

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Romário Junior Ferreira

**Determinação simultânea de metais em cachaças
utilizando voltametria de redissolução com eletrodos
de nanotubo de carbono e calibração multivariada**

Vitória

2015

Romário Junior Ferreira

Determinação simultânea de metais em cachaças utilizando voltametria de redissolução com eletrodos de nanotubo de carbono e calibração multivariada.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Rosângela Cristina Barthus.

VITÓRIA

2015

**Determinação simultânea de metais traço em cachaças
utilizando voltametria de redissolução com eletrodos de
nanotubo de carbono e calibração multivariada.**

Romário Junior Ferreira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química na área de concentração de Química Analítica.

Aprovada em 29 de junho de 2015 por:

Prof^a. Dr^a. Rosângela Cristina Barthus
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Josimar Ribeiro
Universidade Federal do Espírito Santo
Avaliador interno

Prof. Dr. Juliano Souza Ribeiro
Instituto Federal do Espírito Santo
Avaliador externo

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, 29 de junho de 2015

Dedico esse trabalho a minha família, a Iza e a grandes amigos que muito sabiamente e pacientemente me ajudaram para que conquistasse este grande sonho, muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento cedido para o desenvolvimento dos estudos e execução deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Rosângela Cristina Barthus por nunca desistir de seu orientando mesmo nas maiores dificuldades e problemas, pela orientação, sabedoria, paciência e cooperação no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Honório Coutinho de Jesus e por permitir a utilização de toda estrutura do laboratório de Química Analítica da UFES (LQA).

A meu amigo Thalles Ramom Rosa por toda ajuda no desenvolvimento da Voltametria e na utilização do LQA.

A minha amiga Amanda Ramos Della Fonte por toda paciência e ajuda no desenvolvimento da técnica do ICP OES.

Ao Laboratório de Bebidas da UFES por fornecer algumas amostras de cachaça para a continuação do projeto.

A meus pais por toda a paciência do mundo, seja na luta para ultrapassar todos os problemas no desenvolvimento do trabalho, seja por ajudar a adquirir as amostras de cachaça. Principalmente por todo apoio e nunca desistir de mim nesses 25 anos de vida, de lutas e de batalhas diárias.

Agradecer a Iza Emanuelle Martinez Suave pelo carinho, compreensão, amor e paciência, estando ao meu lado em todas as dificuldades.

A meu amigo Vitor Araújo Freitas por influenciar a realizar a prova de mestrado, mesmo desacreditado de tudo, sempre me ajudando a mostrar um caminho para seguir em frente.

A todos os professores que me ajudaram no desenvolvimento do projeto e construção do conhecimento adquirido no mestrado. Posso perder tudo em minha vida, menos este conhecimento; Muito obrigado.

Aos amigos e colegas que passaram comigo a luta de 2 anos de trabalho árduo.

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Expressões para validação do modelo matemático.....	45
TABELA 02 - Concentrações utilizadas para a construção das curvas de calibração dos metais para o ICP OES.....	63
TABELA 03 – Valores utilizados para a construção da otimização dos parâmetros do ICP OES.....	64
TABELA 04 - Parâmetros operacionais do ICP OES.....	65
TABELA 05 - Matriz de contraste do planejamento de experimentos.....	73
TABELA 06 - Avaliação do modelo da otimização para a razão entre as linhas do Magnésio.....	74
TABELA 07 - Valores de recuperação obtidos para cada metal na análise em diferentes concentrações (referentes a tabela 2)	79
TABELA 08 – Valores de LQ e LD para os metais traço analisados por ICP OES.....	80
TABELA 09 - Valores de concentrações obtidas em 30 amostras de cachaças usadas na validação dos modelos quimiometricos.....	82
TABELA 10 - Valores de F calculados para concentrações previstas em PLS e redes neurais.....	105

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – Tabela periodica com elementos analisáveis por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.	27
FIGURA 02 - Nebulizador pneumático.	28
FIGURA 03 - representativa do plasma, com destaque para a diferença de temperatura em suas diversas regiões.	29
FIGURA 04 - Relação entre potencial, U , e tempo, t , na VC e alguns parâmetros da técnica.	33
FIGURA 05 - Voltamograma cíclico.....	34
FIGURA 06 - Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.....	36
FIGURA 07 - (a) Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso (b) Onda aplicada ao eletrodo de trabalho e sistema de medição para voltametria onde: ΔE_p = Pulso; ΔE_s Incremento de potencial por leitura registrada; τ tempo de duração do pulso.....	38
FIGURA 08 - Etapas do método e curva de potencial vs. corrente para determinações por voltametria de redissolução anódica E_{dep} = Potencial de deposição; $\Delta E/\Delta t$ step voltagem; E_p Potencial de pico; I_p Corrente de pico; a Tempo de deposição; b Período de repouso; c Etapa de determinação.....	40
FIGURA 09 - Representação de um neurônio humano com suas entradas (dendritos), um núcleo (corpo celular) onde ocorre a transformação e as saídas (axônios).....	49
FIGURA 10 - Representação de componentes de um uma rede artificial, onde existem as entradas e interconexões dos pesos, núcleo de função de transferência e as saídas.	
FIGURA 11 - ICP OES (Optima 7000, Perkin Elmer®) utilizado para as análises de metais em cachaça.....	63

FIGURA 12 - Analisador voltamétrico da Metrohm® modelo 797 VA Computrace.....68

FIGURA 13 - A) Eletrodo de Mercúrio (Metrohm®); B) Eletrodo de Carbono (Metrohm®); C) Eletrodo de Nanotubo de Carbono: (1) fio elétrico, (2) rolha para tubo de ensaio em borracha, (3) estrutura de plástico e (4) Área ativa do Nanotubo de Carbono na ponta do eletrodo.....69

FIGURA 14 - Superfície de resposta referente ao fluxo do gás de nebulização e a potência para o magnésio, utilizando valores codificados.....75

FIGURA 15 - Superfície de resposta referente a taxa de introdução e a potência da amostra para o magnésio, utilizando valores codificados.....75

FIGURA 16- Superfície de resposta referente a taxa de introdução da amostra e o fluxo do gás de nebulização para o magnésio, utilizando valores codificados.....76

FIGURA 17 – Gráficos de correlação entre as curvas de calibração de adição de padrão (azul) e as curvas de calibração externa (vermelho) das intensidades obtidas no ICP OES.....77

FIGURA 18 - Voltametria de redissolução anódica com onda quadrada em amostras de cachaça utilizando o mercúrio como eletrodo de trabalho em tampão Acetato 1 mol.L⁻¹, pH 4,7.....85

FIGURA 19 - Voltametria de redissolução anódica com onda quadrada em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de carbono como eletrodo de trabalho em tampão Fosfato 1 mol.L⁻¹, pH 4,0.....86

FIGURA 20 - Voltametria de redissolução anódica com onda quadrada em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de nanotubo de carbono como eletrodo de trabalho em tampão Fosfato 1 mol.L⁻¹, pH 4,0.....

FIGURA 21 – (A) Gráfico de *leverage* para construção do modelo de calibração; (B) Gráfico dos resíduos para as amostras de calibração na construção do modelo.90

FIGURA 22 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com PLS para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de carbono.....92

FIGURA 23 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com PLS para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de mercúrio.....94

FIGURA 24 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com PLS para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de nanotubo de carbono.....96

FIGURA 25 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com RNA para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de carbono.....99

FIGURA 26 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com RNA para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de mercúrio.....101

FIGURA 27 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com RNA para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de nanotubo de carbono.....103

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS - Espectrometria de absorção atômica

ANOVA - Análise de variância

CCD - Planejamento de composto central

CV- Coeficiente de variação

FET - Transistores de efeito de campo

ICP - Plasma indutivamente acoplado

ICP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

ISE - Eletrodos íons-seletivos

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCR - Materiais de referência certificados

MQep - Média quadrática do erro puro

MQfaj - Média quadrática da falta de ajuste

MQR - média quadrática da regressão

MQr - Média quadrática dos resíduos

P.A. - Para análise

PCA - Análise de componentes principais

pH- Potencial hidrogeniônico

PLS – Quadrados mínimos parciais

RNA – Redes neurais artificiais

RMSEP - Raiz quadrada do erro de predição

RMSEC - Raiz quadrada do erro de predição para a calibração

RMSEV - Raiz quadrada do erro de predição para a validação

RSC - Metodologia de superfície de resposta

SQep- Soma quadrática do erro puro

SQfaj- Soma quadrática da falta de ajuste

SQR - Soma quadrática da regressão

SQr - Soma quadrática dos resíduos

SWV - Voltametria de Onda Quadrada

SQT - Soma quadrática total

VC- Voltametria Cíclica

VUV – Ultravioleta no vácuo

LISTA DE SÍMBOLOS

t , T – Tempo

R - Resistência

C - Capacitância

E – Potencial

Edep = Potencial de deposição

$\Delta E/\Delta t$ step voltagem

Ep Potencial de pico

Ip Corrente de pico

a - Tempo de deposição

b - Período de repouso

c - Etapa de determinação

Z_i - Nível aplicado,

Z_m - Valor médio do maior ao menor nível,

Z - Variação entre o maior e o menor nível apresentado e

X_i - Valor atribuído a matriz

k - Quantidade de variáveis escolhidas

x₁ - Potência

x₂ - Fluxo do gás de nebulização

x₃ - Taxa de aspiração da amostra

i e *j* - Níveis de experimentação;

n_i - Número de repetições no nível;

m - Níveis distintos de variáveis independentes;

r - Número de observações;

p - Quantidade de parâmetros do modelo;

$\hat{y}_i$ - Resposta esperada;

y_i - Resposta dos experimentos;

$\bar{y}$ - Valor médio de y_i ;

$\hat{y}_{im}$ - Média do y_i em que a resposta de cada ponto central é a média das respostas nas replicatas;

F - Valor calculado no teste estatístico de variância.

X – Matriz de variáveis independentes

Y – Matriz de variáveis dependentes

E – Matriz residual de **X**

F – Matriz residual de **Y**

P – *Loadings* de **X**

Q - *Loadings* de **Y**

T – *Scores* de **X**

U – *Scores* de **Y**

W – Pesos de cada variável nas redes neurais

J - Matriz Jacobiana do erro para cada peso,

μ - Escalar não negativo,

I - Matriz identidade,

R^2 - Correlação de Person

C1 - Concentração Total do analito na amostra fortificada no ensaio de recuperação

C2 - Concentração do analito na amostra sem fortificação no ensaio de recuperação

C3 - Concentração do analito adicionada no ensaio de recuperação

nm - Nanômetro

% - Porcentagem

μg - Micrograma

Cm - Concentração média

$^{\circ}\text{C}$ - Graus celsius

mim - Minutos

v/v- Volume por volume

h - Hora

s – segundo

mA – Miliampère

mL - Mililitro

$\text{L}.\text{min}^{-1}$ – Litro por minuto

$\text{mL}.\text{mim}^{-1}$ – Mililitro por minuto

$\text{mg}.\text{L}^{-1}$ – Miligrama por litro

$\mu\text{g L}^{-1}$ - Micrograma por litro

mg.L⁻¹ e mg/L – Miligrama por litro

mol L⁻¹- Concentração molar

mmol L⁻¹- Milimol por litro

K - Kelvin

mm - Milímetro

® - Registrado

ppb - Parte por bilhão

V- Voltz

mV - Milivoltz

V/s – Voltz por segundo

- α - Menor nível codificado utilizado no planejamento por composto central

+ α - Maior nível codificado utilizado no planejamento por composto central

M - Número de níveis distintos da variável independente

X - Eixo gráfico que representa a concentração de uma curva de calibração

Y - Eixo gráfico que representa o sinal analítico de uma curva de calibração

S - Desvio padrão amostral

W - Watt

n - Número de repetições

RESUMO

Cachaças são bebidas produzidas a partir da cana-de-açúcar com teor alcoólico de aproximadamente 40% em volume. Devido a seu grande consumo no país e sua complexidade em constituição química, promoveu-se neste trabalho a determinação dos metais cobre, zinco, cádmio e chumbo, que em quantidades elevadas, são nocivos à saúde e ao metabolismo humano. Determinou-se as concentrações desses metais por meio da voltametria de redissolução anódica com onda quadrada, sendo elas analisadas por voltametria em caráter *in situ*. Com as correntes obtidas pela voltametria, juntamente com as concentrações encontradas por uma técnica de referência (espectro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado – ICP OES) desenvolveram-se duas metodologias quimiométricas para a previsão desses metais em amostras de cachaça. As determinações simultâneas desses metais foram construídas por meio das as Redes Neurais Artificiais (RNA) e os Quadrados Mínimos Parciais (PLS), utilizando as correntes obtidas pela voltametria utilizando eletrodos de mercúrio e carbono comerciais, e um eletrodo de nanotubo de carbono construído em laboratório. Antes do desenvolvimento dessas técnicas, pré-tratamentos estatísticos particulares foram desenvolvidos nos dados de corrente de voltametria, a fim de obter-se uma melhor resposta de previsão dos metais. Tanto para a voltametria quanto para o ICP OES, a determinação de chumbo fora ineficaz, podendo justificar que o limite de detecção dos aparelhos era maior que a concentração deste metal nas amostras. Após o desenvolvimento dos métodos quimiométricos, calculou-se a raiz quadrada do erro de predição (RMSEP) para todos os metais, tanto no PLS quanto nas redes neurais, além de uma construção de gráficos de correlação de valores obtidos pelo ICP OES pelos valores previstos pela quimiometria. Os valores de RMSEP foram significativos, informando que as redes neurais obtiveram os melhores resultados para este trabalho. Contudo, o teste F com os valores encontrados pelas técnicas quimiométricas, determina que não existe variação das concentrações previstas em análise estatística. O método proposto mostrou-se simples e objetivo, tornando-se um bom método de análise alternativo.

Palavras Chave: PLS, RNA, Cachaças, ICP OES, Voltametria.

ABSTRACT

Cachaças are drinks produced from sugarcane with an alcohol content of approximately 40% in volume. Due to its large consumption in the country and their complexity in chemical constitution, the determination of the metals: copper, zinc, cadmium and lead, it was promoted in this study, which in high amounts, are harmful to health and the human metabolism. It was determined the concentrations of these metals by voltammetric anodic dissolution with square wave, analyzed in situ by voltammetry. With the obtained currents by voltammetry, along with the concentrations found by a reference technique (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry - ICP OES), along with the currents obtained by voltammetry, two chemometric methodologies were developed to predict these metals in samples of Cachaça. Simultaneous determinations of these metals were constructed by means of Artificial Neural Networks (ANN) and the Partial Least Squares (PLS), using the currents obtained by voltammetry using mercury and carbon commercial electrodes, and a carbon nanotube electrode built in the laboratory. Before the development of these techniques, particular statistical pretreatments were developed in voltammetry currents data in order to obtain a better response of forecast of the metals. Both for the voltammetry and ICP OES, the determination of lead was ineffective, and can justify that the detection limit of the equipment was greater than the concentration of this metal in the samples. After the development of quimiometricos methods, it was calculated root mean squared error of prediction (RMSEP) for all metals, both in PLS as in neural networks, in addition to a construction of correlation charts of values obtained by ICP OES for predicted values by chemometrics. However, the F-test with the values found by chemometrics techniques determines that there is no variation of expected concentrations in statistical analysis. The proposed method showed itself simple and objective, making it a good alternative method of analysis.

Keywords: PLS, ANN, Cachaça, ICP OES, Voltammetry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DA CACHAÇA.....	23
1.2 IMPORTÂNCIA NA DETERMINAÇÃO DOS METAIS EM CACHAÇA.....	24
1.3 TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO	26
1.3.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)	26
1.3.2 Técnicas Voltamétricas	32
1.3.2.1 Voltametria Cíclica.....	33
1.3.2.2 Voltametria de redissolução anódica com onda quadrada.....	35
1.3.2.3 Aparelhagem instrumental e o eletrodo a ser utilizado.....	40
1.4 OTIMIZAÇÃO POR MEIO DE PLANEJAMENTO FATORIAL	42
1.5 QUIMIOMETRIA.....	46
1.5.1 Método dos mínimos quadrados parciais – PLS.....	46
1.5.2 Redes Neurais Artificiais.....	48
1.6 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS	51
1.6.1 Faixa de trabalho	52
1.6.2 Linearidade	52
1.6.2.1 Sensibilidade	53
1.6.3 Seletividade	54
1.6.4. Exatidão	54
1.6.5 Precisão	55
1.6.5.1 Repetitividade	55
1.6.6 Robustez	56
1.6.7 Limite de quantificação e detecção.....	56
2. OBJETIVO	59
2.1 OBJETIVO GERAL.....	59
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	59
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	61
3.1 AMOSTRAS.....	61
3.2 DETERMINAÇÃO DOS METAIS EM CACHAÇA POR ICP OES.....	61

3.2.1 Preparo dos materiais e vidrarias.....	61
3.2.2 Preparo da amostra para análise por ICP OES.....	62
3.2.3 Desenvolvimento da técnica do ICP OES.....	62
3.2.4 Análise de metais utilizando a técnica de ICP OES.....	64
3.2.5 Otimizações das condições operacionais do ICP OES para determinação dos metais.....	65
3.2.6 Avaliações da qualidade dos métodos de determinação dos metais em amostras de cachaça usando ICP OES.....	66
3.2.6.1 Seletividade.....	66
3.2.6.2 Linearidade.....	66
3.2.6.3 Robustez do plasma.....	66
3.2.6.4 Exatidão.....	67
3.2.6.5 Limite de quantificação e detecção.....	67
3.3 DETERMINAÇÃO DOS METAIS EM CACHAÇA POR VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA EM ONDA QUADRADA.....	67
3.3.1 Preparo das Amostra.....	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS DE CACHAÇA POR ICP OES.	72
4.1.1 Otimização das condições operacionais do ICP OES para a determinação dos metais.....	72
4.1.2 Avaliações da qualidade do método de determinação dos metais em amostras de cachaça usando ICP OES.....	77
4.1.2.1 Seletividade.....	77
4.1.2.2 Linearidade.....	78
4.1.2.3 Robustez do plasma.....	79
4.1.2.4 Exatidão	79
4.1.2.5 Limite de quantificação e detecção.....	80
4.1.3 Valores das concentrações encontradas dos metais traço amostras de cachaça.....	81
4.2 DETERMINAÇÃO DOS METAIS TRAÇO EM CACHAÇAS POR VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA COM ONDE QUADRADA.....	84
4.2.1 Eletrodo de Mercúrio.....	84

4.2.2 Eletrodo de Carbono.....	86
4.2.3 Eletrodo de Nanotubo de Carbono.....	87
4.3 ANALISE QUIMIOMETRICA.....	88
4.3.1 Calibração e validação da metodologia quimiometrica dos mínimos quadrados parciais – PLS.....	88
4.3.1.1 Pré- tratamento dos dados no PLS.....	88
4.3.1.2 Resultados obtidos por meio do PLS.....	89
4.3.1.2.1 <i>Resultados obtidos por meio do PLS para o eletrodo de carbono.....</i>	<i>91</i>
4.3.1.2.2 <i>Resultados obtidos por meio do PLS para o eletrodo de mercúrio.....</i>	<i>93</i>
4.3.1.2.3 <i>Resultados obtidos por meio do PLS para o eletrodo de nanotubo de carbono.....</i>	<i>95</i>
4.3.2 Calibração e validação da metodologia quimiometrica das redes neurais artificiais.....	98
4.3.2.1 Pré- tratamento dos dados e desenvolvimento da Rede Neural.....	98
4.3.2.2 Resultados obtidos por meio da Rede Neural.....	98
4.3.2.2.1 <i>Resultados obtidos por meio das redes neurais para o eletrodo de carbono.....</i>	<i>98</i>
4.3.2.2.2 <i>Resultados obtidos por meio das redes neurais para o eletrodo de mercúrio.....</i>	<i>100</i>
4.3.2.2.3 <i>Resultados obtidos por meio das redes neurais para o eletrodo de nanotubo de carbono.....</i>	<i>102</i>
4.3.3 Comparação das técnicas quimiométricas.....	105
5 CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
ANEXOS.....	126

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DA CACHAÇA

A cachaça, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)¹ é um destilado alcoólico proveniente da cana-de-açúcar, obtido a partir de uma fermentação da cana-de-açúcar, gerando teores alcoólicos em faixas de porcentagem de 38% a 48% em volume, numa temperatura de 20°C. Na última década, a produção nacional desta bebida ultrapassou bilhões de litros, divididos em produções artesanais em alambiques e produções industriais, cachaça industrial, produzida em destiladores contínuos^{2,3}. Essa quantidade de bebida gerou, nesta década cerca de 2,5 bilhões de dólares anuais, movimentando a economia brasileira, com cerca de 125 mil hectares de cana-de-açúcar, dedicados, exclusivamente, para a produção da cachaça.

Com a preocupação de determinar a constituição química da cachaça, para controle de ingestão de compostos nocivos à saúde pelo seu consumo, além da determinação de critérios organolépticos como odor e sabor, verifica-se parâmetros inorgânicos, constituídos, principalmente, por metais traços, geralmente componentes secundários do produto, ou normas de substâncias orgânicas (porcentagem alcóolica, por exemplo). Com o passar do tempo, os processos de produção da cachaça, com o acréscimo da tecnologia, vêm se desenvolvendo de forma impactante, apesar de uma metodologia básica para sua produção⁴.

A cachaça é obtida a partir do caldo de cana e, para a obtenção do destilado, o caldo produzido é peneirado, decantado e diluído. Após, ajusta-se o pH do líquido obtido, aquecendo-o numa faixa de temperatura entre 28-30°C, construindo o “mosto” do caldo de cana. Em seguida, adiciona-se o mosto na dorna de fermentação, onde as leveduras concentradas são capazes de realizar a fermentação alcoólica, que durará de um a dois dias. Logo após este processo, efetua-se a separação do fermento da solução fermentada (solução agora chamada de “vinho”), seja por centrifugação ou por sedimentação⁵.

O “vinho” é uma mistura complexa apresentada por componentes sólidos, líquidos e gasosos⁵. Com a destilação desta solução, obtém-se uma nova solução chamada de Flegma (a aguardente propriamente dita), que

posteriormente será armazenada em tanques de aço inoxidável, aço de carbono ou de madeira⁵.

Em geral, os componentes da cachaça podem ser classificados como:

- Primários: água e etanol;
- Secundários: produtos minoritários oriundos do processo de fermentação, sendo outras substâncias orgânicas (álcoois superiores e ésteres), metais traços, principalmente cobre e alumínio, entre outras substâncias.

A cachaça produzida artesanalmente é, geralmente, construída em destiladores de cobre, estes que conferem melhor qualidade ao destilado⁶, comparando-os a alambiques confeccionados com outros materiais como aço inox: contudo ambos podem contaminar a bebida, caso o manejo de produção seja inadequado. A contaminação por metais em aguardentes ocorre em consequência de um acúmulo do “mosto” nas paredes dos destiladores, onde a fermentação irá constituir a cachaça⁷. Além disso, fatores como preparo e plantio da cana-de-açúcar pode influenciar na concentração desses metais na cachaça.

Essas substâncias influenciam em aspectos físico-químicos da cachaça, seja em aromas e sabor, seja em aspectos de toxicidade nocivos à saúde humana⁸.

1.2 IMPORTÂNCIA NA DETERMINAÇÃO DOS METAIS EM CACHAÇA

O ser humano é constantemente exposto a contaminantes metálicos no seu dia-a-dia. Metais são considerados altamente tóxicos tanto para o ser humano, seja para um ambiente natural, quando em elevadas concentrações. A toxicidade dos metais está intimamente ligada a inativação de enzimas nos seres vivos, como, por exemplo, mercúrio e prata, competindo com elementos essenciais, substituindo-os no metabolismo enzimático⁹. Além disso, os metais estão ligados a vários outros fatores de risco a saúde, seja pelas interferências nas funções

celulares, pelas alterações em processos genéticos ou cromossômicos, gerando a aparição de doenças¹⁰.

A complexidade da composição química da cachaça pode justificar a produção de trabalhos intensos para a promoção de análises químicas de suas substâncias, que podem ser divididas em substâncias orgânicas e inorgânicas. A fração inorgânica é constituída, majoritariamente, por metais traço e íons metálicos como Al, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Sn, Fe, Li, Mg, Mn, Hg, Ni, K, Na e Zn¹¹. Estes metais contaminam a cachaça desde o plantio da cana de açúcar, por meio de contaminação do solo com agrotóxicos ou pela própria constituição metálica das rochas e sedimentos da região de plantio, seja pela metodologia de fabricação do destilado, por manejo dos inadequados dos aparatos para a fabricação do aguardente¹². Normalmente, dentro dos parâmetros da matriz analítica, é dada uma maior importância na análise dos componentes orgânicos, promovendo um completo desconhecimento da composição química completa de componentes inorgânicos na cachaça.

