



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química – Departamento de Química Analítica

“Utilização de Métodos Quimiométricos em Cromatografia
Gasosa com Microextração em Fase Sólida”

Tese de Doutorado

Gilmare Antônia da Silva

Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

Co-Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto

Campinas, Julho de 2007.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Si38u **Silva, Gilmare Antônia da.**
Utilização de métodos quimiométricos em cromatografia
gasosa com microextração em fase sólida / Gilmare
Antônia da Silva. -- Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.

Co-orientador: Fabio Augusto.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Quimiometria. 2. Microextração em fase sólida. 3.
Cromatografia gasosa. I. Poppi, Ronei Jesus. II.
Augusto, Fabio. III. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. IV. Título.

Título em inglês: Utilization of chemometric methods in gas chromatography with solid phase microextraction

Palavras-chaves em inglês: Chemometrics, Solid phase microextraction, Gas chromatography

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Ronei Jesus Poppi (orientador), Profa. Adriana Vitorino Rossi (IQ-UNICAMP), Prof. José Alberto Fracassi da Silva (IQ-UNICAMP), Prof. Eduardo Carasek da Rocha (DQ-UFSC), Prof. Efraim Lázaro Reis (DQ-UFV)

Data de defesa: 31/07/2007

Aos meus preciosos pais, Maria Antônia e Gil (in memoriam),
e ao meu querido namorado Reinaldo Teófilo
cuja presença foi incontestavelmente fundamental para a realização deste trabalho.

***“Através da dúvida chegamos ao questionamento
e através do questionamento chegamos à verdade.”***

Pierre Abelárd, 1127

AGRADECIMENTOS

À Deus, por proporcionar mais esta realização.

Ao professor Ronei Jesus Poppi, pela confiança, orientação, paciência, amizade e todo o conhecimento transmitido.

Ao professor Fabio Augusto pela excelente parceria e contribuições.

À Universidade Estadual de Campinas, especialmente ao Instituto de Química - Departamento de Química Analítica, pela valiosa oportunidade concedida.

À minha família que sempre acreditou e incentivou todas as minhas decisões.

Aos amigos do grupo LAQQA pelos agradáveis momentos: Alessandra, Bruno, Danilo, Diórginis, Luiz Godoy, Luiz Pataca, Ingrid, Jez, Joana, Júlio, Luciana, Marcello, Patrícia, Paulo Henrique, Renato, Waldomiro, e às outras grandes amigadas de outros laboratórios: Alexandre Kirsten, Alexandre Lopes, Ana Lúcia, Ana Maria, Arnaldo, Carlos, Patrícia Donaire, Rafaela, Raquel, Renata e Rogério.

À Cláudia Kowalski pela amizade e preciosa parceria neste trabalho.

Ao técnico do Instituto de Química José Lara, pela amizade e importante auxílio nas análises por espectrometria de massas; além dos amigos muito especiais do Laboratório de Ensino do Instituto de Química – UNICAMP, Beth, Divino, Eraldo, Rosa e Moisés.

À Profa. Helena Bollini e aos técnicos e alunos do Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, pela oportunidade e suporte na realização das análises sensoriais.

A todos os provadores das análises sensoriais das amostras de cerveja.

Aos meus queridos amigos de São João Del Rei: Andréa Sacramento, Eni Guimarães, Inácio Neves, Karine Faêda, Mônica Costa e Raquel Rossetti.

Ao CNPq, pela bolsa e auxílios concedidos.

Enfim, meu agradecimento franco a todos os amigos, professores e funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, e a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho. Muito Obrigada!

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Agroquímica, com ênfase em Química Analítica e Ambiental

UFV - Universidade Federal de Viçosa - 02/2003

“Determinação potenciométrica simultânea de espécies aniônicas em águas naturais, empregando calibração multivariada, por treinamento de redes neurais artificiais”

Licenciatura Plena - Habilitação em Química

UFSJ – Universidade Federal de São João del Rei - 01/2001

Licenciatura Curta - Habilitação em Ciências e Matemática

UFSJ – Universidade Federal de São João del Rei - 01/1999

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

1. G.A. da Silva, F. Augusto, R.J. Poppi, “Exploratory analysis by Kohonen neural network of the volatile profile of Brazilian beers obtained by headspace solid phase microextraction and gas chromatography”. Submetido para o “*Journal of Agricultural and Food Chemistry*”.
2. J.S. Garcia, G.A. da Silva, M.A.Z. Arruda, R.J. Poppi, “Application of Kohonen neural network to exploratory analyses of synchrotron radiation x-ray fluorescence measurements of sunflower metalloproteins, *X-Ray Spectrom.*, 2007; 36 (2): 122–129.
3. C.H. Kowalski, G.A. da Silva, R.J. Poppi, H.T. Godoy, F. Augusto, “Neuro-genetic multioptimization of the determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography with electron capture detection”, *Anal. Chim. Acta*, 2007; 585 (1): 66-75.
4. G.A. da Silva, F. Augusto, R.J. Poppi, “Simultaneous optimization by neuro-genetic approach of a multiresidue method for determination of pesticides in *Passiflora alata* infuses using headspace solid phase microextraction and gas chromatography”, *J. Chromatogr. A*, 2007; 1138 (1-2): 251-261.
5. R.F. Teófilo, E.L. Reis, C. Reis, G.A. da Silva, L.T. Kubota, “Experimental design employed to square wave voltammetry response optimization for the glyphosate determination”, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2004; 15 (6): 865-871.

EVENTOS APRESENTADOS TRABALHOS – Últimos quatro anos

1. 30ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 05/06 de 2007, Águas de Lindóia/SP
2. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 04/2007, Águas de Lindóia/SP
3. 10º International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, 09/2006, Águas de Lindóia/SP
4. International Symposium on Chromatography, 08/2006, Copenhagen/Denmark
5. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 05/2006, Águas de Lindóia/SP
6. 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, 11/2005, Campinas/SP
7. 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 09/2005, Niterói/RJ (três trabalhos)
8. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 05/2005, Poços de Caldas/MG (dois trabalhos)
9. 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 05/06 de 2004, Salvador/BA
10. 8º International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers, 02/2004, Brugge/Belgium
11. 3ª Escola de Verão em Quimiometria (PUC-Rio), 02/2004, Rio de Janeiro/RJ

ATIVIDADES ACADÊMICAS

Programas de Atividade Docente

1. Programa de Estágio à Docência (PED) – Departamento de Química Analítica/Instituto de Química/UNICAMP – 2º semestre/2006
2. Monitoria de Química Geral II (Físico-Química II) – Departamento de Química/UFSJ - 2º semestre/2000
3. Monitoria de Química Orgânica e Biológica III – Departamento de Química/UFSJ - 2º semestre/2000
4. Monitoria de Química I – Departamento de Química/UFSJ - 1º semestre/2000
5. Monitoria em Química II – Departamento de Química/UFSJ - 2º semestre/1999

Pesquisas Científicas

1. Iniciação Científica não remunerada: "Estabilidade do Mn(III) durante a Formação do MnO₂ Coloidal em Meio de H₂SO₄"/UFSJ - 03/09 de 2000
2. Iniciação Científica: "Dinâmica populacional de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae)"/UFSJ - 04/1997 a 03/1998 – bolsa FAPEMIG

Cursos (mais relevantes)

1. "Basic Chemometrics", 8h, 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, 09/2006
2. "Introduction to Data Mining and a Case Study in Bioinformatics", 4h, 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, 09/2006
3. "Técnicas de Extração e Pré-Concentração para Análises Cromatográficas", 8h, 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, em 11/2005
4. "Gerenciamento de Resíduos Químicos em Laboratórios", 6h, 13º Encontro Nacional de Química Analítica/1º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, em 09/2005
5. "Uso da Calibração Multivariada em Química", 10h, 3ª Escola de Verão em Quimiometria – PUC/Rio, em 02/2004
6. "Análise Exploratória de Dados Químicos", 10h, 3ª Escola de Verão em Quimiometria - PUC/Rio, em 02/2004
7. "Cristalografia", 15h, Universidade Federal de Minas Gerais, 09/2000
8. "Introdução ao FORTRAN", 20h, Universidade Federal de São João del Rei – UFSJ, em 09/10 de 1999
9. "Introdução ao MATLAB", 16 h, Universidade Federal de São João del Rei – UFSJ, 09/10 de 1999
10. "Os Fundamentos da Análise Térmica e suas Aplicações", 16h, Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria - ABRATEC, em 09/1999

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

1. Estágio Supervisionado em Laboratório Químico Industrial da Companhia Industrial Fluminense (CIF) – Indústria Metalúrgica - São João del Rei/MG – 09/1998 a 02/1999

OUTRAS EXPERIÊNCIAS

1. Representante discente suplente na Coordenadoria de Pós-Graduação do Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)/SP, 10/2003 a 09/2004
2. Curso de Inglês - Cultura Inglesa – São João del Rei/MG - 03/1993 a 12/2000
3. Integrante da comissão organizadora do XIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – MG - UFSJ, São João del Rei/MG, 11/1999

RESUMO

UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EM CROMATOGRAFIA GASOSA COM MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A proposta deste trabalho foi explorar a utilização da cromatografia gasosa com a etapa prévia de preparação da amostra através da microextração em fase sólida em diferentes matrizes, potencializando, inovando e viabilizando essas aplicações através de metodologias de quimiometria, especialmente aquelas que envolvem técnicas de inteligência artificial. Foi realizada a otimização simultânea da determinação de cinco pesticidas em infusos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá doce) através de abordagem neuro-genética, ou seja, utilização de algoritmo genético para a otimização da rede neural modelada. Foram obtidos para duas fibras de extração (PDMS/PVA e PDMS 30 μM) os valores dos parâmetros de extração, respectivamente: 67 e 77 % para diluição do chá, 65,5 e 65,0 $^{\circ}\text{C}$ para temperatura de extração, 50 e 39 minutos para tempo de extração e 0,36 g mL^{-1} de concentração de NaCl para ambas as fibras. A abordagem neuro-genética foi também utilizada para a otimização simultânea da determinação de 12 bifenilas policloradas em leite materno. O algoritmo genético forneceu as melhores condições de extração como concentração de NaCl de 0,36 g mL^{-1} , temperatura de extração de 95,0 $^{\circ}\text{C}$, tempo de extração de 60 minutos e adição de 210 μL de metanol. Utilizando cerveja como matriz foi realizado um estudo exploratório de 20 marcas comerciais brasileiras de cerveja em lata através da rede neural de Kohonen. Foi possível visualizar a formação de seis grupos e os espectros de massas permitiram identificar os compostos voláteis responsáveis pelas similaridades e diferenças entre as cervejas, através da análise da fração volátil, utilizando uma fibra PDMS/DVB. Por fim, trinta e duas marcas comerciais de cervejas em garrafa, sendo 31 nacionais e uma estrangeira, foram avaliadas sensorialmente através da Análise Descritiva Quantitativa para os atributos amargor e sabor do grão; e correlacionados os resultados sensoriais com as respostas cromatográficas das cervejas através da utilização de algoritmo genético para a seleção das variáveis (compostos identificados pelos espectros de massas) diretamente relacionadas com os parâmetros de qualidade estudados.

ABSTRACT

UTILIZATION OF CHEMOMETRIC METHODS IN GAS CHROMATOGRAPHY WITH SOLID PHASE MICROEXTRACTION

The purpose of this work was to explore the utilization of gas chromatography with the previous stage of sample preparation through solid phase microextraction in different matrices, innovating and becoming feasible these applications using chemometric methodologies, specially the ones that involve artificial intelligence technique. It was realized the simultaneous optimization for the determination of five pesticides in infuses of *Passiflora alata* Dryander through the neuron-genetic approach, in other words, through the utilization of genetic algorithm to the optimization of the neural network model. It was obtained for two extraction fibers (PDMS/PVA and PDMS 30 μm) the following parameter values, respectively: 67 and 77 % for the tea dilution, 65,5 and 65,0 $^{\circ}\text{C}$ for the extraction temperature, 50 and 39 minutes for the extraction time and 0,36 g mL^{-1} for the NaCl concentration to both fibers. The neuron-genetic approach was also utilized to the simultaneous optimization of the determination of 12 polychlorinated biphenyls in human milk. The genetic algorithm provided the optimized extraction conditions as: NaCl concentration of 0,36 g mL^{-1} , extraction temperature of 95,0 $^{\circ}\text{C}$, extraction time of 60 minutes and addition of 210 μL of methanol. By using beer as sample, it was realized an exploratory study of 20 commercial Brazilian beer labels stored in can, through the Kohonen neural network. It was possible to visualize the formation of six sets and through the mass spectra it was identified the volatile compounds responsible for the similarities and differences among the beer samples, through the fraction volatile analysis, utilizing a PDMS/DVB fiber. Finally, 32 commercial beer labels stored in glass bottles, among these 31 were national and one was international, were evaluated in a sensorial way through the Quantitative Descriptive Analysis to the bitterness and grain taste attributes and it was correlated the sensorial results with the chromatographic data of the beer samples by the utilization of genetic algorithm to the selection of the compounds (identified by the mass spectra) directly correlated with the quality parameters studied.

Lista de Siglas

ADQ – Análise descritiva quantitativa

AE – α -endosulfan

ANN – Rede neural artificial

BE – β -endosulfan

BRANN – Rede neural artificial com regularização Bayesiana

C_{MeOH} – Concentração de metanol

C_{NaCl} – Concentração de NaCl

CT – Clorotalonil

D – Diluição

GA – Algoritmo genético

GC – Cromatografia gasosa

GC-ECD – Cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons

GC-FID – Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

M - Malation

MLR – Regressão Linear Múltipla

MP – Paration metílico

P30 – Fibra comercial de polidimetilsiloxano

PCB – Bifenila policlorada

PLS – Regressão por quadrados mínimos parciais

PDMS - Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno

PDMS/PVA – Polidimetilsiloxano/álcool polivinílico

RMSE – Erro quadrático médio

RMSECV – Erro quadrático médio de validação cruzada

POLYPLS – Regressão por quadrados mínimos parciais polinomial

T – Temperatura

t – tempo

VL – Variáveis latentes

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Designação da matriz Doehlert para as quatro variáveis estudadas.....	36
Tabela 2 - Coeficientes do modelo da matriz Doehlert utilizando a fibra extratora PDMS/PVA para cada pesticida.	42
Tabela 3 - Coeficientes do modelo da matriz Doehlert utilizando a fibra extratora P30 para cada pesticida.	43
Tabela 4 - Avaliação da regressão (Regr.) e da falta de ajuste (F. Aj.) para os modelos individuais dos pesticidas, ao nível de significância de 0,05, utilizando a fibra extratora PDMS/PVA.	45
Tabela 5 - Avaliação da regressão (Regr.) e da falta de ajuste (F. Aj.) para os modelos individuais dos pesticidas, ao nível de significância de 0,05, utilizando a fibra extratora P30.	45
Tabela 6 – Condições experimentais otimizadas pela abordagem neuro-genética.....	53
Tabela 7 - Designação da matriz Doehlert para as quatro variáveis HS-SPME estudadas.	59
Tabela 8 – Coeficientes polinomiais das superfícies de resposta para os PCB individuais determinados por MLR.	64
Tabela 9 - Avaliação da regressão e da falta de ajuste para os modelos individuais dos PCB, ao nível de significância de 0,05.	66
Tabela 10. Composição química típica de cervejas.	87
Tabela 11. Informações comerciais das cervejas em lata estudadas.....	90
Tabela 12. Compostos identificados pelos espectros de massa das cervejas.	98
Tabela 13. Valores médios atribuídos ao parâmetro de qualidade amargor resultante da ADQ.....	128
Tabela 14. Valores médios atribuídos ao parâmetro de qualidade sabor do grão resultante da ADQ.....	129

Tabela 15. Variáveis selecionadas pelo algoritmo GA para o atributo amargor, com os respectivos compostos identificados, os valores de RMSECV e o número de variáveis latentes utilizadas pelo modelo.....	130
Tabela 16. Valores dos coeficientes de correlação entre as variáveis (Var) selecionadas pelo algoritmo genético para o atributo amargor.	133
Tabela 17. Variáveis selecionadas pelo algoritmo GA para o atributo sabor do grão, com os respectivos compostos identificados, os valores de RMSECV e o número de variáveis latentes utilizadas pelo modelo.	135
Tabela 18. Valores dos coeficientes de correlação entre as variáveis (Var) selecionadas pelo algoritmo genético para o atributo sabor do grão.	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Modalidades de extração por microextração em fase sólida. (a) Extração a uma altura pré-definida da solução (<i>headspace</i> -SPME); (b) Extração direta por SPME.	6
Figura 2 – Representação de um neurônio biológico.	18
Figura 3 – Representação de uma unidade de processamento artificial (percéptron)...	18
Figura 4 – Representação típica de rede neural artificial MLP.	19
Figura 5 – Elementos do algoritmo genético.	24
Figura 6. Esquema dos cruzamentos único e duplo pelo GA.	26
Figura 7 – Principais etapas do algoritmo genético básico. (a) Criação aleatória de uma população inicial de indivíduos (cromossomos); (b) e (c) Avaliação da aptidão de cada indivíduo na população e manutenção do melhor indivíduo; (d) Operador genético seleção; (e) Operador genético cruzamento; (f) Operador genético mutação; e (g) Combinação das populações.	27
Figura 8 – Fórmulas estruturais dos pesticidas. (a) Clorotalonil; (b) Paration metílico; (c) Malation; (d) Endosulfan.	34
Figura 9 – Estrutura da rede neural artificial com o número de neurônios na camada de entrada e na camada de saída utilizados neste trabalho.	38
Figura 10 – Codificação hipotética de cada variável experimental no algoritmo genético.	39
Figura 11 – Áreas dos pesticidas clorotalonil (CT), paration metílico (MP), malation (M), α -endosulfan (AE), β -endosulfan (BE), para as extrações com a fibra PDMS/PVA e PDMS comercial (P30), para os diferentes ensaios experimentais.	40
Figura 12 – Gráficos dos valores de área medidos contra os valores de área estimados pelos modelos individuais dos pesticidas clorotalonil (CT), paration metílico (MP), malation (M), α -endosulfan (AE) e β -endosulfan (BE), obtidos do planejamento Doehlert, ao nível de significância de 0,05. As extrações foram realizadas com a fibra PDMS/PVA.	47

Figura 13 – Gráficos dos valores de área medidos contra os valores de área estimados pelos modelos individuais dos pesticidas clorotalonil (CT), paration metílico (MP), malation (M), α -endosulfan (AE) e β -endosulfan (BE), obtidos do planejamento Doehlert, ao nível de significância de 0,05. As extrações foram realizadas com a fibra comercial PDMS (P30).	48
Figura 14 – Valores de RMSE para os modelos BRANN, MLR e POLYPLS para os dados obtidos das extrações com as fibras (a) PDMS/PVA e (b) P30.	50
Figura 15 – Gráfico dos resíduos para os pesticidas CT, MP, M, AE e BE do modelo BRANN otimizado usando a fibra PDMS/PVA.....	51
Figura 16 – Gráfico dos resíduos para os pesticidas CT, MP, M, AE e BE do modelo BRANN otimizado usando a fibra P30.....	52
Figura 17 – Cromatogramas de extração por HS-SPME de infusos de <i>Passiflora alata</i> Dryander com a fibra PDMS/PVA: (a) Cromatograma obtido após tratamento neuro-genético; (b) Ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a região experimental ótima, com $D = 30 \%$, $T = 65 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 35 \text{ min}$, e $C_{\text{NaCl}} = 0,36 \text{ g mL}^{-1}$; e (c) Ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a pior região experimental, com $D = 30 \%$, $T = 75 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 30 \text{ min}$, e $C_{\text{NaCl}} = 0 \text{ g mL}^{-1}$. Cromatogramas de extração por HS-SPME de infusos de <i>Passiflora alata</i> Dryander com a fibra P30: (d) Cromatograma obtido após tratamento neuro-genético; (e) ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a região experimental ótima, com $D = 70 \%$, $T = 65 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 35 \text{ min}$ e $C_{\text{NaCl}} = 0,36 \text{ g mL}^{-1}$; e (f) Ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a pior região experimental, com $D = 30 \%$, $T = 75 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 30 \text{ min}$, e $C_{\text{NaCl}} = 0 \text{ g mL}^{-1}$	55
Figura 18: Estrutura geral de uma bifenila policlorada.	56
Figura 19 – Estrutura da rede neural artificial com o número de neurônios na camada de entrada e na camada de saída utilizados neste estudo.....	61
Figura 20 – Codificação hipotética de cada variável experimental no algoritmo genético.	62

Figura 21. Valores de RMSE para cada PCB estudado, obtidos durante o processo de treinamento da rede neural com 15 neurônios.	69
Figura 22. Resíduos obtidos para os PCB estudados da rede BRANN otimizada.	70
Figura 23. Cromatogramas obtidos da matriz láctea dopada com 9,25 mg L ⁻¹ de cada PCB. (a) Cromatograma obtido após o tratamento dos dados com abordagem neuro-genética; (b) Ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a região experimental ótima, com C _{NaCl} = 0,09 g mL ⁻¹ , T = 95 °C, t = 70 min e C _{MeOH} = 50 µL mL ⁻¹ ; (c) Ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a pior região experimental, com C _{NaCl} = 0,18 g mL ⁻¹ , T = 70 °C, t = 70 min e C _{MeOH} = 50 µL mL ⁻¹	72
Figura 24. Arquitetura típica da rede neural de Kohonen.	82
Figura 25. Função de vizinhança gaussiana.	85
Figura 26. Cromatogramas obtidos de quatro marcas comerciais de cervejas brasileiras, C03, C04, C08 e C18, acondicionadas em lata de alumínio, por HS-SPME-GC-FID (ver Tabela 11).	94
Figura 27. Perfil de distribuição das amostras após tratamento com a rede neural de Kohonen.	95
Figura 28. Mapas de distribuição individual das variáveis (tempos de retenção - t _R) utilizadas no tratamento pela rede de Kohonen. O índice numérico de t _R indica o pico que foi usado.	96
Figura 29. Codificação de um sinal cromatográfico na forma de um cromossomo. Cada valor de tempo de retenção (ou pico cromatográfico) corresponde a um gene do cromossomo.	117
Figura 30. Ficha utilizada durante a realização do treinamento e da Análise Descritiva Quantitativa pelos provadores, para os atributos sensoriais das cervejas amargor e sabor do grão.	124

Figura 31. (a) Gráfico dos valores obtidos pela ADQ (valores medidos) e os valores estimados pelo modelo para o parâmetro amargor. (b) Gráfico dos resíduos para o parâmetro amargor..... 132

Figura 32. Gráfico da relação entre os valores de amargor obtidos pela ADQ e pelo método-padrão. 134

Figura 33. (a) Gráfico dos valores obtidos pela ADQ (valores medidos) e os valores estimados pelo modelo para o parâmetro sabor do grão. (b) Gráfico dos resíduos para o parâmetro sabor do grão. 137

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CONSIDERAÇÕES GERAIS	2
CROMATOGRAFIA GASOSA E MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	3
QUIMIOMETRIA EM CROMATOGRAFIA GASOSA E MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	8
OBJETIVOS	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO 1.....	15
1. OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA ATRAVÉS DE ABORDAGEM NEURO-GENÉTICA	16
1.1 ABORDAGEM NEURO-GENÉTICA.....	17
1.1.1 REDE NEURAL ARTIFICIAL	17
1.1.2 ALGORITMO GENÉTICO.....	23
1.1.3 PROCEDIMENTO NEURO-GENÉTICO	28
1.2 QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS	29
1.3 MATRIZ DOEHLERT.....	30
1.4 OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM INFUSOS DE MARACUJÁ DOCE POR HS-SPME-GC-ECD....	31
1.4.1 PARTE EXPERIMENTAL	33
1.4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
1.4.2.1 Regressão Linear Múltipla.....	40
1.4.2.2 Aplicação do Método dos Mínimos Quadrados Parciais, Redes Neurais Artificiais e Algoritmo Genético.....	49
1.5 OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DA DETERMINAÇÃO DE BIFENILAS POLICLORADAS EM LEITE POR HS-SPME-GC-ECD	56
1.5.1 PARTE EXPERIMENTAL	57
1.5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
1.5.2.1 Regressão Linear Múltipla.....	63
1.5.2.2 Aplicação da Abordagem Neuro-Genética	68
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

CAPÍTULO 2.....	79
2. ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO PERFIL VOLÁTIL DE CERVEJAS BRASILEIRAS EM LATA EMPREGANDO REDE NEURAL DE KOHONEN	80
2.1 REDE NEURAL DE KOHONEN.....	81
2.2 CERVEJA.....	86
2.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	89
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CAPÍTULO 3.....	113
3. ESTUDO CROMATOGRÁFICO, SENSORIAL E QUIMIOMÉTRICO DE CERVEJAS COMERCIAIS EM GARRAFA.....	114
3.1 SELEÇÃO DE VARIÁVEIS POR ALGORITMO GENÉTICO.....	115
3.2 ANÁLISE SENSORIAL.....	120
3.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	122
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
CONCLUSÕES	143
PERSPECTIVAS FUTURAS	147

INTRODUÇÃO

CONSIDERAÇÕES GERAIS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

CROMATOGRAFIA GASOSA E MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A cromatografia é um procedimento analítico bem estabelecido com uma história de uso de várias décadas. Constitui um método que vem sendo continuamente aperfeiçoada através de suas novas variantes e modificações dos procedimentos (1-2).

Uma definição geral estabelecida por um comitê especial da União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC), considera a cromatografia como "... um método, usado primariamente para a separação dos componentes de uma amostra, no qual os componentes são distribuídos entre duas fases, sendo uma delas estacionária, enquanto a outra se move. A fase estacionária pode ser um sólido, um líquido sobre um suporte, ou um gel. A fase estacionária pode ser acondicionada em uma coluna, espalhada como uma camada, ou distribuída como um filme ... A fase móvel pode ser gasosa ou líquida" (3).

A maioria das operações químicas, incluindo as análises químicas, envolve a separação de misturas em seus componentes individuais (4). O processo de análise fica simplificado e agilizado se os componentes do material a ser analisado puderem ser separados em frações ou isolados individualmente (5). Até a metade do século 20, as separações analíticas eram feitas conforme métodos clássicos, como a filtração, precipitação, destilação e extração (6). Nos últimos tempos, a eletroforese, juntamente, e principalmente, com a cromatografia, constituem uns dos procedimentos mais importantes da classe dos métodos de separação. O objetivo dos métodos de retenção diferenciada é separar os componentes de uma mistura fazendo com que estes se movam para diferentes regiões (4).

É fácil constatar que a cromatografia constitui um grupo diversificado e importante de métodos aplicáveis a todos os ramos da ciência. Suas aplicações surgiram de modo acentuado aproximadamente nos últimos cinquenta anos e isto se deve à incontestável e permanente necessidade do desenvolvimento de novas metodologias de análise, mais rápidas e confiáveis, que resultem em métodos mais robustos de caracterização de misturas complexas, com procedências distintas.

Fundamentada em aspectos tais como a utilização de uma fase móvel baseada em um fluxo de gás inerte e a potencialidade da análise de compostos voláteis e semivoláteis, a cromatografia gasosa (Gas Chromatography - GC), é uma modalidade da cromatografia que encontra uso intensivo, principalmente devido aos conseqüentes desenvolvimentos tecnológicos. É possível assim apontar uma poderosa técnica de separação que permite a detecção de analitos puros (7). Em outros termos, a GC prepara de forma muito eficiente os compostos para identificação e quantificação (8). Os recentes avanços na área, com a utilização de colunas capilares, fazem da cromatografia gasosa uma técnica altamente atrativa e atualmente utilizada em larga escala (4-5,9).

A GC constitui uma técnica bastante utilizada na pesquisa de compostos de uso agrônômico, farmacêutico, contaminantes ambientais, entre outros, podendo ser utilizados vários tipos de detectores seletivos ou universais, tais como o detector por captura de elétrons (Electron Capture Detector - ECD), o detector de massas (Mass Spectrometer - MS), o detector por ionização em chama (Flame Ionization Detector - FID), entre outros (10).

A constante de distribuição dos compostos por GC é determinada pela temperatura da coluna cromatográfica e pela extensão das interações intermoleculares entre o analito e a fase estacionária imóvel sólida ou líquida, já que a fase móvel gasosa é responsável apenas pelo transporte do analito através da coluna, não participando do mecanismo de retenção (11).

A qualidade de um método analítico está sujeita à qualidade de suas etapas, levando-se em consideração seus erros experimentais. Faz-se então imprescindível obter uma fração representativa da amostra, onde haja condições de identificar e quantificar os analitos, que presumivelmente definem a amostra. É conveniente que estas frações não tenham ou gerem interferências, além de incompatibilidades com os equipamentos analíticos. São assim empregados procedimentos de preparo de amostras, onde se procura isolar e concentrar os analitos, como também obter um nível de limpeza que não comprometa a análise química (8).

A cromatografia gasosa como técnica analítica depende da qualidade da etapa de preparo da amostra, pois quase nenhuma amostra pode ser diretamente injetada num

cromatógrafo a gás. Portanto, a viabilização da análise por GC fica sujeita a um método adequado de preparação de amostra (8). Um destes métodos é a microextração em fase sólida, (Solid Phase Microextraction - SPME), que apresenta vantagens como o não uso de solventes, tem alto poder de concentração, é aplicável a muitos tipos de analitos e facilita o transporte do material extraído para o cromatógrafo (12). Assim, a SPME combina a extração, pré-concentração e introdução da amostra em uma única etapa.

A SPME foi apresentada por Arthur e Pawliszyn em 1990 (13) constituindo uma microtécnica em que os processos de extração e pré-concentração de analitos ocorrem em escalas dimensionais bastante reduzidas. É um método utilizado para a preparação de amostras contendo compostos voláteis e semi-voláteis, polares e não polares, em várias matrizes (14). O dispositivo básico para SPME consiste de um bastão de fibra ótica de sílica fundida com uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero (material sorvente) (8). Para segurança da fibra, o sistema é montado em um dispositivo semelhante a uma seringa, conhecido como aplicador ou *holder*. O material sorvente da fibra pode ser exposto diretamente na solução ou acima da solução a uma altura pré-definida, o que é denominado *headspace*-SPME (HS-SPME), e os compostos voláteis são então sorvidos (Figura 1). O tipo de sorção depende do material constituinte da fibra, que é determinado pela natureza química dos analitos. A seleção da fibra é baseada primeiramente na polaridade e volatilidade dos compostos alvo, a fim de alcançar seletividade e eficiência de extração (15-17).

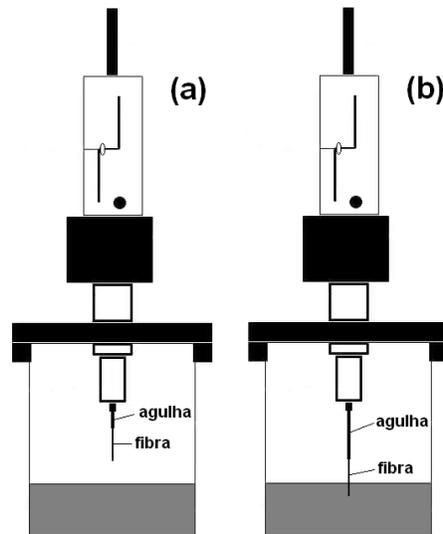


Figura 1- Modalidades de extração por microextração em fase sólida. (a) Extração a uma altura pré-definida da solução (*headspace*-SPME); (b) Extração direta por SPME.

A SPME direta apresenta grande sensibilidade analítica, pois apresenta contato direto da fibra com os analitos na amostra. No entanto, ela é indicada para a análise de matrizes aquosas isentas de materiais particulados ou componentes que possam contaminar/deteriorar a fibra e/ou impedir a subsequente análise por GC (8). A HS-SPME é especialmente indicada para analitos de média e alta volatilidade, apresentando como principais vantagens a maior preservação da integridade da fibra devido ao fato da fibra não entrar em contato com a matriz da amostra, e diminuição da ocorrência de *carryover*, ou seja, diminuição da ocorrência de analitos não completamente desorvidos (ainda sorvidos na fibra) que provavelmente produzirão falsos sinais em análises subsequentes (8,18), embora o efeito de *carryover* possa ser também pronunciado no modo HS-SPME já que a extração dos compostos depende da intensidade da interação analito-fibra. Em ambas as modalidades, uma agitação eficiente propicia alcance rápido da condição de equilíbrio entre a matriz e o polímero, diminuindo o tempo de extração.

Várias outras modalidades da microextração em fase sólida vêm sendo desenvolvidas e aplicadas, como a *in-tube* SPME, na qual a extração do analito é efetuada na superfície interna de uma coluna capilar de cromatografia gasosa, acoplada *on-line* com um sistema de cromatografia líquida (19).

A SPME é baseada na partição dos analitos entre a amostra e a fase estacionária polimérica. Em termos do mecanismo e princípios de extração, a principal diferença entre a SPME e as técnicas de extração convencionais é o fato da extração dos analitos não ser exaustiva (20-21). A cinética do processo de extração é governada pela difusão no meio e/ou recobrimento polimérico da fibra (20,22-23). As dinâmicas da absorção são descritas matematicamente pela Equação 1 (24):

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{(K_{fs} V_f + V_s)} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que n é o número de moles do analito absorvido pela fase estacionária; K_{fs} é o coeficiente de partição do analito entre as fases estacionária e da amostra, dado pela razão $K_{fs} = C_f/C_s$, onde C_f é a concentração do analito na fase estacionária e C_s é a concentração do analito na amostra, ambas concentrações na situação de equilíbrio; V_f e V_s são os volumes da fase estacionária e da amostra, respectivamente; e C_0 é a concentração inicial do analito na amostra. Quando $V_s \gg K_{fs} V_f$, a quantidade de analito extraída pela fase estacionária é independente de V_s e proporcional a K_{fs} e V_f . Esta relação é então descrita pela Equação 2 (24):

$$n = K_{fs} V_f C_0 \quad (\text{Equação 2})$$

A base quantitativa para a SPME é uma relação linear entre a concentração do analito na matriz e a quantidade de analito absorvida pela fibra. A quantidade de analitos extraídos aumenta com o aumento da razão volume da fibra/volume da amostra.

Diversas fases estacionárias poliméricas variando em espessura do filme e mistura de fases são comercialmente disponíveis. As fases estacionárias são imobilizadas nas fibras de sílica fundida através de mecanismos de adsorção, ligações químicas, ligações químicas parcialmente cruzadas, e ligações químicas altamente cruzadas. As fases não-ligadas e parcialmente cruzadas são mais estáveis em solvente orgânicos miscíveis em água do que em solventes não polares, enquanto as fases ligadas são estáveis em aproximadamente quase todos os sistemas, exceto para alguns solventes não-polares (19).

Inúmeros fatores podem influenciar a eficiência da SPME tornando sua avaliação indispensável durante o desenvolvimento do método. A microextração em fase sólida é otimizada pelo ajuste dos parâmetros que afetam a sorção ou dessorção do analito. Os parâmetros primários que influenciam a análise por SPME são o tipo de fibra, o tempo e temperatura de extração, a força iônica do meio, o valor do pH, o volume da amostra, e agitação do sistema. Em cromatografia gasosa, os analitos são dessorvidos termicamente no injetor do cromatógrafo, e a dessorção é uma função do tempo versus temperatura. De outro modo, em cromatografia líquida, a dessorção dos compostos é função do tipo de solvente versus volume ou do tipo de solvente versus tempo (19).

As características e a facilidade de uso têm tornado a SPME uma técnica de grande utilização, sendo muitas vezes escolhida em relação a técnicas tradicionais, como a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. Sua simplicidade tem atraído pesquisadores das mais diferentes áreas nas mais diversas aplicações. Em geral, as muitas vantagens para o preparo de amostra incluem a redução do tempo total de análise por amostra, menor manipulação/tratamento, eliminação de solventes orgânicos, perda reduzida de analito, simplicidade, baixo custo por amostra, possibilidade de implementação de procedimentos analíticos *on-line*, reuso da fibra, e manipulação de pequenos volumes de amostra (20, 25-27).

A cromatografia gasosa juntamente com a microextração em fase sólida vem experimentando crescente aplicação sob as mais diversas áreas como em análises ambientais, de alimentos, produtos naturais e farmacêuticos, entre outros. Sendo uma técnica relativamente nova (da década de 90), a SPME continua em consolidação, tanto sob o aspecto de fundamentação teórica quanto sob os de aplicações.

QUIMIOMETRIA EM CROMATOGRAFIA GASOSA E MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Com o intenso desenvolvimento das técnicas instrumentais e a disponibilidade de grande volume de dados, tornou-se necessário, e praticamente indispensável, o uso de tratamentos mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de se obterem respostas mais precisas e interpretações mais completas. A estatística univariada, isto é, quando apenas uma variável é medida sistematicamente para várias

amostras, se tornou limitada. Sistemas multivariados têm mostrado exercer grande interesse e aceitação, pois através dos mesmos podem-se medir muitas variáveis simultaneamente, sendo então necessários vários recursos matemáticos.

Foi então introduzida a análise multivariada na avaliação e interpretação de dados químicos, dando origem a uma nova área da Química denominada *Quimiometria*. De forma geral, a quimiometria pode ser definida como a parte da química que usa métodos matemáticos e estatísticos a fim de planejar ou selecionar procedimentos de medidas e experimentos otimizados, disponibilizando ferramentas para o processamento dos dados químicos estudados, a fim de se obter o máximo de informação química. A notação quimiometria foi introduzida pelo sueco Svante Wold e pelo americano Bruce R. Kowalski em 1972 (28). O modelo estatístico dos métodos multivariados considera a correlação entre as amostras, entre as variáveis, e entre amostras e variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade muito maior de informação.

Desde então, vários procedimentos quimiométricos têm sido propostos para os mais diversos fins, como a otimização de experimentos, classificação e calibração de dados, análise exploratória, seleção de variáveis, entre outros.

A quimiometria em conjunto com SPME e GC tem sido aplicada em diversos estudos envolvendo suco de maçã (29), óleo de oliva (30-31), café (32), compostos voláteis de pele humana (33), vinhos (34), voláteis de selênio orgânico (35), estanho orgânico (36), fenóis (37), pesticidas organoclorados (38), vinagre (39-40), pimenta (41), contaminação por bactéria (42), presunto (43-44), emissões de aterros sanitários (45), perfil aromático de planta (46), óleos de plantas (47), entre diversos outros.

A quimiometria tem se mostrado bastante útil, senão indispensável, em questões envolvendo determinações cromatográficas tais como: a indisponibilidade da utilização do tempo de retenção como parâmetro instrumental devido às variações inerentes a cada processo de análise; a impossibilidade de modelamento do sistema devido a relações não-lineares; a dificuldade de classificação baseada nos perfis cromatográficos; a otimização dos parâmetros instrumentais cromatográficos e da SPME; a análise exploratória através do reconhecimento de padrões; entre muitos outros.

OBJETIVOS

Visto o potencial da contribuição do uso dos métodos quimiométricos na interpretação e realização de pesquisas em procedimentos cromatográficos, este trabalho teve por objetivo a utilização de ferramentas quimiométricas de otimização, calibração e modelamento de dados, análise exploratória e seleção de variáveis em quatro aplicações de cromatografia gasosa, enfatizando o uso da preparação das amostras através da microextração em fase sólida.

Neste trabalho foram utilizados procedimentos quimiométricos para otimização simultânea da extração de pesticidas organoclorados e organofosforados de infusões de *Passiflora alata* Dryander (maracujá doce); e da extração simultânea de 12 bifenilas policloradas em matriz láctea. Em ambas as aplicações, as extrações foram realizadas por HS-SPME, com separação por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons. As respostas dos analitos foram modeladas através de redes neurais artificiais, sendo os modelos otimizados com o auxílio de algoritmo genético através de uma função de minimização de perda.

Em outra aplicação foi utilizada a rede neural de Kohonen para o estudo e interpretação de diversas amostras de cervejas comerciais brasileiras em lata, através das respostas cromatográficas obtidas por um detector de ionização de chamas, e do perfil espectral proveniente da detecção por espectrometria de massas. Várias inferências puderam ser estabelecidas acerca da composição, semelhanças e diferenças com base nos perfis cromatográficos dos compostos voláteis extraídos das cervejas.

