

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química
Campus Araraquara - SP
Programa de Pós-graduação em Química**

João Carlos de Souza

**Determinação íons cobre(II) em aguardente de
cana-de-açúcar utilizando a combinação
spot test - espectroscopia de reflectância difusa**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza
Co – Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Redigolo Pezza

**Araraquara
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

S719d	Souza, João Carlos de Determinação de íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar utilizando a combinação spot test - espectroscopia de reflectância difusa: / João Carlos de Souza. – Araraquara - SP : [s.n], 2015 118 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Leonardo Pezza Coorientador: Helena Redigolo Pezza 1. Aguardente. 2. Cana-de-açúcar . 3. Cobre . 4. Química verde. 5. Reflectância difusa. I. Título.
-------	--

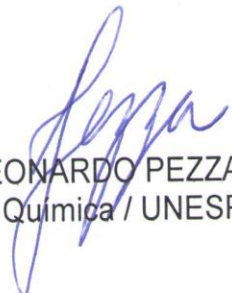
Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

JOÃO CARLOS DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Química.

Araraquara, 03 de junho de 2015.

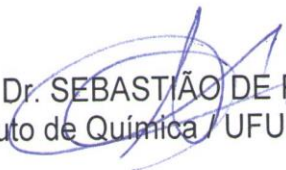
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. LEONARDO PEZZA (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara.



Prof^a. Dr^a. EDILENE CRISTINA FERREIRA
Instituto de Química / UNESP / Araraquara.



Prof. Dr. SEBASTIÃO DE PAULA EIRAS
Instituto de Química / UFU / Uberlândia.

Dedicada ao progresso da química e da ciência como um todo. E que futuramente este trabalho possa servir de ajuda e base para conhecimentos posteriores.

Dados curriculares

1. Dados pessoais

Nome: João Carlos de Souza

Nacionalidade: Brasileira

Nascimento: 23/10/1985 – Uberlândia/MG

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

Departamento de Química Analítica

Grupo de pesquisa “Fritz Feigl”

Rua Professor Francisco Degni, 55

Bairro Jardim Quitandinha - 14800-900

Araraquara - São Paulo - Brasil

Telefone: (16) 3301-9790

Endereço eletrônico: souza_jc33@yahoo.com.br

2. Formação acadêmica/ Titulação

2.1. Graduação

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas

Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Uberlândia – Minas Gerais – Brasil

Conclusão: Dezembro de 2009

Título: “Estudo da determinação de íons cobre(II) em cachaça com 1-(2-piridilazo)-2-naftol e empregando a mistura homogênea dos solventes água – etanol – metilisobutilcetona.”

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras

2.2. Pós-graduação

Mestrado em Química Analítica

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - Instituto de Química

Araraquara – São Paulo – Brasil

Conclusão: Junho de 2015

Título: “Determinação íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar utilizando a combinação spot test - espectroscopia de reflectância difusa.”

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Helena Redigolo Pezza

2.3. Formação complementar

Monitoramento do processo magistral. (Carga horária: 3h).

Instituto de Pesquisa Tecnológica e Controle de Qualidade.

Operação do HPLC isocrático JASCO PU 980. (Carga horária: 2h).

Instituto de Pesquisa Tecnológica e Controle de Qualidade.

Armazenamento de dados pelo sistema Baseline N2000. (Carga horária: 2h).

Instituto de Pesquisa Tecnológica e Controle de Qualidade.

Introdução à validação de métodos ensaios químicos. (Carga horária: 21h).

Universidade Federal de Uberlândia.

Química forense. (Carga horária: 3h).

Universidade Federal de Uberlândia.

Quimiometria-análise multivariada de dados químicos. (Carga horária: 40h).

Universidade Federal de Uberlândia.

Química analítica forense. (Carga horária: 6h).

Universidade Federal da Paraíba.

Agrotóxicos: Destinação final de embalagens vazias. (Carga horária: 6h).

Universidade Federal de Uberlândia.

Produção de açúcar e álcool. (Carga horária: 20h).

Universidade Federal de Uberlândia.

Biossegurança. (Carga horária: 6h).

Universidade Federal de Uberlândia

Cinética química. (Carga horária: 6h).

Universidade Federal de Uberlândia.

Composição química do café. (Carga horária: 6h).

Universidade Federal de Uberlândia.

3. Resumos expandidos publicados em anais de congressos

SOUZA, J. C.; TOCI, A. T.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Otimização das variáveis para construção de um método analítico mais limpo na determinação de íons cobre(II) em aguardente de cana por spot test-reflectância difusa. In: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal. Química e sociedade: motores da sustentabilidade, 2014.

SOUZA, J. C.; BORGES, C. H. R.; LIMA, M. A. O.; EIRAS, S. P. Complexação de Cu^{2+} com PAN no sistema água - etanol - MIC para determinação do íon em cachaça. In: XLVIII Congresso Brasileiro de Química - CBQ, 2008, Rio de Janeiro. Química na produção ao meio ambiente e à saúde, 2008.

LIMA, M. A. O.; ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; EIRAS, S. P. Estudo da complexação de íons Co^{2+} com 2-TTA em mistura homogênea de água - etanol - clorofórmio. In: XLVIII Congresso Brasileiro de Química - CBQ, 2008, Rio de Janeiro. Química na produção ao meio ambiente e à saúde, 2008.

BORGES, C. H. R.; ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; IAMAMOTO, M. S.; EIRAS, S. P. Influência da massa de sílica funcionalizada com PAR e das vazões de percolação da amostra e do eluente na extração sólido - líquido de Mn^{2+} . In: XLVIII Congresso Brasileiro de Química - CBQ, 2008, Rio de Janeiro. Química na produção ao meio ambiente e à saúde, 2008.

4. Resumos publicados em anais de congressos

SOUZA, J. C.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Metodologia analítica ambientalmente mais amigável para determinação de cobre em uísque. In: 67ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Progresso da Ciência, 2015, São Carlos. Luz, Ciência e Ação, 2015.

SOUZA, J. C.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Development of an environmentally more benign reflectometric method for determination of copper(II) ions in sugarcane spirit. In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia. Luz, Química e Ação, 2015.

PEZZA, H. R.; TOCI, A. T.; COLETTA, A.; BORALLE, N.; **SOUZA, J. C.**; PEZZA, L. Autenticidade e rastreabilidade de cafés torrados brasileiro por ¹H-RMN. In: 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal. O papel da química no cenário econômico atual: competitividade com responsabilidade, 2014.

REZENDE, H. P.; **SOUZA, J. C.**; PAIVA, V. A. B.; ALMEIDA, E. S.; EIRAS, S. P.; CRUZ, W. O. Simplex modificado para otimizar variáveis na formação do cis-diol de boro com curcumina na mistura de água – etanol - clorofórmio. In: XV Encontro Nacional de Química Analítica e III Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador. XV Encontro Nacional de Química Analítica, 2009.

SOUZA, J. C.; ALMEIDA, E. S.; REZENDE, H. P.; PAIVA, V. A. B.; EIRAS, S. P. Determinação espectrofométrica de cobre em cachaça empregando PAN e mistura homogênea dos solventes água – etanol - MIC. In: XV Encontro Nacional de Química Analítica e III Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador. XV Encontro Nacional de Química Analítica, 2009.

OLIVEIRA, D. R.; **SOUZA, J. C.**; ALMEIDA, E. S.; IAMAMOTO, M. S.; EIRAS, S. P. Estudo da pré-concentração de soluções de íons Cu²⁺ no sistema de extração sólido - líquido e sílica funcionalizada com PAN. In: XV Encontro Nacional de Química Analítica e III Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador. XV Encontro Nacional de Química Analítica, 2009.

PAIVA, V. A. B.; ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; REZENDE, H. P.; EIRAS, S. P. Determinação de matéria orgânica no solo: uma avaliação do impacto ambiental. In: XV Encontro Nacional de Química Analítica e III Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador. XV Encontro Nacional de Química Analítica, 2009.

LIMA, M. A. O.; **SOUZA, J. C.**; ALMEIDA, E. S.; OLIVEIRA, D. R.; EIRAS, S. P. Avaliação da influência da composição da mistura dos solventes H₂O - EtOH - CHCl₃ na sensibilidade da determinação de íons Co²⁺ com 2-TTA. In: XXII Encontro Regional SBQ-MG, 2008, Belo Horizonte. Integrando pesquisadores em química do estado de Minas Gerais, 2008.

ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; LIMA, M. A. O.; BORGES, C. H. R. ; EIRAS, S. P. Estudo dos interferentes na determinação de Al³⁺ com 8-Hidroxiquinolina em uma mistura de água - etanol - clorofórmio. In: XXII Encontro Regional SBQ-MG, 2008, Belo Horizonte. Integrando os pesquisadores em química do estado de Minas Gerais, 2008.

BORGES, C. H. R.; **SOUZA, J. C.** ; OLIVEIRA, D. R.; IAMAMOTO, M. S.; EIRAS, S. P. Caracterização da sílica gel funcionalizada com 4-(2-piridilazo)-resorcinol. In: XXII Encontro Regional SBQ-MG, 2008, Belo Horizonte. Integrando os pesquisadores em química do estado de Minas Gerais, 2008.

SOUZA, J. C.; LIMA, M. A. O.; ALMEIDA, E. S.; OLIVEIRA, D. R.; EIRAS, S. P. Tratamento de resíduos utilizados na determinação de íons Co²⁺ empregando o sistema água - etanol - clorofórmio. In: XXII Encontro Regional SBQ-MG, 2008, Belo Horizonte. Integrando os pesquisadores em química do estado de Minas Gerais, 2008.

SOUZA, J. C.; ALMEIDA, E. S.; LIMA, M. A. O.; BORGES, C. H. R.; EIRAS, S. P. Estudo dos interferentes na determinação de íons Cu²⁺ em cachaça com PAN e uma mistura de água - etanol - metilisobutilcetona. In: XXII Encontro Regional SBQ-MG, 2008, Belo Horizonte. Integrando os pesquisadores em química do estado de Minas Gerais, 2008.

ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; LIMA, M. A. O.; BORGES, C. H. R.; EIRAS, S. P. Estudo da influência da temperatura e do tempo na determinação de Al³⁺ com 8-hidroxiquinolina e uma mistura de água - etanol - clorofórmio. In: 31 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. Sociedade Brasileira de Química, 2008.

SOUZA, J. C.; ALMEIDA, E. S.; LIMA, M. A. O.; EIRAS, S. P. Avaliação do teor de cobre em cachaça empregando misturas dos solventes água - etanol - acetona e detecção por absorção atômica. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. Ciências e tecnologias analíticas: uma abordagem multidisciplinar da química analítica, 2007.

ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; LIMA, M. A. O.; EIRAS, S. P. Estudo da complexação de íons Al^{3+} com 8-hidroxiquinolina em mistura homogênea de água - etanol - clorofórmio. In: XXI Encontro Regional SBQ-MG, 2007, Uberlândia. Integrando os pesquisadores em Química do estado de Minas Gerais, 2007.

5. Apresentações de Trabalho

PEZZA, H. R.; TOCI, A. T.; COLETTA, A.; BORALLE, N.; **SOUZA, J. C.**; PEZZA, L. 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2014.

SOUZA, J. C. Estudo da extração por fase única de alumínio: sistema água – etanol - clorofórmio e 8-hidroxiquinolina. IX Encontro Interno e XIII Seminário de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq/FAPEMIG da Universidade Federal de Uberlândia. 2009.

6. Participação em eventos

67ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Metodologia analítica ambientalmente mais amigável para determinação de cobre em uísque. 2015.

38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Development of an environmentally more benign reflectometric method for determination of copper(II) ions in sugarcane spirit. 2015.

54º Congresso Brasileiro de Química. Otimização das variáveis para construção de um método analítico mais limpo na determinação de íons cobre(II) em aguardente de cana por spot test-reflectância difusa. 2014.

Ferramenta para o desarmamento e a não proliferação de armas de destruição em massa. Palestra Programa Nacional de Integração Estado-Empresa na Área de Bens Sensíveis - PRONABENS. 2009.

XLVIII Congresso Brasileiro de Química - CBQ. Determinação espectrofotométrica de cobre em cachaça empregando PAN e mistura homogênea de solventes água – etanol -MIC. 2008.

XXII Encontro Regional SBQ-MG. Estudo dos interferêntes na determinação de íons Cu^{2+} em cachaça com PAN e uma mistura de água – etanol - metilisobutilcetona. 2008.

Comemoração do dia nacional do químico. 2008.

14º Encontro Nacional de Química Analítica. Avaliação do teor de cobre em cachaça empregando mistura dos solventes água – etanol - acetona e detecção por absorção atômica. 2007.

XXI Encontro Regional SBQ-MG. Estudo da complexação de íons Al^{3+} com 8-hidroxiquinolina em mistura homogênea de água – etanol - clorofórmio. 2007.

I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba - IV Mostra de Pós-Graduação - III Jornada Científica de Química. 2006.

II Semana da Química - II Escola de Inverno. 2006.

Comemoração ao dia Nacional do Químico. 2005.

7. Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

SOUZA, J. C. XXI Encontro Regional SBQ-MG. 2008.

“Sem este empenho em superar os obstáculos de dentro e de fora, não nos será concedido o prêmio. Ninguém será premiado, se não lutar verdadeiramente, e não seria autêntico o combate se faltasse o adversário com quem pelejar. Portanto, se não houver adversário, não haverá coroa; pois não pode haver vencedor, onde não há vencido.”

Josemaria Escrivá

Agradecimentos

Ao Instituto de Química, Campus de Araraquara – SP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP pelas facilidades e recursos concedidos à realização deste trabalho;

Em especial ao Prof. Dr. Leonardo Pezza e a Prof^a. Dr^a. Helena Redigolo Pezza pela orientação, amizade, paciência e pelos ensinamentos ao qual levarei comigo pelo resto da vida. E peço desculpas pelos momentos que fiquei aquém de suas expectativas;

Aos companheiros de trabalho do Grupo de Pesquisa “Fritz Feigl” pela amizade, momentos de dificuldades, alegrias vividas juntos durante toda a jornada e pelas proveitosas discussões no decorrer deste trabalho;

Agradecimento especial ao grande amigo Paulo Roberto Aparecido Bueno de Toledo pela verdadeira amizade, pelas infinitas ajudas não só no decorrer deste trabalho, pelos conselhos, pelas proveitosas conversas, por todos os momentos de descontração que também foram importantes para mim e pela paciência de ter que me aguentar por todo esses anos. Meu sincero muito obrigado;

Aos professores, funcionários do Instituto de Química, Campus Araraquara – SP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, que diretamente e indiretamente ajudaram no decorrer do curso e na realização deste trabalho;

Aos novos amigos conquistados no decorrer do curso de mestrado pela amizade, momentos de dificuldades e alegria vividos juntos durante toda a jornada;

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro a pesquisa;

Aos meus pais por me proporcionarem a chance de realizar o mestrado, e por todo o amor e apoio dedicados, não só durante esta etapa, como também por todas as outras escolhas de minha vida;

A todos os demais familiares que sempre me apoiaram e incentivaram em todo o decorrer da minha vida.

Resumo

A presença de elevadas concentrações de íons cobre(II) na aguardente a torna prejudicial à saúde humana e também é uma das causas que têm impedido o Brasil de atingir níveis maiores de exportação do produto. No Brasil, o limite máximo de cobre permitido em aguardente pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) é de 5,00 mg.L⁻¹, sendo que em países da União Européia e Estados Unidos esses limites são mais rigorosos, não permitindo mais que 1,00 e 2,00 mg.L⁻¹, respectivamente. Assim, o presente trabalho propõe um novo método analítico simples, rápido, seguro, sensível, econômico, portátil, com baixo consumo de reagentes, geração de mínima quantidade de resíduos e ambientalmente mais amigável para determinação de íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar. Para processar a reação utilizou-se o agente cromogênico 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) e detecção por espectroscopia de reflectância difusa combinada com *spot test*. A reação de formação do complexo bis[1-(2-piridilazo)-2-naftalato]cobre(II) (Cu(PAN)₂) foi realizada em papel de filtro, por meio da adição de 30 µL da solução do reagente cromogênico, com posterior secagem do papel e em seguida a adição de 30 µL da solução do analito. A máxima formação do produto ocorreu com concentração do agente cromogênico PAN de 0,12% m/v em etanol, concentração alcoólica de 40,0% v/v em pH 5,00 e 5 minutos de tempo de reação com detecção a 559 nm. Verificou-se que íons cádmio(II), cobalto(II), chumbo(II), ferro(III), manganês(II), níquel(II) e zinco(II) são interferentes na reação. Desta forma, empregou-se ácido malônico e tripolifosfato pentassódico (trifosfato de sódio) como agentes mascarantes a uma concentração de 0,25% m/v, reduzindo os efeitos de interferência para aproximadamente 2,0% e o deixando dentro dos limites toleráveis. Nas condições otimizadas de determinação de íons cobre(II), uma curva analítica foi construída e sua equação é descrita por $\Delta Abs = 0,0121 C_{Cu(II)} + 0,0038$ ($r^2 = 0,9982$), com faixa linear: 1,0 mg.L⁻¹ - 10,0 mg.L⁻¹ de íons cobre(II). O método apresenta limite de detecção e de quantificação, calculados em relação ao desvio padrão do branco de reagentes, iguais a 0,12 mg.L⁻¹ e 0,47 mg.L⁻¹ de íons cobre(II), respectivamente. O método apresentou bons valores de desvio padrão relativo (RSD) intradia e interdia iguais a 1,82% e 2,64% respectivamente. O método foi aplicado à amostras de aguardentes de cana-de-açúcar comerciais e os resultados foram comparados com os obtidos pela metodologia oficial, mostrando concordância estatística em relação à precisão e à exatidão.

Palavras Chave: reflectância difusa, spot test, aguardente de cana-de-açúcar, cobre.

Abstract

The presence of high concentrations of copper(II) ions in sugarcane spirits become harmful to human health and is also one of the causes that have prevented Brazil from achieving higher levels of exports of the product. The maximum limit of copper in spirit allowed by MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Supply) is 5.00 mg.L⁻¹, and in European Union countries and the United States these limits are more stringent, not allowing more than 1.00 e 2.00 mg.L⁻¹ respectively. In light of the above, this work proposes a new analytical method that is simpler, fast, safe, sensitive, economical, portable, with low reagent consumption, generating minimal waste and environmentally more friendly for the determination of copper(II) ions in Brazilian sugarcane spirits. To process the reaction, the methodology used involved chromogenic agent 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) and detection by diffuse reflectance spectroscopy combined with spot test. The reaction of complex formation bis[1-(2-pyridylazo)-2-naphthalate]copper(II) (Cu(PAN)₂) was carried out on a filter paper through the addition of 30 µL solution of the chromogenic reagent with subsequent drying of the paper, and 30 µL of analyte solution was added thereafter. The maximum product formation occurred at 559 nm with PAN chromogenic agent concentration of 0.12% m/v in ethanol, alcohol concentration of 40.0% v/v at pH 5.0 and 5 minute reaction time. Cadmium(II) ions, cobalt(II), lead(II), iron(III), manganese(II), nickel(II) and zinc(II) were found to interfere in the reaction. By virtue of that, malonic acid and pentasodium tripolyphosphate (sodium triphosphate) were used as masking agents at a concentration of 0.25% m/v, reducing the effects of interference at about 2.0% and leaving it within tolerable limits. In order to optimize the determination of copper(II) ions, an analytical curve was constructed and its equation is described by $\Delta\text{Abs} = 0,0121 C_{\text{Cu(II)}} + 0,0038$ ($r^2 = 0,9982$), with a linear range of 1.0 mg.L⁻¹ – 10.0 mg.L⁻¹ of copper(II) ions. The method presents limit of detection and quantification calculated relative to blank standard deviation equal to 0.12 mg.L⁻¹ and 0.47 mg L⁻¹ of copper (II) ions, respectively. The method showed good values of intraday and interday precision, with RSD equal to 1.82% and 2.64% respectively. The method was applied to the commercial samples of sugarcane spirits and the results were compared with those obtained by the official methodology, showing agreement as to the accuracy.

Keywords: diffuse reflectance, spot test, sugarcane spirit, copper.

Lista de figuras

Figura 1 -	Fluxograma ilustrativo do processo de produção da aguardente de cana-de-açúcar.....	38
Figura 2 -	Esquematização do acessório de reflectância difusa portátil composto de uma esfera integradora e uma fibra óptica acoplado a um espectrômetro.....	58
Figura 3 -	Procedimento para a realização da reação, confecção e leitura dos <i>spots tests</i>	68
Figura 4 -	Suporte metálico utilizado para a confecção dos <i>spots tests</i>	68
Figura 5 -	Exemplo de <i>spot test</i> realizado em papel de filtro com obtenção de mancha colorida uniforme.....	69
Figura 6 -	Espectrômetro portátil, esfera integradora e fibra óptica.....	70
Figura 7 -	Sistema de medidas de reflectância difusa portátil montado.....	71
Figura 8 -	Complexo formado no <i>spot test</i> entre íons cobre(II) e o agente cromogênico PAN.....	80
Figura 9 -	Manchas no <i>spot test</i> de acordo com adição dos reagentes.....	81/82
Figura 10 -	Reação química entre o agente cromogênico PAN e os íons cobre(II).....	83
Figura 11 -	Espectro de absorção, na faixa de 400 a 700 nm, do agente cromogênico PAN e do composto de coordenação Cu(PAN)_2 no <i>spot test</i>	84
Figura 12 -	Variação da absorvância de Cu(PAN)_2 em função da concentração alcoólica da solução (% v/v).....	85
Figura 13 -	Variação da absorvância de Cu(PAN)_2 , a 559 nm, em função da adição de surfactante.....	85
Figura 14 -	Variação da absorvância de Cu(PAN)_2 , a 559 nm, em função do solvente utilizado na solução do agente cromogênico PAN.....	87
Figura 15 -	Variação da absorvância de Cu(PAN)_2 , a 559 nm, em função da concentração (% m/v) de PAN em etanol.....	88
Figura 16 -	Superfície de resposta referente as variáveis pH e tempo na formação do complexo.....	90
Figura 17 -	Estabilidade óptica do agente cromogênico PAN ($\lambda = 480$ nm) em <i>spot test</i> entre 0 e 120 minutos.....	91
Figura 18 -	Estabilidade óptica do agente cromogênico PAN ($\lambda = 480$ nm) em <i>spot test</i> durante o período de uma semana.....	92
Figura 19 -	Estabilidade óptica do complexo ($\lambda = 559$ nm) em <i>spot test</i> entre 0 e 120 minutos.....	92

Figura 20 -	Curva analítica de calibração para íons cobre(II).....	93
Figura 21 -	Variação do fator de interferência em função da concentração do mascarante ácido malônico.....	100
Figura 22 -	Variação do fator de interferência em função da concentração do mascarante trifosfato de sódio.....	101
Figura 23 -	Variação do fator de interferência em função da concentração dos mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio.....	101
Figura 24 -	Curva analítica de calibração para íons cobre(II) com a presença dos mascarantes.....	102

Lista de tabelas

Tabela 1	- Padrões de identidade e qualidade da aguardente de cana-de-açúcar e cachaça, regulamentada pela Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005.....	46
Tabela 2	- Concentração máxima de compostos orgânicos e inorgânicos presentes em aguardente de cana-de-açúcar para o sistema de qualidade selo paulista.....	48
Tabela 3	- Prováveis íons interferentes encontrados em aguardente de cana, suas condições de reação e limites máximos permitidos.....	74
Tabela 4	- Planejamento fatorial 2^2 , tipo estrela com ponto central, para otimização das variáveis pH e tempo.....	89
Tabela 5	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons cádmio(II).....	94
Tabela 6	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons cobalto(II).....	94
Tabela 7	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons chumbo(II).....	94
Tabela 8	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons ferro (III).....	95
Tabela 9	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons manganês(II).....	95
Tabela 10	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons níquel(II).....	95
Tabela 11	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons zinco(II).....	96
Tabela 12	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para o conjunto de todos os íons.....	96
Tabela 13	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons cádmio(II) com o mascarante ácido malônico.....	97
Tabela 14	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons cobalto(II) com o mascarante ácido malônico.....	97
Tabela 15	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons ferro(III) com o mascarante ácido malônico.....	97
Tabela 16	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons níquel(II) com o mascarante ácido malônico.....	98
Tabela 17	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons chumbo(II) com o mascarante trifosfato de sódio.....	98
Tabela 18	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons manganês(II) com o mascarante trifosfato de sódio.....	98
Tabela 19	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons zinco(II) com o mascarante trifosfato de sódio.....	99
Tabela 20	- Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para o conjunto de todos os íons com os mascarantes ácido malônico e	

	trifosfato de sódio.....	99
Tabela 21 -	Valores de recuperação, desvio padrão, teste estatístico “t” e erro relativo de íons cobre(II) obtida nas amostras sintéticas de aguardente de cana-de-açúcar.....	103
Tabela 22 -	Valores de recuperação obtidos de íons cobre(II) nas amostras de aguardente de cana-de-açúcar.....	104
Tabela 23 -	Teor de íons cobre(II) nas amostras comerciais de aguardente de cana-de-açúcar.....	105

Lista de siglas e abreviaturas

A.C. – antes de Cristo

ABRABE - Associação Brasileira de Bebidas

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

C_{Cu(II)} – concentração de íons cobre(II)

Cu(PAN)₂ - bis[1-(2-piridilazo)-2-naftalato]cobre(II)

D.C. – depois de Cristo

DTAB – Brometo de dodecil trimetil amônio

EDTA - Etilendinitrilotetracético

EFS - extração em fase sólida

F.I. – fator de interferência

FAAS - espectrometria de absorção atômica com chama

FBN - Food Nutritional Board

FS-AAS - espectrometria de absorção atômica sequencial rápida

GFAAS - espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

IBRAC – Instituto Brasileiro de Cachaça

IWSR - International Wine and Spirit Record

LDR - light dependent resistor

LED - light emitting diode

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

min. – minutos

P.A. – para análise

PAN – 1-(2-piridilazo)-2-naftol

PBDAC - Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça

pH – potencial hidrogenionico

RDA - Recommended Dietary Allowance

RSD – desvio padrão relativo

SDS – Dodecil sulfato de sódio

USA – United States of America

UV-VIS – ultravioleta e visível

vol – volume

ΔAbs – variação de absorvância

Lista de símbolos

[Cu(II)] – concentração de íons cobre(II)

[CuCO₃Cu(OH)₂] - Diidróxido de cobre(II)

< - menor que

°C – graus Celsius

A – absorvância

b – espessura do caminho óptico

c – concentração do analito

cm – centímetros

d – diâmetro

f – função

g – gramas

g.L⁻¹ – gramas por litro

g/L – gramas por litro

k – coeficiente de absorção molar do analito

m/v – massa/volume

mA – mili ampere

mg – miligramas

mg.L⁻¹ – miligramas por litro

mL – mililitros

mmol.L⁻¹ – milimol por litro

mol.L⁻¹ – mol por litro

nm - nanômetros

°Brix – graus Brix

P – potência

r² – coeficiente de determinação

R_∞ - razão entre a intensidade de radiação refletida pela amostra e a de um padrão não absorvente

s – coeficiente de dispersão ou de espalhamento de radiação

t – tempo

UpH – unidades de potencial hidrogeniônico

v/v – volume/volume

ϵ – coeficiente de absortividade molar da substância

$\mu\text{g.L}^{-1}$ – microgramas por litro

μL – microlitros

Sumário

1. Introdução.....	25
2. Revisão bibliográfica.....	31
2.1. Contexto histórico do surgimento das bebidas fermento-destilladas.....	31
2.2. Contexto histórico da Aguardente de cana-de-açúcar.....	32
2.3. Contexto Atual.....	35
2.4. O processo de produção.....	37
2.5. Matéria-prima.....	38
2.6. Preparo do caldo.....	39
2.7. Fermentação.....	40
2.8. Destilação.....	41
2.9. Envelhecimento.....	44
2.10. Legislação e qualidade da aguardente de cana-de-açúcar.....	45
2.11. Cobre.....	48
2.12. Métodos de determinação de cobre em aguardente de cana.....	50
2.13. Química verde: conceitos básicos.....	53
2.14. Espectroscopia de reflectância difusa – considerações gerais.....	55
2.15. Aspectos teóricos da espectrometria de reflectância difusa no UV/VIS e Lei de Beer.....	55
2.16. Instrumentação.....	58
2.17. Aplicações da espectroscopia de reflectância difusa.....	59
2.18. Spot test.....	60
3. Objetivos.....	62
3.1. Objetivos gerais.....	62
3.2. Objetivos específicos.....	62
4. Parte experimental.....	62
4.1. Materiais e reagentes.....	62
4.1.1. Instrumental.....	62
4.1.2. Materiais de vidro e diversos.....	63
4.1.3. Reagentes.....	63
4.1.4. Soluções.....	64
4.2. Testes preliminares.....	67

4.3. Ordem de adição dos reagentes.....	69
4.4. Avaliação do volume adicionado dos reagentes.....	69
4.5. Espectro de absorção.....	70
4.6. Avaliação do grau alcoólico da solução de cobre(II).....	71
4.7. Avaliação do uso de meio micelar.....	71
4.8. Avaliação do solvente da solução do agente cromogênico.....	72
4.9. Concentração do agente cromogênico na formação do complexo.....	72
4.10. Estudo quimiométrico do pH e tempo de reação.....	73
4.11. Avaliação da estabilidade óptica.....	73
4.12. Curva analítica de calibração para os íons cobre(II).....	74
4.13. Levantamento e estudo dos possíveis interferentes.....	74
4.14. Estudo da redução e/ou eliminação do efeito de interferência.....	76
4.15. Otimização da concentração dos mascarantes.....	76
4.16. Curva analítica de calibração com a presença dos mascarantes.....	77
4.17. Precisão e exatidão do método.....	77
4.18. Avaliação do efeito de matriz.....	78
4.19. Determinação de íons cobre(II) em amostras de aguardente de cana-de-açúcar comerciais.....	78
5. Resultados e discussões.....	79
5.1. Testes preliminares.....	79
5.2. Ordem de adição dos reagentes.....	80
5.3. Avaliação do volume adicionado dos reagentes.....	82
5.4. Espectro de absorção.....	83
5.5. Avaliação do grau alcoólico da solução de cobre(II).....	84
5.6. Avaliação do uso de meio micelar.....	85
5.7. Avaliação do solvente da solução do agente cromogênico.....	86
5.8. Concentração do agente cromogênico na formação do complexo.....	87
5.9. Estudo quimiométrico do pH e tempo de reação.....	88
5.10. Avaliação da estabilidade óptica.....	90
5.11. Curva analítica de calibração para os íons cobre(II).....	93
5.12. Levantamento e estudo dos possíveis interferentes.....	93
5.13. Estudo da redução e/ou eliminação do efeito de interferência.....	96
5.14. Otimização da concentração dos mascarantes.....	100

5.15. Curva analítica de calibração com a presença dos mascarantes.....	102
5.16. Precisão e exatidão do método.....	103
5.17. Avaliação do efeito de matriz.....	103
5.18. Determinação de íons cobre(II) em amostras de aguardente de cana-de-açúcar comerciais.....	104
6. Conclusões.....	106
Referências.....	108

1. Introdução

As bebidas alcoólicas fazem parte da alimentação, da cultura e da história de diversas sociedades há milhares de anos.