Apesar de menos intenso que a análise de composição orgânica da cachaça, com o crescimento significativo do mercado de vendas de aguardente no Brasil, é fácil compreender o desenvolvimento, a relevância e a disponibilidade de metodologias de análises desses metais, em produtos de grande consumo em nível, não somente nacional, mais também mundial, focando principalmente no processo de adulteração de alimentos¹³. Esses metais são comumente determinados por técnicas analíticas como espectroscopia de emissão atômica^{14,15} e análises voltamétricas^{11,16} entre outras. As determinações desses metais são importantes, não somente para a identificação dos constituintes da aguardente, mas também por que, além desses constituintes modificarem os aspectos do destilado, seja em aroma ou sabor, muitos deles são altamente nocivos à saúde humana em determinadas concentrações no corpo^{17,18}.

Este trabalho tem como foco o desenvolvimento de uma calibração multivariada através de técnicas quimiométricas por meio da análise de correntes da voltametria de redissolução anódica com onda quadrada para a previsão das concentrações de alguns desses metais pesados em amostras de cachaça.

1.3 TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO

1.3.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado – ICP OES

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry* - ICP OES) é uma metodologia de análise muito utilizada para quantificar elementos químicos, onde o limite de detecção é muito baixo, em nível traço, trabalhando-se em leitura unielementar ou multielementar, sendo possível desenvolver uma faixa elementar e linear ampla e simultânea¹⁹. A Figura 1 mostra todos os elementos de possível detecção pela técnica de ICP OES.

O ICP OES analisa as amostras em qualquer estado físico, onde geralmente, um processo de digestão/abertura amostral com o objetivo de promover a extração do analito da matriz a ser analisado é realizado. Esta etapa pode promover uma contaminação da amostra por agentes externos ao procedimento (como vidrarias contaminadas e erros de procedimento pelo operador), promovendo sempre novas metodologias para a construção desta digestão amostral.

Fonte: Adaptado de Perkin Elmer, 2008²⁰.

Nas amostras do estado sólido, novas metodologias estão surgindo, principalmente, com a possibilidade da injeção da amostra diretamente no plasma, por meio de técnicas com laser, vaporização eletrotérmica ou ablação com arco de centelha²¹.

Após o preparo dessas amostras, ou até mesmo amostras no estado líquido, utiliza-se um procedimento padrão de introdução das amostras, considerada clássica para o ICP OES: aspiração da solução por uma mangueira com ajuda de uma bomba peristáltica, onde em seguida a amostra será transformada em uma nevoa por meio de um nebulizador, selecionando-a uma porção nebulizada por meio da câmara de nebulização. No fim, a amostra será inserida no plasma. Esses nebulizadores são selecionados para cada tipo de amostra inserida no plasma, possibilitando o conhecimento de vários tipos de conjuntos de câmaras de nebulização e nebulizadores²².

Os nebulizadores pneumáticos, exemplificado na Figura 2, são os mais utilizados, devido a presença de seus tubos finos perpendiculares, onde existe uma entrada para o gás e outra para a amostra a ser analisada. Um tubo de sucção insere a amostra por meio de uma diferença de pressão promovida pelo

gás ao sair de uma região mais estreita para uma em expansão. O argônio é o gás mais utilizado nesta técnica, movimentando-o em velocidades elevadas, chocando-se com a amostra, promovendo a quebra das partículas, formando uma névoa onde a amostra é inserida no gás, no estado líquido²².

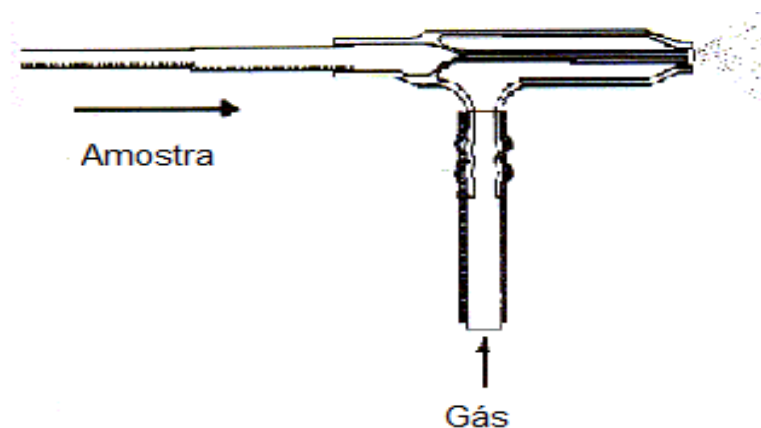


FIGURA 02 - Nebulizador pneumático.

Fonte: Adaptado de Cienfuegos e Vaitsman, 2000²³.

Escolher a metodologia de inserção da amostra no plasma está intimamente associado a complexidade da amostra, a concentração do analito na matriz, o preparo da amostra e a disponibilidade financeira. Isto posto, esta etapa deve ser previamente estudada, pois cada processo tem suas desvantagens e vantagens, como restrições em sua utilização^{24,25}.

O plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma* - ICP) é uma fonte de aplicação em análises, incorporada por um gás parcialmente ionizado, caracterizado por íons excitados e elétrons livres. A tocha de quartzo do aparelho forma o plasma: sua peça é construída por canais em que uma seção anular interna recebe a amostra em fluxo nebulizada, onde a seção anular intermediária irá receber o gás auxiliar, responsável por resfriar a tocha e estabilizar o plasma. A seção anular externa irá receber o gás, geralmente argônio, para a formação e manutenção do plasma¹⁹.

A “bobina de indução”, um aparato que fica envolta de uma parte do plasma, que é constituída em suma por cobre, geralmente resfriada por água ou gás, promove a passagem de uma corrente elétrica gerada pela técnica, promovendo a formação de um campo magnético orientado, incidido sobre os componentes. Mais próximo a entrada gasosa constituída do plasma, há outra bobina, “bobina tesla”, que promove uma descarga elétrica, em contato com o cobre anexado a tocha, gerando as primeiras ionizações gasosas do argônio. Quando este gás ionizado chega à região de campo, acrescido do aumento da energia que é liberada por um gerador de radiofrequência, as partículas serão aceleradas (íons e elétrons), promovendo colisões entre as espécies, criando um efeito cascata denominado *matching*, mantendo o estado plasmático. A Figura 3 representa o plasma com destaque para a diferença de temperatura em suas diversas regiões.

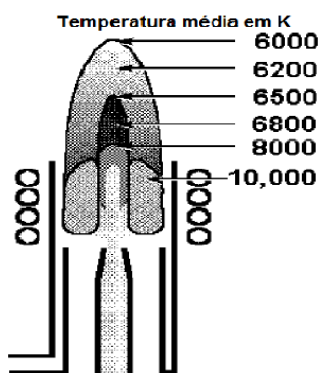
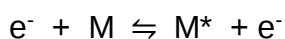


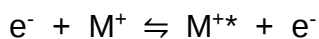
FIGURA 03 - Representativa do plasma, com destaque para a diferença de temperatura em suas diversas regiões.

Fonte: Boss e Fredeen (1997)²⁶.

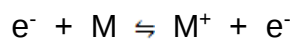
Logo após a inserção da amostra na chama plasmática, ela será dessovatada, tendo seus átomos ionizados por uma excitação, logo após uma volatilização. Programando um software, é selecionada a leitura, seja por linha iônica, seja por linha atômica. Com o processo de excitação, encontram-se moléculas e íons excitados no plasma. Porém, devido a elevada temperatura, existe uma maioria significativa de íons excitados²⁵.

Excitação:

(A)



(B)

Ionização:

(C)

Emissão:

(D)



(E)

Em que:

M - átomo

 M^{+} - íon M^{*} - átomo excitado M^{++} - íon excitado $h\nu$ – fóton¹⁷

Em ICP OES, a energia contabilizada refere-se à emissão espectral devido à excitação de átomos e íons por uma fonte de grande energia, portanto nessa técnica não ocorre o problema de auto-absorção como em espectrometria de absorção atômica (*Atomic absorption spectrometry* - AAS), permitindo que a faixa linear de trabalho seja extensa²⁷.

A maioria dos aparelhos fabricados é dual view, promovendo amostragens de partículas excitadas em duas visões: radial, que é perpendicular ao eixo do plasma; e axial, no mesmo sentido plasmático²⁷.

No eixo radial, a amostragem é promovida na menor região do plasma, ocasionando um limite de detecção maior, porém com menor influência de interferentes. Já no eixo axial ao plasma, a área da chama plasmática é maior, onde promoverá uma maior radiação, melhorando a sensibilidade do sistema. Todavia, a contaminação de interferentes também aumenta, devido ao processo de recombinação de espécies. A região amostra do plasma varia de 15-25mm acima da bobina, região com temperatura entre 6000-6500K ^{23,25}.

Todo fóton da amostra seguirá até o sistema óptico, promovendo a seleção da radiação na linha do espectro escolhida para o desenvolvimento do método, onde posteriormente, será enviada ao detector. A maioria dos aparelhos da técnica analisam na faixa de 180 a 800 nm, contudo, há alguns equipamentos que trabalham no vácuo ou com sistema purgador que diminuem a interferência gerada pelos componentes presentes no ar, facilitando leituras de linhas abaixo de 180 nm^{24, 28}.

Os materiais ópticos mais utilizados no ICP OES, em sistemas ópticos, são caracterizados por:

- 1) Fendas de filtragem de radiação;
- 2) Lentes e espelhos que focam a energia eletromagnética;
- 3) Grades de difração que separam em ordens e o prisma que é responsável pela refração do sistema, separando os comprimentos de onda.

Dentro deste sistema, os componentes mais usuais foram os com rede Echelle e circuitos Rowland. Echelle refere-se a um equipamento sequencial, que promove uma leitura multielementar, que possui apenas um detector, lendo uma linha espectral de cada vez. O sistema Rowland trata-se de um sistema de características simultâneas, possibilitando a varredura de diversos elementos ao mesmo tempo, possuindo diversas saídas de radiação, onde cada uma existirá um detector.

O detector promove a transformação da energia luminosa em um sinal elétrico, geralmente, caracterizado por um detector no estado sólido para esses equipamentos. Além de sólido, ele possivelmente, é constituído por um material

semi-condutor, possuindo um elemento de detecção, usualmente o silício. Quando a radiação incide sobre este elemento, promove-se uma remoção dos elétrons, gerando uma componente eletrônica, um campo elétrico mais precisamente, pela aplicação de uma tensão, onde os elétrons livres serão movimentados no sentido contrário, gerando uma corrente elétrica, proporcional à radiação incidida. Utilizar este detector tem suas vantagens: diminuição de interferências devido a linhas espectrais muito próximas, armazenamento de informações para que elas possam ser reprocessadas e possibilidade de análise em concentrações mais altas²⁵.

Concluindo, os softwares promovem a construção gráfica dos resultados, onde o eixo da ordenada informa a intensidade máxima do sinal gerado pela detecção, correlacionando esta intensidade com a concentração do analito na amostra. Estes softwares avaliam e selecionam de todas as condições operacionais possíveis a serem identificadas, realizando testes de eliminação de efeitos causados por interferentes²⁹.

1.3.2 Técnicas voltamétricas

Técnicas voltamétricas tem uma grande aplicação nos trabalhos acadêmicos em estudos nas áreas de biologia molecular^{30,31}, biomédicas^{32,33}, química ambiental^{34,35}, físico-química^{36,37} e química analítica^{38,39}, qualificando e quantificando dados e informações específicas sobre a constituição e propriedades de substâncias, com novos procedimentos analíticos^{40,41}.

Dentre todas as metodologias eletroanalíticas, a voltametria é caracterizada pela obtenção de dados relacionadas a amostras e analitos, por meio da medida de uma corrente resultante da oxidação ou redução na parte superficial de um eletrodo de trabalho, na célula eletroquímica, quando uma diferença de potencial é aplicada ao sistema. Dentre as técnicas voltamétricas utilizadas para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos e estudos eletroquímicos estão a Voltametria de Onda Quadrada (Square Wave Voltammetry - SWV) e Voltametria Cíclica (Cyclic Voltametric – VC)^{40,41}.

Nessa dissertação os dados obtidos foram analisados por voltametria de redissolução anódica com onda quadrada, utilizando a voltametria cíclica como técnica de teste para o funcionamento do eletrodo.

1.3.2.1 Voltametria Cíclica

Versátil e objetiva para a eletroanalítica, a voltametria cíclica promove a avaliação da reversibilidade de processos eletroquímicos, desenvolvendo uma facilidade nos estudos de amostras que não se conhece informações sobre os potenciais, como sua eletroatividade. Esta voltametria é uma técnica de varredura de potencial reversa, onde a velocidade de varredura é conhecida e aplicada em um potencial variado sobre o eletrodo e, ao atingir o potencial final, a varredura segue processo inverso, na mesma velocidade⁴². Nesses potenciais, chamados de primeiro e segundo potenciais do vértice, o processo de inversão do sentido da varredura irá ocorrer, que pode determinar a reversibilidade de uma reação eletroquímica, pelos fenômenos de redução e oxidação⁴³. Observa-se na Figura 4 a relação entre o potencial (E) e o tempo (t) gerando o voltamograma observado na figura 5.

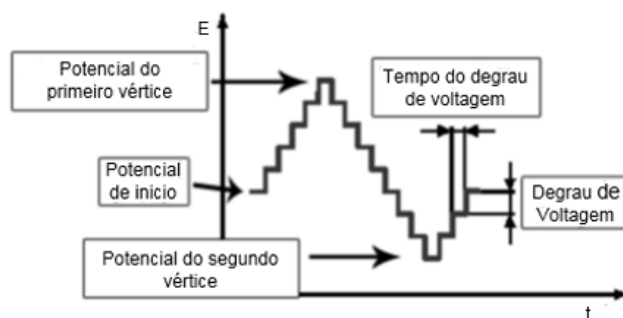


FIGURA 04 - Relação entre potencial, E, e tempo, t, na VC e alguns parâmetros da técnica.

Fonte: ROSA⁴⁴

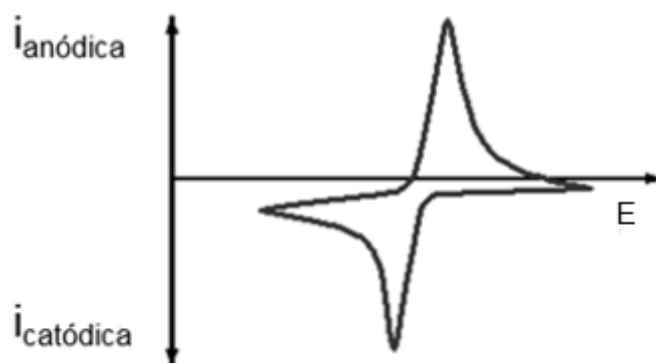


FIGURA 05 - Voltamograma cíclico

Fonte: ROSA⁴⁴

A voltametria cíclica indica suas informações, sejam quantitativas e principalmente qualitativas, ou seja, por meio de um registro uma curva da corrente (i) correlacionando-a com o potencial aplicado na solução eletrolítica. Geralmente, nesta técnica, são utilizados três tipos de eletrodos ^{45,46}:

- Eletrodo de trabalho, no qual a reação interessada irá ocorrer quando aplicado um potencial elétrico;
- Eletrodo de referência no qual o fluxo de corrente não ocorrerá;
- Eletrodo auxiliar ou contraeletrodo, completando o circuito, normalmente de platina.

A voltametria cíclica tem sua metodologia limitada, geralmente aplicada somente em soluções condutoras de eletricidade. Todavia, ela é interessante no que se refere a uma interface de amostras sólidas-líquidas e na determinação dos valores de potencial de redução para cada analito nas amostras. O método é empregado com relativo sucesso na determinação superficial de compostos diferenciados a base de carbono, carbono ativado e nanotubos de carbono em contato com líquidos iônicos⁴⁶.

1.3.2.2 Voltametria de redissolução anódica com onda quadrada

As técnicas voltamétricas vêm se desenvolvendo gradativamente por causa do desenvolvimento das áreas eletrônicas e computacional. Isso proporcionou uma maior velocidade de varredura e alta sensibilidade, além da possibilidade de uma interface com equipamentos eletroquímicos para o controle digital de uma perturbação imposta ao eletrodo de trabalho, possibilitando os desenvolvimentos de técnicas voltamétricas, em especial metodologias de técnicas de pulso a partir da década de 50⁴⁷.

Essas técnicas de pulso são baseadas na medida de uma corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial, onde a corrente está correlacionada tanto com a largura do pulso, quanto com o degrau de potencial que é aplicado ao eletrodo⁴⁸. A medida que o tempo passa, com ajuda da tecnologia aplicada à técnica de pulso, obteve uma nova linha metodológica de aplicação do método: a voltametria de onda quadrada.

A voltametria de onda quadrada é considerada uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis⁴⁷, seus limites de detecção são comparados às técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

Nela ocorre a variação de um potencial realizado na forma de escada é provocada por pulsos de potencial igual à amplitude de uma escada de potenciais de altura constante e duração $2\tau_p$ (Figura 6)⁴⁷. As medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante, apresentando excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas. O pico voltamétrico resultante apresenta posição, largura e altura características do tipo de sistema redox avaliado.

A Figura 06 informa detalhadamente a forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada, indicando em 1 a etapa do processo reversível do sistema, em 2 um processo irreversível, com separação observada das correntes resultantes, inversa e direta, sendo que ambos possuem perfis

voltamétricos semelhantes aos que eram obtidos na polarografia de onda quadrada.

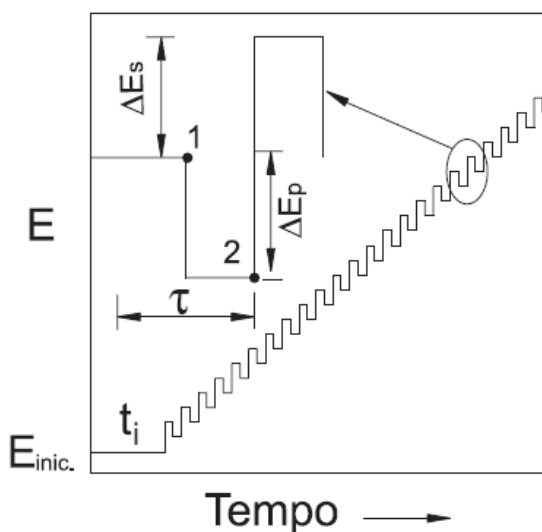


FIGURA 06 - Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.

Fonte: SOUZA⁴⁷

A grande vantagem da voltametria de onda quadrada é a obtenção de correntes de picos muito definidas nos experimentos executados em velocidade de varredura elevada, melhorando a sensibilidade da técnica³⁵. Concomitante a isso, por tratar-se de uma técnica de pulso, a corrente faradaica será coletada em um intervalo de tempo adequado para que a contribuição da corrente capacitiva tenha se minimizado.

Outras duas grandes vantagens podem ser destacadas para a Voltametria de Onda Quadrada¹⁷:

- Ausência de interferências da corrente capacitiva, onde as correntes medidas são realizadas ao final do degrau de potencial, momento que a corrente capacitiva se tornou insignificante, melhorando as resoluções dos experimentos;
- A análise de componentes de corrente reversa e direta informa a divulgação de valores mecanísticos iguais àqueles obtidos por voltametria

cíclica, contudo, com maior sensibilidade devido à minimização das correntes capacitivas.

A voltametria de onda quadrada, associada a redissolução anódica é altamente utilizada na determinação quantitativa de metais em concentrações de nível traço, devido seu limite de detecção ser muito baixo, comparado a outras técnicas espectroscópicas e cromatográficas. Este processo ocorre devido a uma pré-concentração desses metais, onde seus íons presentes nas soluções sofrerá uma redução eletrolítica a um potencial determinado previamente, mais negativo a seu potencial de redução. Este procedimento inicial é denominado *Plating*^{49,50}.

A voltametria de redissolução anódica foi utilizada pela primeira vez por Zbinden⁵¹, quando ele promoveu a determinação de cobre com estado de oxidação II, tentando depositá-lo num eletrodo de trabalho de platina. Observando que a quantidade de cobre reduzida era mínima para ser quantificada com certa exatidão, Zbinden lembrou-se de inverter a corrente e oxidou o cobre existente no eletrodo, conseguindo prever quantitativamente a quantidade do metal por meio da corrente consumida durante o procedimento⁵⁰.

Os avanços instrumentais eletroquímicos, desenvolvidos na área da informática e no controle digital da perturbação no eletrodo de trabalho promoveram o desenvolvimento da voltametria de redissolução anódica. Com essas novas tecnologias, novos métodos voltamétricos foram surgindo, substituindo, a partir da década de 50, os métodos polarográficos⁴⁷.

Criada por Ramaley e Krause e ajustada por Osteryoung, Turner e Christie⁴⁴, a voltametria de redissolução anódica com pulsos possibilitaria, segundo os autores, um limite de detecção menor ainda, comparado aos métodos tradicionais de varredura linear, promovendo uma maior sensibilidade a técnica voltamétrica. Com os pulsos, segundo os autores, parte da substância redissolvida é a resposta entre o intervalo de pulso.

Observado na Figura 7, a medida de corrente está sendo realizada apenas no final de cada pulso de potencial, onde a corrente capacitiva sofre uma minimização considerável e a corrente faradaica possui sua maior magnitude. Este processo ocorre devido a corrente capacitiva ser proporcional a $e^{-t/RC}$, onde τ é o tempo, R a resistência da solução e C a capacitância da dupla camada; a corrente faradaica é proporcional a $t^{-1/2}$ ⁴⁷.

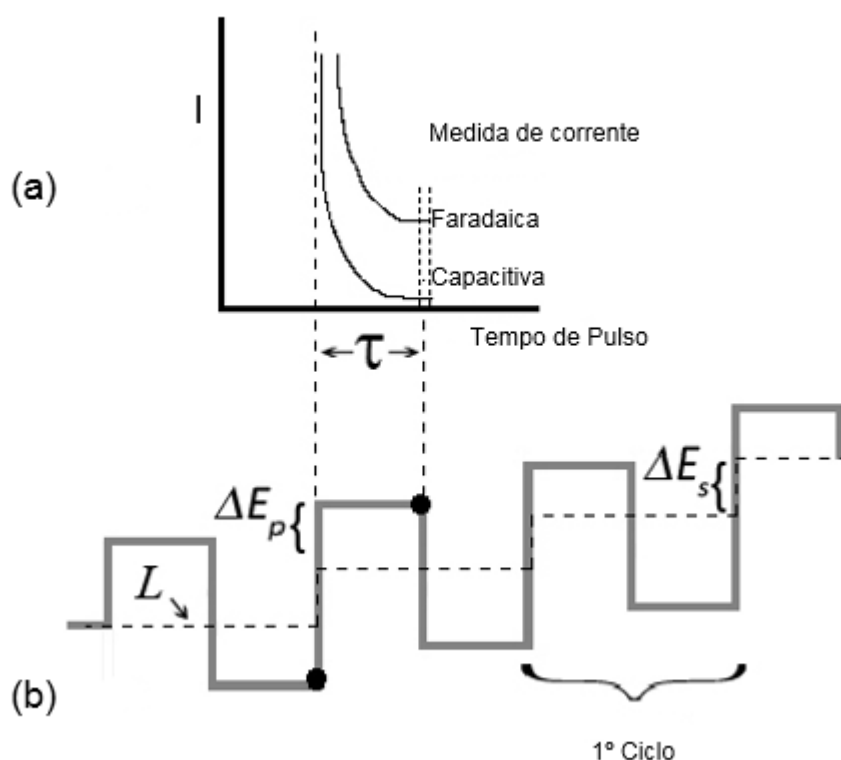


FIGURA 07 - (a) Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso (b) Onda aplicada ao eletrodo de trabalho e sistema de medição para voltametria onde: ΔE_p = Pulso; ΔE_s Incremento de potencial por leitura registrada; τ tempo de duração do pulso³².

A Figura 7(a) mostra o comportamento da corrente (I) a medida que o pulso se desenvolve, onde o decaimento da corrente capacitiva é mais evidente que a faradaica. A Figura 7(b) indica a imagem e forma de medição para a voltametria de onda quadrada.

Na Figura 8, ilustra-se o passo a passo da voltametria de redissolução anódica. A etapa de eletrodeposição acontecerá na seção em que o analíto será reduzido no eletrodo de trabalho a um potencial constante menor que o seu potencial de redução. Esta etapa irá ocorrer com agitação continua, onde sua velocidade de rotação deve ser otimizada, como também o melhor potencial de deposição (E_p), tempo de duração da etapa, volume da amostra e área de superfície do eletrodo⁴³. Na segunda etapa, representada no processo em b, ocorrerá o período de repouso, onde não existe agitação do sistema e a corrente catódica estará em queda devido à falta de convecção do sistema. Na parte c da Figura 8, a varredura de potencial irá ocorrer em uma taxa de variação constante. Com isso, constroem-se os dados de corrente, como função do potencial, gerando um voltamograma que nos retorna a corrente de pico (I_p) o qual está relacionado com a concentração do analito⁵².

