

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

MODIFICAÇÃO DE MATRIZES EM ANÁLISE
ESPECTROSCÓPICA POR RAMAN E INFRAVERMELHO
MÉDIO

Walace Martins Moreira

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

Coorientador: Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior

São Carlos-SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado candidato Wallace Martins Moreira, realizada em 16/12/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro (UFSCar)

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto (UFU)

Prof. Dr. Guilherme Post Sabin (OpenScience)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua produção ou construção. Quem ensina aprende a ensinar. E quem aprende ensina ao aprender”

Paulo Freire

A minha família, aos meus pais Carlos e Estrela por todos os ensinamentos, a minha esposa Corrinha, por todo o companheirismo, apoio e compreensão ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar até o final dessa caminhada sempre abençoando meus passos e consentindo-me alcançar meus objetivos.

Aos meus pais Carlos e Estrela, por todo amor, carinho, incentivo e ensinamentos ao longo da vida. A minha esposa Corrinha, por todo apoio e companheirismo, que mesmo diante das dificuldades sempre me apoiou e incentivou.

Aos meus filhos João Arthur e Emanuelle, que foram minhas fontes de inspiração e incentivo para o alcance de todos os objetivos traçados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro, pela oportunidade de orientação, confiança, amizade e parceria ao longo desses anos. Devo muito da minha formação aos seus ensinamentos e reflexões.

Ao professor Dr. Stanislaw Bogusz Júnior, por aceitar a coorientação. Mostro-lhe gratidão pelo apoio e contribuição para elaboração desse trabalho.

Aos amigos do LABIE e GQA, na qual tive a oportunidade de conhecer, conviver e construir amizades valiosas, Benê, Danilo, Cecília, Tássia, Camila, Wilson, Taíse, Karlota. Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais Luís Guillermo e Marília, na qual contribuí bastante para a conclusão desse trabalho.

Aos amigos do grupo GAIA, que tive oportunidade de conhecer e trocar conhecimentos, Vinicius Câmara, Marcão e Mateus. Ao meu amigo, Raimundo Rafael Gamela, que esteve comigo ao longo de toda caminhada, sempre compartilhando conhecimentos e amizade.

Aos meus professores da graduação, Murilo Sergio da Silva Julião e Ângela Sampaio Beserra, que sempre me incentivaram a alcançar meus objetivos através de seus conselhos e orientações.

Ao departamento de Química por toda infraestrutura concedida para a realização desse trabalho. Aos funcionários do departamento, e em especial, ao

Paulo e a Luciana por toda ajuda e ensinamentos durante as análises no infravermelho.

Ao Instituto Federal do Maranhão-IFMA, pelo salário concedido ao longo do período de afastamento. Ao CNPq processo número, CAPES e FAPESP processo número, pelo apoio concedido à pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Ácido Acetilsalicílico
AS	Ácido Salicílico
ATR	Reflectância Total Atenuada
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ESI	Electrospray Ionization (Ionização por eletro spray)
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flame Ionization Detector (Detector de Ionização por chama)
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho médio com transformada de Fourier
HS	Headspace
IPA	Indian Pale Ale
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massa)
MIR	Espectroscopia no Infravermelho médio
NIPALS	Quadrados mínimos interativos não-lineares
NIR	Espectroscopia no Infravermelho próximo
PAL	Premium American Lager
PAT	Tecnologia Analítica de Processos
PCA	Análise de Componentes principais
PC	Componente Principal
PIB	Produto Interno Bruto
PLS	Partial Least Squares (Mínimos Quadrados Parciais)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RMSE	Raiz do erro quadrático médio

RPM	Rotação por minuto
SAL	Standard American Lager
SPME	Micro extração em fase sólida
SVD	Decomposição de Valores Singulares
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1- Divisão das regiões espectrais no infravermelho	3
TABELA 2.1- Concentração de AAS em mg/comprimido obtidos por espectroscopia Raman e o método comparativo (CLAE), para as marcas A e B	31
TABELA 3.1- Descrição das amostras de cerveja de acordo com as marcas e lotes analisados neste estudo.....	37
TABELA 3.2- Relação m/z das marcas mais consumidas da categoria Standard American Lager	50
TABELA 4.1- Figuras de mérito para o método proposto.....	62
TABELA 4.2 - Concentração de etanol (v/v) obtidos por espectroscopia Raman e método comparativo (HS-CG-FID), para as marcas A e B das amostras analisadas.....	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Representação esquemática do espalhamento Rayleigh, Stokes e anti-Stokes.....	6
FIGURA 1.2- Espectro Raman completo	7
FIGURA 1.3- Representação gráfica das Componentes Principais.....	9
FIGURA 1.4- Fórmula Estrutural do AAS	12
FIGURA 2.1- Gráfico de escores das amostras obtidas em diferentes tempos.	27
FIGURA 2.2- Gráfico de <i>loadings</i> da PC1 com 83,42 % da variância explicada.	27
FIGURA 2.3- Hidrólise do AAS em meio básico.....	28
FIGURA 2.4- Espectros das soluções analisadas (a) AAS com pH 6; (b) AAS com pH 8; (c) AAS com pH 12; (d) AAS e AS puros com pH 6.	29
FIGURA 2.5- (a) Região dos espectros Raman utilizados para calibração na faixa de concentração de 1 - 5 % m/v; (b) Curva de calibração para o AAS	31
FIGURA 3.1- Representação esquemática do processo de secagem dos extratos orgânicos de cerveja.....	39
FIGURA 3.2- Espectros FTIR dos extratos de cerveja analisadas.	40
FIGURA 3.3- Espectros dos extratos de cerveja após a etapa de seleção de variáveis e alisamento	43
FIGURA 3.4- Gráfico de escores da PC1 x PC2 para o modelo PCA calculado....	44
FIGURA 3.5- Gráfico de <i>loadings</i> da PC1, PC2 e PC3	46

FIGURA 3.6- Escores da PC1 X PC2 para as marcas A, B e J, as mais consumidas no mercado brasileiro	48
FIGURA 3.7- Espectro de massa dos extratos orgânicos: (a) Marca F da categoria PAL no tempo de retenção de 9,39 min; (b) Marca K da categoria PAL no tempo de retenção de 11,735 min.....	52
FIGURA 4.1- Espectros Raman para soluções padrões preparados nas faixas de concentração de 1 – 5 % (v/v).....	60
FIGURA 4.2- Curva de calibração e coeficiente para matrizes analisadas (a) Vinho; (b) Whisky; (c) Cerveja da categoria Standard American Lager; (d) Cerveja da categoria Premium American Lager.	61

RESUMO

MODIFICAÇÃO DE MATRIZES EM ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR RAMAN E INFRAVERMELHO MÉDIO - Os métodos espectroscópicos de análise, como Infravermelho médio (MIR) e a espectroscopia Raman, baseiam-se na interação entre a luz e a matéria. Tais técnicas apresentam vantagens como análise não destrutivas, de baixo custo e necessitarem de pouco ou nenhum preparo da amostra. Porém na análise matrizes complexas (alimentos, bebidas e fármacos), a presença de interferentes limitam a capacidade destas técnicas, sobretudo na detecção de compostos minoritários. Dessa forma, a modificação dessas matrizes com o objetivo de diminuir os interferentes presentes nessas amostras apresenta-se como alternativa viável, ampliando a capacidade de análise e possibilitando novas aplicações. Neste trabalho foi avaliada a modificação de matrizes em três diferentes aplicações utilizando espectroscopia MIR ou Raman. O intuito de realizar o tratamento das amostras antes das análises teve como objetivo superar limitações das técnicas analíticas relacionadas à análise direta, como a fluorescência no Raman e a interferência de água no Infravermelho médio. Na primeira aplicação, propõe-se a determinação quantitativa e o estudo de estabilidade de ácido acetilsalicílico (AAS) em amostras comerciais por Espectroscopia Raman e análise univariada. Para tal, foram preparadas 4 soluções de concentração 3 % m/v de AAS com valores de pH variando entre 6-12. Após o preparo das soluções, foram coletados espectros Raman das amostras com intervalos de 30 min nas duas primeiras horas de análise e posteriormente o intervalo entre um espectro e outro foi de 1h, perfazendo um total de 8h. Para determinação quantitativa, foi construída uma curva de calibração de concentração na faixa de 1 a 5 % m/v de AAS. Após avaliação da estabilidade, dois medicamentos comerciais à base de AAS foram adquiridos no comercio local sendo determinado o teor do ativo. Os valores encontrados por Espectroscopia Raman foram confrontados com os resultados obtidos pelo método padrão (HPLC), obtendo-se diferenças relativas abaixo de 1 %. Na segunda aplicação foi

proposto método de abertura de amostra utilizando partição líquido-líquido com acetato de etila para análise de 11 marcas de cervejas do tipo Pilsner divididas nas categorias Standard American Lager e Premium American Lager, por FTIR-ATR. Os dados foram pré-processados e realizado um estudo exploratório utilizando Análise de Componentes Principais (PCA). Foram observados padrões espectrais (*fingerprint*) dos compostos presentes no extrato orgânico das amostras analisadas. Foi possível verificar que a técnica de FTIR-ATR foi capaz de separar em agrupamentos distintos as marcas de cerveja analisadas e separar as amostras de marcas diferentes, de acordo com o seu local de produção. E por fim, na terceira aplicação realizou-se a análise quantitativa de etanol em amostras de cerveja, vinho e uísque por Espectroscopia Raman. Como estratégia para diminuição de interferentes foi realizada a modificação das matrizes com hipoclorito de sódio, este método tem como principal objetivo suprimir a fluorescência de amostras, causadas pelos componentes presentes nessas matrizes. Os resultados mostraram que a utilização do hipoclorito de sódio foi eficaz na supressão da fluorescência permitindo a realização da análise quantitativa de etanol nas matrizes analisadas. Dessa forma, os dados de concentração obtidos por Espectroscopia Raman foram confrontados com os valores obtidos pelo método de referência (Cromatografia Gasosa-CG), alcançando-se desvios relativos entre as duas técnicas abaixo de 10%.

ABSTRACT

MODIFICATION OF MATRICES IN SPECTROSCOPY ANALISYS BY RAMAN AND MID-INFRARED - The spectroscopy methods of analysis, as Mid Infrared (MIR) and Raman spectroscopy, are based on the interaction of light and matter. These techniques present advantages, such as, non-destructive analysis, low cost and little or no sample preparation. However, in the analysis of complex matrices (food, beverages, and drugs), interferents agents decrease the capacity of these techniques, especially in detecting of minority compounds. In this way, the modification of these matrices in order to reduce the interferences, presents itself as a viable alternative, expanding the analysis capacity and enabling new applications of such techniques. In this work, it was performed the modification of matrices in three different applications for analyses using MIR and Raman spectroscopy. The aim of carrying out the treatment of samples before the analysis aimed to overcome limitations of analytical techniques related to direct analysis, such as fluorescence in Raman and water interference in mid-infrared. In the first application, it was proposed the quantitative determination and stability study of acetylsalicylic acid (ASA) in commercial samples by Raman spectroscopy and univariate analysis. For this purpose, four solution of 3% m/v AAS at pH values varying from 6 to 12 were prepared. Raman spectra were collected at intervals of 30 min in the first two hours of analysis and 1 h of interval after two hours, in a total of 8 hours. For quantitative determination, a concentration calibration curve in the range of 1 to 5% m/v of AAS, was built. After evaluating of stability, two commercial drugs containing AAS were purchased in the local market and the content of the active ingredient was determined. The values found by Raman Spectroscopy were compared with the results obtained by the standard method (HPLC) and presented relative deviation below 1%. In the second application, a sample opening method was proposed using liquid-liquid partition with ethyl acetate to analyze by FTIR-ATR 11 brands of Pilsner beers, divided into the Standard American Lager and Premium American Lager categories. The data

were pre-processed the exploratory study performed using Principal Component Analysis (PCA). According to the results, spectral patterns (fingerprints) of the compounds present in the organic extract of the analyzed samples were obtained. It was possible to verify that FTIR-ATR technique was able to separate the analyzed beer brands in distinct groups. Moreover, the FTIR-ATR was able to separate samples of different brands according to the production location. Finally, in the third application the quantitative analysis of ethanol in beer, wine and whiskey samples was performed by Raman Spectroscopy. As a strategy to reduce interferences, the modification of the matrices with sodium hypochlorite was carried out. This method has as its main objective to suppress the fluorescence of samples, caused by the components present in these matrices. The results showed that the use of sodium hypochlorite was effective in the suppressing of fluorescence, allowing for the quantitative analysis of ethanol in the analyzed matrices. The relative deviation between Raman Spectroscopy and the reference method (Gas Chromatography - GC) was below 10%.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Espectroscopia Vibracional.....	2
1.1.1. MIR	2
1.1.2. Raman.....	4
1.2. PCA	8
1.3. Modificação de Matriz	11
1.4. Amostras Modificadas	12
1.4.1. Ácido Acetilsalicílico.....	12
1.4.2. Cerveja.....	14
1.4.3. Vinho	16
1.4.4 Whisky.....	18
2. MODIFICAÇÃO DE MATRIZ PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E ESTUDO DE ESTABILIDADE USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS	22
2.1. Introdução e Objetivos	23
2.2. Parte Experimental	24
2.2.1. Materiais.....	24
2.2.2. Instrumentação	24
2.2.3 Monitoramento Cinético Multivariado	24
2.3.4. Curva de Calibração	25
2.2.5. Preparo das amostras comerciais	25

2.2.6. Análise de Referência	25
2.2.7. Processamento dos dados	26
2.3. Resultados e Discussão	26
2.3.1. Estudo cinético multivariado empregando ferramentas multivariadas...	28
2.3.2. Análise Quantitativa	30
2.3.2.1. Curva de Calibração	30
2.3.2.2. Quantificação de ácido acetilsalicílico em amostras comerciais	31
2.4 Conclusão	32
3. AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRAS NA ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE <i>FINGERPRINTS</i> DE CERVEJA USANDO FTIR-ATR	33
3.1. Introdução e Objetivos	34
3.2. Parte experimental.....	35
3.2.1. Materiais.....	35
3.2.2. Amostras.....	36
3.2.3. Preparo das amostras	38
3.2.4. Medidas FTIR	39
3.2.5. Análise de dados.....	40
3.2.6. Análise de Referência	41
3.3. Resultados e Discussão	42
3.3.1. Análise Espectral.....	42
3.3.2. Análise Exploratória.....	44

3.3.3. Análise de Referência	49
3.4. Conclusão	53
4. SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM BEBIDAS POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	54
4.1. Introdução e Objetivos	55
4.2. Materiais e Métodos	56
4.2.1. Materiais	56
4.2.2. Amostras	56
4.3. Preparo da Amostra	56
4.3.1. Vinho	56
4.3.2. Uísque	57
4.3.3. Cerveja	57
4.4. Curva de Calibração	58
4.5. Método de Referência	58
4.6. Resultados e Discussão	59
4.6.1. Análise quantitativa de etanol	59
4.6.2. Quantificação de etanol em amostras de bebidas comerciais	63
4.7. Conclusão	64
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Espectroscopia Vibracional

1.1.1 - MIR

As técnicas de análise espectroscópica baseiam-se na interação da luz com a matéria (sólida, líquida ou gás)[1]. Tais interações provocam alterações nos modos vibracionais ou rotacionais das moléculas através da absorção, emissão ou espalhamento de fótons. Com os diversos avanços tecnológicos ocorridos nos últimos 60 anos, o desenvolvimento de equipamentos no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com preços acessíveis, incrementação de computadores dentro da rotina laboratorial, desenvolvimento de softwares computacionais, técnica de reflexão total atenuada (ATR) e o uso da quimiometria. A espectroscopia no Infravermelho passou a ser aplicada em diversas análises como alimentos, bebidas e fármacos[2–4], potencializando, dessa forma sua aplicação dentro da química analítica.

Por ser uma técnica baseada na absorção da radiação eletromagnética, a radiação no infravermelho compreende uma faixa do espectro eletromagnético correspondente a aproximadamente 0,78 a 1000 μm , sendo subdividida em três regiões de acordo com as frequências de absorção, com infravermelho próximo, médio e distante[1]. A Tabela 1, expressa as divisões das regiões do infravermelho e as suas respectivas frequências de absorção.

TABELA 1.1- Divisão das regiões espectrais no infravermelho

Região	Comprimento de onda (λ), μm	Número de Onda(cm^{-1})	Frequência (ν) Hz
Próximo	0,78 a 2,5	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14} - 1,2 \times 10^{14}$
Médio	2,5 a 50	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14} - 3,0 \times 10^{12}$
Distante	50 a 1000	200 a 10	$3,0 \times 10^{12} - 3,0 \times 10^{11}$

Dentre as regiões do infravermelho, o Infravermelho médio (MIR) possui grande aplicação nas mais variadas áreas da química. A absorção molecular da radiação MIR provoca a excitação dos modos vibracionais fundamentais das moléculas, conseqüentemente, o espectro do MIR de um composto fornece informações relevantes sobre sua composição química, sendo amplamente aplicado na identificação de grupos funcionais e caracterização de materiais. Além disso, nem todas as ligações entre os átomos vibram em uma única frequência, dessa forma um espectro MIR contém informações específicas de cada molécula, sendo considerado como uma "impressão digital" de cada substância[5].

Porém, para que essa absorção ocorra na região do IR, é necessário que haja um momento dipolo na molécula, pois somente com a alteração do campo elétrico da molécula é possível modificar os modos de vibração. Dessa forma, moléculas que possuem tais propriedades são ativas na região do infravermelho. Já moléculas simétricas ou pseudosimétricas e moléculas diatômicas homonucleares não possuem momento dipolo, dessa forma não absorvem radiação na região do infravermelho.

A espectroscopia MIR fornece ao pesquisador diversas informações sobre os componentes da amostra, ganhando destaque na análise do controle de

qualidade na indústria, identificação de adulterantes e determinação quantitativa de componentes majoritários[6,7]. Auxilia em sua disseminação o fato da técnica ser não destrutiva, possuir baixo custo e não necessitar de quase nenhum preparo da amostra. Outra vantagem da espectroscopia MIR é a não utilização reagentes agressivos ao meio ambiente, evitando dessa forma o descarte de resíduos pela indústria e diminuído com isso os custos do processo de análise.

Entretanto, mesmo sendo uma técnica eficiente, a aplicação da espectroscopia MIR possui limitações, sobretudo em amostras que contenham grande quantidade de água em sua composição. Isso ocorre devido à forte absorção da ligação O-H, o que pode acarretar na sobreposição espectral de bandas, dificultando a análise dos demais componentes da amostra. Além disso os baixos valores de limites de detecção tornam a técnica menos atrativa para aplicação em análise quantitativa de compostos minoritários, como metabolitos e antioxidantes, sendo, portanto, mais eficiente na identificação de grupos funcionais presentes nas substâncias.

1.1.2 - Raman

A espectroscopia Raman, assim como a espectroscopia no Infravermelho, é uma técnica de análise vibracional que nos permite conhecer os padrões de vibrações dos compostos que estão presentes nas amostras. Dessa forma, torna-se possível a aplicação dessa técnica para caracterização de materiais e identificação de substâncias a partir de padrões espectrais (*fingerprint*) que cada substância possui.

Quando a radiação eletromagnética de energia $h\nu$ interage com a matéria, parte dessa radiação poderá ser transmitida, absorvida ou espalhada. A espectroscopia Raman baseia-se no fenômeno do espalhamento, pela amostra, de uma radiação monocromática.

O primeiro cientista a estudar o fenômeno do espalhamento foi Smekal no ano de 1925, e em 1928 o físico indiano Chandrasekara Venkata Raman, provou

experimentalmente o efeito de espalhamento da luz, o que lhe conferiu no ano de 1930 o prêmio Nobel de física. Esse efeito ficou conhecido como efeito Raman, e também referido na literatura como efeito Smekal-Raman[8,9].

Ao contrário da espectroscopia no infravermelho, que necessita de um dipolo elétrico na molécula, na espectroscopia Raman ocorre uma distorção momentânea dos elétrons distribuídos em torno de uma ligação na molécula, seguida pela reemissão (espalhamento) da radiação. Como a espectroscopia Raman é baseada na capacidade de distorção da nuvem eletrônica ou polarizabilidade, modos vibracionais que possuem baixo momento de dipolo tendem a apresentar bandas no espectro Raman, como por exemplo moléculas diatômicas homonucleares. Por outro lado, moléculas altamente polarizadas não tendem a gerar espalhamento Raman significativo, pois não é possível a distorção da nuvem eletrônica, como é o caso da água.

Quando uma radiação monocromática de frequência (ν_0) incide sobre uma amostra, a maior parte da radiação é transmitida sem nenhuma mudança de suas propriedades, mas uma pequena porção é espalhada. Analisando-se a parte espalhada, percebe-se que não somente a frequência incidente (ν_0) estava presente, mas também duas outras porções, com frequências acima ($\nu_0 + e_\nu$) e abaixo ($\nu_0 - e_\nu$), onde e_ν representa a energia do fóton absorvida ou transferida para a molécula. A radiação sem modificação da frequência inicial é conhecida como espalhamento Rayleigh, espalhamentos com menor energia (maior frequência) é chamado de espalhamento Stokes e espalhamentos com maior energia (menor frequência) é o espalhamento anti-Stokes[10]. A Figura 1.1 mostra o fenômeno do espalhamento Rayleigh, Stokes e anti-Stokes.

