



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CAMPUS CAMPO MOURÃO  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

**CRISTIANE DA SILVA MORAIS**

**“APLICAÇÃO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA EM DADOS DE  
ESPECTROSCÓPIA UV-VISÍVEL PARA PREVISÃO DA ACIDEZ TOTAL EM  
VINHOS”**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CAMPO MOURÃO**

**2014**

CRISTIANE DA SILVA MORAIS

**“APLICAÇÃO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA EM DADOS DE  
ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL PARAPREVISÃO DA ACIDEZ TOTAL EM  
VINHOS”**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Campo Mourão, como requisito para a obtenção do título de Tecnólogo de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Março  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Valderrama

CAMPO MOURÃO

2014



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Câmpus Campo Mourão  
Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de  
Alimentos  
Engenharia de Alimentos



## TERMO DE APROVAÇÃO

### “APLICAÇÃO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA EM DADOS DE ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL PARAPREVISÃO DA ACIDEZ TOTAL EM VINHOS”

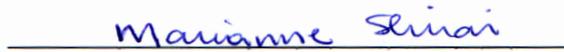
por

**CRISTIANE DA SILVA MORAIS**

Este trabalho de conclusão de curso (TCC) foi apresentado em 26 de Fevereiro de 2014 como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Tecnologia em Alimentos. A candidata foi arguida pela banca examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado.

  
Prof. Dr. Paulo Henrique Março  
Orientador

  
Prof.ª Dr.ª Mirela Vanin Dos Santos Lima  
Membro titular

  
Prof.ª Dr.ª Marianne Ayumi Shirai  
Membro titular

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus porque sem ele me dando força para superar todos os obstáculos e vontade de desistir, sem Ele eu não teria conseguido.

Em segundo a minha família que é o suporte para tudo que faço, e que sempre está ao meu lado quando preciso. Em especial minha mãe que é tudo para mim, meu porto seguro e meu esposo que sempre está comigo e compreendeu a minha ausência que era necessária. Meu irmão e cunhada que são muito companheiros e tentam me ajudar sempre que preciso. Também agradeço aos meus amigos que sempre ajudam da maneira que podem.

Agradeço também aos professores, em especial, o Professor Paulo Henrique Março que sempre me ajudou em tudo desde o começo e sem ele não teria conseguido, pois me fomentou com informações para que eu pudesse concluir o curso e por isso agradeço muito. Também a professora Patrícia Valderrama que também me ajudou, pois no momento que poderia ir embora descansar estava me esperando terminar as demoradas análises, além do tratamento dos dados por calibração multivariada.

Enfim, cada um deu o seu melhor para ajudar e, portanto só tenho agradecer. Obrigada!

## Resumo

MORAIS, S. Cristiane. **Aplicação de Calibração Multivariada em dados de Espectroscopia UV-Visível para previsão da Acidez total em vinhos**. 2014. Trabalho de conclusão de curso – Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2014.

Este trabalho teve como objetivo o estudo de uma metodologia alternativa à titulação ácido base para medir a acidez total de amostras de vinhos brancos e tintos. Mais especificamente, a pesquisa teve como foco oferecer como alternativa a técnica de espectrofotometria nas regiões Ultravioleta e Visível (UV-Vis) por se tratar de uma metodologia que pode ser introduzida na indústria para o monitoramento deste parâmetro já que possibilita a realização de análises rápidas sem perder a eficiência e sem geração de resíduos. Para possibilitar a utilização de espectrofotometria UV-Vis foi necessário realizar calibração multivariada utilizando-se o método quimiométrico de regressão por mínimos quadrados parciais (do inglês *Partial Least Squares* -PLS) entre os espectros UV-Vis dos vinhos e os valores de acidez total, determinados pelo método de referência, que no caso foi titulação ácido base. A fim de se obter um modelo satisfatório para prever acidez total de novas amostras foram utilizadas estratégias quimiométricas, como por exemplo, a análise de componentes principais (do inglês *Principal Component Analysis* - PCA) para observar se a amostra apresentava comportamento linear, e o algoritmo Kennard Stone, para selecionar amostras utilizadas no conjunto de dados utilizados na calibração e previsão. Os valores da Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Calibração (do inglês *Root Mean Square Error of Calibration* - RMSEC), Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Previsão (do inglês *Root Mean Square Error of Prediction* - RMSEP) e o Coeficiente de correlação ( $R^2$ ), relacionando calibração e previsão, foram avaliados. Para o vinho branco os modelos obtidos apresentaram valores de RMSEC, RMSEP e  $R^2$  5,87; 6,58 e 0,71, enquanto que para o vinho tinto os valores foram de 6,93; 8,58 e 0,71, respectivamente. Os resultados sugerem que a metodologia pode ser utilizada já que a titulação tem como detector para o ponto final o olho humano, e pode trazer divergências com relação aos erros obtidos. Além disso, foi utilizado o teste t-pareado para avaliar a compatibilidade entre os métodos de titulação e espectrofotometria UV-Vis empregados, e o resultado mostra que não existe diferença significativa entre estes em um nível de confiança de 95%. Assim, as vantagens oferecidas pelo método UV-Vis são inegavelmente atraentes para exigências industriais, sugerindo que estudos com enfoque em métodos ópticos e calibração multivariada podem ser de interesse para a área e merecem ser observados em estudos futuros.

**Palavras Chave:** Qualidade de vinhos, Análise, Tecnologia em alimentos, Modelos, UV-Vis, Calibração multivariada.

## Abstract

MORAIS, S. Cristiane. **Multivariate Calibration in UV-Vis spectrophotometry and titration data to predict total acidity in wines.** 2014. Research for Course Conclusion – Food Technology, Federal Technological University of the Paraná State (UTFPR). Campo Mourão, 2014.