Se considerado tal contexto, a aguardente de cana-de-açúcar é uma bebida jovem, com aproximadamente quinhentos anos de idade. No entanto é uma bebida cuja história se inicia com o nascimento do Brasil, onde o país e a bebida evoluíram juntos.

A aguardente de cana-de-açúcar, um produto fermento-destilado, é obtido a partir da cana-de-açúcar. Originária da Ásia, provavelmente da Índia, a cana-de-açúcar chegou à Europa pelos mouros. Pelo Mar Mediterrâneo entrou na Itália e logo foi plantada em Portugal. Da Europa, os portugueses a levaram para a Ilha da Madeira e, em seguida, à nova colônia na América. (1)

Embora conhecendo a técnica de destilação e tendo a cana-de-açúcar plantada em seu país, não há registros da produção de destilado de cana por portugueses em Portugal. A cana-de-açúcar, o açúcar e a aguardente tinham seu destino traçado para terras mais distantes. (2)

No Brasil, o açúcar e a aguardente de cana-de-açúcar surgiram nas capitânicas hereditárias, e de lá passaram ao mundo, como produto brasileiro, criando uma identificação com o país e sua gente. O ciclo econômico oriundo da cana foi vital para o surgimento da nação brasileira e os produtos derivados da cana se destacam até hoje em nossa pauta de exportações. Porém, o passado imponente foi apagado para a aguardente de cana-de-açúcar. A bebida foi associada à escravidão e a problemas sociais. 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 o vinho e a bagaceira (aguardente de bagaço de uva), trazidos de Portugal. (3)

Nessa época, o consumo de aguardente de cana-de-açúcar 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 aguardente do que a 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.

Logo vieram as taxas e impostos sobre a produção e comercialização da aguardente. 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 côrte para o Rio de Janeiro, em 1808, a aguardente de cana-de-açúcar já era considerada um dos principais produtos da economia local 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. (4)

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 escravidão 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 aguardente, uma vez que eles buscavam uma identidade mais próxima da europeia. (3,5)

Somente durante a Semana de Arte Moderna de 1922, quando se buscou as raízes brasileiras, é que a aguardente voltou timidamente a ser considerada um símbolo da cultura nacional. (3)

Então com o tempo, a aguardente foi estigmatizada e sua importância histórica e econômica é pouco lembrada. Entretanto, nos últimos anos, o preconceito vem sendo posto de lado e a aguardente de cana-de-açúcar de qualidade passou a ser um produto valorizado no Brasil e no exterior. (6)

De acordo com a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE), o mercado de bebidas alcoólicas destiladas no Brasil possui um faturamento de R\$ 8 bilhões anuais (6). E segundo o Instituto Brasileiro de Cachaça (IBRAC), a produção de aguardente de cana e de cachaça no Brasil atinge 1,5 bilhão de litros anuais, representando 87,0% da produção nacional de bebidas alcoólicas destiladas. O setor responde por 600 mil empregos diretos e outros 240 mil empregos indiretos tendo cerca de 40 mil produtores e 5 mil marcas registradas, com investimentos de 16 milhões de reais ao ano desde 2002 e crescimento anual entre 4,0% e 5,0% no Brasil e de 8,0% no exterior com uma exportação em torno de 9,8 milhões de litros anuais, o que representa aproximadamente 1,0% do total produzido no país, e destacando como principais produtores os estados brasileiros de São Paulo, Pernambuco, Ceará, Minas Gerais e Paraíba (7). A aguardente de cana-de-açúcar é hoje a segunda bebida alcoólica mais

consumida no país perdendo para a cerveja e a terceira mais consumida no mundo, atrás apenas da vodca e do sochu (bebida asiática à base de sorgo). (6,7)

A aguardente de cana-de-açúcar é chamada por diversos nomes, dentre eles: cachaça, aguardente, pinga, jeribita, caninha, etc. No entanto o nome cachaça “produzida no Brasil” ganhou maior destaque e foi definida em 2001 através de um decreto presidencial, devido a problemas de ordem comercial, a fim de evitar conflitos com os países produtores de rum. Técnicos norte-americanos do Bureau of Alcohol, Tobacco & Firearms, com base nas legislações norte-americanas e brasileiras, classificaram a cachaça como um tipo de rum, por não disporem de informações técnico-científicas sobre as diferenças relacionadas com a fabricação e, principalmente, com a caracterização sensorial dessas bebidas (8). Atualmente, a cachaça é um produto exclusivamente brasileiro e de acordo com a Instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005, foi definida como sendo a denominação típica e exclusiva de um tipo de aguardente de cana-de-açúcar 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 6,0 g.L⁻¹, expressos em sacarose. (9)

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 6,0 g.L⁻¹, expressos em sacarose. (9)

Ainda assim, todo este processo de padronização e de valorização não foi capaz de reverter os efeitos do longo tempo em que a bebida esteve no limbo. Se comparada com o uísque, a aguardente de cana-de-açúcar está defasada em tecnologia, pesquisa e literatura.

Um dos pontos cruciais na ampliação do mercado e na valorização do produto é a melhoria de qualidade. Apesar dos grandes investimentos do setor para melhorar a tecnologia e o produto, ainda persistem problemas básicos, como a presença de contaminantes na aguardente. Destacando assim, o desenvolvimento de métodos analíticos apropriados que permitam garantir a manutenção desses padrões para a designação de uma aguardente de boa qualidade nos aspectos físicos-químicos e sensoriais. (10)

Na cadeia produtiva da aguardente de cana existem contaminantes residuais orgânicos como carbamato de etila, metanol, acroleína, entre outros e inorgânicos como o cobre, chumbo, arsênio, etc. (9)

Dos inorgânicos o cobre é o que mais se destaca, sendo que a contaminação por íons de cobre é considerado um dos entraves à exportação da bebida. A legislação brasileira limita o teor de cobre em bebidas destiladas em 5,00 mg.L⁻¹ (9), entretanto, a legislação de outros países, como os Estados Unidos, não tolera mais que 2,00 mg.L⁻¹(11), sendo que na União Européia o teor de cobre não pode ultrapassar 1,00 mg.L⁻¹ nos destilados alcoólicos. (12)

A aguardente de cana-de-açúcar artesanal é, geralmente, produzida em alambiques de cobre, o qual confere melhor qualidade sensorial, funcionando como uma espécie de catalizador durante o processo de destilação da aguardente, por reduzir a acidez e os níveis de aldeídos e de compostos sulfurosos. Tais compostos, conferem à bebida, sabor e odor desagradáveis, originando uma bebida de baixa qualidade organoléptica, quando comparada aos alambiques confeccionados com outros materiais, como aço inox, alumínio e porcelana; porém podem contaminar o produto com cobre, quando o manejo (principalmente a higiene) da produção é inadequada. (13)

A contaminação por cobre na aguardente ocorre durante a etapa de destilação, uma vez que o metal constituinte do equipamento (destilador bem como as serpentinas do condensador), quando exposto ao ar úmido contendo gás carbônico lentamente se oxida, ficando coberto por uma camada esverdeada, chamada de “azinhavre”, composta por Diidróxicarbonato de cobre(II) [CuCO₃Cu(OH)₂]. Esta camada é então dissolvida pelos vapores alcoólicos ácidos, gerados durante o processo de destilação da aguardente, o que acaba contaminando o produto. A presença de cobre na aguardente em elevadas concentrações é indesejável pois é prejudicial à saúde humana. Portanto, é fundamental a sua quantificação (11,13-17). Além disto, há reconhecida associação entre a presença de cobre e a formação de carbamato de etila, sério contaminante na produção de aguardente. (18-20)

Buscando formas de minimizar o problema, ao invés de atuar na causa, melhorando seu processo de produção e evitando a presença do cobre, muitas vezes os produtores combatem o efeito, tentando remover o cobre da bebida. Para tanto, se valem, por exemplo, em processos de tratamento de água e efluentes industriais e escolhem dentre as inúmeras resinas de troca iônica existentes no mercado, as quais serão empregadas na filtração e na remoção de cobre.

Sem recomendações e técnicas específicas para a aguardente, sem que haja regulamentação legal para este processo de filtração, a operação é julgada apenas pelo sucesso na remoção do cobre. Como as resinas, de fato, removem o cobre que contamina a aguardente, o processo é aprovado de modo empírico. Entretanto, não se conhecem os efeitos

das resinas usadas sobre a qualidade da bebida e, ainda, se os parâmetros físico-químicos e os atributos sensoriais são alterados. Por se tratar de produto sem padrões de qualidade ainda bem definidos, a aguardente filtrada é consumida sem que haja qualquer restrição pelo mercado. (21)

O cobre é considerado um metal essencial ao organismo humano em níveis traços, sendo que o *Food Nutritional Board* (FBN) estabeleceu para este metal o RDA (*Recommended Dietary Allowance*) de 1,5 a 3,0 mg por dia para adultos (22). O metal atua como cofator de diversas enzimas celulares, como a catalase, tirosinase, citocromoxidase, dopamina- β -hidroxilase, ceruplasmina e peroxidases (23-28). As manifestações decorrentes da deficiência do metal incluem disfunção cardíaca, aumento de lipoproteínas de baixa densidade, elevação da fração de colesterol de alta densidade, diminuição de metionina, encefalinas leucínicas, cobre-zinco superóxido dismutase eritrocitária e diminuição da depuração da glicose. (29,30)

Distúrbios da concentração normal do cobre solúvel no organismo podem provocar hiper ou hipocupremia. O excesso de cobre solúvel pode ser tóxico devido à afinidade do cobre com grupos tiol (-SH) de muitas proteínas e enzimas causando doenças. A mais conhecida enfermidade decorrente desta descompensação é a doença de Wilson, uma degeneração hepato-lenticular, caracterizada pela precipitação do metal nas córneas, que leva a destruição do fígado e do tecido nervoso. Além disso, provoca perda de paladar, epilepsia, melanoma, esclerose, aceruloplasminemia, doença de Alzheimer, doença de Menkes e artrite reumatóide, que são patologias provavelmente relacionadas com o metabolismo do cobre, porém, ainda são motivos de controvérsias e discussões. (29-35)

Portanto é de grande importância o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de íons cobre que sejam confiáveis e que gerem uma quantidade mínima de resíduos.

No entanto, nos últimos anos, surgiu uma nova forma de pensar e tratar o problema de remediação dos resíduos químicos com o objetivo de buscar alternativas que evite ou minimimize sua produção. Este novo direcionamento na questão da redução do impacto da atividade química ao ambiente é chamado de "green chemistry" ou química verde, podendo ser também denominado de química limpa, química ambientalmente benigna, ou ainda, química auto-sustentável. (36)

A Química verde é definida como o desenvolvimento e implementação de processos e produtos químicos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde

humana e ao meio ambiente (36). Este conceito, cada vez mais está sendo incorporado em várias aplicações industriais, principalmente em países com indústria química bastante desenvolvida e que apresentam legislação rigorosa no controle de emissão de poluentes e vem sendo gradativamente incorporado ao meio acadêmico, no ensino e na pesquisa. (37)

Na química analítica, o conceito de química verde está sendo aplicado na substituição de métodos e processos químicos que geram problemas ambientais por alternativas menos poluentes ou não-poluentes. Esses novos processos são comumente denominados de métodos ou processos ambientalmente amigáveis e que fazem uso de fontes renováveis ou recicláveis de matéria-prima, utilizando menos energia para produção de igual ou maior quantidade de produto, evitando o uso de substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas. (36,37)

Visando aplicar cada vez mais tais características, nos últimos anos a combinação *spot test* e espectroscopia de reflectância difusa têm sido largamente aplicadas em análises clínicas, testes para o controle da qualidade do ar, análises de água, alimentos, prospecção geoquímica, além de outras áreas (38). A metodologia vem ganhando destaque na literatura devido a rapidez, simplicidade das análises, grande redução no consumo de reagentes (utilizando-se, em média, 10-30 μL de cada reagente), boa sensibilidade, possibilidade de medidas “in situ” (portabilidade), muito baixa geração de resíduos ao meio ambiente e baixo custo relativo dos equipamentos (mini-espectrofotômetros portáteis com acessórios para reflectância difusa de baixo custo e excelente performance estão atualmente disponíveis no mercado). (39)

Os *spots tests* constituem uma técnica colorimétrica que pode ser utilizada para análises qualitativas, quando a detecção da substância de interesse se dá visualmente pela presença de cor. Para análises semi-quantitativas, nas quais as escalas de cores feitas com padrões analíticos de diferentes concentrações, são utilizadas para comparação com a intensidade de cor do teste. Nas análises quantitativas utilizam-se, por exemplo, instrumentos para medir a luz refletida, neste caso, a espectroscopia de reflectância difusa (40). A confecção de um *spot test* é muito simples, consistindo apenas da mistura de algumas gotas da solução de analito ou solução-teste com algumas gotas da solução de reagente, formando-se assim, um produto colorido. O meio para a reação pode ser uma superfície porosa, como papel de filtro (41), pastilhas de sílica gel, ou mesmo uma superfície lisa, como uma placa de porcelana. (42)

Durante muito tempo, o uso da técnica de espectroscopia de reflectância difusa teve seu uso limitado somente nas áreas de pigmentos, tintas, têxtil, papel, cerâmica e metalurgia para avaliar algumas propriedades destes materiais, tais como coloração e brilho (40). Porém,

pouca atenção foi dada à reflectância difusa como uma técnica para análises quantitativas, porque os valores de precisão obtidos por medidas de reflectância difusa em *spot tests* convencionais eram muito baixos (entre 10 e 20%) (43). Entretanto, com o recente desenvolvimento de novos dispositivos, como fibras ópticas, esferas de reflectância e reflectômetros construídos em laboratório, resultados aceitáveis passaram a ser obtidos (38,44,45). Hoje, é possível desenvolver métodos reflectométricos quantitativos em suportes sólidos ou trabalhar em solução, medindo-se a reflectância difusa de sólidos suspensos, com bons resultados. (46)

No melhor do nosso conhecimento, nenhum método analítico envolvendo a combinação *spot test* e reflectância difusa para a determinação de íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar é descrito na literatura científica indexada. Portanto, no presente trabalho pretende-se estudar as potencialidades da combinação *spot test* e reflectância difusa para o desenvolvimento de um método analítico simples, portátil, de baixo custo relativo e ambientalmente mais benigno para a determinação de íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Contexto histórico do surgimento das bebidas fermento-destiladas

Embora, na antigüidade, os chineses (3000 A.C.) e os egípcios (2500 A.C.) conhecessem a destilação de certos líquidos fermentados, foi apenas no século X que Avicena, médico, astrônomo e filósofo árabe reintroduziu esse processo. Obtendo um líquido composto em sua maior parte por álcool etílico, nos quais eram produzidos e utilizados para a cura de doenças (47,48). A palavra árabe *Al Kuhul*, que significa fina poeira, refere-se ao sulfeto de antimônio, cosmético muito usado pelos egípcios, que passou a designar qualquer essência alcoólica (49). A posterior denominação álcool é atribuída a Paracelso, famoso alquimista. (50)

Foram os árabes que projetaram os primeiros aparelhos de destilação semelhantes aos que conhecemos hoje, sua bebida mais popular, o Arac, é uma aguardente misturada com licores de anis (49). No século XI (D.C.), os árabes invadem Europa, difundindo a técnica de destilação, onde os alquimistas e os monges aperfeiçoaram a técnica e os equipamentos. Do grego *Ambix*, que os árabes transformaram em *Al Ambic*, originou a palavra alambique. (47)

A palavra aguardente tem origem na Grécia antiga, onde a história registra a obtenção da *acqua ardens* a partir do vapor da resina de cedro, recolhido num pedaço de lã, assim extraindo um líquido ardente: *acqua ardens* que traduzido para o português fica água ardente. Mais tarde, os alquimistas levaram a fórmula para a Europa, passando a prescrevê-la como elixir da longevidade por força da ação terapêutica do álcool, em que um cálice diário prolongaria a vida. (49,51)

Na Europa, a maior parte das principais bebidas destiladas conhecidas, como o uísque e o conhaque, começaram a ser produzidas entre os séculos XV e XVI. Na América do Norte, a produção dos *bourbons* e uísques, a partir de cereais, teve início em torno de 1750. (47)

Não há documentos escritos e informações precisas sobre a origem da aguardente de cana-de-açúcar, mas sabe-se que na América do Sul, os índios brasileiros já utilizavam bebidas alcoólicas antes da chegada dos portugueses. Os ameríndios, espécie indígena em maior quantidade na época do descobrimento do Brasil, desconheciam o processo de destilação e as bebidas por eles usadas eram produzidas por fermentação de mostos de cajú, mandioca, banana da terra, milho, ananás, batata, jenipapo e mel de abelha. Tal processo foi utilizado na ativação ou iniciação do processo de fermentação, consistindo basicamente, na mastigação prévia dos frutos ou raízes usadas como matéria-prima. (52,53)

2.2. Contexto histórico da Aguardente de cana-de-açúcar

Datam de 1516 as primeiras iniciativas para o estabelecimento da indústria do açúcar no Brasil, na forma de "engenhos reais" (54). Nos anos de 1533 e 1534, o colonizador português Martin Afonso de Souza e mais quatro sócios construíram três engenhos em São Vicente: o Engenho de São Jorge dos Erasmos, o Engenho da Madre de Deus e o Engenho de São João (55), sendo o mais famoso deles o Engenho de São Jorge dos Erasmos, na Capitania de São Vicente, próximo a Santos – SP (56). Em um engenho dessa capitania, entre 1532 e 1548, descobriu-se que o resíduo da borra do melaço fermentada, que ficava ao relento em cochos de madeiras para consumo dos escravos e animais, vinda dos tachos de rapadura, era uma bebida de qualidade razoável. Relata-se que, quando essa mistura era fervida, aparecia um “pescoço” ou “cachaço” no tacho, daí a origem do nome cachaça (3). Contudo, muitos creditam a origem da palavra cachaça ao castelhano *cachanza*, nome dado, séculos atrás, a um tipo de vinho feito da borra de uva. Somente depois da metade do século XVI é que a cachaça passou a ser produzida em alambique de barro, posteriormente em cobre, sob o nome de aguardente. (57,58)

A aguardente de cana, 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. (3)

Nos engenhos do nordeste era costume dar aguardente aos escravos, a fim de que pudessem suportar melhor o trabalho árduo dos canaviais. (3)

Nos primeiros engenhos, o caldo de cana-de-açúcar era cozido em tachos de cobre para fabricação de melado, parte do qual era fermentado em cochos de madeira e destilado. A aguardente produzida era transferida para o nível mais baixo do engenho, para ser armazenada em tonéis de madeira. O alambique compunha-se da cucúrbita ou caldeira, um vaso bojudo de cobre com capacidade de 104 litros e uma boca com 70 cm de diâmetro, e do capitel ou capacete, feito em barro, de forma esférica inteiriça e ajustada na boca da caldeira. Na parte lateral do capitel era instalada a serpentina, um grosso tubo de barro. Sobre a serpentina e o capitel era lançada água para condensação da aguardente. (3)

A cultura canavieira exigia cada vez mais mão de obra. A bebida, que já ganhava espaço na Europa e na África, foi usada como uma das principais moedas do tráfico de escravos, intensificando-se essa prática com a ocupação holandesa em Pernambuco por volta de 1630 (54). A popularização da aguardente de cana fazia concorrência com os vinhos e a bagaceira. Nessa época, o consumo de aguardente de cana 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 aguardente 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. (4)

Logo vieram as taxas e impostos sobre a produção e comercialização da aguardente de cana. 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 portuguesa para o Rio de Janeiro, em 1808, a aguardente 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. (4)

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 escravidão 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 aguardente de cana, uma vez que eles buscavam uma identidade mais próxima da europeia. (3-5)

Somente durante a Semana de Arte Moderna de 1922, quando buscaram-se as raízes brasileiras, é que a aguardente de cana 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. (3)

No contexto histórico a aguardente de cana ganhou diversos nomes: cachaça, aguardente, pinga, jeribita, caninha, etc. (3)

Quanto à identidade e tipicidade, até 1997, a legislação brasileira diferenciava a cachaça da aguardente de cana ou caninha pelo tipo de matéria-prima utilizada na fermentação (59). Assim, a cachaça ou aguardente de melaço era a bebida destilada obtida do destilado alcoólico simples do melaço ou da destilação do mosto fermentado de melaço originado da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), sendo reservada à aguardente de cana ou caninha a cana-de-açúcar como matéria-prima. A partir de 1997, todas essas matérias-primas passaram a contemplar, indiscriminadamente, a aguardente de cana, a cachaça e a caninha (60).

Possivelmente, a postura oficial de valorizar a denominação cachaça, associando-a a um produto nobre, acompanhou sua progressiva aceitação popular ocorrida na última década, incrementada por expressivas estratégias de *marketing*, direcionadas a vários segmentos sociais. Apesar disso, os estigmas associados ao vocábulo cachaça perduram até hoje no linguajar corriqueiro.

Com o propósito principal de proteger os direitos de propriedade intelectual relacionados ao comércio, o Decreto Nº 4.062 definiu as expressões "cachaça", "Brasil" e "cachaça do Brasil" como indicações geográficas exclusivamente brasileiras (61). Contudo, entre os problemas decorrentes de embates comerciais (retaliações, etc.), o maior entrave se constituiu no governo dos Estados Unidos, que passou a classificar a cachaça como rum para efeitos de taxação e comercialização. (8,62)

2.3. Contexto Atual

A cadeia produtiva da aguardente de cana vem se firmando como um importante produto do agronegócio brasileiro. Embora detenha ainda uma pequena participação, vem adquirindo espaço crescente na pauta de exportação do país (8). O Brasil produz aproximadamente 1,5 bilhões de litros de aguardente de cana por ano, sendo que cerca de 75% desse total é proveniente da fabricação industrial e 25% de forma artesanal. Mesmo com a produção de 1,5 bilhões de litros, somente 1% da aguardente de cana produzida anualmente é exportada. Essa baixa participação das exportações revela que a bebida detém significativo potencial de mercado. (7)

Atualmente, são aproximadamente 180 empresas exportadoras de aguardente no país, sendo a bebida exportada para mais de 60 países. No Brasil há aproximadamente 40 mil produtores e 5 mil marcas de aguardentes de cana-de-açúcar devidamente registradas. (7)

O setor de produção de aguardente de cana-de-açúcar é responsável pela geração de mais de 600 mil empregos diretos e outros 240 mil indiretos. (7)

Devido à dinâmica do setor produtivo da aguardente, sua alta informalidade e a extensão territorial do país, torna-se complexa a atualização dos dados sobre a produção em cada Estado. Tendo uma economia mais dinâmica, o estado líder na produção de aguardente de cana é São Paulo, respondendo por cerca de 44%. Em seguida vêm Minas Gerais com 15%, Pernambuco, Ceará e Rio de Janeiro com 12%, Goiás com 11%, Paraná com 4%, Paraíba com 2% e Bahia com 1,5%. (7)

Deste volume, 1,3 bilhão de litros são produzidas em colunas de destilação, por processo contínuo, e 200 milhões de litros em alambiques, por processo em batelada (7). As colunas de destilação, geralmente, são capazes de produzir anualmente, em média, cerca de 30 vezes ou mais que os alambiques, o que explica a menor produção em certos estados com grande dimensão territorial, como é o caso da Bahia, onde praticamente toda a aguardente é proveniente de alambiques. (63)

O Estado de Minas Gerais possui tradição como produtor de excelente aguardente de cana. A crença de que a maior parte de sua produção é elaborada de forma artesanal também é geral, embora sejam usadas várias colunas de destilação em algumas regiões. De fato, a tradição de produzir aguardentes em uma grande diversidade de alambiques inteiramente em cobre, aliada a uma estrutura razoável de fornecimento de equipamentos e tecnologia, resulta num expressivo número de aguardentes de cana de boa qualidade. Entretanto, Minas Gerais

tem o problema de possuir áreas com bolsões de isolamento técnico-científico, econômico e cultural, que geram um grande número de produtos com baixa qualidade, fato comprovado pelo seu alto índice de não conformidades. Os estados de São Paulo, Pernambuco, Ceará e Rio de Janeiro produzem um considerável volume de aguardente usando colunas de destilação, que coexiste com uma produção bem inferior em alambiques. (63)

Segundo a Associação Brasileira de Bebidas (ABRABE) em 2010, baseados nos levantamentos de mercado da *International Wine and Spirit Record* (IWSR), o mercado nacional de bebidas, em relação ao volume, está proporcionalmente dividido entre cerveja e aguardente de cana representando 88,8 % e 6,6 %, respectivamente, sendo o restante, 4,6%, para as demais bebidas. (6)

A aguardente de cana constitui a terceira bebida destilada mais consumida no planeta de acordo com o *ranking* mundial do consumo de destilados publicado pelo Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça (PBDAC). Tendo em vista este *ranking*, a aguardente de cana perde somente para: a vodca e o sochu (bebida obtida da destilação do mosto fermentado de arroz, adicionado ou não de tubérculo, raiz amilácea e cereal, em conjunto ou separadamente) e superando várias outras bebidas destiladas bastante tradicionais como o rum, gim, uísque e conhaque. (3,8,63)

Criado desde 1997 para organizar e resgatar o valor histórico e cultural da aguardente de cana, o Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça, tem concentrado esforços para criar condições de inserí-la no mercado internacional e disputar um espaço com destilados tradicionais consagrados mundialmente. (8)

Um dos maiores entraves para o aumento da participação e sobrevivência da bebida e dos produtores no mercado é a alta carga tributária de impostos a qual o setor está sujeito. Essa alta carga tributária tem um impacto devastador para o setor, principalmente para as micro e pequenos produtores e contribui para o aumento da informalidade (64). Outra causa que também tem impedido o Brasil de atingir níveis maiores de exportação, é 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 aguardente, como por exemplo, o cobre ($5,00 \text{ mg.L}^{-1}$) e o carbamato de etila ($0,15 \text{ mg.L}^{-1}$) (19,65,66). Em determinados países, como por exemplo o Estado Unidos, o teor máximo permitido para o cobre nos destilados alcoólicos é de $2,00 \text{ mg.L}^{-1}$ (11) e de $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$ na União Européia (12), o que dificulta ainda mais a exportação da bebida. Além disso, há problemáticas no âmbito ambiental, como a queima da cana e o destino do vinhoto,

que podem ser apontados como pontos integrantes de uma pauta mínima para o crescimento do setor (6).