Ainda enfocando a análise de cerveja foram obtidos os perfis cromatográficos e os perfis espectrais de várias amostras de cerveja em garrafa por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas para a posterior correlação com atributos sensoriais da cerveja, amargor e sabor do grão, identificados e quantificados por uma metodologia de análise sensorial denominada Análise Descritiva Quantitativa. Utilizando algoritmo genético foi possível encontrar, avaliando os perfis cromatográficos, os compostos diretamente relacionados aos parâmetros de qualidade estudados, e construir modelos de calibração simplificados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Robards, K.; Haddad, P. R.; Jackson, P. E. *Principles and practice of modern chromatographic methods*. 2 ed.; ACADEMIC PRESS INC: LONDON, 1997.
2. Eiceman, G. A.; Gardea-Torresdey, J.; Overton, E.; Carney, K.; Dorman, F. Gas chromatography. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2771-2780.
3. Heftmann, E. *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatographic and electrophoretic methods*. ELSEVIER INC: NEW YORK, 1983.
4. IUPAC Analytical Chemistry Division, Commission on Analytical Nomenclature. 1974.
5. Neto, F.; Nunes, D. *Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins*. INTERCIÊNCIA: RIO DE JANEIRO, 2003.
6. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. *Fundamentals of analytical chemistry*. 7 ed.; SAUNDERS COLLEGE PUBLISHING: ORLANDO, 1991.
7. Mc.Nair, H. M.; Miller, J. M. *Basic gas chromatography*. WILEY-V C H VERLAG GMBH: NEW YORK, 1977.
8. Valente, A. L. P.; Augusto, F. Microextração por fase sólida. *Quim. Nova* **2000**, 23, (4), 523-530.
9. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. EDITORA UNICAMP: CAMPINAS, 2006.
10. McCormack, A. J.; Tong, S. C.; Cooke, W. D. Sensitive selective gas chromatography detector based on emission spectrometry of organic compounds. *Anal. Chem.* **1965**, 37, (12), 1470-1476.
11. Abraham, M. H.; Poole, C. F.; Poole, S. K. Classification of stationary phases and other materials by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1999**, 842, (1-2), 79-114.
12. Pawliszyn, J. *Solid phase microextraction: Theory and practice*. WILEY-V C H VERLAG GMBH: NEW YORK, 1997.
13. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. *Anal. Chem.* **1990**, 62, (19), 2145-2148.
14. Matisová, E.; Medved'ová, M.; Vraniaková, J.; Simon, P. Optimisation of solid-phase microextraction of volatiles. *J. Chromatogr. A* **2002**, 960, 159-164.
15. Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectroc. Acta Pt. B-Atom. Spectr.* **2001**, 56, 233-260.

16. Jelen, H. H.; Wlazly, K.; Wasowicz, E.; Kaminski, E. Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: Comparison with static headspace method. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, (4), 1469-1473.
17. Grinberg, P.; Campos, R. C.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E. Solid phase microextraction capillary gas chromatography combined with furnace atomization plasma emission spectrometry for speciation of mercury in fish tissues. *Spectroc. Acta B* **2003**, 58, 427-441.
18. Aguilar, C.; Penalver, S.; Pocurull, E.; Borrull, F.; Marce, R. M. Solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection for the determination of pesticides in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* **1998**, 795, (1), 105-115.
19. Krutz, L. J.; Senseman, S. A.; Sciumbato, A. S. Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples. *J. Chromatogr. A* **2003**, 999, (1-2), 103-121.
20. Haberhauer-Troyer, C.; Rosenberg, E.; Grasserbauer, M. Evaluation of solid-phase microextraction for sampling of volatile organic sulfur compounds in air for subsequent gas chromatographic analysis with atomic emission detection. *J. Chromatogr. A* **1999**, 848, 305-315.
21. Crnoja, M.; Haberhauer-Troyer, C.; Rosenberg, E.; Grasserbauer, M. Determination of Sn- and Pb-organic compounds by solid-phase microextraction-gas chromatography-atomic emission detection (SPME-GC-AED) after in situ propylation with sodium tetrapropylborate. *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, 16, (10), 1160-1166.
22. Moens, L.; De Smaele, T.; Dams, R.; Den Broeck, P. V.; Sandra, P. Sensitive, simultaneous determination of organomercury, -lead, and -tin compounds with headspace solid phase microextraction capillary gas chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1604-1611.
23. De Smaele, T.; Moens, L.; Sandra, P.; Dams, R. Determination of organometallic compounds in surface water and sediment samples with SPME-CGC-ICPMS. *Mikrochim. Acta* **1999**, 130, 241-251.
24. Louch, D.; Motlagh, S.; Pawliszyn, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1187-1199.
25. Scarlata, C. J.; Ebeler, S. E. Headspace solid-phase microextraction for the analysis of dimethyl sulfide in beer. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, (7), 2505-2508.
26. Pinho, O.; Ferreira, I.; Ferreira, M. A. Solid-phase microextraction in combination with GC/MS for quantification of the major volatile free fatty acids in ewe cheese. *Anal. Chem.* **2002**, 74, (20), 5199-5204.

27. Penalver, A.; Pocurull, E.; Borrull, F.; Marce, R. M. Evaluation of parameters in solid-phase microextraction process. *Chromatographia* **1999**, 50, (11,12), 685-688.
28. Otto, M. *Chemometrics - Statistics and computer application in analytical chemistry*. WILEY-V C H VERLAG GMBH: WEINHEIM, 1999.
29. Reid, L. M.; O'Donnell, C. P.; Kelly, J. D.; Downey, G. Preliminary studies for the differentiation of apple juice samples by chemometric analysis of solid-phase microextraction-gas chromatographic data. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, (23), 6891-6896.
30. Berlioz, B.; Cordella, C.; Cavalli, J. F.; Lizzani-Cuvelier, L.; Loiseau, A. M.; Fernandez, X. Comparison of the amounts of volatile compounds in French protected designation of origin virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, (26), 10092-10101.
31. Cimato, A.; Dello Monaco, D.; Distante, C.; Epifani, M.; Siciliano, P.; Taurino, A. M.; Zuppa, M.; Sani, G. Analysis of single-cultivar extra virgin olive oils by means of an electronic nose and HS-SPME/GUMS methods. *Sens. Actuator B-Chem.* **2006**, 114, (2), 674-680.
32. Zambonin, C. G.; Balest, L.; De Benedetto, G. E.; Palmisano, F. Solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis for the characterization of roasted coffees. *Talanta* **2005**, 66, (1), 261-265.
33. Zhang, Z. M.; Cai, J. J.; Ruan, G. H.; Li, G. K. The study of fingerprint characteristics of the emanations from human arm skin using the original sampling system by SPME-GC/MS. *J. Chromatogr. B* **2005**, 822, (1-2), 244-252.
34. Garcia, D. D.; Reichenbacher, M.; Danzer, K.; Hurlbeck, C.; Bartzsch, C.; Feller, K. H. Use of solid-phase microextraction capillary gas chromatography (SPME-CGC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, 360, (7-8), 784-787.
35. Dietz, C.; Landaluze, J. S.; Ximenez-Embun, P.; Madrid-Albarran, Y.; Camara, C. Volatile organo-selenium speciation in biological matter by solid phase microextraction-moderate temperature multicapillary gas chromatography with microwave induced plasma atomic emission spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 501, (2), 157-167.
36. Aguerre, S.; Pecheyran, C.; Lespes, G. Validation, using a chemometric approach, of gas chromatography-inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (GC-ICP-AES) for organotin determination. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 376, (2), 226-235.
37. Mousavi, M.; Noroozian, E.; Jalali-Heravi, A.; Mollahosseini, A. Optimization of solid-phase microextraction of volatile phenols in water by a polyaniline-coated Pt-fiber using experimental design. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 581, 71-77.

38. Aguilar, C.; Penalver, A.; Pocerull, E.; Ferre, J.; Borrull, F.; Marce, R. M. Optimization of solid-phase microextraction conditions using a response surface methodology to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron-capture detection. *J. Chromatogr. A* **1999**, 844, (1-2), 425-432.
39. Mejias, R. C.; Marin, R. N.; Moreno, M. D.; Barroso, C. G. Optimisation of headspace solid-phase microextraction for analysis of aromatic compounds in vinegar. *J. Chromatogr. A* **2002**, 953, (1-2), 7-15.
40. Durante, C.; Cocchi, M.; Grandi, M.; Marchetti, A.; Bro, R. Application of N-PLS to gas chromatographic and sensory data of traditional balsamic vinegars of modena. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* **2006**, 83, (1), 54-65.
41. Sousa, E. T.; Rodrigues, F. D.; Martins, C. C.; de Oliveira, F. S.; Pereira, P.; de Andrade, J. B. Multivariate optimization and HS-SPME/GC-MS analysis of VOCs in red, yellow and purple varieties of *Capsicum chinense* sp peppers. *Microchem J.* **2006**, 82, (2), 142-149.
42. Siripatrawan, U.; Harte, B. R.; AF Siripatrawan, U.; Harte, B. R. Solid phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry integrated with chemometrics for detection of *Salmonella typhimurium* contamination in a packaged fresh vegetable. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 581, (1), 63-70.
43. Sanchez-Pena, C. M.; Luna, G.; Garcia-Gonzalez, D. L.; Aparicio, R. Characterization of French and Spanish dry-cured hams: influence of the volatiles from the muscles and the subcutaneous fat quantified by SPME-GC. *Meat Sci.* **2005**, 69, (4), 635-645.
44. Luna, G.; Aparicio, R.; Garcia-Gonzalez, D. L. A tentative characterization of white dry-cured hams from Teruel (Spain) by SPME-GC. *Food Chem.* **2006**, 97, (4), 621-630.
45. Davoli, E.; Gangai, M. L.; Morselli, L.; Tonelli, D. Characterisation of odorants emissions from landfills by SPME and GC/MS. *Chemosphere* **2003**, 51, (5), 357-368.
46. Zhang, Z. M.; Li, G. K.; AF Zhang, Z.-M.; Li, G. K. A preliminary study of plant aroma profile characteristics by a combination sampling method coupled with GC-MS. *Microchem J.* **2007**, 86, (1), 29-36.

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA ATRAVÉS DE ABORDAGEM NEURO-GENÉTICA

1. OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA ATRAVÉS DE ABORDAGEM NEURO-GENÉTICA

1.1 ABORDAGEM NEURO-GENÉTICA

1.1.1 REDE NEURAL ARTIFICIAL

Redes neurais artificiais (Artificial Neural Networks - ANN) originaram-se do campo da inteligência artificial. A motivação inicial para o desenvolvimento das redes foi tentar imitar algumas características únicas do cérebro humano, tais como a habilidade de aprendizagem de mecanismos gerais pela apresentação de um número reduzido de exemplos, ou de restaurar informações corretas de dados ausentes ou distorcidos (1). De forma geral, podemos definir as redes neurais artificiais como um conjunto de métodos matemáticos e algoritmos computacionais que têm a intenção de imitar o comportamento de uma rede neural biológica no que se refere à maneira de organização e processamento da informação (2). Assim, várias analogias podem ser feitas entre redes neurais biológicas e artificiais.

O sistema nervoso de um organismo inteligente é formado por um conjunto extremamente complexo de células, os neurônios. Eles têm um papel essencial na determinação do funcionamento e comportamento do corpo humano e do raciocínio. Um neurônio biológico (Figura 2) é formado pelos dendritos, que constituem um conjunto de terminais de entrada através dos quais as informações são introduzidas ao neurônio; pelo corpo central, onde ocorre o processamento dos dados; e pelos axônios, que são longos terminais de saída, que transmitem a informação para o neurônio consecutivo (3).

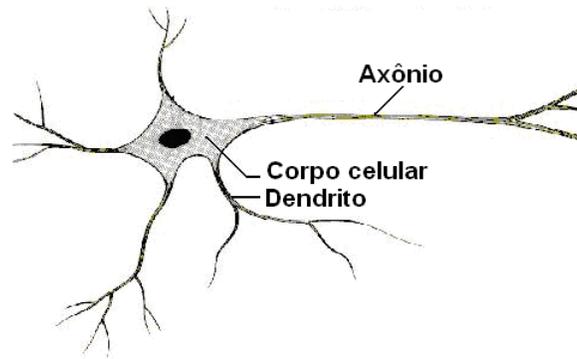


Figura 2 – Representação de um neurônio biológico.

De forma análoga, o neurônio artificial (percéptron) também possui terminais de entrada, centro de processamento de dados e terminais de saída (Figura 3).

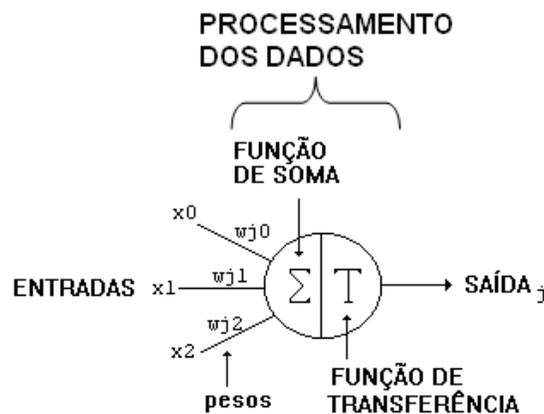


Figura 3 – Representação de uma unidade de processamento artificial (percéptron).

As redes neurais artificiais são constituídas por várias unidades de processamento. Uma rede com multicamadas de percéptrons (Multi-Layer Percéptrons - MLP) é constituída por um conjunto de neurônios artificiais interligados e distribuídos em camadas. Uma arquitetura típica de rede neural (Figura 4) é formada por uma camada de entrada, cujo número de neurônios corresponde ao número de variáveis de entrada, chamadas variáveis independentes ou descritores; uma camada intermediária, onde os dados são processados; e uma camada de saída, onde o número de neurônios depende da quantidade de respostas monitoradas, também chamadas variáveis dependentes (1,3).

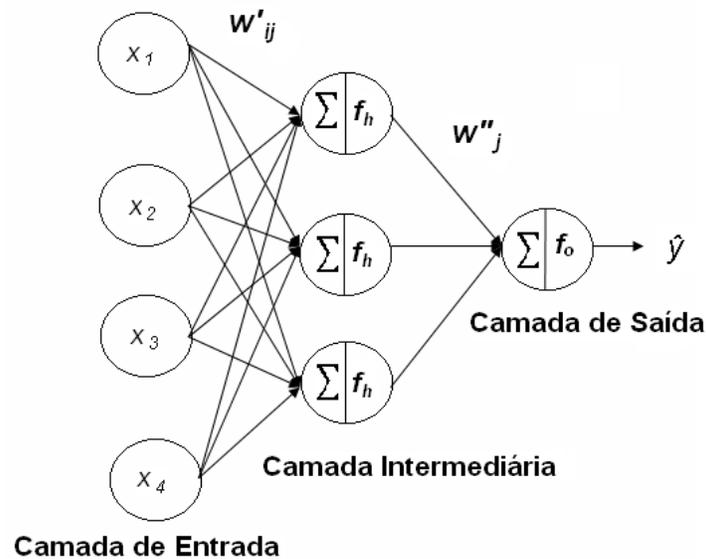


Figura 4 – Representação típica de rede neural artificial MLP.

As redes neurais permitem estimar as relações entre uma ou mais variáveis de entrada e uma ou muitas variáveis de saída. As variáveis de entrada estão relacionadas às medidas instrumentais e as variáveis de saída às propriedades de interesse monitoradas, sejam concentração ou alguma propriedade físico-química. A informação na rede neural é distribuída entre os neurônios e as conexões entre os neurônios (pesos). Os pesos são correspondentes às sinapses da rede neural biológica, que atuam como barreiras modeladoras dos sinais transmitidos de um neurônio pré-sináptico a um neurônio pós-sináptico. Assim, os pesos na rede neural artificial são também considerados como modeladores dos sinais, para um melhor ajuste dos mesmos. Esse ajuste corresponde a uma melhor relação entre os sinais de entrada e os valores de saída da rede (previstos pelo algoritmo).

A Figura 4 mostra quatro descritores (x_1, x_2, x_3 e x_4) apresentados à rede MLP através da camada de entrada. Essas variáveis independentes são ponderadas pelas conexões w'_{ij} entre os neurônios das camadas de entrada e intermediária. Os neurônios das camadas intermediárias recebem os sinais de entrada ponderados e executam duas tarefas, a soma desses sinais e a projeção dessa soma em uma função de transferência ou ativação f_h . A função de transferência é responsável pela transformação do sinal de entrada em sinal de saída. A função de transferência

envolvida depende da complexidade do sistema, podendo ser linear ou não-linear. Usualmente, utiliza-se uma função de transferência não-linear nos neurônios das camadas intermediárias e função de transferência linear nos neurônios da camada de saída. As funções de transferência não-lineares normalmente empregadas são a sigmoideal, hiperbólica ou tangente sigmoideal (4).

Como exemplificado na Figura 4, em seqüência à ativação dos neurônios intermediários, as respostas desses neurônios são ponderados pelas conexões, ou pesos, w''_j entre as camadas intermediárias e de saída e transmitidas para os neurônios da camada de saída. Similarmente aos neurônios da camada intermediária, os neurônios da camada de saída executam a soma dos sinais ponderados e projetam essa soma a uma função de transferência específica f_o . Na Figura 4, a resposta y é modelada e como só há uma resposta, há também somente um neurônio na camada de saída. A saída desse neurônio é a resposta estimada \hat{y} , que é expressa pela Equação 3.

$$\hat{y} = f_o \left[\theta'' + \sum_{j=1}^{nh} w''_j f_h \left(\sum_{i=1}^{nd} w'_{ij} x_i + \theta' \right) \right] \quad (\text{Equação 3})$$

Em que nd e nh são o número de variáveis de entrada e neurônios intermediários, respectivamente. Embora as redes neurais possam ser consideradas como ferramentas não-paramétricas, ou seja, métodos que não são baseados em uma suposição *a priori* de uma forma de modelo específico, os modelos gerados são definidos por conjuntos de parâmetros ajustáveis determinados pelo algoritmo. Esses parâmetros ajustáveis são os pesos w'_{ij} , w''_j , e os viés (*bias*) θ' e θ'' , que atuam como termos compensatórios que deslocam as funções de transferência, em outras palavras, constantes adicionadas para um melhor ajuste dos pesos. Esses parâmetros são determinados por um processo iterativo chamado treinamento ou aprendizagem. Os pesos e bias são designados inicialmente como valores aleatórios e então o processo de treinamento da rede se inicia.

O processo de treinamento da rede neural MLP usada neste trabalho constitui um procedimento de obtenção dos pesos e bias para cada conexão a fim de alcançar valores de saída da rede mais próximos possível dos valores reais apresentados à

rede. Primeiramente, um processo no sentido da camada de entrada para a camada de saída (*forward*) é executado através da rede com um conjunto de amostras de treinamento com resposta experimental y conhecida. No final desse processo, a magnitude do erro entre as respostas experimental e prevista pelo modelo é calculada (Equação 4) e usada para ajustar todos os pesos da rede, num processo de retropropagação dos erros (*backpropagation*) no sentido da camada de saída para a camada de entrada. Esses dois processos constituem uma iteração ou época. Em seguida, um novo processo *forward* é executado com as amostras de treinamento e os parâmetros otimizados da rede na iteração anterior. O procedimento inteiro é repetido até que a convergência seja alcançada. Isto significa que um baixo nível de erro pré-especificado ou aceitável seja alcançado, ou seja, que ocorra a minimização da função erro (E) dada pela Equação 4 (1,5).

$$E = \sum_{m=1}^p \sum_{k=1}^n (y_{m,k} - \hat{y}_{m,k})^2 \quad (\text{Equação 4})$$

O termo y é o alvo, ou valor verdadeiro; \hat{y} é o valor predito, ou saída da rede; n é o número de experimentos do conjunto de treinamento; e p é o número de variáveis dependentes, ou número de respostas a serem otimizadas.

O treinamento da rede neural consiste em um problema de otimização, onde se procura um mínimo da superfície de resposta da função erro, em um espaço multidimensional definido pelos parâmetros da rede ajustados. É aceitável que a rede não convirja para o mínimo global, mas que convirja para um local de mínimo relativamente próximo ao mínimo absoluto e aceitável para o problema considerado. O modelamento da rede é avaliado através do seu poder de previsão, com a apresentação de novos sinais de entrada sem a especificação dos valores de saída, previamente conhecidos pelo usuário, e a verificação do valor do erro gerado por esse conjunto de previsão.

Um dos problemas que podem ocorrer no processo de treinamento da rede é o chamado sobreajuste (*overfitting*), onde o erro no conjunto de treinamento é pequeno, mas quando novos dados são apresentados à rede, seu poder de previsão se mostra precário, com a geração de grandes valores de erro.

A quantidade de amostras disponíveis muitas vezes é um fator limitante no uso de redes neurais artificiais, já que o número de parâmetros ajustáveis é usualmente tal que o conjunto de treinamento se sobreajusta de maneira rápida se poucas amostras forem disponíveis para o processo de treinamento.

Um método para aperfeiçoar o processo de generalização, a fim de evitar o sobreajuste, sem o uso de grandes conjuntos de dados, é a regularização. Neste procedimento, uma modificação da função erro (Equação 4) é realizada pela adição de um termo que consiste da média da soma dos quadrados dos pesos da rede, como se segue na Equação 5:

$$F_{reg} = \gamma E + (1 - \gamma) msw \quad (\text{Equação 5})$$

Em que γ é a taxa do desempenho e msw é dado pela Equação 6:

$$msw = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n w_j^2 \quad (\text{Equação 6})$$

Pelo uso de F_{reg} ao invés de E como função erro no processo de treinamento da rede, os valores dos pesos e bias serão menores, fazendo com que a rede tenha menos tendência de sobreajuste. Um problema com a regularização é a complexidade da determinação dos melhores valores para a taxa do desempenho.

A abordagem Bayesiana (5-6) foi proposta para encontrar os parâmetros da rede constituindo a rede neural artificial com regularização Bayesiana (Bayesian Regularized Artificial Neural Network - BRANN) (7). Os métodos Bayesianos são complementares às redes neurais artificiais, pois adquirem a tendência de uma rede mais flexível para obter modelos com dados não-existentes ou excessivamente complexos, além de provarem possuir boas propriedades de generalização quando usadas no processo de treinamento de redes neurais artificiais, e serem indicadas e aplicadas àquelas situações em que se tem um número reduzido de amostras (7-8).

Diferente do método padrão de treinamento *backpropagation* onde um único conjunto de parâmetros é usado, a abordagem Bayesiana para o modelamento de rede neural artificial considera todos os possíveis valores dos parâmetros da rede ponderados pela probabilidade de ocorrência de cada conjunto de pesos. A inferência Bayesiana é usada para determinar a posterior distribuição de probabilidade dos pesos

e propriedades relacionadas a partir de uma distribuição de probabilidade inicial de acordo com atualizações proporcionadas pelo conjunto de treinamento \mathbf{X} , usando o modelo BRANN H_i (Equação 7). Enquanto a estatística ortodoxa fornece diversos modelos com diferentes critérios de decisão sobre qual é o melhor modelo, a estatística Bayesiana proporciona somente uma resposta para o problema proposto (7).

$$P(\mathbf{w}|\mathbf{X}, H_i) = \frac{P(\mathbf{X}|\mathbf{w}, H_i)P(\mathbf{w}|H_i)}{P(\mathbf{X}|H_i)} \quad (\text{Equação 7})$$

Os métodos Bayesianos podem otimizar simultaneamente as constantes de regularização nos modelamentos por redes neurais. Na literatura, os métodos Bayesianos são descritos como os melhores para encontrar e identificar os melhores modelos usando somente o conjunto de treinamento. Nenhum conjunto de validação ou teste se faz necessário de forma que todo o conjunto de dados disponível pode ser empregado no processo de treinamento da rede, dispensando, o muitas vezes laborioso, processo de validação. Esse fato deve somente ser especulado quando o conjunto de dados for muito pequeno. A não necessidade do conjunto teste para validação da rede vem do fato de que a estatística Bayesiana proporciona o máximo de generalização na estrutura da rede neural artificial treinada (6,9).

As redes neurais artificiais ganharam aceitação em inúmeras áreas da Química. Uma das principais características das redes é que estes métodos podem ser considerados como aproximadores universais; podem ajustar qualquer função contínua em um domínio compacto (um domínio definido por sinais de entrada com distribuição espacial limitada) com um pré-definido grau arbitrário de precisão, definido por um erro máximo de previsão da rede pré-estabelecido.

1.1.2 ALGORITMO GENÉTICO

Os algoritmos genéticos (Genetic Algorithms - GA) são algoritmos de busca estabelecidos sobre os princípios da evolução natural formulada por Charles Darwin. A seleção natural escolhe os melhores fenótipos (características comportamentais, fisiológicas e morfológicas), de acordo com as restrições ambientais e parâmetros evolutivos. Em sistemas biológicos reais, o ambiente está em constante mudança,

fazendo com que populações estejam em contínua evolução em direção a novos pontos de ótimo. Esses fenótipos estão relacionados à presença de genes específicos (genótipo) (10).

Algoritmos genéticos são considerados algoritmos de otimização globais, e a meta é a otimização de uma dada função de resposta. O GA é estruturado de modo que a informação relativa para um dado sistema seja codificada analogamente como um cromossomo biológico.

Em contraste com outros métodos, onde uma busca ponto-a-ponto é efetuada, o GA realiza uma busca paralela na superfície de resposta, conferindo-lhe maior robustez. Algoritmo genético tem sido usado na resolução de problemas complexos envolvendo funções objetivo problemáticas, tais como aquelas com deficiências na continuidade (11-12).

O algoritmo genético compreende um conjunto de elementos individuais. A esse conjunto dá-se o nome de população e os indivíduos nomeiam-se cromossomos. Os cromossomos são organizados em séries de genes, onde cada um representa uma variável específica a ser otimizada (10,13). A Figura 5 mostra a representação hipotética de 4 genes constituintes de um cromossomo, e uma população formada por três cromossomos. Os genes são codificados na forma de código binário (0,1), de acordo com o algoritmo matemático para otimização de sistemas complexos proposto por Holland (14-15).

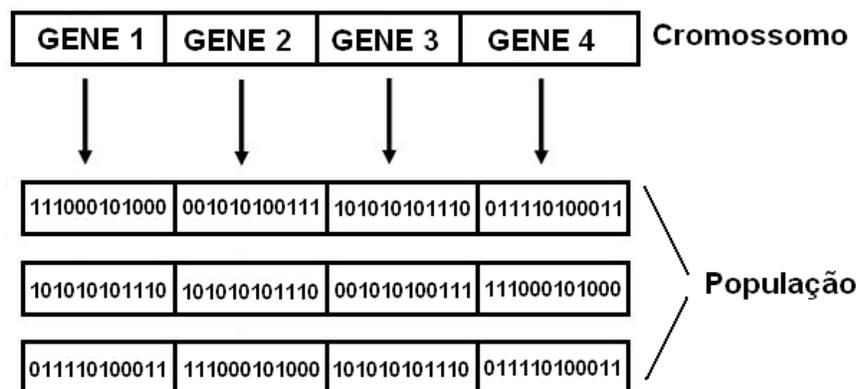


Figura 5 – Elementos do algoritmo genético.

Em um algoritmo genético, cada gene representa um valor ou variável a ser otimizada, como por exemplo, variáveis operacionais de determinada técnica.

De acordo com a teoria evolucionária, somente os elementos mais adaptados da população provavelmente sobreviverão e gerarão descendentes, transmitindo assim sua hereditariedade para as novas gerações (16). Esse comportamento é também visualizado nos algoritmos genéticos que tenderão a gerar indivíduos mais adaptados, de acordo com uma série de operadores inspirados biologicamente. Os operadores podem ser definidos como seleção, cruzamento e mutação.

A seleção é baseada na aptidão, isto é, quanto mais adaptado ou ajustado for um indivíduo, maior a chance de esse indivíduo ser selecionado para reprodução e contribuir com seus genes para a geração da prole na próxima geração.

O operador cruzamento considera dois cromossomos e troca parte de suas informações genéticas para produzir novos cromossomos. O cruzamento pode ser feito por um dos dois métodos: cruzamento único ou cruzamento duplo (Figura 6). Os genes brancos e com hachuras indicam os genes que foram trocados entre os indivíduos. No processo de cruzamento único os genes de dois indivíduos aleatórios A e B são separados em dois segmentos, em algum ponto aleatório do cromossomo. A primeira parte de um dos cromossomos é permutada com a primeira do outro cromossomo, e dois novos indivíduos C e D com genes híbridos são originados para a população. O cruzamento duplo por sua vez é muito similar ao cruzamento único, exceto que neste caso, dois pontos aleatórios de ruptura nos cromossomos E e F são selecionados e as porções médias são trocadas. A maior diferença prática é que o cruzamento duplo usualmente produz novos indivíduos G e H com características mais semelhantes aos cromossomos originais E e F. Especificamente, em termos de variáveis selecionadas, o cruzamento duplo tipicamente gera novos conjuntos com maior número de variáveis iguais a um dos cromossomos de origem, A ou B.

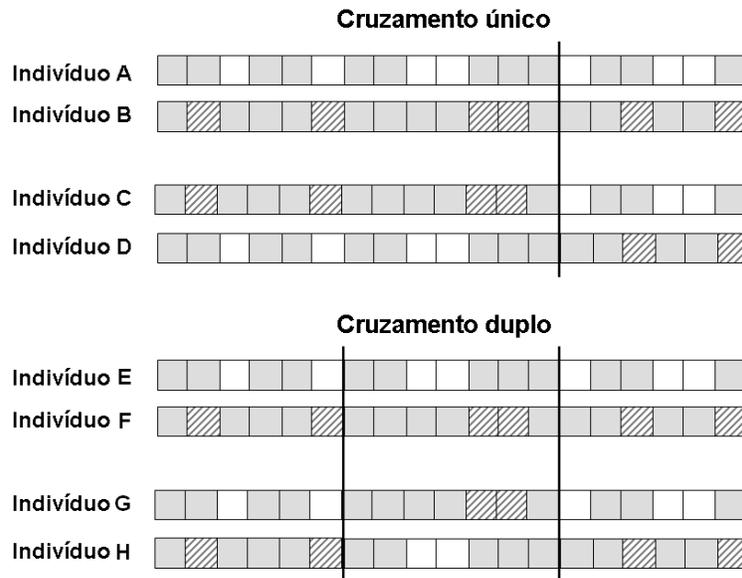


Figura 6. Esquema dos cruzamentos único e duplo pelo GA.

Após a adição dos novos indivíduos à população, todos os genes individuais têm a chance de sofrer mutação aleatória. A mutação é implementada pela alteração ocasional um gene randômico (alteração do código 0 para 1 e vice-versa) de um cromossomo, antes de uma determinada descendência ser inserida na nova população. Isto permite, para uma chance finita de adição ou remoção, o uso de variáveis que possam estar super- ou sub- representadas na população.

Podemos sumarizar a operação do algoritmo genético em um simples ciclo de três estágios:

1. A criação aleatória de uma população inicial de indivíduos (cromossomos) (Figura 7a).

2. A execução dos sub-passos seguintes de forma iterativa para cada geração até que a condições de término do processamento seja efetuada:

- 2.1 Avaliação da aptidão de cada indivíduo na população e manutenção do melhor indivíduo de todas as populações antecedentes (Figura 7b e 7c).

- 2.2 Criação de uma nova população pela aplicação dos operadores genéticos:

- 2.2.1 Seleção (Figura 7d);

- 2.2.2 Cruzamento (Figura 7e);

- 2.2.3 Mutação (Figura 7f).

2.3 Reposição da população em vigor pela nova população.

3. Saída do indivíduo com a melhor aptidão como solução ótima.

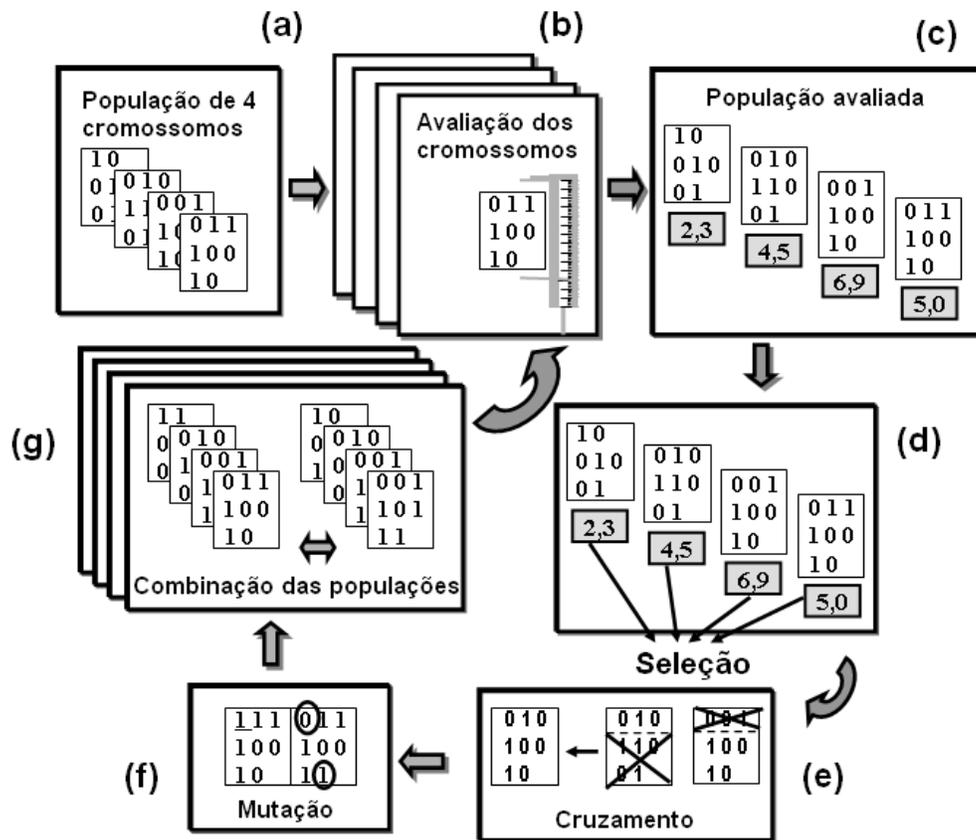


Figura 7 – Principais etapas do algoritmo genético básico. (a) Criação aleatória de uma população inicial de indivíduos (cromossomos); (b) e (c) Avaliação da aptidão de cada indivíduo na população e manutenção do melhor indivíduo; (d) Operador genético seleção; (e) Operador genético cruzamento; (f) Operador genético mutação; e (g) Combinação das populações.

O algoritmo genético pode ainda executar a combinação das populações para a escolha dos indivíduos mais adaptados (Figura 7g).

O GA tem se mostrado apto na resolução de problemas lineares e não-lineares pela exploração de todas as regiões do espaço experimental. O funcionamento dos algoritmos genéticos pode ser visualizado como uma combinação balanceada de investigação de novas regiões no espaço de busca e utilização de regiões já investigadas. Esse balanço, que criticamente controla a desempenho do algoritmo, é

determinado pela escolha certa dos parâmetros de controle, *i.e.*, as probabilidades de cruzamento e mutação e os tamanhos das populações. As questões que podem ser levantadas em relação aos parâmetros se referem ao:

1. Aumento da probabilidade de cruzamento aumenta a recombinação das estruturas, mas também aumenta a possibilidade de rompimento de boas seqüências de genes geradas.

2. Aumento na probabilidade de mutação tende a transformar a busca genética em uma busca aleatória, mas também ajuda a re-introduzir a perda de material genético.

3. Aumento do tamanho da população aumenta sua diversidade e reduz a probabilidade que o algoritmo prematuramente convirja a um ótimo local, mas também aumenta o tempo requerido para a população convergir para as regiões ótimas no espaço de busca.

Na Química tem-se observado uma acentuada tendência na aplicação de algoritmos genéticos em inúmeros problemas de otimização de sistemas complexos, principalmente devido à robustez e versatilidade do algoritmo (17-19).

1.1.3 PROCEDIMENTO NEURO-GENÉTICO

Desde que as redes neurais para calibração podem somente modelar o sistema e devido à sua característica de não apresentar modelos explícitos que relacionem as variáveis de entrada e as variáveis de saída, se faz necessário a utilização de outro algoritmo para se determinar as condições experimentais ótimas desejadas alvos do estudo. O algoritmo genético pode ser uma alternativa interessante para esse tipo de tarefa por suas propriedades. Como um método não-derivativo (menos sensível à presença de mínimos locais), o GA se torna especialmente adequado para essas situações, pois se apresenta mais robusto, por exemplo, quando comparado a outro método comum não-derivativo como o simplex (20) e providencia convergência mais rápida (21).

Algoritmos para otimização de funções são geralmente limitados a funções regulares convexas, entretanto, muitos modelos são descontínuos, multi-modos e não-diferenciáveis. O algoritmo genético tem se mostrado adequado para resolução de tais

funções devido à sua maneira de exploração de todas as regiões do espaço experimental, implementada pela utilização dos operadores genéticos.

O algoritmo genético pode definir as condições ideais (máximos ou mínimos) de um modelo desenvolvido pela rede neural, gerando uma abordagem híbrida denominada neuro-genética. Várias aplicações de sucesso podem ser encontradas na literatura (5,13,22-23).

1.2 QUADRADOS MÍNIMOS PARCIAIS

O método dos mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares - PLS) é um dos métodos de calibração multivariada mais utilizados em quimiometria, tornando-se uma ferramenta extremamente útil e importante em muitos campos da química, como a físico-química, a química analítica, a química medicinal, ambiental, e ainda, no controle de inúmeros processos industriais (24-25). É consideravelmente eficiente para lidar com ruídos experimentais, colinearidades e não-linearidades. Todas as variáveis são incluídas no modelo, o que implica que a calibração pode ser realizada de maneira eficiente mesmo na presença de interferentes, não havendo necessidade do conhecimento do número e natureza dos mesmos (25).

O PLS é uma técnica baseada em fatores, onde se deseja estabelecer uma relação entre duas matrizes de dados, \mathbf{X} (variáveis independentes – matriz de dados experimentais) e \mathbf{Y} (variáveis dependentes – matriz das respostas experimentais). As matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} são decompostas simultaneamente em uma soma de variáveis latentes (novos eixos de coordenadas) como se seguem nas Equações 8 e 9:

$$\mathbf{X} = \sum_{i=1}^f \mathbf{t}_i \mathbf{p}_i^t + \mathbf{E} \quad (\text{Equação 8})$$

$$\mathbf{Y} = \sum_{i=1}^f \mathbf{u}_i \mathbf{q}_i^t + \mathbf{F} \quad (\text{Equação 9})$$

Em que \mathbf{t} e \mathbf{u} são os escores de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente; \mathbf{p} e \mathbf{q} são os pesos de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente; e \mathbf{E} e \mathbf{F} são as matrizes de resíduos.

Uma relação linear entre \mathbf{t} e \mathbf{u} é estabelecida de acordo com a Equação 10.

$$u_f = b_f t_f + g_f \quad (\text{Equação 10})$$

Em que f é o número da variável latente e g é o resíduo.

Em situações onde os dados não apresentem correlação linear entre si é disponível uma variante do algoritmo PLS denominada POLYPLS (Polynomial PLS). No POLYPLS, a relação entre os escores da matriz \mathbf{X} de dados e da matriz \mathbf{Y} das respostas experimentais é dada por um polinômio de grau variável, como o polinômio quadrático descrito na Equação 11.

$$u_f = c_0 + c_1 t_f + c_2 t_f^2 + h_f \quad (\text{Equação 11})$$

Em que f é o número da variável latente e h é o resíduo. A abordagem polinomial permite proceder a correlação de \mathbf{X} e \mathbf{Y} para de um comportamento não-linear.

1.3 MATRIZ DOEHLERT

A matriz ou planejamento Doehlert descreve um domínio experimental esférico e uniforme no espaço envolvido. Os pontos da matriz Doehlert correspondem aos vértices de um hexágono gerado de um simplex regular e, em geral, o número total de pontos experimentais o planejamento é igual a k^2+k+pc , em que k é o número de fatores e pc é o número de experimentos no ponto central. Replicatas no ponto central devem ser realizadas a fim de validar o modelo pela estimativa da variância experimental. Embora suas matrizes não sejam ortogonais nem rotacionais, elas não apresentam divergências significativas que comprometam a qualidade necessária para seu efetivo uso.

No planejamento Doehlert o número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis. Por exemplo, em um planejamento Doehlert com duas variáveis, uma variável será estudada em 5 níveis enquanto a outra em 3. Esta propriedade permite a livre escolha de quais fatores serão avaliados em um número maior ou menor de níveis. Como regra geral é preferível escolher a(s) variável(is) com maior(es) efeito(s) para os níveis de maior magnitude, a fim de obter mais informação a cerca de suas variações no sistema.

Outra característica da matriz Doehlert, é que este tipo de planejamento necessita um número menor de experimentos em relação a outros planejamentos para construção

de superfície de resposta, o que o torna mais eficiente. A eficiência de um planejamento experimental é definida como o número de coeficientes do modelo estimado dividido pelo número de experimentos. O menor número de experimentos solicitados pelo planejamento Doehlert para se chegar à região ótima vem do fato de que o domínio da vizinhança é facilmente explorado pelo ajuste de poucos experimentos, já que o próximo hexágono utiliza pontos experimentais já explorados pelo hexágono anterior.

