

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO DE NOVOS PARÂMETROS PARA APRIMORAMENTO DO CONTROLE DE QUALIDADE DA CERA DE CARNAÚBA

ALLAN NILSON DE SOUSA DANTAS

**ORIENTADOR: PROF. DR. RONALDO FERREIRA DO NASCIMENTO
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. SANDRO THOMAZ GOUVEIA**

FORTALEZA – CE

2014

ALLAN NILSON DE SOUSA DANTAS

**ESTUDO DE NOVOS PARÂMETROS PARA
APRIMORAMENTO DO CONTROLE DE QUALIDADE DA
CERA DE CARNAÚBA**

Tese de doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade
Federal do Ceará como parte
dos requisitos básicos para
obtenção do título de Doutor
em Química

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento

Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Thomaz Gouveia

Fortaleza – CE

2014

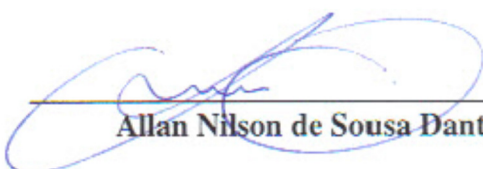
ALLAN NILSON DE SOUSA DANTAS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- D21e Dantas, Allan Nilson de Sousa.
 Estudo de novos parâmetros para aprimoramento do controle de qualidade da cera de carnaúba
 / Allan Nilson de Sousa Dantas. – 2014.
 113 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de
 Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Química Analítica.
 Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.
 Coorientação: Prof. Dr. Sandro Thomaz Gouveia.
1. Cera de carnaúba. 2. Elementos traços. 3. Química analítica. I. Título.
-


CDD 545

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

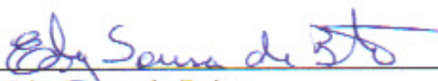


Allan Nilson de Sousa Dantas

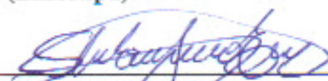
Tese aprovada em: 07/04/2014



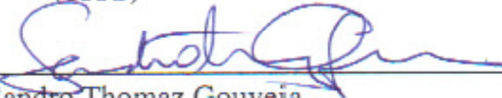
Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento
(Orientador-UFC)



Dr. Edy Sousa de Brito
(Embrapa)



Dr. Sherlan Guimarães Lemos
(UFPB)



Dr. Sandro Thomaz Gouveia
(UFC)



Dra. Wladiana Oliveira Matos
(UFC)

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu irmão Anderson Clayton, um exemplo de pessoa que sempre me incentivou nos estudos e foi quem me deu a notícia de que eu havia ingressado na estrada da Química. Onde quer que você esteja meu irmão, sei que está bem e torcendo pela minha vitória. Saudades eternas!!!

Agradecimentos

Gostaria de agradecer inicialmente a Deus por me conceder saúde e força para realizar essa longa jornada;

À CAPES pelo suporte financeiro concedido durante o doutorado;

Aos meus pais (Nilta e Dantas) por todo os exemplos e ensinamentos de vida passados, por não medir esforços para garantir uma educação de qualidade, permitindo meu acesso às melhores escolas dentro de nossas possibilidades. Amo vocês de todo o meu coração;

À minha irmã Ana Karine, por todos os momentos extremamente alegres e descontraídos passados ao seu lado;

À Gisele Lopes que esteve ao meu lado durante todos esses anos, compartilhando carinho, companheirismo, amizade, conselhos, puxões de orelha, discussões que sem sombra de dúvidas foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional;

Aos meus Orientadores Prof. Sandro Thomaz Gouveia e Prof. Ronaldo do Nascimento Ferreira. Estes foram meus mentores durante a elaboração e desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por acreditar e confiar na minha capacidade em desenvolver este trabalho.

À Profa. Wladiana, pela amizade e por todo apoio e incentivo concedido durante a realização dos trabalhos;

À Profa. Lívia Paulia Dias Ribeiro a quem pude buscar apoio para as discussões sobre os dados quimiométricos e pelo apoio na obtenção dos espectros NIR das amostras de cera de carnaúba. Muito obrigado Lívia!!!

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Estudos em Química Aplicada Wellington, João Paulo, Rouse, Ticiane, Thalita, Luciana, Luan, Silmara, Natália; Thamyris,

A todos os meus mestres inesquecíveis que de alguma forma contribuíram com a minha formação acadêmica e foram grandes fontes de inspiração nessa jornada alucinante.

Ao IFRN pelo fomento na compra de uma versão mais atual do software utilizado nesta pesquisa, bem como flexibilização dos horários para que pudesse finalizar este doutorado.

Obrigado a todos!!!

SUMÁRIO

Capítulo 1. Introdução	1
Capítulo 2. Revisão Bibliográfica	5
2.2 Análise de Cera de Carnaúba.....	10
2.3 Quimiometria: Análise Multivariada de Dados em Química	12
2.3.1 Planejamento Experimental.....	13
2.3.2 Análise de Componentes Principais	13
2.3.3 Calibração Multivariada	15
2.3.4 Processamento dos dados espectrais	17
2.3.5 Espectroscopia na região do infravermelho próximo	18
2.4 Quantificação de inorgânicos utilizando modelos PLS/NIR.....	19
Capítulo 3. Objetivos.....	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
Capítulo 4. Materiais e Métodos	26
4.1 Reagentes e Soluções.....	26
4.2 Amostras	27
4.3 Procedimento Experimental	27
4.3.1 Espectros FT-IR.....	28
4.3.2 Análise Térmica.....	28
4.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.....	28
4.3.4 Digestão por via úmida assistida por micro-ondas de amostras de cera de carnaúba.....	29
4.3.5 Quantificação dos elementos por ICP OES.....	30
4.3.6 Aquisição dos espectros NIR.....	32
4.3.7 Tratamento quimiométrico dos dados	32
Capítulo 5. Resultados e Discussões	34
5.1 Caracterização da matriz orgânica das ceras de carnaúba.....	34
5.1.1 Análise de infravermelho médio das amostras de cera de carnaúba	34
5.1.2 Análise Termogravimétrica das amostras de cera de carnaúba.....	36

5.1.3 Cromatografia Gasosa das amostras de cera de carnaúba	38
5.1.3 – Espectros NIR das amostras de cera de carnaúba dos Tipos 1, 3 e 4.	41
5.2 Planejamento Experimental e metodologia de superfície de resposta no preparo de amostra para os constituintes inorgânicos.	44
5.3 Figuras de mérito para a metodologia de análise por ICP OES	54
5.4 Quantificação de inorgânicos em amostras de cera de carnaúba por ICP OES ...	57
5.4.1 Determinação de inorgânicos em ceras do Tipo 1.....	58
5.4.2 Determinação de inorgânicos em ceras do Tipo 3.....	63
5.4.3 Determinação de inorgânicos em ceras do Tipo 4.....	68
5.5 Análise de Componentes Principais para o conjunto de dados	73
5.6 Utilização de Espectroscopia NIR para previsão dos teores de inorgânicos em cera de carnaúba.	77
5.6.1. Avaliação dos teores de inorgânicos no segundo conjunto de 90 amostras de ceras dos Tipos 1, 3 e 4.	78
5.6 Estudo do melhor pré-processamento dos espectros.	80
5.7. Construção dos Modelos de Calibração	82
5.7.1 Modelagem PLS-1 para determinação de elementos inorgânicos por PLS-NIR para as ceras de carnaúba do tipo 1.	83
5.7.2 Modelo de Calibração para determinação de elementos inorgânicos por PLS-NIR para as ceras de carnaúba do tipo 3.	87
5.7.3 Modelo de Calibração para determinação de elementos inorgânicos por PLS-NIR para as ceras de carnaúba do tipo 4.	90
Capítulo 6. Considerações Finais	93
Capítulo 7. Referências Bibliográficas.....	95

Lista de Figuras

Figura 1. Depósitos de patentes relacionados à cera de carnaúba registrados nos últimos 70 anos. Fo.....	1
Figura 2. Imagem típica de uma carnaubeira (<i>Copernicia prunifera</i>).....	5
Figura 3. Mapa de distribuição da carnaúba no Nordeste Brasileiro [].....	6
Figura 4. (A) Pó cerífero extraído das folhas do “olho”. (B) Pó cerífero extraído das folhas da “palha”.	7
Figura 5. Amostras de cera de carnaúba em sua forma industrializada. (A) Cera de Carnaúba do Tipo 1; (B) Cera de Carnaúba do Tipo 3; (C) Cera de Carnaúba do Tipo 4.	8
Figura 6. Dados econômicos da movimentação anual do setor de cera de carnaúba dos estados Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte no ano de 2012.....	9
Figura 7. Mapa de produção de pó e cera de carnaúba no estado do Ceará.	10
Figura 8. Visualizações do planejamento: (A) Cubo para um BBD com o ponto central. (B) Encontro de três superfícies para um BBD com o ponto central.	13
Figura 9. Primeira e segunda componentes principais para um conjunto de dados hipotéticos em um espaço bidimensional.	14
Figura 10. Representação dos <i>pesos</i> como cossenos dos ângulos formados entre as componentes principais e as variáveis.....	15
Figura 11. Resumo das principais absorções observadas na região do infravermelho próximo.....	19
Figura 12. Quantidade de trabalhos publicados versus o ano da publicação para os termos “Minerals” e “PLS/Near Infrared Spectroscopy” no Portal Science Direct.	20
Figura 13. Fluxograma de desenvolvimento da caracterização das amostras de cera de carnaúba dos Tipos 1, 3 e 4.	26
Figura 14. Esquema do refluxo utilizado para realizar a reação de metilação dos ésteres de ácidos graxos presentes nas amostras de cera de carnaúba.	29
Figura 15. Espectro de Infravermelho obtido para os diferentes tipos de ceras de carnaúba na faixa de 400 a 4000 cm ⁻¹	34
Figura 16. Curva termogravimétrica obtida para os três tipos de ceras de carnaúba.	36
Figura 17 Curvas de Análise Térmica Diferencial para amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4.....	37
Figura 18. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) obtidas para os diferentes tipos de ceras de carnaúba.	38
Figura 19. Cromatograma de íons totais para a cera de carnaúba do Tipo 1.	39
Figura 20. Cromatograma de íons totais para a cera de carnaúba do Tipo 3.	39
Figura 21. Cromatograma de íons totais para a cera de carnaúba do Tipo 4.	40
Figura 22. Fluxograma do procedimento utilizado para a aquisição dos espectros NIR das amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4.....	41
Figura 23. Espectros brutos das amostras de cera de carnaúba dos Tipos 1, 3 e 4. Região espectral de 799 a 2500 nm.	42

Figura 24. Gráfico de variância explicada versus componentes principais para o conjunto de dados espectrais das amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4.....	42
Figura 25. Gráfico de Escores da PCA (PC1 vs PC3 vs PC4) com a formação de três grupos distintos de amostras de cera de carnaúba dos Tipos 1, 3 e 4.....	43
Figura 26. Efeitos das variáveis obtido a partir do planejamento experimental Box Behnken.	47
Figura 27. Gráfico de valores preditos versus medidos para o planejamento experimental Box-Behnken utilizado no preparo de amostras de cera de carnaúba.	48
Figura 28. Superfície de resposta obtida para o planejamento experimental Box-Behnken.	52
Figura 29. Níveis de acidez dos digeridos determinados por titulação ácido-base.	53
Figura 30. Programa de aquecimento no micro-ondas para o preparo das amostras de cera de carnaúba.	54
Figura 31. Gráfico de percentil para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 1.	59
Figura 32. Estatística descritiva para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 1.	60
Figura 33. Gráfico de percentil para Co, Cu, Mn, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 1.	61
Figura 34. Estatística descritiva para Co, Cu, Mn, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 1.	61
Figura 35. Gráfico de Escores da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 1 para diferentes fabricantes.	62
Figura 36. Gráfico de Pesos da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 1 para diferentes fabricantes.	63
Figura 37. Gráfico de percentil para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3.	64
Figura 38. Estatística descritiva para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3.	64
Figura 39. Gráfico de percentil para Co, Cu, Mn, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3.	66
Figura 40. Estatística descritiva para Co, Cu, Mn, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3.	66
Figura 41. Gráfico de escores da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 3 para diferentes fabricantes.	67
Figura 42. Gráfico de Pesos da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 3 para diferentes fabricantes.	68
Figura 43. Gráfico de percentil para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 4.	69
Figura 44. Estatística descritiva para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 4.	69

Figura 45. Gráfico de percentil para Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 4.	71
Figura 46. Estatística descritiva para Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 4.	71
Figura 47. Gráfico de Escores da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 4 para diferentes fabricantes.	72
Figura 48. Gráfico de Pesos da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 4 para diferentes fabricantes.	73
Figura 49. Gráfico de escores da PCA para o conjunto de amostras dos três tipos de cera provenientes dos diferentes fabricantes. PC2 versus PC1. ----- Ceras Tipo 1; ----- Ceras Tipo 3; ----- Ceras Tipo 4.	74
Figura 50. Gráfico de pesos da PCA para o conjunto de amostras dos três tipos de cera provenientes dos diferentes fabricantes. PC2 versus PC1.	75
Figura 51. Gráfico de distribuição média dos elementos nas amostras estudadas de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4.	76
Figura 52. Concentração de macro e micro elementos em amostras de cera de carnaúba do Tipo 1.	78
Figura 53. Concentração de macro e micro elementos em amostras de cera de carnaúba do Tipo 3.	79
Figura 54. Concentração de macro e micro elementos em amostras de cera de carnaúba do Tipo 4.	80
Figura 55. Espectro das 90 amostras de cera de carnaúba após a aplicação da 1ª derivada com região espectral selecionada.	82
Figura 56. Gráficos de previsão dos diversos elementos determinados pelo modelo de calibração do tipo 1.	86
Figura 57. Gráficos de previsão dos diversos elementos determinados pelo modelo de calibração do tipo 3.	89
Figura 58 Gráficos de previsão dos diversos elementos determinados pelo modelo de calibração do tipo 4.	92

Lista de Tabelas

Tabela 1. Programa de aquecimento utilizado no forno de micro-ondas para preparação das amostras de cera de carnaúba.	30
Tabela 2. Parâmetros operacionais do ICP OES.	31
Tabela 3. Comprimento de onda dos diversos elementos avaliados por ICP OES.	32
Tabela 4. Relação dos principais ácidos graxos encontrados nos três tipos de cera de carnaúba.	40
Tabela 5. Relação entre os fatores e os níveis estabelecidos para o Planejamento Box-Behnken.	45
Tabela 6. Matriz de Planejamento Box-Behnken para otimização do preparo de amostra utilizando micro-ondas.	46
Tabela 7 Análise de Variância (ANOVA) para o ajuste do modelo calculado pelo planejamento Box-Behnken.	50
Tabela 8. Avaliação da repetibilidade em função do sinal da linha 285,213 do Mg em uma solução de 5,0 mg L ⁻¹	54
Tabela 9. Parâmetros da calibração analítica para os elementos estudados por ICP OES.	55
Tabela 10. Comparação entre os resultados certificados e encontrados pelo método proposto em amostras de Material de Referência Certificado de Folha de Maçã (MRC 1515 – Apple Leaves).	56
Tabela 11 Matriz de Correlação Cruzada entre os elementos Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Ni, Mn, Na, Pb e Zn.	57
Tabela 12. Resultados obtidos para os modelos de calibração multivariada construídos utilizando todo o conjunto de amostra de cera de carnaúba a partir de seus espectros NIR empregando diferentes formas de pré-processamento.	81
Tabela 13. Estatística descritiva para os valores obtidos em relação aos elementos avaliados para as ceras de carnaúba do Tipo 1.	83
Tabela 14 Estatística para o desempenho de calibração e validação da espectroscopia NIR na quantificação de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e K nas amostras de cera de carnaúba do tipo 1.	84
Tabela 15. Estatística descritiva para os valores obtidos em relação aos elementos avaliados para as cera de carnaúba do Tipo 3.	87
Tabela 16. Estatística para a desempenho de calibração e validação da espectroscopia NIR na quantificação de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e K nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3.	88
Tabela 17. Estatística descritiva para os valores obtidos em relação aos elementos avaliados para as ceras de carnaúba do Tipo 4.	90
Tabela 18. Estatística para a performance de calibração e validação da espectroscopia NIR na quantificação de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, K e Pb nas amostras de cera de carnaúba do tipo 4.	91

RESUMO

A cera de carnaúba consiste em um importante produto econômico e sua produção vem ao longo dos anos sofrendo com a escassez de trabalhos científicos que auxiliem no entendimento das diferenças químicas existentes entre os tipos de cera. Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo propor uma caracterização dos diferentes tipos de cera de carnaúba (Tipo 1, Tipo 3 e Tipo 4) quanto à sua composição química, em especial em relação aos constituintes inorgânicos. As amostras de cera foram avaliadas quanto à composição orgânica por FT-IR, TG e CG-MS. Os resultados obtidos mostraram que as ceras dos Tipos 1, 3 e 4 possuem pequenas diferenças quanto a sua composição orgânica fator que pode ser responsável pela diferença de coloração entre os materiais, apresentando em sua composição basicamente parafinas, álcoois de cadeia longa e ésteres de ácidos graxos. Para avaliação dos inorgânicos, uma etapa de otimização das condições de preparo de amostra por via úmida assistida por micro-ondas foi implementada. Os digeridos apresentaram teores de carbono residual inferior a 5%, sendo feita a quantificação dos elementos por ICP OES. Os teores médios para os elementos investigados nas amostras de cera do Tipo 1 foram: K ($22,3 \text{ mg Kg}^{-1}$), Al ($20,5 \text{ mg Kg}^{-1}$), Fe ($11,5 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mg ($4,0 \text{ mg Kg}^{-1}$), Na ($3,5 \text{ mg Kg}^{-1}$), Pb ($2,2 \text{ mg Kg}^{-1}$), Ca ($1,2 \text{ mg Kg}^{-1}$), Cu ($0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mn ($0,4 \text{ mg Kg}^{-1}$), Zn ($0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$) e Co ($0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$). Os teores observados para Ni ($67,2 \text{ mg Kg}^{-1}$) se mostraram elevados nas amostras de três indústrias, elevando o valor médio do elemento. Para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 3, os valores médios das concentrações dos elementos foram: Al ($122,0 \text{ mg Kg}^{-1}$), K ($112,1 \text{ mg Kg}^{-1}$), Ca ($103,9 \text{ mg Kg}^{-1}$), Fe ($93,4 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mg ($67,1 \text{ mg Kg}^{-1}$), Na ($39,6 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mn ($9,6 \text{ mg Kg}^{-1}$), Pb ($1,7 \text{ mg Kg}^{-1}$), Zn ($0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$), Ni ($0,3 \text{ mg Kg}^{-1}$), Cu ($0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$) e Co ($0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$). Por fim, para as amostras de cera do Tipo 4, os valores médios de concentração observados foram: K ($185,3 \text{ mg Kg}^{-1}$), Ca ($116,8 \text{ mg Kg}^{-1}$), Al ($97,6 \text{ mg Kg}^{-1}$), Fe ($84,5 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mg ($76,9 \text{ mg Kg}^{-1}$), Na ($37,6 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mn ($8,7 \text{ mg Kg}^{-1}$), Pb ($2,3 \text{ mg Kg}^{-1}$), Zn ($0,7 \text{ mg Kg}^{-1}$), Cu ($0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$) e Co ($0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$). Os dados foram tratados utilizando o software de Quimiometria *The Unscrambler 7.1 e X10.3*. Análise de Componentes Principais mostrou que as ceras podem ser classificadas e distinguidas em função dos teores das espécies avaliadas. Nesse contexto as ceras Tipo 4 apresentaram os maiores teores de inorgânicos, seguido das ceras do Tipo 3 e por fim das ceras do Tipo 1. Novas amostras de cera foram adquiridas com o intuito de desenvolver um modelo de calibração multivariada (NIR/PLS) para previsão de Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn e Na nas amostras de cera. Os espectros foram pré-processados aplicando 1º derivada ao conjunto de dados espectrais e em seguida foram obtidos os modelos utilizando PLS-1. As amostras de cera foram divididas em dois conjuntos de dados: um para calibração e o outro para validação. Os modelos obtidos se mostraram promissores para a previsão do teor de elementos como Al, Fe e Cu nas amostras de cera de carnaúba. Por fim, os resultados obtidos neste trabalho podem ser utilizados como parâmetros de classificação das amostras de cera, bem como podem ser utilizados como aporte para a elaboração de normas para classificação dos teores de qualidade das ceras de carnaúba produzidas pelas indústrias refinadoras.

ABSTRACT

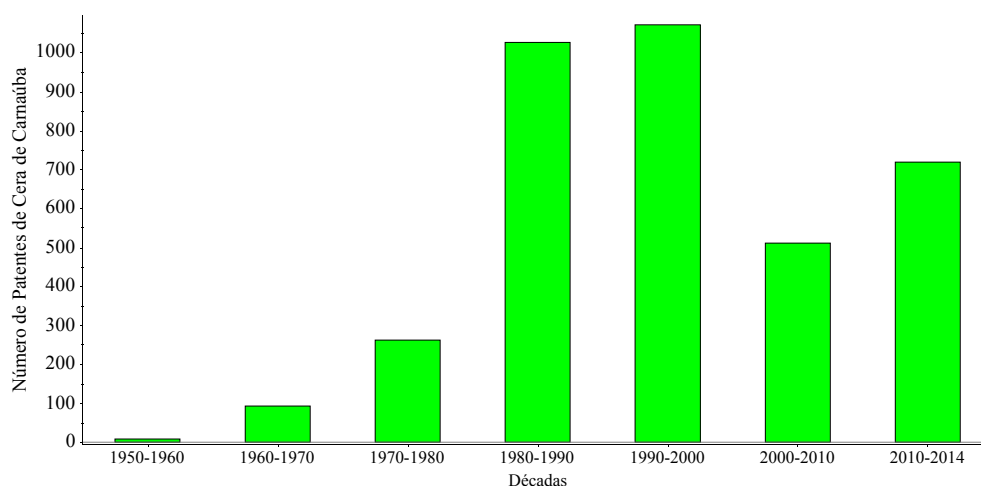
Carnauba wax is an important economic product and its industrial production has over the years suffering from the scarcity of scientific studies to aid in the understanding of the chemical differences between different types of wax. The aim of this work was characterize the different types of carnauba waxes (Type 1, Type 3 and Type 4) in relation to the chemical composition. The organic matrix of the samples were investigated by Infrared Spectroscopy (MID and NIR), Thermal Analysis and Gas Chromatography (CGMS). The results showed that the three types of waxes are very similar in its organic composition, presenting in its composition mainly paraffin, alcohols and esters of long chain fatty acids. To evaluate inorganic content, an optimization of the conditions of the sample preparation by microwave assisted wet digestion implemented. The digests showed residual carbon content less than 5%. The analysis was performed by ICP-OES. The elements data set was processed using the software The Unscrambler 7.1 and X10.3. The mean values for the elements in the samples investigated wax Type 1 levels were: K (22.3 mg kg^{-1}), Al (20.5 mg kg^{-1}), Fe (11.5 mg kg^{-1}), Mg (4.0 mg kg^{-1}), Na (3.5 mg kg^{-1}), Pb (2.2 mg kg^{-1}), Ca (1.2 mg kg^{-1}), Cu (0.5 mg kg^{-1}), Mn (0.4 mg kg^{-1}), Zn (0.2 mg kg^{-1}) and Co (0.2 mg kg^{-1}). The levels observed for Ni (67.2 mg kg^{-1}) were higher in samples from three industries, raising the average value of the element. For samples carnauba wax Type 3, the mean concentrations of elements were: Al(122.0 mg kg^{-1}), K(112.1 mg kg^{-1}), Ca (103.9 mg kg^{-1}), Fe(93.4 mg kg^{-1}), Mg(67.1 mg kg^{-1}), Na(39.6 mg kg^{-1}), Mn(9.6 mg kg^{-1}), Pb(1.7 mg kg^{-1}), Zn (0.6 mg kg^{-1}), Ni (0.3 mg kg^{-1}), Cu (0.2 mg kg^{-1}) and Co (0.1 mg kg^{-1}). Finally, the samples with wax to Type 4, the mean concentration values were observed : K (185.3 mg kg^{-1}), Ca (116.8 mg kg^{-1}), Al (97.6 mg kg^{-1}), Fe (84.5 mg kg^{-1}), Mg (76.9 mg kg^{-1}), Na (37.6 mg kg^{-1}), Mn (8.7 mg kg^{-1}), Pb (2.3 mg kg^{-1}), Zn (0.7 mg kg^{-1}), Cu (0.2 mg kg^{-1}) and Co (0.1 mg kg^{-1}). Principal Component Analysis showed that the three types of waxes could be distinguished based on the levels of inorganic elements. In this view point waxes Type 4 showed the highest inorganic levels than the waxes Type 3 and Type 1. New wax samples were acquired with a view to developing a model of multivariate calibration (NIR / PLS) for prediction of Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn and Na in wax samples. The spectra were preprocessed applying first derivative and then the models PLS-1 were obtained. The spectra data set were divided into two groups: one for the calibration and the other for validation. The models obtained were promising for predicting the content of elements such as Al, Fe and Cu in samples of wax. Finally, the results obtained in this work can be used as parameter for sample classification and as well as used for the development of standards rules for quality assurance of the carnauba waxes produced by refining industrial processes.

Capítulo 1. Introdução

A cera de carnaúba vem ao longo dos anos se mantendo como um dos mais importantes produtos de exportação dos estados Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, sendo utilizada em indústrias que fabricam materiais para polimento, recobrimento de chips de computadores, revestimento de medicamentos, processamento de alimentos, cosméticos etc. Pode-se notar, pela gama de aplicações, a importância que esta *commodity* possui para os estados produtores. A cera de carnaúba industrial é produzida a partir de dois tipos de pó cerífero (pó do olho e pó da palha) extraídos das folhas da carnaubeira, sendo estes submetidos a um processo de refinamento que envolve etapas de extração, filtração e clareamento. De acordo com o tipo de pó coletado da folha de carnaúba são obtidos diferentes tipos de cera (Tipo 1, Tipo 3 e Tipo 4), os quais são diferenciados pela coloração apresentada ao final da etapa de processamento.

Todavia, o setor carece com a falta de investimentos na melhoria dos processos de produção, de modo que a produção se dá de modo semelhante ao praticado no século passado, de modo que poucos avanços científicos para melhoria da produção foram concebidos. Nota-se, ainda, um abismo entre o setor produtivo brasileiro e a academia, esta última com tradição em desenvolvimento de pesquisas de ponta em vários segmentos da indústria brasileira. Dados mundiais de depósito de patentes envolvendo novos usos e aplicações de cera de carnaúba, dão ênfase a importância deste material. A Figura 1 mostra a evolução na quantidade de patentes depositadas em todo o mundo nos últimos 64 anos envolvendo cera de carnaúba.

Figura 1. Depósitos de patentes relacionados à cera de carnaúba registrados nos últimos 70 anos. Fo



Fonte: Dados obtidos no web of knowledge.

A maior parte da literatura envolvendo cera de carnaúba se concentra em patentes, havendo uma quantidade substancialmente inferior de artigos científicos relacionados a este material. Deste modo, esforços são necessários de parte a parte com o objetivo de melhorar o setor produtivo da carnaúba, seja na geração de espécies de carnaúba mais resistentes a pragas, seja no desenvolvimento de novos procedimentos para refinamento da cera, ou na melhoria dos processos e métodos de controle de qualidade da mesma. Este último atualmente é feito de acordo com métodos normatizados por institutos como AMERWAX (*The American Wax Importers and Refiners Association*), ASTM (*American Society for Testing and Materials*) ou USP (*U.S. Pharmacopeial Convention*).

Em 2006, uma comissão de estudo de cera de carnaúba foi formada pela ABNT (*Associação Brasileira de Normas Técnicas*) e coordenada pelo NUTEC (*Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará*) e SINDICARNAÚBA (*Sindicato das Industrias Refinadoras de Cera de Carnaúba do Estado do Ceará*) com o objetivo de estabelecer um conjunto de normas nacionais com base nos parâmetros já utilizados pelas entidades internacionais. A elaboração destas normas representa um importante avanço, uma vez que o Brasil passa a ter documentos oficiais, os quais, de acordo com a Legislação brasileira, são utilizados para a resolução de disputas judiciais. Essa normalização compreende as ceras brutas e beneficiadas, os processos de extração e beneficiamento, as especificações técnicas, classificação dos diversos tipos de ceras e métodos de ensaios [1]. Atualmente, a distinção entre os tipos de cera é feita basicamente em função da cor, sendo este um parâmetro sujeito a subjetividade. Todavia, ensaios que demonstrem as diferenças químicas das ceras produzidas podem contribuir para melhoria dos processos de classificação e ainda auxiliam no aprimoramento do controle de qualidade.

A composição química das ceras afeta propriedades como viscosidade e dureza (que estão diretamente relacionadas com a qualidade do produto), e pode variar em função não só das condições ambientais, mas também da fase de maturação em que as folhas foram coletadas. Estudos que objetivem a elucidação das diferenças na composição química das ceras de carnaúba são fundamentais para compreensão de suas propriedades e ainda podem contribuir para estreitar a relação entre a indústria e a academia.

Estudar este tipo de material não é tarefa simples. Técnicas espectroscópicas e de separação têm sido empregadas na análise das ceras, com o objetivo de identificar e

quantificar os compostos presentes. Sabe-se que o avanço da instrumentação analítica tem possibilitado a geração, em uma única medida, de grandes quantidades de dados de natureza química, sendo estes de difícil interpretação sem o auxílio de ferramentas de análise de dados. Neste contexto, a Quimiometria se apresenta como um ramo da química que emprega métodos estatísticos e matemáticos para planejamento de experimentos e tratamento de dados de natureza multivariada.

A variabilidade dos dados descende não apenas das medições instrumentais dos parâmetros químicos e físico-químicos a serem realizadas, mas principalmente da natureza variada das amostras. Somente no estado do Ceará, existem várias regiões tipicamente produtoras de cera de carnaúba. Cada região possui características particulares relativas ao tipo de solo, clima, índices pluviométricos etc. A soma de todos esses fatores pode causar pequenas diferenças na composição química e nas propriedades físico-químicas dos produtos finais. Neste sentido, torna-se crucial a elaboração de estudos que apontem as diferenças e semelhanças entre os diferentes tipos de cera de carnaúba, do ponto de vista de sua composição orgânica e inorgânica.

Para avaliação das composições orgânicas, análises na região infravermelho médio podem ser útil na caracterização dos diferentes tipos de cera, pois são ferramentas analíticas com capacidade de fornecimento de um padrão espectral. Outras técnicas também podem ser empregadas com análise térmica ou métodos cromatográficos, sendo estes últimos mais utilizados para identificação e quantificação das espécies presentes na matriz da amostra.

Já na avaliação dos constituintes inorgânicos em matrizes orgânicas ou inorgânicas, existem à disposição métodos analíticos baseados nos fenômenos de absorção ou emissão de radiação. Contudo, estes métodos em geral necessitam que a amostra seja convertida em uma solução aquosa por meio de um processo de digestão da amostra, geralmente feito com o auxílio de ácidos minerais à quente. Estes estudos podem ser úteis para a compreensão dos teores normais de inorgânicos nas mostras de cera, apresentando ainda um potencial para novo parâmetro de qualidade das amostras de cera de carnaúba. Entretanto, estes métodos possuem problemas quanto a sua operacionalidade, necessitando de mão de obra qualificada e instrumentação de custo elevado.

A espectroscopia no infravermelho próximo com refletância difusa, já bem fundamentada na literatura, vem sendo amplamente aplicada em diversos controles de qualidade industriais [2 e 3]. Todavia, a região NIR do espectro (NIRS, do inglês “Near

Infra-Red Spectroscopy”) não possui grandes vantagens para fins de elucidação estrutural como sua correlata MIR (do inglês *Mid Infrared*). Todavia, apresenta como principais características a simplicidade de utilização e o fornecimento de resultados rápidos e exatos com diversas aplicações em análises químicas [4 e 5]. O sucesso de sua grande aceitação se deve, em parte, a sua associação com ferramentas quimiométrica de tratamento de dados multivariados, seja na análise de agrupamento seja na calibração multivariada. Esta ferramenta apresenta um enorme potencial para o desenvolvimento de métodos de controle de qualidade dos mais variados parâmetros, desde propriedades físico-químicas até previsão dos teores de espécies orgânicas ou inorgânicas presentes nas amostras em estudo.

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

2.1 Cera de Carnaúba

As ceras são provenientes de fontes naturais ou sintéticas, de forma que as naturais subdividem-se em vegetal, animal, mineral e de origem petroquímica. As ceras produzidas a partir de animais e vegetais são compostas, principalmente, de ésteres e diferentes porcentagens de outros compostos como ácidos graxos livres, álcoois e hidrocarbonetos de cadeias longas [6].

A carnaubeira – *Copernicia prunífera* (Figura 2) é uma espécie de palmeira [7] característica da região semiárida do Nordeste brasileiro [8]. Esse tipo de palmeira geralmente ocorre nos pontos mais próximos dos rios, preferindo solos argilosos (pesados) e aluviais (de margens de rios). Possui capacidade de suportar alagamento prolongado durante a época de chuvas, além de ser bastante resistente a elevados teores de salinidade [9]. É uma planta xerófila, ou seja, ela se adapta ao clima quente e seco, suportando até 3000 horas de insolação por ano. É importante destacar que as condições climáticas, idade da palmeira e a proximidade da mesma com o mar são aspectos que podem influenciar na produção da cera na planta, podendo ainda afetar a qualidade do pó obtido.

Figura 2. Imagem típica de uma carnaubeira (*Copernicia prunífera*).



Fonte: Viva terra palmeiras nativas [10]

As folhas da carnaubeira apresentam-se na forma de leque de até 1,5 m de envergadura e são afixadas ao tronco por pecíolos de até 2 metros de comprimento [11].

As folhas da carnaubeira podem ser classificadas quando a idade de maturação, sendo as mais novas denominadas como folhas do olho da palmeira, e as mais velhas simplesmente denominadas de palha. As folhas são dispostas a formar um conjunto esferoidal, no qual sua copa apresenta tonalidade verde levemente azulado. Essa coloração se deve ao pó cerífero que recobre a palha, de modo que dois tipos de pó podem ser extraídos: o “pó do olho” e o “pó da palha”. O pó cerífero que recobre as folhas dessa palmeira é considerado seu principal produto e representa geração de emprego e renda o ano todo.

Encontrada em maior abundância nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, sendo em algumas localidades dos estados mencionados a única forma de atividade de renda durante os períodos de estiagem. A Figura 3 apresenta a distribuição dos carnaubais no nordeste brasileiro.

Figura 3. Mapa de distribuição da carnaúba no Nordeste Brasileiro [12].



Fonte: FIEC – Federação das Indústrias do estado do Ceará [13].

O pó do olho é mais valorizado por, de acordo com os produtores, conter menos impurezas, ser mais claro resultando em uma cera de melhor qualidade. Já o pó da palha, apresenta uma coloração mais escura e é utilizado na fabricação de ceras de menor valor de mercado. A Figura 4 (A e B) apresenta os dois tipos de pó que são extraídos das folhas da carnaubeira.

Figura 4. (A) Pó cerífero extraído das folhas do “olho”. (B) Pó cerífero extraído das folhas da “palha”.



No beneficiamento do pó extraído são adotados dois tipos de processamentos: o artesanal e o industrial. O artesanal produz a chamada cera de origem e o industrial produz a cera refinada. No processamento artesanal utilizam-se uma caldeira à lenha, uma prensa e um tanque de secagem. O pó extraído é misturado com água na caldeira, sendo cozido a uma temperatura de aproximadamente 120°C por um período de 3h. Após o aquecimento e fervura, parte da cera já sai pronta na forma líquida, sendo então resfriada em tanques. Neste processamento, são gerados diferentes tipos de cera: a partir do beneficiamento do “pó de olho” obtém-se a cera amarela ou “cera de olho”, e do pó da palha são gerados a arenosa (verde acinzentada), que contém cerca de 6% de água em média, e a cera gorda (negra esverdeada), que difere da arenosa por não ter água em sua composição [14].

A transformação da cera pelo processo industrial se dá a partir do pó do “olho” e do pó da “palha”. A transformação ocorre em duas etapas: destilação e refino. Na destilaria, o pó, passa pelo processo de destilação utilizando solvente (aguarrás, benzina ou éter) adicionado de palha de arroz para facilitar a extração da cera. Na refinaria, é feita a filtragem, a centrifugação, a clarificação (adição de peróxido de hidrogênio), a escamação e a embalagem da cera. Concluído o processo de industrialização, a cera de carnaúba apresenta-se em três tipos: Tipo 1, Tipo 3 e Tipo 4 [14].

A cera de carnaúba é um produto não perecível, mantendo sua qualidade ao longo do tempo, sendo este fato um grande benefício na sua comercialização. Atualmente é refinada de acordo com diversas classificações e utilizada em outros

segmentos industriais, tais como: alimentos, automobilística, cerâmica, explosivos, tintas etc. Outras aplicações da cera de carnaúba se dão no revestimento de cápsulas farmacêuticas, produtos para tratamento de cabelo e pele, em cosméticos, produtos de limpeza, plásticos e adesivos [15 e 16]. A cera do Tipo 1 (Figura 5A) é mais nobre e obtida do “pó de olho”, sendo utilizada nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e na produção de emulsões. Os outros dois tipos se originam do “pó da palha”. A cera Tipo 3 (Figura 5B) possui coloração alaranjada, sendo normalmente utilizada em tintas, vernizes e produtos para polimento de superfícies. A cera Tipo 4 (Figura 5C) é de coloração marrom, sendo empregada em quase toda sua totalidade na produção de papel carbono e em embalagens de papelão [17].

