

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

André Moreira de Souza

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE EM
CACHAÇA USANDO FAAS E APLICAÇÃO NO ESTUDO
DE REMOÇÃO DE COBRE EM AMOSTRAS DA BEBIDA
UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Belo Horizonte

2012

UFMG/ICEx/DQ.908^a

D. 509^a

André Moreira de Souza

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE EM CACHAÇA
USANDO FAAS E APLICAÇÃO NO ESTUDO DE REMOÇÃO DE
COBRE EM AMOSTRAS DA BEBIDA UTILIZANDO BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Piccin

Belo Horizonte

2012

S719d Souza, André Moreira de
2012 Desenvolvimento e validação de um método analítico
D para determinação de cobre em cachaça usando FAAS e
aplicação no estudo de remoção de cobre em amostras da
bebida utilizando bagaço de cana-de-açúcar / André
Moreira de Souza. 2012.
xvi, 82 f. : il.

Orientador: Evandro Piccin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química Analítica - Teses 2. Cana-de-açúcar -
Teses 3. Cobre - Teses 4. Validação - Teses 5. Bagaço
de cana - Teses I. Piccin, Evandro, Orientador II.
Título.

CDU 043



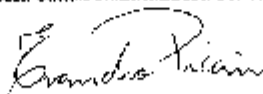
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICQA
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5790
E-MAIL: ppgq@ufmg.br



"Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para Determinação de Cobre em Cachaça Usando FAAS e Aplicação no Estudo de Remoção de Cobre em Amostras da Bebida Utilizando Bagazo de Cana-de-Açúcar"

André Moreira de Souza

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Evandro Piccini
UFMG


Prof. Letícia Malta Costa
UFMG


Prof. Tereza Maria Ferreira de Oliveira
UFMG

Belo Horizonte, 12 de julho de 2012.

Dedico esse trabalho,

Aos meus pais, Jair e Maria Terezinha, pelo esforço que desprenderam e pelo incentivo que nos deram (eu e meus irmãos), mesmo diante de muitas dificuldades, para que pudéssemos estudar.

À minha família, Shirley (minha esposa) e Kauã (meu filho).

Agradeço,

À Deus pela vida, saúde e oportunidade;

À toda minha família pelo amor, amizade, companheirismo e apoio no meu percurso de vida;

Ao Departamento de Química da UFMG pelos conhecimentos e oportunidades oferecidos na pós-graduação;

Ao Prof. Dr. Evandro Piccin pela presença, apoio, amizade, paciência e orientação durante o curso de pós-graduação;

Ao Prof. Rodinei Augusti por disponibilizar o equipamento de GC-MS para realização dos experimentos;

Ao aluno de doutorado do Departamento de Química da UFMG, Marcus Canuto, pela colaboração nos experimentos de GC-MS;

Aos amigos do LAFQ, Cláudia, Herlaine e Aline pela amizade, momentos de descontração, apoio e colaboração durante a realização dos experimentos no LAFQ;

Aos demais amigos do LQA pela amizade e momentos de descontração;

À Lillian, Paula e Ilka pelo apoio e compreensão.

RESUMO

A aguardente produzida em alambiques de cobre apresenta melhor qualidade sensorial quando comparada à produzida em alambiques confeccionados com outros materiais, como aço inox, alumínio e porcelana. A utilização de equipamentos de cobre (destiladores) nos alambiques é favorável por reduzir a acidez e os níveis de aldeídos e compostos sulfurosos, os quais conferem à bebida sabor e odor desagradáveis. Entretanto, a presença de elevadas concentrações de cobre na aguardente a torna prejudicial à saúde humana, pois o cobre é tóxico quando em altas concentrações no organismo. Entre as causas que têm impedido o Brasil de atingir níveis maiores de exportação de cachaça está na dificuldade de adequação aos limites máximos estabelecidos pelas agências reguladoras. O limite máximo de cobre em cachaça permitido pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) é de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. Em determinados países, o teor máximo permitido é de apenas $2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Essa dissertação apresenta o desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação de cobre em cachaça usando a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (Capítulo I) e aplicação no estudo de remoção de cobre em amostras da bebida utilizando bagaço de cana-de-açúcar como material de adsorção (Capítulo II). Como poderá ser observado no Capítulo I, o método desenvolvido sugere a determinação direta do analito sem prévia digestão da amostra, ajustando apenas seu teor alcoólico para 40% (v/v), que reflete à condição usada para construção da curva analítica de calibração. Os parâmetros de validação foram avaliados segundo recomendado pelo guia de validação de métodos analíticos do INMETRO, a saber: efeito de matriz, linearidade, seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa de trabalho, faixa linear, precisão, veracidade e robustez.

O Capítulo II apresenta uma avaliação do uso do bagaço de cana-de-açúcar como material de adsorção para remoção de cobre presente em amostras de cachaça comercial. Como poderá ser observado, 1,5 g de bagaço de cana-de-açúcar tratado com HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi capaz de reduzir a concentração de íons cobre para níveis abaixo do permitido para exportação do produto ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) de 210 mL de uma solução alcoólica 40% (v/v) que continha $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ em cobre. Um estudo sobre possíveis alterações químicas na cachaça devido ao tratamento foi realizado empregando a técnica de CG-MS. Conforme mostrado nos resultados, o bagaço de cana-de-açúcar não libera nenhuma substância na cachaça e também não altera sua qualidade sensorial.

ABSTRACT

Sugar cane spirits (Brazilian cachaça) produced in copper stills show better sensorial quality when compared to those produced in pot stills made with other materials such as stainless steel, aluminum and porcelain. The use of equipment in copper stills is favorable for reducing the acidity and the levels of aldehydes and sulfur compounds, which give the drink, unpleasant taste and smell. However, the presence of high concentrations of copper in the drink becomes harmful to human health, since copper is toxic at high concentrations in the body. Among the causes that have been preventing Brazil from achieving higher levels of exportations of “cachaça” is the difficulty of adjustment to the limits established by regulatory agencies. The maximum concentration of copper in “cachaça” allowed by MAPA (Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply) is 5.0 mg L^{-1} . In certain countries the maximum permitted concentration of copper is 2.0 mg L^{-1} .

This work presents the development and validation of an analytical method for the determination of copper in “cachaça” by using flame atomic absorption spectrometry (FAAS) (Chapter I) and its application in the study of removal of copper in samples of “cachaça” using residue (bagasse) of sugar cane as an adsorption material (Chapter II). As will be seen in Chapter I, the method developed suggests the direct determination of the analyte without prior digestion of the sample, only adjusting its alcohol content to 40% (v/v), which reflects the condition used to construct the calibration curve. The validation parameters were evaluated as recommended by the guide of validation of analytical methods from INMETRO, that is: matrix effect, linearity, selectivity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), working range, linear range, precision, accuracy and robustness.

Chapter II presents an evaluation of the use of sugar cane bagasse as adsorption material for removing the copper present in commercial samples of cachaça. As will be seen, 1.5 g of bagasse of sugar cane treated with $\text{HCl } 1.0 \text{ mol L}^{-1}$ was able to reduce the concentration of copper ions to below the levels allowed for export the product (2.0 mg L^{-1}) of 210 ml of an alcoholic solution 40% (v/v) containing 10.0 mg L^{-1} of copper. A study on the chemical changes in “cachaça” due to its treatment with sugar cane bagasse was carried out using the technique of GC-MS. As shown in the results, bagasse from sugar cane does not release any substance in the drink and also does not change its sensory quality.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURA	xv
CAPITULO 1	1
1.1 INTRODUÇÃO	2
1.1.1 Cachaça no Brasil	2
1.1.1.1 Histórico.....	2
1.1.1.2 Importância econômica e social	3
1.1.1.3 Qualidade da cachaça.....	4
1.1.2 Métodos de determinação de cobre em cachaça.....	9
1.1.3 Espectrometria de absorção atômica (AAS).....	12
1.1.3.1 Fundamentos	12
1.1.3.2 Instrumentação.....	12
1.1.4 Validação de métodos de ensaio.....	14
1.1.4.1 Relevância.....	14
1.1.4.2 Parâmetros de validação.....	14
1.1.4.2.1 Seletividade.....	15
1.1.4.2.2 Linearidade	16
1.1.4.2.3 Faixa de trabalho e faixa linear	17
1.1.4.2.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	17
1.1.4.2.5 Veracidade / tendência.....	18
1.1.4.2.6 Precisão.....	18
1.1.4.2.7 Robustez	19
1.1.4.3 Conduta no procedimento da validação	19
1.2 OBJETIVOS	24
1.3 PARTE EXPERIMENTAL	25
1.3.1 Reagentes.....	25

1.3.2	Condições de operação e configuração do espectrômetro.....	25
1.3.3	Método proposto.....	26
1.3.4	Delineamento experimental para validação.....	27
1.3.5	Ensaio de validação.....	28
1.3.5.1	Estudo do efeito de matriz e da linearidade	28
1.3.5.1.1	Preparo das curvas de calibração	29
1.3.5.2	Estudo de outros parâmetros de validação	29
1.3.5.2.1	Estudo de interferência	30
1.3.5.2.2	Limites e faixas.....	31
1.3.5.2.3	Estudo da precisão	31
1.3.5.2.4	Estudo da veracidade	31
1.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
1.4.1	Efeito de matriz	32
1.4.2	Linearidade	36
1.4.3	Seletividade	39
1.4.3.1	Efeito devido ao envelhecimento da cachaça.....	39
1.4.3.2	Efeito da variação do grau alcoólico.....	40
1.4.3.3	Efeito devido à presença de sacarose	42
1.4.4	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	43
1.4.5	Faixa de trabalho e faixa linear	44
1.4.6	Precisão.....	45
1.4.7	Veracidade	46
1.4.8	Robustez	48
1.5	CONCLUSÕES.....	49
	CAPÍTULO 2.....	51
2.1	INTRODUÇÃO	52
2.1.1	Métodos de remoção de cobre em cachaça	52
2.1.2	Bagaço de cana-de-açúcar como material de remoção de contaminantes inorgânicos	55

2.1.3	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	56
2.1.3.1	Fundamentos	56
2.1.3.2	Instrumentação	58
2.2	OBJETIVOS	61
2.3	PARTE EXPERIMENTAL	62
2.3.1	Materiais utilizados	62
2.3.1.1	Equipamentos	62
2.3.1.2	Reagentes	62
2.3.2	Sistema utilizado para remoção de íons cobre nas amostras de cachaça.....	62
2.3.3	Aquisição e preparo do bagaço de cana.....	63
2.3.4	Estudo da eficiência do bagaço de cana	64
2.3.5	Amostras	65
2.3.6	Qualidade da cachaça após o tratamento com bagaço de cana.....	65
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
2.4.1	Avaliação do tratamento dado ao bagaço de cana-de-açúcar	67
2.4.2	Remoção de cobre das amostras de cachaça	70
2.4.3	Alterações na qualidade da cachaça após remoção do cobre	70
2.5	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1. Principais países importadores de cachaça em termos de volume no ano de 2011. ^[11]	4
Figura 1-2. Proposta de mecanismo de formação do carbamato de etila, tendo o CN ⁻ como precursor, baseada na auto-oxidação de compostos insaturados presentes em bebidas alcoólicas, catalisada pela radiação UV. ^[13]	7
Figura 1-3. Representação esquemática de um instrumento para FAAS de feixe duplo. ^[28]	13
Figura 1-4. Delineamento dos experimentos para validação de métodos quantitativos, incluindo formas de validação e abrangência em termos de parâmetros de desempenho avaliados. ^[34]	20
Figura 1-5. Conduta do procedimento de validação sugerido pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (Parte I). ^[35]	22
Figura 1-6. Conduta do procedimento de validação sugerido pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA(Parte II). ^[35]	23
Figura 1-7. Curvas de calibração em diferentes matrizes.....	32
Figura 1-8. Curvas de calibração construídas em soluções alcoólicas de 34, 36, 38, 40, 42, 44 e 46% (v/v).	35
Figura 1-9. Resultados obtidos nos ensaios realizados em soluções padrão contendo cobre a 2,0 mg L ⁻¹ , preparadas em meios com diferentes graus alcoólicos (32, 40, 48% (v/v)).	41
Figura 1-10. Influência da sacarose na determinação de cobre.....	42
Figura 2-1. Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas. ^[28]	57
Figura 2-2. Esquema de um instrumento GC-MS. O eluente do GC passa para a entrada do espectrômetro de massas, no qual as moléculas de gás presentes são fragmentadas, ionizadas, analisadas e detectadas. ^[28]	58
Figura 2-3. Fotografia do sistema utilizado para remoção de íons cobre de amostras de cachaça.....	63
Figura 2-4. Monitoramento da concentração de cobre em solução alcoólica ao filtrá-la em 1,0 g de bagaço de cana tratado. A concentração de cobre na solução alcoólica antes de ser filtrada era de 10 mg L ⁻¹	67

Figura 2-5. Monitoramento da concentração de cobre em solução alcoólica ao filtrá-la em 0,5 g, 1,0 g, e 1,5 g de bagaço de cana tratado com HCl a 1,0 mol L ⁻¹ . A concentração inicial de cobre na solução alcoólica foi de 10 mg L ⁻¹	68
Figura 2-6. Monitoramento da concentração de cobre em solução alcoólica ao filtrá-la em 0,5 g, 1,0 g, e 1,5 g de bagaço de cana tratado com HCl 0,10 mol L ⁻¹ . A concentração inicial de íons cobre na solução alcoólica antes de ser filtrada era de 10 mg L ⁻¹	69
Figura 2-7. Cromatogramas obtidos por CG-MS para a amostra 1R: (a) sem tratamento e (b) após tratamento com bagaço de cana.	72
Figura 2-9. Quantidade relativa das substâncias na amostra 1R antes de ser tratada e após tratamento com bagaço de cana-de-açúcar.....	74
Figura 2-10. Quantidade relativa das substâncias na amostra 2R antes de ser tratada e após tratamento com bagaço de cana-de-açúcar.....	75
Figura 2-11. Quantidade relativa das substâncias na amostra 3R antes de ser tratada após tratamento com bagaço de cana-de-açúcar.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1. Composição química e requisitos de qualidade da aguardente de cana-de-açúcar e cachaça estabelecidos pela legislação brasileira. ^[5]	8
Tabela 1-2. Limites máximos de contaminantes orgânicos e inorgânicos estabelecidos pela legislação brasileira na aguardente e cachaça de cana de açúcar. ^[5]	9
Tabela 1-3. Seleção dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio. ^[32]	15
Tabela 1-4. Condições em que os parâmetros de operação do instrumento foram configurados	25
Tabela 1-5. Valores do coeficiente angular, número de replicatas, S_{xx} e s_{res} , para as diferentes curvas de calibração.....	33
Tabela 1-6. Valores de F e t obtidos na comparação entre a curva preparada em solução alcoólica 40% (v/v) e as curvas preparadas nas outras matrizes.....	34
Tabela 1-7. Valores de $t_{cal.}$ e $t_{crítico}$ encontrados ao avaliar o efeito de matriz de cada curva de calibração com a curva de calibração construída em solução alcoólica 40% (v/v).....	36
Tabela 1-8. Resultados estatísticos da avaliação das premissas do MMQO: valores de Req , d , tL e F calculados e limites aceitos para cada valor.....	38
Tabela 1-9. Resultados dos ensaios de adição e recuperação realizados em amostras fortificadas com cobre a $2,4 \text{ mg L}^{-1}$	39
Tabela 1-10. Valores de F e t obtidos nos ensaios de adições e recuperação realizados para a amostra 1V em comparação com as amostras 3V e 4V.....	40
Tabela 1-11. Valores de F e t obtidos na comparação entre os ensaios realizados em soluções padrão preparadas em grau alcoólico 32 e 48% (v/v) e a solução padrão a 40% (v/v).	41
Tabela 1-12. Valores de F e t obtidos na comparação entre os resultados obtidos em ensaios realizados em soluções padrão adicionadas de sacarose em 3 e 6 g L^{-1} e solução padrão de cobre sem adição de sacarose.	43
Tabela 1-13. Dados de absorvância obtidos nos ensaios realizados com 15 brancos independentes.	43
Tabela 1-14. LD e LQ determinados para o método.	44
Tabela 1-15 Concentrações das amostras 2V, 3V e 4V, determinadas em condições específicas para avaliar a precisão do método proposto.....	45
Tabela 1-16. Valores calculados e críticos de CV e S_{pi}	46

Tabela 1-17. Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação para uma amostra cachaça (amostra 1V) fortificada com cobre em diversos níveis de concentração.	46
Tabela 1-18. Resultados do programa de ensaio de proficiência em análises de bebidas (cachaça e vinho).....	47
Tabela 2-1. Concentração de cobre nas amostras de cachaça 1R, 2R e 3R antes e após o tratamento com bagaço de cana-de-açúcar. A, B e C representam triplicatas para cada amostra.	70
Tabela 2-2. Resultados obtidos para determinação do pH das amostras 1R, 2R e 3R antes e após o tratamento com bagaço de cana. A, B e C representam triplicatas para cada amostra.	71
Tabela 2-3. Algumas substâncias tipicamente encontradas em amostras de cachaças e identificadas nos cromatogramas da Figura 2-8.....	73

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURA

AAS - Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês, *Atomic Absorption Spectrometry*.

ABNT NBR ISO/IEC 17025 - Associação Brasileira de Normas Técnicas, Norma Brasileira ISO/IEC 17025.

ABS - Absorvância.

ACM - Método da curva de calibração, do inglês, *Arch Calibration Method*.

ANOVA - Análise de Variância.

C - Concentração.

CG - Cromatografia Gasosa.

GC-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas, do inglês, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*.

CV - Coeficiente de Variação;

d - Parâmetro do Teste de *Durbin-Watson*.

EUA - Estados Unidos da América.

F - Teste *F*.

FAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*.

FDA - Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos, do inglês, *U. S. Food and Drug Administration*.

GF-AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, do inglês, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*.

FS-AAS - Espectrometria de Absorção Atômica Sequencial Rápida, do inglês, *Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometry*.

HG-AAS – Espectrometria de absorção atômica com gerador de hidreto, do inglês, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy*

IAL – Instituto Adolfo Lutz.

ICP-MS - Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado, do Inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*.

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do Inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*.

IE - Ionização por Impacto Eletrônico.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

J_{ei} - Resíduos Padronizados *Jackknife*.
LAFQ - Laboratório de Análise Físico-química em Alimentos.
LD - Limite de Detecção.
LQ - Limite de Quantificação.
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MMQG - Método dos Mínimos Quadrados Generalizados.
MMQO - Método dos Mínimos Quadrados Ordinários.
MMQP - Método dos Mínimos Quadrados Ponderados.
MRC - Material de Referência Certificado.
MS - Espectrometria de Massas, do inglês, *Mass Spectrometry*.
m/z - Razão massa/carga.
OES - Espectroscopia de Emissão Ótica, do inglês, *Optical Emission Spectrometry*.
 R^2 - Coeficiente de Correlação ao Quadrado.
 R_{eq} - Parâmetro do Teste de *Ryan-Joiner*.
SAM - Método de Adição de Padrão, do inglês, *Standard Addition Methodology*.
 S_{pi} - Desvio Padrão Intermediário.
 s_{res} - Desvio Padrão dos Resíduos.
 t - t de *Student*.
 t_L - t de *Student* Calculado Especificamente para o Efeito de Matriz.
TFM - Tubo Fotomultiplicador
UV - Ultravioleta.
UV-VIS - Ultravioleta-visível.
 Z score - Índice z .

CAPITULO I

*Desenvolvimento e validação de um método para
determinação de cobre em cachaça.*

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Cachaça no Brasil

1.1.1.1 Histórico

A cachaça, bebida feita da fermentação e destilação do melão proveniente da cana-de-açúcar foi descoberta pelos escravos dos engenhos de açúcar em meados do século XVI. Era considerada uma bebida de baixo *status* perante a sociedade, pois era consumida apenas por escravos e brancos pobres, enquanto que a elite brasileira da época preferia vinhos e a bagaceira (aguardente de bagaço de uva), trazidos de Portugal.^[1] Nessa época, o consumo de cachaça pela população cresceu consideravelmente, pois era mais abundante e de menor custo quando comparada às bebidas portuguesas. A alta demanda levou muitos engenhos a valorizar mais a produção de cachaça do que do açúcar, fato que levou o Conselho da Coroa Portuguesa em 13 de setembro de 1649 proibir a fabricação da bebida em toda a Colônia. Esse ato da Coroa Portuguesa mostrou-se, no entanto, ineficaz, uma vez que uma produção oculta continuou se desenvolvendo, favorecendo a clandestinidade e o contrabando da bebida. Em face disso, e sob forte pressão da Colônia, o Rei D. Afonso VI suprimiu a proibição em 1661.^[2]

Logo vieram as taxas e impostos sobre a produção e comercialização da cachaça. Em 1756, impostos contribuíram para a reconstrução de Lisboa, abatida por um grande terremoto. A bebida transformou-se em verdadeiro símbolo dos ideais de liberdade junto aos Inconfidentes e outros movimentos revolucionários. No tempo da migração da Corte para o Rio de Janeiro, em 1808, a cachaça já era considerada um dos principais produtos da economia e era moeda corrente para a compra de escravos na África. Além disso, era também usada como alimento complementar na trágica dieta das travessias do Atlântico.^[2]

Durante o século XIX, quando o produto nacional começou a ganhar força entre todas as classes sociais, momento em que surgia a economia cafeeira, abolição da escravatura e início da República, um largo preconceito se criou frente a tudo que fosse brasileiro, prevalecendo à moda da Europa. Nesse momento, alguns setores da elite e da

classe média iniciaram um movimento de preconceito contra a cachaça, uma vez que eles buscavam uma identidade mais próxima da europeia.^[1, 3]

Somente durante a Semana de Arte de 1922, quando se buscou as raízes brasileiras, é que a cachaça voltou a ser considerada um símbolo da cultura nacional. E, desde então, é considerada a mais brasileira das bebidas e famosa em todo o mundo.^[1]

No contexto histórico a cachaça ganhou diversos nomes: cachaça, aguardente, pinga, jeribita, caninha, etc. Atualmente, a cachaça é um produto exclusivamente brasileiro e de acordo com o Decreto nº 6871 de 2009^[4] e a Instrução Normativa nº 13 de 20 de junho de 2005,^[5] foi definida como sendo a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38 a 48 % (v/v) à 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expressos em sacarose.^[6] A aguardente de cana, por sua vez, é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% (v/v) à 20°C, obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g/L, expressos em sacarose.^[5]

1.1.1.2 Importância econômica e social

O Brasil destaca-se na produção de aguardente de cana-de-açúcar, sendo a segunda bebida alcoólica mais consumida no país e a terceira bebida mais consumida no mundo.^[1, 6]

A produção anual de aguardente de cana no Brasil é estimada em 1,3 bilhões de litros, com mais de 5 mil marcas registradas e cerca de 30 mil produtores em todo país.^[6, 7] Minas Gerais é o quinto produtor nacional de aguardente industrial, porém o estado se destaca na produção por pequenos e médios produtores, que utilizam alambiques de cobre, com um total anual de 120 milhões de litros, gerando cerca de 120 mil empregos diretos e três vezes mais empregos indiretos nos setores que gravitam em torno dela durante a entressafra agrícola. A produção da genuína cachaça artesanal mineira acumula ao longo do seu ciclo produtivo uma receita anual de R\$1,4 bilhão.^[6]

O grande desafio dos produtores de cachaça brasileiros tem sido agregar valor ao produto, obter reconhecimento internacional como produto brasileiro e aumentar as exportações.^[6, 8, 9] Apesar da alta produção de cachaça no Brasil e dos mais de 60 países importadores, a exportação ainda é baixa, representando aproximadamente 1% de toda

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

produção. Entre as causas que têm impedido o Brasil de atingir níveis maiores de exportação está a variação de qualidade dos produtos e a dificuldade de adequação aos limites máximos estabelecidos pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para alguns componentes presentes na cachaça, como por exemplo, o cobre ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) e o carbamato de etila ($0,15 \text{ mg L}^{-1}$). Em determinados países o teor máximo permitido para o cobre nos destilados alcoólicos é de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, o que dificulta ainda mais a exportação da bebida.^[8, 10]

A Figura 1-1 apresenta uma distribuição dos principais países importadores de cachaça, em termos de volume, no ano de 2011.

