



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Um modelo de calibração de segunda ordem
para determinação espectrofluorimétrica de
hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em
bebidas destiladas**

Amanda Cecília da Silva

João Pessoa – PB - Brasil
Março/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Um modelo de calibração de segunda ordem
para determinação espectrofluorimétrica de
hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em
bebidas destiladas**

Amanda Cecília da Silva*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

* Bolsista:



João Pessoa – PB – Brasil

Março/2015

S586u Silva, Amanda Cecília da.

Um modelo de calibração de segunda ordem para determinação espectrofluorimétrica de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em bebidas destiladas / Amanda Cecília da Silva.- João Pessoa, 2015.

105f. : il.

Orientador: Mário César Ugulino de Araújo

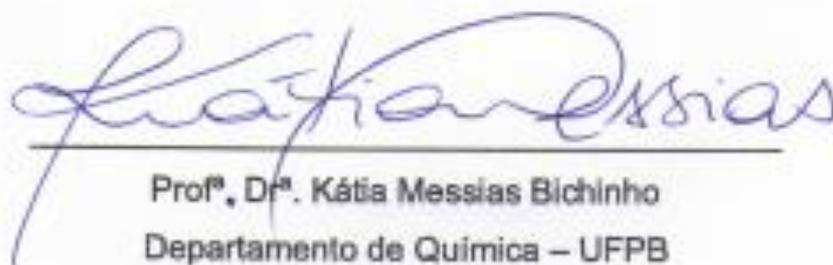
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

Dissertação de Mestrado submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

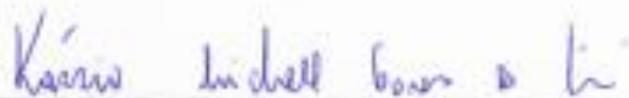
Aprovada pela banca examinadora:



Prof. Dr. Mario César Ugulino de Araújo
Departamento de Química – UFPB
(Orientador)



Profª, Drª. Kátia Messias Bichinho
Departamento de Química – UFPB
(Examinadora interna)



Prof. Dr. Kássio Michell Gomes de Lima
Departamento de Química – UFRN
(Examinador externo)

**DEDICO A DEUS, SENHOR DE TODAS AS
COISAS; A MINHA MÃE, QUE TANTO AMO E
ADMIRO E A TODAS AS PESSOAS QUE
DIRETA OU INDIRETAMENTE ME DERAM
FORÇA PARA SEGUIR NESTA JORNADA.**

*“Como o Pai me amou, também eu vos amei a
vós; permaneci no meu amor”.*

(João 15. 9)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre a meu lado me protegendo e me abençoando todos os dias da minha vida;

À minha família, em especial, minha mãe, Ana Lúcia, por todo incentivo, educação e amor, mas principalmente por todos os sacrifícios que ela fez e tem feito por mim;

A meu orientador, Prof. Dr. Mário Ugulino, pela orientação, dedicação e apoio;

Agradecimento muito especial a Adriano Araújo e Licarion Neto, por todos os ensinamentos, os conselhos e a valiosa e fundamental contribuição para o desenvolvimento deste trabalho; a vocês dois, meu sincero e eterno agradecimento;

A todos que fazem parte do grupo LAQA (Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria), Anabel, Mayara, Emanuella, Adenilton, Ivanda, David, Jefferson, Ivison, Marcelinho, Stefani, Sofacles, Urijatan, Renato, Edilene, Welma, Willy, Pedro, Amália, Dayvison, Daniel, Aline, Heltinho, Lucas, Chico, Janete, Flaviano, Ana Luíza, Karla, Julys, Diana, Inakã, enfim a todos os “laqueanos”.

Aos meus amigos/colegas, Felix, Aldemyr, Ana Beatriz, Adilson Júnior, Auriana Malta e Eriberto Dias por todos os momentos de descontração, pelo apoio e grande amizade;

À minha orientadora na graduação, Prof^a. Dr^a. Alessandra de Figueirêdo, por sempre me incentivar, pelos conselhos e ensinamentos não só profissionais, mas também pessoais;

E a todos que me ajudaram, apoiaram e sempre torceram por mim em mais essa etapa da minha vida acadêmica.

Meu eterno agradecimento.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Caracterização da problemática	16
1.2. Fundamentação Teórica	19
1.2.1. Bebidas Alcoólicas	19
1.2.1.1. Bebidas destiladas	23
1.2.1.1.1. Cachaça	25
1.2.1.1.2. Vodca	26
1.2.1.1.3. Rum	26
1.2.2. Controle da qualidade das bebidas alcoólicas	27
1.2.3. Métodos espectroquímicos	33
1.2.3.1. Espectrometria de Fluorescência Molecular	35
1.2.3.1.1. Instrumentação	37
1.2.3.1.2. Fluorescência do tipo Excitação e Emissão (EEM) em 3D	41
1.2.4. Quimiometria	43
1.2.4.1. Calibração em Química Analítica	44
1.2.4.1.1. Métodos de Calibração Multivias	46
1.2.4.1.1.1. Métodos de Tucker	46
1.2.4.1.1.2. Análise de Fatores Paralelos	48
1.2.4.1.1.3. U-PLS/RBL	52

2. Objetivos	55
2.1. Objetivo Geral	55
2.2. Objetivos Específicos	55
3. METODOLOGIA	57
3.1. Reagentes	57
3.2. Conjunto de calibração	57
3.3. Conjunto de validação	58
3.4. Registro das EEM	60
3.5. Amostras de bebidas destiladas	62
3.6. Software e análise de dados	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1. Considerações gerais	66
4.1.1. Calibração/validação	68
4.2. Modelo PARAFAC	69
4.2.1. Calibração	69
4.2.2. Validação	70
4.3. Modelo U-PLS/RBL	76
4.3.1. Calibração	76
4.3.2. Validação	77
4.4. Análise das amostras de bebidas destiladas	81
5. CONCLUSÕES	90
5.1. Propostas futuras	91
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE A	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Percentual de bebidas alcoólicas consumidas no mundo por região (2010)	21
Figura 2 - Consumo per capita total entre adultos (acima de 15 anos), em litros de puro álcool – Brasil 1963-2007	22
Figura 3 - Distribuição dos tipos de bebidas alcoólicas consumidas no Brasil (1990-2010)	23
Figura 4 - Processo resumido da destilação de bebidas, destacando as etapas de moagem; fermentação; destilação e envelhecimento	24
Figura 5 – Formula estrutural de alguns HPA's	28
Figura 6 - Região do espectro eletromagnético	33
Figura 7 – Lei de Beer	34
Figura 8 - Diagrama de Jablonski	35
Figura 9 - Esquema de um fluorímetro	39
Figura 10 - Esquema de um Espectrofluorímetro	40
Figura 11 - Superfície típica EEM gráfico em 3D (a) e em superfície de contorno (b)	42
Figura 12 - Espalhamento Rayleigh e Raman na EEM	43
Figura 13 - Esquema para o desdobramento do método de Tucker 1	46
Figura 14 - Esquema do método de Tucker 3	48
Figura 15 - Esquema do método PARAFAC	49
Figura 16 - Etapas para o funcionamento do ALS	50
Figura 17. Espectrofluorímetro Fluorolog-3 (Horiba)	61
Figura 18 – Fotografia da cubeta empregada no registro das EEM	61

Figura 19 – Imagem da interface MVC2 (a); no modelo PARAFAC (b); no modelo U-PLS/RBL (c)	63
Figura 20 – Função referente a rotina para remover os espalhamentos	64
Figura 21 - Espectros puros dos HPA's	66
Figura 22 - EEM da mistura dos seis HPA's com espalhamento (a) e após correção do espalhamento (b)	67
Figura 23 – Medida do branco	67
Figura 24 - Superfície típica EEM das amostras de validação	69
Figura 25 - Valor de CORE em função do número de fatores PARAFAC.....	70
Figura 26 - EJCR para o modelo PARAFAC	73
Figura 27 - Perfis recuperados pelo PARAFAC para cada conjunto de analito..	75
Figura 28 - Gráfico de PRESS versus número de fatores incluídos no modelo U-PLS obtido por validação cruzada para as amostras de calibração .	76
Figura 29 - Variação de Su (a) e variação da concentração predita com a inclusão de fatores RBL (b)	78
Figura 30 - Perfis típicos de interferentes recuperados pelo RBL modo excitação (a) e modo de emissão (b)	79
Figura 31 - EJCR para o modelo U-PLS/RBL	81
Figura 32 - Superfícies EEM para amostra de cachaça (a), vodca (b), rum (c) e para amostra de cachaça fortificada (d)	82
Figura 33 - Resultado da decomposição PARAFAC das amostras de bebidas alcoólicas não fortificadas, variação do CORE em função do número de fatores (a), perfis de excitação (b) e perfis de emissão (c)	84
Figura 34 - EJCR para o modelo PARAFAC (a) e U-PLS/RBL (b) AN (—), AC (—), FL (—), BaP (—) e P (—)	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros e limites permitidos para as bebidas alcoólicas.....	28
Tabela 2 - Metodologias analíticas para determinação de HPA's em amostras de bebidas destiladas	32
Tabela 3 - Representação esquemática dos tipos de dados/calibração.....	45
Tabela 4 - Faixas de concentrações para o conjunto de calibração.....	58
Tabela 5 - Níveis e fatores usados para o planejamento Taguchi.....	59
Tabela 6 - Misturas do conjunto de validação preparadas pelo planejamento Taguchi	60
Tabela 7 - Níveis de fortificação das amostras de bebidas destiladas.....	62
Tabela 8 – Parâmetros usados para construir os modelos PARAFAC e U-PLS/RBL na interface MVC2	63
Tabela 9 - Resumo da predição para as amostras de validação para o modelo PARAFAC	71
Tabela 10 - Resumo da predição das amostras de validação para o modelo U-PLS/RBL	80
Tabela 11 - Valores de recuperação relativos à predição dos HPA's nas amostras de bebidas destiladas	85
Tabela 12 - Resumo da predição das amostras de reais para o modelo PARAFAC	86
Tabela 13 - Resumo da predição das amostras de reais para o modelo U-PLS/RBL	87
Tabela 14 - Número CAS para os HPA's estudados neste trabalho.....	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

γ – Sensibilidade analítica

AC – Acenafteno

ALS – Mínimos quadrados alternados

AN – Antraceno

BaA - Benzo[a]Antraceno

BaP - Benzo[a]Pireno

BbF - Benzo[b]Fluoranteno

BjF - Benzo(j)Fluoranteno

BkF - Benzo(k)Fluoranteno

CCHA - Comitê Científico da Alimentação Humana

CG-DIC – Cromatografia gasosa com detecção em ionização de chama

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas

CONCORDIA - Teste de consistência de core

CR - Criseno

DBaeP - DiBenzo(a, e)Pireno

DBahA - DiBenzo(a, h)Antraceno

DBahP - di-hidro-benzo(a, h)Pireno

DBaiP - dibenzo(a, i)Pireno

DBalP - dibenzo(a, l)Pireno

DTLD - Decomposição trilinear direta

EEM – Matrizes de excitação e emissão

EFSA - Autoridade de Segurança Alimentar Europeia

EJCR – Região elíptica de confiança conjunta

ELL – Extração líquido-líquido

FAO/ONU - Organização para a alimentação e agricultura das nações unidas

FL – Fluoranteno

HPA's – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HPLC–FLU - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência

HPLC-UV/Vis - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV/Vis

IP - Indeno (1,2,3-c, d)Pireno

JECFA - Comitê conjunto de peritos em aditivos alimentares, do inglês Joint expert committee on food additives.

LOD - Limite de detecção, do inglês limit of detection.

LOQ – Limite de quantificação, do inglês limit of quantitation.

MC – 5 - metilcriseno

OMS – Organização Mundial de Saúde

P – Pireno

PARAFAC - Análise de fatores paralelos

PCA – Análise por componentes principais

PLS – Mínimos quadrados parciais

PRESS - Somatório quadrático do erro de predição

RBL - Bilinearização residual

REP – Erro relativo de predição

RMSECV – Raiz do erro médio quadrático de validação

RMSEP – Raiz do erro médio quadrático de predição

SEN - Sensibilidade

SMPE – Microextração em fase sólida

SPE – Extração em fase sólida

U - PLS – Mínimos quadrados parciais desdobrados

UV – Radiação ultravioleta

Vis – Visível

RESUMO

O consumo de bebidas alcoólicas aumenta anualmente em todo o mundo e, conseqüentemente, maior é a ingestão dos compostos prejudiciais à saúde que estão presentes nesses produtos. Como exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's), que vem chamando a atenção dos pesquisadores devido ao seu potencial cancerígeno. As bebidas destiladas é a classe mais afetadas pela presença desse grupo de contaminantes, que chega ao produto através da queima da matéria-prima utilizada na produção da bebida. Apesar da preocupação existente sobre os HPA's, ainda não existe nenhuma legislação ou controle para esses contaminantes nas bebidas destiladas. Portanto, é necessário, o quanto antes, que esses contaminantes sejam legislados para bebidas destiladas. Nesse contexto, é relevante o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas, robustas e com a mínima geração de resíduos. A maioria dos métodos para quantificação de HPA's em alimentos faz uso de HPLC-FLU ou CG-EM, porém as técnicas cromatográficas geram muitos resíduos além do tempo de análise e dos gastos associados. Nesse trabalho é apresentada uma metodologia rápida, relativamente simples e de baixo custo para quantificação simultânea de cinco HPA's (BaP, FL, AC, AN e P) em três tipos de bebidas destiladas (rum, cachaça e vodca), empregando espectrometria de fluorescência com EEM 3D e calibração de segunda ordem para contornar os problemas causados pela complexidade da matriz. Modelos de calibração foram construídos via PARAFAC e U-PLS/RBL e validados através de um conjunto de misturas dos analitos, com acréscimo de um interferente (FE). Para a elaboração das misturas de validação, o planejamento Taguchi foi utilizado. Os parâmetros de validação obtidos mostraram-se satisfatórios para ambos os modelos (PARAFAC e U-PLS/RBL), com faixa de REP variando de 4,58% a 8,55% e 1,75% a 9,16% respectivamente. A aplicação dos modelos de calibração nas amostras de bebidas destiladas demonstrou satisfatório desempenho analítico com valores de recuperação na faixa de 85,99% a 115,18% para o PARAFAC e de 81,02% a 106,05% para o U-PLS/RBL. Portanto, é possível afirmar que os modelos construídos apresentaram desempenho satisfatório para determinação de HPA's em bebidas destiladas, alcançando a vantagem de segundo, com pouca geração de resíduo, simplicidade e baixo custo associados.

Palavras-chaves: contaminantes, vantagem de segunda ordem, rum, cachaça, vodca.

ABSTRACT

Alcoholic beverage consumption increases annually worldwide and consequently the higher is the intake of harmful compounds that is present in these products, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) which has attracted the attention of researchers because of their carcinogenic capacity. The spirits is the class of drinks most affected by the presence of this group of contaminants (HPA's) that reaches it by burning the raw material used in the production. Despite the existing concern about the HPA's there is still no legislation or control for these contaminants in spirits, so as soon as possible the creation of legislation is necessary and for this, is necessary to develop rapid, robust and low waste production analytical methods. Most quantitation methods for PAH's in food uses HPLC-FLU or GC-MS, but the use of liquid or gas chromatography coupled to mass spectra generates huge amount of waste beyond the analysis time and high associated costs. In this work we present a rapid methodology, relatively simple and low cost to simultaneous quantification of five HPA's (BaP, FL, AC, AN and P) in three types of spirits (rum, cachaça and vodka) using fluorescence spectroscopy EEM 3D and second order calibration to circumvent the problems caused by the complexity of the matrix by the second order advantage. Calibration models were built by PARAFAC and U-PLS/RBL using pure analyte individual standard solutions. And the models were validated using a set of analytes mixtures adding an interfering (FE). For the development of validation blends the Taguchi design was used. The validation parameters obtained were satisfactory for both models (PARAFAC and U-PLS / RBL), with REP on a range from 4.58% to 8.55% and 1.75% to 9.16% respectively. The application of calibration models in real samples is still being processed. processed. The application of calibration models in spirits showed good performance with recovery values in the range of 85.99% to 115.18% for PARAFAC and 81.02% to 106.05% for U-PLS / RBL. Therefore, we can say that the models built had satisfactory performance for the determination of PAH's in spirits, reaching the second advantage, with little generation of waste, simplicity and low cost associated.

Keywords: Contaminants, second order advantage, cachaça, rum, vodka.

Introdução



1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização da Problemática

Bebida é todo produto industrializado destinado à ingestão humana, em estado líquido, sem finalidade medicamentosa ou terapêutica [1]. As bebidas são classificadas em dois grandes grupos: não alcoólicas (fermentadas e não fermentadas) e as alcoólicas (fermentadas, destiladas, retificadas e por misturas) [2,3]. As bebidas destiladas são obtidas por processo de fermento-destilação de frutas, grãos e outras partes vegetais. Cachaça, vodca e rum são exemplos de bebidas alcoólicas destiladas [1-4].

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as bebidas destiladas correspondem ao tipo mais consumido no mundo (50%), seguido da cerveja (35%) e do vinho (8%). No mercado nacional, a cachaça é a segunda bebida alcoólica mais consumida, atrás apenas da cerveja [4-8].

Sendo o comércio de bebidas um mercado que tende a crescer substancialmente ao longo dos anos, há uma grande necessidade de consolidar parâmetros para garantir a qualidade do produto a níveis aceitáveis para atender às necessidades do mercado nacional e internacional. Portanto, é de grande importância o controle de uma classe de contaminantes orgânicos chamados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's), os quais constituem um grupo de compostos orgânicos com dois ou mais anéis aromáticos condensados [9-11].

Os HPA's têm atraído a atenção dos órgãos fiscalizadores por causa de seu potencial cancerígeno [9-11]. No entanto, não há nenhuma menção de níveis máximos de HPA's em bebidas destiladas no Brasil ou em outros países.

Em 2002, o Comitê Científico da Alimentação Humana (CCAH) estimou um consumo diário máximo de benzo(a)pireno variando de 6 a 8 μgkg^{-1} de peso corporal, considerando indivíduos de 70 kg. Por outro lado, a Comissão Europeia estabeleceu um nível máximo variando de 1 a 10 μgkg^{-1} em alguns alimentos [9,12].

Em 2008, a Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) concluiu que o Benzo[a]Pireno (BaP), Benzo[a]Antraceno (BaA), Benzo[b]Fluoranteno (BbF) e Criseno (CR) eram indicadores para a contaminação dos alimentos por HPA's [9, 13]. Com base nessas conclusões, a Comissão Europeia substituiu o regulamento 1881/2006 pelo 835/2011, incluindo níveis máximos relativos à soma dos quatro contaminantes, variando de 1 μgkg^{-1} a 35 μgkg^{-1} [9,13]. Na legislação brasileira, foi estabelecido valores máximos permitidos de B[a]P devem ser de 0,7 μgL^{-1} para a água potável e engarrafada e, 0,03 μgkg^{-1} para alimentos caracterizados por um aroma de fumo [9, 14, 15].

É possível encontrar, na literatura, alguns métodos consolidados para a análise de HPA's como por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV/Vis (HPLC-UV/Vis), cromatografia líquida de alta Eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLU) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Apesar da eficiência dessas técnicas, o procedimento para a determinação de HPA's é demorado, oneroso e por vezes

trabalhoso devido à necessidade do tratamento minucioso da amostra, tornando esses procedimentos mais laboriosos para análises de rotina [16,17].

Outro agravante é a presença de interferentes durante o rastreamento nas amostras e para que esse fator seja contornado é preciso revalidar a metodologia, porém isso requer mais tempo e gastos. Portanto, faz-se necessário desenvolver metodologias analíticas que atendam às demandas de mercado, como rapidez, robustez, baixo custo e pouca ou nenhuma geração de resíduos, estando, assim alinhado aos denominados métodos analíticos verdes [18,19].

Neste caso particular de análise de compostos fluorescentes como HPA's, a espectrometria de fluorescência do tipo emissão e excitação (EEM) em 3D, combinada ao uso de ferramentas quimiométricas apropriadas, permite desenvolver modelos baseados em amostras padrão com robustez suficiente para serem aplicados em amostras complexas, dispensando etapas prévias de separação e/ou extração. O sinal analítico dos compostos de interesse é registrado concomitantemente com os constituintes da matriz não calibrados e, posteriormente, é separado no domínio matemático [20]. Este tipo de abordagem é conhecida como calibração de ordem superior e vem sendo usada com sucesso em diversas aplicações ambientais [21], amostras biológicas [22] e alimentos [23], por exemplo.

Bro e colaboradores construíram modelos PARAFAC e PLS-DA através de EEM para classificação de mel. Os autores corrigiram os espalhamentos através de uma rotina não informada e a partir daí modelo PARAFAC com 6 fatores foi construído [24]. Em outro trabalho Rubio e colaboradores

construíram modelos PARAFAC usando EEM para determinação simultânea de 2 pesticidas em alface. Os autores usaram o teste de consistência de CORE para definir o número de fatores que foi 4. Os autores também usaram adição de padrão e o algoritmo INCA para a correção de espalhamentos Rayleigh [25]. Olivieri e colaboradores determinaram 7 HPA's em óleos de oliva e girassol a partir de modelos PARAFAC e U-PLS/RBL, através de EEM; a rotina utilizada para corrigir os espalhamentos Rayleigh e Raman foi a implementada por Zepp e colaboradores. Destes os dois modelos construídos o U-PLS/RBL foi o que demonstrou melhor desempenho, segundo os autores [26]. Elcoroaristizabal e colaboradores compararam modelos MCR-ALS, PARAFAC e U-PLS/RBL na determinação de 10 HPA's através de EEM, os autores utilizaram rotina não informada para a correção dos espalhamentos e concluíram com a pesquisa que os modelos MCR-ALS e PARAFAC se mostraram mais eficazes para aplicações de caráter mais qualitativo e o modelo U-PLS/RBL apresentou melhor desempenho para análise quantitativa [27].

1.2. Fundamentação Teórica

1.2.1. Bebidas Alcoólicas

As bebidas, com relação ao teor de etanol, podem ser categorizadas em dois grupos: alcoólicas e não alcoólicas. As bebidas não alcoólicas possuem um teor alcoólico de até 0,5% em volume, a 20°C. Já as bebidas consideradas alcoólicas possuem um teor de etanol na faixa de 0,5% a 54% em volume, a 20°C [2].

A composição química das bebidas ditas alcoólicas consiste de uma mistura complexa de compostos orgânicos. Esta compreende desde compostos carbonilados (álcoois, ácidos voláteis, ácidos não voláteis, ésteres), compostos de azoto, compostos N-heterocíclicos, compostos aromáticos, aminas, compostos terpênicos, hidroxiácidos, compostos fenólicos, aditivos até contaminantes que variam conforme matéria-prima, formas de produção e estocagem [28].

De acordo com sua forma de produção e/ou preparo final que chega ao consumidor às bebidas alcoólicas podem ser agrupadas em:

- ✓ Fermentada: bebida alcoólica obtida por processo de fermentação;
- ✓ Destilada: bebida alcoólica obtida pelo processo de fermento-destilação;
- ✓ Retificada: bebida alcoólica obtida pelo processo de retificação do destilado alcoólico;
- ✓ Por mistura: bebida alcoólica obtida pela mistura de destilado alcoólico simples com outra bebida não-alcoólica.