This research aimed the study of an alternative methodology to replace acid base titration used to measure total acidity in white and red wines during the industrial process of online measurements. More specifically, this research focused on providing Ultraviolet and Visible (UV-Vis) spectrophotometry as an alternative tool for being itself a methodology with potential to be applied in industry to monitor total acidity since it provide fast analysis without loss in efficiency and without waste generation. In order to apply UV-Vis spectrophotometry it was necessary the multivariate calibration by using Partial Least Squares regression (PLS) between wine UV-Vis spectra and its total acidity values, determined from reference method, which in this case was acid base titration. The best model acquired to predict total acidity in new wine samples was obtained trough chemometric strategies, as Principal Component Analysis (PCA), to observe if the sample presented linear behavior, and Kennard Stone algorithm, used to better select calibration and validation samples. The *Root Mean Square Error of Calibration* (RMSEC) and *Root Mean Square Error of Prediction* (RMSEP) values and  $R^2$  relating calibration and prediction were evaluated. To the white wines evaluated in the study the values obtained to RMSEC, RMSEP and  $R^2$  were 5.87, 6.58 and 0.71, while the model to the red ones provided 6.93; 8.58 and 0.71, respectively. The results suggest that the methodology could be employed since the detection system used in titration is the human eye, being a point of discussion among the errors obtained in it. Moreover, the paired t-test was used to evaluate the compatibility among UV-Vis spectrophotometry and titration, and the results shows that there is no significant difference considering a confidence interval of 95%. In this way, the advantages provided for UV-Vis spectrophotometry are enough attractive to the industries, what suggests that some more studies focusing on optical methods and multivariate calibration could be an interesting issue to the area and deserve to be observed in future studies.

**Key words:** Wine quality, Analysis, Food Technology, Models, UV-Vis, Multivariate Calibration.

## LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1 - Tipos de dados de ordem zero, 1ª ordem e 2ª ordem.....11
2. Figura 2 - Organização dos espectros no formato de uma matriz.....12
3. Figura 3 - Representação da calibração univariada (A) e multivariada (B).....12
4. Figura 4 - Espectros UV-Vis das amostras de vinho: (A) branco; (B) tinto; (C) região do espectro utilizada na calibração do vinho branco; (D) região do espectro utilizada na calibração do vinho tinto.....13
5. Figura 5 - Ajuste do modelo PLS para determinação da acidez no vinho. (A) Vinho Branco. (B) Vinho Tinto. Amostras de calibração (•) e validação (\*)......15
6. Figura 6 - Resíduos do modelo para determinação da acidez no vinho. (A) Vinho Branco. (B) Vinho Tinto. Amostras de calibração (•) e validação (\*)......16

## **LISTA DE TABELAS**

<b>1. Tabela 1 - Vinhos brancos e suas características.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Tabela 2 - Vinhos tintos e suas características.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Tabela 3- Parâmetros de qualidade dos modelos de calibração multivariada.....</b>	<b>14</b>
<b>4. Tabela 4 - Valores de acidez dos vinhos tinto e branco determinados por titulação de neutralização ácido base e os resultados previstos pelo modelo PLS .....</b>	<b>17</b>

# SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
3. Objetivos e Metas.....	7
4. Métodos e Procedimentos .....	8
5. Resultados e Discussões.....	13
6. Conclusões .....	18
7. Referências Bibliográficas .....	19

## 1. Introdução

Vinhos são misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos extraídos a partir da uva. Os principais componentes do vinho são a água, alcoóis, ácidos, polissacarídeos, açúcares, compostos aromáticos, minerais e vitaminas (FILHO 2005). Para a elaboração de vinhos tintos de qualidade, as uvas devem ser colhidas segundo o critério que determina o ponto ótimo de maturação, considerando as variáveis açúcares, ácidos, pH e polifenóis. As primeiras três variáveis determinam o índice de maturação tecnológica e os polifenóis compõem o índice de maturação fenólica (FILHO 2010).

Financeiramente, a vinicultura movimenta aproximadamente US\$ 180 bilhões no mercado mundial (FILHO 2005). No Brasil, não se encontram disponíveis muitas informações sobre produção e comercialização de vinho e de suco de uva. No entanto, sabe-se que o único Estado que realiza e publica estimativa é o Rio Grande do Sul, responsável por cerca de 80% do volume da produção do País (FILHO 2010). Todavia, para qualquer lugar do mundo em que se consuma vinho os parâmetros de qualidade são os mesmos, e são eles que atribuem valor ao produto final.

De acordo com o INMETRO (MADURO et.al., 2007), dentre os parâmetros que influenciam na qualidade e *flavor* dos vinhos, a acidez influencia sua estabilidade e coloração, constituindo-se em uma das características gustativas mais importantes. No caso dos vinhos brancos a determinação da acidez pode ser medida por titulação (FILHO 2005). Enquanto para vinhos brancos a determinação da acidez pode ser medida por titulação, nos vinhos tintos uma das dificuldades é a visualização do ponto final da reação, devido os mesmos apresentarem coloração escura, sugerindo que estratégias devem ser utilizadas a fim de se transpor esta dificuldade para análise da acidez total (FILHO 2010).

As substâncias que conferem características ácidas ao mosto ou ao vinho são ácidos orgânicos relativamente fracos. Por isso, quando mostos e vinhos são titulados com base forte, o ponto de equivalência será maior que 7,0, usualmente entre 7,8 e 8,3 (BARROS 1990).

O método de determinação da acidez total em vinhos é descrito por várias instituições como a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (ZOECKLEIN, 1994), Office International de la Vigne et du Vin - OIV (1969) e

Instituto Adolfo Lutz - IAL (2008). Em geral, os métodos preconizados envolvem a titulação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de base, usando fenolftaleína como indicador. A observação visual da mudança de cor no indicador é uma prática tradicional para detecção do ponto final em titulações (CARDWELL et. al., 1991), porém essa observação é dificultada quando amostras coloridas são tituladas (AFONSO e AGUIAR, 2004). Por esta razão, recomenda-se a titulação potenciométrica quando as amostras são coloridas, como no caso do vinho tinto (OIV, 1969 e IAL, 2008).

O maior problema envolvendo o método utilizado como referência para as titulações de vinhos é o consumo de tempo e a geração de resíduos, além das divergências existentes entre os resultados, já que o ponto de viragem das titulações é observada pelo olho humano. Estes fatos tornam as análises de rotina nos processos industriais uma tarefa difícil de ser “otimizada”, já que as análises que necessitam de resposta imediata, como por exemplo, liberação ou proibição de um lote, ficam comprometidas pelo tamanho da “fila de espera” dos demais vinhos que já estão sendo analisados. A fim de solucionar este problema é possível fazer uso de métodos ópticos calibrados pelo método padrão de titulação. Para isso, o novo método empregado deve produzir, no máximo, os mesmos erros das medidas encontrados no método padrão.

## 2. Revisão Bibliográfica

É importante, inicialmente, esclarecer a diferença entre o valor de acidez titulável e pH. Acidez expressa a quantidade de ácido presente enquanto o pH expressa apenas o ácido dissociado na solução. O método recomendado atualmente para a determinação da acidez em vinhos é a titulação de neutralização (IAL, 2008).