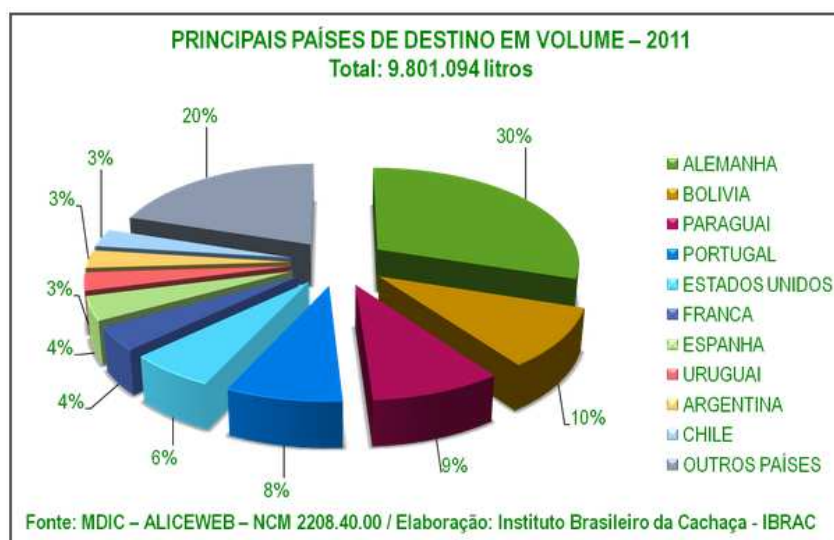


Figura 1-1. Principais países importadores de cachaça em termos de volume no ano de 2011.^[11]

Como pode ser observado, entre os principais mercados de destino estão Alemanha, Bolívia, Paraguai e Portugal. A cachaça foi exportada em 2011 para mais de 60 países, por meio de pouco mais de 90 empresas, que exportaram um total de 9,80 milhões de litros. A receita gerada foi de US\$ 17,28 milhões.^[11]

1.1.1.3 Qualidade da cachaça

A cachaça é constituída majoritariamente por etanol e água, e também por compostos secundários tais como alcoóis superiores, ácidos, ésteres, acetais, fenóis, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados, sulfurados e açúcares, entre outros, que a caracterizam e a qualificam. A cachaça é muito apreciada por seu sabor e aroma característicos, que são decorrentes dos processos de fermentação, destilação e

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

envelhecimento em tonéis de madeira. Pode ser caracterizada como cachaça envelhecida a bebida que contiver no mínimo 50% de aguardente de cana envelhecida em barris de madeira, por um período não inferior a 1 ano, podendo ser adicionada de caramelo para a correção da cor.^[9]

A aguardente produzida em alambiques de cobre apresenta melhor qualidade sensorial por reduzir a acidez e os níveis de aldeídos e compostos sulfurosos, os quais conferem à bebida, sabor e odor desagradáveis quando comparada à produzida em alambiques confeccionados com outros materiais, como aço inox, alumínio e porcelana. Além disso, o cobre em baixas concentrações é fundamental para o organismo, pois participa do funcionamento de vários sistemas enzimáticos importantes no organismo humano.^[12]

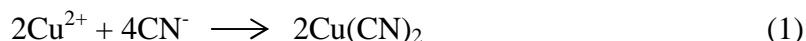
Por outro lado, o cobre pode contaminar o produto quando o manejo da produção for inadequado. A presença de elevadas concentrações de cobre na aguardente a torna prejudicial à saúde humana,^[6] pois, o cobre é tóxico quando em altas concentrações no organismo.

Em particular, o carbamato de etila (fórmula molecular $H_2NCOOC_2H_5$), ou éster etílico do ácido carbâmico, é outra substância presente na cachaça que tem sido alvo de vários estudos. Essa substância ocorre naturalmente em produtos alimentícios fermentados, tais como pão, queijo, iogurte e bebidas alcoólicas, em níveis de microgramas por litro (ppm). As bebidas alcoólicas, principalmente destilados como uísque, conhaque, grapa e cachaça, apresentam os maiores níveis de carbamato de etila, podendo chegar a concentrações tão altas quanto a algumas centenas de microgramas por litro.^[13]

Como o carbamato de etila tem sido reportado como uma substância potencialmente carcinogênica, o Canadá, em 1985, por meio do “Health and Welfare Department”, foi o primeiro país a estabelecer limites para sua quantidade em alimentos. Estabeleceram-se os seguintes teores máximos de carbamato de etila para bebidas alcoólicas: vinhos $0,030 \text{ mg L}^{-1}$; vinhos fortificados $0,100 \text{ mg L}^{-1}$; bebidas destiladas $0,150 \text{ mg L}^{-1}$; destilados de frutas e licores $0,400 \text{ mg L}^{-1}$. A comparação entre os teores de carbamato de etila em bebidas alcoólicas brasileiras com os limites estabelecidos pelo Canadá é inevitável, em função de este ser, até o momento, o único país a possuir legislação específica sobre o assunto, sendo um referencial para os EUA (Estados Unidos) e para a Comunidade Europeia. Em março de 1990, o FDA (“U. S. Food and Drug Administration”) publicou nota na qual os produtores de uísques

americanos se comprometeram, a partir daquela data, a limitar o teor de carbamato de etila em 0,125 mg L⁻¹. Em vista das normas vigentes nesses países e de outras que muito provavelmente serão estabelecidas, a indústria alimentícia de bebidas alcoólicas têm reservado bastante atenção no intuito de manter os níveis de carbamato de etila o mais baixo possível nos seus produtos.^[10, 13]

Os estudos sobre a formação do carbamato de etila em alimentos começaram no início dos anos 1970.^[14] Atualmente sabe-se que essa substância pode ter origem em vários precursores e diferentes mecanismos, considerando a natureza do alimento ou bebida. O íon cianeto (CN⁻) tem sido indicado como o mais importante precursor do carbamato de etila em bebidas alcoólicas destiladas. Essa espécie é formada pela ação enzimática e clivagem térmica de glicosídeos cianogênicos tais como epiheterodendrina na cevada e amigdalina em frutas com sementes. A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*), que é a matéria prima da cachaça brasileira, é classificada como cianogênica, no entanto sua fonte de CN⁻ é ainda desconhecida. Duas prováveis rotas químicas têm sido propostas para a formação do carbamato de etila, tendo o CN⁻ como precursor.^[13] A primeira delas está baseada na complexação do Cu(II) seguida de sua oxidação pelo cianogênio (C₂N₂), com subsequente desproporcionamento a cianato (NCO⁻) e CN⁻. O cianato pode então reagir com o etanol para formar o carbamato de etila, como mostrado pelas seguintes equações:



Em estudos envolvendo amostras de “raspas” de depósitos das paredes de alambiques de cobre usados na produção de uísques, Cook e colaboradores^[15] encontraram diferentes espécies de complexos de cobre(I)-cianeto [CuCN, Cu(CN)₂⁻, Cu₂(CN)₃, Cu₂(CN)₃⁻ e Cu₃(CN)₄⁻], suportando a ideia de que a formação de carbamato de etila tem início durante o processo de destilação. O método analítico utilizado nesses estudos foi a espectrometria de massas. Entretanto, nenhum estudo foi realizado para a determinação dessas espécies diretamente no destilado, o que seria um forte indício de que a formação do carbamato de etila segue esse mecanismo também na bebida.

A segunda rota química proposta para a formação do carbamato de etila, tendo o CN⁻ como precursor, está baseada na auto-oxidação de compostos insaturados presentes em bebidas alcoólicas, catalisada pela radiação UV (ultravioleta).^[13] Como mostrado na

Figura 1-2, essa reação de auto-oxidação proporciona a formação de radicais livres (orgânicos e hidroperóxidos), que catalisam a oxidação do cianeto (CN⁻) a cianato (NCO⁻). O cianato formado pode então reagir com o etanol para formar o carbamato de etila.

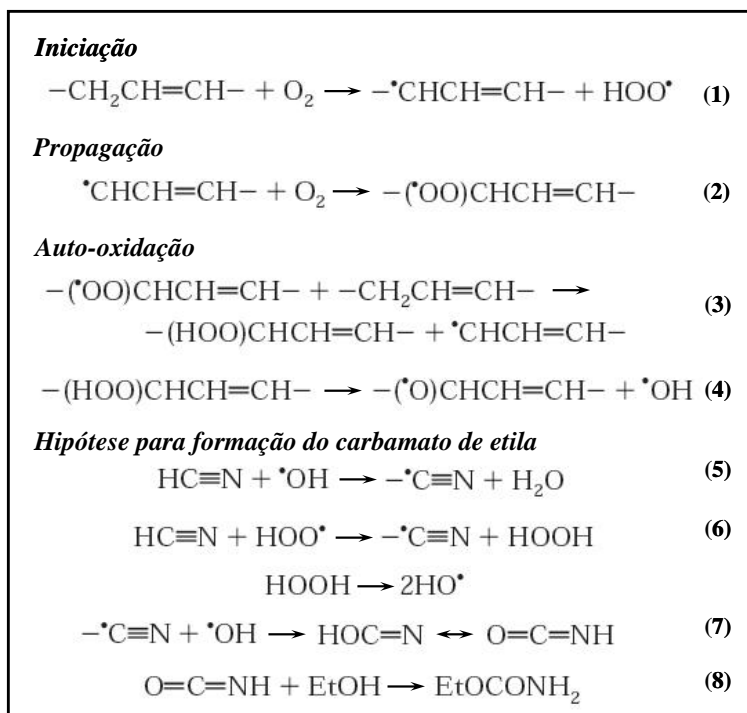


Figura 1-2. Proposta de mecanismo de formação do carbamato de etila, tendo o CN⁻ como precursor, baseada na auto-oxidação de compostos insaturados presentes em bebidas alcoólicas, catalisada pela radiação UV.^[13]

Vários fatores podem influenciar a formação de carbamato de etila a partir do CN⁻, entre eles, destacam-se o pH, luz, concentração de etanol, temperatura e concentração de íons Cu²⁺.^[13] Alguns autores já propuseram outras rotas de formação do carbamato de etila, sem envolver o íon CN⁻. A reação de proteínas com o etanol catalisada por Cu²⁺ é um exemplo.^[16] No entanto, tentativas de reproduzir esta rota gerou resultados não conclusivos. Alguns estudos têm demonstrado que praticamente todo o carbamato de etila presente em bebidas alcoólicas destiladas é formado nas primeiras 24 a 48 horas após a destilação.^[17, 18] A elucidação dos mecanismos e fatores que influenciam a formação do carbamato de etila ainda requer vários estudos, sobretudo no que diz respeito à cachaça, uma vez que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura fazem referência apenas a amostras de uísques.^[15, 18]

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Além do cobre e do carbamato de etila estão presentes, como contaminantes, outras substâncias, as quais afetam a qualidade da cachaça tornando-a um produto de menor valor e menos atraente no mercado brasileiro e internacional.

Sendo um produto de importância sócio-econômica, torna-se necessário assegurar a qualidade da aguardente de cana-de-açúcar. Atualmente, a legislação brasileira, por meio da Instrução Normativa nº13 de 30 de junho de 2005 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), estabelece a composição química, os requisitos de qualidade e a concentração máxima permitida de contaminantes dessa bebida (Tabelas 1-1 e 1-2).

Tabela 1-1. Composição química e requisitos de qualidade da aguardente de cana-de-açúcar e cachaça estabelecidos pela legislação brasileira.^[5]

Componente	Unidade	Limite	
		mínimo	Máximo
Acidez volátil em ácido acético	mg/100 mL de álcool anidro	-	150
Ésteres totais, em acetato de etila	mg/100 mL de álcool anidro	-	200
Aldeídos totais, em acetaldeído	mg/100 mL de álcool anidro	-	30
Soma de Furfural e Hidroximetilfurfural	mg/100 mL de álcool anidro	-	5
Alcoóis superiores*	mg/100 mL de álcool anidro	-	360
Coefficiente de Congêneres**	mg/100 mL de álcool anidro	200	650
Açúcares	g/L	-	30

* **Alcoois superiores:** soma dos alcoóis isobutílico (2-metil propanol), isoamílicos (2-metil -1-butanol +3 metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol), em mg /100 ml de álcool anidro.

** **Coefficiente de Congêneres:** é a soma de acidez volátil (expressa em ácido acético), aldeídos (expressos em acetaldeído), ésteres totais (expressos em acetato de etila), alcoóis superiores (expressos pela soma do álcool n-propílico, álcool isobutílico e alcoois isoamílicos) e furfural + hidroximetilfurfural.

Tabela 1-2. Limites máximos de contaminantes orgânicos e inorgânicos estabelecidos pela legislação brasileira na aguardente e cachaça de cana de açúcar.^[5]

Contaminante	Unidade	Limite máximo
Metanol	mg/100mL álcool anidrido	20
Carbamato de etila	µg/L da bebida	150
Acroleína (2-propenal)	mg/100mL álcool anidrido	5
Álcool sec-butílico (2-butanol)	mg/100mL álcool anidrido	10
Álcool n-butílico (1-butanol)	mg/100mL álcool anidrido	3
Cobre	mg/L da bebida	5
Chumbo	µg/L da bebida	200
Arsênio	µg/L da bebida	100

Esses componentes e seus respectivos limites tem a finalidade de moderar a influência de cada um desses componentes na proteção à saúde pública e na qualidade da bebida, não significando, entretanto, que a cachaça que ali se enquadre possa ser considerada um produto de qualidade sensorial superior.^[19]

1.1.2 Métodos de determinação de cobre em cachaça

Uma vez apresentadas algumas considerações acerca da presença de íons cobre na aguardente de cana-de-açúcar, principalmente no que envolve seu papel na qualidade sensorial da cachaça artesanal, na rota química de formação do carbamato de etila e, principalmente, os limites máximos de concentração assegurados pelo MAPA para garantia de qualidade da bebida consumida no Brasil ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) e para exportação ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$), fica evidente que é fundamental o desenvolvimento de métodos simples e rápidos para a determinação dessa espécie na referida matriz.

Vários métodos tem sido propostos, utilizando diferentes técnicas, para a determinação de íons cobre em amostras de cachaça.^[20, 21] As técnicas espectrométricas de absorção e emissão atômica são as mais utilizadas. O método sugerido pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*),^[20] por exemplo, utiliza a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), com os padrões analíticos para construção da curva de calibração (0,0 a 0,96 ppm) preparados em solução alcoólica a 50% (v/v) e leitura direta de amostras sem ajuste de graduação alcoólica. Entretanto, HONORATO e colaboradores,^[22] em trabalho que também utiliza FAAS, realizaram um estudo de

validação que indicou um efeito de matriz considerável em análises de cobre em cachaça utilizando o método da curva de calibração (ACM). Dessa maneira, sugerem que esse tipo de análise seja realizada utilizando o método de adição de padrões (SAM), uma vez que no caso do ACM, devido ao efeito de matriz, o grau alcoólico de cada amostra deve ser determinado antes da análise e os padrões analíticos preparados em soluções de mesmo grau alcoólico. O principal motivo pelo qual a graduação alcoólica interfere na medida está relacionado com tensão superficial da solução. Quanto maior for a graduação alcoólica, menor será a tensão superficial da solução e maior será a eficiência de nebulização.

O Instituto Adolfo Lutz também propõe, em seu guia de métodos físico-químicos para análise de alimentos, o método de adição de padrão para determinar cobre em aguardente de cana-de-açúcar.^[21] No procedimento proposto, adiciona-se 10 mL da amostra em quatro balões volumétricos de 50 mL. Em seguida, são adicionadas alíquotas de 2, 5, e 10 mL de uma solução padrão contendo $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre em três dos balões, sendo que um dos balões é mantido somente com a alíquota da amostra. Após completar o volume com água, a concentração final de cobre em cada balão deve ser de 0,0; 0,2; 0,5 e $1,0 \text{ mg/L}$. O branco deve ser determinado com a solução de álcool etílico a 8% (v/v) em água. A vantagem deste método é eliminar principalmente interferências provenientes da matriz. Entretanto, pode ser considerado um procedimento trabalhoso quando utilizado em análises de rotina em laboratórios com alta demanda de amostras.

MIRANDA e colaboradores^[23] propuseram um método para determinação de cobre em aguardente de cana-de-açúcar empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica sequencial rápida (FS-AAS). Para realizar o ensaio, diluíram a amostra em uma proporção de 1:1 com HNO_3 1 mol L^{-1} e utilizaram padrões internos (Ag, Bi, Co ou Ni) para minimizar as interferências causadas pelos diferentes teores alcoólicos das amostras, evitando assim o uso do método de adição de padrões empregado por HONORATO e colaboradores.^[22] O método proposto foi validado, encontrando, quando da utilização do Ag como padrão interno, um limite de detecção de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ e coeficiente de correlação de 0,9997 para a faixa linear de $0,1\text{-}4,0 \text{ mg L}^{-1}$. A precisão e a veracidade foram avaliadas, comparando, por meio do teste t de *Student*, os resultados obtidos com o método proposto, analisando 5 amostras de cachaça, com aqueles obtidos utilizando a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

acoplado indutivamente (ICP-OES) em um nível de confiança de 95%, os quais mostraram-se estatisticamente iguais.

A técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS) foi utilizada por CALDAS e colaboradores^[24] para determinação simultânea de As, Cu e Pb em aguardente de cana-de-açúcar, sem prévia digestão da amostra. No procedimento utilizaram-se Bi e Sb como padrões internos para minimizar o efeito de matriz, corrigir erros sistemáticos e eliminar influências geradas por flutuações de ajustes do instrumento. Pd(NO₃)₂ e Mg(NO₃)₂ foram empregados como modificadores químicos. O método proposto foi validado, sendo que os resultados obtidos mostraram coeficiente de correlação de 0,999 para a faixa de 100-1000 µg L⁻¹ de cobre, limite de detecção de 22 µg L⁻¹, recuperação variando de 97% a 108% e coeficiente de variação de 1,8% para amostra contendo 500 µg L⁻¹. Os resultados obtidos para determinação direta de As, Cu e Pb em 10 amostras de cachaça comercial foram comparados com aqueles obtidos por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), em nível de confiança de 95% pelo teste t de *Student*, mostrando-se estatisticamente iguais.

ROCHA e colaboradores^[25] propuseram um método que emprega a técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-vis para determinação de cobre em aguardente de cana-de-açúcar. O composto biquinolina foi utilizado para formação de um complexo cromóforo com o cobre, o qual foi monitorado no comprimento de onda de 545 nm. As análises foram realizadas em um meio contendo solução alcoólica a 87% (v/v), cloreto de amônio a 0,08% m/v, biquinolina em uma concentração de 6,4 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, triton x-100 (0,08%, m/v) e solução tampão de acetato 1,0 mol L⁻¹ (pH 4,8). Foi observado que a reação para formar o complexo é instantânea e apresenta alta seletividade em presença de outros metais. Obtiveram uma faixa linear de 1-17,0 mg L⁻¹ e coeficiente de correlação linear de 0,9999 para a curva de calibração. Este método não requer pré-concentração no preparo de amostra, permitindo direta quantificação de cobre.

Técnicas eletroanalíticas também já foram utilizadas para determinação de íons cobre em amostras de aguardente de cana-de-açúcar. KÜCHLER E SILVA,^[26] por exemplo, desenvolveram um método potenciométrico para tal aplicação, utilizando um eletrodo íon-seletivo para íons cobre construído em laboratório utilizando membranas de sulfeto de cobre. O método proposto foi validado, sendo que os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo método de adição de padrões em FAAS. Essa

comparação mostrou que os resultados obtidos não diferem significativamente em nível de 95% de confiança.

1.1.3 Espectrometria de absorção atômica (AAS)

Entre as técnicas analíticas comumente utilizadas na determinação de metais em amostras de diferentes matrizes, as mais comuns são as espectrofotometrias de absorção atômica e de emissão óptica (AAS e OES, respectivamente) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Entre essas técnicas, a espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) ocupa lugar de destaque em razão de sua simplicidade, eficiência, especificidade e custo relativamente baixo.^[27, 28]

1.1.3.1 Fundamentos

A AAS baseia-se na absorção de ondas eletromagnéticas (energia radiante) por átomos livres que se encontram nos estados gasoso e fundamental. A diferença entre o feixe radiante incidente na amostra e o feixe emergente é relacionada com a concentração analítica da espécie de interesse através da lei de *Beer*. Dessa maneira é possível converter o sinal analítico na concentração do elemento químico analisado. Os nomes atribuídos às técnicas AAS estão relacionados com a fonte atomizadora, que pode ser a chama (FAAS), o forno de grafite (GF-AAS) ou gerador de hidreto (HG-AAS).^[29]

Em AAS, as larguras das linhas obtidas nos espectros de absorção são bastante estreitas (0,002 a 0,005 nm) e menores que as larguras de bandas efetivas da maioria dos monocromadores. Como resultado, o uso de radiação isolada de uma fonte contínua por um monocromador inevitavelmente acarreta a desvios instrumentais da lei de *Beer*. Esse problema foi contornado pelo uso de fontes de radiação (lâmpadas de cátodo oco) que emitem não somente uma linha com o mesmo comprimento de onda selecionado para a medida de absorção, mas também uma linha que é mais estreita.^[30]

1.1.3.2 Instrumentação

Atualmente, existem no mercado instrumentos com várias configurações, como espectrômetro de absorção atômica de feixe único ou duplo, espectrômetro de absorção atômica com chama sequencial rápida, espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite, dentre outros. A Figura 1-3 representa um instrumento para FAAS de feixe

duplo. Nesse sistema, a radiação de uma fonte de linhas é focada no vapor atômico formado na chama. A radiação atenuada da fonte devido à absorção da espécie de interesse entra no monocromador, o qual isola a linha de interesse. Em seguida, a potência radiante da fonte, atenuada pela absorção, é medida pelo detector.

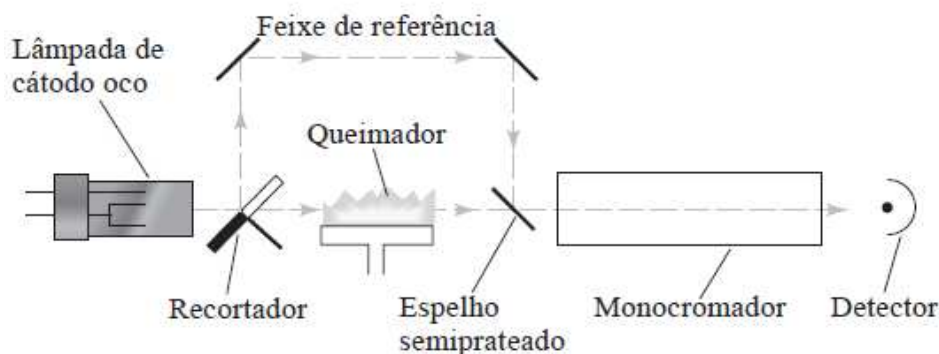


Figura 1-3. Representação esquemática de um instrumento para FAAS de feixe duplo.^[28]

A fonte de radiação representada na Figura 1-3, lâmpada de cátodo oco, consiste em um ânodo de tungstênio e de um cátodo cilíndrico selado em um tubo de vidro, contendo um gás inerte, como o argônio, a pressões de 1 a 5 torr. O cátodo é fabricado com o metal do analito ou serve de suporte para um recobrimento desse metal. Com características similares e mesma função, a lâmpada de descarga sem eletrodo também pode ser empregada no sistema.^[28]

As principais fontes de atomização para AAS são a chama e o aquecimento eletrotérmico. Quando se emprega chama como fonte de atomização, esta é gerada por uma mistura (amostra, combustível e oxidante) que chega ao queimador onde ocorre a combustão e atomização da amostra, podendo atingir temperaturas de até 4800 K cianogênio como combustível e oxigênio como oxidante.^[30] Normalmente são utilizados acetileno como combustível e ar pressurizado como oxidante, obtendo uma chama com temperatura de até 2700 K.^[30]

O monocromador, geralmente constituído de um prisma ou rede de difração, isola a linha de interesse proveniente da fonte de atomização. Após passar pelo monocromador a potência radiante da fonte, atenuada pela absorção, é medida pelo tubo detector (na maioria dos casos é um tubo fotomultiplicador, TFM). O sinal é então

processado e dirigido para um sistema computacional para fornecer os dados de saída.^[28]

1.1.4 Validação de métodos de ensaio

1.1.4.1 Relevância

A validação de métodos tornou-se um requisito essencial na prática de química analítica. Todavia, ciente da importância, e principalmente naquilo que é mais relevante, parece ser pobre em química analítica. Muitos guias de validação foram publicados e estão disponíveis na literatura, especialmente para métodos específicos, porém são pouco usados. Alguns analistas veem validação de métodos como algo que pode ser feito somente em colaboração com outros laboratórios e por esta razão não a faz.^[31] Entretanto, essa prática de validação vem aumentando, pois o credenciamento de laboratórios atualmente deve atender aos requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025: seleção de métodos de ensaio (item 5.4.2), desenvolvimento de métodos de ensaio pelo laboratório (item 5.4.3), utilização de métodos não normalizados (item 5.4.4) e validação de métodos (item 5.4.5). Diante disso, é fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam, conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas.^[32]

Para realizar a validação, alguns parâmetros devem ser avaliados, dentre os quais podem incluir, quando aplicável: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, veracidade, precisão e robustez. Além desses parâmetros, também podem ser incluídos na validação, aqueles que estão sendo adotados recentemente por alguns guias e documentos referente à validação.

1.1.4.2 Parâmetros de validação

Nesta seção estão descritos os parâmetros de validação que mais aparecem nos atuais guias e documentos referentes à validação de métodos de ensaio. Os parâmetros que necessitam ser avaliados durante o processo de validação podem variar de acordo

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

com o tipo de ensaio^[32]. A Tabela 1-3 apresenta sugestões de como selecionar os parâmetros conforme o tipo de ensaio.

Tabela 1-3. Seleção dos parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.^[32]

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do componente (ou analito) em maior teor (1)	Análise de elementos menores e Traços (2)	Propriedades Físicas
Precisão		√	√	√
Seletividade	√	√	√	√
Tendência / recuperação		√	√	√
Robustez	√	√	√	√
Sensibilidade / linearidade / faixa de trabalho		√	√	√
Limite de detecção	√		√	
Limite de quantificação			√	

- (1) Dependendo da faixa de concentração do analito pode não ser necessária a determinação dos limites de detecção e de quantificação, como por exemplo: determinação de sacarose em balas e determinação do teor de gordura em carnes, ou seja, componentes em maior teor com concentração entre 1 a 100%.
- (2) São considerados como de menor teor concentrações entre 0,01 a 1% e elementos traços, os elementos em concentração abaixo de 0,01%.