Figura 5. Amostras de cera de carnaúba em sua forma industrializada. (A) Cera de Carnaúba do Tipo 1; (B) Cera de Carnaúba do Tipo 3; (C) Cera de Carnaúba do Tipo 4.

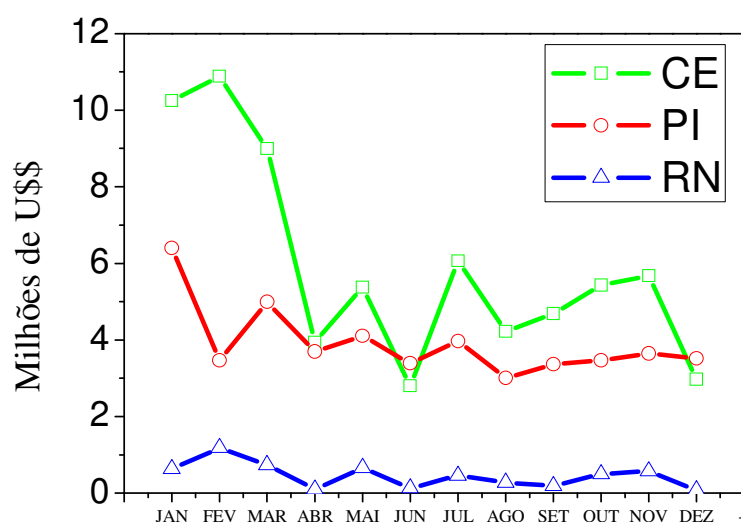


Fonte: O autor

Apesar de tantas formas de utilização da cera de carnaúba, esta continua sendo exportada na forma bruta, quando já poderia ser exportada na forma dos seus diversos derivados, que possuem maior valor agregado. Praticamente toda a cera produzida no Brasil (quantidade superior a 95%) é exportada na sua forma bruta. Nos países importadores, a cera de carnaúba passa por transformações, tornando-se componente de diversos produtos comercializados no mundo inteiro. Esse fato indica a necessidade do desenvolvimento tecnológico em nosso país, de modo que possibilite a transformação da cera em seus derivados, ainda em território nacional. O domínio tecnológico brasileiro ocorre somente sobre produtos de limpeza e de polimento de assoalhos e automóveis, destinados ao mercado interno e, mais recentemente, sobre a emulsão para conservação de frutos. Dessa forma, estudos que venham a contribuir com o conhecimento da composição química desse material são de fundamental importância para melhoria do setor e podem contribuir para agregar valor à cera de carnaúba [17].

No contexto de produção industrial de cera de carnaúba, o estado do Ceará se destaca. Os ganhos em termos de exportação alcançam cifras milionárias, o que torna o setor da cera de carnaúba um dos mais importantes dentro da pauta de exportação do estado. A Figura 6 apresenta uma comparação relativa às exportações de cera refinada por parte dos três principais estados produtores de cera. Observa-se que os ganhos do Ceará são superiores aos demais estados produtores durante todo o ano em que foi feito o levantamento. Assim, Ceará se destaca como maior comercializador de cera, ficando à frente do Piauí e Rio Grande do Norte.

Figura 6. Dados econômicos da movimentação anual do setor de cera de carnaúba dos estados Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte no ano de 2012.



Fonte: Gráfico gerado pelo autor a partir de dados disponibilizados pela FIEC em 2012 [16].

Somente no estado do Ceará existem atualmente cerca de 7 polos de produção e beneficiamento de pó cerífero, como pode ser observado na Figura 7. Pode-se observar que o Polo Metropolitano (7 municípios), Polo Litoral Leste (12 municípios) e polo Sobral (22 municípios) são responsáveis pela produção, individualmente, de quantidades superiores a 2000 toneladas de pó cerífero. O estado do Ceará possui atualmente nove indústrias refinadoras de cera de carnaúba, sendo sete delas situadas na região metropolitana, 1 no polo Litoral Leste e outra no polo Litoral Aracati.

Figura 7. Mapa de produção de pó e cera de carnaúba no estado do Ceará.



Fonte: FIEC – Federação das Indústrias do estado do Ceará [12].

2.2 Análise de Cera de Carnaúba

No Brasil a ABNT é responsável pelas normas que regem os parâmetros de avaliação da cera. Em geral, o controle de qualidade é feito com base nos seguintes parâmetros: faixa de fusão (USP 24), impurezas insolúveis (AMERWAX), substâncias voláteis (ASTM D95-62), índice de acidez (USP 24), índice de ésteres e saponificação (USP 24), impurezas orgânicas voláteis (USP 24), cor (USP 24), resíduos de ignição e metais pesados (USP 24) [18]. Estes parâmetros são utilizados para atestar a qualidade das ceras produzidas. Todavia, a grande maioria dos ensaios acima descritos não são capazes de diferenciar as ceras. Nem mesmo os ensaios para cor, dependendo da forma de comercialização (pulverizada por exemplo), são capazes de mostrar as diferenças químicas entre as ceras. Assim, faz-se necessário a elaboração de estratégias capazes de discriminar quimicamente os tipos de cera de carnaúba por meio da caracterização dos componentes químicos presentes e contribuindo para criação de um padrão de qualidade da cera de carnaúba.

A nível de pesquisa acadêmica, podem ser encontrados diversos estudos relacionados à composição orgânica da cera de carnaúba. De maneira geral, utilizam-se técnicas de separação como, por exemplo, cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM). Asperger et. al. [19 e 20] utilizaram CG-EM para a

caracterização de ceras naturais, dentre elas cera de carnaúba do Tipo 1, após diferentes formas de preparo da amostra. Foram identificadas diversas substâncias, com destaque para ésteres de ácidos graxos de cadeia longa com números pares de átomos de carbono; álcoois de cadeia longa (C22 – C34) com predominância de mono álcoois (C30 a C32). Os métodos desenvolvidos apresentaram boa capacidade para identificação dos compostos orgânicos. Todavia, o método de pirólise não possibilitou, possivelmente em função da elevada temperatura – 800°C, a identificação dos ácidos graxos na cera de carnaúba.

Wang *et. al.* [21] desenvolveram um método de análise empregando pirólise (Py-CG-MS) para identificação da composição orgânica de ceras de carnaúba do Tipo 1 e 4. Vários compostos foram identificados, dentre eles ácidos graxos de cadeia longa, hidroxiácidos, álcoois superiores e dióis. Com base nas intensidades relativas dos picos, a composição química das ceras de carnaúba foi determinada com menos de 2% desvio padrão relativo e sem a utilização de pré-tratamentos de amostras, o que pode ser destacado como um ponto positivo do trabalho, pois evita a manipulação da amostra, reduz custos com reagentes e ainda praticamente elimina a geração de resíduos.

Desta maneira, os trabalhos apresentados anteriormente são relacionados à elucidação da constituição orgânica das ceras de carnaúba. Todavia, estes trabalhos não dão ênfase à comparação das composições dos diferentes tipos de cera (Tipos 1, 3 e 4), uma vez que tratam basicamente da chamada cera amarela (*Carnauba Yellow Wax*), como é conhecida também a cera do Tipo 1. O estudo comparativo entre os tipos de cera é importante, podendo evidenciar quais os componentes químicos inerentes a cada tipo de cera. Esse pode vir a ser mais um parâmetro de qualidade da cera de carnaúba. Tal estudo também pode elucidar a razão da diferença de coloração entre as mesmas. Como suas propriedades são dependentes de sua composição, o entendimento da constituição química das ceras torna possível a realização de trabalhos que visem, por exemplo, a conversão de um tipo de cera de carnaúba no outro, pela adição ou remoção de um ou mais constituintes.

Outra caracterização importante que deve ser feita consiste na determinação dos constituintes inorgânicos neste tipo de material. Na revisão bibliográfica realizada neste trabalho no período de 1930 a 2014, não foram encontrados estudos de espécies inorgânicas em cera de carnaúba, fato que reforça a necessidade do desenvolvimento de procedimentos adequados para quantificação dos teores das espécies inorgânicas. O estudo qualitativo e quantitativo de inorgânicos pode ser utilizado no estabelecimento

de normas regulamentadoras, contribuindo para o estabelecimento de níveis de aceitação de concentração, tendo em vista os diversos setores que venham a utilizar cera de carnaúba. Isso porque as ceras são comumente empregadas em indústrias alimentícias, como por exemplo, na cobertura de frutos para melhor conservação do mesmo.

Para este tipo de caracterização, técnicas espectrométricas são amplamente empregadas. Essas técnicas, geralmente, necessitam da completa decomposição das amostras, de forma que metodologias de preparo de amostras utilizando combinações de reagentes oxidantes com aquecimento são amplamente empregadas [22, 23 e 24]. Para auxiliar na compreensão dos resultados obtidos, que devido ao avanço da instrumentação analítica tem permitido a aquisição de uma grande quantidade de dados, ferramentas estatísticas são de grande importância no entendimento do comportamento químico e nas características dos diferentes tipos de ceras.

2.3 Quimiometria: Análise Multivariada de Dados em Química

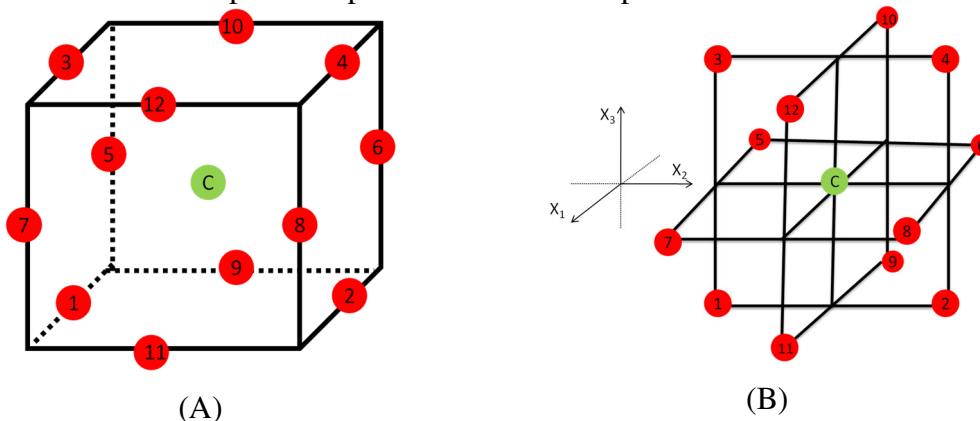
A Quimiometria possui um papel importante na classificação de amostras de cera de outras origens. A ferramenta quimiométrica, associada a dados de natureza espectral, pode prover informações úteis, que outrora não se apresentavam tão evidentes. Korn *et. al* [25] compararam diferentes procedimentos de preparo de amostra para determinação de elementos traço em amostras de própolis obtidos a partir de cera de abelha por ICP OES. Após otimização das condições de preparo e determinação dos teores de elementos traço, foi utilizada análise de componentes principais baseada nos teores de elementos inorgânicos, a qual permitiu avaliar as semelhanças e diferenças entre amostras de diferentes regiões do estado da Bahia.

A Quimiometria [26] pode ser definida como uma especialidade da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar experimentos de forma otimizada, fornecendo o máximo de informação química com a análise e interpretação dos dados obtidos [27]. A Quimiometria pode ser dividida em duas vertentes: a primeira consistindo na elaboração e planejamento de experimentos e a segunda no tratamentos de dados multivariados.

2.3.1 Planejamento Experimental

Alguns planejamentos experimentais podem ser destacados, como por exemplo o planejamento composto central (CCD, do inglês Central Composite Desing) [28], Box Behnken [29] ou ainda o Planejamento Doehlert [30]. Dentro desta perspectiva, o planejamento Box-Behnken ou simplesmente BBD (do inglês, Box-Benhken Design) apresenta-se como uma importante ferramenta para otimização de condições experimentais. O BBD baseia-se em um planejamento fatorial incompleto em três níveis. Para três fatores a representação gráfica pode ser vista na Figura 8, onde o ponto C refere-se ao ponto central e os pontos numerados de 1 a 12 correspondem aos pontos médios das arestas do cubo. O número de experimentos (N) requeridos para o desenvolvimento de um BBD pode ser definido pela equação $N = 2K(K-1) + C_o$, onde K refere-se ao número de fatores e C_o ao número de pontos centrais.

Figura 8. Visualizações do planejamento: (A) Cubo para um BBD com o ponto central. (B) Encontro de três superfícies para um BBD com o ponto central.

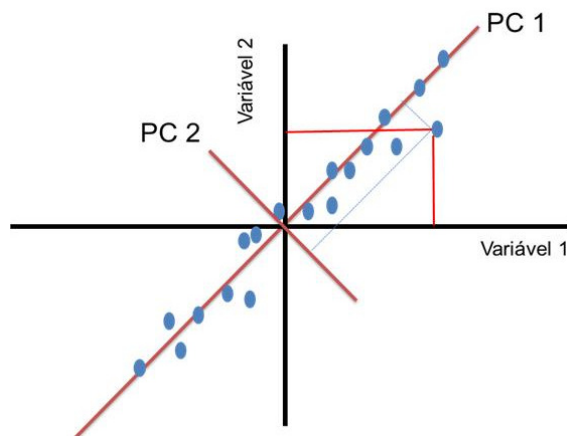


2.3.2 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA) [31] consiste em um método matemático de tratamento de dados que permite extrair, de um determinado conjunto de dados, informações relevantes para o seu entendimento. O novo conjunto de dados é constituído a partir das combinações lineares dos dados originais, gerando um modelo espacial multidimensional com variáveis ortogonais entre si organizadas em ordem decrescente de variância descrita. Assim, cada componente principal age como um vetor direcionado para a região de maior variabilidade dos dados, e as coordenadas de cada amostra neste novo espaço variável constituem os escores para a PC [32]. A

representação gráfica bidimensional de um conjunto de dados pode ser observada na Figura 9 a seguir.

Figura 9. Primeira e segunda componentes principais para um conjunto de dados hipotéticos em um espaço bidimensional.

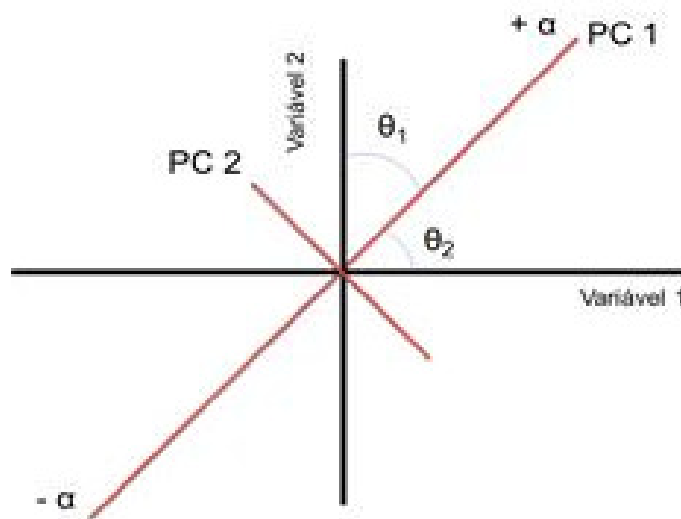


A maior variabilidade nos dados é explicada pela primeira componente principal, sendo essa quantidade reduzida a cada nova componente adicionada até que toda a variabilidade residual seja descrita em função do conjunto formado pelas novas componentes. A projeção de cada amostra i ($i = 1, 2, \dots, n$) neste novo sistema de eixos fornece o gráfico de escores, e cada amostra terá o valor de escores para cada um dos novos eixos (componentes principais). Assim, um gráfico de escores entre PCs pode ser utilizado para evidenciar agrupamentos ou tendências entre as amostras analisadas.

A relação entre as variáveis originais e as novas componentes é dada pelos pesos, que na prática representam a medida da importância de cada variável na i -ésima componente principal (CP_i), ou seja, o peso que cada combinação linear tem na componente. Estes pesos são dados em função do cosseno do ângulo formado entre o eixo da componente principal e o eixo da variável original, encontrando-se sempre um valor entre +1 e -1, como pode ser observado na Figura 10.

Assim, quanto mais próximo de ± 1 estiver o valor, maior será a influência que esta variável apresenta sobre a descrição desta componente principal.

Figura 10. Representação dos *pesos* como cossenos dos ângulos formados entre as componentes principais e as variáveis.



2.3.3 Calibração Multivariada

A calibração multivariada tem por objetivo básico correlacionar dois conjuntos de dados (X e Y) para estabelecer uma relação quantitativa, de forma que X (matriz $n \times m$) é o conjunto dos dados experimentais de variáveis independentes e Y é o conjunto de dados formado pelas variáveis dependentes. Assim, ao contrário do que é feito em uma calibração univariada, múltiplas respostas podem ser utilizadas para o estabelecimento de uma relação com as propriedades medidas de um conjunto de amostras [33].

A calibração multivariada pode ser dividida em duas etapas. Na primeira, dita etapa de modelagem, são estabelecidas as relações entre o sinal medido e as propriedades que se desejam quantificar nas amostras. A etapa seguinte consiste na validação do modelo, onde o mesmo é testado com um conjunto de amostras para assegurar que os valores obtidos para a variável dependente são iguais ou muito próximos dos experimentais. A validação pode ser feita utilizando um conjunto de amostras externo ou ainda por meio de validação cruzada. No primeiro caso o conjunto de dados é dividido em dois subconjuntos, um de calibração e outro de validação. O modelo é construído usando as amostras do conjunto de calibração e depois é validado utilizando o conjunto com as amostras restantes. Os resultados obtidos para a variável dependente nesta etapa são comparados aos valores experimentais, sendo então feito o cálculo do erro experimental. A eficácia do modelo construído é maior quão menor forem os resíduos encontrados. A raiz quadrada do erro médio quadrático de validação

cruzada (RMSECV) é um dos parâmetros utilizados para avaliar a capacidade preditiva dos modelos de calibração, sendo obtido de acordo com a equação 1 vista a seguir.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{cal}} (y_{i,cal} - \hat{y}_{i,cal})^2}{n_{cal}}} \quad (1)$$

Nesta equação, n_{cal} se refere ao número de amostras do conjunto de calibração, $y_{i,cal}$ é o valor do parâmetro de interesse da i -ésima amostra do conjunto de calibração e $\hat{y}_{i,cal}$ é o valor do parâmetro estimado pelo modelo [33].

Após as etapas de construção e validação do modelo de calibração, com auxílio de um método de referência, o modelo pode ser utilizado para prever a variável Y nas amostras desconhecidas. Esta etapa chamada de previsão tem por objetivo avaliar a capacidade do modelo na previsão de novas amostras, por meio do erro médio quadrático de previsão (RMSEP). A equação 2 a seguir demonstra a forma de cálculo do erro médio quadrático de previsão.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{prev}} (y_{i,prev} - \hat{y}_{i,prev})^2}{n_{prev}}} \quad (2)$$

Existem diversos métodos matemáticos para realização de uma calibração multivariada, tais como Regressão Linear Múltipla (MLR), Regressão por Componentes Principais (PCR) e os métodos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – do inglês, *Partial Least Square*).

2.3.3.1 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

Um dos métodos de calibração multivariada mais utilizados é a chamada regressão por mínimos quadrados parciais [31]. De maneira análoga à análise de componentes principais, o PLS decompõe as matrizes de dados \mathbf{X} e \mathbf{Y} de maneira que cada componente do modelo sofra uma pequena mudança ao buscar a máxima covariância entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} , sendo que cada componente do modelo recebe, em função disto, a denominação de Variável Latente.

Os modelos gerados a partir das matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} buscam as variáveis latentes em \mathbf{X} que melhor predizem as variáveis em \mathbf{Y} . Dessa forma a regressão apresenta como característica principal a utilização de um maior número de informações de cada amostra utilizada, reduzindo o erro da análise ao passo que permite múltiplas determinações, mesmo na presença de espécies interferentes. Assim, torna-se possível

representar a matriz de dados, sem a perda de informação estatística útil, pela sua matriz de escores, com a vantagem de não haver correlação entre as suas variáveis. Nesse processo é necessário encontrar o melhor número de variáveis latentes, o que normalmente é feito utilizando a validação cruzada, onde determina-se o erro mínimo de previsão [34].

2.3.4 Processamento dos dados espectrais

O tratamento dos dados espectrais é aplicado antes da etapa de calibração tendo por objetivo melhorar a eficiência de previsão do modelo. Diversos pré-processamentos espectrais têm sido relatados na literatura, como por exemplo: normalização, correção de linha de base, 1º e 2º derivadas, smoothing (alisamento), correção multiplicativa de sinal dentre outros.

2.3.4.2 Dados centrados na média

Consiste em fazer com que para cada variável seus valores tenham média zero. Isto é feito, obtendo-se para cada coluna o valor médio e, em seguida, subtraindo-se este valor de cada variável dessa mesma coluna. Desta forma, ocorre mudança do sistema de coordenadas para o centro dos dados. A equação 3 abaixo é utilizada para centrar os dados na média:

$$x_{(i,j)cm} = x_{(i,j)} - \bar{x}_j \quad (3)$$

Onde $x_{(i,j)cm}$ corresponde ao valor centrado na média para a variável j na amostra i ; $x_{(i,j)}$ é o valor da variável j na amostra i ; \bar{x}_j é a média das amostras na coluna j , calculado pela equação 4 a seguir, onde n é o número de amostras.

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{(i,j)} \quad (4)$$

2.3.4.3 Aplicação de derivadas

A aplicação da primeira ou segunda derivada sobre os dados espectrais brutos consiste em um procedimento que pode realçar detalhes como ombros espectrais, bem como minimizar o efeito de inclinações provocadas na linha de base dos espectros, devido à morfologia das partículas. Ao aplicarmos as operações de derivação aos espectros, as informações contidas ao longo dos diferentes comprimentos de onda são geralmente acentuadas. Não só os sinais espectrais, mas também os ruídos tornam-se

acentuados, portanto, deve-se ter cuidado com a qualidade dos espectros com os quais se deseja aplicar o cálculo das derivadas.

2.3.4.4 Correção do espalhamento de luz

O método de correção multiplicativa de luz MSC (do inglês, *Multiplicative Scatter Correction*) é um método utilizado muito utilizado em leituras de refletância difusa quando ocorrem variações nos espectros NIR obtidos, pois corrige o efeito da dispersão da luz, causada pela heterogeneidade das amostras ou ainda diferença no tamanho das partículas. Consiste no cálculo de um espectro médio referente a todos os espectros presentes no conjunto de calibração. Posteriormente, cada espectro da amostra i (X_i) é transformado de acordo com Equação 5, onde X_i' representa o espectro transformado para a amostra i e os coeficientes u e v são escolhidos de modo a que a diferença entre o espectro transformado e o espectro médio seja mínima.

$$X_i' = u + vX_i \quad (5)$$

No desenvolvimento dos modelos de calibração, tem-se observado que este método MSC reduz o número de fatores necessários, simplificando o modelo de calibração e aumenta a linearidade.

2.3.5 Espectroscopia na região do infravermelho próximo

A região espectral abrangida pelo infravermelho pode ser dividida em três faixas distintas: infravermelho próximo (NIR, 780 – 2500nm), médio (MIR, 2500 – 5000 nm) e distante (FIR, 5000 – 100000 nm) [35].

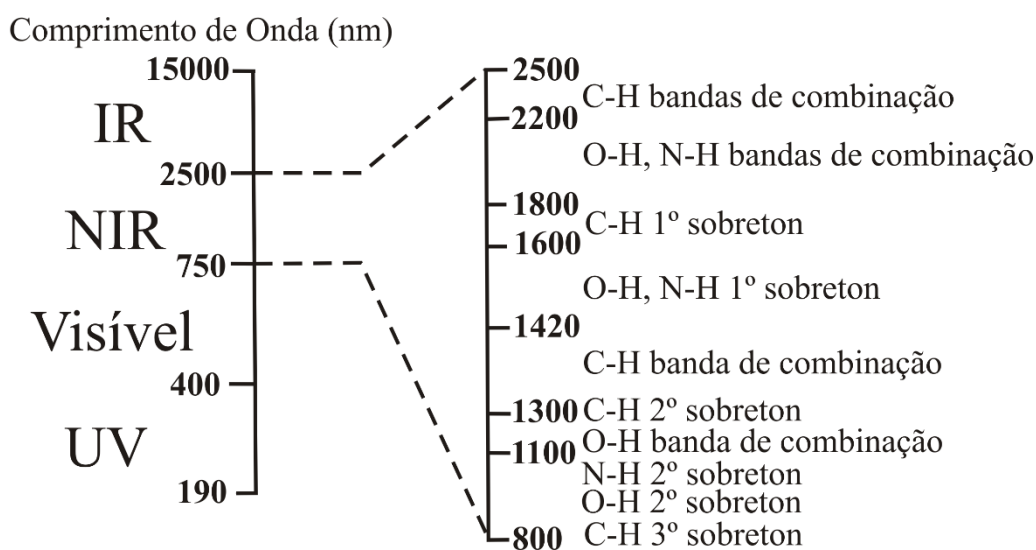
Dentre as diversas maneiras de se obter os espectros na região do infravermelho, pode-se destacar o modo de refletância difusa, já bem fundamentada na literatura [36 e 37]. Esse modo de obtenção dos espectros apresenta a grande vantagem de ser realizado sem procedimentos de tratamento da amostras.

Para que haja absorção da radiação IV é necessária que a molécula apresente variações no momento dipolo como consequência do movimento vibracional ou rotacional. O estiramento está relacionado à mudança na distância interatômica ao longo do eixo de ligação entre dois átomos podendo ser simétrico ou assimétrico. Já as vibrações de deformações angulares são causadas pela mudança do ângulo entre as duas

ligações, podendo também ser simétricas (deformações no plano ou fora do plano) ou assimétricas (torção fora do plano ou tesoura) [38].

Ambos os fenômenos estão presentes em grande intensidade associada com ligações que envolvem o átomo de hidrogênio e algum outro elemento mais eletronegativo, como carbono, nitrogênio e oxigênio. Assim, ligações O-H, C-H, N-H e ainda S-H tendem a apresentar alta anarmonicidade e alta energia de ligação com transições vibracionais fundamentais na região de 3000 – 4000 nm. Por conseguinte, permite o surgimento dos sobretons e combinações de vibrações fundamentais de tais ligações que ocorrem na região de energia associado com fótons NIR. As intensidades estão entre 10 no caso de bandas de combinações, até 1000, por sucessivas vezes, conotação menor do que o resultante da absorção fundamentais vibrações. E contribui para a complexidade do espectro NIR. A Figura 11 apresenta as principais absorções observadas na região do NIR [38].

Figura 11. Resumo das principais absorções observadas na região do infravermelho próximo.



Fonte: O autor.

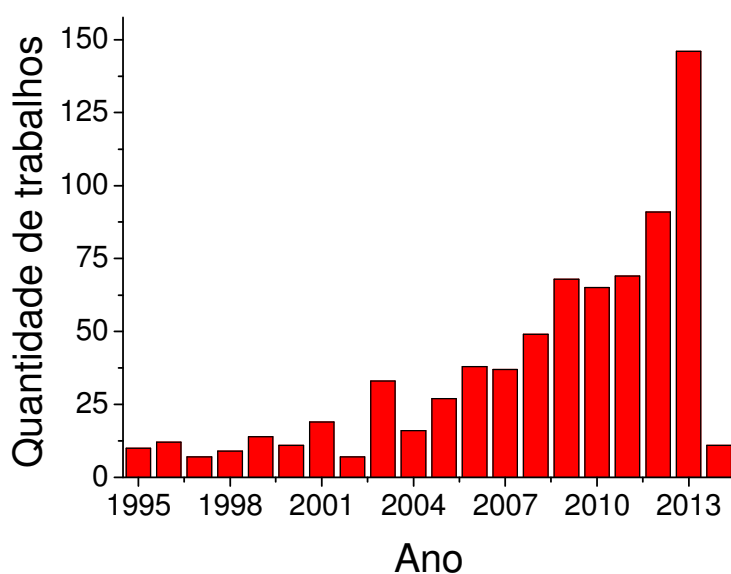
2.4 Quantificação de inorgânicos utilizando modelos PLS/NIR

A Espectroscopia NIR vem sendo amplamente empregada para análise de rotina em diversos segmentos analíticos como agroindústria, indústria química, farmacêutica, têxtil, polímeros, cosméticos e etc. Além das diversas vantagens conhecidas, esta técnica tem se tornado ainda mais poderosa quando associada a

ferramentas quimiométricas de calibração que converta informação espectral (absorção NIR) em um método de informação de referência. A espectroscopia NIR tem sido utilizada para determinação de diversos parâmetros de interesse, incluindo macro e micro elementos em vários produtos [39]. Todavia, a determinação de compostos inorgânicos se apresenta como um grande desafio quando comparada com a análise de orgânicos, pois não há uma relação direta entre o analito inorgânico e as bandas de absorção nesta região espectral [40].

Um levantamento bibliográfico feito utilizando as palavras chave “*minerals and PLS/Near Infrared Spectroscopy*” no portal *Science Direct*, mostra um aumento significativo na quantidade de publicações relacionadas ao tema nos últimos 20 anos, mostrando que esta é uma linha de pesquisa em plena expansão da atividade científica. Os dados podem ser visualizados na Figura 12 a seguir.

Figura 12. Quantidade de trabalhos publicados versus o ano da publicação para os termos “Minerals” e “PLS/Near Infrared Spectroscopy” no Portal Science Direct.



Fonte: o autor.

Uma das explicações abordadas na literatura para explicar a possibilidade de associação entre teores de elementos inorgânicos e a Espectroscopia NIR tem sido a associação entre essas espécies e alguns grupos funcionais presentes na matriz da amostra, fato que provocaria pequenas alterações nas bandas, como por exemplo efeito sobre a banda da ligação O-H em função da formação de quelatos. Desta forma, para

que seja possível estimar a presença destes elementos nas misturas, ferramentas quimiométricas tornam-se indispensáveis para interpretação dos dados espectrais obtidos.

Cozzolino *et. al.* [41] desenvolveram modelos para quantificação de Ca, K, Mn, Mg, P, S e Fe por ICP OES e Espectroscopia NIR e Quimiometria em amostras de bagas de uva. Os espectros foram pré-processados utilizando MSC previamente à construção dos modelos de calibração utilizando regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e validação cruzada. Os coeficientes de determinação na validação cruzada (R^2) e o erro de validação cruzada (SECV) foram obtidos para Fe (0,60 e 1,49 mg kg⁻¹), Mn (0,71 e 0,41 mg kg⁻¹), Ca (0,75 e 60,89 mg kg⁻¹), Mg (0,84 e 12,93 mg kg⁻¹), K (0,78 e 285,34 mg kg⁻¹), P (0,70 e 40,19 mg kg⁻¹), S (0,88 e 14,45 mg kg⁻¹) e CE (0,87 e 7,66mS). Os modelos de calibração desenvolvidos se mostraram adequados para determinação de Mg, S e Ca nas amostras de bagas de uva.

González-Martín *et. al.* [42] estudaram a viabilidade de aplicação de um método de calibração multivariada utilizando espectroscopia NIR para determinação de Ca, P, Mg, K e Na em amostras de queijo. A técnica de referência utilizada foi ICP OES. Para obtenção dos espectros de foi utilizada uma prova de fibra ótica. Previamente à construção dos modelos de calibração os espectros foram tratados utilizando 2º derivada e a ferramenta de calibração multivariada foi PLS. Cerca de 227 amostras de queijo foram utilizadas sendo 170 utilizadas para construção do modelo e 57 para validação externa do mesmo. O coeficiente de correlação múltipla (RSQ) e o erro de previsão foram obtidos para Ca (0,74 e 0,64 g kg⁻¹), P (0,69 e 0,29 g kg⁻¹), K (0,86 e 0,13 g kg⁻¹), Na (0,92 e 0,71 g kg⁻¹) respectivamente. Já para Mg (0,72 e 30.9 mg kg⁻¹). De acordo com os autores, os modelos podem ser utilizados para o monitoramento destas espécies em amostras de queijo com até seis meses de amadurecimento.

Ruano-Ramos *et. al.* [43] avaliaram a capacidade do uso de espectroscopia no infravermelho próximo para determinação de P, K, Ca e Mg em amostras de vegetais coletados em diferentes locais do centro-oeste da Espanha. Os métodos de referência utilizados foram colorimetria para determinação de P e espectroscopia de absorção atômica para a quantificação de K, Ca e Mg. O método empregado apresentou acurácia adequada para estimar os teores dos elementos avaliados. Diferentes tratamentos espectrais foram empregados, todavia os melhores resultados foram obtidos para aplicação de 1º derivada.

Huang *et. al.* [44] desenvolveram uma metodologia para determinação de traços de Pb²⁺ em amostras de água após pré-concentração e análise por espectroscopia

NIR. O metal foi quelado em resina comercial (D401) em uma coluna de vidro. As amostras de água foram passadas através desta coluna à vácuo. Após esta etapa a resina foram obtidos os espectros NIR na faixa de 820 a 2500 nm. Para reutilização da coluna, a mesma foi regenerada utilizando 30 mL de solução HCl 4,0 mol L⁻¹. Foram obtidas apenas 25 amostras de efluente contendo Pb²⁺, com concentrações entre 0,03 a 6,00 mg L⁻¹. Foram avaliados dois tipos de pré-processamento dos dados espectrais: MSC e SNV. Os autores argumentam que as duas formas de pré-processamento fornecem resultados muito semelhantes, escolhendo assim o tratamento usando MSC. Todavia, os valores de RMSEP para os modelos desenvolvidos deveriam ter sido apresentados para reforçar a escolha do melhor pré-processamento espectral. Assim, o modelo desenvolvido apresentou RMSEP de 0,4777 mg Pb²⁺ L⁻¹. A região espectral que apresentou correlação mais significativa para determinação do elemento foi entre 1006 a 1383 nm, que está associada a formação do quelato de Pb²⁺ com o grupo funcional – N(CH₂COOH)₂.

Reeves III e Smith [45] determinaram os teores de macro e micro elementos em amostras de solos. Os teores de Ag, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Ce, Cs, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, La, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Nb, Ni, P, Pb, Rb, S, Sb, Sc, Sn, Sr, Te, Th, Ti, Tl, U, V, W, Y and Zn foram determinados por ICP-MS e ICP-AES. Os teores de Hg foram determinados usando CV-AAS e Se por HG-AAS. Os espectros NIR foram coletados na faixa de 700 a 2500 nm por refletância difusa de cerca de 720 amostras de solos. As faixas de concentração das espécies, de um modo geral, estão abaixo de 0,1% (1000 ppm). Os modelos de calibração utilizando PLS MID e NIR foram desenvolvidos e apresentaram potencial para diferenciação de solos contendo teores de alguns elementos (Co, Cr e Ni) superiores a 100 mg Kg⁻¹, e ainda solos com baixos teores (< 50mg Kg⁻¹).

Cozzolino *et. al.* [46] propuseram uma metodologia utilizando espectroscopia VIS-NIR (400 a 2500nm) para previsão de Ca, K, Mg, P, Na, S, Fe, B e Mn em amostras de vinho produzidos na Austrália. Foram coletadas cerca de 32 amostras de vinho branco e 94 amostras de vinho tinto. As amostras de vinho branco eram subdivididas em vinhos produzidos a partir de quatro tipos de uvas, enquanto o conjunto de amostras de vinho tinto era subdividido em vinhos fabricados a partir de três tipos de uvas. Os teores dos elementos inorgânicos nas amostras de vinho foram determinados por ICP-MS após digestão das amostras utilizando uma mistura de HNO₃ e HCl. As amostras de vinho foram divididas em dois conjuntos: calibração (n = 63) e validação (n = 63). Os espectros foram submetidos a um complexo pré-tratamento

envolvendo aplicação de segunda derivada com filtro Savitzky-Golay seguido de smoothing (janela de cinco pontos e polinômio de segunda ordem). Após este ainda foi aplicado o pré-processamento SNV ao conjunto de dados, com o objetivo de remover os efeitos de espalhamento em função da matriz da amostra. O número de variáveis latentes obtido variou de 1 a 8, consistindo em valores muito baixos ou muito altos de novas componentes. Os erros de previsão (SEP) obtidos variaram de $0,55 \text{ mg L}^{-1}$ (para Fe) até 152 mg L^{-1} (para K). Estes valores dependem, obviamente, da faixa de concentração das amostras que foi utilizada na etapa de calibração. Quanto maior a faixa de concentração utilizada, maior será o erro de previsão. Contudo, os autores do trabalho destacam as relações obtidas entre os espectros NIR e a concentração dos elementos avaliados. Todavia, o método ainda não apresenta confiabilidade analítica para determinação quantitativa em uma rotina de laboratório e melhorias devem ser feitas como por exemplo a aquisição de novas amostras.

Rossel *et. al.* [47] propuseram um método para determinação de composição mineral e orgânica baseado no uso de UV-vis-NIR. Os minerais avaliados foram Caulinita, Ilita, Esmeclita, Goetita e Quatzo. Os analitos orgânicos foram os ácidos Húmico e Flúvico. As amostras utilizadas para construção dos modelos foram artificiais, ou seja, foram preparadas por meio da mistura de diferentes porcentagens dos minerais originais. Os espectros foram coletados na faixa de 200 a 2600nm. O número de variáveis latentes foi de no máximo 5 (para os ácidos orgânicos) para os modelos PLS desenvolvidos. Os erros médios quadráticos de previsão (RMSEP) foram de 0,028 a 0,142%. De acordo com os autores, os modelos desenvolvidos para caulinita, ilita e esmeclita apresentaram capacidade preditiva, o que não foi observado para os demais parâmetros em estudo.