Titulação (ou Volumetria) é uma técnica comum de laboratório em análise química quantitativa, usada para determinar a concentração de um reagente conhecido. O método consiste em reagir completamente um volume conhecido de uma amostra com um volume determinado de um reagente de natureza e concentração conhecida (solução padrão). A substância de interesse em qualquer determinação recebe o nome de analito. A espécie química com a maior concentração definida recebe o nome de titulante, que é, em geral, uma solução obtida a partir de um padrão primário, podendo ser um sal ou uma substância gerada na solução que se deseja valorar. A solução a ter sua concentração determinada recebe o nome de titulado (SIMÕES 2003 e DANTAS 2004). Para a determinação da acidez total do vinho, segundo os protocolos citados anteriormente, sugere-se a titulação ácido base. Neste processo faz-se reagir um ácido com uma base para que se atinja o ponto de equivalência.

As titulações estão entre os procedimentos analíticos mais exatos. Geralmente, a quantidade de titulante é variada até que a equivalência química seja alcançada, como indicado pela mudança de cor de um indicador químico ou pela mudança na resposta de um instrumento. A quantidade do reagente padronizado necessária para atingir a equivalência química pode ser relacionada com a quantidade de analito presente. Portanto, a titulação é um tipo de comparação química. Dentre os problemas observados na determinação da acidez total de vinhos através de titulação, fatores como o consumo de reagentes, o descarte das soluções produzidas, o dispêndio de tempo envolvido na titulação e a destruição da amostra utilizada devem ser considerados. Outra dificuldade envolvida nesta determinação é a falta de metodologias alternativas não destrutivas que possam ser utilizadas não apenas pela indústria, mas também pelo consumidor, principal afetado pela variação na qualidade de vinhos. Com este enfoque, técnicas como as espectroscópicas podem ser calibradas a partir de titulações para serem utilizadas com a finalidade de se medir a acidez total de vinhos de forma rápida e não destrutiva – e,

portanto, sem geração de resíduos – diminuindo custos e aumentando a velocidade das análises.

As medidas baseadas na luz ou outras formas de radiação eletromagnética são amplamente empregadas em química analítica e podem ajudar enormemente outras áreas, como por exemplo, a tecnologia de alimentos. As interações da radiação com a matéria são o objeto de estudo da ciência da espectroscopia e os métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies de interesse. De fato, o uso corrente estende mais ainda o significado da espectroscopia de forma a incluir técnicas que nem mesmo envolvem o uso de radiação eletromagnética, como a espectroscopia acústica, de massas e de elétrons (SKOOG; WEST; HOLLER 2006).

Métodos espectroquímicos utilizam não somente a radiação visível como também a ultravioleta e a infravermelha, e são freqüentemente denominados métodos ópticos, mesmo a despeito do fato de que o olho humano não seja sensível a nenhum dos dois últimos tipos de radiação. Nestes métodos, de alguma forma, a amostra é geralmente estimulada aplicando-se energia na forma de calor, energia elétrica, luz, partículas ou por uma reação química. Antes de se aplicar o estímulo, o analito se encontra predominantemente em seu estado de energia mais baixo ou estado fundamental. O estímulo então resulta que algumas das espécies do analito sofrem uma transição para um estado de maior energia ou estado excitado. Obtemos informações sobre o analito medindo-se a radiação eletromagnética emitida quando este retorna ao estado fundamental ou a quantidade de radiação eletromagnética absorvida decorrente da excitação (SKOOG; WEST; HOLLER 2006).

A aplicação de espectroscopia nas regiões do ultravioleta e visível aliada à calibração multivariada vem se tornando cada vez mais popular para quantificação de espécies de interesse. A calibração multivariada de dados utiliza diferentes tipos de amostras em um mesmo modelo matemático de calibração multivariada visando à determinação de um mesmo analito de interesse. Esta forma de calibração apresenta como vantagens modelos robustos e abrangentes, e que podem ser utilizados para a previsão de mais de um tipo de analito para as amostras, utilizando apenas uma forma de análise (BERZAGHI; SHENNK; WESTERHAUS 2000).

Em calibração multivariada, mais de uma resposta instrumental é relacionada com a propriedade de interesse. No caso dos vinhos, a propriedade de interesse em foco neste estudo foi a acidez total. Em calibrações de primeira ordem tem-se um vetor de medidas instrumentais para cada amostra, por exemplo, um espectro por amostra. Assim, cada coluna adquirida representa um comprimento de onda medido. Esses métodos apresentam a chamada “vantagem de primeira ordem” que é a possibilidade de realizar análises mesmo na presença de interferentes, desde que esses interferentes estejam presentes nas amostras de calibração (MARTENS e NAES, 1996). Em outras palavras, pode-se medir a acidez total do vinho desde que uma parcela da amostra titulada tenha sido utilizada para a obtenção do espectro.

A regressão é uma forma matemática de se transferir as informações obtidas de um método para outro. Uma diversidade de métodos de regressão vem sendo utilizada para a construção de modelos de calibração multivariada. Dentre os métodos de primeira ordem mais empregados um grande destaque pode ser atribuído ao método de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS – do inglês, Partial Least Squares), que é um método para ajuste linear entre as variáveis (GELADI e KOWALSKI, 1986). Tem-se verificado que a maioria dos métodos de calibração multivariada empregados em espectroscopia utiliza ajuste linear entre as variáveis, uma vez que este representa o modelo de mais fácil elaboração e interpretação.

O PLS é considerado o método de regressão matemático mais utilizado para a construção de modelos de calibração multivariada a partir de dados de primeira ordem. Nesse método uma matriz de respostas instrumentais  $\mathbf{X}$  e um vetor contendo os valores obtidos a partir de uma metodologia de referência  $\mathbf{y}$  é decomposto em um produto de duas matrizes, denominadas de *scores* e *loadings* (BRERETON, 2000). O modelo PLS é construído através de uma relação linear obtida entre os *scores* de  $\mathbf{X}$  e os *scores* de  $\mathbf{y}$  (GELADI e KOWALSKI, 1986). Outras vantagens do PLS aliado a espectroscopia incluem, além da rapidez, não geração de resíduos tóxicos, ausência de preparo de amostra e o método é não destrutivo.

Para construção do modelo PLS são necessárias uma etapa de calibração e uma etapa de validação do modelo construído (BEEBE e KOWALSKI, 1987). Para avaliar se o modelo realmente está em concordância com os resultados esperados, alguns

parâmetros de qualidade do modelo podem ser avaliados, tais como: Exatidão, Ajuste e linearidade.