1.1.4.2.1 Seletividade

A seletividade de um método se refere à extensão até a qual ele pode distinguir analito(s) específico(s) numa mistura complexa, sem interferência dos outros componentes da mistura. Um método, que seja totalmente seletivo para um analito ou grupo de analitos, é dito como sendo específico.^[33, 31] Esse parâmetro é fundamental no processo de validação, pois ao comprovar que não há a presença de interferência no ensaio analítico é o mesmo que demonstrar que os resultados são confiáveis. E se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas.^[32]

A interferência pode ser causada por qualquer componente da matriz onde se encontra o analito, e quando está presente, pode aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Experimentos para

avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com ou sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferência.^[32]

1.1.4.2.2 Linearidade

Em metodologias analíticas, a quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito.^[32]

A linearidade é uma forma de avaliar essa dependência, pois mede o quanto um gráfico da curva de calibração segue uma linha reta.^[30] É aplicada tanto na padronização interna quanto na externa e resulta em expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.^[32] A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + bx$$

sendo:

y = resposta medida;

x = concentração;

a = interseção com o eixo y ;

b = inclinação.

O método dos mínimos quadrados ordinário (MMQO) é uma ferramenta ideal e largamente utilizada para obter a curva de calibração e a equação matemática que relaciona as duas variáveis. Porém, o ajuste de uma equação de calibração empregando esse método assume várias premissas relativas aos resíduos da regressão e ao modelo que devem ser satisfeitas: os resíduos são variáveis aleatórias com média zero e variância constante e desconhecida; os resíduos são variáveis normalmente distribuídas; os resíduos são homoscedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X_i ; os resíduos são independentes (não correlacionados) e a relação entre X_i e Y_i é linear.^[34] Dessa forma, na aplicação do MMQO, é essencial a avaliação dessas premissas.

Outros métodos de regressão usados em química analítica são o Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) e o Método dos Mínimos Quadrados Generalizados (MMQG). No caso de os resíduos forem considerados heteroscedásticos

os dados da calibração devem ser tratados pelo MMQP^[35] e quando os resíduos forem considerados dependentes o ideal é o emprego do MMQG.

1.1.4.2.3 Faixa de trabalho e faixa linear

Quando se aplica uma curva de calibração para obter resultados analíticos deve-se garantir que a faixa utilizada dentro desta curva forneça resultados confiáveis, portanto é fundamental que a linearidade, veracidade e a precisão sejam aceitáveis dentro dessa faixa. Uma das formas de assegurar a aplicação de uma faixa que contenha tais qualidades é determinar a faixa de trabalho e a faixa linear do método.

A faixa de trabalho é a faixa de concentração do analito, ou valores de propriedades, ao longo do qual o método pode ser aplicado. A faixa linear é a faixa de concentração do analito ao longo do qual o método fornece resultados de ensaio proporcionais à concentração do analito.^[34]

A faixa de trabalho é geralmente limitada no extremo inferior pelo valor do limite de quantificação, enquanto no limite superior as restrições são impostas por efeitos dependentes do sistema de detecção do equipamento, os quais podem levar a incerteza e sensibilidade para valores inaceitáveis.^[34, 35]

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade.^[32] A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho.

1.1.4.2.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Quando os métodos analíticos quantitativos emitem resultados que estão abaixo do LQ, esses resultados apresentam incerteza acima dos limites aceitáveis, portanto devem ser expressos como valores menores do que o LQ ($X_i < LQ$) e não igual ao valor literalmente encontrado. O mesmo raciocínio é feito com os métodos qualitativos e o LD.

O limite de detecção de um método é muitas vezes determinado pela análise repetida de uma porção de amostra branca, nesse procedimento, primeiro encontra-se o desvio padrão dos brancos analisados e em seguida o multiplica por três. É possível que seu valor seja diferente para diferentes tipos de amostra.^[33]

O limite de quantificação é a menor concentração de analito que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável, normalmente é o ponto mais baixo na curva de calibração. Segundo o estabelecido pelo INMETRO^[32] o LQ pode ser definido como sendo de 5, 6 ou 10 desvios-padrão da medição do branco.

1.1.4.2.5 Veracidade / tendência

A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro.^[35]

A determinação da veracidade, geralmente, deve ser feita por intermédio de ensaios de recuperação utilizando-se material de referência certificado (MRC). Caso não haja MRC disponível, a determinação da recuperação deve ser feita por intermédio de matriz branca fortificada. Na falta de uma matriz branca, fortifica-se amostras com baixa concentração do analito para realizar os ensaios de recuperação. Outra forma de se determinar a veracidade é pela participação em comparações interlaboratoriais.^[32, 35]

Na avaliação da veracidade, os valores obtidos pelo laboratório – a média, o desvio padrão amostral e a incerteza de uma série de ensaios em replicata – devem ser comparados com os valores aceitos como verdadeiros (valores obtidos dos MRC, dos programas interlaboratoriais ou pela fortificação de amostras). Para esta comparação podem ser utilizados diversos critérios de decisão, entre os quais: erro relativo, índice z (z-score), erro normalizado e recuperação.^[32]

Quando o valor obtido, ao utilizar algum critério de decisão, não estiver dentro dos limites aceitáveis, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las.^[32]

Há outra forma de interpretar a veracidade, a qual tem por objetivo corrigir o resultado da análise por meio da recuperação dos erros sistemáticos oriundos dos efeitos de extração ou digestão e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais como limpeza (clean-up), diluições ou pré-concentração, derivatizações, secagens.^[35]

1.1.4.2.6 Precisão

É a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As

três maneiras de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. Sendo que a reprodutibilidade de um procedimento analítico somente pode ser estimada mediante a participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo, raramente disponível.^[35]

O desvio padrão e o coeficiente de variação são as formas mais comuns de expressar a repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. As condições analíticas de repetitividade podem ser caracterizadas utilizando: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições no menor espaço de tempo possível.^[32] As condições analíticas de precisão intermediária podem ser caracterizadas utilizando: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos.^[32]

1.1.4.2.7 Robustez

O estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quanto sensível o resultado analítico é a variações nas condições experimentais do procedimento analítico, os chamados fatores ou tratamentos ou grandezas de influência.^[35]

A robustez não é uma grandeza física ou química, assim não se pode atribuir-lhe um valor numérico. Para avaliar a robustez, verifica-se experimentalmente se a variação de cada fator estudado tem efeito significativo sobre a qualidade metrológica do resultado analítico. Se nenhum dos fatores estudados e plausíveis de afetar o resultado da medição tiver efeito significativo, o procedimento analítico é considerado robusto.^[35]

Um procedimento robusto produz resultados mais reprodutíveis ao longo do tempo e, principalmente, apresenta maior portabilidade para outro laboratório dentro da organização, no país ou até no exterior.^[35]

1.1.4.3 Conduta no procedimento da validação

A conduta no procedimento de validação é importante quando se quer realizar a validação de um método de ensaio, pois minimiza a carga de trabalho do processo de validação. Para isso, recomenda-se que seja adotado um planejamento cuidadoso e estatisticamente consistente, que permita combinar ensaios de forma a determinar diferentes parâmetros de validação em um mesmo experimento.^[35]

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Na literatura, diversas propostas para o delineamento experimental já foram apresentadas. SOUZA,^[34] em seu trabalho de tese de doutorado, propôs a validação de métodos quantitativos, em que foram considerados parâmetros como linearidade, efeito de matriz, seletividade, exatidão, precisão e limites de detecção e de quantificação. O procedimento proposto para o delineamento experimental está esquematizado na Figura 1-4.

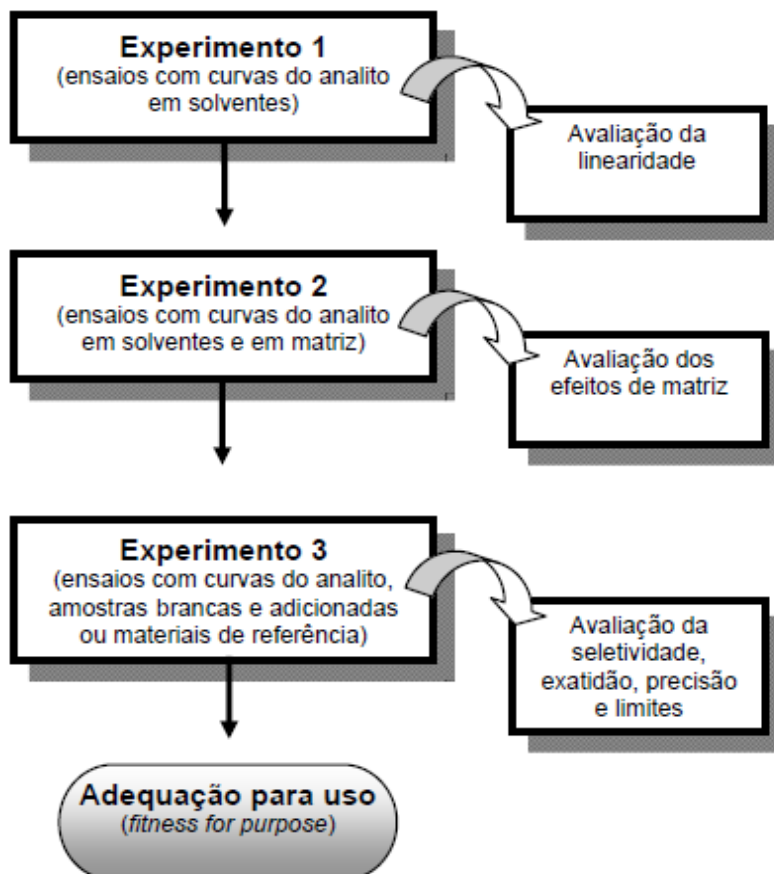


Figura 1-4. Delineamento dos experimentos para validação de métodos quantitativos, incluindo formas de validação e abrangência em termos de parâmetros de desempenho avaliados.^[34]

O processo foi dividido em três delineamentos experimentais distintos: I. Ensaio para curvas de calibração do analito em solventes e determinação da linearidade; II. Ensaio para curva de calibração do analito em solventes e do analito na matriz da amostra para verificação dos efeitos de matriz; e III. Ensaio com curvas de calibração (do analito em solventes, em matriz ou extratos sem matriz, dependendo dos resultados dos estudos de efeitos de matriz), amostras brancas e amostras adicionadas ou materiais de referência para verificação da seletividade, exatidão, precisão e limites.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

O Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA^[35] foi elaborado com o objetivo de estabelecer parâmetros e critérios de aceitação aplicáveis à validação de métodos analíticos e à rotina analítica dos laboratórios públicos e privados que pertencem ou desejam pertencer à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, credenciados ou autorizados a realizar análises para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Nesse manual, há uma proposta para a condução do processo de validação conforme as Figura 1-5 e 1-6, em que inicialmente deve-se obter uma curva de calibração aprovada nos testes de avaliação da linearidade, sensibilidade e seletividade; em seguida usa-se essa curva de calibração para obter dados para validação de outros parâmetros e, então, realiza-se o estudo da veracidade, da precisão, dos limites e da estimativa da incerteza de medição.

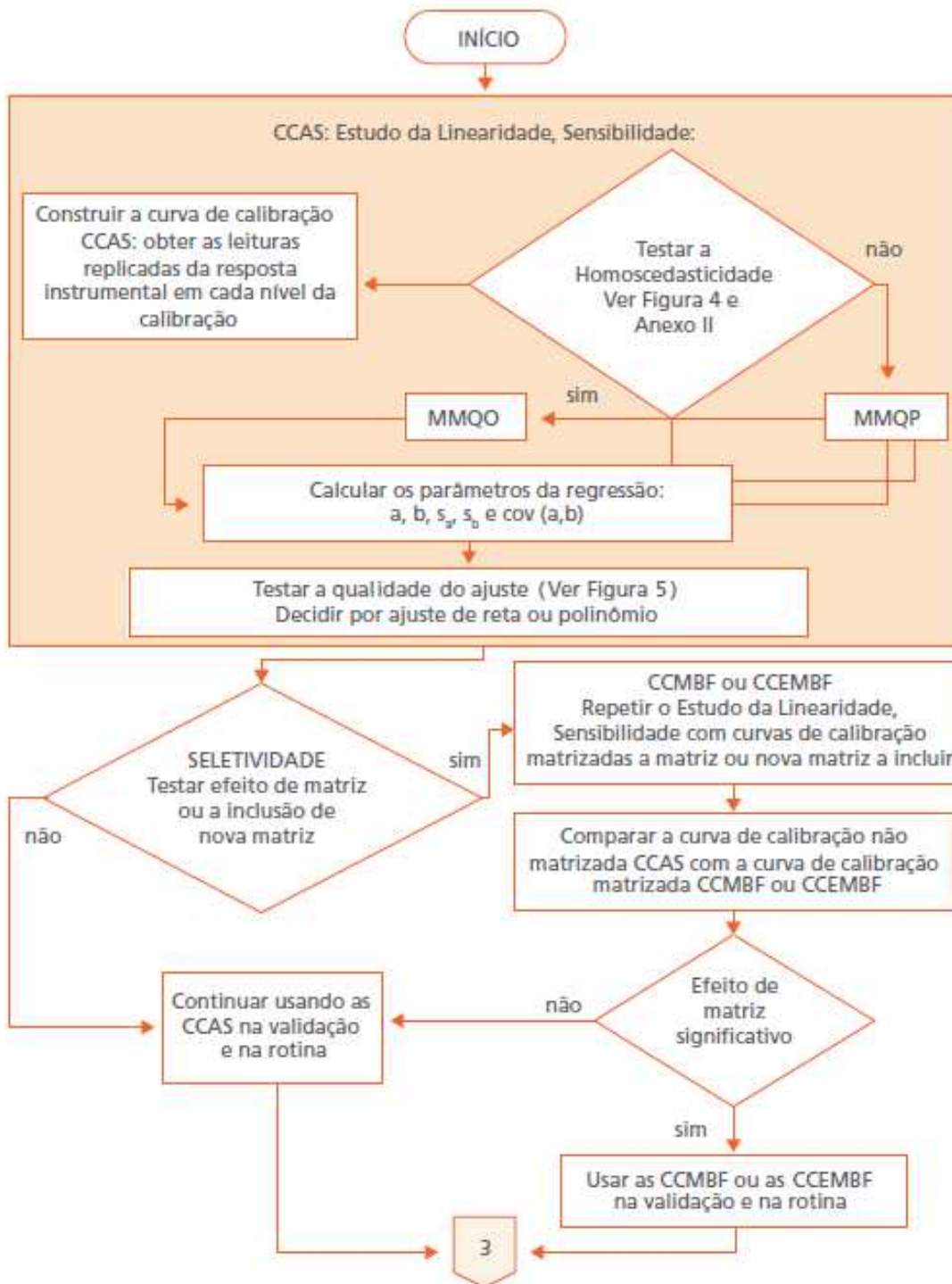


Figura 1-5. Conduta do procedimento de validação sugerido pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA (Parte I).^[35]

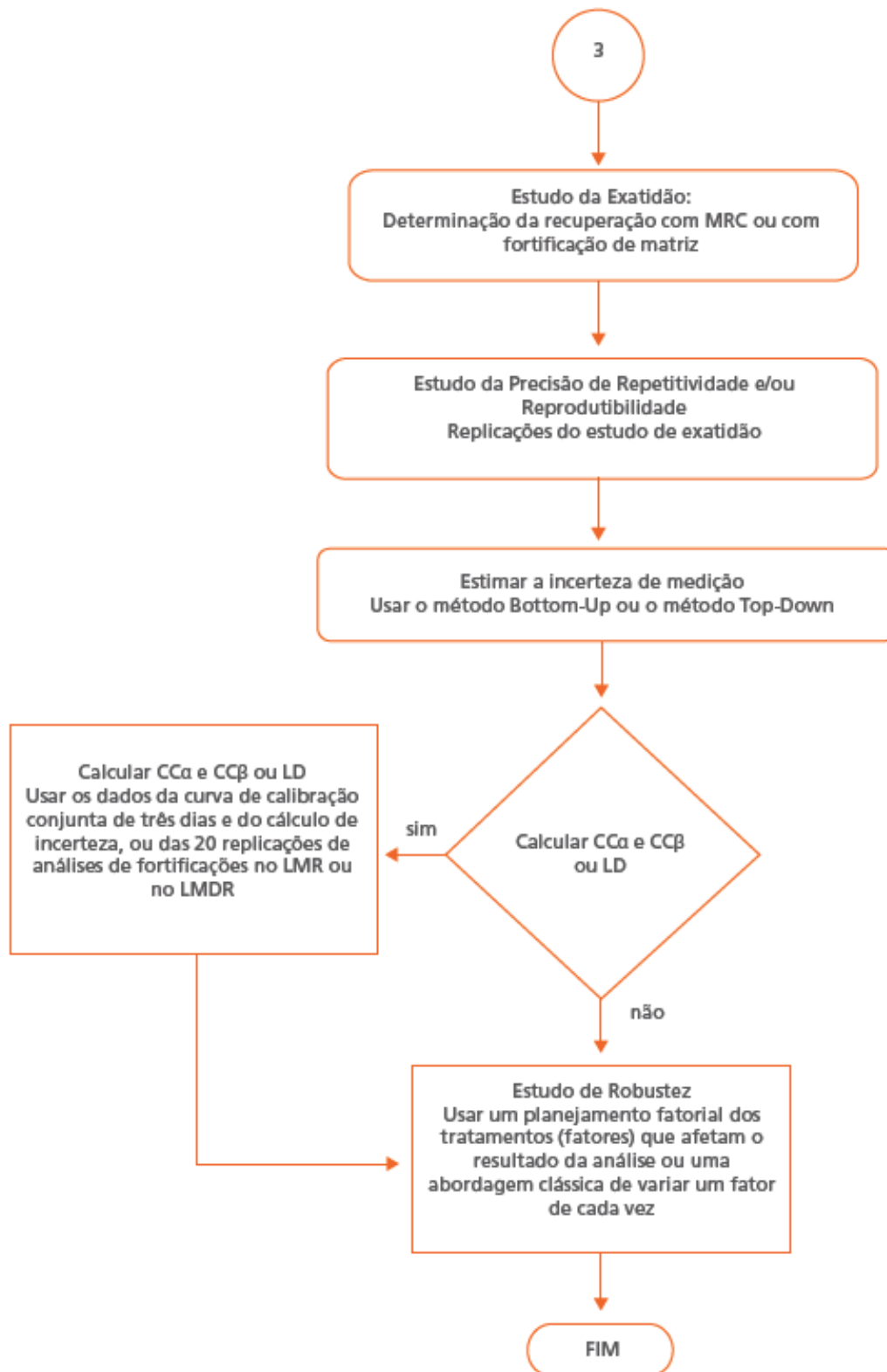


Figura 1-6. Conduta do procedimento de validação sugerido pelo Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA(Parte II).^[35]

1.2 OBJETIVOS

Propor e validar um método para determinação de cobre em cachaça por espectrometria de absorção atômica com chama.

-Realizar a validação do método focando o guia de validação do INMETRO.^[32]

-Definir o escopo do método visando os diferentes tipos de cachaça: não envelhecidas, envelhecidas, envelhecidas e adicionadas de caramelo, adicionadas de sacarose até 6 g L⁻¹ e com grau alcoólico real variado.

1.3 PARTE EXPERIMENTAL

1.3.1 Reagentes

Etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) com grau de pureza 99,5% e solução padrão de cobre(II) contendo 1000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram empregados no desenvolvimento e validação do método.

1.3.2 Condições de operação e configuração do espectrômetro

Foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com atomização em chama modelo SpectrAA 220/FS da Varian. Esse equipamento possui nebulizador de pérola de impacto, sistema óptico com duplo feixe, lâmpada de deutério para correção do *background*, lâmpada de catodo oco e sistema de determinação multielementar em série.

Tabela 1-4. Condições em que os parâmetros de operação do instrumento foram configurados

Parâmetro	Condições de operação
Elemento	Cu
Tipo de instrumento	chama
Unidade	mg L ⁻¹
Modo do Instrumento	absorvância
Modo de amostragem	manual
Modo de medição	<i>PROMT</i>
Comprimento de onda	324,8 nm
Fenda	0,5 nm
Corrente da lâmpada	10,0 mA
Correção de <i>background</i>	<i>BC ON</i>
Tempo de medição	4,0 s
Tempo de espera para medição	4,0 s
Tipo de chama	ar/acetileno
Fluxo de ar	12,60 L/min.
Fluxo de acetileno	2,00 L/min

Ensaio prévios à validação foram realizados (pré-validação), momento em que foram estudadas as condições de operação em que o equipamento de absorção atômica apresentasse melhor desempenho para determinação de cobre em cachaça. No início da operação do equipamento sempre realizou-se o alinhamento da lâmpada e do

queimador, buscando um sinal de medição mais intenso e estável possível. Além disso, cuidados com limpeza, principalmente do queimador, foram realizados quando necessário. Parâmetros que exigem monitoramento como, por exemplo, fluxo de gases, foram monitorados utilizando o *software* do equipamento. As condições específicas de operação utilizadas para medir a absorvância de cobre nas amostras foram configuradas no *software* do equipamento conforme a Tabela 1-4.

1.3.3 Método proposto

- Determina-se o grau alcoólico real em porcentagem de volume empregando método normalizado ou validado pelo laboratório (como por exemplo, o método presente na Instrução Normativa nº 24, de 8 de Setembro de 2005,^[36] este baseia-se na quantificação do grau alcoólico por meio da densidade relativa. Nesse método pode-se utilizar um densímetro digital para medir a densidade da cachaça e, então, determinar o grau alcoólico por meio da densidade e de uma curva que relaciona a densidade e o grau alcoólico).
- Medir, usando pipeta volumétrica, 20 mL da amostra e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Se a amostra apresentar quantidade de cobre acima do valor máximo da faixa de trabalho, medir a quantidade adequada da amostra de modo a focar a medição no centro da curva de calibração.
- Corrigir o teor alcoólico para 40% (v/v) adicionando álcool etílico PA ou água destilada deionizada e, então, o volume completado com solução alcoólica 40% (v/v) até o ponto desejado. A quantidade de álcool etílico ou água para fazer a correção deve ser determinada pelas equações:

Para amostra com grau alcoólico abaixo de 40% v/v adiciona-se álcool anidro em quantidade determinada pela equação abaixo.

$$V_{álcool} = V_{am} \left(\frac{40 - G}{60} \right)$$

Para amostra com grau alcoólico acima de 40% v/v adiciona-se água destilada deionizada em quantidade determinada pela equação abaixo.

$$V_{água} = V_{am} \left(\frac{G}{40} - 1 \right)$$

Sendo:

$V_{álcool}$ = volume de álcool a ser adicionado;

$V_{água}$ = volume de água a ser adicionada;

V_{am} = volume da amostra medido para o balão de 25 mL;

G = grau alcoólico real da amostra em porcentagem.

- Construir a curva de calibração com soluções padrão de cobre(II) preparadas em meio alcoólico a 40% (v/v), nas concentrações 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ utilizando um espectrômetro de absorção atômica com chama, operando no comprimento de onda de 324,8 nm. Fazer as medidas de absorvância das amostras e encontrar o resultado da concentração de cobre por meio da equação:

$$C_{Cu} = \frac{(A_{am} - a) \cdot V_b}{b \cdot V_{am}}$$

Sendo:

C_{Cu} = concentração de cobre na amostra em mg L⁻¹;

A_{am} = absorvância da amostra medida no ensaio;

a = coeficiente linear da curva de calibração;

b = coeficiente angular da curva de calibração;

V_b = volume do balão volumétrico usado no ensaio;

V_{am} = volume da amostra medido durante o ensaio.

1.3.4 Delineamento experimental para validação

Inicialmente, foram realizados estudos de pré-validação para estimar a faixa linear, presença do efeito de matriz, sensibilidade e seletividade do método.

A linearidade e o efeito de matriz foram avaliados tomando-se como referência o delineamento experimental proposto por SOUZA,^[34] o qual está em conformidade com a proposta de validação do INMETRO.^[32] Quanto à avaliação da linearidade e determinação da faixa linear, inicialmente, foram construídas curvas de calibração com seis níveis de concentrações, sendo que para cada nível, foram feitas três replicatas independentes, mais o branco como controle. Em seguida, foram realizadas a estimativa dos parâmetros de regressão pelo MMQO, o tratamento de valores extremos eliminando no máximo 22,2% dos dados e, finalmente, a avaliação das premissas de regressão. Para avaliar o efeito de matriz, preparou-se quatro curvas de calibração, duas com padrões analíticos dissolvidos em solvente (água e solução alcoólica) e outras duas nas matrizes estudadas. Avaliou-se então a linearidade e o efeito de matriz dessas curvas de calibração.

A curva de calibração aprovada e selecionada na avaliação da linearidade e do efeito de matriz foi utilizada para obter os resultados para avaliação dos outros parâmetros de validação. O número de replicatas requerido e os itens de ensaios (amostras, amostras fortificadas, padrões, etc.) utilizados para avaliar a seletividade, limites, faixas, veracidade, precisão e robustez, estão em conformidade com o guia de validação do INMETRO.^[32] Os dados desses ensaios foram tratados verificando a presença de valores extremos usando o teste de *Grubbs*^[37, 34] antes da aplicação dos testes estatísticos.