Blanco e Villaescusa [48] avaliaram o potencial de utilização da espectroscopia NIR para determinação indireta de parâmetros físico-químicos (viscosidade e ponto nuvem) e químicos (acidez e alcalinidade) durante o processo de fabricação, com o objetivo de acompanhar a evolução da reação de formação das mesmas. Um total de 270 amostras foram obtidas, sendo 179 amostras obtidas em diferentes estágios do processo industrial e outras 91 amostras simuladas em bancada de laboratório. Todos os parâmetros avaliados são normatizados pela ASTM. Os espectros foram obtidos na região entre 700 e 2500 nm com uma média de 30 varreduras por espectro. Os pré-processamentos espectrais empregados foram 1º e 2º derivadas usando Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela de 19 pontos. Os pré-tratamentos

variaram de acordo com o tipo de parâmetro utilizado. Para a construção dos modelos de calibração foi utilizado PLS1. As faixas dos parâmetros avaliados foram: acidez (106,4 a 138,0 mg KOH g⁻¹), alcalinidade (74,7 a 102,5 mg KOH g⁻¹), viscosidade (2,95 a 8,67 stokes) e Ponto Nuvem (129,0 a 207,0°C). Os valores de RSEP (Erro padrão relativo de previsão) foram de 1,6% (Acidez), 2,5% (Alcalinidade), 5,7% (Viscosidade) e 3,5% (Ponto Nuvem). Com isso, a metodologia se mostrou eficiente para determinação dos parâmetros avaliados durante o processo de síntese da resina em questão, de modo que os valores dos erros obtidos nas etapas de previsão foram baixos.

Diversos outros trabalhos podem ser encontrados na literatura reportando a determinação que espécies ou parâmetros de maneira direta ou indireta por meio de espectroscopia NIR, como por exemplo na análise de espécies inorgânicas em amostras de alimentos [49], bebidas [50 e 51], biocombustíveis [52] e solos [53], dentre outras aplicações que podem ser encontradas na literatura.

Capítulo 3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo buscar novos parâmetros de classificação para diferenciar as ceras de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4 produzidas no estado do Ceará.

3.2 Objetivos Específicos

➤ Investigar as características dos diferentes tipos de ceras de carnaúba utilizando técnicas de caracterização como Espectroscopia no Infravermelho, Análise Térmica e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas;

➤ Utilizar planejamento experimental (BBD - Box-Behnken Design) para otimizar as condições de preparo de amostra de cera de carnaúba por via úmida assistido por radiação micro-ondas;

➤ Quantificar os teores de Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Na, Pb e Zn nos diferentes tipos de cera de carnaúba por ICP OES;

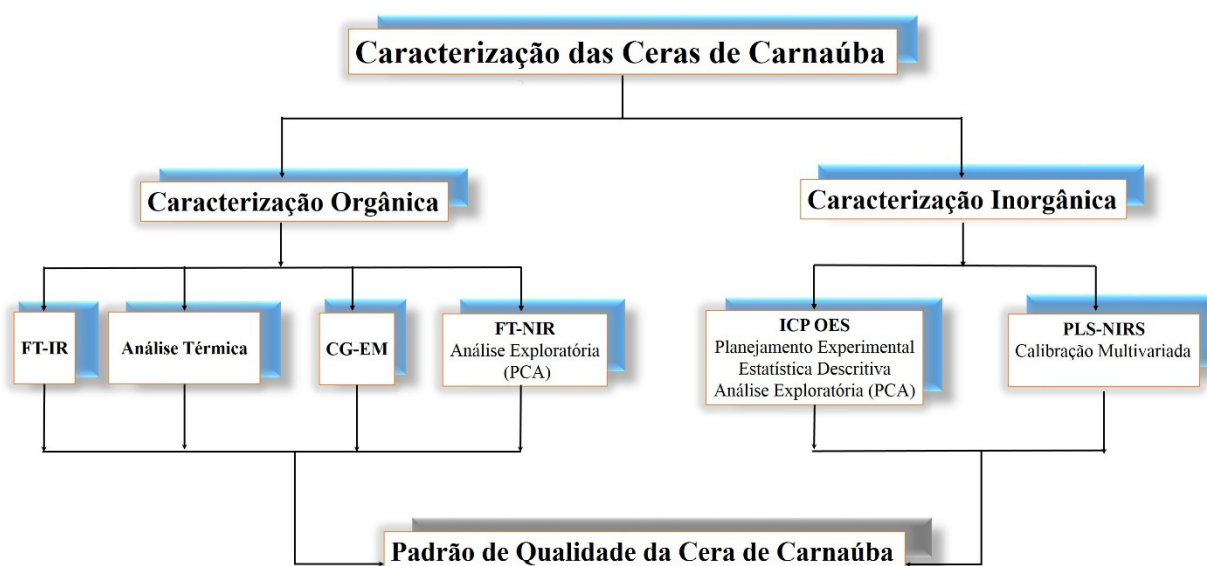
➤ Utilizar ferramentas de análise de agrupamentos para estudar o comportamento das amostras de cera de carnaúba em função dos teores dos elementos inorgânicos;

➤ Construir modelos de calibração multivariada (PLS) utilizando os espectros NIR de amostras de ceras de carnaúba para elaboração de um método de previsão dos teores de inorgânicos nas amostras em estudo.

Capítulo 4. Materiais e Métodos

O fluxograma apresentado na Figura 13 descreve a sistemática utilizada para caracterizar as amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4. Inicialmente foi feito um estudo para caracterização orgânica das amostras de cera de carnaúba utilizando Cromatografia Gasosa, Análise Termogravimétrica FT-IR e FT-NIR. Em seguida, foi realizado um estudo mais detalhado da constituição inorgânica das amostras de cera utilizando ICP OES, bem como por meio da associação de ferramenta quimiométrica de calibração multivariada com os espectros obtidos por FT-NIR.

Figura 13. Fluxograma de desenvolvimento da caracterização das amostras de cera de carnaúba dos Tipos 1, 3 e 4.



Fonte: o autor.

4.1 Reagentes e Soluções

Todas as vidrarias e frascos volumétricos utilizados neste trabalho foram previamente descontaminados em banho de HNO_3 10% v/v durante um período de 24h. Água deionizada ultrapura, com resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$ obtida por meio de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Estados Unidos), foi empregada para a realização das diluições de todas as soluções. Na decomposição das amostras foram utilizados HNO_3 P.A (63% p/v, Vetec) e H_2O_2 (30% p/v, Vetec). Os padrões foram preparados a partir de soluções estoque de referência para os elementos Alumínio (Al), Cálcio (Ca), Chumbo (Pb), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Magnésio (Mg),

Manganês (Mn), Níquel (Ni), Sódio (Na) e Zinco (Zn), contendo 1000 mg·L⁻¹ (Acros Organics). As curvas de calibração foram preparadas nas concentrações de 1,0, 5,0, 10,0 e 12,0 mg L⁻¹ para os elementos anteriormente descritos. As soluções da curva de calibração multielementar foram pipetadas utilizando micropipetas automáticas com volume fixo (10, 25 e 100 µL) e ajustável de 200 a 1000 µL. Foram preparados 25 mL de solução de calibração para cada padrão da curva, sendo as mesmas preparadas e armazenadas (a 4°C em geladeira) em tubos de centrifuga (Tipo Falcon®). Para a aferição destas soluções foi utilizada uma solução de HNO₃ 1% v/v. Para determinação da acidez residual foram utilizados Biftalato de Potássio P.A. (Synth) e Hidróxido de Sódio P. A. (Qhemis – São Paulo - Brasil).

4.2 Amostras

Foram adquiridos dois conjuntos de amostras dos tipos 1, 3 e 4. O primeiro conjunto de amostras foi adquirido ao longo dos anos de 2010 e 2011 por intermédio do SINDICARNAÚBA, perfazendo um total de 34 amostras referentes às safras dos respectivos anos. Essas amostras foram refinadas por cinco diferentes indústrias. Já o segundo conjunto contendo 90 amostras dos Tipos 1, 3 e 4 produzidas durante a safra do ano de 2012 foi fornecido por uma única indústria.

4.3 Procedimento Experimental

Inicialmente as amostras de cera de carnaúba foram avaliadas quanto a sua composição orgânica utilizando Espectroscopia no Infravermelho, Análise Térmica e Cromatografia Gasosa.

Um método para quantificação de elementos inorgânicos ICP OES foi desenvolvido e validado. Posteriormente foram adquiridos os espectros de infravermelho próximo (NIR) e, com auxílio de ferramentas de calibração multivariada foram obtidos modelos para associar os dados obtidos por ICP OES com os espectros de infravermelho próximo, permitindo assim a previsão dos teores dos analitos de um modo rápido e sem manipulação da amostra.

4.3.1 Espectros FT-IR

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos a partir de amostras dispersas em partilhas de brometo de potássio (KBr), utilizando-se um espectrômetro modelo FTLA 2000 - ABB, com janela espectral de 400 a 4000cm⁻¹.

4.3.2 Análise Térmica

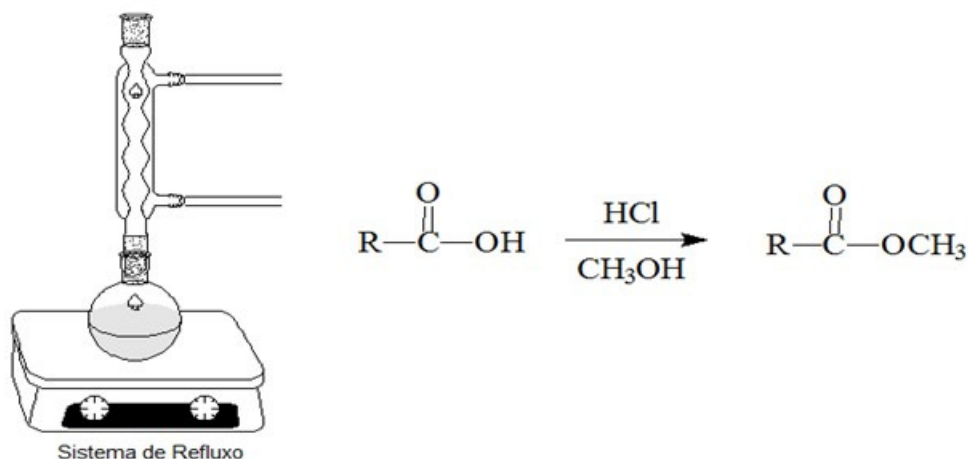
As análises térmicas das amostras de cera de carnaúba foram feitas utilizando sistema de termoanálise DSC-50, DTA-50 e TGA-50 (Shimadzu). As amostras de cera foram previamente trituradas em almofariz de porcelana descontaminados em banho de HNO₃ 10% durante 24 horas. Cerca de 10 mg de amostras de cera foram pesadas em cadinhos de platina. Os recipientes foram selados com auxílio de uma prensa para selar o cadinho, sendo submetidos a rampa de temperatura construída com uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ em atmosfera de argônio.

4.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Previamente à análise cromatográfica, cerca de 5,0 mg de cera foram submetidas a reação de esterificação (Figura 14) utilizando um sistema de refluxo por 2 horas numa solução de HCl/MeOH 10% na proporção 1:3, à temperatura de 65 °C, para o preparo de seus respectivos ésteres metílicos de ácidos graxos.

As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, em seguida, foram adicionados 10 mL de hexano, e a mistura foi transferida para um funil de separação. A fase orgânica foi separada e concentrada em evaporador rotatório. Os ésteres metílicos obtidos na fração orgânica foram submetidos à cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

Figura 14. Esquema do refluxo utilizado para realizar a reação de metilação dos ésteres de ácidos graxos presentes nas amostras de cera de carnaúba.



Fonte: O autor.

As análises cromatográficas foram realizadas em um Cromatógrafo Gasoso acoplado com espectrômetro de massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) Shimadzu, utilizando-se coluna capilar OV-5 (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 μm) e hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 280 °C, com temperatura inicial de 80°C, aumentando de 80 a 180 °C com taxa de 5 °C min^{-1} e de 180 a 280 °C com taxa de 10 °C min^{-1} . A temperatura final permaneceu em 280 °C por 8 minutos. A temperatura do detector foi de 280 °C, e a da interface do sistema CG-EM, de 280 °C. O detector de massas operou com ionização de chama por ionização eletrônica (70 ev) e varredura de massas de 30 a 600 Da. Foi injetado 1 μL de solução de cada amostra, e a identificação dos compostos foi feita por meio de comparação dos fragmentogramas com os existentes no banco de dados.

4.3.4 Digestão por via úmida assistida por micro-ondas de amostras de cera de carnaúba.

Na digestão por via úmida em sistema fechado utilizou-se um forno de micro-ondas Multiwave (Anton Paar, Áustria) equipado com rotor para 6 frascos de quartzo HP (do inglês, *High Pressure*).

Para otimização das condições de preparo de amostras de cera de carnaúba, foi utilizado um planejamento experimental do tipo Box Behnken, gerando um total de 15 experimentos, sendo 12 experimentos do cubo e um ponto central medido em triplicata. A resposta ou variável dependente escolhida consistiu no teor de carbono residual (RCC do inglês, *Residual Carbon Content*). Para validação dos resultados

análise de variância (ANOVA do inglês, *Analysis of Variance*) foi aplicada ao conjunto de dados obtidos. Metodologia de superfície de resposta (RSM do inglês, *Response Surface Methodology*) foi utilizada para obtenção das condições de operação do forno de micro-ondas que fornecessem digeridos com os menores teores de carbono residual, no menor tempo de reação e com as menores quantidades de reagentes. As variáveis independentes estudadas foram o volume de HNO_3 , a potência máxima de irradiação e o tempo de permanência nesta potência.

Após as etapas de otimização, o procedimento final de digestão de amostras de cera de carnaúba consistiu na utilização de 250,0 mg de amostra e uma mistura oxidante (1,0 mL de H_2O_2 e 2,5 mL de HNO_3). O material foi pesado sobre papel manteiga e transferido para o frasco de digestão do micro-ondas. O programa utilizado após a otimização pode ser observado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Programa de aquecimento utilizado no forno de micro-ondas para preparação das amostras de cera de carnaúba.

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)
1	100 – 500	5
2	800	15
3	0	15

Após a etapa de preparo das ceras, foram determinados os valores da acidez residual final dos digeridos, por meio de titulação utilizando solução de NaOH previamente padronizada com uma solução de Biftalato de Potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. No preparo da solução do padrão primário, o biftalato foi previamente seco em estufa a uma temperatura de cerca de 60°C durante 4,0 horas para eliminação da umidade. A amostra foi solubilizada e aferida em balão volumétrico de 100mL. Esta solução foi utilizada na padronização da solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após esta etapa, retirou-se uma alíquota de 10 mL do digerido para titulação com a solução padronizada de NaOH, sendo então realizados os cálculos para determinação da acidez final.

4.3.5 Quantificação dos elementos por ICP OES.

Na determinação dos metais, foi utilizado um Espectrômetro de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) Perkin Elmer, Optima 4300 Series Dual View.

Para validação da metodologia, material de referência certificado de folha de maçã (SRM - Apple Leaves 1515) foi utilizado.

Para o cálculo do Limite de Detecção para a metodologia desenvolvida por ICP OES, foi utilizado o conceito da concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC), definido como a concentração do analito que produz sinal equivalente intensidade de emissão do fundo na linha medida. A incorporação do valor do BEC no cálculo do limite de detecção pode mostrar com maior ênfase as mudanças nas condições operacionais de funcionamento do plasma. Assim, as equações 6 a 8 mostram a forma de obtenção dos valores do BEC e do LOD [54].

$$BEC = \frac{C_{sr}}{SBR} \quad (6)$$

$$SBR = \frac{I_{sr} - I_{branco}}{I_{branco}} \quad (7)$$

$$LOD = \frac{3 \times BEC \times RSD}{100} \quad (8)$$

Na equação 6, C_{sr} é a concentração da solução padrão multielementar e SBR é a razão sinal analítico / sinal de fundo. SBR é um parâmetro determinado em função das intensidades de emissão da solução de referência (I_{sr}) e intensidade de emissão da solução do branco (I_{branco}) – equação 7. RSD é o desvio padrão relativo obtido para 10 medidas da solução do branco analítico. A equação 8 expressa o cálculo para o limite de detecção. Para investigação das condições de robustez do plasma, foi utilizado a razão Mg II/MgI [55]. Os parâmetros operacionais do ICP OES podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros operacionais do ICP OES.

Parâmetro	Valor
Visão do plasma	Axial e Radial
Gerador de radiofrequência (MHz)	40
Potência de radiofrequência (W)	1100
Fluxo de Ar do plasma (L min ⁻¹)	15
Velocidade de fluxo do nebulizador (L min ⁻¹)	0,8
Velocidade de fluxo do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,5
Velocidade de fluxo de amostra (mL min ⁻¹)	1,4
Diâmetro interno da tocha (mm)	2,4

Os comprimentos de onda utilizados, bem como a forma de medição da radiação emitida (axial ou radial) podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Comprimento de onda dos diversos elementos avaliados por ICP OES.

Elemento	Comprimento de Onda (nm)	Visão
Al	308,215 e 396,153	Axial
C	193,030	Axial e Radial
Ca	317,933 e 393,366	Radial
Co	228,616 e 238,892	Axial
Cu	324,752 e 327,393	Axial
Fe	238,204 e 239,562	Axial
K	404,721 e 766,490	Radial
Mg	279,077 e 280,271 e 285,213	Axial
Mn	257,610 e 259,372	Axial
Na	588,995 e 589,592	Radial
Ni	221,648 e 231,604	Axial
Pb	217,000 e 220,353	Axial
Zn	206,200 e 213,857	Axial

4.3.6 Aquisição dos espectros NIR

Os espectros NIR (790 a 2500 nm) foram registrados em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-NIR) equipado com acessório para refletância difusa modelo ABB - FTLA 2000 – 160 do fabricante BOMEN® no Grupo de Instrumentação e Automação em Química Analítica (UNICAMP – SP).

4.3.7 Tratamento quimiométrico dos dados

No tratamento quimiométrico, foi utilizado o *software The Unscrambler 7.5(CAMO Inc.)* [56] e ainda a versão mais atual *The Unscrambler X10.3* para o melhoramento gráfico de algumas figuras.

4.3.7.1 Reconhecimento de Padrões

A análise de reconhecimento de padrões foi feita utilizando PCA com o objetivo de avaliar similaridades e diferenças no conjunto de dados das amostras de cera de carnaúba. As variáveis utilizadas foram os teores dos elementos inorgânicos. Esses dados foram auto escalonados para a construção do sistema de componentes principais e observação do agrupamento de amostras.

4.3.7.2 Pré-processamento dos espectros NIR

Os pré-processamentos espectrais adotados foram: correção de linha de base, suavização por polinômio móvel com filtro Savitzky-Golay, correção de espalhamento multiplicativo (MSC) e derivadas com filtro Savitzky-Golay e janela de 10 pontos (polinômio de segunda ordem). Estas ferramentas estão disponíveis na versão 7.5 do software quimiométrico utilizado neste trabalho. As variáveis utilizadas foram as intensidades medidas em cada comprimento de onda bem como o somatório do teor de íons metálicos. A avaliação dos modelos foi feita em função do Número de variáveis latentes, Coeficiente de Correlação e RMSECV. Após esta etapa, as amostras foram subdivididas em dois grupos, sendo um de calibração e o outro de previsão. As amostras do conjunto de calibração foram utilizadas na modelagem por meio do método de validação cruzada completa (*Full Cross Validation*) para determinação do número ideal de variáveis latentes para construção dos modelos. O Número de variáveis latentes foi escolhido com base no menor valor de RMSECV.

4.3.7.3 Calibração Multivariada

Os modelos de calibração foram obtidos utilizando PLS a partir dos dados espectrais pré-processados, bem como os teores dos elementos inorgânicos determinados pela técnica de referência (ICP OES). A capacidade preditiva dos modelos gerados foi avaliada por meio do RMSEP e RPD, obtido para o conjunto de validação externa.

Capítulo 5. Resultados e Discussões

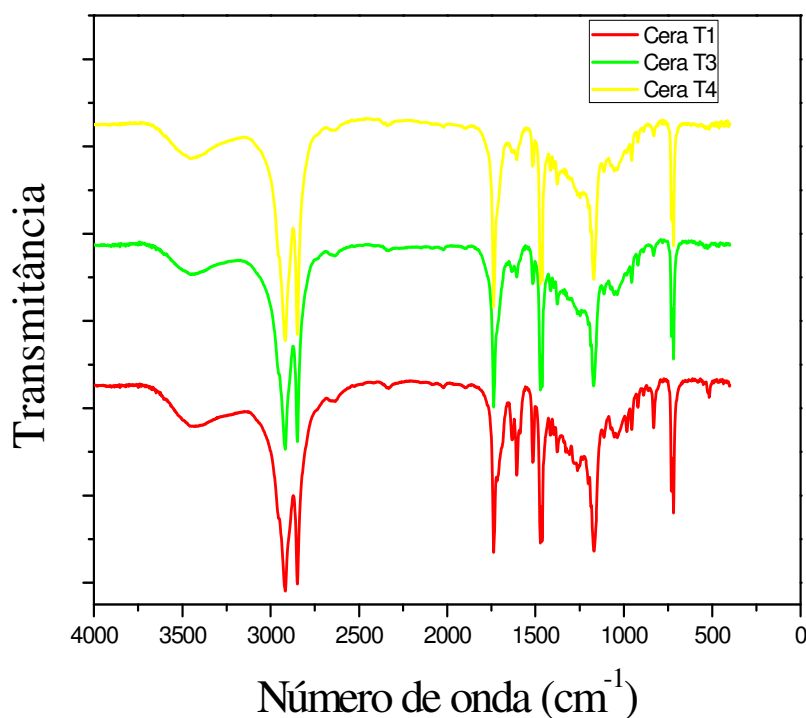
5.1 Caracterização da matriz orgânica das ceras de carnaúba

Com o objetivo de investigar a composição orgânica dos diferentes tipos de cera de carnaúba, foram obtidos os espectros de infravermelho médio, curvas de análise térmica, bem como a identificação dos compostos presentes utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

5.1.1 Análise de infravermelho médio das amostras de cera de carnaúba

As ceras consistem em uma mistura de vários compostos orgânicos (hidrocarbonetos, álcoois superiores e ésteres de ácidos graxos) [19], tornando-se praticamente impossível utilizar os espectros FT-IR para fins de elucidação estrutural. Todavia, os dados podem ser utilizados como “impressão digital” das amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4. A Figura 15 apresenta os espectros de infravermelho para os diferentes tipos de amostras de cera de carnaúba.

Figura 15. Espectro de Infravermelho obtido para os diferentes tipos de ceras de carnaúba na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} .



De um modo geral, os três tipos de cera de carnaúba possuem basicamente o mesmo perfil espectral, evidenciando semelhança nas composições orgânicas desses materiais. De acordo com a Figura 15, podem ser observadas diversas bandas relacionadas a vibrações de compostos alifáticos, dando ênfase para uma grande quantidade de grupos CH_2 e CH_3 nas moléculas que constituem as ceras em estudo. Vibrações de ligações CH_2 são observadas em 2919 e 2850 cm^{-1} com um pequeno ombro em 2958 cm^{-1} referente a CH_3 . Em 1437 e 1464 cm^{-1} são observados dubletos relacionados à vibrações CH_2 . A presença de compostos parafínicos pode ser evidenciada em termos de deformações axiais e angulares de ligações C-H e C-C. As vibrações de deformação angular de C-C ocorrem em frequências muito baixas. Entretanto, as bandas atribuídas às vibrações axiais de C-C são fracas e podem ser observadas na região compreendida entre 1200 e 800 cm^{-1} . Assim, de acordo com o espectro obtido para os três tipos de cera, podem ser observadas uma série de bandas nesta região sendo a grande maioria de baixa intensidade. Bandas características de álcoois e ésteres de ácidos graxos também podem ser destacadas. Uma banda em 3450 cm^{-1} pode ser traduzida como uma deformação axial de O-H em ligação de hidrogênio. O grupamento hidroxila quando livre, ou seja, quando não participa de ligação de hidrogênio absorve fortemente entre 3650 e 3584 cm^{-1} . A ocorrência de ligação de hidrogênio de álcoois reduz a frequência de observação destas bandas tipicamente para a região compreendida entre 3550 e 3200 cm^{-1} . Um estiramento em 1736 cm^{-1} correspondente a C=O de uma função éster, função orgânica presente em compostos.

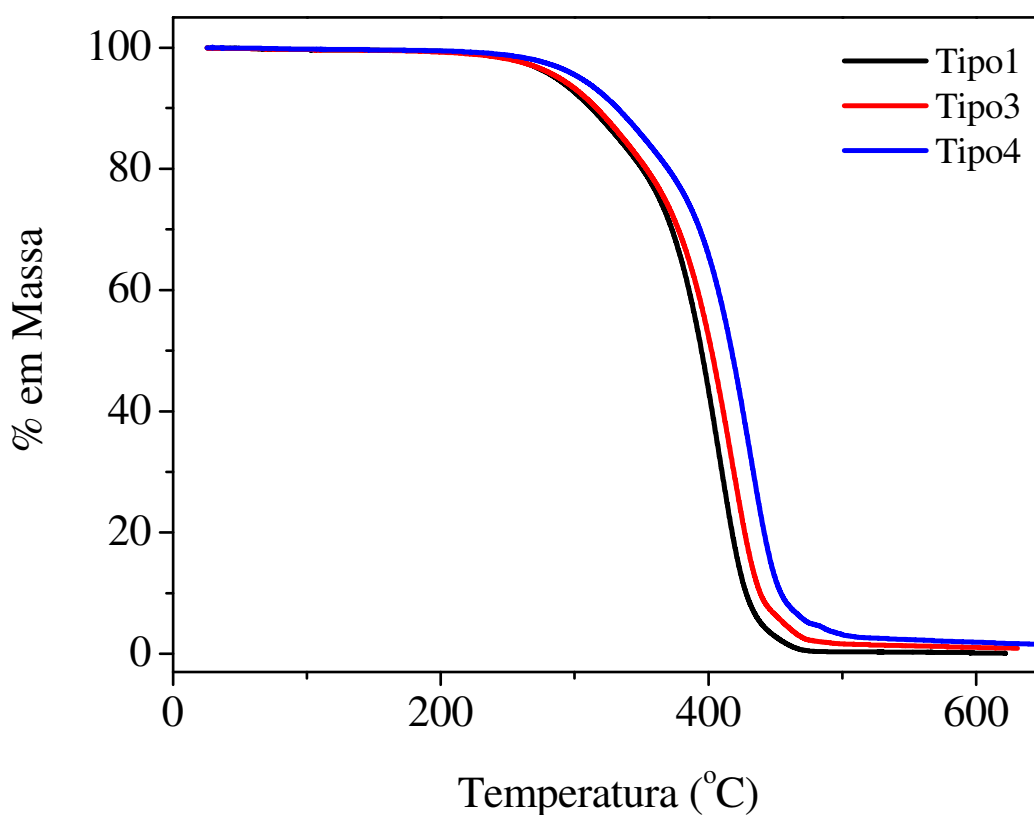
Todavia, é possível destacar algumas bandas observadas apenas nas ceras do Tipo 1. A primeira diferença a ser tratada consiste na intensidade das bandas observadas em 1632 e 1604 e 1515 cm^{-1} , sendo estas de maior intensidade nas ceras do tipo 1 em relação aos demais tipos avaliados. Uma outra diferença observada consiste de uma banda em 516 cm^{-1} que é exclusiva de amostras de cera do Tipo 1.

De um modo geral, as ceras apresentam bandas no infravermelho características, como consequência da grande quantidade de compostos alifáticos [57]. Fontana et. al. [58] em dissertação de mestrado obteve o espectro de uma amostra de cera de carnaúba do tipo 5 (semelhante ao Tipo 4). As bandas obtidas no trabalho em questão são compatíveis com as observadas neste trabalho, com exceção de uma banda observada em cerca de 2300 cm^{-1} , a qual foi atribuída com a vibração do estiramento do grupo funcional $\text{C}\equiv\text{N}$.

5.1.2 Análise Termogravimétrica das amostras de cera de carnaúba

As medidas termogravimétricas permitiram avaliar o comportamento térmico das substâncias orgânicas presentes nas amostras de ceras estudadas. Pode-se observar no gráfico de Análise Termogravimétrica (TGA) mostrado na Figura 16 que os perfis de degradação térmica das amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4 possuem basicamente os mesmos processos.

Figura 16. Curva termogravimétrica obtida para os três tipos de ceras de carnaúba.

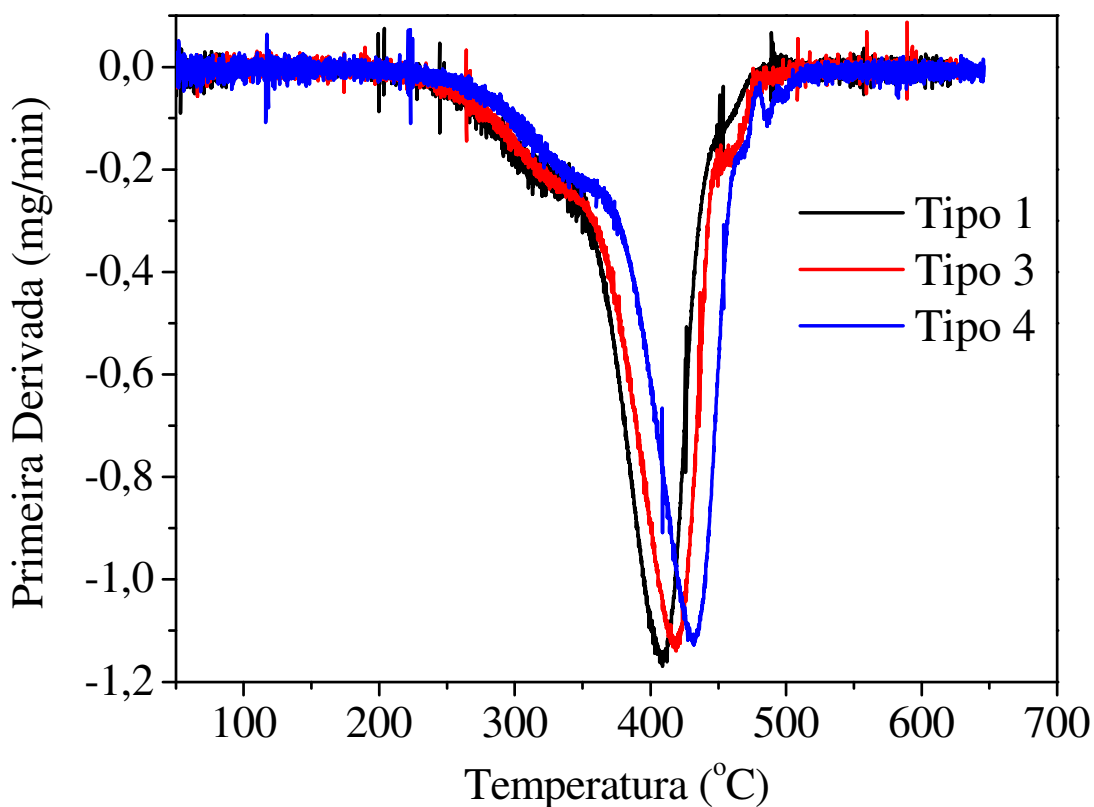


As amostras de cera de carnaúba se mostraram termicamente estáveis até a temperatura de 220°C. Pode-se observar uma variação grande de massa em uma única etapa, entre as temperaturas de 220 e 500°C, ou seja, quando os ácidos graxos presentes nas amostras de cera iniciam a degradação. Na temperatura de 600°C a perda de massa é constante se mantendo em valores próximos a 1%. A cera T1 apresentou após a curva de degradação térmica um resíduo de 0,16% da massa inicial (8,39 mg). Já a amostra de cera T3 apresentou um resíduo de aproximadamente 0,96% (massa inicial de 8,79 mg), enquanto a cera T4 apresentou um percentual residual de 1,63% (massa inicial de 8,56

mg). Este percentual residual pode ser associado a algum constituinte inorgânico presente no material (cinzas) que necessitaria de uma temperatura superior para ser degradado termicamente. Assim, espera-se que as amostras de cera apresentem um teor de constituintes inorgânicos superior aos demais tipos de cera avaliados.

A Figura 17 apresenta as curvas de Análise Térmica Diferencial (DTA) para os três tipos de cera de carnaúba. Pode-se observar que as temperaturas de pico foram de 407,9°C, 419,1°C e 432,1°C respectivamente para as ceras dos Tipos 1, 3 e 4.

Figura 17 Curvas de Análise Térmica Diferencial para amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4.

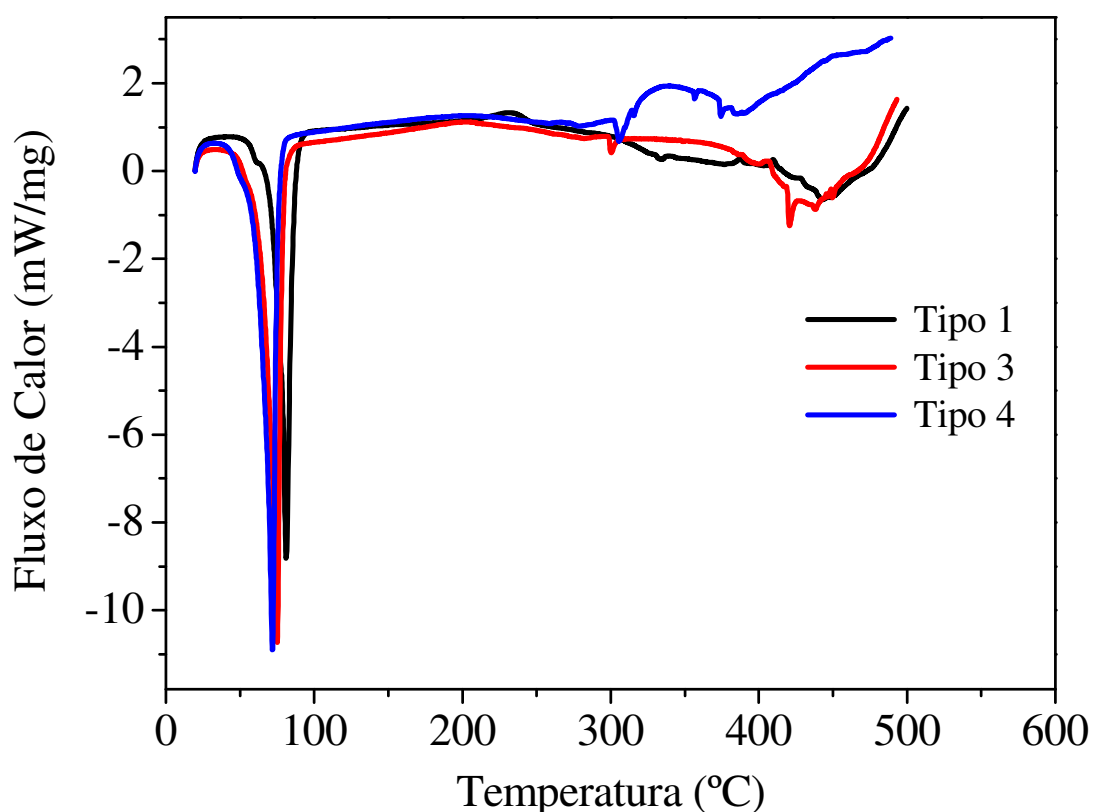


Já o gráfico de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), apresentado na Figura 18, mostra que para os três tipos de ceras de carnaúba, ocorrem processos endotérmicos entre 40 e 90 °C relacionados com a fusão das amostras. Entretanto, a partir de 300 °C, pode-se observar a ocorrência de processos exotérmicos.

As entalpias dos processos envolvidos foram determinadas em função da área do pico de degradação térmica para os processos endotérmicos de primeira ordem.

Assim, para as ceras do Tipo 1 o valor de ΔH foi de $110,97 \text{ J g}^{-1}$. Para as ceras dos Tipos 3 e 4, os valores encontrados foram, respectivamente $124,42$ e $124,24 \text{ J g}^{-1}$.

Figura 18. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) obtidas para os diferentes tipos de ceras de carnaúba.



5.1.3 Cromatografia Gasosa das amostras de cera de carnaúba

Para uma avaliação mais criteriosa das espécies orgânicas presentes nas amostras de ceras de carnaúba foi feita uma análise das frações voláteis da mesma. Para tanto foram obtidos os ésteres metílicos por meio de uma reação de metilação, para posterior análise por CG-MS. Assim, de acordo com os cromatogramas de íons totais apresentados nas Figuras 19 a 21, foram identificados alguns ácidos graxos comuns aos três tipos de ceras, os quais foram listados na Tabela 4.

Figura 19. Cromatograma de íons totais para a cera de carnaúba do Tipo 1.