A exatidão expressa o grau de concordância entre o valor estimado pelo modelo multivariado e o valor tido como verdadeiro obtido pelo método de referência. Esse parâmetro é expresso através da Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração (RMSEC) e de Previsão (RMSEP) (MARTENS e NAES, 1996):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{nv} (y_i - \hat{y}_i)^2}{nv}} \quad (1)$$

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{nc} (y_i - \hat{y}_i)^2}{nc}} \quad (2)$$

em que:  $y_i$  é o valor de referência,  $\hat{y}$  é o valor previsto pelo modelo multivariado,  $nv$  é o número de amostras na validação e  $nc$  é o número de amostras na calibração.

O ajuste é um parâmetro do modelo multivariado que é estimado a partir da correlação entre os valores tidos como referência e os valores estimados pelo modelo de calibração multivariada. Isso é feito determinando por mínimos quadrados, a reta que melhor se ajusta aos valores de referência e aos valores estimados pelo modelo, para as amostras de calibração (MARTENS e NAES, 1996).

Avaliar a linearidade é um problema em calibração multivariada pois as variáveis são decompostas em *scores* e *loadings*. Qualitativamente, o gráfico dos resíduos para as amostras de calibração e validação pode indicar se os dados seguem um comportamento linear se a distribuição dos resíduos for aleatória (MARTENS e NAES, 1996).

Com o objetivo de comparar o método de referência, nesse caso titulação de neutralização, com o modelo PLS proposto, um teste t-pareado pode ser empregado. O teste t-pareado é um teste de significância que possibilita verificar se o resultado obtido por dois métodos diferentes são comparáveis em um dado nível de significância (MILLER e MILLER, 2000).

### **3. Objetivos e Metas**

#### **Objetivo geral:**

Este trabalho tem como objetivo principal a proposição de uma metodologia alternativa para a medição da acidez total de vinhos. Mais especificamente, os estudos sugeridos nesta pesquisa buscam oferecer uma metodologia que apresente vantagens tais como custo relativamente baixo, não utilização de soluções com reagentes químicos e, principalmente, técnicas que além de apresentarem caráter não destrutivo da amostra sejam suficientemente rápidas para serem implementadas na linha de produção industrial.

#### **Objetivo específicos:**

- Realizar a titulação volumétrica de vinhos brancos e tintos adquiridos em comércio local;
- Adquirir espectros da região Ultravioleta e Visível dos vinhos brancos e tintos;
- Construir um modelo de calibração multivariada para os vinhos brancos e um outro modelo de calibração multivariada para os vinhos tintos;
- Avaliar os parâmetros de qualidade (RMSEC, RMSEP e  $R^2$ ) dos modelos de calibração multivariada obtidos no estudo;
- Comparar por “teste-t pareado” a significância dos resultados obtidos entre os métodos de titulação e espectrofotometria para avaliar se os métodos são compatíveis.

#### 4. Métodos e Procedimentos

As amostras de vinhos tintos e brancos foram adquiridas no comércio de Campo Mourão, Paraná. No total, foram adquiridas 26 amostras de vinho branco e 31 amostras de vinho tinto. Tomando como base a metodologia sugerida pelo INMETRO e IAL, a acidez total de vinhos tintos e brancos foi medida por titulação volumétrica utilizando-se NaOH na concentração de 0,1N, padronizado com HCl 0,1N e indicador de fenolftaleína para os vinhos brancos e azul de bromocresol para os vinhos tintos.

Inicialmente, foi retirada uma porção de aproximadamente 50 mL de vinho e colocado em um béquer. Deste volume, foram separadas 3 alíquotas de 11 mL, das quais uma alíquota de 1 mL foi reservada para as medidas espectrais. Os 10 mL de vinho foram titulados com NaOH 0,1N e os valores de acidez total foram determinados. Os ensaios de titulação foram realizados em triplicata para cada variedade de vinho.

Para a realização de medidas espectrais registradas na região Ultravioleta e Visível (UV-Vis) foram avaliadas 3 alíquotas de 1 mL de cada vinho. O volume foi transferido com pipeta volumétrica para uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Esta cubeta foi utilizada por evitar a etapa de preparo de amostra por diluição, já que aumenta a sensibilidade espectral, melhorando a visualização do perfil espectral por diminuir o número de espécies absorventes.

As medidas foram realizadas com um equipamento da Ocean Optics modelo Red Tide USB650 tipo Fiber Optic Spectrometer. A discriminação de cada vinho assim como as características expressadas pelos fabricantes estão apresentados na **Tabela 1** para os vinhos brancos e na **Tabela 2** para os vinhos tintos.

**Tabela 1** - Vinhos brancos e suas características (marca- tipo- teor alcoólico – localização).

<b>Vinhos</b>	<b>Marca</b>	<b>Tipo</b>	<b>Teor Alcoólico</b>	<b>Fabricação:</b>
01	Irurti Cosecha	Seco	12,00%	Uruguai
02	Mr Thomas	Semi Seco	10,50%	Brasil (PR)
03	Alfajôfar	Suave	10,00%	Brasil (PR)
04	Porto Mouro	Suave	10,50%	Brasil (PR)
05	Flowers	Semi Seco	11,30%	Brasil (RS)
06	Quinta Do Morgado	Suave	10,10%	Brasil (RS)
07	Aurora	Suave	13,00%	Brasil (RS)
08	O Barracão	Suave	10,50%	Brasil (RS)
09	Ottobello	Suave	10,50%	Brasil (PR)
10	Saint Germain	Seco	10,50%	Brasil (RS)
11	Quinta Do Morgado	Seco	10,50%	Brasil (RS)
12	Ottobelo	Suave	10,50%	Brasil (PR)
13	Gazzi	Suave	10,50%	Brasil (PR)
14	Liefraumilch	Semi Seco	11,00%	Brasil (RS)
15	Saint Germain	Suave	11,00%	Brasil (RS)
16	Chalise	Suave	11,00%	Brasil (RS)
17	Quinta Do Carvalho	Seco	10,50%	Brasil (RS)
18	Canção	Seco	10,60%	Brasil (RS)
19	Arbo	Seco	12,50%	Brasil (RS)
20	Arbo	Seco	11,00%	Brasil (RS)
21	Paschoeto	Suave	10,60%	Brasil (PR)
22	Country Wene	Suave	10,00%	Brasil (RS)
23	Veneza	Seco	11,00%	Brasil (RS)
24	Jota Pe	Seco	10,70%	Brasil (RS)
25	Canção	Suave	10,40%	Brasil (RS)
26	Bodega Vieja	Semi Seco	12,50%	Chile
27	Santa Ana	Semi Seco	13,00%	Argentina