1.3.5 Ensaios de validação

Todos os experimentos relativos à validação foram realizados no Laboratório de Análise Físico-química em Alimentos do Instituto Mineiro de Agropecuária (LAFQ-IMA). As vidrarias utilizadas foram inicialmente lavadas com detergente alcalino e água destilada deionizada. Em seguida, foram deixadas de molho em solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ para lixiviar os metais remanescentes, novamente lavadas com água (destilada deionizada) e colocadas para secar. Os materiais volumétricos e micropipetas usados para realizar medições quantitativas foram selecionados somente quando possuíam certificado de calibração em vigência.

1.3.5.1 Estudo do efeito de matriz e da linearidade

Para avaliar a linearidade e o efeito de matriz foram construídas curvas de calibração em quatro matrizes diferentes: meio aquoso, solução alcoólica 40% (v/v), cachaça destilada com grau alcoólico ajustado para 40% (v/v) (cachaça destilada no laboratório para remoção do cobre, assim, tornando-se branca a matriz da cachaça) e cachaça natural com grau alcoólico ajustado para 40% (v/v) (cachaça “*in natura*”, ou seja, na forma em que foi adquirida no alambique). Todas as curvas foram construídas em seis níveis de concentração mais o branco, exceto a curva em cachaça natural que foi realizada em cinco níveis de concentração. Em cada nível de concentração e para cada curva de calibração, os ensaios foram realizados independentemente e em triplicata usando padrões intermediários distintos.

1.3.5.1.1 Preparo das curvas de calibração

As curvas de calibração em meio aquoso, cachaça destilada e solução alcoólica 40% (v/v) foram construídas, cada uma, tomando-se seis balões volumétricos de 25 mL, que representaram os padrões de concentração 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mg L⁻¹. Mediu-se, respectivamente, alíquotas de 25, 125, 250, 500, 750, 1000 µL do padrão intermediário de 100 mg L⁻¹ e, em seguida, o volume foi completado com a respectiva matriz de cada curva. Os brancos das curvas foram constituídos apenas da respectiva matriz, ou seja, sem adição de padrão. O grau alcoólico das curvas de calibração em cachaça destilada e solução alcoólica 40% (v/v) foi ajustado, após adição do padrão intermediário, adicionando 10, 50, 100, 200, 300 e 400 mL de etanol, respectivamente, para cada padrão de calibração.

A curva de calibração em cachaça natural (com grau alcoólico 40% (v/v) acertado no laboratório) foi construída utilizando o método de adição de padrão. Em quatro balões volumétricos de 25 mL, que representaram os padrões de concentração 0,4, 1,4, 2,4 e 3,4 mg L⁻¹. Mediu-se, respectivamente, alíquotas de 100, 350, 600 e 850 µL do padrão intermediário de 100 mg L⁻¹ e alíquotas de 40, 140, 240 e 340 µL de álcool anidro para ajustar o grau alcoólico em 40% (v/v). Em seguida, o volume foi completado com cachaça natural. O branco foi constituído apenas de cachaça natural e o equipamento zerado com solução alcoólica 40% (v/v).

Por fim, para estudar de maneira mais detalhada o efeito de matriz, foram construídas sete curvas de calibração em soluções alcoólicas de 34, 36, 38, 40, 42, 44 e 46% (v/v). O modo de preparo dessas curvas foi semelhante ao procedimento realizado para a curva de calibração em solução alcoólica 40% (v/v) já mencionado anteriormente.

1.3.5.2 Estudo de outros parâmetros de validação

Os ensaios para avaliar a seletividade, precisão, veracidade, robustez e determinar o LD e LQ, foram realizados com amostras de cachaça, amostras fortificadas e soluções padrão com grau alcoólico de 40% (v/v). Nesse sentido, quatro amostras foram preparadas e nomeadas como 1V, 2V, 3V, e 4V. As amostras 1V e 2V foram constituídas de uma mistura de várias cachaças (*pool*), sendo cachaças não envelhecidas e sem adição de substâncias já previstas pela legislação (caramelo ou sacarose). Essas amostras se diferenciam apenas no grau alcoólico real e na procedência das cachaças

que as compõem. As amostras 3V e 4V foram constituídas por uma mistura de cachaças envelhecidas. A amostra 3V, além de ser uma mistura de cachaças envelhecidas, também possui adição de caramelo, e a amostra 4V foi constituída pela mistura de cachaças armazenadas em tonéis de carvalho, castanheira e jequitibá. O teor alcoólico foi determinado para cada uma dessas amostras antes de realizar os ensaios para determinação de cobre, encontrando para as amostras 1V, 2V, 3V e 4V os valores de 39,56, 44,93, 39,19 e 39,93% (v/v), respectivamente.

1.3.5.2.1 Estudo de interferência

A influência do teor alcoólico nos resultados analíticos também foi avaliada em ensaios utilizando soluções padrão de cobre a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ com grau alcoólico variado (32, 40 e 48% v/v). Foram preparadas cinco soluções padrão para cada grau alcoólico. Cada uma dessas soluções conteve $500 \text{ }\mu\text{L}$ do padrão intermediário e quantidade suficiente da solução alcoólica com grau alcoólico correspondente para completar um balão volumétrico de 25 mL . Para cada replicata foram utilizados padrões intermediários distintos.

A avaliação de possíveis interferências devido a presença de sacarose foi realizada através de ensaios em soluções padrões de cobre a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ com grau alcoólico a 40% (v/v), adicionadas de sacarose nas concentrações de 0,0, 3,0 e $6,0 \text{ g L}^{-1}$. Para isso, foram preparados cinco soluções padrão para cada nível de concentração de sacarose, sendo cada uma dessas soluções compostas de $500 \text{ }\mu\text{L}$ do padrão intermediário e quantidade suficiente da solução alcoólica para completar um balão volumétrico de 25 mL .

Interferências devido à presença de certas substâncias (extraídas da madeira ou adição de caramelo) em cachaças envelhecidas também foram avaliadas. Para isso, foram realizados ensaios em amostras envelhecidas e adicionadas de caramelo, fortificando-as com $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre e corrigindo o grau alcoólico para 40% (v/v). Assim, foram preparados cinco replicatas para cada amostra (1V, 3V e 4V). Para preparar cada replicata da amostra 1V mediu-se 10 mL de amostra, $473 \text{ }\mu\text{L}$ de álcool anidro e $600 \text{ }\mu\text{L}$ do padrão intermediário, e transferidos para balão volumétrico de 25 mL , em seguida completou-se o volume com solução alcoólica 40% (v/v). Seguiu-se o mesmo procedimento da amostra 1V para preparar as amostras 3V e 4V, alterando apenas o volume da amostra para 20 mL e álcool anidro para 670 e $425 \text{ }\mu\text{L}$

respectivamente. Estes ensaios foram aproveitados para averiguar parcialmente a veracidade.

1.3.5.2.2 Limites e faixas

Para determinar o LQ e LD foram realizados quinze ensaios com brancos analíticos em soluções alcoólicas 40% (v/v) e cachaças destiladas. Para determinar a faixa linear e de trabalho, foram aproveitados os experimentos da *seção 1.3.5.1*, os quais são referentes ao estudo do efeito de matriz e linearidade.

1.3.5.2.3 Estudo da precisão

Para avaliar a precisão foram realizados ensaios nas amostras 2V, 3V e 4V. Os ensaios relativos a uma mesma amostra (seis replicatas) foram realizados por um mesmo analista em curto espaço de tempo (condições para avaliar a repetitividade). Os ensaios relativos a amostras diferentes foram realizados por analistas diferentes em dias diferentes (condições para avaliar a precisão intermediária). Todos os ensaios foram preparados medindo-se 20 mL da amostra e transferindo-a para balão volumétrico de 25 mL, em seguida, o teor alcoólico foi ajustado para 40% (v/v) em volume, adicionando-se, 270 µL na amostra 3V e 25 µL na amostra 4V, de álcool anidro em cada replicata; e 2,47 mL de água destilada deionizada em cada replicata da amostra 2V. Por fim, o volume foi completado com solução alcoólica 40% (v/v).

1.3.5.2.4 Estudo da veracidade

Para avaliar a veracidade foram realizados ensaios de adição e recuperação em quatro níveis de concentrações (0,4, 1,4, 2,4 e 3,4), fortificando-se a amostra 1V com solução padrão de cobre. Os ensaios usados nessa avaliação foram os mesmos realizados para construir a curva de adição de padrão citados na *seção 1.3.5.1.1*.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados expressos nesta seção são relativos à validação intralaboratorial e à participação em programa de ensaio de proficiência em bebidas (cachaça e vinhos), obtidos dos experimentos realizados conforme *seção 1.3*. Todos os cálculos referentes ao tratamento estatístico foram realizados adotando nível de significância de 5%, ou seja, nível de confiança de 95%.

1.4.1 Efeito de matriz

Os ensaios de pré-validação foram bastante úteis para estimar a faixa que acreditava-se ser linear para o método, a saber: 0,0 à 4,0 mg L⁻¹. Foram construídas, nessa faixa, curvas de calibração em cada uma das diferentes matrizes (solução aquosa, solução alcoólica 40% (v/v), cachaça destilada e cachaça natural), essas curvas encontram-se na Figura 1-7.

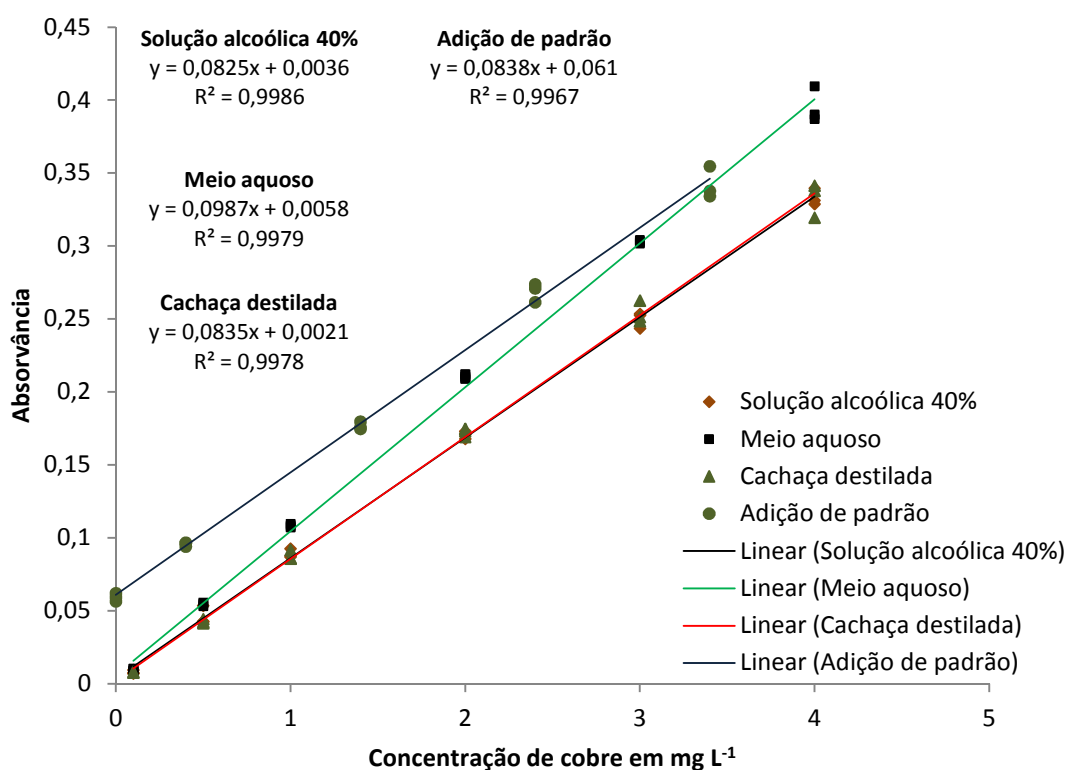


Figura 1-7. Curvas de calibração em diferentes matrizes.

CAPÍTULO I - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O MMQO foi aplicado para obter os dados da regressão das quatro curvas de calibração construídas em diferentes matrizes. Estes dados passaram pelo tratamento de valores extremos segundo o método dos resíduos padronizados de *Jacknife*, cuja estatística é o resíduo padronizado *Jacknife* J_{ei} .^[34] Nesse método, o valor de J_{ei} é calculado para cada ponto de curva de calibração. Os resíduos padronizados *Jacknife* seguem a distribuição de $t_{(1-\alpha/2; n-p-1)}$. Valores absoluto de J_{ei} maiores que o valor do t crítico são considerados valores extremos e removidos, exceto quando a porcentagem de dados tratados for superior a 22,2% do número original de dados ou quando o ponto for a terceira e última replicata de um nível de concentração estudado. Para cada exclusão o método MMQO é novamente aplicado aos dados.^[34]

Após aplicar o MMQO e verificar a presença de valores extremos, avaliou-se a linearidade das curvas de calibração construídas, e os dados de regressão dessas curvas necessários para avaliar o efeito de matriz encontram-se na Tabela 1-5.

Tabela 1-5. Valores do coeficiente angular, número de replicatas, S_{xx} e S_{res} , para as diferentes curvas de calibração.

Matriz da curva	Coef. Angular B	replicatas n	S_{xx}	S_{res}
Meio aquosa	0,0987	18	34,6	0,00669
Sol. alcoólica 40% (v/v)	0,0825	18	34,6	0,00456
Cachaça destilada	0,0835	18	34,6	0,00579
Amostra fortificada	0,0838	15	23,7	0,00650

S_{xx} = a soma dos quadrados dos desvios de X_i em relação à sua média \bar{X} ;

S_{res} = desvio padrão dos resíduos.

Por meio desses dados avaliou-se o efeito de matriz, comparando a curva de calibração construída em solução alcoólica 40% (v/v) com as curvas construídas nas outras matrizes. Nessa comparação, inicialmente, o teste F foi aplicado com intuito de se conhecer a distribuição dos resíduos. Nesse teste, se o valor de F calculado ($F_{cal.}$) for menor ou igual ao valor de F tabelado ($F_{tab.}$), os resíduos são considerados homoscedásticos e, caso contrário, os resíduos são considerados heteroscedásticos. Em seguida, as inclinações das curvas de calibração foram comparadas pelo teste t de *Student* levando em consideração o tipo de distribuição dos resíduos determinado pelo teste F . Nesse teste, se o valor de t calculado ($t_{cal.}$) for menor ou igual ao valor de t tabelado ($t_{tab.}$) considera-se que não há efeito de matriz e, caso contrário, considera-se

que há efeito de matriz.^[34] Os valores encontrados para $F_{tab.}$, $F_{cal.}$, $t_{tab.}$ e $t_{cal.}$ estão na Tabela 1-6.

Tabela 1-6. Valores de F e t obtidos na comparação entre a curva preparada em solução alcoólica 40% (v/v) e as curvas preparadas nas outras matrizes.

Estatística	Matrizes das curvas		
	Solução aquosa	Cachaça destilada	Cachaça
$F_{cal.}$	2,149	1,610	2,033
$F_{tab.}$	2,761	2,761	2,851
$t_{cal.}$	11,748	0,740	0,888
$t_{tab.}$	2,352	2,352	2,363

$F_{cal.}$ = valor de F calculado; $F_{tab.}$ = valor de F tabelado;

$t_{cal.}$ = valor de t calculado; $t_{tab.}$ = valor de t tabelado.

Como observado na Tabela 1-5, comparando-se a curva de calibração preparada em solução alcoólica 40% (v/v) com a curva de calibração preparada em meio aquosa, observa-se que $t_{cal.} > t_{tab.}$. Dessa forma, conclui-se que há efeito de matriz. Por outro lado, comparando a curva preparada em solução alcoólica 40% (v/v) com a curva preparada em cachaça destilada ou em cachaça natural observa-se $t_{cal.} < t_{tab.}$, ou seja, não foram observados efeitos de matriz na avaliação desses sistemas. Cabe ressaltar que, conforme descrito no procedimento experimental, as cachaças destilada e natural tiveram seus teores alcoólicos ajustados para 40% (v/v). Esses dados permitem concluir que é viável o uso de uma curva de calibração preparada em solução alcoólica 40% (v/v) para determinação de cobre em cachaça com grau alcoólico real de 40% (v/v), segundo o que foi proposto para o método. Obviamente, as amostras analisadas utilizando essa curva de calibração terão seus teores alcoólicos determinados antes da medida e, se for o caso, ajustados para 40% (v/v). Os demais ensaios de validação do método foram realizados somente para a curva de calibração preparada em matriz com teor alcoólico 40% (v/v).

Mesmo com o conhecimento da presença do efeito de matriz devido ao álcool presente na cachaça, verificou-se até que ponto o grau alcoólico da amostra pode ser diferente de 40% (v/v) sem que esse efeito mostre-se significativo. Para isso, foram construídas sete curvas de calibração em teores alcoólicos diferentes: 34%, 36%, 38%, 40%, 42%, 44% e 46% (v/v). Na Figura 1-8 pode ser observado o comportamento do efeito de matriz nessas curvas de calibração, em que à medida que se eleva o grau

CAPÍTULO I - RESULTADOS E DISCUSSÃO

alcoólico da solução utilizada para construir a curva de calibração percebe-se que o coeficiente angular diminui.

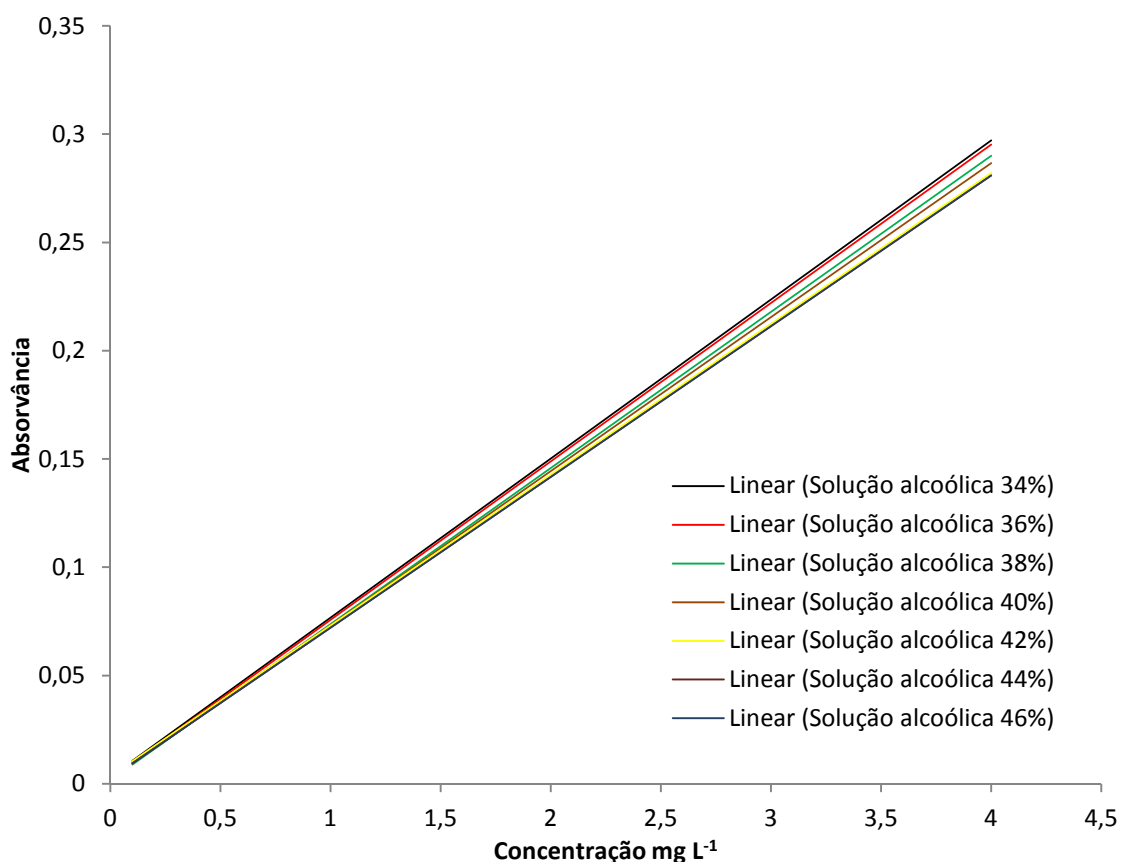


Figura 1-8. Curvas de calibração construídas em soluções alcoólicas de 34, 36, 38, 40, 42, 44 e 46% (v/v).

Como podem ser observados na Tabela 1-7, os valores de $t_{cal.}$ para as curvas de calibração construídas em solução alcoólica 34 e 36% (v/v) são maiores do que o valor crítico quando essas curvas são comparadas com a curva de grau alcoólico 40% (v/v). Com isso, conclui-se que há presença de efeito de matriz nessas curvas de calibração. Por outro lado, quando se compara as curvas construídas em solução alcoólica 38, 42, 44 e 46% (v/v) com a curva de grau alcoólico 40% (v/v), encontra-se valores de $t_{cal.}$ menores do que o valor crítico. Sendo assim, conclui-se que não há efeito de matriz nessas curvas de calibração. Apesar de não ter indicado efeito de matriz nas curvas construídas em solução alcoólica 44 e 46% (v/v), percebe-se que os valores encontrados para $t_{cal.}$ estão muito próximo do valor crítico. Dessa maneira, pode-se concluir com segurança que amostras de cachaça com grau alcoólico de 38 à 42% (v/v) podem ser

analisadas empregando uma curva de calibração em grau alcoólico 40% (v/v) sem que apresente efeito de matriz.

Tabela 1-7. Valores de $t_{cal.}$ e $t_{crítico}$ encontrados ao avaliar o efeito de matriz de cada curva de calibração com a curva de calibração construída em solução alcoólica 40% (v/v).

Curva em solução alcoólica (% v/v)	$t_{cal.}$	$t_{tab.}$
34	3,040	
36	2,960	
38	1,339	2,352
42	1,681	
44	2,308	
46	1,935	

$t_{cal.}$ = valor de t calculado; $t_{tab.}$ = valor de t tabelado.

1.4.2 Linearidade

Como discutido anteriormente, o MMQO foi aplicado para obter os dados de regressão linear. Estes dados passaram pelo tratamento de valores extremos utilizando o método dos resíduos padronizados *Jacknife*, cuja estatística é o resíduo padronizado *Jacknife* J_{ei} .^[34] Após a verificação de valores extremos, as premissas de regressão foram avaliadas: normalidade, independência e homoscedasticidade dos resíduos, significância da regressão e desvio de linearidade. Na avaliação dessas premissas foram aplicados os testes estatísticos e análise de variância.

O teste de *Ryan-Joiner*^[34] foi aplicado para verificar a normalidade dos resíduos. A estatística deste teste é o coeficiente de correlação do gráfico de probabilidade normal ou coeficiente de correlação de *Ryan-Joiner* R_{eq} . Para determinar esse coeficiente; primeiro, os n resíduos e_i das curvas de calibração são ordenados; em seguida, é construído um gráfico dos valores dos resíduos *versus* os valores dos percentis q_i estimados para uma distribuição normal reduzida (quantis normais); e então, o coeficiente de correlação entre e_i e q_i (R_{eq}) é obtido de forma análoga ao coeficiente de correlação linear. Ao aplicar esse teste, compara-se o valor de R_{eq} determinado pelo gráfico com o valor crítico que é de 0,9461 para o nível de confiança de 95%. Quando o valor calculado de R_{eq} estiver acima ou igual ao valor crítico considera-se que os resíduos seguem distribuição normal, caso contrário, os resíduos não seguem

distribuição normal. A Tabela 1-8 apresenta todos os resultados estatísticos obtidos na avaliação das premissas do MMQO. Como pode ser observado, o valor encontrado R_{eq} foi de 0,984, o que permite concluir que os resíduos seguem distribuição normal, assim, confirmando a adequação do MMQO para estimar a curva de calibração.

A autocorrelação dos resíduos da regressão foi verificada pelo teste de *Durbin-Watson*.^[34] O resultado estatístico desse teste é o valor d estimado por uma equação que é função dos resíduos e_i . O valor de d de *Durbin-Watson* varia de zero a quatro com média de dois. Se o valor calculado converge para dois, significa que não há autocorrelação, ou seja, os resíduos são independentes. Quando o valor se afasta de dois para zero ou quatro, a autocorrelação aumenta, sendo perfeita nos valores extremos. Limites inferiores e superiores podem ser estimados por equações que são funções de n , sendo dois limites inferiores (1,157 e 1,391; para $n = 18$) e dois limites superiores (2,609 e 2,943; para $n = 18$). Se o valor de d estiver entre os limites 1,391 e 2,609 considera-se que não há autocorrelação dos resíduos. Se o valor de d estiver entre 1,157 e 2,943 o teste é considerado inconclusivo. Se o valor de d estiver fora dos dois limites (inferiores ou superiores) considera-se que há autocorrelação dos resíduos (os resíduos são dependentes). Como observado na Tabela 1-8, obteve-se um valor de 2,074 para d , mostrando que os resíduos são independentes, o que é esperado quando se aplica o MMQO, pois a validade desse método pressupõe a ausência de autocorrelação dos resíduos. O que leva a concluir que o MMQO pode ser aplicado para estimar a curva de calibração.