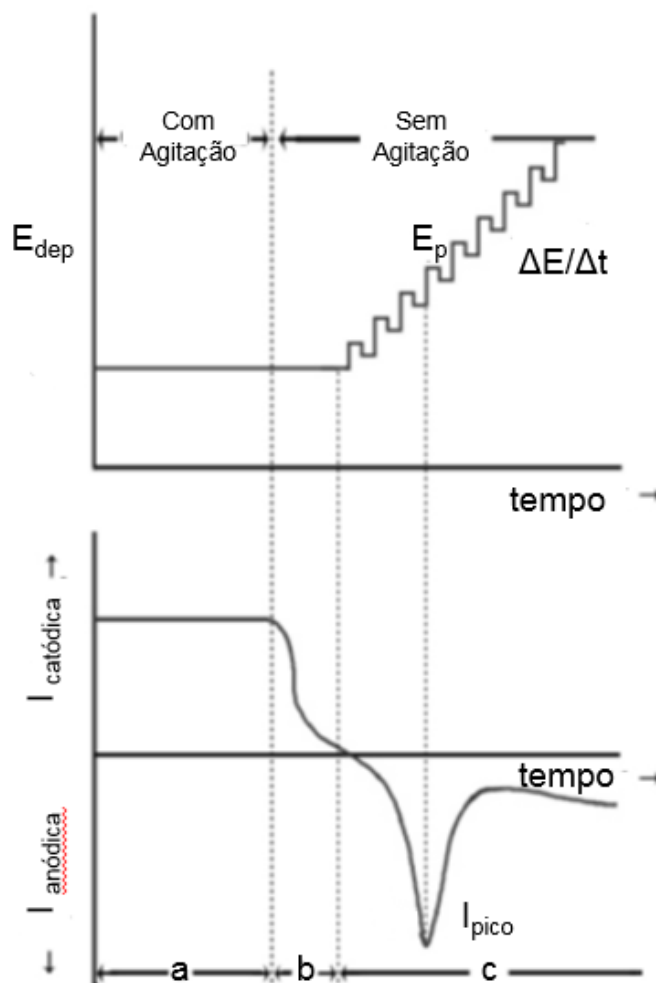


FIGURA 08 - Etapas do método e curva de potencial vs. corrente para determinações por voltametria de redissolução anódica E_{dep} = Potencial de deposição; $\Delta E/\Delta t$ step voltagem; E_p Potencial de pico; I_p Corrente de pico; *a* Tempo de deposição; *b* Período de repouso; *c* Etapa de determinação⁴⁴.

1.3.2.3 Aparelhagem instrumental e o eletrodo a ser utilizado

O potenciostato é utilizado para promover o controle da voltagem entre o eletrodo de trabalho e o contraeletrodo. Essa voltagem é modificada para promover a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência de acordo com *software* no computador que estabelecerá a função entre potencial

e tempo. Observando de forma mais pedagógica e didática, o potenciostato é visualizado como um dispositivo com capacidade de fornecer corrente suficiente para que o potencial desejado seja obtido em qualquer momento, gerando a leitura de voltamogramas, cronoamperogramas e polarogramas quando a corrente é quantificada⁵³.

No campo da potenciometria e voltametria, dois dispositivos de eletrodos são utilizados para o processo potenciométrico: eletrodos íons-seletivos (ISEs), sensores com maior história, e transistores de efeito de campo (Field Effect Transistor - FET)⁵⁴. Vários sensores são desenvolvidos para detecção de atividades mínimas de metais pesados, onde o ponto chave para a obtenção de um sensor eletroquímico bom e confiável encontra-se no tipo de material que constitui a plataforma de detecção.

Neste campo de eletrodos voltamétricos e potenciométricos, os nanomateriais, trouxeram algumas vantagens em relação ao desenvolvimento eletroquímico em plataformas de detecção de metais pesados⁵⁴. A utilização de materiais de nanoestrutura provoca o aproveitamento do aumento da área de eletrodo de superfície, o aumento da taxa de transporte de massa, do rapto de transferência de elétrons em comparação com eletrodos à base de materiais diferentes⁵⁵.

Materiais nanoestruturados de carbono, como os nanotubos de carbono, atraíram consideravelmente a atenção para pesquisadores que trabalham neste campo de detecção de metais pesados, utilizando-os como eletrodos, por causa de suas excelentes propriedades gerais, associando ao carbono características de atuar simultaneamente como agente absorvante e pré-concentrador na plataforma do transdutor⁵⁴.

Os nanotubos de carbono são sensores amplamente utilizados pela eletroquímica de nanoestruturas, apesar de serem um ramo novo de constituição de eletrodos^{56,57}. Os nanotubos de carbono têm grandes vantagens sobre outros eletrodos constituídos de carbono devido sua estabilidade química, seu pequeno tamanho, ótima condutibilidade elétrica, natureza eletrocatalítica, alta resistência mecânica e elevada área superficial específica. A mudança dos eletrodos padrões para nanopartículas, mais especificamente, os nanotubos de carbono,

foi documentado recentemente por causa de resultados positivos em detecção de baixíssimas concentrações de metais em matrizes quaisquer e alta sensibilidade na detecção destes metais pesados^{57,58}.

1.4 OTIMIZAÇÃO POR MEIO DE PLANEJAMENTO FATORIAL

Otimizar representa nada mais que obter a melhor eficiência de dados de processos ou sistemas de forma a torná-lo mais funcional e efetivo possível^{59,60}. Promover uma otimização de um processo ou sistema, você encontra determinados valores de variáveis que irão gerar uma resposta sobre influência dessas variáveis. A utilização do método de planejamento fatorial, em estudos que abrangem muitas variáveis é importante, pois torna possível o planejamento e a realização de maneira organizada de uma quantidade mínima necessária de experimentos, economizando tempo e recursos financeiros

Promovia-se antigamente uma análise univariada das otimizações, onde avaliava-se a alteração dos resultados em função dos níveis (valores), não levando em consideração a influência dos fatores (variáveis) que poderiam ter ao serem utilizados concomitantemente. Isto posto, o valor de cada fator seria avaliado em cada experimento, provocando vários experimentos para se chegar a valores resposta otimizados para cada parâmetro.

Utilizando os planejamentos fatoriais, os experimentos são realizados seguindo uma determinada disposição matricial de contrastes, sendo executados de forma aleatória, diminuindo os erros principalmente provenientes de tendências dos analistas⁶¹.

Para a construção de uma otimização, inicialmente são estabelecidos fatores que podem influenciar significativamente as respostas que se deseja analisar. Caso não conheça esses fatores, será necessário selecionar as possíveis variáveis do sistema onde existe uma suspeita para a realização do planejamento fatorial por triagem, onde testa-se todas as combinações possíveis.

Utiliza-se a Equação 01 para codificar os níveis e organizar a matriz de contraste dos experimentos⁶².

$$Xi = \frac{Zi - Zm}{\frac{\Delta Z}{2}} \quad (1)$$

Onde **Zi** é o nível aplicado, **Zm** é o valor médio do maior ao menor nível, **Z** corresponde a variação entre o maior e o menor nível apresentado e **Xi** é um valor atribuído a matriz que varia de acordo com o método.

O número de experimentos segue uma equação de n^k onde k representa a quantidade de variáveis escolhidas que eleva a quantidade de níveis estudados, sendo o número 2 sua quantidade⁶⁰.

O processo de triagem tem como objetivo avaliar a normalidade do modelo gerado por meio de uma análise gráfica de probabilidade acumulativa, indicando quais fatores são significativos ou não⁶².

Aplicando-se a triagem, a próxima etapa é a realização do planejamento fatorial em si, utilizando uma metodologia para a construção do mesmo, sendo uma delas a de metodologia de superfície de resposta (*Response Surface – RSC*). Esta técnica foi desenvolvida na década de 50, pelo britânico George Edward Pelham Box, na qual trabalha-se a relação entre as respostas dos experimentos e as variáveis utilizadas, por meio de uma expressão matemática, originando gráficos 3D⁶³.

A superfície de resposta tem duas etapas distintas: primeiro, o deslocamento das variáveis e, logo após, a modelagem desses valores, onde essas etapas serão trabalhadas e repetidas até obter uma região ótima de valores, um máximo e mínimo da superfície analisada. O cálculo matemático obtido pode ter vários graus, contudo é comum obter-se uma expressão linear ou quadrática.

Dentre o conjunto de planejamentos fatoriais, pode-se destacar o planejamento de composto central (*Central Composite Design – CCD*) que permite testar três ou mais níveis, promovendo um pequeno número de experimentos, gerando

uma robustez nas respostas obtidas, resistentes a condições não ideais de análise, promovendo a simplicidade dos cálculos⁶⁴.

No planejamento de composto central existem níveis codificados seguindo uma matriz que possuem pontos referentes ao planejamento fatorial simplório de dois níveis (-1 e +1) e k fatores, além de pontos de referência a um planejamento axial variando de $-\alpha$ a $+\alpha$, com pontos nulos (centrais), os quais devem ser repetidos no mínimo três vezes⁶⁰.

Constrói-se uma matriz de ensaios, desenvolvidos posteriormente pela Equação 2, correlacionando os valores determinados das variáveis x_1 , x_2 e x_3 , com o objetivo de realizar os experimentos previamente estabelecidos: aos valores de resposta, aplica-se uma regressão linear múltipla. Realiza-se uma observação dos pontos mínimos e máximos por meio dos gráficos de superfície gerados ou por expressões matemáticas geradas.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + e$$

(2)

A análise dos pontos nulos em triplicata tem como o objetivo indicar uma medida de erro puro a variância da resposta prevista e o valor de α que geralmente é estabelecido usando o conceito de rotabilidade^{64,65}.

Como forma de assegurar os resultados, realiza-se a validação do planejamento por meio da análise de variância ANOVA⁶⁶. A Tabela 01 informa as expressões que serão calculadas para validar o método.

TABELA 01 - Expressões para validação do modelo matemático

Fonte	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Media Quadrática	Valor de F
Regressão	$SQR = \sum_i^m \sum_j^{ni} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQR = \frac{SQR}{p - 1}$	$F = \frac{MQR}{MQr}$
Resíduo	$SQr = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_i - \hat{y}_i)^2$	$r - p$	$MQr = \frac{MQr}{n - p}$	
Falta de Ajuste	$SQfaj = \sum_i^m \sum_j^{ni} (\hat{y}_i - \hat{y}_{im})^2$	$m - p$	$MQfaj = \frac{SQfaj}{m - p}$	$F = \frac{MQfaj}{MQep}$
Erro Puro	$SQep = \sum_i^m \sum_j^{ni} (\hat{y}_i - \hat{y}_{im})^2$	$r - m$	$MQep = \frac{SQep}{n - m}$	
Total	$SQT = SQR + SQr$	$r - 1$		

Fonte: Barros-neto, Scarminio e Bruns (2003)⁶²

Onde:

- i e j são níveis de experimentação;
- n_i é o número de repetições no nível;
- m representa os níveis distintos de variáveis independentes;
- r é o número de observações;
- p informa a quantidade de parâmetros do modelo;
- $\hat{y}_i$ é a resposta esperada;
- y_i é a resposta dos experimentos;
- $\bar{y}$ é o valor médio de y_i ;
- $\hat{y}_{im}$ é a média do y_i em que a resposta de cada ponto central é a média das respostas nas replicatas;
- F é o valor calculado no teste estatístico de variância.

Ao avaliar o modelo, relacionando os resíduos e a regressão, o F calculado deve ser superior ao F crítico, com 95% de confiança, onde demonstra a relação linear entre as variáveis x e y . Ao avaliar a falta de ajuste com o erro puro, o valor de F deve ser inferior ao F tabelado (95% de confiança), mostrando que o modelo é ajustado⁶⁶. Outro fator de análise a ser utilizado para validação do método

matemático é o coeficiente de Person (R^2) onde quanto mais próximo de 1 mais adequado o valor será.

Para a análise no ICP OES, utiliza-se a otimização das condições operacionais do equipamento por meio de um planejamento fatorial de composto central, não usando somente a intensidade das respostas, mas a razão dos sinais encontrados para a leitura do magnésio nas linhas 280,270 nm e 285,213 nm, ou seja, condição de avaliação da robustez^{60,67}. Além disso, constata-se que a condição axial da tocha de plasma apresenta de modo geral, cinco vezes mais sensibilidade para a detecção desses sinais do que a radial⁶⁸.

1.5 QUIMIOMETRIA

1.5.1 Métodos dos quadrados mínimos parciais - PLS

O modelo de PLS - Método dos quadrados mínimos parciais – é moderno, desenvolvido na quimiometria e muito popularizado^{69,70}. É um método normalmente empregado para calibração multivariada, onde o sinal multivariado é estudado. É possível promover a determinação de uma matriz de dados, sem qualquer perda estatística importante, utilizando sua matriz de *scores*, não correlacionando suas variáveis. Inicialmente, os dados obtidos são organizados na forma de matriz: matriz **X** e **Y**, onde contém as variáveis independentes, **X**, e as variáveis dependentes, **Y**. Essas matrizes são desenvolvidas em um conjunto de somas de variáveis latentes, onde os modelos são obtidos pelas Equações 3 e 4:

$$X = TP^T + E = \sum t_f p_f^T + E \quad (3)$$

$$Y = UQ^T + F = \sum t_f p_f^T + F \quad (4)$$

Onde **E** e **F** são matrizes residuais, **P** e **Q** são as chamadas matrizes de “loadings” ou pesos de **X** e **Y**; **T** e **U** são matrizes de “scores” ou “escores” de **X** e **Y** respectivamente⁷¹. O Produto encontrado da **T** e **P**^T aproximam-se as variáveis independentes os valores de voltamogramas obtidos, por exemplo) e o produto **L** e **QT** trabalham para as variáveis dependentes (concentrações obtidas pelo ICP OES). No PLS, as informações importantes contidas nos voltamogramas estão concentradas em algumas variáveis latentes que são otimizadas para produzir a melhor correlação com a propriedade desejada a serem determinada pelo método, no caso, as concentrações dos metais. Obtém-se uma matriz de concentração, que será comum tanto a concentração de **Y** quanto as medições de **X**. A concentração de novas amostras pode ser estimada a partir dos novos “scores” **T**^{*} e o modelo de carga **Q**, o qual pode ser substituído na Equação 4 levando a Equação 5:

$$Y_{new} = T^* Q^T \quad (5)$$

Usando a validação cruzada podemos obter o melhor número de variáveis latentes para o decorrer do procedimento, onde é baseada na determinação da raiz quadrada do erro de predição (RMSEP).

No PLS, normalmente, o método assume uma relação linear entre os valores instrumentais (**X**) e as concentrações da amostra (**y**). Mínimos desvios de linearidade são aceitáveis, onde no caso, fatores de modelagem adicionais são usados em consideração no modelo. Contudo, na presença de uma não linearidade substancial, o PLS promove grandes erros de previsão, gerando modelos falhos.

Geralmente, os modelos não lineares para a resolução do PLS são insatisfatórios, devido às componentes principais terão seus valores encontrados em blocos separados, onde existe uma dificuldade para analisar os *scores* dos valores. A manipulação dos resultados e informações de ambos os blocos, de forma simultânea, torna-se a melhor correlação possível para o método do PLS: isso ocorre rotacionando levemente as componentes principais, mudando os valores de *scores* ligeiramente⁷¹. Este processo rotacional sendo empregada, as componentes principais tornam-se variáveis latentes⁷¹, onde essas variáveis não descrevem apenas uma direção de maior variância, e sim uma correlação entre os valores dessas variáveis latentes com as amostras individuais, com o aumento da correlação entre **T** e **U**.

1.5.2 Redes neurais artificiais

Redes neurais artificiais (RNA) é um método de calibração multivariada utilizado, principalmente para a modelagem de dados não lineares, apesar de muitos utilizarem estes métodos para dados lineares^{72,73}.

A terminologia rede neural indica pesquisas onde utiliza-se a inteligência artificial, e procura-se entender o comportamento cerebral⁷⁴. Segundo Barr & Feigenbaum⁷⁴ a inteligência artificial é uma parte da ciência computacional onde existe o desenvolvimento de sistemas computacionais inteligentes, exibindo características associativas a inteligência humana.

A rede neural é baseada no funcionamento do sistema nervoso do corpo humano, onde existe a detecção de estímulos e envia essas informações iniciais para os neurônios, encaminhando-as para o cérebro. Na Figura 09, existe a representação simplificada de um neurônio biológico. No córtex cerebral, o pulso elétrico é repassado pelos neurônios, onde existe uma interação dos mesmos por meio de forças sinápticas. Baseando em um sinal de entrada, o cérebro conclui e reenvia um sinal de saída na forma de respostas ou reações.

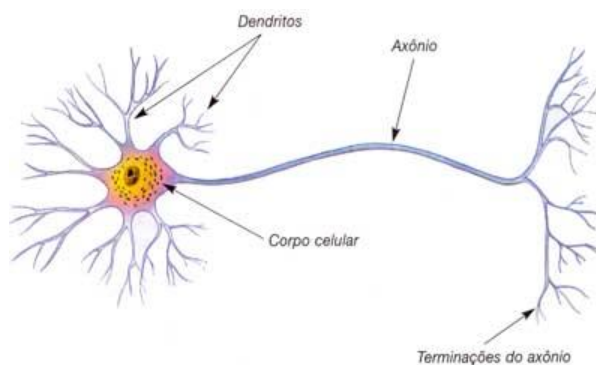


FIGURA 09 – Representação de um neurônio humano com suas entradas (dendritos), um núcleo (corpo celular) onde ocorre a transformação e as saídas (axônios).

A rede neural artificial é um método composto por várias unidades simples (os neurônios artificiais), adequadamente associados, produzindo um complexo comportamento. O comportamento de uma rede neural é caracterizado pelas suas topologias. Utiliza-se como alimentação para essas topologias e construção da rede neural, três camadas características: uma primeira camada que corresponde à entrada dos dados; uma camada escondida, com um número apropriado de neurônios; por fim, camada de saída ou respostas da rede neural, que corresponde à concentração dos metais nas cachaças.

De forma simplória podemos utilizar a Figura 10 para representar a construção de uma rede neural. Para construir uma rede neural, as entradas **X** de dados são multiplicados pelos seus respectivos pesos **W** e serão integradas a um neurônio artificial. Aplica-se uma função de somatória desses valores ($Net_j = \sum X_i.W_{ij}$) antes de promover a interação nos neurônios. A saída de cada camada é obtida por meio da aplicação de uma sigmoide a função de transferência hiperbólica dos dados ou em uma forma linear. Normalmente, existe um ajuste na função por meio de um bias. Para uma análise de redes de multicamadas, a saída de uma camada se torna a entrada para uma próxima camada, onde também as saídas dos neurônios na última camada são consideradas os produtos da rede. Por fim encontra-se os valores de saída **Y**.

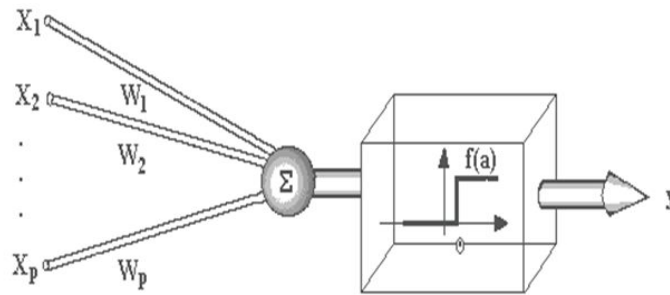


FIGURA 10 - representação de componentes de um uma rede artificial, onde existem as entradas e interconexões dos pesos, núcleo de função de transferência e as saídas.

Com os valores de saída de rede/valores estimados e os valores esperados/teóricos, é possível correlacioná-los esperando encontrar o erro médio quadratico (erro de calibração). Este erro é definido como a soma do quadrado que resulta da diferença entre os valores esperados e estimados. Após isso, é necessário corrigir os pesos de todas as camadas até que o erro de calibração seja minimizado os quais podem ser feitos através de um algoritmo especificado. O algoritmo utilizado para corrigir os pesos e preconceitos neste estudo foi algoritmo de Marquardt-Levenberg⁷⁵. Isto pode ser representado pela Equação 6:

$$\Delta \mathbf{x}_k = -[\mathbf{J}^T(\mathbf{x}_k)\mathbf{J}(\mathbf{x}_k) + \mu_k \mathbf{I}]^{-1} \mathbf{J}^T(\mathbf{x}_k)(\mathbf{v}_k) \quad (6)$$

Onde $\mathbf{J}$ é a matriz Jacobiana do erro para cada peso, μ é o escalar não negativo, $\mathbf{I}$ a matriz identidade, $\mathbf{x}_k$ representa os pesos e $\mathbf{v}_k$ representa o erro. Este método apresentado pode ser visto como um procedimento intermediário entre o método de Gauss-Newton e o método de gradientes descendentes⁷⁶. Neste algoritmo, quando μ assume valores elevados, insere-se um gradiente descendente ao método, onde os novos valores de μ são valores menores que os iniciais. O método de Levenberg-Marquardt é mais rápido em convergência e é mais robusta do que os outros algoritmos.

Depois de corrigir os pesos de cada variável e obter um erro satisfatório, a rede neural artificial está “treinada”, e dessa forma será possível avaliar as propriedades de generalização da rede neural por meio da avaliação de outro grupo, um conjunto de validação que tem dados diferentes daqueles usados na calibração, onde as concentrações dos metais obtidos nas cachacas de um novo grupo podem ser previstas por este método.

1.6 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Para a realização da verificação dos métodos de análise, promove-se a verificação de parâmetros do desempenho da metodologia, onde assegura-se a veracidade dos resultados dos experimentos realizados. Desta forma, afirma-se a utilização da metodologia como metodologia válida na avaliação de um produto ou serviço, com relação a uma especificação na avaliação do cumprimento de uma norma ou lei, entre outros⁷⁷.

Esta etapa irá ocorrer após o estudo prévio e otimização das condições de análise experimental, evitando falsos resultados. O governo federal promove a regulamentação de determinadas atividades que requerem a execução de experimentos químicos, por meio de guias de validação desenvolvidos, nos quais existe procedimentos padrões a serem seguidos e, em alguns casos, determina o limite de aceitação e validação do método⁷⁸.

O número de replicatas válido a serem realizadas para a análise dos parâmetros de validação de um método podem varia de acordo com a metodologia e do operador, contudo, é comumente utilizar sempre no mínimo três replicatas⁷⁹. As características de desempenho mais estudadas são: linearidade, seletividade, faixa de trabalho, exatidão, precisão e robustez⁸⁰.

1.6.1 Faixa de trabalho

Para qualquer experimento de cunho quantitativo, tem-se uma faixa de concentração onde o analito que se encontra na amostra pode ser quantificado e que se refere ao modelo matemático gerado, geralmente linear. A maior concentração da faixa de trabalho depende dos resultados analíticos em função de um sistema de medição; a menor concentração da faixa de trabalho é conhecida como limite de quantificação⁷⁹.

1.6.2 Linearidade

Este parâmetro tem o objetivo de demonstrar a capacidade de um experimento analítico em obter resultados que são diretamente relativos a concentração do analito na amostra. Como a maioria das calibrações univariadas, a equação obtida pela proporcionalidade entre os valores obtidos irá gerar uma reta, sendo por fim uma equação de primeiro grau ($y = ax + b$)⁸¹.

Para validar a linearidade de um método, prepara-se padrões de calibração em solventes e reagentes utilizados no procedimento (padrões externos), ou num branco amostral, até mesmo em reagentes que podem simular a amostra, onde existe uma equiparação de matriz, sendo por último, até mesmo, criando uma calibração amostral na própria amostra a ser analisada.

Na calibração por padrões externos, curvas em meio ao branco da amostra ou com equiparação de matriz é selecionado um intervalo de concentração dentro da faixa de trabalho dividindo-o em cinco pontos⁸². Ao adicionar os padrões em amostras para criar uma curva de calibração, indica-se uma adição entre 50-200% da concentração do analito em sua matriz. Este intervalo pode variar dependendo da sensibilidade da metodologia de quantificação⁸².

Esta calibração por padrões promove a construção de um gráfico de dois eixos, X (representa a concentração do analito) e Y (resposta instrumental), onde aplica-se o método dos mínimos quadrados para gerar um modelo matemático⁸⁰. Inicialmente, a avaliação da linearidade do métodos é proposta pelo cálculo do coeficiente de correlação de Person (R^2), onde valores acima de 0,9 são considerados validos para o método⁸¹.

O estudo dos erros residuais do modelo também é uma ferramenta importante para a sua validação, registrando-os em um gráfico com concentração no eixo X e resíduos no eixo Y, desejando-se que os pontos estejam em torno da reta horizontal no ponto 0,0, que sejam dispersos e que não demonstrem tendência⁷⁰.

1.6.2.1 Sensibilidade

Este parâmetro revela a capacidade do método de promover a variação no valor da propriedade monitorada, provocada pela pequena variação na concentração do analito na matriz analisada: portanto, quanto mais sensível maior é a variação de sinal em alterações pequenas de concentração^{78,80}.

Na curva de calibração, caracterizada por uma equação do segundo grau, a sensibilidade do método é constante em toda a faixa de análise e no coeficiente angular. Se a curva de calibração não for linear, a sensibilidade será a determinada pela derivada primeira da equação da curva de calibração, sendo variável em relação à concentração usada na faixa de trabalho⁷⁷.

