometrics. [s. l.], n. October, 2018.
- TAYLOR, S. L.; HEFLE, S. L. **Chapter 16 - Naturally Occurring Toxicants in Foods**. Third Edition ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00016-4>>
- TANAKA, Takashi; KOUNO, Isao. Oxidation of tea catechins: Chemical structures and reaction mechanism. **Food Science and Technology Research**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 128–133, 2003.
- TAVARES, Katiany Mansur et al. Artigo. [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1164–1168, 2012.
- VIANA, Arivaldo Ribeiro et al. Cachaça de Alambique. Rio de Janeiro, p. 20, 2008.
- WANG, Jiahua et al. Enhanced cross-category models for predicting the total polyphenols, caffeine and free amino acids contents in Chinese tea using NIR spectroscopy. **Lwt**, [s. l.], v. 96, n. September 2017, p. 90–97, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.012>>
- WELLNER, N. Fourier transform infrared (FTIR) and Raman microscopy: principles and applications to food microstructures. In: **Food Microstructures**. [s.l.] : Elsevier, 2013. p. 163–191.
- WILLIAMS, R. Tecwyn; BRIDGES, J. Williams. Fluorescence of Solutions: a Review. **Journal of clinical pathology**, [s. l.], v. 17, p. 371–394, 1964.
- YUCESOY, Dila; OZEN, Banu. Authentication of a Turkish traditional aniseed flavoured distilled spirit, raki. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 141, n. 2, p. 1461–1465, 2013.
- ZACARONI, Lidiany Mendonça et al. Avaliação multivariada da composição fenólica de cachaças envelhecidas em diferentes barris de madeira Multivariate evaluation of the phenolic composition of cachaça aged in barrels made of different kinds of wood. [s. l.], p. 101–107, 2014.
- ZACARONI, M. L. et al. Caracterização e Quantificação de Contaminantes em Aguardentes de Cana. [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1307–1314, 2011.
- ZHAO, Jiewen et al. Automated tea quality classification by hyperspectral imaging. [s. l.], v. 48, n. 19, p. 3557–3564, 2009.

Apêndice

Apêndice I – Tabelas com modelos de tamanho 2,3,4 e 5 utilizando o ACO

Tabela 1: Métricas obtidas para os modelos do grupo SG1, baseados em espectroscopia por (A.) fluorescência e (B.) infravermelho.

A. <i>Espectroscopia por fluorescência</i>								
	Calibração			Validação		Teste		
	R ²	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	
		(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	
Tamanho modelo	2	0,988	887,15	7,31	49,38	6,15	17,66	7,07
	3	0,994	741,86	5,20	31,43	3,99	13,15	3,92
	4	0,996	126,48	4,40	16,78	2,30	4,35	2,55
	5	0,998	434,21	2,70	11,28	1,72	8,82	3,05
Pares selecionados Excitação/Emissão								
Tamanho modelo	2	Ex370/Em460	Ex470/Em560					
	3	Ex370/Em460	Ex440/Em540	Ex440/Em840				
	4	Ex350/Em540	Ex410/Em760	Ex460/Em660	Ex460/Em700			
	5	Ex350/Em620	Ex420/Em810	Ex470/Em560	Ex470/Em640	Ex470/Em800		
B. <i>Espectroscopia no infravermelho</i>								
	Calibração			Validação		Teste		
	R ²	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	
		(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	
Tamanho modelo	2	0,489	8,027	48,40	33,5	26,84	47,89	11,69
	3	0,624	5,318	41,50	34,7	6,40	69,52	22,21
	4	0,678	6,559	38,40	52,4	10,39	100,76	21,16
	5	0,656	6,693	39,72	17,8	8,96	86,17	17,71
Número de onda selecionados (cm⁻¹)								
Tamanho modelo	2	1980	1745					
	3	3899	2320	1743				
	4	3850	3680	1980	1578			
	5	3850	3594	1980	1739	1578		

Tabela 2: Métricas obtidas para os modelos do grupo SG2, baseados em espectroscopia por (A.) fluorescência e (B.) infravermelho.