O teste de *Brown-Forsythe* ou *Levene*^[34] modificado foi aplicado para avaliar a homoscedasticidade dos resíduos. Ao aplicar este teste tem-se como resultado estatístico o valor de t_L quando o tratamento possui apenas um grau de liberdade. Para determinar esse valor, os resíduos são divididos em dois grupos de tamanho n_1 (resíduos dos níveis de concentração de menor concentração da curva de calibração) e n_2 (resíduos dos níveis de concentração de maior concentração da curva de calibração), sempre que possível equilibrando a distribuição dos pontos entre os grupos em função dos níveis de concentração estudados, sem separar as replicatas de um mesmo nível, e, então, o desvio padrão dos resíduos é calculado para cada grupo. Esse valor de t_L é comparado com o valor crítico tabelado, $t_{(1-\alpha; n_1+n_2-2)}$. Quando o valor calculado de t_L estiver abaixo ou igual ao valor tabelado considera-se que há homocedasticidade dos resíduos, caso contrário, há heteroscedasticidade dos resíduos. O valor obtido para t_L , conforme

CAPÍTULO I - RESULTADOS E DISCUSSÃO

mostra a Tabela 1-8, foi de 0,156. Como esse valor é menor que o tabelado então os resíduos seguem distribuição normal, o que é esperado quando se aplica o MMQO. Assim, pode se afirmar que o MMQO está adequado para estimar a curva de calibração.

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para avaliar a significância da regressão e o desvio da linearidade. Em ambas as premissas a estatística é dada pelo valor de F , porém, deve-se ter um valor para cada premissa e determinados por caminhos distintos, os quais são comparados com os valores de F críticos tabelados. Quando se avalia a regressão, se o valor de F calculado for maior que o valor tabelado $F_{(1-\alpha; 1; n-2)}$ então considera-se que a regressão é significativa, caso contrário, não é significativa. Quando se avalia o desvio, se o valor de F calculado for menor que o valor tabelado $F_{(1-\alpha; u-2; n-u)}$ então considera-se que não há desvio de linearidade, caso contrário, há desvio de linearidade.^[34] Como pode ser observado na Tabela 1-8, os valores de F obtidos para a significância da regressão e o desvio da linearidade foram de 11323 e 0,392, respectivamente, mostrando-se dentro dos limites estabelecidos, Assim, pode-se concluir que a regressão é significativa e que a faixa é linear.

Tabela 1-8. Resultados estatísticos da avaliação das premissas do MMQO: valores de R_{eq} , d , t_L e F calculados e limites aceitos para cada valor.

Premissas	Parâmetros estatísticos	Limites		Valor Encontrado
		Mínimo	máximo	
Normalidade dos resíduos	R_{eq}	0,946	-	0,984
Independência dos resíduos	d	1,391	2,609	2,074
Homoscedasticidade dos resíduos	t_L	-	2,473	0,156
Significância da regressão	F	4,494	-	11323
Desvio de linearidade	F	-	3,259	0,392

R_{eq} = coeficiente de correlação de *Ryan-Joiner*; d = valor de d de *Durbin-Watson*

t_L = o valor de t_L de *Levene*; F = razão entre as variâncias.

Diante dos resultados obtidos, observa-se que os limites impostos pelas premissas exigidas pelo MMQO não foram extrapolados ao avaliar a linearidade do método, dentro da faixa de 0,0 a 4,0 mg L⁻¹. Dessa maneira, o método dos MMQO pode ser aplicado com segurança para estimar a equação da reta que correlaciona as variáveis X_i e Y_i . Assim, conclui-se que o método proposto apresenta linearidade adequada na faixa em que é aplicada a calibração.

Outra estatística avaliada na linearidade foi o coeficiente de correlação ao quadrado (r^2), que mede o grau de ajuste das variáveis X_i e Y_i na curva de calibração. Estabelecendo o valor adequado para R^2 maior ou igual a 0,9800 e o valor encontrado de 0,9986, podemos concluir novamente que a faixa avaliada para a curva de calibração proposta está adequada.

1.4.3 Seletividade

1.4.3.1 Efeito devido ao envelhecimento da cachaça

De forma intuitiva, pode-se dizer que a matriz da cachaça pode ser alterada quimicamente quando é envelhecida ou quando se adiciona, após o envelhecimento, caramelo para corrigir sua cor. Para avaliar possíveis interferências devidas ao envelhecimento foram realizados quinze ensaios de adição e recuperação em amostras com matrizes distintas (cachaça natural, envelhecida e envelhecida com adição de caramelo). Os resultados estão na Tabela 1-9.

Tabela 1-9. Resultados dos ensaios de adição e recuperação realizados em amostras fortificadas com cobre a $2,4 \text{ mg L}^{-1}$.

Recuperação das amostras fortificadas (%)		
Amostra 1V	Amostra 3V	Amostra 4V
92,26	97,55	98,32
92,06	98,36	98,57
99,83	93,01	100,69
106,04	92,20	102,66
104,63	93,46	102,31

Os dados foram tratados, usando o teste de *Grubbs*,^[37, 34] para avaliar a presença de valores extremos. O teste de Grubbs é primeiramente realizado verificando a existência de um valor disperso em cada extremidade do conjunto. Se nesta primeira análise, um dos dois valores for considerado disperso, ele é rejeitado, retirado do conjunto e novo teste, verificando a existência de um valor disperso em cada extremidade do conjunto, é realizado e assim sucessivamente, caso contrário, se nesta primeira análise, ambos os valores forem aceitos como não dispersos, o teste é então realizado verificando-se a existência de dois valores dispersos em cada extremidade do

conjunto. Se nesta segunda análise os dois resultados de uma das extremidades forem considerados como dispersos, eles devem ser rejeitados, retirados do conjunto e novo teste verificando a existência de dois valores dispersos em cada extremidade do conjunto é realizado e assim sucessivamente.

Os resultados obtidos para a amostra 1V (não envelhecida) foram comparados com os resultados obtidos para as amostras 3V (envelhecida e adicionada de caramelo) e 4V (envelhecida), através dos valores de F e t calculados. Esses dados encontram-se na Tabela 1-10.

Tabela 1-10. Valores de F e t obtidos nos ensaios de adições e recuperação realizados para a amostra 1V em comparação com as amostras 3V e 4V.

Estatística	Amostras comparadas	
	1V e 3V	1V e 4V
$F_{cal.}$	5,494	10,661
$F_{tab.}$	6,388	6,388
$t_{cal.}$	1,257	0,500
$t_{tab.}$	2,306	2,571

$F_{cal.}$ = valor de F calculado; $F_{tab.}$ = valor de F tabelado;

$t_{cal.}$ = valor de t calculado; $t_{tab.}$ = valor de t tabelado.

Comparando os resultados obtidos para a amostra 1V com os resultados obtidos para as amostras 3V e 4V, encontra-se $t_{cal.} < t_{tab.}$. Dessa maneira, os resultados são estatisticamente equivalentes e, portanto, pode-se concluir que não há interferências significativas. Assim, o método analítico pode ser aplicado para determinar cobre em cachaças naturais, envelhecidas ou adicionadas de caramelo, desde que o grau alcoólico esteja a 40% (v/v).

1.4.3.2 Efeito da variação do grau alcoólico

Como discutido anteriormente, o método desenvolvido no presente trabalho propõe que a curva de calibração seja construída em solução alcoólica 40% (v/v). Entretanto, o grau alcoólico real de grande parte das amostras comerciais de cachaça não é exatamente igual a 40% (v/v), podendo variar de 38 à 48% (v/v). Dessa forma, é importante realizar um estudo para avaliar se existe influência no resultado quando o grau alcoólico da cachaça é diferente ao da curva de calibração. Cabe ressaltar que o

Comparando os resultados dos ensaios realizados para as soluções padrão de grau alcoólico 40% (v/v) com os ensaios realizados em soluções padrão de grau alcoólico 32 e 48% (v/v), encontra-se $t_{cal.} > t_{tab.}$. Dessa maneira, os resultados são estatisticamente diferentes. Conclui-se, portanto, que há interferências e, assim, a curva de calibração preparada em solução alcoólica 40% (v/v) não pode ser utilizada para determinar cobre em cachaças com grau alcoólico variado. Sendo assim, torna-se necessário corrigir o teor alcoólico das amostras antes de realizar a determinação de cobre.

1.4.3.3 Efeito devido à presença de sacarose

As cachaças comerciais podem ter, permitido pela legislação, até 6 g L^{-1} de sacarose. Dessa forma, uma vez que cachaças com sacarose adicionada em diferentes quantidades possuem matrizes distintas, torna-se necessário avaliar possíveis interferências devido à presença dessa substância. Com esse objetivo, avaliou-se os resultados obtidos em ensaios realizados em soluções padrão de cobre a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (grau alcoólico 40 % v/v) adicionadas com diferentes quantidades de sacarose. Os resultados encontram-se na Figura 1-10.

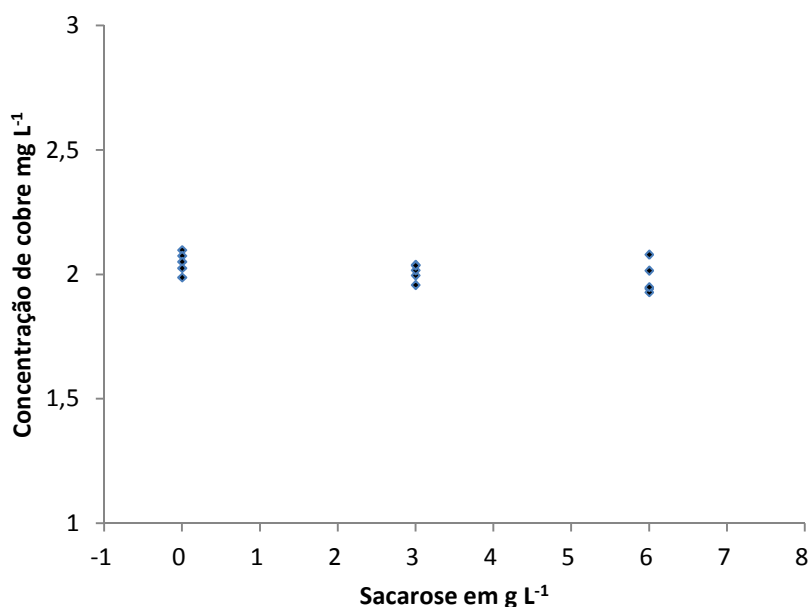


Figura 1-10. Influência da sacarose na determinação de cobre.

Como pode ser observado no gráfico, não há interferências significativas da sacarose na determinação de cobre utilizando o método proposto. Essa observação é

corroborada pelos dados estatísticos obtidos para F e t . A Tabela 1-12 apresenta os valores de F e t obtidos na comparação entre os resultados de ensaios realizados em soluções padrão de cobre sem adição de sacarose e os resultados obtidos em ensaios com soluções padrão de cobre adicionadas de sacarose nas concentrações de 3 e 6 g L⁻¹.

Tabela 1-12. Valores de F e t obtidos na comparação entre os resultados obtidos em ensaios realizados em soluções padrão adicionadas de sacarose em 3 e 6 g L⁻¹ e solução padrão de cobre sem adição de sacarose.

Parâmetros estatísticos	Níveis comparados	
	0 e 3	0 e 6
$F_{cal.}$	1,640	2,194
$F_{tab.}$	6,388	6,388
$t_{cal.}$	1,571	1,871
$t_{tab.}$	2,306	2,306

$F_{cal.}$ = valor de F calculado; $F_{tab.}$ = valor de F tabelado;

$t_{cal.}$ = valor de t calculado; $t_{tab.}$ = valor de t tabelado.

Comparando os resultados obtidos entre as soluções padrão sem adição de sacarose e soluções padrão adicionadas de sacarose em níveis de 3 e 6 g L⁻¹, encontra-se $t_{cal.} < t_{tab.}$. Assim, os resultados são estatisticamente iguais. Conclui-se então que não há interferências significativas e, portanto, o método pode ser aplicado na determinação de cobre em cachaças adicionadas de sacarose em até 6 g L⁻¹, desde que o grau alcoólico esteja em 40% (v/v).

1.4.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD e o LQ do método proposto foram determinados utilizando os dados de 15 ensaios independentes com brancos constituídos de solução alcoólica 40% (v/v) e cachaça destilada. Os dados de absorvância estão apresentados na Tabela 1-13.

Tabela 1-13. Dados de absorvância obtidos nos ensaios realizados com 15 brancos independentes.

Dados de absorvância		
0,0005	-0,0001	0,0000
0,0009	-0,0001	-0,0007
0,0007	-0,0004	-0,0012
0,0001	-0,0008	-0,0006
-0,0001	0,0004	-0,0012

Os valores determinados para o LD e o LQ do método, segundo o guia de validação do INMETRO^[32] estão apresentados na Tabela 1-14.

Tabela 1-14. LD e LQ determinados para o método.

Limites	Valor (mg L ⁻¹)
LD	0,02
LQ	0,05

LD = limite de detecção;

LQ = limite de quantificação.

MIRANDA e colaboradores^[23] encontraram os valores de 0,015 e 0,051 mg L⁻¹, respectivamente, para os LD e LQ empregando a mesma técnica e instrumento semelhante. Como pode ser observado os valores encontrados por esses autores estão dentro da mesma ordem de grandeza quando comparados com os valores obtidos pelo método em estudo. Os limites encontrados para o método em estudo atendem ao objetivo proposto para esse método, pois são bem menores do que o limite máximo de cobre em cachaça permitido pela legislação (0,05 << 5,0 mg L⁻¹).

1.4.5 Faixa de trabalho e faixa linear

Durante os estudos de pré-validação verificou-se desvios de linearidade em concentrações de cobre superiores a 4 mg L⁻¹ e, portanto, a avaliação da linearidade para o método proposto limitou-se a faixa de 0,0 à 4,0 mg L⁻¹, ou seja, se restringindo à faixa linear. Os resultados encontrados atenderam aos limites de aceitabilidade e, portanto pode-se afirmar que o método apresentou faixa linear entre 0,00 e 4,00 mg L⁻¹. Por outro lado, observou-se que a faixa de trabalho pode ir além de 4,00 mg L⁻¹, desde que aplique um método consistente com o desvio apresentado. Nesse sentido, a avaliação de uma faixa linear entre 0,00 e 10,00 mg L⁻¹, nos estudos de pré-validação, apresentaram coeficiente de correlação ao quadrado (r^2), entre as variáveis X_i e Y_i , de 0,999 quando se usava ajuste com equação de segundo grau.

De qualquer maneira, para determinar a faixa de trabalho considerou-se como limite inferior o limite de quantificação (0,05 mg L⁻¹) e o limite superior foi reduzido até o ponto em que a curva de calibração se manteve linear. Portanto, a faixa de trabalho foi considerada sendo: de 0,05 a 4,00 mg L⁻¹.

1.4.6 Precisão

Os teores de cobre das amostras 2V, 3V e 4V foram determinados com o objetivo de avaliar a precisão, sendo que os dados estão apresentados na Tabela 1-15. Os dados obtidos para uma mesma amostra estão em condições específicas para avaliar a repetitividade e o conjunto de todos os dados obtidos das três amostras (2V, 3V e 4V) estão em condições específicas para avaliar a precisão intermediária (analistas diferentes), ou seja, amostras distintas foram analisadas por diferentes analistas.

Tabela 1-15 Concentrações das amostras 2V, 3V e 4V, determinadas em condições específicas para avaliar a precisão do método proposto.

Ensaio	Concentração em mg L ⁻¹		
	amostra 2V	amostra 3V	amostra 4V
1	4,8646	1,4433	0,4207
2	4,8267	1,2949	0,4377
3	5,0085	1,4085	0,4377
4	4,7738	1,3918	0,4301
5	5,0055	1,3267	0,4710
6	4,8207	1,4555	0,4392
$\bar{X} \pm s$	4,88 ± 0,10	1,39 ± 0,06	0,44 ± 0,02

Pode ser observado na Tabela 1-15 que os níveis de cobre nessas amostras permitem avaliar a precisão em diferentes pontos da faixa de trabalho. Para isso, os valores do coeficiente de variação (*CV*) para cada conjunto de dados e o valor do desvio padrão da precisão intermediária (*S_{pi}*) para todo o conjunto de dados foram determinados e estão apresentados na Tabela 1-16.

No caso de não haver limites com os quais possam ser comparadas as características de precisão (desvio padrão e coeficiente de variação), pode-se empregar como limites os valores teóricos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade calculados a partir da equação de *horwitz*.^[32] Essa equação foi desenvolvida na revisão de 150 estudos interlaboratoriais, em que analitos diferentes foram medidos com diferentes técnicas. Observaram-se que o coeficiente de variação dos valores médios relatados pelos diferentes laboratórios aumentava sempre quando a concentração do analito diminuía. Por exemplo, para uma concentração de analito de 1 ppm, o coeficiente de variação entre os laboratórios é de 16% e quando a concentração é 1 ppb, o coeficiente de variação é de 45%.^[30] Os limites críticos estabelecidos para

CAPÍTULO I - RESULTADOS E DISCUSSÃO

repetitividade (2/3 do valor previsto pela equação de *horwitz*) e precisão intermediária (valor previsto pela equação de *horwitz* e convertido em desvio padrão) foram estimados encontrando-se, respectivamente, o valor 10% para $CV_{crítico}$ e 0,300 mg L⁻¹ para $S_{pi\ crítico}$.

Tabela 1-16. Valores calculados e críticos de CV e S_{pi} .

Amostras	Repetitividade		Precisão intermediária	
	CV (%)	$CV_{crítico}$ (%)	S_{pi} (mg L ⁻¹)	$S_{pi\ crítico}$ (mg L ⁻¹)
2V	2,05			
3V	4,61	10	0,069	0,300
4V	3,86			

CV = coeficiente de variação; $CV_{crítico}$ = coeficiente de variação crítico;

S_{pi} = desvio padrão da precisão intermediária; $S_{pi\ crítico}$ = desvio padrão crítico da precisão intermediária.

Como pode ser observado na Tabela 1-16, os valores CV e S_{pi} encontrados para avaliar, respectivamente, a repetitividade e a precisão intermediária estão abaixo dos valores máximos estabelecidos como críticos, dessa forma, conferindo precisão ao método em estudo.

1.4.7 Veracidade

Para avaliar a veracidade foram realizados ensaios de adição e recuperação em quatro níveis de concentrações, fortificando-se a amostra 1V com solução padrão de cobre. A Tabela 1-17 apresenta os resultados de recuperação obtidos para esses ensaios.

Tabela 1-17. Resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação para uma amostra cachaça (amostra 1V) fortificada com cobre em diversos níveis de concentração.

Nível de concentração fortificado (mg L ⁻¹)			
0,4	1,4	2,4	3,4
99,80	96,02	99,83	96,38
91,62	96,88	106,04	97,66
98,89	100,35	104,63	103,68

Estabelecendo os limites aceitáveis^[31, 34] de recuperação entre 80% e 110% para os níveis de concentrações avaliados, observa-se que os resultados encontrados estão adequados, conferindo, assim, veracidade ao método em avaliação. Outros resultados de recuperação que podem ser analisados estão na Tabela 1-9, os quais, também, levam a concluir que o método apresenta veracidade.

Verificar a veracidade empregando ensaios de recuperação é um procedimento considerado limitado, pois o analito adicionado pode não estar necessariamente na mesma forma com que se apresenta na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma que pode ser mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.^[32] Para assegurar a veracidade do método proposto, o LAFQ participou em 2011 de programas de ensaios de proficiência em análises de bebidas, realizados em duas rodadas, organizado pela Rede Metrológica do Rio Grande do Sul. Nesses programas de ensaio de proficiência, o critério empregado para avaliar o desempenho do laboratório foi o índice z (z score), o qual é o quociente do valor absoluto obtido por meio da diferença do valor encontrado pelo laboratório e do valor aceito como verdadeiro (determinado pela organizadora do programa de ensaio de proficiência) pelo desvio padrão do programa de ensaio de proficiência. Esse índice pode ser considerado satisfatório, questionável ou insatisfatório, quando o valor de z encontrado estiver, respectivamente, dentro de uma das faixas: $z \leq 2$; $2 < z < 3$ ou $z \geq 3$. Os resultados encontrados dessas comparações interlaboratoriais estão apresentados na Tabela 1-18.

Tabela 1-18. Resultados do programa de ensaio de proficiência em análises de bebidas (cachaça e vinho).

Rodada	CV	z (score)	Resultado
1º	1,99	1,25	Satisfatório
2º	1,25	0,83	Satisfatório

CV = coeficiente de variação; z (score) = índice z

Observa-se que os resultados encontrados em ambas as rodadas do ensaio de proficiência foram considerados satisfatórios. Mais uma vez, o método proposto mostrou-se exato segundo a veracidade ou a tendência. Apesar de o desempenho da precisão não ser avaliada nesse programa de ensaio de proficiência, o valor do coeficiente de variação foi reportado no relatório final, sendo assim, ao compará-lo com

o valor crítico teórico obtido da equação de *Horwitz*^[30] ($CV_{crítico} = 10\%$) conclui-se, novamente, que o método é preciso.

1.4.8 Robustez

O método proposto, quando aplicado para determinação de cobre em cachaça por um laboratório, mostra-se que é simples, exequível em poucas etapas e utiliza como reagentes apenas solventes (água destilada deionizada e álcool anidrido PA). Os solventes empregados durante a pré-validação e a validação não apresentaram vestígios de cobre detectável pela técnica utilizada. Influências provenientes do ambiente, diferenças nos resultados quando outros analistas executam o ensaio e equipamentos de medição (micropipeta, pipeta e balão volumétrico) são fontes de variação que foram incluídas durante a validação do método, principalmente na precisão intermediária. Outras possíveis fontes de erros já foram estudadas quando se avaliou a seletividade (presença de sacarose, variação do teor alcoólico, substâncias presentes na cachaça advindas do envelhecimento e adição de caramelo). Portanto pode-se afirmar com segurança que o método possui robustez satisfatória.

1.5 CONCLUSÕES

Diversos métodos analíticos estão disponíveis na literatura para determinação de cobre em cachaça. Porém, alguns métodos são bastante trabalhosos como, por exemplo, aqueles que empregam as técnicas de espectrofotometria de absorção molecular e voltametria. Outros métodos, sobretudo os que empregam a técnica AAS, também deixam de ser atraentes quando propõe o uso de procedimentos de adição de padrão (IAL, MAPA) ou com padrões internos (MIRANDA e colaboradores^[23]), pois aumentam o tempo e custo da análise devido ao gasto maior de materiais e mão de obra qualificada. Já o método proposto pela AOAC despreza o efeito de matriz causado pela presença de álcool na cachaça, tornando assim o método menos confiável. Outros métodos, que empregam técnicas modernas, como GF-AAS, ICP-MS ou ICP-OES, são rápidos e eficientes, mas nem todo laboratório possui tais técnicas disponíveis, sendo estas, em determinadas condições, de manutenção cara, portanto nem sempre são viáveis.

O método desenvolvido nesse trabalho, quando empregado em um laboratório de rotina para determinação de cobre em amostras de cachaça, mostra-se que é simples, rápido, de fácil execução e emprega uma técnica amplamente utilizada em laboratórios. Além disso, é economicamente viável quando comparado a outros métodos presentes na literatura. Dessa forma, é uma alternativa interessante para laboratórios que possuem alta demanda por análise de cobre em amostras de cachaça. A única etapa adicional é a determinação prévia do grau alcoólico real das amostras analisadas, o que não é considerada uma desvantagem do método, uma vez que o controle de qualidade da cachaça inclui o ensaio do grau alcoólico real simplesmente utilizando um densímetro. O LAFQ, por exemplo, faz esse tipo de ensaio em todas as amostras de cachaça que recebe para controle de qualidade. Como observado nos estudos de efeito de matriz, se o teor de álcool da amostra estiver entre 38 e 42% (v/v), não é necessário fazer o ajuste de grau alcoólico para utilizar a curva de calibração construída a 40% (v/v).

Os estudos de validação do método proposto mostraram que a linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, veracidade e robustez atenderam aos critérios de aceitabilidade estabelecidos pela proposta de validação do INMETRO. O LD e LQ foram determinados em 0,02 e 0,05 mg L⁻¹, respectivamente, sendo que esses limites

CAPÍTULO I - CONCLUSÃO

encontrados atendem ao objetivo proposto para o método analítico em avaliação, pois são bem menores do que o limite máximo de cobre em cachaça permitido pela legislação brasileira ($0,05 \ll 5,0 \text{ mg L}^{-1}$). As faixas linear e de trabalho foram de 0,00 a $4,00 \text{ mg L}^{-1}$ e 0,05 a $4,00 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, as quais também atendem ao objetivo proposto para o método, já que para exportação o limite máximo de cobre em cachaça deve ser de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, ou seja, esse valor encontra-se no centro da faixa de trabalho.

Como pode ser observado, o método proposto, além de possuir qualidades desejáveis também passou pelo processo de validação intralaboratorial e por comparações interlaboratoriais, mostrando-se adequado em todos os aspectos.