<b>Tabela 2 - Vinhos tintos e suas característica (marca- tipo- teor alcoólico – localização).</b>				
<b>Vinho</b>	<b>Marca</b>	<b>Tipo</b>	<b>Teor Alcoólico</b>	<b>Fabricação</b>
01	Santa Ana	Seco	N/C*	Argentina
02	Santa Ana	Semi Seco	12,59%	Argentina
03	Acqua Santiera	Seco	11,50%	Brasil (RS)
04	Sonata	Semi Seco	12,00%	Chile
05	Panceri	Seco	12,30%	Brasil (SC)
06	Paraná	Suave	10,00%	Brasil (RS)
07	Sangue De Boi	Seco	10,00%	Brasil
08	Canção	Seco	10,40%	Brasil (RS)
09	Mioranza	Suave	10,40%	Brasil (RS)
10	Quinta Do Morgado	Suave	10,10%	Brasil (RS)
11	O Barracão	Suave	10,40%	Brasil (RS)
12	O Barracão	Seco	10,40%	Brasil (RS)
13	Quinta Do Carvalho	Seco	10,50%	Brasil (RS)
14	Mr.Thomas	Semi Seco	10,50%	Brasil (PR)
15	Santos Anjos	Suave	10,50%	Brasil (RS)
16	Quinta Do Morgado	Seco	10,50%	Brasil (RS)
17	Porto Mouro	Suave	10,50%	Brasil (PR)
18	Precioso	Semi Seco	10,50%	Brasil (RS)
19	Jota Pe	Seco	10,60%	Brasil (RS)
20	Adega Vêneto	Seco	11,00%	Brasil (RS)
21	Macaw	Semi Seco	11,50%	Brasil (RS)
22	Aljôfar	Seco	12,50%	Brasil (PR)
23	Santa Ana	Semi Seco	12,50%	Argentina
24	Puente De Piedra	Seco	13,00%	Argentina
25	Bonarda	Seco	13,00%	Argentina
26	Aromo Reservado	Seco	13,00%	Chile
27	Rio Seco	Seco	13,00%	Argentina
28	J.P. Chement	Seco	13,00%	França
29	Santa Helena	Seco	13,5,00%	Chile
30	Salton Classic	Seco	13%,00	Brasil (RS)
31	N/C*	Suave	N/C*	Brasil

\* N/C: Não consta descrição em rótulo.

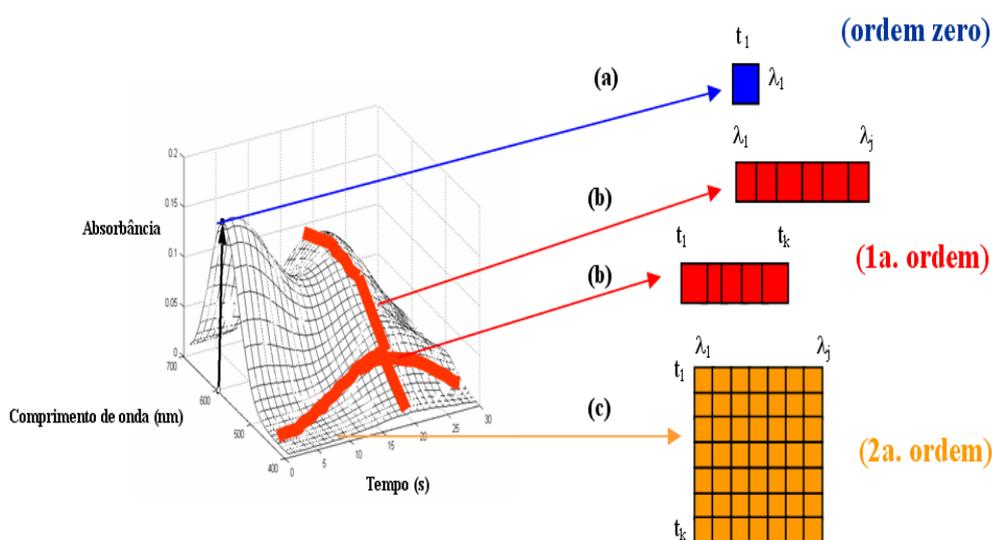
Após a aquisição dos dados espectrais e dos valores de concentração de ácidos totais por titulação, iniciou-se a parte computacional do trabalho. O software empregado nas análises foi o Matlab 2007b empregando-se o *PLS Toolbox 5.2*. Uma seleção das

variáveis foi utilizada com base a literatura (BUSCH et al., 2003, BUCH et al., 2004, FAKAYODE et al., 2005).

Após as análises prévias, foi empregado o método quimiométrico de calibração multivariada para dados de primeira ordem denominado PLS, descrito anteriormente.

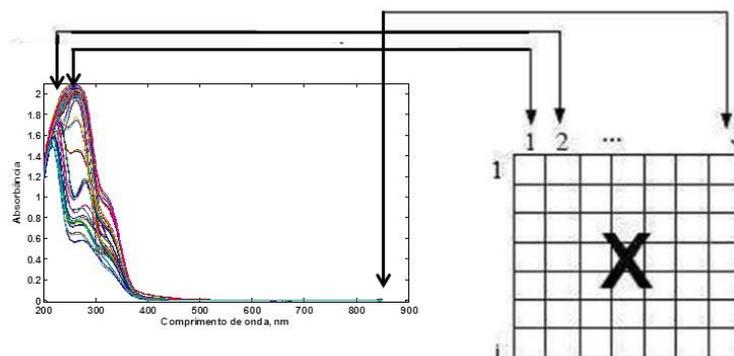
Para que o PLS possa ser melhor compreendido é necessário fazer uma distinção entre os diferentes tipos de dados. Por exemplo, quando se tem um único valor de absorvância, (absorvância em 520 nm) para cada amostra este tipo de dado é dito univariado ou de ordem zero. Quando se tem um espectro como resposta para cada amostra tem-se um dado de primeira ordem. Já no caso de se obter uma superfície de resposta para cada amostra tem-se dados de segunda ordem (espectros com o tempo).

A Figura 1 apresenta um exemplo para dados de ordem zero, 1ª ordem e 2ª ordem.



**Figura 1.** Tipos de dados (VALDERRAMA, BRAGA e POPPI, 2009).

Os espectros UV foram organizados no formato de uma matriz, em que cada linha da matriz **X** corresponde a um espectro e cada coluna corresponde à absorvância nos diferentes comprimentos de onda. Na figura 2 é possível observar a organização dos espectros no formato da matriz.

