UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ÉVERTON SÉRGIO ESTRACANHOLLI

**Quantificação óptica de carboidratos e etanol em mosto
cervejeiro**

São Carlos

2012

ÉVERTON SÉRGIO ESTRACANHOLLI

Quantificação óptica de carboidratos e etanol em mosto cervejeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador
Bagnato

Versão original

São Carlos
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Estracanholti, Éverton Sérgio

Quantificação óptica de carboidratos e etanol em mosto
cervejeiro / Éverton Sérgio Estracanholti; orientador Vanderlei
Salvador Bagnato.-- São Carlos, 2012.

142 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física -
Área de concentração: Física Aplicada) – Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Espectroscopia. 2. Fermentação. 3. Redes Neurais
Artificiais. 4. Análise de componentes principais. 5. Mosto
cervejeiro.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Éverton Sérgio Estracanholi

Tese apresentada ao Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada.

Aprovado(a) em: 08/10/2012

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Vanderlei Salvador Bagnato

Instituição: IFSC/USP

Prof(a). Dr(a). Cleber Renato Mendonça

Instituição: IFSC/USP

Prof(a). Dr(a). João Batista de Almeida e Silva

Instituição: EEL/USP

Prof(a). Dr(a). Waldemar Gastoni Venturini Filho

Instituição: UNESP/Botucatu

Prof(a). Dr(a). Ubirajara Pereira Rodrigues Filho

Instituição: IQSC/USP

**Dedico este trabalho aos meus
familiares e amigos que me acompanharam
por toda esta jornada.**

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste Trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Verlei Salvador Bagnato, pela orientação, paciência, amizade, confiança e incentivo.

Aos meus co-orientadores, Dr.(a) Cristina Kurachi e Dr. Igor Polikarpov pela instrução, orientação e colaboração na realização e compreensão dos experimentos.

Ao meu pai Eurídice Estracanholti que me ensinou os primeiros passos na produção artesanal de cerveja.

Ao amigo Carlos Alberto Colombo e demais funcionários da cervejaria Cevada Pura pela ajuda e aprendizado em técnicas de fabricação de cerveja.

Aos colegas do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, pelo apoio técnico e colaboração que possibilitaram a realização do trabalho.

Aos amigos do grupo de Óptica e dos laboratórios de Biofotônica e Cristalografia, que me acompanharam durante toda a minha jornada, contribuindo para o desenvolvimento do trabalho com comentários, críticas, sugestões e todo o apoio que tanto necessitei.

Às amigas Am;ia Bernardes, Fern;ia Batista, Franciele Colussi, Lívia Manzini, Lívia Maria Faim, Daiana Evelin Martil, Viviane Serpa, Ana Cristina Phul, Maria Luiza Voltatódio, Marisa Lima, muito obrigado por terem tido enorme paciência e carinho sendo minhas primeiras professoras de microbiologia.

Aos amigos Gustavo Nicolodelli, Sebastião Pratavieira e Aless;ro Cosci e Fern;ia Batista por terem realizado inúmeras discussões construtivas ao meu trabalho.

Aos meus familiares, pela confiança, incentivo, carinho e todo apoio que depositam em mim.

À todos os meu amigos, que sempre me incentivaram a prosseguir em meu caminho, me d;io forças nas dificuldades e compartilh;o dos bons momentos.

Ao Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo, CAPES, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro e infra-estrutura.

Resumo

ESTRACANHOLLI, E. S. **Quantificação óptica de carboidratos e etanol em mosto cervejeiro**. 2012. 142 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, 2012.

Neste estudo realizamos uma prova de conceito através da combinação de três técnicas com a finalidade de monitorar a mosturação e fermentação da cerveja durante o processo de fabricação. O princípio deste trabalho é baseado em uma análise espectral, utilizando um equipamento de absorção na região do infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR – *Fourier Transform Infrared*) de amostras coletadas durante a fabricação da cerveja. Combinado com técnicas de processamento de Análise de Componentes Principais e Redes Neurais Artificiais é possível quantificar a concentração dos principais carboidratos e etanol presentes nestas amostras. Estas medidas físicas e químicas irão permitir a redução de erros durante a produção de cerveja além de otimizar as reações enzimáticas intrínsecas de suas principais etapas de análise. As técnicas ópticas de absorção, juntamente com o processamento neural, apresentam grandes vantagens, principalmente devido ao fato de serem facilmente adaptáveis aos equipamentos industriais, fornecendo respostas em curtos intervalos de tempo com alta sensibilidade e especificidade.

Palavras-chave: Espectroscopia. Fermentação. Redes neurais artificiais. Análise de componentes principais. Mosto cervejeiro.

Abstract

ESTRACANHOLLI, E. S. **Optical quantification of carbohydrates ; ethanol in beer wort**. 2012. 142 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, 2012.

This study is fundamentally a proof of concept. By the combination of three techniques, our aim is to develop a new method of monitoring beer wort production and fermentation during brewing. The principle is based on spectral analyses, using Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy to collect absorption data from beer wort samples. This data is refined by the application of a statistical method, Principal Component Analysis (PCA), to reduce the number of variables. A computational method, Artificial Neural Network (ANN), enables quantification of carbohydrates and ethanol concentrations. Such physical-chemical measurements are expected to allow both reduction of mistakes during beer processing and optimization of enzymatic reactions, enhancing brewing processes. Optical absorption techniques associated with Artificial Neural Network present great advantages, mainly because the first ones are more easily inserted in industries than the latter ones, since they enable assessing the process status at short intervals, with high sensibility ; specificity.

Key-words: Spectroscopy. Fermentation. Principal component analysis. Artificial neural networks. Beer wort.

Lista de Figuras

Figura 1 - Classificação das Bebidas Alcoólicas mais consumidas (14)	26
Figura 2 - Produção anual de cerveja entre 1994 e 2004 (14).	26
Figura 3 - Balança comercial brasileira do mercado cervejeiro	27
Figura 4 - Procedimento típico de mosturação por infusão	30
Figura 5 - Cadeia de glicoses linear, amilose (a) e cadeia ramificada, amilopectina (b) sendo quebradas pelas enzimas β -amilase e α -amilase, produzindo respectivamente maltose e dextrinas (22)	31
Figura 6 - Estrutura da molécula de glicose com a numeração convencional dos átomos de carbono (22).	31
Figura 7 - Estrutura da molécula de maltose, sendo formada por 2 moléculas de glicose fazendo uma ligação 1-4 (22).....	32
Figura 8 - Estrutura da molécula de isomaltose, sendo formada por 2 moléculas de glicose fazendo uma ligação 1-6 (22).....	33
Figura 9 - Permeabilidade das moléculas representadas pelas esferas através do tamanho dos poros, permitindo ou não permitindo a passagem pelo material que preenche a coluna (a). A seleção das moléculas devido à combinação dos tamanhos dos poros escolhidos para a composição do material que preenche a coluna (b).....	48
Figura 10 - Princípio do funcionamento das colunas baseadas no sistema de troca iônica, cujas moléculas trocam íons com a resina da coluna de HPLC.....	48
Figura 11 - Range espectral da radiação eletromagnética correlacionada com as técnicas espectroscópicas mais usuais. (49).....	51
Figura 12 - Diagrama de energia representando a correlação entre as transições de níveis rotacionais, vibracionais e eletrônicos (50).	52
Figura 13 - Diagrama dos níveis de energia das transições vibracionais. O potencial parabólico está representado pela linha tracejada e o potencial cúbico pela linha pontilhada (50).....	54
Figura 14 - Representação da montagem de um espectrômetro de FTIR (52).	56
Figura 15 - Interferograma típico obtido pela leitura de intensidade óptica no detector em função da posição do espelho móvel do interferômetro.	57
Figura 16 - Aplicação da transformada de Fourier em um interferograma, convertendo a medida que inicialmente está em função da posição do espelho para o espaço de número de onda da radiação eletromagnética que compõe o interferograma.	58
Figura 17 - Espectro de absorção na região do infravermelho médio de uma amostra de mosto durante a etapa de mosturação	58
Figura 18 - Representação da disposição de todos dados de forma matricial	60
Figura 19 - Representação da disposição dos dados na nova base	63
Figura 20 - Componente principal 1 <i>versus</i> Componente principal 2	64

Figura 21 - Representação de um neurônio biológico	66
Figura 22 - Representação de um neurônio artificial	67
Figura 23 - Topologia de uma rede neural tipo <i>Perceptron</i>	70
Figura 24 - Solução de uma rede <i>Perceptron</i> para um caso bidimensional de separação de 2 grupos;	71
Figura 25 - Aprendizagem com evolução da fronteira de separação (A). A possibilidade de infinitas fronteiras de separação como resposta para o mesmo problema (B);	73
Figura 26 - Topologia da rede neural tipo <i>Adaline</i>	74
Figura 27 - Topologia da rede neural tipo <i>Perceptron Multicamadas</i>	77
Figura 28 - Conjunto de dados cuja equação que rege seu comportamento é desconhecida (A). A soma de várias sigmóides pode construir uma curva que explica o comportamento dos dados.....	81
Figura 29 - Equipamento de aquecimento controlado para mosturação e tina de filtragem à esquerda e um reservatório de água quente à direita.....	83
Figura 30 - Tanques de fermentação com temperatura controlada.	84
Figura 31 - Curvas de mosturação utilizadas para produzir amostras com distintas concentrações de carboidratos;.....	85
Figura 32 - Simulação do funcionamento da realização da medida através da passagem de luz pela amostra à esquerda. Foto da célula de ZnSe construída à direita.....	88
Figura 33 - Corrida de HPLC típico das amostras do padrão (A) e das amostras de mosto (B).	92
Figura 34 - Correlação entre as áreas dos picos de retenção e a concentração para cada carboidrato e etanol analisados.	93
Figura 35 - Concentração dos carboidratos analisados para as quatro curvas de mosturação utilizadas.	97
Figura 36 - Espectros de absorção no infravermelho médio para a água, maltose 10%, etanol 99,9%, mosto 12°Brix e mosto 3,2°Brix (A). B;as de absorção característicos dos carboidratos e etanol na região de <i>fringeprint</i> (B).	98
Figura 37 - Comparação entre as b;as de absorção do etanol, a maltose e as dextrinas.	100
Figura 38 - Espectro de absorção das amostras da curva de mosturação D, abrangendo o pico de absorção da água entre 1500 e 1870 cm ⁻¹ (A) e a região de <i>fringeprint</i> (B).	101
Figura 39 - Espectros de absorção das amostras de mosto da etapa de mosturação após a normalização através da divisão da área da b;a de absorção da água.	102
Figura 40 - Apresentação das duas maiores componentes principais para os 6 métodos de análise das amostras coletadas na etapa de mosturação.	105
Figura 41 - Dependência típica da representatividade dos dados em função do número de componentes principais utilizados.	107

Figura 42 - Erro quadrático médio entre a saída da rede neural e a concentração real dos carboidratos em função do número de neurônios que constitui a rede.	109
Figura 43 - Correlação entre a concentração dos carboidratos analisados através da técnica de HPLC e absorção no infravermelho médio.....	110
Figura 44 - Curva de mosturação com a concentração de cada carboidrato analisado, determinado pelas técnicas de HPLC e absorção no infravermelho médio.....	114
Figura 45 - Correlação não linear entre a quantificação da maltotriose pela técnica de HPLC e a técnica de absorção no infravermelho médio.	115
Figura 46 - Curvas de fermentação, com a concentração dos carboidratos e etanol analisados, determinados por HPLC.	117
Figura 47 - Espectros de absorção no infravermelho médio para as amostras de mosto da etapa de fermentação.....	119
Figura 48 - Apresentação das duas maiores componentes principais para os 6 métodos de análise das amostras coletadas na etapa de fermentação.	121
Figura 49 - Correlação entre a concentração de glicose determinada por HPLC e por absorção no infravermelho médio.....	124
Figura 50 - Curva de fermentação com a concentração de cada carboidrato e etanol analisados, determinado pelas técnicas de HPLC e absorção no infravermelho médio.	126
Figura 51 - Apresentação das duas maiores componentes principais para espectros de absorção por FTIR de amostras de maltose e etanol em solução aquosa.	129

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Consumo médio de cerveja em litros por habitante em alguns países que mais consomem esta bebida.	25
Tabela 2 - Valores dos pontos que formam os espectros de absorção representados em uma tabela.	59
Tabela 3 - Tempo de retenção médio dos carboidratos e do etanol analisados.	92
Tabela 4 - Concentração dos carboidratos analisados, determinados pela técnica de HPLC, da curva de mosturação A.	94
Tabela 5 - Concentração dos carboidratos analisados, determinados pela técnica de HPLC, da curva de mosturação B.	95
Tabela 6 - Concentração dos carboidratos analisados, determinados pela técnica de HPLC, da curva de mosturação C.	95
Tabela 7 - Concentração dos carboidratos analisados, determinados pela técnica de HPLC, da curva de mosturação D.	96
Tabela 8 - Descrição dos métodos de análise utilizados para o cálculo das componentes principais.	104
Tabela 9 - Valores de coeficiente angular e R^2 para os carboidratos analisados quando comparada a técnica de HPLC com a técnica de absorção no infravermelho médio.	111
Tabela 10 - Resultados com o número de componentes principais, número de neurônios da rede PMC de melhor desempenho para cada número de componente principal, coeficiente angular e R^2 para cada método de análise e carboidrato na etapa de mosturação.	112
Tabela 11 - Concentração de cada carboidrato analisado para a curva de validação da mosturação, obtido pela técnica de HPLC e pela técnica de absorção no infravermelho médio.	113
Tabela 12 - Resultados com o número de componentes principais, número de neurônios da rede PMC de melhor desempenho para cada número de componente principal, coeficiente angular e R^2 para cada método de análise e carboidrato na etapa de fermentação.	123
Tabela 13 - Resultados com o número de componentes principais, número de neurônios da rede PMC de melhor desempenho para cada número de componente principal, para cada método de análise e o erro médio na determinação da concentração da glicose e dextrinas na etapa de fermentação.	125
Tabela 14 - Concentração de cada carboidrato e etanol analisado para a curva de validação da fermentação, obtido pela técnica de HPLC e pela técnica de absorção no infravermelho médio.	126

Lista de Abreviaturas ou Siglas

°C – grau Celsius

°Brix – grau Brix

ATP – adenosina trifosfato

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

g – grama

Kg - Kilograma

h – Hora

min - Minutos

nm – nanômetro

cm - centímetro

cm⁻¹ – Unidade de número de onda (1/cm)

K⁺ – íon de potássio

Mg⁺⁺ – íon de manganês

Na⁺ – íon de sódio

PCA – *Principal Component Anlysis* (Análise de Componentes Principais)

ACP – *Análise de componentes Principais*

PC1 – *Principal Component 1* (Componente Principal 1)

PC2 – *Principal Component 2* (Componente Principal 2)

RNA – Redes Neurais Artificiais

ANN – *Artificial Neural Network* (Redes Neurais Artificiais)

FTIR – *Fourier Transform Infrared* (Transformada de Fourier no infravermelho)

s – segundo

UV – ultravioleta

MIR – *Medium infrared* (Infravermelho médio)

NIR – *Near infrared* (Infravermelho próximo)

Sumário

1	Introdução	23
1.1	O Mercado Cervejeiro	25
1.2	O processo de produção de cerveja	27
1.2.1	Mosturação	29
1.2.2	Fermentação	34
1.3	Monitoramento do processo de produção	36
1.4	Método Proposto: Espectroscopia, Análise Multivariada e Redes Neurais Artificiais	39
2	Objetivo	43
3	Motivação	45
4	Considerações Gerais	47
4.1	High Precision Liquid Chromatography	47
4.2	Espectroscopia de Infravermelho	49
4.2.1	Espectroscopia FTIR	55
4.3	Análise das Componentes Principais	58
4.4	Redes Neurais Artificiais	65
4.4.1	Rede Perceptron	70
4.4.2	Rede Adaline e Regra Delta	73
4.4.3	Perceptron Multicamadas	76
5	Materiais e Métodos	83
5.1	Produção das amostras de mosto	83
5.2	Medidas de cromatografia líquida de alta precisão	86
5.3	Medidas de absorção no infravermelho médio	87
5.4	Processamento dos espectros	89
6	Resultados e Discussão	91
6.1	Calibração com a técnica de HPLC	91
6.2	Quantificação de carboidratos na etapa de mosturação por HPLC	94
6.3	Análise exploratória dos espectros de absorção no infravermelho médio	97
6.4	Quantificação de carboidratos na etapa de mosturação por FTIR	101
6.5	Quantificação de carboidratos e etanol na etapa de fermentação por HPLC	115
6.6	Quantificação de carboidratos e etanol na etapa de fermentação por FTIR	118
6.7	Discussão com resultados de outras técnicas	128
7	Conclusão	133
8	Trabalhos Futuros	135
	Referências	137

1 Introdução

Sensibilidade e especificidade são as mais importantes e fundamentais características em análises de qualquer indústria alimentícia. Identificar a presença e quantificar os carboidratos nas amostras pode indicar a qualidade e as propriedades de um produto, além de ser uma via de detecção de contaminação e adulteração. (1,2) Além disso, a análise dos carboidratos é igualmente importante para outras áreas como, por exemplo, em pesquisas de biotecnologia, usinas sucroalcooleiras, na biomedicina. Em biomedicina, por exemplo, a elevação do nível de carboidratos pode estar correlacionada com as mudanças metabólicas do indivíduo, informação relevante para o diagnóstico.

Tanto em materiais biológicos, quanto em alimentos ou qualquer outro caso, geralmente são encontrados vários tipos de carboidratos em concentrações diversas. A grande quantidade de um desses tipos pode mascarar a detecção dos outros açúcares que estão em menor quantidade.

Vários produtos, como os derivados do milho, possuem seus preços controlados pela quantidade de açúcares fermentáveis que estão presentes e, portanto, é importante tanto para o comerciante que vende quanto para o que compra este produto, determinar com uma razoável precisão a quantidade dos principais açúcares, como a maltotriose, a maltose e a glicose. Mesmo que as variações aparentem ser pequenas, quando se lida com grandes quantidades, como no caso das grandes indústrias que adquirem centenas de toneladas, a diferença de preço passa a ser significativa.

A análise da quantidade de carboidratos contidos em alimentos cotidianos é importante para estudos dos aromas e avaliações nutricionais. Diferentes tipos de adoçantes são adicionados aos produtos de consumo diário para criar aumento de aromas.

A medida da quantidade de álcool, neste caso o etanol, é igualmente importante e frequentemente realizada em indústrias de bebidas alcoólicas. Entretanto, os métodos tradicionais tornam esta tarefa relativamente mais difícil. Técnicas como destilação, cromatografia gasosa (CG) (3,4), análise enzimática (5), eletroforese (6), por medida de densidade (7), índice de refração (8), cromatografia

líquida de alto desempenho (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) (1,9-12), podem ser usadas para análises precisas, mas em diferentes graus, elas requerem tempo de análise, complexidade, são destrutivas, dependentes de manuseio técnico, envolvem alto custo instrumental ou apresentam bons resultados apenas em casos de análise de amostras puras, necessitando de um tratamento prévio.

O etanol é tradicionalmente produzido pela fermentação de açúcares pelo fermento (ou levedo), um tipo de fungo que produz este tipo de álcool como subproduto de seu metabolismo. Geralmente, a produção de etanol combustível envolve a quebra do amido em açúcares simples, a fermentação desses açúcares pelo levedo e finalmente a recuperação do etanol como produto principal, além de subprodutos que são utilizados como alimento animal. A otimização da fermentação pode gerar um aumento no fornecimento e rentabilidade deste combustível.

Muitas empresas operam com margens de lucro estreitas, requerendo um grande volume de produção e rápidas negociações de seus produtos para sobreviverem. Como consequência, o conhecimento preciso, o controle dos ingredientes e um rápido monitoramento dos processos de produção são importantes fatores de controle de custos e qualidade.

Dentre as inúmeras importâncias e aplicações de sistemas de análise de carboidratos e etanol, iremos focar este trabalho em um setor específico, o mercado de produção de cerveja. Dessa forma, temos uma série de problemas e ponto de aplicação específico, com objetivos de estudo e análises bem definidos. Porém, todos os resultados e procedimentos realizados neste trabalho podem facilmente ser expandidos para os demais setores. A escolha desse setor em específico é resultado de uma série de fatores, como o fato de este ser um dos setores de maior crescimento econômico tanto no Brasil quanto no exterior, sendo um dos produtos mais consumidos pela população brasileira.

1.1 O Mercado Cervejeiro

O mercado de produção de cerveja é um mercado de franca expansão, consolidação e forte internacionalização. No mercado de cerveja, o Brasil só perde, em volume, para a China (35 bilhões de litros/ano), Estados Unidos (23 bilhões de litros/ano), Alemanha (10,7 bilhões de litros/ano) e Rússia (10 bilhões de litros/ano) (Fonte: Cerveceros Latinoamericanos - 2007) (13). O consumo da bebida, em 2007, apresentou um crescimento em relação ao ano anterior, totalizando 10,34 bilhões de litros. Quanto ao consumo per capita, o Brasil apresenta uma média de 47,6 litros/ano por habitante, estando muito abaixo do total registrado por países como, por exemplo, Reino Unido (101,5 litros/ano) e Alemanha (117,7 litros/ano) como indicado na tabela 1.

Tabela 1 - Consumo médio de cerveja em litros por habitante em alguns países que mais consomem esta bebida.

CONSUMO PER CAPITA (litros/habitante)	
Rep. Checa	158
Alemanha	117,7
Reino Unido	101,5
Austrália	92
Estados Unidos	84
Espanha	78,3
Japão	56
México	50
Brasil	47
França	35,5
Argentina	34
China	18
Fonte: Brewers of Europe, Alaface e Sindicerv (2002-2003)	

Na saída da fábrica, custo da cerveja brasileira é um dos menores do mundo, porém até chegar ao consumidor final a cerveja sofre a incidência de uma série de tributos fiscais que representam pelo menos 30% do custo total no preço do produto. Entre as bebidas consumidas pelos brasileiros, a cerveja é a mais consumida em volume e frequência, correspondendo a 61% do consumo total (Figura 1).

Fonte: Elaborado com base no 1º Levantamento Nacional sobre os Padrões de Consumo de Álcool na População Brasileira (2007).

Figura 1 - Classificação das Bebidas Alcoólicas mais consumidas (14)

Desde 1994 até 2004 a produção nacional de cerveja vem aumentando significativamente, atingindo a marca de 8,5 bilhões de litros por ano.

Figura 2 - Produção anual de cerveja entre 1994 e 2004 (14).

Os dados da balança comercial da indústria cervejeira indicam a autossuficiência da produção para o abastecimento do mercado nacional. As importações são compostas por cervejas especiais, consumidas em estabelecimentos diferenciados, onde a bebida é harmonizada a pratos sofisticados. O preço médio do litro da cerveja importada foi de US\$ 0,77 durante 2006 e o

volume total foi de 4,86 milhões de litros, um acréscimo de 57% em relação a 2005, que demonstra tanto possibilidades de exportação do setor, como demanda nacional pelas cervejas mais sofisticadas. O crescimento do volume exportado foi de 27% em 2006, totalizando 42,72 milhões de litros.

Fonte: Sindicerv

Figura 3 - Balança comercial brasileira do mercado cervejeiro

O setor cervejeiro emprega mais de 150 mil pessoas, entre postos diretos e indiretos, com investimentos que tendem a continuar aumentando. Nos últimos cinco anos, as indústrias cervejeiras investiram mais de R\$3 bilhões, com 10 novas plantas industriais entrando em operação, além de ampliações e modernizações em fábricas já existentes. Além disso, várias micro cervejarias foram implementadas no País nos últimos anos.

1.2 O processo de produção de cerveja

A cerveja é uma bebida alcoólica produzida a partir da fermentação de um meio aquoso obtido a partir da fervura de grãos de cereais e lúpulo (*Humulus lupulus*). Tradicionalmente, a cerveja é obtida a partir de quatro ingredientes: água, malte de

grãos (geralmente de cevada, mas podem-se utilizar outros tipos de grãos maltados ou não maltados), lúpulo e fermento (15).

A água deve ser basicamente potável, límpida e o mais importante, sem cloro. Antes de ser utilizada no processo de produção, o ideal é que a água passe por um filtro que remova as partículas em suspensão e em seguida por um filtro de carvão para remover o cloro. Uma característica importante é a presença de alguns sais minerais, que serão utilizados em uma etapa posterior, a fermentação, provendo íons necessários ao metabolismo celular das leveduras. Dependendo do estilo de cerveja a ser produzida é ideal que a água contenha uma quantidade maior de sais, isto é, seja mais dura, ou tenha uma quantidade menor, portanto, mais mole (16).