De acordo com o relatório da OMS, 50,1% do consumo total de álcool é na forma de bebidas destiladas (**Figura 1**). O segundo tipo de bebida mais consumida é a cerveja (34,8%) e apenas 8,0% de álcool total registrado é consumido na forma de vinho [29].

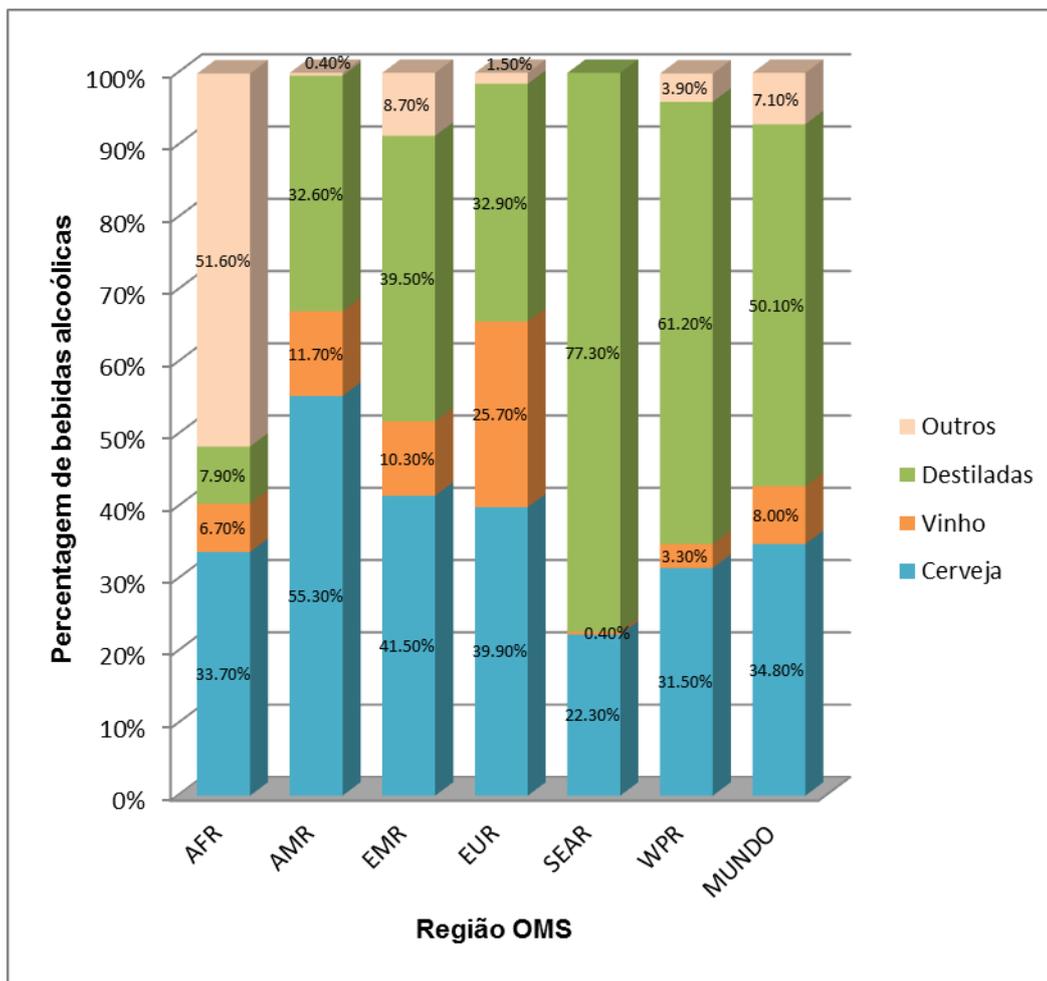


Figura 1 - Percentual de bebidas alcoólicas consumidas no mundo por região (2010) [29]. (AFR) Região Africana; (AMR) Região das Américas; (EMR) Região do Mediterrâneo Oriental; (EUR) Região Europeia; (SEAR) Região Sudeste da Ásia; (WPR) Região do Pacífico Ocidental.

Com relação ao mercado brasileiro, nos últimos 40 anos o consumo de bebidas alcoólicas cresceu a um ritmo de aproximadamente 2,5% ao ano, segundo Yamamoto [30] (**Figura 2**).

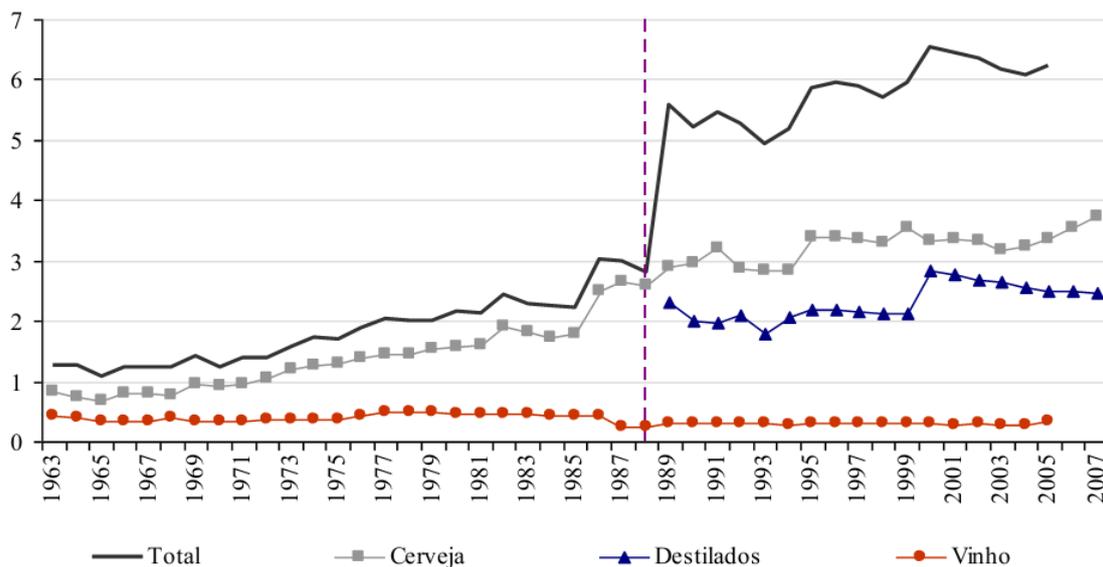


Figura 2 - Consumo per capita total entre adultos (acima de 15 anos), em litros de puro álcool – Brasil 1963-2007 [30].

É possível perceber que nos anos 60, o vinho representava boa parte do volume consumido de bebidas alcoólicas no País, enquanto nos anos 2000 o mercado de vinho corresponde a uma parcela muito pequena do consumo. A cerveja, por sua vez, vem mantendo o ritmo crescente do consumo de álcool. E as bebidas destiladas apresentam uma notável influência sobre a estatística total dos dados a partir do momento em que sua participação foi incluída, deixando evidente que sua contribuição tem bastante importância no mercado brasileiro.

Dados da OMS (**Figura 3**) mostram que até o ano de 2010 o mercado ainda se mantém com a mesma característica acima citada, onde dentre as bebidas alcoólicas existentes, a mais consumida no Brasil é a cerveja (59,6%), seguida das bebidas destiladas (36,3%) e do vinho (3,9%) [31].



Figura 3 - Distribuição dos tipos de bebidas alcoólicas consumidas no Brasil [31] (1990-2010).

1.2.1.1. Bebidas Destiladas

A destilação é utilizada para separar e, em seguida, concentrar líquidos com volatilidades diferentes. Para a produção de destilados este procedimento baseia-se nos pontos de ebulição do etanol (78.5 °C) e da água (100 °C) [32].

As matérias-primas utilizadas para fabricar uma bebida destilada são de dois tipos básicos: (1) as que contêm uma elevada concentração de açúcares naturais ou (2) as que contêm outros hidratos de carbono que podem ser facilmente convertidos em açúcares por enzimas [33]. A **Figura 4** representa basicamente o processo de produção das bebidas destiladas.

Inicialmente, a matéria-prima é submetida a moendas para retirar o máximo de sacarose possível. O caldo então passará por um processo de filtração e/ou decantação para retirar pequenas partículas restantes da etapa de moagem. Na etapa da fermentação, os açúcares, devido à presença das leveduras (microorganismo vegetativo que vive e se multiplica em meios contendo carboidratos, especialmente os açúcares simples), são convertidos

principalmente em álcool etílico e gás carbônico. Na destilação acontece a purificação do álcool e, principalmente, a proporção adequada dos componentes da mistura para definir o aroma e o sabor típico da bebida [32-35].

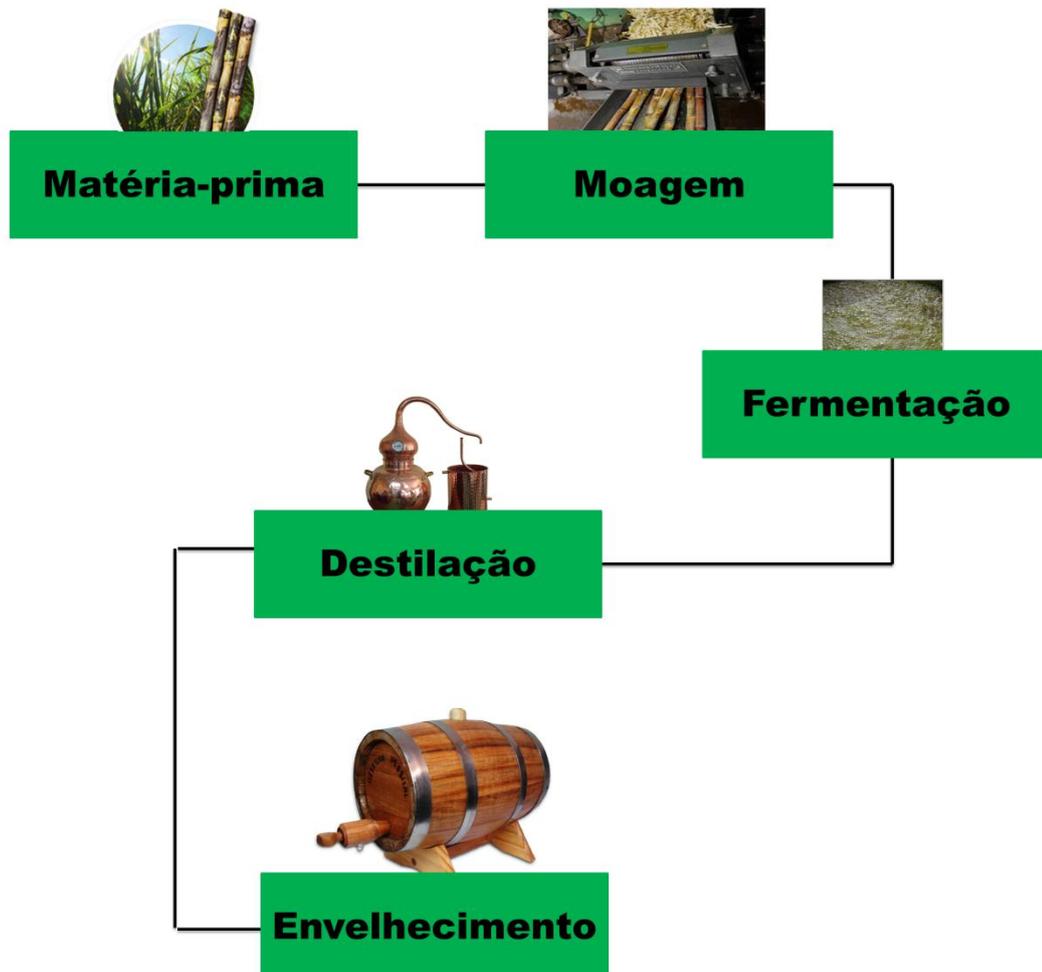


Figura 4 - Processo resumido da destilação de bebidas, destacando as etapas de moagem, fermentação, destilação e envelhecimento.

A composição química final, cor, aroma e sabor de alguns destilados dependem, além dos processos de fermentação e destilação, da etapa de envelhecimento, as quais são alteradas sensivelmente quando os destilados são armazenados em tonéis de madeira [34]. Vale ressaltar que esta última

etapa não é utilizada em todas as bebidas destiladas. Este modo de produção abrange as principais bebidas disponíveis no mercado nacional, como, vodca, rum, uísque, cachaça, aguardente, tequila, gim e conhaque.

1.2.1.1.1. Cachaça

Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica entre 38 % a 48% em volume a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares (sacarose) até 6gL^{-1} [2,3].

No período anterior a II Guerra Mundial, deu-se início à produção da cachaça em pequenos engenhos rurais providos de alambiques de destilação através da agricultura familiar. Na época não havia um padrão de produção e o envelhecimento não tinha como objetivo o melhoramento das características organolépticas da bebida e sim o simples desejo de armazenar o produto para que tivesse maior tempo de duração devido à baixa comercialização. Após a II Guerra Mundial o aumento populacional acarretou em um aumento de consumo da cachaça e conseqüentemente houve mais investimento em tecnologia e pesquisa para melhorar a qualidade do produto [35].

Existem dois processos para a destilação da cachaça: *i)* em batelada, realizado em alambiques de cobre (métodos artesanais); *ii)* por destilação contínua, em colunas de aço inoxidável (produção de cachaça industrial) [36].

A cachaça pode ser do tipo Adoçada (contém açúcares superior a 6gL^{-1}), Envelhecida (armazenada em barris de madeira a mais de 1 ano), “Premium” (contém 100% da cachaça é armazenada em barris de madeira durante um

período mínimo de 1 ano) ou “Extra Premium” (contém 100% da cachaça é armazenada em barris de madeira durante um período mínimo de 3 ano) [37].

1.2.1.1.2. Vodca

A vodca é originária da Europa Ocidental com graduação alcoólica de 36% a 54% em volume, a 20°C, é obtida de destilado alcoólico simples de origem agrícola retificado (trigo, aveia, cevada, etc) seguido ou não de filtração por meio de carvão ativo, como forma de atenuar os caracteres organolépticos da matéria-prima original [3, 35].

1.2.1.1.3. Rum

Rum é a bebida destilada mais antiga, historicamente os países caribenhos foram os principais produtores. Atualmente é fabricada mundialmente na Alemanha, França, Reino Unido e Austrália [37]. Com graduação alcoólica de 35 a 54% em volume, a 20 °C, o rum é obtido do destilado alcoólico simples de melação, ou da mistura dos destilados de caldo de cana-de-açúcar e de melação, envelhecidos total ou parcialmente, em recipiente de madeira, conservando suas características peculiares [3,35].

O rum pode ser rum leve, quando o coeficiente de congêneres (soma dos componentes voláteis "não álcool" ou componentes secundários "não álcool", ou impurezas voláteis "não álcool" [37]), da bebida for inferior a 200mg/100mL em álcool anidro; Pesado, quando o coeficiente de congêneres da bebida for entre 200mg/100mL a 500mg/100mL em álcool anidro, obtido exclusivamente do melação, ou; Envelhecido se a bebida for envelhecida, em sua totalidade, por período mínimo de dois anos [3,35].

1.2.2. Controle da qualidade das bebidas alcoólicas

O controle da qualidade é a verificação se o produto fabricado está de acordo com a legislação vigente do país onde o mesmo será comercializado. O controle de qualidade sobre o produto é realizado desde a produção, padronização, classificação, registro, inspeção, fiscalização, exportação, importação, circulação e comercialização [3].

No Brasil, o Ministério da Agricultura é responsável pelo registro e fiscalização de bebidas alcoólicas e não alcoólicas. O controle de qualidade na elaboração e industrialização desses produtos tem por meta atestar que estes não ofereçam riscos à saúde humana.

No caso de bebidas, os parâmetros que são controlados, bem como seus limites máximos está listado na **Tabela 1** [38]. Além dos compostos listados na **Tabela 1**, existem outras substâncias que também podem estar presentes nas bebidas alcoólicas e que ainda não são controladas pela legislação vigente [38]. Dentre esses contaminantes, os que vêm ganhando destaque em todo o mundo é a classe dos hidrocarbonetos poliaromáticos [38].

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) formam um grupo de compostos orgânicos com dois ou mais anéis aromáticos condensados (**Figura 5**), são conhecidos por exibirem intensa fluorescência devido à estrutura rígida. Podem ter uma variedade de substituintes como alquila, nitro e grupos amino na sua estrutura. São lipofílicos e têm pouca solubilidade em água [9-11, 39-42].

Tabela 1 - Parâmetros e limites permitidos para as bebidas alcoólicas, conforme a instrução normativa nº 13, de 29 de junho de 2005.

Substâncias	Limite máximo
Coeficiente de congêneres	200 – 650mg/100mL
Acidez volátil	≤ 150mg/100mL
Acetaldeído	≤ 30mg/100mL
Acetato de etila	≤ 200mg/100mL
Furfural	≤ 5mg/100mL
Total de álcoois superiores	≤ 360mg/100mL
Açúcares	≤ 6g/L/100mL
Contaminantes orgânicos	
Metanol	≤ 50mg/100mL
Diacetil	≤ 2mg/100mL
Acroleína	≤ 1mg/100mL
Carbanato de etila	≤ 150µg/L
Contaminantes inorgânicos	
Cobre	≤ 5mg/L
Chumbo	≤ 200µg/L
Arsênio	≤ 100µg/L

Fonte: [37]

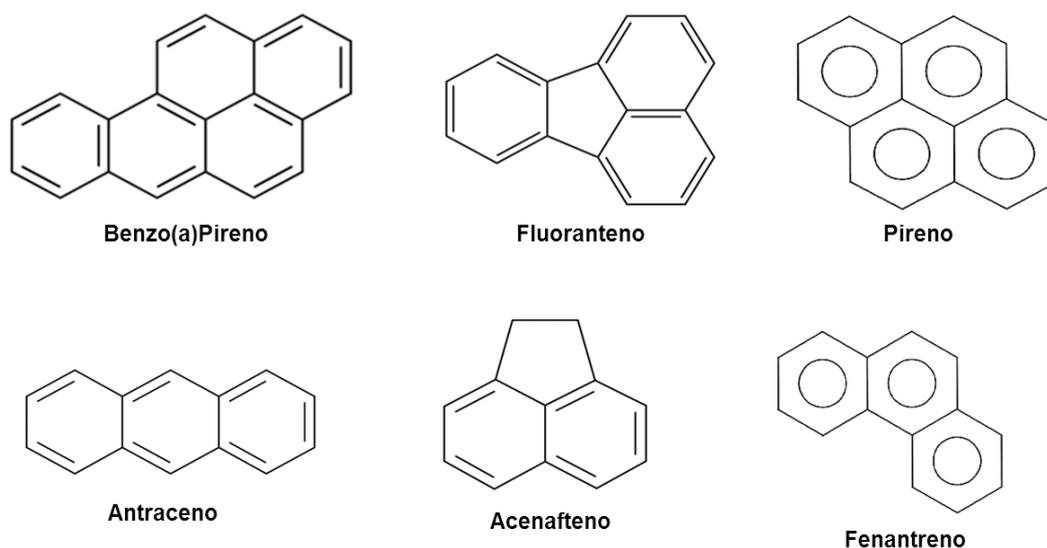


Figure 5 - Formula estrutural de alguns HPA's.

Alguns são capazes de reagir, após transformações metabólicas, com o ADN (ácido desoxirribonucleico), tornando-se carcinogênicos e potenciais mutagênicos. As propriedades físico-químicas dos HAP's são, em geral, determinadas por seus sistemas de duplas conjugadas, que variam com o número de anéis [39,43].

Os HPA's são produtos dos processos pirolíticos, especialmente, a combustão incompleta de materiais orgânicos durante as atividades industriais e humanas, a exemplo da pirólise de madeira para produção de carvão, operações de transporte e refinação do petróleo, incineração de resíduos domésticos e industriais, queimas de matéria orgânica de campos e florestas, geração de energia via queima de combustíveis fósseis, pirólise de querosene para a formação de benzeno, tolueno e outros solventes orgânicos, emissão de motores de veículos (particularmente a diesel), fumo do tabaco, incêndios e etc [39-43]. No caso das plantações de cana de açúcar, a queima antes da colheita produz os HPA's que podem chegar aos seus produtos industrializados, dentre estes produtos estão às bebidas alcoólicas destiladas (rum e cachaça). No caso dos grãos e cereais a contaminação é durante o cultivo, principalmente por meio da água e deposição atmosférica.

Por serem lipofílicos, são rapidamente absorvidos por todas as vias de exposição (inalação, exposição oral e dérmica). A absorção por inalação varia com o grau de contaminação atmosférica na qual a pessoa está inserida. A absorção oral se dá através dos alimentos que são contaminados com HPA's por meio do cozimento, deposição atmosférica sobre grãos, vegetais e frutas. E a absorção dérmica é um importante meio de exposição em algumas atividades industriais [39-41].

Os HPA's podem causar ao ser humano problemas respiratório, gastrointestinal, geniturinário, hematológico, dermatológico, imunológico, reprodutivo, efeitos cardiovasculares, processo inflamatório e carcinogenicidade [39].

Existem dezenas de HPA's, porém o Comitê Conjunto de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA), que é administrado conjuntamente pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO/ONU) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), indicou apenas treze HPA's como contaminantes cancerígenos: benzo(a)antraceno (BaA), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(j)fluoranteno (BjF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BaP), criseno (CHR), DiBenzo(a, h)antraceno (DBahA), DiBenzo(a, e)pireno (DBaeP), di-hidro-benzo(a, h)pireno (DBahP), dibenzo(a, i)pireno (DBaiP), dibenzo(a, l)pireno (DBalP), indeno (1,2,3-c, d)pireno (IP), e 5-metilcriseno (MC) [9, 16, 39].

A remoção dos HPA's no ambiente pode ser realizada por meio de processos físicos, químicos e biológicos [44-48]. Os processos físicos, como a volatilização e adsorção, reduz a presença dos HPA's, mas, devido a incapacidade de degradar esses contaminantes não resolvem o problema da poluição. Nessa perspectiva, os processos de degradação biológicas e químicas são preferidos [45,46]. Porém, o caráter tóxico e a baixa solubilidade em água, faz com que os sistemas biológicos apresentem limitações quanto a remoção dos HPA's [47]. Entre as técnicas químicas, destacam-se a fotólise direta [46]; a oxidação por meio de ozonização [45,46] e cloração [45,46]; e o que vem sendo mais explorado nos últimos anos são os processos oxidativos avançados (POA's), que utilizam o oxidante radical hidroxilo (OH°), que é

capaz de reagir com quase todos os tipos de compostos orgânicos, e levam a mineralização total ou a formação de intermediários mais biodegradáveis [48].

Levando-se em consideração que a presença dos HPA's, através das ações antrópicas, é cada vez maior no meio em que vivemos. Devido ao avanço tecnológico, a tendência é que, em breve, o controle e fiscalização desses e de outros compostos sejam inseridos nas legislações ambientais e sanitárias [39].