Cada planejamento Doehlert é definido considerando o número de variáveis e os valores codificados (x_i) da matriz experimental. A relação entre os valores codificados e os valores reais é dada pela Equação 12.

$$x_i = \left(\frac{z_i - z_i^0}{\Delta z_i} \right) \alpha \quad (\text{Equação 12})$$

Em que o x_i corresponde ao valor codificado para o nível do fator i ; z_i é o correspondente valor experimental; z_i^0 é o valor experimental no ponto central; Δz_i é a distância entre o valor experimental no ponto central e o valor experimental no nível superior ou inferior; e α é o maior valor limite codificado na matriz para cada fator (variável ou coluna). Para cada variável experimental ocorrerá um valor determinado valor de α , de acordo com o número de variáveis e dos níveis para cada variável do planejamento (26-27).

1.4 OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM INFUSOS DE MARACUJÁ DOCE POR HS-SPME-GC-ECD

O gênero *Passiflora*, compreendendo cerca de 500 espécies, é a mais ampla na família Passifloraceae (*Passion flower*) (28), originária da América do Sul (29). Passiflorae são muito populares não somente por causa de suas frutas, mas também porque algumas delas são utilizadas na medicina tradicional, principalmente contra ansiedade e insônia, bem como para o tratamento de nevralgia, convulsões, síndromes histéricas, taquicardia de origem psicológica, e asma (29-30).

A espécie oficial da farmacopéia brasileira é a *Passiflora alata* Dryander, conhecida como maracujá doce (31). No Brasil, o maracujá tem sido usado empregado como ansiolítico, sedativo, diurético e analgésico (32).

O uso de pesticidas é geralmente proibido na produção de plantas medicinais; entretanto, seus resíduos podem estar presentes nas folhas devido às aplicações em plantações de larga escala que demandam maior controle de pragas, e também pela aplicação em partes da planta, como nos frutos. Infusos de plantas medicinais são amostras complexas, que podem conter vários compostos endógenos extraídos das folhas pela água quente durante sua preparação. A quantidade de pesticidas transferidas das folhas para os infusos de *Passiflora alata* Dryander é em geral bastante baixa e depende da solubilidade dos compostos em água quente; assim, os infusos de *Passiflora alata* Dryander podem conter esses resíduos em concentrações que exijam procedimentos eficazes para determinação desses compostos, oferecendo consideráveis capacidades de concentração, alta seletividade e robustez (30).

Em um estudo realizado por Zuin et. al. (33) foi avaliada a extração de pesticidas organoclorados e organofosforados em infusos de várias espécies de *Passiflora*, entre estas *Passiflora alata* Dryander. Os autores procederam a tentativa de otimização das condições de extração por HS-SPME; no entanto, foi constatada a complexidade da relação entre os parâmetros de extração e a sorção dos pesticidas estudados, visto que nem o modelo linear e nem o quadrático foram capazes de descrever as relações entre os dados.

A fim de encontrar um modelo que relacionasse simultaneamente parâmetros de extração por HS-SPME e todas as áreas dos picos dos pesticidas organoclorados e organofosforados avaliados em infusos de *Passiflora alata* Dryander foi realizado o estudo descrito a seguir, em um método combinando *headspace* SPME, cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD) e quimiometria, através de abordagem neuro-genética.

Através das técnicas de SPME e cromatografia gasosa em combinação com procedimentos quimiométricos foi possível obter as propriedades de extração, separação e detecção desejadas de todos os compostos de interesse simultaneamente,

além do benefício da simplificação da etapa de preparação da amostra, economia de tempo, reagentes, e garantia da precisão dos resultados.

1.4.1 PARTE EXPERIMENTAL

Neste trabalho foram realizados dois procedimentos de otimização do uso de duas fibras para SPME com a finalidade de extrair resíduos de pesticidas organoclorados (OCP) e organofosforados (OPP) de infusos de folhas desidratadas de *Passiflora alata* Dryander (maracujá doce), através de metodologias quimiométricas de planejamento, modelamento e otimização dos resultados.

Uma das fibras avaliadas foi desenvolvida em laboratório, com espessura aproximada de 5 μm , e o material polimérico sorvente é o polidimetilsiloxano/álcool polivinílico (PDMS/PVA) (34). A outra consistia de uma fibra comercial revestida por polidimetilsiloxano com espessura de 30 μm (P30), fornecida pela Supelco (Bellefonte, PA, USA). Para uso, ambas as fibras foram encaixadas em *holders* apropriados (Supelco). Previamente às extrações, a fibra PDMS/PVA foi condicionada por aproximadamente 6 h a 280 °C, e a fibra P30 de acordo com as recomendações do fornecedor. Para todas as extrações, frascos de vidro de 16 mL tampados com septos de Teflon/silicone foram usados. Durante as extrações, a temperatura dos frascos foi controlada usando água aquecida circulante de um banho (Polystat, USA).

Todos os dados cromatográficos foram obtidos de um cromatógrafo a gás com detecção por captura de elétrons (Perkin-Elmer, Norwalk, CT), AutoSystemXL GC-ECD, acoplado com uma coluna HP-1 (100 % polidimetilsiloxano) 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm (Agilent, Wilmington, DE), e um *liner* adequado para SPME, sendo o injetor *split-splitless* operado no modo *splitless*. A programação linear de temperatura do forno foi de 140 °C (mantida por 1 min) até 200 °C (mantida por 2 min) a 8 °C/min, e então para 280 °C (mantida por 1 min) a 15 °C/min. As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas a 260 °C e 320 °C, respectivamente. Foi usado hélio como gás carreador (*UP grade*), a uma vazão de 1,3 mL min⁻¹.

Os pesticidas selecionados para este estudo são representativos dos compostos mais comuns encontrados em culturas de *Passiflora alata* Dryander no Brasil, apesar de não terem uso permitido (29). Os pesticidas foram: clorotalonil (CT),

paration metílico (MP), malation (M), α -endosulfan (AE) e β -endosulfan (BE) (Figura 8), listados de acordo com a ordem de eluição.

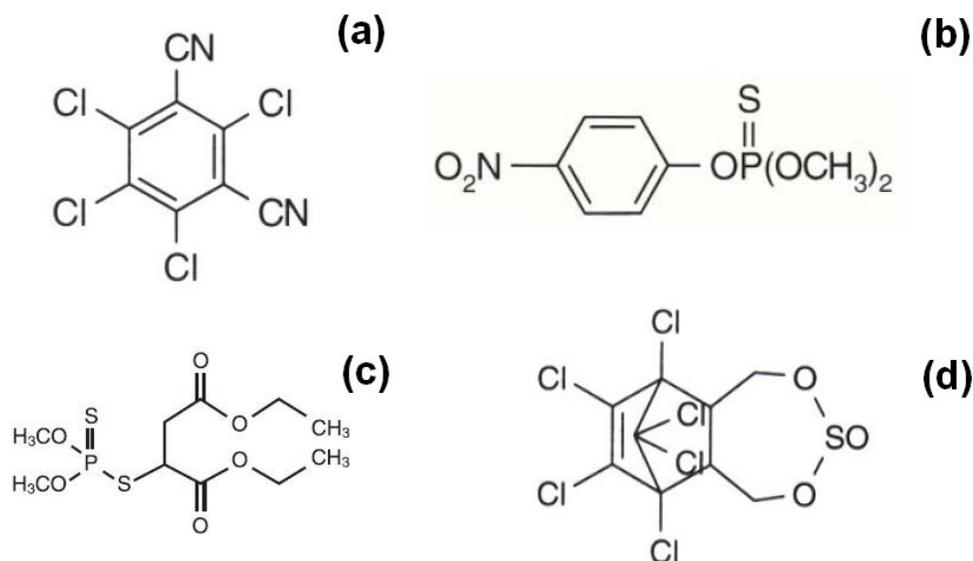


Figura 8 – Fórmulas estruturais dos pesticidas. (a) Clorotalonil; (b) Paration metílico; (c) Malation; (d) Endosulfan.

Soluções estoque individuais dos pesticidas a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ foram preparadas em metanol a partir de suas correspondentes substâncias puras ($\geq 99 \%$) (ChemService, Westchester, PA). A solução metanólica de trabalho com concentrações de cada analito (de $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ para endosulfan a 6 ng mL^{-1} para malation) foram usadas para dopar as amostras de infuso durante o desenvolvimento do trabalho.

As folhas de *Passiflora alata* Dryander foram obtidas de espécimes cultivadas nas cidades de Ribeirão Preto e Botucatu (São Paulo). O material foi seco a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, triturado, peneirado (1-2 mm) e estocado em frascos de vidro lacrados, protegidos de umidade, calor e luz. Os infusos foram preparados diariamente pela suspensão de $1,00 \pm 0,05 \text{ g}$ das folhas secas em 100 mL de água fervente por 5 min. Antes do uso, os infusos eram filtrados.

Para obtenção do conjunto experimental de amostras, os infusos de *Passiflora alata* Dryander eram adicionados de NaCl e seus volumes completados com soluções salinas de NaCl de acordo com as designações do planejamento ou matriz Doehlert (26-27), completando um volume final de 5 mL. Eram ainda acrescentadas

determinadas quantidades de soluções dos pesticidas para se obter as concentrações de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de CT, $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de MP, $3,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de M e $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ de AE e BE nas amostras dos infusos. Os pesticidas foram extraídos empregando-se a modalidade HS-SPME. Os parâmetros de extração HS-SPME alvos da otimização foram a diluição do chá (D), a temperatura de extração (T), o tempo de extração (t), e o efeito da força iônica expresso como concentração de NaCl adicionado (C_{NaCl}), variados novamente de acordo com o planejamento experimental Doehlert (Tabela 1). As alíquotas de 5 mL das amostras salinas diluídas dos infusos de *Passiflora alata* Dryander eram agitadas magneticamente (1200 rpm) antes de cada extração por 5 min para o equilíbrio amostra/*headspace*. Após o tempo de extração definido pela matriz Doehlert (Tabela 1), a fibra SPME (PDMS/PVA ou P30) era imediatamente exposta no injetor do cromatógrafo a $260 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para dessorção dos pesticidas. A fibra era mantida por 15 min no injetor para garantir a total dessorção e evitar efeito de memória.

Os níveis adotados pelo planejamento para cada ensaio experimental e os respectivos valores decodificados das variáveis experimentais de extração podem ser visualizados na Tabela 1. As repetições foram realizadas em torno do ponto central (Ensaio Experimental 1) num total de cinco.

Tabela 1 - Designação da matriz Doehlert para as quatro variáveis estudadas.

Ensaio Experimental	D	T	t	C _{NaCl}
1*	0 (50 %)	0 (60,0 °C)	0 (30 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
2	1 (90 %)	0(60,0 °C)	0 (30 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
3	0,5 (70 %)	0,866 (75,0 °C)	0 (30 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
4	0,5 (70 %)	0,289 (65,0 °C)	0,817 (50 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
5	0,5 (70 %)	0,289 (65,0 °C)	0,204 (35 min)	0,791 (0,36 g mL ⁻¹)
6	-1 (10 %)	0 (60,0 °C)	0 (30 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
7	-0,5 (30 %)	-0,866 (45,0 °C)	0 (30 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
8	-0,5 (30 %)	-0,289 (55 °C)	-0,817 (10 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
9	-0,5 (30 %)	-0,289 (55,0 °C)	-0,204 (25 min)	-0,791 (0 g mL ⁻¹)
10	0,5 (70 %)	-0,866 (45,0 °C)	0 (30 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
11	0,5 (70 %)	-0,289 (55,0 °C)	-0,817 (10 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
12	0,5 (70 %)	-0,289 (55,0 °C)	-0,204 (25 min)	-0,791 (0 g mL ⁻¹)
13	-0,5 (30 %)	0,866 (75,0 °C)	0 (30 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
14	0 (50 %)	0,577 (70,0 °C)	-0,817 (10 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
15	0 (50 %)	0,577 (70,0 °C)	-0,204 (25 min)	-0,791 (0 g mL ⁻¹)
16	-0,5 (30 %)	0,289 (65,0 °C)	0,817 (50 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
17	0 (50 %)	-0,577 (50,0°C)	0,817 (50 min)	0 (0,18 g mL ⁻¹)
18	0 (50 %)	0 (60,0 °C)	0,613 (45 min)	-0,791 (0 g mL ⁻¹)
19	-0,5 (30 %)	0,289 (65,0 °C)	0,204 (35 min)	0,791 (36 g mL ⁻¹)
20	0 (50 %)	-0,577 (50,0°C)	0,204 (35 min)	0,791 (36 g mL ⁻¹)
21	0 (50 %)	0 (60,0 °C)	-0,613 (15 min)	0,791 (36 g mL ⁻¹)

*Ponto central com cinco repetições.

Como pode ser notado pela Tabela 1, a matriz Doehlert é vantajosa, pois necessita de um número reduzido de experimentos, considerando o número de variáveis avaliadas, fazendo com que se torne mais eficiente quando comparada a

outros planejamentos experimentais para construção de superfície de resposta (26-27). As faixas de trabalho decodificadas abrangeram diluições da amostra de 10 % a 90 % (5 níveis); temperaturas de extração de 45 °C a 75 °C (7 níveis); tempos de extração de 10 min a 50 min (7 níveis); e adição de soluções salinas com concentrações de 0, 0,18 e 0,36 g mL⁻¹ (3 níveis) (Tabela 1). Essa é outra característica interessante da matriz Doehlert, a possibilidade de avaliação das variáveis em um número de níveis diferentes. Assim, as variáveis consideradas mais importantes, ou que se deseja obter maiores informações acerca de suas variações no espaço experimental estudado, podem ser avaliadas em um número maior de níveis.

As respostas cromatográficas foram dadas nos valores de área de pico cromatográfico, sendo posteriormente calculados os efeitos das variáveis e construídos os modelos de regressão linear múltipla (Multiple Linear Regression - MLR) individuais, ao nível de significância de 0,05, através de planilhas eletrônicas elaboradas no software Excel 2003 (27).

A fim de explorar a possibilidade de obtenção de um modelo único, que determinasse simultaneamente as concentrações trabalhadas dos pesticidas, foram utilizados algoritmos de calibração multivariada como o método dos quadrados mínimos parciais polinomial (24) e as redes neurais artificiais, especificamente, as redes com multi-camadas de percéptrons com regularização Bayesiana (7,35). Estes cálculos foram executados no *software* MatLab 6.5 (The MathWorks, Natick, MA), utilizando a rotina PLS do PLS Toolbox 3.5 (Eigenvector Technologies, Manson, WA) (36) e a rotina de redes neurais do Neural Network Toolbox 4.0 (The MathWorks) (35).

O POLYPLS foi aplicado variando o grau do polinômio de 2 a 4 e analisando os valores de previsão com 2, 3 e 4 variáveis latentes.

A rede BRANN foi aplicada nesse trabalho com função de transferência tangente-sigmoidal na camada intermediária e função linear na camada de saída; quatro neurônios na camada de entrada (correspondendo às quatro variáveis operacionais HS-SPME estudadas); e cinco neurônios na camada de saída, equivalentes aos cinco pesticidas estudados (Figura 9).

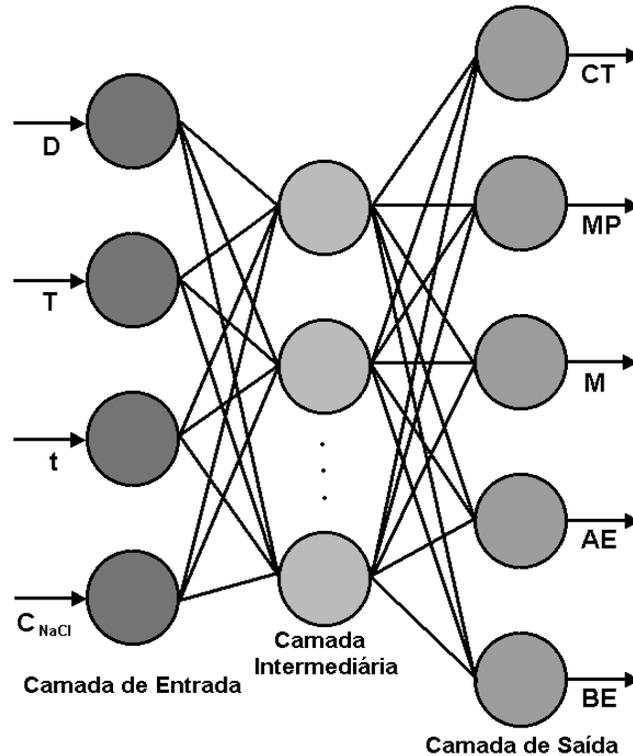


Figura 9 – Estrutura da rede neural artificial com o número de neurônios na camada de entrada e na camada de saída utilizados neste trabalho.

A otimização da arquitetura da rede Bayesiana foi efetuada variando-se o número de neurônios na camada intermediária de 1 a 10, e procedendo cinco replicatas para cada arquitetura de rede gerada.

Após o modelamento dos dados através da rede neural Bayesiana foi utilizada uma rotina de algoritmo genético, usando a implementação para algoritmo genético de Houck et al. (10,37), também executado no *software* MatLab 6.5, a fim de otimizar os parâmetros operacionais HS-SPME, através do procedimento neuro-genético.

Neste estudo, a rotina do GA utilizada demanda uma função a ser otimizada pelo algoritmo. Assim, foi aplicada uma função de minimização de perda (φ) (38-39), calculada pela soma dos desvios relativos ponderados, como apresentado na Equação 13.

$$\varphi = \sum_{i=1}^m w_i \left[\frac{Q(x_1, x_2, \dots, x_n) - Q^*}{Q^*} \right] \quad (\text{Equação 13})$$

Em que m é o número de objetivos, ou seja, o número de pesticidas; w_i é o fator peso, com $i = 1, 2, \dots, m$; $Q(x_1, x_2, \dots, x_n)$ é a função objetivo e n indica o número de variáveis independentes, ou seja, as variáveis experimentais HS-SPME; e Q^* é o valor ótimo individual da função objetivo, definido como a área máxima de pico possível para cada pesticida no sistema cromatográfico estudado.

O algoritmo genético irá encontrar os valores ótimos das condições experimentais através da minimização da função de perda φ . Essa metodologia culmina em um procedimento de otimização simultânea onde se tentou alcançar uma condição experimental na qual se observasse o máximo dos sinais cromatográficos dos pesticidas concomitantemente, sem comprometimento prático das condições experimentais de extração.

No GA, as variáveis operacionais (D , T , t , C_{NaCl}) foram codificadas a fim de que cada variável fosse apresentada como um gene em um número binário de 16 bits de resolução (Figura 10).

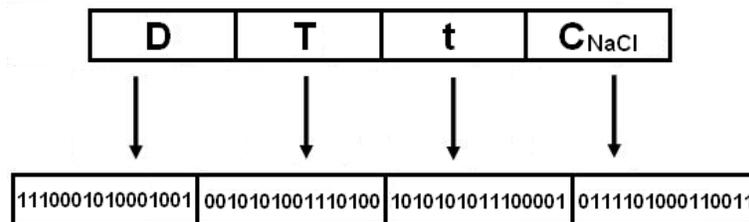


Figura 10 – Codificação hipotética de cada variável experimental no algoritmo genético.

A população no algoritmo genético foi de 100 indivíduos. Para a evolução, a probabilidade de dois cromossomos randômicos realizarem cruzamento foi de 90 % e a probabilidade de mutação foi 1 %. A evolução era continuada até que $\varphi \leq 10^{-3}$ ou alcançasse o número de 100 gerações.

Após a codificação dos parâmetros de entrada e definição dos parâmetros de controle, o algoritmo genético foi iniciado 10 vezes com diferentes populações iniciais, e as variáveis do cromossomo que geraram o menor valor da função de minimização de perda φ foram escolhidas.

1.4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.2.1 Regressão Linear Múltipla

As áreas dos picos dos pesticidas obtidas para cada fibra estão representadas na Figura 11.

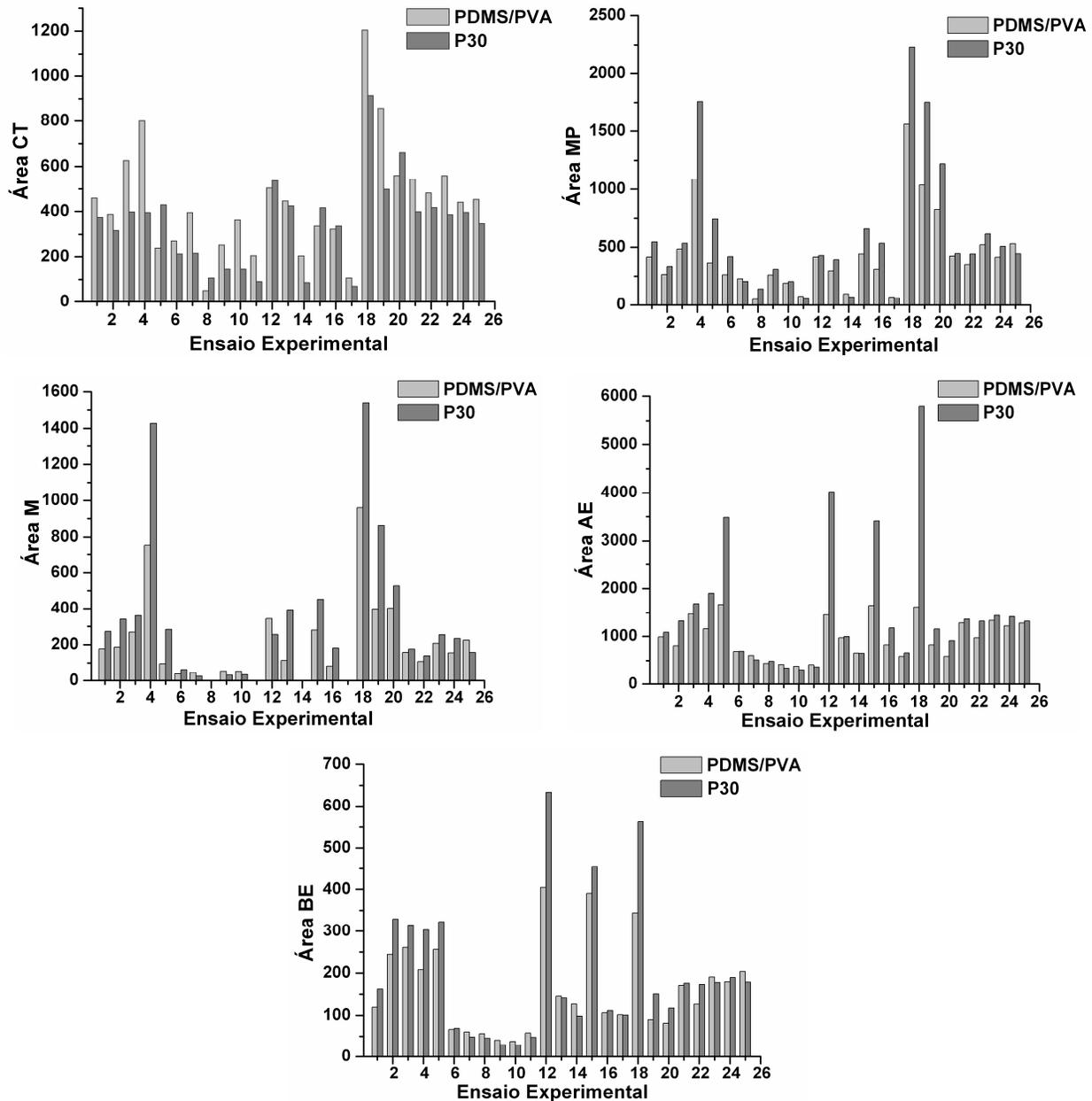


Figura 11 – Áreas dos pesticidas clorotalonil (CT), paration metílico (MP), malation (M), α -endossulfan (AE), β -endossulfan (BE), para as extrações com a fibra PDMS/PVA e PDMS comercial (P30), para os diferentes ensaios experimentais.

Na Figura 11 pode-se notar um comportamento bastante diferenciado em alguns ensaios experimentais, principalmente com maiores valores de área para os picos cujos pesticidas foram extraídos com a fibra PDMS comercial. Entretanto, na maioria dos casos, os resultados não se apresentaram tão díspares. Os pontos 21, 22, 23, 24 e 25 de todos os gráficos da Figura 11 representam as repetições obtidas para ambas as fibras na extração de todos os pesticidas. Pode-se notar razoável reprodutibilidade nos valores de áreas obtidos nas repetições.

A matriz Doehlert é um tipo de planejamento para a construção de superfícies de resposta que permite a obtenção de um modelo quadrático e a avaliação das variáveis selecionadas em um número diferente de níveis, como mostrado na Tabela 1. Para cada pesticida adicionado e considerando o tipo de fibra utilizada (PDMS/PVA ou P30) foi estabelecido um modelo de regressão clássico MLR (Equação 13), através da execução do planejamento Doehlert. Pela Equação 14 podem ser obtidos os valores das áreas de cada pesticida (z), correlacionados com as variáveis operacionais D , T , t e C_{NaCl} usando um polinômio quadrático. A Equação 14 mostra a forma genérica do modelo de regressão, sendo que para a obtenção do valor de área para cada pesticida devem ser considerados somente os efeitos significativos.

$$\begin{aligned}
 z = & b_0 + b_1D + b_2T + b_3t + b_4C_{NaCl} + b_{11}D^2 + b_{22}T^2 \\
 & + b_{33}t^2 + b_{44}C_{NaCl}^2 + b_{12}DT + b_{13}Dt + b_{14}DC_{NaCl} \\
 & + b_{23}Tt + b_{24}TC_{NaCl} + b_{34}tC_{NaCl}
 \end{aligned}
 \tag{Equação 14}$$

Em que b corresponde aos coeficientes da regressão.

Os efeitos significativos, ao nível de significância de 0,05, variaram tanto em relação ao pesticida quanto ao tipo de fibra, de acordo com as Tabelas 2 e 3. Pode ser notado, para ambas as fibras, que muitos coeficientes de segunda ordem, por exemplo, b_{11} , são significativamente diferentes de zero, bem como a maioria dos coeficientes que denotam as interações entre as variáveis (e.g. b_{34}). Esta é uma indicação que a relação entre a eficiência de extração de cada pesticida (representada pelas áreas dos picos) e os principais parâmetros operacionais da SPME é não-linear; além de que o efeito destes parâmetros sobre a eficiência é interdependente. Por essa razão, estratégias de otimização univariada clássicas, que são usualmente aplicadas

quando da otimização dos métodos SPME, não são adequadas para o problema de otimização aqui apresentado, desde que podem conduzir à seleção de condições operacionais distantes do ótimo, resultando em desempenho inferior em relação ao potencial máximo do método.

Tabela 2 - Coeficientes do modelo da matriz Doehlert utilizando a fibra extratora PDMS/PVA para cada pesticida.

Coeficientes	CT	MP	M	AE	BE
b₀	496,1 ± 23,9	448,4 ± 34,4	170,6 ± 20,8	1216,0 ± 64,3	1742,0 ± 13,1
b₁	-*	-	-	-315,0 ± 64,3	-74,6 ± 13,1
b₂	115,8 ± 23,9	-	158,2 ± 20,8	431,9 ± 64,3	160,0 ± 13,1
b₃	-	134,1 ± 34,1	105,6 ± 20,8	408,7 ± 64,3	102,7 ± 13,1
b₄	451,3 ± 23,9	667,2 ± 34,1	397,4 ± 20,8	330,3 ± 64,3	60,08 ± 13,1
b₁₁	-147,0 ± 44,7	-	-	-	-
b₂₂	-141,0 ± 44,7	-178,0 ± 63,9	-	-538,0 ± 120,4	-
b₄₄	-	314,1 ± 56,6	245,1 ± 34,5	-555,0 ± 106,6	-67,7 ± 21,7
b₁₃	271,1 ± 68,9	-	-	-	-
b₁₄	388,0 ± 71,6	303,0 ± 102,4	-	-	-
b₂₄	-	-	319,9 ± 62,4	-	-
b₃₄	388,7 ± 71,6	311,2 ± 102,3	227,6 ± 62,3	-	-

*- coeficientes não significativos.

Tabela 3 - Coeficientes do modelo da matriz Doehlert utilizando a fibra extratora P30 para cada pesticida.

Coeficientes	CT	MP	M	AE	BE
b₀	388,8 ± 11,7	490,7 ± 33,8	191,9 ± 22,4	1370,0 ± 24,7	178,9 ± 2,8
b₁	-102,2 ± 11,7	-128,2 ± 33,8	-	-1379,0 ± 24,7	-108,0 ± 2,8
b₂	138,6 ± 11,7	-	226,1 ± 22,4	1309,0 ± 24,7	231,5 ± 2,8
b₃	48,94 ± 11,7	233,1 ± 33,7	179,8 ± 22,3	995,6 ± 24,7	139,8 ± 2,8
b₄	334,4 ± 11,7	1049,0 ± 33,7	688,7 ± 22,3	1201,0 ± 24,7	133,1 ± 2,8
b₁₁	-*	154,9 ± 63,2	-	914,3 ± 46,2	63,3 ± 5,3
b₂₂	-118,0 ± 22,0	-207,5 ± 63,2	-	-	94,2 ± 5,3
b₃₃	-72,2 ± 20,6	-	-	-260,4 ± 43,3	-32,6 ± 5,0
b₄₄	-	701,2 ± 55,9	544,6 ± 37,0	-	-26,4 ± 4,7
b₁₂	-88,6 ± 30,3	-	-	-1356,0 ± 63,8	-153,3 ± 7,3
b₁₃	-	-	-	-450,7 ± 71,2	-
b₁₄	-302,0 ± 35,2	-	-	-1775,0 ± 74,0	-103,8 ± 8,5
b₂₃	-168,2 ± 33,9	-	-	226,4 ± 71,2	131,9 ± 8,2
b₂₄	118,3 ± 35,2	-	439,9 ± 67,0	1412,0 ± 74,0	144,8 ± 8,5
b₃₄	-	524,0 ± 101,2	606,0 ± 67,0	-1082,0 ± 74,0	85,02 ± 8,5

*- coeficientes não significativos.

Os efeitos líquidos das variáveis na eficiência de extração será resultado dos efeitos individuais, bem como dos efeitos de interferência mútua dos processos individuais. De qualquer modo, há a necessidade de métodos matemáticos e computacionais mais sofisticados para encontrar modelos de otimização adequados, especialmente em procedimentos de otimização simultânea, como neste trabalho.

A dependência não-linear entre as eficiências das extrações e os parâmetros operacionais SPME pode ser avaliada considerando os aspectos cinéticos e termodinâmicos da técnica. Os efeitos individuais da temperatura e tempo de extração bem como da força iônica já são bem conhecidos (40-41). Quando uma fibra é exposta ao *headspace* de alguma amostra, após o transporte dos analitos para a superfície da

fibra por difusão ou convecção através do meio, estes são sorvidos pelo material polimérico de recobrimento da fibra. Os equilíbrios entre as espécies sorvidas nas fases presentes no sistema (material de recobrimento da fibra, amostra e *headspace*) podem ser alcançados; após esse tempo de equilíbrio, a eficiência de extração é máxima e constante. O equilíbrio da massa extraída é uma função da concentração do analito na amostra e das constantes de equilíbrio dos processos de distribuição envolvidos. Estas constantes são função da temperatura, e tipicamente temperaturas muito altas causam decréscimo nas quantidades extraídas. Eletrólitos tais como NaCl na condição de saturação diminuem a atividade do solvente na amostra aquosa, aumentando as atividades dos analitos. Os equilíbrios de extração são deslocados, usualmente aumentando as massas extraídas.

O efeito da diluição da matriz apontado pelos coeficientes dos modelos nas Tabelas 2 e 3 é diferente da predição teórica do efeito da diluição em amostras complexas (42). Pelas Tabelas 2 e 3, o coeficiente da diluição (b_1) ou não é significativo ou é negativo, indicando que baixos valores de diluição favorecem a eficiência de extração. De fato, os pesticidas podem se ligar aos componentes naturais da infusão, tais como pectinas e flavonóides. A maioria dos analitos presentes não é extraída livremente porque estão ligados a estas substâncias pesadas. Quando a amostra é diluída, a posição dos equilíbrios de ligação é alterada e os pesticidas são “liberados”, aumentando a concentração extraível livre.

Outro aspecto em relação às Tabelas 2 e 3 a ser considerado é o fato de que os modelos correlacionando as eficiências de extração e os parâmetros operacionais são consideravelmente diferentes para cada pesticida avaliado. Embora isto não seja esperado, conduz a dificuldades adicionais em relação ao desenvolvimento do método.

As Tabelas 2 e 3 também mostram que o número de coeficientes significativos apresentados para o modelo construído com a fibra comercial é maior que o número de coeficientes observados para a fibra PDMS/PVA, sugerindo um maior controle de todas as variáveis individuais quando da extração com a fibra P30, além também desse sistema exibir maior número de interações entre as variáveis, confirmando a maior dependência dos resultados com os parâmetros experimentais

avaliados. Assim, a princípio, é mais prático o uso da fibra PDMS/PVA, construída em laboratório, pois um menor número de variáveis apresentou efeitos significativos, resultando em maior facilidade no processo de otimização das condições experimentais.

As Tabelas 4 e 5 apresentam as análises de variância (ANOVA) para cada pesticida nas duas situações de extração.

Tabela 4 - Avaliação da regressão (Regr.) e da falta de ajuste (F. Aj.) para os modelos individuais dos pesticidas, ao nível de significância de 0,05, utilizando a fibra extratora PDMS/PVA.

	CT		MP		M		AE		BE	
	Fcal.	Dist. F								
Regr.	<u>9,95</u>	0,00044	<u>20,46</u>	0,00002	<u>18,41</u>	0,00003	<u>12,65</u>	0,00015	<u>40,21</u>	6,85x10 ⁻⁷
F. Aj.	<u>11,56</u>	0,00554	<u>5,00</u>	0,04069	<u>6,88</u>	0,01984	2,55	0,14648	0,55	0,70810
R²	0,948		0,966		0,963		0,933		0,982	

_Valores sublinhados indicam valores de Fcal significativos em relação aos valores da distribuição de F tabelado.

Tabela 5 - Avaliação da regressão (Regr.) e da falta de ajuste (F. Aj.) para os modelos individuais dos pesticidas, ao nível de significância de 0,05, utilizando a fibra extratora P30.

	CT		MP		M		AE		BE	
	Fcal.	Dist. F	Fcal.	Dist. F	Fcal.	Dist. F	Fcal.	Dist. F	Fcal.	Dist. F
Regr.	<u>9,28</u>	0,00060	<u>48,15</u>	2,9x10 ⁻⁷	<u>16,60</u>	0,00004	<u>29,16</u>	3,2x10 ⁻⁶	<u>43,66</u>	4,6x10 ⁻⁷
F. Aj.	<u>33,48</u>	0,00031	<u>5,70</u>	0,03045	<u>22,78</u>	0,00090	<u>121,53</u>	7,2x10 ⁻⁶	<u>92,84</u>	1,6x10 ⁻⁵
R²	0,933		0,985		0,959		0,976		0,984	

_Valores sublinhados indicam valores de Fcal significativos em relação aos valores da distribuição de F tabelado.

A Tabela 4 mostra que todas as regressões foram significativas, mas, entretanto houve falta de ajuste para os modelos dos pesticidas CT, MP e M quando do uso da fibra PDMS/PVA. Em contrapartida, com a aplicação da fibra comercial, todas as

regressões foram significativas, mas também todos os modelos apresentaram falta de ajuste (Tabela 5). A análise da variância confirma que a complexidade entre os sinais e as variáveis estudadas é mais difícil de ser trabalhada com o uso da fibra P30.

Ainda que a maioria dos modelos não tenha se ajustado aos dados cromatográficos, estes ainda apresentaram razoável concordância, como pode ser notado nos gráficos dos valores estimados em função dos valores medidos, apresentados na Figura 12 referentes à fibra PDMS/PVA, e na Figura 13 para a fibra P30.

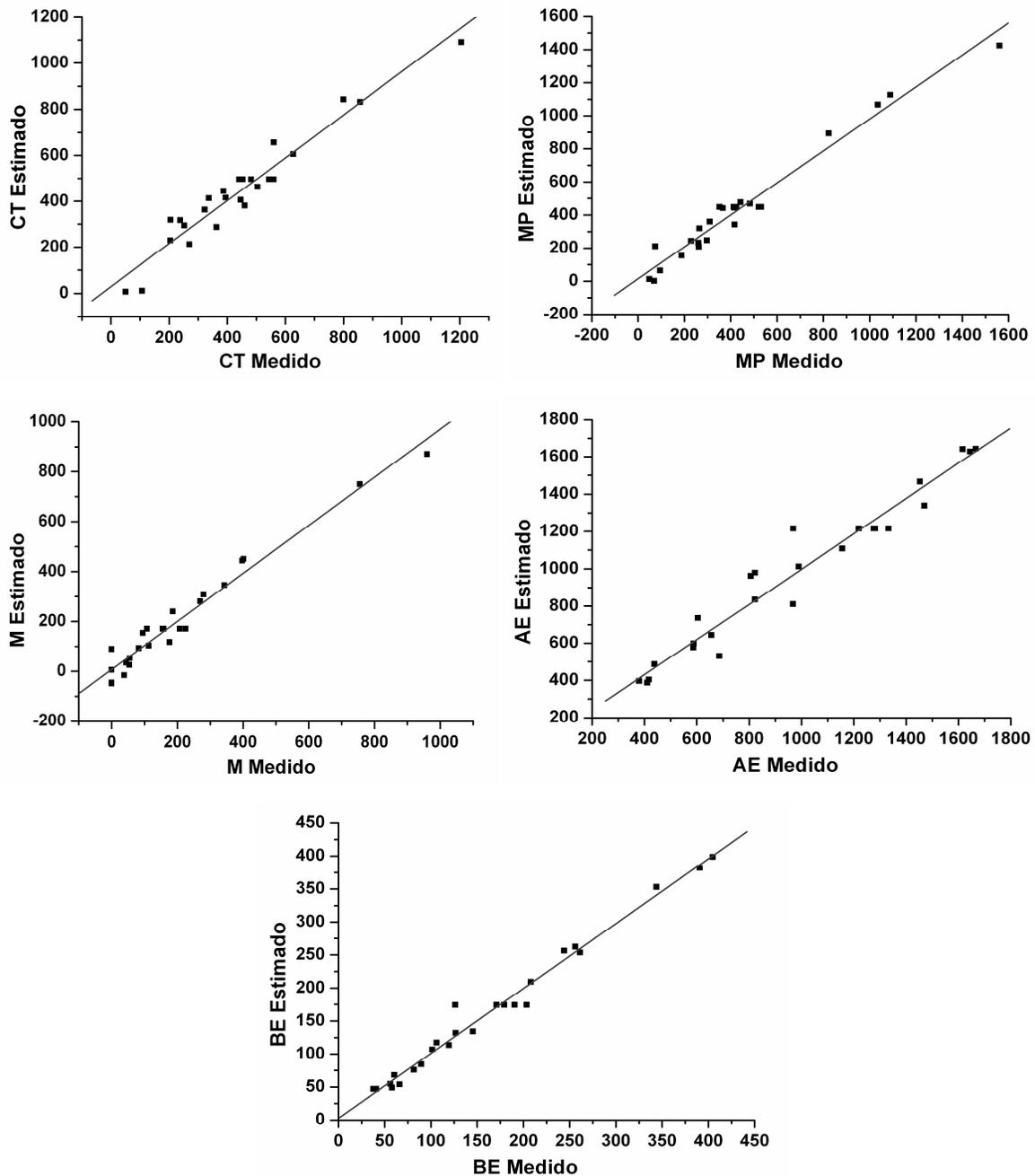


Figura 12 – Gráficos dos valores de área medidos contra os valores de área estimados pelos modelos individuais dos pesticidas clorotalonil (CT), paration metílico (MP), malation (M), α -endossulfan (AE) e β -endossulfan (BE), obtidos do planejamento Doehlert, ao nível de significância de 0,05. As extrações foram realizadas com a fibra PDMS/PVA.