A.		<i>Espectroscopia por fluorescência</i>						
		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE
		(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)
Tamanho modelo	2	0,994	6,8	10,13	4,62	7,49	2,48	4,66
	3	0,996	5,96	8,09	1,75	2,44	1,99	3,81
	4	0,998	3,39	5,57	1,4	3,53	2,52	4,08
	5	0,998	4,26	6,43	3,24	4,74	0,67	1,12
Pares selecionados Excitação/Emissão								
Tamanho modelo	2	Ex370/Em500	Ex480/Em570					
	3	Ex370/Em500	Ex480/Em570	Ex600/Em840				
	4	Ex370/Em510	Ex450/Em640	Ex480/Em570	Ex600/Em840			
	5	Ex370/Em480	Ex390/Em490	Ex440/Em570	Ex480/Em570	Ex510/Em750		
B.		<i>Espectroscopia no infravermelho</i>						
		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE
		(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)
Tamanho modelo	2	0,939	24,71	33,64	15,56	32,03	12,66	21,11
	3	0,981	12,5	18,93	13,87	24,35	12,16	28,07
	4	0,962	19,61	26,43	9,12	18,37	7,52	12,89
	5	0,967	17,19	24,55	4,64	6,57	4,08	9,07
Número de onda selecionados (cm⁻¹)								
Tamanho modelo	2	1759	1566					
	3	2019	1760	1563				
	4	3735	1804	1759	1563			
	5	3735	1905	1758	1566	1211		

Tabela 3: Métricas obtidas para os modelos do grupo SG3, baseados em espectroscopia por (A.) fluorescência e (B.) infravermelho.

A. Espectroscopia por fluorescência								
	Calibração			Validação		Teste		
	R²	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	
		(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	
Tamanho modelo	2	0,969	4,51	55,03	3,3	42,04	2,9	41,72
	3	0,986	2,91	36,75	0,89	13,78	3,5	45,99
	4	0,996	1,43	19,04	1,48	18,38	2,94	37,46
	5	0,997	1,33	18,08	0,58	7,37	3,13	41,82

Pares selecionados Excitação/Emissão		
Tamanho modelo	2	Ex370/Em450, Ex400/Em540
	3	Ex380/Em580, Ex480/Em770, Ex500/Em830
	4	Ex380/Em840, Ex390/Em560, Ex480/Em770, Ex490/Em740
	5	Ex380/Em840, Ex390/Em530, Ex400/Em710, Ex480/Em770, Ex490/Em740

B. Espectroscopia no infravermelho								
	Calibração			Validação		Teste		
	R²	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	
		(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	(%)	(mg GAEL ⁻¹)	
Tamanho modelo	2	0,835	9,95	123,68	7,09	106,84	10,41	219,78
	3	0,904	8,31	94,51	6,28	90,32	12,79	210,33
	4	0,941	5,19	73,77	6,76	96,95	13,51	214,35
	5	0,943	5,95	72,82	5,77	81,40	13,19	221,01

Número de onda selecionados (cm⁻¹)		
Tamanho modelo	2	2015 1789
	3	1966 1561 1075
	4	2279 1966 1827 1031
	5	2279 2131 1966 1561 1084

Tabela 4: Métricas obtidas para predição de compostos fenólicos totais em chás utilizando Espectroscopia por fluorescência.

<i>Espectroscopia por fluorescência</i>								
		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE (%)	RMSE (mg GAEg ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAEg ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAEg ⁻¹)
Tamanho modelo	2	0,88	11,85	12,65	10,05	13,93	10,20	11,01
	3	0,92	8,69	10,12	7,73	8,23	7,93	9,29
	4	0,94	7,89	8,59	6,27	7,61	3,50	5,82
	5	0,96	6,43	7,55	4,95	6,99	4,39	5,31
PLS VL=4		0,98	3,50	4,83	8,27	9,54	6,63	7,92
Pares selecionados Excitação/Emissão								
Tamanho modelo	2	Ex530/Em660 Ex530/Em770						
	3	Ex310/Em430	Ex350/Em480	Ex460/Em780				
	4	Ex300/Em440	Ex350/Em500	Ex350/Em630	Ex440/Em800			
	5	Ex310/Em420	Ex330/Em540	Ex350/Em480	Ex460/Em780	Ex530/Em660		

Tabela 5: Métricas obtidas para predição de compostos fenólicos totais em chás utilizando Espectroscopia no infravermelho médio (MIR).

<i>Espectroscopia no infravermelho médio(MIR)</i>								
		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE (%)	RMSE (mg GAEg ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAEg ⁻¹)	MAPE (%)	RMSE (mg GAEg ⁻¹)
Tamanho modelo	2	0,88	12,28	14,70	11,21	11,89	15,37	15,23
	3	0,97	6,19	7,08	10,35	11,33	17,92	18,52
	4	0,84	14,00	16,88	3,12	3,28	4,44	5,35
	5	0,96	7,08	8,41	4,25	4,38	7,74	8,38
PLS VL=3		0,90	11,90	13,37	34,21	36,28	14,37	15,03
Número de onda selecionados (cm ⁻¹)								
Tamanho modelo	2	1413 1363						
	3	2153	1410	1335				
	4	2662	2265	1335	1192			
	5	2642	2364	1463	1410	1335		

Tabela 6: Métricas obtidas para predição de compostos fenólicos totais em chás utilizando Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR).