No contexto de determinação de HPA's em amostras de bebidas destiladas, os métodos mais usados são HPLC-DAD, HPLC-FLU e CG-EM, que apesar de demonstrarem-se eficientes, o tempo gasto, os altos custos e a geração de resíduos são aspectos negativos para análises de rotina. Na **Tabela 2**, são mostrados os principais trabalhos envolvendo determinação de HPA's em amostras de bebidas destiladas.

Todas as metodologias propostas fazem uso de cromatografia com total separação dos analitos e concomitantes presentes na amostra, tornando o processo ainda mais lento por requerer etapas prévias de preparos de amostras. Uma fragilidade dos métodos previamente discutidos na literatura (**Tabela 2**) é o fato de não estarem aptos a contornar presença de interferentes que por casualidade possa surgir em uma dada amostra. Neste caso uma revalidação do método seria necessária.

Tabela 2 - Metodologias analíticas para determinação de HPA's em amostras de bebidas destiladas.

Pré Tratamento	Instrumentação	HPA's	LOD	Amostra	Recuperação	RSD	Tempo de análise	REF.
SPE	CG-EM	BaP; FE; NA; P; CHR; BeP; AC; F; FL; BbF; BkF; DBahA; BghiP; IP	-	Cachaça	-	-	-	49
SPE	HPLC-FLU	NA; AC; FI; FE; AN; P; BaA; CHR; BeP; BbF; BkF; BaP; DBaA; BgP; I	-	Aguardente	-	-	-	50
SPME	CG-EM	NA; AC; ACF; F FE; A; FL; P; BaA; CHY; BbF; BkF; BaP; IcdP; DBaA; BgP	0,01 mgL ⁻¹ a 0,08 mgL ⁻¹ e 0,02 mgL ⁻¹ a 0,22 mgL ⁻¹	Cachaça	74 ± 12% e 95 ± 7%	-	30-60 min	51
LLE	HPLC-FLU	BaA; BbF; BkF; BaP. DBaP	0,006 a 0,090 µgL ⁻¹	Cachaça	70 - 96,7%	0,07 - 1,94	26-38 min	52
SPE	HPLC-FLU	NA; AC; F; PA; AN; FL; P; BaA; CH; BbF; BkF; BaP; DBahA; BghiP; IP.	1,08x10 ⁻³ a 6,95x10 ⁻³ µgL ⁻¹ e 1,12x10 ⁻¹ a 9,30x10 ⁻¹ µgL ⁻¹	Aguardente	89,8 - 99,4%	0,56 - 9,22	0 – 42 min	53
LLE e HPLC-DAD	CG-DIC	BaP; AN; FL; P; CHY; BaA; DMBaA; BkF; BeP; PE; BgP; BbC;	-	Conhaque	-	-	0 – 40 min	54

Alternativamente aos métodos cromatográficos, os métodos espectrométricos como exemplo a fluorescência, do ponto de vista analítico apresenta vantagens como alta sensibilidade, baixos limites de detecção; alta seletividade (espécies com luminescência nativa não são tão comuns), simplicidade instrumental, baixo custo de análise e manutenção e possibilidade de evitar tratamento prévio das amostras [55- 58].

1.2.3. Técnicas Espectroquímicas

As técnicas espectroscópicas são baseados na interação entre a radiação eletromagnética e a matéria [55,59]. A radiação eletromagnética pode ser descrita como uma onda, apresentando propriedades características como frequência, velocidade, amplitude, comprimento de onda e energia. Porém, o modelo ondulatório não explica todos os fenômenos de interação da radiação eletromagnética com a matéria, que resulta na absorção e emissão da energia radiante. Portanto, a radiação eletromagnética também pode ser descrita como partícula ou pacotes discretos chamados fótons [55, 57, 59].

Na **Figura 6** estão mostradas as principais divisões do espectro eletromagnético.

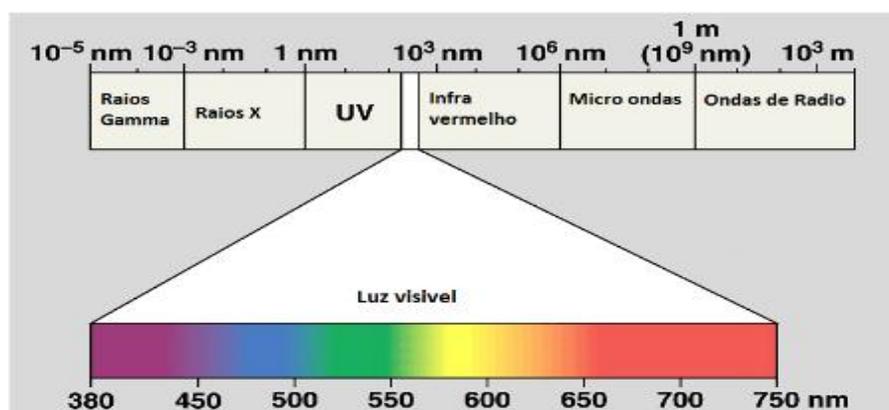


Figura 6 - Espectro eletromagnético [58].

A absorção é o fenômeno de atenuação da intensidade da radiação eletromagnética incidente e a lei que explica este fenômeno é conhecido como lei de Lambert-Beer. Essa lei relaciona a absorvidade molar com a concentração e o caminho óptico que a radiação percorre [55, 59].

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

↑
 absorvidade molar

↓
 concentração

↗ absorbância ↖ caminho óptico

Figura 7. Lei de Beer [58].

A fração da luz incidente que foi transmitida é chamada de transmitância (T). A porção da luz incidente que foi absorvida é a absorbância (A) e está relacionada com a transmitância de forma logarítmica [45, 56, 59, 60]. É possível observar que a absorbância tem uma relação linear com a concentração, entretanto, existem algumas situações onde esta linearidade não é obedecida, como por exemplo: altas concentrações, formação de agregados e presença de espécies absorvedoras (Princípio de Frank Condon) [56].

Além da absorção, outras interações que podem acontecer entre a radiação e a matéria é a emissão e a refração. Ao absorver energia, a espécie é excitada para um nível mais energético e em seguida libera o excesso de energia em forma de radiação eletromagnética ou calor (emissão). Os métodos espectrométricos baseados na emissão são: fluorescência e fosforescência [55- 61].

1.2.3.1. Espectrometria de Fluorescência Molecular

Toda a molécula, a temperatura ambiente, encontra-se em seu estado fundamental (nível eletrônico de mais baixa energia). Ao receber uma radiação com energia que corresponda à diferença entre os níveis eletrônicos, o elétron é excitado (ocupa um nível de maior energia). Em seguida, a molécula sofre um processo de desativação (o elétron libera energia e volta ao estado fundamental). O diagrama de Jablonski (**Figura 7**) representa os processos de excitação e desativação molecular [55- 57, 59].

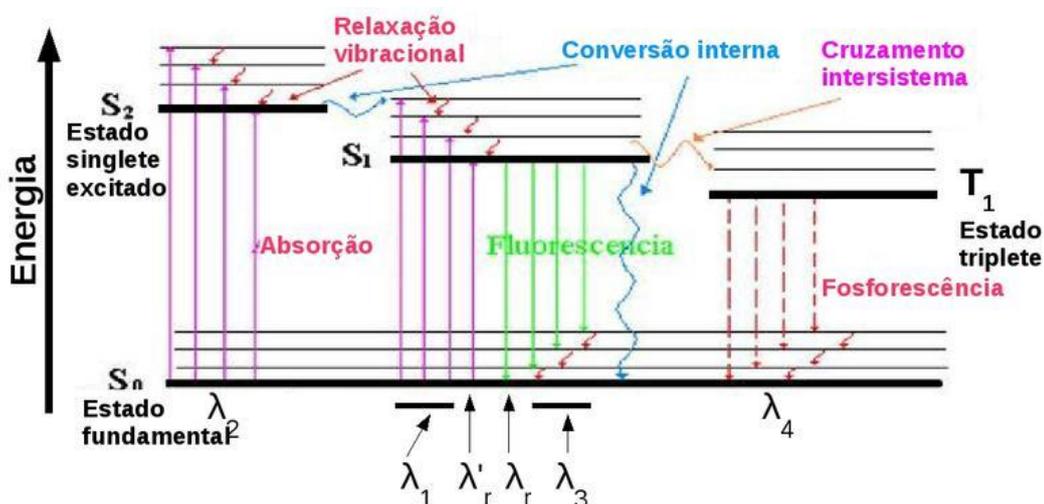


Figura 8 - Diagrama de Jablonski. Adaptado de [56]

Após absorver um fóton de luz, o elétron rapidamente libera o excesso de energia e volta para o nível vibracional fundamental do estado excitado (processo não radiativo). A partir daí, o elétron pode retornar para o estado fundamental emitindo luz (fluorescência) [55- 57, 59].

O diagrama de Jablonski mostra mais dois fenômenos (cruzamento intersistema e fosforescência). O cruzamento intersistema é um processo não radiativo que ocorre quando a molécula em estado excitado troca seu spin total (S) de zero (0) para um (1) e conseqüentemente, sai do estado singlete ($M_s =$

1) para o estado tripleto ($M_s = 3$). A fosforescência é um processo radiativo que emite luz ao decair do estado tripleto para o estado fundamental, em um comprimento de onda maior (menor energia) do que o observado para a fluorescência. Além disso, o tempo envolvido nos fenômenos fosforescentes são maiores que os observados para fluorescência [61,62].

Esses processos competem com a fluorescência e conseqüentemente contribuem para a perda de energia do estado excitado. Logo, a fração que representa a emissão por fluorescência é dada pelo rendimento quântico, Φ_F , [56, 57] como indicado na **Eq. 1**.

$$\Phi_F = \frac{K_F}{K_F + K_{IC} + K_{IS} + K_{q[Q]}} \quad (1)$$

Onde: K_F é a constante de velocidade da relaxação por fluorescência; K_{IC} constante de velocidade de conversão interna; K_{IS} constante de velocidade do cruzamento intersistema e $K_{q[Q]}$ constante de velocidade da supressão de vários tipos, ou seja, o rendimento quântico nada mais é do que a razão entre os fótons emitidos e os fótons absorvidos [55].

Ainda, analisando o diagrama de Jablonski, percebe-se que a fluorescência geralmente é observada a partir do nível vibracional mais baixo do estado eletrônico excitado mais baixo (S_1) para qualquer um dos níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental (S_0). Conseqüentemente, a energia da emissão é menor do que a energia de absorção [55-57, 59, 63]. Essa característica acontece devido à conversão interna e a relaxação vibracional que são fenômenos que ocorrem muito rápido (10^{-12} s). E por esse mesmo motivo, o

espectro de emissão é geralmente o mesmo, independentemente do comprimento de onda de excitação [55-57, 59, 63].

Características como aromaticidade e rigidez estrutural são importantes fatores para que o composto apresente um maior rendimento quântico. Outros fatores que aumentam o rendimento quântico de fluorescência é a diminuição da temperatura e aumento da viscosidade. Quanto maior a temperatura e quanto menos viscosa for à amostra, mais colisões ocorrem e conseqüentemente o risco de relaxação colisional aumenta, acarretando em uma diminuição do rendimento quântico de fluorescência [55, 56, 59].

1.2.3.1.1. Instrumentação

Os componentes básicos dos instrumentos que medem a fluorescência molecular são: lâmpada, filtros ou monocromadores, fendas, cubeta e detector [56].

A lâmpada é a fonte de luz que fornece a energia para excitar o composto de interesse. As lâmpadas mais comuns nos instrumentos são de xenônio e de mercúrio. Fontes de luz como lasers e LEDs também são usados, mas estas emitem radiação em comprimentos de onda mais específicos [55-57, 60- 63].

Os filtros são usados para filtrar os comprimentos de onda que não é absorvido pelo composto em análise (no caso da excitação). No caso da emissão, para filtrar, principalmente, a luz difusa, no caso dos espalhamentos Rayleigh e Raman [57].

Os monocromadores decompõem a luz policromática nos diferentes comprimentos de onda, através da grade de difração. Dessa forma, os

comprimentos de onda de excitação são selecionados pelo monocromador de excitação e a radiação emitida é analisada no monocromador de emissão, chegando ao detector também de forma selecionada [61, 64, 65].

As fendas são usadas para controlar a quantidade de luminescência que passa para excitar a amostra e que chega ao detector [61, 64].

A cubeta contém a amostra de interesse. E deve ser confeccionada por um material que permita a passagem da radiação eletromagnética proveniente da fonte (sem atenuação) que será absorvida pela amostra em análise. As cubetas apropriadas são as de quartzo [61].

O detector é um tubo fotomultiplicador, ou seja, um dispositivo eletrônico que converte os fótons emitidos pela amostra em elétrons, gerando uma corrente elétrica que é medida e proporcional a concentração do analito [56].

No fluorímetro, os comprimentos de onda de excitação e emissão são fixos e selecionados através de filtros ópticos. Para diferentes moléculas, a maioria dos fluorímetros permite que o usuário mude mecanicamente os filtros que correspondam aos comprimentos de onda adequados [60, 64, 65]. Com base na complexidade e versatilidade dos instrumentos, estes podem ser do tipo fluorímetro (**Figura 9**) e espectrofluorímetro (**Figura 10**).

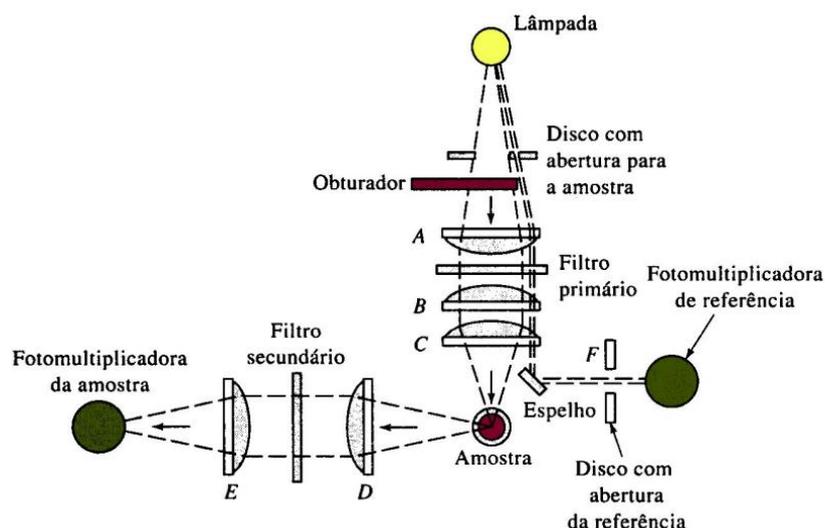


Figura 9 - Esquema de um fluorímetro [65].

De forma resumida, o funcionamento de um fluorímetro começa com fonte de luz incidindo a radiação no intervalo de comprimento de onda de excitação do composto a ser medido (designado previamente pelo analista). A luz passa através de um filtro de excitação, que transmite comprimentos de onda específicos do espectro de excitação do composto e bloqueia outros comprimentos de onda. A luz excita a amostra, e a radiação emitida passa através do filtro de emissão com direção ao detector, e o rendimento quântico de fluorescência é apresentado no instrumento. Vale salientar que o filtro de emissão está posicionado em ângulo reto (90°) com relação à radiação de excitação. Esse posicionamento tem como objetivo minimizar a dispersão da luz. Esses equipamentos são simples, de baixo custo de aquisição e operação, de fácil manuseio, o que os torna interessantes para medidas de rotina [60, 64, 65].

Os espectrofluorímetros utilizam monocromadores de excitação e emissão, que possibilitam uma ampla variedade e dinâmica de comprimentos de onda (200 a 1000 nm). Alguns têm duplo feixe de excitação e emissão para

aumentar a sensibilidade e reduzir interferências da luz difusa e a resolução das medidas é obtida através de fendas que podem ser selecionadas. A vantagem dos espectrofluorímetros é que os monocromadores separam com muito mais precisão os comprimentos de onda; a desvantagem é que possuem custos de aquisição superior quando comparados aos fluorímetros [56, 63].

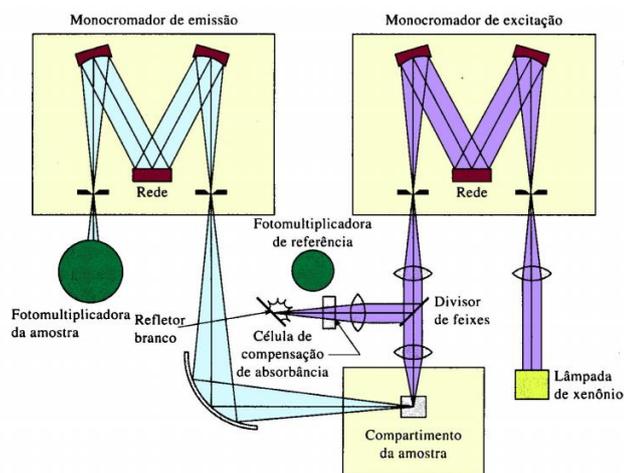


Figura 10 - Esquema de um espectrofluorímetro [65].

O funcionamento básico do espectrofluorímetro pode ser descrito da seguinte forma: a radiação proveniente da fonte incide sobre a superfície do monocromador de excitação, que decompõe a luz em seus respectivos comprimentos de onda. A seguir passa pela fenda, devidamente ajustada pela analista de acordo com a característica da amostra e analito em estudos. A amostra é, então, excitada e emite a sua radiação fluorescente característica que chega ao monocromador de emissão e segue para o detector [56].

É possível observar que, tanto no fluorímetro quanto no espectrofluorímetro, há um divisor de feixe e um fotomultiplicador de referência. O objetivo destas peças é corrigir alterações na intensidade da lâmpada e funcionam da seguinte maneira: o divisor de feixe reflete cerca de 4% da luz

incidente para uma célula de referência, que contém um fluoróforo de referência estável, onde a intensidade da solução padrão é proporcional à intensidade da luz incidente. Dessa forma, o resultado obtido no detector de referência vai compensar qualquer alteração que possa surgir na medida do sinal analítico [56].

1.2.3.1.2. Fluorescência do tipo excitação e emissão (EEM) em 3D

As medidas de fluorescência em um espectrofluorímetro podem ser: espectro de excitação (fixa-se um comprimento de onda de emissão e varre-se uma faixa de comprimento de onda de excitação); espectro de emissão (fixa-se um comprimento de onda de excitação e varre-se uma faixa de comprimento de onda de emissão); fluorescência do tipo excitação e emissão (varredura em uma faixa de comprimentos de onda de emissão a partir de uma série de comprimentos de onda de excitação, gerando uma matriz de excitação e emissão (EEM) que representa um espectro detalhado das propriedades de fluorescência da amostra) [57, 66, 67]. As medidas de EEM geram dados em três dimensões, intensidade dada em ciclos por segundos (cps) x excitação (nm) x emissão (nm). Na **Figura 11** é mostrado um exemplo de uma superfície excitação-emissão.

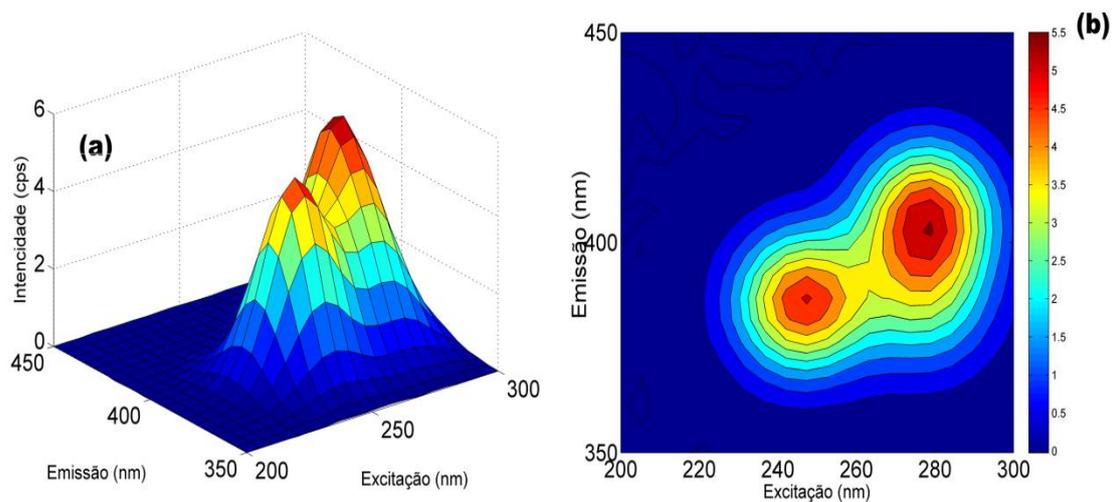


Figura 11 - Superfície típica EE gráfico em 3D (a) e em superfície de contorno (b).

As EEMs apresentam dados muito complexos devido à carga de informação que é gerada por intermédio desse tipo de medida. Contudo apresenta certos inconvenientes, que são as dispersões Rayleigh (espalhamento elástico, comprimento de onda da radiação incidente é igual ao comprimento de onda da radiação espalhada, ou seja, não há perda de energia) e Raman (espalhamento inelástico, comprimento de onda da radiação incidente é menor que o comprimento de onda da radiação espalhada, ou seja, há uma pequena perda de energia) [57, 66, 67].

Durante o fenômeno da fluorescência, uma parte da energia incidente pode ser captada e convertida em energia vibracional e rotacional que irá resultar em uma energia espalhada menor do que a incidente [67-69]. Essas dispersões afetam o tratamento dos dados espectrais e sua influência precisa ser reduzida ou na melhor das hipóteses eliminada. Na **Figura 12** está mostrado o perfil desses espalhamentos presentes nas EEMs.

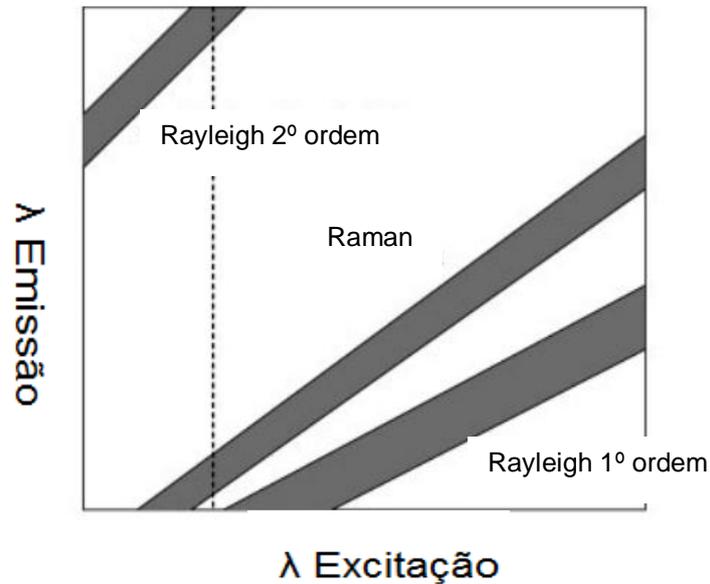


Figura 12 - Espalhamentos Rayleigh e Raman na EEM [69].

Como a quantidade de energia captada é sempre constante, as bandas de dispersão aparecem com a mesma frequência, independentemente do comprimento de onda da luz de excitação [57, 66, 67].