Dentre os principais mercados de destino estão a Alemanha, Bolívia, Paraguai, Portugal, Estados Unidos, Itália, França, Espanha e Chile, dentre outros. A Alemanha consome cerca de 30% das exportações brasileiras, seguidos da Bolívia com 10%, Paraguai com 9%, Portugal com 8%, Estados Unidos com 6%, Itália, França e Espanha com 4% e Uruguai, Argentina e Chile com 3%. (6,7)

Esta pequena fatia do mercado equivale a pouco mais de 9,8 milhões de litros ou US\$ 17,3 milhões ao ano (21,23), valores pouco significativos se comparados aos US\$ 250 milhões da tequila e aos cerca de US\$ 4 bilhões do *Scotch Whisky*. (6,7)

A princípio os números não parecem animadores, mas representam um crescimento médio de 18,2% ao ano a partir dos US\$ 7,3 milhões de 1999, quando o governo começou a promover a aguardente de cana nos mercados estrangeiros. (6)

A partir da segunda metade do século XX, com uma defasagem de quase um século em relação ao uísque, a produção de aguardente de cana passa a viver um novo momento, com um aumento na demanda e um crescente interesse pelo produto. Buscando consolidar esta fase de crescimento, ampliando a comercialização da aguardente, empresas produtoras passaram a investir intensamente. Entre as áreas prioritárias se destacam o controle de qualidade e o *marketing*. (67)

Os investimentos são importantes para o país, pois, apesar dos aspectos polêmicos associados à produção de bebidas alcoólicas, é importante lembrar a importância econômica e social do setor. (6,7)

2.4. O processo de produção

A Figura 1 mostra o fluxograma básico da produção da aguardente de cana-de-açúcar. O processo é um tanto quanto simples e pode ser resumido pelos seguintes estágios: preparo da matéria prima (corte da cana-de-açúcar, limpeza com separação das folhas; transporte e armazenamento dos colmos), extração do caldo da cana, fermentação do caldo, destilação do “vinho” fermentado e obtenção da aguardente. Este produto pode ser ainda armazenado em tonéis de aço inox ou envelhecido em tonéis de madeira. (14,15,68)

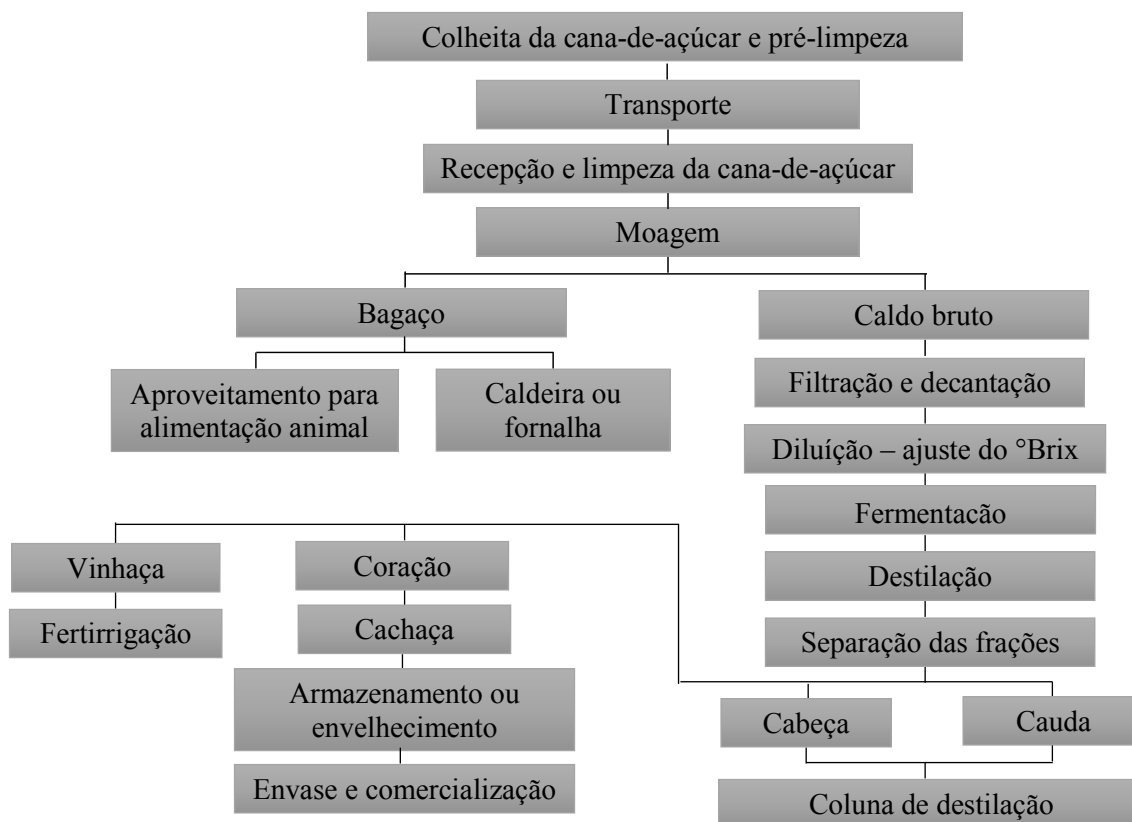


Figura 1. Fluxograma ilustrativo do processo de produção da aguardente de cana-de-açúcar.

2.5. Matéria-prima

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) é cultivada em todo o mundo, visando diferentes aplicações. A cana é usada para a indústria, na produção de alimentos como o açúcar, o melado, o álcool e a aguardente de cana-de-açúcar, bem como na produção de combustível, caso do etanol. Além destas aplicações, a cana-de-açúcar é usada também na alimentação animal. O Brasil é o maior produtor de cana, com uma área plantada de aproximadamente 9,13 milhões de hectares, no qual o estado de São Paulo se destaca como o maior produtor de cana no Brasil. (69)

A relação entre matéria-prima e qualidade do produto é um ponto pouco estudado na produção de aguardente de cana. Porém, por analogia com bebidas como cerveja, vinho e uísque, é factível pensar na existência de uma forte relação entre a qualidade da cana-de-açúcar e a aguardente de cana. Vários fatores são responsáveis pela melhoria da qualidade da matéria-prima, dentre eles: o planejamento agrícola, controle de pragas e doenças, maturação, colheita, carregamento e transporte. (16)

Esta relação entre a qualidade da matéria-prima e do produto pode ainda incluir a componente “processo de produção”. Além da maior qualidade do produto final, a qualidade da matéria-prima está envolvida diretamente com o desempenho das operações de extração, fermentação e destilação. Deste modo, uma matéria-prima de maior qualidade permitiria maiores rendimentos industriais. (70)

Em muitos sistemas de produção agrícola e industrial existe um conflito entre quantidade e qualidade, pois a produtividade tem precedência sobre a qualidade. Neste caso, destacam que a boa qualidade da matéria-prima favorece um processo rápido, com alto rendimento de produto. Porém, cabe lembrar que a situação inversa, quando do uso de matéria-prima de baixa qualidade, não só reduz a velocidade de processamento e a quantidade de produto, mas também afeta sensivelmente sua qualidade. (71)

Assim, no processo de produção da cachaça é necessário lembrar que as características da cana afetam a qualidade da aguardente e é essencial ter informações detalhadas sobre o cultivo da matéria-prima.

2.6. Preparo do caldo

Após a colheita, a cana-de-açúcar é levada para a moagem, etapa onde se faz a extração do caldo, com o auxílio das moendas. Nas grandes unidades produtoras, a extração do caldo é feita por moenda de ternos múltiplos com embebição (lavagem com água) do bagaço para maior extração do açúcar. O rendimento na extração por essa técnica chega a 96% ou mais. Em unidades pequenas, onde a extração é efetuada a partir de um único terno, um bom rendimento está em torno de 75%. (72)

O caldo obtido, chamado por alguns de garapa, é constituído de água (65-75%), açúcares (11-18%), pequenas quantidades de substâncias nitrogenadas, ceras, lipídios, pectinas, materiais corantes e sais minerais. Seu pH é levemente ácido, variando de 4,8 - 6,0, o que favorece o desenvolvimento de microrganismos. (73)

Os compostos orgânicos não-açúcares são constituídos de substâncias nitrogenadas (proteínas, aminoácidos, etc.), gorduras, ceras, pectinas, ácidos (málico, succínico, etc.), e de matérias corantes (clorofila, sacaretina e antocianina). Os compostos inorgânicos, representados pelas cinzas, têm como componentes principais: sílica, potássio, fósforo, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, ferro, alumínio, cloro e outros. (74)

Após a moagem da cana, o caldo passa por um processo de limpeza, com o uso de sistemas de filtração e decantação. Posteriormente o caldo passa por tratamento térmico e

purificação, procedimentos que ajudam a melhorar a padronização da fermentação. Esse tratamento atua na eliminação de microorganismos contaminantes, como bactérias e leveduras, além da retirada de componentes indesejados, como resíduos de ceras da cana, que interferem no rendimento da fermentação. A concentração de açúcares pode ser ajustada, com valores entre 14 a 16 °Brix, para um maior rendimento e controle do processo de fermentação (68). O caldo limpo e diluído passa a ser chamado de mosto, estando pronto para a adição do fermento. (75,76)

2.7. Fermentação

A fermentação é a segunda etapa do processo, sendo um processo relativamente rápido se comparado com outras bebidas, como o vinho e a cerveja, tendo uma duração média de 24 horas. Nessa etapa, os açúcares presentes no mosto são transformados em etanol, gás carbônico e água por microrganismos, chamados de leveduras, principalmente do tipo *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, já foi observada a predominância da levedura *Schizosaccharomyces pombe* em algumas destilarias, embora outras espécies de leveduras tenham sido encontradas, em baixas concentrações. (77)

Dentre os metabólitos secretados pelas leveduras, o etanol é o principal composto produzido (78,79). Além de álcool, é normal que uma parte dos açúcares seja convertida em outros produtos, em menor quantidade, que por isto são denominados componentes secundários que podem no entanto ser responsáveis também pela qualidade ou pelos defeitos do produto. Estes incluem glicerol, ácidos orgânicos (como succínico, acético, láctico, butírico, etc.), álcoois superiores (amílico, isoamílico, butírico, isobutírico, propílico e isopropílico), aldeídos, ésteres, entre outros compostos voláteis. (16,80,81)

Não só a presença de contaminantes, mas a própria condução do processo pode afetar a qualidade da aguardente e o rendimento do processo. No caso da temperatura de fermentação, a faixa ótima encontra-se entre 25 e 30 °C (82,83). Temperaturas maiores afetariam o processo, pois a reprodução de células ocorre até 38 °C e a partir de 40 °C, na presença de 8 a 9% v/v de etanol pode ocorrer a inibição dessa reprodução (84). Entretanto, na produção de aguardente de cana, estes valores de temperatura não se aplicam às regiões tropicais, onde a temperatura no processo facilmente supera 40 °C, porém temperaturas mais elevadas poderiam favorecer contaminações, alterando a qualidade do produto. (85)

A composição química do mosto é outro aspecto importante na produção de aguardente, pois as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais diferenciadas

durante o processo de fermentação alcoólica. Assim, a disponibilidade de nutrientes influenciaria a multiplicação e o crescimento celular, bem como a eficiência da transformação de açúcar em álcool. (86)

O nitrogênio, devido à sua importância para as leveduras, é considerado um elemento essencial para a multiplicação e crescimento do fermento. Este nutriente entra como constituinte de várias substâncias orgânicas encontradas nas leveduras, como os aminoácidos, proteínas, enzimas, pirimidinas, purinas, pigmentos respiratórios (citocromos), lecitina, vitaminas e cefalina. (87)

A presença de nitrogênio no mosto pode ser associada à composição do caldo ou à suplementação do mosto com compostos nitrogenados, quando a uréia ou sulfato de amônio é adicionado diretamente ao mosto. As disponibilidades de nutrientes bem como sua assimilação pelo fermento são importantes, pois, podem favorecer a multiplicação de microrganismos contaminantes ou levar a ocorrência de reações indesejadas, com a formação de compostos prejudiciais à qualidade da aguardente. (88)

2.8. Destilação

Após a fermentação, o mosto de cana passa a ser chamado vinho, que é composto de água e etanol, em maiores proporções, e dos compostos denominados “secundários”, como ácidos, alcoóis, ésteres, compostos carbonílicos, acetais, fenóis, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados, compostos sulfurados e açúcar. Esses compostos secundários são os principais responsáveis pelo sabor e aroma das aguardentes (2). A destilação é realizada para concentrar o álcool e os compostos secundários, definindo em grande parte a composição química da aguardente, conferindo qualidade ao produto final. (89,90)

A otimização das condições da operação de destilação é fundamental na obtenção de bebida de boa qualidade, pois a destilação além de separar, selecionar e concentrar pelo uso do calor os componentes do vinho, ainda promove algumas reações químicas induzidas pelo calor. Assim, a destilação pode aumentar ou diminuir a concentração dos componentes voláteis do vinho e ainda originar novos componentes no destilado. (91)

A destilação é um processo termodinâmico de separação de frações voláteis de uma solução. Para tanto, tem como base a solubilidade e o ponto de ebulição, específicos dos componentes minoritários voláteis nas frações majoritárias de vapores de água e etanol. (91)

A destilação na produção da aguardente emprega basicamente dois tipos de equipamento, de materiais diferentes, o alambique de cobre (processo artesanal) e a coluna de destilação (processo industrial). (92)

Em estudos feitos sobre o material de constituição do destilador na qualidade da aguardente, mostraram que o material de composição do destilador alterou as características químicas e sensoriais do destilado, sendo que o aço inox, o material que apresentou alterações nas características químicas e sensoriais da bebida mais semelhantes ao alambique confeccionado de cobre (11). Porém, em outro estudo, comparando a destilação em destilador de aço inox com outro de cobre, diferenças significativas na concentração de compostos aromáticos foram detectadas, sendo que a destilação em alambique de cobre apresentou maior qualidade sensorial ao produto obtido. (11,13)

Quanto ao tipo de equipamento, apesar de possuir limitações técnicas, o alambique de cobre é mais usado que a coluna de destilação. A coluna de destilação permite melhor separação de compostos como água, álcool, aldeídos, ésteres, álcoois superiores etc, além de maior rendimento do processo. Entretanto, seu alto custo faz com que seja usada apenas nas grandes indústrias, sendo responsável pela maior parte da aguardente de cana produzida no Brasil. Entretanto, o alambique de cobre gera produtos de maior qualidade, sendo mais usado na produção artesanal. (92)

Apesar de estar presente na maior parte das unidades produtoras e de gerar aguardente de qualidade superior, o alambique de cobre exige cuidados para seu uso. Pois, a confecção do equipamento em cobre pode gerar contaminação da bebida, por arraste de metal para a aguardente. (11,13,14,15,93)

Além dos riscos à saúde, a contaminação por cobre pode gerar outros problemas na aguardente, pois o cobre atua como catalisador na geração do carbamato de etila (18-20). Entretanto, em outros estudos realizados, não foi verificado este mesmo comportamento. (94,95)

Apesar de possuir menos recursos tecnológicos e do risco da contaminação, o alambique de cobre é o mais usado não apenas pelos citados efeitos sobre qualidade da aguardente, mas também pelo custo de aquisição e facilidade de operação. A forma de operação é um dos pontos vitais no uso do equipamento, pois o alambique pode ser operado de modo a gerar produtos de melhor qualidade, através da destilação lenta e do fracionamento ou corte do destilado. (96)

O fracionamento pode ser feito com base em diversos fatores, como volume total da fração coletada, associado à concentração de álcool e às propriedades sensoriais de cada fração. Estas frações são tradicionalmente denominadas de: cabeça, coração e cauda, possuindo graduação alcoólica (% v/v) aproximada de 78%, 57% e 27% de álcool, respectivamente. (13)

A primeira etapa do fracionamento da destilação, denominada de “cabeça”, corresponde às primeiras frações recolhidas na saída do alambique que apresenta teor alcoólico elevado, acima de 60% v/v, e compostos mais voláteis como metanol, acetaldeído e acetato de etila. Esta fração do destilado normalmente é descartada, por conter em sua composição vários compostos que apresentam impacto sensorial negativo, como o acetaldeído, alguns compostos sulfurosos e compostos de alta toxicidade como por exemplo, o metanol.

A segunda etapa ou etapa intermediária, chamada de “coração”, é a fração que apresenta melhor qualidade por apresentar quantidade menores de substâncias indesejáveis. É a fração que corresponde a verdadeira aguardente.

A terceira e última etapa do processo de destilação, mais conhecida como “cauda” ou “água fraca”, também não é aproveitada, sendo então descartada. É formada basicamente pela borra do processo e por compostos com ponto de ebulição acima de 100 °C, como por exemplo, os ácidos capríco, caprílico, e cáprico que dão um aroma parecido com o de sabão à bebida. (97,98)

Cabe lembrar que o fracionamento do destilado apresenta limitações, em virtude da complexidade da destilação, associada à composição química do vinho e às características do processo. O comportamento dos componentes secundários durante a destilação depende de suas propriedades termodinâmicas. Assim, os diversos compostos secundários no vinho podem ser agrupados em três categorias:

- Compostos mais voláteis que o álcool, representados por ésteres e muitos aldeídos, são mais freqüentes na fração “cabeça”;
- Compostos menos voláteis que o álcool, representados por compostos fenólicos e muitos ácidos orgânicos, são mais abundantes na fração “cauda”;
- Compostos mais voláteis que o álcool nas soluções alcoólicas de baixa concentração e menos voláteis nas soluções alcoólicas concentradas. (16)

Deste modo, tem-se uma operação influenciada por inúmeros fatores e variáveis operacionais. Isto confere particularidades a cada processo, unidade produtora e,

conseqüentemente, a cada produto. Esta diversidade é potencializada por inovações, fatores que vem sendo pesquisados. Este é o caso da bidestilação ou dupla destilação.

A bidestilação é aplicada em algumas unidades produtoras de aguardente, as quais tomam o processo de produção do uísque como referência. Na produção de uísque esta prática é padrão para o processo, pois melhora a qualidade do produto. Processo que também foi avaliado na produção da aguardente de cana e que influência de forma significativa na redução nos teores de acidez total e de cobre na bebida. (99,100)

2.9. Envelhecimento

A aguardente de cana recém-destilada possui características sensoriais peculiares, sendo considerada uma bebida agressiva. Este período de armazenamento, tanto em recipientes de madeira quanto de aço inox é denominado também de envelhecimento e é uma das fases mais importantes na produção de destilados. Nesta etapa, a aguardente de cana adquire atributos de aroma e sabor, característicos de bebida de maior qualidade, permitindo assim uma melhora considerável na aceitação pelo consumidor. (90,101-105)

A maturação convencional de bebidas destiladas em barris ou tonéis de madeira envolve um sistema complexo de transformações físicas, químicas e sensoriais do produto. São reações complexas, como a mistura e o equilíbrio das frações água e etanol com os compostos secundários da bebida, reações químicas e interações físico-químicas entre os componentes da bebida e aqueles provenientes da madeira e trocas gasosas entre a bebida e o ambiente externo aos recipientes de acondicionamento. (106)

Durante a maturação da bebida são formados congêneres responsáveis por tais mudanças, esses congêneres são originados de reações entre os constituintes do destilado, da interação entre o etanol e a madeira e da extração de componentes da madeira. As alterações químicas que ocorrem durante o envelhecimento consistem especialmente em reações de esterificação e de oxidação, onde alcoóis reagindo com oxigênio formam aldeídos, que em contato com oxigênio formam ácidos e que novamente em contato com oxigênio originam ésteres. (107)

Dentre estes compostos, os ésteres são responsáveis pelo aroma agradável da bebida. O acetato de etila é o principal éster encontrado na bebida envelhecida, porém outros ésteres estão presentes em concentrações que variam em função da extensão das reações de transesterificação (108).

Em estudo realizado, as amostras de aguardente envelhecida tiveram melhor aceitação do que aquelas não envelhecidas (103). Além disso, com o decorrer do tempo de envelhecimento, novas características sensoriais foram desenvolvidas, como aroma e sabor de madeira, doçura, aroma de baunilha, coloração amarela e a diminuição significativa da agressividade e do aroma e sabor alcoólico (102). As reações de degradação da lignina por etanólise também geram produtos que são responsáveis por mudanças no aroma e sabor característico mais agradáveis (107,109).

Durante o período de armazenamento não ocorrem somente reações favoráveis, há a formação de carbamato de etila na aguardente quando armazenada em tonéis de madeira (20). Esse processo também pode ocorrer quando o destilado é armazenado em garrafas de vidro, onde um processo fotoquímico está envolvido na formação de carbamato de etila. (110)

2.10. Legislação e qualidade da aguardente de cana-de-açúcar

Muitos são os termos utilizados para denominar a bebida brasileira, alguns dizem cachaça, outros falam aguardente ou pinga entre outros. No entanto, no dia 29 de junho de 2005 foi regulamentada a Instrução Normativa nº13 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo então aprovado o “Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça” (9). Este regulamento separa a bebida em duas categorias: aguardente e cachaça:

- Aguardente: *“É a bebida com graduação alcoólica de 38% vol. (trinta e oito por cento em volume) a 54% vol. (cinquenta e quatro por cento em volume) a 20 °C (vinte graus Celsius), obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6g/L (seis gramas por litro), expressos em sacarose”.*
- Cachaça: *“É a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% vol. (trinta e oito por cento em volume) a 48% vol. (quarenta e oito por cento em volume) a 20 °C (vinte graus Celsius), obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até 6g/L (seis gramas por litro), expressos em sacarose”.*

No âmbito legal, a qualidade da aguardente de cana foi regulamentada pela Instrução Normativa nº13, de 29 de junho de 2005 (9) e pelo Decreto Federal nº. 2314, de 04 de setembro de 1997 (17), que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Na Tabela 1, são mostrados os padrões de

identidade e qualidade da aguardente de cana e cachaça, regulamentados pela mesma Instrução Normativa nº 13 de 29 de junho de 2005 (9).

Tabela 1. Padrões de identidade e qualidade da aguardente de cana-de-açúcar e cachaça, regulamentada pela Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005.

Componentes	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Graduação alcoólica*	°GL	38,0	54,0
Acidez volátil expressa em ácido acético	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	150,0
Ésteres totais, expressa em acetato de etila	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	200,0
Aldeídos, em acetaldeído	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	30,0
Soma de furfural e hidroximetilfurfural	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	5,0
Soma de alcoóis superiores**	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	360,0
Coefficiente de congêneres***	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	200,0	650,0
Contaminantes			
Álcool metílico (metanol)	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	20,0
Carbamato de etila	µg.L ⁻¹	-	150,0
Acroleína (2-propenal)	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	5,0
Álcool sec-butílico (2-butanol)	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	10,0
Álcool n-butílico (1-butanol)	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	3,0
Cobre	mg.L ⁻¹	-	5,0
Chumbo	µg.L ⁻¹	-	200,0
Arsênio	µg.L ⁻¹	-	200,0

Fonte: MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13 de 29 de junho de 2005. (9)

*Graduação alcoólica da aguardente de cana-de-açúcar. Lembrando que a cachaça é um tipo de aguardente de cana-de-açúcar e tem graduação alcoólica entre 38-48% v/v.

**Alcoóis 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.

***Coeficiente 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 álcoois isoamílicos) e furfural + hidroximetilfurfural.

Em relação ao citado Decreto nº. 2314 (17), a Instrução Normativa nº 13 introduziu novos compostos entre os padrões de identidade e qualidade da aguardente de cana. São componentes considerados contaminantes na aguardente de cana, como o carbamato de etila, o arsênio, a acroleína, o álcool sec-butílico e o álcool n-butílico. O prazo máximo para adequação e controle dos contaminantes da aguardente foi estipulado em três anos a partir da data de publicação da Instrução Normativa nº 13, com exceção do carbamato de etila, que foi de cinco anos. (9)

No ano de 2006, o sistema de qualidade de produtos agrícolas, pecuários e agroindustriais do estado de São Paulo definiu a norma de padrões mínimos de qualidade mais exigentes para aguardente de cana-de-açúcar como base para a certificação do produto pelo selo paulista (Tabela 2). Por essa norma, a aguardente de cana paulista é o produto resultante da destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, com características sensoriais peculiares. Podendo ainda agregar a denominação “envelhecida”, no qual a aguardente de cana deve ser envelhecida por no mínimo 18 meses em tonéis de madeira . (111)

A ampliação dos parâmetros legais segue uma tendência de maior exigência quanto à qualidade, que é acompanhada e observada nos mercados interno e externo de bebidas. No entantanto, estudos sobre a qualidade da aguardente de cana-de-açúcar ainda são limitados, se comparados aos existentes para outras bebidas tradicionais. (102)

Esta situação pode ser explicada pelo preconceito vigente em relação à bebida, visto que por ser uma bebida típica do Brasil, pelo caráter exclusivo da produção e pelo predomínio de pequenas empresas na produção, fato observado até pouco tempo atrás. O controle de qualidade e a própria qualidade da aguardente somente serão aprimorados se a indústria conhecer o processo e o produto, sem mitos e crendices, ou seja, produzir com tecnologia, sobretudo com uma consciência ampla de qualidade entre todos os membros do sistema de produção.

Apesar de haver legislação sobre o tema, parâmetros de qualidade para aguardente ainda são escassos, uma vez que a legislação em vigor pouco rege sobre este atributo, impondo limites para garantia da saúde pública, e que pouco ou nada se referem à qualidade global do produto. (78)

Tabela 2. Concentração máxima de compostos orgânicos e inorgânicos presentes em aguardente de cana-de-açúcar para o sistema de qualidade selo paulista.

Componentes	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Acidez volátil expressa em ácido acético	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	80,0
Ésteres totais, expressa em acetato de etila	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	100,0
Aldeídos totais, expresso em acetaldeído	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	30,0
Soma de furfural e hidroximetilfurfural	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	2,0
Soma de alcoóis superiores*	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	280,0
Coeficiente de congêneres**	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	200,0
Contaminantes			
Álcool metílico (metanol)	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	20,0
Carbamato de etila	µg.L ⁻¹	-	150,0
Acroleína (2-propenal)	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	5,0
Álcool sec-butílico (2-butanol)	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	10,0
Álcool n-butílico (1-butanol)	mg.100 mL ⁻¹ de álcool anidro	-	3,0
Cobre	mg.L ⁻¹	-	2,0
Chumbo	µg.L ⁻¹	-	200,0
Ferro	µg.L ⁻¹	-	250,0
Arsênio	µg.L ⁻¹	-	100,0

Fonte: SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Resolução de 29 de novembro de 2006. (111)

*Alcoóis 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.

**Coeficiente 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 álcoois isoamílicos) e furfural + hidroximetilfurfural.

2.11. Cobre

O cobre é um metal essencial para plantas e animais. Nos seres humanos, encontra-se distribuído praticamente em todo organismo em diferentes concentrações. O cobre tem papel

fundamental, em níveis de traços, nos processos biológicos do organismo humano, atuando como cofator de diversas enzimas, em várias atividades celulares e também na captação de ferro (23-27). O *Food Nutritional Board* (FBN) estabeleceu para este metal o RDA (*Recommended Dietary Allowance*) de 1,5 a 3,0 mg por dia para adultos (22).

Distribuído em diferentes concentrações ao longo do organismo, variando de 100 a 150 mg em um indivíduo adulto, sendo que a maior parte encontra-se no fígado, que junto com os músculos e ossos contém de 50 a 75% do total de cobre corpóreo. O cobre participa de algumas atividades proteicas como a tirosinase, catalase, citocromo oxidase, dopamina- β -hidroxilase, peroxidases e a ceruloplasmina. Este micronutriente é necessário também para o crescimento, mecanismos imunológicos de defesa, resistência óssea, maturação das células vermelhas e brancas, transporte de ferro, metabolismo da glicose e colesterol, contratilidade miocárdia e desenvolvimento cerebral. (28)

As manifestações decorrentes da deficiência do metal incluem disfunção cardíaca, aumento de lipoproteínas de baixa densidade e elevação da fração de colesterol de alta densidade, diminuição de metionina, encefalinas leucínicas, cobre-zinco superóxido dismutase eritrocitária e diminuição da depuração da glicose. (29,30)

Mesmo sendo um nutriente importante em diversos sistemas enzimáticos vitais ao metabolismo humano, a quantidade ingerida pode acarretar sérios problemas de saúde. Em altas concentrações, o cobre pode ser tóxico devido à afinidade do metal por grupos tiol (-SH) de muitas proteínas e enzimas presentes no organismo, sendo associado a várias doenças neurodegenerativas como Doença de Wilson, Doença de Menkes, aceruplasminemia, esclerose, artrite reumatoide, Doença de Alzheimer e autismo. Porém, ainda são motivos de controvérsias e discussões. O cobre em excesso também pode ser carcinogênico causando melanoma (tipo de câncer maligno caracterizado pelo aparecimento de manchas pretas na pele), cegueira e à morte (29-35). Além disso o cobre é também o catalisador responsável na formação do carbamato de etila, outro composto que pode estar presente na aguardente e que é bastante tóxico ao organismo humano e potencialmente carcinogênico (18-20,100). No entanto, existem trabalhos que questionem tal relação. (94,95)

A aguardente de cana-de-açúcar é geralmente produzida em alambiques de cobre, o que confere melhor qualidade do produto, contribuindo para a melhoria do sabor e do aroma, quando comparada aos alambiques confeccionados de outros materiais como, por exemplo, o aço inox, porcelana e o vidro. Muitos pesquisadores atribuem ao cobre o papel de catalisador durante o processo de destilação da aguardente, contribuindo para a eliminação de

determinados odores desagradáveis, atribuídos a compostos sulfurados, observados em aguardentes destiladas em alambiques de outros materiais. Todavia, esta prática pode contaminar o produto com cobre quando o manejo na etapa de higienização e da produção é inadequado. (13)

A presença do cobre na produção de aguardente está associada ao processo de destilação, visto que muitos alambiques podem ser total ou parcialmente confeccionados com esse metal. Quando o metal constituinte das paredes internas do alambique (cobre) fica exposto ao ar úmido contendo gás carbônico, lentamente se oxida ficando coberto por uma camada esverdeada de diidróxicarbonato de cobre(II) ($[\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2]$), comumente denominada de “azinhavre”. Este composto pode ser dissolvido pelos vapores alcoólicos ácidos e arrastados para o destilado durante a destilação. (11,13-17)

A legislação brasileira considera o cobre um contaminante da aguardente de cana e definiu seu limite máximo em $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 1) (9). Em outros países, como Estados Unidos por exemplo, a legislação não tolera mais que $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (11) de cobre nos destilados alcoólicos. Na União Européia, ainda mais rigorosa quanto ao teor de cobre, essa quantidade não pode ser maior que $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$. (12)

De todo modo, considerando o exposto, os teores de cobre devem ser minimizados na aguardente para garantir qualidade ao produto, proteger o consumidor e prevenir a formação de outras substâncias indesejáveis. O meio mais eficaz para evitar contaminação excessiva de cobre no destilado final é a higienização correta do alambique, evitando ou minimizando a formação do azinhavre. Para a higienização do alambique de cobre, recomenda-se que a primeira destilação deva ser feita adicionando-se suco de limão à água (ácido cítrico), à base de 5 litros do suco para cada 100 litros de água. Assim, essa solução removerá o azinhavre do alambique, principalmente aquele existente no interior da serpentina de condensação dos vapores hidroalcoólicos. (68)

2.12. Métodos de determinação de cobre em aguardente de cana

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 aguardente artesanal, na rota química de formação do carbamato de etila e, principalmente nas questões relacionadas à saúde de quem consome a bebida, os limites máximos de concentração assegurados pela legislação brasileira para garantia de qualidade da bebida consumida no Brasil ($5,0 \text{ mg. L}^{-1}$) (9) e para exportação (de $1,0$ a $2,0 \text{ mg. L}^{-1}$) (11,12),

fica evidente que é fundamental o desenvolvimento de métodos simples e rápidos para a determinação dessa espécie na referida matriz.