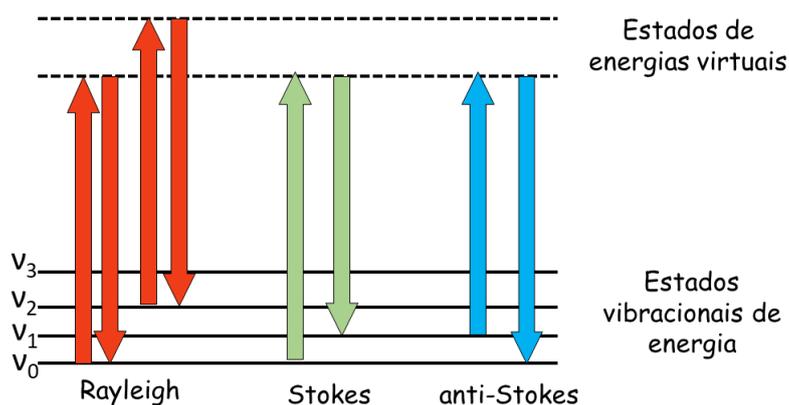


FIGURA 1.1- Representação esquemática do espalhamento Rayleigh, Stokes e anti-Stokes.

Estima-se que uma fração de 10^{-5} da radiação espalhada resulta em espalhamento Raman, o que na prática seria difícil de detectar, porém, a radiação espalhada situa-se nas regiões do visível e infravermelho próximo (NIR), para os quais estão disponíveis detectores mais sensíveis[10]. O espalhamento Rayleigh não traz informações sobre a molécula, pois apresenta o mesmo comprimento de onda do laser. Os espalhamentos Stokes e anti-Stokes são iguais em termos de diferença de energia do fóton espalhado, sendo que, à temperatura ambiente, o espalhamento Stokes é mais intenso que o espalhamento anti-Stokes. Isso porque em temperatura ambiente cerca de 99 % das moléculas encontram-se no estado vibracional de menor energia (v_0) de acordo com a distribuição de Maxwell-Boltzman, assim a probabilidade de ocorrência do espalhamento Stokes é bem maior do que a do espalhamento anti-Stokes. Diante disso, a maioria dos equipamentos Raman utilizam somente o espalhamento Stokes para registro do espalhamento Raman. A Figura 1.2 mostra um espectro Raman completo e os espalhamentos Stokes e anti-Stokes, de uma substância genérica.

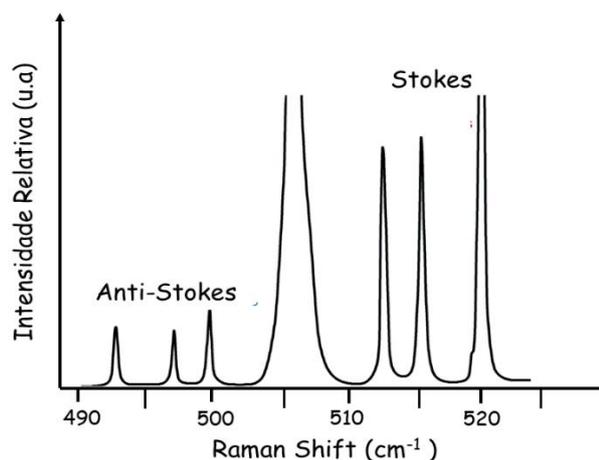


FIGURA 1.2- Espectro Raman completo.

Por ser uma técnica de análise espectroscópica, o espectro Raman registra a intensidade de espalhamento Raman *versus* o comprimento de onda, frequência ou número de onda. Porém, por ser uma medida dependente do comprimento de onda da radiação incidente, diversos equipamentos registram o deslocamento Raman (*Raman Shift*), essa conversão é comumente utilizada devido aos diferentes tipos de lasers de excitação utilizados nos equipamentos Raman (por exemplo 532, 785 e 1064 nm).

O cálculo para o deslocamento Raman é realizado subtraindo a energia do fóton incidido pela energia do fóton espalhado. Essa diferença de energia é convertida em número de onda e equivale à energia do estado vibracional[11]. Assim, os picos terão sempre os mesmos valores de *Raman Shift*, independente da linha de excitação utilizada pelo equipamento, já que a diferença de energia é devido aos estados da molécula, e não ao laser. Devido às melhorias instrumentais, a técnica tem se tornado disponível (e acessível) para uso em diferentes campos de pesquisa, permitindo aos cientistas extrair novas informações de suas amostras e em maior velocidade. O processamento de dados também permitiu o avanço de técnicas de imageamento, que pode fornecer informações sobre a distribuição espacial de substâncias na amostra, sendo uma vantagem frente a outras técnicas analíticas.

No que se refere à análise de alimentos, espectros Raman costumam ser menos densos em relação às bandas do que os espectros IR. Como consequência, a sobreposição de picos em misturas é menos provável e medidas quantitativas apresentam mais seletividade no Raman. Além disso, dispositivos Raman não estão sujeitos ao ataque por umidade, dessa forma a água não interfere na análise, podendo ser realizadas até mesmo medidas em solução aquosa[10].

1.2 - PCA

A análise de componentes principais ou simplesmente PCA, do inglês *Principal Component Analysis*, é um dos métodos mais importantes utilizados na quimiometria e é a base para diversos métodos de reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada[12]. Esta técnica consiste na redução de dimensões de sistemas multivariados em espaço de menor dimensão, sem que as relações entre as amostras sejam afetadas [13,14]. Esta técnica nos permite, dessa forma, otimizar a interpretação e visualização dos dados obtidos na análise, conseguindo informações relevantes e interpretando as diferenças existentes entre as amostras e as relações entre as variáveis. As dimensões desse novo espaço são denominadas componentes principais (PC), sendo ortogonais entre si, ou seja, contendo diferentes informações sobre as amostras. Cada componente principal é formada pela combinação linear das variáveis presentes na matriz de dados originais, dessa forma, é possível visualizar dados multivariados em gráficos bi e tridimensionais, sem que haja perda de informação dos dados. A Figura 1.3 mostra a representação gráfica das componentes principais para um sistema tridimensional.

Do ponto de vista quimiométrico a PCA é uma técnica de análise exploratória que geometricamente consiste na rotação da matriz de dados, a fim de compreender melhor a relação entre as amostras. Em termos matemáticos, no uso da PCA emprega-se expressões algébricas matriciais, dada pela equação 1.1:

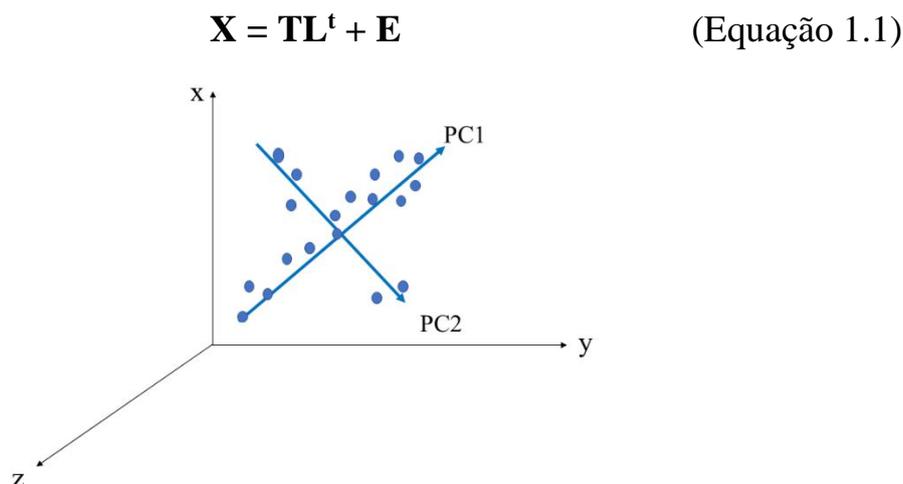


FIGURA 1.3- Representação gráfica dos escores das Componentes Principais.

Na Equação 1.1, \mathbf{X} é a matriz de dados (amostras x variáveis), decomposta em um produto duas outras matrizes, uma denominada de escores (\mathbf{T}) e outra de *loadings* ou pesos (\mathbf{L}), somada a uma matriz de resíduo (\mathbf{E}). As matrizes de escores representam a relação entre as amostras no conjunto de dados, já a matriz de pesos ou *loadings*, as relações entre as variáveis. Matematicamente, os *loadings* são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e as componentes principais (PC), representando, portanto, o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC. Valores absolutos altos para os *loadings* indicam alta influência de determinada variável para a descrição daquela componente principal.

A primeira componente principal (PC1) é projetada no sentido da maior variância do conjunto de dados; a segunda (PC2) é projetada ortogonalmente à primeira, também no sentido de maior variância mas que não foi descrita pela primeira componente, e assim por diante; enquanto os escores representam as relações de similaridade entre as amostras[12]. Essa redução de dimensionalidade dos dados só é possível porque as variações sistemáticas dos dados foram concentradas nas primeiras componentes principais. Com isso, as últimas PCs trazem informações de origem aleatórias, dessa forma é possível separar a estrutura inerente dos dados (primeiras PCs) do ruído instrumental, por exemplo[14].

Diversos algoritmos são expressos na literatura para o cálculo das matrizes de escores de *loadings*, dentre os diversos métodos destacam-se como mais aplicados os métodos de decomposição de valores singulares (SVD) e quadrados mínimos iterativos não-lineares (NIPALS). O método SVD, é um dos métodos mais utilizados pelos químicos no cálculo para o modelo PCA. Tal método consiste na decomposição da matriz de dados originais (X), em duas outras matrizes ortogonais entre si. A Equação 1.2, expressa a decomposição da matriz X , pelo método SVD:

$$X = USV^t + E \quad (\text{Equação 1.2})$$

Onde:

- X = matriz de dados original;
- U = matriz de escores normalizada;
- S = matriz de covariância com valores singulares;
- V = matriz normalizada de pesos;
- E = matriz de resíduos.

As matrizes U e V são quadradas ($n \times n$) e ($m \times m$), respectivamente, sendo ambas ortonormais entre si, isto é, as colunas de U e de V são ortogonais e normalizadas, dessa forma ambas as matrizes estão sujeitas a $U^tU=I_n$ e $V^tV=I_m$, onde I é a matriz identidade. Dessa forma, fazendo uma correlação entre as Equações 1.1 e 1.2, temos:

$$L = V \quad (1.3)$$

$$T = US \quad (1.4)$$

A matriz S , representa a matriz de covariância dos valores, essa matriz é diagonal e contém os comprimentos dos vetores da coluna T (raiz quadrada da variância). Essa matriz contém informação sobre a quantidade de variância que cada PC descreve para no modelo PCA[15,16]. Diferente do método SVD, que utiliza decomposição de matriz para o cálculo do modelo PCA, o método utilizando o algoritmo NIPALS baseia-se na iteração através de quadrados

mínimos alternados para realizar o cálculo dos escores e *loadings*. O algoritmo é bastante simples e pode ser formulado em poucas linhas de programação[15].

1.3 - Modificação de Matriz

As técnicas de análise vibracional apresentam diversas vantagens já apresentadas, sobretudo baixo custo, frequência analítica e são técnicas que necessitam de pouco ou nenhum preparo da amostra, tornando a análise mais rápida e com menor incidência de possíveis erros sistemáticos que podem ocorrer durante o processo de preparo da amostra.

Entretanto, quando se analisa amostras multicomponentes como fármacos, alimentos e bebidas por métodos espectroscópicos (ou seja, quando não estamos analisando uma substância pura), o não preparo da amostra torna-se uma desvantagem quando comparamos técnicas vibracionais com técnicas como UV-Vis e cromatográficas, por exemplo, que fazem uso da abertura da amostra. Por serem matrizes complexas, muitos componentes presentes nesses tipos de amostras acabam interferindo na análise, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de estratégias que busquem minimizar esses efeitos de matriz causadas por esses compostos.

Diversas estratégias de preparo de amostras são utilizadas para a redução ou eliminação de interferentes em uma análise química. Técnicas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG), fazem uso de estratégias de preparo da amostra como dissolução, partição líquido-líquido, QuEChERS, micro extração em fase sólida (SPME) e outros, visando eliminar os efeitos de matriz e interferentes presentes nas amostras[17–19]. Além disso, métodos precipitação seletiva, digestão da amostra e diluição, são outras estratégias elencadas na literatura para diminuição de efeitos de matriz[20,21]. Entretanto, vale ressaltar que as técnicas mencionadas realizam análise univariada, o que torna necessário o preparo da amostra para determinação do analito de interesse, havendo um ganho de seletividade.

Já a utilização dessas estratégias de preparo da amostra utilizando técnicas vibracionais (NIR, MIR ou Raman) são bastante raras, sendo um campo pouco explorado por pesquisadores e que poderia ampliar a capacidade de aplicação das técnicas espectroscópicas. Além disso, com a utilização do preparo da amostra ou modificação da matriz de análise, torna-se possível a análise de compostos minoritários até então não detectáveis.

1.4 - Amostras modificadas

1.4.1 - Ácido Acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico (AAS), Figura 1.4, é um fármaco com propriedades anti-inflamatórias utilizado no combate a dores de cabeça, musculares e prevenção de doenças cardíacas. É um fármaco amplamente utilizado em todo o mundo com um consumo global de aproximadamente 40.000 toneladas por ano[22]. O AAS foi sintetizado por Hoffmann no ano de 1897, e comercializado dois anos depois como Aspirina® [23,24], porém somente no ano de 1940 este fármaco passou a ser empregado em doses maiores como anti-inflamatório[24].

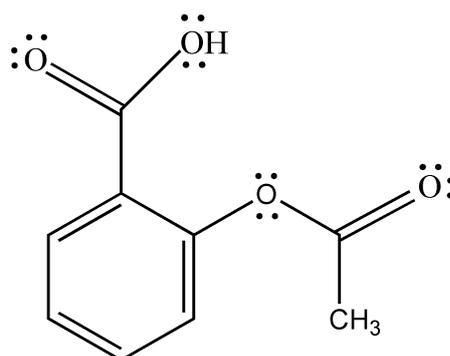


FIGURA 1.4- Fórmula Estrutural do AAS.

Do ponto de vista farmacológico o AAS age no organismo como inibidor da enzima ciclooxygenase (COX-1 e COX-2), tais enzimas estão diretamente envolvidas na produção de prostaglandinas e exercem papel importante na manutenção de órgãos e tecidos[25]. Além disso, no ano de 1980, o *Food and*

Drug Administration (FDA), autorizou o emprego o AAS em pacientes com infarto do miocárdio, o que causou um aumento significativo do consumo desse fármaco em pacientes com idade acima dos 40 anos[26].

De acordo com a farmacopeia Europeia, o método de referência para determinação quantitativa de AAS deve ser feito utilizando CLAE-UV[27]. Porém diversas outras técnicas analíticas, são reportadas visando determinar quantitativamente esse fármaco em amostras comerciais. Yazan e Bayraktepe (2020), realizaram a determinação simultânea de Acetaminofeno, ácido ascórbico e AAS em dosagens farmacêuticas por voltametria utilizando um eletrodo modificado a base de nano-argila[28]. Já Sartori et al. (2020), realizaram a determinação quantitativa de Pravastatina e AAS por voltametria cíclica, utilizando eletrodo de diamante dopado com boro[29].

Entretanto, poucos trabalhos presentes na literatura fazem uso da espectroscopia vibracional, sobretudo da espectroscopia Raman, para análise quantitativa deste fármaco em amostras comerciais. Dentre os trabalhos publicados nesse campo de pesquisa, destacamos os trabalhos desenvolvidos por Ulbert, Boix e Omar (2020), que utilizaram espectroscopia Raman e calibração multivariada para controle de qualidade de AAS, paracetamol e ibuprofeno em amostras comerciais. Neste trabalho os autores utilizaram regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) para construção do modelo de calibração, sendo que o erro médio (RMSE) obtido foi de 11,3 % para o paracetamol, 13,2 % para o ácido acetilsalicílico e 6,2 % para o ibuprofeno. Segundo os autores o método proposto é adequado para implementação em laboratórios forenses envolvidos na fiscalização de drogas lícitas e ilícitas.[30]

Sallum et al. (2014) realizaram de forma inédita a determinação de AAS em amostras comerciais por espectroscopia Raman amplificada por superfícies (SERS) em papel filtro e compararam os resultados com o método de referência (CLAE). Neste trabalho, os autores utilizaram calibração univariada para a determinação do AAS, obtendo-se desvios relativos de 2,06 % entre a técnica

Raman e a CLAE, usada como referência. Um teste-t foi realizado para um nível de significância de 95% indicando que os resultados obtidos pelo método proposto não apresentam diferença significativa quando comparado com o método de referência[31].

Dessa forma, observa-se que o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar AAS em amostras comerciais de forma rápida, barata, com precisão e sem a presença de interferentes, torna-se de grande relevância, tendo em vista a comercialização deste fármaco e sua aplicação no combate das mais variadas doenças.

1.4.2 - Cerveja

Cerveja é a bebida alcoólica mais popular em todo o mundo, com um consumo mundial de aproximadamente 190 bilhões de litros de cerveja no ano de 2017[32]. O mercado cervejeiro brasileiro ocupa atualmente a terceira colocação global no que se refere ao consumo e participação de mercado. Segundo dados do setor cervejeiro, o mercado brasileiro gerou um faturamento de aproximadamente R\$ 77 bi no ano de 2019, equivalente a 2% do produto interno bruto (PIB), além disso, o setor emprega mais 2 milhões de pessoas de forma direta e indireta, gerando um retorno aos cofres públicos via pagamento de imposto de aproximadamente R\$ 25 bi/ano[33].

Do ponto de vista químico, a cerveja pode ser classificada como uma mistura complexa constituída de malte, água, lúpulo e leveduras que interagem entre si durante o processo de fermentação[34]. Dessa forma, a variação da concentração desses compostos e dos parâmetros do processo durante a etapa de fermentação são os principais responsáveis pelos diferentes tipos de cerveja[35].

Diversos tipos como *Ale*, *Lager*, *Kellerbier* e outros são comercializados no mercado interno brasileiro, sendo os estilos do tipo *Lager* e *Ale*, os mais consumidos. Nas cervejas estilo *Ale*, a etapa de fermentação ocorre em temperaturas mais altas, variando entre 15-24°C, as leveduras da espécie

Saccharomyces cerevisiae, se concentram na parte superior do tanque de fermentação, conferindo a cervejas desse estilo a denominação de cerveja de alta fermentação. Assim como ocorre nas cervejas estilo *Lager*, existem subclasses de cervejas *Ale*, como por exemplo a *Indian Pale Ale* (IPA), *Stout*, *Amber Ale*, dentre outras. Cervejas do tipo *Ale*, são mais encorpadas e possuem maior teor alcóolico quando comparadas com as do tipo *Lager*. Além disso, as *Ales* possuem em sua composição ésteres aromáticos que são produzidos durante a etapa de fermentação, o que confere a esse estilo de cerveja a características sensoriais específicas como sabor, coloração, dentre outras[36].

Cervejas do estilo *Lager* são produzidas a partir da fermentação de leveduras da espécie *Saccharomyces pastorianus* em temperaturas que variam entre 5 e 14 °C. Esse tipo de levedura é denominada de levedura de baixa fermentação, devido ao acúmulo dessas leveduras no fundo do tanque durante o processo de fermentação. As cervejas do tipo *Lager*, podem ser subdivididas de acordo com as variações durante processo de fermentação, que conferem ao produto final diferentes características químicas e sensoriais. Dentre as subclasses das cervejas do tipo *Lager*, a cerveja do tipo *Pilsner*, é a mais apreciada pelos consumidores brasileiros. Cervejas do tipo *Pilsner* apresentam características variadas, porém tradicionalmente possuem uma coloração mais clara, com sabor levemente amargo, sendo considerada uma cerveja refrescante e ideal para que sejam servidas geladas. Isso a torna ideal para o mercado brasileiro devido as características geográficas e clima tropical quente em boa parte do país.

Segundo dados oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2020, o Brasil alcançou a marca de 1383 cervejarias registradas, além disso todos os estados brasileiros possuem pelo menos 1 cervejaria registrada[37]. Diante desse cenário, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, robustos e de fácil aplicação na indústria, visando aplicação no controle de qualidade das cervejas produzidas. A análise de todos os compostos presentes na cerveja é inviável,

contudo, a utilização de padrões ou *fingerprints*, juntamente com ferramentas quimiométricas de análise, apresentam-se como uma alternativa viável para aplicação das técnicas de espectroscopia vibracional nesse setor, facilitando o controle e qualidade das cervejas produzidas.

Diversos trabalhos reportados na literatura abordam o uso de técnicas espectroscópicas na análise de cerveja[38,39]. Porém devido à alta quantidade de água presente nesse tipo de matriz, a utilização da espectroscopia MIR sofre muitas limitações, sobretudo em amostras da mesma subclasse de cerveja, por exemplo. Além disso, a presença de compostos minoritários como flavonoides, vitaminas e antioxidantes causam fluorescência na cerveja, tornando a técnica Raman extremamente limitada para esse tipo de amostra.