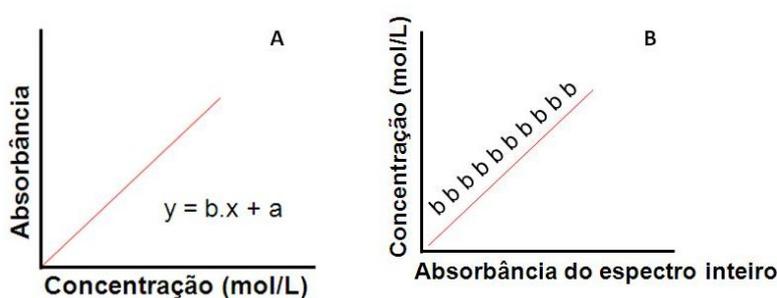


**Figura 2.** Organização dos espectros no formato de uma matriz.

A matriz **X** é então correlacionada a um vetor **y** que contém os valores de acidez determinados por titulação. A correlação entre **X** e **y** é realizada através do método de calibração multivariada PLS.

Na calibração clássica ou de ordem zero tem-se uma relação linear entre um único valor de absorbância em um único comprimento de onda em função das concentrações. Nesse caso, a reta ajustada fornece um único valor de coeficiente de regressão (**b**), conforme Figura 3(A).

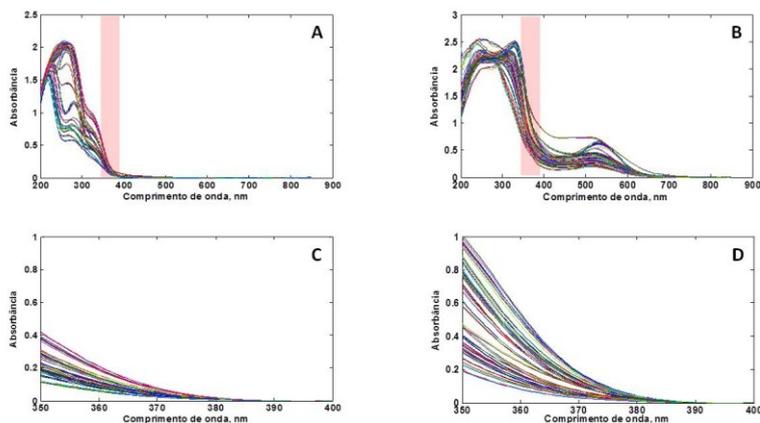
A calibração multivariada é uma calibração inversa, onde a absorbância nos diferentes comprimentos de onda é colocada em função da concentração. Assim, obtém um valor de “**b**” para cada comprimento de onda utilizado na construção do modelo de calibração multivariada, conforme ilustrado na Figura 3(B).



**Figura 3.** Representação da calibração univariada (A) e multivariada (B).

## 5. Resultados e Discussões

A Figura 4 mostra os espectros obtidos na região do UV-Vis e a região utilizada na calibração para as amostras de vinho tinto e branco.



**Figura 4** - Espectros UV-Vis das amostras de vinho: (A) branco; (B) tinto; (C) região do espectro utilizada na calibração do vinho branco; (D) região do espectro utilizada na calibração do vinho tinto.

A região entre 350 a 400nm (Figuras C e D) foi utilizada na construção do modelo de calibração multivariada. Nesta região espectral os valores de absorvância foram inferiores a uma unidade e, portanto, são proporcionais à concentração, conforme previsto pela Lei de Beer e esta região tem sido proposta na literatura para modelos de calibração multivariada através do método PLS (BUSCH et al, 2003, BUSCH et al, 2004, FAKAYODE et al, 2005).

Após a escolha da região, foi construído um modelo de calibração multivariada para determinação da acidez do vinho branco e outro modelo para a determinação da acidez do vinho tinto. Para construção dos modelos de calibração as amostras foram separadas entre conjunto de calibração e validação através do algoritmo de Kennard-Stone (KENNARD e STONE, 1969). Este algoritmo seleciona as amostras com base em suas distâncias: a primeira amostra selecionada é a que apresenta a maior distância em relação à amostra média enquanto a segunda amostra a ser selecionada será a que apresentar maior distância em relação à primeira amostra selecionada. A próxima amostra a ser selecionada apresentará maior distância em relação à última amostra selecionada, e assim sucessivamente até atingir o número de amostras desejadas. Esse algoritmo é aplicado para realizar a seleção das amostras que irão compor o conjunto de

calibração, uma vez que procede a seleção das amostras de maior variabilidade, ou seja, as amostras mais “externas” do conjunto total. Assim, cada conjunto de calibração foi inicialmente composto por 55 amostras de vinhos brancos e 65 amostras de vinhos tintos, e para o conjunto de validação por 16 amostras de vinhos brancos e 17 amostras para os vinhos tintos.

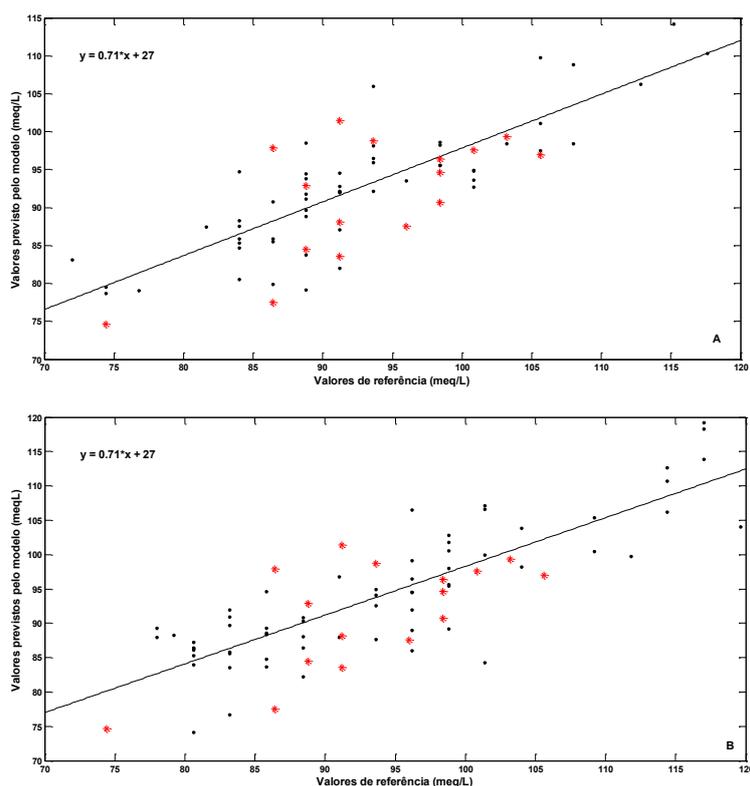
Para a construção dos modelos, os espectros foram centrados na média e o número de variáveis latentes foi determinado através dos resultados da raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) para as amostras de calibração, obtido por validação cruzada do tipo “leave-on-out”. Nesse método de validação interna o modelo é construído e faz-se a previsão de uma das amostras de calibração que foi ‘deixada de fora’ no momento da construção do modelo. Esse procedimento é repetido até que todas as amostras do conjunto de calibração tenham sido previstas. Para o modelo de quantificação da acidez do vinho branco foram necessárias um total de 10 variáveis latentes, enquanto que para o vinho tinto foram necessárias 15 variáveis latentes.