Vários métodos têm sido propostos, utilizando diferentes técnicas, para a determinação de íons cobre em amostras de aguardente de cana (112,113). Estão mencionados somente alguns métodos a título de exemplificar a diversidade utilizada.

As técnicas espectrométricas de absorção e emissão atômica são as mais utilizadas. O método sugerido pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) (112), por exemplo, utiliza a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), com os padrões analíticos para construção da curva de calibração (0,00 a 0,96 mg.L⁻¹) preparados em solução alcoólica a 50% v/v e leitura direta de amostras sem ajuste de graduação alcoólica. Entretanto, em um trabalho que também utiliza FAAS, foi realizado um estudo de que indicou um efeito de matriz considerável em análises de íons cobre em aguardente de cana utilizando o método da curva de calibração sem ajuste do teor alcoólico da matriz (114). Dessa maneira, os autores sugerem que esse tipo de análise seja realizada utilizando o método de adição de padrões, uma vez que no caso do método da curva de calibração, 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 (114). 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, também contribuindo para o aumento da temperatura da chama.

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 (113). 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 5,00 mg.L⁻¹ de cobre em três dos balões, sendo que um dos balões é mantido somente com a alíquota da amostra. 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.

Outros autores (115) 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 ácido nítrico a $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e utilizaram padrões internos de prata, bismuto, cobalto ou níquel para minimizar as interferências causadas pelos diferentes teores alcoólicos das amostras, evitando assim o uso do método de adição de padrões empregado no método anterior. (114)

A técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) foi utilizada para determinação simultânea de arsênio, cobre e chumbo em aguardente de cana-de-açúcar, sem prévia digestão da amostra (116). No procedimento utilizaram-se bismuto e antimônio como padrões internos para minimizar o efeito de matriz, corrigir erros sistemáticos e eliminar influências geradas por flutuações de ajustes do instrumento.

Outra metodologia que emprega a técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-VIS foi proposta 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 $6,40 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, triton x-100 a 0,08% m/v e solução tampão de acetato $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 4,8. Foi observado que a formação do complexo é instantânea e apresenta alta seletividade em presença de outros metais e a metodologia não requer pré-concentração no preparo de amostra, permitindo uma direta quantificação de íons cobre. (117)

Técnicas eletroanalíticas também já foram utilizadas para determinação de íons cobre em amostras de aguardente de cana-de-açúcar. Para tal, um método potenciométrico foi desenvolvido utilizando um eletrodo íon-seletivo para íons cobre, construído em laboratório utilizando membranas de sulfeto de cobre. (118)

São inúmeras as metodologias para a determinação de íons cobre em aguardente de cana-de-açúcar, utilizando de várias técnicas analíticas, descritas na literatura. No entanto, a maioria são técnicas bastante onerosas que envolvem procedimentos laboriosos, que precisam de tratamento prévio de amostras com um custo de análise consideravelmente alto e que no mais requerem o uso de grandes quantidades de solventes, reagentes e amostras gerando um volume grande de resíduos ao meio ambiente. Portanto são metodologias que na sua grande maioria contraria os preceitos da química verde (36). Esses preceitos cada dia mais estão sendo levados em conta quando se vai desenvolver um novo método analítico com mais

responsabilidade ambiental, que sejam mais limpos e que gerem cada vez menos resíduos tóxicos ao meio ambiente.

2.13. Química verde: conceitos básicos

Nos últimos anos, surgiu uma nova forma de pensar e tratar o problema de remediação dos resíduos químicos com o objetivo de buscar alternativas que evite ou minimize sua produção. Este novo direcionamento na questão da redução do impacto da atividade química ao ambiente é chamado de *green chemistry* ou química verde, podendo ser também denominado de química limpa, química ambientalmente benigna, ou ainda, química auto-sustentável. (36)

A Química verde é definida como o desenvolvimento e implementação de processos e produtos químicos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente (36). Este conceito, cada vez mais está sendo incorporado em várias aplicações industriais, principalmente em países com indústria química bastante desenvolvida e que apresentam legislação rigorosa no controle de emissão de poluentes e que vem sendo gradativamente incorporado ao meio acadêmico, no ensino e na pesquisa. (37)

É importante ressaltar que a química verde é diferente da química ambiental. Enquanto a química verde procura a redução e a prevenção da poluição, a ambiental é a química do meio-ambiente e dos poluentes químicos na natureza.

A filosofia verde é baseada em 12 princípios, envolvendo a prevenção, síntese e utilização de produtos menos perigosos bem como a utilização de solventes menos tóxicos, uso racional de energia, utilização de matéria-prima renovável, dentre outros. Princípios que podem ser aplicados às diversas áreas da química como na química orgânica, inorgânica, bioquímica, físico-química e analítica, com ênfase em aplicações industriais e pesquisa (36,37):

1. *Prevenção: Evitar a produção do resíduo é melhor do que tratá-lo ou “limpá-lo” após sua geração;*
2. *Economia de Átomos: Deve-se procurar desenhar metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final;*
3. *Síntese de Produtos Menos Perigosos: Sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente;*

4. *Desenho de Produtos Seguros:* Os produtos químicos devem ser desenhados de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos;
5. *Solventes e Auxiliares mais Seguros:* O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas,
6. *Busca pela Eficiência de Energia:* A utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes;
7. *Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima:* Sempre que técnica e economicamente viável, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não renováveis;
8. *Evitar a Formação de Derivados:* A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos;
9. *Catálise:* Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos;
10. *Desenho para a Degradação:* Os produtos químicos precisam ser desenhados de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente;
11. *Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição:* Será necessário o desenvolvimento futuro de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas;
12. *Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes:* As substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios. (36,37)

Na química analítica, o conceito de química verde está sendo aplicado na substituição de métodos e processos químicos que geram problemas ambientais por alternativas menos poluentes ou não-poluentes. Esses novos processos são comumente denominados de métodos ou processos ambientalmente amigáveis e que fazem uso de fontes renováveis ou recicláveis de matéria-prima, utilizando menos energia para produção de igual ou maior quantidade de produto, evitando o uso de substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas.

Visando aplicar cada vez mais tais características, nos últimos anos a combinação *spot test* e espectroscopia de reflectância difusa têm sido largamente aplicadas em análises clínicas, testes para o controle da qualidade do ar, análises de água e alimentos, prospecção geoquímica e ainda em outras áreas (38). A metodologia vem ganhando destaque na literatura devido a rapidez e simplicidade das análises, grande redução no consumo de reagentes (utiliza-se, em média, 10 a 30 μL de cada reagente), boa sensibilidade, possibilidade de medidas “in situ” (portabilidade), muito baixa geração de resíduos ao meio ambiente e baixo custo relativo dos equipamentos (mini-espectrofotômetros portáteis com acessórios para reflectância difusa, de baixo custo e de excelente performance estão atualmente disponíveis no mercado). (39)

2.14. Espectroscopia de reflectância difusa – considerações gerais

A percepção óptica das espécies químicas é baseada na sua interação com a luz. Absorção, emissão e reflexão são as três técnicas ópticas comumente empregadas em medidas quantitativas (44). Contrastando com as medidas de transmitância, amplamente utilizadas em análises quantitativas, a espectroscopia de reflectância difusa tem sido pouco estudada em química analítica. Durante muito tempo, a sua utilização foi limitada às áreas de pigmentos, tintas, têxtil, papel, cerâmica e metalurgia para avaliar algumas propriedades destes materiais, tais como coloração e brilho (40). Porém, pouca atenção foi dada à reflectância difusa como uma técnica para análises quantitativas, porque os valores de precisão obtidos por medidas de reflectância difusa em *spot tests* convencionais eram muito baixos (entre 10 e 20%) (43). Entretanto, com o recente desenvolvimento de novos dispositivos, como fibras ópticas, esferas de reflectância e reflectômetros construídos em laboratório, resultados aceitáveis passaram a ser obtidos (38,44,45). Hoje, é possível desenvolver métodos reflectométricos quantitativos em suportes sólidos ou trabalhar em solução, medindo-se a reflectância difusa de sólidos suspensos, com bons resultados. (46)

2.15. Aspectos teóricos da espectrometria de reflectância difusa no UV/VIS e Lei de Beer - Lambert

Quando um feixe paralelo de radiação monocromática com determinada potência (P_0) incide perpendicularmente em um bloco de material absorvente com uma solução, apenas uma parte deste feixe, denominado de feixe emergente, sai pelo do outro lado do bloco, com

uma outra potência (P). Em outras palavras, após atravessar uma espessura (b) do material contendo (n) espécies absorventes, sua potência decresce como resultado da absorção.

Este decréscimo está relacionado principalmente com perdas por reflexões na interface do bloco e por espalhamento na própria solução.

O tratamento matemático desta potência ao se levar em consideração todos os fatores externos e internos nos leva à Lei de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Equação 1

Onde:

A = absorvância

ε = absortividade molar da substância

b = caminho óptico (cm)

c = concentração

Porém, alguns desvios podem ser encontrados entre a medida de absorvância e a concentração. Estes desvios são caracterizados por limites da própria lei ou por como são realizadas as medidas de absorvância (desvios instrumentais) ou por mudanças químicas associadas às variações de concentração (desvios químicos).

Geralmente, a Lei de Beer-Lambert é ótima para descrever o comportamento da absorção de meios com baixas concentrações do analito, porém, quando a concentração aumenta a distância das moléculas diminui e cada uma delas afeta a distribuição de carga em sua vizinhança, alterando a capacidade das moléculas absorverem um determinado comprimento de onda da radiação. Tais desvios podem aparecer também devido à absortividade molar depender do índice de refração do meio. (119,120)

Diferentemente da espectroscopia de absorção, a espectroscopia de reflectância tem sido pouco estudada por ser considerada inviável para análises quantitativas já que, a partir de *spot tests* convencionais, a precisão não era tão boa (43). Tal fato foi reconsiderado após haver o desenvolvimento de instrumentos analíticos (fibras ópticas e esferas de reflectância melhores), sendo possível então a análise quantitativa por reflectância acopladas a *spot tests*, apresentando resultados muito melhores. (121)

A espectroscopia de reflectância é um processo relativamente complexo que ocorre quando um feixe de radiação atinge a superfície de uma amostra. A reflexão difusa acontece

após a penetração da radiação incidente no interior do sólido; uma parte desta radiação retorna à superfície da amostra depois de ter sofrido absorção e reflexões múltiplas nas superfícies de cada uma das partículas que a compõem. Desta maneira, a radiação é dispersa em uma faixa de vários ângulos. (40)

Caso a amostra seja sólida, ocorrerá reflexão especular em cada superfície plana, porém, como há muitas destas superfícies orientadas aleatoriamente, a radiação é refletida em todas as direções. Geralmente, a intensidade da radiação refletida é independente do ângulo de observação.

Diferentemente da reflexão especular, a reflexão difusa ocorre em superfícies foscas ou opacas devido às reflexões múltiplas a partir das superfícies das partículas que constituem o meio. Este tipo de reflexão compreende um processo que acontece devido à penetração da radiação em um substrato sólido (como um pó finamente dividido), sendo que parte desta radiação retorna para a superfície do substrato, ocorrendo também dispersão múltipla e absorção parcial da radiação pelas partículas ou fibras que constituem o substrato sólido (40,44,45,121). Como há muitas superfícies orientadas aleatoriamente, a radiação é refletida em todas as direções, sendo a intensidade independente do ângulo de observação. (120)

Vários modelos foram desenvolvidos de modo a descrever a intensidade da radiação refletida difusamente de um modo quantitativo. Dentre estes, está o modelo de Kubelka e Munk (120), relacionando a concentração da amostra com a reflectância através da relação entre o coeficiente de absorção molar do analito (K), coeficiente de dispersão ou de espalhamento (S) e poder de reflectância em um meio semi-infinito (infinitamente fino):

$$f(R'_{\infty}) = \frac{(1 - R'_{\infty})^2}{2R'_{\infty}} = \frac{k}{s}$$

Equação 2

Onde R'_{∞} é a razão entre a intensidade refletida pela amostra e a de um padrão não-absorvente, como o cloreto de potássio finamente moído.

Para uma amostra diluída, (K) está relacionado à absortividade molar (ϵ) e à concentração de analito (c) pela equação:

$$K = 2,303 \varepsilon \cdot c$$

Equação 3

A aplicação da Equação 2 fornece uma relação linear entre a concentração da amostra e a função $f(R_{\infty})$ para concentrações médias e altas, enquanto que para concentrações mais baixas pode haver um desvio da linearidade. (44)

2.16. Instrumentação

Medidas de reflectância difusa podem ser obtidas através da utilização de equipamentos portáteis ou de acessórios de reflectância acoplados a um espectrômetro. A Figura 2 apresenta um esquema de um acessório de reflectância difusa portátil composto de uma esfera integradora e uma fibra óptica acoplado a um espectrômetro.

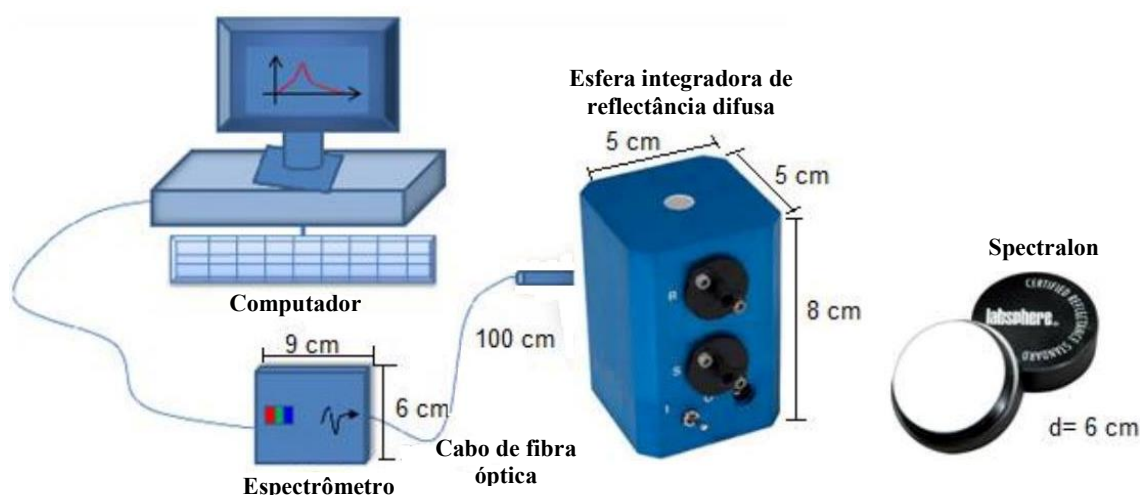


Figura 2. Esquematização do acessório de reflectância difusa portátil composto de uma esfera integradora e uma fibra óptica acoplado a um espectrômetro.

A esfera integradora de reflectância difusa é um sólido oco, cujas paredes são constituídas por um material que reflete a radiação, de qualquer comprimento de onda de interesse difusamente e com alto poder de reflexão (40). Antigamente, as esferas de integração eram fabricadas com material metálico revestido com tinta branca ou pó de óxido de magnésio ou de sulfato de bário prensado. Atualmente, são utilizados materiais brancos de politetrafluoroetileno (PTFE) ou outros termoplásticos, como o Spectralon e o Spectrafect[®]95. (40,42)

A esfera de integração tem a função de coletar e integrar espacialmente o fluxo de radiação refletida por uma superfície. Assim, a intensidade da radiação refletida em qualquer parte da esfera é uma medida do fluxo total da radiação refletida pela mesma, independentemente da distribuição espacial e da posição da fonte de radiação. A radiação é então coletada por um cabo de fibra óptica e encaminhada até o espectrômetro ligado a um computador, no qual será medida e transformada em um sinal analítico que é finalmente interpretado por um software instalado no computador. Como referência e suporte dos *spots tests* é utilizado um disco de politetrafluoroetileno (PTFE) denominado de Spectralon. (40,42)

2.17. Aplicações da espectroscopia de reflectância difusa

Diversos métodos por espectroscopia de reflectância difusa, na região do visível, para análises quantitativas são descritos na literatura. (38,42,44,45,46,122-128)

Pesquisadores desenvolveram método para a determinação de íons ferro(III), cromo(VI) e níquel(II), utilizando papel de filtro como suporte sólido para a reação (45). Outra metodologia desenvolvida foi para a determinação de íons amônio, hidrogenofosfato e cobre(II) (44). Métodos semelhantes aos descritos acima foram desenvolvidos para a determinação de cobre(II), cobalto(II), níquel(II) e ferro(III), em água, todos também utilizando papel de filtro. (38)

Outros pesquisadores utilizaram como suporte sólido para as reações, membranas de extração em fase sólida (EFS) (124-128). Para determinação de íons chumbo(II) foi desenvolvido um método através da imobilização do complexo formado entre os íons chumbo(II) e o alaranjado de xilenol sobre uma superfície de sílica (125). Outro método para determinação de íons níquel(II), em análises da água, por espectroscopia de reflectância difusa foi produzido a partir da reação de precipitação entre os íons níquel(II) e dimetilglioxima. O precipitado foi coletado em membranas de extração de fase sólida (EFS) e as medidas de reflectância difusa foram tomadas por um reflectômetro portátil. (128)

Em 2006, foi desenvolvido um método para a determinação de alumínio, utilizando membranas de sílica C18 para imobilização do complexo de alumínio formado (128). Métodos para análise de compostos não-metálicos também foram descritos (126,127). Um desses métodos desenvolvidos foi para determinação de iodo e iodeto (126) e outro para quantificação de amônio pela reação de Berthelot, utilizando membranas de EFS como suporte sólido para medidas de reflectância. (127).

A espectroscopia de reflectância difusa permite também a construção de reflectômetros *home-made* (38). Um método para determinação de diclofenaco em formulações farmacêuticas, através da sua complexação com íons cobre(II) foi desenvolvido em 2006. O complexo colorido produzido pela reação foi submetido à análise em um reflectômetro *home-made*, composto por um LED (*light emitting diode*) e um LDR (*light dependent resistor*) e medidas de resistência foram obtidas (46). Posteriormente, em 2008, uma cela de fluxo composta novamente por um LED e por um LDR foi construída para determinação de níquel através da sua reação com a dimetilglioxima, onde foi adaptado para análise por injeção em fluxo, e sua detecção através de medidas de resistência foi realizada com sucesso. (129)

Métodos mais recentes para a determinação de princípios ativos de medicamentos, utilizando papel de filtro como suporte sólido para a reação, são descritos na literatura. Tanto o método para determinação de furosemida em formulações farmacêuticas, através da sua reação com *p*-dimetilaminocinamaldeído, quanto o método para determinação de propranolol, pela reação deste com 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida, mostraram-se práticos e eficientes, com limites de detecção adequados para este tipo de análise e ótima precisão. (122,123)

Outros trabalhos publicados recentemente mostram ainda a aplicação das medidas de reflectância na região do infravermelho próximo, para a determinação de metais em amostras de alimentos (130) e de medicamentos em formulações farmacêuticas. (131)

Todos os estudos citados acima revelaram que o uso apropriado da espectroscopia de reflectância difusa, fornecendo resultados quantitativos confiáveis, demonstrando o potencial desta técnica para análises quantitativas.

2.18. Spot test

Nas últimas quatro décadas, as reações clássicas de *spot tests* têm sido largamente aplicadas em análises clínicas, testes para o controle da qualidade do ar, análises de água e alimentos, prospecção geoquímica e ainda em outras áreas da química analítica (42). A simplicidade extrema, rapidez, economia de tempo e reagentes e a baixa produção de resíduos tóxicos, possibilitam que os *spots tests* surjam como uma alternativa para o desenvolvimento de métodos analíticos mais limpos (39,122,123,132,133). A confecção de um *spot test* é muito simples, consistindo apenas da mistura de algumas gotas da solução de analito ou solução-teste com algumas gotas da solução de reagente, formando-se assim, um produto colorido. O

meio para a reação pode ser uma superfície porosa, como papel de filtro (41), pastilhas de sílica gel, ou mesmo uma superfície lisa, como uma placa de porcelana (42).

Em meados do século XIX, alguns testes químicos já eram realizados sobre a superfície de papéis de filtro. Runge, considerado o criador da técnica do *spot test*, desenvolveu, em 1822, um teste para detecção de cloreto em soluções alvejantes. Quando gotas da solução de alvejante eram adicionadas ao papel impregnado com amido e iodeto de potássio, um círculo azul era formado em consequência da liberação do iodeto e da reação entre o cloreto e o amido (123). Vinte e cinco anos mais tarde, Hugo Shiff desenvolveu um método para detecção de ácido úrico, impregnando papel de filtro com carbonato de prata (41,42). Posteriormente, Fritz Feigl se destacou como o cientista que estudou e desenvolveu diversas reações orgânicas e inorgânicas mais seletivas e sensíveis por *spot tests*. (41)

Os *spot tests* constituem uma técnica colorimétrica, que pode ser usada para análises qualitativas, quando a detecção da substância de interesse se dá visualmente pela presença de cor; para análises semi-quantitativas – na quais escalas de cores, feitas com padrões analíticos de diferentes concentrações, são utilizadas para comparação com a intensidade de cor do teste e para análises quantitativas, nas quais utilizam-se, por exemplo, instrumentos para medir a luz refletida, neste caso, a espectroscopia de reflectância difusa. Em análises semi-quantitativas ou quantitativas, o procedimento para a realização do *spot test* deve ser bem elaborado, de modo que haja uniformidade na cor da mancha formada e, conseqüentemente, uma boa precisão das medidas (40). Detalhes importantes da execução do *spot test* envolvem o controle do volume da solução a ser adicionada utilizando micropipetas ou microseringas e da velocidade da adição das soluções, bem como a escolha da ordem de adição que resulte em maior uniformidade da mancha colorida formada.

Métodos para análises quantitativas envolvendo *spot tests* com detecção por espectroscopia de reflectância difusa são interessantes do ponto de vista da química verde, que preconiza o desenvolvimento de novos métodos ambientalmente mais amigáveis (36,37). Os *spots tests* são simples, rápidos, econômicos e geram mínima quantidade de resíduos, sendo, portanto, métodos menos poluentes. Além dessas vantagens, estes métodos possuem também a característica da portabilidade, quando se faz uso de detectores operados à bateria, que podem ser levados para a realização de análises *in situ*. (123,124)

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

Desenvolver um método analítico ambientalmente mais limpo, simples, rápido, sensível, portátil e de baixo custo relativo para a determinação do teor de íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar, utilizando espectroscopia de reflectância difusa combinada com *spot test*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliação de diversos agentes cromogênicos para processar a reação, tais como: 1,5-difenilditiocarbazona (ditizona), 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), 2,2-bipiridina, 1,10-fenantrolina;
- Otimização dos parâmetros experimentais do novo método analítico desenvolvido via quimiometria, no sentido de se utilizar as mínimas quantidades possíveis de amostras, solventes e reagentes;
- Aplicação do método analítico desenvolvido na análise de íons cobre(II) em amostras de aguardente de cana-de-açúcar, comparando os resultados obtidos pelo método proposto com aqueles citados na literatura e/ou metodologia padrão para análise de íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar;
- Interagir com empresas e/ou produtores artesanais de aguardente de cana-de-açúcar.

4. Parte experimental

4.1. Materiais e reagentes

4.1.1. Instrumental

- Agitador magnético marca IKA[®], modelo RH B-KT/C;
- Balança analítica marca Mettler Toledo[®], modelo AG 204, precisão de $\pm 0,0001$ g;
- Banho ultrassom marca Branson[®], modelo 3210R-MTH;

- Equipamento portátil de reflectância difusa composto de uma esfera integradora e fibra óptica da marca Ocean Optics, acoplado a um espectrotômetro USB2000 com o software OOIBase32;
- Espectrômetro de absorção atômica por chama marca Varian[®], modelo SpectrAA 50;
- Lâmpada de cátodo oco marca Varian[®], número de série 0010710;
- Micropipeta marca Eppendorf[®], com variação de volume de 1 a 100 µL;
- pHmetro marca Micronal[®] modelo B474, acoplado com eletrodo combinado de Ag/AgCl.

4.1.2. Materiais de vidro e diversos

- Balões volumétricos de 10,00; 25,00; 50,00; 100,00 mL;
- Barra de agitação magnética;
- Béqueres de 30, 50, 100, e 250 mL;
- Bureta de 25,00 mL
- Conta gotas de vidro;
- Espátula de vidro;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Funil de vidro;
- Pipeta volumétrica de 10,00; 20,00 mL;
- Pipetas graduadas de 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 mL;
- Ponteiras de plástico para micropipetador;
- Provetas de 10,0; 25,0 e 50,0 mL.

Todas as vidrarias reservadas para este trabalho foram devidamente limpas e calibradas.

4.1.3. Reagentes

- 1-(2-piridilazo)-2-naftol, P.A., marca MERCK[®], pureza de 99,0%;
- 1,10-fenantrolina, marca MERCK[®], pureza de 99,5%;
- 1,5-Difeniltiocarbazona, marca MERCK[®], pureza de 99,0%;
- 2,2-bipiridina, marca MERCK[®], pureza de 99,5%;
- 2-propanol, marca J.T. Baker[®], pureza de 99,9%;
- Acetato de cádmio P.A., marca MERCK[®], pureza de 99,0%;

- Acetato de chumbo trihidratado, marca J.T. Baker[®], pureza de 100,7%;
- Acetato de cobalto tetrahidratado, marca MERCK[®], pureza de 99,0%;
- Acetato de mangnês tetrahidratado, marca MERCK[®], pureza de 99,0%;
- Acetato de sódio anidro, marca J.T. Baker[®], pureza de 99,9%;
- Acetato de zinco dihidratado, marca Mallinckrodt[®], pureza de 99,5%;
- Acetona, marca Tédia[®], pureza de 99,5%;
- Ácido acético glacial, marca Tédia[®], pureza de 99,7%;
- Ácido clorídrico, marca Tédia[®], pureza de 37,0%;
- Ácido etilendinitrilotetracético dissódico dihidratado (EDTA – sal dissódico), marca MERCK[®], pureza de 99,9%;
- Ácido malônico, marca MERCK[®], pureza de 99,0%;
- Água deionizada do sistema Millipore[®] (resistividade de 18,2 MΩ.cm),
- Amostras comerciais de aguardente de cana-de-açúcar.
- Brometo de dodecil-trimetilamônio, marca Sigma[®], pureza de 99,0%;
- Cloreto de níquel hexaidratado, marca Mallinckrodt[®], pureza de 98,0%;
- Cloridrato de hidroxilamina, marca MERCK[®], pureza de 99,0%;
- Clorofórmio, marca Tédia[®], pureza de 99,9%;
- Dodecil-sulfato de sódio, marca Sigma[®], pureza de 99,0%;
- Etanol, marca J.T. Baker[®], pureza de 99,9%;
- Hidróxido de sódio, marca Reagen[®], pureza de 99,9%;
- Metanol, marca Tédia[®], pureza de 99,9%;
- Nitrato de cobre (II) . 3 H₂O P.A., marca Synth[®], pureza de 98,0%;
- Nitrato de ferro (III) P.A., J.T. Baker[®], pureza de 99,0%;
- Papel de filtro, marca Whatman[®] 1, utilizado para a confecção dos *spots tests*;
- Tripolifosfato pentassódico P.A., marca Synth[®], pureza de 85,0%.

4.1.4. Soluções

Para este trabalho foram utilizadas as seguintes soluções:

- **Solução estoque de cobre(II) 1000 mg.L⁻¹:** a solução estoque de íons cobre(II) foi preparada através da dissolução de 3,8796 g de nitrato de cobre (II) trihidratado em 1000 mL

de água deionizada e armazenada em geladeira. As demais soluções de íons cobre utilizadas neste trabalho foram preparadas através da devida diluição desta solução.

• **Solução tampão acetato de sódio/ácido acético pH 5,00:** Primeiramente preparou-se uma solução de ácido acético a $2,00 \text{ mol.L}^{-1}$, esta solução foi preparada pipetando-se 6,10 mL de ácido acético glacial e com conseguinte diluição com água deionizada em balão volumétrico até o volume de 50,00 mL. Posteriormente foi preparada uma solução de acetato de sódio a $2,00 \text{ mol.L}^{-1}$, pesando uma massa de 4,1020 g de acetato de sódio anidro, seguida da dissolução do sal com água deionizada e posterior diluição em um balão volumétrico de 25,00 mL. Preparada ambas as soluções, misturou-se 21,50 mL da solução de acetato de sódio $2,00 \text{ mol.L}^{-1}$ com 28,50 mL da solução de ácido acético $2,00 \text{ mol.L}^{-1}$, logo em seguida com a ajuda de um pHmetro, o pH da solução foi corrigido até pH igual a 5,00 com a solução de acetato de sódio $2,00 \text{ mol.L}^{-1}$. (134)

• **Indicador PAN 0,05% m/v:** a solução do indicador PAN foi preparada através da solubilização de 0,0250 g de PAN em 5,00 mL de etanol.

• **Solução EDTA 0,01 mol.L⁻¹:** a solução de EDTA foi preparada através da solubilização de 0,3760 g de EDTA (sal dissódico) em 100,00 mL de água deionizada.