1.2.4. Quimiometria

Quimiometria é a ciência que objetiva encontrar as condições otimizadas para realização de um processo e extrair o máximo de informação útil dos dados coletados durante a execução do mesmo empregando ferramentas matemáticas e/ou estatísticas [68]. Pode ser dividida em planejamento experimental, reconhecimento de padrão e calibração multivariada [18].

Planejamento experimental é uma série de procedimentos utilizados principalmente para otimizar condições experimentais, com um número reduzido de ensaios. Existem dois tipos de planejamento, o sequencial e o simultâneo. O sequencial é baseado na realização de um experimento por vez;

O simultâneo é baseado na realização de uma série de experiências na sequência de um plano pré-estabelecido [69].

Reconhecimento de padrões é uma técnica quimiométrica que explora os resultados obtidos através das análises químicas, buscando semelhanças na composição química das amostras [70]. Os métodos de Reconhecimento de padrão podem ser supervisionados (as classes são conhecidas e definidas previamente pelo analista) e não supervisionados (as classes são determinadas através da dissimilaridade entre as amostras (operação matemática), visto que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração) [18, 71].

Em calibração multivariada modelos matemáticos correlacionam propriedades ou concentração de espécies químicas de um conjunto de amostras com múltiplos sinais registrados no instrumento [18, 72]. Com os modelos construídos é possível prever as propriedades, como por exemplo, a concentração dos analito em amostras desconhecidas [73].

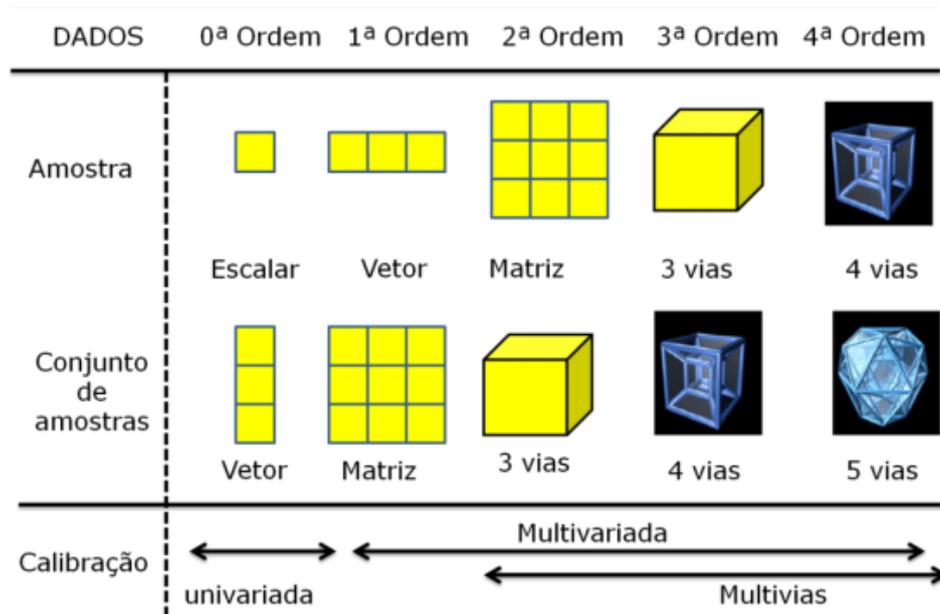
1.2.4.1. Calibração em Química Analítica

A calibração pode ser de dois tipos: calibração univariada e calibração multivariada (**Tabela 3**). Na calibração univariada uma única resposta instrumental é relacionada com a propriedade de interesse. Na calibração multivariada, um conjunto de respostas instrumentais é relacionado com uma ou várias propriedades (que podem ser ou não a concentração dos analitos) das amostras [18, 73, 74].

Devido às limitações que existem na calibração univariada (total seletividade do sensor e ausência de interferentes), a calibração multivariada

foi ganhando espaço. As principais vantagens dessa técnica são a capacidade de determinar mais de um analito no mesmo ensaio e permitir a quantificação do analito na presença de algum(s) interferente(s) [18, 72, 73].

Tabela 3 - Representação esquemática dos tipos de dados/calibração.



Fonte: [18]

Dentro da calibração multivariada, existe a calibração multivias, que emprega dados obtidos em pelo menos dois arranjos de sensores. Conjuntos de dados desta natureza podem ser obtidos através de técnicas como a espectroscopia de fluorescência do tipo emissão e excitação e, cromatografia líquida, por exemplo. A principal vantagem dessa calibração é a chamada “vantagem de segunda ordem”, a qual permite que o analito possa ser quantificado mesmo na presença de interferentes não modelados. Existem vários algoritmos para calibração multivias descritos na literatura, sendo dois dos mais difundidos a análise de fatores paralelos (PARAFAC) e o método dos mínimos quadrados parciais aplicados a dados desdobrados com etapa pós calibração de bilinearização residual (U-PLS/RBL) [18, 38, 58, 75, 76].

1.2.4.1.1. Métodos de Calibração Multivias

Os primeiros dados com estrutura multivias surgiram nos anos 60 na psicometria (uma subárea da psicologia). No início do século XX, onde o positivismo estava no auge e com ele a valorização da experimentação e dos resultados quantitativos, os psicometristas aplicavam questionários a um determinado número de pessoas e queriam com isso, extrair informações necessárias para definir um padrão de comportamento humano [75].

Dentre os psicometristas da época, Ledyard Tucker, se destacou com o desenvolvimento de métodos para tratar dados multivias, que mais tarde foram denominados, métodos de Tucker1, Tucker2 e Tucker3 [18, 75].

1.2.4.1.1.1. Métodos de Tucker

O Tucker1 consiste em desdobrar um tensor de dados ($I \times J \times K$) em uma matriz bidimensional ($I \times JK$) e em seguida são empregados métodos de decomposição bilinear como análise de componentes principais, por exemplo [75]. A representação esquemática do desdobramento do Tucker1 está representada na **Figura 13**.

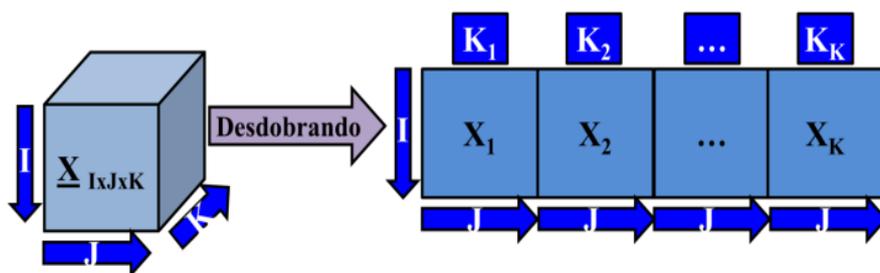


Figura 13 - Esquema para o desdobramento no método de Tucker 1 [18].

Assumindo que o tensor \underline{X} ($I \times J \times K$) corresponde a um conjunto de I EEM's, a dimensão I é referente às amostras, a dimensão J está relacionada aos

espectros de excitação e a dimensão K aos espectros de emissão. Desdobrando o tensor $\underline{\mathbf{X}}$ em uma matriz \mathbf{X} ($I \times JK$) a dimensão I (linhas) refere-se às amostras e a dimensão JK (colunas) correspondem aos espectros de emissão medido em K comprimentos de onda registrados em J comprimentos de onda de excitação [18, 75-77].

Com os dados devidamente desdobrados o método de decomposição bilinear é empregado, mas por não considerar a estrutura multivias dos dados, o método Tucker1 leva a resultados complexos e de difícil interpretação [75-77]. O método Tucker2 é um caso particular do Tucker3, onde um dos modos é fixo durante a decomposição dos dados [77]. No método Tucker3, a modelagem dos dados é feita considerando o caráter multivias dos dados (Eq.2) [77].

$$\underline{\mathbf{X}} = \mathbf{A}\mathbf{G}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T + \underline{\mathbf{E}} \quad (2)$$

Onde, \mathbf{A} ($I \times D$), \mathbf{B} ($J \times E$) e \mathbf{C} ($K \times F$) são os pesos relativos de cada dimensão e são ortogonais entre si; $\underline{\mathbf{G}}$ ($D \times E \times F$) é um tensor que indica como cada dimensão interage individualmente, sendo desdobrado na matriz \mathbf{G} ($D \times E \times F$); \otimes é o operador de Kronecker e $\underline{\mathbf{E}}$ é o tensor dos resíduos; D , E e F indica a quantidade de fatores em cada dimensão e podem assumir valores diferentes ($D \neq E \neq F$) [18, 75-77]. Na **Figura 14** está representada a decomposição no método do Tucker3.

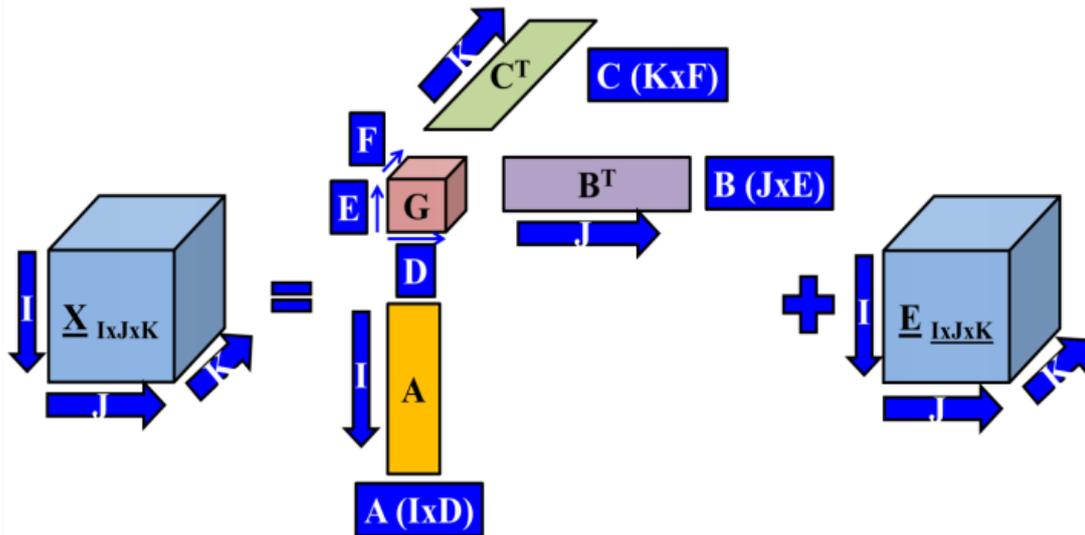


Figura 14 - Esquema do método de Tucker 3 [18].

1.2.4.1.2. Análise de fatores paralelos

A análise de fatores paralelos (parallel factor analysis) modela os dados multivias de forma similar ao Tucker3, com diferença de que o número de fatores referente às dimensões têm que ser iguais. O PARAFAC pode ser visto como generalização de PCA, com a diferença que possui uma matriz de scores e duas matrizes de pesos. A **Eq. 3** representa como os scores e os pesos são estimados no PARAFAC [75, 78, 79].

$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad (3)$$

Onde n é o número de fatores, e_{ijk} refere-se aos resíduos, a está associado ao modo concentração e b e c são os pesos relativos aos modos instrumentais. O modelo PARAFAC também pode ser representado da seguinte forma (**Eq. 4**) [80]:

$$\underline{\mathbf{X}} = \underline{\mathbf{A}}(\underline{\mathbf{C}} \otimes \underline{\mathbf{B}})^T + \underline{\mathbf{E}} \quad (4)$$

Nota-se que a **Eq. 4** é muito parecida com a **Eq. 2** (Tucker3), a diferença é que o tensor **G** não é usado, pois no PARAFAC ele é considerado uma hiperidentidade. Na **Figura 15** está mostrado o esquema de decomposição dos dados pelo PARAFAC [78-81].

A obtenção das matrizes **A**, **B** e **C** é baseada no método ALS (do inglês, “*alternating least squares*”), no qual partindo de estimativas iniciais de duas das três matrizes estima-se a terceira. O método de decomposição trilinear direta (DTLD) pode ser usado para se obter estimativas iniciais, ou também podem ser empregados como estimativas iniciais valores randômicos [82, 83]. O método ALS é iterativo e otimiza de forma alternada **A**, **B** e **C** guiado pela minimização dos resíduos até atingir o critério de convergência ou um número limite de iteração. Na **Figura 16** é apresentado um fluxograma do método ALS [82, 83].

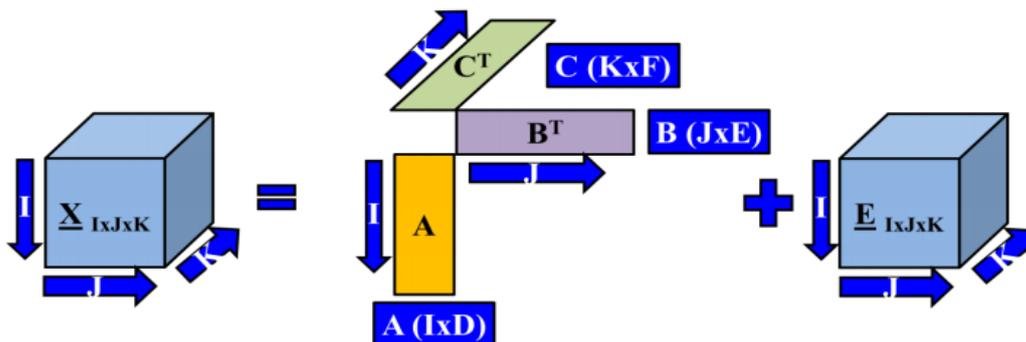


Figura 15 - Esquema do método PARAFAC [18].

As etapas de 3 a 5 são repetidas até a convergência do algoritmo, devido à repetição de algumas etapas que estimam os *loadings* e os *scores*, acrescido do fato de que as matrizes de dados multivias são complexas. O cálculo de convergência geralmente é demorado e para diminuir o esforço computacional

a dimensionalidade dos dados pode ser reduzida empregando PCA, que também permite a diminuição de colinearidade entre os dados [82-85].

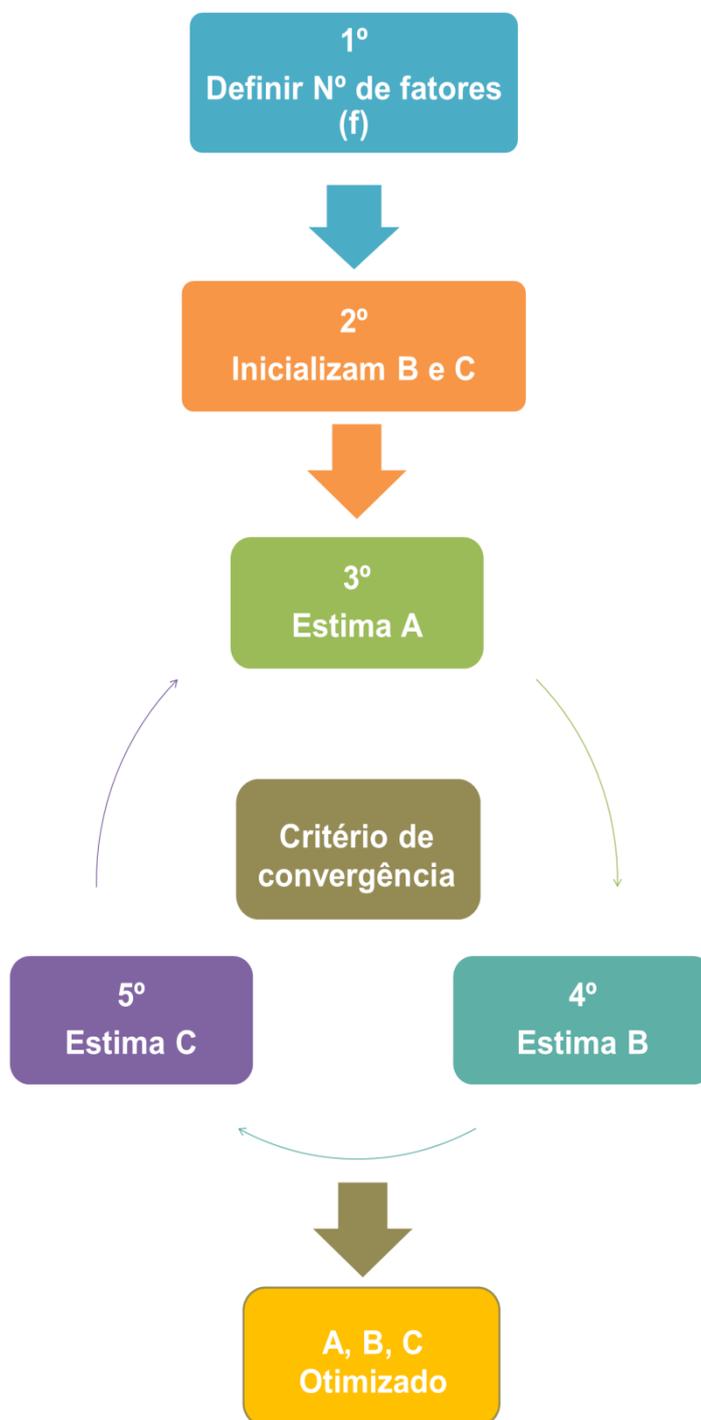


Figura 16 - Etapas para o funcionamento do ALS.

Devido à restrição do PARAFAC de que o número de fatores tem que ser obrigatoriamente iguais para todas as dimensões, o modelo PARAFAC possui menos graus de liberdade do que o método Tucker3 e, conseqüentemente, é menos flexível. Por outro lado, não é preciso o uso de muitas amostras para a modelagem e uma solução única (unicidade) é alcançada. Conseqüentemente permite que o método estime os perfis puros nos dois modos instrumentais (*vantagem de segunda ordem*) em caso de dados trilineares [78-81].

Entretanto, para que todas essas vantagens sejam alcançadas, a escolha do número de fatores é uma etapa importante da modelagem. Essa escolha pode ser feita através do conhecimento químico do sistema ou através do valor de teste de consistência de core (CONCORDIA, do inglês “*core consistency diagnostic*”). O valor de CONCORDIA é obtido conforme mostrado na **Eq. 5**. Aplica-se o método de Tucker 3 na matriz que foi reconstruída pelo PARAFAC para se obter a matriz conectora (**G**) [86].

$$\text{CONCORDIA} = 100 * \left[1 - \frac{\sum_d^f \sum_l^f \sum_h^f (\mathbf{G}_{\text{Tucker}} - \mathbf{I})^2}{\sum_d^f \sum_l^f \sum_h^f \mathbf{q}_{dlh}^2} \right] \quad (5)$$

Os valores $\mathbf{G}_{\text{Tucker}}$ são obtidos pelo ajuste Tucker3 aos pesos do modelo PARAFAC e \mathbf{q}_{dlh} são elementos de uma hiperidentidade perfeita. Idealmente, espera-se um valor de CONCORDIA de 100%, mas acima de 50% pode-se considerar que os dados possuem características trilineares [86].

Uma peculiaridade da implementação do método PARAFAC é a possibilidade do uso de restrição nas etapas de otimização do ALS. As restrições são propriedades naturais dos dados e ajudam o algoritmo chegar à convergência e obter uma solução matemática que corresponde à “*solução*”

química”, ou seja, os pesos obtidos nas matrizes **B** e **C** correspondem a perfis espectrais puros por exemplo. As restrições mais usuais são não negatividade (não existe absorvância negativa, portanto essa restrição exclui qualquer valor negativo referente à absorvância) e unimodalidade (utilizada para analito que apresentam o perfil com um único máximo, como por exemplo cromatogramas) [86].

1.2.4.1.3. U-PLS/RBL

O U-PLS é uma extensão do PLS aplicado em dados multivias desdobrados, similar ao que foi mostrado no método de Tucker1 [87]. A modelagem U-PLS é idêntica ao método PLS-1, em que inicialmente estima-se o número de variáveis latentes (A) para o conjunto de validação geralmente por meio de validação cruzada. Na sequência estima-se os parâmetros (matriz pesos **P** e **W** e o vetor coeficientes de regressão **v**) do modelo PLS para A variáveis latentes [88]. Na sequência, o modelo é usado para prever y_u (concentração) em uma amostra desconhecida (\mathbf{X}_u) com indicado na **Eq. 6** [87-89].

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \quad (6)$$

Onde \mathbf{t}_u são os escores da amostra \mathbf{X}_u . No entanto quando algum constituinte não modelado encontra-se na amostra \mathbf{X}_u , os escores \mathbf{t}_u não são eficazes para uma predição apropriada de y_u . Como o método U-PLS não porta vantagem de segunda ordem, é preciso que após a calibração seja realizada uma etapa conhecida como Bilinearização Residual (RBL) na matriz de resíduos (\mathbf{E}_u , veja **Eq. 7**) da amostra \mathbf{X}_u . [90].

$$\mathbf{E}_u = \mathbf{X}_u - \mathbf{P} \cdot \mathbf{t}_u \quad (7)$$

O procedimento RBL consiste em decompor a matriz \mathbf{E}_u em seus autovetores e valores singulares via SVD (singular value decomposition) como indicado na **Eq. 8**.

$$\mathbf{S}_{int} = \mathbf{B}_{int} \mathbf{G}_{int} (\mathbf{C}_{int})^T = \text{svd}(\mathbf{E}_u) \quad (8)$$

Onde o produto $\mathbf{B}_{int} \mathbf{G}_{int} (\mathbf{C}_{int})^T$ corresponde ao perfil dos interferentes e é denominado de \mathbf{S}_{int} . $\mathbf{B}_{int} \mathbf{G}_{int} (\mathbf{C}_{int})^T$ é uma matriz truncada para N_i fatores, onde N_i corresponde idealmente ao número de constituintes não modelados presentes em \mathbf{X}_u . Mantendo fixa a matriz de pesos (\mathbf{P}) obtida na etapa de calibração, a informação contida em $\mathbf{B}_{int} \mathbf{G}_{int} (\mathbf{C}_{int})^T$ é usada para encontrar um valor de \mathbf{t}_u apropriado para prever \mathbf{X}_u . A busca por um valor adequado de \mathbf{t}_u é conduzida minimizando \mathbf{E}_u empregando um ajuste não linear do tipo Gauss-Newton, como indicado na **Eq. 9** [87-89]. Caso o resíduo (\mathbf{E}_p) obtido para M fatores RBL não esteja em concordância com o resíduo instrumental, estimado para o conjunto de calibração, o procedimento RBL deve ser conduzido para $M + 1$ fatores [88].