A parte do lúpulo utilizada no processo são as flores, onde estão os grânulos de lupulina, contendo os compostos amargos e aromáticos de interesse na produção de cerveja. As substâncias de maior interesse são os óleos essenciais, os polifenóis e as resinas amargas (13).

O fermento cervejeiro é um microrganismo monocelular pertencente ao reino fungi, uma levedura. Na fabricação de cerveja a levedura utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, responsável por converter os carboidratos em etanol e gás carbônico, além de produzir alguns compostos importantes para o aroma e sabor da cerveja. O levedo é aproximadamente dez vezes maior que uma bactéria, medindo em torno de 5 a 10 micrometros. Mas mesmo assim é muito pequeno para ser visto a olho nu. A menor colônia capaz de ser vista em uma cultura celular possui pelo menos 1 milhão de células (15,17,18).

Os maltes são grãos de cereais que passaram por um processo controlado de germinação para aumentar os teores de açúcar e de algumas enzimas. Logo após esses compostos terem atingido seu valor ótimo, os grãos são submetidos a temperaturas elevadas que interrompem a germinação e podem conferir cor e sabores diferenciados, dependendo do grau de tostagem dos mesmos. A maioria das sensações organolépticas produzidas pelo consumo da cerveja, como por exemplo, o corpo, a cor, o aroma e o sabor adocicado são gerados a partir dos maltes utilizados (19).

1.2.1 Mosturação

O malte ainda apresenta um teor alto de amido, que não é consumido pelas leveduras. Então, a produção da cerveja é iniciada com a realização de uma mistura destes grãos com água (que passa a receber o nome de mosto) e através de um aquecimento gradativo, as enzimas α -amilase e β -amilase quebram as ligações químicas do amido presente nos grãos em pedaços menores, os açúcares (20). Os principais açúcares gerados neste processo podem ser subdivididos em duas categorias: os açúcares que podem ser fermentáveis, como a glicose, maltose e maltotriose e a categoria dos açúcares não fermentáveis, compostos de um número alto de moléculas de glicose ligadas, que chamamos de dextrinas. Esse procedimento descrito, de mistura de grãos e água visando ação enzimática sobre o amido recebe o nome de mosturação (16,17,19,21,22).

A mosturação pode ser conduzida através das técnicas de infusão ou decocção (16). Cada uma tem suas características particulares, mas que não é o foco de estudo deste presente trabalho. Ambas as técnicas possuem como principal objetivo a atuação enzimática sobre o amido. Como a técnica mais utilizada, principalmente no Brasil, é a técnica de infusão, optamos por nos ater a esse caso em particular. Para uma mosturação típica por infusão, o mosto cervejeiro composto principalmente de malte de cevada e água deve seguir uma curva de aquecimento semelhante à apresentada na figura 4 abaixo.

Figura 4 - Procedimento típico de mosturação por infusão

Neste procedimento, o cervejeiro utiliza temperaturas por ele determinadas, que estejam próximas das temperaturas ótimas de atividade das enzimas α -amilase e β -amilase, de forma a converter o amido (tanto na forma de amilose quanto na forma de amilopectina) em açúcares fermentáveis e açúcares não fermentáveis. Essas enzimas já estão presentes nos grãos de malte de cevada, embora algumas empresas adicionem enzimas extras com a finalidade de acelerar o processo. A escolha desses patamares de tempo e temperatura é extremamente essencial para a característica final do produto. Na figura 5 abaixo mostramos com mais detalhes essas reações enzimáticas, as mais importantes que ocorrem durante o processo de mosturação.

Figura 5 - Cadeia de glicoses linear, amilose (a) e cadeia ramificada, amilopectina (b) sendo quebradas pelas enzimas β -amilase e α -amilase, produzindo respectivamente maltose e dextrinas (22) .

A glicose é o “bloco de construção” mais elementar e importante para outros tipos de carboidratos presentes na indústria cervejeira. Por ser a estrutura básica, a glicose é classificada como um monossacarídeo. É o açúcar presente em menor quantidade no mosto cervejeiro, chegando ao máximo entre 8% e 10% dos açúcares totais presentes no mosto (22). A estrutura da glicose está apresentada na figura 6.

Figura 6 - Estrutura da molécula de glicose com a numeração convencional dos átomos de carbono (22).

A maltose é uma estrutura formada pela união de duas moléculas de glicose, onde o carbono de número 1 e o carbono de número 4 representados na figura 6 fazem uma ligação química e assume a estrutura apresentada na figura 7. Essa ligação que une as duas moléculas de glicose recebe o nome de ligação 1-4. Este tipo de açúcar está presente em maior quantidade no mosto cervejeiro, atingindo tipicamente, valores entre 46% e 50% e é classificado como um dissacarídeo, por ser formado por duas unidades básicas de glicose.

Figura 7 - Estrutura da molécula de maltose, sendo formada por 2 moléculas de glicose fazendo uma ligação 1-4 (22).

Outro importante açúcar presente no mosto cervejeiro é o trissacarídeo chamado de maltotriose, formada pela união de três moléculas de glicose que se ligam através das ligações 1-4, que constituem cerca de 12% a 18% dos açúcares do mosto cervejeiro.

Conforme as moléculas de glicose vão se unindo exclusivamente através da ligação 1-4, vão formando uma cadeia linear, que é um tipo de amido chamado de amilose, apresentado na figura 5(a) acima.

Porém, há outra possibilidade de ligação química entre as moléculas de glicose. Elas também podem se ligar através do carbono número 1 de uma molécula com o carbono número 6 de outra molécula, conforme apresentado na figura 8 abaixo, chamado de isomaltose.

Figura 8 - Estrutura da molécula de isomaltose, sendo formada por 2 moléculas de glicose fazendo uma ligação 1-6 (22).

Os açúcares que possuem tanto as ligações 1-4 quanto as ligações 1-6 simultaneamente, são as chamadas dextrinas. A cadeia das dextrinas pode apresentar um número grande de moléculas de glicose, até se tornar outra forma de amido, chamado de amilopectina, apresentado na figura 5(b) acima. No malte de cevada, a quantidade de amido pode chegar a aproximadamente 60% do peso seco. No mosto cervejeiro pronto, essa quantidade passa valores entre 25% e 35% dos açúcares totais, mas na forma de açúcares não fermentáveis, isto é, dextrinas de cadeias não tão longas quando comparadas com o amido.

É muito importante para o processo que haja um equilíbrio entre as quantidades de açúcares fermentáveis e dextrinas, pois cada tipo de cerveja requer um padrão muito específico de álcool e corpo (açúcar residual), proveniente principalmente desses açúcares. O cervejeiro geralmente fixa empiricamente tanto os valores de temperatura escolhidos quanto o tempo em que o mosto permanecerá em cada uma dessas temperaturas para cada tipo de cerveja, e ele segue esse padrão categoricamente.

O problema é que dependendo das condições à qual este malte foi produzido, transportado, estocado e até mesmo o tempo de estoque, a quantidade dessas enzimas varia, e pode ser menor do que o necessário. Por exemplo, vamos supor que um mosto típico deve ter 18°brix após permanecer 20 minutos a 60°C, como no caso acima. Se um malte de uma safra ruim apresentar menos β -amilase, após esses 20 minutos o mosto não terá os 18°brix desejáveis pela padronização, pois haveria menos enzima e mais substrato para ser consumido. Consequentemente, o produto final terá menos álcool e mais açúcar residual e, portanto estará fora do

padrão. Esse problema seria facilmente corrigido simplesmente aumentando o tempo em que o mosto permaneceria nessa temperatura de 60°C. A situação inversa seria igualmente problemática. Se o malte vier a apresentar uma quantidade de β -amilase mais alta do que o normal, após o mesmo período de tempo de mosturação, muito mais amido seria convertido em açúcares fermentáveis do que o desejado, produzindo uma cerveja mais alcoólica e poucas dextrinas, consequentemente, com pouco corpo.

Logo após esta etapa de mosturação estar concluída, os grãos são separados da parte líquida. A parte líquida é fervida por aproximadamente 60 a 90 minutos, quando é adicionado o lúpulo, responsável por fornecer várias características importantes ao produto, como amargor, aroma e estabilidade físico-química. Normalmente, poucas gramas de lúpulo são suficientes para obter as características necessárias para a produção de alguns litros de cerveja. O mosto é então resfriado e enviado aos tanques de fermentação, onde o fermento é inoculado.

1.2.2 Fermentação

O fermento cervejeiro por sua vez irá consumir os açúcares fermentáveis presente no mosto e irá liberar álcool e CO₂, além de compostos aromáticos característicos do produto. Dentre as várias características sensoriais que distinguem as cervejas, as mais importantes são, o teor de amargor proveniente do lúpulo utilizado, a cor devido aos tipos de maltes utilizados, o teor de extrato final (vindo da quantidade de dextrinas produzidas na mosturação), produzindo uma cerveja mais doce ou mais seca e o teor de álcool (vindo da quantidade de maltose produzida na mosturação).

Porém, em todos os tipos de cerveja produzidos, este processo fermentativo necessita ser muito bem controlado, principalmente para a produção de cerveja do tipo Pilsen, que é o tipo de cerveja mais consumido no Brasil, por se tratar de um tipo de cerveja que destaca facilmente em suas características organolépticas os defeitos de fabricação. Como a demanda de cerveja no país é extremamente alta, as empresas trabalham em um regime limite de tal forma que querem que seus

produtos estejam nas prateleiras no menor tempo possível. Na etapa de fermentação, quanto mais alta a temperatura, mais rápido é o processo, porém isso tem consequências extremamente ruins para a qualidade da cerveja. Quando a temperatura inicial da fermentação é alta demais (acima de $\sim 15^{\circ}\text{C}$), um dos principais compostos que são produzidos, que acarreta em uma baixíssima qualidade do produto, é o diacetil (2,3-Butanodiona, $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$), responsável por um odor e sabor rançoso (17). Para que isso não ocorra, a temperatura inicial deve ser em torno de 10°C , e após a fermentação atingir um estágio determinado, onde não há mais o crescimento celular, a temperatura pode ser elevada sem a produção excessiva de diacetil e o processo pode ser acelerado. Esse estágio ocorre quando a quantidade de açúcar fermentável no tanque de fermentação está próxima à metade do seu valor inicial (para o caso das cervejas tipo Pilsen). Nesse estágio, não havendo mais multiplicação celular, não ocorre a formação dos precursores do diacetil (17).

Outra forma de remover este produto da cerveja é monitorar a fermentação em uma temperatura média em torno 12°C até o ponto em que a quantidade de açúcares fermentáveis é quase nula. Neste ponto realiza-se uma elevação da temperatura para aproximadamente 14°C , onde o fermento fará o que é chamado *descanso do diacetil*, e consumirá este composto (17). Porém, esse período de *descanso do diacetil* não pode ser muito prolongado, pois pode acarretar em autólise do fermento, trazendo *off-flavours* para a bebida. Se esse procedimento for realizado precocemente há o risco de ainda ter açúcar fermentável no mosto e, portanto não ocorrer o *descanso do diacetil* de forma tão eficiente. Por outro lado, se for realizado tardiamente, as chances de se produzir autólise da levedura são grandes.

Tanto para um procedimento quanto para o outro, a grande dificuldade é ter o conhecimento exato do estágio da fermentação, isto é, saber a quantidade de açúcar fermentável que ainda está presente no mosto.

Para o caso das grandes cervejarias, que possuem fermentadores que podem chegar até 300 metros de altura e 30 metros de diâmetro, onde são misturadas várias bateladas, ocorre o problema da não homogeneidade do tanque. Dessa forma, em cada região do fermentador o mosto está em um estágio diferente do processo de fermentação, o que torna uma tarefa complicada a decisão de controle do processo sem saber em qual estágio está cada um destes pontos.

Com um sistema capaz de ser acoplado em diferentes pontos do fermentador seria possível mapear o estágio da fermentação em cada um desses pontos. Com isso, o cervejeiro poderia saber *on-line*, a situação exata da fermentação de todo o tanque de fermentação, de forma a se ter um controle de qualidade que garanta que o produto se enquadre na categoria e nas especificações almejadas.

1.3 Monitoramento do processo de produção

A grande concorrência entre as indústrias desta área vem forçando as empresas a investir cada vez mais em novos sistemas de análise, aproveitamento de recursos e desenvolvimento de processos que aumentem sua competitividade e rentabilidade. A aplicação de novos sistemas capazes de realizar medidas confiáveis e rápidas de carboidratos e etanol é extremamente desejável por parte das empresas e pesquisadores da área, além de que, apresenta um panorama desafiador em termos de inovação tecnológica.

Neste tipo de aplicação, durante a produção de cerveja em escala industrial, dificilmente são realizadas medidas quantitativas dos carboidratos individualmente. Normalmente, é realizada uma medida chamada de extrato aparente e extrato real. Extrato aparente é o extrato medido durante a fermentação, onde o nome aparente é dado devido ao erro analítico originado pela presença do álcool, que possui uma densidade diferente da água. Extrato real é o extrato medido durante o processo de fermentação, considerando a correção da densidade devido à presença do álcool (23). Na medida tanto do extrato real quanto do extrato aparente, é quantificado o teor de sólidos dissolvidos no meio, o que neste caso inclui proteínas, celulose e todos os tipos de carboidratos, sem nenhuma distinção.

No caso de algumas instituições de pesquisa ou das grandes indústrias cervejeiras, com elevados recursos financeiros, é possível realizar medidas de quantificação individual dos carboidratos e etanol através de técnicas como HPLC ou através de absorção óptica por infravermelho próximo (24-30) (aproximadamente entre 700nm e 1500nm). Porém, estas técnicas além de serem excessivamente caras requerem um tempo de análise de vários minutos. Outra forma de análise

muito empregada atualmente para a quantificação de dextrinas, um dos principais agentes que influenciam no corpo da cerveja, é a técnica de gel cromatografia (31,32) que, contudo, é um método que também requer um tempo de análise de vários minutos. Alguns minutos já fazem diferença na qualidade do produto, uma vez que o processo de produção de cerveja depende de reações enzimáticas que não podem ser interrompidas e retomadas facilmente.

Mesmo nesses casos, esses tipos de análise geralmente são realizados em um laboratório, quando a produção já está concluída, com a finalidade apenas de controle de qualidade do produto já pronto. Caso tenha ocorrido alguma variação na linha de produção, ou na matéria-prima, ou algum erro de processo, o problema é detectado tardiamente. Dessa forma, as consequências podem chegar até situações críticas, como a perda de milhares de hectolitros de produto. Para o caso de pequenas empresas, nem mesmo essas medidas são realizadas devido ao altíssimo custo dos equipamentos envolvidos.

O malte de cevada, uma das principais matérias-primas para a produção de cerveja, sendo um cereal, está totalmente susceptível a variações em sua composição, sendo as mais cruciais, as quantidades de amido, enzimas, carboidratos e celulose. Dependendo do tratamento dado a este produto desde sua colheita no campo, processo de maltagem, estocagem na maltaria, transporte ao distribuidor, estocagem no distribuidor, transporte ao consumidor final, estocagem no consumidor final, suas características podem sofrer variações enormes entre um lote e outro. Durante todas essas etapas muitos fatores influenciam na qualidade do malte, como a possibilidade de desenvolvimento de pragas, como carunchos, retenção de umidade, contaminação fúngica. Sendo assim, a indústria cervejeira não pode simplesmente confiar que a qualidade do malte é sempre constante e realizar o processo de produção rotineiramente da mesma forma e esperar obter um produto final com a mesma qualidade. Por isso, é extremamente importante que se realize medições durante o processo de fabricação para avaliar se está correndo conforme o esperado para atingir a meta de um produto de qualidade ótima e constante, isto é, que tenha alta reprodutibilidade.

Logo que a matéria-prima chega a uma cervejaria de grande porte, são realizados vários testes. Uma pequena produção, em escala laboratorial, é conduzida e o produto é avaliado. Porém, condições de estocagem e inúmeras outras variáveis podem afetar o rendimento do processo, por exemplo, variações na

temperatura e umidade do ambiente podem acarretar em uma precoce ativação enzimática e deterioração do malte.

Além disso, as cervejarias possuem receitas de fabricação que são praticamente imutáveis, no que diz sentido às rampas de mosturação. Seria muito mais interessante para a cervejaria que o controle do processo fosse realizado pela concentração de substratos produzidos pelo processo ao invés de seguir cegamente uma receita pré-estabelecida. Uma situação, que poderia exemplificar o quanto essa tecnologia proposta é importante para o processo de fabricação de cerveja é o que se refere ao modo como é controlado a mosturação de cervejas especiais. Seja o caso de produção de cervejas especiais como, por exemplo, as *Strong Ales*, *Barley Wine*, *Índia Pale Ale*, *Stout*, *Red Ales*, entre outras, que são tão procuradas pelo atual mercado nacional. Todos os tipos de cervejas estão classificados pelo reconhecido internacionalmente *Beer Judge Certification Program* (BJCP) (33). Nesta classificação, dentre vários fatores organolépticos, três importantes índices quantitativos são o extrato real final, o extrato inicial e o teor alcoólico (que vai estar intrinsecamente correlacionado com a diferença entre o extrato inicial e o extrato final). Portanto, seria extremamente interessante para o cervejeiro que durante o processo de fabricação, soubesse em tempo real a quantidade de glicose, maltose, maltotriose e dextrina presente no mosto. Dessa forma, ao invés deste seguir uma receita pré-determinada na mosturação, baseada em tempos e temperaturas pré-definidos, ele poderia controlar o processo pelo tempo necessário para que o mosto atinja as concentrações de carboidratos que se enquadrem na faixa desejável para aquele tipo específico de produto.

Porém, para que seja possível a realização desse tipo de procedimento é necessário um sistema capaz de fornecer os valores das concentrações de cada um dos principais tipos de carboidratos envolvidos no processo com uma boa precisão em um curto intervalo de tempo. Com este propósito, apresentamos neste trabalho uma solução para este problema, onde através de medições por espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio, combinado com técnicas sofisticadas de processamento computacional, podemos quantificar os principais carboidratos presentes no mosto, como a glicose, maltose, maltotriose e dextrinas, além do etanol. A grande vantagem de técnicas ópticas é o fato de que estas podem ser facilmente adaptadas em sistemas industriais para a realização de medidas *on-line*, além de requererem um curto intervalo de tempo de análise, da ordem de segundos.

1.4 Método Proposto: Espectroscopia, Análise Multivariada e Redes Neurais Artificiais

Até meados da década de 1970, já eram bem conhecidos os movimentos vibracionais moleculares dos açúcares, como a glicose e a sacarose, assim como seus espectros de absorção (34). Porém, com a limitação instrumental da época, as regiões espectrais se limitavam em torno de 50cm^{-1} a 500cm^{-1} . A partir da década de 1980, com o avanço no desenvolvimento da microeletrônica e das análises instrumentais, tornou-se mais fácil a obtenção de dados espectroscópicos de absorção óptica na região do infravermelho médio. Estas análises, além de fornecerem os resultados de maneira mais rápida, não são destrutivas e invasivas, assim como não geram subprodutos químicos tóxicos e em alguns casos não necessitam sequer de pré-tratamento das amostras (35). Devido a estas vantagens, este tipo de análise tem sido aplicada no monitoramento em linha de sistemas químicos industriais, na determinação de glicose, colesterol e triglicerídeos (36), no auxílio de identificação de tumores em células, no controle de qualidade, na determinação de nitrogênio em plantas, na indústria de polímeros, no estudo da composição química de solos, na adulteração da composição química de combustíveis, óleos comestíveis e alimentos (37-41), na indústria farmacêutica (42). Entretanto, com tantas aplicações e amostras complexas a serem analisadas, são necessários métodos de processamento cada vez mais complexos e robustos, capazes de identificar padrões, diferenciação e classificação das amostras, analisar sobreposição de bandas, entre outros. Muitos trabalhos vêm sendo apresentados com a finalidade de sanar estas dificuldades de processamento, por exemplo, com o uso de análise de dados multivariados, também conhecido como quimiometria, e algoritmos genéticos (37,43).

Neste trabalho, propomos um método de análise e processamento desses espectros com uma aplicação combinada de duas ferramentas matemáticas e computacionais poderosas, a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* - PCA) e a Rede Neural Artificial (*Artificial Neural Network* – ANN). Além disso, apresentamos esse método de processamento já em uma

aplicação prática, o caso de análise de amostras de mosto cervejeiro coletadas durante as etapas de mosturação e fermentação.

Há na literatura alguns trabalhos prévios sobre a aplicação da técnica de absorção através de FTIR em amostras de cerveja (1,44,45). Porém, estes trabalhos apresentam objetivos de análises distintos. O trabalho de Evgeny Polshin (1) tem como foco uma análise comparativa de cervejas comerciais prontas, para propor um método de classificação e identificação de adulteração. O estudo apresentado por Rafael Llario (45) também utiliza amostras comerciais de cerveja pronta para o consumo, mas determina através do método dos mínimos quadrados parciais (*Partial Least Square* – PLS) o valor do extrato real, extrato original e a quantidade de etanol das amostras. Para o caso do terceiro trabalho, Iola F. Duarte (44) também utiliza amostras comerciais de cerveja com a finalidade de identificar nos espectros as regiões características dos modos vibracionais dos principais compostos, como a maltose, as dextrinas e etanol. Por fim, este também propõe uma classificação dos tipos de cerveja utilizado baseado nestes compostos.

O presente trabalho visa a aplicação de um método óptico combinado com um processamento computacional de dados para o monitoramento da produção da cerveja. As principais características que distinguem o atual trabalho dos seus precedentes podem ser apresentadas abaixo.

- Os trabalhos anteriores utilizam amostras de cerveja já pronta, isto é, já fermentada. Nestas condições a quantidade de açúcares fermentáveis como glicose, maltose e maltotriose são extremamente baixas ou praticamente nulas. Dessa forma, com menos compostos, e portanto variáveis estando presente nas medidas, os espectros e suas análises tornam-se mais simples.
- Em nenhum dos trabalhos anteriores foi quantificado individualmente a quantidade de cada tipo de carboidrato individualmente. Apenas um dos trabalhos (44), fez um cálculo da quantidade total de açúcares presente na amostra através do valor do extrato real, além do valor do etanol.
- O método de processamento dos dados espectrais apresentados aqui, combinando análise de componentes principais e redes neurais artificiais não é apresentado em nenhum dos trabalhos anteriores.
- Em todos os casos, as análises foram realizadas utilizando-se o sistema de medida de FTIR acoplado com o sistema de medida de ATR (*Attenuated Total Reflectance*), que requer um sistema de detecção mais sensível e sofisticado

e, portanto, de maior custo. O sistema de medida proposto neste trabalho é baseado através da utilização de uma simples célula de ZnSe, com medida por transmissão direta do feixe de luz pela amostra, que requer um detector mais simples e barato.

2 Objetivo

O objetivo principal deste trabalho é propor uma técnica baseada em absorção óptica na região do infravermelho médio, através da análise com um equipamento de *Fourier Transform Infrared* (FTIR), capaz de quantificar os principais carboidratos (glicose, maltose, maltotriose e dextrinas) e o etanol, com a finalidade de acompanhar o processo de produção da cerveja.

A produção de cerveja passa por um processo biotecnológico e fermentativo relativamente longo e complexo, que pode gerar uma variedade de cervejas com qualidades e características organolépticas muito distintas. Visando diminuir perdas, aumentar a eficiência, a reprodutibilidade e a segurança do processo, tanto na etapa de sacarificação quanto na etapa de fermentação, na produção da cerveja, o objetivo deste trabalho consiste em uma técnica de análise de amostras que combina detecção óptica (espectroscopia de absorção), análises quimiométricas como Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* – PCA) com processamento avançado de inteligência artificial baseado em redes neurais (*Artificial Neural Network* - ANN).

Tanto em cervejarias de grande porte quanto em microcervejarias, as empresas possuem um procedimento padrão para a produção da cerveja, incluindo patamares de temperaturas e tempos para a realização da etapa de mosturação (mosturação por infusão) (16,21,22), onde não é possível garantir que em todos os processos de fabricação, a eficiência na conversão de amido em açúcares seja sempre a máxima. O produtor pode estar perdendo eficiência simplesmente por uma questão de não saber como otimizar o processo de mosturação, o que poderia ser facilmente resolvido se este pudesse saber em tempo real a quantidade de amido que está sendo convertida em açúcares, ou em outras palavras, a velocidade com que cada uma dessas enzimas está atuando.