• **Padronização da solução estoque de cobre(II) 1000 mg.L⁻¹:** a padronização da solução estoque de íons cobre(II) foi realizada transferindo para um erlenmeyer de 250 mL uma alíquota de 10,00 mL da solução estoque de íons cobre(II) 1000 mg.L^{-1} . Posteriormente adicionou-se 40 mL de água deionizada, 50 mL de etanol e 5 mL do tampão acetato de sódio e ácido acético (pH 5,00) no mesmo erlenmeyer. Logo em seguida foi adicionado 5 gotas do indicador PAN a 0,05% m/v em etanol e por final titulou-se em quintuplicata com EDTA a $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. (135)

• **Solução de íons cobre(II) 5,00 mg.L⁻¹ em solução alcoólica de 40% v/v a pH 5,00:** a solução foi preparada através da solubilização de uma alíquota da solução estoque de íons cobre(II) $1000,00 \text{ mg.L}^{-1}$, para que a concentração final de íons cobre fique em $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$, em uma solução alcoólica de 40% v/v (água – etanol). Logo em seguida, o pH era corrigido em pHmetro até pH 5,00, com solução de ácido clorídrico $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ ou de hidróxido de sódio $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. Posteriormente a solução era transferida para um balão volumétrico e acertado o menisco com solução alcoólica 40% v/v. As demais concentrações de soluções

alcoólicas a 40% v/v a pH 5,00 utilizadas no decorrer do trabalho foram preparadas do mesmo modo.

- **Solução do reagente cromogênico PAN 0,10% m/v:** a solução foi preparada através da dissolução de 0,0253 g de PAN em 25,00 mL de etanol. Após o uso a solução era armazenada em frasco ambar na geladeira. As demais concentrações de soluções do agente cromogênico PAN foram preparadas, pesando a massa devida para as respectivas concentrações, de maneira semelhante.

- **Solução do reagente cromogênico PAN 0,12% m/v:** a solução foi preparada através da dissolução de 0,0303 g de PAN em 25,00 mL de etanol. Após o uso a solução era armazenada em frasco ambar na geladeira.

- **Solução do reagente cromogênico 1,5-difenilcarbazona (ditizona) 0,10% m/v:** a solução foi preparada através da dissolução de 0,0250 g de ditizona em 25,00 mL de etanol. Após o uso a solução era armazenada em frasco ambar na geladeira.

- **Solução do reagente cromogênico 1,10-fenantrolina 0,10% m/v:** a solução foi preparada através da dissolução de 0,0250 g de 1,10-fenantrolina em 25,00 mL de etanol. Após o uso a solução era armazenada em frasco ambar na geladeira.

- **Solução do reagente cromogênico 2,2-bipiridina 0,10% m/v:** a solução foi preparada através da dissolução de 0,0253 g de 2,2-bipiridina em 25,00 mL de etanol. Após o uso a solução era armazenada em frasco ambar na geladeira.

- **Solução do mascarante ácido malônico 5,00% m/v:** a solução foi preparada através da dissolução de 2,5252 g de ácido malônico em 30 mL de água deionizada. Logo em seguida, o pH era corrigido em pHmetro até pH 5,00, com solução de hidróxido de sódio 1,00 mol.L⁻¹. Posteriormente a solução foi transferida para um balão volumétrico e acertado o menisco até 50,00 mL com água deionizada. As demais concentrações de soluções do mascarante ácido malônico utilizadas no decorrer do trabalho foram preparadas do mesmo modo.

- **Solução trifosfato de sódio 5,00% m/v:** a solução foi preparada através da dissolução de 2,9410 g de trifosfato de sódio em 30 mL de água deionizada. Logo em seguida, o pH era corrigido em pHmetro até pH 5,00, com solução de ácido clorídrico 1,00 mol.L⁻¹.

Posteriormente a solução foi transferida para um balão volumétrico e acertado o menisco até 50,00 mL com água deionizada. As demais concentrações de soluções do mascarante trifosfato de sódio utilizadas no decorrer do trabalho foram preparadas do mesmo modo.

4.2. Testes preliminares

Para a reação com íons cobre foram testados os seguintes reagentes cromogênicos: 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), 1,5-difeniltiocarbazona (ditizona), 1,10-fenantrolina e 2,2-bipiridina. Sendo os reagentes PAN e ditizona utilizados para reações com íons cobre(II) e os reagentes 1,10-fenantrolina e 2,2-bipiridina utilizados para reações com íons cobre(I).

A formação do complexo, produto de reação entre os íons cobre e os reagentes cromogênicos, se deu através da interação entre os dois em papel de filtro qualitativo cortado em formato de quadrado de 3 cm x 3 cm aproximadamente (*spot test*). Para facilitar o manuseio nos *spots tests* foram feitas hastes, e os mesmos foram dispostos horizontalmente na base do suporte. Assim, 30 μL da solução do reagente cromogênico a uma concentração de 0,10% m/v diluída em etanol foi gotejada no centro do papel e, em seguida, 30 μL da solução alcoólica 40% v/v de íons cobre(II) com 5,00 mg.L^{-1} a pH 5,00 foram adicionados sobre o reagente cromogênico com auxílio de uma micropipeta encaixada em um suporte metálico, como mostrado na Figura 3 e 4, desenvolvido por Tubino, Rossi e Magalhães (45). Os testes foram feitos para todos os reagentes cromogênicos.

Para os reagentes 1,10-fenantrolina e 2,2-bipiridina, uma massa correspondente de cloridrato de hidroxilamina foi adicionada à solução alcoólica de 40% v/v de íons cobre a 5,00 mg.L^{-1} , para que a mesma ficasse na concentração de 10,00% m/v em solução para a redução dos íons cobre(II) a íons cobre(I).

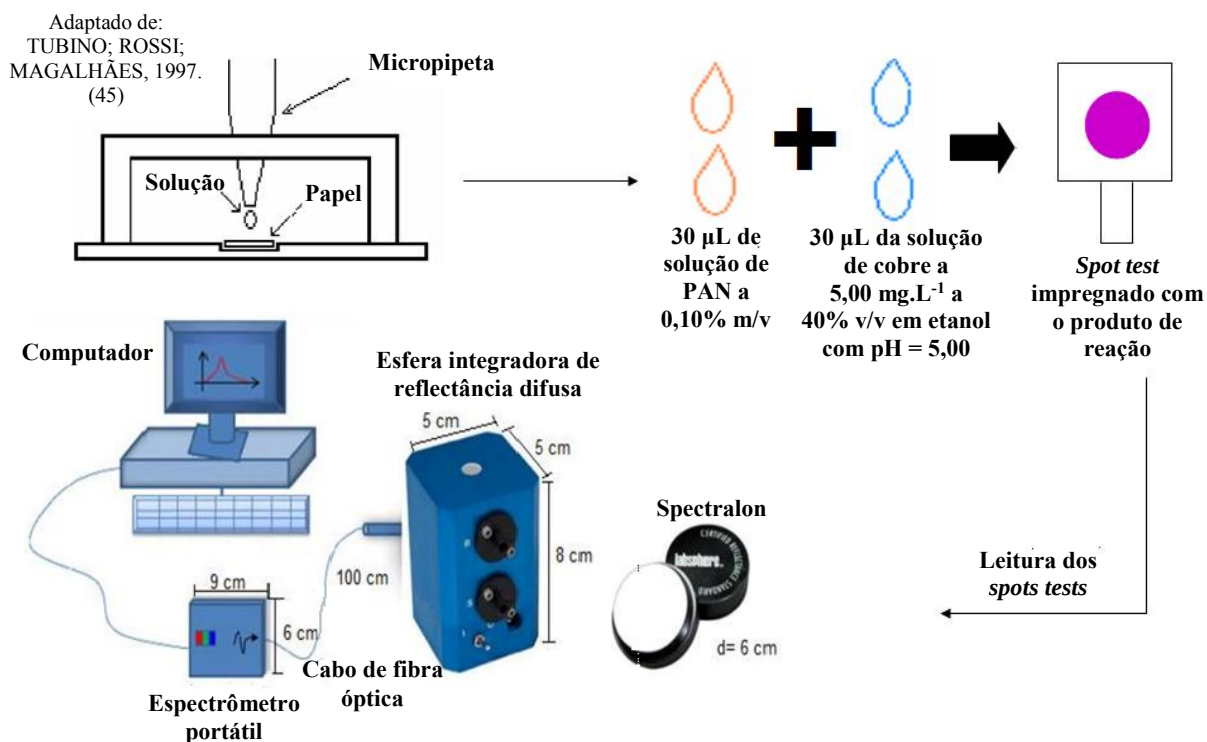


Figura 3. Procedimento para a realização da reação, confecção e leitura dos *spots tests*.



Figura 4. Suporte metálico utilizado para a confecção dos *spots tests*.

Após a aplicação dos reagentes é esperado que os mesmos reajam e formem uma mancha colorida uniforme, evidenciando a formação do complexo entre o reagente cromogênico e os íons cobre, conforme exemplo da Figura 5.

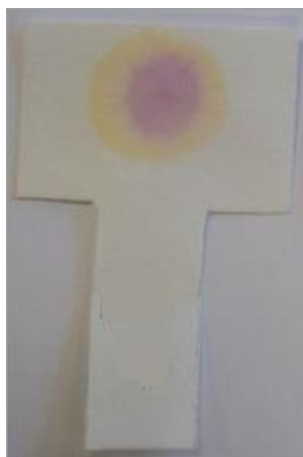


Figura 5. Exemplo de *spot test* realizado em papel de filtro com obtenção de mancha colorida uniforme.

4.3. Ordem de adição dos reagentes

Após definido o reagente cromogênico para a reação com íons cobre, prosseguiu-se com os estudos, afim de avaliar a influência da ordem de adição dos reagentes no *spot test* para a formação de uma mancha uniforme. As ordens de adição dos reagentes estudadas foram as seguintes:

- 30 μL da solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol e 30 μL solução alcoólica 40% v/v de íons cobre(II) com 5,00 mg.L^{-1} a pH 5,00;
- 30 μL solução alcoólica 40% v/v de íons cobre(II) a 5,00 mg.L^{-1} com pH 5,00 e 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol;
- 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol esperando a secagem e 30 μL solução alcoólica 40% v/v de íons cobre(II) com 5,00 mg.L^{-1} a pH 5,00;
- 30 μL solução alcoólica 40% v/v de íons cobre(II) com 5,00 mg.L^{-1} a pH 5,00 esperando a secagem e 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol.

As manchas foram então comparadas visualmente para ser definida a melhor ordem de adição dos reagentes.

4.4. Avaliação do volume adicionado dos reagentes

Neste experimento foi avaliado a quantidade de volume adicionado de cada reagente no *spot test*. Foram avaliados os volumes de 20, 30 e 40 μL de cada reagente e analisada

visualmente a formação da mancha do complexo. As soluções utilizadas no experimento foram: solução alcoólica de 40% v/v a pH 5,00 de íons cobre(II) com 5,00 mg.L⁻¹ e solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol. Estas foram adicionadas da seguinte forma: solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol esperando a secagem e solução alcoólica de 40% v/v de íons cobre(II) com 5,00 mg.L⁻¹ a pH 5,00.

4.5. Espectro de absorção

Definida a ordem de adição dos reagentes, o volume a ser adicionado dos mesmos e obtendo manchas uniformes nos *spots tests*, as medidas de reflectância foram analisadas para obtenção de um espectro de absorção do complexo formado e do reagente cromogênico, com auxílio de um equipamento portátil composto de uma esfera integradora e fibra óptica da marca Ocean Optics, acoplado a um espectrofotômetro USB2000 (Figuras 6 e 7) com o software OOIBase32. As soluções utilizadas no experimento foram: solução alcoólica de 40% v/v a pH 5,00 de íons cobre(II) com 5,00 mg.L⁻¹ e solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol. Estas foram adicionadas da seguinte forma: solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol esperando a secagem e solução alcoólica de 40% v/v de íons cobre (II) com 5,00 mg.L⁻¹ a pH 5,00 para obtenção do espectro do complexo e solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol esperando a secagem e solução alcoólica 40% v/v a pH 5,00 para obtenção do espectro do PAN.

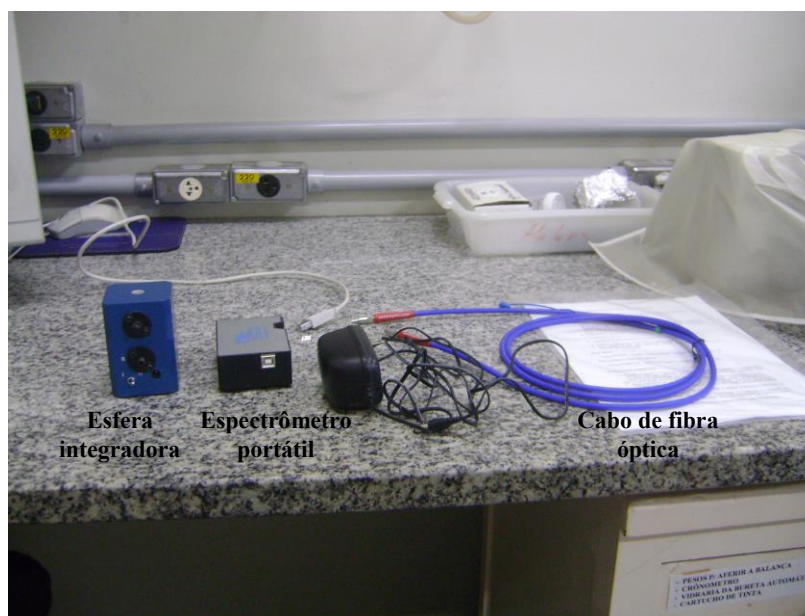


Figura 6. Espectrômetro portátil, esfera integradora e fibra óptica.



Figura 7. Sistema de medidas de reflectância difusa portátil montado.

4.6. Avaliação do grau alcoólico da solução de cobre(II)

A graduação alcoólica da solução de cobre(II) foi avaliada variando-se a concentração de etanol gradativamente na solução de 35 a 55% v/v, respeitando os limites de porcentagem alcoólica da aguardente de cana-de-açúcar que varia de 38 a 54% v/v. Portanto, as soluções utilizadas foram: solução alcoólica de concentração a ser avaliada a pH 5,00 de íons cobre (II) com $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$ e solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol, adicionadas da seguinte forma: 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol esperando a secagem e 30 μL solução alcoólica de íons cobre(II) com $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$ a pH 5,00. Para obtenção do branco foi adicionado 30 μL da solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol, secagem, 30 μL solução alcoólica com a porcentagem avaliada a pH 5,00 e medida da absorvância a 559 nm.

4.7. Avaliação do uso de meio micelar

Verificou-se a sensibilidade da reação entre os íons cobre(II) e o reagente cromogênico frente a utilização de um surfactante catiônico, Brometo de dodecil-trimetilamônio (DTAB), e um aniônico, Dodecil-sulfato de sódio (SDS). Para tal, utilizaram-se concentrações de surfactante em torno da concentração micelar crítica, $14,00 \text{ mmol.L}^{-1}$

para o DTAB e $8,00 \text{ mmol.L}^{-1}$ para o SDS. Uma massa específica de cada surfactantes foi pesada e adicionada separadamente à solução alcoólica de 40% v/v de íons cobre(II) com $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$ a pH 5,00, afim de ficarem com concentração igual a concentração micelar crítica em solução. A outra solução utilizada foi a solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol, adicionadas da seguinte forma: 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol, secagem, e 30 μL solução alcoólica de íons cobre(II) com $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$ a pH 5,00 com o surfactante. As medidas de absorvância foram realizadas em 559 nm.

4.8. Avaliação do solvente da solução do agente cromogênico

Foram realizados testes para avaliar a influência de diferentes solventes na diluição do agente cromogênico e na sensibilidade. Os solventes estudados foram o etanol, metanol, 2-propanol, acetona e clorofórmio. Portanto, para o estudo as soluções utilizadas foram solução alcoólica de 40% v/v a pH 5,00 de íons cobre(II) com $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$ e solução de reagente cromogênico PAN 0,10% m/v diluída nos solventes estudados, adicionadas da seguinte forma: 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v, esperando secagem e 30 μL solução alcoólica de íons cobre(II) com $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$ a pH 5,00. Para obtenção do branco, solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v, esperando secagem e solução alcoólica a pH 5,00, foram adicionadas da seguinte forma: 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v diluído nos diferentes solventes estudados, esperando secagem e 30 μL solução alcoólica de íons cobre(II) com $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$ a pH 5,00, e medida da absorvância em 559 nm.

4.9. Concentração do agente cromogênico na formação do complexo

A influência da concentração do agente cromogênico PAN para a formação do complexo foi avaliada variando-se a concentração do agente cromogênico, em experimentos separados, de 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16; 0,18 e 0,20% m/v em etanol. Portanto, para o estudo as soluções utilizadas foram solução alcoólica na concentração de 40% v/v a pH 5,00 com concentração de íons cobre(II) a $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$ e solução de reagente cromogênico PAN na concentração estudada em etanol, adicionadas da seguinte forma: 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a cada concentração estudada em etanol, esperando secagem, e 30 μL solução alcoólica de íons cobre(II) com $5,00 \text{ mg.L}^{-1}$ a pH 5,00. Para obtenção do branco, solução de reagente cromogênico PAN na concentração estudada em

etanol, esperando secagem, e solução alcoólica a pH 5,00 e medida da absorvância em 559 nm.

4.10. Estudo quimiométrico do pH e tempo de reação

Para avaliar a influência do pH da solução alcoólica do analito e do tempo na reação de formação do complexo no *spot test* e sua interação com o suporte sólido (papel de filtro), empregou-se um estudo quimiométrico de análise de superfície de resposta (136), utilizando o programa computacional (Statistica®, versão 8,0, USA), sendo a resposta do sistema a variação de absorvância (ΔAbs). Escolheram-se níveis baixo (-) e alto (+) do planejamento fatorial 2^2 , tipo estrela com ponto central, os respectivos valores: 2,00 e 6,00 para o pH e 5 e 20 minutos para o tempo de reação. Realizou-se também, um ponto intermediário nos intervalos do pH e do tempo.

Para este estudo foi mantida a solução alcoólica de 40% v/v íons cobre(II) com 5,00 mg.L⁻¹ e a solução de PAN a 0,12% m/v em etanol. A forma de adição foi a mesma feita nos experimentos anteriores e as leituras realizadas em 559 nm, tendo um branco de reagentes adicionados da mesma forma como referência.

4.11. Avaliação da estabilidade óptica

Para avaliar a estabilidade óptica do agente cromogênico e do complexo na reação de *spot test* em relação ao tempo, realizou-se um acompanhamento cinético do valor de (ΔAbs), com leituras feitas a cada 5 minutos até se completar 120 minutos.

Na avaliação do agente cromogênico, o acompanhamento das medidas foi avaliado, impregnando o *spot test* somente com a solução do agente cromogênico PAN a 0,12% m/v em etanol com as leituras de absorvância feitas em 480 nm, comprimento de onda de absorção máxima do PAN, durante 120 minutos e por uma semana afim de verificar a possibilidade de armazenamento dos *spots tests* impregnados com o agente cromogênico para posterior utilização.

Para a avaliação do complexo formado foi mantida a solução alcoólica de 40% v/v íons cobre(II) com 5,00 mg.L⁻¹ e a solução de PAN a 0,12% m/v em etanol. A forma de adição foi a mesma feita nos experimentos anteriores e as leituras realizadas em 559 nm.

4.12. Curva analítica de calibração para os íons cobre(II)

A curva de calibração foi obtida, juntamente com todas as figuras de mérito, variando a concentração de íons cobre(II) dentro da solução alcoólica de 40% v/v a pH 5,00 de 1,00 a 5,00 mg.L⁻¹ e mantendo constante a concentração do agente cromogênico PAN em 0,12% m/v em etanol, adicionados da mesma forma que nos experimentos anteriores. Os valores de absorvância foram obtidos a 559 nm e utilizando como referência um branco de reagentes.

4.13. Levantamento e estudo dos possíveis interferentes

Um levantamento dos possíveis íons metálicos que interferem na análise de íons cobre(II) em aguardente de cana foi realizado. Para classificar um íon metálico como provável interferente, o mesmo deve reagir com o agente cromogênico PAN e podendo ser encontrado em aguardente de cana-de-açúcar. Segundo Sandell et al. (137) os íons metálicos cádmio(II), cobalto(II), chumbo(II), ferro(III), manganês(II), níquel(II) e zinco(II) reagem com PAN formando complexos bastante estáveis. Tais íons além dos íons cobre(II) podem estar presentes em aguardentes de cana e tem suas quantidades controladas pela legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (138). As condições de formação de complexos dos íons cobre(II) e dos demais íons metálicos com o reagente cromogênico PAN e seus teores máximos permitidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Íons que podem ser encontrados em aguardente de cana, suas condições de reação e limites máximos permitidos.

Íons metálicos	Faixa pH de complexação (UpH)*	Faixa comprimento de absorção máxima (nm)*	Concentrações máximas permitidas (mg.L ⁻¹)**
Cobre(II)	4,0 – 10,0	550 - 560	5,00
Cádmio(II)	7,0 – 10,0	550 - 560	0,50
Cobalto(II)	4,0 – 7,0	590 - 640	0,50
Chumbo(II)	4,0 – 7,0	550 – 560	0,20
Ferro(III)	4,0 – 7,0	775	0,30
Manganês(II)	7,0 – 10,0	550	0,10
Níquel(II)	4,0 – 10,0	575	3,00
Zinco(II)	4,5 – 8,0	550 - 560	5,00

*Fonte: SANDELL, E.B., ONISH, H., Photometric determination of traces of metals. Part I, John Wiley & Sons, New York, 1978. (137)

**ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto n° 55871, de 26 março de 1965. Brasília - DF: Diário Oficial 1965. (138)

Definido os prováveis íons interferentes, um estudo para se confirmar a hipótese de interferência foi realizado utilizando o fator de interferência (F.I.) para cada íon.

O fator de interferência é calculado pela razão matemática da variação de absorvância do íon cobre(II) e o íon de interferência ($\Delta\text{Abs (Cu(II) + íon interferente)}$) pela variação de absorvância do íon cobre(II) ($\Delta\text{Abs (Cu(II))}$) (139) (Equação 4).

$$\text{F.I.} = \frac{\Delta\text{Abs (Cu(II) + íon interferente)}}{\Delta\text{Abs (Cu(II))}}$$

Equação 4

Ao analisar o resultado da razão matemática, e este for igual a 1,00, considera-se que a interferência é nula, pois a variação de absorvância dos íons cobre(II) e o íon interferente pela variação de absorção do íon cobre(II) sozinho são iguais. Se a razão for menor que 1,00, admite-se efeito de interferência negativo, onde o íon interferente estudado de fato causa interferência e está ocasionando perda de sinal analítico. Por fim, se a razão for maior que 1,00, admite-se efeito de interferência positivo, em que o íon interferente estudado de fato também causa interferência e está ocasionando ganho de sinal de analítico. É considerado efeito de interferência os valores de fatores de interferência menores que 0,95 e maiores que 1,05. (139)

Portanto para esse estudo foi avaliado dois níveis, mínimo e máximo, de concentração para todos os íons envolvidos e para o conjunto total dos íons nas mesmas condições experimentais fixadas anteriormente. Para os íons cobre(II) as concentrações estudadas foram de 0,50 e 5,00 mg.L⁻¹, para cádmio(II) foram de 0,50 e 5,00 mg.L⁻¹, cobalto(II) 0,50 e 5,00 mg.L⁻¹, chumbo(II) 0,20 e 2,00 mg.L⁻¹, ferro(III) 0,30 e 3,00 mg.L⁻¹, manganês(II) 0,10 e 1,00 mg.L⁻¹, níquel(II) 0,3 e 3,00 mg.L⁻¹ e zinco(II) de 0,50 e 5,00 mg.L⁻¹. A forma de adição dos reagentes no *spot test* foi a mesma feita nos experimentos anteriores, mantendo constante a concentração do agente cromogênico PAN em 0,12% m/v em etanol e as leituras realizadas em 559 nm, tendo um branco de reagentes adicionados da mesma forma como referência.

Com os resultados das medidas de reflectância foi realizado o cálculo do fator de interferência e assim determinado se o íon estudado é de fato ou não um interferente.

4.14. Estudo da redução e/ou eliminação do efeito de interferência

Uma proposta para anular ou diminuir os efeitos de interferência provocados pelos íons metálicos é o uso de substâncias químicas que reagem com esses íons e não que reajam com os íons cobre(II), tais substâncias são denominadas de mascarantes. Para os íons cádmio(II), cobalto(II), ferro(III) e níquel(II) é proposto o uso do ácido malônico, e para os íons chumbo(II), manganês(II) e zinco(II) propõe-se o uso do trifosfato de sódio (tripolifosfato pentassódico ou tripolifosfato de sódio) (140). Assim para avaliar o efeito desses mascarantes aplicados aos respectivos íons, fixou-se uma concentração de 0,20% m/v para ambos os mascarantes. Para os íons cobre(II) as concentrações estudadas foram de 0,50 e 5,00 mg.L⁻¹, para cádmio(II) foram de 0,50 e 5,00, cobalto(II) 0,50 e 5,00, chumbo(II) 0,20 e 2,00, ferro(III) 0,30 e 3,00, manganês(II) 0,10 e 1,00, níquel(II) 0,3 e 3,00 e zinco(II) de 0,50 e 5,00 mg.L⁻¹. Foi avaliado também o uso em conjunto dos dois mascarantes propostos na combinação de concentrações de todos os íons juntos. Com os resultados das medidas de reflectância foi realizado o cálculo do fator de interferência e assim, determinado se o mascarante utilizado está diminuindo de fato o efeito de interferência causado pelo íon metálico. Todos os experimentos foram realizados nas condições de ótimo fixadas anteriormente.

4.15. Otimização da concentração dos mascarantes

Sabendo-se que neste trabalho a adição dos mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio reduz o efeito de interferência, a concentração dos mascarantes foi otimizada no conjunto de íons específicos para cada um e para o conjunto total dos íons, variando apenas sua concentração e mantendo as demais condições constantes, visando reduzir ainda mais os efeitos de interferência e torná-los dentro dos limites toleráveis (< 5,00%). O intervalo de concentração estudada foi de 0,05 a 0,25% m/v em solução com as demais condições mantidas de acordo com o item anterior. Para o conjunto total dos íons interferêntes manteve-se a concentração de cobre(II) constante em 0,50 mg.L⁻¹ e dos íons cádmio(II) em 5,00, cobalto(II) em 5,00, chumbo(II) em 2,00, ferro(III) de 3,00, manganês(II) em 1,00, níquel(II) em 3,00 e zinco(II) em 5,00 mg.L⁻¹. Com os resultados das medidas de reflectância foi realizado o cálculo do fator de interferência e assim determinado se o aumento da concentração dos mascarantes utilizado está diminuindo de fato o efeito de interferência

causado pelo íon metálico. Todos os experimentos foram realizados nas condições de ótimo fixadas anteriormente.

4.16. Curva analítica de calibração com a presença dos mascarantes

Para avaliar a influência na sensibilidade do uso dos mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio, obteve-se uma nova curva analítica de calibração e determinou-se suas respectivas figuras de mérito.

A curva de calibração foi obtida variando a concentração de íons cobre(II) dentro da solução alcoólica de 40% v/v a pH 5,00 de 1,00 a 10,00 mg.L⁻¹, com concentração dos mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio constantes em 0,25% m/v na solução e mantendo a concentração do agente cromogênico PAN em 0,12% m/v em etanol adicionados da mesma forma nos experimentos anteriores. Os valores de absorvância foram obtidos a 559 nm e utilizando como referência um branco de reagentes.

Em seguida, foram feitos ensaios a fim de verificar a repetibilidade do método dentro de um mesmo dia (intradia) e entre dias diferentes (interdia). Para tal, foram feitos três experimentos repetindo três pontos dentro da linearidade da curva analítica, 1,00; 5,00, 10,00 mg.L⁻¹, sendo dois desses experimentos realizados em um mesmo dia e em períodos diferentes e o terceiro, no dia subsequente a fim de se calcular o desvio padrão relativo (RSD).

4.17. Precisão e exatidão do método

A precisão e exatidão do método proposto foram avaliadas analisando 5 amostras de aguardentes de cana-de-açúcar sintéticas simuladas em laboratório. Tais aguardentes foram feitas com graduação alcoólica de 40% v/v e com concentrações conhecidas de 0,60; 1,00; 3,00; 5,00; 7,00 mg.L⁻¹ íons cobre(II). As amostras sintéticas foram analisadas pela metodologia proposta e comparada com metodologia de referência pela AOAC. (112)

Para a metodologia proposta, uma alíquota de 20,00 mL de amostra foi pipetada para um balão volumétrico de 25 mL, posteriormente adicionou-se um volume de 1,25 mL dos mascarantes ácido malônico e tripolifosfato de sódio, ambos a 5,00% m/v, para que os dois mascarantes ficassem em uma concentração de 0,25% m/v em solução, e por fim adicionou-se 2,00 mL de etanol absoluto e completou o restante do volume do balão volumétrico com água

deionizada. Posteriormente a solução era analisada nas condições otimizadas anteriormente e feito todos os cálculos de concentração.

Pela metodologia de referência AOAC (112), as amostras das aguardentes sintéticas foram analisadas conforme as orientações descritas, utilizando um equipamento da marca Varian[®], modelo SpectrAA 50, lâmpada de cátodo oco para cobre da marca Varian[®], n° série 0010710, operando a 4 mA, comprimento de onda de 324,8 nm, chama ar-acetileno.

Todas as análises foram realizadas em quintuplicata e comparadas em curva analítica de concentração por ambas metodologias.