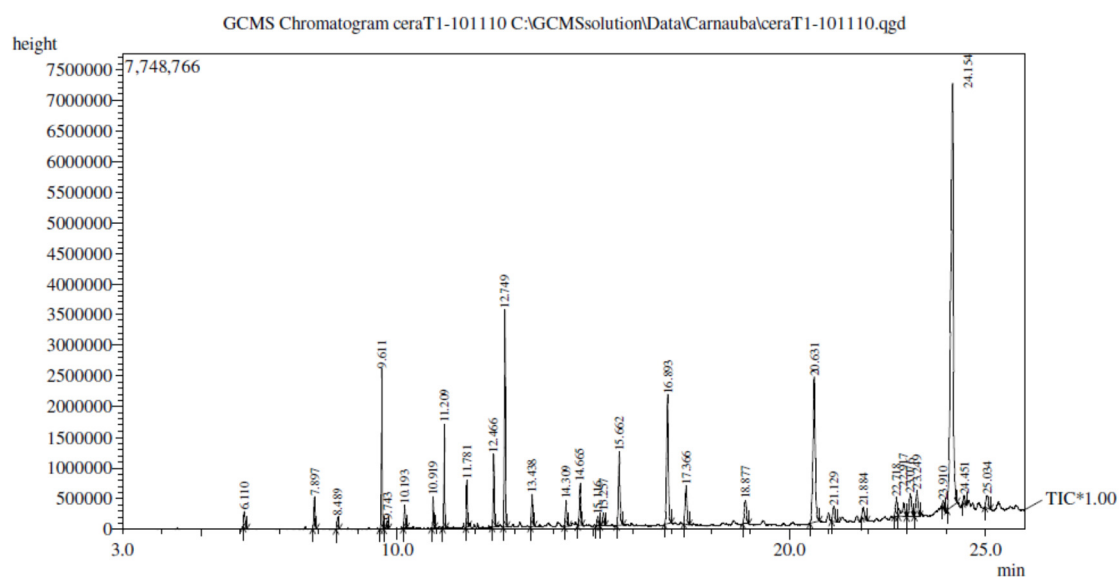
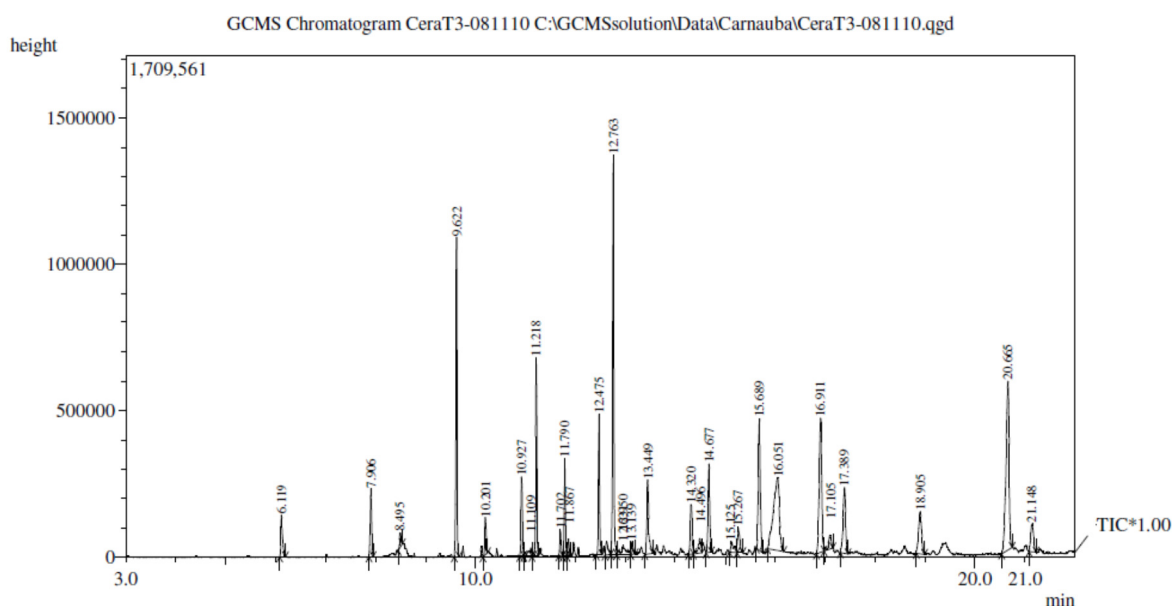


Figura 20. Cromatograma de íons totais para a cera de carnaúba do Tipo 3.



A identificação das substâncias presentes foi feita por meio de comparação entre os fragmentogramas de massa referente a cada pico com um banco de dados interno do equipamento bem como com dados obtidos da literatura. Assim, os três tipos de ceras apresentaram semelhanças em relação aos constituintes estudados, sendo avaliados os ácidos graxos descritos na Tabela 4, além de álcoois identificados como 1-octadecanol (270), 1-eicosanol (298), n-hentriacontanol (425) e 1-hentetracontanol (593).

Figura 21. Cromatograma de íons totais para a cera de carnaúba do Tipo 4.

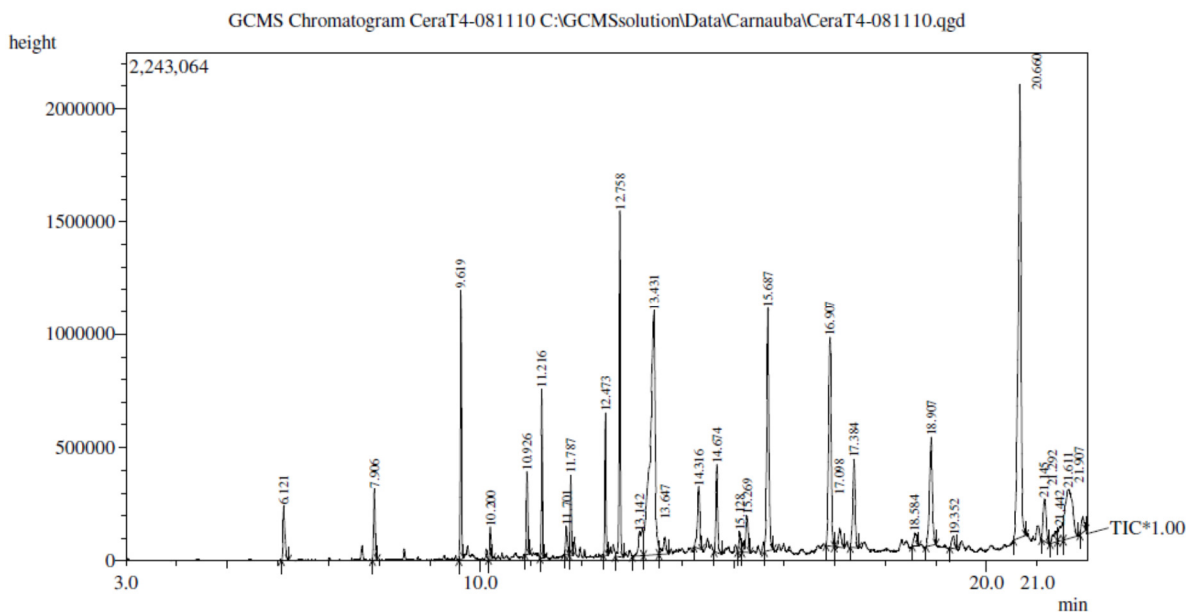


Tabela 4. Relação dos principais ácidos graxos encontrados nos três tipos de cera de carnaúba.

Constituintes	Tempos de Retenção			Massa Molecular
	Tipo 1	Tipo 3	Tipo 4	
Ácido hexadecanóico (i)	6,110	6,115	6,118	270
Ácido heptadecanóico (ii)	7,897	7,901	7,903	298
Ácido eicosanóico (iii)	9,611	9,622	9,617	326
Ácido docosanóico (iv)	11,209	11,216	11,214	354
Ácido tetracosanóico (v)	12,749	12,764	12,756	382
Ácido triacontanóico (vi)	21,129	21,155	21,144	466

A composição dos três tipos de cera consiste basicamente em uma mistura de álcoois e ésteres de ácidos graxos. A variação dos componentes se dá em função do número de átomos de carbono presentes na cadeia, ou seja, ésteres de ácidos graxos com números ímpares de átomos de carbono.

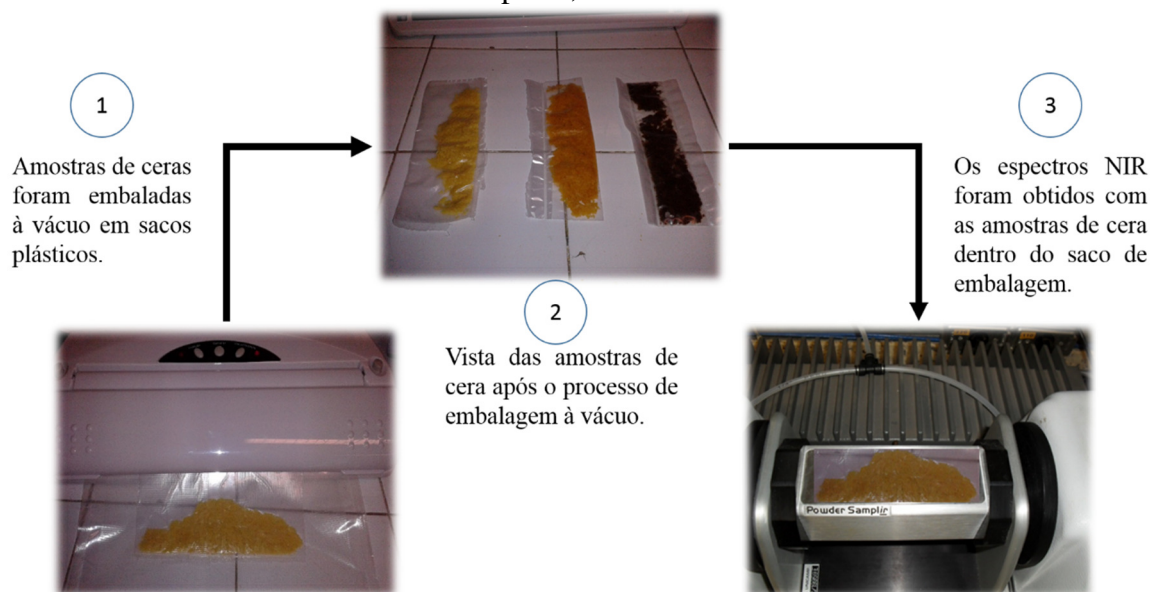
Por meio do estudo de investigação da constituição orgânica das ceras apresentado até aqui, pode-se notar que as amostras possuem um perfil semelhante, fato que ficou evidenciado em função dos resultados de infravermelho, análise térmica e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os mesmos foram capazes

de apresentar algumas diferenças existentes entre as amostras de cera, embora os resultados demonstrem que as amostras possuem considerável semelhança química.

5.1.3 – Espectros NIR das amostras de cera de carnaúba dos Tipos 1, 3 e 4.

As amostras de cera de carnaúba foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno com auxílio de um selador/embalador à vácuo, sendo as medidas feitas diretamente nas amostras. A Figura 22 apresenta um esquema do processo de embalagem e da obtenção dos espectros NIR, os quais foram registrados a temperatura ambiente de 22°C, com resolução espectral de 2,0 cm⁻¹ e uma média de 20 varreduras.

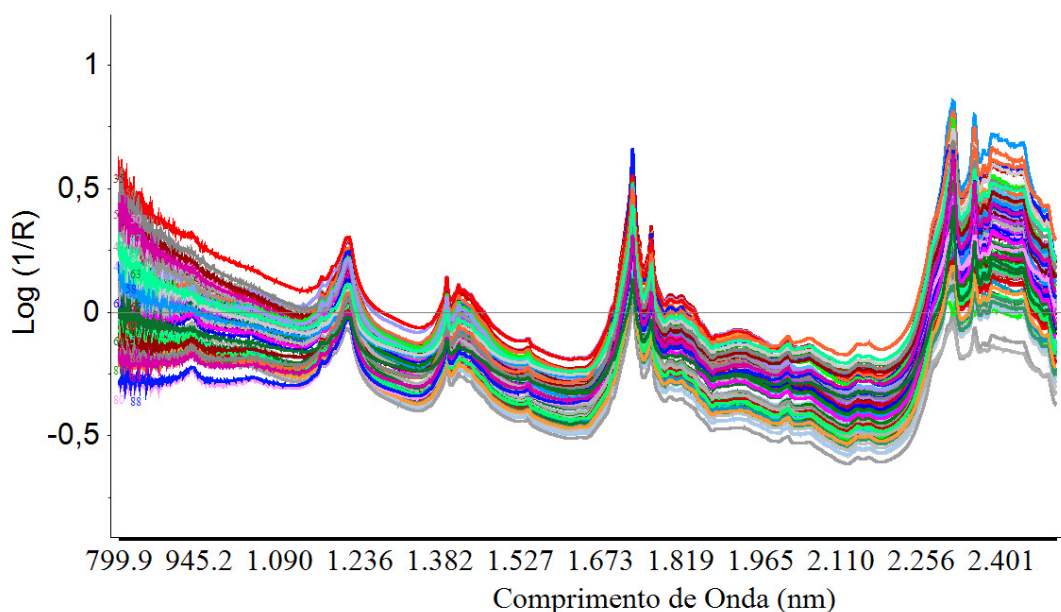
Figura 22. Fluxograma do procedimento utilizado para a aquisição dos espectros NIR das amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4.



A Figura 23 apresenta os espectros originais obtidos para as amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4. Podem ser observadas bandas de absorção em 1213 nm que estão relacionadas ao segundo sobreton do estiramento da ligação C-H; bandas de absorção em 1393 nm podem ser relacionadas ao primeiro sobreton do estiramento O-H; também podem ser observadas bandas na região em torno de 1730 nm relacionadas ao primeiro sobreton do estiramento C-H [59]. Também podem ser observadas bandas de absorção em torno de 2313 nm. Como mencionado anteriormente, os espectros NIR são complexos para serem utilizados como ferramenta de elucidação estrutural. Todavia, para utilizá-los como ferramenta quantitativa, faz-se necessário uma

correção espectral por meio de pré-processamentos matemáticos, que serão vistos discutidos mais adiante.

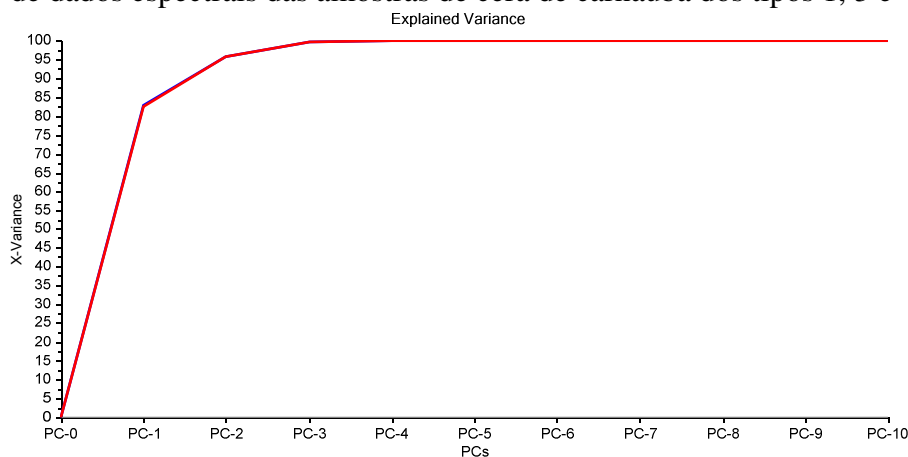
Figura 23. Espectros brutos das amostras de cera de carnaúba dos Tipos 1, 3 e 4. Região espectral de 799 a 2500 nm.



5.1.3.1 Análise de Componentes Principais utilizando os dados espectrais das amostras de ceras de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4.

Uma breve análise do gráfico de variância demonstra que com apenas três componentes principais é possível descrever mais de 95% da variabilidade espectral total do conjunto de dados, como pode ser observado na Figura 24.

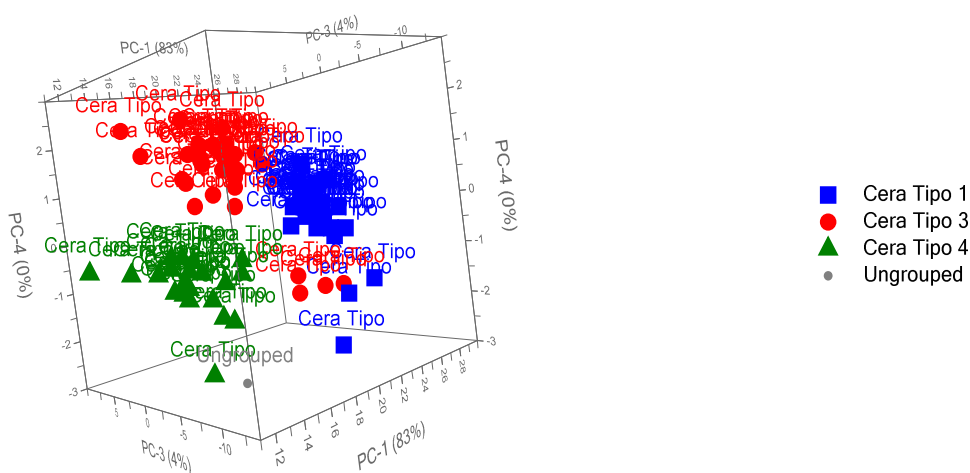
Figura 24. Gráfico de variância explicada versus componentes principais para o conjunto de dados espectrais das amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4.



A Figura 25 apresenta o gráfico (PC1 vs PC3 vs PC4) dos escores da PCA utilizando os espectros originais das amostras de cera de carnaúba. Foi adotada essa combinação de componentes principais tendo em vista uma melhor distinção entre os diferentes conjuntos de amostras de cera.

Pode-se observar, de modo análogo ao tratamento utilizando apenas os teores de inorgânicos, a formação de três grupos distintos: amostras em azul representam as ceras do Tipo 1, amostras em vermelho representam as ceras do Tipo 3 enquanto as amostras em verde as ceras do Tipo 4.

Figura 25. Gráfico de Escores da PCA (PC1 vs PC3 vs PC4) com a formação de três grupos distintos de amostras de cera de carnaúba dos Tipos 1, 3 e 4.



A formação de grupos distintos entre os diferentes tipos de cera deixa claro que existem diferenças espectrais entre as amostras, fato que pode ser originado como resultado da influência da concentração total das espécies inorgânicas presentes na matriz das amostras. A primeira componente principal (PC1) descreve cerca 83% da variabilidade total dos dados. A segunda componente (PC2) descreve cerca de 12% enquanto a terceira componente (PC3) descreve 4%. Com base neste resultado, tem-se um método simples e rápido de diferenciação de cera de carnaúba baseado nas características químicas da amostra, uma vez que o espectro NIR possui uma forte relação com a composição química dos materiais. Esta ferramenta é importante quando se leva em consideração as formas usuais de classificação, sendo atualmente a diferenciação pela cor a forma mais utilizada, fator que em alguns casos é passível de erro de classificação, principalmente quando as ceras encontram-se pulverizadas, em que o tamanho das partículas é diminuto e as diferenças de cores são praticamente

imperceptíveis. Assim, a utilização de espectros NIR para fins de classificação se caracteriza como uma importante ferramenta prática para classificação em função dos diferentes tipos de cera de carnaúba.

5.2 Planejamento Experimental e metodologia de superfície de resposta no preparo de amostra para os constituintes inorgânicos.

Em uma sequência analítica, o preparo da amostra é sempre uma etapa crucial. Diversos procedimentos de digestão assistidos por radiação micro-ondas vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos [60 e 61]. As principais vantagens de utilização da radiação micro-ondas no preparo de amostras incluem a redução de tempo, menor consumo de reagentes e ainda diminuição dos riscos de contaminação [62]. Outro fator importante consiste na eficiência obtida na decomposição da matéria orgânica em função do aquecimento provocado no seio da solução (efeitos de rotação dos dipolos e migração iônica), diferentemente do ocorrido em um aquecimento utilizando bloco digestor, no qual a transferência de calor ocorre por efeito de condução.

Uma comparação entre o BBD e outros planejamentos como o CCD, doehlert ou fatorial completo mostra que as matrizes do BBD e doehlert são levemente mais eficientes que o CCD e muito mais eficientes que os fatoriais completos. A eficiência de um planejamento experimental é definida como sendo a razão do número de coeficientes estimados pelo modelo pela quantidade de experimentos planejados. Com base nisso, para três fatores, por exemplo, o BBD apresenta uma eficiência de 0,77, enquanto o CCD apresenta eficiência de 0,67 [63]. Outra vantagem do BBD é que este planejamento não contém combinações nas quais todos os fatores se apresentam em seus níveis máximos ou mínimos, reduzindo os riscos operacionais para a realização dos experimentos em condições de valores máximos das variáveis. Isso seria problemático para experimentos de preparo de amostras em sistema fechado assistidos por micro-ondas, onde condições máximas significam tempo elevado, potência elevada e massa de amostra alta, por exemplo. Todavia, este planejamento não é indicado para situações onde se deseja conhecer o comportamento das variáveis nas condições extremas do sistema.

A etapa inicial de um planejamento experimental consiste na escolha das variáveis ou fatores. Quando se leva em consideração o uso de micro-ondas, os programas de aquecimento utilizados geralmente possuem uma etapa de aumento gradativo de potência seguido de um patamar em um valor de potência mais elevado.

Entretanto, potência e tempo de irradiação são fatores cruciais para uma boa degradação da matriz orgânica que constitui a amostra. Um terceiro fator que deve ser investigado é a quantidade de ácido nítrico, uma vez que é um dos reagentes químicos mais utilizados em procedimentos de preparo de amostras com matrizes orgânicas. Assim, os três fatores escolhidos para serem trabalhados na etapa de otimização foram: potência (W) máxima de aplicação de micro-ondas; tempo de permanência nesta potência; volume de HNO_3 . A Tabela 5 apresenta as relações entre os fatores e os limites estabelecidos para o desenvolvimento dos experimentos a partir do planejamento Box-Behnken, que apresenta como principal característica a não utilização dos níveis máximos (+++) de um planejamento. Sabe-se que procedimentos de digestão de amostras em sistemas de alta pressão e temperatura apresentam riscos associados a explosões. Assim, condições que minimizem estes riscos são desejáveis na etapa de preparo de amostra.

Tabela 5. Relação entre os fatores e os níveis estabelecidos para o Planejamento Box-Behnken.

Fatores	(+)	(0)	(-)
X₁ - Potência (W)	1000	800	600
X₂ - Tempo (min)	20	12,5	5,0
X₃ - Vol. HNO_3 (mL)	4,0	2,5	1,0

Para a variável potência, o valor mínimo (600W) adotado foi estabelecido com base no trabalho de Augelli et. al. [64] que utiliza preparo de amostras para decomposição de gorduras de peixes e camarão com o objetivo de determinar mercúrio, de modo que a potência usada para degradação dos materiais foi de 630W; o nível máximo (1000W) consiste na maior potência que pode ser aplicada pelo equipamento. O mesmo critério foi utilizado para os fatores tempo e volume de HNO_3 .

Dessa maneira, o BBD gerou 15 experimentos sendo 12 correspondentes aos pontos médios do cubo e os outros três são referentes a réplicas do ponto central do planejamento. A resposta adotada para este planejamento foi o teor de carbono residual, um importante parâmetro de avaliação dos processos de mineralização de amostras orgânicas [14]. Com relação a sequência experimental, vale ressaltar que todas as medidas foram realizadas de maneira aleatória para reduzir o erro sistemático. A Tabela 6 apresenta a matriz codificada para cada experimento e os resultados obtidos para o teor de carbono residual avaliado por ICP OES.

Tabela 6. Matriz de Planejamento Box-Behnken para otimização do preparo de amostra utilizando micro-ondas.

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	% RCC		
				R ₁	R ₂	R ₃
1	-1	-1	0	15,8	15,1	14,9
2	1	-1	0	4,0	3,6	3,8
3	-1	1	0	9,8	10,4	10,2
4	1	1	0	1,0	1,5	0,98
5	-1	0	-1	14,3	15,1	15,7
6	1	0	-1	2,2	2,3	2,3
7	-1	0	1	12,2	11,5	11,1
8	1	0	1	0,99	1,1	1,5
9	0	-1	-1	10,0	9,8	9,9
10	0	1	-1	7,4	7,7	7,8
11	0	-1	1	7,0	6,8	6,7
12	0	1	1	5,0	4,8	4,4
C*	0	0	0	5,2	5,4	5,1

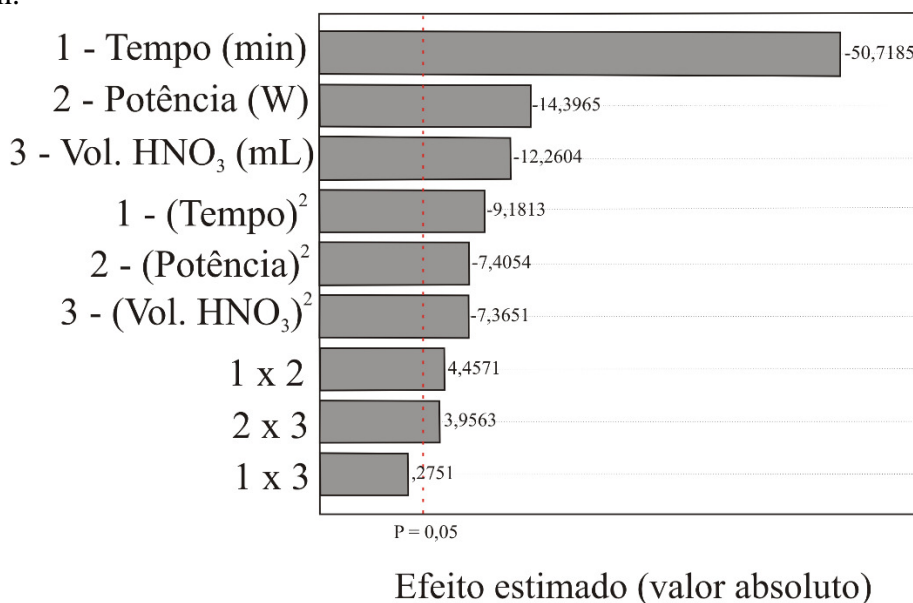
*Ponto central

Neste sistema envolvendo três fatores independentes (X₁, X₂ e X₃) a relação matemática que descreve o sistema pode ser traduzida como uma função polinomial quadrática de segunda ordem que envolve os efeitos individuais dos fatores sobre o teor de carbono residual, bem como a influência das interações entre fatores sobre essa resposta. Matematicamente, esse conjunto de influências é descrito por uma equação do tipo: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$. Nesta equação Y é a resposta estimada e β_0 é uma constante; β_1 , β_2 e β_3 são coeficientes lineares; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os coeficientes de interação entre os três fatores; β_{11} , β_{22} e β_{33} são os coeficientes quadráticos da equação.

Durante a execução dos experimentos não foram observadas maiores dificuldades na decomposição das amostras. Houve apenas uma diferença na coloração (um pouco mais amarelada) das soluções quando foram aplicados os níveis mínimos para os fatores investigados (Exp. 1 e 5), que possivelmente deve-se a um teor de matéria orgânica um tanto maior que nas demais soluções obtidas. Para avaliação dos

efeitos dos fatores na resposta (teor de carbono residual), um gráfico de pareto foi obtido, como pode ser observado na Figura 26, a seguir.

Figura 26. Efeitos das variáveis obtido a partir do planejamento experimental Box Behnken.



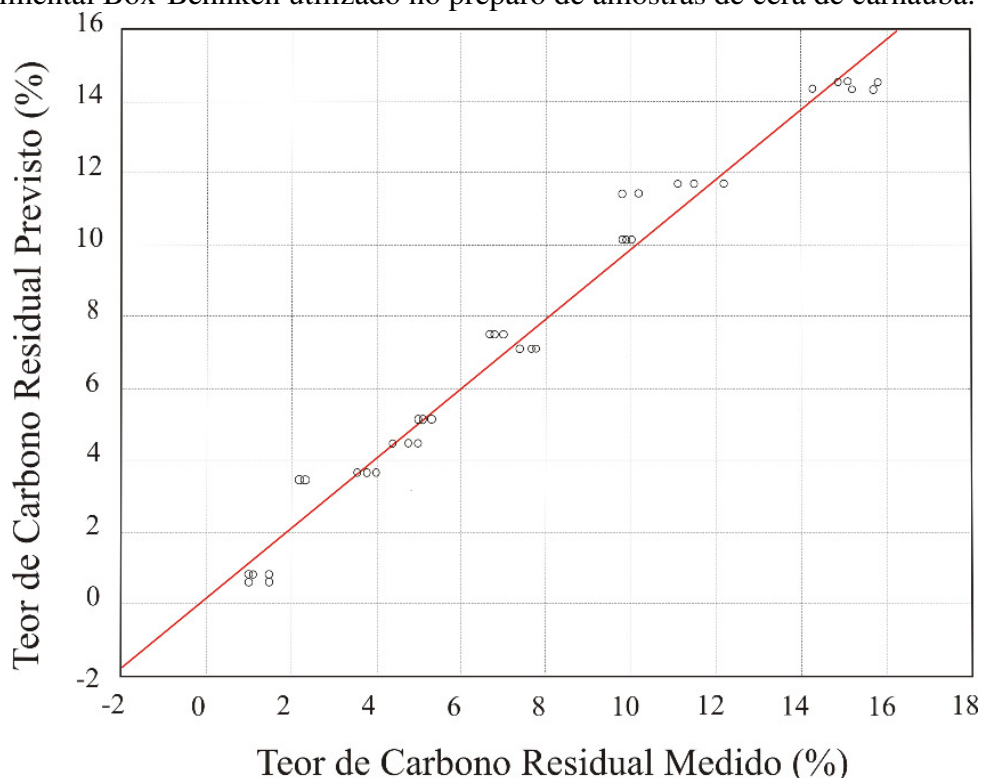
De acordo com o gráfico de efeitos, pode-se constatar que a variável de maior influência na resposta foi o tempo de irradiação de micro-ondas, seguido da potência e do volume de ácido nítrico utilizado. Todos os fatores apresentaram influência significativa na redução do teor de carbono residual. Outro ponto importante a ser mencionado é a interação observada entre os fatores, de modo que as interações tempo/potência e tempo/volume possuem efeitos positivos sobre o teor de Carbono residual. A significância dos efeitos foi testada por análise de variância (ANOVA) e do nível de significância (valor de p) obtido. Este último representa a probabilidade do erro do fator poder ser explicado por erros aleatórios. A Equação 9 ilustra a relação entre os três fatores e a resposta obtida. O ponto crítico obtido pela resolução da equação 2 apresenta valores de 817 W de potência de micro-ondas durante 27 min de irradiação com adição de 2,5 mL de ácido nítrico. Todavia, utilizando este tempo o programa de aquecimento se tornaria muito longo para uma redução de carbono residual percentualmente baixa. Assim, com base na avaliação da superfície de resposta foram adotados valores de 800 W de potência durante 15 min com um volume de 2,0 mL ácido. Nestas condições operacionais o teor de carbono residual se encontra na faixa de 2 a 4%, como pode ser observado na superfície de resposta e comprovado pela equação

da mesma. Esta faixa de RCC já garante segurança contra a possibilidade de interferência espectral causada [65]. Isso ocorre porque a presença de resíduos orgânicos na amostra introduzida afeta as condições de equilíbrio térmico do plasma, além de gerar fuligem que pode se depositar sobre as lentes do equipamento prejudicando assim a detecção.

$$RCC (\%) = 7,44 - 1,54X_1 - 0,54X_1^2 - 5,43X_2 - 0,67X_2^2 - 1,31X_3 - 0,53X_3^2 + 0,68X_1X_2 + 0,042X_1X_3 + 0,60X_2X_3 \quad (9)$$

Para avaliar a eficiência preditiva do modelo desenvolvido, faz-se necessário um estudo da relação entre os valores experimentais e os valores previstos, ou seja, um exame dos resíduos. Estes devem ser pequenos, demonstrando a robustez obtida pelo mesmo. A Figura 27 apresenta a relação entre as predições e as observações realizadas no planejamento Box-Behnken.

Figura 27. Gráfico de valores preditos versus medidos para o planejamento experimental Box-Behnken utilizado no preparo de amostras de cera de carnaúba.



Neste gráfico, a relação linear entre os valores previstos e os valores experimentais demonstram a eficiência do modelo para prever o teor de carbono residual em cada condição experimental. Já com relação aos pequenos desvios

observados, pode-se atribuir ao erro aleatório, que é responsável pela pequena dispersão observada entre os pontos.

Por fim, para avaliar a concordância do ajuste do modelo às condições reais foi utilizada Análise de Variância - ANOVA. Neste caso a avaliação é feita para observar se os desvios previstos são semelhantes aos desvios medidos. A

Por meio das equações 11 e 12 pode-se estimar o coeficiente de determinação (R^2) para a regressão entre a variação predita e os valores observados. Logo, para o modelo em questão, o valor deste coeficiente foi de 0,992 demonstrando uma boa correlação e baixa influência dos resíduos observados. Em termos práticos, isso significa que 99,2% da variação total em torno da média pode ser explicada pela regressão e apenas 0,8% é proveniente dos resíduos.

Em relação ao teste F realizado, sempre que o mesmo for maior que 1 pode-se concluir que a regressão feita possui significância estatística e que há relação entre os fatores e a resposta. Entretanto, para que esta regressão não seja apenas significativa, mas possa ser utilizada com fins preditivos, o valor da razão de F deve ser igual ou superior a 4 []. O valor de F para o modelo foi de 58,32, o que demonstra estatisticamente que o modelo desenvolvido possui capacidade preditiva. Logo, observando a tabela da ANOVA pode-se ver que a razão só não apresenta significância estatística para a interação entre os fatores Tempo e Volume de ácido, que é inferior a 1.

Tabela 7 apresenta a análise de variância para o ajuste do modelo em questão. Os valores dos parâmetros são obtidos como função da soma dos quadrados (SS do inglês, *Square Sum*) - equação 10, demonstrando que a variação total em torno da média é descrita, parte pela regressão e parte por conta dos resíduos.

$$\sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (10)$$

$$R^2 = \frac{\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (11)$$

$$R^2 = \frac{SS_{Regressão}}{SS_{Total}} = 0,992 \quad (12)$$

Por meio das equações 11 e 12 pode-se estimar o coeficiente de determinação (R^2) para a regressão entre a variação predita e os valores observados. Logo, para o modelo em questão, o valor deste coeficiente foi de 0,992 demonstrando uma boa correlação e baixa influência dos resíduos observados. Em termos práticos, isso significa que 99,2% da variação total em torno da média pode ser explicada pela regressão e apenas 0,8% é proveniente dos resíduos.

Em relação ao teste F realizado, sempre que o mesmo for maior que 1 pode-se concluir que a regressão feita possui significância estatística e que há relação entre os fatores e a resposta. Entretanto, para que esta regressão não seja apenas significativa, mas possa ser utilizada com fins preditivos, o valor da razão de F deve ser igual ou superior a 4 [66]. O valor de F para o modelo foi de 58,32, o que demonstra estatisticamente que o modelo desenvolvido possui capacidade preditiva. Logo, observando a tabela da ANOVA pode-se ver que a razão só não apresenta significância estatística para a interação entre os fatores Tempo e Volume de ácido, que é inferior a 1.

Tabela 7 Análise de Variância (ANOVA) para o ajuste do modelo calculado pelo planejamento Box-Behnken.