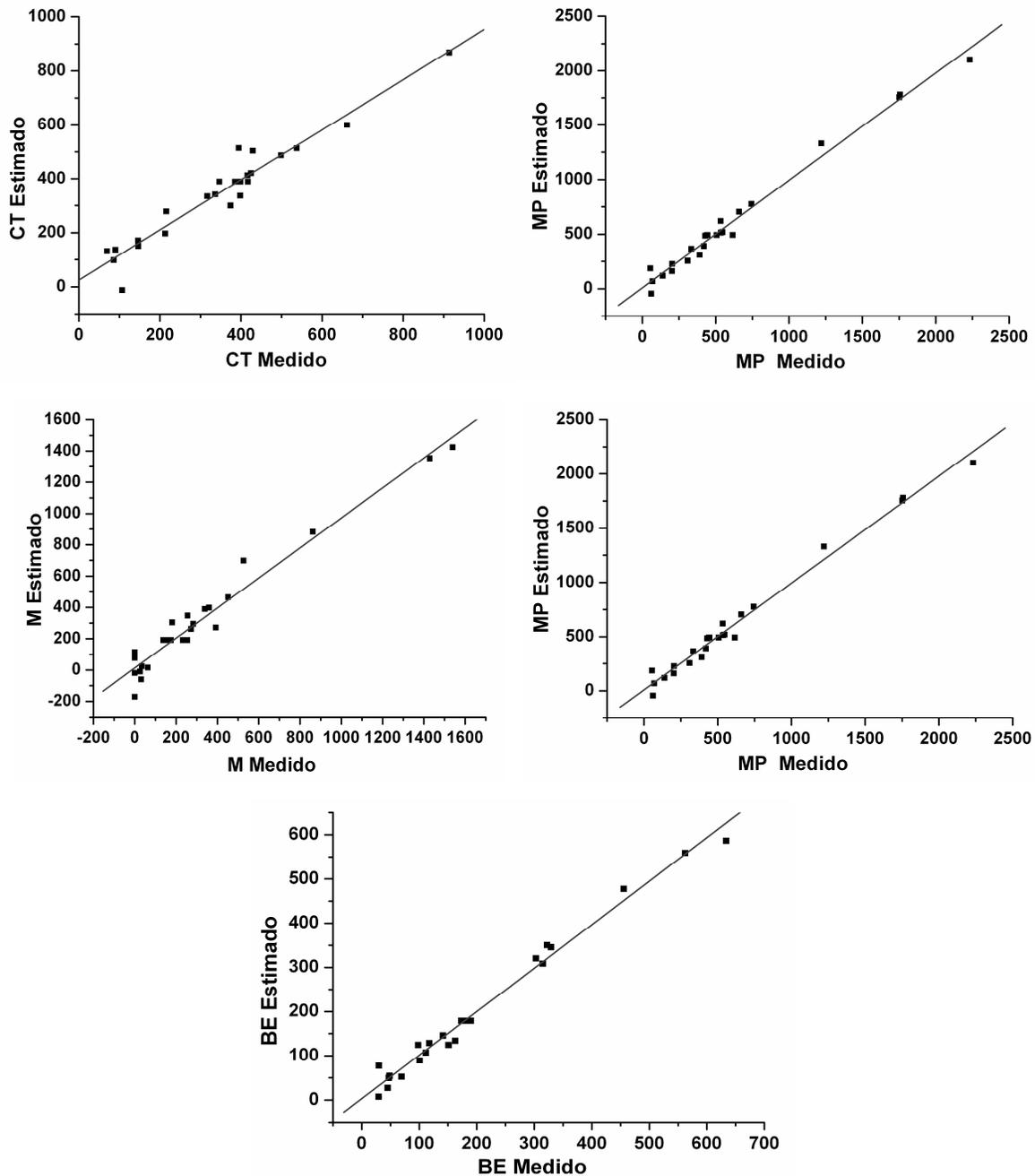


Figura 13 – Gráficos dos valores de área medidos contra os valores de área estimados pelos modelos individuais dos pesticidas clorotalonil (CT), paration metílico (MP), malation (M), α -endossulfan (AE) e β -endossulfan (BE), obtidos do planejamento Doehlert, ao nível de significância de 0,05. As extrações foram realizadas com a fibra comercial PDMS (P30).

Entretanto, quando se otimiza um método multiresíduo, supostamente deve ser determinado um conjunto de condições que maximizam simultaneamente as eficiências de extração para todas as espécies estudadas. Neste caso, a escolha das condições apropriadas para o método multiresíduo deve envolver uma seleção comprometida dos 5 diferentes conjuntos de condições experimentais (cada um otimizando a extração para cada analito). Na ausência de um critério bem definido, esta seleção certamente envolverá um julgamento subjetivo do analista.

Ainda, os fatos de não se ter observado uma região experimental ótima comum a todos os pesticidas; de ocorrer falta de ajuste da maioria dos modelos; além também da necessidade de construção de modelos individuais, ou seja, para cada pesticida, impulsionaram a tentativa de modelamento conjunto das respostas através de uma abordagem objetiva que considera simultaneamente os efeitos dos parâmetros operacionais sobre todos os analitos alvo, utilizando algoritmos de calibração multivariada tais como o método dos mínimos quadrados parciais e as redes neurais artificiais, além da otimização desses resultados com procedimento empregando algoritmo genético.

1.4.2.2 Aplicação do Método dos Mínimos Quadrados Parciais, Redes Neurais Artificiais e Algoritmo Genético

A dependência não-linear entre as eficiências das extrações e os parâmetros operacionais SPME estimularam a tentativa de modelamento conjunto das respostas através da abordagem de otimização simultânea.

Quando da aplicação do POPLYPLS, avaliando-se os 5 pesticidas simultaneamente, os melhores valores de RMSE (Soma do Erro Quadrático Médio) foram obtidos utilizando-se um polinômio de grau 4 e 3 variáveis latentes no tratamento dos dados obtidos com a fibra PDMS/PVA; e um polinômio de grau 4 e 4 variáveis latentes para os dados resultantes da extração com a fibra P30. O RMSE é um indicativo da robustez do modelo avaliado.

Entretanto, os valores de RMSE alcançados pelo POLYPLS se mostraram significativamente maiores em comparação com os obtidos pela rede neural otimizada (erros relativos superiores a 30 %). O POLYPLS se mostrou inadequado para o modelamento concomitante dos dados. Uma possível causa é que as inter-relações

entre as variáveis e as respostas possuem um grau de complexidade elevado, fazendo com que métodos baseados na análise de fatores, tais como o PLS, não sejam capazes de encontrar modelos adequados.

A Figura 14 mostra os valores de RMSE para os tratamentos BRANN, MLR e POLYPLS. Pode ser notado que os erros originados pela rede são significativamente menores se comparados com os outros modelos avaliados, sendo somente estes passíveis de serem considerados como resultados aceitáveis.

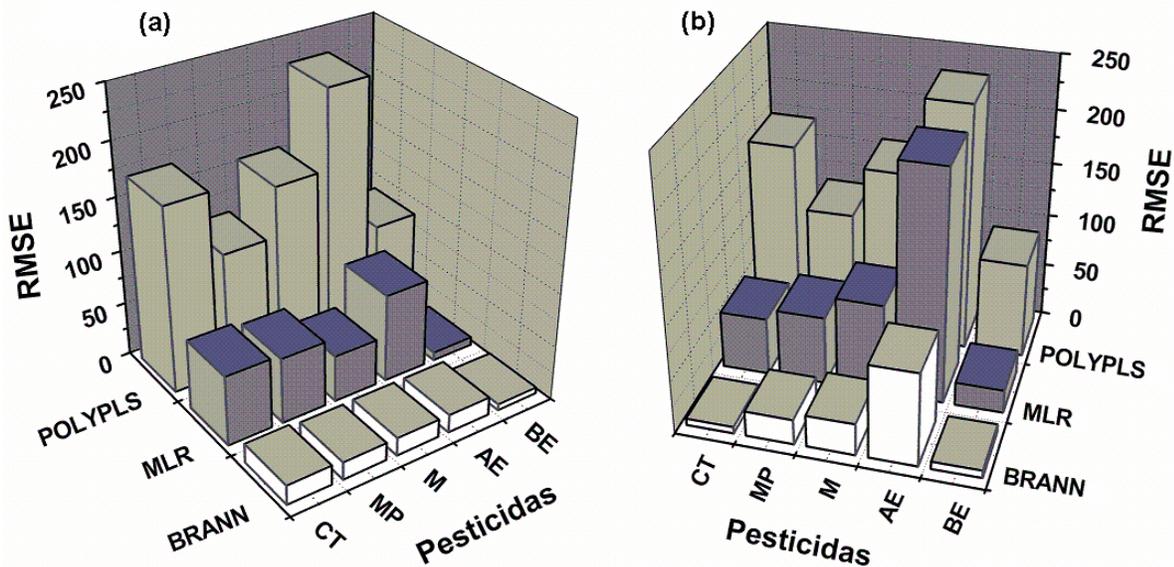


Figura 14 – Valores de RMSE para os modelos BRANN, MLR e POLYPLS para os dados obtidos das extrações com as fibras (a) PDMS/PVA e (b) P30.

A melhor arquitetura de rede para a fibra PDMS/PVA constou de 8 neurônios na camada intermediária. Já para a fibra P30, a melhor arquitetura foi obtida com 9 neurônios na camada intermediária. Com ambas as fibras, os menores valores de RMSE foram resultantes do primeiro treinamento, dentro das 5 replicatas para cada arquitetura montada.

As Figuras 15 e 16 mostram os gráficos dos resíduos obtidos dos modelos BRANN otimizados para as extrações com as fibras PDMS/PVA e P30, respectivamente. Pode ser notada a distribuição aleatória dos resíduos, o que é uma evidência adicional que os dados foram bem modelados pela rede neural, desde que o comportamento dos resíduos não apresenta nenhuma tendência visível, além de baixos

valores dos resíduos quando comparados aos valores de área estimados pelos modelos das redes otimizadas.

Foram calculados os valores dos erros relativos de cada amostra, que se apresentaram relativamente baixos, exceto para alguns pesticidas em determinados pontos do planejamento cujas condições experimentais não se apresentavam favoráveis à extração.

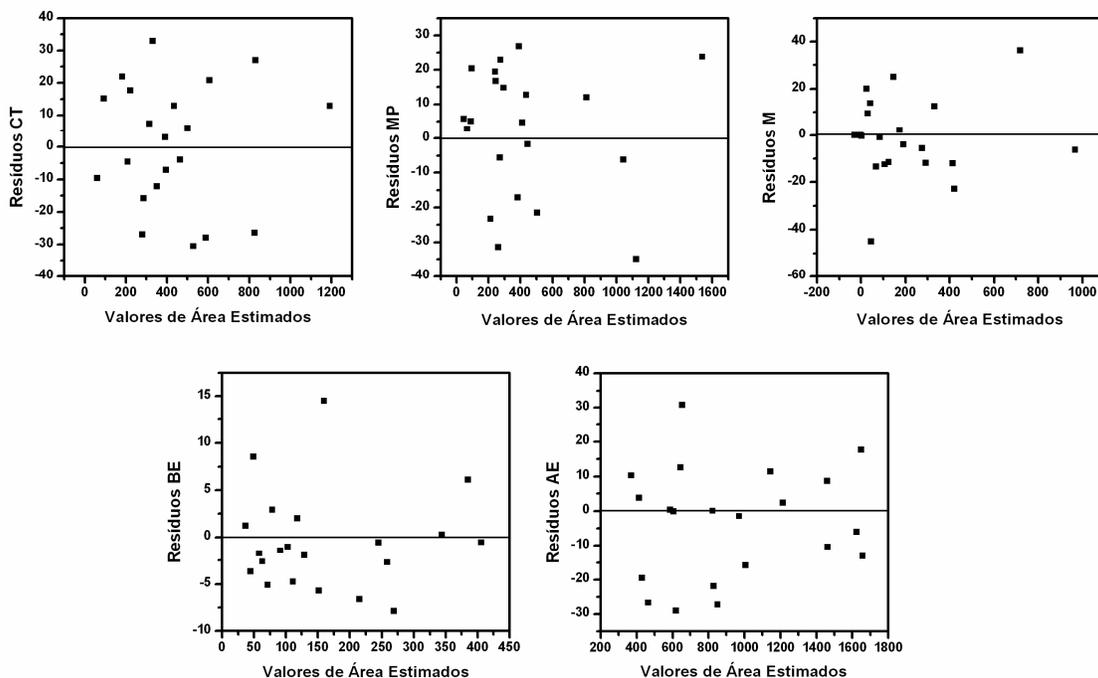


Figura 15 – Gráfico dos resíduos para os pesticidas CT, MP, M, AE e BE do modelo BRANN otimizado usando a fibra PDMS/PVA.

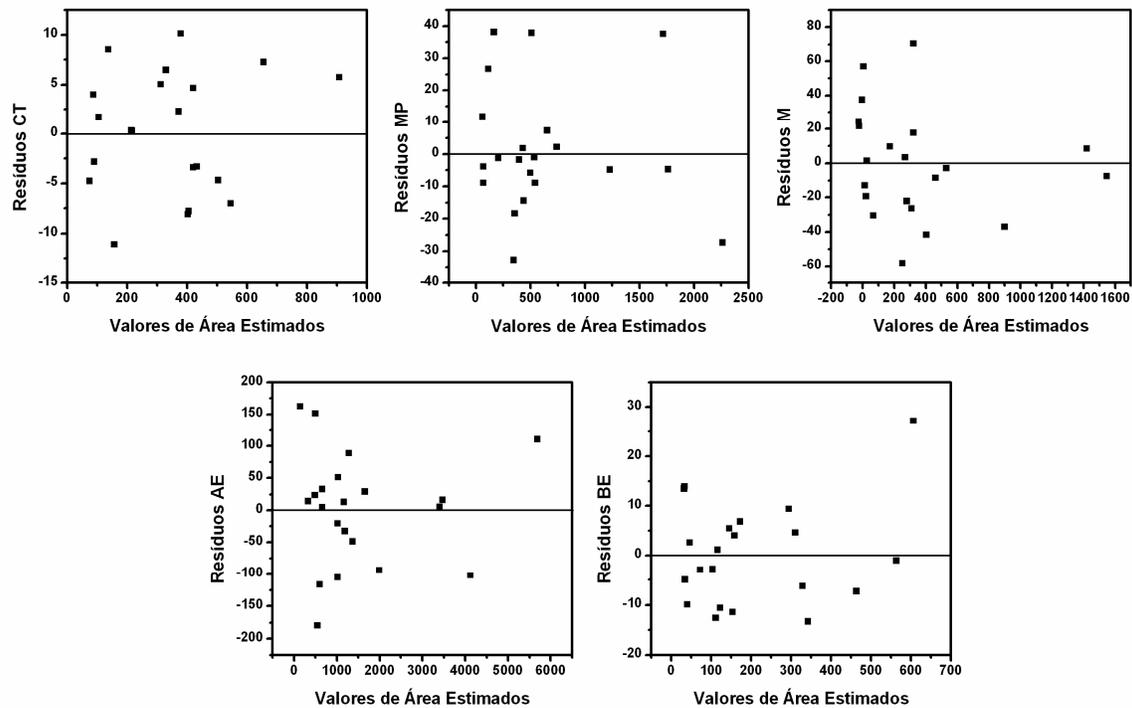


Figura 16 – Gráfico dos resíduos para os pesticidas CT, MP, M, AE e BE do modelo BRANN otimizado usando a fibra P30.

Assim, de posse das redes treinadas, foi utilizada uma rotina de algoritmo genético para a otimização dos parâmetros experimentais, ou seja, para se obter as melhores condições de D , T , t e C_{NaCl} que produzissem as maiores respostas práticas possíveis de CT, MP, M, AE e BE simultaneamente, para ambas as fibras. O algoritmo genético processou uma função matemática de minimização de perda (Equação 11), que foi construída utilizando as redes otimizadas para cada fibra estudada. Logo, a saída da rede constituiu a entrada do algoritmo genético, através da função de minimização, resultando no procedimento neuro-genético utilizado.

As melhores condições experimentais fornecidas pelo GA que maximizam as respostas dos 5 pesticidas simultaneamente, para as fibras PDMS/PVA e P30, são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições experimentais otimizadas pela abordagem neuro-genética.

CONDIÇÕES OTIMIZADAS				
	D (%)	T (°C)	t (min)	C _{NaCl} (g mL ⁻¹)
PDMS/PVA	67,00	65,50	50,00	0,36
P30	77,00	65,00	39,00	0,36

Observando os valores das condições experimentais otimizadas pelo GA é perceptível que, exceto o tempo de extração, as condições operacionais ótimas encontradas para ambas as fibras são bastante próximas; a eficiência de extração para os pesticidas é maximizada quando a infusão é diluída a 67 % para a fibra PDMS/PVA ou 77 % para a fibra P30, na saturação da solução com NaCl (0,36 g mL⁻¹), e com extrações realizadas em torno de 65 °C. Desde que os efeitos da diluição da amostra e força iônica são associados com processos de transferência de massa e processos de equilíbrio afetados somente pela composição da matriz e não por parâmetros dimensionais da fibra SPME ou características químicas do recobrimento, condições ótimas similares são esperadas quando da comparação das diferentes fibras.

A temperatura afeta a transferência de massa e os equilíbrios envolvendo todas as fases físicas do sistema (matriz, *headspace* e recobrimento da fibra); por isso, temperaturas ótimas distintas são esperadas para fibras SPME com diferentes recobrimentos. Entretanto, a temperatura ótima é praticamente a mesma para ambas as fibras. Isto poderia indicar que variações neste parâmetro tenham o mesmo efeito nas extrações realizadas pelas duas fibras; o que é improvável considerando as diferenças na composição química e morfologia dos recobrimentos. Uma suposição mais plausível é que a influência da temperatura no transporte no analito envolvendo a matriz ou seus componentes é muito mais significativa do que qualquer efeito na sorção dos pesticidas pelos materiais de recobrimento das fibras.

O tempo de extração ótimo foi pronunciadamente diferente para as fibras: 50 min para PDMS/PVA e 39 min para P30. Isto também foi inesperado considerando que o recobrimento da fibra PDMS/PVA é 6 vezes menos espesso que o recobrimento da fibra P30 (~ 5 µm x 30 µm, respectivamente). Quando o mecanismo de sorção é a partição – como acontece em recobrimentos poliméricos puros como o da

fibra P30 – o tempo de equilíbrio é inversamente proporcional à espessura do recobrimento, desde que o passo limitante na cinética de sorção seja a difusão do analito da superfície da fibra para o interior do recobrimento. O mecanismo físico-químico real envolvido na sorção dos analitos por fibras SPME obtidas pelo processo sol-gel, como é o caso da fibra PDMS/PVA utilizada neste trabalho, ainda não é identificado na literatura. Logo, algumas conjecturas sobre a natureza dos processos envolvidos nos mecanismos de fibras SPME sol-gel podem ser citadas.

O recobrimento da fibra PDMS/PVA é um filme fino de sílica altamente poroso, modificado por ligações químicas de resíduos PDMS e PVA em sua superfície (34). Se o único processo envolvido na extração fosse a partição entre o *headspace* da amostra e a superfície do filme de PDMS e PVA, o equilíbrio seria mais rápido que o da fibra com recobrimento de PDMS puro. Transporte de massa lento é observado para recobrimentos de fibras baseados em materiais adsorventes tais como Carboxen/PDMS, onde a difusão dentro dos poros do material adsorvente é a etapa limitante na extração (especialmente para espécies polares que são fortemente sorvidas) (43). Considerando a porosidade do recobrimento de PDMS/PVA é viável supor equilíbrios mais lentos e, que considerações aplicadas para a fibra Carboxen/PDMS possam ser utilizadas aqui: provavelmente alguma extensão de adsorção é envolvida no processo, não excluindo pelo menos alguma participação de partição entre o *headspace* da amostra e o filme de PDMS-PVA quimicamente ligado à superfície da sílica. Embora sejam necessários experimentos adicionais, esta pode ser considerada uma razoável suposição.

A Figura 17 mostra os incrementos dos picos dos pesticidas após extração com as condições experimentais indicadas pela abordagem neuro-genética, em comparação com as respostas de dois pontos experimentais do planejamento Doehlert.

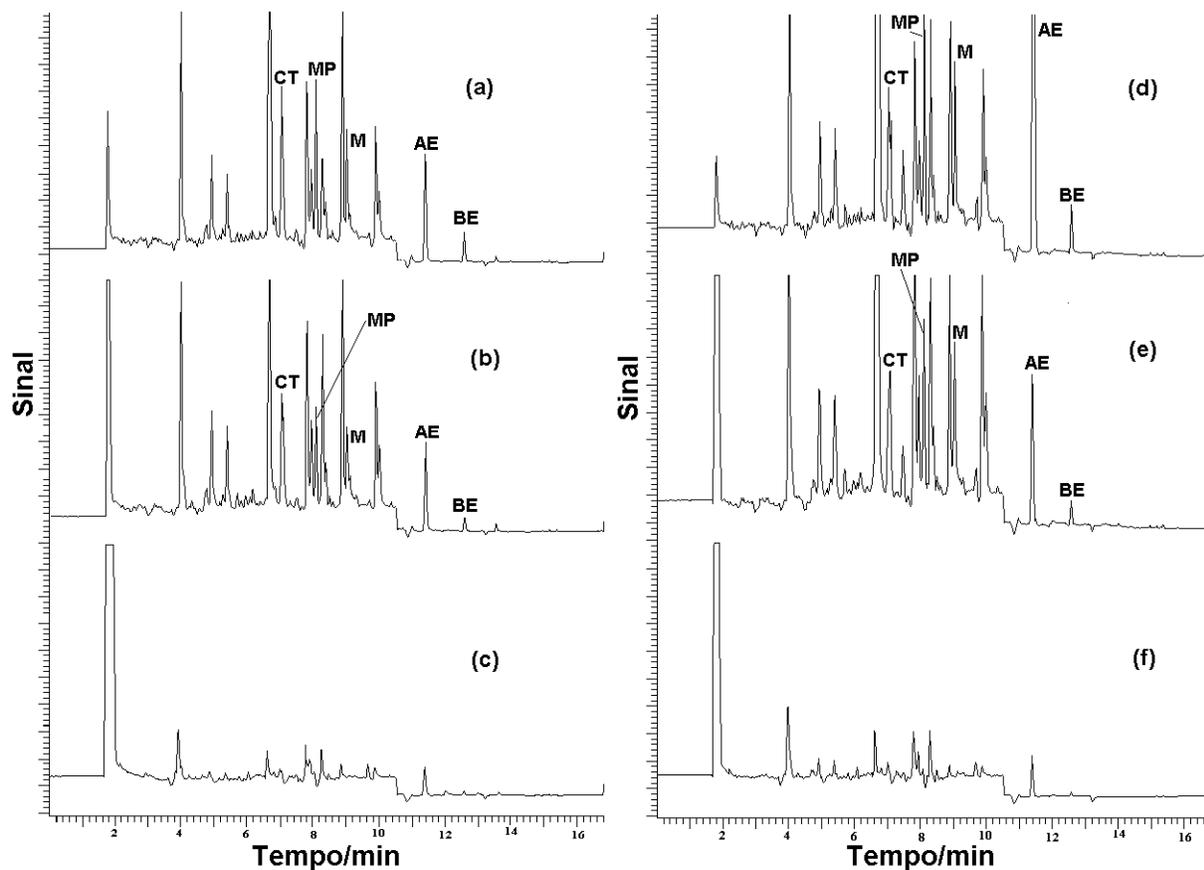


Figura 17 – Cromatogramas de extração por HS-SPME de infusos de *Passiflora alata* Dryander com a fibra PDMS/PVA: (a) Cromatograma obtido após tratamento neuro-genético; (b) Ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a região experimental ótima, com $D = 30 \%$, $T = 65 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 35 \text{ min}$, e $C_{\text{NaCl}} = 0,36 \text{ g mL}^{-1}$; e (c) Ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a pior região experimental, com $D = 30 \%$, $T = 75 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 30 \text{ min}$, e $C_{\text{NaCl}} = 0 \text{ g mL}^{-1}$. Cromatogramas de extração por HS-SPME de infusos de *Passiflora alata* Dryander com a fibra P30: (d) Cromatograma obtido após tratamento neuro-genético; (e) ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a região experimental ótima, com $D = 70 \%$, $T = 65 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 35 \text{ min}$ e $C_{\text{NaCl}} = 0,36 \text{ g mL}^{-1}$; e (f) Ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a pior região experimental, com $D = 30 \%$, $T = 75 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 30 \text{ min}$, e $C_{\text{NaCl}} = 0 \text{ g mL}^{-1}$.

Através da abordagem neuro-genética utilizada foi possível alcançar condições otimizadas de extração por HS-SPME para os 5 pesticidas simultaneamente,

e para cada fibra estudada, mostrando quão promissora se apresenta a ferramenta utilizada.

1.5 OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DA DETERMINAÇÃO DE BIFENILAS POLICLORADAS EM LEITE POR HS-SPME-GC-ECD

Bifenilas policloradas (PCB) são compostos sintéticos clorados que consistem de dois anéis de benzeno ligados por uma ligação carbono-carbono simples onde os átomos de cloro (1-10 átomos) são substituintes nos anéis aromáticos (Figura 18). Elas são usadas na fabricação de materiais plastificantes e na formulação de tinturas, materiais de revestimento, adesivos, pesticidas, entre outros. Os PCB são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal, distribuídos e acumulados no fígado e tecido adiposo (44), bem como na gordura do leite materno (45). Eles também se difundem pela placenta, se acumulando em fetos e recém-nascidos (44). Nesse sentido, crianças estão expostas a essa contaminação antes de nascer e mesmo depois através da amamentação materna (44). Essas crianças conseqüentemente apresentarão quantidades substancialmente maiores de PCB do que adultos, e os efeitos tóxicos principais dos PCB são danos no fígado, imunossupressão, neuropatia e aumento do risco de câncer (46). Para a população humana em geral, mais de 90 % da exposição ao PCB é devido à dieta, predominantemente ao consumo de carne, peixe e aves.

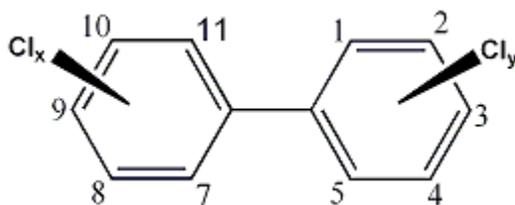


Figura 18: Estrutura geral de uma bifenila policlorada.

Em resposta a esses efeitos adversos que comprometem tanto a vida selvagem quanto a dos seres humanos, a produção e uso do PCB foram restritos e banidos na Europa e América do Norte durante a década de 70 e, conseqüentemente, os níveis de PCB em humanos estão decrescendo (47). Os limites que regulam a quantidade diária de PCB em leite em diversos países variam de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $60 \mu\text{g kg}^{-1}$ (48). No Brasil

não há legislação específica que estime os níveis máximos de concentração de compostos organoclorados (49).

Devido aos baixos níveis presentes nas amostras, a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD) é usualmente empregada para a separação e detecção dos isômeros de PCB. Anterior à etapa de análise por GC-ECD, procedimentos adequados de preparação da amostra são necessários para isolar os compostos da matriz. Desde modo, a microextração em fase sólida se apresenta como uma técnica bastante adequada por ser simples, rápida, confiável e livre de solvente. Através da HS-SPME-GC-ECD e de tratamentos sofisticados e robustos de otimização multivariada é possível obter condições experimentais adequadas para uma maior eficiência na extração e detecção dos compostos, sem comprometimento operacional das variáveis experimentais.

1.5.1 PARTE EXPERIMENTAL

Neste trabalho, a solução padrão consistiu de uma mistura de bifenilas policloradas em isooctano (IUPAC 28, 53, 74, 101, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180 e 198) obtidas da AccuStandard (New Haven, CT). O isooctano foi fornecido pela Mallinckrodt (Kentucky, PA). Outros reagentes tais como metanol e NaCl P.A. foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e da Ecibra (São Paulo, Brasil), respectivamente. Água deionizada purificada através de um sistema Millipore Milli-Q (Bedford, MA) também foi utilizada.

A fibra para SPME usada neste estudo foi uma fibra comercial de polidimetilsiloxano (PDMS) com espessura de recobrimento de 100 μm , encaixada em um *holder* apropriado fornecido pela Supelco (Bellefonte, PA). A fibra foi devidamente acondicionada antes do uso, conforme instruções do fornecedor. Foram utilizados frascos de vidro de 16 mL tampados com septos de Teflon/silicone fornecidos pela Pierce (Rockford, IL).

Para o estudo de otimização, as amostras de leite humano isentas de quantidades detectáveis de PCB foram dopadas com uma concentração de 9,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada PCB estudado. O leite humano foi obtido de um banco de leite da cidade de São Paulo, sendo mantido congelado da coleta até a análise. O número de identificação

do projeto no CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) é 0023.0.146.000-05. Para a análise, o leite contaminado era resfriado a uma temperatura de 4 °C por 24 h para permitir o equilíbrio entre os compostos biológicos ativos do leite e os compostos organoclorados adicionados, e evitar a degradação do leite (50).

Todas as análises cromatográficas foram realizadas em um AutoSystemXL GC-ECD (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) acoplado com uma coluna HP-1 (100 % polidimetilsiloxano) 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm. O injetor *split-splitless* foi operado no modo *splitless* e ajustado com um *liner* adequado para SPME. A programação de temperatura do forno foi: 40 °C por 2 min até 190 °C por 5 min a 30 °C/min, então a 5 °C/min até 220 °C mantida por 5 min, a 300 °C por 1 min a 20 °C/min. As temperaturas de injetor e detector foram 280 °C e 320 °C, respectivamente. O gás carreador foi hélio com uma pureza de 99,999 %, a um fluxo de 1,3 mL min⁻¹. Todas as respostas cromatográficas foram dadas nas razões sinal/ruído (S/N).

Durante o processo de extração dos PCB, a fibra de PDMS 100 µm foi exposta a uma altura pré-determinada de 5 mL do leite contaminado sendo a adição de NaCl para ajuste da força iônica (C_{NaCl}), a temperatura de extração (T), o tempo de extração (t), e a adição do co-solvente metanol (C_{MeOH}), os parâmetros da HS-SPME variados e otimizados de acordo com as designações de um planejamento experimental denominado planejamento ou matriz Doehlert (Tabela 7) (26-27). As repetições foram realizadas em torno do ponto central num total de cinco.

A temperatura dos fracos foi controlada usando água aquecida circulante de um banho (Cole-Parmer – Vernon Hills, IL). As alíquotas de 5 mL das amostras de leite materno foram agitadas magneticamente (1200 rpm) antes de cada extração por 10 min para o equilíbrio amostra/*headspace*.

Após o tempo de extração definido pela matriz Doehlert (Tabela 1), a fibra PDMS era imediatamente exposta no injetor do cromatógrafo a 280 °C para dessorção dos PCB. A fibra era mantida por 5 min no injetor para garantir a total dessorção e evitar efeito de memória, que era também verificado por medidas obtidas após o término da análise de cada extração (análise do branco).

Tabela 7 - Designação da matriz Doehlert para as quatro variáveis HS-SPME estudadas.

Ensaio Experimental	C _{NaCl}	T	t	C _{MeOH} (% v/v)
1*	0 (0,18 g mL ⁻¹)	0 (70,0 °C)	0 (70,0 min)	0 (2,5 %)
2	1 (0,36 g mL ⁻¹)	0 (70,0 °C)	0 (70,0 min)	0 (2,5 %)
3	0,5 (0,27 g mL ⁻¹)	0,866(95,0 °C)	0 (70,0 min)	0 (2,5 %)
4	0,5 (0,27 g mL ⁻¹)	0,289 (78,3 °C)	0,817 (100,0 min)	0 (2,5 %)
5	0,5 (0,27 g mL ⁻¹)	0,289(78,3 °C)	0,204 (77,5 min)	0,791 (5,0 %)
6	-1 (0 g mL ⁻¹)	0 (70,0 °C)	0 (70,0 min)	0 (2,5 %)
7	-0,5 (0,09 g mL ⁻¹)	-0,866 (45,0 °C)	0 (70,0 min)	0 (2,5 %)
8	-0,5 (0,09 g mL ⁻¹)	-0,289 (61,7 °C)	-0,817 (40,0 min)	0 (2,5 %)
9	-0,5 (0,09 g mL ⁻¹)	-0,289 (61,7 °C)	-0,204 (62,5 min)	-0,791 (0 %)
10	0,5 (0,27 g mL ⁻¹)	-0,866 (45,0 °C)	0 (70,0 min)	0 (2,5 %)
11	0,5 (0,27 g mL ⁻¹)	-0,289 (61,7 °C)	-0,817 (40,0 min)	0 (2,5 %)
12	0,5 (0,27 g mL ⁻¹)	-0,289 (61,7 °C)	-0,204 (62,5 min)	-0,791 (0 %)
13	-0,5 (0,09 g mL ⁻¹)	0,866 (95,0 °C)	0 (70,0 min)	0 (2,5 %)
14	0 (0 g mL ⁻¹)	0,577 (86,7 °C)	-0,817 (40,0 min)	0 (2,5 %)
15	0 (0 g mL ⁻¹)	0,577 (86,7 °C)	-0,204 (62,5 min)	-0,791 (0 %)
16	-0,5 (0,09 g mL ⁻¹)	0,289 (78,3 °C)	0,817 (100,0 min)	0 (2,5 %)
17	0 (0,18 g mL ⁻¹)	-0,577 (53,3 °C)	0,817 (100,0 min)	0 (2,5 %)
18	0 (0,18 g mL ⁻¹)	0 (70,0 °C)	0,613 (92,5 min)	-0,791 (0 %)
19	-0,5 (0,09 g mL ⁻¹)	0,289 (78,3 °C)	0,204 (77,5 min)	0,791 (5,0 %)
20	0 (0,18 g mL ⁻¹)	-0,577 (53,3 °C)	0,204 (77,5 min)	0,791 (5,0 %)
21	0 (0,18 g mL ⁻¹)	0 (70,0 °C)	-0,613 (47,5 min)	0,791 (5,0 %)

*Ponto central com cinco repetições.

As faixas de trabalho decodificadas abrangeram concentrações de NaCl de 0 a 0,36 g mL⁻¹ (5 níveis), temperaturas de extração de 45,0 °C a 95,0 °C (7 níveis); tempos de extração de 40 min a 100 min (7 níveis); e adições de metanol de 0 a 500 µL por 5 mL de amostra (3 níveis) (Tabela 7).

Como se trata de uma abordagem de regressão linear múltipla (MLR), através do planejamento Doehlert é necessário encontrar um modelo matemático (Equação 15) apropriado para cada PCB estudado, a fim de descrever o comportamento de cada composto em função das variáveis experimentais de extração avaliadas.

$$\begin{aligned}
 z = & b_0 + b_1 C_{\text{NaCl}} + b_2 T + b_3 t + b_4 C_{\text{MeOH}} + b_{11} C_{\text{NaCl}}^2 + b_{22} T^2 \\
 & + b_{33} t^2 + b_{44} C_{\text{MeOH}}^2 + b_{12} C_{\text{NaCl}} T + b_{13} C_{\text{NaCl}} t + b_{14} C_{\text{NaCl}} C_{\text{MeOH}} \\
 & + b_{23} T t + b_{24} T C_{\text{MeOH}} + b_{34} t C_{\text{MeOH}}
 \end{aligned}
 \tag{Equação 15}$$

Em que z é a resposta (área de pico do PCB) e b corresponde aos coeficientes da regressão. Certamente, cada PCB apresentará uma equação de regressão, com seus respectivos coeficientes significativos.

A qualidade dos modelos individuais foi estimada através da análise de variância (ANOVA). Os cálculos dos modelos de regressão e das análises de variância foram feitos através de planilhas eletrônicas elaboradas no software Excel 2003 (27).

Com o intuito de explorar a possibilidade de obtenção de um modelo único, que determinasse simultaneamente as concentrações trabalhadas dos PCB, correlacionando-as concomitantemente com as variáveis operacionais HS-SPME, foi utilizada a rede neural artificial com regularização Bayesiana (BRANN) (Figura 19).

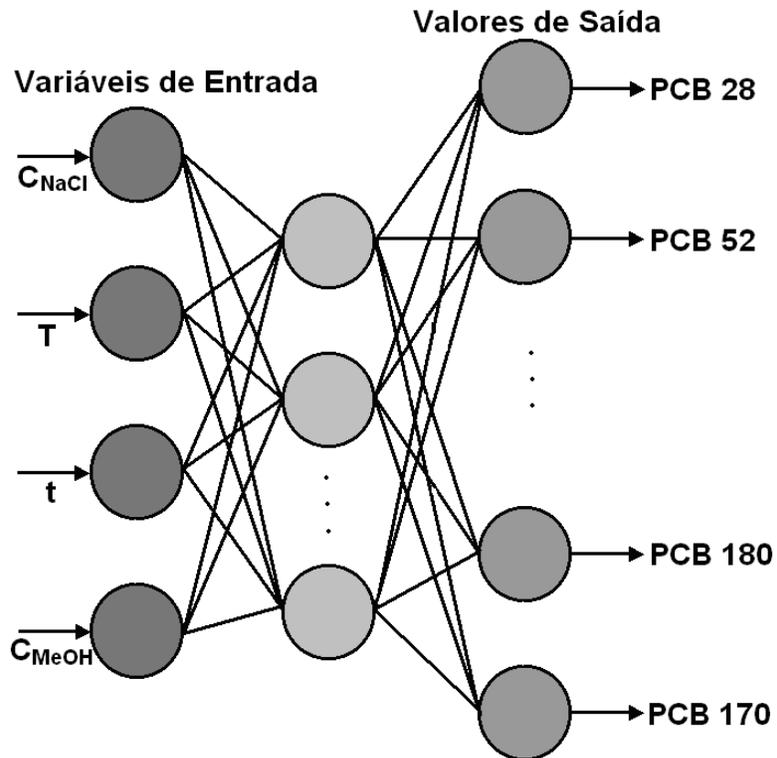


Figura 19 – Estrutura da rede neural artificial com o número de neurônios na camada de entrada e na camada de saída utilizados neste estudo.

A função de transferência da camada intermediária utilizada foi a tangente-sigmoidal e a arquitetura da rede utilizada constou de 4 neurônios na camada de entrada, correspondendo às variáveis HS-SPME estudadas (C_{NaCl} , T , t e C_{MeOH}), e 12 neurônios na camada de saída, relacionados ao número de PCB avaliados (Figura 17). A otimização da rede foi efetuada pela variação do número de neurônios na camada intermediária, especificamente de 1 a 20, procedendo 5 replicatas para cada arquitetura de rede gerada.

Esse tipo de abordagem é muito apropriado para o objetivo do estudo considerando o número de PCB e as possíveis relações entre si e com as variáveis experimentais de extração.

Após o modelamento dos dados através da rede neural Bayesiana foi utilizada uma rotina de algoritmo genético, usando a implementação para algoritmo genético de Houck et al. (10,37), a fim de otimizar os parâmetros operacionais HS-SPME, através do procedimento neuro-genético.

Neste estudo, a rotina do GA utilizada otimizou uma função de minimização da perda (φ) (38-39), calculada pela soma dos desvios relativos ponderados como mostrado na Equação 16.

$$\varphi = \sum_{i=1}^m w_i \left[\frac{Q(x_1, x_2, \dots, x_n) - Q^*}{Q^*} \right] \quad (\text{Equação 16})$$

Em que m é o número de objetivos, ou seja, o número de PCB; w_i é o fator peso, com $i = 1, 2, \dots, m$; $Q(x_1, x_2, \dots, x_n)$ é a função objetivo e n indica o número de variáveis independentes, ou seja, as variáveis experimentais HS-SPME; e Q^* é o valor ótimo individual da função objetivo, definido como a área máxima de pico possível para cada PCB no sistema cromatográfico estudado.

O algoritmo genético irá encontrar os valores ótimos das condições experimentais através da minimização da função de perda φ . Essa metodologia culmina em um procedimento de otimização simultânea onde se tentou alcançar uma condição experimental na qual se observasse o máximo dos sinais cromatográficos dos PCB concomitantemente, sem comprometimento prático das condições experimentais de extração HS-SPME.

No GA, as variáveis operacionais (C_{NaCl} , T , t , C_{MeOH}) foram codificadas a fim de que cada variável fosse apresentada como um gene em um número binário de 16 bits de resolução (Figura 20), constituindo um indivíduo ou cromossomo da população.

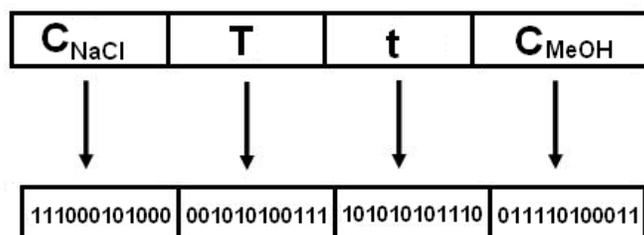


Figura 20 – Codificação hipotética de cada variável experimental no algoritmo genético.

A população no algoritmo genético foi de 100 indivíduos. Para a evolução, a probabilidade de dois cromossomos randômicos realizarem cruzamento foi de 90 % e a probabilidade de mutação foi 1 %. A evolução era continuada até que $\varphi \leq 10^{-3}$ ou alcançasse o número de 100 gerações.

Após a codificação dos parâmetros de entrada e definição dos parâmetros de controle, o algoritmo genético foi iniciado 10 vezes com diferentes populações iniciais aleatórias, definidas pelo algoritmo, e as variáveis do cromossomo que geraram o menor valor da função de minimização de perda φ foram escolhidas.

Os cálculos neuro-genéticos foram executados no software MatLab 6.5 (The MathWorks, Natick, MA), utilizando a rotina de redes neurais do Neural Network Toolbox 4.0 (The MathWorks Inc.) (35) e uma rotina de GA, usando a implementação para algoritmo genético de Houck et al. (10,37).