1.4.3 Vinho

O vinho é uma bebida obtida pela fermentação alcoólica total ou parcial do mosto simples de uva sã, fresca e madura[40,41]. Do ponto de vista do consumo, o vinho é a segunda bebida alcoólica mais consumida em todo o mundo, ficando atrás somente da cerveja, sendo Estados Unidos, França e Itália, respectivamente, os países que mais consomem essa bebida no mundo.

O vinho é uma bebida bastante complexa no que se refere a sua composição química. Um vinho tinto comum possui água e etanol como os compostos presentes em maiores concentrações, ao redor de 86 % e 12 %, respectivamente[42]. Além disso, o vinho possui diversos compostos responsáveis pelas características sensoriais como polifenóis, glicerol, ácidos orgânicos (ácido succínico e tartárico), diacetil, acetoína, poliálcoois, dentre outros [43,44].

Por possuir uma composição química complexa, diversas pesquisas visam estudar esse tipo de amostra com objetivo de determinar os diversos compostos presentes, como também desenvolver métodos que melhorem o processo de controle e qualidade dos vinhos fabricados. Dentre os trabalhos desenvolvidos

podemos citar o de Barnes et.al (2015), neste trabalho os autores validaram um método para determinação simultânea de etanol e metanol em amostras de vinhos comerciais utilizando cromatografia gasosa com sistema de injeção por *headspace* (HS-CG), o método desenvolvido mostrou-se bastante eficiente, preciso e adequado para na determinação desses dois analitos[45]. Xu et.al (2017) utilizaram micro extração líquido-líquido dispersiva para determinar compostos fenólicos em amostras de vinho tinto, branco e rosê por CLAE. Os autores conseguiram determinar cerca de 12 diferentes compostos fenólicos nas amostras analisadas, obtendo limites de quantificação variando entre 0,004 a 0,433 mg L⁻¹ [46]. Zawadzki, Szpot e Wachelko (2021), desenvolveram um método para determinação de etanol em cervejas artesanais, vinho e coquetéis, por HS-CG, sendo ao todo analisadas 167 amostras comerciais das bebidas. Os autores obtiveram boa linearidade no método proposto, com valores de limite de quantificação e detecção de 0,01% e 0,003% (v/v), respectivamente [43]. Porém as técnicas utilizadas por esses autores apresentam desvantagens como alto custo e/ou uso de solventes orgânicos e/ou maior tempo de análise.

No que se refere ao uso de técnicas espectroscópicas aplicadas à análise de vinho, diversos trabalhos vêm sendo propostos com objetivo de diminuir o tempo de análise e obter resultados satisfatórios quando comparados com a técnica de referência. Lopes et al. (2018), avaliaram o uso da espectroscopia Raman na análise de vinho branco, e compararam os resultados com espectroscopia MIR e NIR[47]. Neste trabalho foram avaliados o uso destas técnicas visando a determinação quantitativa da graduação alcoólica, densidade, acidez total, açúcares e pH. Guillaume et al. (2015), avaliaram o uso da espectroscopia Raman em amostras de vinho branco, sendo avaliados três diferentes lasers de excitação (325, 532 e 785 nm) com objetivo de diminuir a interferência do fundo fluorescente presente nesse tipo de amostra. De acordo com os dados obtidos pelos autores, os melhores resultados foram obtidos utilizando o comprimento de

onda de 325 nm, sendo detectados, com auxílio de ferramentas quimiométricas, componentes minoritários como ácidos hidroxicinâmicos, frutose e glicose[48].

Pinzaru et al. (2018), realizaram uma análise exploratória em 30 amostras de vinho branco, de origem romena. Neste trabalho, os autores utilizaram espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) com laser de excitação em 1064 nm e PCA para análise exploratória. Os resultados mostraram que a técnica FT-Raman foi eficaz na discriminação dos vinhos fabricados em distintas regiões geográficas da Romênia[49].

Mesmo sendo técnicas promissoras em substituição às análises convencionais, as espectroscopias vibracionais apresentam como principais desvantagens os efeitos de matriz, baixo limites de detecção e baixa seletividade. A espectroscopia Raman apresenta ainda problemas relativos à fluorescência da amostra, absorção o laser e emissão de fundo térmico. Além disso, a maioria dos trabalhos publicados abordam a análise de vinho branco pois a presença de compostos como as antocianinas, compostos fenólicos e outros compostos presentes nos vinhos tintos dificultam a análise por essa técnica devido à fluorescência da amostra.

1.4.4 - Uísque

O uísque, é uma bebida destilada obtida do destilado alcoólico simples de cereais envelhecido, parcial ou totalmente maltados, com graduação alcoólica variando de 38 a 54 % (v/v)[50]. Contém em sua composição, além de etanol, ésteres, terpenos, cetonas e flavonoides que conferem ao uísque características sensoriais únicas, que variam de acordo com a origem e pelo processo de fabricação.

Uísque é uma bebida bastante popular em todo o mundo, com um número de adeptos bastante significativo no mercado brasileiro. O mercado global de uísque para o ano de 2018 foi avaliado em aproximadamente USD\$ 57,96 bilhões, com estimativa de USD\$ 89,60 bilhões para o ano de 2025[51]. De acordo com a

legislação brasileira, o uísque engarrafado em território nacional somente poderá fazer uso das denominações de origem, garantindo que os destilados importados sejam produzidos e envelhecidos nos seus países de origem, com as características determinadas pela legislação vigente. Dessa forma o produto importado somente poderá sofrer modificação em sua graduação alcoólica (adição de água) ou na sua coloração (adição de caramelo)[50].

Os principais tipos de Uísque que são importados no mercado brasileiro são *Scotch Whisky*, *American Whiskey* e *Irish Whiskey*. Uísque do tipo *Scotch Whisky*, são os mais consumidos pelos brasileiros, é uma bebida produzida e envelhecida na Escócia, sua fermentação ocorre pela adição de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) à cevada maltada ou outros grãos de cereais. Seu processo de envelhecimento dura no mínimo 3 anos, em barris de carvalho, sendo permitido somente adição de água e caramelo ao produto final. O Uísque do tipo *Scotch Whisky*, pode-se dividir-se em 5 categorias que variam de acordo com a sua produção[40]:

- *Single Malt*: É um uísque produzido a partir de 100 % de cevada maltada, em destiladores do tipo alambique. É um produto com maior valor agregado em relação aos demais tipos de Uísque e sua produção ocorre em uma única destilaria.
- *Single Grain*: É produzido a partir de diferentes grãos de cereais (podendo ou não conter cevada), seu processo de destilação é realizado em alambique contínuo. Seu valor agregado é menor quando comparado ao *Single Malt* e sua produção ocorre em uma única destilaria.
- *Blended*: É produzido a partir da mistura de destilações diversas de pelo menos um uísque do tipo *Single Malt* e um uísque do tipo *Single Grain*, sua produção pode ocorrer em uma ou em várias destilarias diferentes, geralmente na proporção de 40% *Single Malt* e 60% *Single Grain*. Uísque do tipo *blended* deverá ter pelo menos três anos de idade para sua

comercialização, e o número de anos que conta no rótulo de uma garrafa deve pertencer ao uísque mais novo presente na mistura.

- *Blended Malt*: Uísque do tipo *Blended Malt*, são produzidos a partir da mistura da destilação de dois ou mais uísques do tipo *Single Malts*. Pode ser produzido em diferentes destilarias e possui um maior valor agregado, quando comparado com o tipo *Blended*.
- *Blended Grain*: O Uísque do tipo *Blended Grain*, são produzidos a partir da mistura da destilação de dois ou mais uísques do tipo *Single Grain*. Sua produção pode ocorrer em diferentes destilarias, porém esse tipo de uísque é raramente encontrado no mercado.

Por ser uma bebida com alto valor agregado, é muito comum o relato de falsificações de Uísque. Diante disso, torna-se importante a análise desses produtos, a fim de obter um rigoroso controle e qualidade do produto comercializado em bares e restaurantes brasileiros, evitando falsificações e adulterações desses produtos, o que pode acarretar em diversos problemas ao fabricante, como também à saúde dos consumidores. Existem diversos tipos de adulteração neste tipo de bebida, por exemplo, diluição com água fora dos padrões recomendados pela legislação, adição externa de etanol, adição de corantes, presença de fármacos e/ou drogas, são alguns dos exemplos publicado literatura[52–54].

Além das análises por técnicas de referência, o uso da espectroscopia vibracional na análise de destilados alcoólicos vem ganhando espaço nos trabalhos publicados na literatura. Retta et al. (2017) realizaram a determinação de etanol e metanol em amostras comerciais de Uísque e Vodka por espectroscopia MIR e NIR e compararam os resultados obtidos com o método de referência[55]. Koczon e Sujka (2018), aplicaram espectroscopia MIR na discriminação e autenticação de diferentes amostras de Uísque originárias da Escócia, Estados Unidos e Irlanda, bem como o tempo de maturação entre as

amostras. Os autores conseguiram diferenciar neste estudo as amostras de acordo com o seu local de origem, como também a técnica MIR foi capaz de diferenciar as amostras de Uísque de acordo com o grau de maturação[56].

Já no trabalho de Kiefer e Cromwell (2017), os autores fizeram o uso da espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas para análise de uísque. Neste trabalho os autores utilizaram PCA como ferramenta de análise exploratória das amostras e PLS para determinação quantitativa do teor de etanol nas amostras. Porém, os autores relataram sobre a dificuldade na análise desse tipo de amostra devido ao fundo fluorescente da matriz[57].

**CAPÍTULO 2 - MODIFICAÇÃO DE MATRIZ PARA
DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE ÁCIDO
ACETILSALICÍLICO E ESTUDO DE ESTABILIDADE
POR ESPECTROSCOPIA RAMAN E FERRAMENTAS
QUIMIOMÉTRICAS**

2.1 - Introdução e Objetivos

O ácido acetilsalicílico (AAS) é um fármaco anti-inflamatório não esteroidal, com propriedades antipiréticas e comumente usados como analgésico em todo o mundo[23,58,59]. O controle analítico do AAS na indústria farmacêutica, é realizada usando técnicas cromatográficas como CLAE ou CG. Porém estas técnicas apresentam desvantagens como alto custo, preparo da amostra e uso de solventes orgânicos[60].

Diversas técnicas analíticas têm sido reportadas na literatura objetivando a determinação quantitativa do princípio ativo em amostras comerciais[61–64]. Dentre as diversas técnicas utilizadas nesse tipo de análise, técnicas espectroscópicas como NIR e Raman, associadas a ferramentas quimiométricas, se apresentam como métodos alternativos frente às técnicas convencionais[59,65–67]. As técnicas espectroscópicas apresentam uma grande versatilidade na indústria farmacêutica, permitindo a análise de diversos materiais, incluindo sólidos, semissólidos, suspensões e soluções, aplicações em controle de processos (*Process Analytical Technology* - PAT), quantificação de polimorfos e propriedades físico-químicas[68–72].

O AAS possui alta solubilidade em solventes orgânicos como etanol, clorofórmio e acetona, porém o mesmo apresenta baixa solubilidade em água[73]. Isso pode trazer algumas desvantagens ao Raman na análise do AAS em solução, uma vez que com a presença de solventes orgânicos aparecem problemas como sobreposição de picos. Diante disso, uma possível estratégia que visa aumentar a solubilidade do fármaco e minimizar os efeitos de matrizes na análise por espectroscopia Raman é o uso de soluções aquosas capazes de causar a ionização da molécula, aumentando a solubilidade do fármaco em meio aquoso. Diversos trabalhos são reportados na literatura visando a quantificação do AAS utilizando técnicas espectroscópicas[31,74], porém observou-se que o procedimento de modificação de matriz visando a determinação quantitativa de AAS por espectroscopia Raman ainda não foi reportado na literatura, de acordo com as

bases de dados científicos como *Web of Science*, *SciElo*, *Google acadêmico*, dentre outras.

Portanto, esta aplicação tem como objetivo realizar a quantificação de ácido acetilsalicílico em solução aquosa, em amostras comerciais, utilizando a espectroscopia Raman de modo univariado. Ao se trabalhar com solução aquosa ao invés de análise direta, ocorre a diminuição da interferência de excipientes não solúveis, do efeito do tamanho dos cristais e de problemas de microheterogeneidade na análise Raman. Além disso, foi realizado um monitoramento cinético multivariado usando PCA, para avaliar a estabilidade do AAS em soluções com diferentes pHs.

2.2 - Parte Experimental

2.2.1 - Materiais

Uma solução de hidróxido de sódio 0,3 mol. L⁻¹ (Synth, 97%) foi preparada com água ultrapura (18,2 MΩ cm) obtida por um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). O ácido acetilsalicílico foi obtido em farmácias de manipulação local. Cada solução foi preparada antes de cada análise. Todos os reagentes usados nestes experimentos foram de grau analítico (PA).

2.2.2 - Instrumentação

Os espectros Raman foram obtidos usando um espectrômetro Raman B&W Tek i-Raman, modelo BWS 415-785H, operado pelo software B&W Spec 3.27. O comprimento de onda de excitação foi de 785 nm, o tempo de integração foi de 180 s com a potência do laser em 100% (320 mW). As medidas de pH foram realizadas usando um indicador de pH universal (Merck, Alemanha). Para a pesagem dos reagentes utilizou-se uma balança analítica SHIMADZU modelo AUW 220D com uma acurácia de 0,01 mg.

2.2.3 - Monitoramento Cinético Multivariado

Quatro soluções padrões de AAS foram preparadas na concentração de 3% m/v com pH variando de 6 a 12. Durante as primeiras duas horas de análise, os espectros Raman foram coletados em intervalos de 30 min e foi realizada medida do pH do meio. Passados as primeiras duas horas de análise, os espectros passaram a ser coletados em intervalos de 60 min sendo avaliado também o pH, totalizando 8h de análise.

2.2.4 - Curva de Calibração

A curva de calibração padrão do ácido acetilsalicílico em solução de NaOH foi preparada na faixa de concentração de 1 % a 5 % (m/v). As soluções foram preparadas adicionando diferentes volumes de NaOH de acordo com a massa de AAS pesada. Este procedimento teve como objetivo manter o mesmo pH para todas as soluções (pH 7), independentemente da quantidade de AAS, a fim de ionizar e ao mesmo tempo evitar a degradação do AAS.

2.2.5 - Preparo das amostras comerciais

Duas marcas de amostras comerciais de AAS contendo 500 mg por comprimido foram analisadas. Para ambas as marcas os comprimidos continham como excipientes fosfato de cálcio dibásico, celulose microcristalina e amido. A fração de massa de cada excipiente não foi fornecida pelo fabricante.

Cinco comprimidos foram pesados em uma balança analítica e posteriormente foram macerados com auxílio de um pistilo até a formação de um pó homogêneo. Após o processo de maceração, aproximadamente 370 mg da amostra foi pesada e solubilizada com NaOH (0,3 mol L⁻¹). Durante o processo de solubilização do fármaco a solução de foi agitada manualmente por 5 minutos e posteriormente filtrada com auxílio de um papel de filtro.

2.2.6 - Análise de Referência

O método HPLC-UV foi adaptado da literatura[75]. A análise no HPLC foi realizada em um cromatógrafo Agilent Technology 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) equipado com detector UV/Vis de arranjo de diodos G1314B. A detecção UV foi realizada no comprimento de onda de 207 nm. Uma coluna Xtimate™ C18 (4.6 x 150 mm, 5µm da Welch Materials, Inc., Shanghai, China) foi usada. A fase móvel consistiu em acetonitrila:água (25:75 v/v) acidificada com ácido fosfórico para pH 2,52, no modo isocrático. A temperatura da coluna, o fluxo e o volume de injeção foram respectivamente, 30 °C, 1.0 mL.min⁻¹ e 10 µL.

2.2.7 - Tratamento dos dados

O tratamento dos dados foi realizado utilizando o software MATLAB 2011a (Matworks,USA). Os dados dos espectros foram organizados em uma matriz X (i x j), onde i e j são respectivamente, amostras coletadas em diferentes tempos e número de variáveis, neste caso, Raman shift. Os dados foram tratados usando as seguintes etapas em sequência: (i) primeira derivada com alisamento; (ii) normalização por área; (iii) centragem na média e; (iv) seleção de intervalo.

2.3 - Resultados e Discussão

2.3.1 Estudo cinético multivariado empregando ferramentas multivariadas

A PCA foi usada para avaliar a estabilidade do AAS em diferentes pHs ao longo do tempo. A PC1 explicou 83,42 % da variância dos dados, como apresentado na Figura 2.1, e pode ser utilizada para acompanhar a estabilidade das soluções em cada pH.

As variações dos escores em função do tempo indicam mudanças nos espectros das amostras. É possível observar que o pH influenciou na estabilidade do AAS, visto que em diferentes pHs houve diferentes quedas dos scores ao longo

do tempo. Além disso, é possível observar que as amostras apresentam uma relação linear entre escores e tempo, o que indica uma cinética de pseudo-zero-ordem[76,77], onde o coeficiente angular da reta corresponde ao valor da constante cinética (km) de cada amostra. Já os principais picos responsáveis pela separação entre as amostras podem ser vistos no gráfico de *loadings*, apresentado na Figura 2.2.

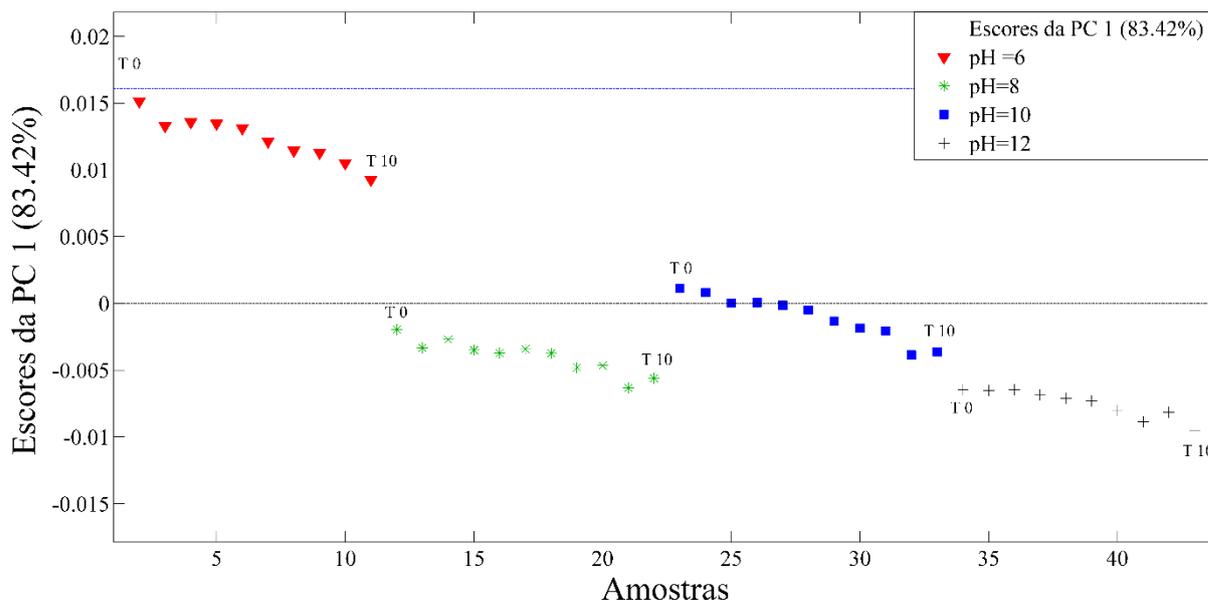


FIGURA 2.1- Gráfico de escores das soluções de AAS em diferentes pHs, obtidas em diferentes tempos.

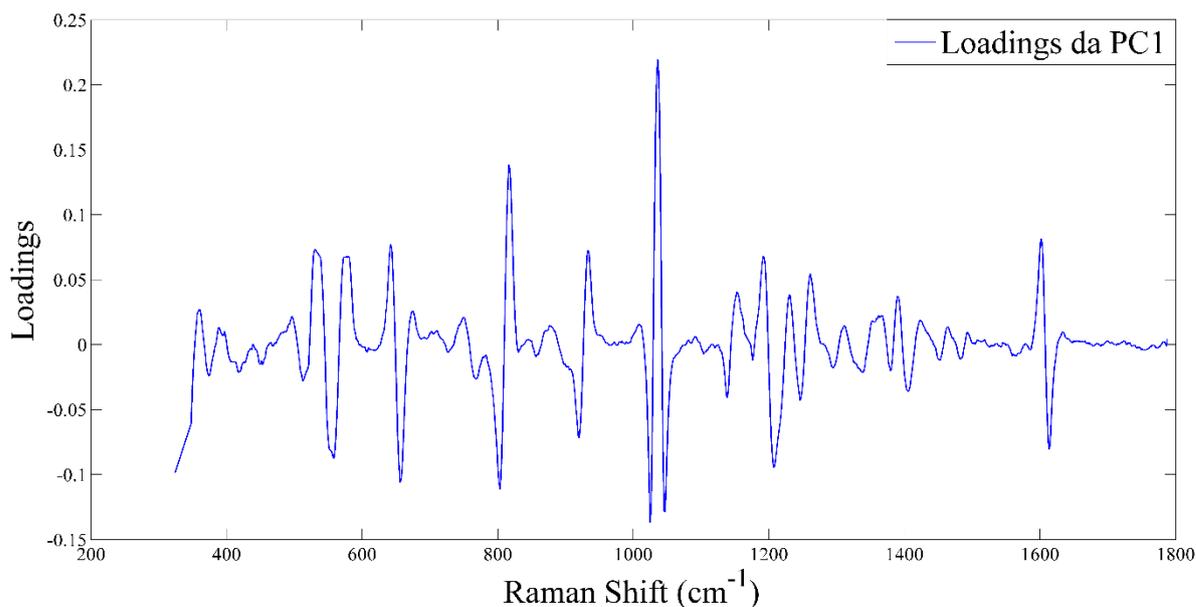


FIGURA 2.2- Gráfico de loadings da PC1.