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + \text{vec}[\mathbf{B}_{int} \mathbf{G}_{int} (\mathbf{C}_{int})^T] + \mathbf{E}_p \quad (9)$$



Objetivos

2. Objetivos

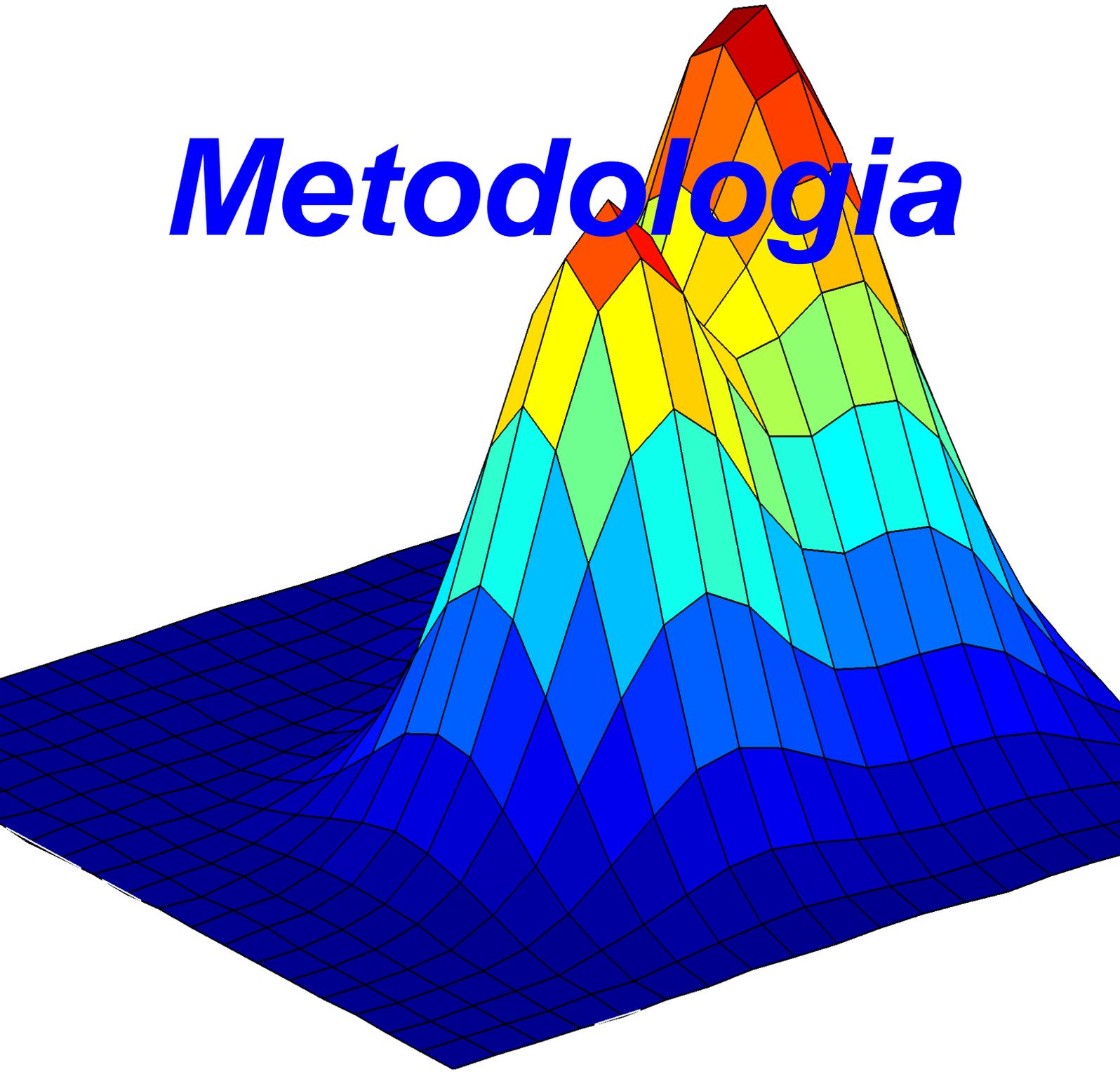
2.1. Objetivo geral

Construir modelos analíticos utilizando a espectrometria de fluorescência molecular 3D e calibração de segunda ordem para quantificação rápida de cinco hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (antraceno, pireno, fluoranteno, benzo(a)pireno e o acenaftreno), em bebidas destiladas (rum, vodca e cachaça).

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o comportamento fluorescente dos compostos HPA's.
- ✓ Avaliar a necessidade de correção das EEM devido à presença de efeitos de espalhamento da radiação eletromagnética.
- ✓ Construir modelos de calibração individual para cada analítico empregando soluções padrão e posterior modelagem dos dados com algoritmos de calibração de segunda ordem.
- ✓ Validar os modelos de calibração frente a um conjunto de amostras de validação com a presença de constituintes não calibrados, para explorar a vantagem de segunda ordem.
- ✓ Aplicar os modelos validados na predição dos HPA's em amostras de rum, vodca e cachaça.

Metodologia



3. METODOLOGIA

3.1. Reagentes

Padrões de alta pureza dos analito acenafteno (99%), benzo(a)pireno (96%), fluoranteno (98%), antraceno (99%), pireno (98%) e fenantreno (98%), foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. Os solventes utilizados foram Acetonitrila, adquirida da Tedia e etanol a 45%, além de água deionizada foi utilizada em todos os casos. O número CAS de cada um dos compostos utilizados no trabalho encontram-se no Apêndice A.

Um estudo de solubilidade foi feito e a partir deste, as soluções dos padrões (**estoques 1**) foram preparadas em acetonitrila, sendo: acenafteno e fenantreno a 3000 mgL^{-1} ; pireno e fluoranteno a 2000 mgL^{-1} ; benzo(a)pireno a 1200 mgL^{-1} e antraceno a 800 mgL^{-1} . Os estoques 1, foram armazenados em frasco âmbar com batoque e mantidos no freezer a -20°C .

A partir desses estoques 1, foram preparados **estoques 2** por diluição volumétrica usando etanol 45% como solvente no qual: acenafteno, fluoranteno e antraceno estavam a 20 mgL^{-1} e, pireno e benzo(a)pireno a 10 mgL^{-1} . Em seguida, as soluções de calibração foram preparadas por diluição volumétrica usando etanol 45%, a partir do estoque 2 de cada analito.

3.2. Conjunto de calibração

Conjuntos de calibração composto de padrões puros para cada analito em dez níveis de concentração, em triplicatas, foram registrados conforme condições instrumentais descritas na seção 3.4. Na **Tabela 4** é apresentada a faixa de concentração para cada analito. A faixa de concentração modelada

para cada analito foi determinada com base em um estudo prévio de linearidade do sinal com a concentração, de forma que não saturasse o detector. Também foi levado em consideração que, para as misturas de validação, o sinal total não deve saturar o detector.

Tabela 4 - Faixas de concentrações para o conjunto de calibração.

Analito	Faixa de concentração (ngmL⁻¹)	Incremento (ngmL⁻¹)
Acenafteno	90 – 1x10 ³	100
Antraceno	30 – 300	30
Benzo(a)Pireno	10 – 100	10
Fluoranteno	50 – 1x10 ³	100
Pireno	10 – 100	10

3.3. Conjunto de validação

O conjunto de validação foi constituído de 25 misturas de seis HPA's (acenafteno, fenantreno, pireno, fluoranteno, benzo(a)pireno e antraceno) segundo um planejamento Taguchi. O planejamento (**Tabela 5**) foi realizado com cinco níveis (concentrações) e seis fatores (HPA's).

Tabela 5 - Níveis e fatores usados para o planejamento Taguchi.

Fatores/Níveis	-2	-1	0	1	2
P	25	40	55	70	85
NA	75	120	165	210	255
BaP	25	40	55	70	85
AC	240	390	540	690	840
FL	200	350	500	650	800
FE	200	400	600	800	1.000

Cada um dos analitos foi calibrado com padrões puros e, no conjunto de validação estão presentes, além do analito, outros cinco HPA's que atuam como constituintes não modelados. Tendo em vista que esse cenário invalidaria qualquer metodologia analítica tradicional, as misturas de validação foram usadas para avaliar o conjunto de calibração explorando a vantagem de segunda ordem. Na **Tabela 6** é mostrada a composição de cada mistura de validação.

Tabela 6 - Misturas do conjunto de validação preparadas pelo planejamento Taguchi, valores expressos em ngmL⁻¹.

Misturas	P	AN	BaP	AC	FL	FE
1	25	75	25	240	200	200
2	25	120	40	390	350	400
3	25	165	55	540	500	600
4	25	210	70	690	650	800
5	25	255	85	840	800	1000
6	40	75	40	540	650	1000
7	40	120	55	690	800	200
8	40	165	70	840	200	400
9	40	210	85	240	350	600
10	40	255	25	390	500	800
11	55	75	55	840	350	800
12	55	120	70	240	500	1000
13	55	165	85	390	650	200
14	55	210	25	540	800	400
15	55	255	40	690	200	600
16	70	75	70	390	800	600
17	70	120	85	540	200	800
18	70	165	25	690	350	1000
19	70	210	40	840	500	200
20	70	255	55	240	650	400
21	85	75	85	690	500	400
22	85	120	25	840	650	600
23	85	165	40	240	800	800
24	85	210	55	390	200	1000
25	85	255	70	540	350	200

Embora as misturas de validação sejam compostas por seis HPA's apenas cinco foram quantificados. O fenantreno não compõe o grupo das espécies químicas consideradas analito neste trabalho, foi adicionado apenas com intuito de aumentar a complexidade das misturas de validação.

3.4. Registro das EEM

As EEM foram registradas em um espectrofluorímetro Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon Inc.) (**Figura 17**), equipado com um monocromador grade-única

para excitação e um monocromador grade-única para emissão; lâmpada de xenônio de 450 W e fotomultiplicador para detecção.

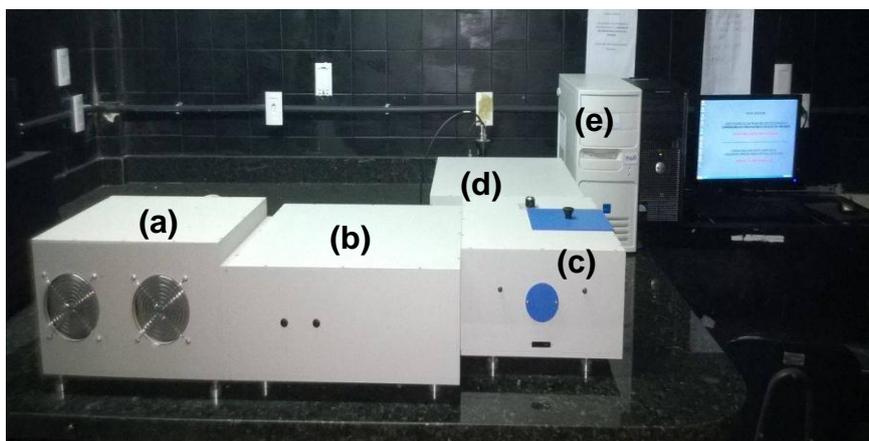


Figura 17 – Fotografia do espectrofluorímetro Fluorolog-3 (Horiba), instalado no laboratório de Espectroscopia Molecular do departamento de Química/UFPB/CCEN. **(a)** Fonte de radiação; **(b)** Monocromador de excitação; **(c)** Compartimento da amostra; **(d)** Monocromador de emissão; **(e)** Detector.

As larguras das fendas foram fixadas em 3 nm para excitação e 2 nm para emissão. O tempo de integração do fotomultiplicador foi 0,05 s. As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo com dimensões de 1 x 0,2 x 3,5cm e capacidade para 500 μ L de volume (**Figura 18**).

As variações relacionadas à intensidade da radiação emitida pela lâmpada foram corrigidas usando o detector no modo sinal corrigido (S1c). As EEM foram registradas na faixa espectral de 240 a 420 nm de excitação e a emissão foi de 315 a 589 nm ambas com resolução de 2 nm.



Figura 18 - Fotografia da cubeta de quartzo empregada no registro das EEM, com capacidade de 500 μ L.

3.5. Amostras de bebidas destiladas

Uma amostra de cada bebida destilada (rum, vodca e cachaça) foi adquirida no comércio local (João Pessoa – PB), e analisadas sob as mesmas condições instrumentais descritas para os padrões de calibração e amostras de validação. O único tratamento prévio das amostras foi uma filtração usando acetato de celulose de 0,22 μm para remover possíveis partículas sólidas em suspensão. As amostras de bebidas alcoólicas foram fortificadas em três níveis a fim de avaliar a exatidão do método proposto, empregando adição e recuperação como indicado na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Níveis de fortificação das amostras de bebidas destiladas, valores expressos em ngmL^{-1} .

Níveis	P	NA	BaP	AC	FL
Amostra	-	-	-	-	-
Amostra + 1	25	75	25	390	200
Amostra + 2	55	165	55	540	500
Amostra + 3	85	255	85	840	800

3.6. Software e análise de dados

Todos os cálculos relativo aos modelos PARAFAC e U-PLS/RBL foram realizados no MatLab[®] usando a interface gráfica MVC2 (**Figura 19**) implementada por Olivieri e coautores e está disponível no endereço: www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar. Na **tabela 8**, estão mostrados os parâmetros para a construção dos modelos PARAFAC e U-PLS/RBL.

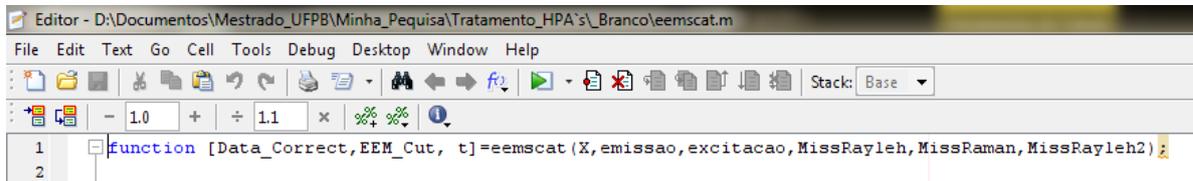


Figura 19. Imagem da interface MVC2 (a); no modelo PARAFAC (b); no modelo U-PLS/RBL (c).

Tabela 8. Parâmetros usados para construir os modelos PARAFAC e U-PLS/RBL na interface MVC2.

Parâmetros da interface MVC2			
Sensor data	Dimensão dos dados	Uncertainty in signals	Excluir amostra com sinal ruim
Selected sensores	Selecionar parte dos dados	Uncertainty in	Indicar em qual modo vai ocorrer a exclusão do sinal
Data type	Tipo de dados	Mean center	Centrar na média
Sample	Plotar amostra	Constraint in A, B e C	Restrições nos modos A, B e C
Calibration signals	Conjunto de calibração	Inicialization	Inicialização para o ALS
Test signals	Conjunto de validação ou predição	Calibratio	Número de fatores
Compone	Número de componentes (fatores)	RBL	Número de etapas de RBL
Cal. Samples excluded	Excluir amostra de calibração		

A rotina (**Figura 20**) empregada para correção de espalhamento foi implementada por Bro e está disponível em http://www.models.life.ku.dk/go?filename=flumod_ver1.0_2005Feb.zip.



The image shows a screenshot of a MATLAB editor window. The title bar reads 'Editor - D:\Documentos\Mestrado_UFPB\Minha_Pequisa\Tratamento_HPA's_Branco\eemscat.m'. The menu bar includes 'File', 'Edit', 'Text', 'Go', 'Cell', 'Tools', 'Debug', 'Desktop', 'Window', and 'Help'. The toolbar contains various icons for file operations and editing. The main editing area shows a function definition starting with 'function [Data_Correct, EEM_Cut, t]=eemscat(X,emissao,excitacao, MissRayleh, MissRaman, MissRayleh2);'. The line numbers 1 and 2 are visible on the left side of the editor.

Figura 20. Função referente à rotina para remover os espalhamentos.

Onde:

X= Conjunto de dados que serão usados para remoção dos espalhamentos;

Emissão = A faixa de comprimentos de onda de emissão estudados;

Excitação = A faixa de comprimentos de onda de excitação estudados;

MissRayleh = Número de comprimentos de onda que serão removidos no espalhamento Rayleigh de 1^o ordem, para posterior interpolação;

MissRaman = Número de comprimentos de onda que serão removidos no espalhamento Raman, para posterior interpolação;

MissRayleh2 = Número de comprimentos de onda que serão removidos no espalhamento Rayleigh de 2^o ordem, para posterior interpolação.

Resultados e Discussão



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Considerações gerais

Na **Figura 21** são apresentados os espectros puros (excitação **Figura 21a** e emissão **Figura 21b**) dos seis HPA's dissolvidos em etanol/água 45% em volume. É possível observar os máximos característicos de cada composto na excitação e na emissão e que, embora estejam fortemente sobrepostos, os espectros apresentam diferenças nos perfis, o que é uma característica favorável para desenvolvimento de modelos de calibração de segunda ordem, uma vez que as matrizes EEM certamente não apresentaram deficiência de posto.

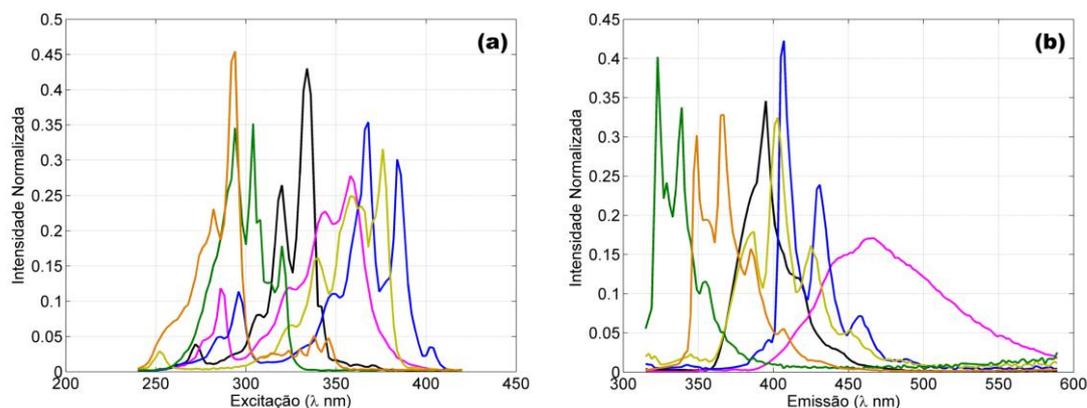


Figura 21 - Espectros puros dos HPA's excitação (a) e emissão (b) AN (—), AC (—), FL (—), BaP (—), P (—) e FE (—).

Um inconveniente intrínseco a dados instrumentais do tipo EEM é a presença de espalhamentos Rayleigh e Raman e que, idealmente deve ser devidamente tratado antes de qualquer modelagem, uma vez que esses são sinais não bilineares e afetam drasticamente a qualidade de um modelo de calibração.

Na **Figura 22a** é apresentada uma EEM para uma mistura dos seis HPA's em que se observa que os espalhamentos Rayleigh de primeira e segunda ordem estão sobrepostos ao sinal dos analitos. Embora menos visível devido à sua baixa intensidade quando comparado à fluorescência dos HPA's também estão presentes espalhamentos Raman.

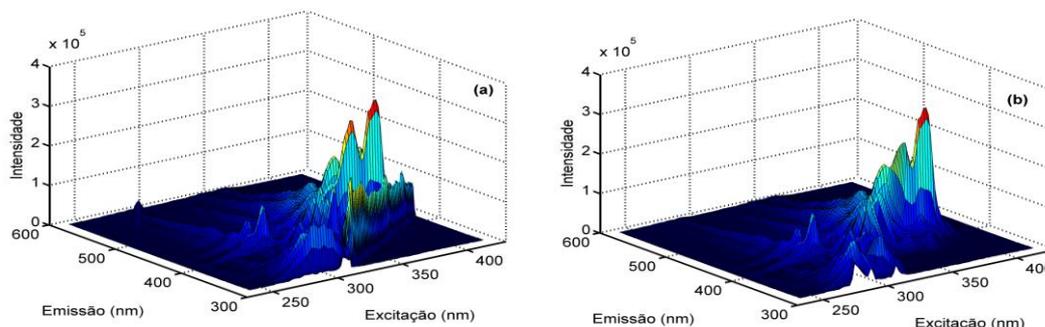


Figura 22 - EEM da mistura dos seis HPA's em (a) com espalhamento e em (b) após correção do espalhamento (mistura 12 da Tabela 6).

Na **Figura 23**, está mostrada a medida do branco, onde é possível observar nitidamente como estão dispostos os espalhamentos Rayleigh de 1^o e 2^o ordem, bem como o Raman nas superfícies das EEM.

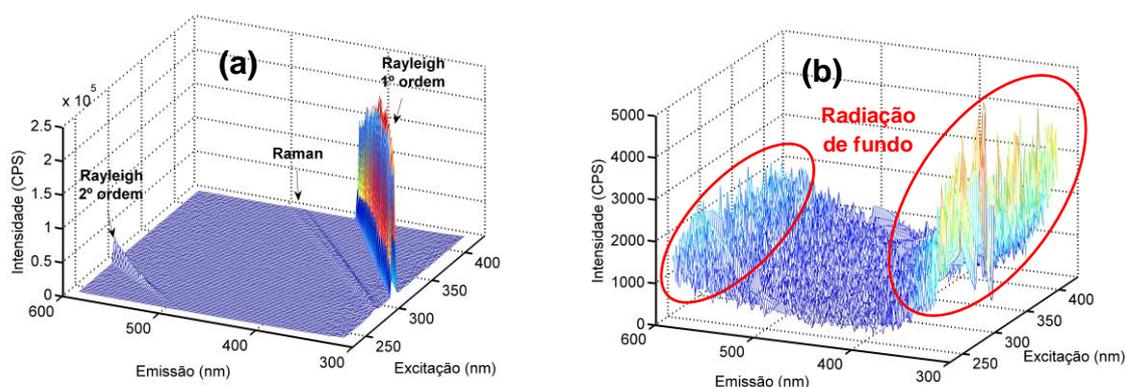


Figura 23. Medida do branco. Com espalhamentos (a); sem espalhamentos (b).

Ao analisar a **Figura 23a**, nota-se que o espalhamento Raman apresenta uma intensidade baixíssima se comparado aos espalhamentos Rayleigh (1^o e

2º ordem), isso é devido a baixa energia associada a este espalhamento. Mas é importante ressaltar que, mesmo com intensidade baixa, o espalhamento Raman afeta negativamente o sinal dos analitos que absorvem na região. A **Figura 23b** mostra a superfície EEM do branco sem a presença dos espalhamentos, onde observa-se que há a presença de radiação de fundo, nas regiões de 315 a 380 e 550 a 598 nm de emissão.

Portanto, para contornar este inconveniente foi aplicado um procedimento de remoção e interpolação do sinal na região afetada pelos espalhamentos, conforme sugerido por Bro e colaboradores [91]. Na **Figura 22b**, é apresentada a mesma EEM após correção dos espalhamentos e é possível observar por inspeção visual, que o sinal de fluorescência está menos susceptível aos efeitos dos espalhamentos Raman e Rayleigh.

4.1.1. Calibração/ validação

O conjunto de calibração é composto de dez amostras de padrões puros em triplicata e foram arranjados em um tensor com dimensões 30x138x91.

O conjunto de validação é composto de vinte e cinco misturas segundo um planejamento Taguchi (veja **Tabela 6**). As EEMs para cada ensaio foram registradas em triplicata, de modo que os dados de validação consistem de um tensor 75x138x91. Na **Figura 24** é ilustrada a superfície excitação emissão típica para as amostras do conjunto de validação.