1.6.3 Seletividade

Também conhecida como a especificidade de um método, a seletividade é nada mais que a capacidade de determinar apenas o analíto escolhido sofrendo o mínimo de interferência possível de contaminantes terceiros na amostra. Alguns testes simples promovem a análise de interferência com relação ao efeito da matriz.

Em alguns casos promove-se a análise do branco da amostra, do branco de calibração (solvente ou demais reagentes usados no preparo do padrão), da solução padrão e da amostra preparada, analisando os reagentes e o placebo, verificando se apresentam sinais significativos⁸³.

Se a matriz sem o analíto não estiver disponível, a seletividade pode ser testada comparando-se as inclinações das curvas de adição padrão. Isto é feito preparando-se dois grupos de amostras que contenham a mesma adição de analíto para cada nível de concentração, sendo o primeiro grupo uma curva de calibração externa e o segundo grupo, uma curva de adição de analíto em amostra⁸¹. Os resultados destas amostras podem ser representados em um mesmo gráfico em função da concentração de analíto adicionado. Se as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem em as mesmas, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analíto.

1.6.4. Exatidão

Parâmetro de grande importância, a exatidão fornece um valor de concordância entre o valor medido e o valor esperado, avaliado por meio de experimentos com materiais de referência certificados (MCR), ensaios de recuperação e testes de comparação entre metodologias⁷⁴.

A metodologia mais aplicada para a avaliação da exatidão é o teste de recuperação que consiste em na adição de padrão no branco amostral ou sobre a amostra propriamente dita⁷⁸. Três níveis de concentração são avaliados,

compreendendo o intervalo das curvas de calibração e o cálculo a ser realizado pela Equação 7.

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{C1-C2}{C3} \times 100 \quad (7)$$

Onde C é a concentração total do analito na amostra fortificada, $C2$ é a concentração do analito na amostra sem fortificação e $C3$ é a concentração do analito adicionada.

1.6.5 Precisão

Este parâmetro representa a dispersividade das respostas dos experimentos. Os experimentos são realizados pelo auxílio dos MCRs, um matéria de referência ou até mesmo com soluções padrões imersas em um branco das amostras, em três níveis de concentração⁸¹. As principais formas de avaliação da precisão aplicam-se a estudos de repetitividade e reprodutibilidade.

1.6.5.1 Repetitividade

Também chamada de repetibilidade, a repetitividade é um parâmetro que informa o grau de dispersão dos valores de resposta de uma análise, em condições previamente estabelecidas, seja em aparatos materiais, seja até mesmo em um mesmo analista⁸¹.

Para avaliar a repetibilidade de um experimento, utiliza-se o cálculo demonstrado na Equação 8, referente ao coeficiente de variação (CV).

$$CV = \frac{C_m}{s} \times 100 \quad (8)$$

Onde S é o desvio padrão das amostras em replicatas e C_m é a concentração média.

1.6.6 Robustez

A avaliação da robustez de um experimento identifica a capacidade daquela metodologia resistir a variações experimentais mínimas onde o método é suscetível a respostas diferentes. Quanto maior a robustez do experimento, maior sua confiança e sua precisão^{81,84}.

Exemplificando, o ICP OES tem como teste de robustez do plasma analisar uma amostra contendo magnésio, analisando-o nas linhas de 280 e 285 nm. As condições analíticas resultam em valores robustos quando promove-se a relação entre os resultados das duas linhas de detecção, gerando um valor de no mínimo 8 para configurações axiais e 10 para configurações radiais^{85,86,87}.

1.6.7 Limite de quantificação e detecção

O limite de detecção (LD) para um método analítico é o nível mínimo de um elemento químico que está sendo testado que pode ser detectado com uma precisão razoável. O método talvez seja capaz de detectar níveis mais baixos, mas nesses níveis, as possibilidades de um teste falso positivo se tornam inaceitáveis. Isto ocorre porque todos os métodos de teste têm alguma variação aleatória em seus resultados; portanto, quando uma amostra não contém nada do químico testado, o teste talvez mostre que realmente existe uma pequena quantia daquele elemento. Por essa razão, resultados muito baixos são

descontados. A linha onde se torna difícil distinguir entre resultados verdadeiramente positivos e uma dispersão aleatória é o LD^{81,84}.

Embora uma metodologia analítica possa detectar um analíto em níveis acima do LD, o elemento só está presente em uma pequena quantidade. Por essa razão, o método pode não se sentir confortável colocando um valor numérico naquele nível. Isso leva à necessidade do limite de quantificação (LQ), que é mais alto do que o LD. Quando um teste dá um resultado de nível químico abaixo do LD, o experimento reporta "nada detectado". Quando o resultado é entre o LD e o LQ, a metodologia diz "detectado", e quando o resultado é acima do LQ, o método relata o valor numérico real da concentração química⁸¹.

CAPÍTULO 2

OBJETIVO

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologia de calibração multivariada para a previsão dos metais cobre, chumbo, cádmio e zinco em amostras de cachaças utilizando a voltametria de redissolução anódica com onda quadrada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições operacionais para ICP OES e voltametria de redissolução anódica com onda quadrada;
- Determinar a concentração de Zn, Cd, Cu e Pb em amostras de cachaça por ICP OES;
- Construir modelos válidos de PLS e RNA para a determinação das concentrações dos metais em cachaça;
- Promover a comparação das previsões das ferramentas multivariadas para esses metais traço em cachaças.

CAPITULO 3

PROCEDIMENTOS

EXPERIMENTAIS

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 AMOSTRAS

Todas as amostras obtidas neste trabalho foram adquiridas em estabelecimentos comerciais em diversas cidades do estado do Espírito Santo. Todas as cachaças foram produzidas a partir da cana-de-açúcar, com uma porcentagem entre 38 a 50% de álcool. As cachaças, em sua maioria, foram produzidas em municípios do Espírito Santo como Domingos Martins, São Roque do Canaã, Aracruz, Afonso Claudio, Linhares, Cachoeiro do Itapemirim, Alfredo Chaves, Anchieta, Cariacica, Santa Teresa, Vargem Alta, Serra, São Gabriel da Palha e Castelo. Algumas cachaças foram produzidas fora do estado, destacando-se Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (observar o Anexo 1).

3.2 DETERMINAÇÃO DOS METAIS EM CACHAÇA POR ICP OES

3.2.1 Preparo dos materiais e vidrarias

Todos os tubos de Falcon® e vidrarias usadas para os métodos analíticos foram previamente lavados com detergente, seguido de permanência em solução de Ácido Nítrico NEON® 5% por 24 h e enxaguados com água purificada MilliQ. Todas as vidrarias e materiais foram secos dentro de um recipiente fechado para evitar contaminação.

3.2.2 Preparo da amostra para análise por ICP OES.

Para a determinação de contaminantes inorgânicos em cachaças por ICP OES, transferiu-se 100mL das amostras para erlenmeyers de 125 mL, utilizando vidros de relógio, para manter o sistema fechado, para minimizar a contaminação entre as análises, com a finalidade de reduzir em 50% o volume da amostra por evaporação em chapa a 100°C, objetivando diminuir a matéria orgânica do analito¹³. Após isso, acidificou 25mL da amostra com uma solução de Ácido Nítrico P.A. NEON® previamente destilado 0,014 mol.L⁻¹, completando o volume até 50 mL de solução com água purificada pelo sistema de deionização Quimis® Q180 seguido de um sistema de osmose reversa Quimis® Q342⁷⁶.

3.2.3 Desenvolvimento da técnica do ICP OES

Esta técnica foi utilizada como referência para a análise quantitativa destes metais.^{16,88}. Os experimentos por ICP OES (Figura 11) foram realizados em um equipamento Optima 7000, Perkin Elmer®, com dupla visão, equipado com shear gás (sistema de remoção da zona fria do plasma), detector em estado sólido (CCD), e sistema pré-óptico com purga, possibilitando a análise em comprimentos de onda na faixa do Ultravioleta no vácuo (VUV).



FIGURA 11 - ICP OES (Optima 7000, Perkin Elmer®) utilizado para as análises de metais em cachaça.

Os parâmetros operacionais utilizados estão listados na Tabela 02. Alguns destes parâmetros foram otimizados, como introdução da amostra, potência e fluxo de nebulização, pois mostram influência significativa nos sinais obtidos. Isto foi realizado por meio de metodologia de superfície de resposta.

TABELA 02 -Parâmetros operacionais do ICP OES

Visão	Axial
Taxa de Aspiração da Amostra	Otimizado
Potência	Otimizado
Fluxo do Gás de Nebulização	Otimizado
Tubo Injetor	Alumina
Nebulizador	Gemcone
Câmara de Nebulização	Ciclônica para aquosos
Linhas de Emissão (nm)	Cu 327.393
	Zn 206.200
	Cd 226.502
	Pb 261.418

3.2.4 Otimizações das condições operacionais do ICP OES para determinação dos metais

Promoveu-se a otimização dos parâmetros operacionais do ICP OES por metodologia de superfície de resposta, método de composto central, onde avaliou-se a potência (i), fluxo do gás de nebulização (ii) e taxa de aspiração da amostra (iii), utilizando os valores observados na Tabela 03.

TABELA 03 – Valores utilizados para a construção da otimização dos parâmetros do ICP OES

	(-1)	(0)	(+1)
Potência (W)	1100	1250	1400
Fluxo do Gás de Nebulização (L.min ⁻¹)	0,60	0,95	1,30
Taxa de Aspiração da Amostra (mL.min ⁻¹)	1,00	1,25	1,50

Realizou-se a otimização utilizando soluções padrões de magnésio e promovendo a leitura do elemento nas linhas 280.000 (I) e 285.000 nm (II), onde a razão destas duas intensidades foram as respostas para a construção do planejamento.

A validação dos modelos gerados foi realizada pelo teste estatístico de análise de variância (ANOVA) e os cálculos foram realizados através do software Matlab® versão 8.0.124.

3.2.5 Análise de metais utilizando a técnica de ICP OES.

As medidas encontradas no ICP OES tiveram suas respostas associadas a intensidade em modo área dos metais analisados. Curvas de calibração para cada metal foram construídas separadamente para posteriormente encontrar as concentrações dos metais; as concentrações das curvas (faixa de trabalho) estão descritas na Tabela 04.

TABELA 04- Concentrações utilizadas para a construção das curvas de calibração dos metais para o ICP OES

	Cobre	Zinco	Cadmio	Chumbo
Concentração 1	10 mg.L ⁻¹	1,5 mg.L ⁻¹	0,5 mg.L ⁻¹	0,5 mg.L ⁻¹
Concentração 2	6 mg.L ⁻¹	1,0 mg.L ⁻¹	0,1 mg.L ⁻¹	0,1 mg.L ⁻¹
Concentração 3	3 mg.L ⁻¹	0,5 mg.L ⁻¹	0,05 mg.L ⁻¹	0,05 mg.L ⁻¹
Concentração 4	1 mg.L ⁻¹	0,1 mg.L ⁻¹	0,01 mg.L ⁻¹	0,01 mg.L ⁻¹
Concentração 5	0,1 mg.L ⁻¹	0,05 mg.L ⁻¹	0,005 mg.L ⁻¹	0,005 mg.L ⁻¹

Os valores encontrados no ICP OES de concentração para os metais serão os valores de referência (matriz **Y** de variáveis dependentes) utilizadas na construção dos modelos de calibração multivariada, como o PLS e Redes Neurais.

3.2.6 Avaliações da qualidade dos métodos de determinação dos metais em amostras de cachaça usando ICP OES

3.2.6.1 Seletividade

Realizou-se o teste de seletividade no ICP OES por meio da avaliação da curva com adição de um padrão analítico e calibração externa. Com isso, foi preparada e analisada soluções padrão de concentrações dos

metais referentes a curvas de calibração externa (Tabela 04) e analisaram os gráficos correlacionando as curvas construídas.

3.2.6.2 Linearidade

As curvas de calibração externa (em triplicata) também foram usadas nos demais ensaios, portanto, foi realizado sua avaliação por meio do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (R^2), análise de resíduos por meio de gráficos.

3.2.6.3 Robustez do plasma

Outro ensaio realizado foi com relação à robustez do plasma e para isso foram preparadas soluções de magnésio, sendo realizada a leitura do magnésio na linha 280.000 (I) e 285.000 nm (II), seguindo do cálculo da relação entre a intensidade da linha do magnésio iônico (I) pela linha do magnésio atômico (II).

3.2.6.4 Exatidão

Foram avaliadas a exatidão do método através da análise do branco amostral dopado com as curvas de calibração (Tabela 04), em triplicata. Na exatidão calculou-se a recuperação dos metais envolvidos na construção do método.

3.2.6.5 Limite de quantificação e detecção

Encontra-se o LQ e o LD promovendo-se uma análise do branco amostral em testes triplicata, não contendo nenhum analíto de interesse. Calculam-se as médias dos resultados obtidos bem como seu desvio padrão (uma média da variação nas leituras replicadas. Por fim, adiciona o três vezes o valor de desvio padrão na média para encontrar o LD e dez vezes para obter-se o LQ.

3.3 DETERMINAÇÃO DOS METAIS EM CACHAÇA POR VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA EM ONDA QUADRADA

Os ensaios eletroquímicos se desenvolveram no analisador voltamétrico da Metrohm® modelo 797 VA Computrace (Figura 12). Todos os voltamogramas gerados pelo programa foram tratados e disponibilizados na forma de gráficos, utilizando o programa Origin 8.5 da Microcal®.



FIGURA 12 -Analisador voltamétrico da Metrohm® modelo 797 VA Computrace.

Para promover a construção de um modelo quimiométrico, utilizamos como técnica de voltametria de redissolução anódica com onda quadrada (X),

correlacionado os dados obtidos com as concentrações encontradas no ICP OES (y).

Utilizou-se um sistema convencional de três eletrodos para a construção dos voltamogramas, onde existe um eletrodo de referência (Ag/AgCl), um contra eletrodo de Pt associados a três eletrodos de trabalho: eletrodo de mercúrio e um eletrodo de carbono, ambos da Metrohm® e um eletrodo construído em laboratório de nanotubo de carbono (Figura 13).

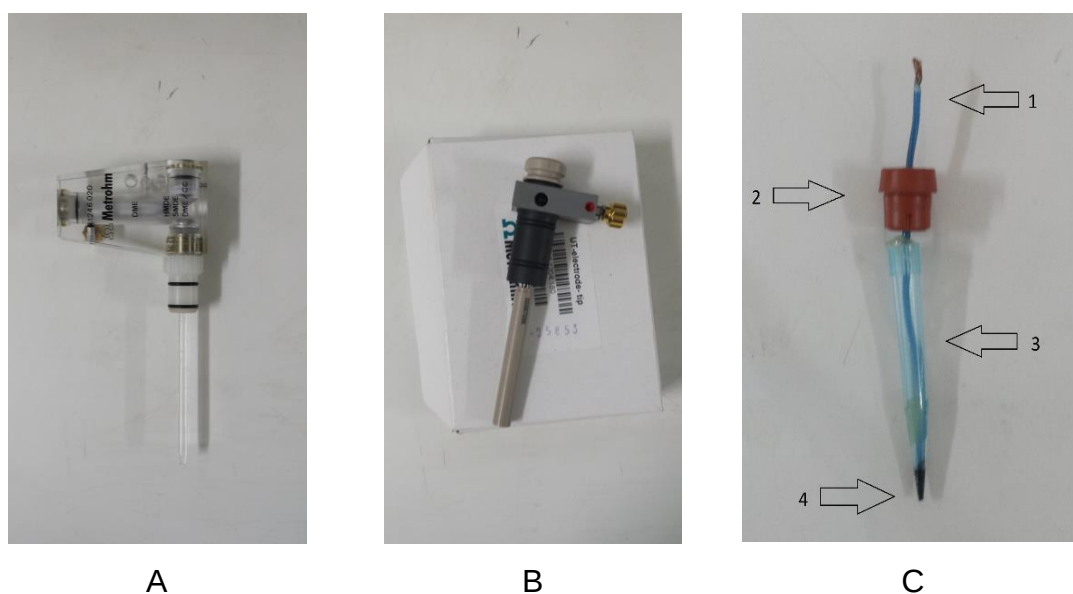


FIGURA 13 – A) Eletrodo de Mercúrio (Metrohm®); B) Eletrodo de Carbono (Metrohm®); C) Eletrodo de Nanotubo de Carbono: (1) fio elétrico, (2) rolha para tubo de ensaio em borracha, (3) estrutura de plástico e (4) Área ativa do Nanotubo de Carbono na ponta do eletrodo.

O eletrodo de nanotubo de carbono foi construído de forma artesanal, utilizando uma mistura de nanotubos de carbono e pó de grafite, formando uma solução pastosa característica. A pasta de Nanotubo de Carbono foi desenvolvida numa proporção de 10 para 1 de pó de grafite e nanotubos de carbono, mais

especificamente 0,9g de pó de grafite para 0,1g de nanotubos de carbono. Estes compostos foram homogeneizados e dispersados em Álcool Dietílico em um almofariz. Após este processo, o solvente orgânico foi evaporado por meio de agitação para eliminar toda a composição orgânica contida na solução pastosa⁵⁵ e colocado em uma ponteira de pipeta e realizado o contato elétrico, sendo o eletrodo construído.

Para o desenvolvimento dos voltamogramas, utilizou-se tempo de eletrodeposição de 50s, amplitude de 0,05V, velocidade de 0,1V/s com frequência de 100Hz.

3.3.1 Preparo das Amostras

As amostras foram inseridas *in situ* no aparelho, cerca de 20 mL, acrescentando os eletrólitos suportes (1 mL), sendo o tampão Acetato para o eletrodo de Mercúrio e o tampão Fosfato para os eletrodos de carbono e nanotubo de carbono.

Na voltametria de redissolução, as curvas das amostras foram obtidas em uma faixa de potencial entre -1400mV a 200mV para o eletrodo de mercúrio seguindo até 1500mV para os eletrodos de carbono (grafite-comercial) e nanotubo de carbono. As correntes obtidas foram utilizadas para compor a matriz **X** de variáveis independentes para os modelos de redes neurais e PLS.

CAPITULO 4

RESULTADOS E

DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DE METAIS EM AMOSTRAS DE CACHAÇA POR ICP OES.

Ao promover a avaliação das linhas, chegou-se nas linhas utilizadas por descartar as demais, seja por pouca sensibilidade de detecção onde com o aumento de concentração gerava pouco aumento do sinal analítico, dificultando até mesmo a construção da curva de calibração; seja pela interferência parcial em uma região espectral, impossibilitando a contabilização do sinal gerado pelos metais. Portanto, realizou-se as determinações dos metais em cachaça nas linhas de 327.393 nm para o Cobre, 206.200 para o Zinco, 226.502 nm para o Cadmio e 261,418 nm para o Chumbo.

4.1.1 Otimização das condições operacionais do ICP OES para a determinação dos metais

Promoveu-se uma otimização da potência, do fluxo de gás de nebulização e da taxa de introdução da amostra com o objetivo de selecionar as melhores condições para a geração do sinal analítico. Para este planejamento de experimentos, utilizou-se a razão Magnésio Iônico pelo Magnésio Atômico como analito para obtenção das respostas, devido esses parâmetros promoverem a identificação da robustez do plasma e melhores condições de análise. Com isso, as variáveis foram analisadas em diferentes condições segundo um planejamento composto central, seguindo a matriz de contraste demonstrada na Tabela 05.

TABELA 05 - Matriz de contraste do planejamento de experimentos

Nº de experimentos	Taxa de Introdução da amostra (mL.min ⁻¹)	Potência (W)	Fluxo de gás de nebulização (L.min ⁻¹)	Valores das razões de Mg ⁺ /Mg (intensidade)
1	1 (-1)	1100 (-1)	0,6 (-1)	24.14442852
2	1,5 (1)	1100 (-1)	0,6 (-1)	16.26836954
3	1 (-1)	1400 (1)	0,6 (-1)	17.40147037
4	1,5 (1)	1400 (1)	0,6 (-1)	22.52013457
5	1 (-1)	1100 (-1)	1,3 (1)	-0.181317469
6	1,5 (1)	1100 (-1)	1,3 (1)	-0.119739365
7	1 (-1)	1400 (1)	1,3 (1)	-0.859653696
8	1,5 (1)	1400 (1)	1,3 (1)	-0.829976403
9	1,25 (0)	1250 (0)	0,296 (-1,682)	-16.84456584
10	1,25 (0)	1250 (0)	1,304 (1,682)	-0.415455812
11	1,25 (0)	1500 (-1,682)	0,95 (0)	22.17641867
12	1,25 (0)	1000 (1,682)	0,95 (0)	21.05516594
13	0,83 (-1,682)	1250 (0)	0,95 (0)	16.03301038
14	1,67 (1,682)	1250 (0)	0,95 (0)	18.58916744
15	1,25 (0)	1250 (0)	0,95 (0)	17.4244164
16	1,25 (0)	1250 (0)	0,95 (0)	17.37371187
17	1,25 (0)	1250 (0)	0,95 (0)	16.41918571

Na otimização dos parâmetros instrumentais do ICP OES para o Magnésio, gerou-se o modelo matemático, demonstrado pela Equação 9:

$$Y = 17,065 + 1.828x_1 - 0,2757x_2 - 5,7127x_3 - 9,0597x_1^2 + 1,6316x_2^2 + 0,11x_3^2 + 1,6204x_1x_2 + 0,3561x_1x_3 - 0,1122x_2x_3 - 1,6283x_1x_2x_3 \quad (9)$$

Onde: x_1 representa o fator potência, x_2 representa fluxo de introdução da amostra e x_3 representa o fluxo de nebulização.

A avaliação deste modelo foi realizada por meio de parâmetros estatísticos. A relação entre média quadrática da regressão (MQR) e a média quadrática dos resíduos (MQr) nos informa o F calculado para avaliação da regressão. Para a razão entre as linhas do Magnésio encontrou-se um valor de 18,74, valor superior encontrado para o F tabela, compreendendo cerca de 95% de confiança. Com este teste, foi concluído a superioridade da regressão em relação aos resíduos e, portanto, adequação dos modelos gerados. A avaliação dos modelos foi realizada por meio dos testes estatísticos, produziram os dados apresentados na Tabela 06.

TABELA 06 - Avaliação do modelo da otimização para a razão entre as linhas do Magnésio

MQR	MQr	F Calculado (regressão e resíduo)	Coeficiente de correlação (R^2)	MQFaj	MQep	F calculado (falta de ajuste e erro puro)
$4,07 \times 10^3$	$2,14 \times 10^2$	19,01	0,9611	318,7576	305,8993	3,01

Onde MQR é a média quadrática da regressão, MQr é a média quadrática dos resíduos, é o coeficiente de correlação de Pearson, MQFaj é a média quadrática da falta de ajuste e a MQep é a média quadrática do erro puro.

Com a análise de variância (ANOVA) realizou-se com a relação à falta de ajuste do erro puro e com isso correlacionou a média quadrática da falta de ajuste

(MQFaj) e a média quadrática do erro puro (MQep) a fim de encontrar o F à falta de ajuste e erro puro. O F encontrado para a razão entre as linhas o Magnésio foi de 19,01, menor que o valor tabelado de 19,25 onde 95% de confiança dos valores são encontrados, indicando que não há indícios de falta de ajuste, mostrando a adequação do modelo criado. Vale salientar que o valor de coeficiente de correlação para o Magnésio foi de 0,9611, resultado valido e positivo.

Ao promover a divisão dos níveis codificados no intervalo utilizado nos planejamentos por um valor pequeno e substitui-los nas equações geradas pelo experimento, observa-se a tendência das respostas, demonstradas em forma de gráficos nas Figuras 14, 15 e 16.

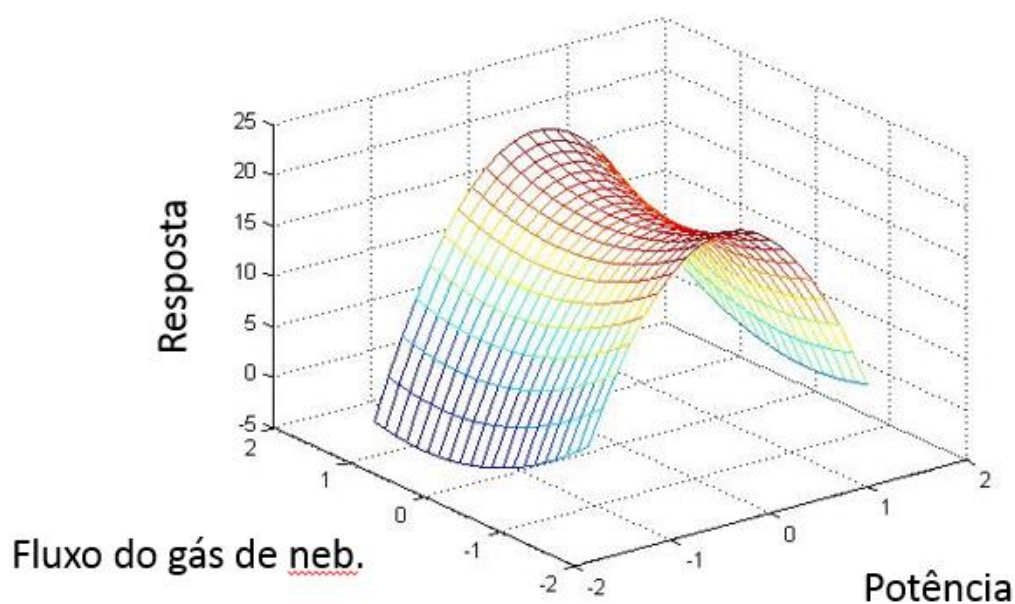


FIGURA 14 - Superfície de resposta referente ao fluxo do gás de nebulização e a potência para o magnésio, utilizando valores codificados.