Os resultados dos parâmetros de qualidade do modelo desenvolvido estão apresentados na **Tabela 3**. Os valores de exatidão são representados RMSEC e RMSEP e revelam que os valores estimados pelos modelos multivariados apresentaram concordância com os resultados esperados. Os valores de RMSEP e RMSEC são parâmetros globais que incorporam tanto erros sistemáticos quanto aleatórios. Sendo assim, um melhor indicador de exatidão é a regressão entre os valores de referência e os valores estimados pelo modelo, e os valores da inclinação e do intercepto, apresentados na Figura 5.

<b>Tabela 3 - Parâmetros de qualidade dos modelos de calibração multivariada</b>			
<b>Vinho</b>	<b>RMSEC</b>	<b>RMSEP</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Branco</b>	5,87	6,58	0,7091
<b>Tinto</b>	6,93	8,58	0,7094

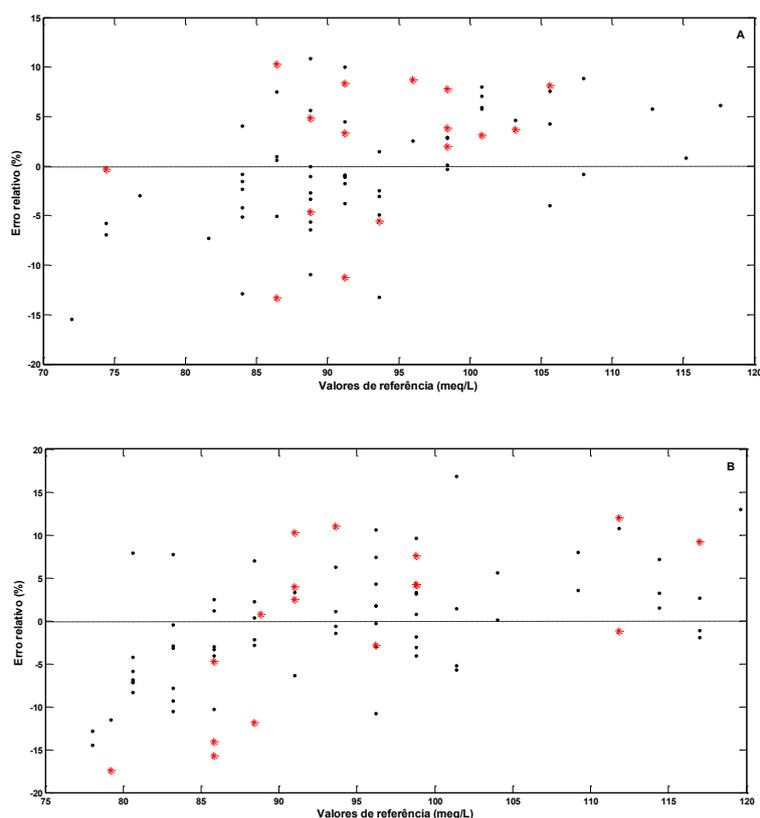
É possível observar que o modelo de calibração multivariado para determinar a acidez no vinho branco apresentou melhor exatidão do que o modelo para determinar a acidez no vinho tinto. Uma explicação para esses resultados pode ser associada ao erro do método de referência em que o ponto de viragem da titulação do vinho tinto é muito menos visual do que o ponto de viragem da titulação do vinho branco. A coloração apresentada pelo vinho torna difícil a visualização precisa do ponto de viragem, proporcionando, conseqüentemente, um erro maior.

O coeficiente de correlação para o ajuste está apresentado na Tabela 3. Apesar de parecerem valores muito baixos, resultados de coeficiente de correlação da ordem de 0,7 já foram reportados antes na literatura quando o método de referência, na calibração multivariada, é a titulação (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI 2007, VALDERRAMA; BRAGA; POPPI 2007, FERREIRA; PALLONE; POPPI, 2013)



**Figura 5** - Ajuste do modelo PLS para determinação da acidez no vinho. (A) Vinho Branco. (B) Vinho Tinto. Amostras de calibração (•) e validação (\*).

A linearidade do modelo de calibração multivariada de primeira ordem foi avaliada através do gráfico dos resíduos da calibração e validação, mostrados na Figura 6. Qualitativamente, este tipo de gráfico pode indicar se os dados seguem ou não um comportamento linear, se a distribuição dos resíduos for aleatória.



**Figura 6** - Resíduos do modelo para determinação da acidez no vinho. (A) Vinho Branco. (B) Vinho Tinto. Amostras de calibração (•) e validação (\*).

A Figura 6 evidencia o comportamento aleatório para os resíduos da calibração e validação indicando que o modelo PLS na região do UV segue um comportamento linear.

Os resultados alcançados para determinação da acidez no vinho através da espectroscopia na região do UV e calibração multivariada de primeira ordem estão correlacionados de tal forma a sugerir que o método se apresenta como muito promissor. A **Tabela 4** apresenta os valores de acidez nos vinhos tinto e branco, determinados por titulação de neutralização e os resultados previstos pelo modelo PLS. Um teste de significância, teste t-pareado, foi utilizado para comparar os dois métodos:

modelo PLS e titulação de neutralização. O teste t-pareado, que indica se existem diferenças significativas entre os métodos utilizados, apresentou um valor para  $t_{\text{calculado}}$  de 0,286 e 0,059, enquanto o valor de  $t_{\text{tabelado}}$  é de 2,131 e 2,120 para 95% de confiança, para os vinhos branco e tinto, respectivamente. Como o valor de  $t_{\text{calculado}}$  é menor que o valor de  $t_{\text{tabelado}}$ , em ambos os casos, isso indica que não existem diferenças significativas entre a titulação de neutralização e o modelo PLS na determinação da acidez dos vinhos branco e tinto, respectivamente, no nível de significância considerado.