4.18. Avaliação do efeito de matriz

Após verificar a exatidão e precisão do método com amostras de aguardentes sintéticas simuladas em laboratório, foi verificado se as amostras reais de aguardentes apresentavam ou não interferência nas determinações. Para avaliar tal efeito, 3 amostras de aguardentes de cana-de-açúcar comerciais comumente comercializadas em supermercados locais foram contaminadas com concentrações de cobre conhecidas de 50, 100, 150 e 200% do limite máximo permitido pela legislação brasileira de 5,00 mg.L⁻¹ de íons cobre(II). (9)

Para a realização das análises, uma alíquota de 20 mL das amostras de aguardente de cana foi pipetada e transferida para um balão volumétrico de 25 mL, posteriormente foi adicionada uma quantidade específica de um padrão de íons cobre(II) e 1,25 mL dos mascarantes ácido malônico e tripolifosfato de sódio, ambos na concentração de 5,00% m/v, no qual ficassem em uma concentração de 0,25% m/v em solução, e por fim adicionou-se 2,00 mL de etanol absoluto e completou o restante do volume do balão volumétrico com água deionizada. Posteriormente as amostras foram analisadas pela metodologia proposta nas condições já otimizadas e determinadas anteriormente, em seguida foram realizados todos os cálculos de concentração e recuperação. Todas as análises foram realizadas em quintuplicata.

4.19. Determinação de íons cobre(II) em amostras de aguardente de cana-de-açúcar comerciais

Foram analisadas dez amostras de aguardente de cana-de-açúcar de marcas comumente comercializadas em supermercados locais. A graduação alcoólica de cada aguardente foi determinada com densímetro específico para álcool (alcoômetro).

A determinação de íons cobre(II) foi realizado pelo método proposto neste trabalho e comparado com metodologia padronizada pela AOAC (112). Para as análise com a metodologia padrão, utilizou-se um equipamento da marca Varian[®], modelo SpectrAA 50, lâmpada de cátodo oco para cobre da marca Varian[®], n° série 0010710, operando a 4 mA, comprimento de onda de 324,8 nm, chama ar-acetileno.

Para a metodologia proposta, uma alíquota de 20,00 mL de aguardente de cana-de-açúcar foi pipetada para um balão volumétrico de 25 mL, posteriormente adicionou-se um volume de 1,25 mL dos mascarantes ácido malônico e tripolifosfato de sódio, ambos a 5,00% m/v, para que os dois mascarantes ficassem em uma concentração de 0,25% m/v em solução, e por fim adicionou-se 2,00 mL de etanol absoluto e completou o restante do volume do balão volumétrico com água deionizada. As análises foram feitas conforme condições já otimizadas e determinadas anteriormente. Todas as análises foram realizadas em quintuplicata e comparadas em curva analítica de concentração por ambas as metodologias.

5. Resultados e discussões

5.1. Testes preliminares

Foram realizados testes preliminares para a escolha de alguma substância que atuasse com um agente complexante (quelante) com os íons cobre e que formasse um complexo estável, funcionando assim, como um agente cromogênico. Dentre a grande quantidade de reagentes disponíveis escolheu-se os comumente mais utilizados para a reação com íons cobre, dentre eles, os reagentes testados foram: 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), 1,5-difenilditiocarbazona (ditizona), 1,10- fenantrolina e 2,2-bipiridina. Sendo os reagentes PAN e ditizona utilizados para íons cobre(II) e os reagentes 1,10-fenantrolina e 2,2-bipiridina utilizados para íons cobre(I).

Os reagentes utilizados para a reação com os íons cobre(I), 1,10-fenantrolina e 2,2-bipiridina, não reagiram com os íons cobre no *spot test*, evidenciando a não formação de produto com coloração, ou seja, não formando complexo com íons cobre. Além disso, apresentaram desvantagens em termos metodológicos, pois houve a necessidade de usar um agente redutor (cloridrato de hidroxilamina), para a redução dos íons cobre(II) a íons cobre(I). Por estes motivos os mesmos foram descartados como alternativa de uso como agentes cromogênicos para íons cobre.

Os quelantes PAN e ditizona apresentaram reação com íons cobre(II) no *spot test*, mas a reação dos íons cobre com a ditizona não se mostrou estável. Com a adição da ditizona no *spot test* observou-se a formação de um complexo colorido, porém após alguns segundos a coloração desapareceu e o *spot test* voltou a sua coloração inicial, sendo assim, descartado como agente cromogênico.

O quelante PAN apresentou reação com íons cobre(II), evidenciada pela formação de uma mancha uniforme de coloração violeta no *spot test* (Figura 8) e que se manteve estável ao longo do tempo.

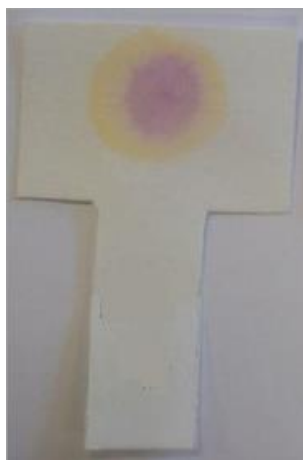


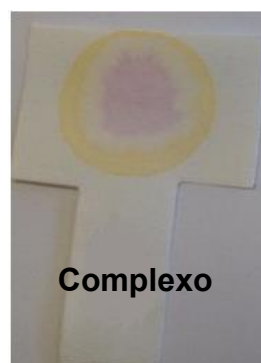
Figura 8. Complexo formado no *spot test* entre íons cobre(II) e o agente cromogênico PAN.

Portanto, o quelante PAN por ser o único reagente avaliado estável com os íons cobre e com a vantagem metodológica de não ser necessário utilizar mais nenhum outro tipo de reagente para que a reação ocorra, foi escolhido como agente cromogênico.

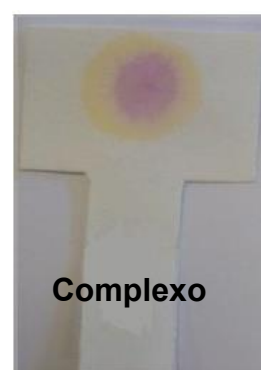
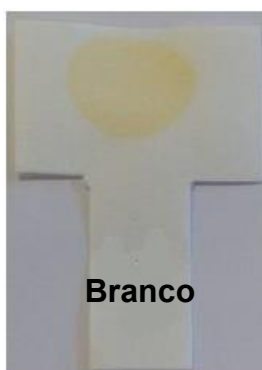
5.2. Ordem de adição dos reagentes

A ordem de adição dos reagentes foi estudada para verificar a uniformidade da mancha e o aumento da sensibilidade. As manchas formadas nos *spot tests* são mostradas na Figura 9.

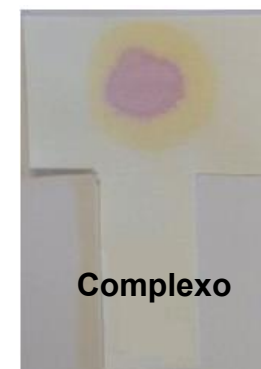
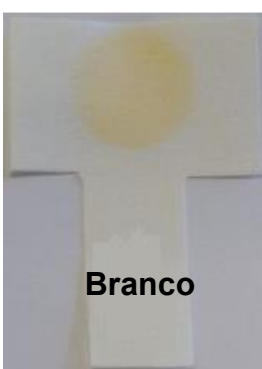
a) 30 μL da solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol e 30 μL solução alcoólica 40% v/v de íons cobre (II) com 5,00 mg.L^{-1} a pH 5,00.



b) 30 μL solução alcoólica 40% v/v de íons cobre (II) com 5,00 mg.L^{-1} a pH 5,00 e 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol.



c) 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol esperando a secagem e 30 μL solução alcoólica 40% v/v de íons cobre (II) com 5,00 mg.L^{-1} a pH 5,00.



d) 30 μL solução alcoólica 40% v/v de íons cobre (II) com 5,00 mg.L^{-1} a pH 5,00 esperando a secagem e 30 μL solução de reagente cromogênico PAN a 0,10% m/v em etanol.

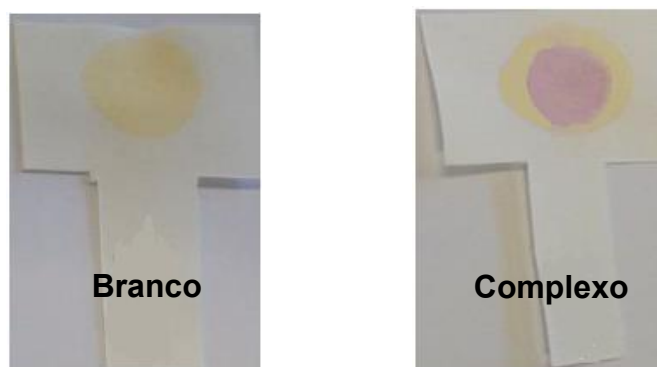


Figura 9. Manchas no spot test de acordo com adição dos reagentes

Analisando-se as manchas, foi possível observar que ao adicionar o PAN primeiro (Figura 9a), sem secagem, não obteve-se uma mancha uniforme intensa em relação as demais. Este fato, pode ser explicado pela a adição da solução alcoólica de cobre(II) que eluiu parte do PAN para as bordas do *spot test*, ficando assim pouco agente cromogênico para reagir com os íons cobre(II).

Adicionando-se o reagente PAN após a solução de cobre (Figura 9b) o efeito de eluição é anulado, mas observa-se a não uniformidade da mancha. No centro da mancha é possível observar uma coloração alaranjada (refente ao agente cromogênico PAN) que não reagiu com os íons cobre(II), indicando uma reação incompleta do PAN com os íons cobre.

Na adição do PAN após a solução de cobre, com secagem (Figura 9d), os mesmos problemas relacionados com a forma de adição anterior (Figura 9b) foram observados. Todavia, a intensidade da cor do complexo formado foi menor.

Por último, para avaliar o efeito da secagem adicionou-se o PAN primeiro, esperou-se a secagem da mesma no *spot test* e posteriormente a solução de íons cobre (Figura 9c), a mancha ficou mais uniforme e intensa, mostrando ser a forma mais eficiente de adição. Portanto, foi a forma escolhida de adição dos reagentes para se processar a reação.

5.3. Avaliação do volume adicionado dos reagentes

A fim de observar se a quantidade de reagentes interfere na formação do tamanho e na uniformidade da mancha, foi avaliada a quantidade de reagentes a ser adicionada no *spot test*.

Analisando as manchas, não foi notada diferença entre os parâmetros avaliados. O diâmetro das manchas, em torno de 1,90 cm, foi o mesmo para todas as formas de adição como também o volume adicionado de reagentes não influenciou na uniformidade da mancha.

Portanto, por ser um volume intermediário e razoável de se mensurar, o volume de 30 μL de foi utilizado em ambas soluções para prosseguir os estudos.

5.4. Espectro de absorção

O composto de coordenação $\text{Cu}(\text{PAN})_2$ forma-se a partir da reação química entre os íons cobre(II) e o agente cromogênico PAN (Figura 10).

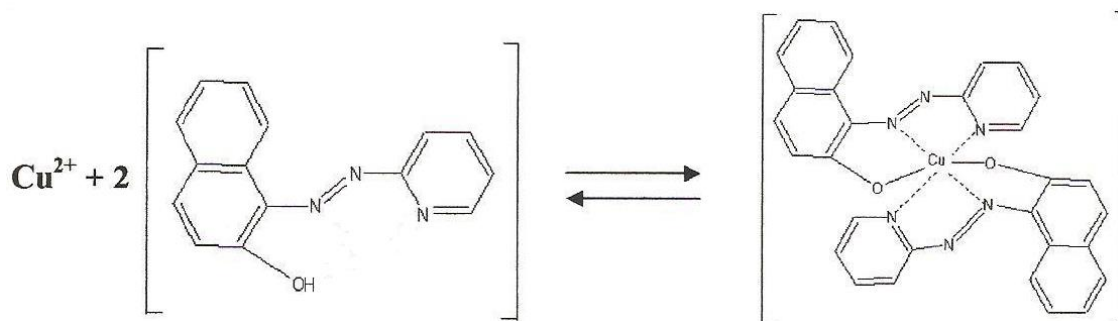


Figura 10. Reação química entre o agente cromogênico PAN e os íons cobre(II).

O espectro de absorção do composto de coordenação $\text{Cu}(\text{PAN})_2$, apresenta um máximo de absorção em 559 nm (Figura 11), contrapondo com a região de mínima absorção do agente cromogênico PAN, que tem seu máximo de absorção em 480 nm. Portanto, o comprimento de onda de 559 nm apresenta maior variação de absorção (ΔAbs), sendo então adotado para os demais estudos.

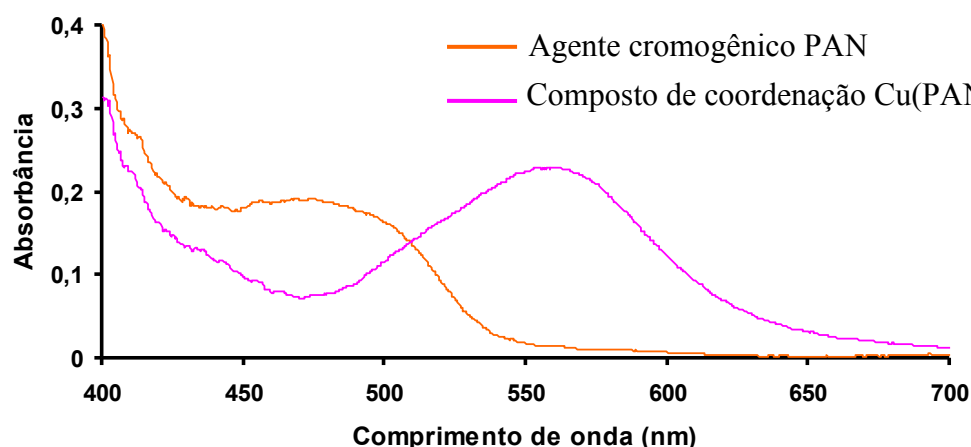


Figura 11. Espectro de absorção, na região de 400 a 700 nm, do agente cromogênico PAN e do composto de coordenação Cu(PAN)₂ no *spot test*.

5.5. Avaliação do grau alcoólico da solução de cobre(II)

Sendo a aguardente de cana-de-açúcar praticamente uma mistura de água e etanol (38 a 54% v/v), estudou-se a influência da graduação alcoólica da solução de cobre(II). Na Figura 12, no intervalo das concentrações alcoólicas de 35 a 40% v/v, observaram-se as maiores absorvâncias. A medida que o teor alcoólico aumenta há um decréscimo do sinal a partir de 45% v/v, ficando praticamente constante até a concentração alcoólica de 55% v/v. Essa diminuição da absorvância em relação ao aumento do teor alcoólico ocorre provavelmente por uma eluição maior do agente cromogênico PAN que estava previamente impregnado no spot test, assim uma quantidade menor de reagente PAN reagiu com os íons cobre ocasionando a ligeira queda de sinal analítico.

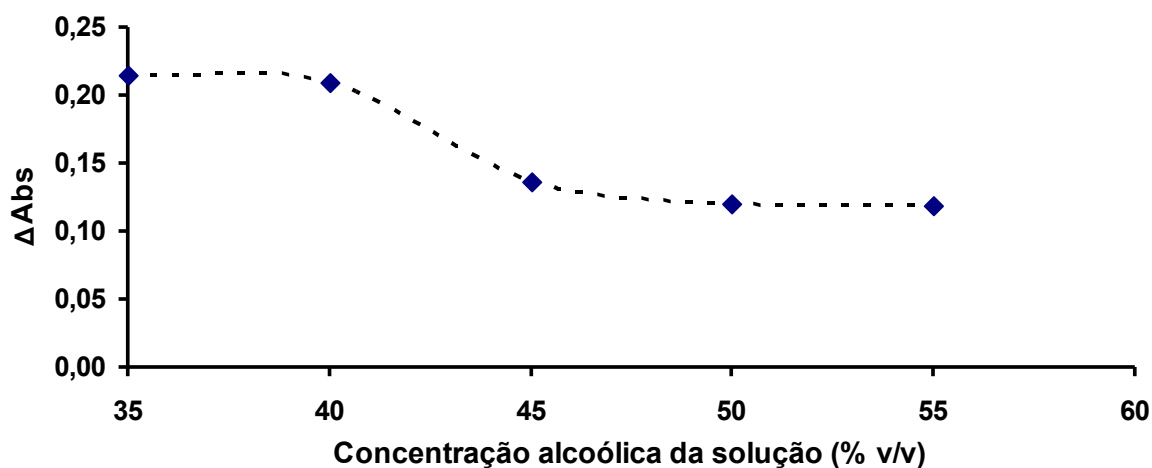


Figura 12. Variação da absorvância de Cu(PAN)_2 em função da concentração alcoólica da solução (% v/v).

Diante destes resultados adotou-se a concentração alcoólica de 40% v/v para prosseguir os estudos, pois esta concentração além de apresentar boa absorção e não apresentar diferença significativa da concentração de 35% v/v, é a concentração média de teor alcoólico da maioria das aguardentes de cana-de-açúcar encontradas no mercado.

5.6. Avaliação do uso de meio micelar

Tanto na adição do surfactante aniônico SDS quanto do surfactante catiônico DTAB, em suas respectivas concentrações micelares críticas, não houve ganho de sensibilidade (Figura 13).

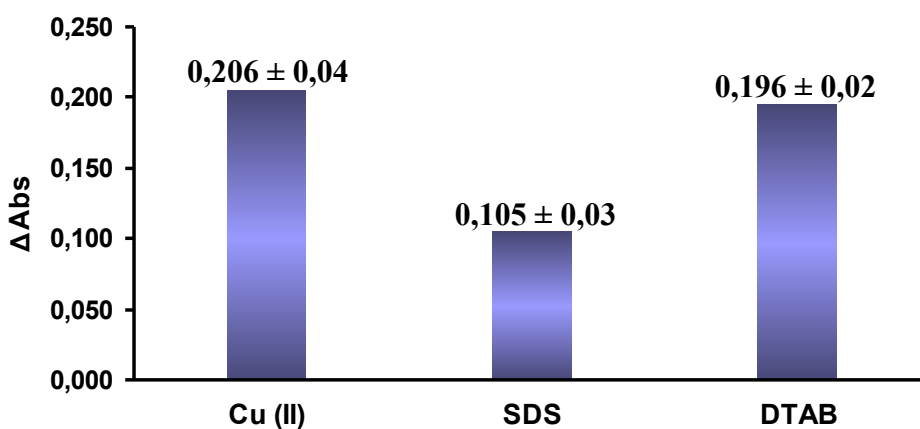


Figura 13. Variação da absorvância de Cu(PAN)_2 , a 559 nm, em função da adição de surfactante.

Para o surfactante SDS houve um decréscimo na absorvância, ou seja, perda de sensibilidade. Tal perda pode ser explicada pelo fato do SDS ser um surfactante aniônico, assim o grupamento hidrofílico da molécula do SDS (cadeia carbônica com 12 átomos de carbono) se aproximou dos íons cobre(II) formando assim uma micela. Logo a parte hidrofílica da molécula (grupamente sulfato) causou uma repulsão eletrônica com os átomos de oxigênio da molécula do agente cromogênico PAN, não os deixando aproximar dos íons cobre(II) para reagirem e formar o complexo Cu(PAN)_2 . Com a diminuição da formação do complexo, ocorreu a menor formação do produto e consequentemente queda do sinal analítico.

Para o surfactante DTAB houve uma ligeira queda na absorvância, em média, mas não de forma significativa. Essa diminuição pode ter sido ocasionada pelo grau alcoólico da solução. Sabendo que o meio pode prejudicar a formação de micelas, a grande quantidade de etanol no meio pode ter prejudicado de forma branda a formação das micelas e logo ocasionando a ligeira queda de sinal analítico.

Desta forma, conclui-se que a adição de surfactante, tanto aniônico como catiônico, não gera um aumento na absorvância e com isso não há ganho expressivo de sensibilidade, sendo então descartado o seu uso.

5.7. Avaliação do solvente da solução do agente cromogênico

Sabendo que a sensibilidade pode variar de acordo com uso de diferentes solventes, foi verificada a possibilidade de melhorar a sensibilidade fazendo o uso de diferentes solventes na diluição do agente cromogênico PAN. Os resultados experimentais estão apresentados na Figura 14.

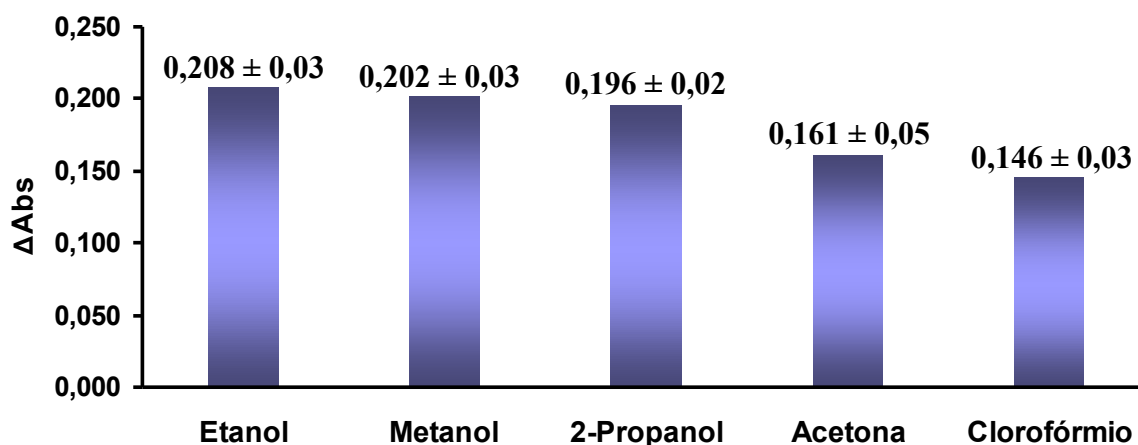


Figura 14. Variação da absorvância de Cu(PAN)_2 , a 559 nm, em função do solvente utilizado na solução do agente cromogênico PAN.

Analisando a Figura 14, os alcoóis estudados não mostraram diferença significativa de sinal analítico. Agora para os solventes acetona e clorofórmio a queda de sinal foi expressiva. A alta volatilidade da acetona e do clorofórmio prejudicou e muito a adição do agente cromogênico, pois logo se volatilizavam e impregnavam parte do agente cromogênico PAN na ponteira do pipetador automático, assim uma menor quantidade de agente cromogênico era adicionada causando a queda de sinal analítico.

O etanol teve uma absorvância ligeiramente maior que os demais alcoóis e bastante superior a acetona e o clorofórmio, além de se enquadrar dentro do propósito da química verde, por ser um solvente menos tóxico que os demais estudados, relativamente barato e de fonte renovável. Sendo assim, o mesmo foi escolhido como solvente para a solubilização do agente cromogênico PAN.

5.8. Concentração do agente cromogênico na formação do complexo

Sabendo que a quantificação de cobre(II) é feita pelo produto da reação deste com o agente cromogênico PAN, otimizou-se a concentração do PAN, variando-a no solvente etanol. A Figura 15 mostra que a medida que a concentração do PAN aumenta, há uma variação positiva no valor da absorvância até aproximadamente 0,10% m/v de concentrações para a solução de PAN em etanol, a partir do qual observa-se uma estabilização no valor das absorvâncias, com ligeira queda em 0,20% m/v. A perda de sinal observada é devido ao excesso do agente cromogênico na mancha.

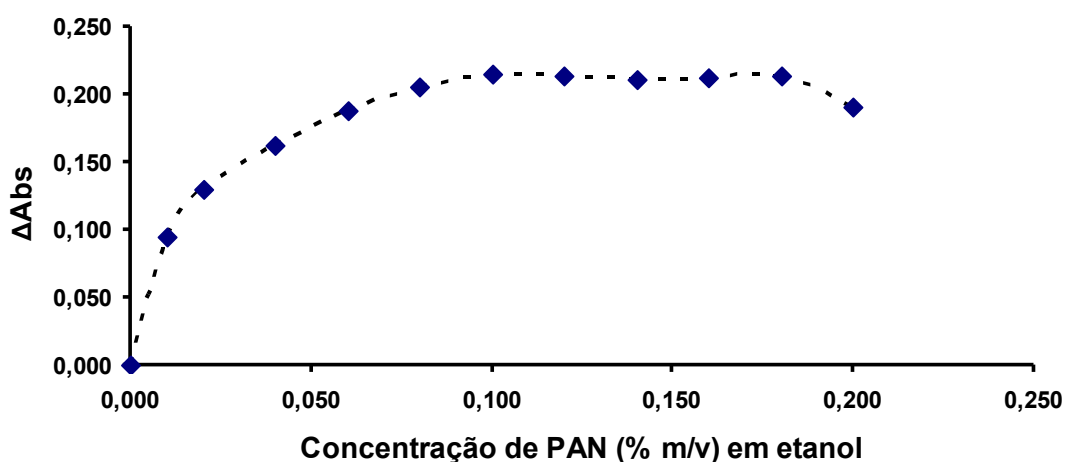


Figura 15. Variação da absorvância de Cu(PAN)_2 , a 559 nm, em função da concentração (% m/v) de PAN em etanol.

Diante destes resultados, conclui-se que a sensibilidade não aumenta significativamente para concentrações de PAN acima de 0,10% m/v. Assim, a concentração de PAN de 0,12% m/v em etanol foi escolhida para prosseguir os estudos, por apresentar valor absoluto de absorvância apropriado e considerável ganho de sensibilidade, além de estar no meio do intervalo da faixa de concentração. Desta forma, nesta concentração qualquer pequena variação, tanto para cima ou para baixo, não provocará diferença significativa na absorvância.

5.9. Estudo quimiométrico do pH e tempo de reação

Para verificar a influência das variáveis pH da solução alcoólica dos íons cobre(II) e tempo para a formação do complexo Cu(PAN)_2 , visando obter maior variação de absorvância, isto é, máxima sensibilidade para a determinação de íons cobre(II), realizou-se um estudo quimiométrico com planejamento fatorial 2^2 , tipo estrela, com ponto central. A Tabela 4 apresenta as condições estudadas e os resultados das absorvâncias medidas em 559 nm.

Para a realização do experimento, selecionou-se dois níveis (alto e baixo) para cada variável. O nível baixo para o pH foi escolhido considerando um mínimo medido com segurança pelo eletrodo. Por outro lado, o nível alto para o pH foi escolhido levando em consideração que valores de pH maiores que 6,00 há uma desestabilização do complexo formado, provavelmente, devido a formação de hidróxido de cobre(II) (Cu(OH)_2) na solução.

Para a variável tempo o nível baixo foi escolhido considerando um tempo mínimo para a secagem do *spot test* e para a reação se processar. Para o nível alto, foi escolhido um tempo razoável para a reação se processar por completo, caso ela ocorra ao longo do tempo, e para se ter uma razoável frequência analítica.

Tabela 4. Planejamento fatorial 2^2 , tipo estrela com ponto central, para otimização das variáveis pH e tempo.

Variáveis		Níveis			
		(-)		(+)	
pH (UpH),	pHreal	2		6	
Tempo (min),	treal	5		20	
Ordem de execução	Variáveis escalonadas*		Absorvância		
	pH	t	Cu(PAN)2	PAN	ΔAbs
2	+1	-1	0,197	0,011	0,186
9	0	0	0,200	0,007	0,193
3	-1	+1	0,107	0,008	0,099
6	-√ 2	0	0,042	0,006	0,036
7	0	+√ 2	0,203	0,007	0,196
8	0	-√ 2	0,214	0,008	0,206
1	-1	-1	0,099	0,009	0,090
4	1	1	0,201	0,012	0,189
5	+√ 2	0	0,220	0,007	0,213

* As equações de auto-escalonamento para temperatura e tempo são respectivamente:

$$\text{pH} = \frac{(\text{pH}_{\text{real}} - 4)}{2}$$

Equação 5

$$t = \frac{(\text{t}_{\text{real}} - 12,5)}{7,5}$$

Equação 6

Através da associação dos valores de ΔAbs e dos valores das variáveis escalonadas pH (pH, UpH) e tempo (t, min) na Tabela 4, obteve-se o modelo matemático que descreve o sistema (Equação 7).

$$\Delta\text{Abs} = -0,0947 + 0,1302\text{pH} - 0,0035t - 0,0135\text{pH}^2 + 0,0001t^2 + 2,8485 \cdot 10^{-5}\text{pH}t$$

Equação 7

De posse do modelo matemático (Equação 7), construiu-se a superfície de resposta com auxílio de um programa computacional gráfico (Statistica®, versão 8,0, USA).

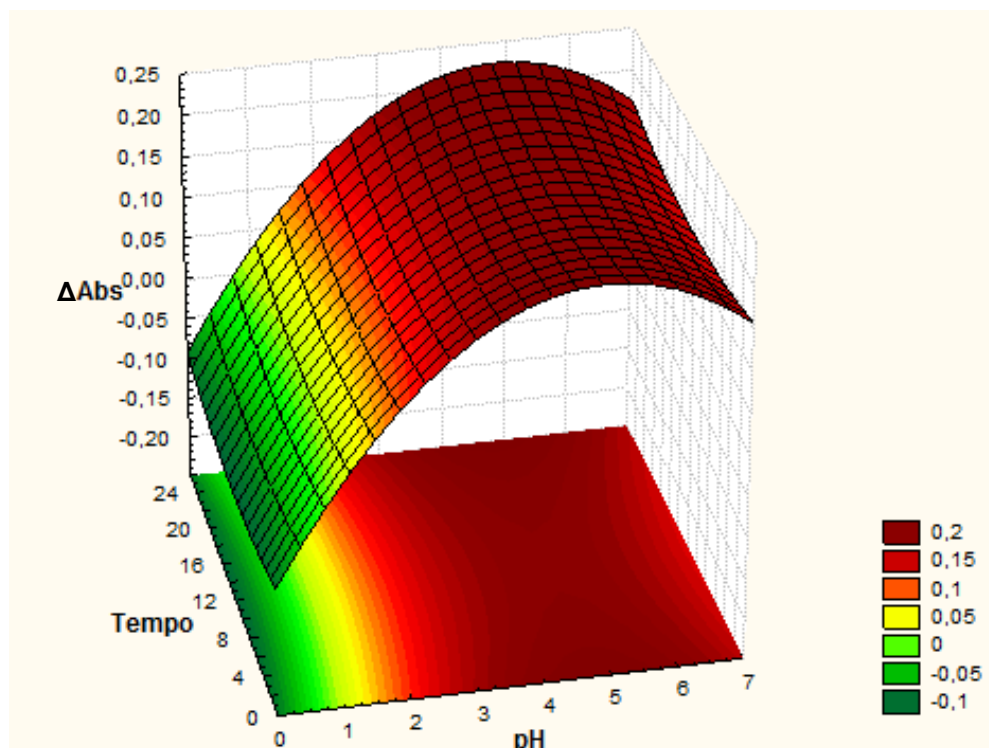


Figura 16. Superfície de resposta referente as variáveis pH e tempo na formação do complexo.