Outra etapa importante para a indústria cervejeira é a fermentação alcoólica. Nesta etapa a levedura consome os açúcares simples e produz álcool. É extremamente importante ter conhecimento de quanto de álcool já foi produzido em um tanque de fermentação, pois o produtor geralmente trabalha com a levedura em

várias temperaturas diferentes, dependendo do teor de álcool que está presente no tanque. Isso é importante para evitar fatores organolépticos indesejáveis como, por exemplo, o diacetil (17,19) e para otimizar a fermentação, uma vez que o etanol produzido pela própria levedura acaba sendo um agente inibidor do processo (18).

3 Motivação

Em um mercado em constante crescimento como o mercado de consumo de cerveja, de alta competitividade e exigência dos consumidores, as empresas fabricantes destes produtos estão constantemente preocupadas em fazer com que seus produtos tenham uma aceitação maior. Isso necessariamente exige maior controle do processo de mosturação e de fermentação, que geram as características principais da cerveja, tais como cor, sabor (gosto adocicado ou amargo, quantidade de álcool, equilíbrio entre amargor e teor alcoólico, corpo e gosto residual da cerveja, etc.), estabilidade e quantidade de espuma. Portanto, um controle analítico *on-line* dos processos de mosturação e fermentação da cerveja teriam impactos muito significativos sobre a estabilidade e a confiabilidade da produção e, portanto, a sua rentabilidade, com impactos imediatos sobre as variedades e sofisticação dos tipos de cerveja produzidos, promovendo vantagens competitivas aos produtores.

Conforme apresentado anteriormente, com base na literatura há a possibilidade de se empregar a espectroscopia de infravermelho médio para analisar as amostras de cerveja. Embora em nenhum trabalho anterior tenha sido analisado o mosto cervejeiro durante a sua produção, é possível observar que os principais componentes envolvidos no processo (carboidratos e etanol) podem ser detectados (46-48). Apresentamos um trabalho inovador capaz não apenas de determinar o extrato real do mosto, composto pela soma total de todos os açúcares, mas também quantificar individualmente cada um dos principais carboidratos que compõe esse montante.

Além disso, durante o processo de fermentação do mosto, onde temos uma situação complexa pela variedade de açúcares oriundos da etapa de mosturação, tornamos o trabalho ainda mais desafiador com a inserção de mais uma variável (composto) a ser quantificado, o etanol.

Como uma das grandes vantagens das técnicas baseadas em análises espectroscópica é a velocidade com que os resultados são gerados, queremos manter essa característica e fornecer um método de análise que seja igualmente robusto, rápido e preciso. Temos o objetivo de fornecer uma técnica capaz de

fornecer ao cervejeiro os valores das concentrações dos compostos em curto intervalo de tempo, de forma que este possa monitorar e tenha tempo com condições de corrigir o processo de produção caso seja necessário. Com esse intuito, optamos por aplicar em um primeiro passo um processamento quimiométrico de análise de componentes principais para reduzir o número de variáveis espectrais a serem analisadas. Dessa forma, um espectro com centenas de valores de absorção passa a ser representado por poucas componentes, isto é, por grupos de poucos pontos. Com essa redução, há um significativo ganho de tempo de processamento para a etapa posterior, a aplicação de uma rede neural artificial.

Como a entrada da rede neural são as poucas componentes vindas do processo quimiométrico, e sendo esta rede neural previamente treinada, sua utilização torna-se extremamente rápida, podendo chegar à décimos de segundos. Uma das grandes vantagens da utilização do sistema baseado em redes neurais artificiais é o fato de ser um sistema de fácil aplicação em análise e controle de processos, isto é, *on-line*. Além disso, este sistema possui a grande vantagem de poder ser constantemente alimentado com um banco de dados atualizado, de forma que cada vez mais a rede neural aperfeiçoa o seu aprendizado, fornecendo resultados cada vez mais precisos ao usuário final.

4 Considerações Gerais

4.1 High Precision Liquid Chromatography

Atualmente, a técnica de cromatografia líquida de alta precisão (High Precision Liquid Chromatography – HPLC) é considerada o método padrão de análise na identificação e quantificação de substâncias que compõem amostras de estudo. Neste tipo de técnica, a amostra a ser analisada é inserida em um sistema contendo uma coluna específica para cada tipo de aplicação, onde os compostos são separados dependendo de sua natureza através de vários fenômenos físico-químicos como, por exemplo, tamanho e carga molecular. Certas classes de compostos insolúveis em água são separadas em colunas de fase reversa, enquanto que compostos solúveis em água, como por exemplo, açúcares, álcool e ácidos orgânicos de cadeia curta são melhor separados em colunas com resinas de troca iônica (49). Esses tipos de colunas permitem o uso de métodos isocráticos, eluindo com água ou soluções diluídas de ácido. Em associação com o sistema de troca iônica, geralmente é utilizada a técnica de exclusão por tamanho nas colunas de HPLC no caso da separação de açúcares. A coluna é recheada com um material de poros de tamanhos controlados que separa as moléculas de acordo com o seu tamanho específico (figura 9). No caso do sistema de troca iônica, as resinas trocadoras de íons são fabricadas com polímeros porosos cuja superfície possui grupos trocadores de íons (figura 10).

Figura 9 - Permeabilidade das moléculas representadas pelas esferas através do tamanho dos poros, permitindo ou não permitindo a passagem pelo material que preenche a coluna (a). A seleção das moléculas devido à combinação dos tamanhos dos poros escolhidos para a composição do material que preenche a coluna (b).

Figura 10 - Princípio do funcionamento das colunas baseadas no sistema de troca iônica, cujas moléculas trocam íons com a resina da coluna de HPLC.

Vários parâmetros podem ser variados durante uma análise de HPLC, de forma a visar uma melhor separação dos compostos de interesse e consequentemente melhor resolução e precisão na quantificação dos mesmos. Através do controle da concentração da fase móvel a eluição pode ser acelerada caso o objetivo seja diminuir o tempo da corrida e a rápida remoção de compostos que não sejam de interesse. Por outro lado, a utilização mais diluída da fase móvel

acarreta em uma corrida mais lenta, porém com maior separação entre os compostos.

O controle de temperatura é outro parâmetro que possui alta influência no tempo de retenção dos compostos durante a corrida. Geralmente o aumento da temperatura resulta em uma diminuição no tempo de retenção e aumento da eficiência da coluna. Para o caso da aplicação em carboidratos, o aumento da temperatura diminui a viscosidade da amostra e do eluente, o que permite uma maior penetração dos açúcares na resina e conseqüentemente melhor resolução.

Após a separação do composto na coluna, o passo seguinte é a detecção. Nesta etapa, tendo sido feita a separação com sucesso, a fase móvel carrega apenas um composto por vez em um determinado intervalo de tempo. O fluxo segue para uma célula, cujas dimensões e materiais permitem a passagem de luz, que atravessa a amostra e chega até o detector. A detecção pode ser realizada por detectores de absorção na região do ultravioleta (UV) ou por índice de refração (RI), dependendo da classe do composto analisado. A utilização do detector de absorção no UV é empregada, por exemplo, nos casos onde o elemento em análise se trata de ácidos orgânicos, compostos aromáticos e proteínas. No caso deste presente estudo, onde a análise é realizada com interesse de identificar carboidratos e etanol, o detector mais apropriado é o de medida de índice de refração. Também podem ocorrer situações onde é necessária a detecção dos dois sistemas simultâneos, visando melhor quantificação ou para situações onde há a presença de mais de um composto, sendo que alguns deles podem ser detectados em um sistema e outros são detectados pelo outro sistema.

4.2 Espectroscopia de Infravermelho

Quando nos referimos ao termo espectroscopia, estamos estudando os fenômenos de absorção, emissão ou espalhamento de fótons por um átomo ou molécula. A diferença entre a espectroscopia molecular e a atômica é o fato de que a energia das moléculas pode ser alterada não somente por transições eletrônicas, mas também pela mudança de estados de rotação e vibração. Esse fator é

responsável pela inserção de maior complexidade ao sistema, tornando a espectroscopia molecular mais difícil de ser resolvida do que a atômica. Em uma primeira aproximação, podemos dizer que a energia total de uma molécula possui três componentes, sendo elas: a energia cinética do movimento dos elétrons, a energia da vibração dos átomos que constituem a molécula e a energia rotacional da molécula (eq.1).

$$E_{Total} = E_{elet} + E_{vibr} + E_{rot} \quad (1)$$

Na espectroscopia de absorção, a absorção líquida de uma radiação incidente sobre a amostra é monitorada em função da variação da frequência. É chamada de absorção porque, quando a amostra é irradiada, absorção e emissão, numa certa frequência são, simultaneamente, estimuladas e o detector mede a diferença entre os dois processos, a absorção líquida (48). Sendo h a constante de Planck, a energia, $h\nu$, do fóton emitido ou absorvido, e, portanto a frequência, ν , da radiação emitida ou absorvida, é dada pela condição de frequência de Bohr, $h\nu = |E_1 - E_2|$, quando ocorre uma transição do estado inicial com energia E_2 para o estado final com energia E_1 . Geralmente, em se tratando de espectroscopia vibracional, não se costuma falar das transições em termos de energia, nem em termos de comprimento de onda, como no caso de espectroscopia de transição eletrônica. Para esse tipo de estudo, o mais comum é analisar as transições vibracionais em termos de número de onda, $\tilde{\nu}$, como apresentado na equação 2, onde λ é o comprimento de onda e c é a velocidade da luz no vácuo.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{c}{\nu} \quad (2)$$

Levando-se em consideração as transições eletrônicas, vibracionais e rotacionais e suas respectivas técnicas espectroscópicas, podemos comparar suas ordens de grandeza na figura 11.

Figura 11 - Range espectral da radiação eletromagnética correlacionada com as técnicas espectroscópicas mais usuais. (49)

Outra forma possível de compreender como essas distintas formas de transição de energia estão dispostas é através de um diagrama de energia, conforme apresentado na figura 12.

Figura 12 - Diagrama de energia representando a correlação entre as transições de níveis rotacionais, vibracionais e eletrônicos (50).

As variações de energia molecular devido às transições vibracionais são o foco de estudo deste trabalho. Essas transições vibracionais ocorrem através da absorção ou emissão de radiação infravermelha, que compreende a radiação com número de onda entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} .

Para compreender um pouco melhor sobre os níveis de energia dos modos vibracionais vamos iniciar uma breve explicação de um caso simples, uma molécula diatômica. Uma molécula diatômica, com núcleos de massa m_1 e m_2 que estão oscilando pode ser reduzida ao caso do movimento de uma simples partícula de massa μ , que oscila na posição q , em torno do centro de equilíbrio dos dois núcleos. A massa μ é chamada de *massa reduzida* e seu valor é dado pela equação 3.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \quad (3)$$

A energia cinética é dada pela equação abaixo.

$$T = \frac{1}{2} \mu \dot{q}^2 \quad (4)$$

Fazendo-se uma primeira aproximação, consideremos uma simples função potencial parabólica, e que desta forma, o sistema seja representado por um oscilador harmônico, cuja energia potencial seja fornecida pela equação 5.

$$V = \frac{1}{2} k q^2 \quad (5)$$

Aqui, k é uma constante de vibração, que esta correlacionada com a natureza dos núcleos da molécula diatômica. A equação de onda de Schrödinger para esse sistema fica expressa pela equação 6.

$$\frac{d^2\psi}{dq^2} + \frac{8\pi^2}{h^2} \left(E - \frac{1}{2} k q^2 \right) \psi = 0 \quad (6)$$

Onde: ψ é função de onda da partícula;

h é a constante de Planck;'

Se esta equação é resolvida, com a condição de que ψ deve ser finito e contínuo, os autovalores, que fornecem os níveis de energia, são dados pela equação abaixo.

$$E_v = h\nu \left(v + \frac{1}{2} \right) = hc\tilde{\nu} \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad (7)$$

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad ou \quad \tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (8)$$

Onde: v é o número quântico vibracional, e pode possuir valores inteiros 0,1,2,3...

Dessa forma, os níveis de energia de vibração da molécula são discretos e possuem valores bem específicos. Esse diagrama de energia esta apresentado na

figura 13. Contudo, deve-se lembrar de que a aproximação feita inicialmente de um potencial parabólico não satisfaz totalmente a oscilação real da molécula, pois esse modelo nunca leva ao rompimento da ligação entre os átomos. Pode-se ver pela figura 13 que um modelo com dependência cúbica estaria mais próximo do perfil real do potencial. Dessa forma, não podemos mais dizer que se trata de um oscilador harmônico, e sim de uma oscilação *anarmônica*. Além disso, a resolução se torna muito mais complexa quando analisamos moléculas que são poliatômicas.

Figura 13 - Diagrama dos níveis de energia das transições vibracionais. O potencial parabólico está representado pela linha tracejada e o potencial cúbico pela linha pontilhada (50).

Para o caso das moléculas diatômicas, discutido anteriormente, as vibrações dos núcleos ocorrem somente na direção ao longo da linha que conecta os dois núcleos. No caso de moléculas poliatômicas a situação é bem mais complexa, pois cada núcleo executa o seu próprio movimento de oscilação. Entretanto, sabemos que esse movimento complexo de oscilação pode ser analisado como a sobreposição de *modos normais* de oscilação. Uma molécula não linear, com N núcleos, possui $3N - 6$ modos normais de vibração, e se for linear, possui $3N - 5$. Em geral, um modo normal é um movimento síncrono e independente de átomos ou de grupo de átomos, que pode ser excitado sem provocar a excitação de nenhum outro modo normal e sem envolver translação ou rotação da molécula como um todo. Cada modo normal comporta-se como um oscilador harmônico independente (desprezando-se a anarmonicidade).

Contudo, existe uma regra de seleção que dita se um modo normal é ativo ou não ativo na espectroscopia de infravermelho. A regra de seleção geral para a atividade no infravermelho é o movimento correspondente a um modo normal provocar alteração no momento de dipolo.

Como cada modo normal de vibração, sendo correlacionado com um oscilador harmônico entre dois núcleos, que corresponderiam à constante k , depende da natureza dos átomos e do tipo de ligação, então a técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho possui a vantagem de ser uma técnica altamente seletiva.

4.2.1 Espectroscopia FTIR

A técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier ou *Fourier Transform Infrared* (FTIR) é utilizado para se referir a uma técnica espectroscópica de medida de absorção ou transmitância que tem como base o uso de um interferômetro de Michelson (51) e a aplicação da transformada de Fourier para a obtenção dos resultados. Na figura 14 é apresentado um modelo esquemático típico de um espectrômetro FTIR.

Figura 14 - Representação da montagem de um espectrômetro de FTIR (52).

A fonte de luz utilizada nesses equipamentos para realizar medições de absorção na região do infravermelho médio ou *Medium Infrared* (53), entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , são filamentos que são aquecidos devido à passagem de corrente elétrica e assim passam a emitir luz. Dessa forma, a fonte emissora possui um espectro contínuo e que abrange toda a região espectral de interesse. Essa luz é então conduzida para um interferômetro, onde é dividido em dois feixes por um *beam splitter* (divisor de feixes), que se propagam perpendicularmente entre si. Um dos feixes incide sobre um espelho fixo e retorna pelo mesmo caminho até o *beam splitter*. O segundo feixe incide sobre um espelho móvel e também retorna ao *beam splitter*. Como o segundo espelho é móvel, devido ao fato de estar se deslocando, gera uma diferença de caminho óptico em relação ao feixe que incide sobre o espelho fixo. Quando os feixes se encontram no *beam splitter*, são refletidos na mesma direção e sentido e, portanto, devido à diferença de fase entre eles, devido ao segundo feixe ser refletido no espelho móvel, um padrão de interferência se torna presente, chamado *interferograma*. Conforme o espelho móvel varia sua posição o interferograma vai sendo obtido, uma vez que este se trata de uma medida de

intensidade luminosa no detector em função do tempo. Na figura 15 vemos um exemplo do interferograma obtido de um espectrômetro de FTIR.

Figura 15 - Interferograma típico obtido pela leitura de intensidade óptica no detector em função da posição do espelho móvel do interferômetro.

O feixe composto pela combinação dos dois feixes é guiado até a posição onde se encontra a amostra a ser analisada. Ao atravessar a amostra, algumas componentes desse feixe de luz podem ser absorvidas dependendo da composição da amostra e seguindo a lei de *Lambert Beer* (54). Após percorrer a amostra o feixe de luz incide no detector, onde é feita a medida de intensidade luminosa em função do tempo, construindo o interferograma típico apresentado anteriormente. Nesta etapa, o interferograma já possui a informação da absorção da amostra, mas ainda está na forma de interferograma, o que não permite uma análise direta de quais componentes da luz foram absorvidas pela amostra.

Como o interferograma é uma combinação da soma de intensidades de luz em várias frequências, é possível, através do cálculo da *Transformada de Fourier* (55,56) decompor este sinal nestas frequências que o compõe. Dessa forma, a partir desse procedimento obtemos o espectro de absorção da amostra, conforme exemplificado na figura 16.

Figura 16 - Aplicação da transformada de Fourier em um interferograma, convertendo a medida que inicialmente está em função da posição do espelho para o espaço de número de onda da radiação eletromagnética que compõe o interferograma.

4.3 Análise das Componentes Principais

Antes de descrever o processo de análise em componentes principais, é muito importante ter um breve conhecimento do que são as matrizes de covariância e correlação utilizadas no processo e como obtê-las. Os dados obtidos de um experimento observados em uma curva, como os espectros de absorção, (figura 17) podem ser armazenados em uma matriz.

Figura 17 - Espectro de absorção na região do infravermelho médio de uma amostra de mosto durante a etapa de mosturação

Em particular, neste caso dos espectros de absorção, onde cada espectro é composto por um conjunto de pontos de intensidade em função do número de onda, é comum a representação matricial conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Valores dos pontos que formam os espectros de absorção representados em uma tabela.

Número de Onda (cm^{-1})	1000	1001	1002	1003	...	...	1199	1200
Intensidade Amostra1	035	0.33	0.30	0.25	...	...	0.21	0.20
Intensidade Amostra2	0.25	0.28	0.35	0.41	...	...	0.19	0.18
...	...	...	...	...	...	...	...	...
Intensidade AmostraN	0.41	0.47	0.52	0.55	...	...	0.28	0.25

Conforme já sabemos pela literatura (25,29,40,45,46,50,57,58) que os espectros apresentados na figura17 possuem informações providas de vários tipos de açúcar, o que estamos buscando é um método de analisar as variações nas formas dos espectros em função da quantidade de cada um desses compostos individualmente. A variação que pode ocorrer num espectro nada mais é do que uma mudança no valor da intensidade de absorção para determinados números de onda em proporções que estejam correlacionadas com os tipos e quantidade dos elementos presentes na amostra. Dessa forma, cada número de onda é uma variável que assume valores que dependem dos tipos e concentrações na amostra de onde o espectro foi obtido. Nesse nosso equipamento utilizado para obtenção dos espectros temos aproximadamente 1000 pontos, e, portanto 1000 variáveis para serem analisadas. Queremos saber então, como as mudanças dessas 1000 variáveis estão correlacionadas com a concentração dos açúcares e etanol. O conjunto de todas as medidas realizadas e separadas para realizar o treinamento forma então uma matriz de dados “Q” (figura18).

O diagrama mostra uma matriz de dados organizada em linhas e colunas. As colunas são rotetadas no topo como 'Variável 1', 'Variável 2', '...', e 'Variável n'. As linhas são rotetadas à esquerda como 'Amostra 1', 'Amostra 2', 'Amostra 3', '...', e 'Amostra N'. A matriz em si é uma grade de células vazias, representando os dados coletados para cada amostra em cada variável.

	Variável 1	Variável 2	...	Variável n
Amostra 1				
Amostra 2				
Amostra 3				
...				
Amostra N				

Figura 18 - Representação da disposição de todos dados de forma matricial

Nesse momento é interessante observar que devemos normalizar os dados antes de prosseguir, pois geralmente entre as medições alguns fatores podem influenciar nas medidas, como por exemplo, a quantidade de amostra analisada, a temperatura e humidade da sala, a posição da amostra, a estabilidade do detector. Esses fatores em conjunto são responsáveis por significativas variações nos espectros, sendo uma delas o deslocamento observado na linha de base. Esse assunto de pré-normalização será tratado posteriormente na secção de resultados obtidos. É importante notar que a forma com que se faz a normalização dos dados influencia fortemente os resultados finais obtidos, uma vez que dependendo do método utilizado esse processo pode modificar a correlação entre as variáveis.

Após a normalização dos dados fazemos então uma transformação na matriz de dados “Q” da seguinte maneira:

$$X_{ij} = \left(\frac{q_{ij} - \bar{q}_j}{\sigma_j} \right) \quad (9)$$

Onde:

X_{ij} é o elemento da nova matriz de dados;

q_{ij} é o elemento da matriz de dados correspondente a i-ésima medida da variável j;

$\bar{q}_j$ é o valor médio da variável j;

σ_j é o desvio padrão da variável j;

Essa transformação (autoescalamento) tem como finalidade expressar cada variável em termos das variações inerentes ao sistema. Essa modificação na apresentação dos dados mantém a informação estatística do sistema e transforma as variáveis de tal forma que agora possuam valor médio nulo e desvio padrão igual a um (59,60). Esse exemplo de transformação citado acima e utilizado no processamento dos dados é uma das possíveis transformações a serem realizadas. Outras variações de transformações e centralizações podem ser realizadas obtendo resultados distintos. Neste trabalho decidimos explorar esse fato onde, por exemplo, realizamos outra transformação tradicional igual à descrita acima com a diferença de não ser feita a divisão pelo desvio padrão.

Se X é a nossa nova matriz de dados, composta pelos elementos X_{ij} da equação 9, então a matriz de correlação R formada pelos coeficientes de correlação desses dados fica da seguinte maneira:

$$R = X^T \cdot X \quad (10)$$

E os elementos da matriz R são dados por (61,62):

$$r_{jj'} = \sum_{i=1}^n x_{ij} \cdot x_{ij'} = \sum_{i=1}^n \frac{(q_{ij} - \bar{q}_j) \cdot (q_{ij'} - \bar{q}_{j'})}{\sigma_j \cdot \sigma_{j'}} \quad (11)$$

Os valores $r_{jj'}$ são então uma covariância padronizada entre -1 e 1. É interessante observar que essa matriz é Hermitiana (simétrica, no caso de variáveis reais, que é o nosso caso). Podemos ainda verificar que os elementos ao longo da diagonal principal da matriz de correlação (elementos em que $j=j'$) correspondem à variância da variável q_j (63). Como observado anteriormente, a matriz de correlação R é Hermitiana e, portanto os seus autovalores são reais e positivos e seus autovetores são ortogonais.

Ao diagonalizar a matriz de correlação encontramos os seus autovalores representados pela matriz K e seus autovetores pela matriz V :

$$K = \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \lambda_2 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & 0 \\ 0 & 0 & \dots & \lambda_n \end{bmatrix} \quad V = \begin{bmatrix} \uparrow & \uparrow & \uparrow & \dots & \uparrow \\ v_1 & v_2 & v_3 & \dots & v_n \\ \downarrow & \downarrow & \downarrow & \dots & \downarrow \end{bmatrix} \quad (12)$$

Como a matriz que diagonalizamos era uma matriz de correlação, temos que o resultado obtido é uma nova base formada pelo conjunto dos autovetores de R de tal forma que cada autovetor represente uma parte da variância total, e parte essa que é única de cada autovetor, uma vez que eles são ortogonais entre si. Cada λ_i na matriz K corresponde então a variância total dos dados explicado por cada autovetor v_i , e portanto, através desses autovalores podemos determinar quais componentes principais (ou qual componente da nova base formada pelos autovetores) explicam a maior quantidade dos dados e com que proporção pela simples relação do valor de cada autovalor dividido pela soma de todos os autovalores, isto é $\lambda_i / \sum \lambda_i$.

Uma vez encontrada a base que maximiza as variâncias do conjunto de dados, o que fazemos é “projetar” os dados nessa base:

$$S = V \cdot X \quad (13)$$

Onde S é o conjunto de dados projetados na nova base e é conhecida como *score*.