De acordo com o gráfico de *loadings* é possível observar que as variáveis em 642, 816, 1036 e 1602 cm^{-1} foram as principais responsáveis na separação das amostras de pH 6, das demais. As bandas em 642 e 816 cm^{-1} correspondem a vibrações de estiramento de C-H fora do plano [78], próximo de 1036 cm^{-1} corresponde a vibrações do anel aromático, tais vibrações envolvem estiramentos C-H no plano que interagem com vibrações C=C [78–80]. Esta vibração apresenta mais contribuição no gráfico de *loadings*, isto pode estar relacionado à mudança dos modos vibracionais da molécula, devido à degradação do ativo. Já a variável em 1602 cm^{-1} , corresponde a vibrações C=O do grupo éster presente na molécula AAS [78,79].

Para este estudo foi selecionada a região entre 1050 e 1700 cm^{-1} das soluções de ácido acetilsalicílico com pH 6, pH 8 e pH 12, nos tempos 0, 1,5 e 8 h após o início do monitoramento. A seleção do tempo justifica-se pelo procedimento adotado na medição dos espectros. A Figura 2.4 mostra os espectros das soluções analisadas, nos tempos selecionados e os espectros puros do ácido acetilsalicílico (AAS) e do ácido salicílico (AS), principal produto de degradação do AAS (figura 2.3), com concentração de 3% m/v em pH 6.

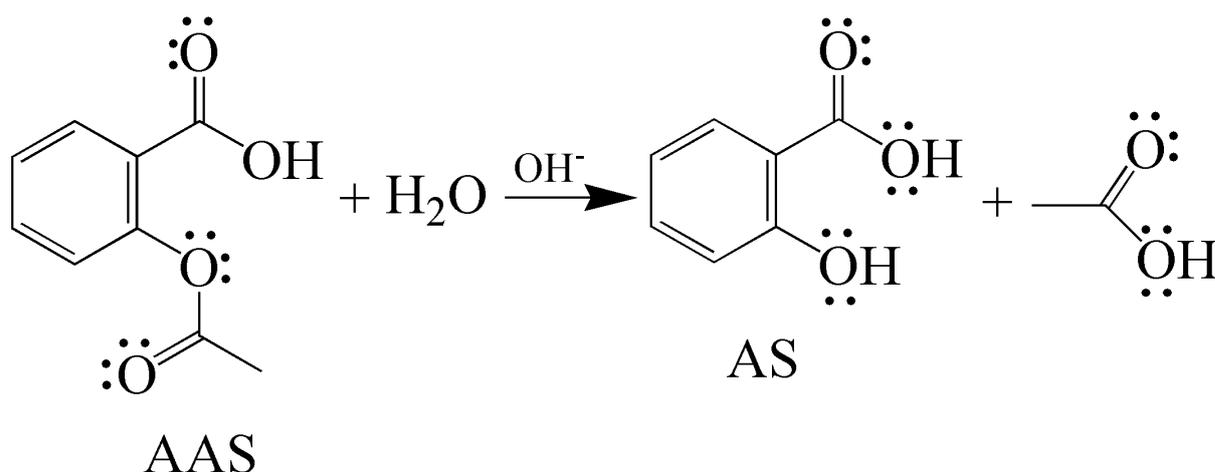


FIGURA 2.3- Hidrólise do AAS em meio básico.

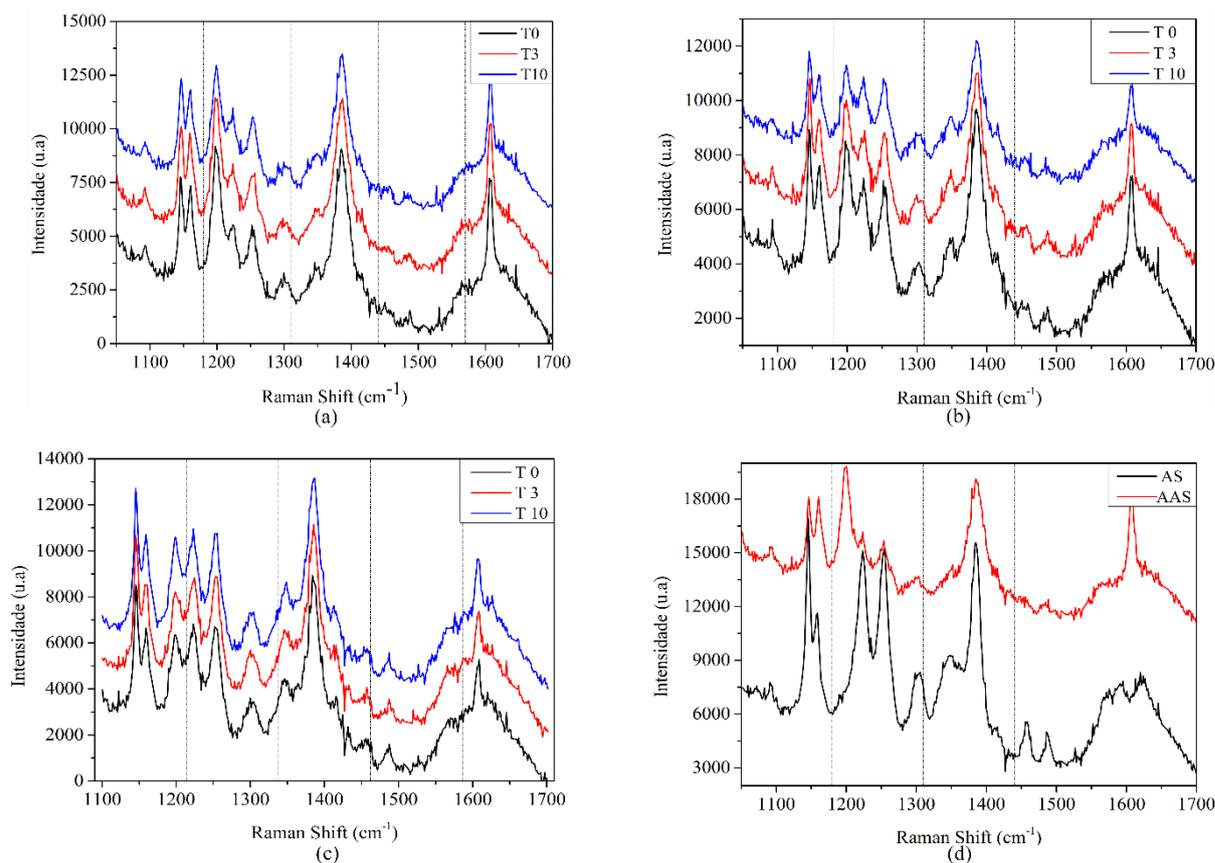


FIGURA 2.4- Espectros das soluções analisadas em (a) pH 6, (b) pH 8, (c) pH 12, e espectros de soluções de AAS e AS em pH 6.

O espectro do AAS apresentou mudanças na região de 1300 a 1050 cm^{-1} conforme o tempo, em todos os pHs estudados. Quando comparamos os espectros puros do AAS e AS (Figura 2.3d) com o espectro da solução de pH 6 (Figura 2.3a), observa-se que as bandas na região em estudo apresentam comportamento semelhante ao AAS nos tempos T0 e T3. No tempo T10 (8h), observa-se mudanças nos perfis de bandas próximo a 1350 cm^{-1} , como a diminuição da intensidade relativa do pico ao redor de 1200 cm^{-1} , por exemplo. Estas mudanças possivelmente estão relacionadas à degradação do AAS em AS, ao longo do tempo.

Os espectros das soluções de pH 8 e pH 12 (Figuras 2.3b e 2.3c, respectivamente), apresentaram correlação com o espectro do AS puro na região de 1300 e 1050 cm^{-1} já no início do monitoramento, indicando uma possível degradação do AAS, já nos tempos iniciais. Além disso, foi observado na solução

de pH 8 um aumento na intensidade da banda próximo a 1350 cm^{-1} e o aparecimento de uma nova banda em 1500 cm^{-1} , quando comparada aos espectros da solução de pH 6, corroborando com os dados apresentados no gráfico de escores do modelo PCA. Além disso, observamos a presença dessas bandas no espectro do AS, indicando que a degradação do AAS em AS ocorre rapidamente em valores de pH acima de seis, já no início do processo de dissolução do fármaco.

Por fim, observou-se uma diminuição da intensidade na banda próxima a 1600 cm^{-1} à medida que os valores de pH aumentam. Esta banda corresponde à vibração da ligação C = O do grupo éster, presente na molécula de AAS e ausente na molécula de AS, corroborando com a influência desta variável no gráfico de escores do modelo PCA.

2.3.2 - Análise Quantitativa

2.3.2.1 - Curva de Calibração

A curva analítica foi construída utilizando AAS padrão nas concentrações de 1 a 5% m/v, em pH 6. As medidas foram realizadas em triplicada, sendo a banda de intensidade próxima de 1605 cm^{-1} utilizada para quantificação do AAS. Foi obtida uma média de 3 espectros e a linha base foi corrigida utilizando mínimos quadrados ponderados (polinômio de segunda ordem). A calibração foi realizada de modo univariado, calculando a diferença de intensidade de cada concentração através da subtração do ponto máximo de absorção e da linha de base. Nesta etapa a variável escolhida como a linha de base, foi a mesma para todas as amostras analisadas (calibração e amostras comerciais). A curva de calibração apresenta uma equação linear do tipo $y = ax + b$ com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9906. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para $n = 10$ foram 0,205 % m/v e 0,623 % m/v respectivamente. A Figura 2.4 mostra o pico monitorado para a média de cada solução analisada e a curva de calibração obtida.

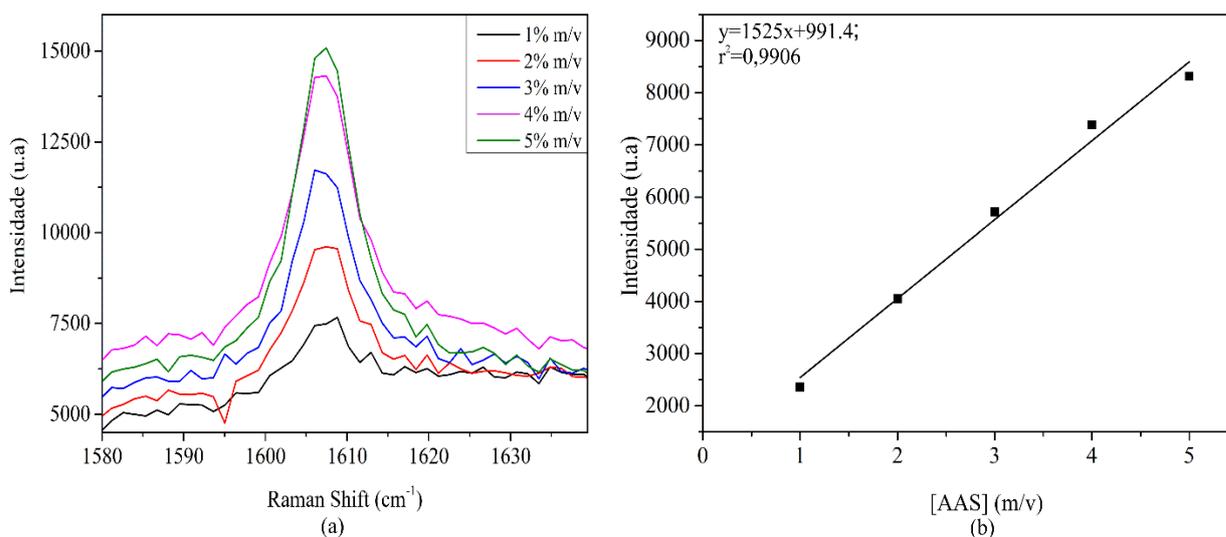


FIGURA 2.5- (a) Região dos espectros Raman utilizados para calibração na faixa de concentração de 1 a 5 % m/v; (b) Curva de calibração para o AAS.

2.3.2.2 - Quantificação de ácido acetilsalicílico em amostras comerciais

Dois medicamentos comerciais contendo AAS foram adquiridos em farmácias locais. As amostras foram analisadas em triplicatas. A tabela 2.1 mostra a média da concentração de AAS por comprimido, obtida por espectroscopia Raman e pelo método referência (CLAE). O teste-t foi aplicado para comparação de médias entre os métodos, Raman e CLAE, os valores de t calculado e t tabelado foram de 0,3 e 4,3, respectivamente, indicando que os dados não apresentaram diferenças significativas em um nível de confiança de 95%.

TABELA 2.1- Concentração de AAS em mg/comprimido obtidos por espectroscopia Raman e o método comparativo (CLAE), para os produtos A e B.

Marcas	Raman	CLAE	Rótulo	Erro relativo CLAE/Raman (%)
A	489 ± 3,0	486 ± 7,0	500	-0,63
B	481 ± 27	477 ± 11	500	-0,88

Método Raman e HPLC são dados em média ± desvio padrão (mg/comprimido), para n = 3.

Dessa forma, observa-se que o método por espectroscopia Raman apresenta algumas vantagens em relação ao método de referência, pois o primeiro é rápido, possui baixo custo, simples preparo da amostra e o não uso de solventes orgânicos, sendo dessa forma um método mais ecológico.

2.4 - Conclusão

A técnica Raman e a análise multivariada possibilitaram o estudo de estabilidade do AAS em diferentes pHs. A análise quantitativa univariada utilizando Raman, apresenta vantagens sobre os métodos comuns de quantificação do AAS utilizados pela literatura, como preparo mais simples da amostra, ausência de interferência espectral, possibilidade de quantificação univariada e método mais ecológico.

O método Raman foi capaz de obter limites de detecção e quantificação comparáveis ao método CLAE, com valores inferiores a 1 % m/v para ambos os produtos analisados.

**CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO
DA AMOSTRA NA ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE
FINGERPRINTS DE CERVEJA USANDO FTIR-ATR**

3.1 – Introdução e Objetivos

A cerveja é uma bebida milenar consumida mundialmente, e ao longo de vários anos, sofreu diversas alterações em seu processo de fabricação e nos constituintes da matéria-prima, principalmente nos cereais[81,82]. A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida em todo o mundo, sendo consumidos aproximadamente 190 bilhões litros de cerveja no ano de 2017, com o Brasil ocupando a terceira posição com um consumo de aproximadamente 14 bilhões de litros de cerveja no respectivo ano[83].

De acordo com a definição do ministério da agricultura pecuária e abastecimento, cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo[84]. No mercado brasileiro as cervejas do tipo *Lager* são as mais predominantes entre os consumidores, sendo as categorias *Standard American Lager (SAL)* e *Premium American Lager (PAL)* as mais comuns. A diferença entre as duas categorias encontra-se na concentração e na fonte de carboidratos em cada uma. A categoria PAL é caracterizada por apresentar em sua constituição malte de cevada puro, com nenhuma ou baixas concentrações de outros carboidratos[85,86]. Por outro lado, a categoria SAL utiliza além da cevada e outras fontes de carboidratos oriundos principalmente do arroz e milho, sendo permitido, de acordo com a legislação brasileira, uma quantidade de até 45 % de cereais não malteados em sua composição[35,50]. Além disso, cervejas da categoria SAL são consideradas mais leves e refrescantes.

Técnicas baseadas na espectroscopia vibracional como MIR, NIR e Raman, associadas a ferramentas quimiométricas, vem sendo cada vez mais empregadas na identificação de adulterantes, controle de qualidade e monitoramento de processos industriais em diversas matrizes alimentícias[87–91]. Porém, devido ao alto teor de água em cerveja, o uso de técnicas de absorção no infravermelho (próximo ou médio) encontra muitas limitações. No que se refere ao emprego da

técnica FTIR na análise de cerveja, encontra-se poucos trabalhos publicados na literatura. Biancolillo et al., fez uso das técnicas FTIR, NIR e UV-Vis, juntamente com ferramentas quimiométricas para avaliar cervejas artesanais italianas de alto valor agregado[92]. Castritius et al., fez uso da técnica FTIR e ferramentas quimiométricas para determinação de açúcar em amostras de cervejas usando a região de *Fingerprints* dos espectros MIR[7]. Chandravanshi e colaboradores empregaram a técnica FTIR para determinação direta de etanol e açúcar em fermentados alcoólicos utilizando PLS. Contudo, vale ressaltar que em todos os trabalhos citados os autores realizaram a análise das amostras de forma direta.

Diante disso, embora o FTIR seja uma técnica rápida e que fornece informações químicas importantes, ela não consegue extrair informações de compostos em baixa concentração, os quais poderiam gerar um *fingerprint*, e isso ocorre no caso de bebidas, devido ao alto teor de água. Com isso, a utilização de estratégia como a partição líquido-líquido, pode apresentar-se como uma alternativa para diminuir a influência da água na análise de alimentos e bebidas. Neste trabalho pretende-se, de forma inédita, empregar o uso da partição líquido-líquido e posterior evaporação do solvente, a fim de avaliar o potencial da técnica de FTIR-ATR na diferenciação de amostras de cerveja baseadas no *fingerprint* gerados pelos componentes minoritários presentes na fase apolar da partição. Após a análise por FTIR, os extratos orgânicos das cervejas foram analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massa (UPLC-MS), com o objetivo de identificar os possíveis compostos extraídos durante o processo de tratamento da amostra.

3.2 - Parte Experimental

3.2.1 - Materiais

Os reagentes utilizados nesta etapa foram acetato de etila (Neon, 99 %), propanona (Quemis, 99 %), acetonitrila grau CLAE (JT Baker), ácido fórmico PA

(Fluka) e água ultrapura (18,2 MΩ.cm) obtida em um sistema Mili-Q (Millipore, Bedford, MA).

Os equipamentos utilizados foram uma Centrifuga Eppendorf, modelo 5810R (Hamburg, Germany), um espectrômetro FTIR modelo IR Prestigie-21 (Shimadzu, Japão) equipado com um acessório de ATR de seleneto de zinco (ZnSe) (PIKE Technology, USA), um sistema Acquity-UPLC/MS equipado com detector PDA e QDA (Waters, USA), um banho ultrassônico Ultracleaner 1400 (Unique, Brasil), um agitador vórtex modelo Skyline (Elmi Ltd, Latvia) e um secador de cabelo Eleganza 2200 (Gama Italy, Brazil).

3.2.2 - Amostras

Ao todo, 8 marcas de cerveja da categoria SAL e 3 marcas de cerveja da categoria PAL foram adquiridas em diferentes supermercados localizados na cidade de São Carlos-SP, dentre estas as marcas mais consumidas no Brasil. A análise de tipos de cervejas semelhantes foi intencional, uma vez que cervejas de diferentes tipos (como *Stout* ou *Pale Ale*) seria facilmente diferenciada.

Para cada marca de cerveja foram adquiridas 9 latas de três diferentes lotes, ou seja, 3 latas para cada lote, totalizando dessa forma 99 amostras analisadas. As análises foram realizadas em triplicata para cada amostra (incluindo novas extrações), totalizando 297 extrações/medidas. Esse cuidadoso procedimento quanto ao número de amostras foi adotado devido à variabilidade intrínseca entre os diferentes lotes de cada marca, e também para avaliar a reprodutibilidade do preparo da amostra proposto neste trabalho. As informações sobre as marcas de cervejas escolhidas, localização das cervejarias e lotes estão presentes na Tabela 3.1.

TABELA 3.1- Descrição das amostras de cerveja de acordo com as marcas e lotes analisados neste estudo.

Amostras	Categoria	Marca	Lote	Local de produção
1	SAL	Antarctica	2313	JA
2	SAL	Antarctica	0740B	TM
3	SAL	Antarctica	16202	AG
4	SAL	Brahma	12:50	JA
5	SAL	Brahma	08:59	MG
6	SAL	Brahma	21:11	JC
7	SAL	Budweiser	22:432	PI
8	SAL	Budweiser	23:062	PI
9	SAL	Budweiser	21:492	PI
10	SAL	Cristal	11171410	SP
11	SAL	Cristal	11190450	SP
12	SAL	Cristal	11190451	SP
13	PAL	Heineken	L81855076N2006	JC
14	PAL	Heineken	L8139076N0921	JC
15	PAL	Heineken	L8053076N0903	JC
16	PAL	Império	L2121181058	PT
17	PAL	Império	L3420181535	PT
18	PAL	Império	L05281903	PT
19	SAL	Itaipava	12030138	PT
20	SAL	Itaipava	12030139	PT
21	SAL	Itaipava	12030140	PT
22	SAL	Kaiser	L8218076AD2041	PG

TABELA 3.1 Continuação...