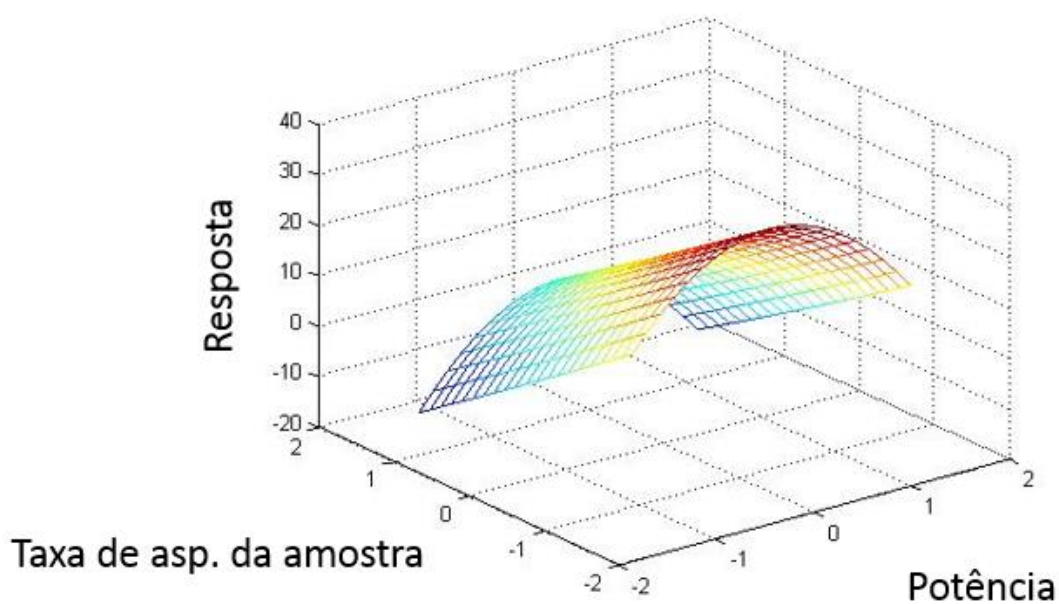


FIGURA 15 - Superfície de resposta referente a taxa de introdução e a potência da amostra para o magnésio, utilizando valores codificados.

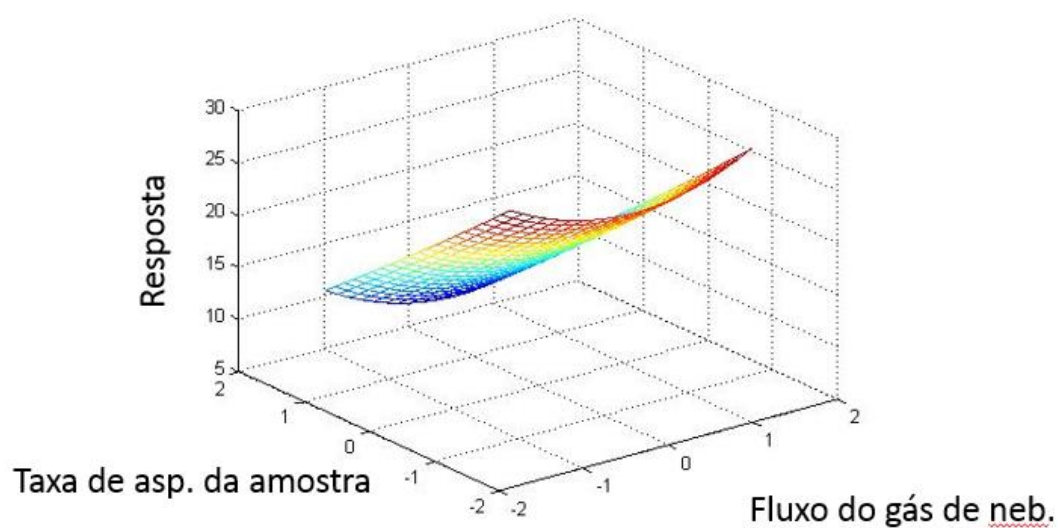


FIGURA 16 - Superfície de resposta referente à taxa de introdução da amostra e o fluxo do gás de nebulização para o magnésio, utilizando valores codificados.

Ao observar os gráficos acima (Figuras 14 a 16), os resultados referentes aos parâmetros observados estão codificados, contudo os valores de resposta estão apresentados com intensidade dos sinais gerados. Quanto mais próximo da coloração azul escuro no gráfico, menores serão as respostas; e quanto mais próximo do vermelho escuro, maior serão as intensidades geradas, estando próxima da resposta máxima, mais conhecida como ponto crítico, compreendido na última região citada.

O cálculo para obter as respostas críticas foi efetuado com a derivada das equações geradas formando um sistema de três equações com três variáveis distintas, utilizando o método de Newton para encontrar os valores para as três variáveis. Os valores de x_1 , x_2 e x_3 estavam codificados e ao promover sua decodificação, relacionando-os com os valores utilizados nos experimentos, encontrou-se para a razão entre as linhas de análise da solução padrão de magnésio uma potência de 1257 W, um fluxo de introdução da amostra de 1,57 mL.min⁻¹ e o fluxo de nebulização no valor de 1,25 L.min⁻¹. Na análise por ICP OES a amostra, ao chegar a tocha de plasma, passa por processos de volatilização, desolvatação e atomização, com átomos isolados encontrados no estado elementar⁹⁰. Desta forma, o estado de oxidação dos analitos' não interferem nos próximos processos ocorridos no equipamento.

4.1.2 Avaliações da qualidade do método de determinação dos metais em amostras de cachaça usando ICP OES

4.1.2.1 Seletividade

Para confirmar a não existência de efeito de matriz, utilizou-se curvas de adição de analito em amostra e curvas externas, correlacionando-as em representação gráfica, correlacionando as intensidades obtidas pelo ICP OES para cada metal com os valores de concentração pré-determinado pelas curvas, observados na Figura 17.

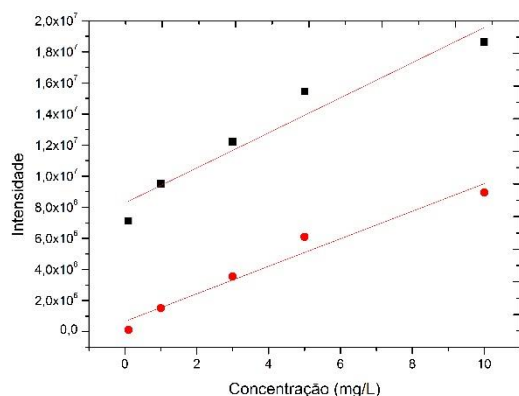
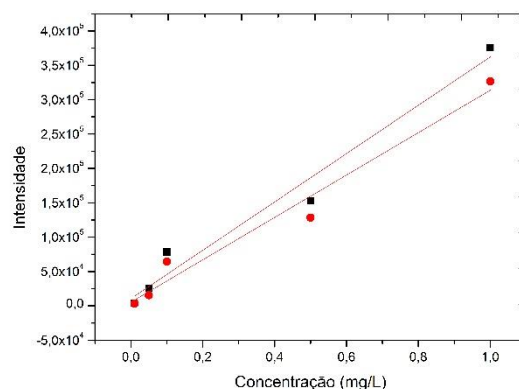
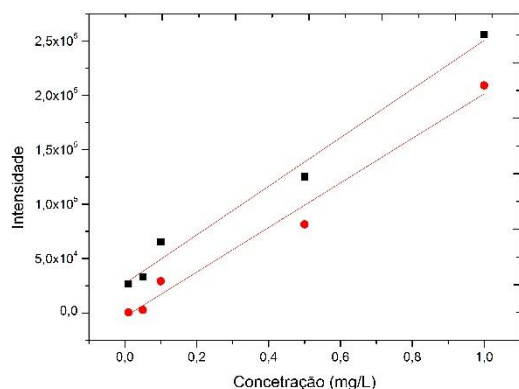
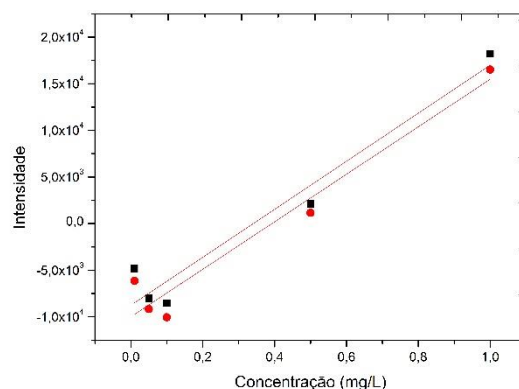
**Cu****Cd****Zn****Pb**

FIGURA 17 – Gráficos de correlação entre as curvas de calibração de adição de padrão (pontos em preto) e as curvas de calibração externa (pontos em vermelho) das intensidades obtidas no ICP OES.

Observando uma tendência quase paralela entre as linhas do gráfico nos metais chumbo e zinco, com coeficientes de inclinação das linhas nos gráficos de $3,69 \times 10^{-5}$ e $3,31 \times 10^{-4}$ para as curvas de chumbo e $4,41 \times 10^{-6}$ e $4,80 \times 10^{-6}$ para as linhas de zinco. Apesar de não observamos o paralelismo em cobre e cádmio, os coeficientes apresentam escalas na mesma casa decimal, podendo atribuir valores de $8,32 \times 10^{-7}$ e $1,09 \times 10^{-7}$ para o cobre; $2,76 \times 10^{-6}$ e $3,15 \times 10^{-6}$ para os coeficientes angulares do zinco.

4.1.2.2 Linearidade

As curvas de calibração externa média referente a análise das soluções de cobre, cádmio, chumbo e zinco geraram R^2 de 0,9919, 0,9913, 0,9867 e 0,9924 respectivamente. Para as curvas de calibração com adição de padrão nas amostras, os valores de R^2 foram de 0,9981, 0,9956, 0,9898 e 0,9981 para o cobre, cádmio, chumbo e zinco, respectivamente. Para o cobre, zinco e cádmio, os valores encontrados estão acima de 0,9900, próximos de 1,0000, demonstrando uma boa linearidade para o método. Somente o chumbo não apresentou uma linearidade compatível como as dos demais metais.

4.1.2.3 Robustez do plasma

A razão gerada pelas intensidades obtidas das análises das amostras de magnésio nas linhas I (280.000 nm) e II (285.000 nm) foi $9,05 \pm 0,16$. Como o valor está acima de 8, considera-se que as condições analíticas utilizadas foram satisfatórias em relação a estabilidade do plasma⁹¹.

4.1.2.4 Exatidão

Avaliou-se a exatidão por meio da recuperação dos metais por meio do método proposto, observado na Tabela 07.

TABELA 07 - Valores de recuperação obtidos (%) para cada metal na análise em diferentes concentrações (referentes a Tabela 4).

Concentrações	Cu (%)	Zn (%)	Cd (%)	Pb (%)
---------------	--------	--------	--------	--------

1	84,2	109,3	100,5	100,7
2	104,3	89,9	91,7	98,5
3	90,6	80,0	84,5	100,1
4	97,3	94,7	82,7	86,4
5	87,8	88,9	97,6	90,8

Os valores encontrados de exatidão apresentaram de 84,2 – 104,3% para o cobre, 80,0 – 109,3% para o zinco, 82,7 – 100,5% para o cádmio e 86,4 – 100,7% para o chumbo. A complexidade da cachaça, em termos de análises químicas, justifica esta variação na porcentagem de recuperação dos metais nas amostras. Outra justificativa está no processo de pré-tratamento das amostras, já que não existe uma abertura amostras, simplesmente apenas uma acidificação das amostras.

4.1.2.5 Limite de quantificação e detecção

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram encontrados e representados na Tabela 08.

TABELA 08 – valores de LQ e LD para os metais traço analisados por ICP OES

	Pb	Cd	Cu	Zn
LD	0,040 mg.L ⁻¹	0,001 mg.L ⁻¹	0,020 mg.L ⁻¹	0,010 mg.L ⁻¹
LQ	0,040 mg.L ⁻¹	0,001 mg.L ⁻¹	0,020 mg.L ⁻¹	0,011 mg.L ⁻¹

Os limites de detecção e quantificação demonstram semelhança, modificando seus valores apenas na quarta casa decimal.

Para as amostras de cachaça, observou-se a não quantificação do chumbo, justamente pelo limite de quantificação de chumbo nas amostras serem menores que o encontrado. Para os demais metais, todos os valores de concentrações obtidos nas cachaças foram compatíveis com os limites de quantificação e detecção.

4.1.3 Valores das concentrações encontradas dos metais traço nas amostras de cachaça

Após a obtenção dos resultados de intensidade dos metais, a otimização dos parâmetros instrumentais e a construção das figuras de mérito da metodologia, obteve-se as concentrações dos metais nas amostras de cachaça por meio de uma correlação com a curva de concentração obtida para cada metal analisado. Dentre as concentrações obtidas, 30 amostras (escolhidas de forma aleatória) serão utilizadas para a validação dos modelos multivariados quimiométricos, obtendo-se então, as concentrações observadas na Tabela 09.

Ressalta-se que ao todo, 90 amostras foram analisadas no ICP OES.

Observa-se que em geral, as concentrações de Cobre nas cachaças são muito maiores que os demais, possivelmente devido ao processo de destilação da cachaça em alambiques de cobre, incrementando a sua concentração nas amostras obtidas. Destaca-se também a não detecção de Chumbo nas cachaças, o que supostamente era esperado, possivelmente por estar abaixo do limite de detecção do aparelho de $0,0410 \text{ mg.L}^{-1}$.

O ICP OES demonstrou ser uma ótima técnica de quantificação de metais em cachaça, principalmente pela facilidade de preparo da amostra, caracterizado, muitas vezes, apenas por uma acidificação da amostra e pela capacidade de

análise multivariada dos metais, ou seja, podendo avaliar a concentração de vários metais ao mesmo tempo.

Segundo Pinto et al.⁹² a legislação brasileira trabalha somente com o controle cobre e chumbo nas cachaças, dando como um limite aceitável de 5mg.L⁻¹ e 0,2mg.L⁻¹ ⁹³ respectivamente, onde podemos observar que algumas cachaças analisadas para o processo de validação das metodologias quimiométricas estariam vetadas pela legislação.

TABELA 09 - valores de concentrações (em mg.L⁻¹) obtidas em 30 amostras de cachaças usadas na validação dos modelos quimiométricos

Amostr as	Cu (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	Zn (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	Cd (mg.L ⁻¹)	Desvio padrão	Pb (mg.L ⁻¹)
1	0,98	0,022	0,39	0,006	0,08	0,002	ND
2	0,05	0,010	0,54	0,004	0,12	0,004	ND
3	4,78	0,060	0,17	0,005	0,04	0,008	ND
4	11,86	0,026	0,32	0,002	0,01	0,002	ND
5	7,09	0,120	0,26	0,001	0,04	0,003	ND
6	1,73	0,031	1,17	0,056	0,04	0,004	ND
7	5,29	0,210	0,89	0,006	0,03	0,008	ND
8	0,25	0,042	0,57	0,004	0,10	0,001	ND
9	0,59	0,014	0,46	0,002	0,10	0,043	ND
10	6,22	0,022	0,27	0,003	0,05	0,009	ND
11	26,51	0,620	1,27	0,022	0,12	0,004	ND
12	0,33	0,011	0,11	0,004	0,02	0,006	ND
13	0,11	0,001	0,07	0,008	0,03	0,007	ND
14	0,10	0,003	0,03	0,009	0,01	0,001	ND
15	8,86	0,160	5,19	0,471	0,00	0,000	ND
16	5,96	0,091	1,75	0,061	0,06	0,003	ND
17	4,15	0,051	0,08	0,001	0,03	0,00	ND
18	4,55	0,072	0,89	0,018	0,17	0,045	ND
19	9,26	0,021	0,00	0,006	0,00	0,000	ND
20	15,77	0,742	1,22	0,063	0,05	0,086	ND
21	9,07	0,052	0,69	0,010	0,14	0,019	ND
22	0,72	0,005	0,24	0,005	0,07	0,006	ND
23	0,28	0,001	1,10	0,074	0,01	0,002	ND

24	1,65	0,027	0,03	0,001	0,01	0,001	ND
25	0,88	0,005	0,71	0,062	ND	---	ND
26	0,50	0,004	0,11	0,008	0,05	0,005	ND
27	0,90	0,018	0,75	0,052	0,21	0,062	ND
28	2,00	0,034	0,80	0,032	0,20	0,006	ND
29	1,66	0,085	0,51	0,002	0,15	0,054	ND
30	1,74	0,042	0,18	0,006	0,06	0,002	ND

ND - Não detectado

Segundo Fernandes et al.¹¹ as concentrações de cobre e chumbo em quantidades mensuráveis indicaria em um melhor controle de qualidade de algumas cachaças. Comparado a cachaças de regiões do Nordeste e Centro-Oeste, as cachaças analisadas neste trabalho demonstraram ter um cuidado em contaminação por chumbo, já que este metal não foi detectado em nenhuma amostra, contudo, cachaças analisadas por Fernandes¹¹ e as deste trabalho, assemelham-se na composição do metal cobre, já que em ambos o metal esteve em grandes concentrações.

Fernandes et al.⁸⁸ informa que a redução das concentrações de cobre em cachaças pode ser diminuído por meio de armazenamento em recipientes de esteatito *in natura*, onde ele observou que esta metodologia implicou em valores de concentração de metais traço em consonância com os limites legais de consumo da bebida, diferentes do observado para o cobre nas amostras observadas neste trabalho. Alambiques de destilação a base de cobre promovem, principalmente em cachaças artesanais, este fenômeno de contaminação deste metal na bebida, segundo Fernandes et al.⁸⁸.

Segundo Sousa⁹⁴ a provável fonte de contaminação de zinco presente nas amostras com teores relativamente superiores aos teores médios, se deve a contaminação por tais componentes, que fazem parte dos destiladores, como também pelos recipientes usados no armazenamento a granel das cachaças. Miranda et al.¹² promoveu análises de cachaças da região de São Carlos, São Paulo, onde os valores encontrados para cobre estiveram em uma faixa de 0,53mg.L⁻¹ a 6,70mg.L⁻¹, valores em geral coerentes com os demais trabalhos

encontrados, mostrando a preocupação com a determinação deste metal em amostras de cachaça, já que todos os trabalhos supracitados quantificam o cobre como metal principal.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS METAIS TRAÇO EM CACHAÇAS POR VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA COM ONDE QUADRADA

Para a realização de uma análise quimiométrica, utilizou-se o ICP OES como uma técnica de referência para as concentrações de metais traço em cachaças, obtendo a matriz resposta da quimiometria. Esta correlação quimiométrica foi obtida correlacionando essas concentrações com a corrente obtida nos voltamogramas construídos pela voltametria de redissolução anódica com onda quadrada, utilizando três eletrodos de trabalho.

4.2.1 Eletrodo de Mercúrio

Para a determinação dos metais em cachaça usando o eletrodo gotejante de mercúrio, utilizou-se como eletrólito suporte o tampão acetato, com concentração de 1mol.L^{-1} , em pH 4,7. Para a exemplificação dos voltamogramas obtidos, observa-se na Figura 18, voltamogramas obtidos para amostras quaisquer de cachaças.

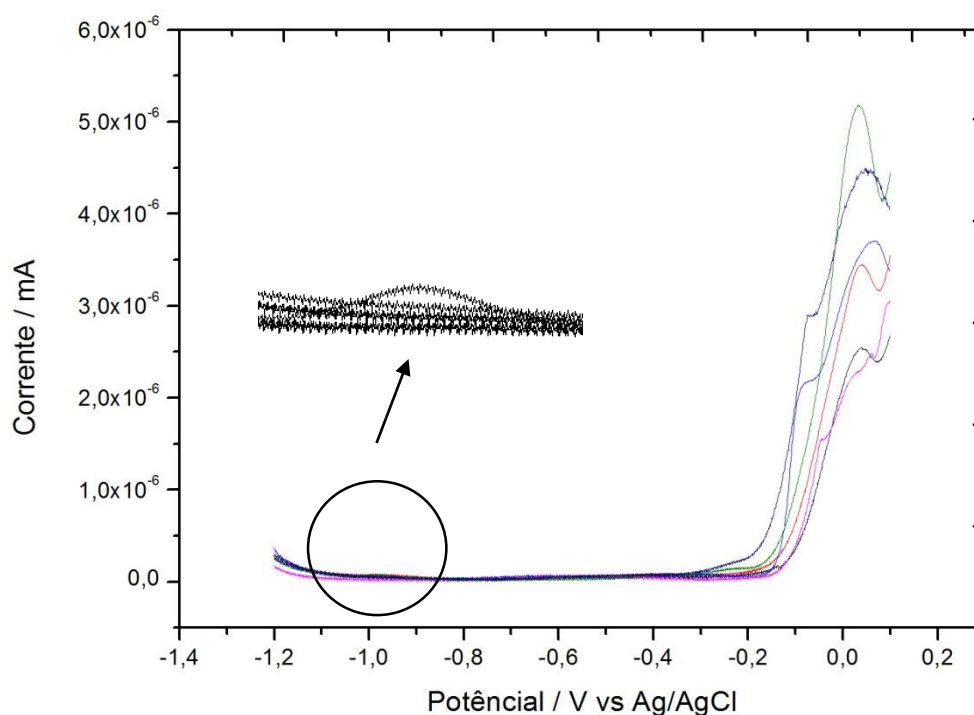


FIGURA 18 - Voltametria de redissolução anódica com onda quadrada em amostras de cachaça utilizando o mercúrio como eletrodo de trabalho em tampão Acetato 1 mol.L⁻¹, pH 4,7.

Observa-se na Figura 18, por volta do potencial de valor aproximadamente 0V, picos de proporções maiores, representando e afirmando o que foi observado no ICP OES, a concentração de Cobre nas amostras. Na faixa de -1,0V a -0,8V encontram-se picos menores, possivelmente caracterizando a presença de Zinco nas amostras, já que o potencial do Zinco está estabelecido entre esta faixa de análise. Em algumas amostras de cachaça observa-se picos de Cadmio por volta de -0,4V de potencial. O Chumbo em nenhuma amostra foi detectado pelo eletrodo. Com o desenvolvimento de um pensamento de caráter ambiental, a utilização do eletrodo de mercúrio vem sendo uma técnica de pouca aceitação no segmento científico para a determinação desses metais em amostras diversas por voltametria.

4.2.2 Eletrodo de Carbono

Utilizando o eletrodo de trabalho de carbono, juntamente com um tampão Fosfato 1 mol.L^{-1} , em pH 4,0, adquiriu-se os voltamogramas de amostras de cachaça, observados na Figura 19.

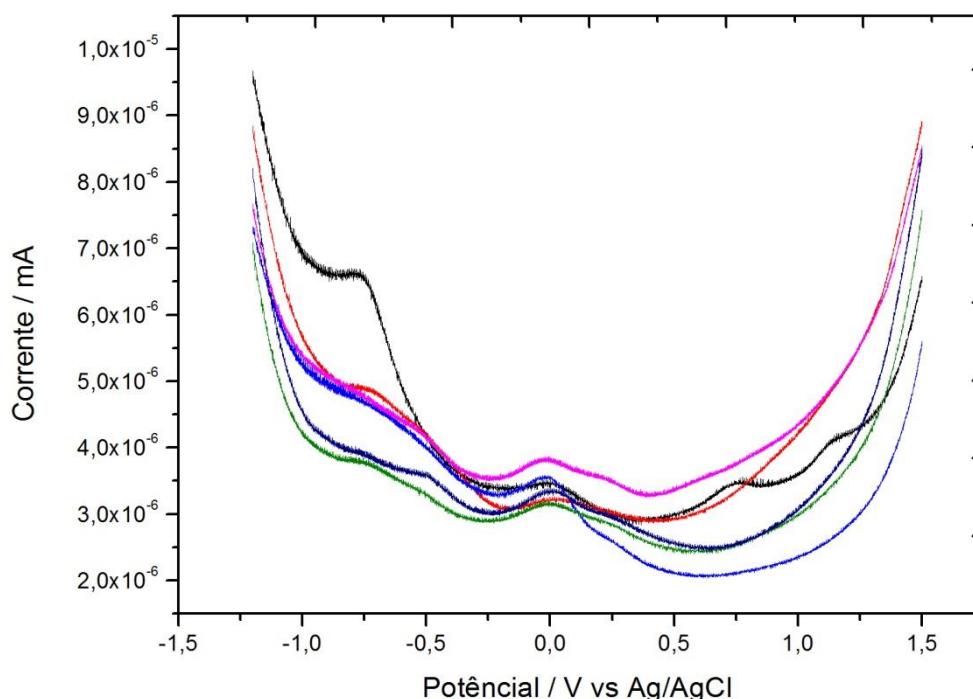


FIGURA 19 - Voltametria de redissolução anódica com onda quadrada em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de carbono como eletrodo de trabalho em tampão Fosfato 1 mol.L^{-1} , pH 4,0.