Essa transformação de base dos dados da matriz X na matriz S pela base que maximiza as variâncias é conhecida como Transformação de Karhunen-Loève (63).

A matriz dos *scores* representa então os dados nessa nossa nova base e fica da seguinte forma:

	PC 1	PC 2									PC N
Amostra 1											
Amostra 2											
Amostra 3											
⋮											
⋮											
⋮											
Amostra N											

Figura 19 - Representação da disposição dos dados na nova base

Ao invés da análise dos dados ser feita na base das variáveis que eram definidas como sendo o valor da intensidade de absorção em cada número de onda, agora analisamos no espaço das variâncias desses valores (64). Essa mudança de dados permite uma redução muito significativa da dimensão em que os dados são analisados, uma vez que em poucas dimensões (ou poucas componentes principais) podemos observar a maior parte das informações dos dados. Tomando o caso deste experimento como exemplo, quando fazemos uma análise espectroscópica de absorção na região do infravermelho médio das amostras de sacarificação e fermentação obtemos uma curva com os aproximados 1000 valores de número de onda, isto é, temos aproximadas 1000 variáveis a serem analisadas. Quando calculamos as componentes principais desse sistema podemos representar em torno de 90% das informações do sistema, isto é, do espectro obtido, em apenas duas componentes dessa nova base. Portanto o gráfico das componentes principais (PC1 *versus* PC2) nos fornece um ponto de vista muito privilegiado para a análise

dos dados do que nas 1000 dimensões que tínhamos anteriormente. Em outras palavras, temos uma redução bastante significativa do número de variáveis analisadas, neste caso específico, os números de onda, que trazem a mesma informação. As componentes que possuem informação relevante são levadas em consideração e aquelas que não apresentam nenhuma informação significativa, como por exemplo, ruídos, podem ser descartadas.

Um gráfico típico de PC1 *versus* PC2 é mostrado abaixo na figura 20, obtido de medições de uma de mosturação, onde cada espectro de absorção é representado por um ponto, sendo que a evolução temporal ocorre da esquerda para a direita.

Figura 20 - Componente principal 1 *versus* Componente principal 2

A partir desses conjuntos de pontos que caracteriza a curva de sacarificação utilizada, podemos diferenciar cada amostra em função de sua composição, como será explanado mais a diante.

O princípio básico da análise das componentes principais já foi descrito anteriormente, porém, é preciso ressaltar que esse método apresenta algumas pequenas variações devido as possíveis formas distintas de se obter matrizes de covariância que podem ser diagonalizadas. Para a realização desse estudo utilizamos o método descrito acima com algumas variações, como por exemplo, o

fato de testar a utilização ou não utilização da razão da variável pelo desvio padrão, calcular a derivada espectral, entre outras, que serão apresentados na secção de materiais e métodos.

4.4 Redes Neurais Artificiais

Redes neurais artificiais (RNA) são programas computacionais construídos com inspiração no funcionamento dos neurônios biológicos, de tal forma que possuem a capacidade de aprender baseado em métodos de comparação. As unidades básicas de processamento, chamados de neurônios artificiais, são interligados por um grande número de interconexões, as *sinapses artificiais*, que possuem a mesma função das sinapses dos neurônios biológicos, a transmissão de uma informação.

Uma das principais características das redes neurais artificiais é sua capacidade de aprender através de exemplos, sem a necessidade de serem explicitamente programadas. As RNA podem se adaptar, modificando suas regras de classificação, conforme novas informações são inseridas e comparadas com informações anteriores, o que define o processo de aprendizagem. Após criar um modelo computacional com o treinamento de uma rede neural, esta pode generalizar as informações obtidas para regimes de operação que eram até então desconhecidos. Outra vantagem é o fato de que o processamento neural pode facilmente ser implementado tanto em hardwares quanto softwares e ser implementado em equipamentos de controle, automação e análises.

Essas características permitem que esse tipo de processamento seja utilizado em inúmeras tarefas distintas. Pode ser utilizado como um aproximador universal de funções, onde é possível fornecer valores de saída de uma determinada equação que apresenta difícil solução por métodos convencionais. Em controle de processos as RNA's identificam ações e tomam decisões de resposta, sendo empregado em linhas industriais, controle de aeronaves, satélites, etc. Na área de sistemas de segurança, as redes neurais podem ser utilizadas para identificação de padrões, como por exemplo, digitais, voz, perfil de rosto. Outra área de grande aplicação é em previsão de sistemas, onde é apresentado um conjunto de dados com evolução

temporal e a rede neural fornece previsão dos próximos valores, com grande importância para previsões climáticas, mercados financeiros, entre outros.

Conforme citado anteriormente, o funcionamento da rede neural artificial, baseado no neurônio artificial, é inspirado no neurônio biológico. Um neurônio biológico resume seu funcionamento com o transporte de impulsos (estímulos elétricos advindos de reações físico-químicas) sob determinadas condições de operação. Ele pode ser dividido em três partes principais, os dendritos, o corpo celular e o axônio. Os dendritos são constituídos por vários finos prolongamentos, com a função de captar os estímulos vindos de diversos outros neurônios. O corpo celular é responsável por processar as informações adquiridas pelos dendritos e produzir um potencial de ativação, que indicará se o neurônio irá disparar um impulso elétrico ao longo de seu axônio. O axônio é constituído de um único prolongamento, cuja função é transmitir os impulsos elétricos para outros neurônios. A terminação dos axônios é formada por ramificações, chamadas de terminações sinápticas. A figura 21 ilustra um neurônio biológico.

Figura 21 - Representação de um neurônio biológico

Os neurônios artificiais utilizados nos modelos de redes neurais artificiais realizam funções simples, como coletar os sinais existentes em suas entradas, agrega-los de acordo com sua função operacional e produzir uma resposta, levando em consideração sua função de ativação inerente. O modelo mais simples e que engloba as principais características de uma rede neural biológica, isto é, paralelismo e alta conectividade, foi proposto por McCulloch & Pitts em 1943 (65), sendo ainda o modelo mais utilizado nas diferentes arquiteturas de redes neurais

artificiais. Uma representação desse tipo de neurônio artificial é apresentada na figura 22.

Figura 22 - Representação de um neurônio artificial

Seja um conjunto de sinais de entrada representado por $\{x_1, x_2, x_3, \dots, x_n\}$ advindos do meio externo, isto é, aplicados na entrada da rede neural, como sendo análogo aos impulsos elétricos captados pelos dendritos no neurônio biológico. As ponderações exercidas pelas junções sinápticas do modelo biológico são representadas no neurônio artificial pelo conjunto de pesos sinápticos $\{w_1, w_2, w_3, \dots, w_n\}$. De forma análoga, a relevância de cada uma das entradas $\{x_i\}$ do neurônio é então executada por meio de suas multiplicações pelos respectivos pesos sinápticos $\{w_i\}$, ponderando-se, portanto, todas as informações externas que chegam ao neurônio. Sendo assim, a saída do corpo neural artificial, denotado por u , é a soma ponderada de suas entradas. Em termos matemáticos, podemos dizer que o corpo neural artificial é um combinador linear. Assim como um neurônio biológico, o neurônio artificial possui um patamar mínimo de ativação, denotado pelo símbolo θ , que determina o valor mínimo para que o resultado gerado pelo combinador linear possa gerar um valor de disparo em direção à saída do neurônio. Sendo assim, a saída do corpo neural (u), também chamado de potencial de ativação, é o resultado obtido pela diferença entre o resultado produzido pelo combinador linear e o limiar de ativação.

Após obter o valor do potencial de ativação, este é inserido no domínio de uma função matemática, $g(u)$, chamada de função de ativação, que possui a finalidade de limitar a saída do neurônio dentro de um intervalo de valores razoáveis a serem assumidos pela sua própria imagem funcional. Dependendo de cada

aplicação ou da arquitetura de rede neural a ser construída utiliza-se uma função de ativação apropriada.

Sendo assim, podemos definir que a saída final do neurônio, y , é a imagem produzida pela função de ativação sobre o potencial de ativação. Essas descrições podem ser resumidas em duas equações matemáticas (eq.14 e eq. 15), propostas por McCulloch e Pitts.

$$u = \sum_{i=1}^n (w_i \cdot x_i) - \theta \quad (14)$$

$$y = g(u) \quad (15)$$

A arquitetura de uma rede neural artificial define a forma como os seus neurônios estão arranjados, ou dispostos, uns em relação aos outros. Esses arranjos são essencialmente estruturados através do direcionamento das conexões sinápticas dos neurônios. A topologia de uma rede neural artificial, considerando determinada arquitetura, pode ser definida como sendo as diferentes formas de composições estruturais que esta poderá assumir. Por exemplo, é possível ter duas topologias pertencentes a uma mesma arquitetura com distintos números de neurônios ou com neurônios que possuem distintas funções de ativação.

Dependendo da aplicação da rede neural, isto é, se ela vai ser utilizada como um aproximador universal de função, como um previsor financeiro ou como um filtro de ruídos ou ainda como identificador de padrões, é utilizado uma arquitetura distinta. Dentro desta arquitetura definida ainda pode ser variada a topologia visando a busca de um aperfeiçoamento com melhoria de resultados. Neste trabalho realizamos exatamente este procedimento descrito.

É preciso ter em mente que estamos aplicando um sistema de processamento neural em cima dos dados vindos da análise de componentes principais. Nesta análise sabemos que cada região do espaço formado pelas componentes principais, onde se encontra o ponto referente à uma medida espectral de uma amostra, está intrinsicamente correlacionado com as características da amostra. Sendo assim, estamos lidando com um problema de identificação de padrões, que inicialmente eram bandas espectrais e agora são regiões de um espaço N-dimensional geradas

pelo PCA. Portanto, a arquitetura escolhida para este processamento neural foi o *Perceptron Multicamadas* (65). Já a topologia foi variável, sendo que o número de neurônios foi variado, com o objetivo de otimizar o processamento, conforme será discutido posteriormente.

Uma vez determinada a arquitetura e topologia da RNA, é iniciada a etapa de treinamento, ou aprendizagem, que consiste basicamente na aplicação de um conjunto de passos ordenados, com o intuito de ajustar os pesos e limiares de seus neurônios. Esse processo visa então calibrar a rede neural para que as suas respostas estejam próximas dos valores desejados. O conjunto desses passos ordenados visando o treinamento da rede é denominado de algoritmo de aprendizagem. Ao longo de sua aplicação, a rede será capaz de extrair características discriminantes do sistema a ser mapeado por intermédio das amostras que são apresentadas. Assim como na análise de componentes principais, costuma-se separar aproximadamente 70% dos dados para serem utilizados na etapa de treinamento. Após a conclusão da etapa de treinamento se utiliza os 30% restante dos dados para verificar a eficiência da rede neural.

Para o nosso caso em específico, na etapa de aprendizagem é utilizado um sistema de treinamento supervisionado. A estratégia consiste em se ter disponível, considerando para cada amostra do sinal de entrada, as respectivas saídas desejadas, ou seja, cada amostra de treinamento é composta pelos sinais de entrada e suas correspondentes saídas. Em termos práticos, no nosso processamento temos para cada amostra o grupo de entrada formado pelos valores das componentes principais e no grupo de saída as concentrações de cada tipo de carboidrato e etanol. Conforme as amostras são apresentadas à rede neural, os pesos sinápticos e limiares são continuamente ajustados mediante a aplicação de ações comparativas. Através do algoritmo de aprendizagem é supervisionando a defasagem entre as respostas produzidas pela rede em relação àquelas desejadas, sendo esta diferença utilizada no processo de ajuste. A rede é considerada treinada quando tal defasagem estiver dentro de valores aceitáveis.

Para uma compreensão da rede neural *Perceptron Multicamadas*, utilizada para o processamento dos dados obtidos neste trabalho, vamos explorar os princípios básicos de redes neurais mais simples. Dessa forma, podemos introduzir mais claramente os conceitos e funcionamento da aprendizagem de uma rede neural. Através da inserção detalhada e ambienta dos conceitos mais complexos,

como do *backpropagation*, passar os princípios de operação e otimização utilizados na rede neural artificial escolhida.

4.4.1 Rede Perceptron

A rede neural tipo *Perceptron* foi inicialmente idealizada por Rosenblatt em 1958 (65) e é a forma mais simples configuração de uma rede neural artificial, aplicada para identificar padrões geométricos em um estudo do comportamento da retina ocular. A simplicidade da rede *Perceptron* está no fato de ser constituída de apenas uma camada de um único neurônio artificial, conforme apresentado na figura 23.

Figura 23 - Topologia de uma rede neural tipo *Perceptron*.

Visando aspectos computacionais, verifica-se pela observação da figura 23 que a única diferença entre a rede *Perceptron* e o neurônio apresentado na figura 22 é o fato de que o valor do limiar de ativação $\{\theta\}$ foi assumido como sendo também um termo de ponderação $\{w_0\}$, tendo-se o valor unitário negativo como respectiva entrada. Cada uma das entradas $\{x_i\}$, as quais representam informações sobre o comportamento do processo a ser mapeado, será inicialmente ponderada pelos pesos sinápticos $\{w_i\}$. A seguir, o valor resultante da composição de todas as entradas já devidamente ponderadas pelos seus respectivos pesos, adicionado do limiar de ativação $\{\theta\}$, é repassado como argumento da função de ativação, cujo resultado de retorno será a saída $\{y\}$ produzida pelo *Perceptron*.

Para compreender melhor o funcionamento do *Perceptron* vamos supor um sistema cujas amostras pertencentes a dois grupos distintos, que fornecem entradas

definidas por um conjunto de pares ordenados $\{x_1, x_2\}$, e seja a função de ativação tal que $g(u)=1$ se $u \geq 0$ e $g(u)=-1$ se $u < 0$. Sendo assim, a saída da rede neural, expressa pela eq.15, seria dada por:

$$y = \begin{cases} 1, & \text{se } \sum w_i \cdot x_i - \theta \geq 0 \leftrightarrow w_1 \cdot x_1 + w_2 \cdot x_2 - \theta \geq 0 \\ -1, & \text{se } \sum w_i \cdot x_i - \theta < 0 \leftrightarrow w_1 \cdot x_1 + w_2 \cdot x_2 - \theta < 0 \end{cases} \quad (16)$$

As desigualdades expressas na eq.16 são representadas por equações de primeiro grau (linear). A fronteira de decisão para esse problema é então uma equação de reta definida por:

$$w_1 \cdot x_1 + w_2 \cdot x_2 - \theta = 0 \quad (17)$$

Podemos ilustrar esse resultado com a figura 24 abaixo.

Figura 24 - Solução de uma rede *Perceptron* para um caso bidimensional de separação de 2 grupos;

Com base na observação da figura 24, podemos concluir que o *Perceptron* é um classificador de padrão que distingue classes que são linearmente separáveis. Se estivéssemos tratando de um caso com três variáveis de entrada e, portanto três dimensões, a fronteira de separação seria um plano. Analogamente, para um número de entradas superior a três, a superfície de separação seriam hiperplanos.

Assim como em qualquer arquitetura de rede neural, o treinamento da rede *Perceptron* exige modificações nos valores dos pesos sinápticos $\{w_i\}$ e limiares de ativação $\{\theta\}$. Se a saída produzida pela rede esta coincidente com a saída desejada, os pesos sinápticos e os limiares da rede serão então incrementados (ajuste

excitatório) proporcionalmente aos valores de seus sinais de entrada. Caso contrário, se a saída produzida pela rede é diferente do valor desejado, os pesos sinápticos e limiar serão então decrementados (inibitório). Este processo é repetido, sequencialmente para todas as amostras de treinamento, até que a saída produzida pelo *Perceptron* seja similar à saída desejada de cada amostra. Esse tipo de arquitetura de rede neural é conhecida como *feedforward*, pois o fluxo de informação é realizado sempre adiante, isto é, partindo-se das entradas em direção à saída da rede.

Em termos matemáticos, esses ajustes nos pesos sinápticos e no limiar de ativação são expressos pelas equações abaixo.

$$w_i^{atual} = w_i^{anterior} + \eta \cdot (d^k - y) \cdot x^k \quad (18)$$

$$\theta_i^{atual} = \theta_i^{anterior} + \eta \cdot (d^k - y) \cdot x^k \quad (19)$$

onde: η é uma constante que define a taxa de aprendizagem da rede;

$d^{(k)}$ é o valor desejado para a k-ésima amostra de treinamento;

A taxa de aprendizagem $\{\eta\}$ exprime o quão rápido ocorre o processo de treinamento da rede neural, conduzindo à sua convergência. A escolha do valor de $\{\eta\}$ deve ser muito cautelosa para evitar instabilidades no processo de treinamento. Se a taxa de aprendizagem é muito pequena isso significa que as variações nos valores de $\{w_i\}$ e $\{\theta\}$ também serão pequenas e, portanto a rede neural precisará repetir o processo de aprendizagem mais vezes, resultando em um tempo de processamento mais longo. Se a taxa de aprendizagem é muito grande significa que grandes variações são realizadas nos valores de $\{w_i\}$ e $\{\theta\}$, e sendo assim a saída da rede neural pode ficar oscilando entre valores superiores e inferiores aos valores desejados e, portanto a rede pode demorar um tempo muito longo para convergir ou mesmo nem convergir. Usualmente a taxa de aprendizagem é escolhida com valores entre 0 e 1.

Retornando ao exemplo de classificação de um sistema com apenas duas variáveis de entrada apresentado na figura 24, podemos ilustrar esse processo de treinamento na figura 25 abaixo, como a evolução das consecutivas retas traçadas pelo Perceptron.

Figura 25 - Aprendizagem com evolução da fronteira de separação (A). A possibilidade de infinitas fronteiras de separação como resposta para o mesmo problema (B);

Conforme apresentado na figura 25(A) acima, conforme a rede neural tipo *Perceptron* foi sendo treinada, novas equações de reta foram sendo construídas até que uma delas satisfaça a condição de separação de todos os pontos dos dois grupos. Porém, segundo a figura 25(B), podemos concluir que não existe uma única equação de reta que satisfaz a convergência da rede neural, mas infinitas retas. Além do valor da taxa de aprendizagem, quem possui grande influência em qual dessas infinitas retas será a “escolhida” pela rede *Perceptron* são os valores iniciais de $\{w_i\}$ e $\{\theta\}$ que são escolhidos aleatoriamente.

4.4.2 Rede Adaline e Regra Delta

A rede neural do tipo *Adaline* também é relativamente simples, porém é extremamente importante por ter sido responsável pela inserção do algoritmo de aprendizagem conhecido como regra Delta, considerado precursor da regra Delta generalizada que é utilizada nas redes *Perceptron Multicamadas*. Assim como a rede *Perceptron*, a rede *Adaline* também é constituída de uma única camada com um único neurônio. Essa arquitetura também é do tipo *feedforward*, com a

informação fluindo exclusivamente no sentido da entrada para a saída. Apresentamos na figura 26 a representação da rede *Adaline*.

Figura 26 - Topologia da rede neural tipo *Adaline*

Conforme é possível notar pela figura 26, a única diferença entre a rede *Perceptron* e a *Adaline* é a presença do bloco associador, cuja função é auxiliar no processo de treinamento da rede. O bloco associador calcula o valor do *erro*, definido como a diferença entre o valor desejado $\{d\}$ e o valor do potencial de ativação $\{u\}$.

$$erro = d - u \quad (20)$$

Em termos do treinamento, é a utilização deste parâmetro *erro* na regra Delta, utilizada como regra de aprendizado, que diferencia a rede *Adaline* da rede *Perceptron*. A regra Delta também é conhecida como regra de aprendizado de Widrow-Hoff, algoritmo *LMS* (*least mean square*) ou regra do Gradiente Descendente. A ideia básica da regra Delta consiste em ajustar o valor dos pesos e do limiar do neurônio de forma a minimizar o valor da diferença entre a saída desejada $\{d\}$ e a resposta do combinador linear $\{u\}$ para todas as amostras. Na verdade, o processo de minimização é realizado sobre o erro quadrático entre u e d . Seja um conjunto de p amostras de treinamento. Então a equação do erro quadrático é definida por:

$$E(\mathbf{w}) = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^p (d^{(k)} - u)^2 \quad (21)$$

onde: $\mathbf{w}$ = representação matricial de conjunto de pesos;

$E(\mathbf{w})$ = erro quadrático para um determinado vetor $\mathbf{w}$;

Substituindo a eq.14 na eq.21 obtemos

$$E(\mathbf{w}) = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^p \left(d^{(k)} - \left(\sum_{i=1}^n w_i \cdot x_i^{(k)} - \theta \right) \right)^2 \quad (22)$$

$$E(\mathbf{w}) = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^p \left(d^{(k)} - (\mathbf{w}^T \cdot \mathbf{x}^{(k)} - \theta) \right)^2 \quad (23)$$

Sendo assim, obtemos na eq.23 acima o erro quadrático médio para as p amostras do conjunto de treinamento, na representação matricial. A ideia principal deste método é realizar um treinamento que minimize esse erro quadrático médio. Para tanto, o próximo passo consiste na aplicação do operador gradiente na função $E(\mathbf{w})$, com relação a $\mathbf{w}$.

$$\nabla E(\mathbf{w}) = \frac{\partial E(\mathbf{w})}{\partial \mathbf{w}} = \sum_{k=1}^p \left(d^{(k)} - (\mathbf{w}^T \cdot \mathbf{x}^{(k)} - \theta) \right) \cdot (-\mathbf{x}^{(k)}) \quad (24)$$

Substituindo a eq.14 na eq.24 temos então

$$\nabla E(\mathbf{w}) = - \sum_{k=1}^p (d^{(k)} - u) \cdot \mathbf{x}^{(k)} \quad (25)$$

Portanto, a variação no valor do vetor de pesos $\Delta \mathbf{w}$ é dada pela equação a seguir:

$$\Delta \mathbf{w} = -\eta \cdot \nabla E(\mathbf{w}) = \eta \sum_{k=1}^p (d^{(k)} - u) \cdot \mathbf{x}^{(k)} \quad (26)$$

O sinal negativo na eq.26 é devido ao fato de que o objetivo é a minimização do erro e, portanto, devemos percorrer o sentido contrário do gradiente. Na prática, seguindo a mesma ideia de ajuste dos pesos sinápticos apresentados na eq.18 para

a rede tipo *Perceptron*, realizamos uma correção nos pesos para cada k-ésima amostra do grupo de treinamento que é apresentada para a rede, seguindo o algoritmo abaixo.

$$\mathbf{w}^{atual} = \mathbf{w}^{anterior} + \eta \cdot (d^{(k)} - u) \cdot \mathbf{x}^{(k)} \quad (27)$$

Dessa forma, as variações nos pesos sinápticos não são realizadas de maneira aleatória. Cada vez que uma amostra do grupo de treinamento passa pela rede neural, o incremento (ou detrimento) do peso sináptico é realizado de forma a minimizar o erro quadrático médio. Este método de aprendizado da rede neural descrito, baseado na minimização do erro quadrático médio pelo cálculo do gradiente é conhecido como regra delta (65).

Esse procedimento de ajuste dos pesos sinápticos é realizado para todas as p amostras do conjunto de treinamento. Quando todas as amostras forem analisadas, isto é, quando ocorre o fim de uma época de treinamento, o valor do erro quadrático médio é comparado com um valor pré-determinado como mínimo. Sendo o valor do erro quadrático médio menor ou igual a este valor mínimo a rede é finalizada e considerada convergente. Caso contrário, é reiniciado o processo de correção dos pesos sinápticos desde a primeira amostra.

4.4.3 Perceptron Multicamadas

O que diferencia as redes neurais do tipo *Perceptron Multicamadas* (PMC) é o fato de possuírem pelo menos uma camada intermediária de neurônios (também conhecida como camada oculta) entre a camada de entrada e a camada de saída da rede neural. As redes PMC podem apresentar várias camadas intermediárias, o que torna a rede neural cada vez mais complexa. Para o presente trabalho decidimos utilizar uma rede neural do tipo PMC composta de uma camada de entrada, uma camada intermediária e uma camada de saída. Foi no final da década de 1980 que as redes PMC foram se tornando populares, com suas extensas áreas de aplicação. Isso se deve principalmente à publicação do livro *Parallel Distributed Processing*,

publicado por Rumelhart em 1986 (65), onde foi explicitado o algoritmo utilizado no método de aprendizagem conhecido como *backpropagation*, utilizado por essas redes. Apresentamos na figura 27 abaixo uma ilustração do funcionamento de uma rede *Perceptron Multicamadas* com a notação utilizada no algoritmo do *backpropagation*.