Amostras	Categoria	Marca	Lote	Local de produção
23	SAL	Kaiser	L8267076G0214	JA
24	SAL	Kaiser	L88780873SP	SP
25	SAL	Proibida	L1802MG2022	MG
26	SAL	Proibida	L18226SP01	SP
27	SAL	Proibida	L1880SP01	SP
28	SAL	Skol	CM16:13	CM
29	SAL	Skol	PG2158A	PG
30	SAL	Skol	JA2021	JA
31	PAL	Stela	JC 01:04	JC
		Artois		
32	PAL	Stela	PI 09:592	PI
		Artois		
33	PAL	Stela	P109:552	JA
		Artois		

AG - Agudos; CM - Camaçari; JC - Jacaré; JA - Jaguariúna; MG - Minas Gerais; PT - Petrópolis; PI – Pirai - RJ; PG - Ponta Grossa; SP - São Paulo; TM - Triângulo Mineiro (MG).

3.2.3 Preparo das amostras

Uma alíquota de aproximadamente 20 mL de cerveja foi transferida para um béquer de 25 mL e levada para o processo de degaseificação usando um banho ultrassônico durante 3 minutos a temperatura ambiente. Após a retirada do gás, uma alíquota de 5 mL de cerveja foi transferida para um tubo Falcon e foram adicionados 2 mL de acetato de etila. O tubo foi lacrado e levado para agitação em um agitador vórtex há uma rotação de 4000 rpm durante 3 minutos. Após a

agitação as amostras foram centrifugadas há uma rotação de 5000 rpm durante 5 min.

Após a centrifugação, uma alíquota de 500 μL do extrato orgânico sobrenadante foi adicionado sobre o cristal do acessório de ATR e levado ao processo de secagem com auxílio de um secador. O secado foi posicionado em um suporte fixo distante 20 cm do cristal do ATR. A secagem foi realizada durante 5 minutos a uma temperatura controlada de 50 $^{\circ}\text{C}$, nesta etapa a checagem da temperatura foi realizada com auxílio de um termômetro de mercúrio posicionado sobre o cristal. A Figura 3.1 mostra a representação esquemática do processo de secagem.

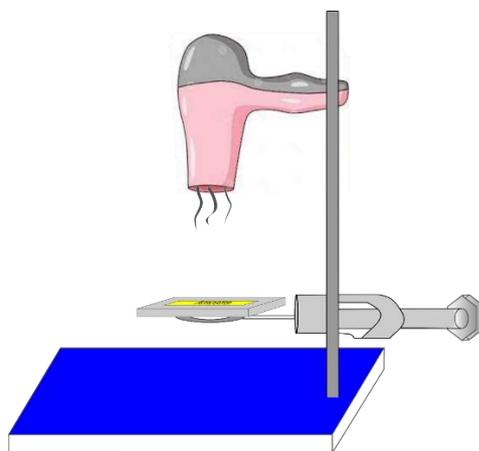


FIGURA 3.1- Representação esquemática do processo de secagem dos extratos orgânicos de cerveja

Vale ressaltar que as réplicas das amostras de um mesmo lote foram analisadas em dias diferentes sem condições ambientes controladas. Esse procedimento foi adotado para avaliar a variabilidade interdia do processo de extração/preparo da amostra.

3.2.4 - Medidas FTIR

Após a secagem dos extratos das amostras, o acessório de ATR foi acoplado ao espectrômetro FTIR e realizada a coleta dos espectros. Os espectros foram

obtidos em uma faixa espectral de 4000-650 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} e 32 *scans*. Após adquirir cada espectro, o suporte de ATR foi removido e limpo com água ultrapura e propanona, passando por secagem antes da realização de uma nova medida. Antes de cada nova medição, uma leitura do branco era obtida a fim de descontar possíveis resíduos de solvente ou de amostra da análise anterior. A Figura 3.2 apresenta os 297 espectros coletados sem qualquer pré-processamento.

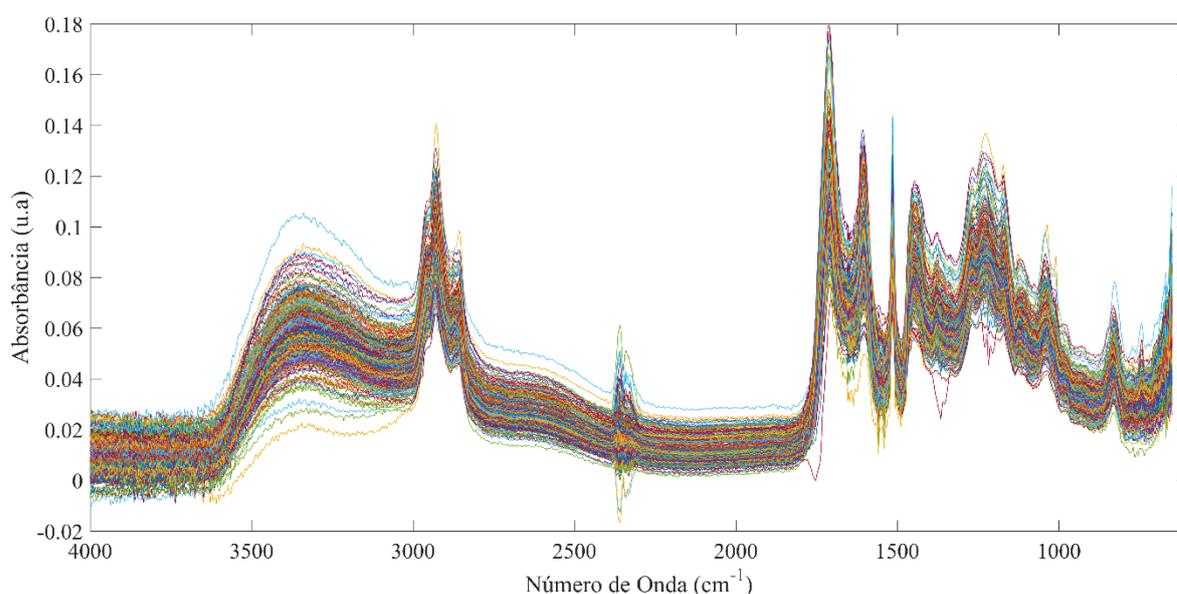


FIGURA 3.2- Espectros FTIR dos extratos de cerveja analisadas.

3.2.5 - Análise dos dados

O tratamento quimiométrico dos dados foi realizado usando o software MATLAB versão 2011a (Mathworks,USA). Os espectros foram organizados na forma de uma matriz de dimensões $i \times j$, onde i e j representam amostras e variáveis, respectivamente. Os dados foram tratados usando os seguintes passos: (i) foi aplicado o método da primeira derivada, utilizando o algoritmo de *Savitzky-Golay*, com uma janela de 15 pontos; (ii) foi realizada uma seleção de variáveis utilizando as faixas espectrais 935 : 1186 cm^{-1} ; 1398 : 1487 cm^{-1} e 1591 : 1707 cm^{-1} ; (iii) foi realizada a normalização por área com objetivo de reduzir possíveis

efeitos de intensidade do sinal devido a variações na extração e na posição do extrato sobre o cristal ATR e; (iv) foi realizada a centragem dos dados na média.

3.2.6 - Análise de Referência

A análise qualitativa dos extratos orgânicos foram realizadas usando um sistema Waters Acquity-UPLC (Waters, Milford, MA, USA) equipado com um sistema de injeção automática. As eluições cromatográficas foram realizadas usando uma coluna C8 (1,70 μm , 2,1 x 100 mm, Acquity UPLC BEH, Waters, Milford, MA, USA) a 40 °C.

A fase móvel consistiu de (A) água : ácido fórmico (99,75 : 0,25, v/v) e (B) acetonitrila : ácido fórmico (99,75 : 0,25, v/v), com o seguinte gradiente de eluição: 0 - 2 min (5 % B), 2 - 14 min (5→95 % B), 14 - 17 min (95 %), 17 - 23 min (95→5 % B) e 23 - 25 min (5 %), e vazão de 0,5 mL min⁻¹. O Volume de injeção foi de 10 μL e o comprimento de onda de 254 nm do detector de arranjo de fotodiodos foi usado para monitorar a eluição dos compostos.

Já os experimentos de espectrometria de massa (MS) foram realizados usando um detector quadrupolo simples (Waters, Milford, MA, USA) equipado com fonte ESI (ionização por *eletrospray*) em polaridade negativa nas seguintes condições: Voltagem do cone em 20 V, pressão de nebulização entre 6 - 7 bar, temperatura da probe em 500 °C, voltagem capilar em 80 V e faixa de aquisição de 100 - 950 *m/z*.

Nesta etapa, 33 amostras de cervejas (1 lata para cada lote) foram analisadas em duplicata, totalizando 66 medidas. O preparo da amostra seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente (seção 3.2.3). Para injeção no sistema UPLC-MS, uma alíquota de 2 ml do extrato orgânico foi adicionada a um béquer e seco com auxílio de um secador, distante de 20 cm do béquer há uma temperatura de 50 °C durante 20 minutos. Após etapa de secagem, o extrato seco foi dissolvido em 5 ml de acetonitrila e levado para o banho ultrassônico durante

3 minutos. Posteriormente, uma alíquota de 1 ml da mistura foi transferida para um *vial* e levado para o amostrador automático do equipamento.

3.3 - Resultados e Discussão

3.3.1 - Análise Espectral

Amostras de cerveja apresentam em sua composição cerca de 90 a 92% m/m de água [38], e 4 a 6 % de etanol. O propósito de realizar a partição líquido-líquido era eliminar (ou pelo menos reduzir) a interferência de água e de etanol, possibilitando a avaliação dos *fingerprints* formados pelos componentes minoritários das amostras. Além disso, por estarem presente em pequenas quantidades, tais compostos não poderiam ser detectados por FTIR sem o pré-tratamento da amostra. Na análise quimiométrica dos espectros foi realizada uma seleção prévia das variáveis, desconsiderando também as bandas de absorção de gás carbônico presentes nos mesmos. A Figura 3.3 apresenta os espectros dos extratos de cerveja, após a primeira derivada.

As bandas de absorção entre 3600 e 2500 cm^{-1} (figura 3.2), são geralmente relacionadas a vibrações de estiramentos O-H, N-H e C-H. Considerando o comportamento químico dos extratos de acetato de etila, as vibrações de O-H podem ser oriundas de ácidos carboxílicos, álcoois/grupos hidroxilas e água, que exibem absorção de muito intensa nessa faixa espectral[93]. As vibrações de estiramento de ligações N-H podem vir de vibrações simétricas e assimétricas de amidas primárias e secundárias, que absorvem próximo a 3350 e 3180 cm^{-1} [93,94]. Picos de absorção C-H aparecem usualmente entre 3000 e 2800 cm^{-1} e estão relacionados a cadeias alifáticas de grupos metil e metileno em carboidratos e gorduras.[5,38,93,95,96].

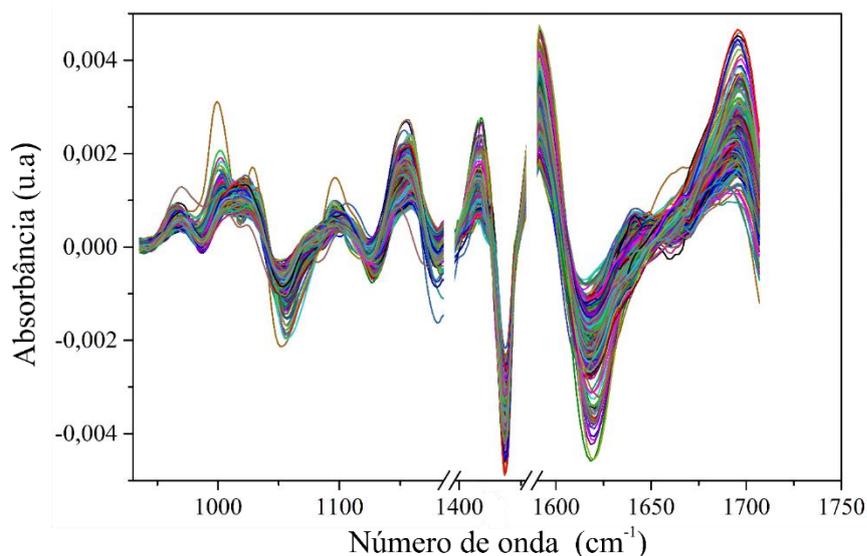


FIGURA 3.3- Espectros dos extratos de cerveja após a etapa de seleção de variáveis e alisamento

A forte absorção ao redor de 1715 cm^{-1} corresponde a vibrações de estiramento de $\text{C}=\text{O}$, podendo ser oriundos de ácidos carboxílicos e ésteres, que são compostos geralmente presentes em extratos de acetato de etila[93,95]. Já as absorções por volta de 1600 cm^{-1} podem ser de atribuídas a estiramentos da insaturação $\text{C}=\text{C}$, isolada ou conjugada, ou flexões de ligações N-H de amins, oriundas da degradação de proteínas do malte e ácidos nucleicos [81,93,96].

A região entre 1500 e 950 cm^{-1} é chamada de região de impressão digital (*fingerprints*), onde é difícil de atribuir bandas para uma única vibração molecular em uma matriz complexa como os extratos de cervejas analisados. Além disso, tais atribuições se tornam inviáveis, pois não se trata de uma única substância, mas sim uma mistura, dando origem a espectros que representam a soma de diferentes padrões de absorção [95,97–99]. Já os picos de absorção próximos a 830 cm^{-1} podem ser atribuídos a vibrações de estiramento de ligações $\text{C}-\text{C}$, sendo de pouco valor para a identificação dos compostos [93,99].

3.3.2 - Análise Exploratória

A análise exploratória das cervejas foi realizada usando Análise de Componentes Principais após o pré-tratamento dos dados. A Figura 3.4 mostra o gráfico de escores da primeira e segunda componentes principais, que somadas apresentam 57.51 % da variância dos dados.

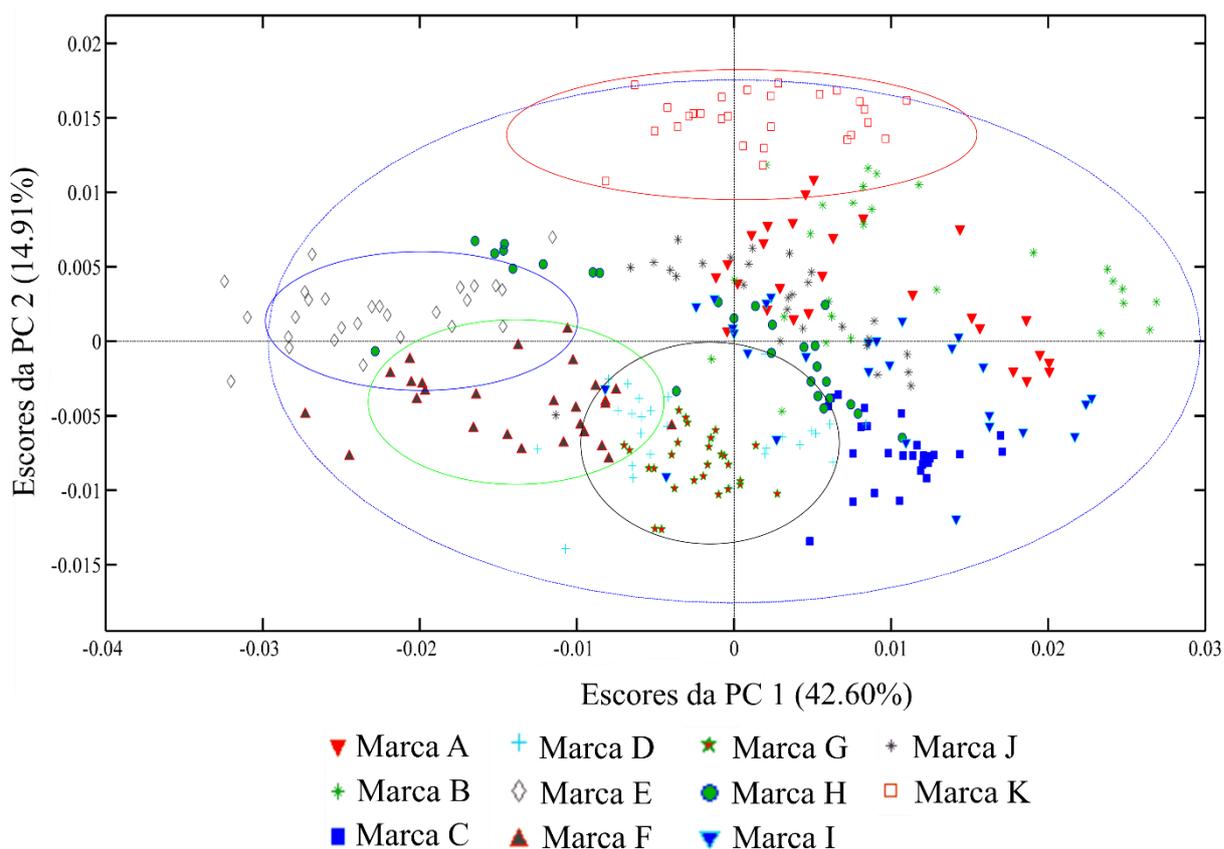


FIGURA 3.4- Gráfico de escores da PC1 x PC2.

A Figura 3.4 apresenta os escores da PCA para todos os 297 espectros. A distribuição das amostras no gráfico de escores, é resultado da similaridade entre os espectros de FTIR dos extratos de cada amostra, com base nos compostos minoritários presentes na fase orgânica da partição, encontrados em cada amostra. À primeira vista, o gráfico de escores parece confuso, no entanto, precisamos levar em consideração que:

- A análise foi realizada usando cada replica das triplicatas em vez de usar a média. Esse procedimento foi intencional, com o objetivo de avaliar a variabilidade das extrações entre as triplicatas e os lotes;
- Todas as amostras são do mesmo tipo de cerveja, sendo, portanto, de composição muito similar. Outros tipos de cervejas, como *Stout* ou *Pale Ale*, seriam facilmente agrupados;
- A variabilidade intrínseca da matéria-prima utilizada em cada lote;
- A variabilidade intrínseca do processo industrial na produção de cerveja, em cada lote;
- A variação da composição química das cervejas ao longo do tempo (o prazo de validade dessas cervejas varia de 6 a 12 meses);
- A variabilidade do processo de extração.

As cervejas da categoria PAL, na Figura 3.4 (marcas K, E e F estão destacadas nas elipses vermelha, azul e verde, respectivamente) estão agrupadas em distintas regiões no gráfico de escores da PC1 x PC2. Tais resultados estão de acordo com o esperado ponto de vista quimiométrico, pois já que as amostras da categoria PAL apresentam algumas diferenças em sua composição comparadas com a maioria das outras cervejas analisadas, espera-se que as amostras dessa classe apareçam nos extremos das PCs no gráfico de escores. A Figura 3.5 apresenta o gráfico de *loadings* da PC1, PC2 e PC3 para o modelo PCA obtido.

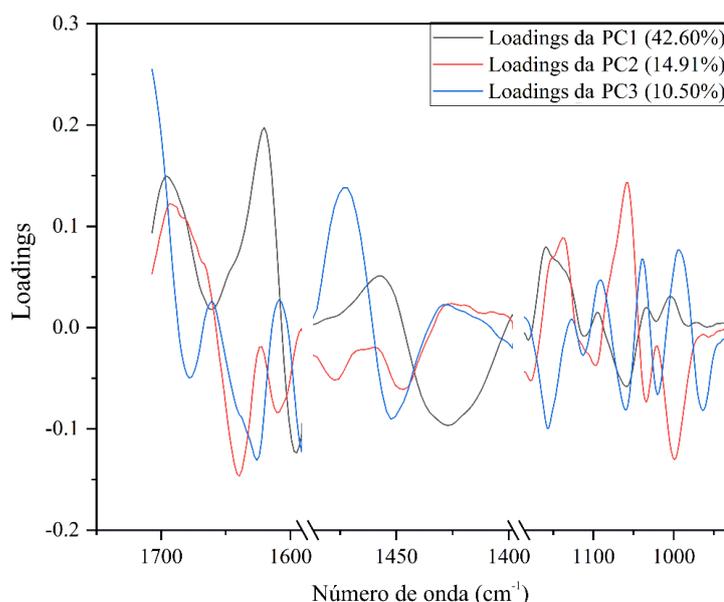


FIGURA 3.5- Gráfico de *loadings* da PC1, PC2 e PC3

As variáveis mais importantes na PC1 (42.60 % da variância explicada) são as que estão próximas a 1700 cm^{-1} (C = O) e 1600 cm^{-1} (C = C e/ou N - H), indicando diferentes conteúdos de ácidos carboxílicos, ésteres e compostos insaturados. Já a PC2 traz 14,91 % da variância explicada, e os números de onda em torno de 1700 e 1600 cm^{-1} também apresentam uma grande importância, apesar dos *loadings* em torno de 1600 cm^{-1} na PC2 serem opostos aos da PC1. O número de onda em torno de 1200 cm^{-1} apresenta valores de pesos similares para ambas as PC's. Os *loadings* próximos de 1100 e 1000 cm^{-1} estão intensos na PC2 e opostos aos da PC1. A região entre 1000 e 1250 cm^{-1} usualmente apresenta intensa absorção para vibrações de estiramento de C-O, de ácidos, ésteres, éteres e álcoois ou de bandas de ligações N-H não conjugadas provenientes de amins alifáticas primárias, secundárias ou terciárias[38,93].