1.5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.5.2.1 Regressão Linear Múltipla

Os coeficientes polinomiais das superfícies de resposta para cada PCB, ao nível de significância de 0,05, definidos de acordo com o modelo quadrático da Equação 14 encontrados pela abordagem MLR, são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Coeficientes polinomiais das superfícies de resposta para os PCB individuais determinados por MLR.

Coeficientes	PCB #											
	28	52	74	101	118	153	138	187	128	156	180	170
b_0	345 ± 65	505 ± 64	161 ± 31	245 ± 29	222 ± 21	643 ± 54	215 ± 19	222 ± 13	97 ± 6	113 ± 9	210 ± 16	76 ± 6
Coeficientes de 1ª ordem												
b_1	-*	-	134 ± 24	206 ± 23	234 ± 16	738 ± 42	240 ± 15	327 ± 10	46 ± 5	143 ± 7	173 ± 13	129 ± 5
b_2	-	248 ± 50	607 ± 24	736 ± 23	1188 ± 16	3338 ± 42	1217 ± 15	1856 ± 10	963 ± 5	1016 ± 7	1220 ± 13	878 ± 5
b_3	-	-	-	-	-	-	-70 ± 15	-117 ± 10	-47 ± 5	-46 ± 7	-	-45 ± 5
b_4	-	-	-133 ± 24	-237 ± 23	-293 ± 16	-619 ± 42	-255 ± 15	-390 ± 10	-168 ± 5	-200 ± 7	-237 ± 13	-124 ± 5
Coeficientes de 2ª ordem												
b_{11}	-	-	-	-	189 ± 33	391 ± 85	133 ± 31	196 ± 20	108 ± 10	119 ± 14	-	79 ± 10
b_{22}	-	-	567 ± 50	578 ± 46	1264 ± 33	4106 ± 85	1539 ± 31	2416 ± 20	1349 ± 10	1405 ± 14	1637 ± 26	1349 ± 10
b_{33}	-	-	-	-	-	-456 ± 80	-129 ± 29	-324 ± 19	-202 ± 9	-227 ± 13	-289 ± 24	-248 ± 9
b_{44}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-81 ± 9
Coeficientes de interação												
b_{12}	-	-	576 ± 63	695 ± 58	980 ± 42	3770 ± 107	1035 ± 39	1643 ± 26	151 ± 12	699 ± 17	933 ± 36	695 ± 12
b_{13}	-	-	-	-377 ± 65	-536 ± 47	-1659 ± 120	-518 ± 43	-794 ± 29	-151 ± 14	-343 ± 19	-395 ± 36	-337 ± 14
b_{14}	-	-	-	-236 ± 49	-968 ± 124	-282 ± 45	-383 ± 30	-	-	-165 ± 20	-267 ± 38	-180 ± 14
b_{23}	-	-	-	-350 ± 65	-270 ± 47	-	-	-	79 ± 14	-	-	160 ± 14
b_{24}	-	-	-	-336 ± 68	-319 ± 49	-	-236 ± 45	-310 ± 30	-73 ± 14	-146 ± 20	-273 ± 38	75 ± 14
b_{34}	-	-	-	-423 ± 49	-1580 ± 124	-496 ± 45	-908 ± 30	-501 ± 14	-577 ± 20	-699 ± 38	-555 ± 14	

*- coeficientes não significativos.

A observação dos efeitos significativos dos modelos individuais evidenciou a relação não-linear entre as áreas cromatográficas obtidas para cada conjunto experimental SPME, devido à presença de vários efeitos significativos de segunda ordem. Além disso, pode ser também notado muitos efeitos significativos de interação entre as variáveis. Neste caso, uma otimização univariada clássica se torna inconveniente, desde que ela pode conduzir à seleção de variáveis operacionais distantes do ótimo, resultando em sensibilidade e detectabilidade significativamente reduzidas considerando o máximo desempenho do método.

Para as variáveis C_{NaCl} e T , a maioria dos coeficientes se apresentaram positivos enquanto para as variáveis t e C_{MeOH} os coeficientes se mostraram em grande parte negativos, indicando direções distintas dos valores das variáveis experimentais para o aumento das respostas cromatográficas, para a maioria dos PCB estudados. Assim, geralmente, a adição de NaCl e o aumento na temperatura de extração aumentam a eficiência de extração dos PCB. Por outro lado, o indicativo é que menores períodos de tempo e baixas concentração do co-solvente metanol ampliam a eficiência de extração na região experimental avaliada.

A qualidade do ajuste dos modelos individuais foi estimada através da análise de variância (ANOVA) apresentada na tabela 9.

Tabela 9 - Avaliação da regressão e da falta de ajuste para os modelos individuais dos PCB, ao nível de significância de 0,05.

	F_{calc}	F_{dist}	F_{calc}	F_{dist}	F_{calc}	F_{dist}	F_{calc}	F_{dist}
	PCB 28		PCB 52		PCB 74		PCB 101	
Regressão	<u>5,45</u>	$1,07 \times 10^{-2}$	<u>6,06</u>	$7,60 \times 10^{-3}$	<u>6,89</u>	$7,90 \times 10^{-3}$	<u>9,59</u>	$1,60 \times 10^{-3}$
F. Ajuste	1,11	$4,61 \times 10^{-1}$	2,39	$2,09 \times 10^{-1}$	<u>39,02</u>	$6,40 \times 10^{-3}$	<u>50,49</u>	$1,10 \times 10^{-3}$
R²	0,905		0,914		0,923		0,944	
	PCB 118		PCB 153		PCB 138		PCB 187	
Regressão	<u>8,22</u>	$2,70 \times 10^{-3}$	<u>4,34</u>	$2,16 \times 10^{-2}$	<u>5,09</u>	$1,89 \times 10^{-2}$	<u>4,96</u>	$1,43 \times 10^{-2}$
F. Ajuste	<u>300,87</u>	$3,00 \times 10^{-5}$	<u>768,18</u>	$5,00 \times 10^{-6}$	<u>646,95</u>	$1,00 \times 10^{-4}$	<u>3589,24</u>	$2,00 \times 10^{-7}$
R²	0,935		0,884		0,899		0,897	
	PCB 128		PCB 156		PCB 180		PCB 170	
Regressão	<u>6,23</u>	$1,89 \times 10^{-2}$	<u>4,83</u>	$1,55 \times 10^{-2}$	<u>4,516</u>	$1,910 \times 10^{-2}$	<u>3,28</u>	$4,84 \times 10^{-2}$
F. Ajuste	<u>3364,07</u>	$3,00 \times 10^{-7}$	<u>2491,81</u>	$5,00 \times 10^{-7}$	<u>1064,94</u>	$3,000 \times 10^{-6}$	<u>5810,20</u>	$9,00 \times 10^{-8}$
R²	0,916		0,894		0,888		0,851	

Valores sublinhados indicam valores de F{calc} significativos em relação aos valores da distribuição de F tabelado.

De acordo com a Tabela 9, as regressões para todos os PCB estudados foram estatisticamente válidas, ao nível de significância de 0,05, mas também ocorreu falta de ajuste dos modelos para a maioria dos analitos ao mesmo nível de confiança. Novamente, esta é uma confirmação, pelo menos para o problema analítico estudado aqui, que existe uma dependência não-linear entre as massas extraídas e os parâmetros operacionais SPME. Além disso, pelos coeficientes significativos das interações entre as variáveis, pode-se estimar que o efeito das variações dos parâmetros operacionais na eficiência de extração não é independente. Por isso, a aplicação dos modelos MLR para a otimização individual dos PCB é questionável.

Ainda, os modelos individuais são diferentes, cada um gerou condições operacionais distintas, tornando a escolha de uma condição particular para a extração simultânea dos PCB essencialmente subjetiva.

A causa para esta complexa dependência entre a eficiência de extração e os parâmetros experimentais pode ser discutida em termos dos aspectos cinéticos e termodinâmicos da *headspace* SPME. Os efeitos individuais dos parâmetros operacionais básicos, tais como tempo e temperatura de extração e força iônica do meio podem ser tratados considerando a teoria da SPME (51):

a) Quando a fibra é exposta à amostra ou ao *headspace* da amostra, os analitos transportados para a superfície da fibra por difusão ou convecção podem ser sorvidos pela fibra. Eventualmente, um equilíbrio entre as espécies sorvidas no recobrimento da fibra, dissolvidas na amostra, e presentes no *headspace* é alcançado. Após esse tempo de equilíbrio, as massas extraídas se apresentam maximizadas e permanecem constantes.

b) No equilíbrio, a massa extraída depende da concentração do analito na amostra e das constantes de equilíbrio da distribuição dos analitos entre a fibra, a matriz da amostra, e o *headspace*. Estas constantes, e assim as massas extraídas, são função da temperatura, usualmente decrescendo a temperaturas muito altas.

c) A presença de eletrólitos nas amostras aquosas, tais como NaCl, em quantidades da ordem de grandeza de suas soluções saturadas, decresce a atividade do solvente (água), aumentando a atividade do analito e deslocando o equilíbrio de extração. Na maioria dos casos, especialmente para espécies não-polares, a massa extraída aumenta quando eletrólitos fortes são adicionados a amostras aquosas.

Finalmente, pode ser mostrado que amostras aquosas adicionadas de pequenas quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água, tais como metanol ou acetonitrila, podem ter ampliada a eficiência de extração de compostos altamente hidrofóbicos (52), tais como os PCB, desde que reduzem as quantidades perdidas por adsorção nas superfícies dos frascos, barra magnética, gotículas de gordura, ou agregados protéicos do leite. Entretanto, esse efeito é devido ao aumento na solubilidade dos analitos no meio; um aumento excessivo de co-solvente pode mudar as constantes de equilíbrio amostra/*headspace* e amostra/fibra para os analitos, reduzindo as quantidades extraídas na condição de equilíbrio.

Por isso, dependências complexas entre a eficiência de extração e os parâmetros operacionais são esperadas em aplicações de SPME; o efeito líquido das mudanças dos valores desses parâmetros é quase imprevisível. De qualquer modo, a obtenção de diferentes parâmetros SPME ajustados que satisfaçam simultaneamente altas extrações dos 12 PCB, requer a aplicação de estratégias matemáticas e computacionais mais adequadas com o objetivo de alcançar o compromisso ideal, ou quase ideal, entre altos valores de áreas cromatográficas e valores operacionais adequados de C_{NaCl} , T , t e C_{MeOH} . Esta proposta pode ser resumida em uma abordagem que considera simultaneamente os efeitos dos parâmetros operacionais e todos os compostos estudados – i.e., a abordagem de otimização simultânea neuro-genética.

1.5.2.2 Aplicação da Abordagem Neuro-Genética

As arquiteturas das redes neurais artificiais geradas foram avaliadas de acordo com a soma do erro quadrático médio (RMSE) (Figura 21) e através do comportamento dos resíduos (Figura 22).

Foram calculados também os valores dos erros relativos de cada amostra, que se apresentaram relativamente baixos exceto para alguns PCB em determinados pontos do planejamento cujas condições experimentais não se apresentavam favoráveis à extração.

A Figura 21 mostra os valores de RMSE durante o processo de treinamento obtidos da arquitetura escolhida. A fim de manter o compromisso entre os valores de RMSE que pudessem satisfazer o modelamento de todos PCB foi decidido proceder a abordagem neuro-genética utilizando a rede obtida do quinto treinamento, constituída de 15 neurônios na camada intermediária.

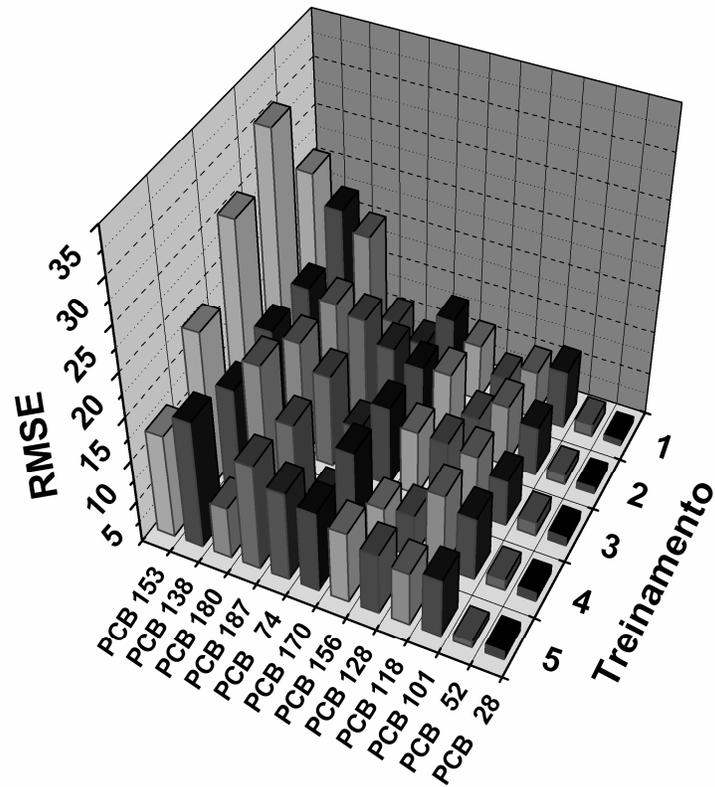


Figura 21. Valores de RMSE para cada PCB estudado, obtidos durante o processo de treinamento da rede neural com 15 neurônios.

As distribuições dos resíduos para a rede ótima são apresentadas na Figura 22.

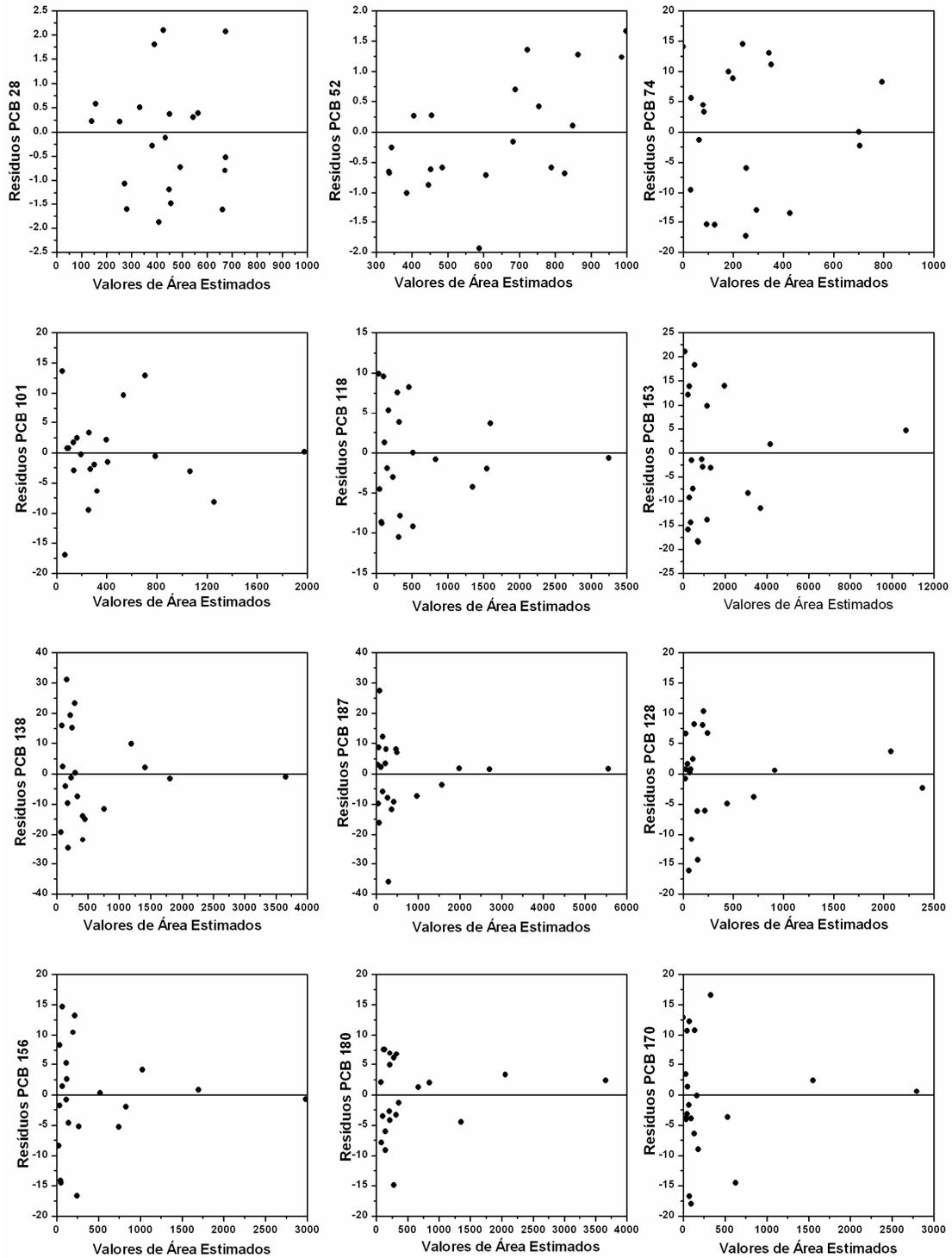


Figura 22. Resíduos obtidos para os PCB estudados da rede BRANN otimizada.

Os gráficos da Figura 22 mostram distribuições aleatórias dos resíduos sem qualquer tendência evidente, indicando que os dados foram modelados de maneira adequada.

Assim, após a definição da rede neural, foi utilizada a rotina de algoritmo genético para a otimização dos parâmetros experimentais, ou seja, para se obter as melhores condições de C_{NaCl} , T , t e C_{MeOH} que produzissem as maiores respostas possíveis de todos os PCB simultaneamente. O algoritmo genético processou uma função matemática de minimização que foi construída utilizando a rede otimizada. Logo, a saída da rede (áreas cromatográficas de todos os PCB) constituiu a entrada do algoritmo genético, através da função de minimização.

O algoritmo genético forneceu as melhores condições experimentais que maximizam as respostas dos PCB simultaneamente como $C_{NaCl} = 0,36 \text{ g mL}^{-1}$, $T = 95,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 60 \text{ min}$ e adição de $210 \text{ } \mu\text{L}$ de metanol ao meio. Estes parâmetros instrumentais estão de acordo com a indicação do planejamento Doehlert de que altos valores das respostas cromatográficas são obtidos com altos valores dos parâmetros C_{NaCl} e T . Entretanto, valores intermediários de C_{MeOH} e t que otimizam a eficiência de extração não ficaram claros quando da avaliação pela regressão linear múltipla.

A Figura 23 compara cromatogramas obtidos usando as condições não otimizadas e a condição otimizada pela abordagem neuro-genética. Pode ser notado um aumento expressivo das magnitudes dos picos para o cromatograma multioptimizado, especialmente para os PCB de baixo peso molecular (PCB 28, PCB 52, PCB 74 e PCB 101). Para os PCB de maiores pesos moleculares, os incrementos dos sinais não foram tão expressivos desde que estes foram usados como referência para implementar os picos de menores áreas.

Esses resultados vêm do fato de que o objetivo do trabalho foi obter um compromisso entre valores experimentais coerentes e aplicáveis e valores consideráveis e maximizados de área dos picos dos PCB. Com o incremento nas áreas dos PCB foi possível obter condições de maior reprodutibilidade das medidas em relação aos compostos de menor peso molecular, considerando a maior volatilidade destes quando comparados aos outros PCB.

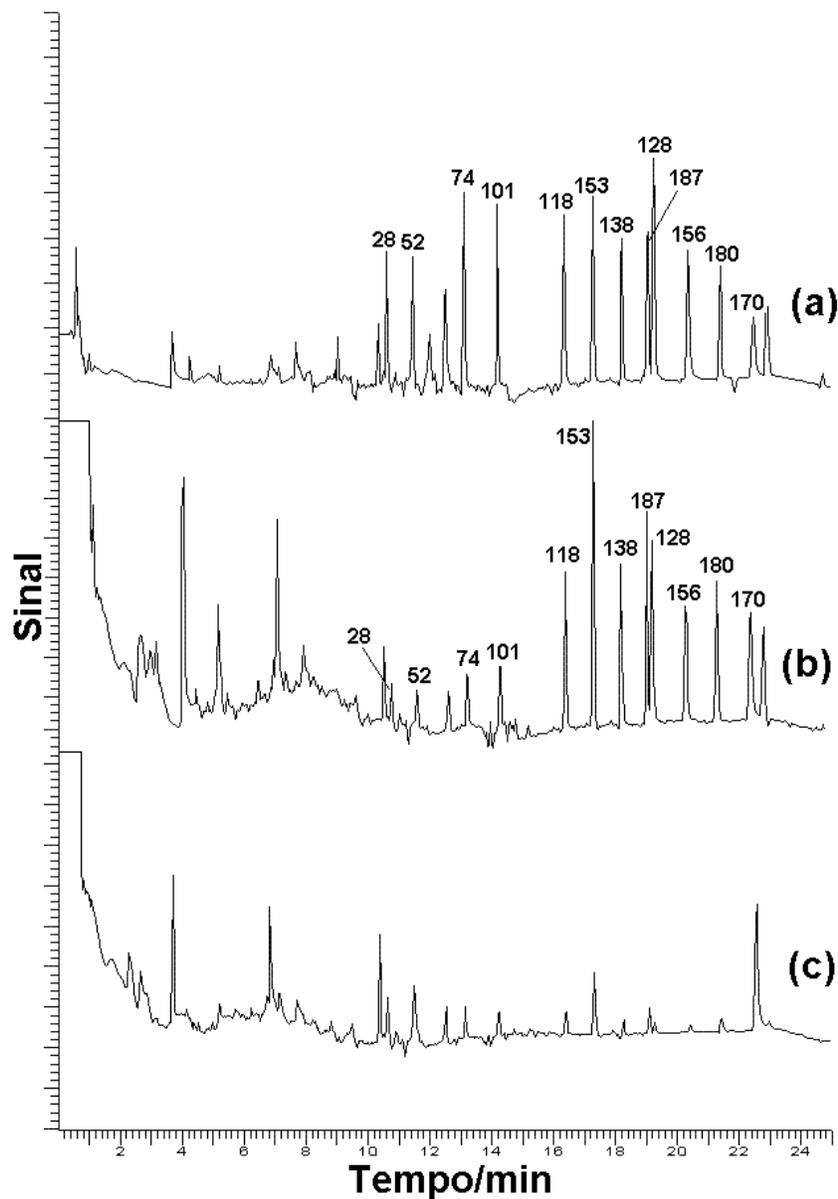


Figura 23. Cromatogramas obtidos da matriz láctea dopada com $9,25 \text{ mg L}^{-1}$ de cada PCB. (a) Cromatograma obtido após o tratamento dos dados com abordagem neuro-genética; (b) Ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a região experimental ótima, com $C_{\text{NaCl}} = 0,09 \text{ g mL}^{-1}$, $T = 95 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 70 \text{ min}$ e $C_{\text{MeOH}} = 50 \text{ } \mu\text{L mL}^{-1}$; (c) Ponto experimental do planejamento Doehlert, indicando a pior região experimental, com $C_{\text{NaCl}} = 0,18 \text{ g mL}^{-1}$, $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$, $t = 70 \text{ min}$ e $C_{\text{MeOH}} = 50 \text{ } \mu\text{L mL}^{-1}$.

O incremento geral dos valores das áreas cromatográficas dos PCB mostra o quão útil e promissor o processo de otimização simultânea através da abordagem neuro-genética apresentada pode ser para o tratamento de medidas multi-respostas.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Despagne, F.; Massart, D. L. Neural networks in multivariate calibration. *Analyst* **1998**, 123, 157R-178R.
2. Zupan, J.; Gasteiger, J. *Neural networks in chemistry and drug design*. 2 ed.; WILEY-VCH VERLAG GMBH: NEW YORK, 1999.
3. Haykin, S. *Redes Neurais - Princípios e prática*. 2 ed.; BOOKMAN: PORTO ALEGRE, 2001.
4. Kovács, Z. L. *Redes neurais artificiais fundamentos e aplicações*. 2 ed.; SAO PAULO, 1996.
5. da Silva, G. A.; Augusto, F.; Poppi, R. J. Simultaneous optimization by neuro-genetic approach of a multiresidue method for determination of pesticides in *Passiflora alata* infuses using headspace solid phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1138, (1-2), 251-261.
6. MacKay, D. J. C. a practical Bayesian framework for backpropagation networks. *Neural Comput.* **1992**, 4, 415-447.
7. Burden, F. R.; Winkler, D. A. Robust QSAR models using Bayesian regularized neural networks. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3183-3187.
8. Kumar, P.; Merchant, S. N.; Desai, U. B. Improving performance in pulse radar detection using Bayesian regularization for neural network training. *Digit. Signal Prog.* **2004**, 14, 438-448.
9. Burden, F. R.; Winkler, D. A. A quantitative structure-activity relationships model for the acute toxicity of substituted benzenes to *Tetrahymena pyriformis* using Bayesian-regularized neural networks. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, 436-440.
10. Lucasius, C. B.; Kateman, G. Understanding and using genetic algorithms. Part 1. Concepts, properties and context. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* **1993**, 19, 1-33.
11. Salomon, R. Evolutionary algorithms and gradient search: similarities and differences. *IEEE Trans. Evolut. Comput.* **1998**, 2, (2), 45-55.

12. Zitzler, E.; Thiele, L. Multiobjective evolutionary algorithms: A comparative study. *IEEE Trans. Evolut. Comput.* **1999**, 3, (4), 257-271.
13. Pereira-Filho, E. R.; Mello, C.; Filho, P. A. C.; Arruda, M. A. Z.; Poppi, R. J. Neuro-genetic approach for optimisation of the spectrophotometric catalytic determination of cobalt. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 433, 111-117.
14. Holland, J. H. Genetic algorithms. *Sci. Am.* **1992**, 267, (1), 66-72.
15. Li, T. H.; Lucasius, C. B.; Kateman, G. Optimization of calibration data with the dynamic genetic algorithm. *Anal. Chim. Acta* **1992**, 268, (1), 123-134.
16. Shukla, K. K. Neuro-genetic prediction of software development effort. *Inform. Software Tech.* **2000**, 42, 701-713.
17. Gestal, M.; Gómez-Carracedo, M. P.; Andrade, J. M.; Dorado, J.; Fernández, E.; Prada, D.; Pazos, A. classification of apple beverages using artificial neural networks with previous variable selection. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 524, 225-234.
18. Wienke, D.; Lucasius, C.; Ehrlich, M.; Kateman, G. Multi-criteria target vector optimization of analytical procedures using a genetic algorithm. II. Polyoptimization of the photometric calibration graph of dry glucose sensors for quantitative clinical analysis. *Anal. Chim. Acta* **1993**, 271, (2), 253-268.
19. Zhang, Z.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M. Multiobjective optimization of simulated moving bed and varicol processes using a genetic algorithm. *J. Chromatogr. A* **2003**, 989, 95-108.
20. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y.; Kaufman, L. *Chemometrics: A textbook*. ELSEVIER INC: AMSTERDAM, 1988.
21. Centner, V.; Verdu-Andres, J.; Walczak, B.; Jouan-Rimbaud, D.; Despagne, F.; Pasti, L.; Poppi, R. J.; Massart, D. L.; Noord, O. E. Comparison of multivariate calibration techniques applied to experimental NIR data sets. *Appl. Spectrosc.* **2000**, 54, (4), 608-623.
22. Kowalski, C. H.; da Silva, G. A.; Poppi, R. J.; Godoy, H. T.; Augusto, F. Neuro-genetic multioptimization of the determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography with electron capture detection. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 585, (1), 66-75.
23. Ray, K. S.; Ghoshal, J. Neuro-genetic approach to multidimensional fuzzy reasoning for pattern classification. *Fuzzy Sets and Systems* **2000**, 112, 449-483.
24. Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. *Chemometrics - A practical guide*. JOHN WILEY & SONS INC: NEW YORK, 1998.

25. Ferreira, M.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. Chemometrics I: Multivariate calibration, a tutorial. *Quim. Nova* **1999**, 22, (5), 724-731.
26. Ferreira, S. L. C.; Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M. Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry - Review. *Talanta* **2004**, 63, 1061-1067.
27. Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quim. Nova* **2006**, 29, 338-350.
28. Dhawan, K.; Dhawan, S.; Sharma, A. Passiflora: a review update. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 94, (1), 1-23.
29. Bicchì, C.; Cordero, C.; Iori, C.; Rubiolo, P.; Sandra, P.; Yariwake, J. H.; Zuin, V. G. SBSE-GC-ECD/FPD in the analysis of pesticide residues in *Passiflora alata* Dryander herbal teas. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, (1), 27-33.
30. Sartoratto, A.; Augusto, F. Application of headspace solid phase microextraction and gas chromatography to the screening of volatile compounds from some Brazilian aromatic plants. *Chromatographia* **2003**, 57, (5-6), 351-356.
31. Farmacopéia Brasileira, Andrei. SAO PAULO, 1977.
32. Oga, S.; Freitas, P. C. D.; Silva, A. C. G.; Hanada, S. Pharmacological trials of crude extracts of *Passiflora alata*. *Planta Med.* **1984**, 51, 303-306.
33. Zuin, V. G.; Lopes, A. L.; Yariwake, J. H.; Augusto, F. Application of a novel sol-gel polydimethylsiloxane-poly(vinyl alcohol) solid-phase microextraction fiber for gas chromatographic determination of pesticide residues in herbal infusions. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1056, (1-2), 21-26.
34. Lopes, A. L.; Augusto, F. Preparation and characterization of polydimethylsiloxane/poly(vinylalcohol) coated solid phase microextraction fibers using sol-gel technology. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1056, 13-19.
35. Demuth, H.; Beale, M. *Neural network toolbox version 4.0 for use with MATLAB*, THE MATHWORKS INC: NATICK, 2002.
36. Wise, B. M.; Gallagher, N. B.; Bro, R.; Shaver, J. M.; Winding, W.; Kock, R. S. *PLS toolbox 3.5 for use with MATLAB*, EIGENVECTOR RESEARCH INC: MANSON, 2005.
37. Houck, C.; Joines, J.; Kay, M. *A genetic algorithm for function optimization: A MATLAB implementation*, NCSU-IE, Technical Report, 95-09. NORTH CAROLINE STATE UNIVERSITY.
38. Osyczka, A. *Multicriterion optimization in engineering*. JOHN WILEY & SONS INC: CHICHESTER, 1984.

39. Gergely, S.; Bekassy-Molnar, E.; Vatai, G. The use of multiobjective optimization to improve wine filtration. *J. Food Eng.* **2003**, 58, 311-316.
40. Augusto, F.; Valente, A. L. P. Applications of Solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends Anal. Chem.* **2002**, 21, (6,7), 428-438.
41. Augusto, F.; Lopes, A. L.; Zini, C. A. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Trends Anal. Chem.* **2003**, 22, (3), 160-169.
42. Simplício, A. L.; Boas, L. V. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J. Chromatogr. A* **1999**, 833, 35-42.
43. Oliveira, A. M.; Pereira, N. R.; Marsaioli Jr., A.; Augusto, F. Studies on the aroma of cupuassu liquor by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1025, 115-124.
44. WHO. *Polychlorinated biphenyls: Human health aspects. Concise International Chemical Assessment Document, 55, 2003.* GENEVA.
45. Norén, K.; Meironyté, D. Certain Organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years. *Chemosphere* **2000**, 40, 1111-1123.
46. WHO. *Polychlorinated biphenyls and terphenyls, 2nd. 1993.* GENEVA.
47. Jaraczewska, K.; Lulek, J.; Covaci, A.; Voorspoels, S.; Kaluba-Skotarczak, A.; Drews, K.; Schepens, P. Distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkopolska region, Poland. *Sci. Total Environ.* **2006**, 372, 20-31.
48. Moffat, C. F.; Whittle, K. J. *Environmental contaminants in food.* SHEFFIELD ACADEMIC PRESS: ENGLAND, 1999.
49. Pereira, M. S.; Kuch, B. Heavy metals, PCDD/F and PCB in sewage sludge samples from two wastewater treatment facilities in Rio de Janeiro state, Brazil. *Chemosphere* **2005**, 60, 844-853.
50. Rohrig, L.; Meisch, H. U. Application of solid phase micro extraction for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, (1), 106-111.
51. Pawliszyn, J. *Solid phase microextraction: Theory and practice.* WILEY-V C H VERLAG GMBH: NEW YORK, 1997.

52. Garcia-Falcon, M. S.; Perez-Lamela, M.; Simal-Gándara, J. Comparison of strategies for extraction of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 6897-6903.

CAPÍTULO 2

*ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO PERFIL VOLÁTIL
DE CERVEJAS BRASILEIRAS EM LATA
EMPREGANDO REDE NEURAL DE KOHONEN*

2. ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO PERFIL VOLÁTIL DE CERVEJAS BRASILEIRAS EM LATA EMPREGANDO REDE NEURAL DE KOHONEN

2.1 REDE NEURAL DE KOHONEN

Teuvo Kohonen (1) introduziu o conceito de mapas auto-organizáveis de características topológicas, os quais são mapas que preservam a topologia de uma representação multidimensional dentro de um novo arranjo de dimensões bastante reduzidas de neurônios. Assim, surgiu a rede neural artificial de Kohonen que constitui um sistema de auto-organização capaz de resolver problemas não-supervisionados. Isto significa que durante o processo de aprendizagem ou treinamento não é necessária a apresentação dos valores de saída da rede (2). Esse tipo de rede apresenta a habilidade de projetar dados de alta dimensão em um espaço de baixa dimensão, especialmente o espaço bidimensional, sem perda da informação original.

A visualização e interpretação da rede de Kohonen vêm principalmente do fato de que o usuário pode assumir que todas as amostras posicionadas em um mesmo neurônio são consideradas semelhantes entre si, de acordo com o aspecto avaliado. Outro ponto é a possibilidade de formação de conjuntos de amostras que são consideradas possuírem as mesmas características avaliadas, devido à localização em neurônios próximos (neurônios vizinhos). Essa facilidade de visualização da distribuição dos dados é uma de suas principais características, resultando em um método mais amigável de interpretação dos dados. Desse modo, a rede de Kohonen usualmente consiste de uma única camada de neurônios tipicamente arranjados em um espaço bidimensional. Outros arranjos com maiores dimensões são possíveis, entretanto são menos comuns (3-5).

Um esquema geral da rede de Kohonen pode ser visualizado na Figura 24. Os neurônios podem ser representados como colunas arranjadas em uma caixa, e estes neurônios contêm tantos níveis de pesos quantos forem os elementos dos vetores (\mathbf{x}) dos dados de entrada. Este vetor \mathbf{x} normalmente corresponde aos valores das variáveis experimentais, tais como os valores de absorbância de um espectro, ou, os tempos de

retenção de um cromatograma. Todos os neurônios conterão um número específico de pesos (\mathbf{w}), que será o mesmo para todos os neurônios, de acordo com a dimensionalidade dos vetores de entrada \mathbf{x} . Os pesos podem ser então definidos como vetores de números onde cada número está relacionado a uma variável específica do vetor de entrada. Se, por exemplo, um determinado dado de entrada possuir 40 amostras, 40 vetores de entrada \mathbf{x} serão obtidos, e a dimensionalidade desses vetores dependerá do número de variáveis contidas nos dados, ou seja, o número de elementos dos vetores. Logo também, o número de pesos de cada neurônio da rede será o mesmo que o número dos elementos dos vetores. De acordo com os valores dos pesos, variáveis específicas do vetor de entrada, que corresponde a uma amostra, serão mais representativas na descrição desta amostra e na localização desta amostra em determinado neurônio. Os valores dos pesos são estimados pela rede neural.

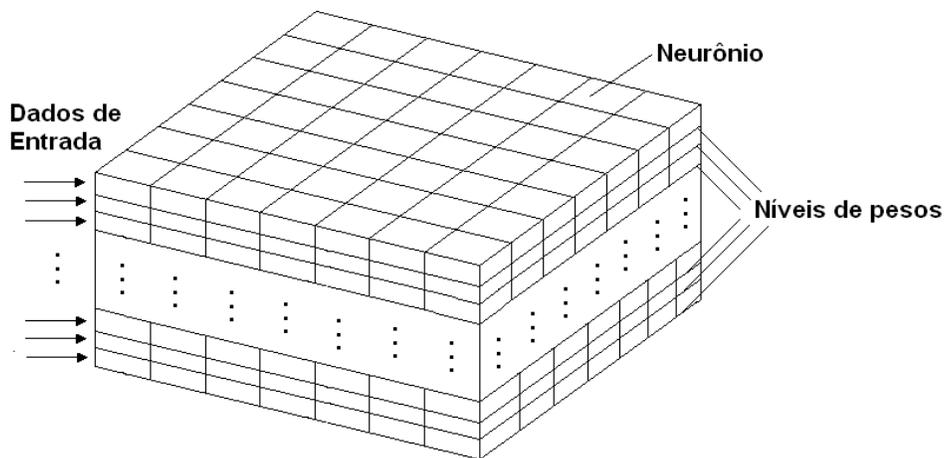


Figura 24. Arquitetura típica da rede neural de Kohonen.

No processo de análise dos dados, cada conjunto de pesos, afetado pela primeira, segunda e subseqüentes variáveis do vetor de entrada \mathbf{x} é formado em níveis separados de pesos, sobrepostos um após o outro em uma correspondência de um-para-um (Figura 24). Novamente, cada neurônio é representado por um vetor peso d -dimensional $\mathbf{w} = [w_1, w_2, \dots, w_d]$, em que d é igual a dimensão dos vetores de entrada. Generalizando, os pesos de cada neurônio são obtidos tomando todos os pesos em todos os níveis que estão exatamente alinhados em uma coluna vertical (Figura 24) (4).

Mais especificamente, quando a entrada é apresentada à rede de Kohonen, um processo de cálculo de distância entre cada vetor de dados e todos os vetores de peso da rede se inicia, de acordo com a Equação 17.

$$\text{saída} \leftarrow \min \left[\sum_{i=1}^m (x_{si} - w_{ji})^2 \right] \quad j = 1, 2, \dots, n \quad (\text{Equação 17})$$

Em que o índice j se refere a um neurônio particular; n é o número de neurônios; m é o número de pesos por neurônio; e s identifica uma entrada particular.

O neurônio cujo vetor peso \mathbf{w} é mais próximo do vetor de entrada \mathbf{x} , produzindo a menor diferença entre os valores do vetor de entrada e do vetor peso, é chamado de neurônio vencedor c ou neurônio central. Em outras palavras, o neurônio vencedor é aquele cuja diferença entre seu vetor peso \mathbf{w} e o vetor de entrada \mathbf{x} produz um mínimo na saída da rede. O processo de treinamento da rede de Kohonen é denominado aprendizagem competitiva, já que os neurônios da camada ativa competem entre si para serem selecionados (tornarem-se ativos), com a condição de que somente um neurônio é selecionado após cada entrada ocorrer. Essa característica torna a aprendizagem competitiva muito adequada para descobrir características estaticamente importantes que podem ser utilizadas para classificar um conjunto de padrões de entrada (4).

Depois que o neurônio vencedor é localizado, a correção dos pesos (adaptação da rede ou aprendizagem) se inicia. Este procedimento demonstra outra importante característica da rede de Kohonen, que a torna muito similar à rede neural biológica, a capacidade de implementação das correções. A correção dos pesos não afeta todos os neurônios na rede, mas somente um pequeno número deles: aqueles que estão topologicamente próximos ao neurônio vencedor, i.e., a vizinhança (5).

A vizinhança de um neurônio é normalmente disposta em quadrados ou em hexágonos, o que significa que cada neurônio tem quatro ou seis vizinhos mais próximos. Entretanto, o conceito de “vizinhos mais próximos” requer alguma elaboração, e, por exemplo, a vizinhança quadrada é freqüentemente mencionada como tendo oito e não quatro vizinhos mais próximos (Figura 24). Essa inspeção é feita tomando-se um neurônio e contando-se o número de colunas que “circundam” essa

unidade (Figura 24). Certamente, os pontos nos cantos de uma grade retangular estão mais distantes do ponto central quando comparados aos primeiros vizinhos reais; mas o interesse está na topologia, isto é, nas conexões e não nas distâncias reais. Na concepção Kohonen de redes neurais, a similaridade de sinal está relacionada com as relações espaciais (topológicas) entre os neurônios na rede (6).

Em termos específicos, considerando que $h_{j,c}$ represente a vizinhança topológica centrada no neurônio vencedor c , abrangendo um conjunto de neurônios, um neurônio típico deste conjunto é representado por j . Considerando que $d_{j,c}$ represente a distância lateral entre o neurônio vencedor c e o neurônio j , a vizinhança topológica $h_{j,c}$ é uma função que deve satisfazer no mínimo a duas condições (4):

a) A função vizinhança topológica $h_{j,c}$ é simétrica em relação ao ponto máximo definido por $d_{j,c} = 0$; em outras palavras, ela alcança seu valor máximo no neurônio vencedor c para o qual a distância $d_{j,c}$ é zero.

b) A amplitude da vizinhança topológica $h_{j,c}$ decresce monotonicamente com o aumento da distância lateral $d_{j,c}$, decaindo a zero para $d_{j,c} \rightarrow \infty$; esta é uma condição necessária para a convergência. Logo, a função vizinhança topológica, também chamada função escalamento de correção, é dita função dependente da topologia (6).