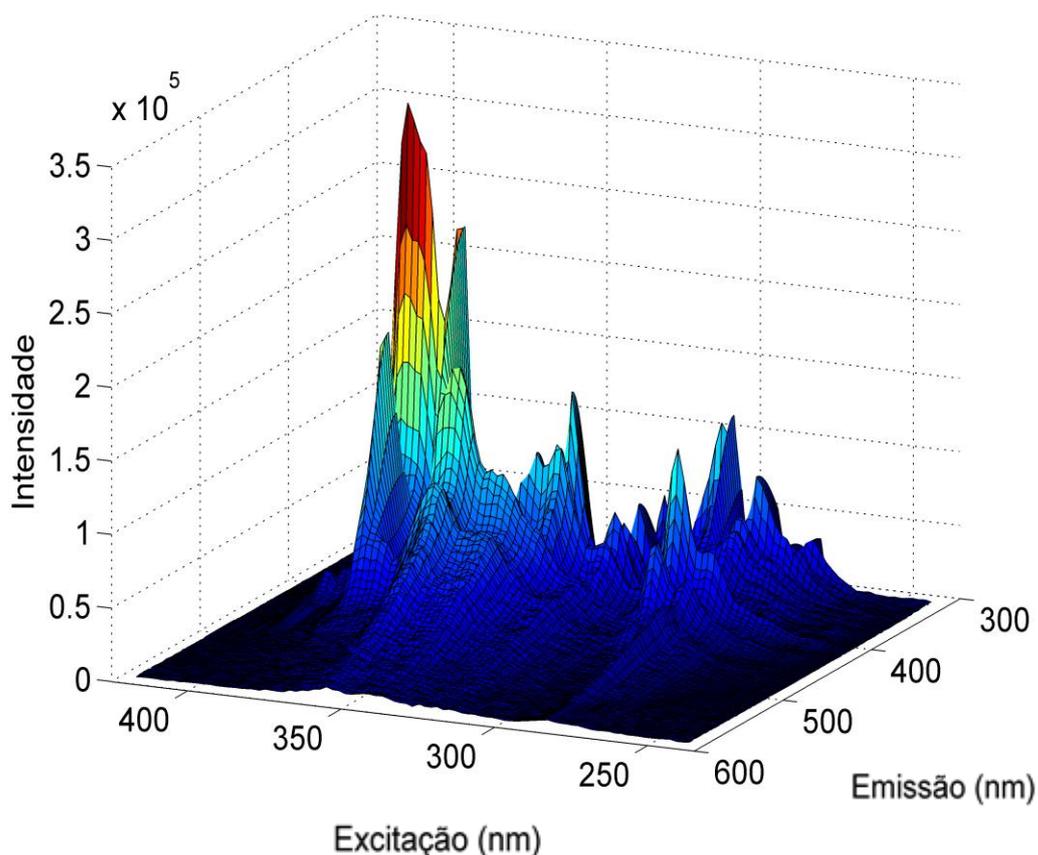


Figura 24 - Superfície típica EEM das amostras de validação (mistura 1 da Tabela 6).

As amostras de validação foram justapostas ($\underline{X}_{val}/\underline{X}_{analito_{cal}}$) às amostras de calibração para cada analito, para a obtenção de cinco tensores com dimensões $105 \times 138 \times 91$.

4.2. Modelo PARAFAC

4.2.1. Calibração

Para modelar os dados empregando o PARAFAC, para cada analito foi determinado o número de fatores apropriado, levando-se em consideração o conhecimento químico do sistema (número de substâncias presentes nas amostras de calibração), o valor de CORE em função do aumento do número de fatores e a inspeção dos perfis espectrais recuperados.

Aplicando PARAFAC apenas às amostras de calibração, em todos os casos foram obtidos valores de CORE igual ou superior a 98% para um único fator. Os perfis recuperados são concordantes com os perfis medidos, indicando um bom ajuste dos dados de calibração.

4.2.2. Validação

O tensor referente a cada analito foi submetido à decomposição PARAFAC, empregando a restrição de não negatividade, a fim de avaliar como varia o valor de CORE em função do número de fatores incluídos no modelo. O resultado está mostrado na **Figura 22**.

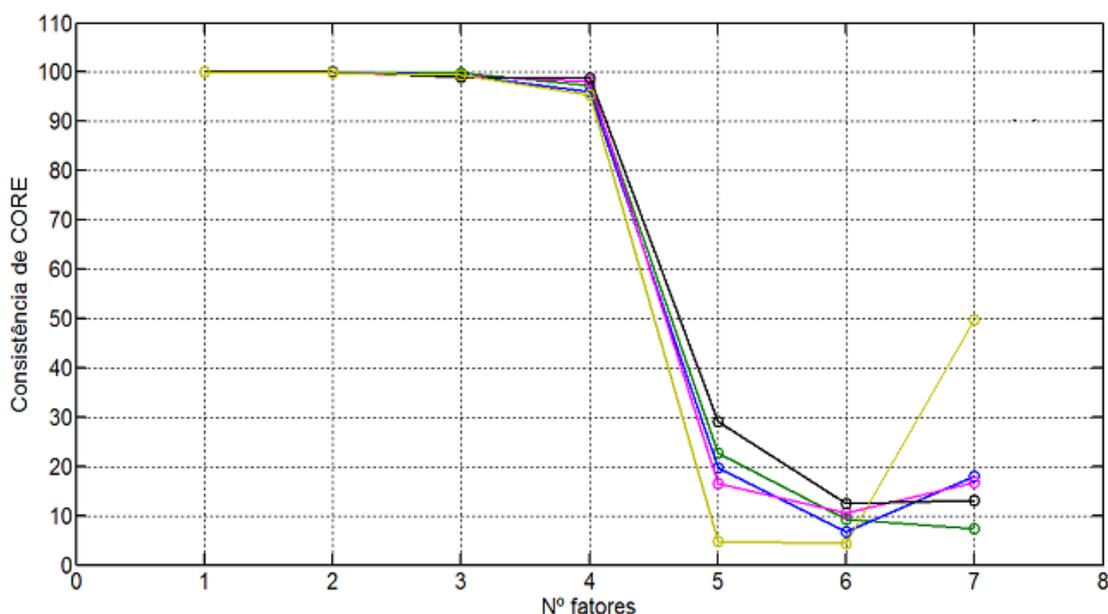


Figura 25 - Valores de CORE em função do número de fatores PARAFAC para AN (—), AC (—), FL (—), BaP (—) e P (—).

Com base na variação de CORE mostrada na **Figura 25**, é possível observar bons valores de CORE de um a quatro fatores para todos os casos. Contudo, a partir do quinto fator ocorre uma queda acentuada com valor máximo em torno de 30%, sugerindo baixa trilinearidade dos dados para cinco

fatores. Esse fato pode ser justificado ao ser aplicado a rotina de correção dos espalhamentos que pode ter retirado parte do sinal analítico. Contudo, as amostras de validação são constituídas por misturas de seis compostos químicos, portanto o número razoável de fatores seria seis, em que teríamos posto matemático igual ao posto químico.

Levando-se em consideração que o perfil de dois ou mais componentes pode ser recuperado em um único fator como combinação linear, ou que um fator adicional pode ser requerido para explicar a radiação de fundo (linha de base), foram avaliados de quatro a sete fatores para todos os analitos, sendo escolhida a quantidade de fatores que mostrou melhor recuperação do perfil do analito em cada caso.

Na **Tabela 9** está apresentado o resultado da predição das amostras de validação. Os resultados são expressos em termos de raiz do erro médio quadrático de validação (RMSEV), reprodutibilidade (REP), sensibilidade (SEN), sensibilidade analítica (γ^{-1}) e limite de detecção (LOD).

Tabela 9 - Resumo da predição para as amostras de validação para o modelo PARAFAC.

Analito	RMSEV ng mL ⁻¹	REP %	SEM	γ^{-1} ng mL ⁻¹	LOD ng mL ⁻¹
AC (5)*	46,24	8,55	3,9x10 ³	2,22	22
AN (7)*	7,56	4,58	9,4x10 ²	7,14	32
BaP (6)*	3,00	5,45	1,7x10 ⁴	0,42	3,2
FL (5)*	35,87	7,10	2,8x10 ³	2,86	27
P (5)*	16,82	30,57	2,0x10 ⁴	0,42	2,5

*Número de fatores PARAFAC usados.

Com base na **Tabela 9** podemos observar que a modelagem PARAFAC foi boa para todos os analito, com exceção do pireno, onde valores de REP aceitáveis ($\leq 9\%$) foram obtidos, como também altos valores de sensibilidade e baixos valores de LOD. Destacam-se os resultados obtidos para o AN e o BaP, com valores de REP muito próximos do ideal (5%).

A pobre modelagem relacionada ao pireno pode ser devido a perda de informação durante a correção do espalhamento Raman, afinal dentre todos os cinco analito, é justamente o pireno o mais afetado pelo Raman, como está mostrado nas **Figuras 22a e 22b** da **sessão 4.1**.

Apesar do AC e do FL estarem localizados na região que é menos afetada pelos espalhamentos, os valores de RMSEV de ambos foram altos, indicando que possivelmente houve variações entre as concentrações preditas e nominais. Essas variações podem ser justificadas devido à radiação de fundo (linha de base), fato que pode ser observado na **Figura 23b** da **sessão 4.1**. Entretanto, pode ser observado através das outras figuras de mérito disponíveis, que essas pequenas variações não afetam drasticamente a modelagem.

Como forma completar de avaliar o desempenho dos modelos PARAFAC, na **Figura 26** está apresentada a região elíptica de confiança conjunta (EJCR), obtida por regressão dos mínimos quadrados ordinários entre valor nominal e predito para cada analito.

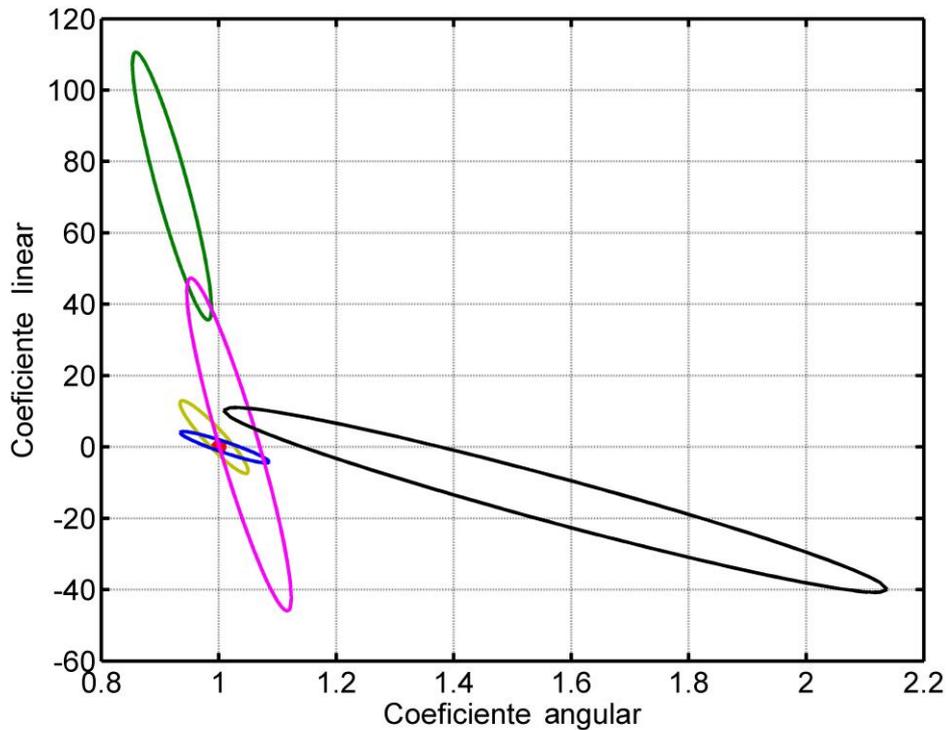


Figura 26 - EJC para o modelo PARAFAC AN (—), AC (—), FL (—), BaP (—) e P (—).

Em um modelo de calibração ideal, a reta ajustada entre valores nominais e preditos deve possuir como valor de coeficiente angular (um) e coeficiente linear (zero), ou seja, valor predito igual valor nominal. Contudo, em condições reais valores próximos de zero e um são obtidos. A região da elipse representa o intervalo de confiança obtido de forma conjunta para ambos os coeficientes, angular e linear. Se o modelo não estiver afetado por um *bias* significativo (a 95% de confiança) a EJC deve conter o ponto ideal (1,0). Por outro lado, a área da elipse é um indicativo da exatidão do modelo.

Neste caso, vemos que o modelo PARAFAC para o AC apresenta um *bias* significativo embora a respectiva EJC possua uma área pequena. Em outras palavras, significa dizer que o modelo faz boas previsões, contudo seus pequenos desvios entre predito e nominal são unidirecionais. Por outro lado, como já esperado, um *bias* significativo também foi observado para o modelo

PARAFAC aplicado aos dados do P, bem como a enorme área da EJCR reflete o pobre ajuste já indicado pelo valor de RMSEV (16,82) o que representa um REP de cerca de 30% para a faixa calibrada.

O desempenho da modelagem PARAFAC está relacionado à capacidade do modelo recuperar os perfis dos analitos de forma mais concordante possível. Portanto, na **Figura 27** são apresentados os perfis recuperados pelo PARAFAC para cada modelo de calibração. A linha colorida sólida representa o perfil registrado experimentalmente, a linha colorida pontilhada representa o perfil do analito recuperado, enquanto as demais linhas pontilhadas em cinza representam as outras contribuições recuperadas pelo PARAFAC em cada caso.

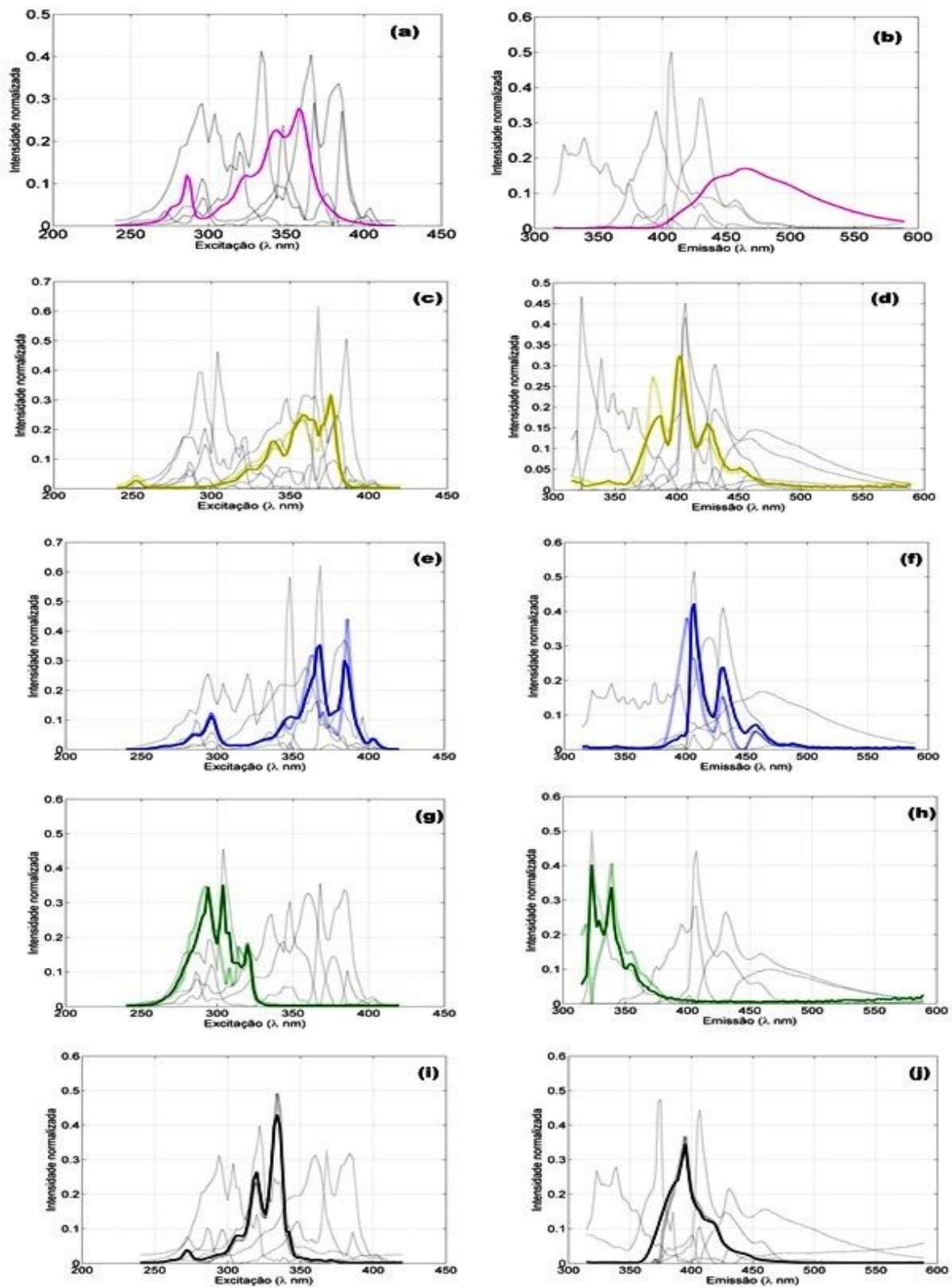


Figura 27 - Perfis recuperados pelo PARAFAC para cada conjunto de analito, (a/b) FL, (c/d) AN, (e/f) BaP, (g/h) AC e (i/j) P.

É possível observar uma semelhança entre perfil recuperado e perfil experimental, em especial para o caso do FL (**Figuras 27a e 27b**) com quase completa sobreposição dos dois perfis.

4.3. Modelo U-PLS/RBL

4.3.1. Calibração

Para modelagem U-PLS, o tensor $30 \times 138 \times 91$ (conjunto de calibração) inicialmente foi desdobrado originando uma matriz 30×12558 . Na sequência o número ótimo de fatores selecionado(s) para cada modelo/analito foi baseado no conhecimento químico do sistema, uma vez que as amostras de calibrações são padrões puros, uma única variável latente deve ser capaz de modelar adequadamente a relação entre a EEM e o vetor de concentração.

Embora a inspeção do gráfico de PRESS versus o número de fatores incluídos no modelo (**Figura 28**), para todos os casos, indique que deve ser usado um número maior de fatores, apenas um fator foi empregado.

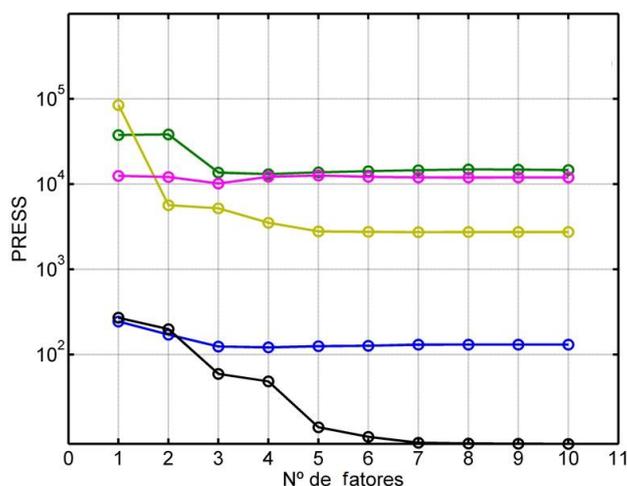


Figura 28 - Gráfico de PRESS versus número de fatores incluídos no modelo U-PLS obtido por validação cruzada para as amostras de calibração, sendo AN (—), AC (—), FL (—), BaP (—) e P (—).

Este número de fatores sempre superior a um pode ser explicado em função de algumas variações introduzidas nas EEM devido à remoção dos espalhamentos e também ao nível de ruído que afeta de forma mais acentuada os padrões de calibração de menor concentração.

Modelos para as quantidades de fatores sugeridos no gráfico da **Figura 28** foram avaliados e apresentaram fortes indícios de sobre ajuste.

4.3.2. Validação

Empregando apenas uma variável latente para modelar a relação entre sinal analítico (EEM) e concentração para as amostras de calibração e ajustando os escores das amostras de validação com uma etapa pós-calibração de bilinearização residual (RBL), as concentrações do conjunto de validação foram preditas.

Para acessar o número ótimo de fatores RBL, foi examinada a variação do ruído instrumental da amostra de validação (S_u) a cada fator RBL adicional, tendo como referência o valor de ruído instrumental estimado para o conjunto de calibração (S_{cal} amostras sem constituintes não modelados). Um gráfico típico da variação de S_u , para predição do FL na primeira amostra do conjunto de validação (**Tabela 6**), com a inclusão de fatores na etapa RBL é ilustrado na **Figura 29a**.

Pode ser observado na **Figura 29a** que para zero fator o desvio padrão residual da amostra de validação é muito superior ao resíduo obtido para a amostra do conjunto de calibração, o que indica para o analista que a amostra em questão apresenta constituintes não modelados.

A adição progressiva de fatores RBL modifica o valor de escores da amostra de validação de modo que o resíduo pós RBL sofre uma redução ate atingir

valores próximo ao resíduo de calibração (linha em azul). A partir do quinto fator adicionado observa-se uma estabilização do valor de S_u com aumento do número de fatores RBL, sugerindo que o valor ótimo é cinco fatores. Um aumento excessivo de fatores (mostrado neste caso em caráter ilustrativo) indica que o resíduo da amostra de validação torna-se menor que o resíduo de calibração, sugerindo que a etapa RBL está sobre ajustada.

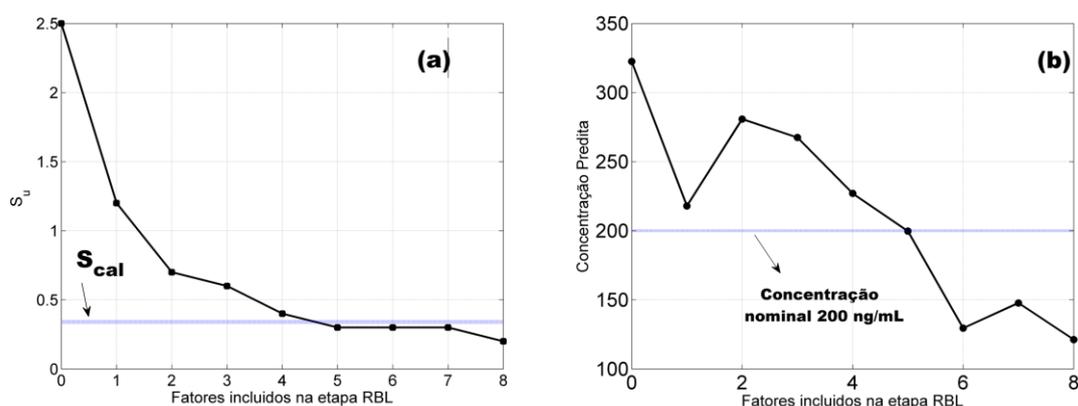


Figura 29 - Variação de S_u (a) e variação da concentração predita ambos com em função da inclusão de fatores RBL (b), a linha em azul representa o nível do ruído instrumental das amostras de calibração (fluoranteno).