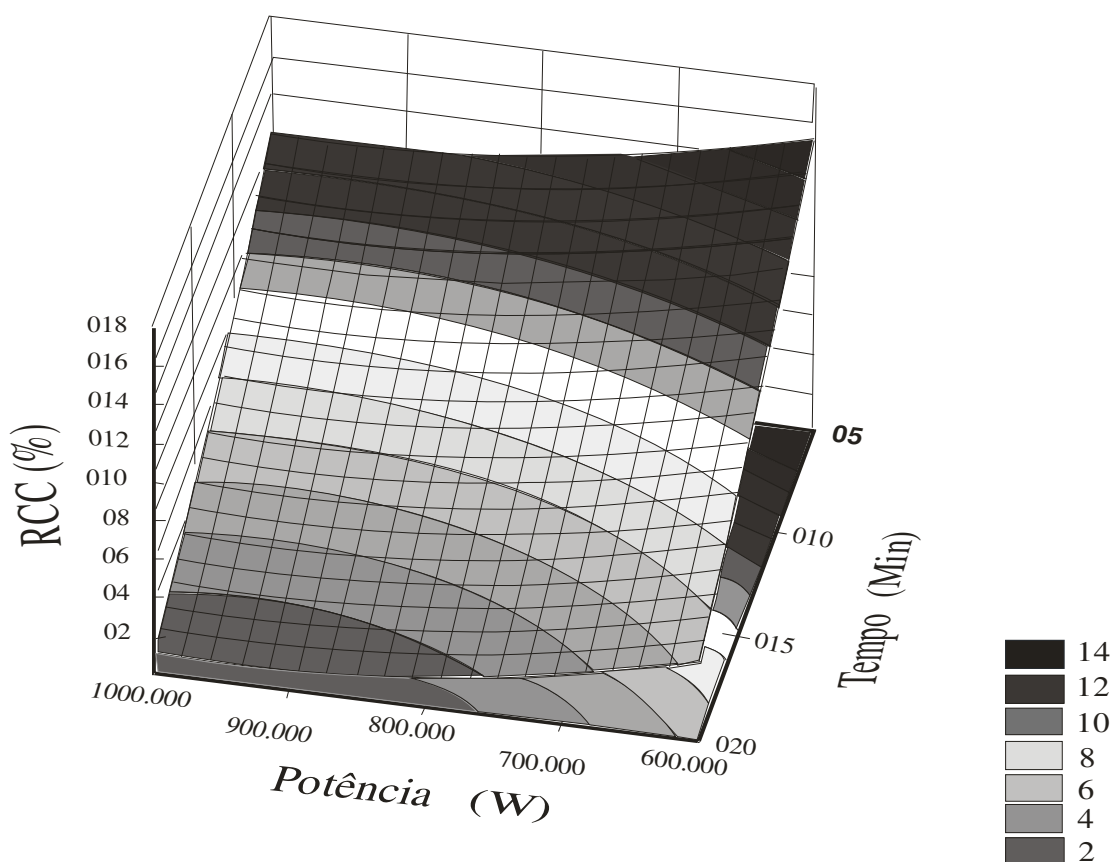
Fatores	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	Razão de F	Valor de P
Intercepto	82,16	1	82,16	104,15	0,0002
Tempo (X_2)	236,53	1	236,53	299,84	0,0000
Potência(X_1)	18,61	1	18,61	23,58	0,0046
Volume (X_3)	13,78	1	13,78	17,47	0,0087
X_1X_1	6,44	1	6,44	8,16	0,036
X_2X_2	4,04	1	4,04	5,12	0,073
X_3X_3	3,48	1	3,48	4,41	0,090
X_1X_2	1,69	1	1,69	3,96	0,1174
X_1X_3	3,42	1	3,42	6,02	0,0701
X_2X_3	0,023	1	0,023	0,040	0,8520
Regressão	298,18	9	33,13	58,32	0,0007
Lack of Fit	2,63	3	0,88	1,35	0,45
Pure Error	1,31	2	0,65	-	-

Error	3,94	5	0,57	-	-
Total	300,45	13	-	-	-

Mesmo apresentando significância e capacidade preditiva, um modelo pode em certas ocasiões apresentar a chamada falta de ajuste, ou seja, pode não descrever tão bem o domínio experimental. Com este propósito, o modelo obtido neste trabalho foi avaliado utilizando os parâmetros estatísticos *Lack of Fit* e *Pure Error* [67]. Como foram obtidos réplicas dos experimentos do ponto central, foi possível obter o erro do experimento em função destas repetições. Se o modelo for bem ajustado aos dados experimentais MSS_{lof} deve refletir apenas o erro aleatório do sistema. Adicionalmente MSS_{pe} é também uma estimativa do erro aleatório, de modo que deve-se assumir que estes dois valores não sejam estatisticamente diferentes. Assim, a razão obtida foi de 1,35, valor inferior ao F-tabelado que é de 9,28. Assim, o modelo construído não possui falta de ajuste. Após todas estas avaliações da etapa de modelagem, torna-se válida a construção da superfície de resposta que descreve a relação entre as três variáveis escolhidas e a resposta (teor de carbono residual). Para a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 28, o volume de HNO_3 foi fixado em 2,0 mL.

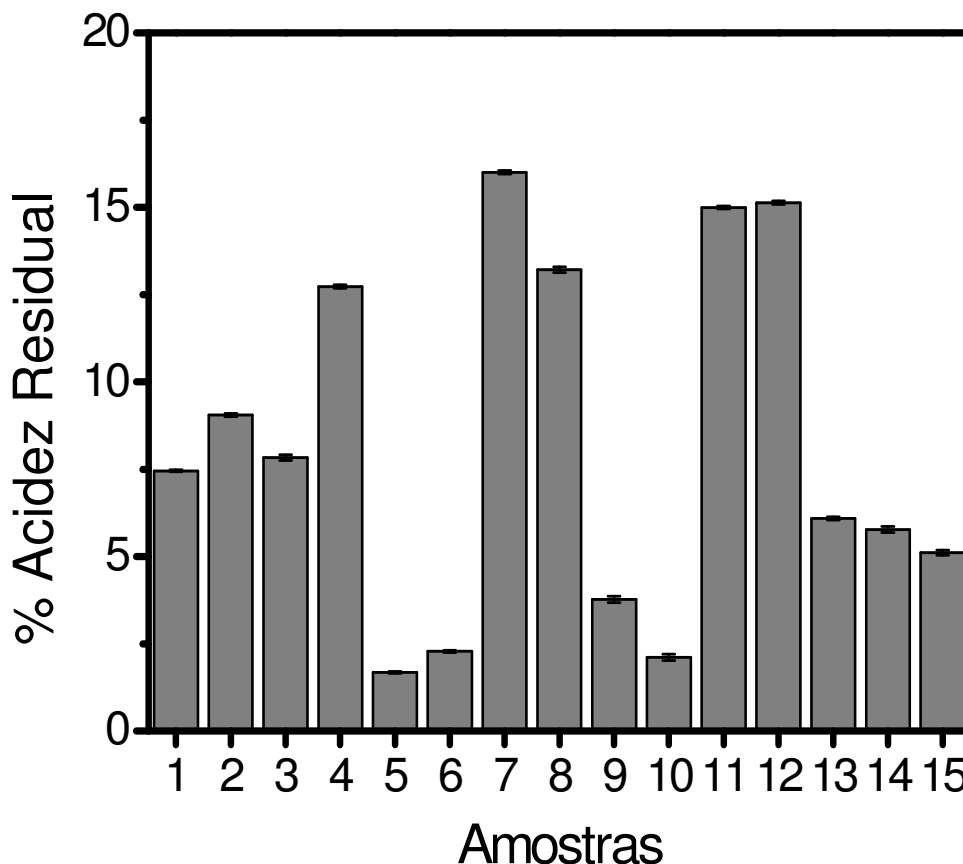
Uma estimativa das características finais dos digeridos obtidos na etapa de otimização das condições experimentais é importantes quando se leva em consideração a técnica que será utilizada na quantificação dos analitos investigados. No presente trabalho, onde as amostras serão analisadas por espectroscopia atômica, faz-se necessário um controle não somente em relação aos níveis de carbono residual, mas também da acidez residual que deve se encontrar em torno de 10% e ainda reflete características de um método de preparo de amostra quimicamente verde, uma vez que a quantidade de reagentes utilizados é menor tendo como consequência um resíduo final menos agressivo ao meio ambiente. Para garantir a eficiência dos processos de digestão assistidos por micro-ondas, uma combinação muito utilizada é a combinação de HNO_3 e H_2O_2 como mistura oxidante. Como mencionado o volume de H_2O_2 foi fixado em 1,0 mL.

Figura 28. Superfície de resposta obtida para o planejamento experimental Box-Behnken.



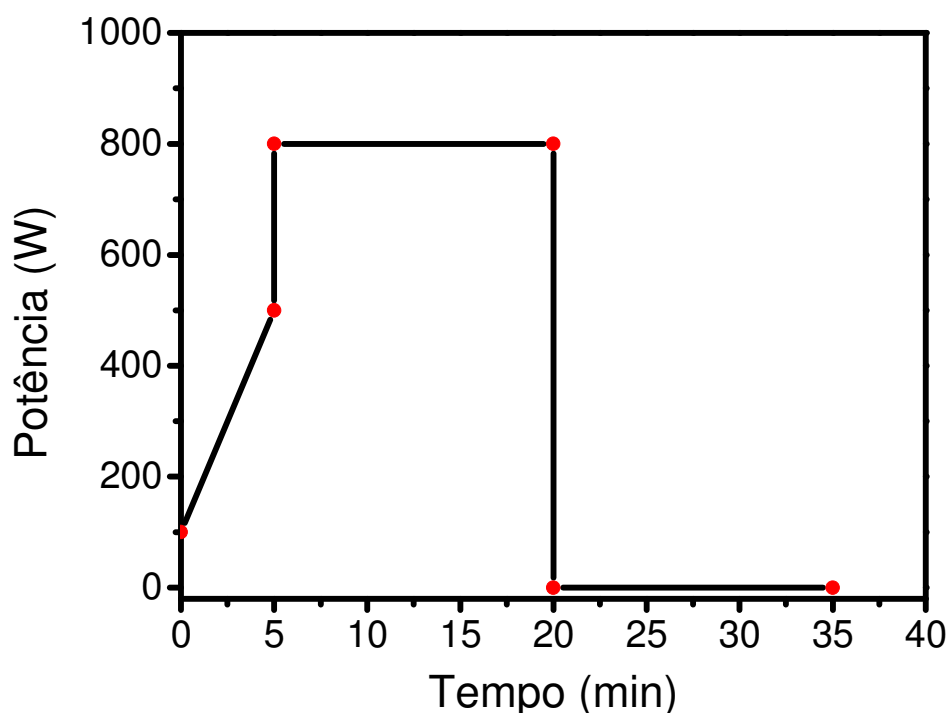
O peróxido de hidrogênio é um importante reagente utilizado em métodos de preparo de amostras em sistemas fechados aquecidos por micro-ondas. A utilização de peróxido de hidrogênio auxilia na ação regeneradora de ácido nítrico a partir das reações de óxidos de nitrogênio – NO e NO₂ formados pela após oxidação da matéria orgânica, com oxigênio presente dentro dos frascos de digestão, como mostram as reações abaixo.

Após a digestão das amostras de cera de carnaúba foram obtidos os valores de acidez residual por meio de titulação com solução de NaOH 0,104 mol L⁻¹. Os valores referentes à acidez residual podem ser observados na Figura 29 a seguir. É possível notar que a taxa de redução de acidez nas soluções finais (que são compostas pelos digeridos diluídos para 25 mL) foram bastante significativas, ou seja, acima de 80%.

Figura 29. Níveis de acidez dos digeridos determinados por titulação ácido-base.

Após toda essa etapa de otimização, o programa de aquecimento utilizado no preparo das amostras de cera de carnaúba pode ser visualizado na Figura 30. O programa consiste em uma rampa de aquecimento de 100 a 500 W durante 5 minutos seguida de um platô de 15 minutos a uma potência de 800 W. Após esta, uma etapa de 15 minutos de resfriamento se faz necessária para garantir as condições de segurança de abertura dos frascos para transferência das amostras. A temperatura e pressão alcançadas durante o de preparo foram de aproximadamente 200°C e 70bar, respectivamente. Após, este procedimento as soluções resultantes apresentaram-se límpidas e sem presença de sólidos dissolvidos, indicando uma drástica redução da quantidade de matéria orgânica.

Figura 30. Programa de aquecimento no micro-ondas para o preparo das amostras de cera de carnaúba.



5.3 Figuras de mérito para a metodologia de análise por ICP OES

As figuras de mérito avaliadas para a metodologia foram as comumente utilizadas quando a técnica de análise utiliza um ICP. Assim, repetibilidade, robustez, limites de detecção, limites de quantificação e validação por meio de material de referência certificado foram avaliados. A repetibilidade pode ser estimada em função do desvio padrão relativo (RSD do inglês, *Relative Standard Deviation*) da variação do sinal da linha 285 para o magnésio estimada em uma série de replicatas (15 no total), de modo que este desvio deve ser inferior a 1%, para que o método apresente boa repetibilidade. A concentração adotada para avaliação deste parâmetro foi de 5,0 mg L⁻¹. A Tabela 8 apresenta os valores referentes a repetibilidade para sucessivas medições de Magnésio em uma solução padrão do elemento, em meio de ácido nítrico 1%.

Tabela 8. Avaliação da repetibilidade em função do sinal da linha 285,213 do Mg em uma solução de 5,0 mg L⁻¹.

Média do sinal (cps)	Desvio Padrão (cps)	RSD (%)
104765,62	758,12	0,724

De acordo com o valor obtido, pode-se observar que o desvio entre as replicatas é inferior a 1%, demonstrando uma boa repetibilidade entre as medidas realizadas e ainda as condições de estabilidade do plasma como fonte promotora dos processos de emissão. Ainda na avaliação desta estabilidade, um outro parâmetro utilizado para atestar a qualidade das condições de determinações e utilização do equipamento foi a razão das intensidades de emissão das linhas iônicas e atômicas do magnésio - Mg II/ Mg I, medidas em 280,271 e 285,213 nm, respectivamente [55]. Essas linhas de emissão referem-se a emissões iônicas e atômicas de intensidade semelhante no qual os valores de probabilidade de intensidade de emissão são conhecidos com exatidão aceitável para o cálculo da razão teórica. Outro fator que favorece a utilização desta razão é a avaliação de processos ineficientes de atomização, excitação e ionização. Para que um plasma esteja operando em condições robustas a razão entre as intensidades de emissão para essas linhas deve ser igual ou superior a 8. Assim, para este trabalho a razão obtida foi de 8,8.

Para determinação do Limite de Detecção foi utilizado o conceito de concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC). A solução de referência utilizada para os cálculos foi de 1 mg L⁻¹. Os resultados podem ser observados na Tabela 9 a seguir.

Tabela 9. Parâmetros da calibração analítica para os elementos estudados por ICP OES.

Elementos	Parâmetros					
	I _{branco}	I _{sr}	SBR	RSD	BEC	LOD
Al	607,5	40218,8	65,2	4,20	0,015	0,0010
Ca	1216,5	15009,1	11,3	2,12	0,088	0,0055
Co	4,3	3093,5	718,4	56,4	0,0014	0,0024
Cu	15543,8	97226,5	5,3	0,28	0,19	0,0016
Fe	159,6	7565,9	46,4	6,90	0,022	0,0046
K	36141,9	369810,5	9,2	3,90	0,108	0,012
Mg	1222,8	68001,1	54,6	9,80	0,018	0,0052
Mn	155,6	63793,9	408,9	8,20	0,0024	0,00059
Ni	143,8	1547,2	9,8	0,02	0,102	6x10 ⁻⁵
Pb	23,8	297,1	11,5	0,69	0,087	0,0018
Zn	300,2	4183,1	12,9	5,22	0,77	0,012

Para avaliar a exatidão do método, foi utilizado material de referência certificado de Folha de Maçã. A amostra foi submetida ao mesmo procedimento que as amostras de cera de carnaúba, de modo que os valores para os teores dos elementos certificados podem ser observados na

Tabela 10. Nesta amostra de material de referência nove elementos coincidem com os estudados neste trabalho: Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn. Os teores de recuperação foram avaliados em função da relação entre os valores certificados e quantificados pelo método em questão. A taxa de recuperação variou de cerca de 80 a 103%.

A taxa de recuperação mais baixa observada foi para o ferro, com valor de 81,57%. Como o ferro está associado a frações de silicatos neste tipo de matriz, seria necessário utilizar HF para liberar todo o ferro encontrado na amostra. Todavia, os valores obtidos podem ser considerados como bons níveis de recuperação para os elementos, demonstrando que o método em questão pode ser utilizado com segurança e confiabilidade analítica na determinação dos elementos em questão.

Tabela 10. Comparação entre os resultados certificados e encontrados pelo método proposto em amostras de Material de Referência Certificado de Folha de Maçã (MRC 1515 – Apple Leaves).

Elementos	Valor Encontrado	Valor Certificado	Taxa de Recuperação
Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$288,0 \pm 3,6$	286 ± 9	100,7%
Ca (% m m ⁻¹)	1.5 ± 0.1	1.526 ± 0.02	103,0%
Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	5.2 ± 0.4	5.64 ± 0.24	93,09%
Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$67,2 \pm 0,6$	83 ± 5	81,57%
K (% m m ⁻¹)	$1,60 \pm 0,01$	$1,61 \pm 0,02$	101,0%
Mg (% m m ⁻¹)	$0,268 \pm 0.006$	$0,271 \pm 0.008$	99,11%
Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$53,7 \pm 0,6$	54 ± 3	99,60%
Na ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$24,1 \pm 0,1$	$24,04 \pm 1.2$	100,2%
Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	-	$0,91 \pm 0,12$	-
Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	-	$0,47 \pm 0,024$	-
Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$12,5 \pm 0,2$	12.5 ± 0.3	100,1%

5.4 Quantificação de inorgânicos em amostras de cera de carnaúba por ICP OES

Após a etapa de obtenção das melhores condições de preparo de amostra de cera de carnaúba, foram avaliados os teores de inorgânicos nas 34 amostras de cera oriundas de cinco empresas refinadoras (A – E). Deste total, 10 foram do Tipo 1, 12 amostras foram do Tipo 3 e outras 12 amostras foram do Tipo 4.

A Tabela 11 apresenta os termos obtidos para as correlações cruzadas entre todos os elementos estudados. Valores de correlação positivos indicam que as variáveis estudadas possuem uma tendência de aumentar simultaneamente, enquanto valores negativos de correlação mostram que as variáveis são inversamente proporcionais. Por conseguinte, valores de correlação próximos a zero indicam que não existe relação entre as variáveis e as mesmas são independentes entre si.

Tabela 11 Matriz de Correlação Cruzada entre os elementos Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Ni, Mn, Na, Pb e Zn.

	Al	Ca	Co	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	Pb	Zn
Al	1	0,85	0,12	-0,12	0,89	0,64	0,85	0,69	0,62	-0,61	0,06	0,49
Ca		1	0,12	-0,16	0,83	0,76	0,92	0,69	0,78	-0,54	0,11	0,49
Co			1	0,32	0,05	0,11	0,00	0,04	-0,02	-0,02	-0,07	0,07
Cu				1	-0,15	-0,08	-0,19	-0,21	-0,26	-0,17	0,06	0,41
Fe					1	0,60	0,85	0,65	0,62	-0,56	0,06	0,35
K						1	0,75	0,46	0,69	-0,39	0,14	0,65
Mg							1	0,72	0,75	-0,53	0,06	0,47
Mn								1	0,71	-0,50	-0,05	0,06
Na									1	-0,50	-0,05	0,43
Ni										1	0,03	-0,46
Pb											1	0,00
Zn												1

A maior parte das correlações observadas entre os elementos estudados são positivas, destacando-se as correlações entre Al vs Ca ($R^2 = 0,85$), Al vs Fe ($R^2 = 0,89$), Al vs Mg ($R^2 = 0,85$), Ca vs Fe ($R^2 = 0,83$), Ca vs Mg ($R^2 = 0,91$), Ca vs K ($R^2 = 0,77$), Ca vs Na ($R^2 = 0,78$), Fe vs Mg ($R^2 = 0,85$), K vs Mg ($R^2 = 0,75$), Mg vs Mn ($R^2 = 0,72$) e ainda Mg vs Na ($R^2 = 0,75$). Os teores de Cu e Ni apresentaram-se, de um modo geral, inversamente proporcionais (correlação negativa) às concentrações de todos os demais elementos investigados. Já os elementos Co, Pb e Zn não possuem correlações

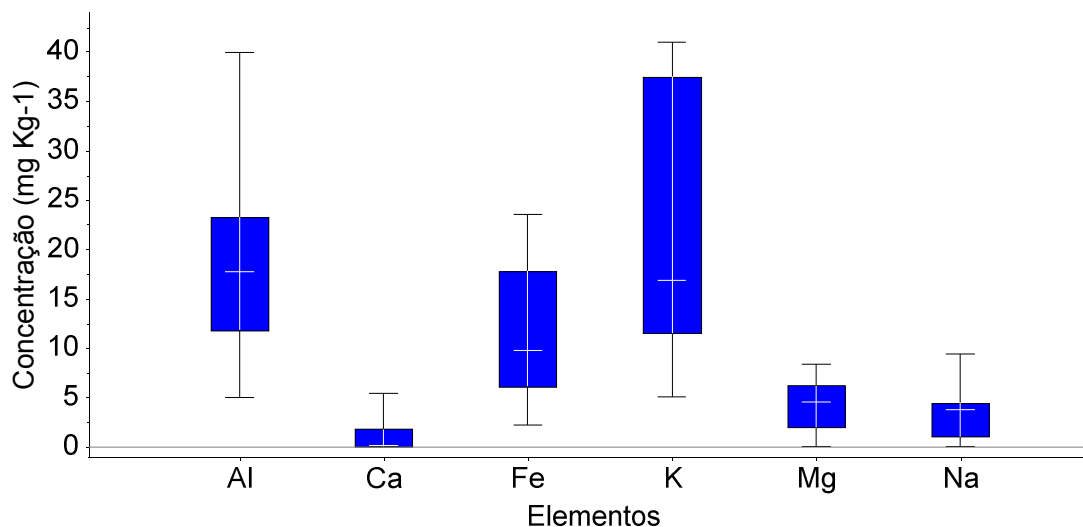
com os demais elementos, ou seja, suas concentrações aumentam ou diminuem de maneira independente. Por meio deste resultado, pode-se concluir que os macro e micro elementos possuem correlação positiva entre si, nos diferentes tipos de cera de carnaúba avaliados.

Como o conjunto de dados possui uma grande variabilidade, um estudo de *measure of location* se faz necessário para averiguar a distribuição dos dados. Assim, uma comparação entre os valores das médias e medianas mostrou que as mesmas foram semelhantes, demonstrando que o conjunto de dados possui uma distribuição normal (95%). Para tanto, gráficos de Box e Whisker bem como dados de médias e desvio foram utilizados.

5.4.1 Determinação de inorgânicos em ceras do Tipo 1

As Figura 31 a 35 apresentam a estatística descritiva dos resultados obtidos para as amostras de ceras do Tipo 1. Estas amostras possuem um teor (mg Kg^{-1}) de elementos inferior quando comparadas aos demais tipos de ceras (Tipo 3 e Tipo 4). Isso possivelmente em consequência de grau de pureza maior por parte do pó olho utilizado na fabricação deste tipo de produto em relação às demais ceras, que são produzidas a partir do pó da palha. Como mencionado anteriormente, o pó do olho é extraído de folhas ainda fechadas e que sofreram menos exposição às intempéries, caracterizando-se como um material mais claro. As Figura 31 e 33 apresentam os teores obtidos para os macro elementos na cera do Tipo 1. Na Figura 31, a caixa do gráfico contém 50% dos dados, de modo que o limite superior da caixa representa o percentil de 75% e o limite inferior de 25%. A linha dentro da caixa indica o valor da mediana e os extremos representam os valores máximos e mínimos observados para o conjunto de dados. Pode-se notar que para elementos como Al (4,96 a 30,70 mg Kg^{-1}), Fe (2,15 a 23,54 mg Kg^{-1}) e K (5,04 a 40,98 mg Kg^{-1}), com destaque para este último que apresenta uma diferença maior que os demais elementos, já que são elementos de fácil contaminação.

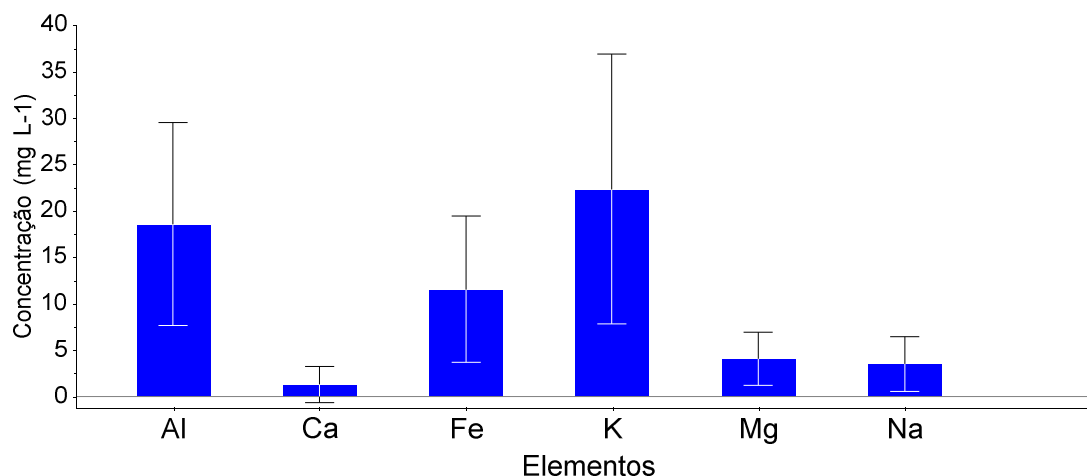
Figura 31. Gráfico de percentil para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 1.



Pode-se observar, em função da mediana que o conjunto de dados possui uma assimetria. Para Al, a maior parte dos dados obtidos se encontra abaixo da mediana. Já para Fe e K a maior parte dos dados se encontra acima da mediana do conjunto de dados.

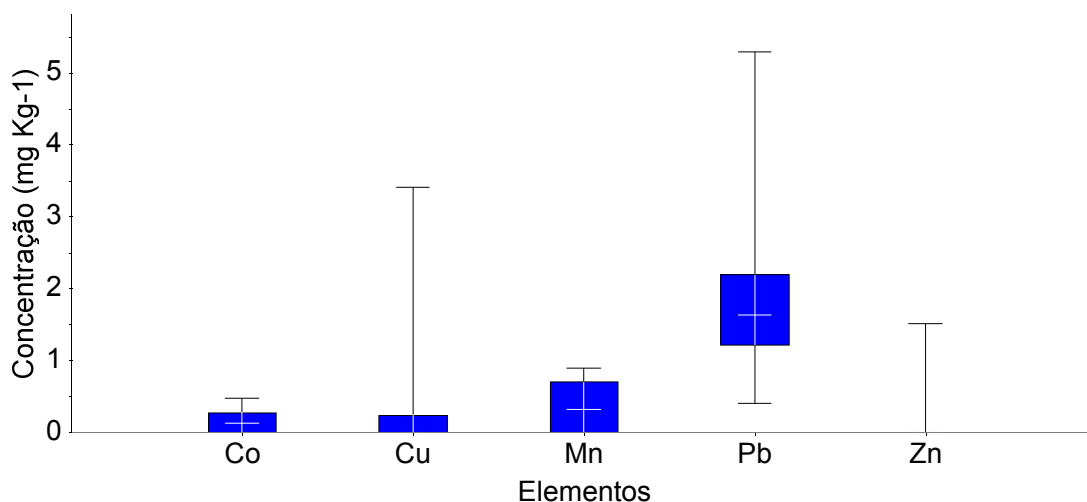
Essas variações podem ser promovidas por fontes diversas e de difícil controle como, por exemplo, diferentes fornecedores de pó cerífero ou ainda singularidades nas linhas de produção de cada usina beneficiadora. Já elementos como Ca (< LD a 5,39 $\mu\text{g g}^{-1}$), Mg (0,15 a 8,33 $\mu\text{g g}^{-1}$) e Na (< LD a 9,42 $\mu\text{g g}^{-1}$) possuem uma homogeneidade maior para este tipo de amostra. Isso pode ser comprovado avaliando a linha de distribuição abaixo e acima da mediana para esses elementos. A Figura 32 apresenta a média e o desvio padrão para os macro elementos. Assim, os valores obtidos foram: Alumínio ($16,53 \pm 8,04 \mu\text{g g}^{-1}$); Cálcio ($2,17 \pm 2,21 \mu\text{g g}^{-1}$); Ferro ($11,92 \pm 8,11 \mu\text{g g}^{-1}$); Potássio ($22,50 \pm 14,35 \mu\text{g g}^{-1}$) Magnésio ($4,24 \pm 3,06 \mu\text{g g}^{-1}$) e Sódio ($4,37 \pm 3,19 \mu\text{g g}^{-1}$).

Figura 32. Estatística descritiva para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 1.



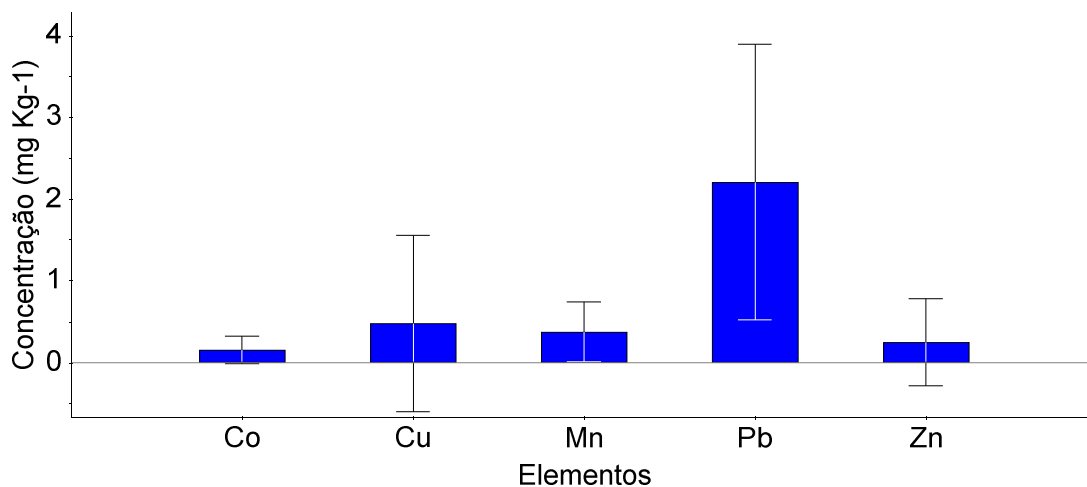
A Figura 33 apresenta o gráfico de percentil para os elementos presentes em quantidades menores nas amostras de cera de carnaúba do Tipo 1. O elemento Co ($< LD$ a $0,51 \mu\text{g g}^{-1}$) apresentou uma distribuição bastante homogênea em todas as amostras estudadas. O elemento Cu ($< LD$ a $3,42 \mu\text{g g}^{-1}$) apresentou uma grande variação. Todavia, este elemento não foi detectado pelo método em questão em mais de 50% das amostras de cera do Tipo 1; cerca de 75% das amostras estudadas possuem teor igual ou inferior a $0,33 \mu\text{g g}^{-1}$. Apenas o conjunto de amostras oriundo de uma das empresas apresentou teor de cobre em torno de $3,0 \mu\text{g g}^{-1}$. Esta amostra possivelmente se caracteriza como um *outlier* dentro do conjunto de dados. Todavia, como o estudo consiste em uma análise exploratória, estas amostras foram preservadas dentro do conjunto de dados. Para o Manganês ($< LD$ a $0,88 \mu\text{g g}^{-1}$) foi observada uma distribuição simétrica do conjunto de dados, com mediana em torno de $0,32 \mu\text{g g}^{-1}$ deste elemento. Para o Chumbo ($1,35$ a $5,28 \mu\text{g g}^{-1}$), considerado um elemento potencialmente tóxico, observa-se uma assimetria no conjunto de dados e a grande maioria encontra-se com valores acima de $2,15 \mu\text{g g}^{-1}$ deste elemento. Já para o elemento Zinco, este foi detectado nas amostras de uma única usina beneficiadora. Em todas as demais amostras o elemento se mostrou abaixo dos limites de detecção para o método.

Figura 33. Gráfico de percentil para Co, Cu, Mn, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 1.



A Figura 34 apresenta as médias e desvios para os elementos em menor concentração nas amostras de cera do tipo 1.

Figura 34. Estatística descritiva para Co, Cu, Mn, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 1.



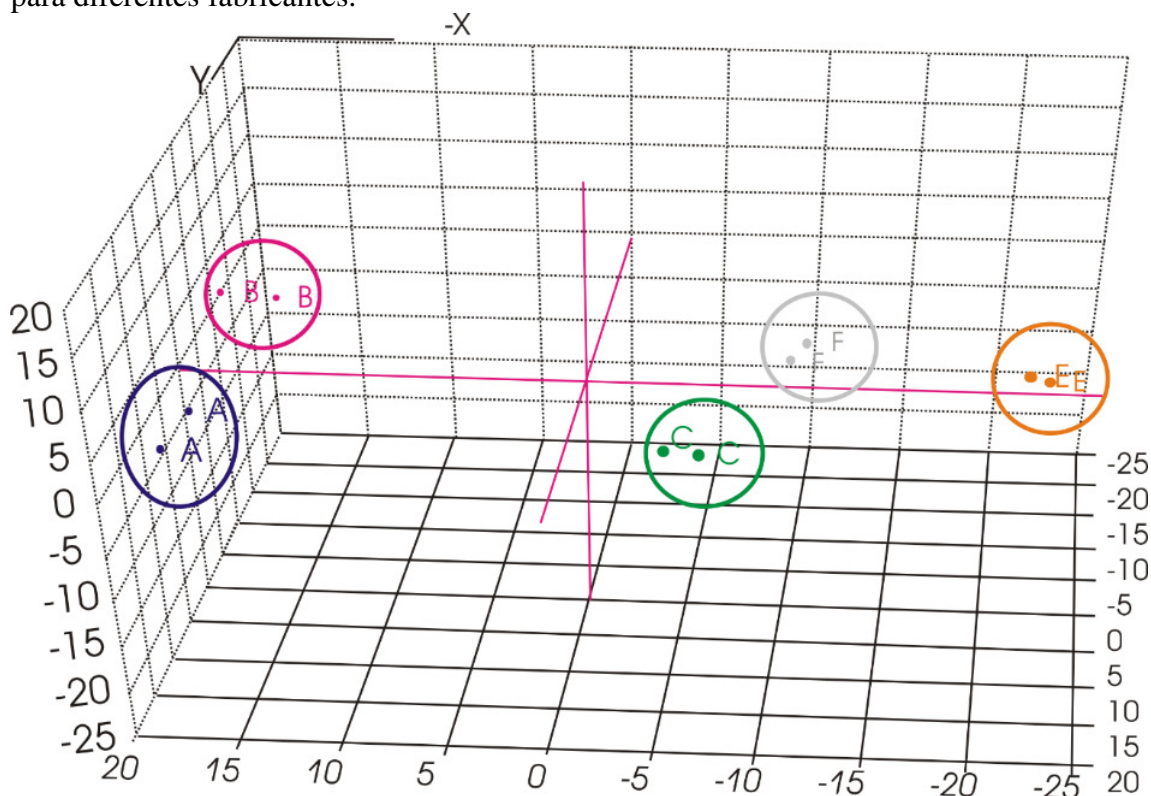
Assim, tem-se que: Co ($0,25 \pm 0,18 \mu\text{g g}^{-1}$); Cu ($0,74 \pm 1,41 \mu\text{g g}^{-1}$); Mn ($0,37 \pm 0,37 \mu\text{g g}^{-1}$); Pb ($3,13 \pm 1,74 \mu\text{g g}^{-1}$) e Zn ($0,34 \pm 0,73 \mu\text{g g}^{-1}$). Vale ressaltar que para o caso do Zn a mediana, que indica um valor abaixo do limite de detecção para este elemento, é um parâmetro mais adequado para indicar seu valor dentro do conjunto de dados. Com relação ao Níquel, foram observados grandes diferenças para este elemento. Os teores de Ni variaram de 0,24 a $116,2 \mu\text{g g}^{-1}$, com uma mediana de $110,48 \mu\text{g g}^{-1}$.

Para uma melhor investigação das semelhanças e diferenças entre as ceras oriundas de diferentes fabricantes, uma Análise de Componentes Principais foi

empregada. Com apenas 2 componentes principais é possível descrever 94% dos dados, sendo 79% da variância total descrita pela primeira componente principal (PC1) e 15% pela PC2. Assim, de acordo com o gráfico dos *escores* da PCA visto na Figura 35, é possível observar a diferenciação entre as ceras produzidas em função do fabricante, de maneira a formar cinco grupos distintos em função dos teores dos elementos estudados nas amostras de cera de carnaúba do Tipo 1. Já a Figura 36 apresenta o gráfico de *pesos* da PCA.

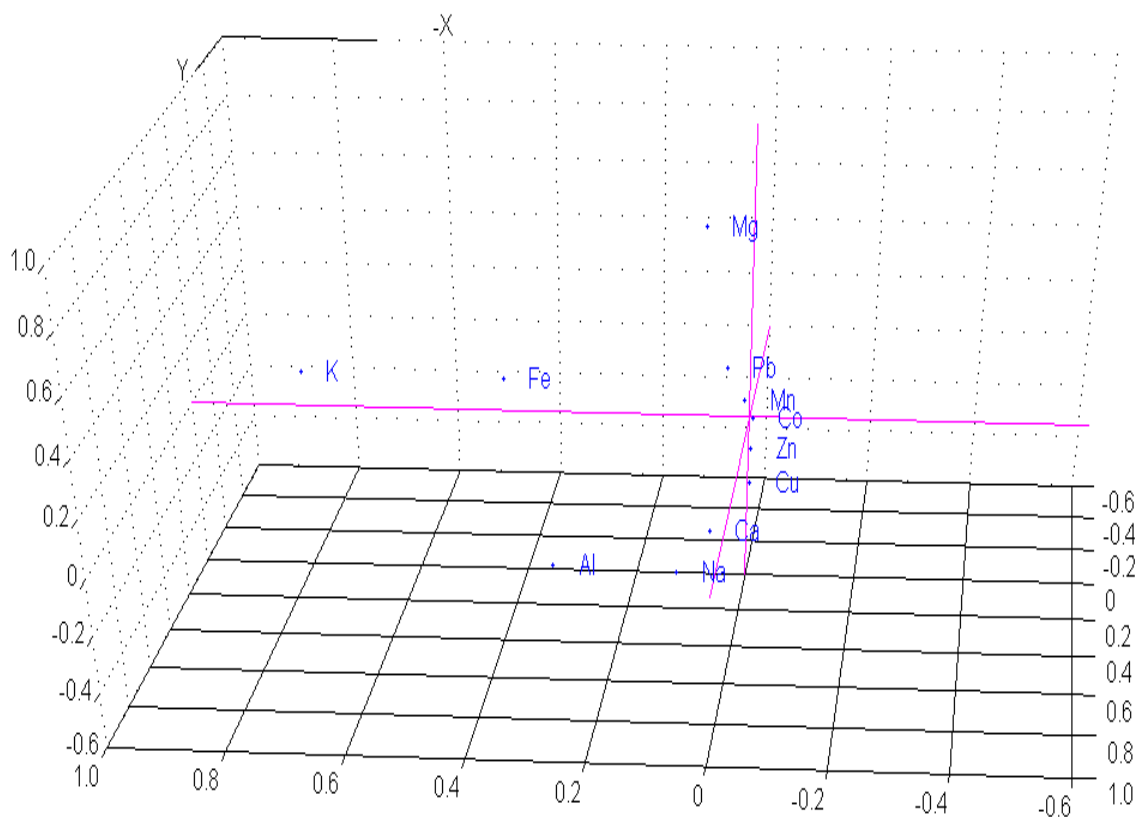
As amostras das empresas codificadas como **A** e **B** possuem um teor de potássio superior às demais ceras. Já as amostras das empresas **C**, **D** e **E** apresentaram teores inferiores para os elementos estudados.