Os números de onda próximo de 1425 cm^{-1} na PC1 também apresenta grande importância no agrupamento das amostras, com *loading* negativo. De acordo com o estudo proposto por Lohumi et. al (2015) essa região foi adotada como para a determinação e estimativa de carboidratos (polissacarídeos) em uma variedade de diferentes produtos alimentícios[98].

A separação entre as marcas da mesma classe de cerveja está relacionada com as diferentes matérias-primas utilizadas, água e fatores relacionados ao processo de fabricação, como tempo de fermentação e temperatura, grau maturação do mosto e armazenamento.

Outra importante observação no gráfico de escores (Figura 3.4) é o agrupamento entre as amostras da marca D e G (elipse preta), que pertencem a categoria SAL. De acordo com o gráfico, é possível observar que estas amostras apresentam alta similaridade apesar de pertencerem a marcas diferentes. Tal fator pode ser explicado pelo fato destas cervejas serem produzidas no mesma região e/ou cervejaria, portanto eles provavelmente usam matéria-prima semelhantes, água e alguns parâmetros similares de processo em sua produção.

A fim de estender a análise de correlação entre localização/cervejaria e agrupamento, realizamos uma PCA utilizando somente as três marcas de cervejas mais consumidas da categoria SAL no Brasil, sendo todas da mesma empresa, mas sendo cada lote da mesma marca produzidos em diferentes locais e/ou cervejarias. As marcas analisadas foram A (de JA, TM e AG), B (de JA, MG e JC) e J (de JA, PG e CM), conforme a Tabela 3.1. A Figura 3.6 apresenta o gráfico de escores obtido do novo modelo PCA calculado para as marcas A, B e J.

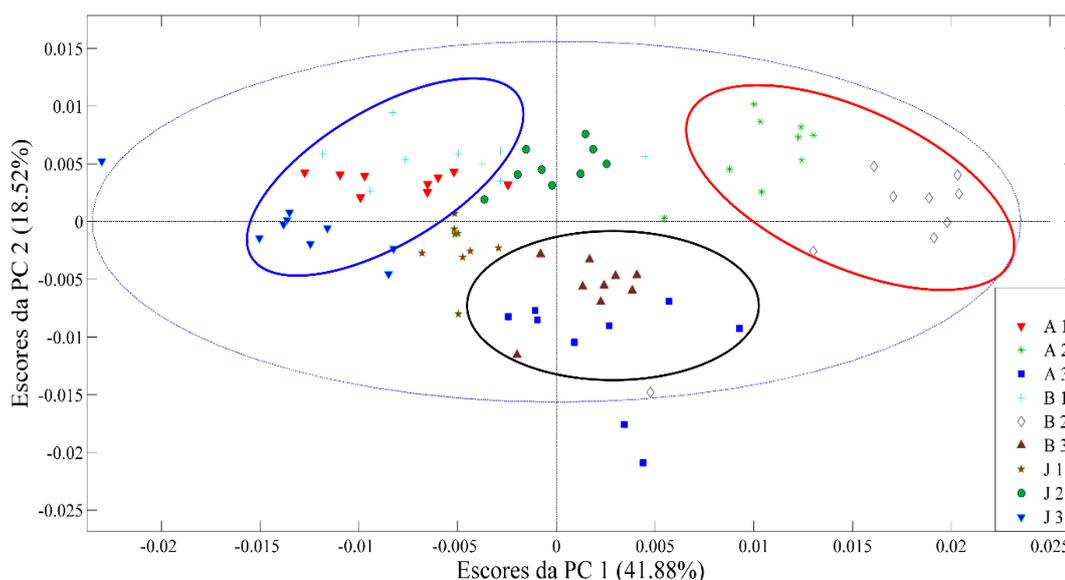


FIGURA 3.6- Escores da PC1 X PC2 para as marcas A, B e J, as mais consumidas no mercado brasileiro.

Uma análise da Figura 3.6 nos mostra que:

- Lotes produzidos na mesma cervejaria localizadas no estado de Minas Gerais (Brasil) estão próximos um do outro (elipse vermelha). A formação desse grupo está relacionada à parte positiva da PC1 com pouca influência da PC2;
- Lotes produzidos na cidade de Jaguariúna, localizada no estado de São Paulo, estão próximos um do outro (elipse azul). A formação desse grupo está relacionada com a parte negativa da PC1 com pouca influência da PC2;
- Já os lotes A3 e B3 foram os demais lotes fabricados no estado de São Paulo (elipse preta). A formação desse grupo está relacionada com a parte negativa da PC2 com pouca ou nenhuma influência da PC1.

Ao analisar os lotes de marcas individuais, observa-se uma tendência de separação dos lotes. Esta tendência é mais pronunciada para as marcas A e B do que em J. Tais observações podem estar relacionadas a variáveis incontrolláveis no processo de fabricação das cervejas como transporte, estocagem, fatores climáticos de diferentes cidades (ou até climas diferentes na mesma cidade com

lotes produzidos no inverno ou verão), entre outros, pois mesmo para uma mesma marca, às vezes os lotes apresentam perfis diferentes, e marcas diferentes produzidas na mesma localidade/cervejaria apresentam perfis semelhantes na análise.

Tais resultados mostram o potencial do uso do tratamento das amostras previamente à análise por FTIR. Pois seria praticamente impossível a obtenção de tais resultados através da análise direta das amostras devido ao alto teor de água e etanol. Um simples tratamento da amostra pode abrir um novo horizonte de possibilidades na utilização da espectroscopia vibracional, possibilitando ser possível detectar diferenças entre as amostras em um baixo percentual em massa (cerca de 0,2 mg da massa da fase orgânica seca), proporcionando o manuseio de informações de compostos minoritários que seriam indetectáveis em uma análise direta. No exemplo deste trabalho, o FTIR e a PCA apresentam-se como ferramentas eficazes a serem utilizadas no controle de qualidade da indústria cervejeira, por exemplo, para monitoramento da reprodutibilidade entre os lotes, o que poderia ser posteriormente estendido para o estabelecimento de correlações entre matéria-prima, parâmetros de processo e parâmetros sensoriais.

3.3.3 - *Análise de Referência*

Um sistema UPLC-MS foi utilizado para identificar alguns compostos orgânicos que poderiam estar influenciando nos agrupamentos obtidos pela análise PCA/FTIR. A Tabela 3.2 mostra as relações massa/carga (m/z) obtidas dos espectros de massa da análise UPLC-MS, realizadas para as amostras mais consumidas da categoria Standard American Lager. Para análise dos dados, foram selecionados apenas os picos mais intensos de m/z .

TABELA 3.2- Relação m/z das marcas mais consumidas da categoria Standard American Lager.

Tempo de retenção/Lotes	A1	B1	J3	A2	B2	A3	B3
	m/z			m/z		m/z	
7,885	329	329	329	329	329	329	329
10,492	347	347	347	347	347	347	347
10,907	361	361	361	361	361	361	361
11,631	351	351	351	311	311	311	311
11,981	365	365	365	365	365	351	351
12,158	325	325	325	325	325	365	365
12,894	339	339	339	-	-	325	325
13,169	-	-	-	-	-	339	339

Ao analisar o espectro de massa dos extratos de cerveja, observa-se que a maioria dos possíveis compostos identificados na literatura, são obtidos da espécie *Humulus Lupulus Linnaeus*. Estas espécies pertencem a família das *Cannabaceae* sendo responsáveis por fornecer diversos compostos que conferem à cerveja características sensoriais e importantes, como o amargor, propriedades antioxidantes e aromas[100].

De acordo com os dados da Tabela 3.2, observa-se que o composto com m/z 311,26 está presente nos lotes dois e três das marcas A e B. Tal m/z pode combinar isômeros da *Apegnin-C-Hexoside-O-Hexoside* e *Apeginin-C-Hexoside*, obtidos a partir dos fragmentos de íons moleculares dessas espécies[101]. Esses compostos pertencem a classe das flavonas, que são metabolitos secundários com propriedades antioxidantes, presentes no lúpulo utilizado durante o processo de fermentação, sendo sua presença na cerveja relatada no trabalho de Gerhäuser et. al (2012) e confirmado usando CLAE-MS por Quifer-Rada et al. (2015)[101,102].

Já o composto com m/z de 325 pode estar relacionado com o íon molecular do ácido cumárico-O-Hexoside[101], composto fenólicos derivado do ácido hidroxicinâmico. Estes compostos são metabolitos secundários obtidos da

transformação de fenilpropanoides em L-fenilalanina e tirosina e ácido cinâmico, que é posteriormente hidroxilado a partir do ácido p-cumárico[100,103]. As espécies de razão m/z 339 podem estar relacionadas com isômeros do íon molecular denominado de 8-prenilnaringenina e 6-prenilnaringinina[101,104]. Estes compostos são fitoestrógenos derivados da xantohumanol pertencentes à classe dos prenilflavonóides, que são encontrados no lúpulo em uma faixa de concentração de 0,2 a 0,6% e estão presentes nas classes de compostos denominadas de resinas duras[101,104,105].

Os compostos com razão m/z 329 podem corresponder à fragmentação molecular do íon iso- α -Cohumulona. Estes compostos pertencem a classe dos alfas ácidos, denominados de resinas macias, e correspondem a uma faixa de 5-21 % do total de massa do lúpulo[100,106]. As espécies de m/z 347 podem corresponder aos compostos identificados de Cohumulona ou seus isômeros Cis e Trans, denominados de Iso- α -Cohumulona [94,101,104,106–108]. Já as espécies de razão m/z 347, podem corresponder ao isômero do íon molecular da lupulona, denominado de epoxycohulupona[109]. Estes compostos correspondem a frações beta (β) de resinas macias denominadas de beta ácidos. Os β -ácidos são compostos menos ácidos quando comparados com os α -ácidos, e correspondem a uma faixa de 3-8% da massa total das resinas, sendo a lupulona e seus análogos os compostos presentes em maior quantidade[100,109].

Os compostos de razão m/z 351 e 365 podem estar relacionados a análogos da humulona como cis-tetrahydro-isocohumulona, adhumulona e isohumulona[101,104,106,108]. As humulonas são uma classe de compostos com propriedades antioxidantes, pertencente à classe dos α -ácidos. A contribuição desses compostos para o processo de fermentação consiste em conferir ao produto um sabor amargo, proporcionando um equilíbrio entre a doçura do malte e uma sensação de frescor. Além disso tais compostos contribuem para a não formação de compostos de sabor desagradável, quando expostos a luz, além contribuir na estabilidade da espuma da cerveja.

Na análise das marcas da categoria PAL, observa-se diferentes razões m/z nas marcas F e K quando comparadas às marcas não premium. A Figura 3.7 mostra os espectros de massa das amostras das marcas F e K, respectivamente, em diferentes tempos de retenção.

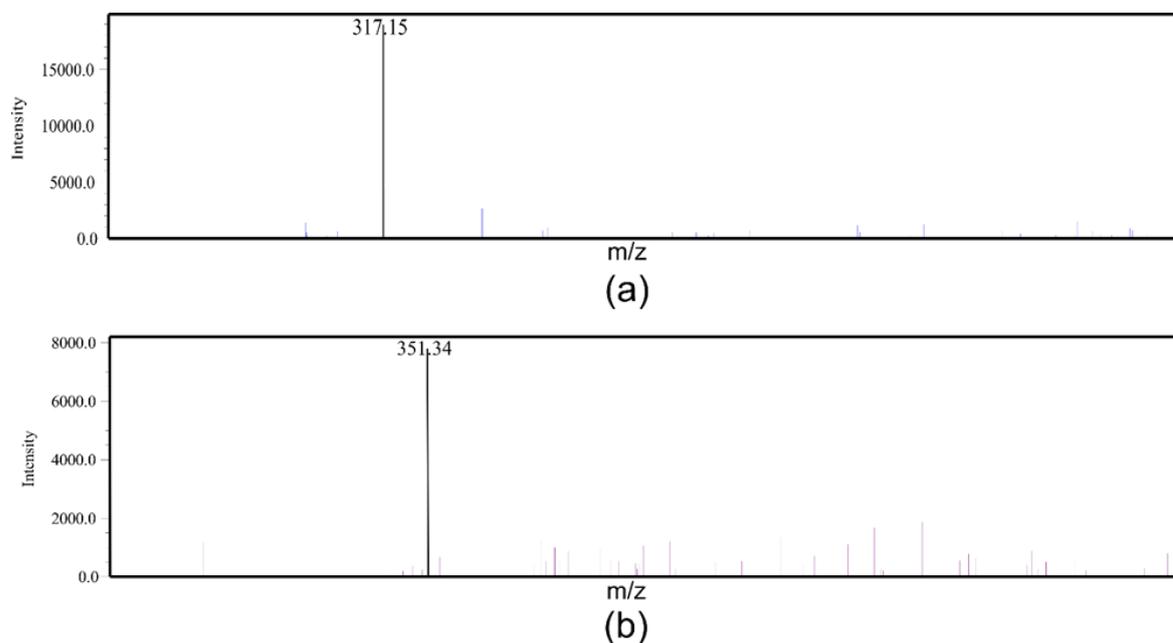


FIGURA 3.7- Espectro de massa dos extratos orgânicos: (a) Marca F da categoria PAL no tempo de retenção de 9,39 min; (b) Marca K da categoria PAL no tempo de retenção de 11,735 min.

Os compostos de razão m/z 317 observado nas amostras da marca F podem corresponder aos análogos da humulona, denominado de cohulupona[109]. As huluponas e seus análogos, são metabolitos secundários pertencentes a classe dos β -ácidos, denominadas de resinas- δ . Tais compostos representam uma fração de 0.5-3 % em massa no lúpulo, e são produzidas através da oxidação dos β -ácidos durante o processo de fervura do mosto[100].

Já o composto de razão m/z 351 foi observado nas amostras da marca K e não detectado nas marcas E e F. A presença desse composto nas amostras da marca K, pode estar relacionado com o processo de fabricação, pois mesmo

pertencendo à categoria PAL, essas marcas possuem cerca de 5% do malte de sua composição oriundos do milho.

3.4 - Conclusão

O uso da técnica de FTIR-ATR com o preparo da amostra mostrou-se ser uma ferramenta analítica interessante, permitindo o estudo exploratório das amostras considerando os componentes minoritários, e permitindo realizar análises até então inviáveis quando realizadas de forma direta. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a metodologia empregada pode ser considerada inovadora na análise qualitativa de componentes orgânicos minoritários, como polifenóis, ácidos orgânicos e flavonoides em amostras comerciais de cerveja.

Além disso, verificou-se que a abordagem utilizada permitiu o agrupamento de diferentes marcas de cerveja muito semelhantes, bem como a capacidade de diferenciar cervejas da mesma marca de acordo com diferentes locais de produção. Dessa forma, esta análise tem grande potencial na identificação e controle de adulteração de cerveja, controle de qualidade, reprodutibilidade do processo e rastreabilidade.

**CAPÍTULO 4 - SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA
PARA DETERMINAR DE ETANOL EM BEBIDAS POR
ESPECTROSCOPIA RAMAN**

4.1 - Introdução e Objetivos

Bebidas alcoólicas são misturas complexas contendo água e etanol como componentes majoritários, sendo que compostos secundários incluem aromatizantes, carboidratos, metabolitos secundários e outros. O etanol presentes nas bebidas é originado a partir do processo de fermentação e da destilação (dependendo da bebida) de frutas e açúcares de cereais sob estrito controle físico-químico e biológico para atender às especificidades de cada bebida[110]. O monitoramento do percentual de etanol em bebidas alcoólicas é um importante parâmetro no controle e autenticidade de bebidas e identificação de adulterantes.

De acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira, o percentual de etanol em bebidas é realizado por método densimétrico [111,112]. Além disso, vários outros métodos utilizando diferentes técnicas analíticas como amperometria, biosensores, espectroscopia MIR, espectroscopia NIR e espectroscopia de imagem digital, são reportados na literatura para determinação quantitativa de etanol em bebidas[110,113–117]. Poucos trabalhos abordam o uso da espectroscopia Raman na análise e determinação de compostos em bebidas[48,57,118]. Dentre as principais dificuldades encontradas pelos autores, destaca-se a presença de interferentes causadas pelo fundo fluorescente nos espectros Raman. Dessa forma, estratégias que visem diminuir tais interferências causadas por efeitos de matriz, são importantes para ampliar o uso da espectroscopia Raman na análise de alimentos e bebidas. Uma das possíveis estratégias que podem ser aplicadas para minimizar a fluorescência das amostras, é o uso de soluções capazes de oxidar as espécies que causam fluorescência e conseqüentemente a promover a supressão da mesma, permitindo dessa forma, a análise quantitativa de componentes majoritários por espectroscopia Raman.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo a supressão da fluorescência molecular em amostras de cerveja, vinho e uísque para determinação quantitativa de etanol. Para tal, foi usada uma solução comercial de

hipoclorito de sódio para promover a oxidação das espécies interferentes e possibilitar, dessa forma, a análise dessas amostras por espectroscopia Raman.

4.2 - Materiais e Métodos

4.2.1 - Materiais

Os reagentes utilizados nesse estudo foram etanol ($\geq 99,9\%$, Honeywell, Alemanha), solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5% v/v), filtro de seringa hidrofílico PVDF (Analítica, Brasil) e água ultrapura (resistividade 18,2 M Ω .cm) obtida de um sistema Milli-Q (Millipore Direct-Q 3UV, Bedford, MA).

Os aparatos utilizados foram uma centrífuga (Kasvi, modelo K14-4000 PRF, China); agitador Vortex modelo Skyline (Elmi Ltd, Latvia); espectrômetro Raman *B&W Tek i-Raman*, modelo BWS 415-785HG, equipado com software *B&W Spec 3.27*. O comprimento de onda de excitação do laser foi de 785 nm, o tempo de integração de cada espectro obtido foi de 180 s, com 100% da potência do laser (320 mW); um banho ultrassônico (Unique, modelo USC-14, Brasil).

4.2.2 - Amostras

As amostras foram obtidas em diferentes supermercados localizados na cidade de São Carlos-SP. No total, 8 amostras de bebidas foram adquiridas, sendo 2 marcas de cerveja da categoria SAL; 2 marcas de cerveja da categoria PAL; 2 marcas de vinho tinto e 2 marcas de uísque. Além disso, foram obtidas amostras zero álcool de cerveja SAL e PAL e de vinho.

4.3 - Preparo da Amostra

4.3.1 - Vinho

Uma alíquota de 15 mL de vinho foi transferida para um tubo Falcon e posteriormente levada para centrifugação durante 5 min a uma rotação de 4000

rpm. Após a centrifugação, 5 mL da amostra foi adicionada a um balão volumétrico de 25 mL, e completado seu volume com água e homogeneizado.

Posteriormente, em triplicata, 5 mL da solução diluída foi transferida para um tubo Falcon e adicionado 500 µL da solução de hipoclorito de sódio e levado para agitação em um agitador vórtex durante 3 min a uma rotação de 4000 rpm. Após a agitação, a amostra foi levada para centrifugação a uma rotação de 4000 rpm durante 5 min, em seguida, após filtragem da amostra, foi coletado o espectro Raman.

4.3.2 - Uísque

Para a amostra de Uísque, uma alíquota de 1,25 mL da amostra foi adicionada a um balão volumétrico de 25 mL, completado o volume com água e homogeneizado. Posteriormente, em triplicata, 5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo Falcon e adicionado 50 µL da solução de hipoclorito, em seguida o tubo foi agitado em um tubo vórtex a uma rotação de 4000 rpm durante 3 minutos. Após a agitação, a solução foi filtrada com filtro de seringa e foi coletado o espectro Raman.

4.3.3 - Cerveja

As amostras foram levadas para desgaseificação usando um banho ultrassônico durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, uma alíquota de 12,5 mL de cerveja foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, completado o volume com água e homogeneizado. Posteriormente, em triplicata, 5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo Falcon e adicionada 500 µL da solução de hipoclorito, agitado em um agitador vórtex a 4000 rpm durante 3 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada durante 5 minutos a uma rotação de 4000 rpm, filtrada com um filtro de seringa e coletado o espectro Raman.

4.4 - Curva de Calibração

Para a construção da curva de calibração foram preparadas em triplicata cinco soluções de 1 a 5 % v/v de etanol. Para as amostras de cerveja e vinho a construção das curvas de calibração foram realizadas usando as amostras zero álcool, seguindo os mesmos procedimentos adotados para as amostras comerciais. Já para as amostras de Uísque a construção da curva de calibração, foi realizada usando uma solução aquosa de etanol. Após a análise das triplicatas de cada amostra no equipamento Raman, foi realizada a correção da linha de base, com o objetivo de minimizar os possíveis efeitos de matriz causados pelas amostras.

A análise dos dados foi realizada utilizando o software MATLAB versão 2011a (Mathworks,USA). Para todas as amostras analisadas, o pico próximo a 880 cm^{-1} foi utilizado para calcular a concentração de etanol de maneira univariada. Para cada concentração foi calculada a média das triplicadas e realizada a subtração da intensidade do pico monitorado com a linha de base.