Percebe-se na figura acima picos predominantes de Cobre em potencial próximo a 0V e pequenos picos em -0,8V, característico de Zinco. Neste eletrodo, o Zinco fica bem mais claro no desenvolvimento dos voltamogramas do que no eletrodo de mercúrio, contudo, percebe-se uma grande dificuldade na detecção de Cadmio e Chumbo nas amostras de cachaça.

4.2.3 Eletrodo de Nanotubo de Carbono

Avaliando eletroquimicamente as cachaças, agora utilizando o eletrodo de trabalho de nanotubo de carbono, juntamente com um tampão Fosfato 1 mol.L^{-1} , em pH 4,0, adquiriu-se os voltamogramas das amostras, observados na Figura 20.

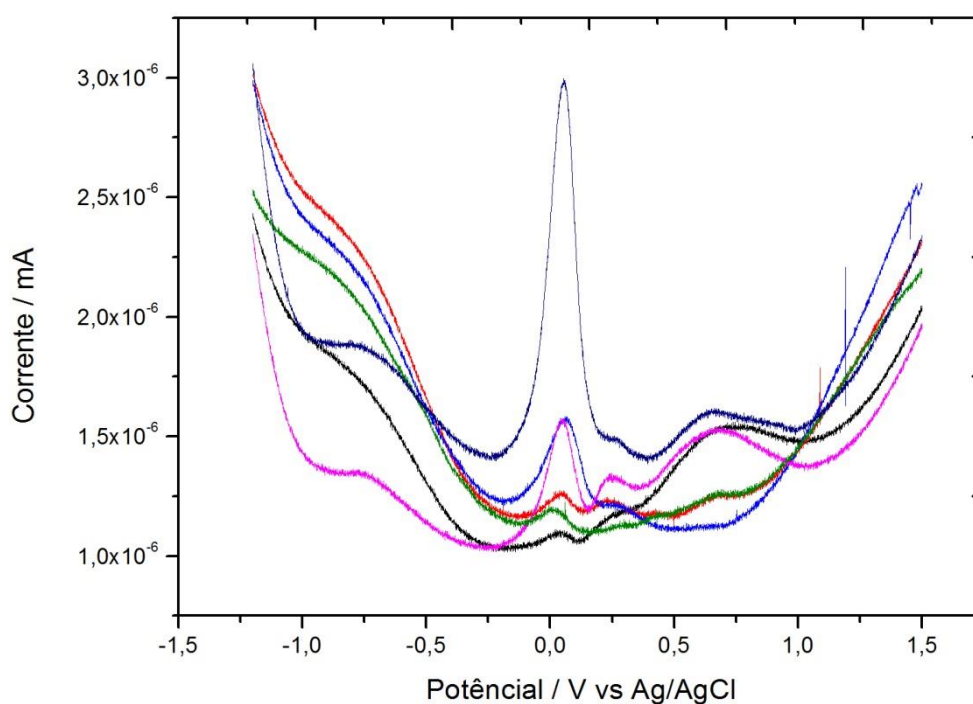


FIGURA 20 - Voltametria de redissolução anódica com onda quadrada em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de nanotubo de carbono como eletrodo de trabalho em tampão Fosfato 1 mol.L^{-1} , pH 4,0.

Percebe-se nitidamente os picos característicos de Cobre em potencial de 0V. O maior problema deste eletrodo está caracterizado por interferentes e sobreposições de picos, onde muitas vezes picos de Zinco e Cadmio são observados em uma única banda de voltamograma, sobrepostos em um único

pico no voltamograma, devido à proximidade do potencial de redução, e algumas vezes, existe uma separação visível de dois metais distintos. Apesar de ter se mostrado um eletrodo mais sensível que os demais, novamente o Chumbo não foi detectado pela técnica.

4.3 ANÁLISE QUIMIOMETRICA

Para o desenvolvimento do método dos quadrados mínimos parciais (PLS) e das redes neurais artificiais, das 90 amostras analisadas, foi subdividido em 60 amostras para a calibração do método e 30 amostras para o desenvolvimento de validação do método, sendo estas últimas, apresentadas a seguir.

O valor de concentração referencial foi obtido por ICP OES, tornando-se nossa matriz resposta para o desenvolvimento das metodologias de análise multivariada. Esta matriz resposta irá ser correlacionada com as correntes dos voltamogramas obtidos pela voltametria de redissolução anódica com onda quadrada, sem qualquer eliminação de valores, utilizando as correntes em toda a faixa de potencial.

Em ambas as técnicas, pré-tratamentos matemáticos iniciais foram necessários para a construção de um modelo de previsão.

4.3.1 Calibração e validação da metodologia quimiometrica dos mínimos quadrados parciais – PLS

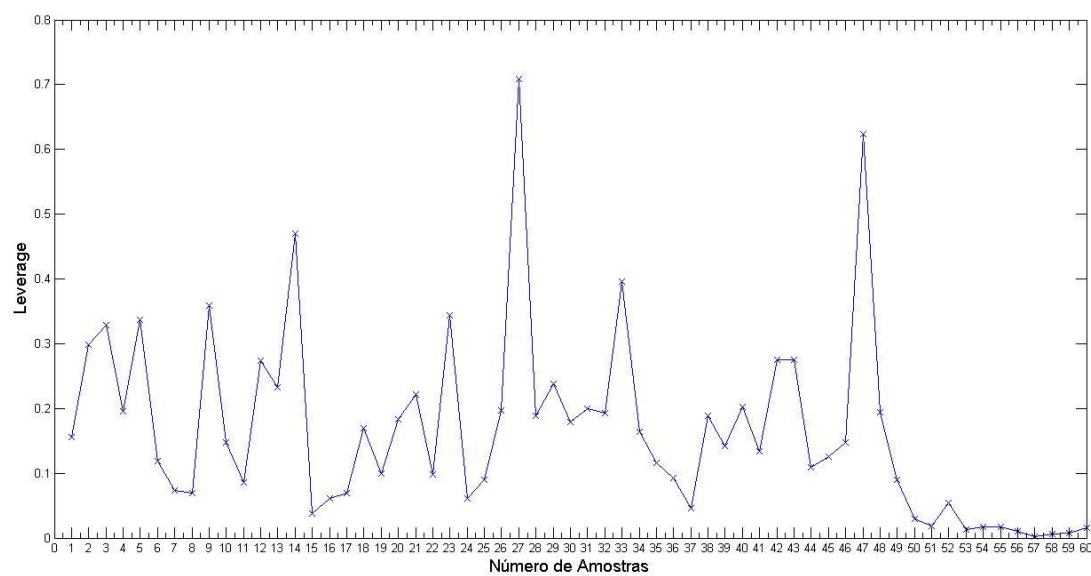
4.3.1.1 Pré- tratamento dos dados no PLS

O método dos mínimos quadrados parciais usados nas amostras de cachaça foi construído com os dados obtidos na voltametria de redissolução (variável **X**) e com os valores de concentração obtidos no ICP OES (variável **Y**). Estes dados foram dispostos em forma de matriz: matriz **X** e matriz **Y** correspondem aos dados das variáveis **X** e **Y**. O pré-tratamento utilizado neste modelo foram o centro na média dos valores e a primeira derivada dos valores de voltamograma. A média de dados centralizada é obtido subtraindo-se o valor médio da coluna, para cada ponto nesta coluna. Este pré-tratamento consiste em uma migração do eixo de coordenadas para o centro de coordenadas. Utilizando o algoritmo Savitzky-Golay⁹⁵ foi possível promover a derivada dos valores obtidos na matriz de voltamogramas, com o objetivo de minimizar influências de deslocamento de linha base.

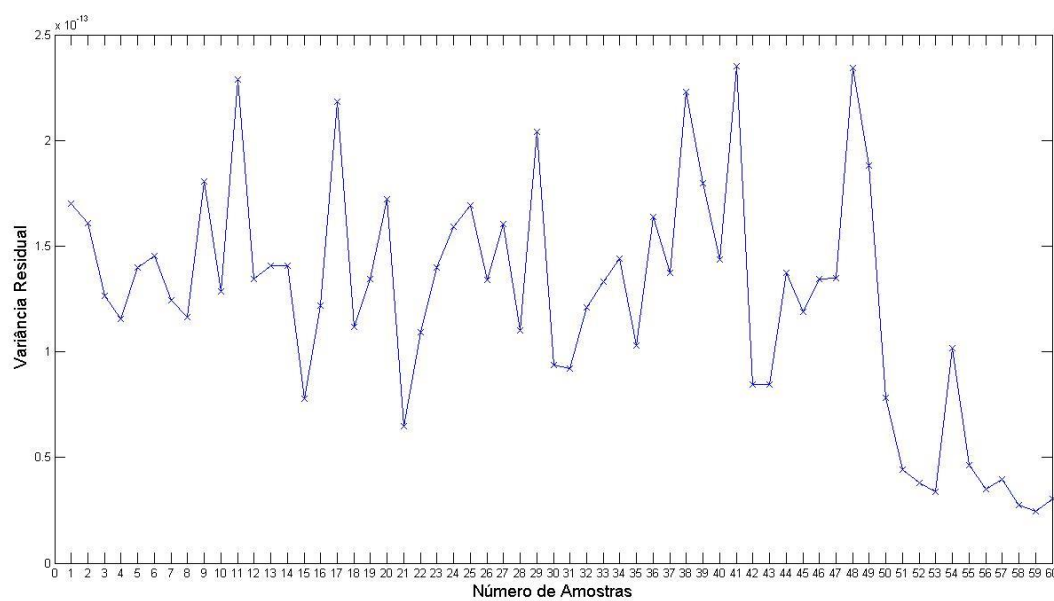
Este modelo foi aplicado em todos os metais, diferenciando-os apenas na quantidade de variáveis latentes. O número de variáveis latentes para ser utilizado neste modelo foi escolhido pela validação cruzada completa, onde todas as amostras de calibração foram validadas um por um. A partir da validação cruzada, cinco variáveis latentes foram necessárias para construir o modelo PLS para o chumbo e zinco, enquanto seis variáveis latentes foram usadas no modelo PLS correspondente ao cádmio, em amostras de cachaças.

4.3.1.2 Resultados obtidos por meio do PLS

O modelo PLS foi analisado por meio da construção do gráfico de *leverage* (Figura 21), onde se pode identificar algumas amostras anômalas ao modelo de calibração construído. Observa-se a presença de uma amostra acima do valor médio de *leverage*, demonstrando ser uma amostra diferente das demais, onde poderia mostrar anomalias prejudiciais ao modelo de calibração. As amostras 14, 27 e 47 foram retiradas para a construção do modelo PLS.



A



B

FIGURA 21 – (A) Gráfico de *leverage* para construção do modelo de calibração; (B) Gráfico dos resíduos para as amostras de calibração na construção do modelo.

Após essas análises, o modelo de calibração PLS construído foi utilizado para determinar os metais em outras amostras de cachaça. O desempenho relativo dos diferentes modelos para cada amostra foi avaliado em termos de erro relativo e raiz quadrada do erro de predição (RMSEP), representado pela Equação 10.

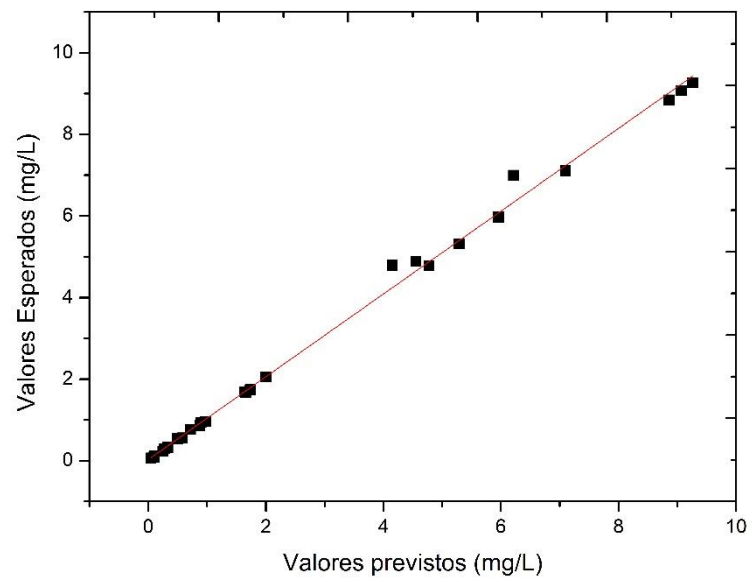
$$RMSEP = \sqrt{\frac{\Sigma(y_{referencia} - y_{prev})^2}{n}} \quad (10)$$

Onde $y_{referencia}$ são os valores referência de y , y_{prev} são os valores encontrados pelo modelo construído e n é número de amostras utilizadas. Trabalhou-se o RMSEP tanto para as amostras de calibração (RMSEC) quanto para as amostras de validação (RMSEV).

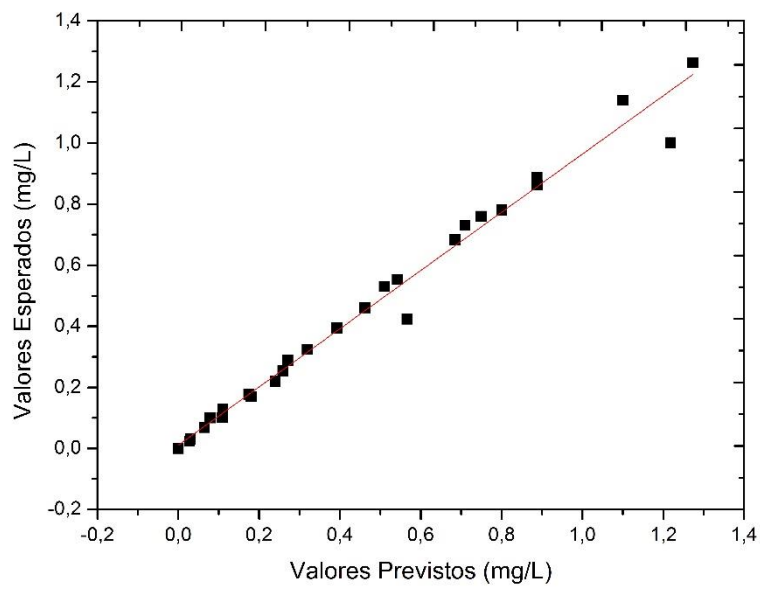
Os resultados obtidos a partir de PLS e os critérios do método de validação com base na correlação entre os valores previstos e os valores de referência (esperados), em forma de gráficos, analisando a linearidade e o R^2 , levando em consideração os eletrodos de trabalho e a curva de calibração utilizada, eliminando amostras que sobrepõe a curva.

4.3.1.2.1 Resultados obtidos por meio do PLS para o eletrodo de carbono

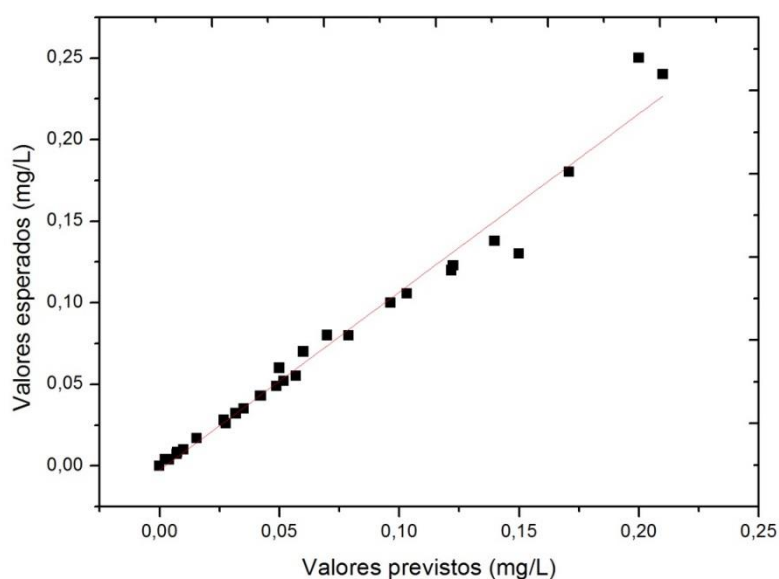
Os gráficos descritos na Figura 22 correlaciona os valores esperados com os valores previstos pelo PLS utilizando as correntes da voltametria com o eletrodo de carbono.



Cu



Zn



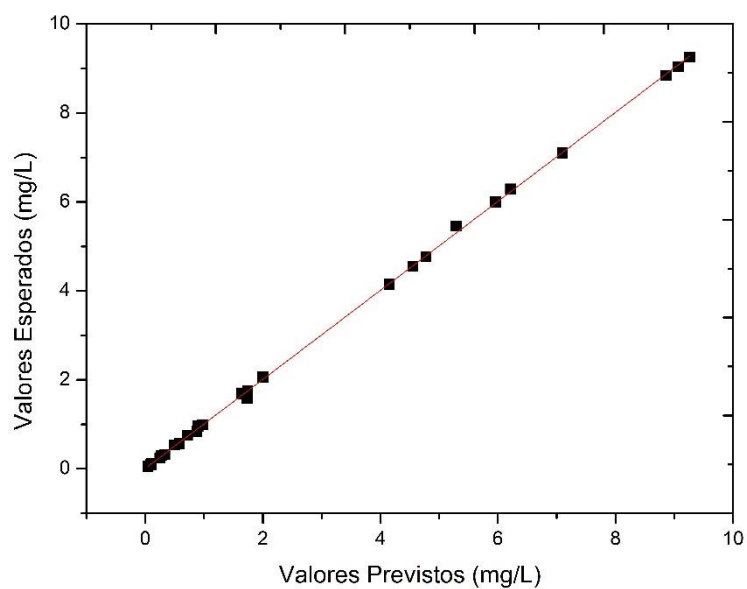
Cd

FIGURA 22 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com PLS para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de carbono.

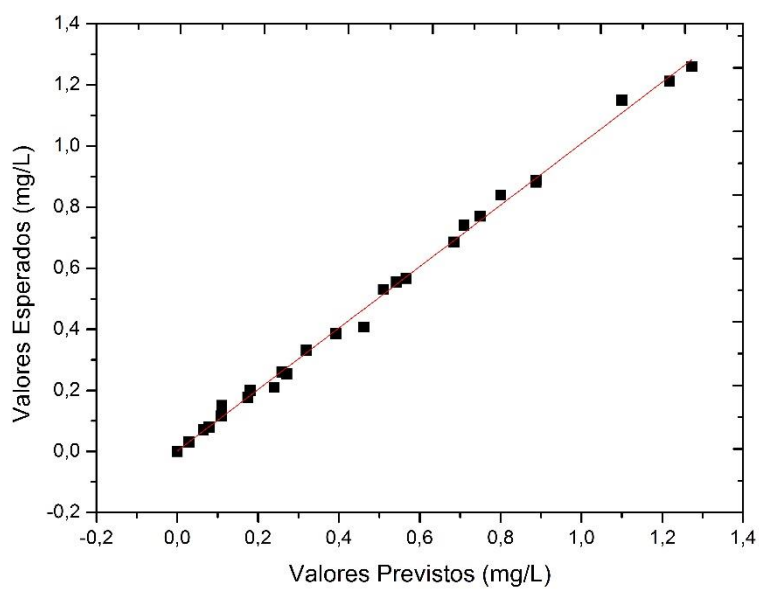
É possível observar na Figura 22 certa linearidade dos pontos, em considerável proximidade da reta, onde os valores de R^2 foram respectivamente 0,9914, 0,9901 e 0,9795 para cobre, zinco e cádmio. O RMSEC, para cobre, zinco e cádmio, ficaram em 0,18%, 0,11% e 0,0045% respectivamente; os valores de RMSEV foram de 0,18% para o cobre, 0,11% para o zinco e 0,0032% para o cádmio. Com estes valores atribuídos em mesma grandeza de interesse (mg.L^{-1}) demonstra que o modelo foi válido para este eletrodo.

4.3.1.2.2 Resultados obtidos por meio do PLS para o eletrodo de mercúrio

Na Figura 23 mostra-se gráficos que correlaciona os valores esperados com os valores previstos pelo PLS utilizando as correntes da voltametria com o eletrodo de mercúrio



Cu



Zn

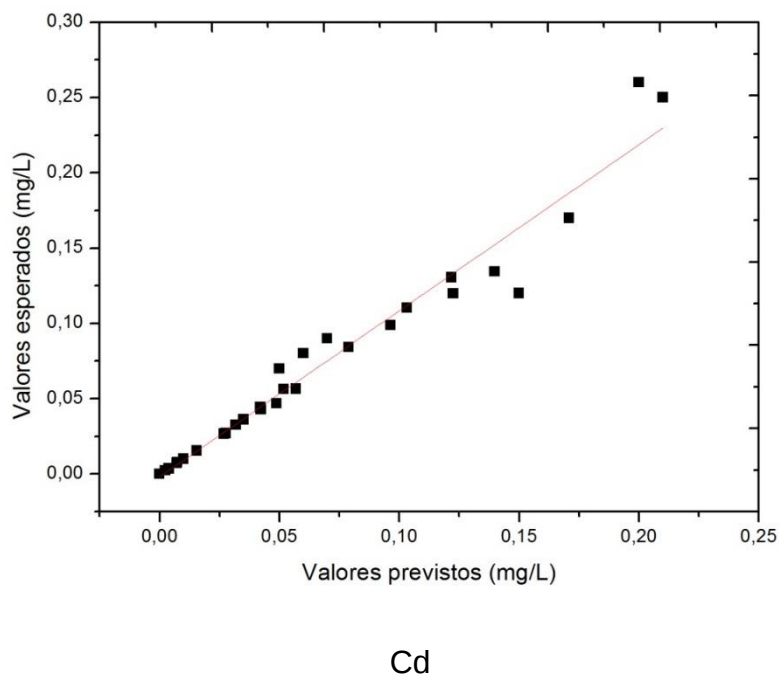
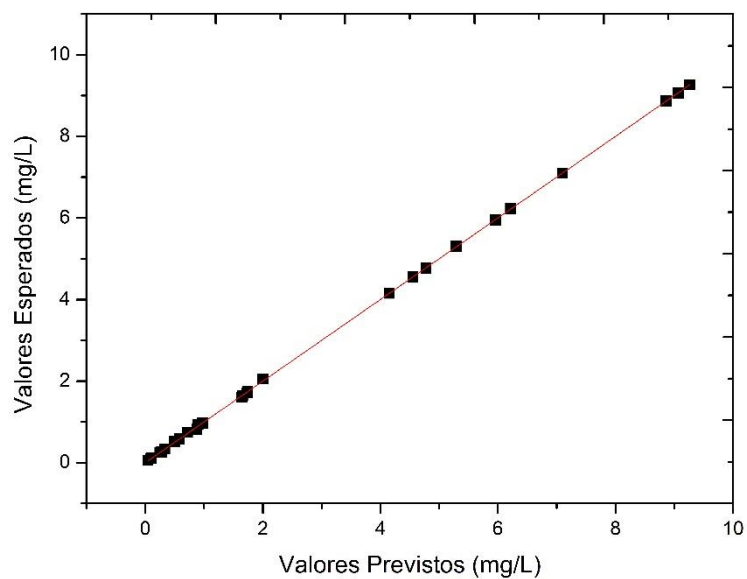


FIGURA 23 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com PLS para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de mercúrio.

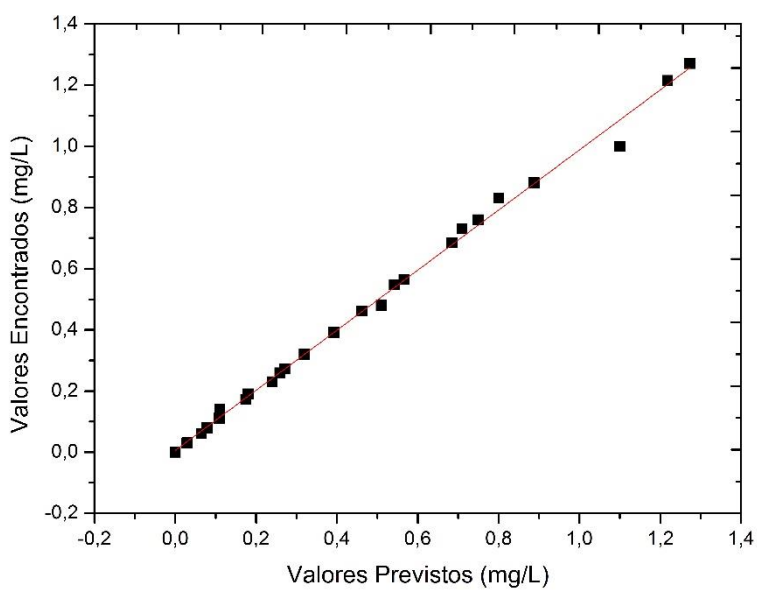
Ao observar a Figura 23, comprova-se uma certa linearidade dos pontos, próximos ou sobrepostos a reta, onde os valores de R^2 foram respectivamente 0,9975, 0,9898 e 0,9805 para cobre, zinco e cádmio. O RMSEC, para cobre, zinco e cádmio, ficaram em 0,090%, 0,022% e 0,004% respectivamente; os valores de RMSEV foram de 0,081% para o cobre, 0,026% para o zinco e 0,003% para o cádmio. Os valores atribuídos em mesma grandeza de interesse (mg.L^{-1}) demonstra que o PLS para o eletrodo de mercúrio foi de boa concordância.