Figura 35. Gráfico de Escores da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 1 para diferentes fabricantes.



Os elementos que se encontram próximos ao eixo central do sistema ortogonal de componentes principais do gráfico de *pesos* não possuem grande influência na formação e separação dos grupos de amostras observados. O Gráfico de pesos da PCA (Figura 36) resalta também resalta o peso das variáveis Al, Fe e K sobre o conjunto de dados.

Figura 36. Gráfico de Pesos da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 1 para diferentes fabricantes.



5.4.2 Determinação de inorgânicos em ceras do Tipo 3

De um modo geral, os teores dos elementos avaliados nas amostras de cera de carnaúba do Tipo 3 se mostraram superiores aos observados para as ceras do Tipo 1. As Figura 37 a 41 apresentam a análise descritiva dos teores dos elementos investigados. A mesma diferenciação em macro e micro elementos feita para as ceras Tipo 1 foi empregada para as cera do Tipo 3.

De acordo com os resultados observados nas Figura 37 e 39, houve uma menor dispersão dos valores de concentração dos elementos Al, Ca, Fe, K, Mg e Na nas amostras de cera do Tipo 3.

Figura 37. Gráfico de percentil para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3.

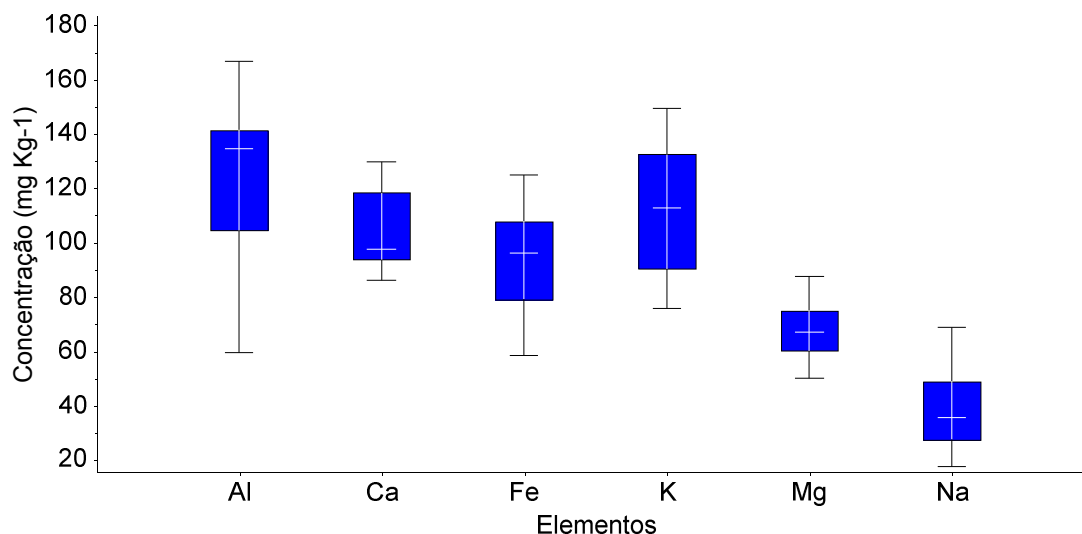
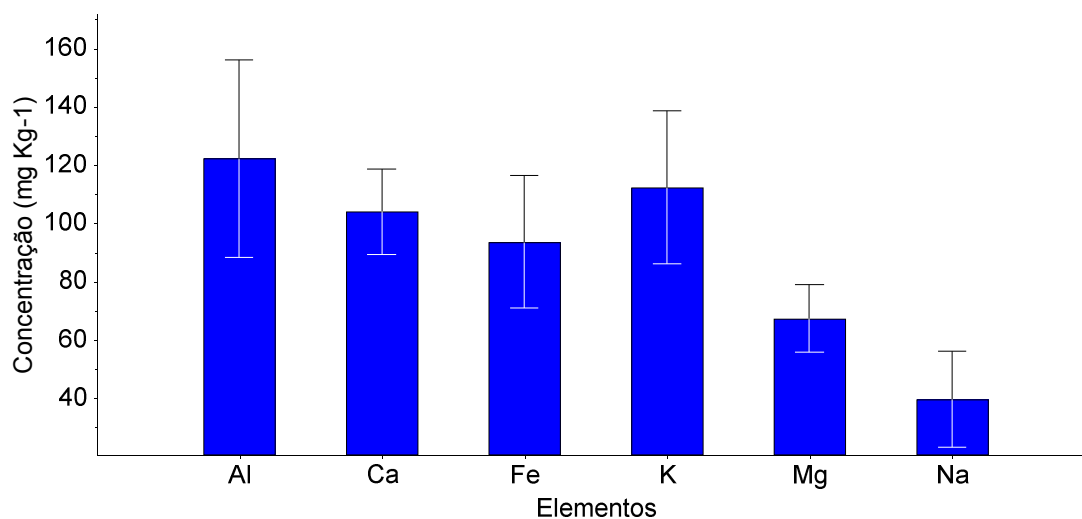


Figura 38. Estatística descritiva para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3.



O teor de Al variou de 59,41 a 166,73 $\mu\text{g g}^{-1}$, de modo que a maior parte dos valores observados se encontrou abaixo da mediana (134,36 $\mu\text{g g}^{-1}$) do conjunto de dados, evidenciando uma assimetria na distribuição dos dados obtidos para os teores de alumínio. A média e desvio para este elemento foi de $123,22 \pm 33,64 \mu\text{g g}^{-1}$. Os teores de Ca tiveram uma variação entre 90,12 e 129,75 $\mu\text{g g}^{-1}$; a média e desvio foram de $104,08 \pm 15,27 \mu\text{g g}^{-1}$, de modo que a maior parte dos resultados se encontrou acima da mediana (96,02 $\mu\text{g g}^{-1}$); desta forma os teores de cálcio entre as diferentes usinas apresentam assimetria. Para o Fe a variação foi de 63,24 a 124,70 $\mu\text{g g}^{-1}$ e a média de

$96,21 \pm 20,14 \mu\text{g g}^{-1}$; os dados se apresentaram distribuídos de maneira simétrica em torno da mediana ($98,03 \mu\text{g g}^{-1}$). Para o elemento K a variação foi de 75,63 a $149,18 \mu\text{g g}^{-1}$ com uma média de $113,32 \pm 27,14 \mu\text{g g}^{-1}$; os resultados se mostraram com uma distribuição simétrica em torno da mediana ($115,11 \mu\text{g g}^{-1}$). Para o elemento Mg a variação foi de 50,00 a $89,12 \mu\text{g g}^{-1}$ com média de $67,83 \pm 12,97 \mu\text{g g}^{-1}$; novamente os dados se mostraram simétricos em torno da mediana ($66,67 \mu\text{g g}^{-1}$) do conjunto de dados. Para o elemento Na, a variação dos teores foi de 17,34 a $68,70 \mu\text{g g}^{-1}$ com uma média de $40,42 \pm 16,55 \mu\text{g g}^{-1}$.

Os dados também se mostraram simétricos em torno da mediana ($39,66 \mu\text{g g}^{-1}$) do conjunto de dados. Uma comparação entre média e mediana é sempre importante para mostrar que o conjunto de dados possui uma distribuição normal.

A estatística descritiva para os teores de micro elementos nas amostras de cera do Tipo 3 é apresentada na Figura 39 e Figura 40.

Para o elemento Co, a variação foi de 0,023 a $0,48 \mu\text{g g}^{-1}$ com uma média de $0,19 \pm 0,16 \mu\text{g g}^{-1}$. A mediana para os dados relacionados ao cobalto foi de $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$. Para o elemento Cu a variação foi de <LD a $0,79 \mu\text{g g}^{-1}$, com uma média de $0,24 \pm 0,29 \mu\text{g g}^{-1}$. Nesta avaliação, chama atenção o resultado para o Mn. A variação foi de 5,40 a $14,95 \mu\text{g g}^{-1}$, com uma média de $9,60 \pm 3,41 \mu\text{g g}^{-1}$.

Pode-se observar uma pequena assimetria no conjunto de dados. Todavia, quando comparado com o valor médio observado para as ceras do Tipo 1, temos um aumento muito significativo superior a 2000%. Para o elemento Ni a variação observada foi de 0,23 a $0,64 \mu\text{g g}^{-1}$, com uma média de $0,37 \pm 0,11 \mu\text{g g}^{-1}$. A mediana para o mesmo foi de $0,35 \mu\text{g g}^{-1}$ e a maior parte dos dados estavam abaixo deste valor (dados assimétricos).

Figura 39. Gráfico de percentil para Co, Cu, Mn, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3

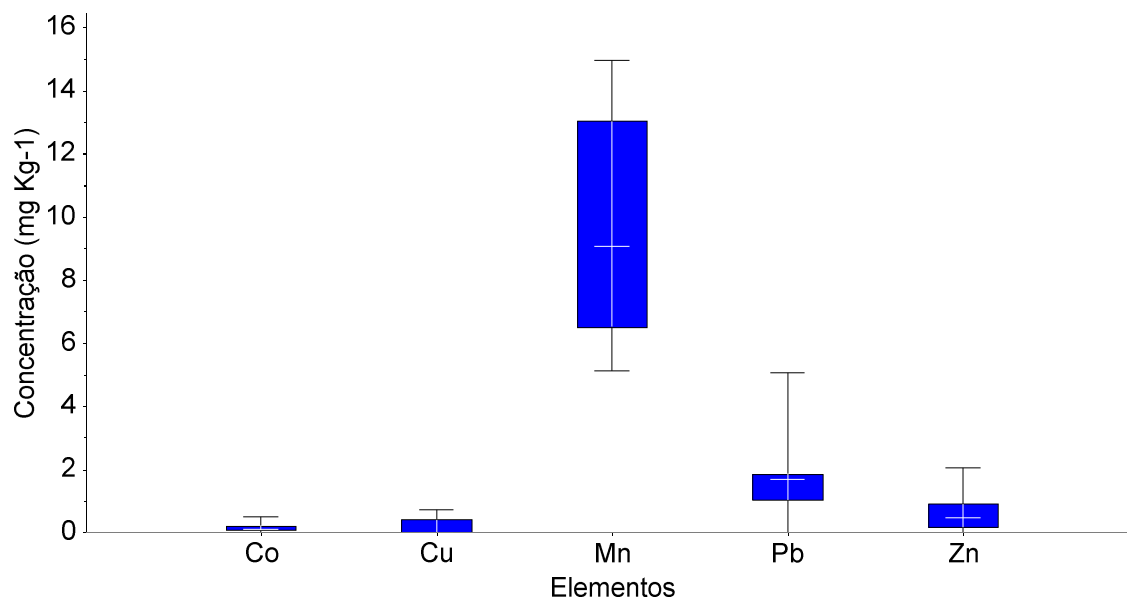
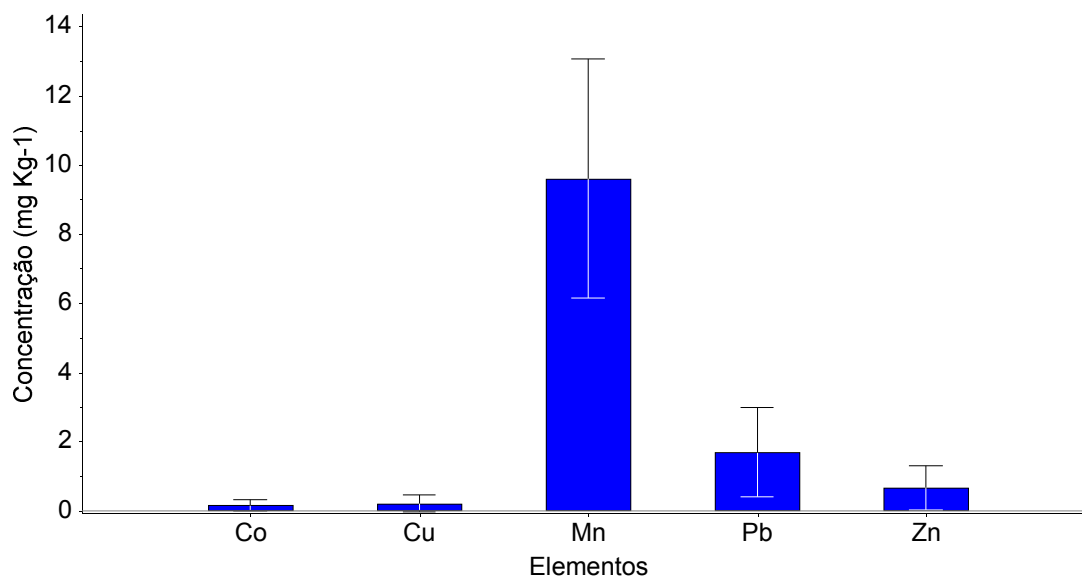


Figura 40. Estatística descritiva para Co, Cu, Mn, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3

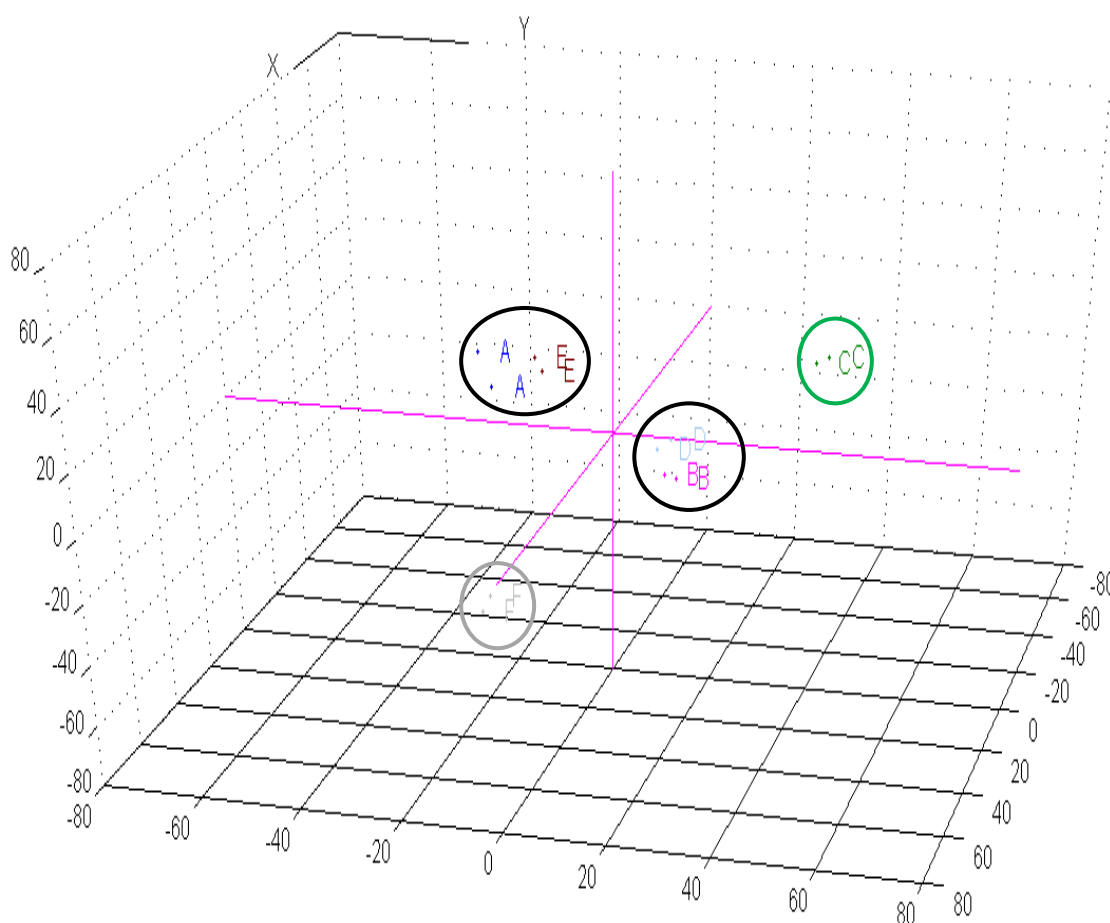


Para o elemento Pb, os valores foram semelhantes aos observados para as ceras do Tipo 1, apresentando variação de 0,95 a 5,76 $\mu\text{g g}^{-1}$ com uma média de $2,40 \pm 1,49 \mu\text{g g}^{-1}$. Para o elemento Zn a variação observada foi de < LD a 2,54 $\mu\text{g g}^{-1}$ com média de $0,83 \pm 0,87 \mu\text{g g}^{-1}$. Os dados para Zn se mostraram assimétricos, sendo a maior parte dos valores acima da mediana ($0,47 \mu\text{g g}^{-1}$). Comparando-se novamente os valores de média e mediana foi possível observar, como feito anteriormente, uma

similaridade entre os valores destes parâmetros, mostrando que o conjunto de dados possui uma distribuição normal.

Aplicando-se análise de componentes principais ao conjunto de dados, com três componentes foi possível explicar aproximadamente 95% da variância total dos dados. 72% da variância é explicada apenas pela componente PC1; 18% é explicada pela PC2. A Figura 41 apresenta o gráfico de *escores* da PCA para as amostras do Tipo 3.

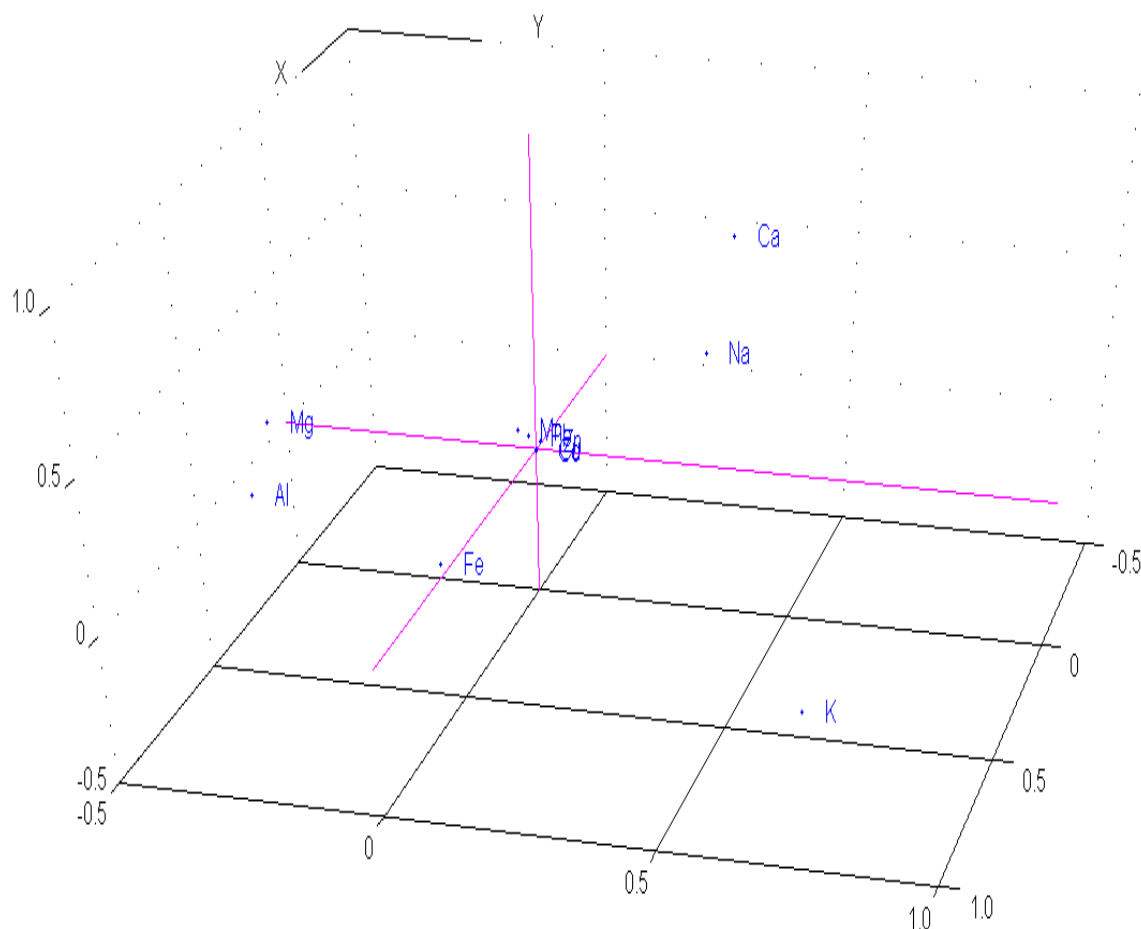
Figura 41. Gráfico de escores da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 3 para diferentes fabricantes.



De acordo com a Figura 41 é possível observar uma maior semelhança entre as características químicas das amostras de cera do tipo 3, uma vez que houve a formação de grupos com amostras de diferentes usinas beneficiadoras. Entretanto, as amostras de outras duas usinas não agruparam, sendo do fabricante **C** – que se destaca em função dos teores de Na elevados, e do fabricante **F** que possuem o maior teor de Fe (cerca de $120,0 \mu\text{g g}^{-1}$). As amostras das empresas **A** e **E** possuem semelhança em

relação aos teores de Al e Mg, e desta maneira apresentam-se no sistema de componentes agrupadas. Já as amostras das empresas **B** e **D** apresentaram teores de magnésio semelhantes. As variáveis (elementos Co, Cu, Mn, Pb, Ni, e Zn) que se encontram no certo de coordenadas do gráfico de *pesos* (Figura 42) da PCA tiveram pouca ou nenhuma influência na separação das amostras provenientes de diferentes fabricantes.

Figura 42. Gráfico de Pesos da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 3 para diferentes fabricantes.



5.4.3 Determinação de inorgânicos em ceras do Tipo 4

Os teores dos elementos estudados nas ceras do Tipo 4 foram superiores aos encontrados nas demais amostras de cera de carnaúba. A análise estatística para os macro elementos nas amostras de cera de carnaúba do Tipo 4 é apresentada na Figura 43 e Figura 44. De um modo geral, para os elementos em maior concentração neste tipo

de amostra não foram observadas grandes variações nos teores dos elementos em função dos fabricantes.

Figura 43. Gráfico de percentil para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 4.

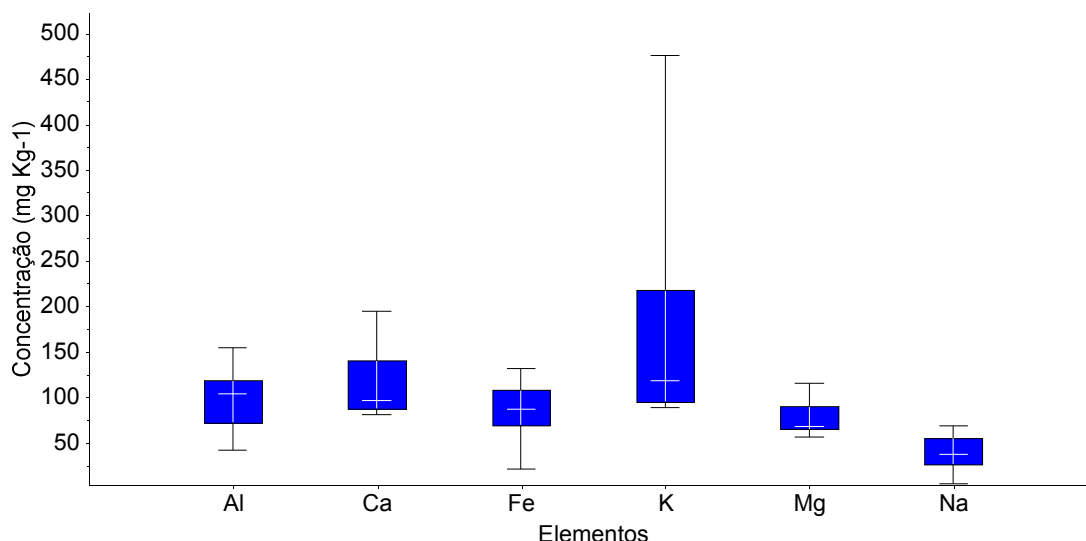
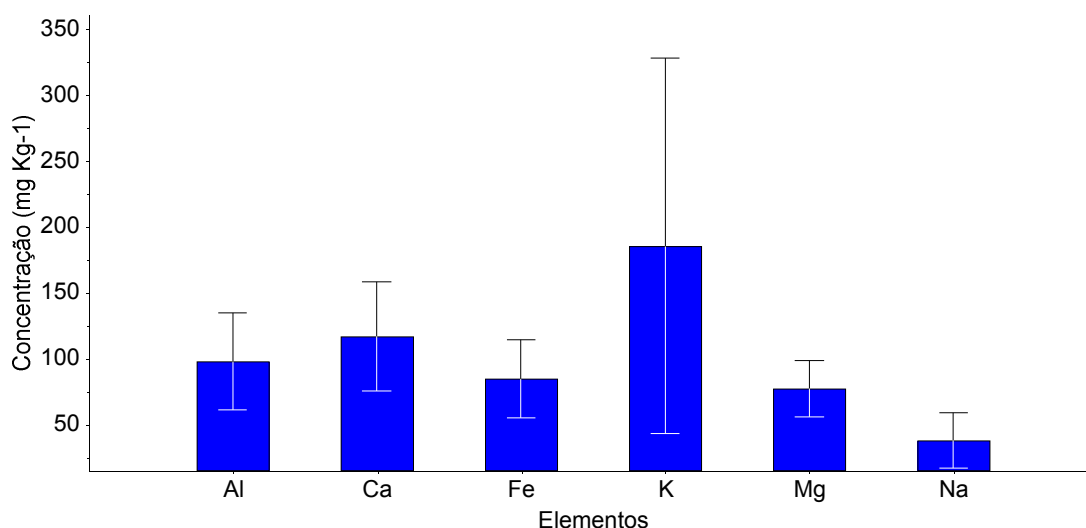


Figura 44. Estatística descritiva para Al, Ca, Fe, K, Mg e Na avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 4.



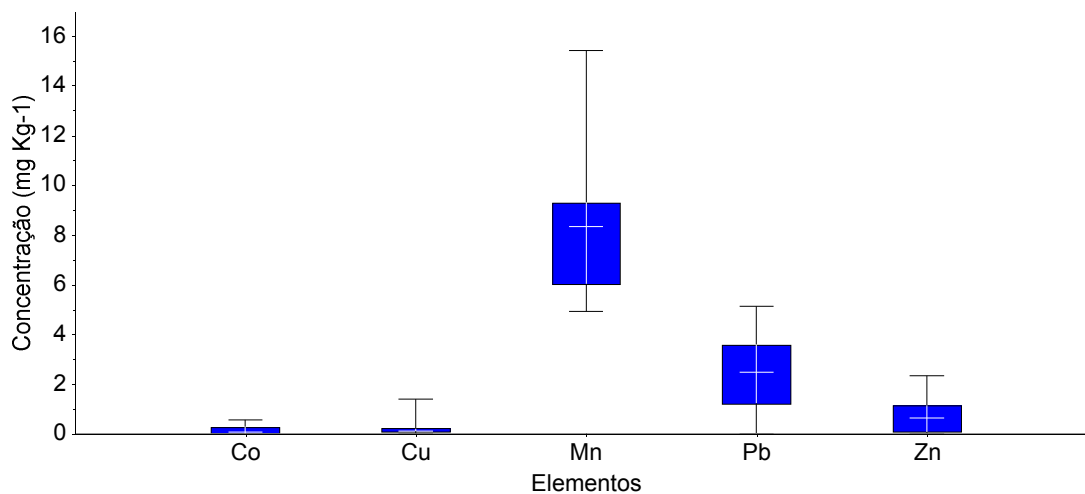
Para o elemento Al a variação foi de 41,05 a 154,31 $\mu\text{g g}^{-1}$ com uma média de $97,63 \pm 37,15 \mu\text{g g}^{-1}$. Os dados se mostraram simétricos em torno da mediana ($103,36 \mu\text{g g}^{-1}$). Para o elemento Ca a variação foi de 80,14 a 194,12 com uma média de $116,79 \pm 41,45$. A maior parte dos valores observados se encontra acima da mediana ($95,81 \mu\text{g g}^{-1}$) para o conjunto de dados. Para o elemento Fe, os dados se mostraram

distribuídos de forma simétrica em torno da mediana ($86,28 \mu\text{g g}^{-1}$) com uma variação de 20,11 a $131,44 \mu\text{g g}^{-1}$ e com uma média de $84,52 \pm 29,93 \mu\text{g g}^{-1}$.

Dentre os macro elementos da cera de carnaúba do Tipo 4, o elemento K apresentou a maior variação percentual de concentração, sendo de 88,49 a $475,08 \mu\text{g g}^{-1}$ com uma média de $185,34 \pm 142,56 \mu\text{g g}^{-1}$. A mediana do conjunto de dados para o potássio foi de 117,61, sendo que 75% das amostras apresentaram teor inferior a $217,0 \mu\text{g g}^{-1}$. As amostras provenientes do fabricante B apresentaram teor deste elemento bastante elevado em relação às demais amostras de cera do Tipo 4 pertencentes ao conjunto de dados. Assim, tem-se que a mediana se caracteriza como um parâmetro mais adequado do que a própria média para este elemento. Para o elemento Mg a variação foi de 55,29 a $115,12 \mu\text{g g}^{-1}$ com uma média de $76,97 \pm 21,23 \mu\text{g g}^{-1}$. A mediana para este elemento foi de $67,23 \mu\text{g g}^{-1}$. A maior parte dos dados se encontra acima da mediana para o magnésio. Já para o elemento Na, foi observada uma simetria (mediana de 36,40) na distribuição dos teores do elemento entre as amostras, evidenciando a normalidade da distribuição dos dados, com uma variação de 4,76 a $67,76 \mu\text{g g}^{-1}$ e com uma média de $37,66 \pm 20,94 \mu\text{g g}^{-1}$.

A análise estatística para micro elementos nas amostras de cera do tipo 4 é apresentada na Figura 45 e Figura 46. Os teores destes elementos foram semelhantes aos observados para as amostras dos Tipos 1 e 3, com exceção do Mn que apresentou uma variação de 4,91 a $15,40 \mu\text{g g}^{-1}$ e média de $9,28 \pm 3,43 \mu\text{g g}^{-1}$. As medianas para os demais elementos foram: Co ($0,040 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($0,079 \mu\text{g g}^{-1}$), Ni, ($0,032 \mu\text{g g}^{-1}$), Pb ($2,44 \mu\text{g g}^{-1}$) e Zn ($0,87 \mu\text{g g}^{-1}$). Comparando-se esses valores com os encontrados nos demais tipos de cera, os mesmo se mantiveram em torno de $1 \mu\text{g g}^{-1}$.

Figura 45. Gráfico de percentil para Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 4.



Os gráficos de *escores* e *pesos* da PCA para as amostras de cera de carnaúba do tipo 4 são apresentados nas Figura 47 e 49, respectivamente. Vale salientar que a amostra do tipo 3 é um derivado das ceras do tipo 4, como mencionado na introdução. A primeira componente principal descreve cerca de 85% da variância total do sistema. Já a segunda componente principal descreve cerca de 7% da variância dos dados.

Figura 46. Estatística descritiva para Co, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn avaliados nas amostras de cera de carnaúba do tipo 4.

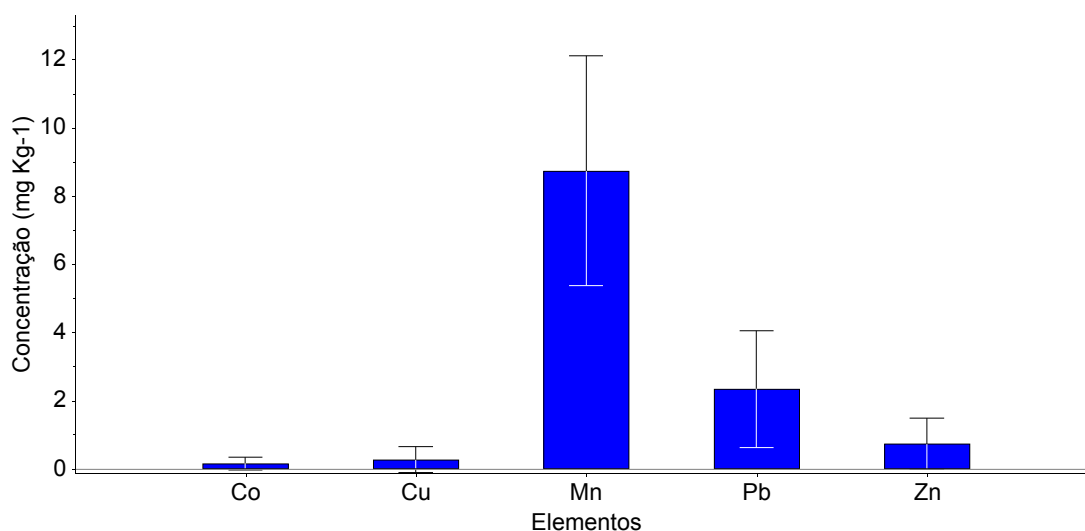
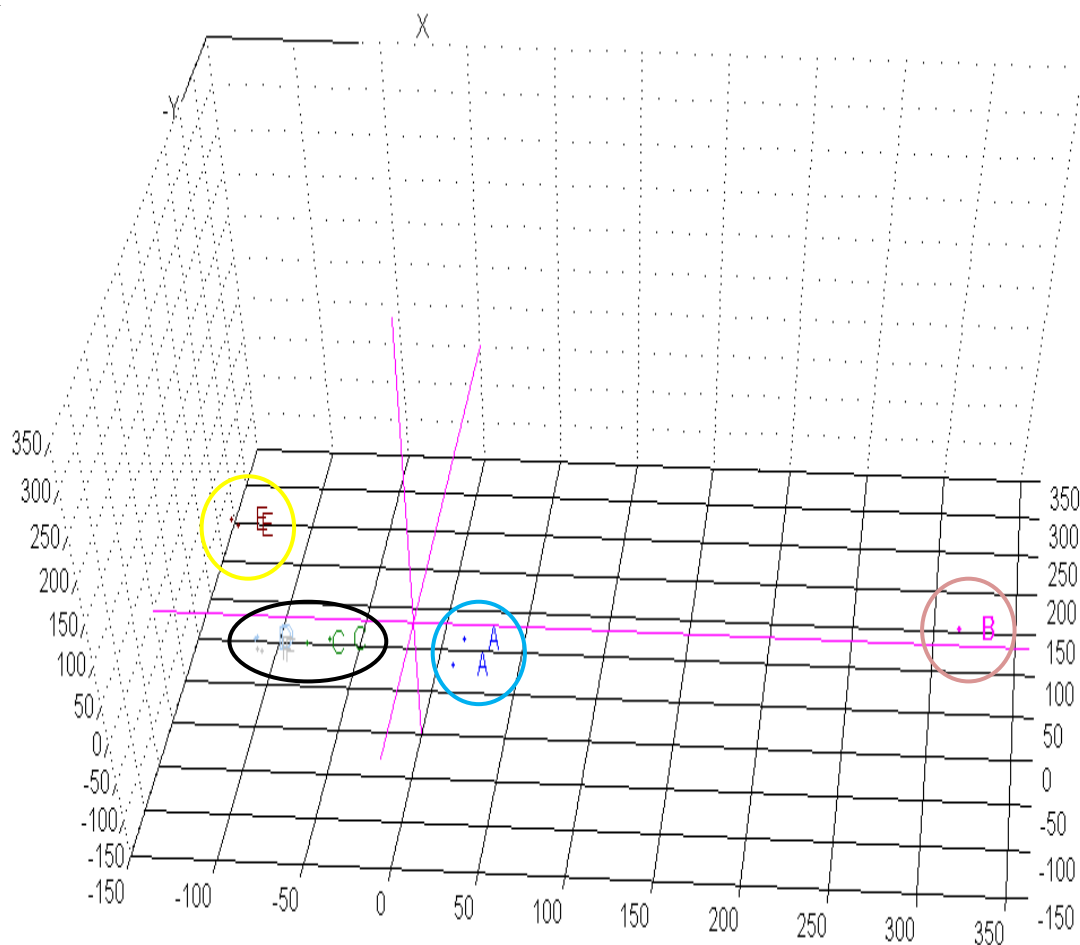


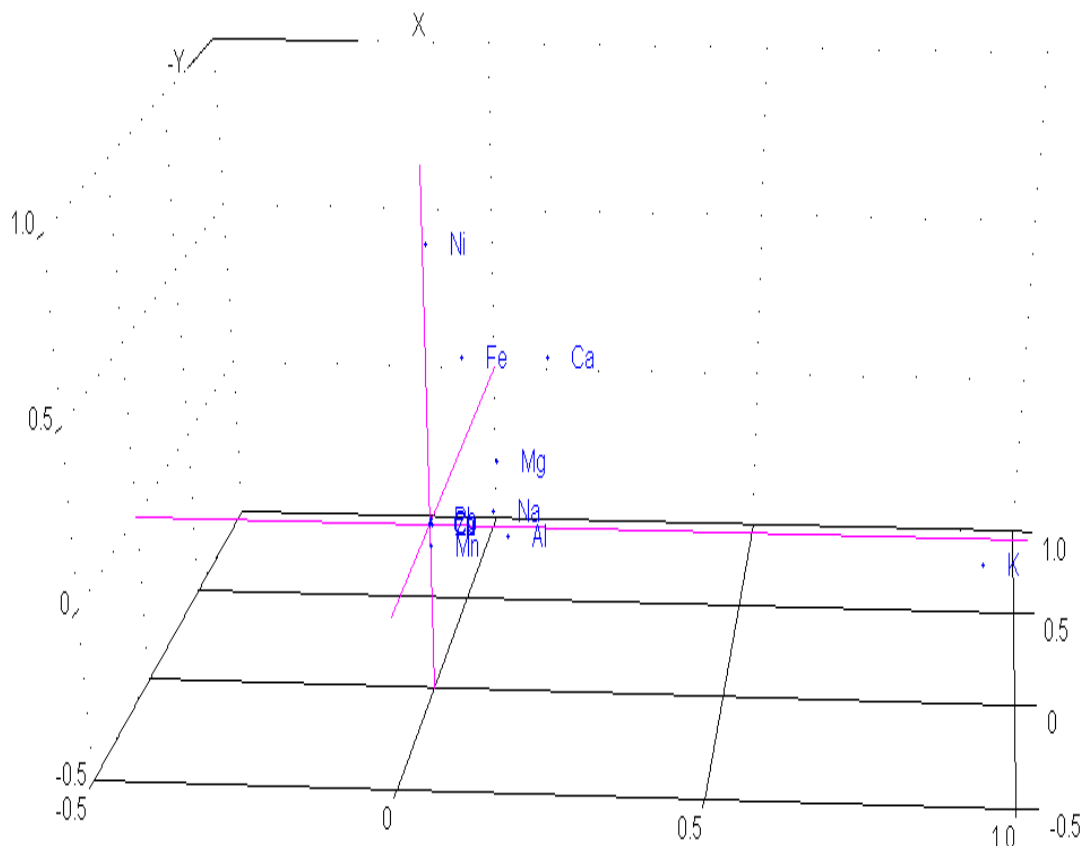
Figura 47. Gráfico de Escores da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 4 para diferentes fabricantes.