Uma escolha típica de $h_{j,c}$ que satisfaz estas condições e é independente da localização do neurônio vencedor é a função gaussiana, descrita pela Equação 18 e exemplificada na Figura 25.

$$h_{j,c(x)} = \exp\left(-d_{j,c}^2/2\sigma^2\right) \quad (\text{Equação 18})$$

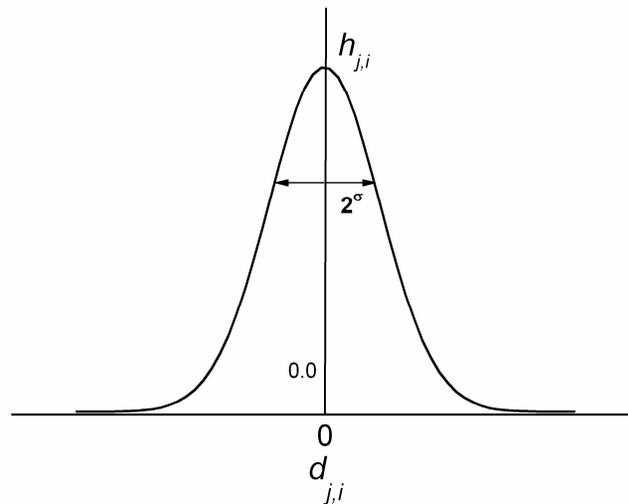


Figura 25. Função de vizinhança gaussiana.

O parâmetro σ é a largura efetiva da vizinhança topológica, como ilustrado na Figura 25; ele mede o grau com o qual neurônios na vizinhança do neurônio vencedor participam do processo de aprendizagem.

O processo de correção dos pesos da rede ocorre em períodos definidos previamente chamados iterações ou ciclos. De maneira simplificada, o algoritmo para um ciclo de aprendizagem da rede de Kohonen pode ser descrito como se segue:

- Um objeto m -dimensional \mathbf{x} é apresentado à rede e as respostas de todos os neurônios (cada um contendo m pesos) são calculadas;
- O neurônio vencedor é encontrado, sua saída é a mais similar à entrada, e o conjunto da vizinhança é coletado;
- Os pesos do neurônio vencedor são corrigidos para implementar sua resposta para a mesma entrada \mathbf{x} no próximo ciclo e os pesos de todos os neurônios da vizinhança do neurônio vencedor também são corrigidos;
- O próximo objeto m -dimensional \mathbf{x} é apresentado à rede e o processo se repete (3,5).

Como mencionado, a facilidade de visualização e interpretação proporcionadas pela rede de Kohonen se oriunda do fato de que o usuário pode assumir que todas as amostras localizadas em um mesmo neurônio não são consideradas diferentes entre si de acordo com o aspecto avaliado (considerando a Figura 24 seria o equivalente a dizer

que diferentes vetores de dados de entrada seriam localizados em uma mesma coluna). Então, estas amostras podem ser consideradas apresentarem o mesmo comportamento para a propriedade estudada. O outro aspecto importante é a capacidade de formação de grupamentos de amostras na rede, que também são consideradas apresentarem as mesmas características avaliadas pela locação em neurônios diferentes, mas vizinhos. Esta suposição é baseada no modo de processamento da rede de Kohonen, que considera que quanto mais distante uma amostra for alocada em relação a outra, maiores diferenças podem ser apontadas entre elas.

O fato da rede de Kohonen elucidar a relação entre as amostras em um espaço bidimensional, um plano, torna este o principal aspecto vantajoso em relação a outras rotinas de análise exploratória, como o método da Análise das Componentes Principais (Principal Component Analysis - PCA) (7), onde na maioria dos casos é necessário trabalhar em espaços multidimensionais fornecidos pelas componentes principais (Principal Component - PC). Para avaliar os dados torna-se necessário observar as PC de duas em duas (PC1 x PC2, PC1 x PC3, PC2 x PC3, etc.). Esse processo pode resultar em uma prática bastante tediosa, tornando difícil a análise dos dados.

2.2 CERVEJA

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais antigas do mundo, sendo constituída de uma solução aquosa de composição complexa que contém principalmente CO₂, etanol, vários sais inorgânicos e mais de 800 compostos orgânicos (Tabela 10) (8-9). Todos estes compostos influenciados por fatores físicos, químicos e biológicos são decorrentes de quatro ingredientes essenciais: água, malte (cevada germinada), lúpulo (flor européia que confere o amargor característico do produto) e leveduras (responsáveis pela fermentação). A diversidade das técnicas de misturas e de fermentação permite obter uma infinidade de diversas cervejas.

Tabela 10. Composição química típica de cervejas.

Compostos	Concentração	Número de Compostos	Fonte
Água	90 – 94 %	-	-
Etanol	2,5 -5 %	-	levedo e malte
CO₂	2,1 – 2,9 %	-	levedo e malte
Outros álcoois	0,1 – 0,3 %	15	levedo e malte
Carboidratos	1,0 – 5,0 %	≈100	malte
Sais Inorgânicos	0,5 – 0,8 %	26	água e malte
Compostos de Nitrogênio	0,26 – 0,45 %	≈100	levedo e malte
Ácidos Orgânicos	0,17 – 0,22 %	≈200	levedo e malte
Aldeídos	30 – 40 mg L ⁻¹	≈50	levedo e lúpulo
Ésteres e Cetonas	0,03 – 0,06 %	≈150	levedo e malte
Compostos de Enxofre	2,0 – 3 mg L ⁻¹	41	levedo e malte
Derivados do Lúpulo	30 – 60 mg L ⁻¹	>100	lúpulo
Vitamina B	5,0 -11 mg L ⁻¹	13	levedo e malte

A cerveja é uma das bebidas mais delicadas e lábeis possuindo um complexo, mas moderado, aroma e sabor. O equilíbrio de seus compostos voláteis e não-voláteis é responsável pela aceitação e qualidade da bebida. A composição em ésteres, aldeídos, dicetonas vicinais, ácidos orgânicos, álcoois superiores, fenóis, iso- α -ácidos e outros compostos está diretamente relacionada com a qualidade. A perda de qualidade por sabores indesejáveis é um sério problema nas indústrias cervejeiras (10).

A cerveja brasileira é de origem européia, tendo chegado ao Brasil por ocasião da vinda da corte de D. João VI. A maioria das cervejas do mercado brasileiro é do tipo Pilsen, a qual segue o padrão de elaboração dos demais países que utilizam cevada maltada e adjuntos (arroz, milho) (11). Este tipo Pilsen ou Pilsener além de ser o mais produzido é o mais promovido e conhecido no Brasil (12).

A cerveja Pilsen é do tipo *lager*, uma cerveja de baixa fermentação obtida pela ação da levedura *Saccharomyces uvarum*, que trabalha na faixa de temperatura entre 5 e 15 °C e deposita-se no fundo da cuba, durante ou após a fermentação (11).

As cervejas *lagers* diferenciam-se por apresentarem um nível mais alto de certos compostos sulfurosos, destacando-se o dimetilsulfeto, sendo apontado como um constituinte essencial para o sabor das *lagers* (13).

Devido à complexidade da composição da cerveja, faz-se necessário determinar um grande número dos seus constituintes para se obter uma razoável caracterização química. Por isso, análises multicomponentes podem ser ferramentas muito valiosas na autenticação e caracterização de amostras de cerveja. Substâncias responsáveis pelo aroma são muito importantes para a composição da cerveja desde que constituem a maior contribuição para a qualidade do produto final; e, como há um grande número de compostos voláteis, é possível realizar um processo de caracterização da cerveja através desses compostos.

Uma ampla variedade de compostos voláteis decorrentes da fermentação do açúcar (maltose) pelas leveduras é responsável pelo sabor característico das cervejas. Estes compostos voláteis pertencem a grupos bastante heterogêneos tais como os álcoois, compostos nitrogenados, ácidos orgânicos, aldeídos, ésteres, cetonas, aminas, entre outros (14-15).

Um melhor conhecimento dos compostos de aroma chave pode ser de significativa importância, já que esta informação é valiosa para a tecnologia da fabricação da cerveja, particularmente na seleção das matérias-primas e leveduras, para o controle de qualidade da cerveja, e desenvolvimento do produto.

Nesse sentido, a análise dos compostos de aroma pode se tornar um meio extremamente útil e eficaz capaz de permitir a caracterização de cervejas. A análise dos compostos voláteis pode ser implementada com técnicas sofisticadas de tratamento e interpretação de dados, como aquelas disponibilizadas pela quimiometria, tornando essa associação um meio eficaz para o controle de qualidade da produção da cerveja.

Considerando as atrativas características da HS-SPME na extração e pré-concentração de voláteis e os interesses das indústrias cervejeiras na caracterização da cerveja, o objetivo desse trabalho foi avaliar e caracterizar diferentes marcas comerciais

de cervejas brasileiras em lata, explorando a potencialidade da *headspace* SPME combinada à cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID), que é altamente sensível e disponível em muitos laboratórios de cromatografia, e o tratamento dos dados obtidos através de abordagem quimiométrica. Especificamente, foi utilizada a rede neural artificial de Kohonen. Adicionalmente, foram obtidos os espectros de massas de cada amostra de cerveja, fornecendo informações das composições das cervejas e permitindo a verificação de quais picos (compostos) são responsáveis pela separação das cervejas em diferentes grupos.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

Neste trabalho foram utilizadas 20 marcas de diferentes cervejas comerciais brasileiras acondicionadas em lata de alumínio, tipo Pilsen, encontradas no mercado local da cidade de Campinas, SP. A Tabela 11 mostra algumas informações comerciais disponíveis nas embalagens das cervejas avaliadas. A fim de preservar a marca e a origem das amostras não serão apresentados os nomes comerciais nem o local de fabricação das mesmas. Ainda, cada amostra de cerveja foi também codificada, de C01 a C20.

Tabela 11. Informações comerciais das cervejas em lata estudadas.

Cerveja	Cidade de fabricação	Cereais maltados	Grau alcóolico	Acidulante	Estabilizante	Antioxidante
C01	A	Não possui	4,8	-	INS 450	INS 316 e 224
C02	B	Arroz, milho	4,4	-	INS 450	INS 316
C03	A	Arroz, milho	4,6	-	INS 450	INS 316
C04	C	Arroz, milho	4,7	INS 270	INS 450	INS 316
C05	D	Arroz, milho	4,8	-	INS 450	INS 300
C06	A	Arroz, milho	4,5	-	INS 450	INS 316 e 224
C07	B	Arroz, milho	4,7	-	INS 450	INS 316
C08	A	Arroz, milho	4,6	-	-	-
C09	E	Arroz, milho	4,7	INS 270	INS 450	INS 316
C10	A	Arroz, milho	4,9	-	INS 450	INS 316
C11	A	Arroz, milho	5,0	-	INS 450	INS 316
C12	F	Arroz, milho	4,5	-	INS 450	INS 316
C13	-	Arroz, milho	4,7	-	-	INS 316
C14	F	Arroz, milho	4,5	-	INS 450	INS 316
C15	A	Arroz, milho	4,7	-	INS 450	INS 316
C16	A	-*	5,0	-	-	-
C17	B	Arroz, milho	4,7	-	INS 450	INS 316
C18	G	Arroz, milho	5,0	-	INS 450	INS 316
C19	A	Arroz, milho	4,8	-	INS 450	INS 316
C20	H	Arroz, milho	4,7	INS 270	INS 450	INS 316

*Indica ausência de informação na embalagem.

As amostras de cerveja foram submetidas a um processo de degaseificação pré-análise, mantendo-se por quinze minutos em banho de ultra-som com gelo. Todos os parâmetros cromatográficos e de extração foram previamente testados. Para as extrações, frascos de vidro de 16 mL fechados com septos de Teflon/silicone (Pierce, Rockford, USA) foram utilizados. Durante as extrações, a temperatura dos fracos foi controlada usando água aquecida circulante de um banho (Polystat, USA). A fibra

extratora escolhida possuía o recobrimento polimérico de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), devido ao melhor desempenho de extração, verificado nos perfis de cromatogramas teste. Anterior ao uso, a fibra PDMS/DVB foi condicionada de acordo com as recomendações do fornecedor.

Após a desgaseificação, as amostras foram submetidas à fase de extração por HS-SPME utilizando a fibra de PDMS/DVB. Alíquotas de 5 mL das amostras foram submetidas à agitação constante (1200 rpm) por 5 min para o equilíbrio amostra/*headspace*. Após esse tempo, a fibra PDMS/DVB foi imediatamente exposta ao *headspace* por 30 min. A temperatura foi mantida a 50 °C durante todo o processo. Previamente ao procedimento de extração, foram adicionados 27 g de NaCl por 100 mL de amostra, para controle da força iônica do meio. Logo após o término do período de extração, os compostos extraídos na fibra foram dessorvidos a 210 °C, e a fibra foi mantida no injetor do cromatógrafo por 15 min para garantir total dessorção dos analitos e evitar efeito de memória entre as corridas.

As análises cromatográficas foram realizadas no equipamento Network GC System 6890N GC-FID (Agilent Technologies), equipado com uma coluna HP-50 (50 % fenilmetilpolisiloxano) com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent, Wilmington, DE). O injetor *split-splitless* foi operado no modo *splitless* e acoplado com um *liner* adequado para SPME. Os parâmetros cromatográficos de trabalho foram: gás de arraste He (*UP grade*) com vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura do injetor de 210 °C; temperatura de detector de 280 °C; rampa linear de temperatura de 40 °C por 2 min, aumento de 10 °C/min até 140 °C, e aumento de 7 °C/min até 250 °C mantendo-se por 3 min.

Os cromatogramas para cada tipo comercial de cerveja foram obtidos em triplicata, sendo posteriormente tomados os valores de área de pico médios para cada amostra avaliada. Para analisar os dados gerados pelo sistema HS-SPME-GC-FID foi aplicada uma ferramenta quimiométrica baseada em redes neurais artificiais que permite a visualização da formação de grupamentos, denominada rede de Kohonen (2,16).

Os cálculos foram realizados no ambiente de programação MatLab 6.5 (The MathWorks, Natick, MA), e foi utilizado o *toolbox* para MatLab de rede neural artificial de

Kohonen, que é disponível para domínio público no *web site* <http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox/> (3).

Neste trabalho, a rede de Kohonen foi usada para análise exploratória objetivando a caracterização dos dados de diferentes amostras comerciais de cerveja, de acordo com as características químicas, especialmente no que se refere à constituição das cervejas. O conjunto de dados foi organizado em uma matriz de 20 linhas (20 amostras) e 32 colunas (32 variáveis). As amostras foram as 20 marcas comerciais tipo Pilsen de cervejas, e as variáveis foram os valores das áreas dos picos de cada tempo de retenção considerado, que refletiam sobre compostos específicos das cervejas. Antes do processamento dos dados realizado pela rede, todo o conjunto dos dados foi auto-escalado ao longo das variáveis. Isto significa que as variâncias das variáveis foram normalizadas (foram computados valores unitários para as variâncias) e as médias calculadas a zero. O escalamento das variáveis é de peculiar importância para a aplicação da rede de Kohonen, desde que o algoritmo utiliza a métrica euclidiana para medir a distância entre os vetores. Se uma variável possuir um valor muito alto e outra variável um valor muito baixo, a primeira dominará quase completamente a organização do mapa devido ao seu grande impacto na medida das distâncias. Tipicamente, na maioria dos casos, é desejável que as variáveis sejam igualmente importantes. Assim, o procedimento de pré-processamento garante que todos os valores das variáveis possuam o mesmo nível de importância, fazendo com que os usuários sejam capazes de avaliar a significância de todas as variáveis em todas as amostras.

Os mapas de Kohonen foram criados e inicializados linearmente. A inicialização foi feita primeiramente pelo cálculo dos autovalores e autovetores do conjunto de dados. Então, os vetores de pesos do mapa foram inicializados ao longo dos maiores autovetores da matriz de covariância, de acordo com a dimensão do mapa, que é tipicamente 2. A rede neural de Kohonen foi treinada com os dados usando o algoritmo de treinamento em batelada, no qual ao invés de se utilizar um único vetor de dados por vez, o conjunto inteiro dos dados é apresentado ao mapa antes que qualquer ajuste dos pesos seja feito. A função de vizinhança usada no treinamento foi a gaussiana, a estrutura foi hexagonal e a forma do mapa planar.

Foram treinados mapas com diferentes arquiteturas (de 4 x 4 a 10 x 10 unidades), desde que a capacidade de discriminação da rede é dependente do número de unidades selecionadas para definir o mapa. Foi escolhida a melhor estrutura que permitiu proceder uma eficiente interpretação da distribuição das amostras na rede, resultando na redução da dimensão original dos dados de 32 para 2, sem perda de informação relevante.

Através das distribuições das amostras na rede gerada é possível inferir sobre similaridades e dessemelhanças entre as cervejas em lata estudadas, baseando-se nos perfis cromatográficos gerados, especificamente nas áreas de picos, pelos sistemas de extração e detecção adotados. Os perfis refletem acerca dos voláteis extraídos, tanto em termos de composição como de concentração.

Essas deduções foram fundamentadas e complementadas pelos espectros de massas obtidos por um GC/MS, cromatógrafo a gás (modelo CP 3900) acoplado ao espectrômetro de massas tipo armadilha de íons (Ion Trap, modelo Saturn 2000), fabricado pela Varian, no modo de corrente total, com energia de impacto de elétrons de 70 eV, que permitiu avaliar as composições químicas de cada marca comercial de cerveja. Os compostos foram identificados de acordo com os espectros de massas padrão da biblioteca do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (National Institute of Standards and Technology), NIST98, além do cálculo dos índices de retenção linear *I*. Com esse estudo foi possível inferir sobre qual(is) composto(s) químico(s) é(são) responsável(is) pela semelhanças ou diferenças apontadas pelos grupamentos formados pela rede de Kohonen. As condições de extração por HS-SPME e as condições cromatográficas para a geração dos espectros de massas foram as mesmas utilizadas quando da detecção por FID (descritas anteriormente), para possibilitar a comparação dos cromatogramas gerados pelo dois sistemas de detecção.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 26 apresenta alguns cromatogramas típicos obtidos de algumas cervejas avaliadas (C03, C04, C08 e C18) com detecção por ionização por chama. É possível verificar picos que apresentam tempos de retenção semelhantes, variando em intensidade, como também a presença ou ausência de picos específicos, de acordo

com a cerveja. Esse comportamento pode ser estendido a todas as marcas. Estes fatos indicam a potencialidade da *headspace* SPME combinada com a GC-FID em obter informação suficiente para caracterizar uma amostra de constituição tão complexa, através do perfil da fração volátil, além da necessidade da utilização de procedimentos robustos e apropriados que permitam a interpretação dos dados de maneira eficaz e prática.

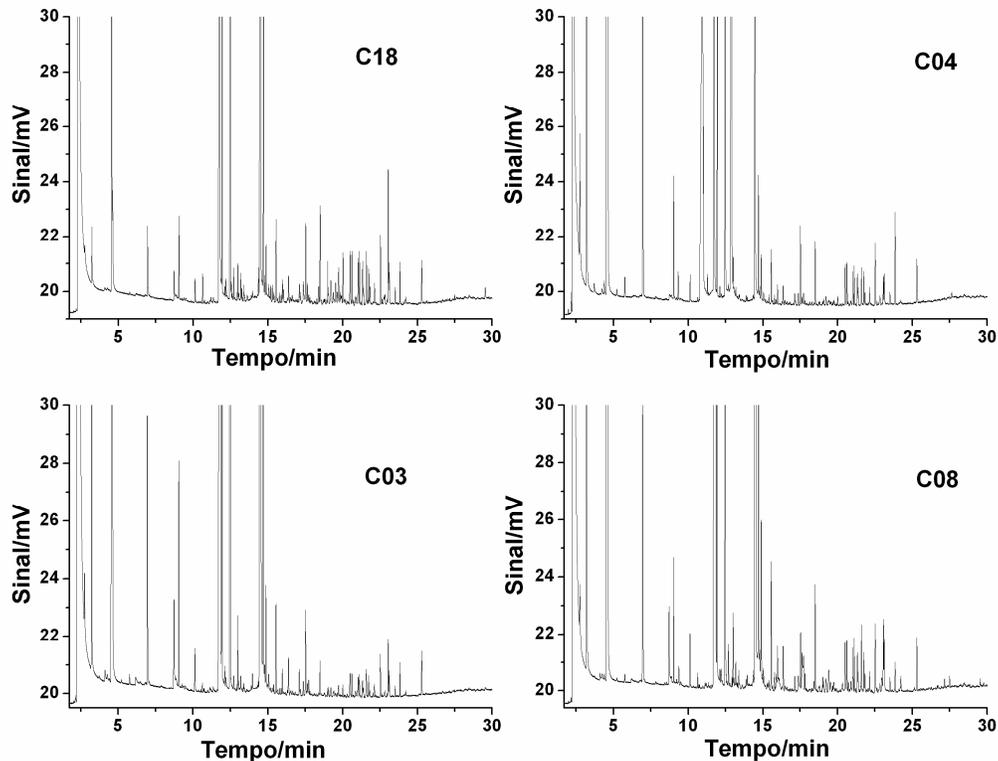


Figura 26. Cromatogramas obtidos de quatro marcas comerciais de cervejas brasileiras, C03, C04, C08 e C18, acondicionadas em lata de alumínio, por HS-SPME-GC-FID (ver Tabela 11).

A ferramenta quimiométrica rede de Kohonen foi utilizada por permitir visualizar as similaridades e diferenças das marcas estudadas, através da formação de grupamentos de acordo com as semelhanças apresentadas. Assim, o algoritmo agrupa amostras consideradas similares de acordo com o perfil químico avaliado, e separa ou distancia amostras consideradas distintas, também de acordo com o perfil avaliado.

A Figura 27 mostra o perfil de distribuição das 20 cervejas após tratamento com a rede neural de Kohonen. Para avaliação foram considerados somente os picos

significativos normalizados (32 picos), que mostraram fornecer informações suficientes para interpretação dos dados, sendo descartados os sinais que se confundiam com ruído instrumental ou de intensidade muito baixa. A otimização da arquitetura de rede, ou seja, a obtenção do melhor número de neurônios que permitiam a distribuição adequada das amostras resultou na seleção de uma arquitetura de 36 neurônios, arranjados em um quadrado 6x6, como apontado na Figura 27. Essa configuração foi alcançada após o treinamento de várias arquiteturas de rede com 4 a 10 neurônios. A normalização das áreas dos picos cromatográficos foi efetuada para garantir o mesmo peso ou nível de significância dos sinais, independente do valor absoluto, e para o funcionamento apropriado do algoritmo.

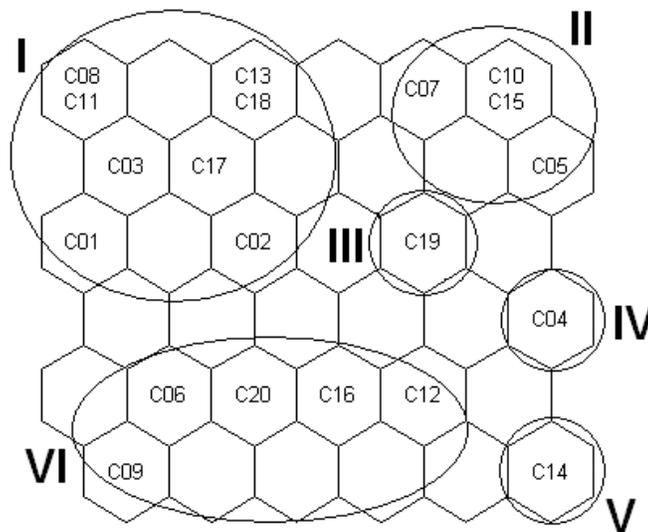


Figura 27. Perfil de distribuição das amostras após tratamento com a rede neural de Kohonen.

Através da Figura 27 é possível perceber a formação de seis conjuntos, sendo três destes conjuntos individuais. Para interpretar a formação dos grupamentos foram observados os mapas de distribuição individual das variáveis, ou seja, dos tempos de retenção (Figura 28).

A Figura 28 mostra os tempos de retenção significativos utilizados para o tratamento dos dados, i.e. t_{R3} , t_{R4} , t_{R8} , etc.

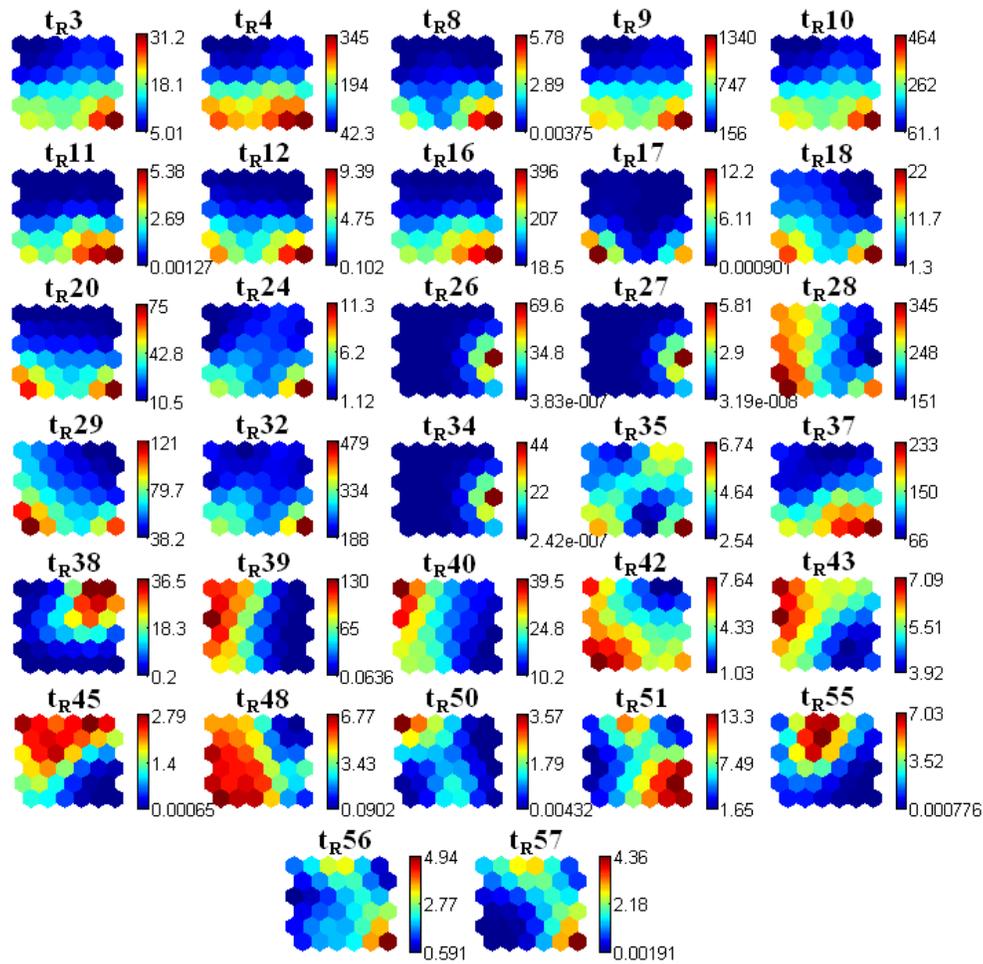


Figura 28. Mapas de distribuição individual das variáveis (tempos de retenção - t_R) utilizadas no tratamento pela rede de Kohonen. O índice numérico de t_R indica o pico que foi usado.

Assim, podemos verificar através da cor do mapa, designada pela barra de intensidade lateral a cada mapa, por exemplo, que o tempo de retenção t_{R3} foi importante para a distribuição da cerveja C14, assim como os tempos t_{R4} , t_{R8} , t_{R9} , t_{R10} , entre outros, uma vez que os valores de peso para o neurônio ativado por C14 são os mais altos. Essa avaliação foi estendida a todas as 20 amostras estudadas, podendo ser determinado quais os tempos efetivos para a distribuição das cervejas na rede. A avaliação destes mapas individuais permitiu inferir sobre o nível de significância de cada variável (tempo de retenção) para a caracterização de cada diferente grupamento das cervejas.

Os perfis cromatográficos, especificamente as áreas dos picos cromatográficos, refletem sobre os voláteis extraídos, tanto em termos de composição como de concentração. Essas deduções foram validadas e complementadas através dos espectros de massas obtidos de cada cerveja que permitiram identificar os picos dos compostos voláteis sorvidos pela fibra PDMS/DVB e, portanto, obter um perfil minucioso desses compostos de aroma que caracterizam cada cerveja (Tabela 12), conforme indicado na rede de Kohonen.

Através do mapa das amostras (Figura 27) e com as identificações promovidas pelos espectros de massas em conjunto com a observação dos mapas das variáveis (Figura 28) podemos fundamentar as semelhanças e diferenças das cervejas apontadas pelo mapa de Kohonen acerca dos compostos voláteis.

Tabela 12. Compostos identificados pelos espectros de massa das cervejas.

Pico	t _R FID* (min)	t _R MS** (min)	Composto	I
3	2,72	1,80	Dimetil sulfeto	701
4	3,19	2,39	Acetato de etila	728
8	4,38	3,48	Propanoato de etila	795
9	4,55	3,60	1-pentanol	805
10	4,60	3,66	2-metil 1-butanol	808
11	5,20	4,27	Acetato de 2-metil-propila	842
12	5,75	4,81	Butanoato de etila	873
16	6,95	5,99	Acetato de 3-metil 1-butanol	942
17	6,99	- ^{***}	-	944
18	8,76	7,86	2-pentil furano	1045
20	9,03	8,12	Hexanoato de etila	1060
24	10,11	9,21	1-octanol	1122
26	10,63	9,74	Ácido sórbico	1151
27	11,01	10,14	2-metil 3-nonanona	1173
28	11,78	10,95	Ácido octanóico	1217
29	11,93	11,78	Tiooctanoato de etila	1225
32	12,46	11,58	Álcool feniletílico	1255
34	12,90	12,05	Benzoato de etila	1280
35	13,00	12,15	1-undecanol	1286
37	14,45	13,61	Acetato de 2-feniletila	1369
38	14,49	-	-	1371
39	14,52	-	-	1373
40	14,69	13,89	Decanoato de etila	1382
42	14,87	14,02	(Z)-4-decenoato de etila	1393
43	15,55	14,70	p-vinilguaiacol	1431
45	16,36	15,55	g-nonolactona	1477
48	17,52	16,72	Hidroxitolueno butilado	1543
50	17,72	16,88	Nerolidol	1555
51	18,48	18,25	Sugestão de álcool de cadeia longa	1598
55	20,00	19,75	Provável éster de álcool feniletílico com 6 carbonos	1685
56	20,49	19,71	Isopropil naftaleno?	1713
57	20,61	19,83	Isopropil naftaleno?	1719

*O termo t_R FID indica o tempo de retenção pelo sistema de detecção por ionização por chama.

**O termo t_R MS indica o tempo de retenção pela detecção por espectrometria de massas.

***Compostos não identificados.

Através da Tabela 12 é possível visualizar a identificação de diversos tipos de compostos tais como álcoois, ésteres, um composto de sulfeto, ácido orgânico, entre

outros. Estes compostos são os principais responsáveis pelos grupamentos estabelecidos na Figura 27.

O grupo I à esquerda superior na Figura 27 constituído pelas amostras C01, C02, C03, C08, C11, C13, C17 e C18 foi formado pela presença acentuada dos compostos: ácido octanóico (t_{R28}), decanoato de etila (t_{R40}), (*Z*)-4-decenoato de etila (t_{R42}), *p*-vinilguaiacol (t_{R43}), *g*-nonalactona (t_{R45}), hidroxitolueno butilado (t_{R48}), nerolidol (t_{R50}), um álcool de cadeia longa (sugestão para t_{R51}), um éster de álcool fenilético com 6 carbonos (proposição para t_{R55}) e isopropil naftaleno, sendo sugerido aos tempos t_{R56} e t_{R57} , além de um composto não identificado no tempo t_{R39} . Essas observações foram possíveis pela análise dos mapas das variáveis mostrados na Figura 28, de acordo com as barras laterais de intensidade de cada mapa. A maior intensidade de cada composto volátil é indicada pelo maior valor da barra lateral, identificado pela cor vermelha nos mapas. Assim, as cervejas reunidas nesse conjunto podem ser então caracterizadas em termos dos voláteis extraídos acima listados.

Sobre os compostos identificados no grupo I, citações são apresentadas a seguir:

- Ácido octanóico ou caprílico já foi determinado em vinho pela análise de voláteis através de extração líquido-líquido assistida por ultrassom (17). Foi empregado no processamento de alimentos devido à sua atividade antimicrobiana, tendo sido mostrado os efeitos tóxicos em culturas de *Saccharomyces cerevisiae* (tipo de levedura usada na fabricação da cerveja), inibindo o crescimento da população do fungo, mas, contrariamente, aumentando a taxa de fermentação do meio (18);

- Ésteres voláteis são compostos encontrados na forma de traços em bebidas fermentadas tais como vinho e cerveja, mas são apontados como fortes contribuintes para o aroma e sabor das bebidas. Muitos estudos têm identificado ésteres etílicos, entre estes decanoato de etila, em diversas bebidas tais como tequila, vinhos, uísque, conhaque e rum, principalmente como o resultado do metabolismo da levedura durante o processo de fermentação, o que é também aplicado à cerveja, tornando os compostos de éster associados com agradáveis notas de frutas (19-22);

- Ésteres de decenoato foram identificados na análise de manteiga aquecida como os maiores provedores do aroma e sabor da manteiga (23), e decenoato de etila foi

também encontrado em vinho Madeira quando da análise por extração sortiva desta bebida (24);

- O composto *p*-vinilguaiacol é citado como derivado do ácido ferúlico (ácido hidroxicinâmico) durante o processo da fabricação da cerveja, e é freqüentemente encontrado em cervejas quando trigo ou malte de trigo é usado como um dos componentes na produção da cerveja (25). Isto pode ser uma indicação de que as cervejas apresentadas no grupo I são produzidas utilizando trigo ou malte de trigo, o que está em acordo com a legislação brasileira no que se refere à utilização de outros componentes na produção da cerveja, tais como açúcar e outros cereais como arroz, milho, centeio, sorgo, aveia e trigo (26);

- Com respeito ao composto *g*-nonalactona, que é conhecido por apresentar um caráter de “coco”, é encontrada citação em que este é referido como um dos compostos chave em cervejas, cuja concentração é aumentada durante o envelhecimento da cerveja, em um estudo da influência do pH e do processo de envelhecimento nas propriedades organolépticas da cerveja (27). Em outro estudo (28) é descrita uma abordagem de análise sensorial de aroma do extrato diluído para a análise do aroma de cervejas derivado do lúpulo, no qual não foi identificado o composto *g*-nonalactona nos extratos puros de lúpulo, mas os aromagramas da cerveja foram significativamente modificados após a adição do lúpulo à cerveja. É suposto então que a *g*-nonalactona possa ser derivada do metabolismo da levedura de subprodutos do ácido nonanóico. Na análise da composição do perfil volátil de vinho Baga vermelho, um dos mais influentes odorantes apontados na descrição deste vinho foi o composto *g*-nonalactona (29);

- O hidroxitolueno butilado (BHT) é um composto fenólico comumente usado como aditivo em alimentos, devido a sua atividade antioxidante. Graças a sua propriedade, ele também tem sido utilizado em produtos de borracha e petróleo e, ultimamente, em plásticos (30-31). O BHT é uma molécula pequena que exhibe alta mobilidade e, por isso, quando usada na fabricação de materiais para embalagem, tem a tendência de migrar rapidamente para o alimento (32). Um estudo foi executado para a avaliação do efeito antioxidante do BHT na conservação de amostras de cerveja submetidas a diferentes condições de armazenagem. Os autores apontaram uma baixa atividade

antioxidante do BHT provavelmente devido à sua baixa solubilidade em água (33). Ainda no que se refere à conservação de alimentos, o BHT foi realçado como um dos antioxidantes sintéticos mais usados na indústria alimentícia. O trabalho enfatiza a aplicação em óleos, gorduras e alimentos gordurosos (34). O BHT possui uma estrutura fenólica que permite a doação de um próton a um radical A livre, interrompendo a reação em cadeia deste radical A. O radical fenólico gerado se torna assim um radical livre estabilizado pelo mecanismo de ressonância do anel aromático, não promovendo ou propagando reações oxidativas (35);

- Nerolidol é um sesquiterpeno presente em óleos essenciais de diversas plantas, possuindo propriedades antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias. Nerolidol foi encontrado no aroma de mel cítrico como um possível agente botânico discriminador (36), e também foi citado num estudo de caracterização do aroma de vinhos Madeira, devido aos interessantes odores de flor dos terpenóides, como também de frutas, sementes e raízes (37-38);

- O último composto identificado no grupo I foi suposto ser isopropil naftaleno para os tempos t_{R56} ou t_{R57} . Este não é um constituinte aromático de cervejas e na literatura foi encontrada uma citação de diisopropil naftalenos que são amplamente empregados como solventes na indústria de papel. A presença de naftalenos em gêneros alimentícios deve possivelmente ocorrer devido à sua migração de embalagens de papelão (39). Embora a cerveja não seja estocada em recipientes de papelão, uma razoável justificativa é que alguns dos ingredientes possam ser armazenados ou obtidos de embalagens de papelão.

O grupo II à direita superior da Figura 27 é constituído pelas amostras C05, C07, C10 e C15. Os tempos de retenção responsáveis por essa formação correspondem à t_{R35} (1-undecanol), t_{R43} (*p*-vinilguaiacol), t_{R45} (*g*-nonalactona), t_{R55} (provável éster de álcool feniletílico com 6 carbonos) e ainda t_{R38} não identificado. Se compararmos esses tempos com os verificados para o grupamento anterior (grupo I) pode-se notar picos comuns que justificaram as duas formações. São os casos de t_{R43} , t_{R45} e t_{R55} . Isso ocorreu porque alguns compostos voláteis foram responsáveis não só pelas separações individuais ou dentro de mesmo grupo, mas também por separações em termos de lado superior e inferior ou lado direito e esquerdo. Esse é o caso, por exemplo, do tempo

t_{R45} (*g*-nonalactona) que separou o lado superior do lado inferior da rede (Figura 27), mostrando que essa substância é importante e está presente tanto nas cervejas pertencentes ao conjunto do lado superior esquerdo, quanto do lado superior direito.

Nas amostras do grupo II (Figura 27) foi significativa a quantidade do álcool superior 1-undecanol. Os álcoois constituem importantes subprodutos formados durante a fermentação da cerveja. Os álcoois contribuem para o forte e pungente odor e sabor das cervejas (40), e a sua formação está ligada à síntese de proteínas das leveduras, sendo derivados dos ceto-ácidos, que por sua vez podem ser formados por transaminação ou deaminação dos aminoácidos no mosto (cerveja não fermentada), ou sintetizados a partir de carboidratos do mosto. Os ceto-ácidos são convertidos a álcoois superiores por decarboxilação ou redução (41). Álcoois superiores são importantes precursores de ésteres ativos contribuintes para o aroma e são freqüentemente considerados como contribuintes para o positivo aroma da cerveja (40). Compostos de undecanol já foram reportados como constituintes de óleos essenciais de diversas espécies de plantas (42-43).

A amostra C19 (grupo III) assim como as amostras C04 (grupo IV) e C14 (grupo V) formam conjuntos individuais (Figura 27). A amostra C19 situada na parte central direita do mapa de Kohonen (Figura 27) foi locada próxima ao grupo II devido à presença acentuada do composto no tempo de retenção t_{R38} (composto não identificado); mas, entretanto, esta amostra não foi agrupada no conjunto II devido à maior quantidade de um álcool de cadeia longa (sugestão para t_{R51}) em comparação com as amostras do grupamento II, e também à quase ausência do composto *g*-nonalactona (t_{R45}), em contraste com as outras amostras do grupo II que mostraram a presença dessa substância nas suas porções voláteis.

Já as amostras de cerveja C04 (Grupo IV) e C14 (Grupo V) foram separadas individualmente das demais por apresentarem alguns picos bastante peculiares, não verificados nas outras cervejas. A amostra C04 localizada na porção direita da rede de Kohonen (Figura 27) apresentou os seguintes compostos: ácido sórbico (t_{R26}), 2-metil 2-nonanona, (t_{R27}), benzoato de etila (t_{R34}), um provável álcool de cadeia longa (t_{R51}) e isopropil naftaleno (sugerido aos tempos t_{R56} e t_{R57}). Os tempos t_{R26} , t_{R27} e t_{R34} se

apresentaram exclusivos à amostra C04, sendo a razão pela separação particular dessa cerveja.