4.3.1.2.3 Resultados obtidos por meio do PLS para o eletrodo de nanotubo de carbono

Na Figura 24, gráficos foram construídos correlacionando os valores esperados com os valores previstos pelo PLS utilizando as correntes da voltametria com o eletrodo de nanotubo de carbono.



Cu



Zn

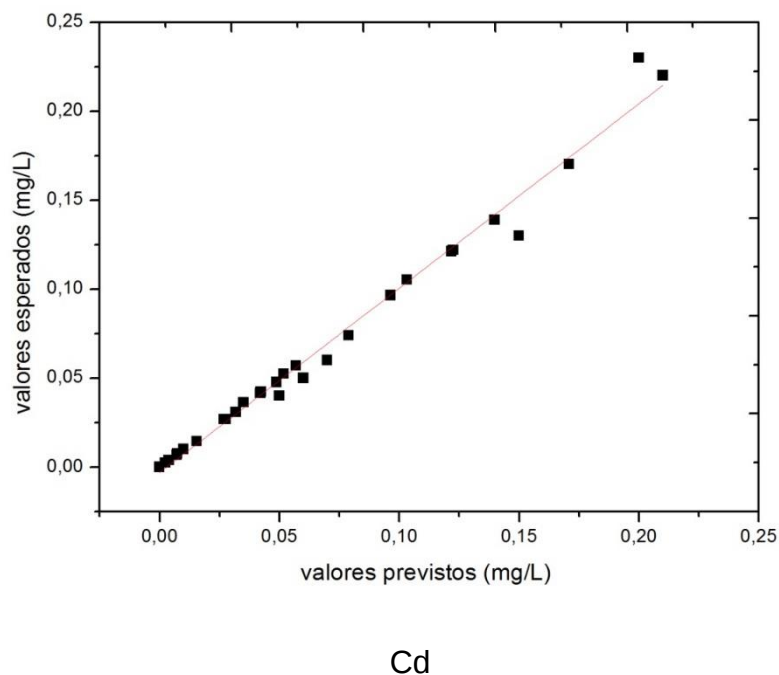


FIGURA 24 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com PLS para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de nanotubo de carbono.

A Figura 24 mostra a reta sendo construída por pontos com grande excelência, que estes pontos estão bem próximos ou sobrepostos à reta. Os valores de R^2 foram respectivamente 0,9994, 0,9910 e 0,9800 para cobre, zinco e cádmio. O RMSEC, para cobre, zinco e cádmio, ficaram em 0,019%, 0,002% e 0,007% respectivamente; os valores de RMSEV foram de 0,017% para o cobre, 0,002% para o zinco e 0,003% para o cádmio. Os valores atribuídos em mesma grandeza de interesse (mg.L^{-1}) demonstra que o PLS para o eletrodo de nanotubo de carbono obteve as melhores correlações e concordância.

Analisando o R^2 e os valores de erro de predição, o eletrodo de nanotubo de carbono apresentou os melhores resultados para a previsão dos metais em amostras diversificadas de cachaça, para o modelo do PLS.

4.3.2 Calibração e validação da metodologia quimiométrica das redes neurais artificiais

4.3.2.1 Pré- tratamento dos dados e desenvolvimento da Rede Neural

As redes neurais foram utilizadas para a previsão de metais traço em amostras diversas de cachaça. Após o pré-tratamento de centro na média e desenvolvimento de uma análise de componentes principais (PCA), os valores de scores foram utilizados para o desenvolvimento do modelo. Utilizou-se cinco componentes principais, englobando cerca de 98,89% da variância dos dados.

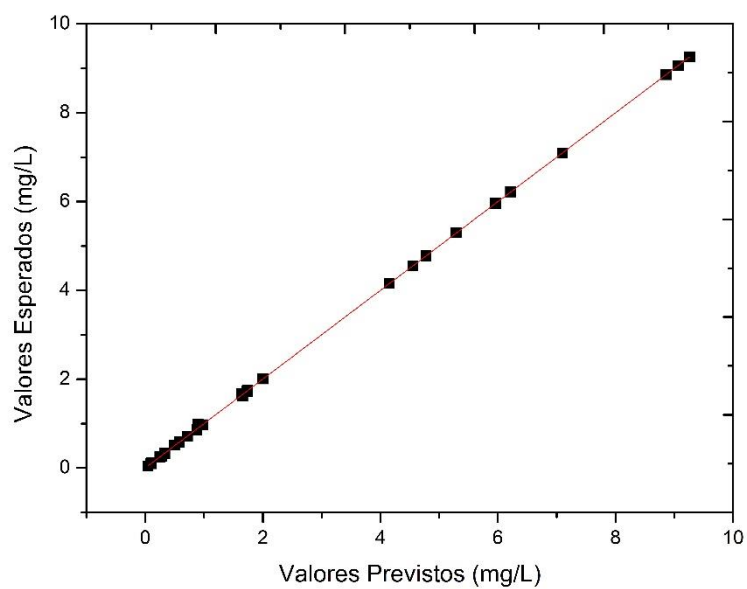
Para treinar a rede neural, uma função de transferência sigmoidal foi utilizado na camada escondida como uma função de transferência. Para a camada de saída foi utilizada uma função linear. A rede neural foi treinada pelo algoritmo de Marquardt-Levenberg, usando um número máximo de iterações igual a seis com o número de neurônios igual a cento e cinquenta e o valor de erro utilizado como critério para parar foi de 1×10^{-7} .

4.3.2.2 Resultados obtidos por meio da Rede Neural

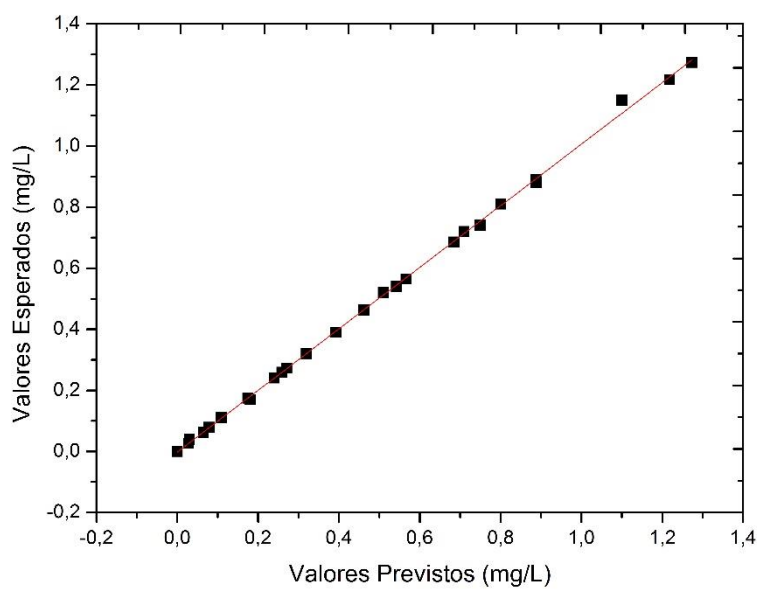
Os resultados obtidos nas redes neurais com base na correlação entre os valores previstos e os valores de referência, em forma de gráficos, analisando a linearidade e o R^2 , levando em consideração os eletrodos de trabalho a curva de calibração utilizada, eliminando amostras que sobrepõe a curva.

4.3.2.2.1 Resultados obtidos por meio das redes neurais para o eletrodo de carbono

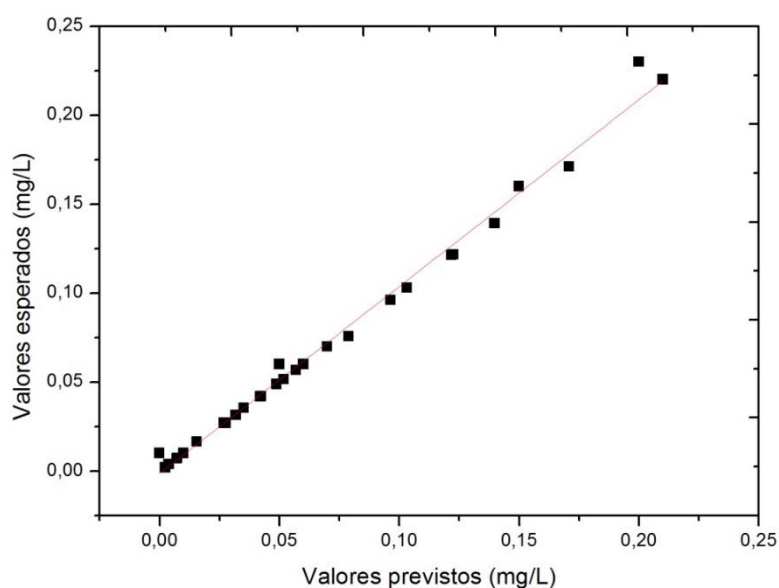
Os gráficos da Figura 25 informa a relação entre os valores esperados com os valores obtidos pelo modelo das redes neurais para o eletrodo de carbono.



Cu



Zn



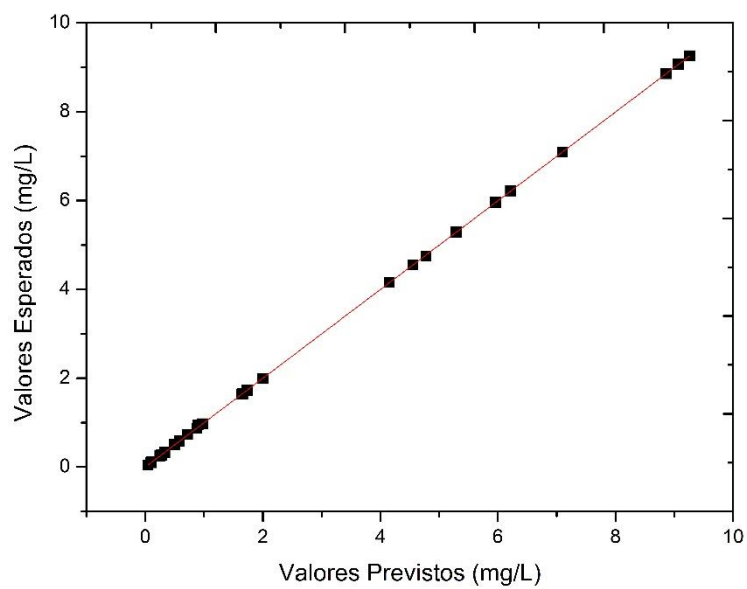
Cd

FIGURA 25 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com RNA para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de carbono.

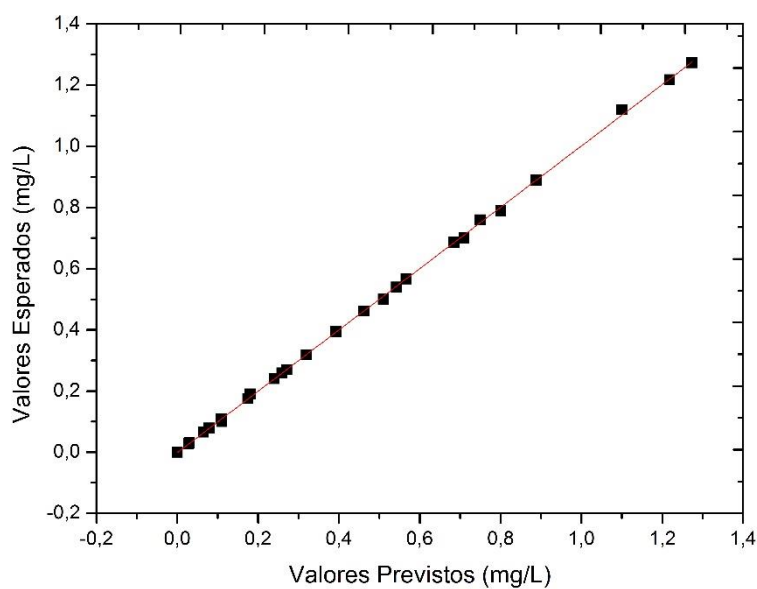
A Figura 25 informa a reta sendo construída por pontos com grande excelência, principalmente para cobre e zinco, como os pontos bem próximos ou sobrepostos à reta. Os valores de R^2 foram respectivamente 0,9965, 0,9899 e 0,9804 para cobre, zinco e cádmio. O RMSEC, para cobre, zinco e cádmio, ficaram em 0,010%, 0,001% e 0,005% respectivamente; os valores de RMSEV foram de 0,015% para o cobre, 0,013% para o zinco e 0,013% para o cádmio. Os valores atribuídos em mesma grandeza de interesse (mg.L^{-1}) demonstra que as redes neurais, para o eletrodo de carbono, obtiveram as melhores correlações e concordância.

4.3.2.2.2 Resultados obtidos por meio das redes neurais para o eletrodo de mercúrio

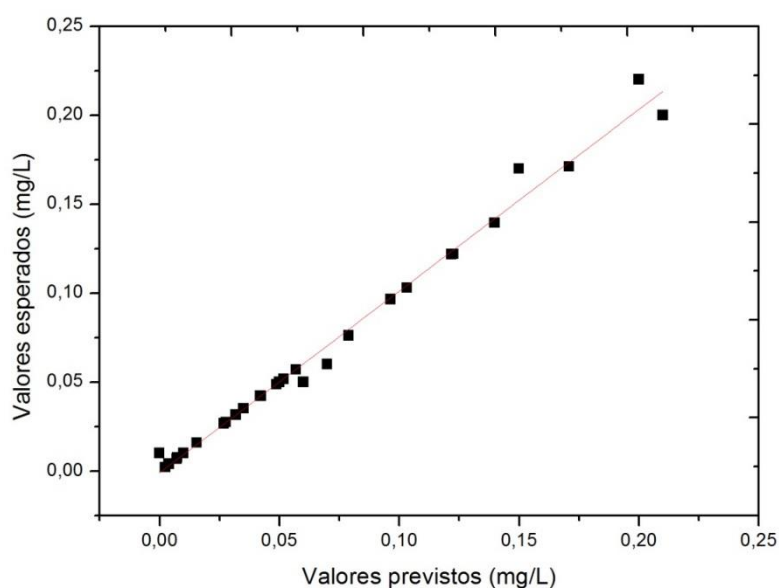
Os gráficos da Figura 26 informa a relação entre os valores esperados com os valores obtidos pelo modelo das redes neurais para o eletrodo de mercúrio.



Cu



Zn



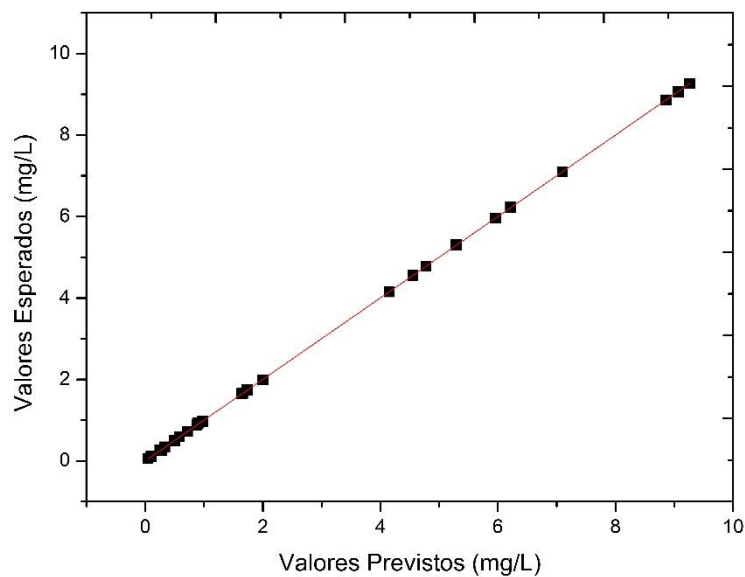
Cd

FIGURA 26 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com RNA para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de mercúrio.

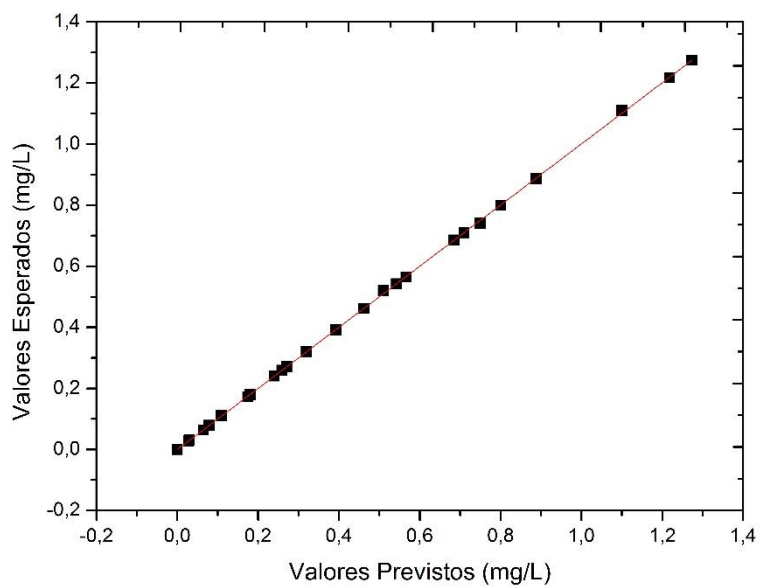
É possível observar na Figura 26 uma boa linearidade dos pontos, em considerável proximidade da reta, onde os valores de R^2 foram respectivamente 0,9972, 0,9963 e 0,9888 para cobre, zinco e cádmio. O RMSEC, para cobre, zinco e cádmio, ficaram em 0,006%, 0,001% e 0,004% respectivamente; os valores de RMSEV foram de 0,006% para o cobre, 0,002% para o zinco e 0,004% para o cádmio. Com estes valores atribuídos em mesma grandeza de interesse (mg.L^{-1}) demonstra que as redes neurais foram eficientes para a predição no eletrodo de mercúrio.

4.3.2.2.3 Resultados obtidos por meio das redes neurais para o eletrodo de nanotubo de carbono

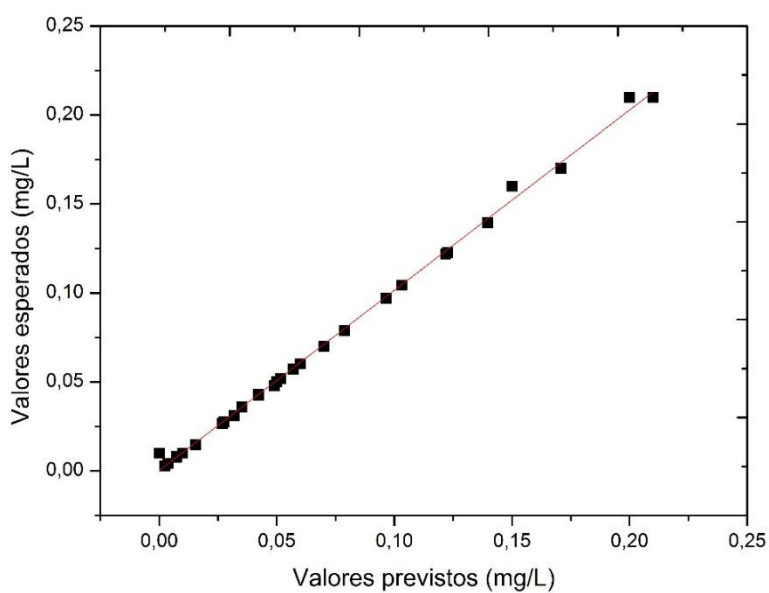
Os gráficos da Figura 27 informa a relação entre os valores esperados com os valores obtidos pelo modelo das redes neurais para o eletrodo de nanotubo de carbono



Cu



Zn



Cd

FIGURA 27 - Os resultados para o conjunto de validação modelado com RNA para Cu, Zn e Cd em amostras de cachaça utilizando o eletrodo de nanotubo de carbono.

Ao observar a Figura 27, comprova-se uma certa linearidade dos pontos, próximos ou sobrepostos a reta, onde os valores de R^2 foram respectivamente 0,9985, 0,9902 e 0,9805 para cobre, zinco e cádmio. O RMSEC, para cobre, zinco e cádmio, ficaram em 0,095%, 0,023% e 0,005% respectivamente; os valores de RMSEV foram de 0,082% para o cobre, 0,025% para o zinco e 0,004% para o cádmio. Os valores atribuídos em mesma grandeza de interesse (mg.L^{-1}) demonstra que as redes neurais para o eletrodo de nanotubo de carbono obteve uma excelente concordância de previsão.

4.3.3 Comparação das técnicas quimiométricas

Analizando somente os valores obtidos por R^2 e RMSEP, os modelos de redes demonstraram melhores valores de previsão que o PLS. Apesar do desenvolvimento positivo do modelo PLS, esperava-se que o modelo encontrado pelas redes neurais fosse ainda melhor, já que os voltamogramas são característicos como respostas não lineares. Além disso, segundo esses parâmetros, observa-se que nos modelos de redes neurais artificiais que o eletrodo de nanotubo de carbono foi o melhor para a detecção de zinco e cádmio, ou seja, em concentrações menores de metais em amostras de cachaça. Para a detecção de cobre, o eletrodo de carbono tornou-se o melhor eletrodo. Justifica-se este resultado com a possível saturação dos nanotubos de carbono, correlacionando metais em grande concentração associado a sua maior sensibilidade.

Além dos valores encontrados de R^2 e RMSEP, a tabela abaixo mostra os valores encontrados de teste F para os metais analisados em diferentes eletrodos, num intervalo de confiança de 95%, correlacionando os 30 valores de validação previstos pelo PLS e pelas redes neurais, com graus de liberdade igual a 28.

TABELA 10 - Valores de F calculados para valores previstos em PLS e redes neurais.

		Carbono	Mercúrio	Nanotubo de carbono
Cobre	F calculado	0,981442	0,993654	1,005421
	F critico	1,535624	1,533654	1,885845
Zinco	F calculado	0,934512	0,999654	0,993625
	F critico	1,535481	1,539652	1,531245
Cádmio	F calculado	1,092635	1,202541	1,058412
	F critico	1,885561	1,882854	1,883652

Ao analisar os valores de F encontrados e do F crítico encontrado, todos os valores de F crítico estão acima dos F calculados. Pode-se concluir que, em análise estatística, os modelos tiveram uma previsão semelhante, não possibilitando afirmar uma diferença significativa entre os métodos quimiométricos.

Os métodos criados tornaram-se válidos para a metodologia proposta, substituindo possíveis metodologias de alto custo de manutenção e execução como o ICP OES, utilizando métodos mais baratos como os métodos eletroquímicos.

CAPITULO 5

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra que a associação de técnicas quimiométricas correlacionado com a voltametria de redissolução, em resposta ao ICP OES, tornou-se uma ferramenta analítica válida para a determinação de concentrações de metais em cachaças de diversas peculiaridades.

O ICP OES representa uma das melhores técnicas de detecção de metais dentro da química, tornando-se a melhor opção para a construção dos métodos quimiométricos, fornecendo os valores de concentração de referência para as matrizes resposta.

Para a identificação dos metais por voltametria de redissolução anódica com onda quadrada, percebe-se que o eletrodo de mercúrio teve dificuldades na identificação de cádmio e chumbo (este último metal não foi detectado em nenhum voltamograma). Os eletrodos de carbono e nanotubo de carbono sofreram muito com interferentes e sobreposições de picos nos voltamogramas obtidos, porém, em todas as amostras, picos característicos de cobre e zinco eram nítidos, sendo em alguns voltamogramas, possibilidades de detecção do cádmio.

A não detecção do metal Chumbo era esperado em ambas as metodologias de análise, devido seu limite de quantificação ser maior que o encontrado nas amostras de cachaça, seguindo como referência a legislação prescrita. Apesar de quase semelhantes, as redes neurais demonstraram melhores resultados comparados ao PLS, devido a possíveis respostas não lineares nos voltamogramas obtidos em todos os eletrodos de trabalho utilizados. Analisando o erro de predição, para o PLS, o eletrodo de nanotubo de carbono obteve as melhores respostas para construção do método, para todos os metais quantificados. Nas Redes Neurais, para concentrações menores, no caso cádmio e zinco, o eletrodo de nanotubo de carbono também obteve as melhores respostas de previsão. Para concentrações de cobre, o eletrodo de carbono foi o que obteve os melhores resultados. Todos os eletrodos apresentaram potenciais válidos para a construção do modelo, de forma uniforme para os

valores obtidos de erro relativo e erro de predição. Após aplicar um teste F, conclui-se que os valores encontrados para os metais no PLS e nas redes neurais, estatisticamente não tem diferença, mostrando que os valores previstos entre as técnicas são semelhantes.