O modelo matemático (Equação 7), através do termo de interação entre as variáveis pH e tempo de reação ($2,8485 \cdot 10^{-5} \text{pHt}$) mostram que ambas são praticamente independentes. Nota-se também que no intervalo avaliado a variável tempo não interfere no sistema estudado ($0,0035t$). A superfície de resposta e suas linhas de contorno mostram que em pH próximo a 5,00, maior será a formação do complexo, isto é, será máxima a variação de absorvância (Δabs). Os tempos de reação não interferem no aumento da sensibilidade. Desta forma, nas condições de pH de 5,00 e o tempo de 5 minutos, haverá um aumento na sensibilidade na determinação dos íons cobre(II) e portanto tais valores foram fixados para continuidade dos estudos.

5.10. Avaliação da estabilidade óptica

Com o objetivo de avaliar a estabilidade óptica do agente cromogênico PAN e do complexo formado do PAN com os íons cobre no *spot test*, em relação ao tempo, realizou-se

um acompanhamento cinético do valor de absorvância a cada 5 minutos até completar 120 minutos.

Os resultados demonstram que o agente cromogênico PAN não tem variação significativa de absorvância, mostrando estabilidade óptica por pelo menos 120 minutos (Figura 17), não perdendo suas características de intensidade de cor e não se degradando pelo período de tempo estudado.

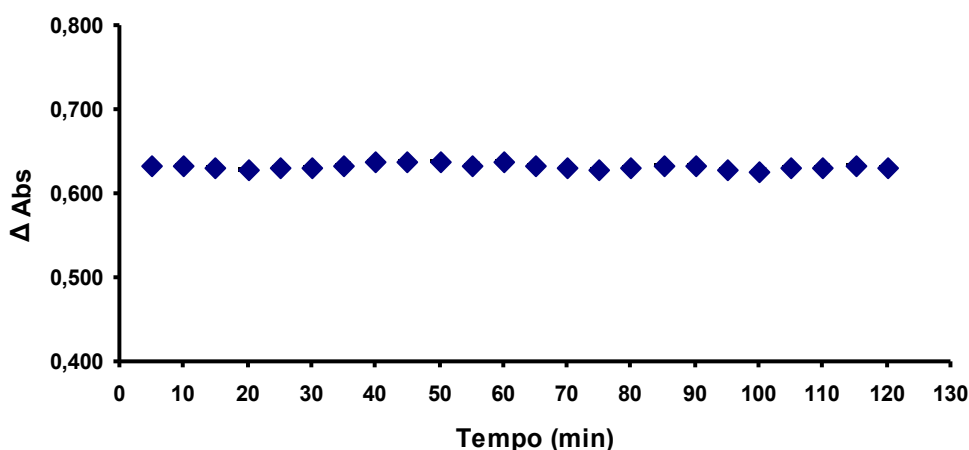


Figura 17. Estabilidade óptica do agente cromogênico PAN ($\lambda = 480$ nm) em *spot test* entre 0 e 120 minutos.

Portanto o *spot test* impregnado com o agente cromogênico PAN pode ser utilizado por pelo menos 120 minutos após a adição.

Para o acompanhamento da estabilidade óptica do agente cromogênico PAN durante o período de uma semana (Figura 18), nota-se um decréscimo gradativo da absorvância ao longo dos dias, perdendo suas características de intensidade de cor, se degradando.

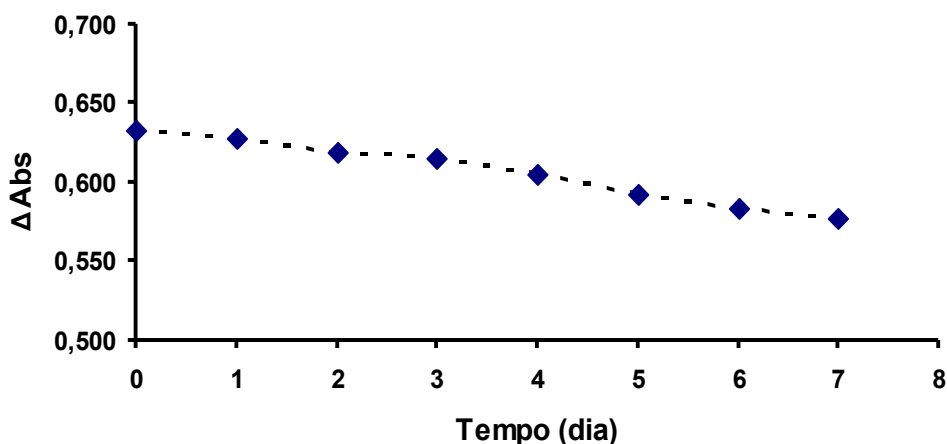


Figura 18. Estabilidade óptica do agente cromogênico PAN ($\lambda = 480$ nm) em *spot test* durante o período de uma semana.

Diante dos resultados apresentados na Figura 18, conclui-se que não é viável o armazenamento, por um período prolongado, dos *spots tests* impregnados com o agente cromogênico PAN para posterior utilização para a reação com os íons cobre(II).

Os resultados para o complexo formado demonstram que o produto atinge sua estabilidade óptica após 5 minutos depois de adicionada a solução de íons cobre(II), mostrando um valor de absorvância aproximadamente constante por pelo menos 120 minutos, de acordo com a Figura 19. Os cinco minutos iniciais são necessários para a secagem do papel ao ar livre.

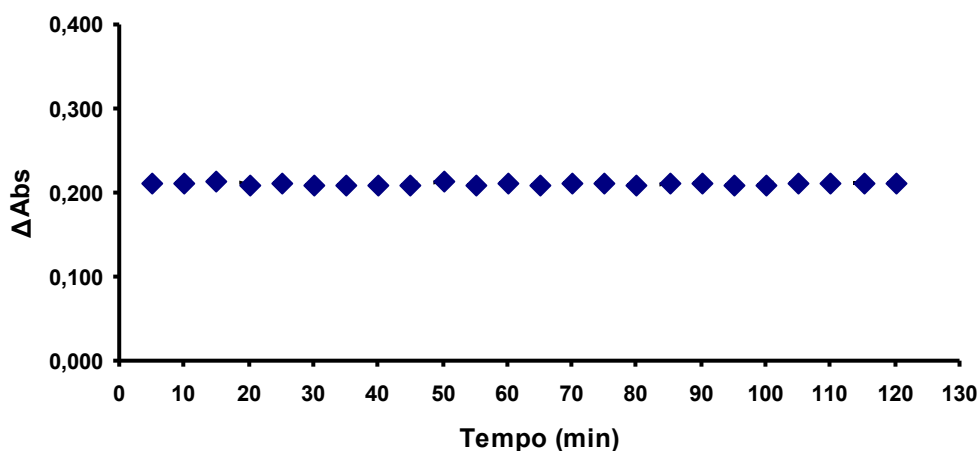


Figura 19. Estabilidade óptica do complexo ($\lambda = 559$ nm) em *spot test* entre 0 e 120 minutos.

Portanto a leitura do *spot test* impregnado com o produto da reação entre o agente cromogênico PAN e os íons cobre(II) pode ser feita até 120 minutos depois após a adição dos reagentes sem perda de sinal analítico e sem diferença significativa na absorvância.

5.11. Curva analítica de calibração para os íons cobre(II)

A curva analítica de calibração (Figura 20), apresenta-se linear até a concentração estudada de 5,00 mg.L⁻¹ e é descrita pela equação $\Delta\text{Abs} = 0,0397 C_{\text{Cu(II)}} + 0,0153$ ($r^2 = 0,9992$).

O método apresenta um limite de detecção de 0,15 mg.L⁻¹ e limite de quantificação de 0,52 mg.L⁻¹, calculados em relação ao desvio padrão de um branco de reagentes, tendo uma faixa linear de trabalho de 0,52 mg.L⁻¹ a 5,00 mg.L⁻¹.

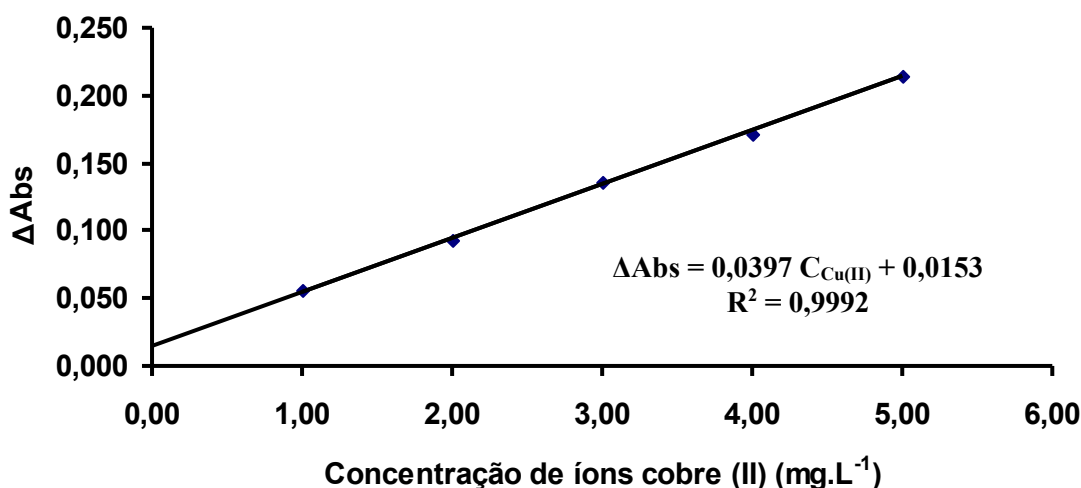


Figura 20. Curva analítica de calibração para íons cobre(II).

5.12. Levantamento e estudo dos possíveis interferentes

Avaliou-se pelo cálculo do fator de interferência se os íons cádmio(II), cobalto(II), chumbo(II), ferro(III), manganês(II), níquel(II) e zinco(II) e a mistura de todos esses íons metálicos são de fato interferentes e se causam algum efeito na determinação de íons cobre(II) pela metodologia proposta. Os resultados individuais de cada íon e do conjunto de todos estão dispostos nas Tabelas 5 a 12.

Tabela 5. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons cádmio(II).

Cu(II) Cd(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,50 mg.L⁻¹	2,79	1,14
5,00 mg.L⁻¹	3,91	1,66

Tabela 6. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons cobalto(II).

Cu(II) Co(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,50 mg.L⁻¹	2,08	1,02
5,00 mg.L⁻¹	2,87	1,73

Tabela 7. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons chumbo(II).

Cu(II) Pb(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,20 mg.L⁻¹	1,43	1,49
2,00 mg.L⁻¹	2,52	1,64

Tabela 8. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons ferro (III).

Cu(II) Fe(III)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,30 mg.L⁻¹	0,44	0,63
3,00 mg.L⁻¹	0,33	0,58

Tabela 9. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons manganês(II).

Cu(II) Mn(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,10 mg.L⁻¹	2,13	1,49
1,00 mg.L⁻¹	2,33	1,96

Tabela 10. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons níquel(II).

Cu(II) Ni(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,10 mg.L⁻¹	2,57	1,01
1,00 mg.L⁻¹	2,71	2,33

Tabela 11. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons zinco(II).

Cu(II) \ Zn(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,50 mg.L⁻¹	3,41	1,47
5,00 mg.L⁻¹	4,23	2,12

Tabela 12. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para o conjunto de todos os íons.

Cu(II) \ Conj. Íons	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
Conc. Mín. (mg.L⁻¹)	1,14	1,10
Conc. Máx. (mg.L⁻¹)	2,20	1,18

Pelos valores dos fatores de interferência calculados e apresentados nas tabelas para cada íon isolado e para o conjunto total desses íons, todos apresentaram valores de fator de interferência fora da faixa de 0,95 a 1,05, ou seja, com porcentagens acima do limite tolerável (5,0%). Assim é possível observar um efeito significativo de interferência, ou seja, todos os íons e a combinação deles são de fato interferentes. Este efeito de interferência é intensificado pelo aumento da concentração dos íons interferentes e também quando a concentração dos íons cobre(II) está no seu nível mais baixo.

5.13. Estudo da redução e/ou eliminação do efeito de interferência

Uma alternativa para reduzir e/ou eliminar os efeitos de interferência desses íons metálicos é o uso de mascarantes (140). Para mascarar os íons metálicos cádmio(II), cobalto(II), ferro(III) e níquel(II), Perrin (140) propõe o uso do ácido malônico e para os íons

chumbo(II), manganês(II) e zinco(II) propôs o uso do trifosfato de sódio. Os resultados dos efeitos de interferência de cada íon específico nos níveis de mínimo e máximo, assim como da mistura de todos os íons, estão dispostos nas Tabelas 13 a 20.

Tabela 13. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons cádmio(II) com o mascarante ácido malônico.

Cu(II) Cd(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,50 mg.L⁻¹	1,02	0,99
5,00 mg.L⁻¹	1,03	1,00

Tabela 14. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons cobalto(II) com o mascarante ácido malônico.

Cu(II) Co(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,50 mg.L⁻¹	1,01	1,04
5,00 mg.L⁻¹	1,03	1,01

Tabela 15. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons ferro(III) com o mascarante ácido malônico.

Cu(II) Fe(III)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,30 mg.L⁻¹	1,06	1,04
3,00 mg.L⁻¹	1,07	1,04

Tabela 16. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons níquel(II) com o mascarante ácido malônico.

Cu(II) Ni(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,10 mg.L⁻¹	1,02	1,05
1,00 mg.L⁻¹	1,00	1,03

Tabela 17. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons chumbo(II) com o mascarante trifosfato de sódio.

Cu(II) Pb(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,20 mg.L⁻¹	1,06	1,02
2,00 mg.L⁻¹	1,08	1,07

Tabela 18. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons manganês(II) com o mascarante trifosfato de sódio.

Cu(II) Mn(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,10 mg.L⁻¹	0,94	0,93
1,00 mg.L⁻¹	0,92	0,92

Tabela 19. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para os íons zinco(II) com o mascarante trifosfato de sódio.

Cu(II) Zn(II)	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
0,10 mg.L⁻¹	1,09	1,05
1,00 mg.L⁻¹	1,06	1,04

Tabela 20. Fatores de interferência nos níveis de concentração mínimo e máximo para o conjunto de todos os íons com os mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio.

Cu(II) Conj. Íons	0,50 mg.L⁻¹	5,00 mg.L⁻¹
Conc. Mín. (mg.L⁻¹)	1,10	1,04
Conc. Máx. (mg.L⁻¹)	1,17	1,07

Para a concentração estudada, de 0,20% m/v, dos mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio há uma grande redução dos efeitos de interferência de todos os íons metálicos, sendo que alguns dos efeitos de interferência de alguns íons ficaram dentro dos limites toleráveis (entre 0,95 e 1,05). Observa-se também que alguns desses efeitos de interferência de alguns íons ainda estão acima do limite tolerável, porém verifica-se a potencialidade dos reagentes mascarantes utilizados em diminuir os níveis de interferência e atuar como verdadeiros mascarantes para a metodologia proposta, tendo em vista que o aumento da concentração desses mascarantes no meio reacional pode reduzir o níveis de interferência dos íons metálicos estudados como o conjunto de todos eles para dentro dos limites toleráveis, em torno de 5,00%.

5.14. Otimização da concentração dos mascarantes

Visando reduzir ainda mais os efeitos de interferência dos íons metálicos analisados e deixá-los dentro dos limites toleráveis, foi avaliado a concentração dos mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio separadamente e juntos em solução. Os resultados estão dispostos nas Figuras 20 a 23.

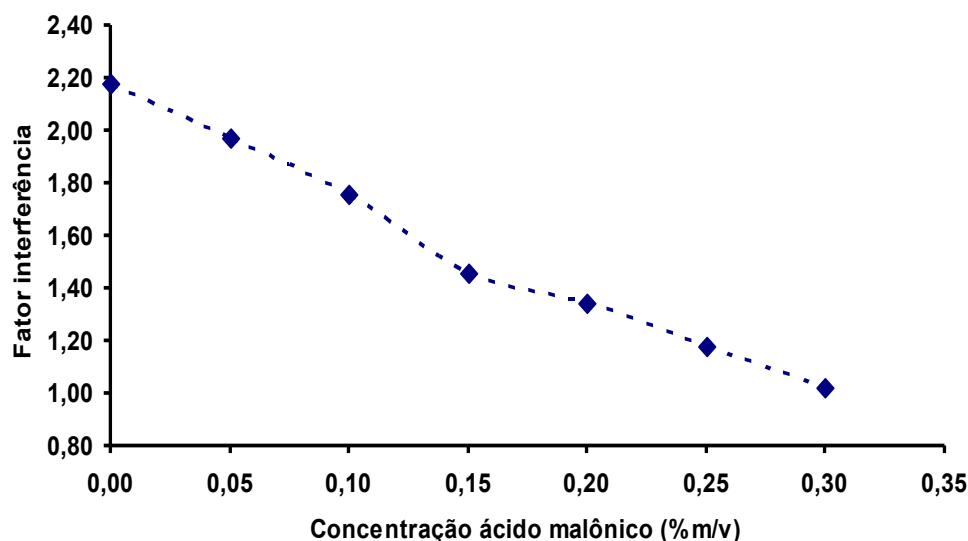


Figura 21. Variação do fator de interferência em função da concentração do mascarante ácido malônico.

Para o mascarante ácido malônico, à medida que sua concentração aumenta, provoca uma variação positiva na diminuição do efeito de interferência (Figura 21). Nota-se que a concentração de 0,30% m/v foi suficiente para reduzir o fator de interferência para 0,97, o que significa uma interferência de somente 3,0%, ficando dentro dos limites toleráveis de interferência.

O mesmo comportamento do ácido malônico é observado para o trifosfato de sódio. Assim, a concentração de 0,25% m/v foi suficiente para reduzir o fator de interferência para 0,98, o que significa uma interferência de somente 2,0% (Figura 22), ficando assim, dentro dos limites aceitáveis de interferência.

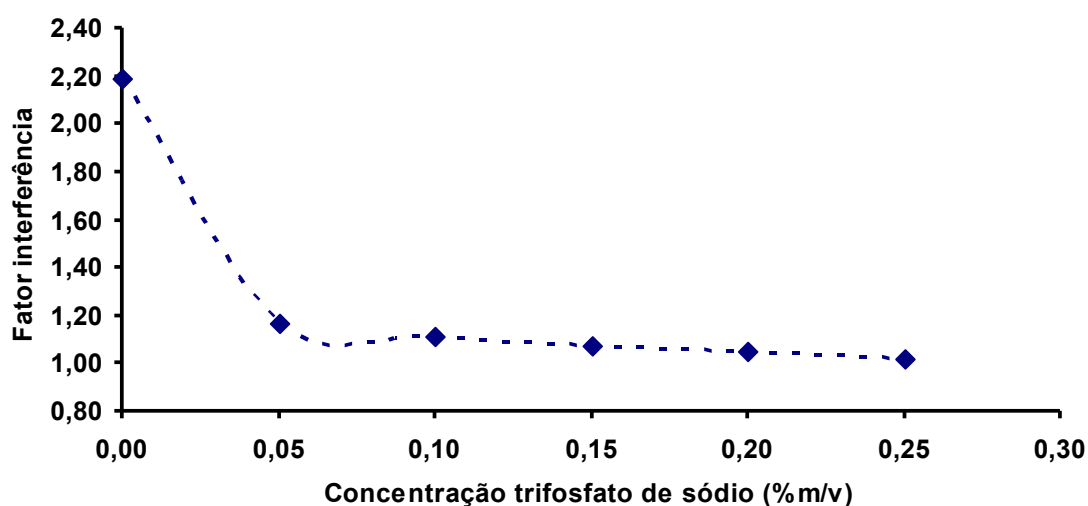


Figura 22. Variação do fator de interferência em função da concentração do mascarante trifosfato de sódio.

Os mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio quando empregados juntos, também provocam uma variação positiva na diminuição do efeito de interferência a medida que a concentração deles aumenta. Porém, a concentração de 0,25% m/v para cada mascarante foi suficiente para reduzir o fator de interferência para 0,98, representando uma interferência de somente 2,0% (Figura 22), ficando dentro dos parâmetros toleráveis de interferência.

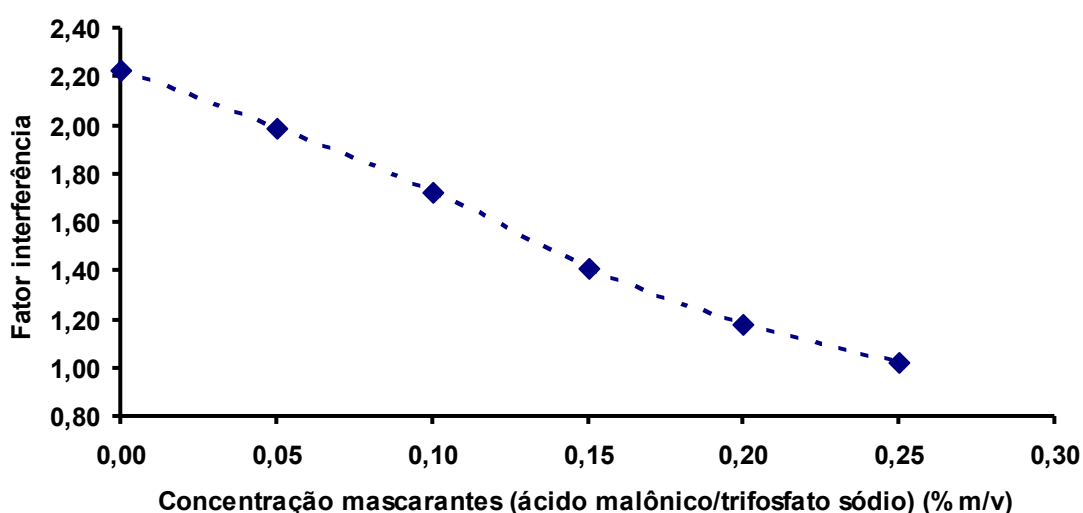


Figura 23. Variação do fator de interferência em função da concentração dos mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio.

Adicionalmente o emprego dos dois mascarantes juntos ocasionou uma diminuição da concentração do mascarante ácido malônico que antes era de 0,30% m/v para 0,25% m/v, redução que provoca uma economia de reagentes, estando em acordo com os princípios da química verde.

5.15. Curva analítica de calibração com a presença dos mascarantes

A curva analítica de calibração (Figura 24), apresenta-se linear até a concentração de 10,00 mg.L⁻¹ e é descrita pela equação $\Delta\text{Abs} = 0,0121 C_{\text{Cu(II)}} + 0,0038$ ($r^2 = 0,9982$).

O método apresenta um limite de detecção de 0,12 mg.L⁻¹ e um limite de quantificação de 0,47 mg.L⁻¹, calculados em relação ao desvio padrão de um branco de reagentes, tendo uma faixa linear de trabalho de 0,47 mg.L⁻¹ a 10,00 mg.L⁻¹.

O desvio padrão relativo da curva analítica de calibração intradia foi de 1,82% e de interdia de 2,64%.

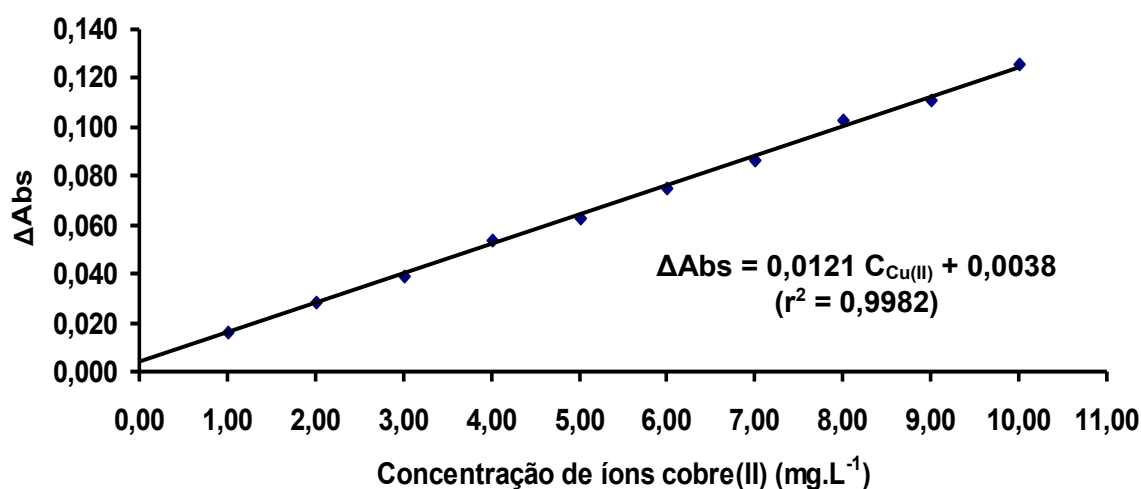


Figura 24. Curva analítica de calibração para íons cobre(II) com a presença dos mascarantes.

Observando a curva analítica de calibração (Figura 24) é possível concluir que a adição dos mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio provoca uma redução do sinal analítico, ocasionando perda de sensibilidade quando os coeficientes angulares das curvas analíticas são comparados (Figuras 20 e 24). Mesmo com a perda de sensibilidade, os limites de detecção e quantificação mantiveram praticamente a mesma ordem, pois a presença dos mascarantes deixaram as medidas de absorvância mais precisas, diminuindo assim, o desvio padrão dessas medidas.

Os resultados dos desvios padrões relativos obtidos foram relativamente baixos e satisfatórios, mostrando que as medidas foram precisas.

5.16. Precisão e exatidão do método

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através da dopagem de amostras sintéticas de aguardente de cana-de-açúcar sintetizadas em laboratório. Os resultados das recuperações, do desvio padrão, do teste estatístico (teste “t”) aplicado e do erro relativo estão dispostos na Tabela 21.

Tabela 21. Valores de recuperação, desvio padrão, teste estatístico “t” e erro relativo de íons cobre(II) obtida nas amostras sintéticas de aguardente de cana-de-açúcar.

Amostras sintéticas	[Cu(II)] Método Referência (mg.L ⁻¹)	[Cu(II)] Método Proposto (mg.L ⁻¹)	Test “F” ^a	Test “t” ^b	Erro Relativo (%)
0,60	0,57 ± 0,03	0,55 ± 0,05	0,3538	1,2591	- 3,51
1,00	0,96 ± 0,04	0,98 ± 0,07	1,8158	0,8231	2,08
3,00	2,95 ± 0,07	2,98 ± 0,08	0,7433	0,1010	1,02
5,00	5,01 ± 0,04	5,04 ± 0,12	0,2779	0,3754	0,60
7,00	7,04 ± 0,10	6,99 ± 0,03	0,7176	1,8898	- 0,71

^a : Test “F” realizado ao nível de 5% de probabilidade e n=5;

F_{tabelado} = 5,050.

^b : Test “t” realizado ao nível de 95% de confiança e n=5;

t_{tabelado} = 2,776.

Para as concentrações de íons cobre(II) avaliadas, nas amostras sintéticas de aguardente de cana-de-açúcar, todos resultados foram estatisticamente semelhantes ao nível de confiança de 95% e dentro do intervalo aceitável de erro ($\leq 5,00\%$). Os valores de recuperação apresentaram boa exatidão, precisão, mostrando ser uma metodologia confiável.

5.17. Avaliação do efeito de matriz

Os testes para verificar se há algum efeito de matriz na determinação de íons cobre(II) foram feitos em três amostras de aguardente de cana-de-açúcar. Dentre essas amostras, uma amostra foi de aguardente de cana não adoçada e não envelhecida (Amostra 1), uma de aguardente adoçada (Amostra 2) e outra de aguardente de cana adoçada e envelhecida em

barril de carvalho (Amostra 3). Os resultados das recuperações destas amostras estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Valores de recuperação obtidos de íons cobre(II) nas amostras de aguardente de cana-de-açúcar.

Amostra	[Cu(II)] adicionada (mg.L ⁻¹)	[Cu(II)] encontrada (mg.L ⁻¹)	Recuperação (%)
Amostra 1	2,50	2,48	99,2
	5,00	5,03	100,6
	7,50	7,41	98,8
	10,00	9,96	99,6
Amostra 2	2,50	2,46	98,5
	5,00	4,97	99,4
	7,50	7,65	102,0
	10,00	10,01	100,1
Amostra 3	2,50	2,47	99,0
	5,00	5,15	103,0
	7,50	7,52	100,2
	10,00	9,99	99,9

Analisando a Tabela 22, os valores de recuperação para os íons cobre(II) estão dentro do intervalo aceitável de 95 e 105%, mostrando que não há interferência significativa de nenhuma das matrizes avaliadas para a metodologia proposta.