O ácido sórbico é um aditivo de alimentos com atividade antimicrobiana usado para prevenir o crescimento de fungos e bactérias em diversos gêneros alimentícios (44). Ele é amplamente considerado como uma das substâncias mais ativas no controle de leveduras e outros tipos de fungos, e um dos menos ativos contra bactérias (45). Há na literatura muitos esforços no desenvolvimento de estratégias para análises de compostos preservativos desde que há a necessidade de garantir que suas concentrações ou quantidades estejam dentro dos limites permitidos pela legislação, não comprometendo a saúde humana. Diversas citações de estudos de análise de ácido sórbico podem ser encontradas na literatura tais como a sua determinação em bebidas carbonatadas e sucos de fruta (46), entre vários outros. Estudos de compostos de nonanona carbonílicos podem ser encontrados, citando estas substâncias como uma das principais constituintes de aroma. Pode ser mencionada sua determinação em um trabalho de análise multivariada de vinhos Madeira considerando as principais variedades de uva (47), entre outros. Benzoato de etila é um éster formado pela condensação do ácido benzóico e etanol e é um composto responsável pelo aroma de gêneros alimentícios conferindo agradáveis notas florais e de frutas (48). Um composto de benzoato (benzoato de metila) foi identificado como um dos odores de impacto em vinhos envelhecidos originados da Rioja (Espanha) (49).

A amostra C14 (Grupo V) foi localizada no canto inferior direito da rede de Kohonen (Figura 27), tendo sido identificada uma variedade de picos característicos dessa cerveja sendo muitos deles quase exclusivos, contribuindo para sua posição individual. Os tempos de retenção foram: t_{R3} (dimetil sulfeto), t_{R4} (acetato de etila), t_{R8} (propanoato de etila), t_{R9} (1-pentanol), t_{R10} (2-metil 1-butanol), t_{R11} (acetato de 2-metil-propila), t_{R12} (butanoato de etila), t_{R16} (acetato de 2-metil 1-butanol), t_{R18} (2-pentil furano), t_{R20} (hexanoato de etila), t_{R24} (1-octanol), t_{R28} (ácido octanóico), t_{R29} (tiooctanoato de etila), t_{R32} (álcool feniletílico), t_{R35} (1-undecanol), t_{R37} (acetato de 2-feniletila), t_{R42} ((Z)-4-decenoato de etila), t_{R51} (possível álcool de cadeia longa), t_{R56} e t_{R57} (sugeridos como possibilidades para isopropil naftaleno).

Sobre os compostos identificados na amostra C14 (Grupo V), citações são descritas a seguir:

- Embora os compostos de enxofre contribuam de maneira positiva para o aroma e sabor de muitos alimentos, por causa de seus baixos limites sensoriais são freqüentemente a causa de maus odores e sabor (15). A baixos níveis, os compostos de enxofre contribuem para o agradável palato e aroma geral da cerveja, todavia, a altos níveis, eles têm sido os principais responsáveis por aromas indesejáveis, conferindo à cerveja odores de vegetais cozidos ou de repolho (50). Uma ampla variedade de compostos sulfurados tem sido relatada em cerveja, sendo o dimetil sulfeto um dos compostos de enxofre mais abundantes (51). Malte, água e lúpulo são todos possíveis fontes dos compostos sulfurados; entretanto, a maioria dos compostos de enxofre voláteis e semi-voláteis não se originam diretamente da matéria-prima bruta, mas são formados durante o processo de fermentação (15,52). Dimetil sulfeto tem sido amplamente detectado em uma grande variedade de alimentos; por exemplo, no perfil aromático de queijo Cheddar (53), em um estudo dos voláteis de suco de limão de quatro diferentes variedades (54), em diferentes amostras de bebida e café (55), entre vários outros;

- O composto orgânico acetato de etila é um éster derivado do etanol e ácido acético e, como a maioria dos ésteres, está correlacionado com o frescor e o aroma de frutas em cervejas jovens (56). Foi referido em estudos de análises de cervejas (56), (57-58), e em um trabalho de monitoramento do processo de fermentação de cidra (59);

- Propanoato de etila foi identificado no perfil dos compostos de aroma ativos de vinho, sendo também nomeado como um dos componentes predominantemente responsáveis pelo aroma e sabor de frutas (60). Foi mencionado como um componente volátil de uma fruta brasileira, a mangaba, no estágio intermediário de maturação (61), entre outros;

- O composto 1-pentanol é um álcool superior, comumente um produto de oxidação lipídica, tendo sido já descrito nos perfis voláteis de culturas de cevada e trigo. Ele foi um dos principais compostos detectados nos cultivos de cevada e o principal componente volátil em trigo (62);

- A substância 2-metil 1-butanol é um álcool superior mencionado como um dos componentes básicos em vinhos doces, determinado por *headspace* SPME e cromatografia gasosa (63);
- O éster acetato de 2-metil-propila foi também identificado como um componente volátil da fruta brasileira mangaba, no estágio intermediário de maturação (61), também no perfil volátil de outra fruta, acerola, no estágio maduro (64), e na composição de óleo de camomila comercial (65);
- Outro éster, butanoato de etila, também conhecido como butirato de etila, foi identificado em pesquisas referentes a cerveja (66), (67), como no estudo de uma cerveja da Baviera (Alemanha), na qual este odorante foi sugerido como um dos contribuintes chave para o perfil do aroma em geral, apresentando notas de fruta (67);
- O éster volátil acetato de 3-metil 1-butanol (acetato isoamílico ou isopentílico) é estimado um dos fundamentais ésteres voláteis ativos em cerveja (68-69). Novamente, o acetato de 3-metil 1-butanol foi apontado como um dos componentes de aroma mais influentes, em vinhos brancos Zalema (70);
- Furano, também conhecido como furfuran, é um composto orgânico heterocíclico descrito como um dos constituintes da fração volátil de cerveja, também encontrado na forma de 2-pentil furano. A concentração dos compostos de furano se modifica com o envelhecimento da cerveja, sendo indicadores sensíveis de problemas com aquecimento durante a fabricação da cerveja, ou seja, são compostos de aroma e sabor oriundos do mau controle de temperatura da produção (40). A presença de 2-pentil furano é um forte indício dessa ocorrência na amostra de cerveja C14;
- Hexanoato de etila é outro éster já mencionado como um constituinte de cerveja (40), e também em outras bebidas tais como tequila (19), vinhos brancos Zalema (70), vinhos Carbernet Sauvignon (20), entre outros;
- O álcool superior alifático 1-octanol foi encontrado na fração volátil de cerveja (40), e foi também apontado como um dos padrões orgânicos voláteis característicos de méis uniflorais (71);
- O éster octanoato de etila foi identificado como um dos mais importantes compostos em uma cerveja tipo Pilsen da Baviera (67);

- O álcool feniletílico, um produto do metabolismo da levedura e um marcador de parâmetros da fermentação (72), contribui com um intenso aroma de rosas em cerveja (73). Ele foi detectado e analisado em um estudo da atividade antioxidativa de compostos voláteis da cerveja, embora não tenha apresentado nenhum nível de inibição da oxidação (74). O álcool feniletílico foi também detectado na composição volátil de vinhos Mencía (75), promovendo um aroma de rosas neste vinho;

- O éster aromático acetato de 2-feniletila foi detectado como um dos mais ativos odorantes em vinhos Rhine Riesling e vinhos Chardonnay, sendo responsável por notas florais de rosa, como também notas de fruta (60,76).

Muitos tempos de retenção foram responsáveis pela formação do último conjunto localizado na parte inferior esquerda da rede (grupo VI) (Figura 27), composto pelas amostras C06, C09, C12, C16 e C20. Os compostos importantes para a formação desse grupo são as seguintes: t_{R3} (dimetil sulfeto), t_{R4} (acetato de etila), t_{R8} (propanoato de etila), t_{R9} (1-pentanol), t_{R10} (2-metil 1-butanol), t_{R11} (acetato de 2-metil-propila), t_{R12} (butanoato de etila), t_{R16} (acetato de 2-metil 1-butanol), t_{R18} (2 pentil furano), t_{R20} (hexanoato de etila), t_{R24} (1 octanol), t_{R28} (ácido octanóico), t_{R29} (tiooctanoato de etila), t_{R32} (álcool feniletílico), t_{R35} (1-undecanol), t_{R37} (acetato de 2-feniletila), t_{R40} (decanoato de etila), t_{R42} ((*Z*) 4-decenoato de etila), t_{R43} (*p*-vinilguaiacol), t_{R45} (*g*-nonalactona), t_{R48} (hidroxitolueno butilado), t_{R51} (possível álcool de cadeia longa), além dos tempos t_{R17} e t_{R39} não identificados. De fato, estes compostos influenciaram a formação dos outros conjuntos previamente descritos.

Analogamente, como citado para o tempo t_{R45} (*g*-nonalactona), cabe ainda ressaltar as variáveis t_{R28} (ácido octanóico), t_{R40} (decanoato de etila), e t_{R48} (hidroxitolueno butilado) responsáveis pela separação das amostras no lado esquerdo da rede (Figura 27); os tempos t_{R3} (dimetil sulfeto), t_{R4} (acetato de etila), t_{R9} (1-pentanol) e t_{R10} (2-metil 1-butanol) as variáveis responsáveis pela alocação das cervejas na parte inferior da rede (Figura 27); e ainda o tempo t_{R42} ((*Z*)-4-decenoato de etila) que “isolou” o conjunto superior direito (Figura 27) não-significativo das outras amostras com quantidades expressivas desse composto; e o tempo t_{R43} (*p*-vinilguaiacol) que separou o grupo inferior direito (Figura 27) também

não-significativo das outras cervejas que apresentam quantidades expressivas desse composto.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kohonen, T. *Self-organization and associative memory*. 3 ed.; SPRINGER VERLAG: BERLIN, 1989.
2. Melssen, W. J.; Smits, J.; Buydens, L.; KATEMAN, G. Using artificial neural networks for solving chemical problems .2. Kohonen self-organizing feature maps and Hopfield networks. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* **1994**, 23, (2), 267-291.
3. Kohonen, T. I. A., E.; Himberg, J.; Parhankanpgas, J.; Vesanto, J. SOM Toolbox. <http://www.cis.hut.fi/> (20 de maio de 2005).
4. Haykin, S. *Redes neurais - Princípios e prática*. 2 ed.; BOOKMAN: PORTO ALEGRE, 2001.
5. Vesanto, J.; Himberg, J.; Alhoniemi, E.; Parhankangas, J. *SOM Toolbox for Matlab 5*. Report A57, 2000.
6. Zupan, J.; Gasteiger, J. *Neural networks in chemistry and drug design*. 2 ed.; WILEY-V C H VERLAG GMBH: NEW YORK, 1999.
7. Otto, M. *Chemometrics - Statistics and computer application in analytical chemistry*. WILEY-V C H VERLAG GMBH: WEINHEIM, 1999.
8. Hardwick, W. A. *Handbook of brewing*. MARCEL DEKKER INC: NEW YORK, 1995.
9. Lewis, M. J.; Young, T. W. *Brewing*. CHAPMAN HALL LTD: LONDON, 1995.
10. Araújo, F. B.; Silva, P. H. A.; Minim, V. P. R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2003**, 23, (2), 121-128.
11. Reinold, M. R. *Manual prático de cervejaria*. ADEN EDITORA E COMUNICAÇÕES LTDA: SAO PAULO, 1997.
12. Slemer, O. *Os prazeres da cerveja*. MAKRON BOOKS DO BRASIL EDITORIAL LTDA: SAO PAULO, 1996.
13. Collin, S.; Derdelinckx, G.; Dufour, J. P. Relationships between the chemical composition and sensory evaluation of lager beers. *Food Qual. Prefer.* **1994**, 5, 145-149.
14. Liu, M. M.; Zeng, Z. R.; Xiong, B. Preparation of novel solid-phase microextraction fibers by sol-gel technology for headspace solid-phase microextraction-gas

chromatographic analysis of aroma compounds in beer. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1065, (2), 287-299.

15. Hill, P. G.; Smith, R. M. Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection. *J. Chromatogr. A* **2000**, 872, (1-2), 203-213.

16. Zupan, J.; Novic, M.; Ruisanchez, I. Kohonen and counterpropagation artificial neural networks in analytical chemistry. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* **1997**, 38, (1), 1-23.

17. Cabredo-Pinillos, S.; Cedrón-Fernández, T.; Gonzáles-Briongos, M.; Puente-Pascual, L.; Sáenz-Barrio, C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: Optimization of the method. *Talanta* **2006**, 69, 1123-1129.

18. Kasemets, K.; Kahru, A.; Laht, T.; Paalme, T. Study of the toxic effect of short- and medium-chain monocarboxylic acids on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* using the CO₂-auxo-accelerostat fermentation system. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, 111, 206-215.

19. Vallejo-Cordoba, B.; Gonzalez-Cordova, A. F.; del Carmen Estrada-Montoya, M. Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, (18), 5567-5571.

20. Gürbüz, A.; Rouseff, J. M.; Rouseff, R. L. Comparison of aroma volatiles in commercial Merlot and Carbet Sauvignon wines using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 3990-3996.

21. Garde-Cerdán, T.; Anín-Azpilicueta, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 222, 15-25.

22. Moreno, N. J.; Anín-Azpilicueta, C. The development of esters in filtered and unfiltered wines that have been aged in oak barrels. *J. Food Sci. Technol.* **2006**, 41, 155-161.

23. Ito, N.; Wada, S.; Yamanaka, Y.; Takagaki, H.; Nakamura, H. Identification of novel decenoic acids in heated butter. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, 69, (12), 2416-2420.

24. Alves, R. F.; Nascimento, A.; Nogueira, J. Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 546, (1), 11-21.

25. Coghe, S.; Benoot, K.; Delvaux, F.; Vanderhaegen, B.; Delvaux, F. R. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: Indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, (3), 602-608.

26. BRASIL. Decreto nº 2.314 de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.914 de 14 de julho que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.
27. Guyot-Declerck, C.; Francois, N.; Ritter, C.; Govaerts, B.; Collin, S. Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. *Food. Qual. Prefer.* **2005**, 16, (2), 157-162.
28. Lermusieau, G.; Bulens, M.; Collin, S. Use of GC-olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, (8), 3867-3874.
29. Rocha, S. M.; Rodrigues, F.; Coutinho, P.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. Volatile composition of Baga red wine. Assessment of the identification of the would-be impact odourants. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 513, 257-262.
30. Tombesi, N. B.; Freije, R. H.; Augusto, F. Factorial experimental design optimization of solid phase microextraction (SPME) conditions for analysis of butylated hydroxytoluene (BHT) in bottled water. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, 15, (5), 658-663.
31. Tombesi, N. B.; Freije, R. H. Application of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry to the determination of butylated hydroxytoluene in bottled drinking water. *J. Chromatogr. A* **2002**, 963, 179-183.
32. Wessling, C.; Nielsen, T.; Leufvén, A.; Jägerstad, M. Mobility of alfa-tocopherol and BHT in LDPE in contact with fatty food simulants. *Food Addit. Contam.* **1998**, 15, 709-715.
33. Nakajima, S.; Hagiwara, Y.; Hagiwara, H.; Shibamoto, T. Effect of the antioxidant 2"-O-glycosylisovitexin from young green barley leaves on acetaldehyde formation in beer stored at 50 degrees C for 90 days. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, (4), 1529-1531.
34. Ramalho, V. C.; Jorge, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras em alimentos gordurosos. *Quim. Nova* **2006**, 29, (4), 755-760.
35. Buck, D. F. Antioxidants in soya oil. *J. Am. Oil Chem. Soc* **1981**, 58, (3), 275-278.
36. Cowan, M. M. Plant Products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 12, 564-582.
37. Câmara, J. S.; Alves, M. A.; Marques, J. C. Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 555, 191-200.
38. Câmara, J. S.; Herbert, P.; Marques, J. C.; Alves, M. A. Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 513, (1), 203-207.

39. Boccacci, M. M.; Chiaccherini, E.; Gesumundo, C. Potential migration of diisopropyl naphthalenes from recycled paperboard packaging into dry foods. *Food Addit. Contam.* **1999**, 16, 207-213.
40. Pinho, O.; Ferreira, I.; Santos, L. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1121, (2), 145-153.
41. Pollock, J. R. A. *Brewing science*. ACADEMIC PRESS INC: LONDON, 1981; Vol. 2.
42. Limberger, R. P.; Simões-Pires, C. A.; Sobral, M.; Menu, C.; Bessiere, J.; Henriques, A. T. Essential oils from some *Myrceugenia* species (Myrtaceae). *Flavour Frag. J.* **2002**, 17, 341-344.
43. Mohmood, U.; Kaul, V. K.; Acharya, U. R. Volatile constituents of *Capillipedium parviflorum*. *Phytochemistry* **2004**, 65, 2163-2166.
44. Wang, L.; Zhang, X.; Wang, Y.; Wang, W. Simultaneous determination of preservatives in soft drinks, yogurts and sauces by a novel solid-phase extraction element and thermal desorption-gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 577, 62-67.
45. González, M.; Gallego, M.; Valcárcel, M. Simultaneous gas chromatographic determination of food preservatives following solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **1998**, 823, 321-329.
46. Dong, C. Z.; Wang, W. F. Headspace solid-phase microextraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in beverages. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 562, (1), 23-29.
47. Camara, J. S.; Alves, M. A.; Marques, J. C. Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. *Talanta* **2006**, 68, (5), 1512-1521.
48. Fan, W.; Qian, M. C. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese "Yanghe Daqu" liquors. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7931-7938.
49. Aznar, M.; López, R.; Cacho, J. F.; Ferreira, V. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 2924-2929.
50. Scarlata, C. J.; Ebeler, S. E. Headspace solid-phase microextraction for the analysis of dimethyl sulfide in beer. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, (7), 2505-2508.
51. Nykänen, L.; Suomalinen, H. *Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages*. AKADEMIE VERLAG PRESS: BERLIN, 1983.

52. Walker, M. D.; Simpson, W. J. Production of volatile sulfur-compounds by ale and lager brewing strains of *Saccharomyces-cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* **1993**, 16, (1), 40-43.
53. Burbank, H. M.; Qian, M. C. Volatile sulfur compounds in cheddar cheese determined by headspace solid-phase microextraction and gas chromatograph-pulsed flame photometric detection. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1066, 149-157.
54. Allegrone, G.; Belliardo, F.; Cabella, P. Comparison of volatile concentrations in hand-squeezed juices of four different lemon varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 1844-1848.
55. Jiemin, L.; Ning, L.; Meijuan, W.; Guibin, J. Determination of volatile sulfur compounds in beverage and coffee samples by purge-and-trap on-line coupling with a gas chromatography-flame photometric detector. *Microchim. Acta* **2004**, 148, 43-47.
56. Wampler, T. P.; Washall, J. W.; Matheson, M. J. Applications of purge-and-trap to the analysis of beer. *Amer. Lab.* **1996**, 28, (11), 18T-18V.
57. Lachenmeier, D. W.; AF Lachenmeier, D. W. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chem.* **2007**, 101, (2), 825-832.
58. Andrés-Toro, B.; Girón-Sierra, J. M.; López-Orozco, J. A.; Fernández-Conde, D.; Peinado, J. M.; Garcia-Ochoa, F. A. A kinetic model for beer production under industrial operational conditions. *Math. Comput. Simul.* **1998**, 48, 65-74.
59. de la Roza, C.; Laca, A.; García, L. A.; Díaz, M. Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. *Proc. Biochem.* **2003**, 38, 1451-1456.
60. Komes, D.; Ulrich, D.; Lovric, T. Characterization of odor-active compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 222, 1-7.
61. Sampaio, T. S.; Nogueira, P. C. L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. *Food Chem.* **2006**, 95, 606-610.
62. Cramer, A. J.; Mattinson, D. S.; Fellman, J. K.; Baik, B. K. Analysis of volatile compounds from various types of barley cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7526-7531.
63. Rodriguez-Bencomo, J. J.; Conde, J. E.; Garcia-Montelongo, F.; Perez-Trujillo, J. P. Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, 991, (1), 13-22.
64. Vendramini, A. L.; Trugo, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chem.* **2000**, 71, 195-198.

65. Mierendorff, H.; Stahl-Biskup, E.; Posthumus, M. A.; Beek, T. A. V. Composition of commercial cape chamomile oil (*Eriocephalus Punctulatus*). *Flavour Frag. J.* **2003**, 18, 510-514.
66. Schieberle, P. Primary odorants of pale lager beer - Differences to other beers and changes during storage. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **1991**, 193, (6), 558-565.
67. Fritsch, H. T.; Schieberle, P. Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a Bavarian pilsner-type beer. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, (19), 7544-7551.
68. Verstrepen, K. J.; Derdelinckx, G.; Dufour, J. P.; Winderickx, J.; Thevelein, J. M.; Pretorius, I. S.; Delvaux, F. R. Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, 96, (2), 110-118.
69. van Iersel, M. F. M.; van Dieren, B.; Rombouts, F. M.; Abee, T. Flavor formation and cell physiology during the production of alcohol-free beer with immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Tech.* **1999**, 24, 407-411.
70. Gómez-Miguez, M. J.; Cacho, J. F.; Ferreira, V.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Volatile components of Zalema white Wines. *Food Chem.* **2005**, 100, 1464-1473.
71. Baroni, M. V.; Nores, M. L.; Diaz, M. D.; Chiabrande, G. A.; Fassano, J. P.; Costa, C.; Wunderlin, D. A. Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, (19), 7235-7241.
72. Smogrovicova, D.; Domeny, Z. Beer volatile byproduct formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. *Proc. Biochem.* **1999**, 34, 785-794.
73. Meilgaard, M. C. Flavor Chemistry of Beer. Part 1: Flavor interaction between principal volatiles. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **1975**, 12, 107-117.
74. Wei, A.; Mura, K.; Shibamoto, T. Antioxidative activity of volatile chemicals extracted from beer. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, (8), 4097-4101.
75. Calleja, A.; Falque, E. Volatile composition of Mencía wines. *Food Chem.* **2005**, 90, 357-363.
76. Lee, S.; Noble, A. C. Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 8036-8044.

CAPÍTULO 3

ESTUDO CROMATOGRÁFICO, SENSORIAL E QUIMIOMÉTRICO DE CERVEJAS COMERCIAIS EM GARRAFA

3. ESTUDO CROMATOGRÁFICO, SENSORIAL E QUIMIOMÉTRICO DE CERVEJAS COMERCIAIS EM GARRAFA

3.1 SELEÇÃO DE VARIÁVEIS POR ALGORITMO GENÉTICO

O desenvolvimento da microeletrônica e a popularização dos microcomputadores proporcionaram um significativo avanço nas análises químicas instrumentais, possibilitando a aquisição de maneira fácil e rápida de um grande número de dados de uma mesma amostra. Conseqüentemente, o tratamento desses dados passou a exigir modelos mais complexos que vão além da tradicional calibração univariada (1). A calibração multivariada contribuiu de forma significativa para a obtenção de modelos de regressão multivariada que relacionam um conjunto de variáveis experimentais medidas à propriedade ou estado de interesse químico, como a concentração. As variáveis experimentais podem ser, por exemplo, valores de absorbância em diferentes comprimentos de onda, ou, valores de área de picos cromatográficos frente a diversos tempos de retenção.

As técnicas cromatográficas constituem ferramentas de análise que viabilizam a realização de determinações multicomponentes quantitativas e qualitativas em amostras complexas de maneira bastante eficiente, o que agrega um alto valor à cromatografia, fazendo com que se tornasse uma ferramenta padrão para os mais diversos tipos de análises químicas (1). Entretanto, muitas vezes, o número de variáveis experimentais originadas dificulta a obtenção de suas relações com a(s) propriedade(s) química(s) de interesse. Por outro lado, é interessante também identificar sob o ponto de vista químico e para praticidade do trabalho, além da economia de tempo, quais dessas variáveis são realmente significativas, por se mostrarem diretamente correlacionadas com o objetivo do estudo em questão.

Muitas vezes o uso de somente algumas variáveis que contêm mais informações acerca do sistema estudado pode proporcionar maior segurança e facilidade na construção e interpretação de um modelo de regressão (2). A seleção de variáveis permite a exclusão de dados que não possuam informações diretamente correlacionadas com o(s) analito(s) de interesse, além de variáveis que geram uma

menor relação sinal/ruído (indicativo de baixa sensibilidade) e não linearidades, ou até mesmo exclui características potenciais dos interferentes. A não eliminação dessas variáveis não-informativas pode ocasionar em distorções do modelo e, conseqüentemente, conduzir a conclusões errôneas nas análises (1).

Existem diferentes algoritmos que se propõem a selecionarem variáveis, tais como a regressão linear múltipla por passos (*stepwise multiple linear regression*) (3), e o método baseado em inteligência artificial (4) denominado algoritmo genético (GA). O algoritmo genético para seleção de variáveis é uma técnica que ajuda a identificar um subconjunto das variáveis medidas que, para um dado problema, correspondem às mais úteis e informativas para a obtenção de um modelo de regressão preciso e exato. O GA providencia um método direto baseado na abordagem “o mais adaptado sobrevive” para o modelamento dos dados (5).

A implementação do algoritmo genético na seleção de variáveis difere-se das demais aplicações do algoritmo genético, no que tange à codificação do problema e a função de resposta, já que as outras etapas permanecem inalteradas. Na codificação do problema em seleção de variáveis, considera-se que o cromossomo possui n genes, onde cada gene representa uma das variáveis do sinal (pico cromatográfico), como apresentado para um cromatograma típico na Figura 29.

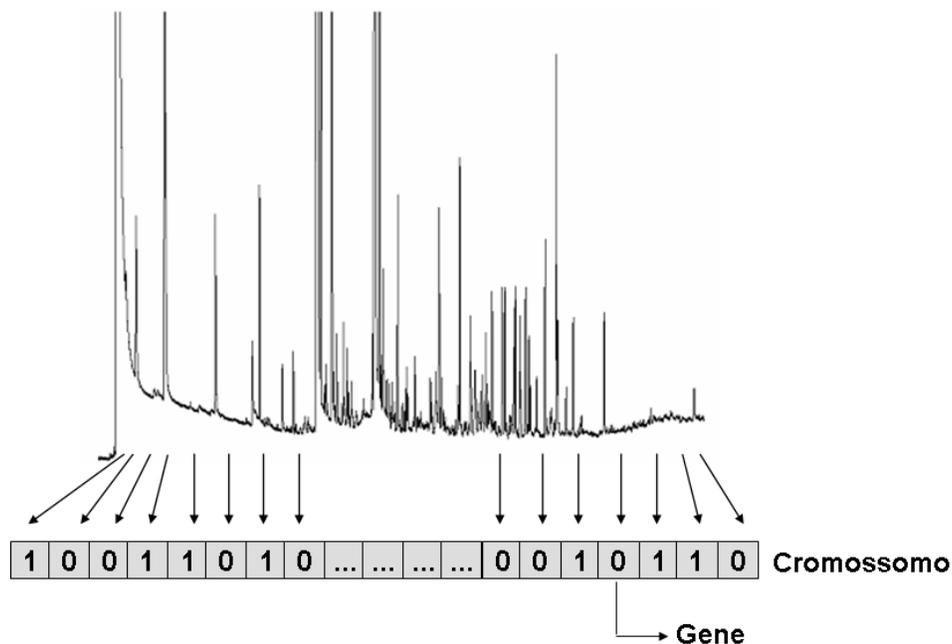


Figura 29. Codificação de um sinal cromatográfico na forma de um cromossomo. Cada valor de tempo de retenção (ou pico cromatográfico) corresponde a um gene do cromossomo.

Assim sendo, o cromossomo terá o mesmo número de variáveis contidas no cromatograma, conforme representado na Figura 29.

Na seleção de variáveis por GA utiliza-se também o auxílio do código binário (0,1) para codificar o problema (Figura 29). Neste caso, cada gene pode assumir o valor 1 ou 0. Quando a posição referente a uma determinada variável for igual a 1, isto implica na seleção deste variável. Ao contrário, se a posição contiver o valor 0, isto indica que a variável não foi selecionada.

Quando se utiliza o algoritmo genético para a seleção de variáveis é necessário, dependendo do modelo de calibração, utilizar algumas “condições de contorno”, como por exemplo, pré-estabelecer o número máximo de variáveis selecionadas, como no caso da regressão linear múltipla (2).

O GA é apontado como bastante robusto e rápido na convergência dos dados, devido à busca paralela na superfície de resposta. Dada a matriz de variáveis independentes \mathbf{X} , e os vetores de dados \mathbf{y} , o algoritmo genético seleciona subconjuntos aleatórios do conjunto de dados \mathbf{X} e calcula o erro quadrático médio de validação

cruzada (RMSECV) (Equação 19), que consiste no erro de previsão quando usando somente aquele conjunto de variáveis no modelo de regressão. O melhor subconjunto de variáveis considerado é aquele que gera o menor valor de RMSECV.

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (\text{Equação 19})$$

Em que \hat{y}_i representa o valor previsto pelo modelo; y_i representa o valor de referência, ou medido; e n corresponde ao número de amostras.

O primeiro passo que o GA faz é a geração de um grande número de seleções randômicas de variáveis e o cálculo dos valores de RMSECV para cada um dos subconjuntos dados. Cada subconjunto de variáveis é chamado de um indivíduo e cada variável utilizada nesse subconjunto é um gene. O conjunto de todos os indivíduos testados constitui uma população. Os valores de RMSECV, descrito como os ajustes dos indivíduos, indicam o nível de predição de cada indivíduo selecionado em relação à matriz **Y**. Quanto menor o valor do RMSECV, melhor o ajuste do modelo.

O segundo passo realizado pelo GA é a seleção. Os indivíduos com ajustes inferiores em relação ao ajuste médio são descartados. Os indivíduos restantes utilizam as variáveis que, por uma razão ou outra, proporcionam os menores valores de RMSECV – os melhores ajustes para os dados. Nesse ponto, a população foi diminuída para a metade do seu tamanho original. Para substituir os indivíduos descartados, o GA realiza o cruzamento dos indivíduos conservados.

Todos os genes individuais podem ainda ter a chance de sofrer mutação randômica.

Após todos os indivíduos terem sido pareados e cruzados, a população retorna ao tamanho original e o processo pode prosseguir novamente até o passo de avaliação do ajuste. O processo completo pode ser assim resumido:

1. Geração de subconjuntos randômicos de variáveis;
2. Avaliação de cada subconjunto das variáveis selecionadas individualmente em relação ao ajuste para a previsão de **y**;
3. Descarte de metade dos indivíduos apresentando pior ajuste;

4. Cruzamento dos indivíduos remanescentes;
5. Mutação;
6. Repetição dos passos 2 a 5 até que o critério de parada seja alcançado.

O algoritmo genético irá interromper a seleção após (i) um número finito de iterações, ou (ii) após alguma percentagem dos indivíduos na população sejam constituídos de variáveis idênticas. Indivíduos usando variáveis que contenham ruído tenderão a ser descartadas; desse modo, em geral, as variáveis usadas por estes indivíduos serão menos representadas na população de genes. Do mesmo modo, variáveis com menos ruído serão mais e mais representadas. Dependendo do número de variáveis e da taxa de mutação, muitos dos indivíduos eventualmente conterão os mesmos genes.

Em relação à utilização do GA para a seleção de variáveis, o maior risco concerne na ocorrência de sobreajuste (*over-fitting*). É possível que as variáveis selecionadas sejam particularmente “boas” para a construção do modelo de um dado conjunto de dados, mas não seja útil para a previsão de dados futuros. Isto é particularmente problemático quando se analisa conjuntos com menores números de amostras. A rotina de algoritmo genético do usada neste trabalho utiliza uma versão modificada do procedimento de validação cruzada, implementando a robustez do método em evitar a ocorrência desse problema. Além disso, é recomendado seguir as seguintes diretrizes:

- Manter o critério de parada adequado. Quanto maior o número de iterações, maior a retroinformação que o GA terá sobre o processo de validação cruzada, e assim maior a probabilidade da ocorrência de sobreajuste;
- Usar a validação cruzada randômica e múltiplas iterações de acordo com a praticidade;
- Repetir o GA várias vezes e observar as tendências gerais;
- Ao analisar dados com muitas variáveis e um menor número de amostras, agrupar uma maior quantidade de variáveis por vez ao conjunto de variáveis avaliado anteriormente, mantendo baixo o número máximo de variáveis latentes utilizadas (5).

A seleção de variáveis realizada pelo GA, ao gerar um subconjunto com o melhor e mais reduzido número de variáveis, faz com que os dados apresentem maior sensibilidade e linearidade para o(s) composto(s) de interesse.

3.2 ANÁLISE SENSORIAL

A avaliação sensorial dos alimentos é função primária do homem, que desde sua infância, de forma consciente ou não, aceita ou rejeita alimentos de acordo com a sensação que experimenta ao observá-lo ou ingeri-lo. Mesmo recém-nascidos já possuem preferências com relação aos gostos básicos.

Os métodos de análise sensorial permitem que as propriedades sensoriais, também chamadas atributos sensoriais, que constituem quaisquer propriedades que caracterizam o produto, sejam avaliadas por seres humanos utilizando os sentidos visão, olfato, paladar, tato e audição. A importância da análise sensorial é crescente dentro das indústrias de alimentos e bebidas, cosméticos e produtos farmacêuticos, porque esta análise é considerada uma extensão natural dos objetivos em alcançar a mais alta qualidade dos produtos e ocupar uma posição dominante no mercado consumidor (6). Como os julgamentos sensoriais são realizados por indivíduos, os dados obtidos apresentam elevada variabilidade normalmente associada às medidas subjetivas (7). Ainda assim, as medidas sensoriais podem ser reprodutivas e precisas se a metodologia de avaliação e os provadores utilizados forem adequadamente selecionados (8). Pode ser definido que a avaliação da qualidade sensorial deve se realizar sensorialmente, e que medidas instrumentais são úteis e podem ser também utilizadas na medida em que apresentem boa correlação com as medidas sensoriais.

A aplicação da análise sensorial fornece informações fundamentais para a área de desenvolvimento e otimização de produtos, auxiliando na redução de custos, na alteração de produtos/processos, e na determinação da vida útil. A análise sensorial participa também no controle e garantia da qualidade de produtos e serviços, estabelecendo especificações sensoriais, treinando e monitorando equipes sensoriais em programas de qualidade assegurada, e auxiliando a área de *marketing* a definir segmentos de mercado (9).

A análise sensorial descritiva discrimina e descreve características qualitativas e quantitativas de um produto. Trata-se de uma análise complexa que exige grande capacidade discriminante dos julgadores (10). As técnicas descritivas são também chamadas técnicas de perfis e são amplamente aplicadas para a caracterização de atributos sensoriais individuais que compõem um estímulo complexo (11).

As técnicas de análise descritiva englobam dois aspectos de avaliação dos alimentos: (a) aspecto qualitativo, onde ocorre a descrição de cada característica do produto, através de terminologia consensual desenvolvida por uma equipe de provadores; (b) aspecto quantitativo, que avalia a intensidade das percepções de cada característica sensorial do produto através de uma escala (12).

Os requisitos básicos para o desenvolvimento de perfis descritivos confiáveis consistem em gerar termos descritivos que são de fato perceptíveis e significativos para a descrição dos produtos, e selecionar e treinar julgadores consistentes e discriminativos.

Um dos métodos de análise descritiva mais utilizado é o método da Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) desenvolvido por Stone e colaboradores em 1974 (13) que fornece, de forma completa e precisa, informações sobre o perfil sensorial de alimentos. Esse método estabelece diferenças qualitativas entre os atributos sensoriais, avaliando também a magnitude dessas diferenças. Assim, pode-se dizer que a Análise Descritiva Quantitativa descreve os aspectos qualitativos (definição de descritores ou atributos) e quantitativos (intensidade perceptível) das características sensoriais de um produto (14). A descrição e a medição das propriedades sensoriais permitem que a avaliação do produto ocorra em termos matemáticos. Além disso, esses atributos podem ser correlacionados com diferentes tipos de substâncias voláteis e não voláteis presentes na amostra (15).

A ADQ apresenta um diferencial no que se refere aos avaliadores, pois permite que consumidores qualificados participem da equipe dos julgadores sensoriais (9).

As principais etapas para a aplicação do perfil descritivo através da Análise Descritiva Quantitativa podem ser resumidas em:

- Seleção da equipe;
- Desenvolvimento da terminologia descritiva;
- Treinamento da equipe;
- Avaliação do desempenho da equipe;
- Desenvolvimento da ficha consensual de avaliação descritiva;
- Avaliação do produto pelos julgadores;
- Análise estatística dos resultados (13,16).

Na ADQ, indivíduos treinados identificam e quantificam as propriedades sensoriais de um produto ou ingrediente. Esses dados permitem desenvolver modelos multidimensionais do produto em uma forma quantitativa, facilitando a visualização dos dados (13,16).

A Análise Descritiva Quantitativa é referenciada como um dos procedimentos sensoriais modernos de grande complexidade, exigindo dos provadores a análise de suas percepções ao testar produtos e a verbalização e quantificação dessas percepções em relação ao espaço sensorial do produto sob estudo. Essas avaliações descritivas quando realizadas por equipe selecionada, adequadamente treinada e monitorada, produzem resultados precisos e consistentes (12,17).

A técnica da Análise Descritiva Quantitativa fundamenta-se na seleção cuidadosa do provador e no treinamento criterioso do mesmo para detectar e medir características sensoriais através de uma escala linear contínua não estruturada (isenta de marcação de escala). Dos métodos descritivos foi o que causou maior impacto inovador na metodologia dos perfis clássicos.

A ADQ avalia todos os aspectos de todos os atributos sensoriais presentes no produto, quais sejam aparência, aroma, sabor e textura, e algumas características básicas da ADQ podem ser listadas como se segue: (a) avaliação de todas as características sensoriais dos produtos relacionadas à aparência, aroma, sabor e textura; (b) oferecer procedimentos para avaliar o desempenho individual de cada julgador e da equipe; (c) utilizar de seis a dez provadores por teste; (d) não utilizar exclusivamente especialistas; (e) ser aplicado a todo e qualquer produto industrial (18).

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

Neste trabalho foram utilizadas 32 marcas de cervejas comerciais acondicionadas em garrafa, todas tipo Pilsen, encontradas no mercado local da cidade de Campinas, SP, sendo 31 nacionais e uma importada.

As amostras de cerveja foram submetidas a um processo de desgaseificação pré-análise, mantendo-se por quinze minutos em banho de ultra-som com gelo. Para as extrações, frascos de vidro de 16 mL fechados com septos de Teflon/silicone (Pierce, Rockford, USA) foram utilizados. Durante as extrações, a temperatura dos frascos foi

controlada usando água aquecida circulante de um banho (Polystat, USA). A fibra extratora utilizada possuía o recobrimento polimérico de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB). Anterior ao uso, a fibra PDMS/DVB foi condicionada de acordo com as recomendações do fornecedor.

Após a desgaseificação, as amostras foram submetidas à fase de extração por HS-SPME. Alíquotas de 5 mL das amostras foram submetidas à agitação constante (1200 rpm) por 5 min para o equilíbrio amostra/*headspace*. Após esse tempo, a fibra PDMS/DVB foi imediatamente exposta ao *headspace* por 30 min. A temperatura foi mantida a 50 °C durante todo o processo. Previamente ao procedimento de extração, foram adicionados 27 g de NaCl por 100 mL de amostra, para controle da força iônica do meio. Logo após o término do período de extração, os compostos extraídos na fibra foram dessorvidos a 210 °C, e a fibra foi mantida no injetor do cromatógrafo por 15 min para garantir total dessorção dos analitos e evitar efeito de memória entre as corridas.

Foram realizadas as medidas cromatográficas e obtidos os espectros de massas em um equipamento GC/MS, cromatógrafo a gás (modelo CP 3900) acoplado ao espectrômetro de massas tipo armadilha de íons (Ion Trap, modelo Saturn 2000), fabricado pela Varian, no modo de corrente total, com energia de impacto de elétrons de 70eV. O aparelho foi equipado com uma coluna HP-50 (50 % fenilmetilpolisiloxano) com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent, Wilmington, DE). O injetor do cromatógrafo *split-splitless* foi operado no modo *splitless* e acoplado com um *liner* adequado para SPME. Os parâmetros cromatográficos de trabalho foram: gás de arraste He (*UP grade*) com vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura do injetor de 210 °C; temperatura de detector de 280 °C; rampa linear de temperatura de 40 °C por 2 min, aumento de 10 °C/min até 140 °C, e aumento de 7 °C/min até 250 °C mantendo-se por 3 min.

As áreas significativas dos picos cromatográficos de cada amostra foram tomadas e correlacionadas com parâmetros de qualidade em cerveja obtidos através da metodologia de análise sensorial denominada Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) (13).

Neste estudo, os atributos da cerveja avaliados que constituem parâmetros de qualidade foram o amargor e o sabor do grão. O amargor é um gosto primário da

cerveja, promovido pelo lúpulo, e o sabor do grão está associado ao gosto oriundo do extrato primitivo, ou seja, de matéria-prima.

Na ADQ, os provadores utilizaram uma ficha de avaliação, que continha uma escala horizontal não-estruturada de 9 cm para cada termo descritivo levantado, ancorada em suas extremidades esquerda e direita com expressões quantitativas que indicavam a intensidade do atributo que estava sendo avaliado (Figura 30).