4.5 - Método de Referência

Um cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo GC 2010 Plus equipado com auto-injetor (Combi PAL AOC-500) e um detector de Ionização por chama (FID), foi usado como método de referência. A coluna capilar usada foi NA-WAX Plus (30 m x 0,250 mm x 0,25 μm). O método usado foi adaptado da literatura[43], o programa de temperatura do forno do CG foi de 40 °C até 180 °C com uma variação de 20 °C min^{-1} , resultando em um tempo total de aquecimento de 7 minutos. O hélio foi usado como gás de arraste (vazão de 1,5 mL/min). As condições de operação do *Headspace* foram 10 min de agitação (250 rpm) para o equilíbrio da amostra a 80 °C; volume de injeção de 1mL; temperatura da linha de transferência de 150 °C; tempo de enxague da agulha de 5 minutos e; modo de injeção split.

Com o objetivo de eliminar os possíveis efeitos de matriz durante a quantificação, para as amostras de vinho e cerveja, as curvas de calibração foram construídas nas matrizes comerciais que não continham o analito. Desta maneira, as matrizes foram fortificadas com padrão até uma concentração final de 1 a 5% v/v, e realizado o mesmo procedimento de preparo das amostras comerciais. Para as amostras de uísque, a curva de calibração foi construída usando uma solução aquosa de etanol. Após o preparo das amostras, uma alíquota de 200 μL era adicionada a um vial (10 mL) e este imediatamente selado com septo PTFE/silicone e tampas de frasco *Headspace*.

O tratamento dos dados foi realizado usando o software GC-Solution para cálculo da área do pico monitorado.

4.6 - Resultados e Discussão

4.6.1 - Análise quantitativa de etanol

Bebidas alcoólicas são matrizes que apresentam alta complexidade em sua composição. Dessa forma, substâncias como antocianinas, compostos fenólicos e corantes causam grandes interferência na análise dessas matrizes por espectroscopia Raman devido a presença do fundo fluorescente causado por estas espécies. Diante disso, o uso de solução oxidantes como hipoclorito de sódio apresenta-se como uma possível estratégia visando a supressão do fundo fluorescente. Dessa forma, a modificação estrutural de espécies, como aminoácidos, vitaminas, peptídeos, antioxidantes e outros, possibilitam a diminuição do efeito fluorescente, tornando possível a determinação de compostos majoritários dessas amostras e reduzindo os efeitos de matriz causados por essas substâncias.

Para a determinação do etanol, foi monitorado o pico próximo de 880 cm^{-1} , esta banda corresponde ao estiramento (C-C), presente na molécula do etanol. A escolha dessa banda justifica-se por ser um pico de maior intensidade nos

espectros Raman, proporcionando maior seletividade no método analítico. A Figura 4.1, mostra o pico monitorado para os espectros médio das soluções padrão preparadas de 1 a 5 % v/v.

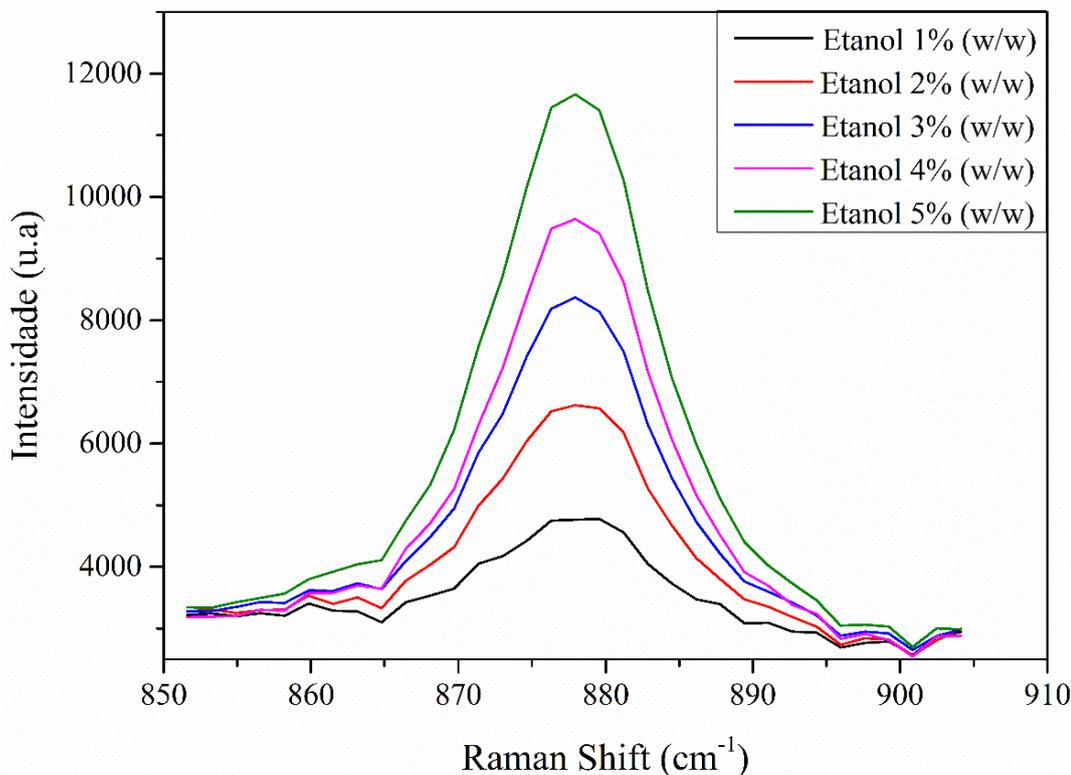


FIGURA 4.1- Espectros Raman para soluções padrões preparadas nas faixas de concentração de 1 a 5% (v/v).

A curva de calibração obtida para cada amostra apresenta boa relação linear, indicando que a modificação de matriz usando hipoclorito para o processo de oxidação das espécies fluorescentes, é reproduzível, indicando que os efeitos de matriz causados por essas espécies foram minimizados. A Figura 4.2, mostra a curva de calibração e o coeficiente de determinação para cada matriz analisadas.

De acordo com a Figura 4.2, observa-se que todas as matrizes analisadas apresentam uma relação linear do tipo $y = ax + b$, obtendo-se coeficientes de determinação acima de 0,99, mostrando uma alta correlação entre sinal e concentração do etanol nas amostras padrões. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para $n = 10$, foram calculados usando o desvio padrão relativo da relação sinal-ruído (s/n) do branco para cada amostra. A Tabela 4.1,

mostra os valores de LD e LQ obtidos, e o estudo de recuperação do método proposto.

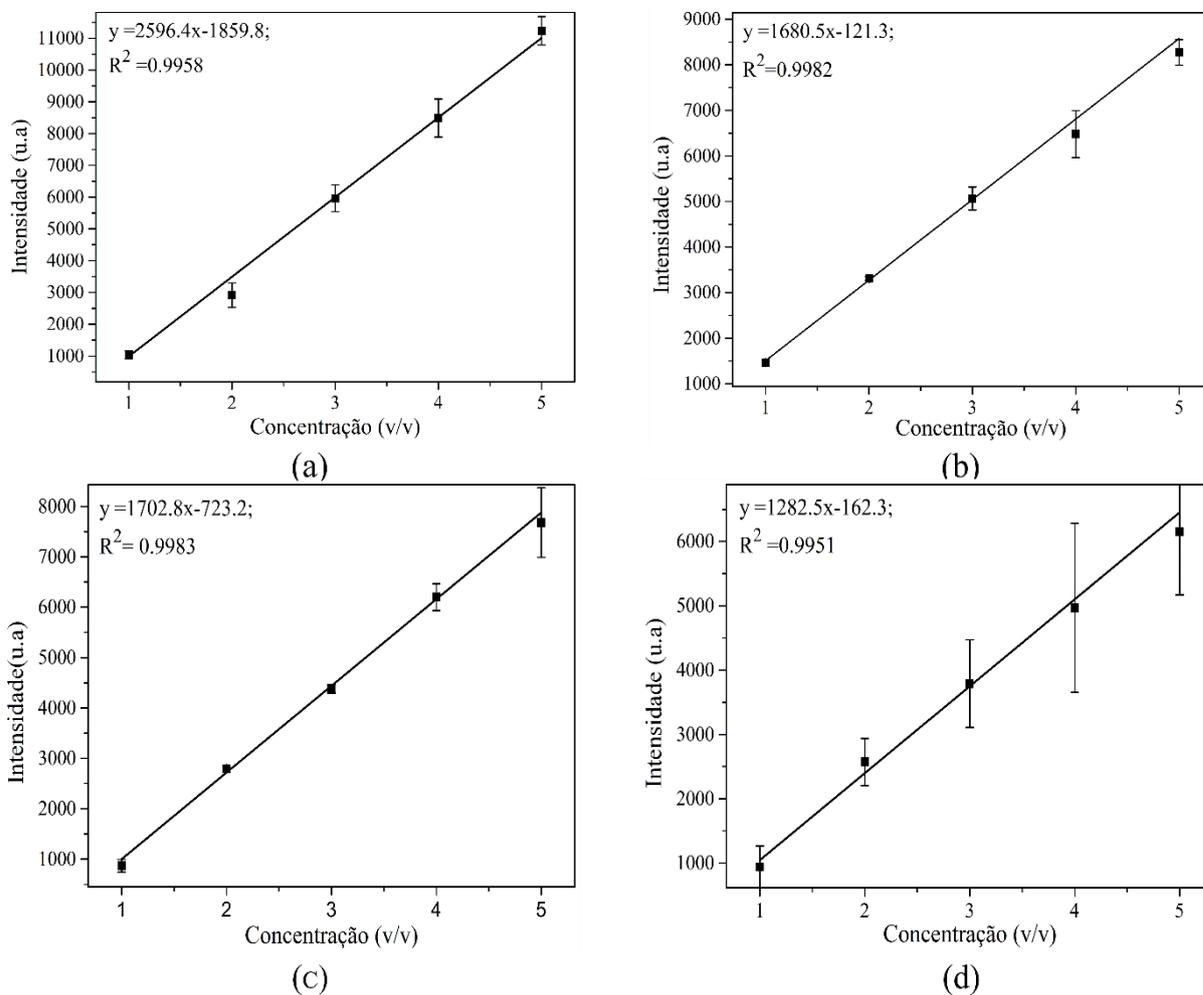


FIGURA 4.2- Curva de calibração para matrizes analisadas (a) Vinho; (b) Whisky; (c) Cerveja da categoria Standard American Lager; (d) Cerveja da categoria Premium American Lager.

TABELA 4.1- Figuras de mérito para o método proposto

Amostras	LD (% v/v)	LQ (% v/v)	Recuperação (%)
Vinho	0,1	0,33	91-111
Uísque	0,1	0,32	94-103
Cerveja SAL	0,09	0,29	93-103
Cerveja PAL	0,18	0,61	86-106

Os dados da tabela 4.1, mostram que o método proposto apresenta LD e LQ similares para as amostras de vinho, Uísque e cerveja da categoria Standard American Lager. Já para as amostras de cerveja da categoria Premium American Lager, os valores do LD e LQ foram maiores em quando comparados as demais amostras. Essa variação pode estar relacionada com complexidade das amostras de cerveja dessa categoria, pois por apresentar em sua composição carboidratos oriundos exclusivamente do malte, diferentes compostos responsáveis pela cor e o sabor da cerveja, podem ser produzidos durante o processo de fabricação da mesma. Além disso, o volume de hipoclorito usado para todas as amostras, foram iguais. Diante disso, a complexidade da amostra e a concentração das espécies responsáveis pelos efeitos de matriz, podem influenciar no processo de oxidação e conseqüente supressão da fluorescência, produzindo uma menor relação sinal-ruído em comparação com as demais amostras analisadas.

O estudo de recuperação foi realizado em triplicata para cada concentração da curva de calibração em cada matriz. Os resultados mostram que a média dos intervalos varia entre 86-111 %, para todas as amostras. Indicando que o método proposto é suficientemente acurado e robusto para a determinação de etanol nas matrizes analisadas.

4.6.2 - Quantificação de etanol em amostras de bebidas comerciais

Para a determinação de etanol em amostras comerciais, estas foram analisadas em triplicatas de forma aleatória, e em dias diferentes. A Tabela 4.2, mostra a média da concentração de etanol obtidos para cada amostra e marcas analisadas por espectroscopia Raman, os valores encontrados pelo método de referência (cromatografia gasosas com injeção em *headspace* – HS-CG) e valores do rótulo dos produtos.

TABELA 4.2- Concentração de etanol (v/v) obtidos por espectroscopia Raman e método comparativo (HS-CG-FID), para as marcas A e B das amostras analisadas.

Amostras	Marcas	Raman	HS-CG-FID	Rótulo	Desvio Relativo HS-CG/Raman (%)
Vinho	A	10,4 ± 0,2	11,0 ± 0,6	10	6,7
	B	9,4 ± 0,3	10,0 ± 0,7	10	6,5
Uísque	A	43,0 ± 3,0	43,5 ± 2,5	40	2,4
	B	39,0 ± 2,0	42,0 ± 3,5	40	6,0
Cerveja SAL	A	5,0 ± 0,03	5,0 ± 0,1	4,7	-0,1
	B	4,9 ± 0,1	4,9 ± 0,4	5,0	-1,2
Cerveja PAL	A	5,5 ± 0,2	5,3 ± 0,2	5,0	-4,0
	B	6,0 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,0	-9,2

De acordo com os dados da Tabela 4.2, observa-se que para todas as amostras foram obtidos baixos valores de desvio relativo quando comparando o Raman com o método de referência. Além disso, o teste-t foi aplicado para comparação de médias entre os métodos Raman e HS-GC, os valores de t-calculado variaram entre 0,02-0,5, para todas as amostras e marcas analisadas, já o valor de t-tabelado foi de 4,3 para 2 graus de liberdade. Dessa forma, os dados

indicam que os métodos não apresentam diferença significativa em um nível de confiança de 95%.

Portanto, o uso de solução oxidante para promover a supressão da fluorescência das espécies interferentes e posterior análise por espectroscopia Raman, mostrou-se uma estratégia satisfatória para determinação de etanol em amostra de vinho, uísque e cerveja. Além disso, o método proposto apresenta vantagens quando comparado ao método de referência como baixo custo, rápido e simples preparo da amostra. Vale ressaltar que sem o tratamento dessas amostras, a obtenção do espectro Raman não é nem possível devido à forte coloração e fluorescência.

4.7 - Conclusão

O presente estudo apresenta um novo método para determinação de etanol em bebidas, usando espectroscopia Raman. O uso de hipoclorito de sódio comercial para promover a oxidação das espécies fluorescentes, apresentou boa reprodutibilidade no processo de modificação das matrizes analisadas.

Os resultados mostram que a utilização da espectroscopia Raman para determinação de etanol em bebidas foi satisfatória quando comparados com o método de referência. Além disso, o método proposto apresenta-se como uma nova possibilidade para análise de amostras até então inviáveis, ampliando dessa forma o potencial da técnica de espectroscopia Raman para determinação de compostos majoritários em diversas amostras.

**CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS
FUTURAS**

A modificação de matrizes se mostrou uma ferramenta inovadora na análise qualitativa e quantitativa de fármacos e bebidas por espectroscopia no Infravermelho médio e Raman. O método proposto para análise quantitativa do AAS, mostrou-se bastante promissor, para a determinação de princípios ativos em amostras comerciais utilizando somente soluções aquosas e de maneira univariada, ou seja, sem a presença de interferentes causados pela dissolução em solventes orgânicos.

Já a utilização da partição líquido-líquido com acetato de etila e a técnica FTIR-ATR permitiu obter os *fingerprints* utilizando informações de compostos minoritários presentes em amostras de cervejas. Tais padrões não seriam possíveis de se obter devido ao alto teor de água que essa matriz possui. Além disso, a pré-concentração dos extratos orgânicos permitiu a diminuição do limite de detecção desses compostos, ampliando dessa forma a capacidade de análise da técnica FTIR-ATR.

Na terceira aplicação, a utilização de hipoclorito de sódio, mostrou-se uma alternativa viável para suprimir a fluorescência nas amostras, permitindo dessa forma a análise, por espectroscopia Raman. O método proposto é apresentado de forma inédita, abordando novas aplicações da técnica para análise de bebidas.

Como perspectivas futuras a presente tese, aborda novas possibilidades de ampliação da capacidade de análise das técnicas espectroscópicas, em diferentes áreas da química analítica, como por exemplo:

- Possibilidade da quantificação de compostos majoritários em amostras alimentícias utilizando calibração univariada;
- Análise de extrato de plantas, por espectroscopia Raman;
- Possibilidade de identificação de adulterantes em amostras alimentícias;
- Determinação de compostos minoritários em amostras ambientais;
- Possibilidade do emprego da espectroscopia vibracional no controle e identificação de lotes de acordo com seu local de origem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. Bureau, D. Cozzolino, C.J. Clark, Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review, *Postharvest Biol. Technol.* 148 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.003>.
- [2] R. Gordon, J. Chapman, A. Power, J. Roberts, D. Cozzolino, S. Chandra, Unfrazzled by Fizziness: Identification of Beers Using Attenuated Total Reflectance Mid-infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 2360–2367. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1225-y>.
- [3] A. Debebe, M.R. Abshiro, B.S. Chandravanshi, Non - destructive determination of ethanol levels in fermented alcoholic beverages using Fourier transform mid - infrared spectroscopy. *Chem. Cent. J.* (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0257-5>.
- [4] N.L. Calvo, R.M. Maggio, T.S. Kaufman, A dynamic thermal ATR-FTIR/chemometric approach to the analysis of polymorphic interconversions. Cimetidine as a model drug. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 92 (2014) 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.12.036>.
- [5] F. Van de Voort, Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res. Int.* 25 (1992).
- [6] R. Valand, S. Tanna, G. Lawson, L. Bengtström, A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations, *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 37 (2020) 19–38. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1675909>.
- [7] S. Castritius, M. Geier, G. Jochims, U. Stahl, D. Harms, Rapid determination of the attenuation limit of beer using middle-infrared (MIR) spectroscopy and a multivariate model. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 6341–6348. <https://doi.org/10.1021/jf3006382>.
- [8] G.M. de Oliveira, Simetria de moléculas e cristais: Fundamentos da espectroscopia vibracional, Bookman, Porto Alegre, 2009.
- [9] R. Singh, The 90th Anniversary of the Raman Effect. *Indian J. Hist. Sci.* 53 (2018). <https://doi.org/10.16943/ijhs/2018/v53i1/49363>.

- [10] D.A. Skoog, S.R. Crouch, F.J. Holler, *Instrumental Analysis Principles*, 2016.
- [11] F.L.F. Soares, *Espectroscopia Raman Amplificada Por Superfície Associada À Cromatografia Em Camada Delgada Para Análise De Amostras Alimentícias*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2018, 183 p.
- [12] A.M. De Souza, R.J. Poppi, Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: UM tutorial, parte I, *Quim. Nova*. 35 (2012) 223–229. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100039>.
- [13] J.L. Godoy, J.R. Vega, J.L. Marchetti, Relationships between PCA and PLS-regression, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 130 (2014) 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.11.008>.
- [14] M.M.C. Ferreira, *Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações*, 1st ed., Unicamp, Campinas, 2015.
- [15] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, Principal component analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2 (1987) 37–52. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9).
- [16] P.L.O. Ferreira, Márcia M C; Antunes, Alexandre M; Melgo, Marisa S; Volpe, *Quimiometria I: Calibração Multivariada, Um tutorial*. *Quim. Nova*. 22 (1999).
- [17] D. Pasquini, A. Gori, F. Ferrini, C. Brunetti, An improvement of SPME-based sampling technique to collect volatile organic compounds from *Quercus Ilex* at the environmental level. *Metabolites*. 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/metabo11060388>.
- [18] M. Sarraf, A. Beig-babaei, S. Naji-Tabasi, Application of QuEChERS method for extraction of functional compounds. *SN Appl. Sci.* 2 (2020) 1–6. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03639-5>.
- [19] Q. Wu, D. Wu, X. Geng, Z. Shen, Y. Guan, Hollow fiber-based liquid-liquid-liquid micro-extraction with osmosis: I. Theoretical simulation and verification. *J. Chromatogr. A*. 1248 (2012) 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.087>.

- [20] D.C.V. Belchior, M.G. Freire, Simultaneous separation of egg white proteins using aqueous three-phase partitioning systems. *J. Mol. Liq.* 336 (2021) 116245. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116245>.
- [21] M.L. de Mello, F.C. Pinheiro, D. Carnaroglio, J.A. Nóbrega, Evaluation of Partial Digestion as a Strategy for Elemental Analysis of Inorganic Samples by Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry (ICP OES)—A Proof of Concept Study. *Anal. Lett.* 0 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1080/00032719.2021.1945616>.
- [22] A.N. Khrenkov, E. V Vikhareva, E.Y. Tumilovich, Y.N. Karpenko, Chromatographic Analysis of Acetylsalicylic Acid in Rhodococcus Cultural Fluids. *Moscow Univ. Chem. Bull.* 75 (2020) 309–314. <https://doi.org/10.3103/S0027131420050053>.
- [23] E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos, 3rd ed., Porto Alegre, 2015.
- [24] F.A.A. Matias, M.M.D.C. Vila, M. Tubino, Quantitative reflectance spot test for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations. *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 327–330. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000200027>.
- [25] V. Obermoser, D. Baecker, C. Schuster, V. Braun, B. Kircher, R. Gust, Chlorinated cobalt alkyne complexes derived from acetylsalicylic acid as new specific antitumor agents. *Dalton Trans.* (2018) 4341–4351. <https://doi.org/10.1039/c7dt04790h>.
- [26] R. Casado-arroyo, C. Fellow, F. Bayrak, C. Fellow, A. Sarkozy, G. Chierchia, C. De Asmundis, P. Brugada, Role of ASA in the primary and secondary prevention of cardiovascular events. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 26 (2012) 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2012.01.013>.
- [27] P. European, European Pharmacopeia-Electronic Version, (2013) 3513. <http://pharneuropa.edqm.eu>.
- [28] D. Eskiköy, Z. Yazan, Application of Single-use Electrode Based on Nano-clay and MWCNT for Simultaneous Determination of Acetaminophen, Ascorbic Acid and Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Dosage. *Eletroanalysis.* (2020) 1263–1272. <https://doi.org/10.1002/elan.201900601>.