CAPÍTULO II

*Remoção de íons cobre de amostras de cachaça utilizando
bagaço de cana-de-açúcar*

2.1 INTRODUÇÃO

No capítulo 1, foram apresentadas algumas considerações acerca da presença de íons cobre na aguardente de cana-de-açúcar, principalmente no que envolve seu papel na qualidade sensorial da cachaça artesanal, na rota química de formação do carbamato de etila e, principalmente, seus limites máximos de concentração assegurados pelo MAPA para garantia de qualidade da bebida consumida no Brasil ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$) e para exportação ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$). Diante do exposto, fica evidente que é fundamental o desenvolvimento de sistemas economicamente viáveis para a remoção dessa espécie na cachaça. Existem, na literatura, diversos estudos, utilizando diferentes materiais, que visam propor procedimentos para remoção de cobre na bebida. O desafio é desenvolver um material que seja eficiente para remoção de cobre, mas que não remova outros compostos presentes na cachaça, principalmente aqueles que contribuem para sua qualidade sensorial. A seção seguinte apresenta uma síntese dos principais trabalhos presentes na literatura que envolvem a remoção de cobre em cachaça.

2.1.1 Métodos de remoção de cobre em cachaça

Entre os métodos presentes na literatura desenvolvidos para remover íons cobre da cachaça, um deles é aquele que utiliza o carvão ativado. LIMA e colaboradores^[8] empregaram esse material e compósitos de carvão ativado/óxido de ferro para remover íons cobre de cachaça. No procedimento proposto foram adicionados 12 g de carvão ativado ou compósito carvão/óxido de ferro em um litro de cachaça contendo 9 mg L^{-1} de íons cobre, utilizando recipiente fechado que foi submetido à agitação por 1 hora. Após esse tempo, realizou-se uma filtração a vácuo para remoção do carvão ativado e, então, a concentração de íons cobre e os principais compostos orgânicos presentes na cachaça foram determinados. A remoção do cobre mostrou-se mais eficiente com a utilização do compósito de carvão ativado/óxido de ferro do que simplesmente o carvão ativado, pois o teor de íons cobre da cachaça tratada pelos dois materiais diminuiu de 9 mg L^{-1} para $0,30$ e $5,34 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, os autores observaram que compostos orgânicos indispensáveis à qualidade da cachaça também foram extraídos pelo carvão ativado ou carvão ativado / óxido de ferro, tornando inviável seu uso para

tal finalidade. SANTOS,^[12] em seu trabalho de mestrado, também utilizou carvão ativado para remover íons cobre de amostras de cachaça. No procedimento utilizado, três amostras de 50 mL de cachaça, contaminadas com íons cobre em nível de concentrações de 4,0, 7,0 e 9,0 mg L⁻¹, foram passadas através de um funil analítico contendo 10 g de carvão ativo sobre o papel de filtro. Os resultados mostraram que o carvão ativo foi eficiente na remoção de cobre em cachaça e que a quantidade utilizada do carvão (10 g) promove a remoção de cobre para níveis abaixo do permitido pela legislação de até 150 mL de cachaça que contenha uma concentração inicial de 9,0 mg L⁻¹ de cobre. Entretanto, não foram realizados estudos em cromatografia gasosa para avaliar possíveis remoções de compostos responsáveis pela qualidade sensorial da cachaça.

A quitosana, um biopolímero, também foi avaliada para a remoção íons cobre em amostras de cachaça. JANEGITZ e colaboradores^[38] demonstraram a grande eficiência deste material em adsorver íons cobre de amostras de cachaça. Essa eficiência é resultado da presença de grupos hidroxilas e aminas que servem como sítios de interação com íons catiônicos. No procedimento proposto pelos autores, 2,5 g de quitosana foi inserida em uma coluna (7 cm de comprimento e 0,8 cm de diâmetro) e percolada com solução alcoólica a 40 % (v/v) contendo 634 mg L⁻¹ de íons cobre. Os resultados mostraram que o material foi eficiente para remoção de cobre para níveis abaixo dos permitidos pela legislação de 450 mL da solução alcoólica que continha concentração inicial de cobre de 634 mg L⁻¹. Os autores monitoraram o pH das amostras de cachaça submetidas ao material e observaram que o mesmo não foi alterado após o tratamento. Entretanto, não foram realizados estudos de avaliação de possíveis alterações no perfil de voláteis e outros compostos orgânicos presentes na cachaça após o tratamento com a quitosana. Dessa maneira, a viabilidade desse material para tal aplicação fica comprometida devido a necessidade desses estudos adicionais.^[38]

NEVES e colaboradores^[39] empregaram carbonatos sólidos, CaCO₃ ou MgCO₃, para remover íons cobre de amostras de cachaça. Amostras tratadas com esses carbonatos apresentaram quantidades remanescentes de cobre em níveis abaixo de 5,0 mg L⁻¹. No procedimento empregado pelos autores, uma massa de 0,10 g de CaCO₃ ou MgCO₃ foi adicionada em um volume de 25 mL de cachaça contendo concentrações de íons cobre acima do permitido pela legislação. O frasco que continha a mistura foi agitado por 10 minutos e, em seguida, deixado em repouso até completa sedimentação da fase sólida. Após separação das fases, foram retiradas alíquotas para determinação de

CAPÍTULO II - INTRODUÇÃO

cobre.^[39] Ambos os compostos mostraram-se eficientes na remoção de íons cobre nas amostras de cachaça, com melhor desempenho apresentado pelo $MgCO_3$. O pH das amostras aumentou após o tratamento, o que era esperado, pois esses carbonatos, que são básicos em meio aquoso, neutralizam os ácidos orgânicos e também possuem uma solubilidade intrínseca. Os autores reportaram que não houve mudanças perceptíveis nas propriedades organolépticas das cachaças após o tratamento com os compostos. Entretanto, não foram realizados estudos para avaliar se houve remoção de compostos orgânicos voláteis ou não-voláteis, responsáveis pela qualidade sensorial da cachaça.^[39]

A literatura apresenta diversos trabalhos em que se utilizam resinas de troca iônica para remoção de íons cobre em amostras de cachaça. Atualmente, vários produtores da bebida tem utilizado esse material para adequar o nível de íons cobre em seus produtos, de acordo com os requerimentos da legislação. No comércio especializado em materiais para produção de cachaça, essas resinas são comercializadas em cartuchos que podem ser acoplados ao sistema de produção da bebida (após o destilador) ou na forma de grãos que comumente são utilizados em colunas montadas fora do sistema de produção.

LIMA e colaboradores,^[8] além do carvão ativado, também estudaram a utilização de resinas de troca iônica na remoção de íons cobre de amostras de cachaça. Para isso, uma coluna de vidro com 2,5 cm de diâmetro e 16 cm de altura foi preenchida com 70 g de resina de troca iônica. Alíquotas de 300 mL de cachaça contendo $9,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram introduzidas na coluna e recolhidas em recipiente de vidro para análise de cobre utilizando espectrofotometria. Os resultados mostraram que a resina de troca iônica apresentou-se eficiente na remoção de íons cobre de amostras de cachaça, com níveis de cobre remanescentes nas amostras de $0,05$ e $0,06 \text{ mg L}^{-1}$, após tratamento de primeira e segunda passagens, respectivamente, pela coluna contendo a resina. Estudos utilizando cromatografia gasosa mostraram que o tratamento com a resina causou uma pequena diminuição na concentração de alcoóis superiores e de ésteres nas amostras de cachaças estudadas.

SANTOS^[12] também utilizou resinas de troca iônica com estrutura gel (Amberlite 120Na) e macrorreticular (Amberlite 252Na) para remover íons cobre de cachaça. No procedimento empregado, inicialmente, contaminou três amostras de cachaça nas concentrações de $4,0$, $7,0$ e $9,0 \text{ mg L}^{-1}$, em seguida, 8 alíquotas de 300 mL de cada cachaça contaminada, uma de cada vez, foram vertidas no topo de uma coluna feita de tubo de PVC com 30 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro e preenchidas com 100

gramas de uma das resinas. A cachaça tratada foi coletada na base da coluna e então realizou-se a análise do teor de cobre. Verificou-se que ocorria saturação parcial das resinas para qualquer das amostras contaminadas antes de tratar todas as alíquotas. Por exemplo, quando a concentração inicial de cobre era igual a 4 mg L^{-1} a resina Amberlite 252Na apresentou-se melhor, pois conseguiu remover mais cobre da cachaça, ou seja, com 7 alíquotas removeu 50% dos íons cobre enquanto a resina Amberlite 120Na removeu apenas 25% dos íons cobre.

SOUZA e colaboradores^[40] realizaram um estudo detalhado utilizando cromatografia gasosa bidimensional, para avaliar o efeito da utilização de resinas de troca iônica na remoção de íons cobre de cachaças, sobre a composição de compostos orgânicos voláteis e não-voláteis. Os resultados mostraram que não há mudanças significativas nos níveis dos principais compostos orgânicos presentes na cachaça, após seu tratamento com a resina de troca iônica. Entretanto, observaram a presença de compostos derivados de ftalatos nas amostras que passaram pelo tratamento com as resinas de troca iônica. A contaminação de alimentos por compostos ftálicos é comumente atribuída ao contato com plásticos. Esses compostos, que são considerados micropoluentes orgânicos, estão sendo objeto de estudos por diversos grupos de pesquisa, pois há indícios de que a exposição a esses compostos podem trazer sérios danos à saúde.^[41]

2.1.2 Bagaço de cana-de-açúcar como material de remoção de contaminantes inorgânicos

SOUZA e colaboradores^[42] empregaram bagaço de cana-de-açúcar na remoção de contaminantes inorgânicos como o Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} , de águas residuais remanescentes de processos industriais. Para isso, o bagaço de cana-de-açúcar foi tratado com $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$. Estudos utilizando difração de raio-X, espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica, mostraram que o tratamento ácido contribuiu para melhora na pureza do material e aumento de sua área de contato possibilitando, dessa forma, maior adsorção dos íons metálicos. Neste trabalho, também propuseram a regeneração do bagaço de cana com solução de $\text{HCl } 2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e mostraram que a eficiência na remoção de contaminantes diminui somente após o quarto ciclo de

reutilização. Os resultados mostraram que o bagaço de cana é uma alternativa viável para remoção de íons metálicos tóxicos de efluentes industriais.

No procedimento proposto pelos autores, o bagaço de cana-de-açúcar foi primeiramente triturado (20-48 *mesh*) e tratado com HCl 1,0 mol L⁻¹ por 24 horas. Em seguida, o material foi lavado com água deionizada, seco em temperatura ambiente e, finalmente estocado em dessecador a vácuo. Com 4,0 g desse material, montou-se uma coluna de 30 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro, a qual foi utilizada para remoção de metais contidos em 200 mL de água residual. O fluxo da coluna foi controlado por uma bomba peristáltica operando com fluxo de 2,0 mL min⁻¹. Os autores compararam a eficiência do bagaço de cana na remoção de metais de efluentes industriais com outros materiais como casca de coco, resíduos de chá, carvão ativado, biomassa e zeolitas. A capacidade de remoção de íons cobre em mg do metal por grama de material usado no tratamento para o bagaço de cana, casca de coco, resíduos de chá, carvão ativado, biomassa e zeólita) foi de 4,08; 10,12; 4,08 38,0; 2,89 e 0,125, respectivamente.

2.1.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

2.1.3.1 Fundamentos

A cromatografia gasosa e a espectrometria de massas são técnicas analíticas que surgiram independentemente e encontram-se bastante difundidas em diversas áreas da química. Quando combinadas tornam-se ferramentas poderosas capazes de resolver diversos problemas analíticos. A cromatografia gasosa devido a eficiência na separação de compostos contidos em misturas complexas, e a espectrometria de massas pela confirmação da identidade desses compostos, sensibilidade a pequenas quantidades de analitos, fornecimento de informações qualitativas e quantitativas e poder de distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção.^[43]

Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna cromatográfica. Ao realizar-se uma separação por cromatografia gasosa, inicialmente a amostra é vaporizada ao ser

injetada na cabeça da coluna cromatográfica. Em seguida, a eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte e, então, os componentes da amostra são separados chegando ao detector em tempos diferentes. Por fim, o cromatograma é gerado. Em contraste com muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, sendo sua única função a de transportar o analito através da coluna.^[28]

A espectrometria de massas (MS) é uma ferramenta que vem sendo utilizada há muito tempo para a medida de isótopos e para determinar a estrutura de moléculas orgânicas. Nessa técnica, a amostra é inicialmente transformada em espécies gasosas ionizadas ou neutras. As espécies ionizadas incluem moléculas, fragmentos e átomos com cargas negativa ou positiva que são, em seguida, analisadas segundo suas razões massa/carga.^[28] Um espectrômetro de massas é um instrumento formado por um sistema de entrada de amostras, uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um registrador, Figura 2-1.^[44]

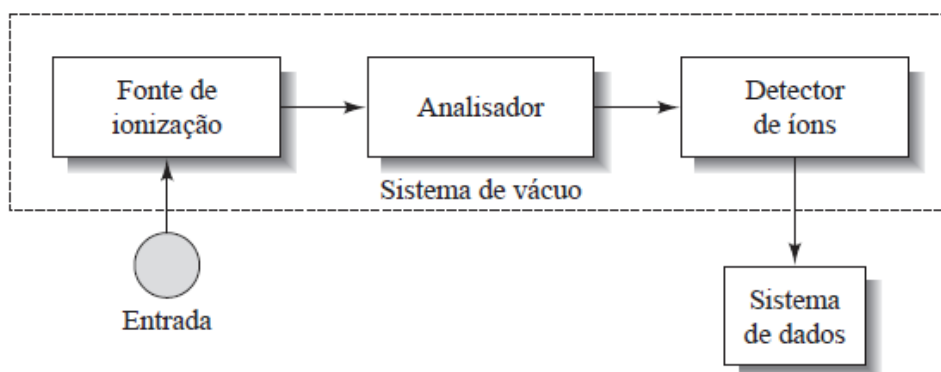


Figura 2-1. Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas. A amostra entra na fonte de ionização através de um sistema de entrada. As moléculas da amostra são convertidas a íons e frequentemente fragmentadas na fonte de ionização. Então, os íons passam para o analisador no qual são separados de acordo com a suas razões massa/carga. A seguir, os íons separados atingem um detector de íons no qual produzem um sinal elétrico que é registrado e representado na forma de gráfico pelo sistema de dados.^[28]

Inicialmente, a amostra entra na fonte de ionização através de um sistema de entrada que pode ser um cromatógrafo ou por inserção direta. Na fonte de ionização, os componentes da amostra são convertidos em íons, pela ação de um agente ionizante. Os íons positivos ou negativos são imediatamente acelerados através de um campo elétrico em direção ao analisador de massas. A função do analisador de massa é separar tais íons

de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). Finalmente, um detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados gerando o espectro de massas.^[44] A partir do valor de m/z , consegue-se estimar ou obter o valor exato da massa molar da substância. Quase todas as substâncias podem ser analisadas por MS, já que existem diversos tipos de fontes de ionização, analisadores de massas e detectores.^[44]

2.1.3.2 Instrumentação

Um instrumento de cromatografia gasosa pode ser separado em um sistema de injeção, coluna de separação, sistema de arraste e detector. Cada uma dessas unidades pode ser independentemente equipada de acordo com a finalidade de aplicação do instrumento. O mesmo pode ser observado nos espectrômetros de massas. Portanto, existem diversos modelos de equipamentos de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). A Figura 2-2 representa um esquema genérico para um instrumento de GC-MS.

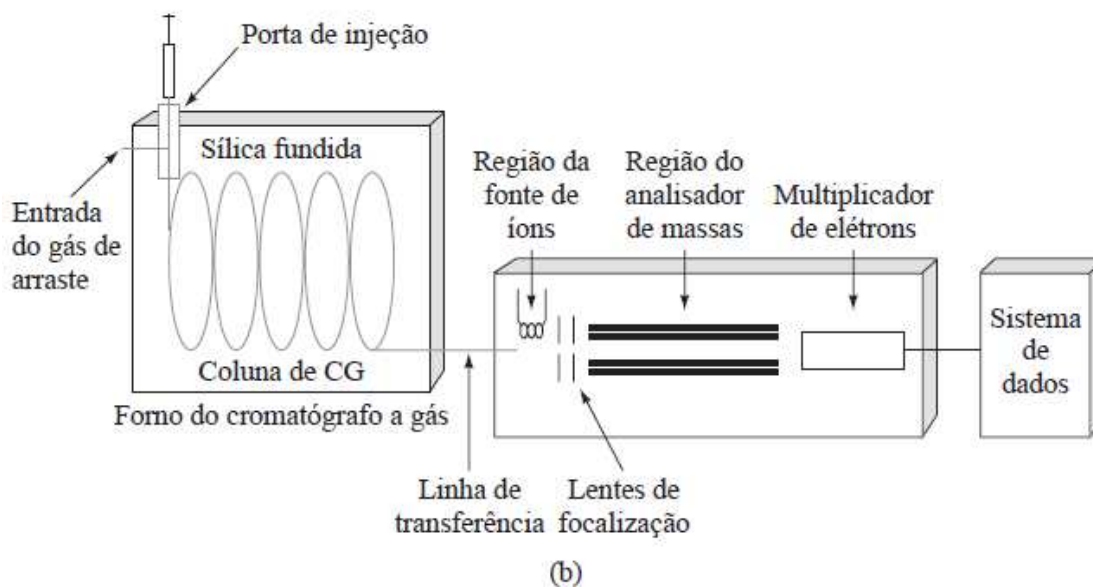


Figura 2-2. Esquema de um instrumento GC-MS. O eluente do GC passa para a entrada do espectrômetro de massas, no qual as moléculas de gás presentes são fragmentadas, ionizadas, analisadas e detectadas.^[28]

Em GC-MS, para haver eficiência de separação dos componentes da amostra na coluna, é desejável que a amostra seja introduzida como uma zona “estreita” de vapor.

CAPÍTULO II - INTRODUÇÃO

A injeção lenta ou de amostras muito volumosas causa o espalhamento das bandas e uma resolução não adequada na separação. Seringas calibradas ou um mecanismo com válvula de amostragem são empregados para a injeção de amostras.^[28]

Dois tipos gerais de colunas são encontrados em cromatografia gasosa: colunas recheadas e colunas tubulares abertas, ou colunas capilares. No passado, a ampla maioria das análises cromatográficas empregava as colunas recheadas. Para a maioria das aplicações atuais, as colunas recheadas têm sido substituídas pelas colunas tubulares abertas, pois são mais eficientes e mais rápidas.^[28]

Vários tipos de fontes de ionização estão disponíveis em espectrometria de massas. As fontes de ionização química ou impacto de elétrons (IE) são as mais compatíveis para os sistemas GC-MS. Na ionização por impacto de elétrons, as moléculas neutras na fase gasosa, obtidas por dessorção térmica à pressão de aproximadamente 10^{-5} torr, são bombardeadas por elétrons, com energia típica de 70 eV. Como resultado, pode ocorrer a retirada ou captura de um elétron pela molécula, formando íons M^{+} ou M^{-} . A geração de íons positivos é predominante, cerca de 100 vezes mais que íons negativos.^[28, 44] Os íons positivos ou negativos são dirigidos para o analisador por repulsão eletrostática. Em IE, o feixe de elétrons é tão energético que muitos fragmentos são produzidos. Esses fragmentos são muito úteis na identificação das espécies moleculares que entram no espectrômetro de massas. A ionização química, em contraste, produz íons com menor excesso de energia. Deste modo, esta técnica de ionização apresenta a vantagem de produzir um espectro com menos fragmentação, no qual o íon molecular é facilmente reconhecido.^[28]

Os analisadores mais comuns para CG-MS são os do tipo quadrupolo e os que empregam armadilha de íons (*ion trap*). Em espectrômetros de massas de alta resolução, também podem ser utilizados analisadores de duplo foco, de ressonância ciclotrônica ou de tempo de voo (TOF).^[28]

Em muitos espectrômetros, os íons são detectados após colidirem com a superfície de um detector. As colisões causam a emissão de elétrons, fótons ou outros íons. Estes podem ser medidos por detectores de carga ou radiação. Um detector bastante comum é o multiplicador de elétrons. No detector de ressonância ciclotrônica de íons, estes induzem um sinal cujas frequências são inversamente relacionadas aos valores de m/z . As frequências são decodificadas por técnicas de transformada de Fourier.^[28]

CAPÍTULO II - INTRODUÇÃO

Em GC-MS, o espectrômetro de massas varre as massas repetidamente durante o experimento cromatográfico. Se a cromatografia ocorre em dez minutos, por exemplo, e uma varredura é obtida a cada segundo, 600 espectros de massas serão registrados. Os dados podem ser analisados pelo sistema de dados de diversas formas. Primeira, a abundância dos íons em cada espectro pode ser somada e colocada em um gráfico em função do tempo para fornecer um cromatograma do total de íons. Esse gráfico é similar a um cromatograma convencional. Pode-se também mostrar o espectro de massas em um tempo particular durante o cromatograma para identificar-se as espécies que estão eluindo naquele momento. Finalmente, pode-se selecionar um valor único de m/z e monitorá-lo durante o experimento cromatográfico. Esse modo é denominado monitoramento de íon selecionado.^[28]

2.2 OBJETIVOS

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar o uso do bagaço de cana-de-açúcar como material adsorvente na remoção de íons cobre de amostras de cachaça. Para atingir esse objetivo principal, foram realizadas etapas intermediárias, caracterizando os objetivos parciais do projeto:

- Avaliar o efeito do tratamento do bagaço de cana com diferentes ácidos e em diferentes concentrações.

- Avaliar o efeito do tratamento com bagaço de cana sobre o pH da cachaça.

- Realizar estudos em cromatografia gasosa para verificar se o tratamento da cachaça com o bagaço de cana promove a retirada de compostos orgânicos responsáveis pelas propriedades organolépticas da bebida.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Materiais utilizados

2.3.1.1 Equipamentos

- Estufa de secagem, marca: FANEM, modelo: 320-SE;
- Moinho tipo *wolley* de câmara, marca: MARCONI, modelo: MA 340/A;
- Balança analítica, marca: MARTE, modelo: AY220;
- Medidor de pH, marca: MARCONI, modelo: MA PA200;
- Eletrodo do medidor de pH, marca: DIGIMED, modelo: 0967163;
- Espectrômetro de absorção atômica, marca: VARIAN, modelo: SpectrAA 220/FS;
- Cromatografia Gasosa com Detector Espectrometria de Massas: marca: SHIMADZU, modelo: GC-2010-Plus-MS-QP2010SE.

2.3.1.2 Reagentes

- Ácido clorídrico PA 37% (v/v), marca: ACROS ORGANICS;
- Álcool etílico PA 99,5% (v/v), marca: PROQUÍMIOS;
- Sulfato de cobre penta-hidratado PA, teor > 99% (m/m), marca: ACROS ORGANICS;
- Solução padrão de cobre 1000 mg L⁻¹, marca: MERCK.

2.3.2 Sistema utilizado para remoção de íons cobre nas amostras de cachaça

O sistema empregado para remover íons cobre de amostras de cachaça está ilustrado na Figura 2-3. Nesse sistema, utilizou-se uma bureta de 25 mL preenchida com uma porção de bagaço de cana, como em uma coluna para cromatografia. As amostras foram percoladas pela coluna para avaliação da possível remoção de íons cobre.

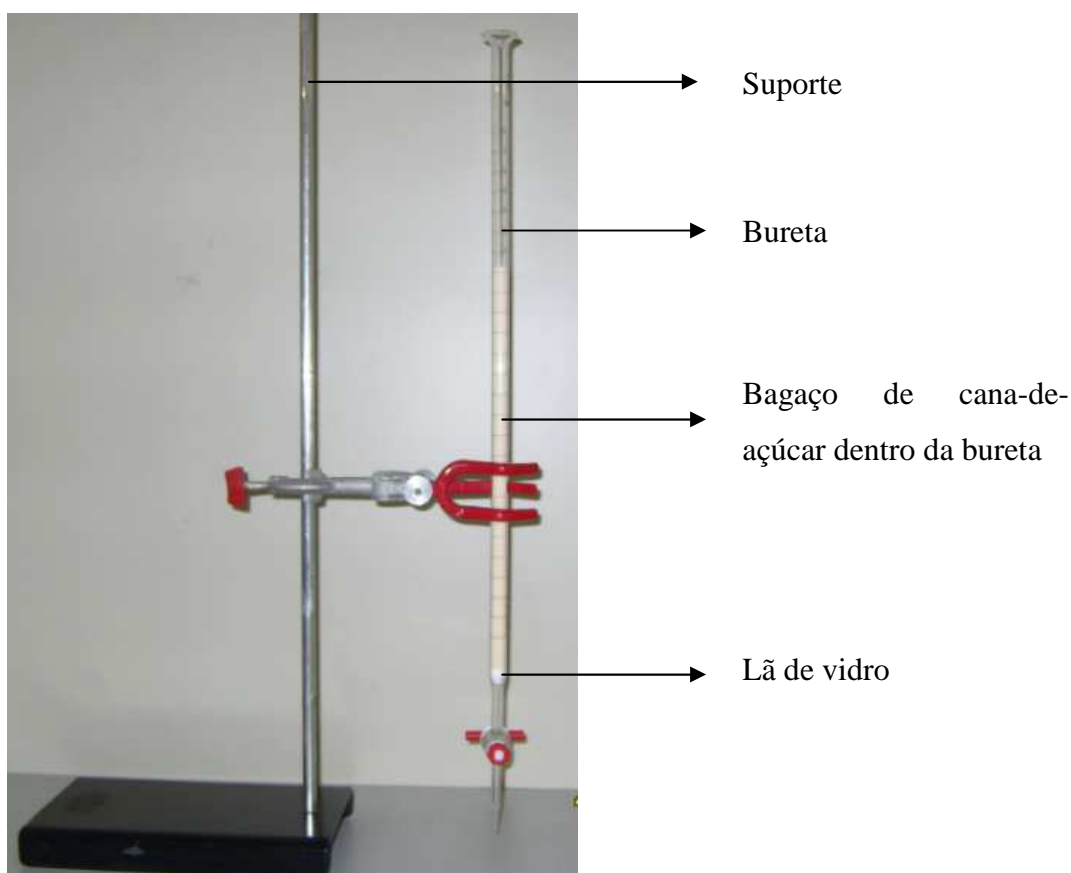


Figura 2-3. Fotografia do sistema utilizado para remoção de íons cobre de amostras de cachaça.