5.18. Determinação de íons cobre(II) em amostras de aguardente de cana-de-açúcar comerciais

Dez marcas industrializadas de aguardente de cana-de-açúcar e comercializadas em supermercados e lojas especializadas foram utilizadas para a aplicação do método proposto. Os resultados das concentrações obtidas estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Teor de íons cobre(II) nas amostras comerciais de aguardente de cana-de-açúcar.

Amostra	Teor alcoólico (% v/v)	Região (cidade/estado)	[Cu(II)] Método Referência (mg.L ⁻¹)	[Cu(II)] Método Proposto (mg.L ⁻¹)	Test “F” ^a	Test “t” ^b	Erro Relativo (%)
1	45	Brotas/SP	2,90 ± 0,04	2,85 ± 0,06	2,9626	2,2469	-1,72
2	39	Pirassununga/SP	0,52 ± 0,03	0,54 ± 0,07	1,8746	0,9818	3,85
3	40	Jaú/SP	4,30 ± 0,06	4,22 ± 0,04	0,6587	2,3983	-1,86
4	49	Jaú/SP	4,39 ± 0,04	4,33 ± 0,03	0,8704	2,0591	-1,37
5	39	Santa Rita Passa do Quatro/SP	0,99 ± 0,02	0,97 ± 0,02	1,1200	1,7143	-2,02
6	39	Pirassununga/SP	0,67 ± 0,04	0,68 ± 0,08	4,6908	0,3388	1,49
7	39	Rio Claro/SP	1,15 ± 0,02	1,19 ± 0,01	2,6133	2,5762	3,48
8	38	Pirassununga/SP	0,46 ± 0,09	0,48 ± 0,09	3,4814	1,1749	4,35
9	38	Patrocínio Paulista/SP	n.d.	n.d.	-	-	-
10	39	Jundiaí/SP	n.d.	n.d.	-	-	-

^a : Test “F” realizado ao nível de 5% de probabilidade e n=5;
F_{tabelado} = 5,050.

^b : Test “t” realizado ao nível de 95% de confiança e n=5;
t_{tabelado} = 2,776.

Comparando as duas metodologias, é possível observar uma pequena diferença de resultados na concentração de íons cobre(II) nas amostras analisadas. Essa diferença encontra-se dentro dos padrões de confiabilidade aceitáveis, mostrando que a metodologia proposta tem boa exatidão e precisão. De todas as amostras analisadas, nenhuma apresentou teores de íons cobre(II) acima do permitido pela legislação brasileira, evidenciando assim, um cuidado e limpeza adequados dos alambiques utilizados na produção da aguardente de cana-de-açúcar. Todavia, as amostras 1, 3, e 4 apresentaram teores de íons cobre(II) acima dos limites toleráveis estabelecidos pela legislação dos Estados Unidos (2,00 mg.L⁻¹) e da União Europeia (1,00 mg.L⁻¹), estando impróprias para exportação. No entanto, a amostra 7 apresentou teores

de íons cobre(II) acima dos limites toleráveis estabelecidos somente pela legislação da União Europeia.

6. Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvido um novo método para determinação de íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar, utilizando a combinação da espectroscopia de reflectância difusa com *spot tests*. As vantagens da metodologia desenvolvida está na economia de reagentes, baixa geração de resíduos, uso de solventes de baixíssima toxicidade tornando o método mais limpo, simples, rápido, econômico e portátil.

Para otimização das condições experimentais, a fim de obter um valor máximo de absorvância, foram realizados vários experimentos pelo método univariado e planejamento fatorial com análise de superfície de resposta. De acordo com os resultados apresentados, as melhores condições de reação de formação do complexo Cu(PAN)_2 empregando a combinação *spot test*-reflectância difusa e detecção espectrométrica em 559 nm são:

- A forma e ordem de adição dos reagentes para se obter uma mancha melhor e mais uniforme, foi adicionando o agente cromogênico PAN primeiramente, secagem e adição da solução alcoólica de íons cobre (II);
- O intervalo de concentração alcoólica da solução de íons cobre(II) que promoveu melhor ganho de sensibilidade foi de 35 a 40% v/v;
- O uso de agentes tensoativos (surfactantes), tanto aniônico como catiônicos, não provocaram melhora na sensibilidade;
- O melhor solvente para diluição do agente cromogênico PAN foi o etanol (enquadrando dentro do método de química verde);
- A melhor concentração de PAN em etanol foi de 0,12% m/v, pois acima deste valor não houve aumento de sensibilidade;
- O melhor pH para a solução alcoólica de íons cobre(II) foi o pH = 5,00;
- O tempo de reação não contribui para o aumento da sensibilidade, assim o tempo de 5 minutos foi utilizado;
- O agente cromogênico PAN e o complexo Cu(PAN)_2 formado foram estáveis por até 2 horas;
- Os efeitos dos íons interferentes podem ser minimizados a nível de 2,0% utilizando concentrações de mascarantes ácido malônico e trifosfato de sódio a 0,25% m/v.

Também foram observados baixos limites de detecção e quantificação em relação ao limite máximo de cobre permitido em aguardente pelo MAPA (5,00 mg.L⁻¹), os quais foram de 0,12 e 0,47 mg.L⁻¹, respectivamente. O método apresentou boa sensibilidade analítica, boa repetibilidade e de acordo com os testes estatísticos, boa precisão e exatidão.

O método proposto apresenta vantagens como baixo custo relativo de equipamento e manutenção quando comparado com o equipamento exigido para a aplicação da metodologia de referência (oficial). Além disso, apresenta baixo custo de análise, pois não há o uso de gás como na metodologia de referência. Há também a possibilidade de medidas “in situ”, pois o aparato para as medidas de reflectância difusa pode ser carregado para qualquer lugar e conectado a computadores móveis e fontes de energia alternativas como baterias, o que é impossível para um equipamento de espectrofotometria atômica de chama, no qual o mesmo exige um local específico reservado para a realização das análises, apresenta grande volume e necessita estar ligado a uma fonte de gás para alimentação da chama.

As amostras comerciais de aguardente de cana-de-açúcar analisadas não apresentaram teores de íons cobre(II) acima do limite permitido pela legislação brasileira. Todavia, algumas amostras encontram-se com teores de íons cobre(II) acima do permitido pela legislação vigente na comunidade europeia e Estados Unidos, sendo assim consideradas impróprias para exportação.

Referências

- 1 ANDRADE, L. A. B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2. ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 2006. Cap. 1, p. 25-67.
- 2 LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgard Blucher, 1983. v. 5, cap. 4, p. 79-102.
- 3 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cachaça**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONT000fiog1ob502wyiv80z4s473agi63ul.html>>. Acesso em: 21 abr. 2015.
- 4 PINHEIRO, P. C.; LEAL, M. C.; ARAÚJO, D. A. Origem, produção e composição química da cachaça. **Química Nova na Escola**, v. 18, n. 1, p. 3-7, 2003.
- 5 ALAMBIQUE DA CACHAÇA. **A história da cachaça**. Disponível em: <<http://www.alambiquedacachaca.com.br/artigo.php?recordID=2&artigo=A%20Hist%C3%B3ria%20da%20Cacha%C3%A7a>>. Acesso em: 15 mar. 2015.
- 6 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BEBIDAS. **Destilados**. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/categorias/>>. Acesso em: 15 fev. 2015.
- 7 INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA. **Mercado interno**. Brasília, DF, 2008. Disponível em: <<http://www.ibrac.net/index.php/servicos/estatisticas/mercado-interno>>. Acesso em: 22 jan. 2015.
- 8 VERDI, A. R. Dinâmicas e perspectivas do mercado da cachaça. **Informações Econômicas**, v. 36, n. 2, p. 93-98, 2006.
- 9 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13 de 29 de junho de 2005: aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 jun. 2005. Seção 1, p. 3. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12386>>. Acesso em: 29 jan. 2015.
- 10 AZEVEDO, S. M.; CARDOSO, M. G.; PEREIRA, N. E.; RIBEIRO, C. F. S.; SILVA, V. F.; AGUIAR, F. C. Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 618-624, 2003.
- 11 CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. Parte II. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 165-169, 2003.
- 12 DEBELKE, K. **Technical guide on metals and alloys used as food contact**. Brussels: European Copper Institute, 2011. Disponível em: <http://www.copperalliance.eu/docs/default-source/resources/cu-risk-assessment_coe-food-contact-materials---eci-comments-20110627.pdf>. Acesso em: 11 fev 2015.

- 13 NASCIMENTO, R. F.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W.; FARIAS, J. B. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 735-739, 1998.
- 14 LIMA NETO, B. S.; BEZERRA, C. W. B.; POLASTRO, L. R.; CAMPOS, P.; NASCIMENTO, R. F.; FURUYA, S. M. B.; FRANCO, D. W. O cobre em aguardentes brasileiras: sua quantificação e controle. **Química Nova**, v. 17, n. 3, p. 220-223, 1994.
- 15 LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Aguardente e o controle químico de sua qualidade. **Engarrafador Moderno**, v. 33, n. 4, p. 5-8, 1994.
- 16 YOKOYA, F. **Fabricação de cachaça de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995. 92 p.
- 17 BOZA, Y.; HORII, J. Influência do grau alcoólico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 279-284, 2000.
- 18 ARESTA, M.; BOSCOLO, M.; FRANCO, D. W. Cooper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2819-2824, 2001.
- 19 ANDRADE SOBRINHO, L. G.; BOSCOLO, M.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1074-1077, 2002.
- 20 LELIS, V. G. **Ocorrência de carbamato de etila e sua formação em cachaça de alambique e em aguardente de cana-de-açúcar**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- 21 RIBEIRO, C. A. F.; PRADO FILHO, L. G. **O cobre contaminante da aguardente de cana**. 5. ed. Piracicaba: NAPMA, 1997. 24 p.
- 22 SUBCOMMITTEE ON THE TENTH EDITION OF RDAs. **Recommended dietary allowances**. Washington, DC: National Academic Press, 1989.
- 23 LINDER, M. C.; SCHAFFER, K. J.; HAZEGHAZAM, M.; ZHOU, C. Y. J.; TRAN, T. N.; NAGEL, G. M. Serum ferritin: does it differ from tissue ferritin? **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 11, p. 1033-1036, 1996.
- 24 STEARMAN, R.; YUAN, D. S.; YAMAGUCHI-IWAI, Y.; KLAUSNER, R. D.; DANCIS, A. A permease in high-affinity iron uptake in yeast. **Science**, v. 271, p. 1552-1557, 1996.
- 25 O'HALLORAN, T. V.; CULOTTA, V. C. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25057-25060, 2000.

26 SHANMUGANATHAN, A.; AVERY, S. V.; WILLETTS, S. A.; HOUGHTON, J. E. Copper-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* targets enzymes of the glycolytic pathway. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 556, p. 253-259, 2004.

27 FERNANDEZ, A. I.; FERNANDEZ, A. F.; PEREZ, M. J.; NIETO, T. P.; ELLIS, A. E. Siderophore production by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Lack of strain specificity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 33, p. 87-92, 1998.

28 COZOLLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2007.

29 SARGENTELLI, V.; MAURO, A. E.; MASSABNI, A. C. Aspectos do metabolismo do cobre no homem. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 290-293, 1996.

30 MOSHA, D.; WANGABO, J.; MHINZI, G. African traditional brews: how safe are they? **Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 205-209, 1996.

31 WECKER, L.; MILLER, S. B.; COCHRAN, S. R.; DUGGER, D. L.; JOHNSON, W. D. Trace element concentrations in hair from autistic children. **Journal of Mental Deficiency Research**, v. 29, p. 15-22, 1985.

32 ROTILIO, G.; CARR, M. T.; ROSSI, L.; CIRIOLO, M. R. Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. **International Union Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 50, p. 309-314, 2000.

33 ROTTKAMP, C. A.; NUNOMURA, A.; RAINA, A. K.; SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress, antioxidants, and Alzheimer disease. **Alzheimer Disease and Associate Disorders**, v. 14, p. 62-66, 2000.

34 KAWANISHI, S.; HIRAKU, Y.; MURATA, M.; OIKAWA, S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 9, p. 822-832, 2002.

35 WAGGONER, D. J.; BARTINIKAS, T. B.; GITLIN, J. D. The role of copper in neurodegenerative disease. **Neurobiology of Disease**, v. 6, n. 4, p. 221-230, 1999.

36 LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green chemistry" – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

37 ANASTAS, P. T.; WARNER, J. **Green chemistry: theory and practice**. Oxford: Oxford University Press, 1998.

38 GHAUCH, A.; TURNAR, C.; FACHINGER, C.; RIMA, J.; CHAREF, A.; SUPTIL, J.; MARTIN-BOUYER, M. Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1327-1333, 2000.

- 39 LUIZ, V. H. M.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Rapid determination of furosemide by combined spot test/diffuse reflectance spectroscopy to detect doping in sport. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 68-72, 2013.
- 40 WENDLANDT, W. W. M.; HECHT, H. G. **Reflectance spectroscopy**. New York: Interscience Publishers, 1996.
- 41 FEIGL, F. **Spot test in organic analysis**. 5th ed. New York: Elsevier, 1956.
- 42 JUNGREIS, E. **Spot test analysis**: clinical, environmental, forensic and geochemical applications. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.
- 43 KEALEY, D. Quantitative reflectometry I: principles and scope. **Talanta**, v. 19, n. 12, p. 1563-1571, 1972.
- 44 GHAUCH, A. et al. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu(II) by diffuse reflectance spectrometry. **Talanta**, v. 48, n. 2, p. 385-392, 1999.
- 45 TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe(III), Cr(VI) and Ni(II) by reflectance measurements. **Analytical Letters**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 1997.
- 46 TUBINO, M.; SOUZA, R. L. Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by diffuse reflectance photometry. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 776-780, 2006.
- 47 LÉAUTÉ, R. Distillation in alambic. **American Journal Enology Viticulture**, v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.
- 48 AS BEBIDAS destiladas. 2014. Disponível em: <http://correiogourmand.com.br/info_01_cultura_gastronomica_01_07.htm>. Acesso em: 12 mar. 2015.
- 49 CHARUTOS E BEBIDAS. **História da cachaça**. Disponível em: <<http://www.charutosebebidas.com.br/materias/historia.html>>. Acesso em: 12 mar. 2015.
- 50 DISTILLED beverage. In: Wikipedia: the free encyclopedia. 2015. Disponível em: <<http://www.en.wikipedia.org/wiki/Spirits>>. Acesso em: 05 mar. 2015.
- 51 INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA DE ALAMBIQUE. **Estudo de viabilidade técnica e econômica do arranjo produtivo da cachaça do estado de tocantins**. Belo Horizonte, 2003. Disponível em: <[http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/50a0e17a7c6facd603256e680069349b/ebe934d872bc924903257219006fed01/\\$FILE/C03-6-32-EVTE-Relat%C3%B3rioFinal.pdf](http://www.http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/50a0e17a7c6facd603256e680069349b/ebe934d872bc924903257219006fed01/$FILE/C03-6-32-EVTE-Relat%C3%B3rioFinal.pdf)>. Acesso em: 04 mar. 2015.
- 52 CASCUDO, L. C. **História da alimentação no Brasil**. Belo Horizonte: Itatiaia; São Paulo: Ed. USP, 1983. v. 1. (Coleção reconquista do Brasil, nova série, 79).
- 53 IHDE, A. J. **The development of modern chemistry**. New York: Dover, 1984. 851 p.

54 HISTÓRIA da cachaça. Disponível em: <<http://odia-a-historia.blogspot.com.br/2015/02/historia-da-cachaca.html>>. Acesso em: 23 fev. 2015.

55 CAMARA, M. **Cachaça**: prazer brasileiro. Rio de Janeiro: Mauad, 2004. 143 p.

56 LIMA, U. A. **Aguardente**: fabricação em pequenas destilarias. Piracicaba: Fealq, 1999. 187 p.

57 COSTA, L. E. **História da cachaça**. Disponível em: <<http://www.brasilcult.pro.br/cachaca/historia.htm>>. Acesso em: 02 jan. 2015.

58 LAUS, E. **A cachaça na história do Brasil**. São Vicente, 2004. Disponível em: <<http://www.novomilenio.inf.br/sv/svh028d.htm>>. Acesso em: 23 fev. 2015.

59 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 29, de 19 de setembro de 2012: estabelecer a complementação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas retificadas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2012. Disponível em: <http://sites.unasp.edu.br/portal/secretariageral/Documentos/DOU/2012-2/09/DO1_2012_09_20.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2015.

60 BRASIL. **Decreto no 2.314, de 04 de setembro de 1997**: regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília, DF, 1997. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/D2314.htm>. Acesso em: 05 jan. 2015.

61 BRASIL. **Decreto nº 4062, de 21 de dezembro de 2001**: define as expressões "cachaça", "Brasil" e "cachaça do Brasil" como indicações geográficas e dá outras providências. Brasília, DF, 2001. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2001/d4062.htm>. Acesso em: 05 jan. 2015.

62 OLIVEIRA, A. F.; ANEFALOS, L. C.; GARCIA, L. A. F.; ISTAKE, M.; BURNQUIST, H. L. **Sistema agroindustrial da cachaça e potencialidades de expansão das exportações**. São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.fearp.usp.br/egna/resumos/Oliveira.pdf>>. Acesso em: 09 abr. 2015.

63 LABANCA, R. A.; GLÓRIA, M. B. A.; GOUVEIA, V. J. P.; AFONSO, R. J. C. F. Determinação dos teores de cobre e grau alcoólico em aguardentes de cana produzidas no estado de Minas Gerais. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1111-1113, 2006.

64 ALVES, M. **Mercado de cachaça**. São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.ibrac.net/index.php?option=com_content&view=article&id=130:mercado-de-cachaca&catid=3:noticias&Itemid=57>. Acesso em: 22 mar. de 2015.

65 LIMA, A. J. B.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; LIMA J. M.; NELSON, D. L. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 845-848, 2009.

66 NOVAES, F. V. Em nome da qualidade da aguardente de cana. **O Engarrafador Moderno**, v. 7, n. 46, p. 68-73, 1997.

67 MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. **Cachaça**: orientações técnicas para produção. Teresina: SEBRAE-PI, 2005. 150 p.

68 VEIGA, J. F. Equipamentos para a produção e controle de operação da cachaça. In: CARDOSO, M. G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. Cap. 2, p. 69-100.

69 AGÊNCIA ESTADO. **Área plantada com cana cresce 3,6% na safra 2014/15, apura Conab**. São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2014/04/area-plantada-com-cana-cresce-36-na-safra-201415-apura-conab.html>>. Acesso em 13 fev. 2015.

70 STUPIELLO, J. P. Produção de aguardente: qualidade da matéria-prima. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. **Aguardente de cana**: produção e qualidade. Jaboticabal: FUNEP, 1992. v. 1, cap. 1, p. 9-21.

71 CLARKE, M. A.; LEGENDRE, B. R. Qualidade da cana-de-açúcar: impactos no rendimento do açúcar e fatores de qualidade. **STAB: Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v. 17, n. 6, p. 36-40, 1999.

72 CASIMIRO, F. C. **Produção de aguardente de cana**. Fortaleza: FIEC/DAMPI, 1998. 92 p.

73 SCHWAN, R. F.; CARVALHO, F. P.; DIAS, D. R.; CASTRO, H. A. Fermentação. In: CARDOSO, M. G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. Cap. 3, p. 101-135.

74 STUPIELLO, J. P. A cana-de-açúcar como material prima. In: PARANHOS, S. P. (Ed.). **Cana-de-açúcar**: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2. cap. 7, p. 761-804.

75 LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Ed.). **Biotecnologia industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 4, cap. 5, p. 145-182.

76 SORATTO, A. N.; VARVAKIS, G.; HORII, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 681-687, 2007.

77 PATARO, C.; GOMES, F. C. O.; ARAÚJO, R. A. C.; ROSA, C. A.; SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; CLARET, A. S.; CASTRO, H. A. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, v. 23, n. 217, p. 37-43, 2002.

78 SILVA, C. L. C. **Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* floculantes e linhagens não produtoras de H₂S e sua influência na qualidade da cachaça**. 2003. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

79 MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: SEBRAE-MG, 2005. 129 p.

80 JANZANTTI, N. S. **Compostos voláteis e qualidade de sabor de cachaça**. 2004. 179 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

81 NAGATO, L. A. F.; DURAN, M. C.; CARUSO, M. S. F.; BARSOTTI, R. C. F.; BADOLATO, E. S. G. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 39-42, 2001.

82 JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeasts: the effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, v. 16, n. 3, p. 42-49, 1981.

83 WATSON, K. Temperature relations. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The yeasts**. London: Academic Press, 1987. v. 2, chap. 3, p. 41-71.

84 STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum Stab**, v. 4, n. 17, p. 43-46, 1981.

85 ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a produção de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 128 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

86 RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v. 1, p. 26-30, 1987.

87 WHITE, J. **Yeast technology**. London: Chapman & Hall, 1954. 135 p.

88 PINOTTI, R. F. Quantificação do nível de nitrogênio nas etapas do processo de produção de álcool. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**. v. 10, n. 1, p. 34-35, 1991.

89 SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 85, n. 3, p. 149-156, 1979.

90 OSHIRO, C. R.; MACCARI JUNIOR, A. **Cachaças do Paraná: de gole em gole, da cana ao copo**. Curitiba: SEBRAE-PR, 2005. 104 p.

91 GUYMON, J. F. Chemical aspects of distilling wines into brandy. In: WEBB, A. D. (Ed.). **Chemistry of winemaking**. Washington, DC: American Chemical Society, 1974. v. 1, p. 232-253. (Advances in chemistry series, v. 137).

92 STUPIELLO, J. P. Destilação do vinho. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. **Aguardente de cana: produção e qualidade**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. Cap. 6, p. 67-78.

- 93 FARIA, J. B. **A influência do cobre na qualidade das aguardentes da cana (*Saccharum officinarum*)**. 1989. 72 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- 94 BARCELOS, L. V. F.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; ANJOS, J. P. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do Estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1009-1011, 2007.
- 95 ANDRADE SOBRINHO, L. G.; CAPPELINI, L. T. D.; SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; BUCHVISER, S. F.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Teores de carbamato de etila em aguardentes de cana e mandioca: parte II. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 116-119, 2009.
- 96 NICOL, D. A. Batch distillation. In: RUSSELL, I. **Whisky: technology, production and marketing**. London: Academic Press, 2003. Chap. 5. p. 155-180.
- 97 CASSINI, C. E. B. **Produção de aguardente de cana de açúcar por células imobilizadas**. 2004. 143 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- 98 DIAS, S. M. B. C. O processo de destilação. In: CARDOSO, M. G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. Cap. 4, p. 137-202.
- 99 BIZELLI, L. C.; RIBEIRO, C. A. F.; NOVAES, F. V. Dupla destilação da aguardente de cana: teores de acidez total e de cobre. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 4, p. 623-627, 2000.
- 100 BRUNO, S. N. F.; VAITSMAN, D. S.; KUNIGAMI, C. N.; BRASIL, M. G. Influence of distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1345-1352, 2007.
- 101 CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Modificações físico-químicas e sensoriais de aguardente de cana durante o envelhecimento em tonéis de carvalho. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 15, n. 2, p. 87-100, 1997.
- 102 CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise descritiva quantitativa da aguardente de cana durante o envelhecimento em tonel de carvalho (*Quercus alba L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 169-175, 1998.
- 103 CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise da aceitação de aguardentes de cana por testes afetivos e mapa de preferência interno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 32-36, 2000.
- 104 MOSEDALE, J. R.; PUECH, J. L. Wood maturation of distilled beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 3, p. 95-101, 1998.
- 105 BOZA, Y.; OETTERER, M. Envelhecimento de aguardente de cana. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 8-15, 1999.

- 106 NISHIMURA, K.; MATSUYAMA, R.; PIGGOTT, R. J.; SHARP, R.; DUNCAN, R. E. **B. Maturation and maturation chemistry: the science and technology whiskies**. London: Logman Scientific & Technical, 1989.
- 107 REAZIN, G. H. Chemical mechanisms of whisky maturation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 32, p. 283-239, 1981.
- 108 NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Rum flavour. In: PIGGOTT, J. R. (Ed.). **Flavour of distilled beverages: origin and development**. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1983. v. 1, chap. 3, p. 49-63.
- 109 LITCHEV, V. Influence of oxidation process on the development of the taste and flavor of wine distillates. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 40, n. 1, p. 31-35, 1989.
- 110 BATTAGLIA, R.; CONACHER, R. B. S.; PAGE, B. D. Ethyl carbamate (urethana) in alcoholic beverages and foods: a review. **Food Additives & Contaminants**, v. 7, n. 4, p. 477-496, 1990.
- 111 SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Resolução SAA de 28 de novembro de 2006**: define norma e padrões mínimos de qualidade para a cachaça envelhecida, como base para certificação de produtos pelo sistema de qualidade de produtos agrícolas, pecuários e agroindustriais do Estado de São Paulo, instituído pela Lei 10.481 de 29/12/1999. São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.codeagro.sp.gov.br/qualidade>>. Acesso em: 26 jan. 2015.
- 112 ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Arlington: AOAC, 1997.
- 113 INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo, 2008. 1020 p.
- 114 HONORATO, F. A.; HONORATO, R. S.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. 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.
- 115 MIRANDA, K.; DIONÍSIO, A. G. G.; PEREIRA FILHO, E. R. Copper determination in sugar cane spirits by fast sequential flame atomic absorption spectrometry using internal standardization. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 99-101, 2010.
- 116 CALDAS, N. M.; OLIVEIRA, S. R.; GOMES NETO, J. A. 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**, v. 636, n. 1, p. 1-5, 2009.

- 117 ROCHA, S. A. N.; DANTAS, A. F.; JAEGER, H. V.; COSTA, A. C. S.; LEÃO, E. S.; GONÇALVES, M. R. Spectrophotometric determination of copper in sugarcane using biquinoline in the presence of ethanol and Triton X-100. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 71, p. 1414-1418, 2008.
- 118 KÜCHLER, I. L.; SILVA, F. A. M. Método potenciométrico para determinação de cobre em cachaça. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 339-341, 1999.
- 119 HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862 p.
- 120 SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- 121 NARAYANASWAMY, R. Optical chemical sensors: transduction and signal processing. **Analyst**, v. 118, n. 4, p. 317-322, 1993.
- 122 GOTARDO, M. A.; GIGANTE, A. C.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, v. 64, p. 361-365, 2004.
- 123 GOTARDO, M. A.; TOGNOLLI, J. O.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Detection of propranolol in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 69, n. 4, p. 1103-1109, 2008.
- 124 GAZDA, D. B.; FRITZ, J. S.; PORTER, M. D. Determination of nickel(II) as the nickel dimethylglyoxime complex using colorimetric solid phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 508, n. 1, p. 53-59, 2004.
- 125 ZAPORZHETS, O. A.; TSYUKATO, L. Y. Xylenol orange adsorbed on silica surface as a solid phase reagent for lead determination using diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, v. 58, p. 861-868, 2002.
- 126 ARENA, M. P.; PORTER, M. D.; FRITZ, J. S. Rapid, specific determination of iodine and iodide by combined solid-phase extraction/diffuse reflectance spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 1, p. 185-190, 2002.
- 127 MOLINER-MARTINEZ, Y.; HERRAEZ-HERNANDEZ, R.; CAMPINS-FALCO, P. Improved detection limit for ammonium/ammonia achieved by Berthelot's reaction by use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, n. 2, p. 327-334, 2005.
- 128 ZANJANCHI, M. A.; NOEI, H.; MOGHIMI, M. Rapid determination of aluminum by UV-Vis diffuse reflectance spectroscopy with application of suitable adsorbents. **Talanta**, v. 70, p. 933-939, 2006.
- 129 TUBINO, M.; QUEIROZ, C. A. R. Flow injection visible diffuse reflectance quantitative analysis of nickel. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, p. 199-204, 2008.

- 130 MOROS, J.; LLORCA, I.; CERVERA, M. L.; PASTOR, A.; GARRIGUES, S. G. M. Chemometric determination of arsenic and lead in untreated powdered red paprika by diffuse reflectance near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 2, p. 196-206, 2008.
- 131 ROSA, S. S.; BARATA, P. A.; MARTINS, J. M.; MENEZES, J. C. Development and validation of a method for active drug identification and content determination of ranitidine in pharmaceutical products using near-infrared reflectance spectroscopy: a parametric release approach. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 725-723, 2008.
- 132 MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Quantitative reflectance spot test for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 327-330, 2004.
- 133 LUIZ, V. H. M.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of nitrite in meat products and water using dapsone with combined spot test/diffuse reflectance on filter paper. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2546-2551, 2012.
- 134 MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Reagentes gerais especiais. In: _____. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação e purificação**. 11. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. Cap. 4, p. 246-280.
- 135 FLASCHKA, H. A. **EDTA titrations an introduction to theory and practice**. 2nd ed. London: Pergamon Press, 1964.
- 136 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como variar tudo ao mesmo tempo. In: _____. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e indústria**. 2. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 2002. Cap. 3, p. 83-100.
- 137 SANDELL, E. B.; ONISH, H. **Photometric determination of traces of metals**. Part I. New York: John Wiley & Sons, 1978.
- 138 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Decreto nº 55871, de 26 março de 1965**: modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Brasília, DF, 1965. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/414d248047458a7d93f3d73fbc4c6735/DECRETO+N%C2%BA+55.871,+DE+26+DE+MAR%C3%87O+DE+1965.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 25 jan. 2015.
- 139 EIRAS, S. P.; ANDRADE, J. C.; BRUNS, R. E. Catalytic determination of molybdenum-VI in plants using mono-segmented continuous-flow analysis and spectrophotometric detection. **Analyst**, v. 118, p. 213-217, 1993.
- 140 PERRIN, D. D. **Masking and demasking of chemical reactions**. New York: Interscience Publishers, 1970.