- [29] B. Coldibeli, N. Sayuri, M. Campos, C.A.R. Salamanca-neto, J. Scremin, G.J. Mattos, G.G. Marcheafave, E.R. Sartori, Feasibility of the use of boron-doped diamond electrode coupled to electroanalytical techniques for the individual determination of pravastatin and its association with acetylsalicylic acid. *J. Electroanal. Chem.* 862 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.113987>.
- [30] J. Omar, A. Boix, F. Ulberth, Vibrational Spectroscopy Raman spectroscopy for quality control and detection of substandard painkillers. *Vib. Spectrosc.* 111 (2020) 103147. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103147>.
- [31] L.F. Sallum, F.L.F. Soares, J.A. Ardila, R.L. Carneiro, Determination of acetylsalicylic acid in commercial tablets by SERS using silver nanoparticle-coated filter paper. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 133 (2014) 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.198>.
- [32] U. Kirin Beer, Global Beer Consumption by Country in 2019, https://www.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2020/1229_01.pdf. (2020) 5.
- [33] SINDICERV, O setor em números, (2020). <https://www.sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros/> (accessed October 14, 2021).
- [34] G.A. da Silva, F. Augusto, R.J. Poppi, Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC. *Food Chem.* 111 (2008) 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.022>.
- [35] L.A. da Silva, D.L. Flumignan, A.G. Tininis, H.R. Pezza, L. Pezza, Discrimination of Brazilian lager beer by ¹H NMR spectroscopy combined with chemometrics. *Food Chem.* 272 (2018) 488–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.077>.
- [36] T. Meier-Dörnberg, M. Hutzler, M. Michel, F.J. Methner, F. Jacob, The importance of a comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* strains for brewing. *Fermentation.* 3 (2017). <https://doi.org/10.3390/fermentation3030041>.
- [37] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário da cerveja 2020, (2020) 24. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/com-crescimento-de-14-4-em-2020-numero-de-cervejarias-registradas-no-brasil-passa-de-1->

- 3-mil/anuariocerveja2.pdf.Acesso em 26 de abr de 2021.
- [38] S. Garrigues, M. De La Guardia, Methods for the vibrational spectroscopy analysis of beers. *Beer Heal. Dis. Prev.* (2008) 943–961. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00094-8>.
- [39] F.S. de Almeida, C.A. de Andrade Silva, S.M. Lima, Y.R. Suarez, L.H. da Cunha Andrade, Use of Fourier transform infrared spectroscopy to monitor sugars in the beer mashing process. *Food Chem.* 263 (2018) 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.109>.
- [40] H.D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, Food chemistry, 4th ed., 2009. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>.
- [41] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, decreto nº 8.198 de 20 de fevereiro de 2014., 2014. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/decreto-no-8-198-de-20-de-fevereiro-de-2014.pdf/view>.
- [42] M.M. Markoski, J. Garavaglia, A. Oliveira, J. Olivaes, A. Marcadenti, Molecular properties of red wine compounds and cardiometabolic benefits, *Nutr. Metab. Insights.* 9 (2016) 51–57. <https://doi.org/10.4137/NMI.S32909>.
- [43] O. Wachelko, P. Szpot, M. Zawadzki, The application of headspace gas chromatographic method for the determination of ethyl alcohol in craft beers, wines and soft drinks. *Food Chem.* 346 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128924>.
- [44] T. Tarko, A. Duda-chodak, P. Sroka, The Impact of Oxygen at Various Stages of Vinification on the Chemical Composition and the Antioxidant and Sensory Properties of White and Red Wines. *Int. J. Food Sci.* 2020 (2020) 11. <https://doi.org/10.1155/2020/7902974>
- [45] C. Zhang, N. Lin, X. Chai, D.G. Barnes, A rapid method for simultaneously determining ethanol and methanol content in wines by full evaporation headspace gas chromatography. *Food Chem.* 183 (2015) 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.048>.
- [46] P. Yang, H. Li, H. Wang, F. Han, S. Jing, C. Yuan, A. Guo, Y. Zhang, Z. Xu, Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for HPLC Determination of Phenolic Compounds in Wine. *Food Anal. Methods.* 10

- (2017) 2383–2397. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0781-2>.
- [47] C.A. Teixeira dos Santos, R.N.M.J. Páscoa, P.A.L.S. Porto, A.L. Cerdeira, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, J.A. Lopes, Raman spectroscopy for wine analyses: A comparison with near and mid infrared spectroscopy. *Talanta*. 186 (2018) 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.075>.
- [48] C. Martin, J.L. Bruneel, F. Guyon, B. Médina, M. Jourdes, P.L. Teissedre, F. Guillaume, Raman spectroscopy of white wines. *Food Chem.* 181 (2015) 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.076>.
- [49] D.A. Magdas, F. Guyon, I. Feher, S.C. Pinzaru, Wine discrimination based on chemometric analysis of untargeted markers using FT-Raman spectroscopy. *Food Control*. 85 (2018) 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.024>.
- [50] BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, decreto nº 6.871, de 4 de Junho de 2009, 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19394.htm. Acesso em 15 de mar de 2021.
- [51] A.C. Power, N. Caoimhe, S. Geoghegan, M. Deasy, A Brief History of Whiskey Adulteration and the Role of Spectroscopy Combined with Chemometrics in the Detection of Modern Whiskey Fraud, *Beverages*. 6 (2020) 49.
- [52] X.G. Oliveira, R.A.A. Munoz, C.S. Henry, W.K.T. Coltro, Detection of Analgesics and Sedation Drugs in Whiskey using Electrochemical Paper-Based Analytical Devices. *Electroanalysis*. 30 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1002/elan.201800308>.
- [53] J.S. Garcia, B.G. Vaz, Y.E. Corilo, C.F. Ramires, S.A. Saraiva, G.B. Sanvido, E.M. Schmidt, D.R.J. Maia, R.G. Cosso, J.J. Zacca, M. Nogueira, Whisky analysis by electrospray ionization-Fourier transform mass spectrometry. *Food Res. Int.* 51 (2013) 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.027>.
- [54] R.K. Pandey, M.S. Sankhla, R. Kumar, Determination of adulterants in suspected liquor samples using chemical tests. *MOJ Toxicol.* 4 (2018) 309–314. <https://doi.org/10.15406/mojt.2018.04.00118>.
- [55] A. Debebe, A. Anberbir, M. Redi-abshiro, B.S. Chandravanshi, A. Asfaw, N. Asfaw, N. Retta, Alcohol Determination in Distilled Alcoholic

- Beverages by Liquid Phase Fourier Transform Mid-Infrared. *Food Anal. Methods*. 10 (2017) 172–179. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0566-7>.
- [56] K. Sujka, P. Koczoń, The application of FT-IR spectroscopy in discrimination of differently originated and aged whisky. *Eur. Food Res. Technol.* 244 (2018) 2019–2025. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3113-5>.
- [57] J. Kiefer, A.L. Cromwell, Analysis of single malt Scotch whisky using Raman spectroscopy. *Anal. Methods*. 9 (2017) 511–518. <https://doi.org/10.1039/c6ay02907h>.
- [58] A. Korolkovas, J.H. Burckhalter, Química Farmacêutica, São Paulo, 1982.
- [59] L.F. Sallum, F.L.F. Soares, J.A. Ardila, R.L. Carneiro, Optimization of SERS scattering by Ag-NPs-coated filter paper for quantification of nicotinamide in a cosmetic formulation. *Talanta*. 118 (2014) 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.039>.
- [60] E. Katainen, M. Elomaa, U.M. Laakkonen, E. Sippola, P. Niemelä, J. Suhonen, K. Järvinen, Quantification of the amphetamine content in seized street samples by Raman spectroscopy. *J. Forensic Sci.* 52 (2007) 88–92. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00306.x>.
- [61] M.M. Sena, R.J. Poppi, N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.japna.2003.08.011>.
- [62] M.M. Karim, C.W. Jeon, H.S. Lee, S.M. Alam, S.H. Lee, J.H. Choi, S.O. Jin, A.K. Das, Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulation by first derivative synchronous fluorimetric method. *J. Fluoresc.* 16 (2006) 713–721. <https://doi.org/10.1007/s10895-006-0115-7>.
- [63] A.A.J. Torriero, J.M. Luco, L. Sereno, J. Raba, Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. *Talanta*. 62 (2004) 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.07.005>.
- [64] J.C.L. Alves, R.J. Poppi, Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine using solid-phase molecular fluorescence and parallel factor analysis. *Anal. Chim. Acta.* 642 (2009) 212–216.

- <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.067>.
- [65] B.R.A. Junior, F.L.F. Soares, J.A. Ardila, L.G.C. Durango, M.R. Forim, R.L. Carneiro, Determination of B-complex vitamins in pharmaceutical formulations by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 188 (2018) 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.07.049>.
- [66] J. Cruz, M. Bautista, J.M. Amigo, M. Blanco, Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets. *Talanta.* 80 (2009) 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.008>.
- [67] C. Pino-torres, S. MasPOCH, R. Castillo-felices, M. Pérez-rivera, M. Aranda-bustos, C. Peña-farfal, Evaluation of NIR and Raman spectroscopies for the quality analytical control of a solid pharmaceutical formulation with three active ingredients. *Microchem. J.* 154 (2020).
- [68] A. Paudel, D. Raijada, J. Rantanen, Raman spectroscopy in pharmaceutical product design. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 89 (2015) 3–20. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.003>.
- [69] F.L.F. Soares, R.L. Carneiro, Green Synthesis of Ibuprofen – Nicotinamide Cocrystals and In-Line Evaluation by Raman Spectroscopy. *Cryst. Growth Des.* (2013). <https://doi.org/10.1021/cg3017112>.
- [70] A. Hédoux, Y. Guinet, M. Descamps, The contribution of Raman spectroscopy to the analysis of phase transformations in pharmaceutical compounds. *Int. J. Pharm.* 417 (2011) 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.031>.
- [71] T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J.P. Remon, C. Vervaet, Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. *Int. J. Pharm.* 417 (2011) 32–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.012>.
- [72] T. Frosch, M. Schmitt, G. Bringmann, W. Kiefer, Structural Analysis of the Anti-Malaria Active Agent Chloroquine under Physiological Conditions. *J. Phys. Chem. B.* 111 (2007) 1815–1822.
- [73] G.D. Maia, M. Giulietti, Solubility of acetylsalicylic acid in ethanol, acetone, propylene glycol, and 2-propanol. *J. Chem. Eng. Data.* 53 (2008) 256–258. <https://doi.org/10.1021/je7005693>.

- [74] R. Szostak, S. Mazurek, Quantitative determination of acetylsalicylic acid and acetaminophen in tablets by FT-Raman spectroscopy. *Analyst*. 127 (2002) 144–148. <https://doi.org/10.1039/b108240j>.
- [75] J.T. Franeta, D. Agbaba, S. Eric, S. Pavkov, M. Aleksic, S. Vladimirov, HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Farmaco*. 57 (2002) 709–713. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(02\)01265-X](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(02)01265-X).
- [76] M. Richards, H.L. De Kock, E.M. Buys, Multivariate accelerated shelf-life test of low fat UHT milk. *Int. Dairy J.* 36 (2014) 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.12.012>.
- [77] A.M.K. Pedro, M.M.C. Ferreira, Multivariate accelerated shelf-life testing: a novel approach for determining the shelf-life of foods. *J. Chemom.* 20 (2006) 76–83. <https://doi.org/10.1002/cem.995>.
- [78] P.J. Larkin, IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectra Interpretation, 2018. <https://doi.org/10.3390/re19100297>.
- [79] C. Muthuselvi, M. Dhavachitra, S. Pandiarajan, Growth and Characterization of Aspirin Crystal in the Phosphoric acid Medium. *J. Chem. Pharm. Res.* 8 (2016) 804–814.
- [80] B. Humbert, M. Alnot, F. Quilès, Infrared and Raman spectroscopical studies of salicylic and salicylate derivatives in aqueous solution. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 54 (1998) 465–476. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(97\)00239-4](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(97)00239-4).
- [81] Buiatti S, Beer composition: An overview, *Beer Heal. Dis. Prev.* (2009) 213–227.
- [82] C.Y. deMan, John M; Finley, John W; Hurst, W. Jeffrey; Lee, Principles of Food Chemistry, 4th ed., 2018. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6390-0>.
- [83] U. Kirin Beer, Report Global Beer Production by Country in 2017, (2018). Disponível em: https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2018/0809_01.html. Acesso em 15 de abr de 2019.
- [84] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 65. de 10 de Dezembro de 2019, (2019) 1–7.

- [85] C.M. Cooper, D.E. Evans, A. Yousif, N. Metz, A. Koutoulis, Comparison of the impact on the performance of small-scale mashing with different proportions of unmalted barley, Onda Pro®, malt and rice. *J. Inst. Brew.* 122 (2016) 218–227. <https://doi.org/10.1002/jib.325>.
- [86] Y. He, J. Dong, H. Yin, Y. Zhao, R. Chen, X. Wan, P. Chen, X. Hou, J. Liu, L. Chen, Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer - A review. *J. Inst. Brew.* 120 (2014) 157–163. <https://doi.org/10.1002/jib.145>.
- [87] J. Engel, L. Blanchet, L.M.C. Buydens, G. Downey, Confirmation of brand identity of a Trappist beer by mid-infrared spectroscopy coupled with multivariate data analysis. *Talanta.* 99 (2012) 426–432. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.005>.
- [88] J.F.D. Kelly, G. Downey, Detection of sugar adulterants in apple juice using fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3281–3286. <https://doi.org/10.1021/jf048000w>.
- [89] N. Moura-Nunes, T.C. Brito, N.D. Da Fonseca, P.F. De Aguiar, M. Monteiro, D. Perrone, A.G. Torres, Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. *Food Chem.* 199 (2016) 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.133>.
- [90] K. Georgouli, J. Martinez Del Rincon, A. Koidis, Continuous statistical modelling for rapid detection of adulteration of extra virgin olive oil using mid infrared and Raman spectroscopic data. *Food Chem.* 217 (2017) 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.011>.
- [91] F.L.F. Soares, J.A. Ardila, R.L. Carneiro, Thin-layer chromatography–surface-enhanced Raman spectroscopy and chemometric tools applied to Pilsner beer fingerprint analysis. *J. Raman Spectrosc.* 48 (2017) 943–950. <https://doi.org/10.1002/jrs.5168>.
- [92] A. Biancolillo, R. Bucci, A.L. Magrì, A.D. Magrì, F. Marini, Data-fusion for multiplatform characterization of an italian craft beer aimed at its authentication. *Anal. Chim. Acta.* 820 (2014) 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.02.024>.
- [93] D.J. Silverstein, Robert M.; Webster, Francis X.;Kiemle, Spectrometric and identification of organics Compounds, 7th ed., 2005.

- [94] H. Yang, S. Yang, J. Kong, A. Dong, S. Yu, Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat. Protoc.* 10 (2015) 382–396.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2015.024>.
- [95] B.H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*, 2004.
- [96] E.C.Y. Li-Chan, A.A. Ismail, J. Sedman, F.R. Van De Voort, *Vibrational Spectroscopy of Food and Food Products. Food Sci.* 2006.
<https://doi.org/10.1002/9780470027325.s6501>.
- [97] S. Jawaid, F.N. Talpur, S.T.H. Sherazi, S.M. Nizamani, A.A. Khaskheli, Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR-Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* 141 (2013) 3066–3071. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.106>.
- [98] S. Lohumi, S. Lee, H. Lee, B.K. Cho, A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends Food Sci. Technol.* 46 (2015) 85–98.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.003>.
- [99] E. Polshin, B. Aernouts, W. Saeys, F. Delvaux, F.R. Delvaux, D. Saison, M. Hertog, B.M. Nicolai, J. Lammertyn, Beer quality screening by FT-IR spectrometry: Impact of measurement strategies, data pre-processings and variable selection algorithms. *J. Food Eng.* 106 (2011) 188–198.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.003>.
- [100] R.S. Durello, L.M. Silva, S. Bogusz, Química do Lúpulo. *Quim. Nova.* 42 (2019) 900–919.
- [101] P. Quifer-Rada, A. Vallverdú-Queralt, M. Martínez-Huélamo, G. Chiva-Blanch, O. Jáuregui, R. Estruch, R. Lamuela-Raventós, A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS), *Food Chem.* 169 (2015) 336–343.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.154>.
- [102] C. Gerhäuser, A.P. Alt, K. Klimo, J. Knauft, N. Frank, H. Becker, Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. *Phytochem. Rev.* 1 (2002) 369–377.
<https://doi.org/10.1023/A:1026082325529>.
- [103] H.R. El-Seedi, A.M.A. El-Said, S.A.M. Khalifa, U. Göransson, L. Bohlin,

- A.K. Borg-Karlson, R. Verpoorte, Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 10877–10895. <https://doi.org/10.1021/jf301807g>.
- [104] M. Cortese, M.R. Gigliobianco, D.V. Peregrina, G. Sagratini, R. Censi, P. Di Martino, Quantification of phenolic compounds in different types of craft beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1612 (2020) 460622. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460622>.
- [105] D. De Keukeleire, H. Rong, E. Daeseleire, C. Van Peteghem, Determination of the Hop-Derived Phytoestrogen, 8-Prenylnaringenin, in Beer by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 5059–5063. <https://doi.org/10.1021/jf990645m>.
- [106] G. Haseleu, D. Intelmann, T. Hofmann, Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chem.* 116 (2009) 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.008>.
- [107] Y.N. Agatomi, T.Y. Oshioka, M.Y. Anagisawa, A.U. Yama, N.M. Ochizuki, Simultaneous LC-MS / MS Analysis of Glyphosate, Glufosinate, and Their Metabolic Products in Beer, Barley Tea, and Their Ingredients. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77 (2013) 2218–2221. <https://doi.org/10.1271/bbb.130433>.
- [108] G. Vanhoenacker, D. De Keukeleire, P. Sandra, Analysis of iso- α -acids and reduced iso- α -acids in beer by direct injection and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection or with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1035 (2004) 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.038>.
- [109] M. Dušek, J. Olšovská, K. Krofta, M. Jurková, A. Mikyška, Qualitative determination of β -acids and their transformation products in beer and hop using HR/AM-LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 7690–7697. <https://doi.org/10.1021/jf501852r>.
- [110] O.R. Marinho, M.J.A. Lima, F.R.P. Rocha, B.F. Reis, M.Y. Kamogawa, A greener, fast, and cost-effective smartphone-based digital image procedure for quantification of ethanol in distilled beverages. *Microchem. J.* 147 (2019) 437–443.

- [111] Instituto Adolfo Lutz, Métodos Físicos-Químicos Para Análise Aliment. 1^a Edição Digital (2008), p.1020.
- [112] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres, d (2005) 1–2. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/arquivos-metodos-da-area-bev-iqa/nao-alcoolicos-23-hidroximetilfurfural-hmf.pdf%0Ahttps://www.gov.br/agricultura/pt-br/as>.
- [113] R. Angeloni, M. Tomassetti, M. Castrucci, L. Campanella, Ethanol Determination in Alcoholic Beverages Using Two Different Amperometric Enzyme Sensors, *Curr. Anal. Chem.* 11 (2014) 56–67. <https://doi.org/10.2174/1573411010666140612004417>.
- [114] S.S. Bozkurt, E. Merdivan, Y. Benibol, A fluorescent chemical sensor for ethanol determination in alcoholic beverages. *Microchim. Acta.* 168 (2010) 141–145. <https://doi.org/10.1007/s00604-009-0271-y>.
- [115] T.R.L.C. Paixão, D. Corbo, M. Bertotti, Amperometric determination of ethanol in beverages at copper electrodes in alkaline medium. *Anal. Chim. Acta.* 472 (2002) 123–131. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00942-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00942-X).
- [116] L. Rotariu, C. Bala, V. Magearu, New potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic beverage. *Anal. Chim. Acta.* 513 (2004) 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.12.048>.
- [117] N. Spectrophotometries, A. Debebe, A. Anberbir, M. Redi-abshiro, Alcohol Determination in Distilled Alcoholic Beverages by Liquid Phase Fourier Transform Mid-Infrared. *Food Anal. Methods.* 10 (2017) 172–179. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0566-7>.
- [118] I.H. Boyaci, H.E. Genis, B. Guven, U. Tamer, N. Alper, A novel method for quantification of ethanol and methanol in distilled alcoholic beverages using Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* 43 (2012) 1171–1176. <https://doi.org/10.1002/jrs.3159>.