Figura 27 - Topologia da rede neural tipo *Perceptron Multicamadas*

Para derivar o algoritmo do *backpropagation*, vamos definir o conjunto de variáveis apresentados na topologia desta rede na figura 27.

Cada um dos neurônios $\{j\}$ pertence a uma camada $\{L\}$. Assim como nas redes mais simples apresentadas anteriormente, $g(.)$ é a função de ativação do neurônio.

$\mathbf{W}_{ji}^{(L)}$ é a matriz de pesos, cujos elementos são os sinápticos, de tal forma que denota o valor do peso sináptico que conecta o j -ésimo neurônio da camada (L) ao i -ésimo neurônio da camada anterior, isto é, $(L-1)$. Por exemplo, $\mathbf{W}_{ji}^{(2)}$ é o peso sináptico que conecta o j -ésimo neurônio da camada de saída ao i -ésimo neurônio da camada 1. Assim como, $\mathbf{W}_{ji}^{(1)}$ é o peso sináptico que conecta o j -ésimo neurônio da primeira camada oculta ao i -ésimo sinal da camada de entrada.

$I_j^{(L)}$ é o vetor cujos elementos são soma ponderada em relação ao j -ésimo neurônio da camada L . Explicitamente para esta rede neural utilizada temos:

$$I_j^{(1)} = \sum_{i=0}^n w_{ji}^{(1)} \cdot x_i = w_{j,0}^{(1)} \cdot x_0 + w_{j,1}^{(1)} \cdot x_1 + \cdots + w_{j,n}^{(1)} \cdot x_n \quad (28)$$

$$I_j^{(2)} = \sum_{i=0}^n w_{ji}^{(2)} \cdot x_i = w_{j,0}^{(2)} \cdot Y_0^{(1)} + w_{j,1}^{(2)} \cdot Y_1^{(1)} + \dots + w_{j,n}^{(2)} \cdot Y_{N_1}^{(1)} \quad (29)$$

Onde $Y_j^{(L)}$ são vetores cujos elementos são a saída do j-ésimo neurônio da camada L. Portanto, também pode ser reescrito como:

$$Y_j^{(1)} = g(I_j^1) \quad (30)$$

$$Y_j^{(2)} = g(I_j^2) \quad (31)$$

De maneira similar ao método de aprendizagem aplicado à rede *Adaline*, através do cálculo do gradiente, realiza-se um ajuste nos pesos da camada de saída, $\mathbf{W}_{ji}^{(2)}$, de forma a minimizar o erro entre a saída da rede e o valor desejado, $E^{(2)}$. Sendo que o erro da saída da rede neural para uma determinada amostra k é dada pela eq.32 e o gradiente do erro pela eq.33.

$$E(k) = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^{n_2} (d_j(k) - Y_j^2(k))^2 \quad (32)$$

$$\nabla E^{(2)} = \frac{\partial E}{\partial \mathbf{w}_{ji}^{(2)}} = \frac{\partial E}{\partial \mathbf{Y}_j^{(2)}} \cdot \frac{\partial Y_j^{(2)}}{\partial I_j^{(2)}} \cdot \frac{\partial I_j^{(2)}}{\partial \mathbf{w}_{ji}^{(2)}} \quad (33)$$

Realizando o ajuste $\Delta \mathbf{W}_{ji}^{(2)}$ da matriz de pesos $\mathbf{W}_{ji}^{(2)}$ em direção oposta ao gradiente, com a finalidade de minimizar o erro, temos:

$$\Delta W_{ji}^{(2)} = -\eta \cdot \frac{\partial E}{\partial \mathbf{w}_{ji}^{(2)}} = \eta \cdot \delta_j^{(2)} \cdot Y_i^{(1)} \quad (34)$$

onde $\delta_j^{(2)}$ é definido como o gradiente local em relação ao j-ésimo neurônio da camada de saída, sendo dado por:

$$\delta_j^{(2)} = (d_j - Y_j^{(2)}) \cdot g'(I_j^{(2)}) \quad (35)$$

Sendo assim, no algoritmo de aprendizagem do *backpropagation*, o ajuste da camada $\mathbf{W}_{ji}^{(2)}$ pode ser escrita como apresentado na eq.36 abaixo.

$$W_{ji}^{(2)atual} = W_{ji}^{(2)anterior} + \eta \cdot \delta_j^{(2)} \cdot Y_j^{(2)} \quad (36)$$

Da mesma forma, ainda é necessário ajustar os pesos sinápticos da primeira camada escondida, $\mathbf{W}_{ji}^{(1)}$. Analogamente é calculado o valor do gradiente do erro da saída da primeira camada escondida, dada pela eq.37.

$$\nabla E^{(1)} = \frac{\partial E}{\partial \mathbf{w}_{ji}^{(1)}} = \frac{\partial E}{\partial \mathbf{Y}_j^{(1)}} \cdot \frac{\partial Y_j^{(1)}}{\partial I_j^{(1)}} \cdot \frac{\partial I_j^{(1)}}{\partial \mathbf{w}_{ji}^{(1)}} \quad (37)$$

Que fornece o ajuste de pesos $\Delta \mathbf{W}_{ji}^{(1)}$, na direção oposta ao gradiente, dado pela eq.38.

$$\Delta W_{ji}^{(1)} = -\eta \cdot \frac{\partial E}{\partial \mathbf{w}_{ji}^{(1)}} = \eta \cdot \delta_j^{(1)} \cdot x_i \quad (38)$$

onde $\delta_j^{(1)}$ é definido como o gradiente local em relação ao j-ésimo neurônio da primeira camada escondida, sendo dado por:

$$\delta_j^{(1)} = \left(\sum_{k=1}^{n_2} \delta_k^{(2)} \cdot W_{kj}^{(2)} \right) \cdot g'(I_j^{(1)}) \quad (39)$$

Sendo assim, no algoritmo de aprendizagem do *backpropagation*, o ajuste da camada $\mathbf{W}_{ji}^{(1)}$ pode ser escrita como apresentado na eq.40 abaixo.

$$W_{ji}^{(1)atual} = W_{ji}^{(1)anterior} + \eta \cdot \delta_j^{(1)} \cdot x_j \quad (40)$$

Aplicando-se esse conjunto de procedimentos podemos construir uma rede neural do tipo *Perceptron Multicamadas*, baseado na técnica de aprendizado *backpropagation*, com uma camada de entrada, uma camada escondida e uma camada de saída que seja aplicável ao nosso conjunto de dados. Dessa forma, os resultados das componentes principais fazem parte dos dados da camada de entrada e na camada de saída cada neurônio apresenta como resposta a concentração de cada um dos compostos de interesse.

Para alcançar esse objetivo, estamos utilizando a rede neural tipo *Perceptron Multicamadas* como um aproximador universal de funções. É como se tivéssemos uma função matemática, onde temos no domínio os valores das componentes principais e na imagem temos as concentrações de cada um dos compostos. Porém, nós não temos solução analítica para este problema, isto é, desconhecemos essa função matemática.

Através da rede neural podem fazer essa correlação entre as componentes principais e as concentrações de carboidratos e etanol. Isso é possível se utilizarmos na camada neural escondida uma função do tipo sigmoide e na camada de saída uma função do tipo linear. Dessa forma, através do ajuste dos pesos sinápticos a rede neural constrói na camada intermediária um conjunto de equações sigmóides com variados parâmetros e coeficientes de inclinação e amplitude. Assim como, o ajuste dos pesos sinápticos da camada de saída fará uma combinação linear dessas curvas sigmóides da camada anterior. Isto é, será realizada uma soma de curvas no formato sigmoide de tal forma que o resultado obtido seja a equação que correlaciona as componentes principais com as concentrações dos compostos. Para exemplificar esse procedimento, apresentamos um caso bidimensional conforme apresentado na figura 28, onde é conhecido um conjunto discreto de dados que estão correlacionados através de uma função $f(x)$ desconhecida.

Figura 28 - Conjunto de dados cuja equação que rege seu comportamento é desconhecida (A). A soma de várias sigmóides pode construir uma curva que explica o comportamento dos dados.

Para este caso em específico, é utilizado uma rede neural tipo *Perceptron Multicamadas*, com 3 neurônios na camada intermediária e 1 neurônio na camada de saída. Cada neurônio da camada intermediária gerou uma sigmoide com um valor específico do parâmetro θ , enquanto que o neurônio de saída determinou o valor do peso de cada sigmoide produzida por cada neurônio (λ). Quando é

realizada a soma, o resultado é muito próximo do conjunto de pontos iniciais. A partir de então, se for inserido nesta rede neural um valor de um ponto qualquer, x , que pertença ao domínio de operação utilizado no treinamento e que seja distinto dos valores do conjunto inicial, a saída da rede será um valor que apresenta um comportamento similar aos demais pontos do conjunto, isto é, a imagem da função traçada pela soma das sigmoides.

5 Materiais e Métodos

5.1 Produção das amostras de mosto

Para a realização do experimento, objetivando realizar medidas de quantificação de açúcares e etanol no mosto cervejeiro, se faz necessário um conjunto de amostras que apresente estes compostos em várias concentrações distintas. Esse conjunto de amostras foi produzido em um equipamento, *fábrica piloto*, construído especificamente para produção de mosto cervejeiro (Mec Bier, Pompéia-SP). Essa *fábrica piloto* é constituída de uma panela utilizada na etapa de mosturação e fervura do mosto, com capacidade de 100 litros úteis, uma tina de clarificação com fundo falso, uma panela para aquecimento de água com capacidade de 60 litros, um trocador de calor de placas paralelas, uma unidade de refrigeração de mosto e um tanque de fermentação com capacidade de 200 litros (figuras 29 e 30). Tanto a panela de mosturação e fervura quanto a panela de aquecimento de água operam utilizando um sistema de resistência elétrica para promover o aquecimento, controlado através de um termostato digital.

Figura 29 - Equipamento de aquecimento controlado para mosturação e tina de filtragem à esquerda e um reservatório de água quente à direita.

Figura 30 - Tanques de fermentação com temperatura controlada.

Na etapa de mosturação, o mosto cervejeiro foi produzido utilizando 100 litros de água e 24 quilogramas (Kg) de malte tipo Pilsen produzido pela empresa Cooperativa Agrária Agroindustrial S.A./Agromalte – Guarapuava, Brasil. A água utilizada é oriunda da rede pública do município de São Carlos, Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE), e antes de ser utilizada foi previamente filtrada em um filtro de polipropileno e carvão ativado, com a finalidade de remover partículas em suspensão e o cloro dissolvido na água. O malte utilizado foi previamente moído em um moinho do tipo rolo, formado por 2 rolos giratórios, promovendo uma quebra satisfatória dos grãos de malte sem a produção excessiva de partículas muito pequenas. Logo que é feita a mistura da água com o malte moído é feita a correção do pH do mosto para o valor de 5,5 utilizando-se para esta finalidade ácido láctico 85% P.A. (Synth, Diadema-SP).

Para a realização da mosturação optamos pelo método de infusão, por se tratar de uma técnica acessível ao equipamento disponível além de ser o método mais amplamente utilizado em todo o mundo, principalmente no Brasil (16). Como estamos interessados em obter amostras com variadas concentrações dos principais açúcares, foram realizadas 4 curvas de sacarificação variando-se as temperaturas e tempos escolhidas para realizar os patamares das curvas de mosturação por infusão. As curvas com os tempos e temperaturas estão apresentadas na figura 31, onde os pontos em vermelho representam os momentos em que foram feitas as coletas das amostras.

etapa de mosturação do mosto cervejeiro. O momento em que cada amostra foi coletada está representado pelo ponto vermelho na figura 31.

Depois de concluída as etapas de mosturação, o mosto passou pelo processo de clarificação e fervura. A fervura durou 60 minutos, sendo que logo no início foram adicionados 20 gramas de lúpulo tipo Nugget (WE Consultoria, Porto Alegre – RS) e nos últimos 5 minutos mais 50 gramas de lúpulo tipo Saaz (WE Consultoria, Porto Alegre – RS). Após a realização do *whirlpool*, esperamos 40 minutos para a decantação do *trub*, e logo em seguida o mosto foi transferido ao fermentador a uma temperatura de 10,5°C. Foi feita a inoculação do fermento cervejeiro *Saccharomyces cerevisiae* do tipo W34/70 da marca Fermentis-França, a uma concentração de 100 gramas/hl, ou seja, aproximadamente 6.10^9 células viáveis por mililitro de mosto. O fermento foi obtido desidratado e foi inserido diretamente no fermentador. A partir deste momento começamos a realizar a coleta das amostras durante a etapa de fermentação. O mesmo procedimento de armazenamento realizado para as amostras coletadas na etapa de mosturação foi aplicado para as amostras obtidas da etapa de fermentação. Foram realizados 4 processos de fermentação, produzindo no total 36 amostras.

5.2 Medidas de cromatografia líquida de alta precisão

Para que as amostras produzidas sejam utilizadas no experimento que propõe um novo método de quantificação de açúcares e etanol é necessário obter um conhecimento prévio da concentração destes compostos através de outra técnica, que seja bem estabelecida e aceita como um método padrão. Com essa finalidade, fizemos uma análise através da técnica de cromatografia líquida de alto desempenho (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) para determinar a quantidade de dextrina, maltotriose, maltose, glicose e etanol nas amostras com a maior precisão possível. A coluna utilizada para fazer a separação dos compostos é do tipo C-611 da marca SUPELCOGEL, sendo que previamente as amostras foram passadas por uma pré-coluna de Ca da marca SUPELCOGEL.

Como para a análise de HPLC é necessário realizar uma calibração, utilizamos um padrão Fuel Ethanol Residual Saccharides Mix da marca Sigma-Aldrich (EUA), que contém uma ampola de 1ml com as concentrações de 1% de glicerol, 2% de glicose, 1% de maltotriose, 2% de maltose, 3% de ácido láctico, 3% de ácido acético, 3,25% de dextrina e 12% de etanol. Essa amostra padrão foi diluída em outras 10 amostras de concentrações variadas, utilizadas para obter a curva de calibração das medidas de HPLC. Todas as amostras de mosto utilizadas no experimento foram diluídas na concentração de 10% de seu valor inicial antes de serem inseridas no equipamento de HPLC para que os valores de leitura do equipamento estivessem dentro da mesma faixa de leitura realizada na medida das amostras da curva com o padrão, isto é, dentro da escala da curva de calibração obtida.

As medidas de HPLC foram realizadas em um equipamento da marca Waters (EUA) modelo 2414, com detecção por índice de refração, da Universidade de São Paulo – Instituto de Química – Laboratório de Sistemas Biomiméticos, localizado na cidade de São Paulo – SP, sob a supervisão da professora Dra. Iolanda M. Cuccovia.

5.3 Medidas de absorção no infravermelho médio

As medidas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio foram realizadas em um equipamento *Fourier Transform Infrared* (FTIR) da marca Varian (EUA) modelo 640IR FT-IR. Inicialmente tentamos acoplar neste equipamento um sistema de *Refletância Total Atenuada* (Attenuated Total Reflectance - ATR), também da marca Varian (EUA), com um cristal de seleneto de zinco (ZnSe) de uma reflexão. Porém, esse sistema de análise não resultou em uma medida espectral satisfatória, pois a presença da água, altamente absorvedora desses comprimentos de onda utilizados, resultou em uma saturação da detecção. Alterando-se os parâmetros de análise, a fim de diminuir a interferência da água nas

medidas espectrais, há uma significativa redução na intensidade de sinal, a ponto de não ser possível a detecção pelo equipamento.

Dessa forma, decidimos construir uma janela óptica de ZnSe, onde a amostra é inserida entre dois discos deste material, formando um filme de espessura aproximada de $50\mu\text{m}$. Na figura 32 apresentamos um desenho esquemático e uma foto dessa montagem.

Figura 32 - Simulação do funcionamento da realização da medida através da passagem de luz pela amostra à esquerda. Foto da célula de ZnSe construída à direita.

Inserindo essa janela óptica no equipamento é possível uma leitura do espectro de absorção através de uma passagem direta do feixe, obedecendo a lei de Lambert-Beer. As configurações utilizadas no equipamento foram: sensibilidade igual a 2, resolução de 2 cm^{-1} , abertura igual a 4, número de scans igual a 32. Para cada leitura foi utilizado um volume de 0,5ml, sendo que cada amostra consome menos de 1 minuto para realizar as 32 medidas e calcular a média de todos os espectros. Entre cada amostra a célula de ZnSe foi limpa com um fluxo de 20 ml de água destilada e posteriormente seca com um fluxo de ar comprimido.

Dentre algumas vantagens desse sistema de análise podemos destacar o fato de ser possível variar a espessura desse filme produzido pela amostra de forma a otimizar o máximo sinal de detecção sem saturação do detector. Além disso, como o feixe de luz do equipamento passa diretamente pela amostra, a intensidade de luz que chega ao detector é muito maior do que no caso da utilização do sistema de ATR.

5.4 Processamento dos espectros

Os espectros obtidos foram analisados através de uma série de métodos matemáticos e computacionais. Foram realizadas algumas normalizações, como por exemplo, divisão da curva espectral pela banda de absorção da água, remoção da linha de base, estabelecimento de valores máximos e mínimos, seleção de bandas espectrais a serem analisadas. Em seguida, foi feita uma redução no número de variáveis dos espectros através da *Análise de Componentes Principais* (Principal Component Analysis – PCA). Finalmente, os dados foram inseridos em uma Rede Neural do tipo Perceptron Multicamadas, onde é realizado o treinamento e validação do método. Tanto o número de componentes utilizados quanto o número de neurônios na camada intermediária foram variados e o sistema de processamento refeito desde o início de forma a encontrar os valores destes parâmetros capazes de otimizar e fornecer melhor precisão às medidas. A forma como esses parâmetros foram sendo analisados e variados será melhor explicado e apresentado na secção subsequente de resultados obtidos.

6 Resultados e Discussão

6.1 Calibração com a técnica de HPLC

Após as amostras terem sido preparadas conforme descrito no item anterior, foram levadas até o Instituto de Química da Universidade de São Paulo, na cidade de São Paulo, no Laboratório de Sistemas Biomiméticos, onde foram realizadas as medidas de HPLC para quantificação dos açúcares e etanol por um padrão ouro. Um resultado típico obtido de uma corrida de HPLC está apresentado na figura 33 para uma amostra do padrão para calibração e uma amostra de mosto durante a etapa de fermentação.

Figura 33 - Corrida de HPLC típico das amostras do padrão (A) e das amostras de mosto (B).

Através das referências (9,10) e da corrida da amostra padrão podemos identificar o tempo de retenção de cada um dos compostos de interesse, apresentados na tabela 3 abaixo.

Tabela 3 - Tempo de retenção médio dos carboidratos e do etanol analisados.

Composto	Tempo Retenção(min)
Glicose	4.35
Maltose	5.11
Maltotriose	5.64
Dextrinas	6.65
Etanol	14.45

A amostra de padrão foi dividida, em duplicata, nas concentrações de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90% e 100% da concentração inicial para obtenção da curva de calibração. Para cada uma destas concentrações, em duplicata, realizamos as corridas de HPLC e calculamos as áreas dos picos em torno dos valores do tempo de retenção da tabela 3 para cada composto de interesse. Dessa forma, foi possível obter as curvas de calibração da figura 34.

Figura 34 - Correlação entre as áreas dos picos de retenção e a concentração para cada carboidrato e etanol analisados.

Em seguida, todas as amostras de mosto da etapa de mosturação e fermentação passaram pelo mesmo procedimento de medida de HPLC, onde os picos de retenção dos açúcares e etanol foram identificados, as áreas calculadas e através das curvas de calibração pudemos quantificar cada um separadamente.

6.2 Quantificação de carboidratos na etapa de mosturação por HPLC

Para a etapa de mosturação, utilizamos as curvas de calibração da figura 34 e a técnica de HPLC e determinamos as concentrações dos principais açúcares para cada uma das quatro curvas de mosturação. Os resultados estão apresentados nas tabelas 4,5,6 e 7 abaixo.

Tabela 4 - Concentração dos carboidratos analisados, determinados pela técnica de HPLC, da curva de mosturação A.

Curva de Mosturação A				
Tempo(min)	Dextrina(%) ±0.01	Maltotriose(%) ±0.01	Maltose(%) ±0.01	Glicose(%) ±0.01
0	0.32	0.24	0.32	0.38
10	0.16	0.32	1.77	0.95
20	0.22	0.52	2.41	1.28
30	0.58	0.37	2.63	1.40
45.5	2.41	0.79	5.91	1.78
55.5	2.84	0.95	7.40	2.00
65.5	3.09	1.05	8.16	2.13
81.5	3.36	1.41	7.94	1.88
91.5	3.56	1.82	7.89	1.72
101.5	3.66	1.97	7.69	1.63
111.5	3.82	2.05	7.76	1.63
120.5	4.39	2.10	7.63	1.54
125.5	4.48	2.10	7.64	1.52

Tabela 5 - Concentração dos carboidratos analisados, determinados pela técnica de HPLC, da curva de mosturação B.

Curva de Mosturação B				
Tempo(min)	Dextrina(%) ±0.01	Maltotriose(%) ±0.01	Maltose(%) ±0.01	Glicose(%) ±0.01
0	0.10	0.17	0.19	0.22
11	0.12	0.19	0.59	1.07
20	0.15	0.22	0.72	0.99
30	0.19	0.26	0.97	1.17
38	0.24	0.36	1.49	1.19
48	0.23	0.36	2.00	1.40
58	0.41	0.39	2.32	1.70
81	3.61	1.04	7.25	2.14
91	3.88	1.44	7.32	1.96
101	4.06	1.67	7.23	1.84
111	4.22	1.81	7.12	1.77
125	4.73	1.91	6.77	1.67
130	5.21	2.01	6.83	1.74

Tabela 6 - Concentração dos carboidratos analisados, determinados pela técnica de HPLC, da curva de mosturação C.

Curva de Mosturação C				
Tempo(min)	Dextrina(%) ±0.01	Maltotriose(%) ±0.01	Maltose(%) ±0.01	Glicose(%) ±0.01
0	0.38	0.35	0.71	0.42
10	0.44	0.27	1.47	0.93
20	0.54	0.31	1.91	1.13
32.5	1.10	0.41	2.85	1.32
47.5	1.20	0.68	5.97	1.81
52.5	0.73	0.78	7.04	2.05
62.5	0.80	0.86	7.76	2.18
77	2.45	1.25	8.35	2.18
87	3.06	1.60	8.36	2.21
97	3.27	1.76	8.46	2.24
107	3.32	1.90	8.40	2.20
117	3.38	2.01	8.46	2.20
138	3.87	2.46	7.69	1.89
143	4.06	2.53	7.88	1.94

Tabela 7 - Concentração dos carboidratos analisados, determinados pela técnica de HPLC, da curva de mosturação D.

Curva de Mosturação D				
Tempo(min)	Dextrina(%) ±0.01	Maltotriose(%) ±0.01	Maltose(%) ±0.01	Glicose(%) ±0.01
0	0.12	0.39	0.79	0.46
10	0.25	0.33	2.19	1.02
20	0.32	0.37	2.86	1.29
30	0.38	0.44	3.32	1.48
42.5	0.46	0.54	4.10	1.74
52.5	0.62	0.75	5.82	2.00
62.5	0.74	0.91	6.88	2.20
77	2.50	1.49	8.12	2.28
87	3.00	1.77	8.22	2.34
97	3.05	1.84	7.96	2.29
107	3.35	2.08	8.46	2.42
128	3.89	2.60	7.62	2.09
133	3.81	2.58	7.56	2.06

Na figura 35, apresentamos as curvas de sacarificação das tabelas 4,5,6 e 7 na forma gráfica. As barras de erro (desvio padrão) são menores do que o tamanho do ponto apresentado no gráfico.

Figura 35 - Concentração dos carboidratos analisados para as quatro curvas de mosturação utilizadas.

Podemos observar que como as temperaturas e tempos escolhidos nas curvas de mosturação foram distintos, conseguimos obter um conjunto de amostras com concentrações de carboidratos diversificados. Conforme foi planejado, conseguimos obter um conjunto de 53 amostras de varias concentrações de carboidratos, que a partir de agora são conhecidas e podem ser utilizadas para treinar e validar o novo método de análise proposto.