Como pode ser observado, uma pequena porção de lã de vidro foi introduzida no fundo da bureta para servir de apoio para o bagaço de cana. Foram avaliadas porções de 0,5, 1,0 e 1,5 g do material adsorvente (bagaço de cana tratado), que, após introduzido na bureta, foi compactado de maneira uniforme pela vibração da bureta com o auxílio de um bastão de vidro encapado com uma borracha de silicone. Por fim, a cachaça foi introduzida na bureta, deixando-a percorrer toda a coluna, sendo recolhida em frasco apropriado para posterior análise.

2.3.3 Aquisição e preparo do bagaço de cana

O bagaço de cana-de-açúcar foi adquirido em comércios de Contagem/MG que trabalham com esse produto para extração do caldo de cana (garapa).

Esse material foi tratado de acordo com o que foi proposto por SOUSA e colaboradores^[42] quando estudaram seu uso para adsorção de metais em águas residuais. Inicialmente, separou-se o bagaço em duas partes: a esponjosa (interna) e a casca

(externa). Somente a parte interna foi usada para preparar o material empregado na remoção de íons cobre. O bagaço de cana selecionado (esponjoso) foi colocado em bandeja de alumínio e deixado em estufa a 55°C por 24 horas. Em seguida foi triturado em moinho equipado com uma peneira de 20 *mesh*. Depois de triturado, fez-se um tratamento diferenciado em cinco porções de bagaço, sendo 50 g cada porção. No tratamento dado a uma dessas porções, deixou-se 50 g do bagaço em contato por 24 horas em solução de HCl 0,0010 mol L⁻¹. Após o tempo decorrido, retirou-se o excesso do ácido através da filtração do bagaço em filtro de papel e lavagem com água destilada deionizada até obtenção de pH 5 no lavado. Retirou-se o excesso de umidade do bagaço deixando-o em estufa a 55°C por 24 horas. Finalmente, o bagaço foi armazenado em frasco de polietileno para ser usado na remoção de íons cobre de amostras de cachaça. Nas outras quatro porções de bagaço, repetiu-se o mesmo procedimento, mas usando, no lugar da solução de HCl 0,0010 mol L⁻¹, água destilada deionizada e soluções de HCl 0,010, 0,10 e 1,0 mol L⁻¹.

2.3.4 Estudo da eficiência do bagaço de cana

Para avaliar se o tratamento ácido dado ao bagaço de cana causaria alguma influência na eficiência desse material quando usado na descontaminação das amostras de cachaça, foram realizados experimentos utilizando solução alcoólica 40% (v/v) adicionada de cobre a 10,0 mg L⁻¹. Para realizar esses experimentos, foi montado o sistema descrito na *seção* 2.3.2, utilizando de 1,0 g de bagaço de cana tratado sem tratamento ácido, fazendo-se percorrer pela coluna 360 mL da solução alcoólica contendo 10 mg L⁻¹ de cobre. O fluxo foi regulado em torno de 2 mL min⁻¹. A solução alcoólica que passou pela coluna foi recolhida em alíquotas de 20 mL (18 alíquotas) armazenadas separadamente em tubos de ensaios com tampas rosqueáveis, para determinar a concentração de cobre. No restante dos experimentos, o mesmo procedimento foi empregado, diferenciando apenas no bagaço de cana, sendo esses tratados previamente com soluções de HCl a 0,0010, 0,010, 0,10 e 1,0 mol L⁻¹.

Além de verificar a eficiência do tratamento ácido dado ao bagaço de cana, estudou-se também a quantidade desse material utilizada na coluna (bureta). Para isso, foram realizados experimentos semelhantes aos descritos anteriormente, mas utilizando quantidades de 0,5, 1,0 e 1,5 g no preenchimento da coluna, para os bagaços de cana

tratados somente com as soluções de HCl 0,10 e 1,0 mol L⁻¹, pois foram as condições de prévio tratamento que mais aumentou a capacidade de adsorção desse material quando submetido na remoção de cobre em cachaça. Bagaços de cana tratados previamente com água destilada deionizada ou soluções de HCl a 0,0010 e 0,010 mol L⁻¹ não foram empregados nesses experimentos.

Determinou-se a concentração de cobre em todas as alíquotas de solução alcoólica, colhidas após percorrer a coluna, empregando método validado para determinação de cobre em cachaça descrito no Capítulo I.

2.3.5 Amostras

Três amostras (1R, 2R e 3R) de cachaça foram coletadas em estabelecimentos de produção da bebida no interior de Minas Gerais. Essas amostras apresentaram quantidades significativas de cobre e foram submetidas ao procedimento de remoção de cobre descrito na *seção* 2.3.2. Nesses experimentos, utilizou-se 1,5 g do bagaço de cana tratado previamente com solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ como material adsorvente de íons cobre das amostras de cachaça. Fez-se percorrer através da coluna 120 mL de cada amostra de cachaça, a qual foi coletada em frascos de vidro para subsequente análise. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada amostra e a concentração de cobre determinada antes e após tratamento da cachaça para cada uma dessas replicatas.

2.3.6 Qualidade da cachaça após o tratamento com bagaço de cana

Como a cachaça entra em contato com o bagaço de cana quando tratada para remoção de íons cobre, existe a possibilidade da remoção de compostos orgânicos voláteis ou não-voláteis que conferem as propriedades sensoriais da bebida. Portanto foram realizados experimentos em GC-MS para averiguar se houve alteração na qualidade do produto após o tratamento com o bagaço de cana, focando a concentração dos componentes voláteis presente na cachaça.

As análises por GC-MS foram realizadas em triplicata para cada uma das amostras antes e depois do tratamento com o bagaço de cana. Utilizou-se um Cromatógrafo Gasoso com detector de Espectrometria de Massas modelo GC-2010-Plus-MS-QP2010SE (Shimadzu). Foram usadas as seguintes condições: para o CG

CAPÍTULO II - PARTE EXPERIMENTAL

modo de injeção *splitless* com 0,75 minutos de amostragem, temperatura do injetor 250°C, pressão do gás (He) 97,2 kPa com um fluxo total de gás 10 mL min⁻¹, fluxo de gás na coluna 2,09 mL min⁻¹ e 3,0 mL min⁻¹ na purga, controle de fluxo de gás linear e usando uma coluna capilar polar HP-INNOWAX de 60 m x 32 mm e 0,50 µm de espessura do filme de polietilenoglicol; a rampa de aquecimento foi com a temperatura inicial de 40°C com aquecimento até 65°C com uma razão de 6 °C min⁻¹, manteve essa temperatura por 3 minutos, depois aqueceu a coluna até 100°C com uma razão de 3°C min⁻¹, em seguida aqueceu até 185°C com uma razão de 10°C min⁻¹ e depois até 230°C com uma razão de 30°C min⁻¹, totalizando 38,83 minutos para a corrida do CG.

Para o espectrômetro de massas foi usada a temperatura de 230°C para a fonte de íons e de 270°C para a interface, um corte de solvente de 1 minuto e desligamento do filamento nos intervalos e tempo de 5,8 a 7,0 minutos devido a saturação do etanol e de 16,1 a 16,8 minutos presente em grande quantidade nas frações analisadas. As soluções para análise foram preparadas a partir de uma alíquota de 980 µL de cada amostra, que foi transferida para um vial de vidro com septos de silicone revestidos de politetrafluoretileno e, acrescidos de 20 µL do padrão interno 4-metil-1-pentanol a 1 mg L⁻¹ preparado em etanol/água 40 : 60 (v/v).

O pH das amostras de cachaça também foi determinado antes e após o tratamento com o bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se medidor de pH equipado com eletrodo. Além disso, testes qualitativos com nitrato de prata foram realizados com o objetivo de verificar se as amostras continham excesso de íons cloreto provenientes do HCl utilizado para o tratamento do bagaço de cana.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Avaliação do tratamento dado ao bagaço de cana-de-açúcar

A Figura 2-4 apresenta o efeito do tratamento do bagaço de cana com ácido clorídrico em diferentes concentração sobre sua capacidade de adsorção de íons cobre de soluções alcoólicas 40 % (v/v) contendo 10 mg L^{-1} de cobre. Os pontos contidos nas curvas representam as alíquotas de 20 mL coletados no fluxo de 2 mL min^{-1} controlado para a passagem da solução pela coluna. Como observado, a quantidade de cobre adsorvido pelo bagaço de cana aumenta com o aumento da concentração do ácido usado no tratamento desse material. O bagaço de cana tratado com ácido clorídrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ tem capacidade de adsorção de aproximadamente 1,5 vezes maior do que aquele tratado com água destilada deionizada. Comparando a eficiência de adsorção dos bagaços tratados com HCl $0,10$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ observa-se que o segundo extraiu, em média, 15 % mais íons cobre do que o primeiro, para uma mesma alíquota de solução coletada.

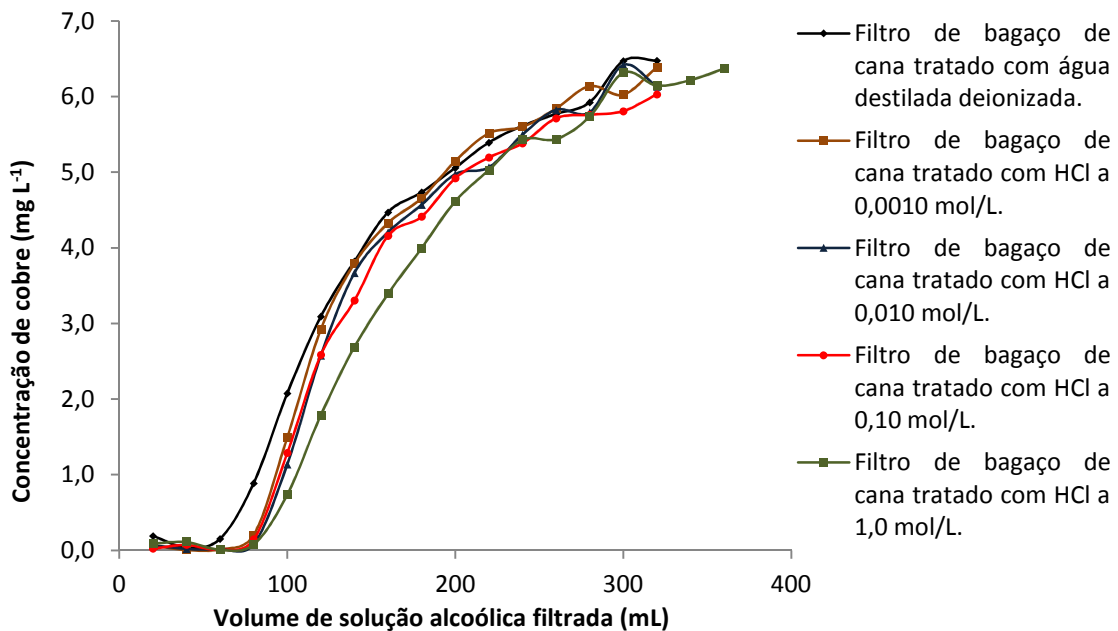


Figura 2-4. Monitoramento da concentração de cobre em solução alcoólica ao filtrá-la em 1,0 g de bagaço de cana tratado. A concentração de cobre na solução alcoólica antes de ser filtrada era de 10 mg L^{-1} .

CAPÍTULO II - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do tratamento do bagaço de cana por ácidos foi investigado por SOUZA e colaboradores^[42]. Esses autores mostraram, por meio da difração de raio-X, espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica, que o bagaço de cana tratado com HCl 1,0 mol L⁻¹ teve sua pureza e área de contato aumentadas, possibilitando maior adsorção de íons.

As Figuras 2-5 e 2-6 mostram a influência da quantidade em massa de bagaços de cana tratados com HCl nas concentrações de, respectivamente, 0,10 e 1,0 mol L⁻¹ sobre a quantidade de cobre removida de soluções alcoólicas 40 % (v/v) contendo 10,0 mg L⁻¹ de cobre.

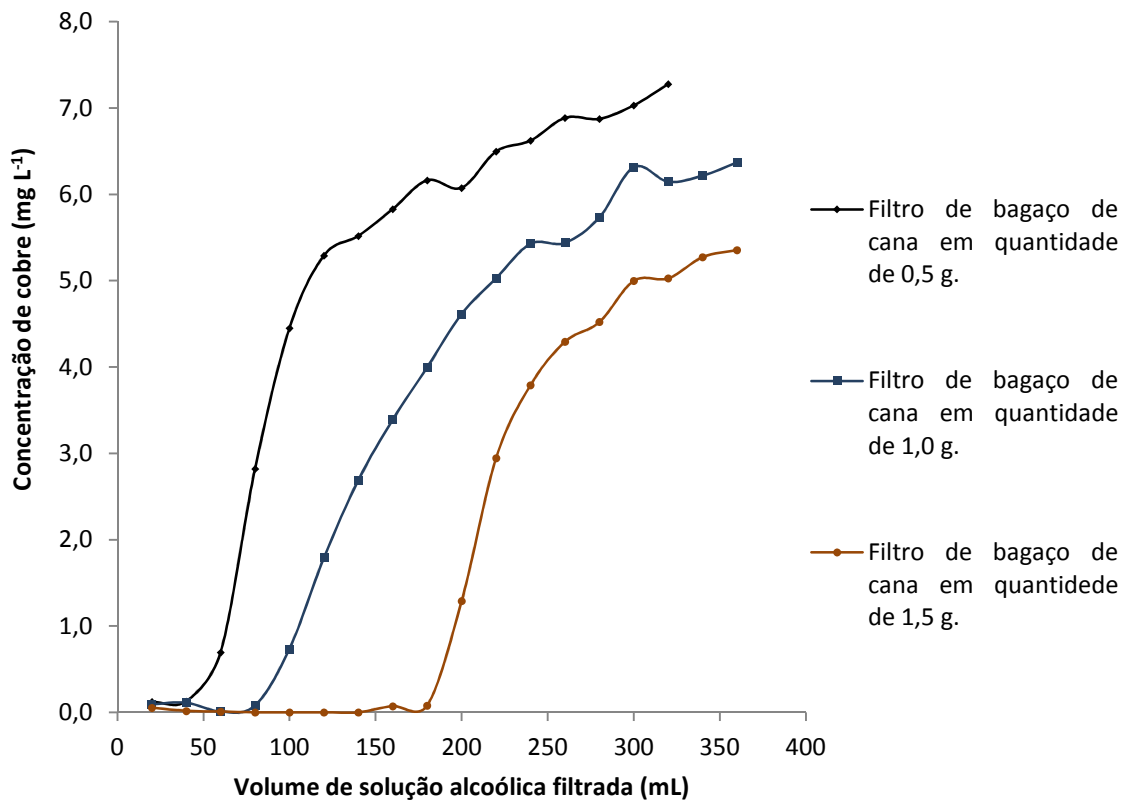


Figura 2-5. Monitoramento da concentração de cobre em solução alcoólica ao filtrá-la em 0,5 g, 1,0 g, e 1,5 g de bagaço de cana tratado com HCl a 1,0 mol L⁻¹. A concentração inicial de cobre na solução alcoólica foi de 10 mg L⁻¹.

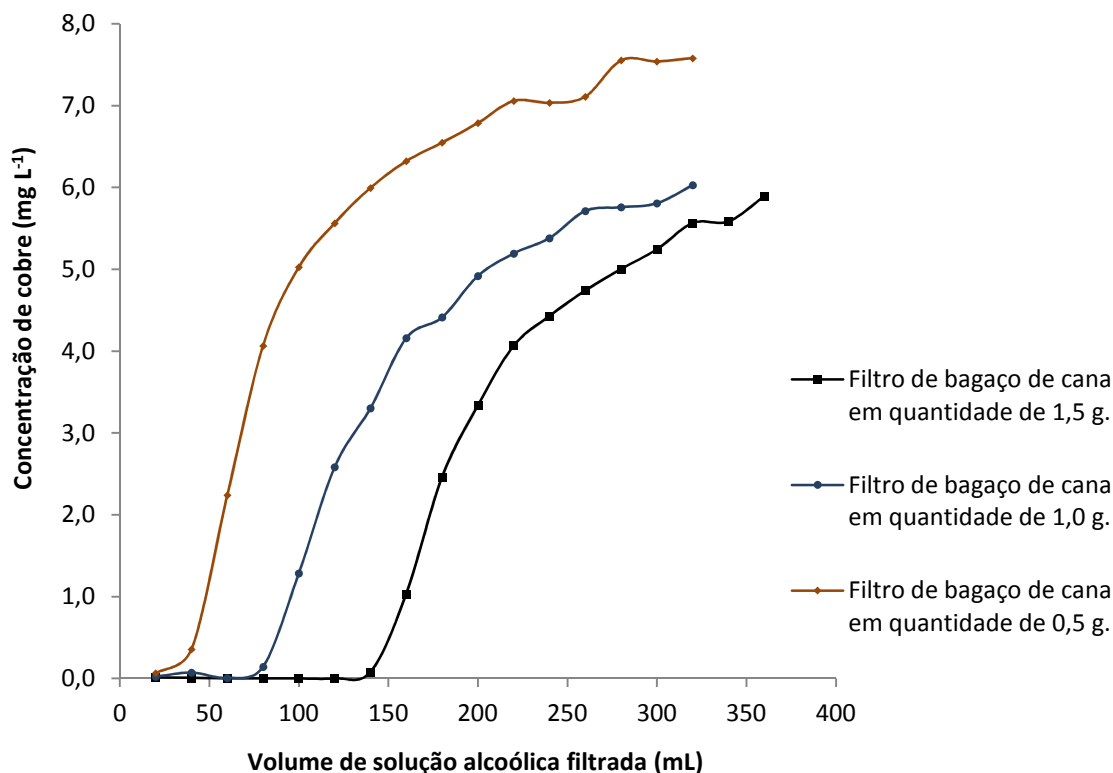


Figura 2-6. Monitoramento da concentração de cobre em solução alcoólica ao filtrá-la em 0,5 g, 1,0 g, e 1,5 g de bagaço de cana tratado com HCl 0,10 mol L⁻¹. A concentração inicial de íons cobre na solução alcoólica antes de ser filtrada era de 10 mg L⁻¹.

Nota-se que, conforme esperado, a eficiência na remoção de íons cobre da solução aumenta à medida que se aumenta a massa de bagaço de cana usado no preenchimento da coluna (bureta). Para ambos os tratamentos ácidos, 0,10 e 1,0 mol L⁻¹, a capacidade de adsorção dobrou quando se aumentou a massa de 0,5 para 1,0 g e triplicou quando se aumentou a massa de 1,5 g. Embora previsíveis, esses resultados foram úteis para mostrar que o método funciona de maneira reprodutível e para selecionar a melhor condição para a aplicação do método nas amostras. Para os estudos subsequentes, os bagaços de cana previamente tratados com água destilada deionizada ou por soluções ácidas de HCl a 0,0010, 0,010 e 0,10 mol L⁻¹ foram desconsiderados. Utilizando apenas o bagaço de cana previamente tratado com HCl 1,0 mol L⁻¹, na quantidade de 1,5 g, pois, esse apresentou maior capacidade de adsorção de íons cobre em cachaça. Nessa condição, o material teve a capacidade de remover íons cobre para níveis abaixo do permitido pelo MAPA (5,0 mg L⁻¹) de aproximadamente 300 mL da solução alcoólica que continha 10,0 mg L⁻¹. Quanto ao nível permitido para exportação (2,0 mg L⁻¹), esse volume foi de aproximadamente 210 mL. Cabe ressaltar que

difícilmente o nível de cobre de uma cachaça produzida com o mínimo de padrão atinge o patamar de 10,0 mg L⁻¹.

2.4.2 Remoção de cobre das amostras de cachaça

A Tabela 2-1 apresenta os resultados obtidos nos experimentos realizados para a remoção de íons cobre das amostras de cachaça empregando 1,5 g de bagaço de cana tratado com 1,0 mol L⁻¹ de HCl. Os ensaios foram realizados para volumes de 120,0 mL de cada amostra.

Tabela 2-1. Concentração de cobre nas amostras de cachaça 1R, 2R e 3R antes e após o tratamento com bagaço de cana-de-açúcar. A, B e C representam triplicatas para cada amostra.

Amostras	Ensaio	Concentração de cobre em mg L ⁻¹	
		Antes do tratamento	Após tratamento com bagaço
1R	A	6,66	0,16
1R	B	6,99	< 0,05
1R	C	7,05	0,07
2R	A	7,71	0,13
2R	B	7,68	< 0,05
2R	C	7,96	0,39
3R	A	3,02	0,23
3R	B	2,78	0,18
3R	C	2,79	0,22

Como pode ser observado, todas as amostras submetidas à remoção de íons cobre com bagaço de cana tiveram níveis do metal reduzidos para concentrações que estão abaixo dos limites máximos permitidos pelo MAPA e também para exportação. Os estudos subsequentes foram realizados para avaliar possíveis alterações em outras propriedades da cachaça, como pH e perfil de compostos orgânicos voláteis e não-voláteis, quando tratada com o bagaço de cana.

2.4.3 Alterações na qualidade da cachaça após remoção do cobre

CAPÍTULO II - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seria inconveniente a alteração da qualidade da cachaça quando se faz o tratamento para eliminação do cobre usando o bagaço de cana-de-açúcar. Como discutido anteriormente, na parte introdutória desse capítulo, existem muitos trabalhos na literatura com várias propostas de materiais que podem ser utilizados para remoção de íons cobre de amostras de cachaça. Entretanto, poucos mostram estudos dos efeitos causados por esses materiais sobre a qualidade da cachaça.

Uma vez que o bagaço de cana foi tratado com HCl 1,0 mol L⁻¹, o pH das amostras de cachaça foi avaliado antes e após os experimentos de remoção de íons cobre. Os resultados obtidos na determinação desse parâmetro nas amostras 1R, 2R e 3R antes e após o tratamento para remoção de cobre encontram-se na Tabela 2-2.

Tabela 2-2. Resultados obtidos para determinação do pH das amostras 1R, 2R e 3R antes e após o tratamento com bagaço de cana. A, B e C representam triplicatas para cada amostra.

Amostras	Ensaio	pH	
		Antes do tratamento	Após tratamento com bagaço
1R	A	4,19	3,95
1R	B	4,17	3,92
1R	C	4,17	4,00
2R	A	4,17	4,15
2R	B	4,18	4,13
2R	C	4,08	4,09
3R	A	3,50	3,66
3R	B	3,52	3,65
3R	C	3,58	3,71

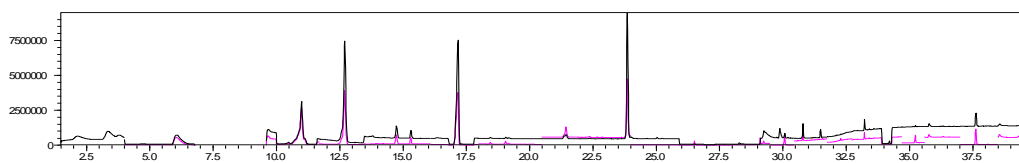
Observa-se que o pH das amostras de cachaça antes e após o tratamento para remoção de cobre com bagaço de cana permanece praticamente o mesmo para as amostras 2R e 3R, e tem uma pequena diminuição na amostra 1R. Esses resultados mostram que mesmo com um tratamento com ácido relativamente concentrado (1,0 mol L⁻¹), o bagaço de cana não modificou significativamente o pH das amostras. Isso pode ser explicado pelo fato de que, como descrito no procedimento experimental, após o tratamento ácido por 24 h, o bagaço de cana foi lavado com água em abundância até obtenção de um pH em torno de 5 no resíduo do lavado. Outro indício de que a lavagem foi eficiente é o fato de que as alíquotas das soluções alcoólicas 40% (v/v) resultantes

CAPÍTULO II - RESULTADOS E DISCUSSÃO

dos experimentos de otimização apresentados na *seção 2.4.1* foram tratadas com solução de AgNO_3 a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e nenhuma precipitação de íons cloreto foi observada.