**Tabela 4** - Valores de acidez dos vinhos tinto e branco determinados por titulação de neutralização ácido base e os resultados previstos pelo modelo PLS

<b>Vinho Branco</b>		<b>Vinho Tinto</b>	
<b>Valores de acidez determinados por titulação de neutralização (meq/L)</b>	<b>Valores de acidez determinados pelo modelo PLS (meq/L)</b>	<b>Valores de acidez determinados por titulação de neutralização (meq/L)</b>	<b>Valores de acidez determinados pelo modelo PLS (meq/L)</b>
91,20	88,14	79,20	92,98
88,80	84,51	88,80	88,08
98,40	90,71	93,60	83,29
98,40	96,42	85,80	89,84
91,20	101,45	91,00	87,39
86,40	77,51	98,80	94,63
96,00	87,59	111,80	113,09
105,60	96,99	98,80	91,27
74,40	74,65	117,00	106,24
103,20	99,36	85,80	99,26
88,80	92,91	111,80	98,35
86,40	97,91	88,40	98,88
98,40	94,63	96,20	98,90
100,80	97,63	98,80	94,64
93,60	98,77	91,00	81,64
91,20	83,60	91,00	88,72
-	-	85,80	97,83

## **6. Conclusões**

O desenvolvimento deste trabalho mostrou a possibilidade da utilização de métodos espectroscópicos associados à métodos quimiométricos para a determinação da acidez nos vinhos branco e tinto. Os modelos construídos por calibração de primeira ordem utilizando o método PLS mostraram resultados satisfatórios para essa determinação. A exatidão do modelo para a determinação da acidez no vinho branco foi superior à exatidão do modelo para a mesma determinação no vinho tinto. Isso pode ser atribuído a um erro maior associado na determinação do ponto de viragem da titulação de neutralização utilizada como método de referência na determinação da acidez nos vinhos tintos.

Os modelos desenvolvidos se mostraram lineares, de acordo com a distribuição aleatória dos resíduos. Um teste de significância foi aplicado aos resultados obtidos pelo modelo PLS e os resultados obtidos pela titulação de neutralização mostrando que, no nível de confiança de 95%, os métodos não apresentam diferença significativa.

## 7. Referências Bibliográficas

AFONSO, J.C.; AGUIAR, R.M.; GOMES, L.M.B.; **Quim. Nova**, 27, 678, 2004.

ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS. *Standards practices for infrared multivariate quantitative analysis*. E1655-05. West Conshohocken, Pennsylvania, USA: ASTM international, 2012.

BARROS, F. G., *Determinação condutométrica e colorimétrica de acidez volátil de vinagres e vinhos por injeção em fluxo*, Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química, UNICAMP, 1990. Dissertação de mestrado, 97p.

BEEBE, K.R.; KOWALSKI, B.R.; *Anal. Chem.*, 59(17), A1007, 1987.

BERZAGHI, P.; SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M.O. **J. Near Infrared Spectrosc.**, 8, 1, 2000.

BOOKSH, K.S.; KOWALSKI, B.R.; **Anal. Chem.**, 66(15), 782A, 1994.

BRERETON, R.G.; **Analyst**, 125, 2125, 2000.

BUSCH, K. W.; SWAMIDOSS, I. M.; FAKAYODE, S. O.; BUSCH, M. A.; **J. Am. Chem. Soc.**, 125, 1690, 2003.

BUSCH, K. W.; SWAMIDOSS, I. M.; FAKAYODE, S. O.; BUSCH, M. A.; **Anal. Chim. Acta**, 525, 53, 2004.

CARDWELL, T. J.; CATTRALL, R.W.; CROSS, G.J.; O'CONNELL, R.; PETTY, J.D.; SCOLLARY, G.R.; **Analyst**, 116: 1051, 1991.

DANTAS, M.C.: Ciências Físico-Químicas, 1ª. Ed., **Texto Editora LDA**: Lisboa, 2004.

FAKAYODE, S. O.; BUSCH, M. A.; BELLERT, D. J.; BUSCH, K. W.; **Analyst**, 130, 233, 2005.

FERREIRA, D.S.; PALLONE, J.A.L.; POPPI, R. J.; Food Resear. Int., 51(1), 53, 2013.

FISHER BOX, J.; *Statist. Sci.*, 2(1), 45, 1987.

FILHO, W.G.V.; *Bebidas alcoólicas, ciência e tecnologia*, 1ª. Ed., **Edgard Blucher**: São Paulo, 2010.

FILHO, W. G.V.; *Tecnologia de bebidas, matéria-prima-processamento*, 1ª. Ed., **Edgard Blucher**: São Paulo, 2005.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R.; *Anal. Chim. Acta*, 185, 1, 1986.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. 4ª ed., 1ª Ed. Digital, São Paulo: 2008.

KENNARD, R.W.; STONE, L.A.; *Technometrics*, 11(1), 137, 1969.

**Ministério Do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior** Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial **INMETRO**. Programa de Análise de Produtos: *Relatório de Vinho*. Acesso em 30/01/2014. Disponível em: [<http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/vinho.pdf>]

MADURO, R; MONTEIRO, L, C; LOBO, A, C, O. **PROGRAMA DE ANÁLISE DE PRODUTOS: Relatório de Vinho**, Divisão de Orientação e Incentivo à Qualidade - Diviq Diretoria da Qualidade - Dqual Inmetro, *Rio de janeiro dezembro de 2007*, acesso em 30 de janeiro de 2014.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C.; *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Prentice Hall: London, 2000).

MARTENS, H.; NAES, T.; *Multivariate calibration*. **Wiley**: New York, 1996.

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN. Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins, OIV, 1969. A10, p. 1–3.

SIMÕES, T.S.; Técnicas Laboratoriais de Química, **Porto Editora**: Porto, 2003.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª ed. Norte-Americana, Thomson Learning Ltda, 2006.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J.; **J. Agri. Food Chem.**, 55, 8331, 2007.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J.; **J. Braz. Chem. Soc.**, 18, 259, 2007.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J.; **Quím. Nova**, 32, 1278, 2009.

ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY, F.S.; Wine analysis and production, **The Chapman & Hall Enology Library**: New York, 1995.