Neste trabalho, um extremo designava o atributo como fraco e o outro extremo como forte. Os provadores escolhiam a posição que melhor refletisse sua avaliação para cada termo descritivo, e marcavam esta posição com uma marca vertical (|). Logo, quanto menos intensa fosse considerada a amostra em relação ao atributo avaliado, mais próximo do extremo indicado como fraco seria marcado pelo provador, e vice-versa. As amostras avaliadas com intensidades médias foram então marcadas no centro da escala.

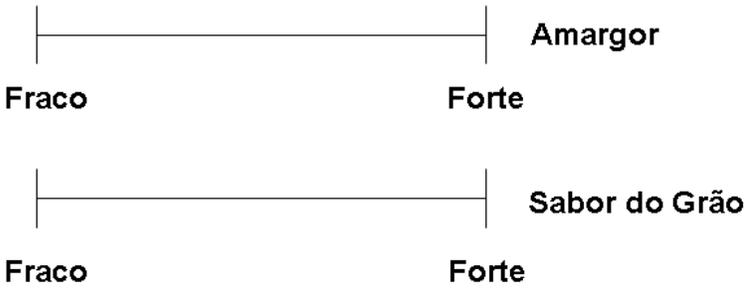
Análise Descritiva Quantitativa - ADQ	
Nome:	Data:
Amostra n°:	
Experimente, sinta e avalie a amostra de acordo com os atributos treinados:	
	

Figura 30. Ficha utilizada durante a realização do treinamento e da Análise Descritiva Quantitativa pelos provadores, para os atributos sensoriais das cervejas amargor e sabor do grão.

Voluntários para compor a equipe sensorial foram recrutados da comunidade do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, SP, sendo homens e mulheres que variaram de 25 a 45 anos, num total de 15, e estes passaram por um período de treinamento de cinco dias, no qual lhes eram oferecidas amostras de cervejas diluídas com água destilada, indicando o extremo fraco, para ambos os parâmetros estudados, e amostras fortificadas do atributo que estava sendo avaliado, para o extremo forte. Cafeína foi utilizada para a intensificação do atributo amargor, e cevada moída era acrescentada às amostras de cerveja para fortificar o atributo sabor do grão. Após a fase de treinamento, foram apresentadas aos provadores amostras de cerveja que variavam na intensidade de fortificação dos atributos. As respostas dos provadores foram analisadas estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) a fim de estabelecer quais voluntários se mostravam aptos para a avaliação das cervejas comerciais. Portanto, os provadores foram avaliados de acordo com a habilidade de discriminar as amostras, a repetibilidade e a coerência dos resultados, que foi avaliada por meio das médias de cada provador para cada parâmetro avaliado.

Após o treinamento dos provadores decidiu-se trabalhar com os 15 voluntários e posteriormente, quando da finalização da ADQ, avaliar suas respostas novamente para verificação da necessidade de exclusão. Iniciou-se então a ADQ das 32 amostras comerciais de cerveja, em dias e ordens de apresentação diferentes. Os valores médios dos atributos amargor e sabor do grão obtidos pela ADQ, que corresponderam à média de todas as respostas dos provadores para determinado atributo por cerveja, foram correlacionados com os valores de área dos cromatogramas gerados pelo sistema HS-SPME-GC-MS das 32 cervejas estudadas, após avaliação estatística prévia das respostas dos provadores, através do teste *t* em par para médias, ao nível de 95 % de confiança.

Em relação ao atributo amargor, foi ainda realizado o método-padrão oficial da AOAC 970.16 (Association of Official Analytical Chemists, órgão de regulamentação dos Estados Unidos) para a sua determinação em cerveja, denominado Método de Unidades de Amargor (19).

O método para determinação do amargor é espectrofotométrico e se baseia na verificação da absorção no comprimento de onda de 275 nm, após tratamento prévio da

amostra com isooctano, álcool *n*-octílico e ácido clorídrico. Consiste na transferência de 10,0 mL de cerveja carbonatada a uma temperatura de 10 °C para um tubo de centrífuga de 50 mL, utilizando uma pipeta com uma pequena quantidade de álcool octílico na ponta. Ainda no tubo foi adicionado 1 mL de uma solução de HCl 3N e 20 mL de isooctano. A mistura foi agitada usando um agitador mecânico por 15 min, sendo logo depois centrifugada por 10 min para separação das fases. A fase superior foi transferida para uma cela de 1 cm para análise utilizando um espectrofotômetro Femto 700 Plus. As medidas foram realizadas em 275 nm utilizando um branco constituído de 20 mL de isooctano, adicionado de uma gota de álcool octílico (19). Todos os reagentes utilizados eram substâncias de pureza analítica.

A intensidade de amargor é dada em unidades de amargor (BU), sendo calculada pela Equação 20.

$$BU = A_{275} \times 50 \quad (\text{Equação 20})$$

Em que A_{275} corresponde ao valor de absorbância obtido a 275 nm.

A correlação entre as respostas sensoriais e cromatográficas foi realizada através da aplicação do método de calibração multivariada por quadrados mínimos parciais (PLS) em conjunto com o algoritmo genético (GA) para seleção de variáveis, a fim de obter a melhor correlação possível entre certos picos obtidos pelo sistema HS-SPME-GC-MS, que correspondem aos compostos detectados nas amostras de cerveja, com os parâmetros de qualidade avaliados sensorialmente amargor e sabor do grão. Assim, foi possível inferir sobre quais constituintes voláteis da cerveja possuem relação direta com os atributos característicos estudados.

O algoritmo genético para seleção de variáveis é uma técnica que permite identificar um subconjunto das variáveis medidas que correspondem às mais informativas e diretamente relacionadas aos atributos das cervejas. Isto permite a obtenção de modelos de regressão mais simples e precisos devido ao uso de um menor número de variáveis, além também da aquisição de modelos que poderão ser utilizados para o controle de qualidade de matérias-primas e de cervejas durante o processo de fabricação.

O GA é apontado como bastante robusto e rápido na convergência dos dados, devido à busca paralela na superfície de resposta. Os cálculos foram realizados no *software* MatLab 6.5 (The MathWorks, Natick, MA), utilizando a rotina de algoritmo genético para seleção de variáveis do PLS Toolbox 4.0 (Eigenvector Technologies, Manson, WA) (5).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matriz com as áreas cromatográficas obtidas por HS-SPME-GC-MS consistiu de 32 linhas, relativas às amostras de cerveja, e de 54 colunas, referentes às variáveis, ou tempos de retenção, que correspondem aos compostos identificados.

Os valores médios atribuídos pelos provadores aos atributos amargor e sabor do grão, resultantes da Análise Descritiva Quantitativa são mostrados nas Tabelas 13 e 14. Cabe ressaltar que esses valores são dados entre os extremos numéricos 1 e 9, visto que a escala não estruturada utilizada possuía 9 cm, sendo também decorrentes da média dos resultados dos provadores aptos estatisticamente, ao nível de significância de 0,05, pelo teste *t* em par para médias. Para cada amostra de cerveja e para cada atributo, os provadores realizaram as medidas em triplicata. Após a avaliação das respostas dos provadores, cada amostra foi avaliada, em média, por 10 provadores. As marcações efetuadas pelos provadores eram medidas com uma régua milimetrada, e após os cálculos estatísticos originaram os valores apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Valores médios atribuídos ao parâmetro de qualidade amargor resultante da ADQ.

Amostras de cerveja	Amargor	Amostras de cerveja	Amargor
1	5,2 ± 1,1	17	3,0 ± 1,4
2	5,8 ± 0,9	18	3,9 ± 1,7
3	4,4 ± 1,7	19	4,5 ± 1,9
4	3,7 ± 1,9	20	4,2 ± 2,1
5	5,9 ± 0,9	21	3,7 ± 1,8
6	5,8 ± 1,1	22	6,6 ± 1,5
7	4,7 ± 1,2	23	3,8 ± 1,5
8	6,8 ± 1,3	24	5,2 ± 0,6
9	5,2 ± 1,0	25	3,7 ± 2,0
10	4,9 ± 1,4	26	3,1 ± 1,2
11	4,0 ± 1,8	27	4,0 ± 1,5
12	2,1 ± 1,7	28	6,6 ± 1,6
13	4,5 ± 2,7	29	5,0 ± 1,3
14	3,7 ± 1,4	30	5,4 ± 1,4
15	6,4 ± 1,3	31	6,5 ± 0,7
16	3,4 ± 1,2	32	8,4 ± 0,6

Tabela 14. Valores médios atribuídos ao parâmetro de qualidade sabor do grão resultante da ADQ.

Amostras de cerveja	Sabor do grão	Amostras de cerveja	Sabor do grão
1	5,2 ± 1,3	17	3,5 ± 1,0
2	5,7 ± 1,4	18	5,0 ± 1,2
3	3,9 ± 1,4	19	4,1 ± 1,4
4	3,6 ± 1,5	20	4,4 ± 2,4
5	5,9 ± 1,6	21	4,3 ± 2,3
6	4,0 ± 1,5	22	6,1 ± 1,4
7	5,3 ± 0,9	23	3,7 ± 1,0
8	5,0 ± 1,7	24	4,8 ± 1,2
9	5,9 ± 0,6	25	4,9 ± 1,5
10	5,3 ± 1,80	26	3,5 ± 2,2
11	4,5 ± 1,3	27	4,2 ± 1,6
12	4,2 ± 2,6	28	5,4 ± 2,3
13	6,0 ± 1,4	29	5,5 ± 1,4
14	5,1 ± 1,1	30	4,8 ± 0,6
15	5,4 ± 1,5	31	4,8 ± 2,0
16	3,9 ± 2,0	32	5,1 ± 1,6

As amostras foram enumeradas de 1 a 32 a fim de preservar as marcas das cervejas.

Para cada parâmetro de qualidade avaliado foi feita a correspondência da matriz das áreas cromatográficas **X** com o vetor de resposta **y**, que constituíram os valores apresentados nas Tabelas 13 e 14.

O algoritmo genético foi executado em dez replicatas, com uma população de tamanho 64, taxa de mutação de 0,005, máximo de 80 gerações, sendo avaliada a performance do algoritmo através do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) através da construção de modelos por quadrados mínimos parciais (PLS).

A matriz **X** e os vetores **y** foram pré-processados de duas formas, auto-escalados (as variâncias das variáveis foram normalizadas e médias calculadas a zero) e centrados na média (a média dos dados é zero), além de serem desenvolvidos modelos sem nenhum pré-tratamento. Os melhores resultados foram obtidos com os dados auto-escalados e a Tabela 15 mostra as variáveis selecionadas, os valores de RMSECV e o número de variáveis latentes (VL) utilizadas durante os tratamentos pelo algoritmo genético, na avaliação do parâmetro de qualidade amargor.

Tabela 15. Variáveis selecionadas pelo algoritmo GA para o atributo amargor, com os respectivos compostos identificados, os valores de RMSECV e o número de variáveis latentes utilizadas pelo modelo.

Amargor	
Variáveis selecionadas	Compostos identificados
3	Acetato de etila
14	1-octanol
17	Ácido octanóico
19	Possível éster com 8 ou 9 carbonos
30	Ácido decanóico
34	<i>p</i> -vinilguaiacol
38	<i>g</i> -nonalactona
39	Butirato de β -feniletila
47	δ -cadineno
48	Óxido de cariofleno
54	di-butil-ftalato
VL	4
RMSECV	0,648

Como pode ser notado pela Tabela 15, foram selecionadas 11 variáveis pelo GA para o parâmetro amargor. Isto corresponde a uma redução de 80 % das variáveis originais. Com apenas 1/5 das variáveis iniciais é possível descrever e estudar o

atributo amargor, através da captura das informações realmente relevantes, ou seja, através da utilização das variáveis que estão diretamente relacionadas ao amargor. Considerando os dados originais, 11 picos cromatográficos são utilizados para descrever o amargor.

Sobre as substâncias relacionadas com o atributo amargor, comentários serão apresentados a seguir:

- O composto orgânico acetato de etila é um éster derivado de etanol e ácido acético e, como a maioria dos ésteres, está correlacionado com o frescor e com as notas frutais em cervejas não-envelhecidas, assim também como o éster butirato de β -feniletila (20);

- O álcool superior 1-octanol já foi detectado na fração volátil da cerveja, sendo contribuinte para um forte e pungente aroma (21);

- O ácido octanóico ou caprílico é empregado no processamento de alimentos pela sua atividade antimicrobiana, tendo mostrado grandes efeitos tóxicos em culturas de leveduras, inibindo o crescimento da população do fungo, mas aumentando a taxa de fermentação (22);

- O ácido decanóico é basicamente formado na fermentação, tendo sido detectado na fração volátil de vinhos. Embora sua presença seja usualmente relacionada à presença de odores negativos, constitui um composto muito importante para o equilíbrio aromático, já que se opõe à hidrólise do éster correspondente (23);

- O *p*-vinilguaicol é um composto derivado do ácido ferúlico durante o processo de fermentação, e é freqüentemente encontrado em cerveja quando trigo ou malte de trigo é usado como um componente da produção. Possui baixo limite sensorial e pode, mesmo em nível traço, produzir um significativo sabor fenólico na cerveja (24);

- O composto *g*-nonalactona, que é conhecido por apresentar um caráter “de coco”, é citado como um dos principais compostos chave cuja concentração é aumentada durante o envelhecimento da cerveja. É suposto que a *g*-nonalactona é um derivado do metabolismo do ácido nonanóico pela levedura, não tendo sido encontrada em extratos brutos do lúpulo (25);

- O composto cadineno é um sesquiterpeno bicíclico constituinte do óleo essencial de plantas, associado com o aroma de madeira, já reportado como um componente volátil de vinho (26);
- O cariofleno é também um sesquiterpeno bicíclico constituinte de alguns óleos essenciais, tendo sido também encontrado na fração volátil de vinho (26);
- Os ftalatos são um grupo de compostos químicos principalmente usados como plastificantes (adicionam flexibilidade) (27). Apesar de não ser um constituinte da cerveja, em todos os tratamentos realizados pelo algoritmo genético, esse composto foi selecionado, estando presente em todas as cervejas estudadas. Sua presença pode ser devido à contaminação por algum (s) recipiente (s) plástico (s) usado (s) durante o processo de fabricação da cerveja.

Foi feita a avaliação do conjunto de variáveis selecionado pelo algoritmo genético para o atributo amargor (Tabela 15), através da regressão por mínimos quadrados parciais; o gráfico dos valores obtidos pela ADQ (valores medidos – Tabela 15) e os valores estimados pelo modelo para o parâmetro são apresentados na Figura 31(a).

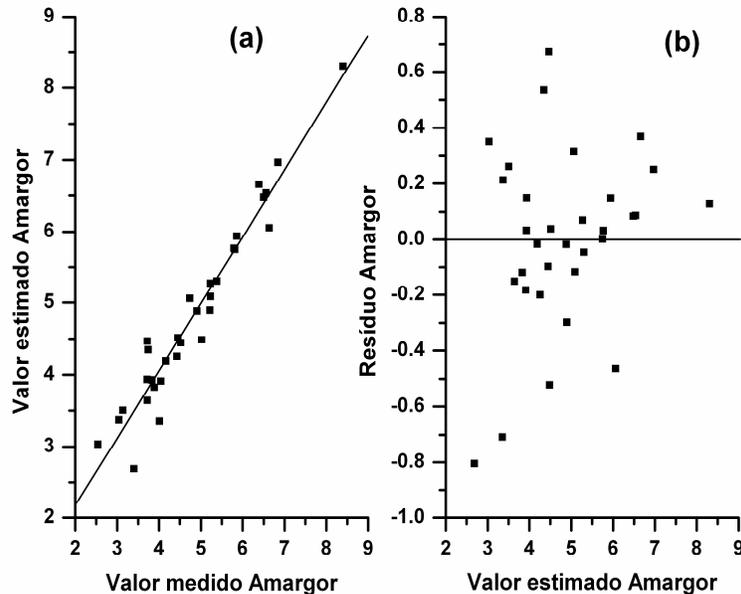


Figura 31. (a) Gráfico dos valores obtidos pela ADQ (valores medidos) e os valores estimados pelo modelo para o parâmetro amargor. (b) Gráfico dos resíduos para o parâmetro amargor.

O coeficiente de correlação R obtido para a relação da Figura 31(a) foi de 0,9678, com um desvio padrão SD de 0,33 cm. Também, na Figura 31(b), é possível visualizar o comportamento aleatório e bem distribuído dos resíduos do modelo PLS, refletindo que o subconjunto de variáveis selecionado pelo algoritmo genético para o atributo amargor permitiu um adequado modelamento dos dados.

É esperado que as variáveis selecionadas pelo GA sejam as mais diretamente correlacionadas com o amargor, e também, que não apresentem correlação entre si, isto é, que sejam ortogonais, visto que o GA deve procurar as variáveis mais informativas independentemente. Caso sejam escolhidas variáveis com alta correlação isto pode ser um indício de falta de robustez do algoritmo. Para verificar essa ocorrência foram obtidos os valores dos coeficientes de correlação das variáveis selecionadas pelo GA entre si, mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores dos coeficientes de correlação entre as variáveis (Var) selecionadas pelo algoritmo genético para o atributo amargor.

Coefficientes de Correlação											
	Var 1	Var 2	Var 3	Var 4	Var 5	Var 6	Var 7	Var 8	Var 9	Var 10	Var 11
Var 1	1,000	0,270	-0,048	0,404	-0,068	0,137	0,045	0,058	-0,047	0,181	-0,157
Var 2	0,270	1,000	-0,024	0,379	-0,341	0,282	0,275	-0,124	-0,038	-0,017	-0,014
Var 3	-0,048	-0,024	1,000	-0,167	-0,093	-0,211	-0,038	0,276	-0,064	-0,110	-0,104
Var 4	0,434	0,379	-0,167	1,000	-0,361	0,094	-0,293	-0,400	-0,029	0,094	-0,002
Var 5	-0,068	-0,341	-0,093	-0,361	1,000	-0,076	0,286	0,252	0,454	0,324	-0,082
Var 6	0,137	0,282	-0,211	0,094	-0,076	1,000	0,530	0,114	-0,074	0,199	0,215
Var 7	0,045	0,275	-0,038	-0,293	0,286	0,530	1,000	0,423	0,360	0,354	-0,034
Var 8	0,058	-0,124	0,276	-0,400	0,252	0,114	0,423	1,000	0,170	-0,045	-0,164
Var 9	-0,047	-0,038	-0,064	-0,029	0,454	-0,074	0,360	0,170	1,000	0,545	0,174
Var 10	0,181	-0,017	-0,110	0,094	0,324	0,199	0,354	-0,045	0,545	1,000	0,305
Var 11	-0,157	-0,014	-0,104	-0,002	-0,082	0,215	-0,034	-0,164	0,174	0,305	1,000

Pode ser notado através da Tabela 16 que as variáveis possuem coeficientes de correlação bastante baixos, indicando que as variáveis selecionadas não estão correlacionadas entre si.

Ainda, a Figura 32 mostra a relação entre os valores de amargor determinados pela ADQ (Tabela 13) e pelo método espectrofotométrico padrão oficial da AOAC.

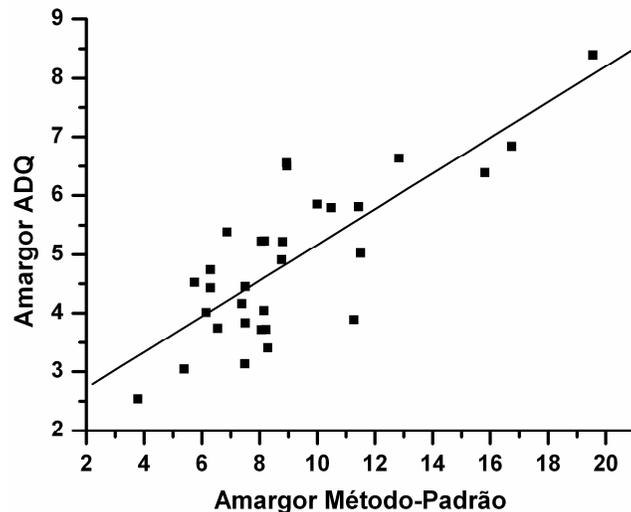


Figura 32. Gráfico da relação entre os valores de amargor obtidos pela ADQ e pelo método-padrão.

Através do gráfico da Figura 32 é possível notar uma relação com tendência linear entre os valores de amargor obtidos pelos provadores (Tabela 13) e os valores resultantes do método-padrão. O coeficiente de correlação linear dessa relação foi de 0,7832.

A Tabela 17 mostra as variáveis selecionadas, os valores de RMSECV e o número de variáveis latentes (VL) utilizadas durante o tratamento pelo algoritmo genético na avaliação do parâmetro de qualidade atributo sabor do grão.

Tabela 17. Variáveis selecionadas pelo algoritmo GA para o atributo sabor do grão, com os respectivos compostos identificados, os valores de RMSECV e o número de variáveis latentes utilizadas pelo modelo.

Sabor do Grão	
Variáveis selecionadas	Compostos identificados
6	1-pentanol
7	2-metil-1-butanol
22	Ácido benzóico
25	1-undecanol
27	Ácido (<i>E</i>)-2-hidroxicinâmico
28	Acetato de 2-feniletila
34	<i>p</i> -vinilguaicol
35	Possível monoterpeneo
38	<i>g</i> -nonalactona
39	Butirato de β -feniletila
41	Dodecanoato de etila
42	Nerolidol
51	Possível sesquiterpeneo oxigenado
52	Provável contaminante
54	di-butil-ftalato
VL	3
RMSECV	0,5392

Sobre as substâncias relacionadas com o atributo sabor do grão, serão apresentados comentários:

- O composto 1-pentanol é um álcool superior, comumente um produto de oxidação lipídica, tendo sido já descrito nos perfis voláteis de culturas de cevada e trigo. Ele foi um dos principais compostos detectados nos cultivos de cevada e o principal componente volátil em trigo (28);

- A substância 2-metil 1-butanol é um álcool superior mencionado como um dos componentes básicos em vinhos doces, determinado por *headspace* SPME e cromatografia gasosa (29);
- O ácido benzóico é usado extensivamente como preservativo em alimentos com atividade antimicrobiana para prevenir a proliferação de bactérias, germes e fungos (30). É principalmente usado em produtos ácidos devido à sua atividade na faixa de pH entre 2,5 e 4,0 (31);
- Os álcoois superiores, assim como o 1-undecanol, constituem importantes subprodutos formados durante a fermentação da cerveja. Os álcoois contribuem para o forte e pungente odor e sabor das cervejas (21), e a sua formação está ligada à síntese de proteínas das leveduras (32). Álcoois superiores são importantes precursores de ésteres ativos contribuintes para o aroma e são freqüentemente considerados como colaboradores para o positivo aroma da cerveja (21);
- O ácido hidroxicinâmico é um constituinte natural de cereais tais como cevada e trigo, usados como matéria-prima na fabricação da cerveja (24);
- O éster aromático acetato de 2-feniletila foi detectado como um dos mais ativos odorantes em vinhos Rhine Riesling e vinhos Chardonnay, sendo responsável por notas florais de rosa, como também notas de fruta (33-34);
- O dodecanoato de etila foi apontado como um dos principais compostos voláteis em um estudo do perfil aromático de vinhos Madeira (35) e vinho de morango (36), assim também como em óleo de frutas (37);
- Nerolidol é um sesquiterpeno presente em óleos essenciais de diversas plantas, possuindo propriedades antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias. Nerolidol foi encontrado no aroma de mel cítrico como um possível agente botânico discriminador (38), e também foi citado num estudo de caracterização do aroma de vinhos Madeira, devido aos interessantes odores de flor dos terpenóides, como também de frutas, sementes e raízes (39-40).

Assim como para o atributo amargor, também foi feita a avaliação do conjunto de variáveis selecionado pelo algoritmo genético para o atributo sabor do grão (Tabela 16), através da regressão por mínimos quadrados parciais; o gráfico dos valores obtidos

pela ADQ (valores medidos – Tabela 17) e os valores estimados pelo modelo para o parâmetro são apresentados na Figura 33(a).

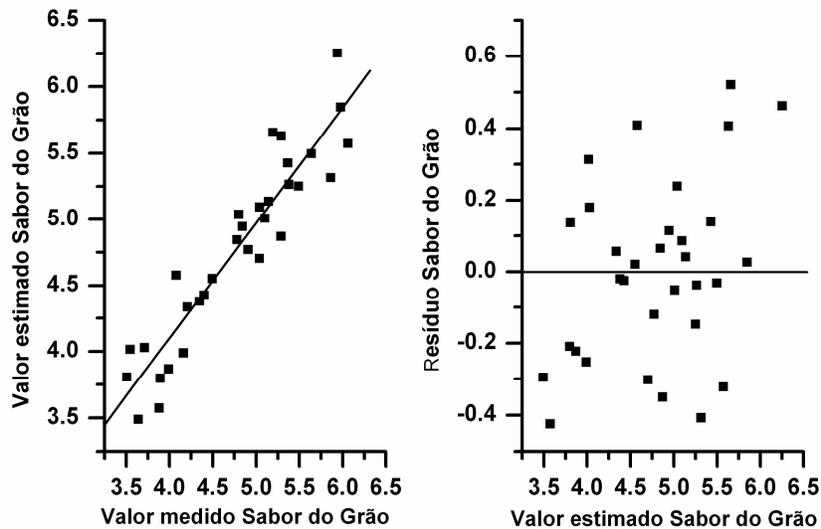


Figura 33. (a) Gráfico dos valores obtidos pela ADQ (valores medidos) e os valores estimados pelo modelo para o parâmetro sabor do grão. (b) Gráfico dos resíduos para o parâmetro sabor do grão.

O coeficiente de correlação obtido para a relação da Figura 33(a) foi de 0,9334, com um desvio padrão de 0,26 cm. Também, na Figura 33(b), é possível visualizar o comportamento aleatório e bem distribuído dos resíduos do modelo PLS, refletindo que o subconjunto de variáveis selecionado pelo algoritmo genético para o atributo sabor do grão permitiu um apropriado modelamento dos dados.

É esperado que as variáveis selecionadas pelo GA sejam as mais diretamente correlacionadas com o sabor do grão, e também, que não apresentem correlação entre si, isto é, que sejam ortogonais, visto que o GA deve procurar as variáveis mais informativas independentemente. Caso sejam escolhidas variáveis com alta correlação isto pode ser um indício de falta de robustez do algoritmo. Para verificar essa ocorrência foram obtidos os valores dos coeficientes de correlação das variáveis selecionadas pelo GA entre si, mostrados na Tabela 18.

Tabela 18. Valores dos coeficientes de correlação entre as variáveis (Var) selecionadas pelo algoritmo genético para o atributo sabor do grão.

Coeficientes de Correlação															
	Var 1	Var 2	Var 3	Var 4	Var 5	Var 6	Var 7	Var 8	Var 9	Var 10	Var 11	Var 12	Var 13	Var 14	Var 15
Var 1	1,000	0,324	-0,061	0,201	-0,237	-0,014	-0,286	-0,021	-0,473	-0,446	-0,249	-0,017	-0,085	0,085	0,150
Var 2	0,324	1,000	0,087	-0,365	-0,121	0,099	-0,494	-0,017	-0,413	0,114	0,119	-0,377	-0,325	0,070	-0,374
Var 3	-0,061	0,087	1,000	-0,243	0,252	-0,420	-0,135	0,155	-0,114	-0,130	-0,132	-0,077	0,147	-0,396	-0,160
Var 4	0,201	-0,365	-0,243	1,000	0,063	-0,181	0,178	-0,061	0,026	-0,264	-0,203	-0,088	-0,111	0,128	0,247
Var 5	-0,237	-0,121	0,252	0,063	1,000	-0,272	0,286	-0,316	0,199	-0,064	-0,141	-0,078	-0,005	0,008	-0,078
Var 6	-0,014	0,099	-0,420	-0,181	-0,272	1,000	-0,102	-0,099	-0,098	0,194	0,572	0,372	-0,116	0,130	0,032
Var 7	-0,286	-0,494	-0,135	0,1078	0,286	-0,102	1,000	0,386	0,530	0,114	-0,136	0,462	0,321	0,221	0,215
Var 8	-0,021	-0,017	0,155	-0,061	0,316	-0,099	0,386	1,000	0,160	-0,091	-0,006	0,247	0,143	0,021	0,080
Var 9	-0,473	-0,413	-0,114	0,026	0,199	-0,098	0,530	0,160	1,000	0,423	0,001	0,209	0,088	0,103	-0,034
Var 10	-0,446	0,114	-0,130	-0,264	-0,064	0,194	0,114	-0,091	0,423	1,000	0,218	-0,021	0,076	0,342	-0,163
Var 11	-0,249	0,119	-0,132	-0,203	-0,141	0,572	-0,136	-0,006	0,001	0,218	1,000	0,428	-0,037	-0,153	-0,193
Var 12	-0,017	-0,377	-0,077	-0,088	-0,078	0,372	0,462	0,247	0,209	-0,021	0,428	1,000	0,472	-0,117	0,397
Var 13	-0,085	-0,325	0,147	-0,111	-0,005	-0,116	0,321	0,143	0,088	0,076	-0,037	0,472	1,000	-0,189	0,386
Var 14	0,085	0,070	-0,396	0,128	0,008	0,130	0,221	0,021	0,103	0,342	-0,153	-0,117	-0,189	1,000	0,043
Var 15	0,150	-0,374	-0,160	0,247	-0,0780	0,032	0,215	0,080	-0,034	-0,164	-0,193	0,397	0,386	0,043	1,000

Pode ser notado através da Tabela 18 que as variáveis possuem coeficientes de correlação bastante baixos, indicando que as variáveis selecionadas não estão correlacionadas entre si.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Filho, P. A. C.; Poppi, R. J. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio. Determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. *Quim. Nova* **2002**, 25, (1), 46-52.
2. Filho, P. A. C.; Poppi, R. J. Algoritmo genético em química. *Quim. Nova* **1999**, 22, (3), 405-411.
3. Martens, H.; Naes, T. *Multivariate calibration*. JOHN WILEY & SONS INC: NEW YORK, 1989.
4. Cartwright, H. M. *Applications of artificial intelligence in chemistry*. OXFORD SCIENCE PUBLICATIONS: NEW YORK, 1995.
5. Wise, B. M.; Gallagher, D. A.; Bro, R.; Shaver, J. M.; Winding, W.; Koch, R. S. *PLS Toolbox Version 4.0 for Use with MATLAB*, EIGENVECTOR RESEARCH INC: WENATCHEE, 2006.
6. Meiselman, H. L. Critical evaluation of sensory techniques. *Food. Qual. Prefer.* **1993**, 4, 33-40.
7. Williams, A. A. Flavour quality - Understanding the relationships between sensory responses and chemical stimuli. What are we trying to do? The data, approaches and problems. *Food. Qual. Prefer.* **1994**, 5, (1-2), 5-16.
8. Armstrong, G.; McIlveen, H.; McDowell, D.; Blair, I. Sensory analysis and assessor motivation: Can computers make a difference? *Food. Qual. Prefer.* **1997**, 8, (1), 1-7.
9. Sidel, S. L.; Stone, H. The role of sensory evaluation in the food industry. *Food. Qual. Prefer.* **1993**, 4, 65-73.
10. Meilgaard, M. C.; Civille, G. V.; Carr, B. T. *Sensory evaluation techniques*. CRC PRESS INC: FLORIDA, 1988.
11. Land, D. G.; Shepherd, H. In *Sensory analysis of foods*, Piggott, J. R., Ed. ELSEVIER APPLIED SCIENCE: NEW YORK, 1984, pp 179-242.
12. McTigue, M. C.; Koehler, H. H.; Silbernagel, M. J. Comparison of four evaluation methods for assessing cooked dry bean flavor. *J. Food Sci.* **1989**, 54, (5), 1278-1283.

13. Stone, H.; Sidel, J. L.; Oliver, S.; Woolsey, A.; Singleton, R. C. sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technol.* **1974**, 28, (11), 24-34.
14. Meilgaard, M. C.; Muller, J. E. Progress in descriptive analysis of beer and brewing products. *MBAA Tech. Quart.* **1987**, 24, 79-85.
15. Araújo, F. B.; Silva, P. H. A.; Minim, V. P. R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2003**, 23, (2), 121-128.
16. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. NBR14140; Análise Sensorial - Teste de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ). São Paulo, Comitê Brasileiro de Alimentos e Bebidas. 1998.
17. Lesschaeve, I.; Issanchou, S. Could selection tests detect the future performance of descriptive panellists? *Food Qual. Prefer.* **1996**, 7, (3,4), 177-183.
18. Stone, H.; Sidel, J. L.; Bloomquist, T. J. Quantitative descriptive analysis. *Cereal Foods World* **1980**, 25, (10), 642-644.
19. AOAC Official Method 970.16. Bitterness of beer. bitterness units method. ASBC: Beer 23. JAOAC 52, 1161 (1969). 1969.
20. Wampler, T. P.; Washall, J. W.; Matheson, M. J. Applications of purge-and-trap to the analysis of beer. *Amer. Lab.* **1996**, 28, (11), 18T-18V.
21. Pinho, O.; Ferreira, I.; Santos, L. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1121, (2), 145-153.
22. Kasemets, K.; Kahru, A.; Laht, T.; Paalme, T. Study of the toxic effect of short- and medium-chain monocarboxylic acids on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* using the CO₂-auxo-accelerator fermentation system. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, 111, 206-215.
23. Gil, M.; Cabellos, J. M.; Arroyo, T.; Prodanov, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the denomination of origin "Vinos de Madrid" (Spain). *Anal. Chim. Acta* **2006**, 563, (1-2), 145-153.
24. Coghe, S.; Benoot, K.; Delvaux, F.; Vanderhaegen, B.; Delvaux, F. R. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: Indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, (3), 602-608.
25. Lermusieau, G.; Bulens, M.; Collin, S. Use of GC-olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, (8), 3867-3874.

26. Coelho, E.; Rocha, S. M.; Delgadillo, I.; Coimbra, M. A. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv 'Baga' ripening. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 563, 204-214.
27. Holadová, K.; Prokupková, G.; Hajšlová, J.; Poustka, J. Headspace solid-phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oil employing solvent based matrix modification. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 582, 24-33.
28. Cramer, A. J.; Mattinson, D. S.; Fellman, J. K.; Baik, B. K. Analysis of volatile compounds from various types of barley cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7526-7531.
29. Rodriguez-Bencomo, J. J.; Conde, J. E.; Garcia-Montelongo, F.; Perez-Trujillo, J. P. Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2003**, 991, (1), 13-22.
30. Pan, Z.; Wang, L.; Mo, W.; Wang, C.; Hu, W.; Zhang, J. Determination of benzoic acid in soft drinks by gas chromatography with on-line pyrolytic methylation technique. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 545, 218-223.
31. Ochiai, N.; Sasamoto, K.; Takino, M.; Yamashita, H.; Daishima, S.; Heiden, A. C.; Hoffmann, A. Simultaneous determination of preservatives in beverages, vinegar, aqueous sauces, and quasi-drug drinks by stir-bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GS-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373, 56-63.
32. Pollock, J. R. A. *Brewing science*. ACADEMIC PRESS INC: LONDON, 1981; Vol. 2.
33. Komes, D.; Ulrich, D.; Lovric, T. Characterization of odor-active compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 222, 1-7.
34. Lee, S.; Noble, A. C. Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 8036-8044.
35. Alves, R. F.; Nascimento, A.; Nogueira, J. Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 546, (1), 11-21.
36. Kafkas, E.; Cabaroglu, T.; Selli, S.; Bozdogan, A.; Kurkcuoglu, M.; Paydas, S.; Baser, K. Identification of volatile aroma compounds of strawberry wine using solid-phase microextraction techniques coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Flavour Frag. J.* **2006**, 21, (1), 68-71.
37. Cakir, A. Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, 32, (9), 809-816.

38. Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 12, 564-582.
39. Câmara, J. S.; Alves, M. A.; Marques, J. C. Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 555, 191-200.
40. Camara, J. S.; Herbert, P.; Marques, J. C.; Alves, M. A. Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 513, (1), 203-207.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os trabalhos elaborados nesta tese confirmaram a potencialidade do uso dos métodos quimiométricos, principalmente aqueles referentes à inteligência artificial, tanto no desenvolvimento da determinação dos parâmetros operacionais de uma metodologia analítica quanto na interpretação e tratamento dos dados cromatográficos estudados.

O procedimento quimiométrico de otimização simultânea estabelecido através do uso de estratégias quimiométricas sofisticadas, redes neurais e algoritmo genético, mostrou-se eficaz e relevante para a otimização e determinação simultânea de cinco pesticidas organoclorados e organofosforados em infusos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá doce), como também na concomitante determinação de 12 bifenilas policloradas em leite materno. A maximização dos sinais cromatográficos nos dois estudos se deu pela otimização dos parâmetros de extração HS-SPME, sendo obtidos para duas fibras avaliadas os valores dos parâmetros: 67 e 77 % para diluição do chá, 65,5 e 65,0 °C para temperatura de extração, 50 e 39 minutos para tempo de extração e 0,36 g mL⁻¹ de concentração de NaCl para ambas as fibras. As condições de extração HS-SPME otimizadas para o estudo das bifenilas policloradas foram: concentração de NaCl de 0,36 mL⁻¹, temperatura de extração 95,0 °C, tempo de extração 60 minutos e adição 210 µL de co-solvente metanol. O sucesso da abordagem neuro-genética nos estudos analíticos propostos apontou a potencialidade do método indicando que o mesmo pode ser estendido e aplicado a outros diversos tipos de determinações, principalmente as que envolvem sistemas complexos onde é necessária uma multioptimização (otimização simultânea de várias respostas), podendo resultar na diminuição dos valores dos limites de detecção e quantificação e otimização do processo de análise.

A aplicação da rede de Kohonen foi muito importante no estudo exploratório de 20 marcas comerciais brasileiras de cerveja em lata possibilitando a observação das similaridades e diferenças entre as amostras estudadas. Através do mapa de Kohonen foi possível visualizar a formação de seis grupos de amostras, e pelos mapas das variáveis foi possível identificar quais os picos (compostos) foram expressivos na caracterização das cervejas. Os espectros de massas permitiram a validação dos

grupamentos formados pela rede, pela identificação de diversos tipos de compostos tais como álcoois, ésteres, um composto contendo enxofre, ácido orgânico, entre outros, todos citados na literatura como possíveis constituintes de bebidas fermentadas. Os compostos apresentados no trabalho foram os principais responsáveis pelos grupamentos estabelecidos.

A aplicação do algoritmo genético para seleção de variáveis permitiu a correlação entre os dados cromatográficos obtidos de 32 amostras de cerveja comerciais em garrafa (31 nacionais e uma importada) e os dados resultantes de um procedimento sensorial denominado Análise Descritiva Quantitativa de dois atributos sensoriais da cerveja, amargor e sabor do grão. Foi possível identificar quais os compostos das cervejas estão diretamente relacionados aos parâmetros de qualidade avaliados, além também da obtenção de modelos de regressão referentes aos atributos, que poderão servir de moldes para implementação da metodologia no monitoramento da produção da cerveja, bem como da matéria-prima. Para o atributo amargor foram necessárias somente 11 variáveis (compostos) para a construção do modelo de regressão sendo obtido um coeficiente de correlação de 0,9678 entre os valores reais e estimados pelo modelo, e o desvio padrão de 0,33 cm. Ainda em relação a esse atributo, foi realizado o método espectrofotométrico padrão oficial da AOAC para determinação de amargor em cerveja. Foi possível notar uma relação com tendência linear entre os valores de amargor obtidos pelos provadores através da ADQ e os valores resultantes do método-padrão, visto o valor do coeficiente de correlação linear dessa relação, 0,7832. Em relação ao atributo sabor do grão foram necessárias 15 variáveis (compostos) para a construção do modelo de regressão, sendo o coeficiente de correlação obtido entre os valores reais e estimados pelo modelo de 0,9334, e o desvio padrão de 0,26 cm. A aplicação de algoritmo genético para a seleção de variáveis permitiu a construção dos modelos de regressão para os parâmetros de qualidade avaliados de maneira simplificada (menor número de variáveis), graças à definição dos compostos diretamente relacionados com os atributos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

PERSPECTIVAS FUTURAS

O procedimento quimiométrico de otimização simultânea estabelecido através da abordagem neuro-genética poderá ser validado através dos cálculos dos limites de detecção e quantificação.

O estudo exploratório das cervejas pode ser estendido a um número maior de amostras, podendo ainda ser inferidos outros dados, não somente envolvendo a composição, tais como o fabricante e a região de fabricação.

A análise descritiva quantitativa e a seleção de variáveis utilizando algoritmo genético podem ser aplicadas a um maior número de atributos sensoriais da cerveja, como também ser realizado um teste de aceitação das cervejas a fim de tentar correlacionar os atributos com a aceitação do produto.