6.3 Análise exploratória dos espectros de absorção no infravermelho médio

Tendo em mãos as amostras de mosto necessárias pra treinar e validar o novo método e sendo conhecidas as quantidades de cada um dos principais

açúcares e etanol, prosseguimos com a análise de absorção na região do infravermelho médio. Porém, antes de analisar as amostras de mosto decidimos compará-las com amostras de alguns compostos puros. Comparamos então a água, uma solução aquosa de maltose (10%), etanol (99,9%), mosto pronto antes de fermentar (extrato inicial igual a 12 °Brix), mosto fermentado (3,2 °Brix de extrato aparente). Essas medidas estão apresentadas na figura 36. Foi realizado uma varredura entre 400cm^{-1} e 4000cm^{-1} , sendo que a leitura do *background* (“branco”) foi realizada com a janela de ZnSe e ar.

Figura 36 - Espectros de absorção no infravermelho médio para a água, maltose 10%, etanol 99,9%, mosto 12°Brix e mosto 3,2°Brix (A). Bandas de absorção característicos dos carboidratos e etanol na região de *fingerprint* (B).

Conforme já era esperado pela literatura (1,46,53,66), podemos encontrar bandas de absorção dos açúcares e etanol na região entre 980cm^{-1} e 1189cm^{-1} , principalmente devido ao modos vibracionais de alongamento das ligações C – O e –OH e os modos de flexão dos grupos CH. Observamos 4 bandas intensas na amostra de água (figura 36 - A), sendo seus picos centrados em 690cm^{-1} , 1647cm^{-1} , 2131cm^{-1} e 3366cm^{-1} . Para a maltose, segundo Polshin (1) e Wang (67) os principais picos estão localizados em 1037cm^{-1} , 1077cm^{-1} , 1108cm^{-1} e 1149cm^{-1} (figura 36 - B). Exceto o primeiro pico de 1037cm^{-1} que possui um leve deslocamento em torno de 6cm^{-1} os demais picos possuem uma grande coincidência com esses valores. Porém, Sivakesava (53) também encontra um valor próximo ao obtido em nossas medidas, sendo este pico em torno de 1044cm^{-1} .

Para o etanol puro, observam-se vários picos de absorção espalhados por toda a região espectral analisada, porém, a maioria deles encontra-se em

sobreposição com as bandas de absorção da água. Quando analisamos o espectro do mosto fermentado, com aproximadamente 4,7% de etanol, a quantidade de água é muito superior, assim as suas bandas de absorção mais intensas, impossibilitando a identificação da presença do etanol nessas regiões de sobreposição espectral. Ainda comparando o etanol com o mosto fermentado, é possível identificar na região entre 980cm^{-1} e 1089cm^{-1} uma boa semelhança entre os espectros, inclusive com picos de absorção muito próximos. Segundo Llario (45), podemos observar em 1052cm^{-1} o pico característico do etanol devido ao modo de vibração assimétrico das ligações C–C–O. Sabendo-se que neste estágio, dentre os açúcares temos apenas dextrinas, podemos concluir que há uma grande possibilidade de identificarmos o etanol a partir desta região devido a grande semelhança entre os espectros do mosto fermentado e o etanol puro.

Além disso, ainda comparando a medida do etanol com o mosto fermentado, observamos que entre 1130cm^{-1} e 1189cm^{-1} há uma banda de absorção que está presente apenas no espectro do mosto fermentado, que provavelmente é referente à presença de dextrinas. Este fato pode nos fornecer indícios da possibilidade de quantificação deste tipo de carboidrato. Confirmamos essa suposição através de uma comparação com uma medida apresentada por Duarte (44) de uma amostra de dextrina, apresentando um pico de absorção na região de 1151cm^{-1} (figura 37). Encontramos em nestas medidas prévias outra característica espectral da presença de dextrinas no mosto fermentado. Na curva do mosto fermentado, na região entre 1010cm^{-1} e 1031cm^{-1} podemos ver que há uma modificação do perfil do pico devido ao fato de que nesta região há uma sobreposição entre uma banda de absorção do etanol (pico em 1044cm^{-1}) e uma banda de absorção da dextrina (pico em 1024cm^{-1} segundo Duarte).

Ref. Duarte(44)

Figura 37 - Comparação entre as bandas de absorção do etanol, a maltose e as dextrinas.

Os picos presentes nessa região analisada e descrita acima são difíceis de serem correlacionados com vibrações moleculares específicas devido à complexidade de mistura de compostos presentes na amostra de mosto como, por exemplo, proteínas e lipídios, além de carboidratos e etanol. Entretanto, sabemos pela literatura (24,44-46,57), que há uma série de bandas de absorção nessa região espectral devido aos modos vibracionais das ligações C – C, C – O, –CH, –OH, presentes nos carboidratos e etanol, que conforme observado anteriormente, fornece a grande possibilidade não apenas de serem detectados, mas também de serem quantificados.

Como o açúcar presente em maior quantidade no mosto cervejeiro é a maltose, decidimos fazer uma comparação inicial entre eles. Podemos observar, pela figura 37, que como era esperado, há uma grande semelhança entre os espectros de absorção destas duas amostras. Porém, é possível observar que os picos máximos de absorção não são exatamente coincidentes, havendo um pequeno deslocamento espectral. Essa sutil diferença já é um bom indício, pois sabemos que há outros açúcares no mosto cervejeiro, e esta técnica de absorção no infravermelho médio já se mostra capaz de identificar essa diferença.

Uma das características mais importantes e de extremo impacto prático a ser ressaltada é o fato de que nesta região espectral entre 980cm^{-1} e 1189cm^{-1} não há uma significativa influência da banda de absorção da água. Dessa forma, esse fato nos permite que a análise seja feita em solução aquosa, sem nenhum tipo de pré-tratamento de secagem ou remoção de água que venha a consumir tempo e

trabalho. Consequentemente, um futuro sistema baseado em medidas nessa região espectral já possui o grande potencial de poder ser aplicado em uma linha de produção.

6.4 Quantificação de carboidratos na etapa de mosturação por FTIR

Tendo sido identificadas as regiões de interesse, realizamos as medidas de espectroscopia de absorção para todas as amostras de mosto. Abaixo apresentamos o resultado obtido de uma das curvas de mosturação (D) para podermos descrever o pré-processamento realizado nos dados.

Figura 38 - Espectro de absorção das amostras da curva de mosturação D, abrangendo o pico de absorção da água entre 1500 e 1870 cm^{-1} (A) e a região de *fingerprint* (B).

Estamos interessados em quantificar os açúcares e etanol em termos de uma porcentagem da quantidade total da massa da amostra, levando em consideração principalmente a quantidade de água. Decidimos então, realizar uma normalização onde selecionamos uma banda de absorção da água, entre 1500cm^{-1} e 1870cm^{-1} (figura 38(A)). Calculamos a área dessa região para cada curva de espectro de absorção e dividimos todo o espectro por esse valor.

Como podemos observar, ainda há um deslocamento (*offset*) entre as curvas, resultante do fato de que a quantidade de amostra que compõe o filme no interior da

janela de ZnSe não ser exatamente igual em todas as medidas, podendo ficar pequenas bolhas de ar ou CO₂. Solucionamos facilmente esse problema removendo a linha de base de todos os espectros. É importante notar que esse procedimento não causa nenhum problema com relação ao resultado, pois com a normalização pela divisão da área da banda de absorção da água, estamos realizando um cálculo relativo da concentração de cada composto, sem alterar o formato do espectro. Dessa forma, aplicando esse procedimento para todos os espectros das quatro curvas de mosturação, obtemos o conjunto de dados apresentado na figura 39.

Figura 39 - Espectros de absorção das amostras de mosto da etapa de mosturação após a normalização através da divisão da área da banda de absorção da água.

Dessa forma, obtemos ao todo 53 espectros, referente as 53 amostras, com distintas concentrações de dextrinas, maltotriose, maltose e glicose, e sendo assim podemos prosseguir com o processamento desses dados com o próximo passo, a seleção dos grupos de treinamento e validação para conseguinte redução do número de variáveis com a técnica de análise de componentes principais.

Para avaliar a eficiência do método de análise, o banco de dados foi dividido em um grupo de treinamento e outro grupo de validação. Usualmente utiliza-se em torno de 75% dos dados para realizar o treinamento, gerando um modelo matemático, e os 25% restantes para validar o método. Decidimos utilizar os dados das curvas de mosturação A, B e D pra realizar o treinamento e a curva C para validar. Dessa maneira estamos utilizando na validação um conjunto de amostras totalmente independente das amostras de treinamento, uma vez que foram obtidas de mosturações distintas, com tempos e rampas de temperatura distintas e, portanto concentrações distintas de açúcares. Sendo assim, foram utilizadas 39 amostras na etapa de treinamento e 14 amostras na etapa de validação.

A curva C foi escolhida para a etapa de validação em detrimento das demais pelo simples fato de que, na etapa seguinte, quando for aplicada a rede neural artificial, umas das condições necessárias é o fato de que o grupo de validação deve conter valores que estejam dentro dos limites inferiores e superiores determinados pelo grupo de treinamento. Sendo assim, devemos selecionar para o grupo de validação amostras que contenham para cada um dos carboidratos e de etanol, concentrações que sejam maiores do que a menor concentração utilizada no grupo de treinamento e que ao mesmo tempo também sejam inferiores a maior concentração deste mesmo grupo. A curva de sacarificação C obedece esse requisito, e portanto, foi selecionada para ser separada para a etapa de validação.

Para a realização do passo seguinte, que é realizar o treinamento, gerando um modelo capaz de descrever as variações espectrais optamos por realizar a redução no número de variáveis através da aplicação do PCA. Conforme descrito anteriormente na secção teórica sobre a análise de componentes principais, o resultado fornecido por este tipo de análise está intrinsecamente correlacionado com a forma como é realizado o autoescalonamento da matriz de dados. Realizamos um primeiro autoescalonamento tradicional, utilizando a equação(9), onde as variáveis são centradas em seus valores médios e divididas pelo valor do desvio padrão. Uma segunda forma de autoescalonamento utilizada, muito semelhante à primeira, é obtida através da centralização das variáveis em torno de seus valores médios sem fazer a divisão pelo desvio padrão.

Uma terceira análise que realizamos trata-se da inserção de um procedimento de normalização nas mesmas duas citadas acima. A diferença se deve ao fato de

que os espectros foram previamente normalizados entre 0 e 1 antes de passarem pelo autoescalamento.

Além disso, também propomos uma análise onde aplicamos os métodos descritos anteriormente nas derivadas das curvas dos espectros. A primeira derivada de um espectro pode ser definida como a taxa de variação da absorção espectral em função do comprimento de onda. Desta forma, a curva derivada torna mais evidente os pontos em que a curva espectral apresenta uma inflexão de comportamento devido à presença de componentes que favorecem a absorção da luz.

Afim de melhor visualizar as formas de análise propostas, construímos a tabela 8 abaixo com o nome e uma breve descrição de cada método.

Tabela 8 - Descrição dos métodos de análise utilizados para o cálculo das componentes principais.

Método	Descrição
PCA Tradicional	Matriz de dados formada pelos espectros, com variáveis centradas na média e divididas pelo desvio padrão.
PCA Tradicional Sem Desvio Padrão	Matriz de dados formada pelos espectros, com variáveis centradas na média.
Derivada	Matriz de dados formada pela derivada dos espectros, com variáveis centradas na média e divididas pelo desvio padrão.
Derivada Sem Desvio Padrão	Matriz de dados formada pela derivada dos espectros, com variáveis centradas na média.
PCA Trad. c/ Norm. 0-1	Matriz de dados formada pelos espectros, normalizados entre 0 e 1, com variáveis centradas na média e divididas pelo desvio padrão.
PCA Trad. c/ Norm. 0-1 Sem Desvio Padrão	Matriz de dados formada pelos espectros, normalizados entre 0 e 1, com variáveis centradas na média.

O resultado da aplicação do PCA para cada um dos métodos de análise descritos acima está apresentado na figura 40, onde utilizamos apenas as duas

maiores componentes principais, a fim de ilustrar a transformação matemática realizada através deste tipo de análise.

Figura 40 - Apresentação das duas maiores componentes principais para os 6 métodos de análise das amostras coletadas na etapa de mosturação.

Apresentamos no primeiro gráfico, para o método de análise “PCA Tradicional”, o sentido da evolução temporal da mosturação para a primeira componente principal, sendo que o mesmo fato ocorre para os demais métodos de

análise. Isto é, há uma evolução temporal no sentido de menores valores para maiores valores de PC1 durante a mosturação. Esse fato não se repete para a segunda maior componente principal (PC2), uma vez que nesta direção os pontos apresentam um caráter variável. Contudo, através de simples observações dessas curvas não é trivial obtermos as informações quantitativas dos compostos de interesse. Apenas podemos afirmar que cada região desse espaço possui uma informação sobre as concentrações de carboidratos e que pelo conjunto de dados apresentados na figura 40 há um nítido padrão, isto é, uma tendência conforme a mosturação foi ocorrendo.

Além disso, sabemos que as informações contidas em cada componente é única e exclusiva, e que para este caso em específico, mesmo tendo uma elevada representatividade, ainda não podemos garantir que a informação referente a todos os compostos estejam contidas nestas 2 componentes. Com isso, se faz necessária uma maior investigação, utilizando-se um número maior ainda de componentes, o que torna o trabalho mais complexo.

O número de componentes necessárias para a análise de um conjunto de dados não é uma questão simples de ser respondida, principalmente devido ao fato de não sabermos em qual componente está a informação que se esta procurando. Quanto mais componentes inserirmos no processamento maior a probabilidade de abranger a informação de interesse, em contrapartida haverá um maior consumo computacional e, portanto maior tempo de processamento. Além disso, com a inclusão de mais componentes, podemos estar inserindo mais “ruídos” (informação desnecessária) ao conjunto de dados, o que acarretará em perda de precisão no método de análise.

Um dos métodos mais utilizados para se determinar um número inicial de componentes principais para se analisar é através de um gráfico do número de componentes em função da representatividade do sistema. Nesse tipo de curva, a representatividade cresce rapidamente com a inserção das primeiras componentes principais e passam a atingir um patamar de saturação com um aumento excessivo das mesmas, conforme mostrado na figura 41, obtida através da análise do método “PCA Tradicional Sem Desvio Padrão”.

Figura 41 - Dependência típica da representatividade dos dados em função do número de componentes principais utilizados.

Através do traçado das retas tangentes à essas duas regiões, a de crescimento e a de estabilização, representadas pelas retas vermelhas na figura 41, encontra-se através do ponto de intersecção das mesmas, o valor do número de componentes para o início da análise. Para este caso, o indicado seria o uso de 3 componentes, que contém aproximadamente 95% dos dados dos espectros.

Obviamente, se a informação de interesse, no caso os açúcares, possui uma contribuição significativa para a formação do perfil do espectro de absorção, então as chances dessa informação estar contida dentro desses 95% de dados são altas. Mas, isso não nos garante que o uso de apenas 3 componentes seja suficiente.

Com o intuito de encontrarmos uma forma de garantirmos uma boa eficiência computacional, com a melhor precisão possível, realizamos os processamentos seguintes variando-se o número de componente principais em torno desse número determinado pelo método acima. Em outras palavras, como o próximo passo é a aplicação de uma rede neural artificial, executamos a rede neural variando-se o número de entradas, que é o número de componentes principais entre 2 e 7. Para cada número de componentes principais a rede neural foi executada 3 vezes, de onde selecionamos apenas o resultado de menor erro quadrático médio entre o valor esperado e o valor da saída da rede. Dessa forma, podemos determinar o número de componentes capaz de fornecer o resultado mais preciso.

Utilizando o software Matlab® - The Mathworks, Inc. (EUA), construímos uma rede neural artificial do tipo *Perceptron Multicamadas*. A rede neural possui uma camada de entrada, uma camada oculta e uma camada de saída. Como a camada

de saída é apenas um combinador linear que, portanto utiliza como função de ativação uma equação de reta, o número de neurônios deve ser igual ao número de compostos que queremos determinar, isto é, o número de saídas da rede. Dessa forma, a camada de saída é composta de 4 neurônios para a situação onde analisamos os espectros de mosturação, um para cada tipo de açúcar (glicose, maltose, maltotriose e dextrinas). Já para a situação de análise das amostras coletadas durante a etapa de fermentação há um composto adicional, o etanol e, portanto nesse caso o número de neurônios da camada de saída deve ser igual a cinco.

Para a camada intermediária, a função de ativação utilizada, por ser mais apropriada é a função sigmoide (65). Dessa forma, tendo seus limites inferiores e superiores iguais a 0 e 1 respectivamente, a entrada da rede neural (que são as componentes principais determinadas anteriormente) foram normalizadas para esse intervalo. Queremos que haja uma convergência da rede neural, evitando que se utilize um número baixo demais de neurônios a ponto de perder precisão do método e também que se utilize um número alto demais a ponto de que a rede fique viciada e convirja em um ponto de mínimo local. Para isso a rede neural foi executada variando-se o número de neurônios da camada intermediária entre um valor considerado razoavelmente baixo e outro alto, sendo estabelecido então um intervalo entre 2 e 30 neurônios. Como foi mencionado anteriormente, para cada número de neurônios da camada intermediária a rede neural foi executada 3 vezes, sendo que o melhor resultado foi mantido e os demais excluídos.

Os demais parâmetros da rede neural artificial projetada são:

Taxa de aprendizagem = 0.001

Momentum = 0.9

Erro quadrático médio = 10^{-9}

Após ter sido concluída a etapa de treinamento, variando-se o número de componentes principais utilizados na entrada da rede neural e o número de neurônios utilizados na camada intermediária, todos os pesos w_1 e w_2 referentes à primeira e segunda camada de neurônios foram salvos e utilizados na etapa seguinte de validação. Nesta etapa a rede neural é executada somente no sentido “*feedforward*”, sem retro propagação de erro, utilizando os valores de w_1 e w_2 determinados no treinamento.

Para encontrar o número de neurônios que fornece maior precisão de previsão fazemos uma análise comparativa do valor obtido pela saída da rede neural na etapa de validação com o valor das concentrações de açúcares nas amostras determinadas por HPLC. Por exemplo, abaixo na figura 42 apresentamos o resultado obtido pelo método *PCA Tradicional Sem Desvio*, utilizando 3 componentes principais, onde os melhores resultados foram obtidos com 9, 10 e 11 neurônios, dentro da região destacada com o círculo preto. Neste caso em específico, para cada número de neurônios, após a rede neural ter sido treinada, utilizamos os parâmetros que foram encontrados (os pesos w_1 e w_2) e calculamos a quantidade de cada tipo de carboidrato para todas as amostras do grupo de validação (mosturação C). A seguir, para cada carboidrato, foi determinado o valor do erro quadrático médio com relação ao valor determinado pela técnica de HPLC. Esse valor do erro quadrático médio em função do número de neurônios pode ser visto na figura 42.

Figura 42 - Erro quadrático médio entre a saída da rede neural e a concentração real dos carboidratos em função do número de neurônios que constitui a rede.

O número de neurônios ideal é aquele para o qual o erro quadrático médio seja o menor possível para todos os compostos. Porém, nem sempre o mesmo número de neurônios fornece um ponto de mínimo erro para todos os compostos simultaneamente. Dessa forma, selecionamos como o melhor número de neurônios aqueles que fornecem valores de erro quadrático médio que não apresente valor discrepante para nenhum dos compostos e que na média de todos os compostos tenha um dos menores erros. Para esse caso acima, escolhemos o resultado obtido

para o uso de 11 neurônios. Em futuros trabalhos podemos aplicar técnicas computacionais mais avançadas para selecionar o número ideal de neurônios, como por exemplo, aplicação de regras com valores mínimos de erro, discrepância mínima entre o erro de todos os compostos, método do número de vizinhos próximos (*K-Nearest Neighbor - KNN*).

Vamos analisar melhor o quanto o valor fornecido pela rede neural está próximo do valor determinado pela técnica de HPLC através de um gráfico com todos os valores obtidos para o grupo de teste C. Na figura 43 abaixo, apresentamos a correlação de cada composto individualmente comparando as duas técnicas para esse mesmo exemplo.

Figura 43 - Correlação entre a concentração dos carboidratos analisados através da técnica de HPLC e absorção no infravermelho médio.

Para esse caso da figura 43 acima, encontramos os valores de coeficiente angular e desvio quadrático médio para cada tipo de açúcar apresentado na tabela 9 abaixo.

Tabela 9 - Valores de coeficiente angular e R^2 para os carboidratos analisados quando comparada a técnica de HPLC com a técnica de absorção no infravermelho médio.

Composto	Coef. Angular $\pm 0,05$	R^2
Dextrina	0.93	0.969
Maltotriose	1.17	0.981
Maltose	0.96	0.994
Glicose	0.91	0.943

O valor de R^2 nos passa a informação da correlação entre os pontos da curva, isto é, de o quão próximos estão o conjunto de dados da equação de reta que passa por esses dados. Se o valor de R^2 fosse exatamente 1 significaria que todos os pontos estão exatamente alinhados sobre a reta que passa pelo conjunto. Já o valor do coeficiente angular, para esse tipo de análise, nos diz respeito ao quanto eficiente é o método proposto em comparação com o método considerado “ouro”. Se o valor do coeficiente angular fosse exatamente 1 significaria que o valor previsto pela técnica proposta coincidiria exatamente com o valor determinado pela técnica de HPLC.

Esse procedimento descrito acima foi realizado para todos os métodos de análise, com o número de componentes variando entre 2 e 7 e o número de neurônios variando entre 2 e 30. Todos os resultados obtidos estão na tabela 10.

Além disso, também apresentamos o resultado obtido através de uma análise utilizando os espectros diretamente como entrada na rede neural artificial, sem utilizar a técnica de redução de variáveis com o PCA. Esse procedimento além de fornecer um resultado não tão satisfatório como os demais, resultou em um alto consumo de tempo de processamento da rede neural. Enquanto os métodos que utilizam o PCA e, portanto no máximo 7 valores de entradas na rede neural, consomem um tempo médio de 15 minutos para que haja a convergência da rede, o procedimento com a utilização dos espectros diretamente consumiu em torno de 2800 minutos.

Tabela 10 - Resultados com o número de componentes principais, número de neurônios da rede PMC de melhor desempenho para cada número de componente principal, coeficiente angular e R^2 para cada método de análise e carboidrato na etapa de mosturação.

			Dextrina		Maltotriose		Maltose		Glicose	
Método	N° Comp. Principais	N° Neurônios	Coef. Angular $\pm 0,05$	R^2	Coef. Angular $\pm 0,05$	R^2	Coef. Angular $\pm 0,05$	R^2	Coef. Angular $\pm 0,05$	R^2
PCA Tradicional	02	20	0.762	0.92334	0.97	0.92738	1.04	0.9723	1.29	0.89287
	03	11	*	*	*	*	1.05	0.95511	1.23	0.86323
	04	13	*	*	1.12	0.9246	1.06	0.94125	1.28	0.77117
	05	19	0.83	0.80407	*	*	1.03	0.94018	1.26	0.86581
	06	19	0.70	0.8074	0.94	0.91021	1.02	0.9288	*	*
PCA Tradicional Sem Desvio Padrão	02	04	0.81	0.90909	0.96	0.90582	1.03	0.97845	1.03	0.85565
	03	08	0.91	0.93675	1.16	0.98307	0.97	0.98748	0.93	0.9519
	04	11	0.93	0.969	1.17	0.9813	0.96	0.99387	0.91	0.94334
	05	15	0.98	0.86304	1.28	0.93902	0.96	0.99394	1.02	0.98264
	06	11	0.90	0.98553	1.11	0.96295	0.98	0.98598	0.96	0.85645
Derivada	02	07	0.95	0.97578	1.14	0.95538	0.99	0.97045	0.98	0.9772
	02	21	0.95	0.96684	0.93	0.93162	1.00	0.9978	1.11	0.96462
	03	15	0.95	0.94499	0.94	0.93471	1.01	0.98022	1.01	0.93696
	04	8	0.94	0.97066	1.08	0.83218	0.97	0.9756	0.91	0.90759
	05	18	0.97	0.96178	1.17	0.87289	0.99	0.98954	0.90	0.90109
Derivada Sem Desvio Padrão	06	10	0.97	0.97083	1.20	0.9296	1.02	0.98244	0.94	0.91155
	07	29	0.91	0.906	*	*	0.96	0.9792	0.98	0.94152
	02	07	0.93	0.97976	*	*	0.99	0.97887	1.03	0.93517
	03	06	0.93	0.98342	1.16	0.91946	0.97	0.99192	1.04	0.95938
	04	08	0.91	0.98007	1.16	0.97775	0.99	0.99191	1.05	0.94898
PCA Trad. c/ Norm. 0-1	05	15	0.89	0.97552	1.16	0.96153	0.99	0.98803	0.95	0.94048
	06	18	0.95	0.98507	1.18	0.96727	0.97	0.99421	1.08	0.95907
	07	13	0.97	0.94937	1.19	0.96846	1.00	0.98699	1.09	0.94887
	02	14	*	*	*	*	1.04	0.95438	1.24	0.89236
	03	07	*	*	*	*	0.95	0.95552	1.15	0.91291
PCA Trad. 0-1 Sem Desvio Pad.	04	16	1.07	0.91549	1.33	0.95928	1.01	0.97214	0.95	0.94884
	05	10	1.01	0.94243	1.30	0.95605	1.06	0.95102	1.09	0.95308
	06	09	*	*	*	*	1.16	0.94901	1.37	0.92203
	07	07	0.93	0.95584	*	*	1.01	0.92246	1.30	0.86052
	02	21	*	*	*	*	1.05	0.96223	1.32	0.9268
Espectros Direto	03	22	*	*	*	*	1.08	0.93488	1.29	0.86823
	04	18	*	*	*	*	0.96	0.96338	1.06	0.9605
	05	21	0.91	0.95984	*	*	0.96	0.95816	1.02	0.95103
Espectros Direto	-	-	*	*	*	*	1.05	0.94938	1.29	0.85269

* Casos em que o gráfico não apresenta um comportamento linear.