De forma complementar, pode-se visualizar, na **Figura 29b**, como varia a concentração predita pelo modelo U-PLS com a inclusão de fatores na etapa RBL. Inicialmente, a concentração predita (linha preta) aparece com valores maiores que a concentração nominal (linha azul), quando o número adequado de fatores RBL é empregado (como indicado na **Figura 29a**), a concentração nominal (200 ngmL^{-1}) e concentração predita ($199,68 \text{ ngmL}^{-1}$) são extremamente concordantes entre si.

Contudo vale ressaltar que a informação contida na **Figura 29b** está disponível porque a amostra em questão compõe o conjunto de validação e sua concentração nominal é conhecida. Na predição de amostras

desconhecidas, o analista deve guiar-se apenas pela variação de \mathbf{S}_u em função dos fatores RBL (**Figura 29a**).

Com relação aos perfis dos constituintes não modelados, ao contrário do PARAFAC, os perfis de interferência recuperados pela RBL correspondem a pesos de combinações lineares ortogonais e normalizadas obtidas por decomposição em valores singulares (pesos de PCA). Por esta peculiaridade, são abstratos e não possuem uma relação direta com os perfis instrumentais reais. Contudo, o primeiro perfil recuperado pelo RBL guarda uma semelhança com perfil instrumental real, principalmente para sistemas simples que requerem um único fator RBL para alcançar a *vantagem de segunda ordem*.

Na **Figura 30** está mostrado o perfil dos cinco primeiros fatores RBL, nos modos excitação (**Figura 30a**) e emissão (**Figura 30b**), selecionados para estabilizar o resíduo \mathbf{S}_u da amostra de validação mostrada na **Figura 29**. Como discutido acima, o primeiro fator (linha em azul) apresenta grande semelhança com perfis espectrais de excitação e emissão. Contudo, os demais fatores mostram-se abstratos, inclusive contendo partes negativas.

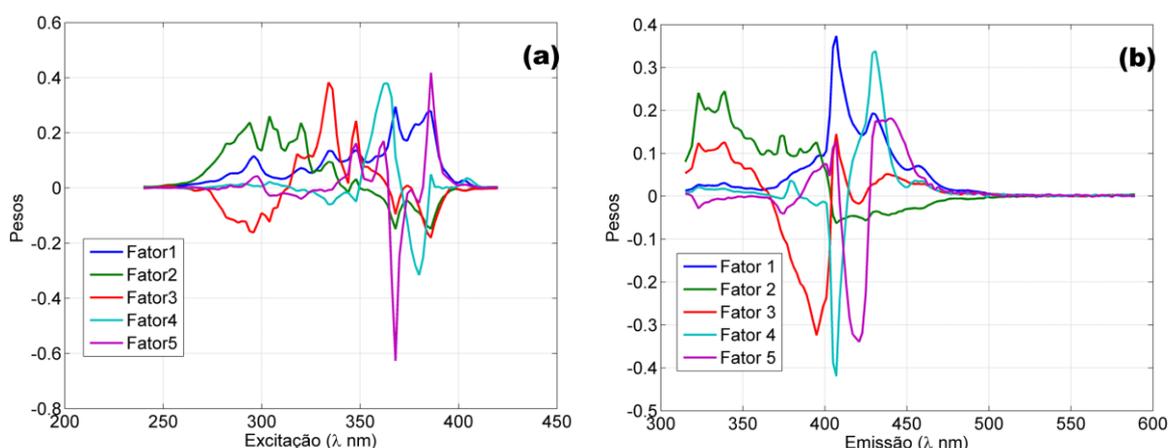


Figura 30 - Perfis típicos de interferentes recuperados pelo RBL (a) modo excitação (b) modo de emissão.

Seguindo o procedimento descrito acima para demais amostras de validação e analitos, em todos os casos a quantidade de fatores RBL variou entre quatro e seis, que representa um número em concordância com a composição do sistema químico. Na **Tabela 10** está apresentado um resumo da predição das amostras de validação obtida para o modelo U-PLS/RBL.

Tabela 10 - Resumo da predição das amostras de validação para o modelo U-PLS/RBL.

Analito*	REMSV (ngmL ⁻¹)	REP%	SEM	γ^{-1} (ngmL ⁻¹)	LOD (ngmL ⁻¹)
AC	49,17	9,09	3,11	$6,4 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-2}$
NA	9,52	5,57	1,83	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-2}$
BaP	5,04	9,16	4,52	$1,3 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-4}$
FL	8,82	1,75	1,82	$3,1 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-2}$
P	2,97	5,41	1,86	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$

*Para todos os casos uma única variável latente foi empregada.

Com base na **Tabela 10**, é possível observar que melhores resultados foram obtidos empregando a estrutura de variáveis latentes do PLS aos dados desdobrados e que a etapa RBL alcançou com sucesso a vantagem de segunda ordem. Valores de REP igual ou inferior a nove foram obtidos para todos os casos, inclusive para o P, que mostrou uma pobre modelagem com o PARAFAC. Melhores valores de sensibilidade analítica e LOD também foram obtidos quando comparados ao PARAFAC. Nota-se ainda que o RMSEV do AC na modelagem U-PLS/RBL permanece alto, indicando novamente que há variações consideráveis na predição, porém a modelagem como um todo apresentam bons resultados levando em consideração as outras figuras de mérito.

Observando as EJCR obtidas para modelagem U-PLS/RBL, mostradas na **Figura 31**, vemos que para todos os casos o ponto ideal está contido no interior da elipse, indicando que a 95% de significância para nenhum analito há *bias* significativo.

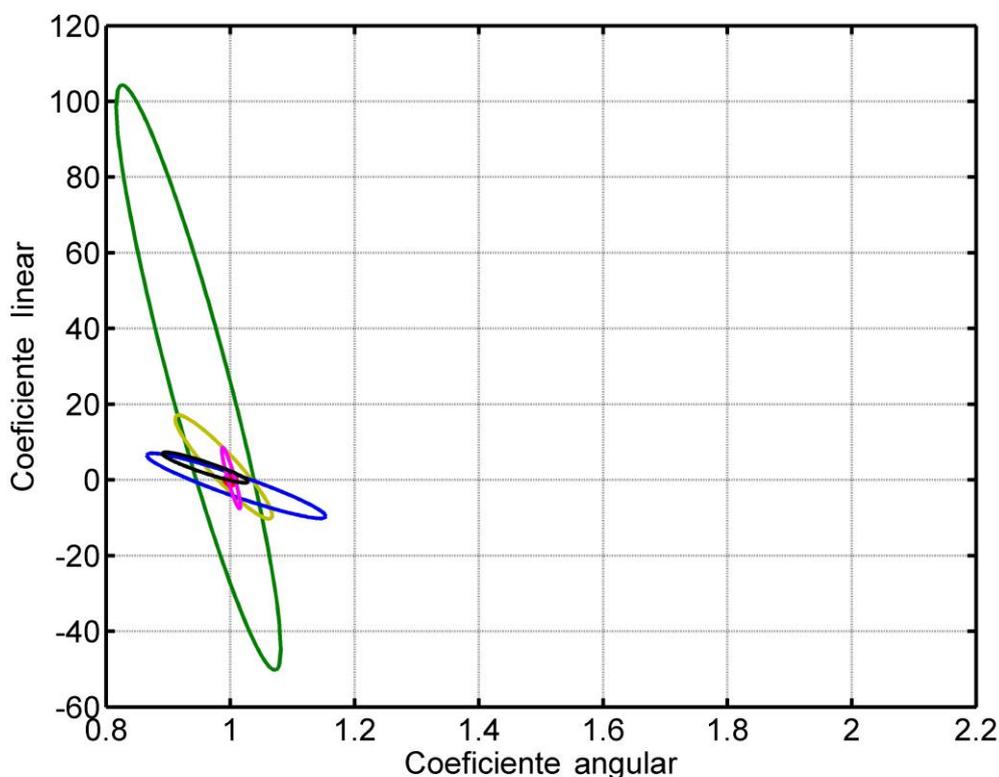


Figura 31 - EJCR para o modelo U-PLS/RBL AN (—), AC (—), FL (—), BaP (—) e P (—).

4.4. Análise das amostras de bebidas destiladas

Como mencionado na seção 3, três amostras de bebidas destiladas (sendo uma amostra de cachaça, uma amostra de vodca e outra de rum) foram adquiridas no comércio. As amostras foram filtradas e fortificadas em três níveis distintos (veja Tabela 7). As EEM resultantes foram submetidas à remoção de “*sacttering*” previamente para posterior modelagem via PARAFAC e U-PLS/RBL empregando o conjunto de calibração (seção 3.3).

Na **Figura 32** são apresentadas as superfícies típicas excitação-emissão obtidas para amostras de bebidas destiladas puras, e também após a fortificação com os cinco HPA's determinados neste estudo.

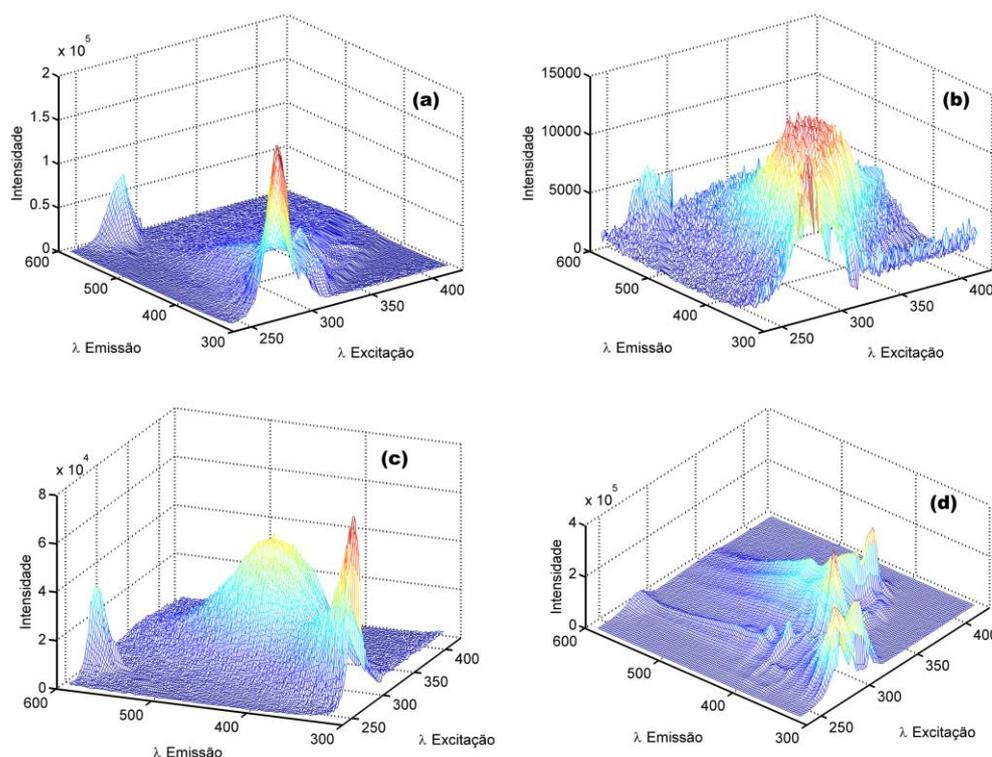


Figura 32 - Superfícies EEM para amostra de cachaça (a), vodca (b), rum (c) e para amostra de cachaça fortificada (d).

Na **Figura 32, (a, b e c)** é perceptível a presença de fluoróforos nas amostras puras de cachaça, rum e vodca e, na **Figura 32d** está mostrada uma superfície EEM da amostra de cachaça fortificada com os cinco analito. É possível observar que há sobreposição entre o perfil fluorescente da matriz pura com os perfis dos analito foram adicionados, em ambos os modos instrumentais.

Em outras palavras isso significa que, as metodologias convencionais falhariam diante deste cenário, a menos que uma etapa prévia de extração e/ou separação dos analitos fossem empregadas. O que elevaria os custos e tempos, fatores negativos para ensaios de rotina, ocasionaria ainda geração de resíduos bem como levaria a um método menos exato e preciso.

Uma decomposição via PARAFAC das EEMs para as amostras de bebidas foram conduzidas a fim de examinar quantos constituintes puros estão contribuindo para gerar o sinal fluorescente registrado. Na **Figura 33a** é mostrado como varia o valor de CORE em função do número de fatores PARAFAC.

O melhor ajuste foi obtido para cinco fatores e os perfis recuperados em ambos os modos são mostrados na **Figura 33b e c**. É possível observar que cinco contribuições distintas foram recuperadas em ambos os modos instrumentais. Com base nesta informação, sabe-se que as amostras contêm cinco fluoróforos. Logo a determinação do número de fatores PARAFAC e RBL foi realizada de modo similar ao discutido para o conjunto de validação.

Os resultados da predição para as amostras reais de bebidas destiladas são apresentados na **Tabela 11** para ambos os modelos. Em todos os casos os teores dos HPA's provavelmente estão abaixo do limite de detecção do método, uma vez que não foi possível determinar nenhum dos analitos em nenhuma amostra real pura.

Para todos os casos (amostras e níveis de fortificação) é observada uma boa recuperação. Para o PARAFAC, a faixa de recuperação ficou em torno de 85,99% e 115,18%. Para o U-PLS/RBL, a faixa foi de 81,02% e 106,05%. No caso dos modelos PARAFAC o número de fatores variou entre 8 e 10. O mesmo ocorre na maioria dos casos para o U-PLS/RBL, sendo que em alguns casos é observado um baixo número de fatores.

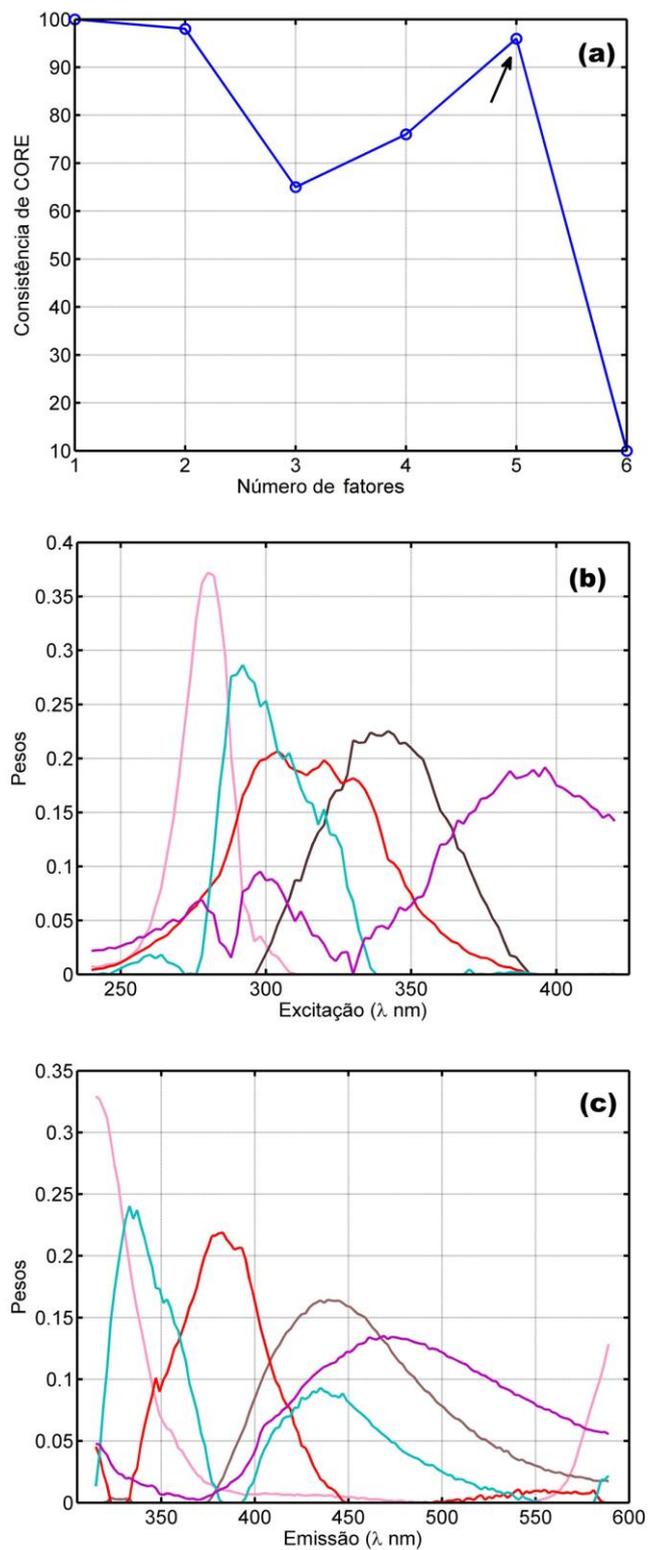


Figura 33 - Resultado da decomposição PARAFAC das amostras de bebidas alcoólicas não fortificadas, variação do CORE em função do número de fatores (a), perfis de excitação (b) e perfis de emissão (c).

Tabela 11 - Valores de recuperação relativos à predição dos HPA's nas amostras de bebidas destiladas (%).

PARAFAC															
	Cachaça					Vodca					Rum				
Fortificações	AC	NA	BaP	F	P	AC	NA	BaP	F	P	AC	AN	BaP	F	P
1º Nível	91,49(9)	102,13(8)	85,99(9)	110,47(9)	92,76(8)	104,60(10)	104,70(9)	100,90(9)	95,01(10)	94,14(9)	90,91(9)	98,52(9)	109,53(8)	100,01(10)	115,18(9)
2º Nível	103,04(9)	97,16(8)	102,17(9)	102,73(9)	98,64(8)	104,74(10)	104,38(9)	91,83(9)	97,31(10)	105,89(9)	93,35(9)	106,61(9)	103,25(8)	106,07(10)	98,88(9)
3º Nível	102,76(9)	102,26(8)	102,20(9)	102,45(9)	102,93(8)	98,35(10)	99,60(9)	98,05(9)	97,99(10)	98,05(9)	94,48(9)	104,23(9)	100,04(8)	100,27(10)	92,62(9)
UPLS/RBL															
	Cachaça					Vodca					Rum				
Fortificações	AC	NA	BaP	F	P	AC	NA	BaP	F	P	AC	AN	BaP	F	P
1º Nível	101,17(4)	105,66(8)	89,31(3)	100,00(8)	105,26(9)	102,77(8)	100,11(6)	97,62(8)	102,84(6)	95,82(10)	100,48(8)	81,02(5)	106,02(4)	106,52(6)	106,05(10)
2º Nível	100,78(9)	100,64(9)	106,26(3)	100,00(5)	97,98(7)	104,09(1)	104,91(9)	100,36(1)	99,33(10)	98,95(4)	97,50(4)	104,87(9)	91,04(2)	97,46(10)	101,42(4)
3º Nível	91,54(9)	100,44(9)	103,21(3)	99,31(8)	98,59(4)	94,44(1)	103,12(9)	94,67(1)	102,55(10)	95,81(8)	94,42(1)	104,97(9)	103,28(1)	101,67(10)	98,52(4)

Entre parêntesis número de fatores PARAFAC e RBL.

De modo complementar aos resultados mostrados na **Tabela 11**, nas **Tabelas 12 e 13**, são mostradas algumas figuras de mérito, que possibilitam uma melhor avaliação do desempenho dos modelos PARAFAC e U-PLS/RBL respectivamente.

Tabela 12 - Resumo da predição das amostras de reais para o modelo PARAFAC.

Analito	RMSEP (ngmL ⁻¹)	REP %	SEN	γ^{-1} (ngmL ⁻¹)	LOD (ngmL ⁻¹)
AC	31,52	5,83	1,66x10 ³	2,44	20
NA	8,03	4,87	9,80 x10 ²	4,17	23,7
BaP	2,71	4,93	2,70 x10 ⁴	0,18	3,00
FL	18,16	3,60	1,67 x10 ³	1,89	27
P	3,40	6,18	6,53 x10 ³	0,69	4,47

Com base na **Tabela 12** é possível observar que bons valores de RMSEP (exceto para o AC e FL) e REP foram obtidos com o modelo PARAFAC, bem como valores de sensibilidade analítica e LOD bastante baixos, refletindo a alta sensibilidade.

Já na **Tabela 13** são mostrados os resultados obtidos com a modelagem U-PLS/RBL, em que é possível observar que geralmente menores valores de RMSEP e REP foram obtidos, seguindo a mesma tendência do conjunto de validação. Isso ocorre devido, certamente a melhor flexibilidade da modelagem via variáveis latentes e componentes RBL. Em relação às demais figuras de mérito obtidas para o U-PLS/RBL, valores de sensibilidade muito inferiores aos obtidos pelo PARAFAC, que levam a valores de sensibilidade analítica e LOD melhores.

Tabela 13 - Resumo da predição das amostras de reais para o modelo U-PLS/RBL.

Analito	RMSEP (ngmL ⁻¹)	REP %	SEN	γ^{-1} (ngmL ⁻¹)	LOD (ngmL ⁻¹)
AC	34,53	6,38	2,50	2,11 x10 ⁻⁴	4,40 x10 ⁻³
NA	9,60	5,82	1,36	2,67 x10 ⁻⁴	1,10 x10 ⁻³
BaP	3,26	5,93	4,42	3,33 x10 ⁻⁴	7,70 x10 ⁻⁴
FL	11,94	2,36	1,99	3,59 x10 ⁻⁴	4,40 x10 ⁻³
P	1,92	3,49	2,20	5,30 x10 ⁻⁴	3,30 x10 ⁻⁴

Este fato está associado às peculiaridades de como figuras de mérito são obtidas para modelagem de dados multivias [75]. Em que a sensibilidade analítica esta definida como a razão entre sensibilidade e ruído não modelado. Modelos PARAFAC com restrições costumam ser qualitativos, porém sofrem com perda de ajuste. Por outro lado os modelos U-PLS/RBL levam a valores de resíduos muito baixos, com consequentes menores valores de sensibilidade analítica e LOD.

Por fim as regiões elípticas de confiança conjunta, obtidas para as amostras que compõe o conjunto de predição (amostras reais) são mostradas na **Figura 34**. Para o modelo PARAFAC (**Figura 34a**) todas as EJCR contém o ponto ideal, sugerindo a inexistência de *bias* significativo. Já para o U-PLS/RBL a EJCR para o AC não contém o ponto ideal, e sua posição relativa mostra a existência de um *bias* negativo, de acordo com a faixa de recuperação obtida (81,02% a 106,05%). Por outro lado as EJCR obtidas para o U-PLS/RBL (**Figura 34b**) possuem menor área que as obtidas para o PARAFAC indicando melhor acurácia dos modelos U-PLS/RBL quando comparados ao PARAFAC.