No geral, o método é rápido, simples e não gera resíduos químicos perigosos, tornando assim, mais facilmente possível para uso em laboratórios de controle de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento:** diário oficial da união, Decreto nº 42664. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 5 de maio de 2013.
2. **ABRABE - Associação brasileira de bebidas.** Disponível em:
<<http://www.abrabe.org.br/>>. Acesso em 05 de maio de 2013.
3. CALDAS, L.F.S.; FRANCISCO, B.B.A.; NETTO, A.D.P., CASSELLA, R.J. Multivariate optimization of a spectrophotometric method for copper determination in Brazilian sugar-cane spirits using the Doehlert design. **Microchemical Journal**, Rio de Janeiro, V. 99, p. 118-124, 2011.
4. COUTINHO, E. P. **Práticas ultrapassadas e mitos de qualidade na cadeia de produção de cachaça artesanal.** XXIII Encontro Nac. de Eng. de Produção - OuroPreto, MG, Brasil, 2003.
5. SALES, A.C.; CARDOSO, M.G. **Registro de estabelecimento, equipamentos para produção e controle de operação da fábrica de aguardente. Produção de aguardente de cana-de-açúcar.** Lavras: UFLA, 2001.
6. SILVA, F. B.; PERES, N. R. A. A.; CALIARI, M.; SOARES JR., M. S.; DOURADO, K. K. F. Diagnóstico da produção de cachaça no município de Paracatu. **Revista Verde**, V. 9, p. 201 - 207, 2014.
7. AZEVEDO, S.M.; CARDOSO, M.G.; PEREIRA, N.E.; RIBEIRO, C.F.S.; SILVA, V.F.; AGUIAR, F.C. Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em minas gerais. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.3, p.618-624, 2003.

8. ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D.W. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Italy, V. 49, p. 2819, 2001.
9. OLIVEIRA, M.G. **Investigação da Contaminação por Metais Pesados da Água e do Sedimento de Corrente nas margens do Rio São Francisco e tributários, a jusante da Represa da Cemig, no município de Três Marias, Minas Gerais**. 2007, 150 f. Tese (Doutorado em Geologia Ambiental) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Geociências. Minas Gerais.
10. DUARTE, R.P.S.; PASQUAL. Avaliação do cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. **Energia na Agricultura**, São Paulo, V. 15, p. 46-58, 2000.
11. PINTO, F.G.; ROCHA, S.S.; CANUTO, M.H.; SIEBALD, H.G.L.; SILVA, J.B.B. Determinação de cobre e zinco em cachaça por espectrometria atômica com chama usando calibração por ajuste de matriz. **Analytica**, Minas Gerais, V. 17, p. 48-50, 2005.
12. MIRANDA, K.; DIONÍSIO, A.G.G.; PEREIRA-FILHO, E.R. Copper determination in sugar cane spirits by fast sequential flame atomic absorption spectrometry using internal standardization. **Microchemical Journal**, São Paulo, V. 96, p. 99–101, 2010.
13. FERNANDES, A.P.; SANTOS, M.C.; LEMOS, S.G.; FERREIRA, M.M.C.; NOGUEIRA, A.R.A.; NOBREGA, J.A. Pattern recognition applied to mineral characterization of Brazilian coffees and sugar-cane spirits. **Spectrochimica Acta Part**, São Paulo, V. 60, p. 717–724, 2005.
14. MORENO, I.S.; GONZÁLEZ-WALLER, D.; GUTIERREZ, V.; MARINO, M.; CARMEÁN, A.M.; GONZÁLEZ, A.G.; HARDISSON, A. Determination of Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn in red wine samples by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy: Evaluation of

- preliminary sample treatments. **Microchemical Journal**, Spain, V. 88, p. 56–61, 2008.
15. PETRY, C.F. **Determinação de elementos traço em amostras ambientais por ICP OES**. 2005, 90 f. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
16. GINÉ, M. F. **Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma**. São Paulo: CPG/CENA, 1998.
17. SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A.R.; TOLEDO, R.A.; PEDROSA, V.A.; OLIVEIRA, R.T.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Voltametria de onda quadrada. Segunda Parte: aplicações. **Química Nova**, V. 27, p. 790-797, 2004.
18. AVARES, E. F. L.; OKUMURA, L.L.; CARDOSO, M.G.; OLIVEIRA, M.F.; MAGRIOTIS, Z.M.; SACZK, A.A. An alternative method for the simultaneous determination of copper and lead for quality control of sugar cane spirit using a nanotube-based sensor. **J. Braz. Chem. Soc.** 2012, V.23, p. 1614-1622, 2012.
19. CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D.. **Análise Instrumental**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 187,188, 193,194, 195, 199, 200 p.
20. PERKIN ELMER - **Guide to Inorganic Analysis**. Disponível em: <http://www.groco.is/groco/upload/files/manualar_fra_birgjum/pe/icp_7_mai_2008/gde_inorganicanalysis.pdf>. Acessado em 02 de Fevereiro de 2014.
21. HOLLER, F. J; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. . **Princípios de análise instrumental**. 6ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 238 - 276 p.

22. GUINÉ-ROSÍAS, M. F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP –AES)**. 1ª Ed. Piracicaba: CPG/CENA, 1998. 3 -104 p.
23. DA-COL, J.A. Uma Breve Visão sobre a Determinação de Metais em Ligas Metálicas e Matrizes Semelhantes: Alguns Métodos Clássicos e Espectroscópicos Modernos. **Rev. Virtual Quim.**, V. 6, p. 989-1009, 2014
24. KORN, M. G.A.; SANTOS, D. S. S.; WELZ, B.; VALE, M. G. R.; TEIXEIRA, A. P.; LIMA, D. C.; FERREIRA, S. L. C. Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels – a review. **Talanta**, V. 73, P. 1 -10, 2007.
25. SZYMCHYZHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Determination of essential and non-essential elements in green and black teas by FAAS and ICP OES simplified–multivariate classification of different tea products. **Microchemical Journal**, V. 121, p. 122–129, 2015.
26. BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. **Concepts, instrumentation, and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry**. 2ª Ed. Perkin Elmer, 1997. 2 cap, 4 - 7 p.; cap 3, 25 - 27 p.
27. BRENNER, I. B.; ZANDER, A. T. Axially and radially viewed inductively coupled plasmas- a critical review. **Spectrochim. Acta Part B**, V.55, 1196 - 1200 p., 2000.
28. OLIVEIRA, Adriana Alice de. **Determinação de iodo por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial**. Dissertação de mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009. p. 3, 27-30, 38-40.]

29. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, J. F.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 6^a Ed. São Paulo: Thomson, 2006. 175, 176, 144, 812 p.
30. LIU, Y.; XU, L.; WANG, S.; YANG, W.; WEN, Y.; ZHANG, X. An ultrasensitive electrochemical immunosensor for apolipoprotein E4 based on fractal nanostructures and enzyme amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, V. 71, p. 396–400, 2015.
31. LIU, S.; SU, W.; LI, Z.; DING, X. Electrochemical detection of lung cancer specific microRNAs using 3D DNA origami nanostructures. **Biosensors and Bioelectronics**, V. 71, p. 57–61, 2015.
32. GUGOASA, L. A.; STADEN, R. S.; CALENIC, B.; LEGLER, J. Multimode sensors as new tools for molecular recognition of testosterone, dihydrotestosterone and estradiol in children's saliva. **J. Mol. Recognit.**, V. 28, p. 10–19, 2015.
33. KANG, J.; LU, X.; ZENG, H.; LIU, H.; LU, B. Investigation on the eletrochemistry of rutin and its analytical application. **Analytical Letters**, V.35, p. 677–686, 2002.
34. IZADKHAH, V.; FARMANY, A. MORTAZAVI, S. S. Voltammetric determination of copper in water samples using a Schiff base/carbon nanotube-modified carbon paste electrode. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, V. 21, p. 994–996, 2015.
35. SANDER, M.; HOFSTETTER, T. B.; GORSKI, C. A. Electrochemical Analyses of Redox-Active Iron Minerals: A Review of Nonmediated and Mediated Approaches. **Environ. Sci. Technol.**, V. 49, p. 5862–5878, 2015.

36. TARUSHI, A.; PERONTSIS, S.; HATZIDIMITRIOU, A. G.; PAPADOPOULOS, A. N.; KESSISSOGLOU, D.P.; PSOMAS, G. Copper(II) complexes with the non-steroidal anti-inflammatory drug tolifenamic acid: Structure and biological features. **Journal of Inorganic Biochemistry**, V. 149, p. 68–79, 2015.
37. CHAKRABARTI, M. H.; MANAN, N. S. A.; BRANDON, N. P.; MAHER, R. C.; MJALI, F. S.; ALNASHEF, I. M.; HAJIMOLANA, S. A.; HASHIM, M. A.; HUSSAIN, M. A.; NIR, D. One-pot electrochemical gram-scale synthesis of graphene using deep eutectic solvents and acetonitrile. **Chemical Engineering Journal**, V. 274, p. 213–223, 2015.
38. GULPPI, M.; PAVEZ, J.; ZAGAL, J. H.; SANCY, M.; AZOCAR, M.; SCHOLZ, F.; PAEZ, M. A. Stripping voltammetry microprobe (SPV): Substantial improvements of the protocol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, V. 745, p. 61–65, 2015.
39. FANJUR-BOLADO, P.; SANTOS, D. H.; MONTOYA, V. M.; COSTA-GARCIA, A. Uric Acid Determination by Adsorptive Stripping Voltammetry on Multiwall Carbon Nanotubes Based Screen-Printed Electrodes. **Electroanalysis**, V.27, p. 1276 –1281, 2015.
40. RIBEIRO, W. F. **Análise de Traços do Pesticida Carbendazim por Voltametria de Onda Quadrada com Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Nanotubos de Carbono**. 2009. Dissertação (Mestrado) , pag.24, 2009.
41. NECKEL, I. T. **Crescimento e Morfologia de Ligas de Co_xFe_{100-x} Eletrodepositadas sobre Si(111) TIPO-n**. Dissertação de Mestrado, pag.: 41-47, 2009
42. EVANS, D.H; O'CONNELL, K.M.; PETERSEN, R.A.; KELLY, M.J. Cyclic Voltammetry. **Jornal of Chemical Education**. V. 60, p. 290-293, 1983.

43. GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções :Análise quantitativa**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian., 2001. 1050 p.
44. ROSA, T. R. **Determinação de Zinco em água de coco (*Cocos nucifera* L.) usando voltametria de redissolução anódica e o eletrodo de diamante dopado com Boro**. 2013, 75 f. Trabalho de Conclusão de Curso em Bacharelado em Química – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo.
45. BOTTON, J.C. **Líquidos iônicos como eletrodos para reações químicas eletrolíticas**. 2007. Tese (Doutorado) – Instituto de Química: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
46. FERTONANI, F.L.; BENEDETTI, A.V. Microeletrodos: construção e caracterização. **Eclet. Quím.**; V.22, p.1-16, 1997
47. SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, V. 26, p. 81-89, 2003.
48. AMORELLO, D.; ORECCHIO, S. Vanadium and molybdenum concentrations in particulate from Palermo (Italy): analytical methods using voltammetry. **Front. Environ. Sci. Eng.**, V. 9, p. 605–614, 2015.
49. OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R. Square wave voltammetry. *Anal.Chem.*, **ACS Publications**, V. 57, p. 101-110, 1985.
50. SVANCARA, I.; PRIOR, C.; HOCEVAR, S. B.; WANG, J. A Decade with Bismuth-Based Electrodes in Electroanalysis. **Electroanalysis**, V. 22, p. 1405 – 1420, 2010.

51. ELEMA, B. The zbinden method for the micro-estimation of copper after preliminary deposition of the metal by electrolysis. **Antonie leeuwenhoek.**, Springer, V. 12, p. 243_256, 1947.
52. HENZE, G. Introduction to Polarography and Voltammetry. German: Metrohm Limited, 2004.
53. ARAGAY, G.; MERKOÇI, A. Nanomaterials application in electrochemical detection of heavy metals. **Electrochimica Acta**, Spain, V. 84, p. 49 – 61, 2012.
54. MERKOÇI, A. Electroanalysis. **Wiley InterScience**, Spain, V. 19, p. 7–8, 2007.
55. KEYVANFARD, M.; SHAKERI, R.; KARIMI-MALEH, H.; ALIZAD, K. Highly selective and sensitive voltammetric sensor based on modified multiwall carbon nanotube paste electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, acetaminophen and tryptophan. **Materials Science and Engineering**, Iran, V. 33, p. 811–816, 2013.
56. TAVARES, E.F.L.; OKUMURA, L.L.; CARDOSO, M.G.; OLIVEIRA, M.F.; MAGRIOTISA, Z.M.; SACZK, A.A. An Alternative Method for the Simultaneous Determination of Copper and Lead for Quality Control of Sugar Cane Spirit using a Nanotube-Based Sensor. **J. Braz. Chem. Soc.**, Lavras, V. 23, p.1614-1622, 2012.
57. YUE, W. RIEHL; B.L.; PANTELIC, N.; SCHLUETER, K.T.; JOHNSON, J.M.; WILSON, R.A.; GUO, X.; KING, E.E.; HEINEMAN, W.R. Anodic Stripping Voltammetry of Heavy Metals on a Metal Catalyst Free Carbon Nanotube Electrode. **Electroanalysis, Cincinnati**, V. 24, p. 1039 – 1046, 2012.
58. AFKHAMI, A.; GHAEDI, H.; MADRAKIAN, T.; REZAEIVALA, M. Highly sensitive simultaneous electrochemical determination of trace amounts

of Pb(II) and Cd(II) using a carbon paste electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and a newly synthesized Schiff base.

Electrochimica Acta, Hamedan, V.89, p. 377– 386, 2013.

59. BARTHUS, R.C.; MAZO, L.H.; POPPI, R.J.; Simultaneous determination of vitamins C, B6 and PP in pharmaceuticals using differential pulse voltammetry with a glassy carbon electrode and multivariate calibration tools. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 38, p. 94-99, 2005.

60. dos SANTOS, M. F.; SIMÕES, J. C.; SILVA, J. R. A; BARTHUS, R. C.; POPPI, R. J; AMARAL, A. C. F. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Quím. Nova**, V. 34, p. 1629 - 1633, 2011.

61. MOTA, F. D. B. **Aplicação de análises de componentes principais (PCA) e ICP OES para a caracterização de vinhos do Estado do Espírito Santo**. Monografia de conclusão de curso. Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011. 11, 30-35 p.

62. TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quim. Nova**, V. 29, p. 344-346, 2006

63. BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª Ed. Campinas: Editora Unicamp, 2003. 1-3, 111, 132, 133, 245, 251, 302,401 p.

64. NOVAES, C. G. **Aplicação de técnicas quimiométricas na otimização de métodos usando a espectrometria de emissão**

- óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com chama visando a análise de amostras ambientais.** Tese de doutorado. Departamento de química da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.11-12 p.
65. FABRINO, H. J. F. **Emprego de otimização multivariada no desenvolvimento de métodos para determinação de metais de interesse em soro e sangue humanos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.** Dissertação de mestrado. Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008. 31-33 p.
66. OHASHI, T.; YAMAKI, M.; PANDAV, C. S.; KARMARKAR, M. G.; IRIE, M. Simple Microplate Method for Determination of Urinary Iodine. **Clinic. Chem.**, V. 46, p. 530, 2000.
67. PIMENTEL, M. F.; de BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Quim. Nova**, V. 19, p. 270-271, 1996.
68. PEIXOTO, R. G. A.; OLIVEIRA, A.; CADORE, S. Multielemental determinations in chocolate drink powder using multivariate optimization and ICP OES. **J. Agric. Food Chem.**, V.60, p. 8117-8118, 2012.
69. FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P.L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Quím. Nova**. 1999, vol.22, n.5, pp. 724-731.
70. MARTENS, H.; TORMOD, N. **Multivariate Calibration**. John Wiley & Sons, New York, 1989.
71. POPPI, R.J. **Quantificação de Picos Cromatográficos Superpostos por Métodos de Calibração Multivariada.** UNICAMP – dissertação de mestrado, 1989.

72. BARTHUS, Rosângela Cristina. **Aplicação de métodos quimiométricos para análise de controle de qualidade de óleos vegetais utilizando espectroscopias no infravermelho e Ramon.** 1999, 112f., Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
73. PABISEK, E.; WASZCZYSZYN, Z. Identification of thin elastic isotropic plate parameters applying Guided Wave Measurement and Artificial Neural Networks. **Mechanical Systems and Signal Processing**, V. 64-65, p. 403–412, 2015.
74. BARR, A.; FEIGENBAUM, E.A. The handbook of artificial intelligence. Addison- Wesley, Reading, MA, 1, 1981.
75. AMINI, K.; ROSTAMI, F. A modified two steps Levenberg–Marquardt method for nonlinear equations. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, V. 288, p. 341–350, 2015.
76. DEMUTH, H.; BEALE, M.; *Neural Network Toolbox for use with Matlab*, **EigenVector Research Inc.**, Manson, W.A., 1998.
77. de OLIVEIRA, A. A. **Determinação de iodo por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial.** Dissertação de mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009. 3, 27-30, 38-40 p.
78. **Manual da garantia da qualidade analítica.** Disponível em: <http://biblioteca.quimicaufmg2010.files.wordpress.com/2012/02/mapa-2011-manual-de-garantia-da-qualidade-analitica.pdf>. Acesso em 16 de março de 2014.

79. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, V. 27, p. 771-775, 2004.
80. CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; da NOBREGA, A. W.; ABRANTES, S. de M. P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 30, 63-72, 2010.
81. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acessado em 16 março de 2014.
82. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil** . Resolução normativa nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o Regulamento da Lei no 6.198, de 26 de dezembro de 1974, que dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação animal, dá nova redação aos arts. 25 e 56 do Anexo ao Decreto no 5.053, de 22 de abril de 2004, e dá outras providências. Brasília, 02 Jun. 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12++Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>> .Acessado em 19 de junho de 2014.
83. BRITO, N. M.; de AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussões. **R. ecotoxicol. e meio ambiente**, V.13, p. 129-146, 2003
84. RAYA-RODRIGUES, M. T.; ALBANO, F.M. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. Porto Alegre: Rede metrológica, RS, 2009, 29, 39-41 p.

85. **MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento:** Guia de validação e controle de qualidade analítica. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Animal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analitica.pdf>. Acessado em 20 de outubro de 2014.
86. SANTANA, A.K.M.; NUNES, L.C.C.; MEDEIROS, F.P.M.; SILVA, M.J.; LAVRA, Z.M.M.; ROLIM-NETO, P.J. Otimização e validação do método analítico volumétrico para quantificação do carbonato de cálcio. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, V. 28, p. 177-183, 2007.
87. VIEIRA, E. C. **Avaliação de potencialidades e aplicações de espectrômetros com plasma acoplado indutivamente em análises químicas.** Tese de doutorado. Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007, 23 p.
88. FERNANDES, I.C.; FAUSTO, M.A.; BEZERRA, O.M.P.A.; QUINTAES, K.D. Níveis de contaminantes inorgânicos em cachaças da região do quadrilátero ferrífero armazenadas em copos *in natura* de esteatito (pedra sabão). **Quim. Nova**, V. 36, p. 1360-1365, 2013.
89. MITKO, K., BEBEK, M. ICP-OES determination of trace elements in salinated water samples. **Atomic Spectroscopy**, v.20, p.217-223, 1999. 13.
90. OLIVEIRA, A. A.; NÓBREGA, J. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. Avaliação de ICP OES com configuração axial ou radial para determinação de iodo em sal de cozinha. **Quim. Nova**, V. 35, P. 1299-1305, 2012.
91. FONTE, A. R. D. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de iodo em amostras de premixes e soluções**

- expectorantes usando técnicas espectrométricas. Dissertação de metrado.** Departamento de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014, 146 p.
92. GARBIN, R. G.; BOGUSZ JR., S.; MONTANO, M. A. Níveis de cobre em amostras de cachaça produzidas na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, V. 35, p. 1436-1440, 2005.
93. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução normativa n.13, de 29 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2005. Seção 1, p.3.
94. SOUZA, L.M.; FERREIRA, K.S.; PASSONI, L.C. Teores de minerais em cachaças produzidas na região norte do estado do Rio de Janeiro. **Alim. Nutr.**, V. 21, p. 625-631, 2010.
95. HOANG, V. D.; HUE, N. T.; THO, N. H.; NGUYEN, H. M. T. Simultaneous determination of chloramphenicol, dexamethasone and naphazoline in ternary and quaternary mixtures by RP-HPLC, derivative and wavelet transforms of UV ratio spectra. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, V. 139, p. 20-27 , 2015.

ANEXO

ANEXO 01 - Amostras de cachaça e suas características

Cachaças	Município de fabricação	Estado	Teor Alcoólico (% V/V)
1	Domingos Martins	ES	40,00%
2	São Roque do Canaã	ES	45,00%
3	Aracruz	ES	45,00%
4	Aracruz	ES	50,00%
5	Afonso Claudio	ES	42,00%
6	Linhares	ES	42,00%
7	Uberlândia	MG	39,00%
8	Santa Rita do Passo Quatro	SP	39,00%
9	Cachoeiro de Itapemirim	ES	15,50%
10	Pirassununga	SP	38,00%
11	Nova Friburgo	RJ	38,00%
12	Cachoeiro de Itapemirim	ES	41,00%
13	Domingos Martins	ES	44,00%
14	São Roque do Canaã	ES	47,00%
15	Alfredo Chaves	ES	46,00%
16	São Roque do Canaã	ES	47,00%
17	Anchieta	ES	42,00%
18	Cariacica	ES	46,00%
19	Cariacica	ES	44,00%
20	Santa Teresa	ES	40,00%
21	São Roque do Canaã	ES	49,20%
22	São Roque do Canaã	ES	44,70%
23	São Roque do Canaã	ES	44,70%
24	São Roque do Canaã	ES	46,00%
25	Teresópolis	RJ	39,00%
26	Castelo	ES	41,00%
27	Afonso Claudio	ES	42,00%
28	Afonso Claudio	ES	...
29	Rio das Pedras	SP	39,00%

30	Vila Velha	ES	40,00%
31	Vitória do Santo Antão	PE	40,00%
32	São Gabriel da Palha	ES	45,00%
33	Rio claro	SP	39,00%
34	São Gonçalo do Pará	MG	42,00%
35	Rio das Pedras	SP	39,00%
36	Alfredo Chaves	ES	45,00%
37	Castelo	ES	41,00%
38	Cachoeiro de Itapemirim	ES	41,00%
39	Castelo	ES	46,50%
40	Domingos Martins	ES	42,00%
41	Castelo	ES	42,00%
42	Domingos Martins	ES	41,00%
43	Pirassununga	SP	39,00%
44	Domingos Martins	ES	43,00%
45	Cariacica	ES	38,00%
46	Pirassununga	SP	39,00%
47	Vargem alta	ES	...
48	Domingos Martins	ES	...
49	Serra	ES	45%
50	São Roque do Canaã	ES	46,00%
51	Itarana	ES	46,00%
52	Itarana	ES	47,00%
53	Domingos Martins	ES	40,00%
54	São Roque do Canaã	ES	45,00%
55	Aracruz	ES	45,00%
56	Aracruz	ES	50,00%
57	Afonso Claudio	ES	42,00%
58	Linhares	ES	42,00%
59	Uberlândia	MG	39,00%
60	Santa Rita do Passo Quatro	SP	39,00%
61	Cachoeiro de Itapemirim	ES	15,50%
62	Pirassununga	SP	38,00%

63	Domingos Martins	ES	42,00%
64	Aracruz	ES	45,00%
65	Domingos Martins	ES	42,00%
66	São Roque do Canaã	ES	44,70%
67	São Roque do Canaã	ES	46,00%
68	Vila velha	ES	40,00%
69	Aracruz	ES	45,00%
70	Domingos Martins	ES	42,00%
71	Vila velha	ES	40,00%
72	Cachoeiro de Itapemirim	ES	41,00%
73	Aracruz	ES	45,00%
74	Anchieta	ES	42,00%
75	Teresópolis	RJ	39,00%
76	São Roque do Canaã	ES	44,70%
77	São Roque do Canaã	ES	46,00%
78	Cachoeiro de Itapemirim	ES	41,00%
79	Afonso Claudio	ES	42,00%
80	Castelo	ES	46,50%
81	Domingos Martins	ES	42,00%
82	Domingos Martins	ES	42,00%
83	Afonso Claudio	ES	42,00%
84	São Roque do Canaã	ES	44,70%
85	São Roque do Canaã	ES	46,00%
86	São Roque do Canaã	ES	44,70%
87	São Roque do Canaã	ES	46,00%
88	São Roque do Canaã	ES	44,70%
89	São Roque do Canaã	ES	46,00%
90	São Roque do Canaã	ES	44,70%