De acordo com a Figura 47, pode-se observar a formação de um grupo composto pelos fabricantes **C**, **D** e **E**. Isso mostra que o processo de fabricação destas ceras por parte das referidas usinas geram produtos com alto grau de semelhança química. As amostras destas empresas possuem teores dos elementos inorgânicos estudados menores em comparação com as amostras coletadas das demais usinas.

As amostras do fabricante **E** possuem teores de inorgânicos semelhantes quando comparados às amostras do grupo **C**, **D** e **F**. Todavia, as mesmas apresentaram teores de Ni elevados, o que foi responsável pela diferenciação em relação às outras. As amostras do fabricante **B** possuem um teor elevado de potássio, o que às diferencia das outras amostras.

Figura 48. Gráfico de Pesos da PCA para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 4 para diferentes fabricantes.



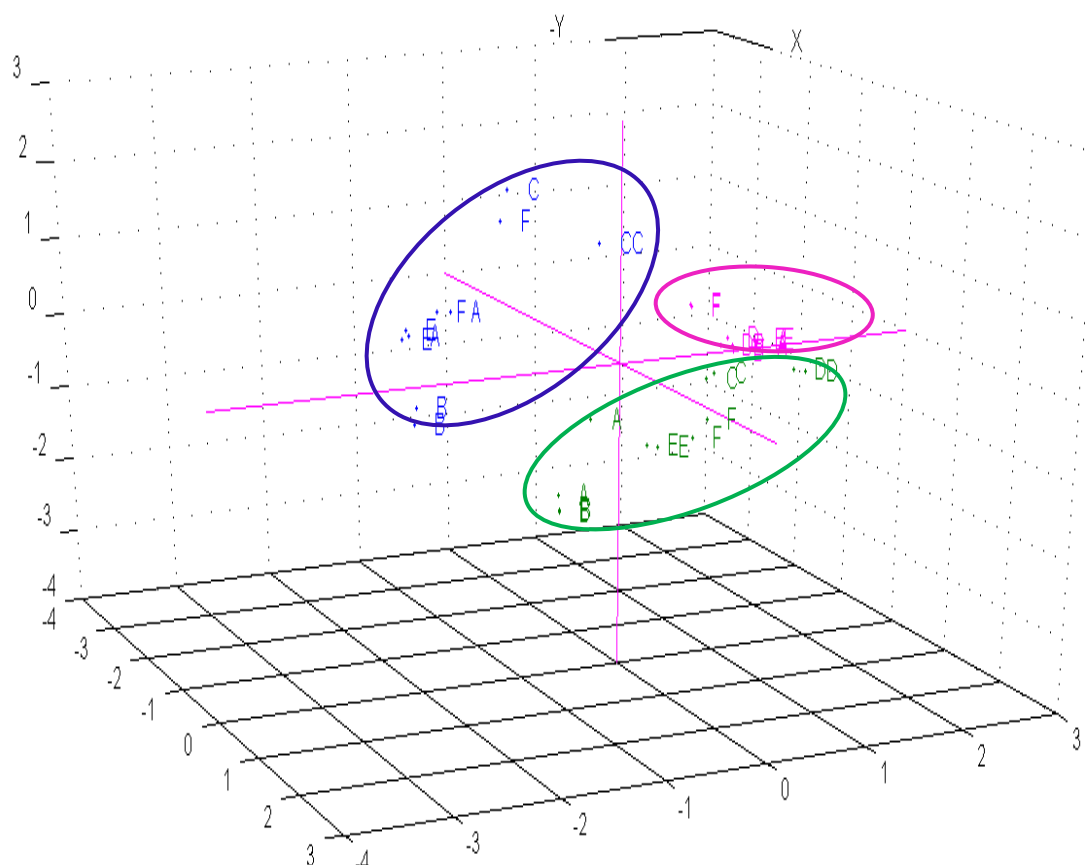
5.5 Análise de Componentes Principais para o conjunto de dados

Na construção do modelo para as ceras dos três tipos, os dados foram pré-processados por meio de normalização pela média. Essa normalização se faz necessária para que cada variável tenha a mesma influência no modelo, uma vez que a ordem de grandeza dos valores é bastante distinta.

Com o objetivo de observar o comportamento do conjunto de dados como um todo, buscando explicações para as relações existentes entre as amostras e as variáveis, foi feita uma análise de componentes principais. O modelo foi criado com 32 amostras e 8 variáveis, novamente aplicando-se o pré-processamento AE, com um número máximo de componentes igual a três. De acordo com os resultados da PCA (Figura 49 e Figura 50), com apenas duas componentes principais é possível explicar cerca de 84% da variabilidade total encontrada. Apenas a primeira componente já explica cerca de 50%, enquanto a segunda componente contribui com cerca de 35%.

Com a inserção de uma terceira componente principal a quantidade de variação que pode ser explicada chega pelo modelo chega a cerca de 98%.

Figura 49. Gráfico de escores da PCA para o conjunto de amostras dos três tipos de cera provenientes dos diferentes fabricantes. PC2 versus PC1. ---- Ceras Tipo 1; ---- Ceras Tipo 3; ---- Ceras Tipo 4.

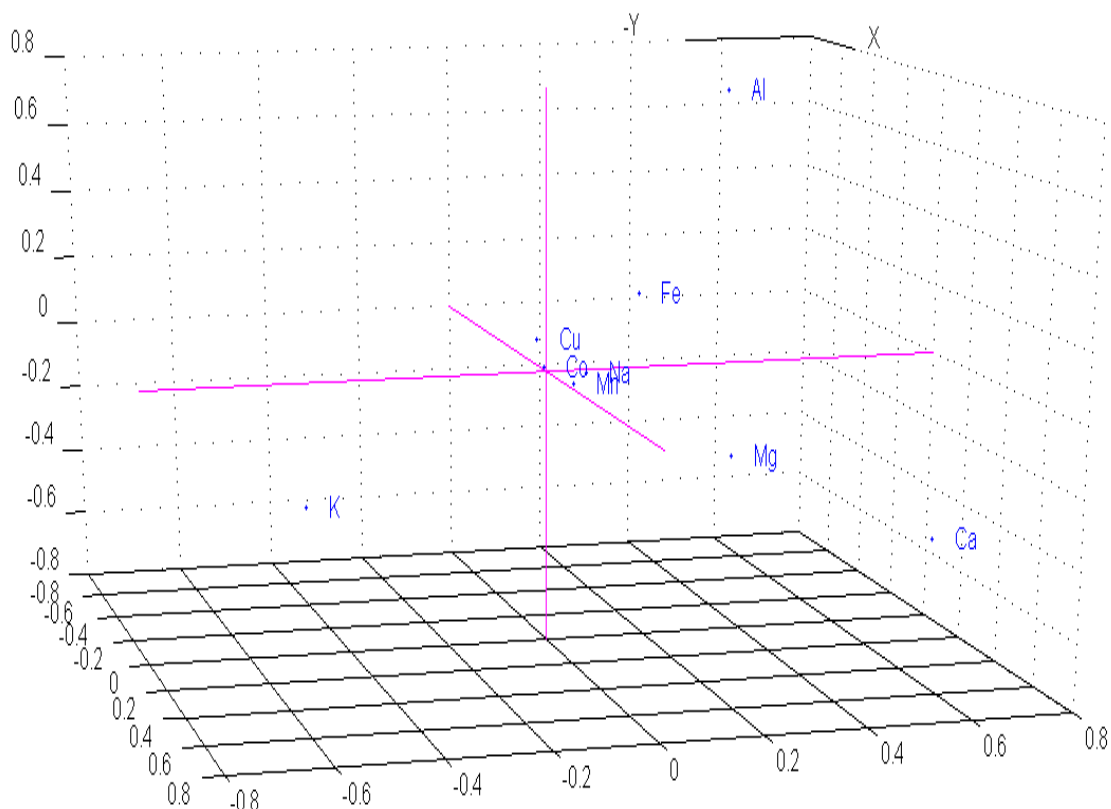


Três agrupamentos podem ser observados quando os dados são dispostos em relação às duas primeiras componentes. Neste gráfico, pode-se ver a formação de um grupo de amostras do tipo 1 (amarelo) e um grupo de amostras dos tipos 3 e 4 (vermelho), da mesma forma que o observado na análise hierárquica de grupos.

Para melhor compreensão dos dados, o gráfico de escores deve ser comparado com o de pesos da PCA, permitindo assim uma correlação das variáveis com as amostras. As variáveis Ca e Mg são as principais responsáveis pelo agrupamento das amostras dos tipos 3 e 4, ou seja, os teores destes elementos são mais semelhantes para estas amostras. Os elementos que aparecem próximos ao zero no gráfico de pesos, tiveram uma menor contribuição na formação dos grupos. O gráfico de

pesos também pode ser utilizado para avaliar a causa de amostras anômalas no conjunto de dados. Por exemplo, uma das amostras do Tipo 1 apresentou-se com uma distância maior do grupo, e isso deve-se ao teor de alumínio nesta amostra ser maior que as demais. Este é o fator que a torna diferente do restante de amostras do grupo.

Figura 50. Gráfico de pesos da PCA para o conjunto de amostras dos três tipos de cera provenientes dos diferentes fabricantes. PC2 versus PC1.

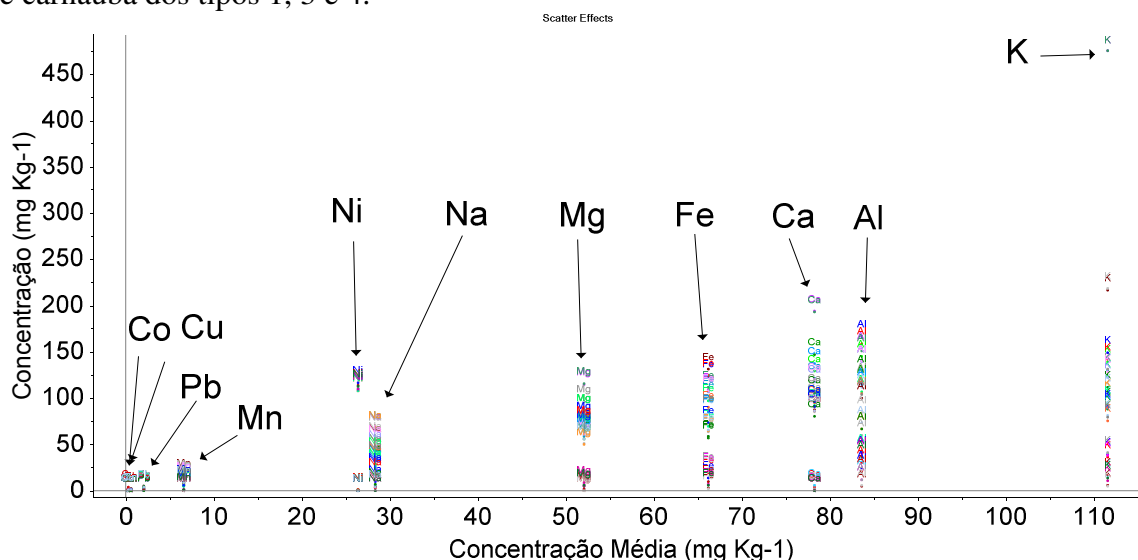


No trabalho de Wang, foi aplicada análise de componentes principais utilizando os dados relativos à composição orgânica das ceras, tendo observado a formação de dois grupos distintos de amostras, um entre as amostras do Tipo 1 e outro para as amostras do Tipo 4. Todavia, os autores não se detiveram em explicar quais os fatores que levaram a formação de grupos distintos entre as amostras de cera utilizadas no trabalho.

Por fim, a Figura 50 e a Figura 51 apresentam a distribuição média relativa dos elementos estudados nas amostras de cera de carnaúba. Pode-se observar que o elemento com maior teor médio nas amostras estudadas é o potássio, seguido por Al,

Ca, Fe Mg e Na. Observa-se média elevada para Ni, todavia, este resultado deve-se a um conjunto de amostras que possuíam altos valores de concentração deste elemento.

Figura 51. Gráfico de distribuição média dos elementos nas amostras estudadas de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4.



Por fim, os elementos que se encontram em maior abundância nas amostras de cera de carnaúba do Tipo 1 são, em ordem decrescente: K (22,3 mg Kg⁻¹), Al (20,5 mg Kg⁻¹), Fe (11,5 mg Kg⁻¹), Mg (4,0 mg Kg⁻¹), Na (3,5 mg Kg⁻¹), Pb (2,2 mg Kg⁻¹), Ca (1,2 mg Kg⁻¹), Cu (0,5 mg Kg⁻¹), Mn (0,4 mg Kg⁻¹), Zn (0,2 mg Kg⁻¹) e Co (0,2 mg Kg⁻¹). O elemento Ni (67,2 mg Kg⁻¹) apresentou médias elevadas em função das amostras oriundas provenientes de três diferentes indústrias (A, E e F). Todas as demais amostras avaliadas apresentaram teores inferior a 0,5 mg Kg⁻¹ deste elemento. Isso levanta a possibilidade de contaminação durante o processo de fabricação, por exemplo, em função do maquinário que em muitos casos possuem revestimentos a base de pigmentos inorgânicos como é caso do níquel.

Para as amostras de cera de carnaúba do Tipo 3, os elementos que se encontram em maior abundância são: Al (122,0 mg Kg⁻¹), K (112,1 mg Kg⁻¹), Ca (103,9 mg Kg⁻¹), Fe (93,4 mg Kg⁻¹), Mg (67,1 mg Kg⁻¹), Na (39,6 mg Kg⁻¹), Mn (9,6 mg Kg⁻¹), Pb (1,7 mg Kg⁻¹), Zn (0,6 mg Kg⁻¹), Ni (0,3 mg Kg⁻¹), Cu (0,2 mg Kg⁻¹) e Co (0,1 mg Kg⁻¹). Assim, percebe-se que o elemento em maior abundância nas amostras de cera do Tipo 3 passa a ser o Al. Por fim, para as amostras de cera do Tipo 4, a ordem de abundancia dos elementos estudados é: K (185,3 mg Kg⁻¹), Ca (116,8 mg Kg⁻¹), Al, (97,6 mg Kg⁻¹), Fe (84,5 mg Kg⁻¹), Mg (76,9 mg Kg⁻¹), Na (37,6 mg Kg⁻¹), Mn (8,7 mg

Kg^{-1}), Pb ($2,3 \text{ mg Kg}^{-1}$), Zn ($0,7 \text{ mg Kg}^{-1}$), Cu ($0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$) e Co ($0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$). Novamente, as amostras da empresa E apresentaram teores de Ni ($18,2 \text{ mg Kg}^{-1}$) elevados em relação às demais amostras estudadas. Entretanto, este valor ainda está bem abaixo do observado nas amostras Tipo 1, que foi de aproximadamente 70 ppm do elemento.

Os resultados até aqui apresentados são importantes para setor de produção, pois norteiam quais os teores característicos dos elementos estudados em cada tipo de cera estudado, independentemente do tipo de fabricante ou ainda da região de produção do pó, uma vez que as ceras utilizadas aqui foram fornecidas por indústrias de diferentes pólos de produção do estado, o que aumenta a variabilidade do conjunto de dados tornando-o, desta forma, mais robusto. Estes resultados poderão ser utilizados na elaboração de normas especificando, por exemplo, quais os teores máximos permitidos de cada elemento na cera ou ainda no incentivo de estudo para remoção de um ou outro elemento indesejado no processo que utilizará a cera de carnaúba.

5.6 Utilização de Espectroscopia NIR para previsão dos teores de inorgânicos em cera de carnaúba.

Com o objetivo de viabilizar a determinação de inorgânicos no controle de qualidade dentro da linha de produção das indústrias refinadoras de cera de carnaúba, buscou-se o desenvolvimento de um método utilizando espectroscopia NIR, caracterizada por ser de baixo custo e bastante utilizada no controle de qualidade de diversos segmentos industriais.

Uma das maiores dificuldades encontradas no desenvolvimento deste trabalho foi a aquisição de amostras de cera de carnaúba, pois cada tipo é produzido de acordo com a demanda de mercado, como ocorre em diversos outros setores (sucroalcooleiro, por exemplo). Assim, com o apoio do SINDICARNAÚBA, uma das empresas refinadoras de cera aceitou fornecer uma maior quantidade de amostras dos tipos 1, 3 e 4, de diferentes lotes de produção, fato que impõe ao trabalho uma maior robustez para que os mesmos possam ser utilizados com confiabilidade de previsão. Desta maneira, foram obtidas 90 amostras de cera de diferentes lotes, das quais 33 foram amostras do Tipo 1, 34 do Tipo 3 e 23 do Tipo 4, às quais tiveram avaliados os teores de elementos específicos bem como foram adquiridos os espectros NIR para cada amostra. Em seguida, os teores dos elementos avaliados pela técnica de referência (ICP OES) foram correlacionados com os espectros NIR por meio de ferramentas

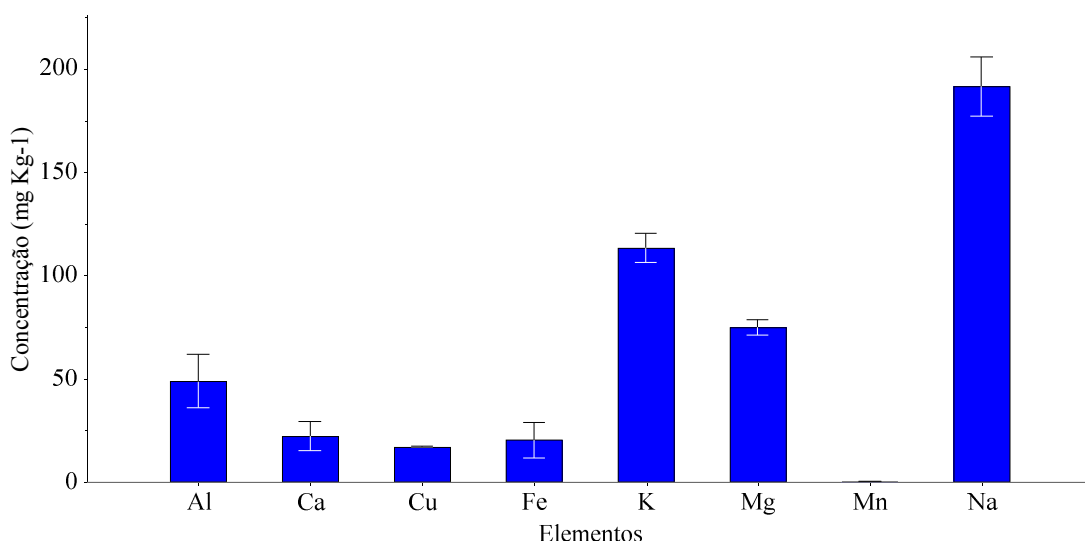
quimiométrica (PLS) para desenvolvimento dos modelos, sendo isto abordado na sequência do trabalho.

5.6.1. Avaliação dos teores de inorgânicos no segundo conjunto de 90 amostras de ceras dos Tipos 1, 3 e 4.

Nesta etapa, foram trabalhados dados de macro e micro elementos (Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn e Na), uma vez que os trabalhos encontrados na literatura reportam resultados relacionados a estas espécies químicas.

A Figura 52 a seguir apresenta os teores médios das concentrações dos macro e micro elementos estudados nas amostras de cera do Tipo 1.

Figura 52. Concentração de macro e micro elementos em amostras de cera de carnaúba do Tipo 1.

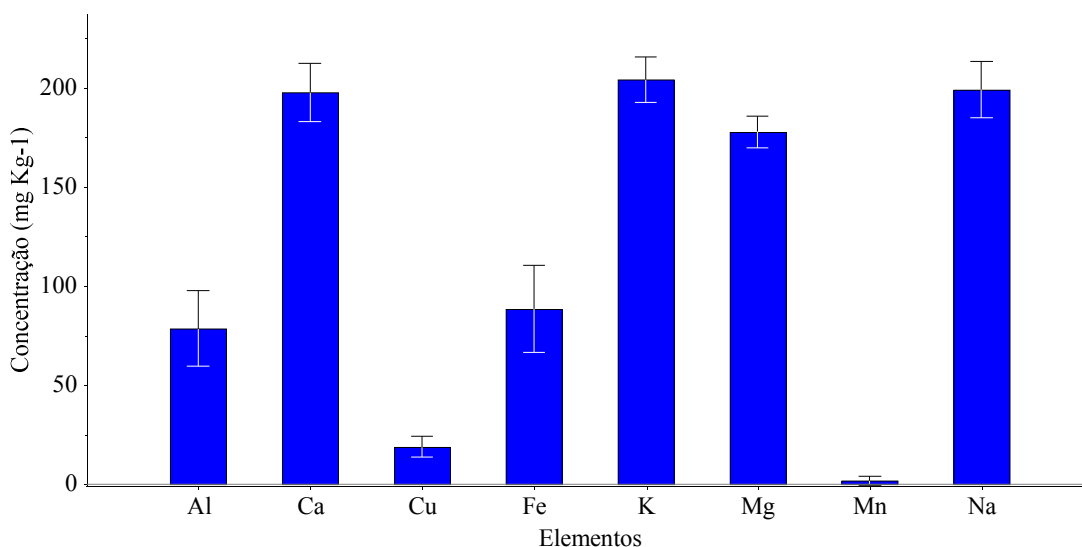


Pode-se observar baixos valores de desvios, pois as amostras de cera são oriundas de uma mesma indústria. Os valores médios observados para as amostras de cera do Tipo 1 foram: Al ($48,5 \pm 12,9 \text{ mg Kg}^{-1}$), Ca ($22,0 \pm 6,8 \text{ mg Kg}^{-1}$), Cu ($16,0 \pm 0,2 \text{ mg Kg}^{-1}$), Fe ($20,2 \pm 8,5 \text{ mg Kg}^{-1}$), K ($113,0 \pm 7,0 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mg ($74,7 \pm 3,7 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mn ($0,03 \pm 0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$) e Na ($191,2 \pm 14,1 \text{ mg Kg}^{-1}$). Os valores estão acima da média obtida apresentada na seção 5.4.1 Determinação de inorgânicos em ceras do Tipo 1. Uma das possibilidades dessa observação deve-se o fato da quantidade de chuvas registradas no ano de 2012 estar bem abaixo da média histórica do estado do Ceará [68]. O índice pluviométrico normal é de 814,9mm, sendo o observado no ano de 2012 de

388,9 mm, menos da metade do que seria esperado dentro das condições normais de chuva. Isso equivale a uma redução de cerca de 52% no volume de chuvas. Isso promove uma redução na quantidade de água disponível e uma consequente pré-concentração destes elementos na cera. Todavia, estudos mais específicos são necessários para comprovar a relação entre o índice pluviométrico observado no período e o teor dos elementos estudados.

Já nas Figura 53 e Figura 54, são apresentados os resultados para os teores de macro e micro elementos avaliados nas amostras de cera do tipo 3 e 4. Os teores observados para as 34 amostras de ceras do tipo 3 (Figura 53) foram de Al ($78,4 \pm 19,0 \text{ mg Kg}^{-1}$), Ca ($197,4 \pm 14,6 \text{ mg Kg}^{-1}$), Cu ($18,7 \pm 5,2 \text{ mg Kg}^{-1}$), Fe ($88,2 \pm 21,2 \text{ mg Kg}^{-1}$), K ($203,8 \pm 11,6 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mg ($177,5 \pm 8,1 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mn ($1,7 \pm 2,4 \text{ mg Kg}^{-1}$) e Na ($198,7 \pm 14,2 \text{ mg Kg}^{-1}$).

Figura 53. Concentração de macro e micro elementos em amostras de cera de carnaúba do Tipo 3.

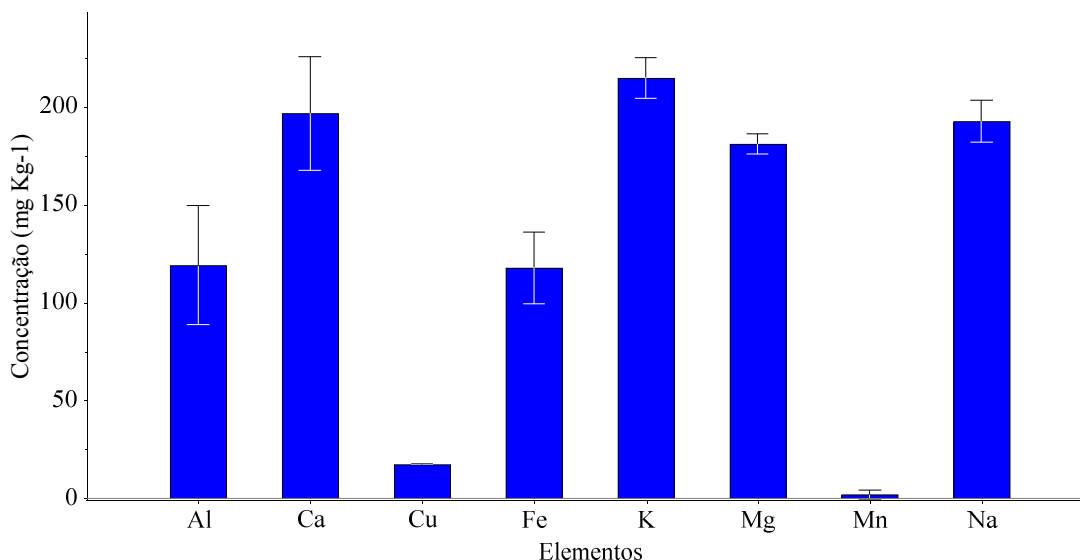


Os teores observados para as 24 ceras do tipo 4 (Figura 54) foram de Al ($118,9 \pm 30,5 \text{ mg Kg}^{-1}$), Ca ($196,5 \pm 28,9 \text{ mg Kg}^{-1}$), Cu ($17,2 \pm 0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$), Fe ($117,5 \pm 18,1 \text{ mg Kg}^{-1}$), K ($214,5 \pm 10,6 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mg ($180,7 \pm 5,0 \text{ mg Kg}^{-1}$), Mn ($1,7 \pm 2,5 \text{ mg Kg}^{-1}$) e Na ($192,4 \pm 10,7 \text{ mg Kg}^{-1}$).

De um modo geral, o padrão de ocorrência dos elementos estudados foi mantido. Assim, as ceras do tipo 1 apresentam-se com menores teores de inorgânicos em relação as ceras Tipo 3 e 4. Comparando-se estes dois últimos, o padrão também foi mantido, de modo que as ceras do Tipo 4 apresentaram os maiores teores de inorgânicos,

reforçando a essência dos dados obtidos na etapa 5.4 Quantificação de inorgânicos em amostras de cera de carnaúba por ICP OES.

Figura 54. Concentração de macro e micro elementos em amostras de cera de carnaúba do Tipo 4.



5.6 Estudo do melhor pré-processamento dos espectros.

Os espectros NIR das amostras de cera apresentaram oscilações de linha de base bem como uma região bastante ruidosa (799 a 1000 nm). Com o intuito de minimizar estes problemas, diferentes estratégias de pré-processamento dos dados foram utilizadas, tendo como parâmetros de comparação o número de Variáveis Latentes (componentes principais) e os valores do Erro Médio Quadrático de Previsão (RMSEP). Como variável de trabalho para testar os diferentes pré-tratamentos foi utilizado o somatório de íons inorgânicos totais (determinados por ICP OES). Optou-se por utilizar esta variável em virtude da futura utilização do modelo para determinação do teor de metais utilizando espectroscopia NIR. Para esta etapa, foram utilizadas todas as amostras do conjunto, assim como todas as variáveis espectrais. Para o cálculo do erro foi utilizado o método validação cruzada.

Os pré-processamentos testados foram: correção do espalhamento multiplicativo (MSC – do inglês *Multiplicative Scatter Corretion*); aplicação de 1º e 2º derivadas; e correção de linha de base usando filtro Savitzky-Golay e a combinação entre estes pré-processamentos. A Tabela 12 apresenta os valores obtidos para os diferentes modelos de calibração desenvolvidos após a aplicação destes pré-processamentos.

Tabela 12. Resultados obtidos para os modelos de calibração multivariada construídos utilizando todo o conjunto de amostra de cera de carnaúba a partir de seus espectros NIR empregando diferentes formas de pré-processamento.

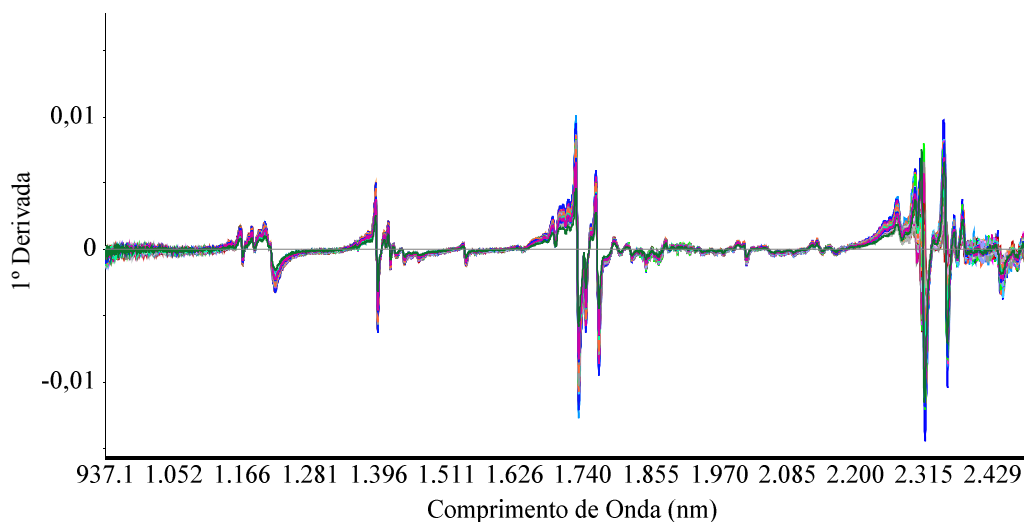
	Pré-processamento	Correlação (R^2)	RMSEC (mg L^{-1})	Nº variáveis latentes
1	Dados Bruto	0,976	54,1	7
2	CLB	0,977	52,8	8
3	MSC*	0,976	54,4	6
4	1º derivada	0,991	33,5	5
5	2º derivada	0,874	121,6	3
6	CLB + MSC	0,976	54,4	6
7	CLB+1ºderivada	0,991	33,5	6
8	CLB+2ºderivada	0,882	117,9	3
9	MSC+1ºderivada	0,968	62,1	5

* CLB – Correção pela linha de base

** MSC – Correção do espalhamento multiplicativo

Vale ressaltar que a etapa de pré-processamento dos dados espectrais é importante, podendo consumir um longo tempo de estudo. Pode-se observar que o coeficiente de correlação variou de 0,874 a 0,991, enquanto a variação do RMSEC foi de 33,5 a 117,9. Com base nos resultados o pré-processamento espectral que apresentou o menor valor de RMSEC se deu após aplicação da 1º derivada com seleção de região espectral. Para este pré-processamento os valores de RMSEC e R^2 foram respectivamente de 33,51 mg L^{-1} e 0,991. O número de variáveis latentes após a aplicação deste pré-processamento foi de 5. A Figura 55 a seguir apresenta os espectros NIR para o conjunto de amostras de cera de carnaúba dos três tipos após aplicação da 1º derivada à região selecionada.

Figura 55. Espectro das 90 amostras de cera de carnaúba após a aplicação da 1^o derivada com região espectral selecionada.



A primeira derivada remove efeitos aditivos que causam deslocamentos na linha de base por meio do enquadramento do modelo em um polinômio de baixa ordem, melhorando a relação sinal-ruído, o que para fins analíticos aumenta a sensibilidade do modelo. Um ajuste matemático dos dados espectrais é normalmente necessário para realçar a contribuição da composição química das amostras sobre o conjunto de dados espectrais ou retirar informações que não estejam relacionadas ao problema químico em estudo. O pré-processamento também visa remover do conjunto de dados interferências relacionadas à instabilidades do espectrofotômetro ao longo da faixa espectral ou ainda espalhamento da radiação durante as medidas.

5.7. Construção dos Modelos de Calibração

Para estimar os teores de elementos inorgânicos em amostras de cera de carnaúba foram construídos modelos de calibração separadamente para cada elemento e para cada tipo de cera. Desta maneira, as amostras foram divididas em três conjuntos de dados, com base nos seus tipos: Cera Tipo 1 (33 amostras), Cera Tipo 3 (34 amostras) e Cera Tipo 4 (24 amostras). Cada conjunto foi subdividido em dois novos conjuntos, sendo um de calibração e um de previsão (validação externa), de modo aleatório para garantir a máxima variabilidade natural de concentração dos elementos estudados. Todavia, para melhorar a robustez dos modelos, as amostras com valores extremos, ou seja, aquelas que possuem os valores máximos e mínimos em cada conjunto foram incluídas propositalmente nos conjuntos de calibração.

5.7.1 Modelagem PLS-1 para determinação de elementos inorgânicos por PLS-NIR para as ceras de carnaúba do tipo 1.

A seguir, a Tabela 13 apresenta os teores máximos e mínimos, assim como a média e o desvio padrão para cada elemento utilizado no desenvolvimento e construção dos modelos de calibração NIR/PLS. Para tanto as amostras foram divididas em dois grupos, sendo o primeiro deles o conjunto de calibração ($n = 22$) e um conjunto de amostras previsão ou validação externa ($n = 11$).

Tabela 13. Estatística descritiva para os valores obtidos em relação aos elementos avaliados para as ceras de carnaúba do Tipo 1.

Elementos	Conj. de Calibração ($n = 22$)				Conj. de Validação ($n = 11$)			
	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Al	47,5	13,7	5,92	59,2	53,6	4,95	48,0	58,7
Ca	21,4	7,26	8,87	31,6	23,5	6,15	9,01	30,7
Cu	16,8	0,26	16,4	17,3	16,9	0,22	16,5	17,2
Fe	19,3	8,72	2,47	30,5	22,2	8,34	6,04	30,5
K	112,2	6,94	104	125,2	114,8	7,26	104,2	124,3
Mg	74,4	4,0	67,1	79,9	75,5	3,35	68,2	79,3
Mn		-	<LD	<LD	-	-	<LD	<LD
Na	190,1	15,1	175,0	217,7	193,8	12,5	175,9	209,8

* Valor de referência em g Kg^{-1}

LD – Limite de Detecção

Pode-se observar que o constituinte inorgânico que se apresenta em maior quantidade é o fósforo com valor variando entre 448 a 530 g Kg^{-1} . Nestas medições, alguns elementos apresentaram teores inferiores aos limites de detecção para o método de referência utilizado (ICP OES), sendo eles Mn, Pb e Zn. Avaliando-se os dois conjuntos, pode-se observar que todas as amostras escolhidas para o conjunto de previsão encontram-se dentro da faixa utilizada no conjunto de calibração, fato de grande importância para garantir que os modelos gerados possam ter a capacidade de medir todo tipo de amostra. Outro fator a ser destacado consiste no desvio padrão dos conjuntos. Em geral, o desvio para o conjunto de previsão é menor pelo fato das amostras ditas extremas não constituírem este conjunto. Entretanto, para demonstrar que os desvios são semelhantes e que as amostras foram tomadas de maneira aleatória, um

teste F para comparação de desvio mostrou que para um nível de significância de 95%, o erro inerente aos dois conjuntos de dados é estatisticamente semelhante.