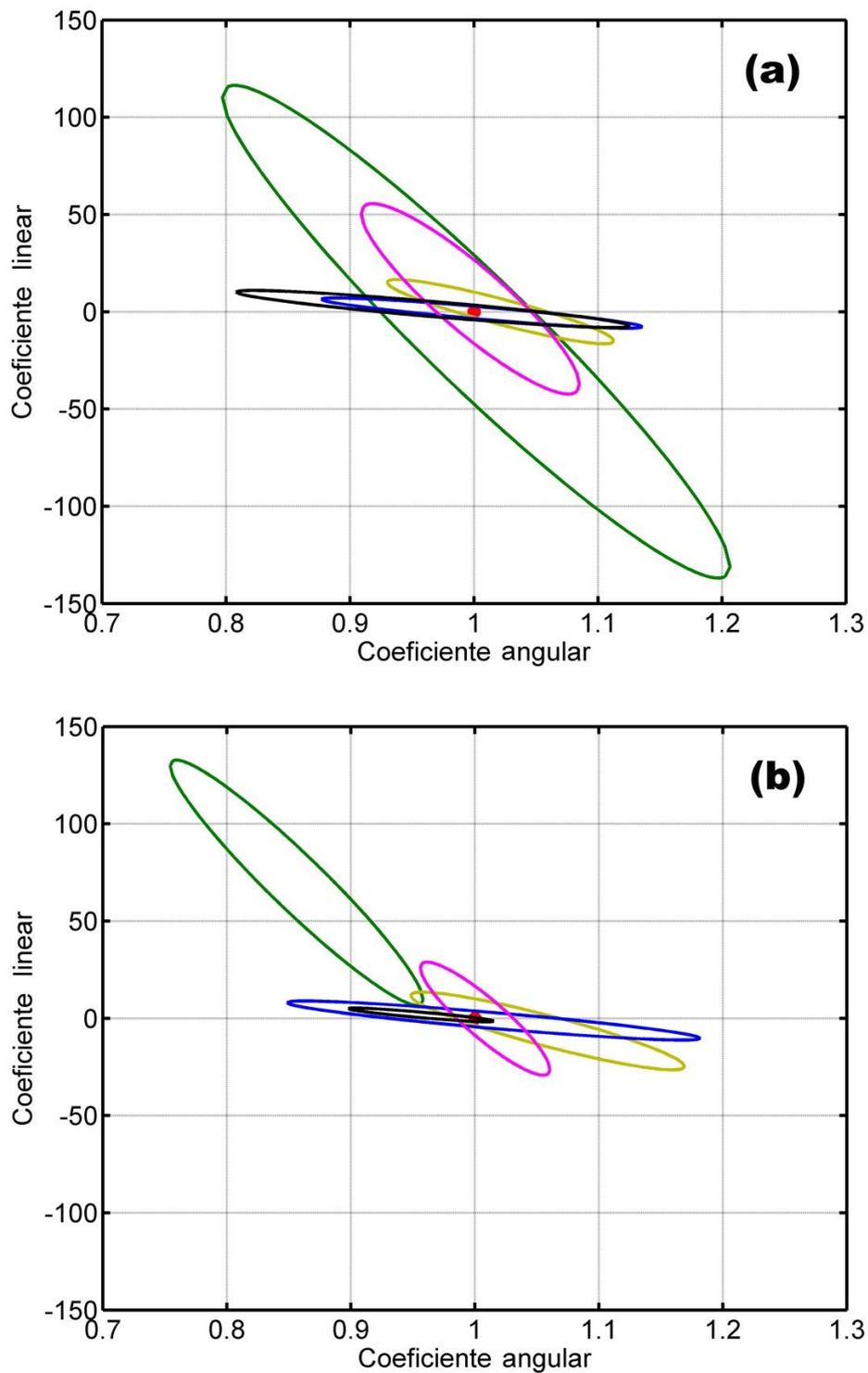


Figura 34 - EJCRC para o modelo PARAFAC (a) e U-PLS/RBL (b) AN (—), AC (—), FL (—), BaP (—) e P (—).

Conclusões



5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram construídos modelos quimiométricos para quantificação de HPA's, que faz uso das vantagens da espectroscopia de fluorescência em 3D e calibração de segunda ordem. Modelos PARAFAC e U-PLS/RBL baseados em conjuntos de calibração constituídos a partir de padrões puros mostram excelente desempenho frente a um conjunto de validação de misturas etanol/água (bebida alcoólica simulada) fortificadas com seis HPA's, que por si só já fornece um sistema analítico complexo. Os modelos validados foram avaliados também na predição de cinco HPA's em amostras de bebidas destiladas (cachaça, vodca e rum) adquiridas no comércio local.

Quando se compara os desempenhos do PARAFAC e do U-PLS/RBL, foi possível concluir que o último mostrou-se mais robusto, levando a melhores acurácias e modelos isentos de *bias* para o conjunto de validação. O PARAFAC apresentou resultados com *bias* significativo em dois casos (pireno e acenafteno).

Os resultados obtidos pelo PARAFAC podem ser justificados levando-se em consideração que a etapa de remoção de espalhamento das EEM pode provocar certos desvios de trilinearidade, premissa sob a qual está baseada a decomposição PARAFAC. Com relação aos altos valores de RMSEV e RMSEP para os modelos PARAFAC e U-PLS/RBL do AC, estes podem ser justificados devido a radiação de fundo.

A aplicação do PARAFAC e U-PLS/RBL a amostras de bebidas destiladas mostrou bons resultados para ambos os modelos. A vantagem de segunda

ordem foi alcançada com sucesso, em que a presença de interferentes presentes nas amostras foi contornada, levando a valores de recuperações aceitáveis. Por fim, também para as amostras reais melhores resultados foram obtidos pelo U-PLS/RBL.

5.1. Propostas futuras

Como propostas de possíveis melhorias e aplicações da nova estratégia, pode-se destacar:

- ✓ Desenvolver um método simultâneo para determinação de HPA's em cachaça;
- ✓ Quantificação simultânea de outros HPA's em amostras de etanol combustível, aumentando assim a abrangência do método proposto;
- ✓ Modelar os dados LC-EEM com algoritmos apropriados (PARAFAC, N-PLS/RTL e UPLS/RTL) para gerar modelos mais sensíveis (vantagem de terceira ordem).

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. LEI Nº 8.918, DE 14 DE JULHO DE 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersetorial de Bebidas e dá outras providências. Brasília, DF: 14 de julho de 1994.
2. BRASIL. DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009. 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: 04 de junho de 2009.
3. Brereton, P.; Hasnip, S.; Bertrand, A.; Wittkowski, R.; Guillou, C. Analytical methods for the determination of spirit drinks. *Trend Anal Chem* 22 (2003) 19-25.
4. Szymczycha-Madeja, A.; Welna, M.; Jamroz, P.; Lesniewicz, A.; Pohl, P. Advances in assessing the elemental composition of distilled spirits using atomic spectrometry. *Trend Anal Chem* 64 (2015) 127–135.
5. Coelho, B.; Mello, R.; Rocha, A. Leblon Cachaça: A born global in a traditional industry. *J Bus Res* 67 (2014) 567–575.
6. Maisch, W.F.; Sobolov, M.; Petricola, A.J. [Microbial Technology: Fermentation Technology](#). 2. Ed. (1979) 79–94.
7. OMS. Global status report on alcohol and health. 2014;
8. Riachi, L.G.; Santos, Â.; Moreira, R.F.A.; Maria, C.A.B. A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits. *Food Chem* 149 (2014) 159–169.

9. Tfouni, S.; Souza, N.; Bertolani, M.; Loredó, I.; Leme, F.; Furlani, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sugarcane juice. *Food Chem* 116 (2009) 391–394.
10. Tfouni, S.; Machado, R.; Camargo, M.; Vitorino, S.; Vicente, E.; Toledo, M. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaca by HPLC with fluorescence detection. *Food Chem* 101 (2007) 334–338.
11. European Commission (EC) no. 1881. (2006). Official Journal of the European Union. Disponível em:
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>. Acessado em 25.11.2014.
12. European Commission (EU) no. 835. (2011). Official Journal of the European Union. Disponível em:
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:EN:PDF>. Acessado em 25.11.2014.
13. EFSA (European Food Safety Authority). (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Disponível em:
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/724.pdf>. Acessado em 28.11.2014.
14. Brasil. (2007b). National Health Surveillance Agency, rdc No. 20. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/edbef8804745959d9d90dd3fbc4c6735/RDC_20_2007.pdf?MOD=AJPERES. Acessado em 25.11.2014.

15. Brasil. (2005b). National Health Surveillance Agency, RDC No. 274. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9b898900474592b8b15df3fbc4c6735/RDC_274_2005.pdf?MOD=AJPERES. Acessado em 25.11.2014.
16. Elcoroaristizabal S.; Juan, A.; García, J.; Durana, N.; Alonso, L. Comparison of second-order multivariate methods for screening and determination of PAHs by total fluorescence spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 132 (2014) 63–74.
17. Biggs, W.R.; Fetzer, J.C. Analytical techniques for large polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Trend Anal Chem*, 15 (1996) 196-205.
18. Pinto, L. Uma metodologia analítica rápida para a quantificação simultânea de estrógenos em água usando HPLC-DAD e calibração de segunda ordem. 75f. Dissertação de mestrado em Química. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 2014.
19. Sousa-Aguiara, E.; Almeida, J.; Roman, P.; Fernandes, R.; Carvalho, Y. Química verde: a evolução de um conceito. *Química Nova* 37 (2014) 1257-1261.
20. Juan A.; Arancibia, P.; Damiani, G.; Escandar, G.; Olivieri, A. A review on second- and third-order multivariate calibration applied to chromatographic data. *J Chromatogr B*, 910 (2012) 22– 30.
21. Lozano, V.; Escandar, G. Second-order advantage with excitation–emission photoinduced fluorimetry for the determination of the antiepileptic carbamazepine in environmental Waters. *Anal Chim Acta* 782 (2013) 37– 45.

22. Escandar, G.; Damiani, P.; Goicoechea, H.; Olivieri, A. A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis. *Microchem J* 82 (2006) 29 – 42.
23. Schenone, A.; Culzoni, M.; Marsili, N.; Goicoechea, H. Determination of tartrazine in beverage samples by stopped-flow analysis and three-way multivariate calibration of non-linear kinetic-spectrophotometric data. *Food Chem* 138 (2013) 1928–1935.
24. Lenhardt, L.; Bro, R.; Zekovic, I.; Dramicanin, T.; Dramicanin, M. Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey. *Food Chem* 175 (2015) 284–281.
25. Rubio, L.; Sarabia, L.; Ortiz, M. Standard addition method based on four-way PARAFAC decomposition to solve the matrix interferences in the determination of carbamate pesticides in lettuce using excitation – emission fluorescence data. *Talanta* 138 (2015) 86 – 99.
26. Alarcón, F.; Baéz, M.; Bravo, M.; Richter, P.; Escandar, G.; Olivieri, A.; Fuentes, E. Feasibility of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils via unfolded partial least-squares/residual bilinearization and parallel factor analysis of fluorescence excitation emission matrices. *Talanta* 103 (2013) 361–370.
27. Elcoroaristizabal, S.; Juan, A.; García, J.; Durana, N.; Alonso, L. Comparison of second-order multivariate methods for screening and determination of PAHs by total fluorescence spectroscopy. *Chemometr Intell Lab* 132 (2014) 63–74.

28. Yan Zhang.; Hai-Long Wu.; A-Lin Xia.; Qing-Juan Han.; Hui Cui.; Ru-Qin Yu. Interference-free determination of Sudan dyes in chilli foods using second-order calibration algorithms coupled with HPLC-DAD. *Talanta* 72 (2007) 926–931.
29. IARC (International Agency for Research on Cancer). (2010a). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Disponível em:
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf>. Acessado em. 03.12.2014.
30. International Programme on Chemical Safety, selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons, Environment Health Criteria No. 202, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1998.
31. Yamamoto, C. A Demanda por Bebidas Alcoólicas no Brasil, 2008-2009. 88f. Dissertação de Economia. Escola de Economia de São Paulo da Fundação Getúlio Vargas, São Paulo. 2011.
32. OMS. Recorded alcohol per capita (15+ years) consumption in litres of pure alcohol, from 1990. Disponível em:
http://www.who.int/gho/alcohol/consumption_levels/adult_recorded_percapita/en/ Acessado 05.12.2014.
33. Cardoso, D.; Sobrinho, L.; Lima-Neto, B.; Franco, D. A Rapid and Sensitive Method for Dimethylsulphide Analysis in Brazilian Sugar Cane Sugar Spirits and Other Distilled Beverages. *J. Braz. Chem. Soc* 15 (2004) 277-281.
34. Raposo, J.; Oliveira, A.; Jones, B.; Gomes, J. Internal standardization combined with dilute-and-shoot preparation of distilled alcoholic

- beverages for Cu determination by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* 92 (2012) 53– 57.
35. Takahashi, Kei.; Goto-Yamamoto, Nami. Simple method for the simultaneous quantification of medium-chain fatty acids and ethyl hexanoate in alcoholic beverages by gas chromatography-flame ionization detector: Development of a direct injection method. *J Chromatogr A*, 1218 (2011) 7850–7856.
 36. Lima, L.; Melo-Filho, A. *Tecnologia de bebidas*. EDUFRPE, Recife, 201.
 37. Melo, M.; Muniz-Filho, R.; Bueno, M.; Ferreira, M. Potencialidades das técnicas fluorescência de raios x por dispersão de energia e infravermelho próximo aliadas a quimiometria na calibração dos teores de água e álcool em amostras de cachaça. 7º Colloquium Chemiometricum Mediterraneun Granada, 2010.
 38. Brasil. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Brasília, DF. 13 de Junho de 2005.
 39. Vilela, A. Estudo da adequação de critérios de boas práticas de fabricação na avaliação de fábricas de cachaça de alambique. 95f. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2005.
 40. Keith, L.; Telliard, W. Priority Pollutants. *Environmental Science & Technology* 13 (1979) 416-423).

41. WHO Regional Office for Europe. Air Quality Guidelines. 2 Ed. Copenhagen, Denmark, 2000.
42. Pampanin, D.; Sydnes, M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons a Constituent of Petroleum: Presence and Influence in the Aquatic Environment. INTECH. 2013.
43. Meire, R.; Azeredo, A.; Torres, J. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecol. Bras* 11 (2007) 188-201.
44. Clemente, A.; Torres-Palma, R.; Peñuela, G. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review. *Science of the Total Environment* 478 (2014) 201–225.
45. Zeng, Y.; Hong, P.; Wavrek, D. Integrated chemical–biological treatment of benzo[a]pyrene. *Environ Sci Technol*, 34 (2000), pp. 854–862.
46. Zeng, Y.; Hong, P.; Wavrek, D. Chemical–biological treatment of pyrene. *Water Res*, 34 (2000), pp. 1157–1172.
47. Glaze, W.; Kang, J.; Chapin, D. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone Sci Eng*, 9 (1987), pp. 335–352.
48. Manoli, E.; Samara, C. The removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in the wastewater treatment process: experimental calculations and model predictions. *Environ Pollut*, 151 (2008), pp. 477–485.
49. Pissinatti, R.; Nunes, C.; Souza, A.; Junqueira, R.; Souza, S. Simultaneous analysis of 10 polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted

- coffee by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: Optimization, in-house method validation and application to an exploratory study. *Food Control* 51 (2015) 140 -148.
50. Riachi, L.; Santos, Â.; Moreira, R.; Maria, C. A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits. *Food Chem* 149 (2014) 159–169.
 51. Porto, C.; Moret, S. Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) between smoked marc spirits and whiskies. *Food Chem Toxicol* 45 (2007) 2069–2071.
 52. Menezes, H.; Paulo, B.; Paiva, Maria.; Barcelos, S.; Macedo, D.; Cardeal, Z. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in artisanal cachaça by DI-CF-SPME–GC /M S. *Microchem J* 118 (2015) 272 – 277.
 53. Galinaro, C.; Cardoso, D.; Franco, D. Profiles of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Brazilian Sugar Cane Spirits: Discrimination between Cachacü as Produced from Nonburned and Burned Sugar Cane Crops. *Food Chem.* 55 (2007) 3141–3147.
 54. Toussaint, G.; Walker, E. Use of high-performance liquid chromatography as a clean-up procedure in analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic beverages. *J Chromatogr.* 171 (1979) 448-452.
 55. Lenhardt, L.; Bro, R.; Zekovic', I.; Dramicanin, T.; Dramicanin, M. Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for

- characterization and classification of honey. *Food Chem* 175 (2015) 284–291.
56. Lakowicz, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 Ed. Nova Iorque, EUA. Springer 2006.
57. Qimeng Fan.; Chaoyin Chen.; Zaiqiang Huang.; Chunmei Zhang.; Pengjuan Liang.; Shenglan Zhao. Discrimination of Rhizoma Gastrodiae (Tianma) using 3D synchronous fluorescence spectroscopy coupled with principal component analysis. *Spectrochim Acta A* 136 (2015) 1621–1625.
58. Sotomayor, M.; Dias, I.; Lanza, M.; Moreira, A.; Kubota, L. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em Análises farmacêuticas. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 7, 1755-1774, 2008.
59. Skoog, D. A; West, D. M; Holler, F. J; Crouch, S. R. *Fundamentos da Química Analítica*. 8º Ed. São Paulo: Thomson, 2006.
60. Kassouf, A.; Rakwe, M.; Chebib, H.; Ducruet, V.; Rutledge D.; Maalouly, J. Independent components analysis coupled with 3D-front-face fluorescence spectroscopy to study the interaction between plastic food packaging and olive oil. *Anal Chim Acta* 839 (2014) 14 –25.
61. Ammari, F.; Redjda, L.; Rutledge, D. Detection of orange juice frauds using front-face fluorescence spectroscopy and Independent Components Analysis. *Food Chem* 168 (2015) 211–217.
62. Faris, R. Termos espectrais para átomos e íons livres. 42 f. Dissertação de mestrado em Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2007.

63. Herzi, F.; Jean, N.; Zhao, H.; Mounier, S.; Mabrouk, H.; Hlaili, A. Copper and cadmium effects on growth and extracellular exudation of the marine toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*: 3D-fluorescence spectroscopy approach. *Chemosphere* 93 (2013) 1230–1239.
64. Kristensen, K.; Henriksen, J.; Andresen, T. Quantification of leakage from large unilamellar lipid vesicles by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1838 (2014) 2994–3002.
65. Skoog, D.; Holler, M.; Nieman. *Princípios de Análise Instrumental*. 5 Ed. São Paulo: Thomson, 2005.
66. Guo, L.; Lu, M.; Li, Q.; Zhang, J.; Zong, Y.; She, Z. Three-dimensional fluorescence excitation–emission matrix (EEM) spectroscopy with regional integration analysis for assessing waste sludge hydrolysis treated with multi-enzyme and thermophilic bacteria. *Bioresource Technol* 171 (2014) 22–28.
67. Giacomino, A.; Abollino, O.; Malandrino, M.; Mentasti, E. The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: A Review. Part II. Cluster analysis, multiple linear regression, mixture resolution, experimental design and other techniques. *Anal Chim Acta* 688 (2011) 122–139.
68. Sena, M.; Poppi, R.; Trevisan, M. PARAFAC: Uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. *Quim. Nova* 28 (2005) 910-920.

69. Bahram, M.; Bro, R.; Stedmon, C.; Afkhami, A. Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation. *J. Chemometr* 20 (2006) 99 – 105.
70. Correia, P.; Ferreira, M. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Quim. Nova* 30 (2007) 481 – 487.
71. Parreira, T. Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariada. 91 f. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campina. Campina, São Paulo. 2003.
72. Sena, M.; Poppi, R.; Frigueto, R.; Valarini, P. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Quim. Nova* 23 (2000) 547 – 556.
73. Brereton, R. G., Introduction to multivariate calibration in analytical Chemistry. *Analyst*, 125 (2000) 2125–2154.
74. Barros-Neto, B.; Pimentel, M.; Araújo, M. C. R. Recomendações para calibração em química analítica - parte i. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Quim. Nova* 25 (2002) 856-865.
75. Olivieri, A.C. Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration. *Chem Rev* 114 (2014) 5358–5378.
76. Valderrama, P.; Braga, J.W.B.; Poppi, R.J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Quim Nova* 32 (2009) 1278–1287.
77. Bro, R.; Kiers, H.A.L. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *J Chemometr* 17 (2003) 274–286.

78. Bro, R. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometr Intell Lab* 38 (1997) 149 – 171.
79. Pimentel, M.F.; Galvão, R.K.H.; Araújo, M.C.U. Recomendações para calibração em química analítica parte 2. Calibração multianálito. *Quim Nova* 31 (2008) 462–467.
80. Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Graeber, D., Bro, R.; Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. *Anal. Method*, 5 (2013) 6557-6566.
81. BRO, R.; Multi-way Analysis in the Food Industry: Models, Algorithms, and Applications. Tese de Doutorado, Universidade de Amsterdã, Holanda, 1998.
82. Sanchez, E., Kowalski, B. R., Tensorial Calibration: II. Second-Order Calibration. *J Chemometr* 2 (1998) 265-280.
83. Escandar, G. M., Faber, N. M., Goicoechea, H. C., Peña, A. M., Olivieri, A. C., Poppi, R. J.; Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *Trend Anal Chem* 26 (2007) 752-765.
84. Bro, R., Vierendeck, N., Toft, M., Toft, H., Hansen, P. I., Engelsen, S. B.; Mathematical chromatography solves the cocktail party effect in mixtures using 2D spectra and PARAFAC. *Trend Anal Chem* 29 (2010) 281- 284.
85. Gomes, A.A.; Alcaraz, M.R.; Goicoechea, H.C.; Araújo, M.C.U. The Successive Projections Algorithm for interval selection in trilinear partial least-squares with residual bilinearization. *Anal Chim Acta* 811 (2014) 13–22.

86. Gil, D.B.; Peña, A.M.; Arancibia, J.A.; Escandar, G.M.; Olivieri, A.C. Second-Order Advantage Achieved by Unfolded-Partial Least-Squares/Residual Bilinearization Modeling of Excitation-Emission Fluorescence Data Presenting Inner Filter Effects. *Anal Chem* 78 (2006) 8051-8058.
87. García, M.D.G.; Cilzoni, M.J.; Zan, M.M.D.; Valverde, R.S.; Galera, M.M.; Goicoechea, H.C. Solving matrix effects exploiting the second-order advantage in the resolution and determination of eight tetracycline antibiotics in effluent wastewater by modelling liquid chromatography data with multivariate curve resolution-alternating least squares and unfolded-partial least squares followed by residual bilinearization algorithms II. Prediction and figures of merit. *J Chromatogr A* 1179 (2008) 115–124.
88. Olivieri, A. Recent advances in analytical calibration with multi-way data. *Anal. Method* 4 (2012) 1876 – 1886.
89. Bortolato, S.S.; Arancibia, J.A.; Escandar, G.M.; Olivieri, A.C. Improvement of residual bilinearization by particle swarm optimization for achieving the second-order advantage with unfolded partial least-squares. *J Chemometr* 21 (2007) 557–566.
90. Braga, J.W.B.; Carneiro, R.L.; Poppi, R.J. Evaluation of the number of factors needed for residual bilinearization in BLLS and UPLS models to achieve the second-order advantage. *Chemometr Intell Lab* 100 (2010) 99–109.
91. Morteza Bahram, Rasmus Bro, Colin Stedmon, Abbas Afkhami, Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation, *J Chemometr* 20 (2006) 99-105.

APÊNDICE A**Tabela 14** - Número CAS para os HPA's estudados neste trabalho.

Compostos	Número CAS
Acenafteno	83-32-9
Antraceno	120-12-7
Benzo(a)pireno	50-32-8
Fenantreno	85-01-8
Fluoranteno	206-44-0
Pireno	120-00-0