Experimentos utilizando GC-MS foram primordiais para avaliar possíveis alterações, devido ao tratamento com o bagaço de cana, nas concentrações de compostos orgânicos que são responsáveis pela qualidade da cachaça. Essas alterações podem ocorrer (a) pela transferência de substâncias do bagaço de cana para a cachaça ou (b) pela retenção de substâncias contidas na cachaça pelo bagaço de cana. Ambos os casos foram avaliados pela análise do perfil cromatográfico característico da cachaça antes e após do tratamento, quanto ao número de substâncias detectadas, bem como possíveis aumentos ou diminuições nas concentrações de alguns compostos selecionados. Portanto, a verificação da qualidade da cachaça foi realizada, nesse trabalho, de maneira qualitativa. A Figura 2-7 apresenta os cromatogramas obtidos por GC-MS no modo *full scan* para a amostra de cachaça 1R antes (a) e após o tratamento com o bagaço de cana (b).

a)



b)

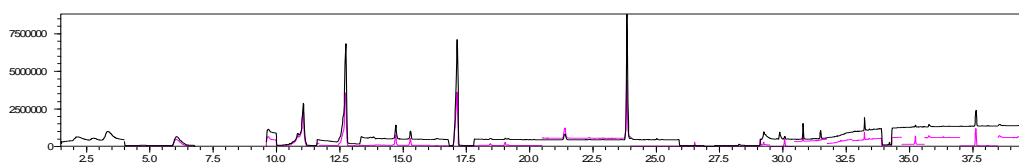


Figura 2-7. Cromatogramas obtidos por CG-MS para a amostra 1R: (a) sem tratamento e (b) após tratamento com bagaço de cana.

Nos cromatogramas apresentados na Figura 2-7, observou-se que não houve diferenças significativas que possam caracterizar o aparecimento de novas substâncias ou a remoção total de outras na cachaça devido ao tratamento com o bagaço de cana.

A Tabela 2-3 lista algumas substâncias tipicamente encontradas em amostras de cachaças e identificadas nos cromatogramas da Figura 2-7.

Tabela 2-3. Algumas substâncias tipicamente encontradas em amostras de cachaças e identificadas nos cromatogramas da Figura 2-8.

Substância	Nome da substância
1	Acetaldeído
2	Dimetil sulfeto
3	Etanoato de etila
4	Óxido de etileno
5	2-Butanol
6	1-Propanol
7	2-Metil-1-propanol
8	2-carbinol-tetrahidropirano
9	1-Butanol
10	4-metil-2-pentanol
11	3-metil-1-butanol
12	Éter isopropil propil
13	1-pentanol
14	3-metil-3-bute-1-ol
15	Éter isopentil metila
16	Fufural
17	Ácido acético
18	Ácido 2-hidroxi-4-metil pentanóico
19	Propanoato de 2-hidroxi- -3-metill-butila
20	2,3-butanodiol
21	Dimetilsulfóxido
22	Decanoato de etila
23	Butanodioato de etila
24	1-Propanol3-metiltiol
25	Etil éster do ácido Eicosanóico
26	Dinitrato de isossorbida
27	Oleato de etila
28	1,4-dioxan-2-i-hidroperóxido
29	Dodecanoato de etila
30	Pentadecanoato de 3-metil butila
31	Ácido hexanóico
32	2-fenil etanol
33	Pentadecanoato de etila
34	Ácido octanóico
35	Octadecanoato de etila
36	Pentadecanoato de etila

CAPÍTULO II - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar possíveis aumentos ou diminuições nas concentrações dos compostos listados na Tabela 2-3 após o tratamento das amostras 1R, 2R e 3R com o bagaço de cana, foram construídos os gráficos representados nas Figuras 2-8, 2-9 e 2-10, respectivamente. As “razões de áreas” representadas pelos eixos y dos gráficos foram calculadas integrando as áreas dos picos de cada espécie e dividindo pela área do padrão interno utilizado (4-metil-2-pentanol). Uma vez que os cromatogramas foram obtidos em triplicata, então foi possível determinar o desvio padrão referente às razões das áreas que representam as substâncias.

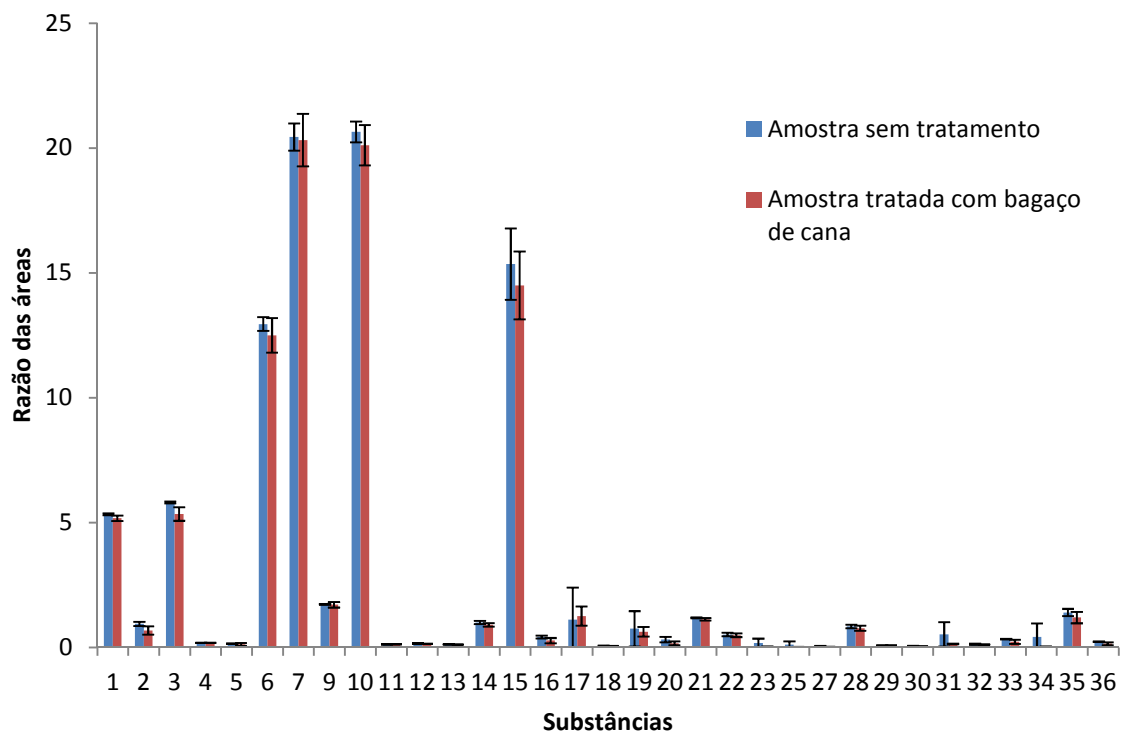


Figura 2-8. Quantidade relativa das substâncias na amostra 1R antes de ser tratada e após tratamento com bagaço de cana-de-açúcar.

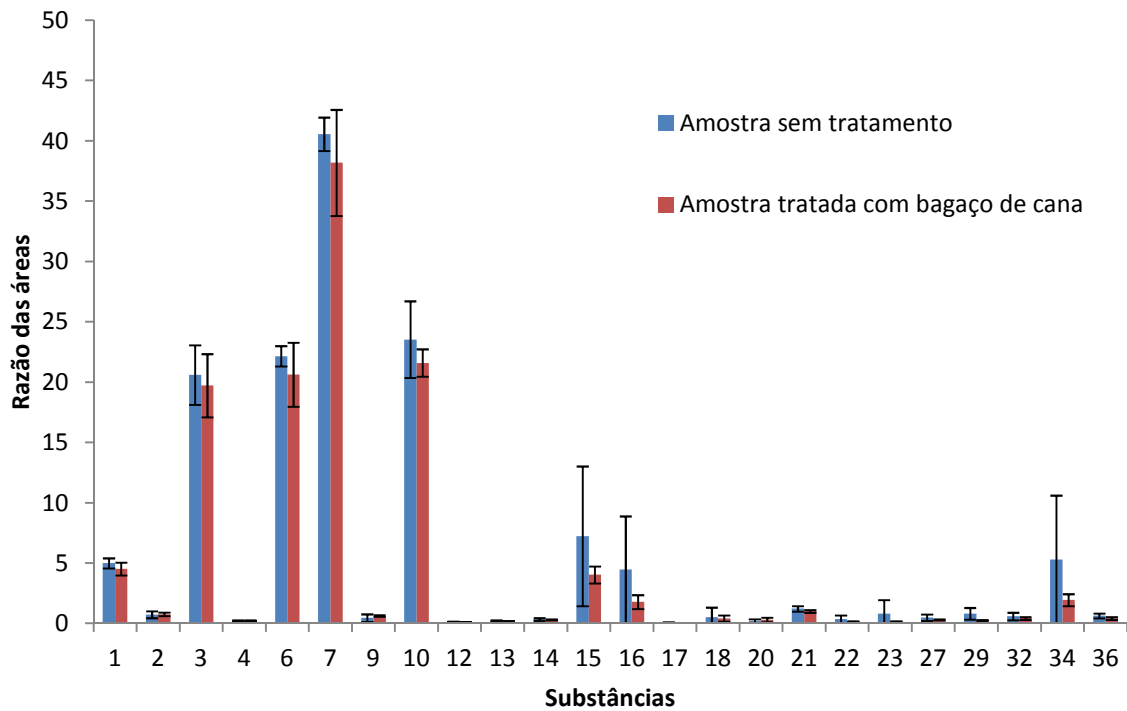


Figura 2-9. Quantidade relativa das substâncias na amostra 2R antes de ser tratada e após tratamento com bagaço de cana-de-açúcar.

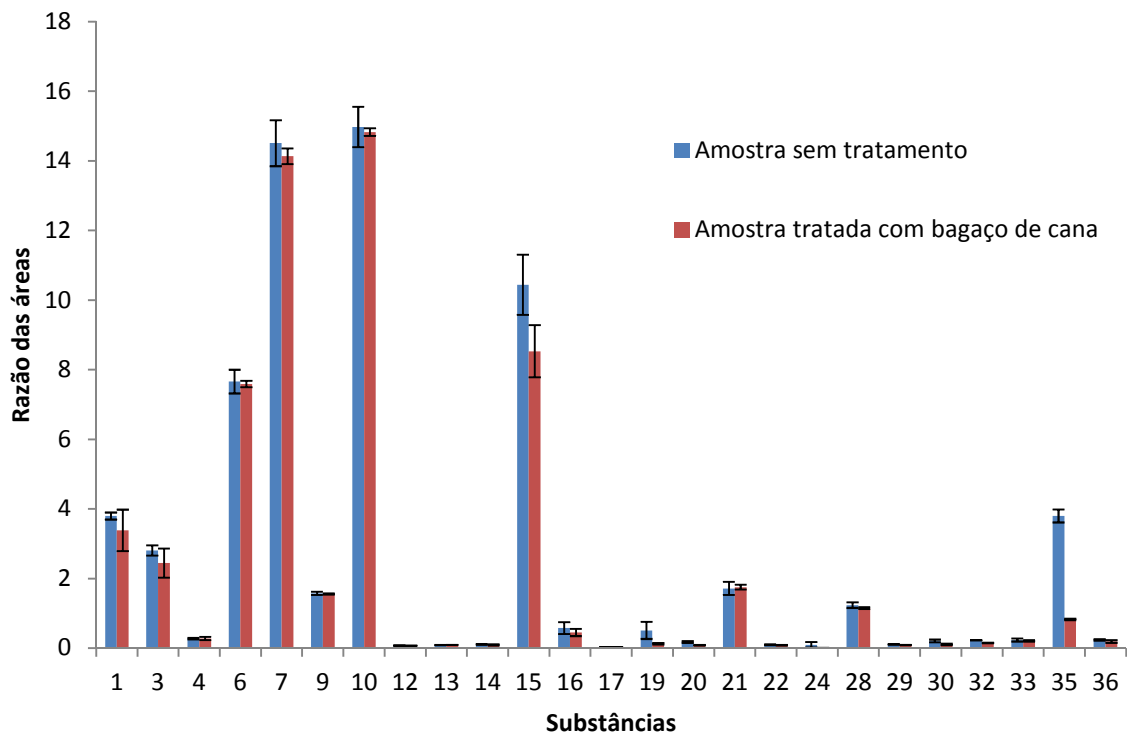


Figura 2-10. Quantidade relativa das substâncias na amostra 3R antes de ser tratada e após tratamento com bagaço de cana-de-açúcar.

CAPÍTULO II - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado, nas Figuras 2-8, 2-9 e 2-10 existe uma tendência para pequenas diminuições nas concentrações dos compostos estudados após o tratamento com o bagaço de cana. Entretanto, para a maioria dos compostos, essa diminuição foi tão baixa que ficou dentro do limite de erro (expresso pelos desvios padrão) da análise considerando as triplicatas. Em outras palavras, quando se considera os desvios padrão não se pode afirmar que houve alteração na quantidade dessas substâncias devido ao tratamento dado à cachaça. As únicas exceções foram observadas para os compostos 15 e 35 da amostra 3R (Figura 2-10). Mesmo assim, não é possível afirmar que a concentração dessas substâncias sofre influência no tratamento, uma vez que para as amostras 1R e 2R as variações ficaram no limite de erro das triplicatas.

Diante desses resultados, pode-se afirmar que não ocorreram mudanças significativas no perfil de concentração dos principais compostos orgânicos voláteis e não-voláteis presentes nas amostras de cachaça, após o tratamento com o bagaço de cana-de-açúcar. Dessa maneira, pode-se inferir que o tratamento sugerido para remoção de íons cobre não altera a qualidade e as propriedades sensoriais da cachaça.

2.5 CONCLUSÃO

Este trabalho apresentou os resultados obtidos na utilização do bagaço de cana-de-açúcar como material de adsorção de íons cobre presentes em amostras de cachaça. Observou-se que 1,5 g de bagaço de cana-de-açúcar tratado com HCl 1,0 mol L⁻¹ foi capaz de reduzir a concentração de íons cobre de um máximo de 210 mg L⁻¹ de uma solução alcoólica 40% (v/v) que continha 10,0 mg L⁻¹, para níveis abaixo do que o permitido para exportação do produto (2,0 mg L⁻¹). Essa eficiência na remoção não é tão alta quando comparada à eficiência das resinas de troca iônica comumente utilizadas para tal propósito. Entretanto, a utilização do bagaço de cana-de-açúcar pode ser uma alternativa de baixo custo para pequenos produtores, uma vez que esse material é um subproduto da própria produção da bebida. Além disso, como discutido na parte introdutória desse capítulo, estudos demonstraram que as resinas de troca iônica, atualmente utilizadas por alguns produtores, podem liberar compostos ftálicos na cachaça, o que é totalmente indesejável, pois estudos mostram que a exposição a essas substâncias podem trazer sérios danos à saúde. Em contrapartida, o bagaço de cana-de-açúcar é um produto natural que, conforme mostrado nos resultados, não libera nenhuma substância na cachaça e não altera a qualidade sensorial da mesma.

Com relação aos outros materiais, discutidos na parte introdutória, já utilizados para remoção de cobre em amostras de cachaça, a saber: carvão ativado, quitosana, MgCO₃ e CaCO₃, é possível fazer uma comparação apenas com o carvão ativado, pois para os outros materiais os autores não avaliaram possíveis mudanças na qualidade da bebida. Com relação ao carvão ativado, pode-se afirmar que o bagaço de cana-de-açúcar é mais adequado para remoção de cobre, uma vez que o carvão ativado promove a remoção de outras substâncias responsáveis pela qualidade sensorial da bebida.

REFERÊNCIAS

- [1] BRASIL, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), “História da Cachaça”, Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. [Acesso em 04.2012].
- [2] P. C. PINHEIRO, M. C. LEAL e D. A. ARAÚJO, “Origem, Produção e Composição Química da Cachaça”, *Química Nova na Escola*, n. 18, p. 3-7, 2003.
- [3] ALAMBIQUE DA CACHAÇA, “A História da Cachaça”, Disponível em: <http://www.alambiquedacachaca.com.br>. [Acesso em 04.2012].
- [4] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), “Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994. Brasília”, Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>. [Acesso em 22.11.2010].
- [5] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), “Instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005. Brasília: Diário Oficial da União de 30/06/2005, Seção 1, p. 3.”, Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>. [Acesso em 22.11.2010].
- [6] R. A. LABANCA, M. B. A. GLÓRIA, V. J. P. GOUVEIA e R. J. C. F. AFONSO, “Determinação dos Teores de Cobre e Grau Alcoólico em Aguardentes de Cana Produzidas no Estado de Minas Gerais”, *Química Nova*, vol. 29, p. 1111-1113, 2006.
- [7] M. B. MIRANDA, N. G. S. MARTINS, A. E. S. BELLUCO, J. HORII e A. R. ALCARDE, “Qualidade Química de Cachaças e de Aguardentes Brasileiras”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 27, n. 4, p. 897-901, 2007.
- [8] A. J. B. LIMA, M. G. CARDOSO, L. G. D. L. GUIMARÃES, J. M. LIMA e D. L. NELSON, “Efeito de Substâncias Empregadas para Remoção de Cobre sobre o Teor de Compostos Secundários da Cachaça”, *Química Nova*, vol. 32, n. 4, p. 845-848, 02 2009.
- [9] L. ODELLO, G. P. BRACESCHI, F. R. F. SEIXAS, A. A. SILVA, C. A. GALINARO e D. W. FRANCO, “Avaliação Sensorial de Cachaça”, *Química Nova*, vol. 32, n. 7, p. 1839-1844, 2009.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [10] L. G. ANDRADE-SOBRINHO, M. BOSCOLO, B. S. LIMA-NETO e D. W. FRANCO, “Carbamato de Etila em Bebidas Alcoólicas (Cachaça, Tiquira, Uísque e Grapa)”, *Química Nova*, vol. 25, n. 6B, p. 1074-1077, 2002.
- [11] INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA (IBRAC), “Mercado Externo”, Disponível em: <http://www.ibrac.net>. [Acesso em 04.2012].
- [12] M. C. R. SANTOS, “Quantificação e Remoção de Íons de Cobre em Aguardente de Cana-de-açúcar”, 2009.66 f. Dissertação (Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Engenharia Mauá, Centro Universitário do Instituto Mauá de tecnologia, São Caetano do Sul. 2009.
- [13] M. ARESTA, M. BOSCOLO e D. W. FRANCO, “Copper(II) Catalysis in Cyanide Conversion into Ethyl Carbamate in Spirits and Relevant Reactions”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, n. 6, p. 2819-2824, 2001.
- [14] G. LOFROTH e T. GEJVALL, “Diethyl Pyrocarbonate: Formation of Urethan in Treated Beverages”, *Science*, vol. 174, n. 15, p. 1248-1250, 1971.
- [15] R. COOK, N. MACCAIG, J. M. B. MACMILLIAN e W. B. LUMSDEN, “Ethyl Carbamate Formation in Grain-based Spirits Part III. The Primary Source”, *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 96, n. 4, p. 233-244, 1990.
- [16] H. L. RIFFIKIN, R. WILSON e T. A. BRINGHURST, “The Possible Involvement of Cu⁺⁺ Peptide/Protein Complexes in the Formation of Ethyl Carbamate”, *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 95, n. 1, p. 121-122, 1989.
- [17] H. L. RIFFIKIN, R. WILSON, D. HOWIE e S. MULLER, “Ethyl Carbamate Formation in the Production of Pot Still Whisky”, *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 95, n. 1, p. 115-119, 1989.
- [18] R. I. AYLOTT, G. C. COCHANE, M. J. LEONARD, L. S. MCDONALD, W. M. MCKENZIE, A. S. MCNEISH e D. A. WALKER, “Ethyl Carbamate Formation in Grain Based Spirits. Part I: Post-Distillation in a Maturing Grain Whisky”, *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 96, n. 1, p. 213-221, 1990.
- [19] Â. C. BOSQUEIRO, “Composição Química da Aguardente de Cana-de-açúcar ao Longo do Processo de Dupla Destilação em Alambique Simples”, 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2010.
- [20] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), “Official

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Methods of Analysis of AOAC International, 16° Ed., 3° Rev.”, 1997.
- [21] INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL), “Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos, Capítulo IX, Bebidas Alcoólicas, 4° Ed.”, 2008.
- [22] F. A. HONORATO, R. S. HONORATO, M. F. PIMENTEL, M. C. U. ARAÚJO. Analytical Curve or Standard Addition Method: How to Elect and Design – A Strategy Applied to Copper Determination in Sugarcane Spirits Using AAS. *Analyst*, v. 127, n. 11, p. 1520-1525, 2002.
- [23] K. MIRANDA, A. G. DIONÍSIO e E. R. PEREIRA-FILHO, “Copper Determination in Sugar Cane Spirits by Fast Sequential Flame Atomic Absorption Spectrometry Using Internal Standardization”, *Microchemical Journal*, vol. 96, p. 99-101, 2010.
- [24] N. M. CALDAS, S. R. OLIVEIRA e J. A. G. NETO, “Feasibility of Internal Standardization in the Direct and Simultaneous Determination of As, Cu and Pb in Sugar-cane Spirits by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 636, p. 1-5, 2009.
- [25] S. A. N. ROCHA, A. F. DANTAS, H. V. JAEGER, A. C. S. COSTA, E. S. LEÃO e M. R. GONÇALVES, “Spectrofotometric Determination of Copper in Sugar-cane Using Biquinoline in the Presence of Ethanol and Triton X-100”, *Spectrochimica Acta Part A*, vol. 71, p. 1414-1418, 2008.
- [26] I. L. KÜCHLER e F. A. M. SILVA, “Método Potenciométrico para Determinação de Cobre em Cachaça”, *Química Nova*, vol. 22, n. 3, p. 339-341, 1999.
- [27] H. J. F. FABRINO, “Emprego de Otimização Multivariada no Desenvolvimento de Métodos para a Determinação de Metais de Interesse em Soro e Sangue Integral Humanos por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite”, 2008. 106 f. Dissertação (Química Analítica) - Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2008.
- [28] SKOOG, WEST, HOLLER e CROUCH, *Fundamentos de Química Analítica*, 8 ed., Thomson, 2005.
- [29] F. R. AMORIM, “Desenvolvimento de Metodologias para Determinação de Cobre, Estanho e Níquel em Peixes e de Alumínio em Refrigerantes por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite”, 2006. 78 f. Dissertação (Química Analítica) - Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belo Horizonte. 2006.
- [30] D. C. Harris, *Análise Química Quantitativa*. 7º Ed. 2008.
- [31] EURACHEM, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, First English Edition 1.0 ed., E. W. Group, Ed., LGC, Queens Rd, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, United Kingdom, 1998.
- [32] BRASIL, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO): DOC.CCGRE-008, “Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos”, Revisão 04-jul/2011.
- [33] BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “Guia para Qualidade em Química Analítica: Uma Assistência à Habilitação”, vol. 1, 2005.
- [34] S. V. C. SOUZA, “Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos”, 2007, 296 f. Tese de Doutorado (Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2007.
- [35] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), “Manual da Garantia da Qualidade Analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos”, 1º ed., Brasília-2011.
- [36] BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), “Instrução Normativa nº 24, de 8 de Setembro de 2005”, Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>. [Acesso em 06.2012].
- [37] JCOLIVIERI CONSULTORIA, “Consultoria em Qualidade e Confiabilidade Metrológica para Laboratórios de Calibrações, Ensaio Físicos e Análises Químicas”, Disponível em: http://jcolivieri.sites.uol.com.br/PrgIntPrec/7rejeicao_de_dispersos.htm. [Acesso em 06.2012].
- [38] B. C. JANEGITZ, A. OLIVEIRA, M. S. GOMES, E. R. SARTORI, E. R. PEREIRA-FILHO e O. FATIBELLO-FILHO, “Removal of Copper (II) from Sugar-cane Spirits Employing Chitosan”, *Química Nova*, vol. 33, n. 2, p. 458-460, 2010.
- [39] E. A. NEVES, A. OLIVEIRA, A. P. FERNANDES e J. A. NÓBREGA, “Simple and Efficient Elimination of Copper (II) in Sugar-cane Spirits”, *Food Chemistry*,

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- vol. 101, p. 33-36, 2007.
- [40] P. P. SOUZA, Z. L. CARDEAL, R. AUGUSTI e P. MORRISON, “Determination of Volatile Compounds in Brazilian Distilled Cachaça by Using Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography and Effects of Production Pathways”, *Journal of Chromatography A*, n. 1216, p. 2881-2890, 2009.
- [41] D. BOTTA e E. MANTICA, “Micropollutants Migration from Ion-Exchange Resins into Water”, *Pergamon*, vol. 33, n. 4, p. 1054-1064, 1999.
- [42] F. W. SOUZA, M. J. SOUZA, I. R. N. OLIVEIRA, A. G. OLIVEIRA, R. M. CAVALCANTE, P. B. A. FECHINE, V. O. S. NETO, D. KEUKELEIRE e R. F. NASCIMENTO, “Evaluation of a Low-cost Adsorbent for Removal of Toxic Metal Íons from Wastewater of an Electroplating Factory”, *Journal of Environmental Management*, vol. 90, p. 3340-3344, 2009.
- [43] M. N. R. ALVES, “Desenvolvimento e Validação de Metodologia para Análise de Cocaína, Derivados e Metabólitos em Amostras de Mecônio Utilizando a Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas”, 2010. 66 f. Dissertação (Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2010.
- [44] A. G. SOUZA, “Avaliação da Estabilidade de Agrotóxicos Frente às Condições de Tratamento de Água Utilizando SPME-CG/MS e ESI/MS”, 2011. 434 f. Tese (Ciências-Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2011.
- [45] A. P. F. M. URZEDO, “Degradação de Substâncias de Relevância Ambiental por Processos Oxidativos e Redutivos com Monitoramento por Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray”, 2008. 158 f. Tese (Ciências-Químicas) - Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2008.