<i>Espectroscopia no infravermelho próximo(NIR)</i>								
		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE
			(%)	(mg GAEg ⁻¹)	(%)	(mg GAEg ⁻¹)	(%)	(mg GAEg ⁻¹)
Tamanho modelo	2	0,92	11,98	11,96	10,71	12,17	23,07	22,90
	3	0,94	9,28	12,19	9,75	10,14	8,82	11,54
	4	0,88	14,47	9,88	8,67	14,38	2,96	4,62
	5	0,94	9,23	9,94	9,04	9,91	4,19	5,54
PLS VL=5		0,99	3,16	3,16	23,60	28,63	10,09	14,84
Número de onda selecionados (cm ⁻¹)								
Tamanho modelo	2	4644 4880						
	3	4664 4890 5134						
	4	4680 4806 5426 7240						
	5	4422 4644 4908 7240 7646						

Tabela 7: Métricas obtidas para predição de cafeína em chás utilizando Espectroscopia por fluorescência.

<i>Espectroscopia por fluorescência</i>								
		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE
			(%)	(mg g ⁻¹)	(%)	(mg g ⁻¹)	(%)	(mg g ⁻¹)
Tamanho modelo	2	0,88	10,08	2,03	10,37	2,72	13,65	2,81
	3	0,92	7,66	1,64	6,00	1,60	11,58	2,44
	4	0,96	6,38	1,19	3,50	0,88	3,34	0,90
	5	0,98	4,09	0,92	2,15	0,58	3,29	0,93
PLS VL=4		0,98	3,75	0,88	18,97	4,96	11,93	3,26
Pares selecionados Excitação/Emissão								
Tamanho modelo	2	Ex300/Em670 Ex310/Em790						
	3	Ex290/Em360 Ex300/Em760 Ex550/Em660						
	4	Ex360/Em700 Ex410/Em520 Ex570/Em650 Ex590/Em820						
	5	Ex290/Em380 Ex310/Em700 Ex310/Em800 Ex520/Em820						

Tabela 8: Métricas obtidas para predição de cafeína em chás utilizando Espectroscopia no infravermelho médio (MIR).

<i>Espectroscopia no infravermelho médio (MIR)</i>								
		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE
		(%)	(%)	(mg g ⁻¹)	(%)	(mg g ⁻¹)	(%)	(mg g ⁻¹)
Tamanho modelo	2	0,82	13,01	2,52	2,45	0,80	15,73	3,28
	3	0,87	11,57	2,10	6,69	1,87	5,44	1,38
	4	0,91	9,53	1,81	2,39	0,65	6,32	1,79
	5	0,92	8,16	1,67	2,26	0,58	5,29	1,69
	PLS VL=4		0,94	7,45	1,40	26,87	6,41	26,11
Número de onda selecionados (cm ⁻¹)								
Tamanho modelo	2	1834 1075						
	3	2962 1834 1075						
	4	2962 2509 1746 1054						
	5	2962 2457 1785 1128 1075						

Tabela 9: Métricas obtidas para predição de cafeína em chás utilizando Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR).

<i>Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)</i>								
		Calibração			Validação		Teste	
		R ²	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE	MAPE	RMSE
		(%)	(%)	(mg g ⁻¹)	(%)	(mg g ⁻¹)	(%)	(mg g ⁻¹)
Tamanho modelo	2	0,83	12,98	2,45	4,28	1,24	3,46	1,00
	3	0,84	12,52	2,36	4,65	1,24	1,63	0,36
	4	0,88	11,24	2,05	3,94	1,04	1,21	0,27
	5	0,89	9,85	1,92	2,88	0,76	1,16	0,26
	PLS VL=5		0,94	5,90	1,33	23,21	5,65	13,79
Número de onda selecionados (cm ⁻¹)								
Tamanho modelo	2	6406 6656						
	3	6390 6406 6656						
	4	6390 6408 6656 6658						
	5	6390 6408 6488 6656 6658						

Anexo

Anexo I – Fases do Algoritmo: Modelagem Quimiométrica com Componentes Espectrais Puros (PSCM).