Do conjunto de resultados obtidos, selecionamos os métodos de análise com melhores valores de coeficiente angular e R^2 para cada composto individualmente. Utilizando esses métodos de análise comparamos na tabela 11 abaixo a quantidade de cada composto determinada através da técnica de espectroscopia no infravermelho médio com a técnica de HPLC para o grupo de validação, isto é, a curva de mosturação C.

Tabela 11 - Concentração de cada carboidrato analisado para a curva de validação da mosturação, obtido pela técnica de HPLC e pela técnica de absorção no infravermelho médio.

Dextrinas (%)		Maltotriose (%)		Maltose (%)		Glicose (%)	
Infravermelho	HPLC	Infravermelho	HPLC	Infravermelho	HPLC	Infravermelho	HPLC
0.95	0.38	0.27	0.35	0.45	0.71	0.59	0.42
0.36	0.44	0.32	0.27	1.49	1.47	1.10	0.93
0.35	0.54	0.32	0.31	2.08	1.91	1.29	1.13
0.23	1.10	0.41	0.41	3.49	2.85	1.51	1.32
0.90	1.20	0.85	0.68	6.45	5.97	2.10	1.81
0.72	0.73	0.63	0.78	6.85	7.04	2.32	2.05
1.10	0.80	0.69	0.85	7.26	7.76	2.26	2.18
2.01	2.45	1.61	1.25	8.24	8.34	2.35	2.18
2.89	3.06	1.57	1.60	8.35	8.36	2.36	2.21
3.01	3.27	2.05	1.76	8.44	8.46	2.29	2.24
3.18	3.32	2.12	1.90	8.37	8.40	2.25	2.20
3.2	3.38	2.16	2.00	8.55	8.46	2.27	2.20
3.67	3.87	2.19	2.46	8.17	7.69	2.12	1.88
3.86	4.06	2.17	2.53	8.21	7.88	2.08	1.94

Observando esses resultados, temos um erro médio de previsão da ordem de 0.28% para dextrinas, 0.17% para a maltotriose, 0.24% para a maltose e 0.16% para a glicose.

Na figura 44, fazemos uma comparação da curva de mosturação através de um monitoramento pela técnica de HPLC e pela técnica de absorção com o FTIR.

Figura 44 - Curva de mosturação com a concentração de cada carboidrato analisado, determinado pelas técnicas de HPLC e absorção no infravermelho médio.

Através da análise da figura 44 acima, podemos observar que há uma boa correspondência entre os valores medidos através da técnica de HPLC e por FTIR. Os resultados obtidos pela técnica de absorção no infravermelho médio não apresentam precisão o suficiente para substituir a técnica de cromatografia líquida, quando analisamos os valores do erro quadrático médio das curvas de calibração da figura 34 com precisão na quarta casa decimal. Porém, os valores obtidos pela técnica de espectroscopia possuem um erro suficientemente pequeno para poder ser aplicado no caso da produção de cerveja. Variações que ocorrem dentro dos valores de erro médio obtidos não resultarão em alteração significativa no processo de produção e nas sensações organolépticas detectáveis.

Há situações em que se observa um padrão não linear na comparação dos resultados obtidos pela técnica de absorção e pela técnica de HPLC, como é mostrado na figura 45 quando se realiza um processamento com o *PCA Tradicional*, com três componentes principais no cálculo da concentração da maltotriose.

Figura 45 - Correlação não linear entre a quantificação da maltotriose pela técnica de HPLC e a técnica de absorção no infravermelho médio.

Analizando a figura 45 acima, vemos que para valores elevados de maltotriose, praticamente não há uma correspondência unívoca entre o valor determinado pela técnica de absorbância e a técnica de HPLC. Nesse ponto, relembando que o resultado final provém do valor da saída da rede neural, fica evidente que o problema é causado pelo fato de a rede neural não conseguir distinguir com precisão as amostras com elevada quantidade de maltotriose. Em outras palavras, os hiperplanos traçados por este tipo de rede neural não foram suficientes para prover regiões de classificação entre essas amostras.

Uma possível solução para esse tipo de problema seria aumentar a complexidade da rede neural e inserir mais camadas intermediárias, capazes de inserir sub-hiperplanos no conjunto de dados com maior delimitação das regiões e, portanto, maior caracterização das mesmas.

6.5 Quantificação de carboidratos e etanol na etapa de fermentação por HPLC

Para a etapa de fermentação realizamos a produção de 5 conjuntos de amostras de mosto tipo Pilsen, obtidos a partir das curvas de mosturação A, B, C e

D, além de uma adicional E. Dessa forma, seguindo o mesmo princípio anterior, contamos com amostras de diversificadas concentrações de cada composto. A fermentação desse mosto foi realizada através de uma fermentação do tipo lager, utilizando-se a levedura tipo W34/70, com temperatura constante em 12°C, controlada por um equipamento que fixa uma histerese de 0.5°C. Durante a fermentação foram coletadas amostras em intervalos de tempo aleatórios.

As amostras também foram analisadas pela técnica de HPLC, onde encontramos as concentrações de cada um dos açúcares (dextrinas, maltotriose, maltose e glicose) além do etanol. Esses valores estão apresentados nos gráficos da figura 46.

Figura 46 - Curvas de fermentação, com a concentração dos carboidratos e etanol analisados, determinados por HPLC.

Através de uma análise dos resultados acima, podemos observar que possuímos um conjunto de amostras com concentrações de carboidratos e etanol diversificados. Isso é devido principalmente ao fato de que as concentrações iniciais dos carboidratos são variadas, conforme explanado na seção anterior, com a utilização de diferentes temperaturas e tempos de repouso. Dessa forma, foi possível obter um conjunto de 37 amostras de mosto durante a fermentação com

varias concentrações de carboidratos e etanol, que a partir dessa análise de HPLC são conhecidas e podem ser utilizadas para treinar e validar o novo método de análise proposto.

6.6 Quantificação de carboidratos e etanol na etapa de fermentação por FTIR

Para esse mesmo conjunto de amostras foram realizadas as medidas de absorção na região do infravermelho médio utilizando-se o mesmo apararato com a janela de ZnSe descrito na etapa de mosturação. Todos os parâmetros como abertura do detector, resolução e número de medidas por amostra foram mantidos os mesmos. Na figura 47 são apresentados esses espectros de absorção em função do tempo de fermentação já com as normalizações de divisão do espectro pela área da banda de absorção da água entre 1500cm^{-1} e 1870cm^{-1} e a remoção da linha de base.

Figura 47 - Espectros de absorção no infravermelho médio para as amostras de mosto da etapa de fermentação.

É interessante notar nos resultados espectrais da figura 47, que durante a fermentação, os picos característicos da maltose em torno de 1037cm^{-1} e 1077cm^{-1} vão se deslocando e tornando-se cada vez mais próximos dos picos do etanol em 1052cm^{-1} e 1090cm^{-1} , conforme já era esperado. Além disso, também podemos observar a presença do pico em 1151cm^{-1} no espectro do mosto fermentado, referente a presença de dextrinas, conforme foi discutido na apresentação das medidas prévias e baseado na literatura (44). Também identificamos durante a

fermentação a sobreposição dos picos das dextrinas e do etanol na região entre 1010cm^{-1} e 1031cm^{-1} .

No total foram coletadas 37 amostras de 5 curvas de sacarificação distintas. Desse conjunto, as 9 amostras referentes à curva de fermentação E foram separadas das demais durante a etapa de treinamento da rede neural, afim de serem utilizadas na etapa seguinte de validação.

Utilizamos os mesmos métodos de análise e construção das matrizes de correlação descritas para a etapa de mosturação. Apresentamos abaixo, na figura 48 as duas maiores componentes principais para cada um dos métodos utilizados.

Figura 48 - Apresentação das duas maiores componentes principais para os 6 métodos de análise das amostras coletadas na etapa de fermentação.

Conforme ilustrado na figura 48, para o método de análise “PCA Tradicional”, durante a evolução da fermentação as amostras apresentam um padrão de deslocamento de valores menores de PC1 para valores maiores. O mesmo ocorre

para todos os outros métodos de análise. Analogamente ao observado na etapa de mosturação, na direção da segunda maior componente principal (PC2), não é observado um padrão tão obvio, sendo que os valores oscilam em função do tempo de fermentação.

Da mesma maneira como foi realizado o processamento dos dados da etapa de mosturação, com o intuito de encontrarmos uma forma de garantir uma boa eficiência computacional, com a melhor precisão possível, realizamos os processamentos variando-se o número de componente principais entre 2 e 7. Para cada número de componentes principais a rede neural foi executada 3 vezes, de onde selecionamos apenas o resultado de menor erro quadrático médio entre o valor esperado e o valor da saída da rede. Variamos o número de neurônios da camada intermediária entre 2 e 50 e os demais parâmetros da rede neural foram mantidos os mesmos. Dessa forma, encontramos os valores de coeficiente angular e R^2 entre os valores determinados pela técnica de HPLC e por absorção no infravermelho médio para o grupo de validação composto pelos pontos da curva de fermentação E. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 12.

Tabela 12 - Resultados com o número de componentes principais, número de neurônios da rede PMC de melhor desempenho para cada numero de componente principal, coeficiente angular e R^2 para cada método de análise e carboidrato na etapa de fermentação.

			Etanol		Maltotriose		Maltose	
Método	N° Comp. Principais	N° Neurônios	Coef. Angular ± 0.05	R^2	Coef. Angular ± 0.05	R^2	Coef. Angular ± 0.05	R^2
PCA Tradicional	02	05	0.90	0.99393	0.80	0.94378	0.93	0.97295
	03	11	1.04	0.83464	1.07	0.99748	1.17	0.97586
	04	15	1.07	0.97655	0.87	0.99226	1.03	0.98356
	05	16	0.98	0.98053	0.89	0.9561	0.91	0.97277
	06	09	0.90	0.99393	0.80	0.94378	0.93	0.97295
PCA Tradicional Sem Desvio Padrão	02	09	0.99	0.99485	1.07	0.96036	1.11	0.98458
	03	09	1.01	0.99537	0.91	0.99512	0.97	0.99691
	04	20	1.28	0.99225	0.99	0.99849	1.10	0.99668
	05	22	1.29	0.95582	0.99	0.99874	1.16	0.99651
	06	12	0.98	0.98032	0.98	0.99255	1.02	0.99539
Derivada	02	24	0.95	0.98224	1.07	0.96729	1.09	0.99563
	03	22	1.10	0.97033	1.44	0.91577	1.37	0.9474
	04	06	0.98	0.99137	1.00	0.99038	1.03	0.99891
	05	12	1.12	0.97968	0.96	0.97705	1.08	0.9911
	06	13	0.89	0.9539	0.94	0.95694	0.99	0.95678
Derivada Sem Desvio Padrão	02	13	0.98	0.98492	1.02	0.97698	1.11	0.98583
	03	11	0.89	0.99634	1.02	0.99002	1.06	0.99668
	04	16	0.91	0.98921	1.02	0.99255	1.05	0.99745
	05	21	1.28	0.98356	0.97	0.99421	1.11	0.99824
	06	19	1.16	0.98867	0.88	0.98704	1.03	0.995
PCA Trad. c/ Norm. 0-1	02	18	1.06	0.99263	0.92	0.95525	1.03	0.97917
	03	10	0.93	0.99344	0.89	0.99488	0.97	0.99773
	04	14	0.90	0.99384	0.88	0.99299	0.93	0.99324
	05	28	1.35	0.96521	1.03	0.95726	1.19	0.9673
	06	15	0.96	0.95769	0.89	0.95596	1.02	0.98046
PCA Trad. c/ Norm. 0-1 Sem Desvio Pad	02	08	1.03	0.99365	0.95	0.99481	1.04	0.99744
	03	21	1.03	0.96989	1.16	0.96893	1.17	0.9772
	04	09	0.99	0.99366	1.02	0.99237	1.07	0.99817
	05	25	0.87	0.99309	0.98	0.99484	0.97	0.99693
	06	15	1.07	0.98574	0.95	0.98452	1.03	0.99217

Para o caso das dextrinas, sendo um açúcar não fermentável, sua quantidade permanece constante durante a fermentação e, portanto, não faz sentido querermos realizar a mesma análise proposta para os demais compostos.

No caso da glicose, sua concentração varia rapidamente de um valor inicial de 1,050% para 0.007% determinado por HPLC, para a curva de fermentação E, sendo que a maior parte dos pontos encontra-se em torno dos valores mais baixos, conforme mostra a figura 49.

Figura 49 - Correlação entre a concentração de glicose determinada por HPLC e por absorção no infravermelho médio.

Dessa forma, tanto para as dextrinas quanto para a glicose, comparamos o valor determinado pela técnica de HPLC e o valor obtido pela técnica de absorção proposta neste trabalho, de forma individual para cada amostra da curva de fermentação E. A partir de então, calculamos o valor médio da diferença entre as concentrações, expressos na tabela 13, a fim de analisar a precisão do resultado e comparar os métodos de análise.

Tabela 13 - Resultados com o número de componentes principais, número de neurônios da rede PMC de melhor desempenho para cada numero de componente principal, para cada método de análise e o erro médio na determinação da concentração da glicose e dextrinas na etapa de fermentação.

			Dextrina	Glicose
Método	N° Comp. Principais	N° Neurônios	Erro Médio (%)	Erro Médio (%)
PCA Tradicional	02	05	0.1	0.1
	03	11	0.3	0.2
	04	15	0.4	0.2
	05	16	0.5	0.2
	06	09	0.4	0.2
PCA Tradicional Sem Desvio Padrão	02	09	0.4	0.07
	03	09	0.4	0.09
	04	20	0.2	0.09
	05	22	0.3	0.08
	06	12	0.3	0.09
Derivada	02	24	0.3	0.08
	03	22	0.3	0.1
	04	06	0.3	0.08
	05	12	0.2	0.08
	06	13	0.2	0.09
Derivada Sem Desvio Padrão	02	13	0.2	0.09
	03	11	0.3	0.07
	04	16	0.2	0.1
	05	21	0.3	0.06
	06	19	0.3	0.1
PCA Trad. c/ Norm. 0-1	02	18	0.3	0.1
	03	10	0.2	0.1
	04	14	0.2	0.1
	05	28	0.3	0.1
	06	15	0.1	0.2
PCA Trad. c/ Norm. 0-1 Sem Desvio Pad	02	08	0.3	0.1
	03	21	0.3	0.07
	04	09	0.3	0.03
	05	25	0.2	0.08
	06	15	0.4	0.07

Do conjunto de resultados obtidos, selecionamos os métodos de análise com melhores valores de coeficiente angular e R^2 para cada composto individualmente no caso da maltose, maltotriose e etanol. Para as dextrinas e a glicose selecionamos os métodos de análise referentes ao menor erro médio entre as técnicas. Utilizando esses métodos de análise comparamos na tabela 14 a quantidade de cada composto determinada através da técnica de espectroscopia no infravermelho médio com a técnica de HPLC para o grupo de validação, isto é, a curva de fermentação E.

Tabela 14 - Concentração de cada carboidrato e etanol analisado para a curva de validação da fermentação, obtido pela técnica de HPLC e pela técnica de absorção no infravermelho médio.

Dextrinas		Maltotriose		Maltose		Glicose		Etanol	
FTIR	HPLC	FTIR	HPLC	FTIR	HPLC	FTIR	HPLC	FTIR	HPLC
3.46	3.41	1.59	1.49	5.06	5.52	1.03	1.05	0.00	0.24
3.41	3.42	1.47	1.44	5.19	5.35	0.67	0.68	0.27	0.57
3.07	3.08	1.21	1.25	4.48	4.62	0.33	0.19	0.74	0.90
3.24	3.35	0.92	0.97	2.99	3.21	0.07	0.028	1.74	2.23
3.07	3.28	0.57	0.59	1.58	1.68	0.00	0.012	2.83	3.15
3.17	3.19	0.39	0.40	0.69	0.90	0.00	0.011	3.29	3.53
2.90	3.23	0.23	0.19	0.08	0.22	0.00	0.003	3.57	3.86
3.09	3.29	0.22	0.16	0.00	0.19	0.00	0.006	3.82	4.07
3.07	3.31	0.19	0.13	0.00	0.20	0.00	0.007	3.77	4.22

Observando esses resultados, temos um erro médio de previsão da ordem de 0.1% para as dextrinas, 0.05% para a maltotriose, 0.20% para a maltose, 0.03% para a glicose e 0,30% para o etanol.

Na figura 50, fazemos uma comparação da curva de fermentação através de um monitoramento pela técnica de HPLC e pela técnica de absorção com o FTIR.

Figura 50 - Curva de fermentação com a concentração de cada carboidrato e etanol analisados, determinado pelas técnicas de HPLC e absorção no infravermelho médio.

Os resultados apresentados acima são muito satisfatórios quando comparados com a literatura, conforme apresentado posteriormente. Para alguns compostos como, por exemplo, no caso da glicose, há uma correspondência muito próxima. Em outros casos como, por exemplo, o etanol, há uma discrepância em torno de 0,3%, que dependendo da aplicação pode ser considerada não tão satisfatória.

Para a etapa de mosturação e fermentação, foram utilizadas 39 e 28 amostras, respectivamente, para o a fase de treinamento. Sendo o sistema de análise neural um método totalmente baseado em comparação com um banco de dados previamente conhecido, essa quantidade de amostras pode não ser o suficiente para gerar um modelo computacional satisfatório. Com a inserção de um número maior de amostras a rede neural pode ser aperfeiçoada, de forma a fornecer resultados mais precisos.

Conforme mencionado na apresentação dos resultados da etapa de mosturação, é possível que ao adicionar mais camadas neurais nessa rede neural possamos obter uma convergência mais satisfatória dos métodos de análise. Contudo, como estamos interessados em realizar uma prova de conceito, analisando a viabilidade da aplicação das técnicas de espectroscopia no infravermelho médio, análise de componentes principais e redes neurais artificiais aplicadas em conjunto, vamos nos manter em uma análise mais simples. Este tipo de análise mais aprofundada poderá ser realizado em trabalhos futuros.

Devemos ressaltar que todas as análises foram realizadas com amostras que foram previamente centrifugadas e filtradas em um filtro de 0.22 μ m. Como o objetivo deste estudo é avaliar a possibilidade de quantificação dos carboidratos individualmente e o etanol simultaneamente, não focamos exageradamente em questões técnicas de implementação industrial. Embora esse tipo de pré-processamento das amostras não sejam de grande dificuldade técnica para as futuras construções de equipamentos de uso cotidiano, a finalidade deste procedimento é evitar possíveis entupimentos da janela óptica de ZnSe. Dependendo das possíveis construções dos futuros equipamentos baseados nesta técnica esse procedimento pode até ser feito de forma mais prática ou até mesmo ser totalmente removido.

6.7 Discussão com resultados de outras técnicas

Com o intuito de comparar os resultados obtidos com as análises feitas no mosto cervejeiro apresentamos alguns resultados encontrados na literatura para quantificação de carboidratos e etanol. Preferencialmente optamos por trabalhos que contenham pelo menos um tipo de carboidrato em comum com as amostras de mosto cervejeiro. Comparamos tanto análises em outros tipos de amostras que também utilizam como base de medida a absorção no infravermelho médio com a técnica de FTIR quanto outras análises realizadas com outras técnicas, como por exemplo cromatografia gasosa e líquida.

No trabalho apresentado por Costa Filho (37), ele prepara 64 soluções aquosas de maltose, glicose e frutose para realizar medidas de absorção com FTIR e posterior aplicação de algoritmos genéticos para seleção de variáveis e quantificação de carboidratos. As misturas contém glicose entre 21,99 e 28,28g/L, maltose entre 15,99 e 28,30g/L e frutose entre 9,97 e 16,30g/L. Os melhores resultados obtidos pelo autor fornecem um erro de 0,90g/L para a maltose, 1,08g/L para a glicose e 0,58g/L para a frutose. Sendo que 1g/L corresponde a 0,1%, podemos comparar esses resultados com os obtidos pelo trabalho proposto neste estudo. Contudo, há uma diferença muito significativa entre os dois experimentos. No caso do trabalho realizado por Costa Filho não há nenhum interferente, pois as amostras foram preparadas com água e açúcares. Dessa forma, os espectros obtidos possuem apenas informações referentes aos açúcares, o que não ocorre com as amostras de mosto.

Inicialmente, antes de realizarmos as medidas diretamente no mosto cervejeiro, também realizamos um ensaio com soluções aquosas de maltose e etanol. Preparamos amostras de maltose que variavam entre 0 e 15%, amostras com etanol entre 0 e 10% e amostras com maltose e etanol simultaneamente, com maltose entre 3 e 12% e etanol entre 2 e 8%. Realizamos as medidas dos espectros de absorção e a seguir aplicamos a análise de componentes principais. O resultado obtido está apresentado na figura 51 abaixo, onde os pontos em preto representam as amostras exclusivamente com maltose, os pontos vermelhos são as amostras com etanol e os pontos azuis são as amostras mistas.

Figura 51 - Apresentação das duas maiores componentes principais para espectros de absorção por FTIR de amostras de maltose e etanol em solução aquosa.

Podemos observar que na análise com as duas maiores componentes principais há a formação de um novo plano ordenado formado pelas concentrações de cada composto. Dessa forma, apenas com os valores dos pares ordenados (PC1,PC2) é possível determinar a concentração da maltose e do etanol. Porém, esse experimento foi realizado apenas com o intuito de observarmos a capacidade de distinguir e quantificar a maltose e o etanol em um meio simples, o aquoso. Como era esperado, as aplicações em situações e amostras reais requerem a convivência com interferentes, e geralmente o modelo mais simples não é capaz de funcionar satisfatoriamente. Portanto decidimos prosseguir os estudos com a análise de amostras de mosto cervejeiro, que estaria mais próximo da aplicação em si.

Uma técnica encontrada na literatura para quantificação de etanol com precisão é a cromatografia gasosa. Um dos trabalhos mais recente encontrado foi publicado por Hailong Li (3). Neste trabalho, uma amostra líquida de aproximadamente 50µl é evaporada ocupando um volume de 20ml e então analisada. Segundo o autor, esta técnica consome um tempo de análise de aproximadamente 3 minutos para equilibrar o sistema e aproximadamente mais 1 minuto de execução da leitura. As medidas foram realizadas com amostras contendo entre 0,25% e 1,25% de etanol, sendo que o desvio padrão entre os valores reais e os valores determinados pela técnica é da ordem de 1,6%. Embora esta técnica

necessite de alguns minutos de análise não há dúvidas de que possui um nível de precisão elevado.