A Tabela 14 apresenta os parâmetros de performance da espectroscopia NIR para os modelos de calibração multivariada construídos para previsão dos teores de elementos inorgânicos.

Tabela 14 Estatística para o desempenho de calibração e validação da espectroscopia NIR na quantificação de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e K nas amostras de cera de carnaúba do tipo 1.

	Calibração			Validação Externa				
	n	RMSECV	R ²	r	RMSEP	Slope	SD/RMSEP	Fatores
Al	19	2,03	0,931	0,954	1,54	0,991	9,0	3
Ca	22	2,20	0,929	0,912	2,51	0,822	2,9	3
Cu	22	2,02	0,845	0,978	0,0454	0,928	5,7	3
Fe	22	3,22	0,926	0,850	4,56	0,596	1,9	4
K	22	1,78	0,965	0,977	2,36	0,714	2,9	3
Mg	21	1,50	0,923	0,947	1,20	0,748	5,8	3
Mn	-	-	-	-	-	-	-	-
Na	22	5,37	0,930	0,931	4,72	0,773	3,2	2

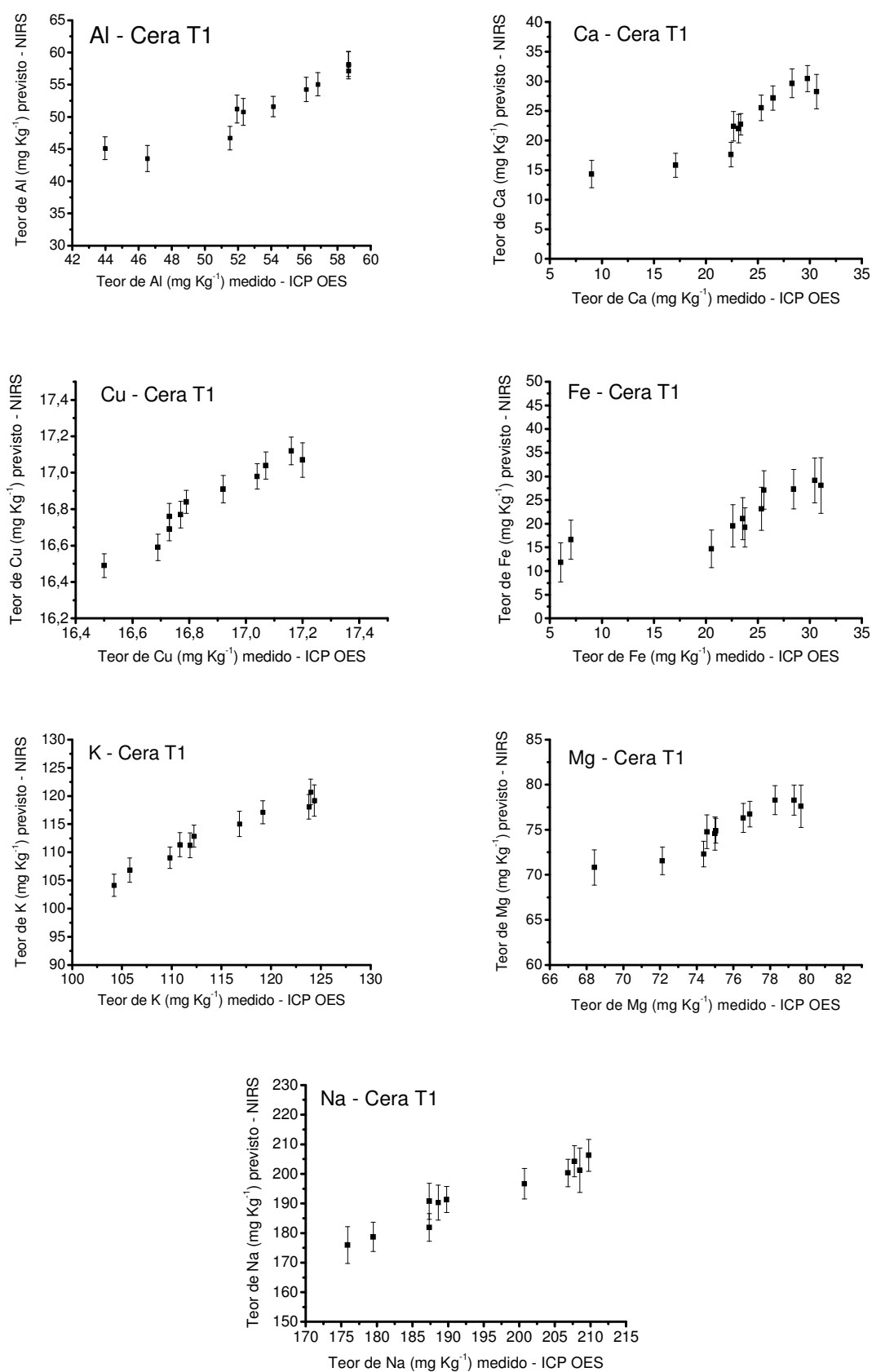
n: número de amostras utilizadas no conjunto de calibração; RMSECV: erro médio quadrático de validação cruzada; R²: coeficiente de determinação na calibração; r: coeficiente de correlação (validação externa); RMSEP: erro médio quadrático de previsão.

Pode-se observar uma variação de coeficiente de correlação (R²) para os modelos de calibração de 0,845 a 0,965. Estes valores podem ser considerados bons quando se considera o tipo de metodologia em que trata o presente trabalho. Os valores de RMSECV variaram entre 1,50 a 5,37 mg Kg⁻¹. Para avaliar a magnitude deste erro, um dos métodos utilizados é a comparação com trabalhos previamente publicados. Todavia, não existem trabalhos com cera de carnaúba que possam ser utilizados como fonte de comparação para com a metodologia em questão. Desta forma, consideramos estes resultados como adequados para um controle de qualidade industrial, fato que pode ser reforçado com base nos valores do parâmetro SD/RMSEP. De acordo com Willians et. al. [69], a razão entre o desvio padrão do conjunto de calibração (SD) e a raiz quadrada do erro médio de previsão (RMSEP) pode ser utilizada como uma estimativa da utilização do método para princípios analíticos. Desta maneira quando

$SD/RMSEP > 5$ indica que o método pode ser utilizado com bastante confiabilidade para fins analíticos de quantificação, de modo que o presente trabalho mostra adequado dentro deste parâmetro para os estudos envolvendo Al, Cu e Mg, os quais apresentaram valores iguais a 9,0, 5,7 e 5,8 respectivamente. Quando a razão $SD/RMSEP > 2$ o método possui adequação intermediária para fins analíticos, o que enquadra neste caso os elementos Ca, K, Na e P, com os respectivos valores de 2,9, 2,9, 3,2 e 4,0 respectivamente. Razões $SD/RMSEP < 2$ indicam que o método proposto pode ser utilizado quando o controle de qualidade não é muito rigoroso e se deseja apenas ter uma estimativa dos valores relacionados ao parâmetro, caso em que se enquadra o Fe com $SD/RMSEP$ de aproximadamente 1,9.

Todavia, quando se avalia a capacidade preditiva por comparação individual observa-se como os modelos desenvolvidos foram eficientes na previsão dos teores para todos os elementos estudados, com exceção aqueles não quantificados pelo método de referência. Desta maneira, a Figura 56 apresenta os gráficos comparativos para os valores previstos (NIRS/PLS) versus medidos (ICP OES).

Figura 56. Gráficos de previsão dos diversos elementos determinados pelo modelo de calibração do tipo 1.



5.7.2 Modelo de Calibração para determinação de elementos inorgânicos por PLS-NIR para as ceras de carnaúba do tipo 3.

A Tabela 15 apresenta os valores máximos e mínimos, bem como a média e o desvio padrão para os elementos estudados e quantificados nas amostras de cera de carnaúba do Tipo 3. Para este conjunto de amostras, apenas o elemento Zn apresentou-se abaixo dos limites de detecção da técnica de referência utilizada (ICP OES). Assim como foi feito para a construção dos modelos para as amostras de cera do tipo 1, as ceras do tipo 3 foram divididas em dois conjuntos, calibração ($n = 24$) e previsão ($n = 10$). A média dos teores dos elementos destas amostras é superior aos observados para as amostras do tipo 1. Novamente pode ser observado o cuidado na formação dos grupos, uma vez que as amostras do conjunto de previsão possuem valores dentro da faixa de calibração utilizada. Dois elementos merecem destaque especial nesta discussão, sendo eles: Mn e Pb. Ambos foram detectados em um número muito baixo de amostras. No caso do Pb, apenas 6 amostras (18% das amostras do conjunto) apresentaram quantidades detectáveis do elemento. Já para o Mn esse número sobe para cerca de 19 amostras (56% das amostras do conjunto).

Tabela 15. Estatística descritiva para os valores obtidos em relação aos elementos avaliados para as ceras de carnaúba do Tipo 3.

Elementos	Conj. de Calibração ($n = 24$)				Conj. de Validação ($n = 10$)			
	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Al	78,7	20,3	44,6	140,2	78,1	16,3	56,3	100,3
Ca	197,2	14,6	181,7	234,4	198,1	15,5	181,7	221,7
Cu	19,2	6,2	16,8	39,4	17,6	0,8	16,9	18,9
Fe	87,6	21,3	56,5	131,3	89,7	24,3	63,2	131,3
K	203,9	11,9	186,6	226,4	204,0	11,6	188,2	218,6
Mg	177,0	8,3	162,0	190,6	178,9	7,9	164,6	189,6
Mn	1,5	2,5	<LD	9,0	1,6	2,2	<LD	6,0
Na	198,3	14,2	180,5	229,3	199,9	15,0	184,7	223,7

A Tabela 16 apresenta os parâmetros de performance da espectroscopia NIR para os modelos de calibração multivariada construídos para previsão dos teores de elementos inorgânicos nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3.

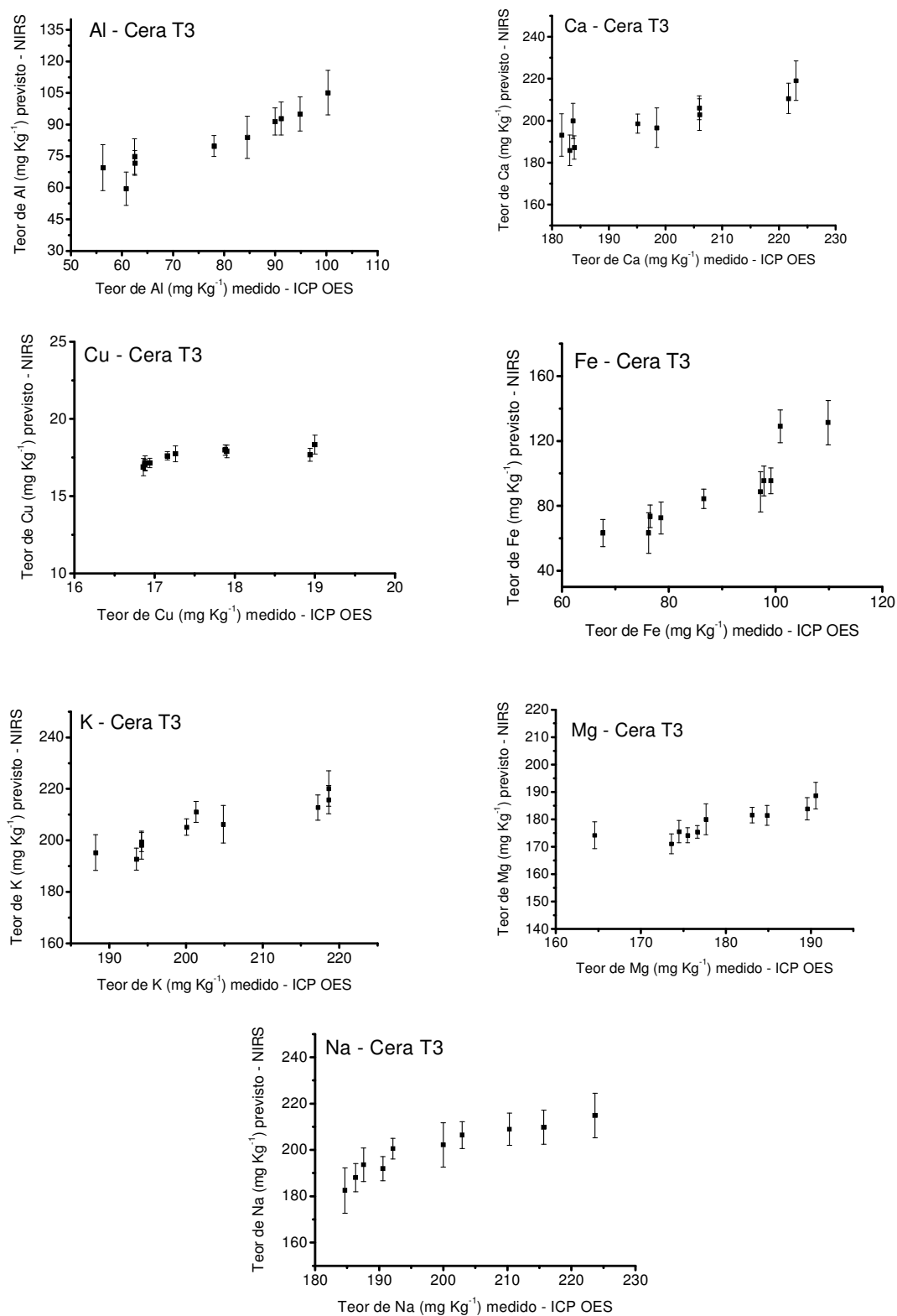
Tabela 16. Estatística para a desempenho de calibração e validação da espectroscopia NIR na quantificação de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na e K nas amostras de cera de carnaúba do tipo 3.

	Calibração			Validação				
	n	RMSECV	R ²	R	RMSEP	Slope	SD/SEP	Fatores
Al	24	1,40	0,997	0,948	6,70	0,808	3,0	5
Ca	24	1,51	0,994	0,899	7,54	0,596	2,0	3
Cu	22	0,0811	0,991	0,794	0,501	0,463	12,4	5
Fe	22	2,58	0,988	0,903	12,5	0,512	1,7	5
K	24	1,89	0,987	0,963	3,88	0,765	8,4	4
Mg	24	2,86	0,936	0,871	3,94	0,596	2,1	2
Mn	24	0,495	0,979	0,760	1,42	0,459	1,8	4
Na	24	1,77	0,991	0,916	6,53	0,636	2,2	5

Pode-se observar uma variação de coeficiente de correlação (R^2) para os modelos de calibração de 0,812 a 0,997, o que caracteriza bons resultados de calibração. Os valores de RMSECV variaram entre 0,0811 a 11,7 mg Kg⁻¹. Para avaliar a magnitude do erro do método, mais uma vez recorre-se à razão SD/RMSEP. Desta maneira os modelos que apresentaram razão SD/RMSEP > 5 foram para o Cu (12,4) e K (8,4). Já os modelos construídos para Al (3,0), Ca (2,0), Mg (2,1), Na (2,2) e P (2,0) apresentaram uma boa confiabilidade analítica, podendo ser utilizado, de acordo com este parâmetro, para previsões analíticas dos teores de metais. Já os modelos para os elementos Fe (1,7), Mn (1,8) e Pb (0,9) podem ser utilizados se a estimativa do controle de qualidade exigido pelas indústrias de cera de carnaúba não for muito grande. Razões SD/RMSEP < 2 foram encontradas para os modelos construídos para Fe (1,7), Mn (1,8) e Pb (0,9).

Após a avaliação do desempenho dos modelos, foram feitas as previsões utilizando as amostras que foram removidas do grupo para construção dos modelos de calibração. Assim, os gráficos da Figura 34 apresentam as previsões entre o método de referência (ICP OES) e os valores previstos pelo método NIRS/PLS.

Figura 57. Gráficos de previsão dos diversos elementos determinados pelo modelo de calibração do tipo 3.



5.7.3 Modelo de Calibração para determinação de elementos inorgânicos por PLS-NIR para as ceras de carnaúba do tipo 4.

A Tabela 17 apresenta os valores máximos e mínimos, bem como a média e o desvio padrão para os elementos estudados e quantificados nas amostras de cera de carnaúba do Tipo 4.

Tabela 17. Estatística descritiva para os valores obtidos em relação aos elementos avaliados para as ceras de carnaúba do Tipo 4.

Elementos	Conj. de Calibração (n = 18)				Conj. de Validação (n= 6)			
	Média	SD	Min	Max	Média	SD	Min	Max
Al	111,24	27,25	84,55	177,53	139,62	26,66	104,47	177,53
Ca	189,21	26,78	157,85	237,90	219,05	16,45	198,17	232,88
Cu	17,19	0,098	17,03	17,40	17,26	0,041	17,21	17,31
Fe	113,79	17,69	69,92	144,51	126,77	13,98	115,33	144,51
K	212,37	10,68	194,06	226,82	221,44	3,73	217,13	226,82
Mg	179,51	4,33	173,63	190,23	184,58	4,49	180,49	190,23
Mn	1,36	2,28	<LD	8,54	3,46	2,76	1,49	8,02
Na	190,90	10,51	177,31	215,0	200,50	11,41	190,08	215,0

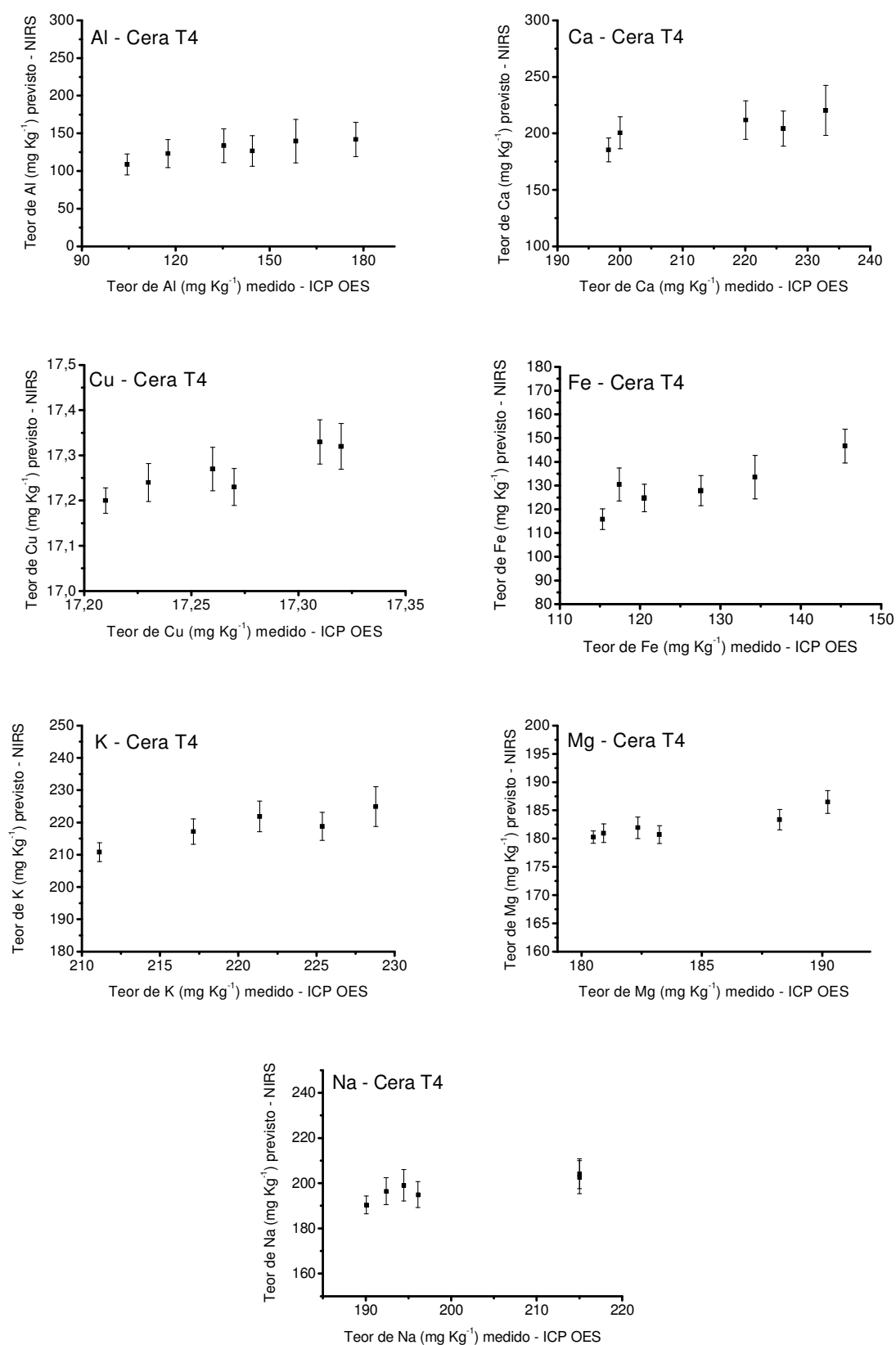
Novamente apenas o elemento Zn apresentou-se abaixo dos limites de detecção em todas as amostras estudadas pela técnica de referência. As amostras foram divididas em dois conjuntos, calibração (n = 18) e previsão (n = 6). Observa-se que o intervalo utilizado para as amostras que compõem o grupo de previsão estão dentro da faixa de concentração utilizada para construção dos modelos de calibração. Como este tipo de amostra é produzido a partir do mesmo pó cerífero utilizado para extração das ceras do tipo 3, os teores dos elementos. A Tabela 18 apresenta os parâmetros obtidos após a previsão das amostras do tipo 4. Observa-se que apenas para o Mn foi obtido uma baixa razão entre SD/SEP.

Tabela 18. Estatística para a performance de calibração e validação da espectroscopia NIR na quantificação de Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, K e Pb nas amostras de cera de carnaúba do tipo 4.

	Calibração			Validação Externa				
	n	RMSECV	R ²	R	RMSEP	Slope	SD/SEP	Fatores
Al	18	13,2	0,866	0,919	18,2	0,423	1,50	3
Ca	18	11,1	0,904	0,881	14,0	0,712	1,91	2
Cu	18	0,0175	0,983	0,953	0,0165	1,21	5,94	4
Fe	18	5,32	0,951	0,584	10,4	0,288	1,70	2
K	18	3,69	0,934	0,855	3,17	1,25	3,37	2
Mg	18	0,313	0,997	0,888	3,35	0,454	1,29	5
Mn	18	0,338	0,988	0,633	2,43	0,239	0,94	5
Na	18	1,14	0,994	0,877	7,17	0,393	1,47	5

Todos os demais modelos construídos demonstraram boa capacidade de previsão em relação aos teores das amostras utilizadas com este fim. Assim, os gráficos da Figura 58 apresentam as previsões entre o método de referência (ICP OES) e os valores previstos pelo método NIRS/PLS.

Figura 58 Gráficos de previsão dos diversos elementos determinados pelo modelo de calibração do tipo 4.



Capítulo 6. Considerações Finais

O estudo da constituição químicas das ceras de carnaúba se apresenta como um campo que ainda possui bastante espaço a ser explorado pelos pesquisadores. Assim, os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o entendimento da constituição química de amostras de cera de carnaúba dos diferentes tipos, bem como evidenciam semelhanças e diferenças entre as mesmas.

A investigação orgânica das amostras por meio dos espectros de infravermelho mostrou que os três tipos possuem espectros bastante semelhantes, evidenciando a presença de matriz orgânica semelhante. As técnicas termogravimétricas mostraram processos químicos de decomposição com temperaturas semelhantes, fato que pode ser correlacionado com os dados de infravermelho que comprovaram a grande similaridade química. Todavia, foi observado uma pequena diferença em relação aos resíduos inorgânicos observados após a completa decomposição das amostras, seguindo a ordem decrescente para amostras do Tipo 4, Tipo 3 e Tipo 1, respectivamente. Por fim, os resultados obtidos na investigação por meio de CG-EM mostraram basicamente a presença dos mesmos compostos majoritários nas amostras de cera. Desta maneira, de um modo geral, o estudo de caracterização orgânica das amostras de cera de carnaúba dos tipos 1, 3 e 4 mostrou que as amostras são mais semelhantes do ponto de vista químico do que se imaginava, uma vez que imaginava-se haver uma diferença química acentuada em relação à constituição orgânica.

Os estudos envolvendo a caracterização inorgânica das ceras evidenciaram diferenças químicas existentes entre os três tipos. Desta maneira, os teores de inorgânicos encontrados foram superiores nas amostras de cera do Tipo 4, quando comparados às amostras do Tipo 3 e do Tipo 1. Estes resultados podem servir de aporte na elaboração de normas para o controle de qualidade da cera produzida, uma vez que demonstra os níveis normais para os elementos estudados, além de se caracterizar como um dado novo na literatura.

Por fim, foi investigado um meio prático de viabilizar a análise dos teores de inorgânicos na indústria como um parâmetro de controle de qualidade. Para tanto, a união entre espectroscopia NIR e Quimiometria se mostrou promissora no monitoramento dos teores de elementos inorgânicos nos diferentes tipos de cera de carnaúba. O método em questão foi pensado para ser implementado em rotinas industriais que necessitam continuamente de controle dos processos de produção. O

desenvolvimento deste sistema de análise pode ser aplicado para análises rápidas durante o processo de produção das ceras. Como próximas etapas, serão obtidos os parâmetros de controle para a construção de modelos de calibração que permitam uma avaliação rápida das ceras, reduzindo assim tempo e gerando menores quantidades de resíduos oriundos das etapas de controle atualmente utilizadas.

Capítulo 7. Referências Bibliográficas

- 1 ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas – A Normalização no Setor Químico ABNT/CB-10. 2007.
- 2 Ferrão, M.F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicada na análise de alimentos. *Tecno-lógica* 5 (2001) 63.
- 3 Hooton, D.E. The versatility of near-infrared reflectance devices. *Cereal Food World* 23 (1978) 176.
- 4 Morgano, M.A.; Faria, C.G.; Ferrão, M.F.; Bragagnolo, N.; Ferreira, M.M.C. Determinação de proteína de café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25 (2005) 25.
- 5 Roogo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal and Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44 (2007) 683.
- 6 Elvers, B.; Hawkin, S. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5º ed., Vol. 28. 1996.
- 7 Jonson, D. A carnaubeira e seu papel como uma planta econômica. Fortaleza: ETENE/Banco do Nordeste do Brasil, 1970.
- 8 Secretaria de Agricultura do Estado do Ceará. <<http://www.seagri.ce.gov.br/carnauba.htm>>, acessado em 26 de janeiro de 2014.
- 9 Coimbra Filho, A. F.; Os limites originais do bioma Mata Atlântica na região nordeste do Brasil. Brasília: FBCN, 1996.
- 10 Viva Terra Palmeiras Nativas, http://www.vivaterra.org.br/palmeiras_nativas.htm, acessado em 17 de março de 2014.
- 11 <http://www.floresta.ufpr.br/~paisagem/plantas/carnaubeira.htm>, acessado em 10 de abril de 2012.
- 12 Câmara setorial da carnaúba. A Carnaúba – preservação e sustentabilidade – Fortaleza-CE: Câmara setorial da carnaúba, 2009.
- 13 Federação das Indústrias do Estado do Ceará – FIEC, http://www.sfiec.org.br/porta/v2/sites/sindicarnauba/files/Brochura_Carna%C3%BAb2.pdf, acessado em 26 de janeiro de 2014.
- 14 D'alva, O. A. O extrativismo da carnaúba no Ceará, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará. 2004.

- 15 <http://www.machado.com.br.htm>, acessado em 26 de janeiro de 2014.
- 16 **Federação das Indústrias do Estado do Ceará.** <http://www.fiec.org.br/artigos/agroindustria/>, acessado em 26 de janeiro de 2014.
- 17 **CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento: Carnaúba.** Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_10_25_08_12_23_conjuntura_carnauba.pdf, acessado em 17 de março de 2014.
- 18 **Sindicato das Indústrias Refinadoras de Cera de Carnaúba do Estado do Ceará.** <<http://www.sindicarnauba.org.br>>, acessado em 26 de janeiro de 2009.
- 19 Asperger, A.; Engewald, W.; Fabian, G. Analytical characterization of natural waxes employing pyrolysis – gas chromatography – mass spectrometry, *Journal of analytical and applied pyrolysis* 50 (1999) 103.
- 20 Asperger, A.; Engewald, W.; Fabian, G. Advances in the analysis of natural waxes provided by thermally assisted hydrolysis and methylation (THM) in combination with CG/MS, *Journal of analytical and applied pyrolysis* 52 (1999) 51.
- 21 Wang, L.; Ando, S.; Ishida, Y.; Othani, H.; Tsuge, S.; Nakayama, T. Quantitative and discriminative analysis of carnauba waxes by reative pyrolysis-CG in the presence of organic alkali using a vertical microfurnace pyrolyser, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58 (2001) 525.
- 22 Gouveia, S.T.; Silva, F.V.; COSTA, L.M.; Nogueira, A.R.A.; Nóbrega, J.A. Determination of residual carbon by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations, *Analytica Chimica Acta* 445 (2001) 269.
- 23 Millos, J.; COSTAs-Rodrigues, M.; Lavilla, I.; Bendicho, C. Multiple small volume microwave-assisted digestion using conventional equipment for multielemental analysis of human breast biopsies by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Talanta* 77 (2009) 1490.
- 24 COSTA, L.M.; Santos, D.C.M.B.; Hatje, V.; Nóbrega, J.A.; Korn, M.G.A. Focused-microwave-assisted acid digestion: Evaluation of losses of volatile elements in marine invertebrate samples. *Journal of food composition and analysis* 22 (2009) 238.
- 25 Korn, M. G. A.; Guida, M. A. B; Barbosa, J. T. P.; Torres, E. A.; Fernandes, A. P.; Santos, J. C. C.; Dantas, K. G. F.; Nóbrega, J. A. Evaluation of Sample Preparation Procedures for Trace Element Determination in Brazilian Propolis by Inductively

Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry and Their Discrimination According to Geographic Region. *Food Analytical Methods* 6 (2013) 872.

26 Neto, B. B.; Scarmínio, I.S.; Bruns, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2º Edição, Ed. Unicamp: Campinas-SP, 2002.

27 Neto, B. B.; Scarmínio, I.S.; Bruns, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova* 29 (2006) 1401.

28 Box, G. E. P.; Wilson, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of Royal Statistics Society Ser. B Method*, 13 (1951) 1.

29 Box, G. E. P.; Behnken, D. W. Some new three levels designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2 (1960) 455.

30 Doehlert, D. H. Uniform Shell Designs. *Applied Statistics*, 19 (1970) 231.

31 Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. Chemometrics: A Practical Guide. Wiley Interscience Publication, 1998, USA.

32 Brereton, R. G. Applied Chemometrics for Scientists. John Wiley and Sons, 2007.

33 Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova* 22 (1999) 1.

34 Simões S. S. Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIR e calibração multivariada. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba. 2008.

35 Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A., **Princípios de Análise Instrumental**. Ed. Bookman 5ª. Edição. 2002.

36 Ferrão, M.F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicada na análise de alimentos. *Tecno-lógica* 5 (2001) 63.

37 Hooton, D.E. The versatility of near-infrared reflectance devices. *Cereal Food World*, 23 (1978) 176.

38 Pasquine, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2003) 198.

39 McClure, W.F. 204 years of near infrared technology: 1800 – 2003. *Journal of Infrared Spectroscopy*, 11 (2003) 487.

40 Clark, D. H.; Mayland, H.F.; Lamb, R.C.; Mineral analysis of forages with near infrared reflectance spectroscopy. *Agronomy Journal*, 79 (1987) 485.

- 41** Cozzolino, D.; Cynkar, W.; Shah, N.; Smith, P. Quantitative analysis of minerals and electric conductivity of red grape homogenates by near infrared reflectance spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture* 77 (2011) 81.
- 42** González-Martin, I.; Hernandez-Hierro, J.M.; Revilla, I.; Vivar-Quintana, A.; Ortega, I.L. The mineral composition (Ca, P, Mg, K, and Na) in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times using near infrared spectroscopy with a fibre-optic probe. *Food Chemistry* 127 (2011) 147.
- 43** Ruano-Ramos, A.; García-Ciudad, A.; García-Criado, B. Near infrared spectroscopy prediction of mineral content in botanical fractions from semi-arid grasslands. *Animal Feed Science and Technology* 77 (1999) 331.
- 44** Huang, Z.; Tao, W.; Fang, J.; Wei, X.; Du, Y. Multivariate calibration of on-line enrichment near infrared (NIR) spectra and determination of trace lead in water. *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 98 (2009) 195.
- 45** Reeves III, J. B.; Smith, D. B. The potential of mid- and near-infrared diffuse spectroscopy for determining major- and trace-elements concentrations in soils from a geochemical survey of North America. *Applied Geochemistry* 24 (2009) 1472.
- 46** Cozzolino, D.; Kwiatkowski, M. J.; Dambergs, R. G.; Cynkar, W. U.; Janik, L. J.; Skouroumounis, G.; Gishen, M. Analysis of elements in wine using near infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Talanta* 74 (2008) 711.
- 47** Rossel, R. A. V.; McGlynn, R. N.; McBratney, A. B. Determining the composition of mineral-organic mixes using UV-vis-NIR diffuse reflectance spectroscopy. *Geoderma* 137 (2006) 70.
- 48** Blanco, M.; Villaescusa, V. Use of NIR spectroscopy in the production of modified industrial resins. *Talanta* 71 (2007) 1333.
- 49** Cozzolino, D.; Moron, A. Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. *Animal Feed Science and Technology* 111 (2004) 161.
- 50** Cozzolino, D.; Kwiatkowski, M.J.; Parker, M.; Cynkar, W.U.; Dambergs, R.G.; Gishen, M.; Herderich, M.J. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 513 (2004) 73.

- 51** Cozzolino, D.; Cynkar, W.U.; Shah, N.; Smith, P. Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality. *Food Research International* 44 (2011) 1888.
- 52** Kilner, M. H. M.; Rohwedder, J. J. R.; Pasquini, C. A PLS regression model using NIR spectroscopy for on-line monitoring of the biodiesel production reaction. *Fuel* 90 (2011) 3268.
- 53** Song, Y.; Li, F.; Yang, Z.; Ayoko, G. A.; Frost, R. L.; Ji, J. Diffuse reflectance spectroscopy for monitoring potentially toxic elements in the agricultural soils of Changjiang River Delta. *China Applied Clay Science* 64 (2012) 75.
- 54** Thomsen, V.; Roberts, G.; Burgess, K. The concepts of background equivalent concentration in spectrochemistry. *Spectroscopy* 51 (2000) 33.
- 55** Mermet, J. M. Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics. *Analitica Chimica Acta* 250 (1991) 85.
- 56** CAMO S.A. <<http://www.camo.com>>, acessado em 07 de agosto de 2012.
- 57** Regert, M.; Langlois, J.; Laval, E.; Le Ho, A.-S.; Pagès-Camagna. Elucidation of molecular and elementary composition of organic and inorganic substances involved in 19th century wax sculptures using an integrate analytical approach. *Analytica Chimica Acta* 577 (2006) 140.
- 58** Fontana, J. F. Extração de ferro da cera de carnaúba utilizando sistemas micro emulsionados. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2011.
- 59** Cozzolino, D.; Murray, I.; Chree, A.; Scaife, J.R. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. *LWT* 38 (2005) 821 – 828.
- 60** Mello, P. A.; Pereira, J.S.F.; Mesko, M. F.; Barin, J. S.; Flores, E. M. M.; Sample preparation methods for subsequent determination of metals and non-metals in crude oil – a review. *Analytica Chimica Acta*. 2012.
- 61** Dantas, A.N.S.; Matos, W.O.; Gouveia, S.T.; Lopes, G.S. The combination of infrared and microwave radiation to quantify trace elements in organic samples by ICP OES. *Talanta* 107 (2013) 292.
- 62** Pereira, J.S.F.; Pereira, L.S.F.; Shimidt, L.; Moreira, C. M.; Barin, J. S.; Flores, E. M. M. Metals determination in milk powder samples for adult and infant nutrition after focused-microwave induced combustion. *Microchemical Journal* 109 (2013) 29.

- 63 Ferreira, S. L. C.; Bruns, R. E.; Ferreira, H.S.; Matos, G. D.; David, J. M.; Brandão, G. C.; da Silva, E.G.P.; Portugal, L.A.; dos Reis, P.S.; Souza, A.S.; dos Santos, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 597 (2007) 179.
- 64 Augelli, M. A.; Munoz, R. A. A.; Richer, E. M.; Cantagallo, M. I.; Angnes, L. Analytical procedure for total determination in fishes and shrimps by chronopotentiometric stripping analysis at gold film electrodes after microwave digestion. *Food Chemistry* 101 (2007) 579.
- 65 Giné-Rosias, M. F. Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente ICP-AES. Editora: CPG/CENA, Piracicaba: CENA, 1998.
- 66 De Melo Santos, S F; de Macedo, G F; Silva, F.L.H.; Souza, R.L.A.; Pinto, G.A.S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. *Química Nova* 31 (2008) 1973.
- 67 Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escaleira, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76 (2008) 965.
- 68 Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos – Calendário das chuvas no estado do Ceará, disponível em <http://www.funceme.br/>, acessado em 26 de Janeiro de 2014.
- 69 Willians, P. C.; Norris, K. H. Implementation of near infrared technology in the agricultural and food industries. *American Association of Cereal Chemist*. (2001) 145 – 171.