O funcionamento do algoritmo pode ser dividido em quatro fases: A fase inicial do algoritmo é caracterizada pela inicialização das seguintes variáveis (RANZAN, 2014):

- a) Matrizes de dados, onde cada linha da matriz é referente à amostra e cada coluna é referente à intensidade de fluorescência dos pares de excitação/emissão ou à absorvância correspondente a determinado número de onda no caso dos espectros no infravermelho.
- b) Vetor coluna: corresponde aos valores observados para cada variável de interesse utilizando uma metodologia de referência.
- c) Dimensão do modelo (ω): número de variáveis que constituem o modelo.
- d) Tipo de modelo: é feita a escolha da metodologia que será utilizada no ajuste dos modelos, neste caso foi utilizado modelo linear.
- e) Métricas de otimização: a função objetivo implementada é baseada na minimização de algumas métricas. O ACO permite o uso das métricas Raiz quadrada do erro médio (RMSE) e Erro percentual Absoluto médio (MAPE).
- f) Número de formigas(N): número de modelos ajustados a cada iteração.
- g) Número de rodagens (σ): número de vezes que o algoritmo é iniciado como um todo.
- h) Número de iterações(t): número de vezes que a fase interna do algoritmo é repetida.
- i) Feromônio inicial ($\tau(0)$): valor inicial do índice de qualidade (feromônio) de cada variável, todos os elementos inicializam com a mesma quantidade de feromônio.
- j) FerroAdd: valor utilizado na atualização da trilha de feromônio que cada formiga realiza em suas variáveis selecionadas a cada iteração.
- k) Taxa de evaporação (ρ): Ao fim de cada fase interna todo o vetor de feromônio é multiplicado pela taxa de evaporação.

Definidos os parâmetros segue-se para a segunda fase do algoritmo. Nessa fase ocorre à inicialização do vetor solução onde é selecionado um conjunto de elementos de forma aleatória através da resolução da função objetivo.

De acordo com RANZAN (2014) a terceira fase é a essência do algoritmo. Cada formiga irá gerar um modelo, o melhor modelo naquela iteração é comparado com o melhor modelo global. Esse processo é repetido t vezes, obtendo como resultado o melhor modelo global da rodagem σ_i . Ao fim das rodagens, o melhor modelo global é selecionado. A seguir serão apresentadas as etapas da terceira fase.

- a) Seleção das variáveis: É realizada através da comparação de um valor obtido através de um “gatilho randômico” com a densidade de feromônio acumulada. Resumidamente o “gatilho randômico” é disparado e o seu valor é encontrado na curva de densidade acumulada de feromônios, a variável que estiver com um valor maior que o “gatilho” é selecionada, a mesma é retirada da lista de possibilidades e um novo “gatilho” é disparado. Esse processo é repetido até que número de variáveis (ω) escolhido na fase inicial do algoritmo tenha sido selecionado.
- b) Ajuste dos modelos: O ajuste dos modelos é realizado através do conjunto de dados de calibração. Neste caso o método linear foi utilizado.
- c) Qualidade preditiva do modelo: Com o modelo já calibrado é realizada a predição da variável de interesse para os grupos de calibração, validação e teste através das métricas: raiz quadrada do erro médio (RMSE), erro percentual absoluto médio (MAPE) e o coeficiente de determinação R^2 .
- d) Atualização da trilha de feromônio: Conforme a equação 1, para cada variável selecionada é adicionado uma quantidade de feromônio que é diretamente proporcional ao $FeroAdd$ estabelecido na fase inicial do algoritmo e inversamente proporcional a métrica de otimização utilizada.

$$\tau_{t+1} = \tau_t + \frac{FeroAdd}{f(Métrica_{cal})} \quad (1)$$

- e) Evaporação de feromônio: conforme a equação 2 os elementos que não foram selecionados ou que geraram modelos com grandes erros são penalizados.

$$\tau_{(t+n)} = \tau(t). (1 - \rho) \quad (2)$$

- f) Melhor formiga da iteração e melhor formiga global: Para a escolha da melhor formiga é utilizado um índice que leva em consideração as métricas do grupo de calibração e grupo de validação. Assim a formiga com o menor índice é escolhida como a melhor formiga daquela iteração. A melhor formiga daquela iteração é comparada com a melhor formiga global se o índice da formiga daquela iteração for menor, ela assume o lugar de nova formiga global.

Ao fim de todas as rodagens é apresentado o resultado do melhor modelo ajustado que corresponde ao modelo da melhor formiga global.