Uma das aplicações das técnicas de quantificação de carboidratos é identificar adulteração em alimentos. Com esse objetivo, Sivakesava (53) apresenta um estudo da composição dos açúcares presentes no mel através da técnica de absorção no infravermelho com FTIR, porém seu processamento matemático se diferencia do apresentado neste atual trabalho por ser realizado com a utilização de *Partial Least Square* (PLS) e *Regressão de Componentes Principais* (PCR). As amostras de mel analisadas possuem em sua composição em torno de 38% de frutose, 31% de glicose, 1% de sacarose e 7% de maltose. Os melhores resultados obtidos forneceram um valor de coeficiente de correlação (R^2) de 0,862 para a glicose, de 0,946 para a frutose e 0,919 para a sacarose. Comparando os valores determinados pela técnica apresentada por Sivakesava com os valores reais das quantidades dos carboidratos em questão, para um grupo de validação, é encontrado um erro padrão de 1,687% para a glicose, 0,942 para a frutose e 1,443 para a sacarose. Neste caso, o açúcar em comum com a análise do mosto cervejeiro é a glicose. Em nossas medidas, temos que a glicose varia entre 0,5% e 2,3%, cujo coeficiente de correlação entre o valor real e o valor determinado é de $R^2=0,982$ para a etapa de mosturação, com um erro padrão de 0,2%. Sivakesava publicou outro trabalho (53) no qual aplica o mesmo estudo de absorção com FTIR e tratamento dos dados com PLS, porém, utiliza como amostras meio de cultura inoculado com *Saccharomyces cerevisiae*. Nesta análise, ele obtém um coeficiente de correlação de 0,980 para a determinação da glicose e 0,992 para o etanol. O valor do erro padrão para esse caso é de 0,1745% para a glicose e 0,1284% para o etanol.

Em outro trabalho, também baseado em análises de absorbância com FTIR, Evgeny Polshin (1) utiliza amostras de cervejas comerciais de vários estilos com o intuito de analisar a classificação das cervejas. Aplicando a análise de componentes principais ele consegue uma classificação onde os principais fatores que influenciam na seleção são a concentração de etanol e o valor do extrato real. Com a utilização da técnica de processamento PLS, o autor consegue excelentes resultados de quantificação do etanol, sendo o coeficiente angular entre os valores reais e os valores determinados apresenta o valor de 0,99, com um desvio padrão de 0,95. Esses resultados estão em boa concordância e proximidade com os resultados que

obtemos neste trabalho, apresentando apenas uma pequena melhora no valor do desvio padrão dos resultados. Porém, vale a pena ressaltar mais uma vez, que neste caso apresentado por Polshin, a análise é realizada com amostras de cerveja já fermentadas e, portanto, com baixos índices de carboidratos.

Dentre as técnicas possíveis de serem aplicadas na indústria e na pesquisa, a que tem sido mais explorada e que chega a ser comercializada, é baseada em absorção óptica na região do infravermelho próximo (*Near Infrared* - NIR), o que envolve medidas de carboidratos e etanol na faixa espectral entre 1600nm e 1800nm. Segundo várias referências bibliográficas (24-29), os estudos envolvendo a quantificação de carboidratos e etanol, principalmente para aplicação em amostras de cerveja, apresenta um erro quadrático médio de 0,1% tanto para o valor do extrato real quanto para o etanol. Porém, algumas empresas que comercializam equipamentos baseados nesta técnica como, por exemplo, a Anton Paar (Österreich - Áustria), garante que seu equipamento, Alcohol Analyser®, apresenta uma precisão de 0,03% para o extrato real e 0,01% para o etanol.

A vantagem desta técnica baseada no NIR é o fato de não precisar de pré-tratamento das amostras analisadas. Porém, mesmo os equipamentos comerciais que utilizam este princípio ainda não realizam medições *on-line*, necessitam coletar a amostra e passar por um equipamento de leitura e processamento. Além disso, esses equipamentos apresentam um tempo de resposta de alguns minutos (~4 minutos). Aplicando-se uma combinação de NIR com correção de medida de índice de refração, Stefan Castritius (29) apresenta análises de calibração multivariada com amostras de cervejas já fermentadas comerciais, onde obtém resultados muito precisos de extrato real e álcool, com desvios padrões médios 0,03% e 0,01% respectivamente.

Encontramos ainda outro trabalho, publicado por S. Engelhard (68) demonstrando a viabilidade da aplicação da técnica de absorção no NIR para quantificar o etanol de amostras de cerveja. O autor utiliza amostras com soluções aquosas de etanol e maltose para realizar uma análise espectral, onde conclui que dois comprimentos de onda ótimos para a análise são 1692nm e 1719nm. A partir de uma correlação entre as intensidades nestes comprimentos de onda é feita uma curva de calibração. A validação é realizada com amostras de cerveja desde baixa graduação alcoólica (cervejas tipo light) até cervejas mais alcoólicas (cervejas tipo bock). Nesta análise, em uma comparação entre os valores determinados pela

técnica de NIR e o valor real, é encontrado um coeficiente angular de 0,9995. Esse resultado confere a técnica uma boa precisão e rapidez, contudo a análise é restrita somente a quantificação do etanol.

Um trabalho envolvendo uma técnica distinta é apresentado na forma de um *Review* por Sadecka (6), chamada de eletroforese capilar. A eletroforese é definida como o transporte, em solução eletrolítica, de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo elétrico. Quando o meio eletrolítico é inserido em um capilar conectando os eletrodos, é chamada de eletroforese capilar. Neste trabalho, Sadecka apresenta a possibilidade de detecção de vários compostos presentes em amostras de cerveja, dentre elas o etanol. Para a determinação deste tipo de álcool é apresentado o resultado cujos melhores resultados apresentam um desvio padrão entre 0,5% e 1,2%.

7 Conclusão

É importante observar, que as medidas realizadas neste trabalho envolvendo a quantificação dos açúcares totais e do etanol nos permite calcular uma série de outros parâmetros comumente utilizados na indústria. Um mosto típico de 12°Brix, possui aproximadamente entre 4% e 4,5% (68,69) de extrato real final, sendo que desse valor, 80% a 85% são carboidratos. Isto é, os carboidratos contidos no extrato final estão aproximadamente entre 3,2% e 3,8%. Sendo assim, ao somar a quantidade de todos os carboidratos analisados, glicose, maltose, maltotriose, dextrinas e etanol, podemos fornecer os valores de extrato inicial, extrato final real, extrato final aparente, grau de fermentabilidade e porcentagem alcoólica com uma precisão razoável.

A desvantagem da utilização da técnica de absorção com FTIR se deve ao fato de que atualmente os equipamentos desse tipo são relativamente caros. Porém, esses equipamentos são construídos para apresentar largas faixas espectrais de análise, geralmente entre 400cm^{-1} a 4000cm^{-1} . Foi determinado neste trabalho, que a região de maior interesse está entre 900cm^{-1} e 1200cm^{-1} , isto é, uma região relativamente estreita em relação a toda a capacidade de abrangência do equipamento. Dessa forma, há a possibilidade de em futuros trabalhos, haver o desenvolvimento de equipamentos específicos para a quantificação de açúcares e etanol, que operem em um regime espectral voltado exclusivamente para esta finalidade. Consequentemente seria possível gerar equipamentos menores e mais baratos.

Assim como qualquer outro procedimento, há a necessidade de realizar a calibração do sistema, o que requer um número considerável de amostras com concentrações de carboidratos e álcool conhecidas. Contudo, sendo uma técnica de rápida leitura e processamento, a maior dificuldade estaria resumida na obtenção das amostras previamente conhecidas.

Conforme proposto inicialmente, demonstramos que mesmo havendo sobreposição de bandas de absorção dos compostos de interesse, carboidratos e etanol, é possível determinar a concentração de cada tipo de açúcar individualmente

além do álcool com precisão suficiente para ser empregada em linhas de produção de cervejarias.

Embora o erro das medidas das concentrações da maioria dos compostos esteja muito próximo da literatura, é possível aperfeiçoar ainda mais o processamento através da construção de redes neurais artificiais mais complexas, inserindo mais camadas de neurônios capazes de traçar sub-hiperplanos de classificação.

Sendo a realização das medidas dos espectros de absorção um procedimento muito rápido, da ordem de segundos, e o processamento por análise de componentes principais combinado com redes neurais artificiais igualmente veloz, comprovamos através dos resultados apresentados que este conjunto de técnicas possuem grande potencial de serem aplicados em sistemas de medida *in-line*, seja em indústrias ou laboratórios de pesquisa.

Além da aplicação explorada neste trabalho, conforme mencionado inicialmente, esta técnica pode ser expandida para diversas outras aplicações e setores visando otimização de processos, como por exemplo, produção de vinhos, sucos, extratos e outros alimentos, indústria alcooleira, estudos em biocombustíveis, biomedicina.

8 Trabalhos Futuros

Através de uma análise mais minuciosa dos espectros de absorção e de métodos de análise de dados multivariados, podemos identificar individualmente, as regiões de maior influência para cada composto, principalmente na diferenciação de etanol, açúcares fermentáveis e açúcares não fermentáveis. Dessa forma, para cada elemento a ser quantificado seria feita uma análise isolada em regiões espectrais específicas, o que poderia gerar maior precisão no cálculo das concentrações, sendo que de certa forma, seria o equivalente a uma análise com ausência de agentes interferentes.

Conforme apresentado na literatura, é possível identificar na região espectral entre 2300cm^{-1} e 2400cm^{-1} a banda de absorção do gás carbônico (70), outro componente extremamente importante na composição da cerveja. Através da criação de sondas especiais que possam ser inseridas nos tanques de fermentação ou através de um circuito fechado de coleta de amostras dos fermentadores, seria possível expandir este trabalho para quantificar mais este composto numa mesma leitura amostral.

Análises com redes neurais artificiais mais complexas poderão ser realizadas com a finalidade de obter melhor convergência e resultados mais precisos na quantificação dos carboidratos e etanol.

Com o estudo minucioso dos tipos de detectores, fontes de luz, grades de difração, fibras ópticas presentes no mercado, podem fornecer condições de construção de dispositivos compactos e mais baratos do que um equipamento de FTIR capaz de fornecer resultados semelhantes aos obtidos neste estudo.

Referências

- 1 POLSHIN, E.;AERNOUTS, B.;SAEYS, W.;DELVAUX, F.;DELVAUX, F.R.;SAISON, D.;HERTOG, M.;NICOLAI, B.M. ; LAMMERTYN, J. Beer quality screening by FT-IR spectrometry: Impact of measurement strategies, data pre-processings ; variable selection algorithms. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 188-198,2011. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.05.003.

- 2 EGIDIO, V.D.;OLIVERI, P.;WOODCOCK, T. ; DOWNEY, G. Confirmation of br; identity in foods by near infrared transfectance spectroscopy using classification ; class-modelling chemometric techniques — The example of a Belgian beer. **Food Research International**, v. 44, p. 544-549,2011; DOI:10.1016/j.foodres.2010.11.021.

- 3 HAILONG, L.;XIN-SHENG, C.;YULIN, D.;HUAIYU, Z. ; SHIYU, F. Rapid determination of ethanol in fermentation liquor by full evaporation headspace gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 169-172, 2009.

- 4 SHARMA, K. Novel method for identification ; quantification of methanol ; ethanol in alcoholic beverages by gas chromatography- Fourier transform infrared spectroscopy ; horizontal attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of aoac International**, v. 92, p. 518-526, 2009.

- 5 GONCHAR, M.V.;MAIDAN, M.M.;PAVLISHKO, H.M. ; SIBIRNY, A.A. A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages **Food Technology Biotechnology**, v. 39, p. 37-42, 1330-9862, 2001.

- 6 SADECKA, J. ; POLONSKY, J. Electrophoretic methods in the analysis of beverages. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 243-279,2000. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00426-X.

- 7 RAMASAMI, P.;JHAUMEER-LAULLOO, S.;CADET, F.;RONDEAU, P. ; SOOPHUL, Y. Quantification of alcohol in beverages by density ; infrared spectroscopy methods. **International Journal of Food Sciences ; Nutrition**, v. 56, 3, p. 177-183, 2005.DOI: 10.1080/09637480500146713.

- 8 ZILIO, S.C. A simple method to measure critical angles for high-sensitivity differential refractometry. **Optics Express**, v. 20, 2, p. 1862-1867,2012. DOI: 10.1364/OE.20.001862.

- 9 CECIL, S. Fuel ethanol: fermentation analysis by HPLC. **Sigma Aldrich Report**, v. 26.3, p. 18-19, 2008 Manual técnico.

- 10 ALDRICH, S. Separation of organic ocids in beverages busing a SUPELCOGELTM C-610H HPLC Column. **Sigma Aldrich Aplicacion Note**, v. 21, p. 2, 1995. Manual técnico.

11 ALDRICH, S. Separation of carbohydrates ; fermentation products in beverages using HPLC. **Sigma Aldrich Application Note**, v. 20, p. 2, 1995. Manual técnico.

12 TAGLIARO, F.;DORIZZI, R. ; GHIELMI, S. Direct injection high-performance liquid chromatographic method with electrochemical detection for the determination of ethanol ; methanol in plasma using an alcohol oxidase reactor. **Journal of Chromatography B**, v. 566, p. 333-339,1991. DOI: 10.1016/0378-4347(91)80249-C.

13 VENTURINI, W.G. **Bebidas alcoólicas - ciência e tecnologia**. São Paulo:: Blucher, 2011. 461 p. ISBN: 978-85-212-0492-3.

14 **Sindicerv - mercado**. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br/mercado.php>>. Acesso em: 24/08/2012

15 BOULTON, C. ; QUAIN, D. **Brewing yeast & fermentation**. Oxford,London: Blackwell Science, 2001. 644 p. ISBN: 1405152680.

16 LEWIS, M.J. ; YOUNG, T.W. **Brewing**. 2nd. New York: Springer, 2001. 398 p. ISBN: 0306472740.

17 WHITE, C. ; ZAINASHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Boulder: Brewers Publications, 2010. 304 p. ISBN: 0937381969.

18 BAMFORTH, C.W. **Food, fermentation ; micro-organisms**. Oxford: Blackwell science, 2005. p. ISBN: 0632059877.

19 DANIELS, R. **Designing great beers**. Boulder: Brewers Publications, 2000. 390 p. ISBN: 0937381500.

20 FERGUS, G.P. ; GRAHAM, G.S. **H;book of brewing**. 2 ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p. ISBN: 082472657X.

21 PALMER, J.J. **How to brew**. 3rd. Boulder: Brewers Publications, 2006. 400 p. ISBN: 0937381888.

22 FIX, G. **Principles of brewing science**. 2. Boulder: Brewers Publications, 1999. 190 p. ISBN: 0937381748.

23 VENTURINI, W.G. **Tecnologia de cerveja**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 83 p. ISBN: 85-87632-28-0.

24 INON, F.A.;LLARIO, R.;GARRIGUES, S. ; GUARDIA, M.D.L. Development of a PLS based method for determination of the quality of beers by use of NIR spectral ranges ; sample-introduction considerations. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1549-1561,2005. DOI: 10.1007/s00216-005-3343-9.

25 INON, F.A.;GARRIGUES, S. ; GUARDIA, M.D.L. Combination of mid ; near-infrared spectroscopy for the determination of the quality properties of beers. **Analytical Chemistry Acta**, v. 571, p. 167-174,2006. DOI : 10.1016/j.aca.2006.04.070.

26 GALLIGNANI, M.;GARRIGUES, S. ; GUARDIA, M.D.L. Stopped-flow nearinfrared spectrometric determination of ethanol ; maltose in beers. **Analytical Chemistry Acta**, v. 296, p. 155-161,1994. DOI : 10.1016/0003-2670(94)80259-9.

27 GALLIGNANI, M.;GARRIGUES, S. ; GUARDIA, M.D.L. Direct determination of ethanol in all types of alcoholic beverages by near-infrared derivative spectrometry. **Analyst**, v. 118, p. 1167-1173,1993. DOI : 10.1039/an9931801167.

28 NORGAARD, L.;SAUDL, A.;WAGNER, J.;NIELSEN, J.P.;MUNCK, L. ; ENGELSEN, S. Interval partial least-squares regression (iPLS): a comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 54, p. 413-419,2000. DOI: 10.1366/0003702001949500.

29 CASTRITIUS, S.;KRON, A.;SCHAFER, T.;RADLE, M. ; HARMS, D. Determination of alcohol ; extract concentration in beer samples using a combined method of near-infrared (NIR) spectroscopy ; refractometry. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 58, p. 12634–12641,2010. DOI: 10.1021/jf1030604.

30 LACHENMEIER, D.W.;GODELMANN, R.;STEINER, M.;ANSAY, B.;WEIGEL, J. ; KRIEG, G. Rapid ; mobile determination of alcoholic strength in wine, beer ; spirits using a flow-through infrared sensor. **Chemistry Central Journal**, v. 4, n.5, 2010.

31 SOHRABV,I, S.;MOUSAVI, S.M.;RAZAVI, S.H. ; MORTAZAVIAN, A.M. Application of advanced instrumental techniques for analysis of physical ; physicochemical properties of beer: a review. **International Journal of Food Properties**, v. 13, p.744-759, 2010. DOI: : 10.1080/109429109028181456, 2010.

32 ENEVOLDSEN, B.S. ; SCHMIDT, F.J. Dextrins in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v.80, n.6, p.520-533,1974.

33 **Beer Judge Certification Program - BJCP**. Disponível em: <www.bjcp.org> Acesso em: 10/07/2012

34 HINENO, M. ; YOSHINAGA, H. Far infrared spectra of glucose ; saccharose. **Bulletin of the chemical society of Japan**, v. 43, p. 3308-3309, 1970.

35 GRIFFTHS, P.R. **Fourier transform infrared spectrometry**. EUA: John Wiley & Sons, 1986. 656 p. ISBN: 0471099023.

36 PARADKAR, M.M. ; IRUDAYARAJ, J. Determination of cholesterol in dairy products using infrared techniques: FTIR spectroscopy. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, p. 127-132,2002. DOI: 10.1046/j.1471-0307.2002.00044.x.

37 FILHO, P.A.D.C. ; POPPI, R.J. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio. Determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. **Química Nova**, v. 25, 1, p. 46-52,2002. DOI: 10.1590/S0100.

38 MAGGIO, R.M.;CERRETANI, L.;CHIAVARO, E.;KAUFMAN, T.S. ; BENDINI, A. A novel chemometric strategy for the estimation of extra virgin olive oil adulteration with edible oils. **Food Control**, v. 21, p. 890-895,2010. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.12.006.

39 SIVAKESAVA, S. ; IRUDAYARAJ, J. A Rapid Spectroscopic Technique for Determining Honey Adulteration with Corn Syrup. **Journal of Food Science**, v. 66, n.6, p. 787-792, 2001.

40 KOCA, N.;KOCAOGLU-VURMA, N.A.;HARPER, W.J. ; RODRIGUEZ-SAONA, L.E. Application of temperature-controlled attenuated total reflectance-mid-infrared (ATR-MIR) spectroscopy for rapid estimation of butter adulteration. **Food Chemistry**, v. 121, p. 778-782,2010.DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.12.083.

41 BELITZ, H.D.;GROSCH, W. ; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 4 ed. Berlin Heidelberg: Springer, 2009. ISBN: 354069935X.

42 SHERAZI, S.T.H.;ALI, M. ; MAHESAR, S.A. Application of Fourier-transform infrared (FT-IR) transmission spectroscopy for the estimation of roxithromycin in pharmaceutical formulations. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, p. 115-118, 2011. DOI: 10.1016/j.vibspec.2010.09.010.

43 BERRUETA, L.A.;ALONSO-SALCES, R.M. ; H'EBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 196-214, 2007. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.05.024.

44 DUARTE, I.;BARROS, A.;AALMEIDA, C.;SPRAUL, M. ; GIL, A.M. Multivariate analysis of NMR ; FTIR data as a potential tool for the quality control of beer. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 1031-1038,2004. DOI: 10.1021/jf030659z.

45 LLARIO, R.;INON, F.A.;GARRIGUES, S. ; GUARDIA, M. Determination of quality parameters of beers by the use of attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 69, p. 469-480, 2006. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.10.016.

46 SOCRATES, G. **Infrared and raman characteristic: group frequencies**. 3nd. ed. New York: J. Wiley, 2001. ISBN: 0471852988.

47 STUART, B.H. **Infrared spectroscopy: fundamentals ; applications**. New York: J. Wiley, 2004. ISBN: 0470854286.

48 ATKINS, P. ; PAULA, J.D. **Físico-Química**. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 2. 427 p. ISBN: 978-85-216-1601-6.

49 ZANELLA, R. **Cromatografia líquida de alta eficiência**. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/larp/media/aulahplc>>. Acesso em: 10/07/2012

50 NAKAMOTO, K. **Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds**. 5. New York: John Wiley & Sons, 1997. 387 p. ISBN: 0471163945.

51 TIPLER, P.A. ; LLEWELLYN, R.A. **Física moderna**. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2010. ISBN: 9788521617686.

52 **FOURIER transform infrared spectroscopy**. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fourier_transform_infrared_spectroscopy>. Acesso em: 24/08/2012

53 SIVAKESAVA, S.;IRUDAYARAJ, J. ; DEMIRCI, A. Monitoring a bioprocess for ethanol production using FT-MIR ; FT-Raman spectroscopy. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 185-190, 2001.DOI: 10.1038/sj.jim.7000124.

54 ATKINS, P. ; PAULA, J.D. **Físico-Química**. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 1. p. Isbn: 978-85-216-1600-9.

55 THERMO-NICOLET. **Introduction to Fourier transform infrared spectrometry**. Madson: Thermo-Nicolet Manual Guide, 2001. 8 p. Manual técnico.

56 SPIEGEL, M.R. **Análise de Fourier**. New York: McGraw-Hill, 1974. ISBN: 0070602190.

57 GRIFFITHS, P.R. ; HASETH, J.A.D. **Fourier transform infrared spectrometry**. 2nd. Hoboken, EUA: John Wiley ; Sons, Inc, 2007. ISBN: 0471194042.

58 MANTSCH, H.H. ; CHAPMAN, D. **Infrared spectroscopy of biomolecules**. New York: Wiley-Liss, 1996. 359 p. ISBN: 0471021849.

59 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. ; BRUNS, R.E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, 6, p. 1401-1406, 2006.DOI: 10.1590/S0100-40422006000600042.

60 MOITA NETO, J.M.; MOITA, G. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n.4, p. 467-469, 1998. DOI: 10.1590/S0100-40421998000400016.

61 VALDERRAMA, P.;BRAGA, J.W.B. ; POPPI, R.J. Validation of multivariate calibration models in the determination of sugar cane quality parameters by near infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, 2, p. 259-266,2007. DOI: 10.1590/S0103-50532007000200003,

62 SOUZA, A.J.G. **Análise em componentes principais**. Disponível em: <<http://biomonitor.ist.utl.pt/~ajsousa/textos/Adados3.PDF>>. Acesso em: 10/07/2012

63 COSTA, L.F. **Shape analysis and classification and theory and practice**. Boca Raton Crc Press, 2001. 456 p. ISBN: 0849334934.

64 DAVIES, A.M.C. ; FEARN, T. Back to basics: the principles of principal component analysis. **Spectroscopy Europe**, v. p. 20-23, 2005.

65 SILVA, I.N.D.;SPATTI, D.H. ; FLAUZINO, R.A. **Redes neurais artificiais para engenharia e ciências aplicadas**. São Paulo: ArtLiber, 2010. 399 p. ISBN: 9788588098534.

66 ROHMAN, A.; SISMINDARI;ERWANTO, Y. ; MANSISMINDARI, Y.B.C. Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Meat Science**, v. 88, p. 91-95,2011. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.12.007.

67 WANG, J.;KLIKS, M.M.;JUN, S.;JACKSON, M. ; LI, Q.X. Rapid analysis of glucose, fructose, sucrose, ; maltose in honeys from different geographic regions using Fourier transform infrared spectroscopy ; multivariate analysis. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 208-214,2010. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01504.x.

68 ENGELHARD, S.;LOHMANNROBEN, H.G. ; SCHAEF, F. Quantifying ethanol content of beer using interpretive near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 58, 10, p. 1205-1209, 2004.

69 SILVA, F.;FERREIRA, I.M.P.L.V.O. ; TEIXEIRA, N. Polipeptídeos e proteínas com influência na qualidade da espuma da cerveja e métodos analíticos utilizados no seu estudo. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1326-1331, 2006.DOI: 10.1590/S0100-40422006000600030.

70 SCHADEN, S.;HABERKORN, M.;FRANK, J.;BAENA, J.R. ; LENDL, B. Direct determination of carbon dioxide in aqueous solution using mid-infrared quantum cascade lasers. **Applied Spectroscopy**, v. 58, n.6, p. 667-670, 2004.DOI: 10.1366/000370204872971.