

LORRAYNE MOREIRA ZAMPIER

**ESPECTRÔMETRO DE SOM PARA ANÁLISE DE COMPONENTES
MAJORITÁRIOS EM MATRIZES LÍQUIDAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: André Fernando de Oliveira

Coorientadores:

Alvaro Vianna N. de Carvalho Teixeira
Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Zampier, Lorryne Moreira, 1988-
Z26e Espectrômetro de som para análise de componentes
2021 majoritários em matrizes líquidas / Lorryne Moreira Zampier. –
Viçosa, MG, 2021.
1 tese eletrônica (104 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: André Fernando de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.192>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Quimiometria. 2. Detectores. 3. Análise de regressão.
I. Oliveira, André Fernando de, 1970-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 543.072

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

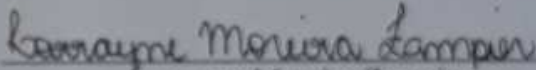
LORRAYNE MOREIRA ZAMPIER

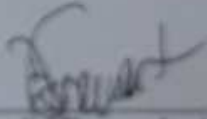
ESPECTRÔMETRO DE SOM PARA ANÁLISE DE COMPONENTES
MAJORITÁRIOS EM MATRIZES LÍQUIDAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Meteorologia Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 22 de setembro de 2021.

Assentimento:


Lorrayne Moreira Zampier
Autora


André Fernando de Oliveira
Orientador

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor André Fernando pelos ensinamentos, orientação, paciência e pela confiança em mim depositada. Sua generosidade e competência profissional tornaram essa caminhada muito mais fácil.

Aos meus coorientadores, professora Maria Eliana e professor Alvaro pela contribuição neste trabalho.

À professora Jane por permitir a realização de experimentos iniciais em seu laboratório.

Ao Sergio Olivo pela imensa contribuição em todas as etapas do desenvolvimento do espectrômetro de som.

Aos membros da banca examinadora, professoras Cassiana (UNICAMP), Jane (DTA-UFV), Renata (DEQ-UFV) e Maria Eliana (DEQ-UFV) por aceitarem participar e por suas contribuições e avaliações.

Aos companheiros de laboratório pela ótima convivência e pela ajuda na execução deste trabalho.

A todos que de uma maneira ou de outra, possam ter contribuído para a execução desse trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Química e ao LAQUA pela recepção e pela oportunidade de realizar o trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por ter me guiado em mais uma etapa de minha vida, dando-me forças para atingir os meus objetivos, sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Marlei e José Ricardo e a meu irmão, Josserrand pelo amor, carinho e incentivo.

Ao Marcos pela compreensão, apoio e companheirismo.

Aos familiares que sempre me apoiaram e incentivaram.

A todos os amigos, em especial, Mayra, Priscilla, Stefania, Liliane e Alex, sempre dispostos a ajudar e nunca me deixando desistir.

Aos colegas de curso pelos bons e maus momentos compartilhados.

RESUMO

ZAMPIER, Lorryne Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2021. **Espectrômetro de som para análise de componentes majoritários em matrizes líquidas.** Orientador: André Fernando de Oliveira. Coorientadores: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira e Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

As ondas acústicas ou sonoras são ondas mecânicas que dependem de um meio para se propagarem e a partir de algumas propriedades como a velocidade de propagação e atenuação torna-se possível realizar medidas desta propagação, sendo a temperatura um fator importante a ser considerado. O método baseado na propagação de ondas acústicas transferidas para o meio em estudo emprega sensores acústicos para detectá-las. Uma das vantagens está no fato de ser não destrutivo, com a possibilidade de ser não invasivo e usado em aplicações de linha. Assim, pode ser utilizado para análise de várias matrizes, como alimentos, sendo bastante utilizado na análise de líquidos. Neste trabalho foi construído um espectrômetro de som para análise de componentes majoritários em matrizes líquidas, utilizando-se como transdutores, elementos piezoelétricos para uma faixa de frequência de 100 Hz a 20 kHz. Foram desenvolvidas células de diferentes tamanhos e formatos. Observou-se a importância do controle da temperatura e da distância entre os elementos piezoelétricos. Em particular, quanto maior a distância, maior a atenuação observada enquanto, abaixo de 4 mm foi observado a sobreposição de bandas. Foi possível discriminar diferentes matrizes líquidas, tais como soluções puras de sacarose, etanol, lactose, ácido acético e soluções de leites (integral e zero lactose) com auxílio da análise de componentes principais. Com auxílio da regressão por quadrados mínimos parciais, foi possível a quantificação de sacarose, etanol e ácido acético em uma mistura destes, assim como a determinação de teor alcoólico em vinhos, com um erro relativo de -3,92 a 2,35% quando comparado ao método de referência e uma estimativa do desvio padrão dos resíduos igual a 0,012. O instrumento desenvolvimento mostrou-se eficaz, prático e robusto, além de apresentar um baixo custo relativo à sua montagem.

Palavras-chave: Quimiometria. Detectores. Análise de Regressão.

ABSTRACT

ZAMPIER, Lorryne Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2021. **Sound spectrometer for analysis of major components in liquid matrices.** Adviser: André Fernando de Oliveira. Co-advisers: Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira and Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

Acoustic or sound waves are mechanical waves that depend on a medium to propagate and, based on some properties such as propagation speed and attenuation, it is possible to measure this propagation, with the temperature being an important factor to be considered. The method based on the propagation of acoustic waves transferred to the medium under study employs acoustic sensors to detect them. One of the advantages is that it is non-destructive, with the possibility of being non-invasive and used inline applications. Thus, it can be used for the analysis of various matrices, such as food, being widely used in the analysis of liquids. In this work, a sound spectrometer was built for the analysis of major components in liquid matrices, using piezoelectric elements for a frequency range from 100 Hz to 20 kHz as transducers. Cells of different sizes and shapes were developed. The importance of controlling the temperature and the distance between the piezoelectric elements was observed. In particular, the greater the distance, the greater the observed attenuation, whereas, below 4 mm, overlapping bands were observed. It was possible to discriminate different liquid matrices, such as pure solutions of sucrose, ethanol, lactose, acetic acid, and milk solutions (integral and zero lactose) with the aid of principal component analysis. With the aid of partial least squares regression, it was possible to quantify sucrose, ethanol, and acetic acid in their mixtures, as well as to determine the alcohol content in wines, with a relative error of -3.92 to 2.35% when compared to the reference method and an estimate of the standard deviation of the residuals equal to 0.012. The development instrument proved to be effective, practical and robust, in addition to having a low cost relative to its assembly.

Keywords: Chemometry. Detectors. Regression Analysis.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	10
1 JUSTIFICATIVA.....	11
2 INTRODUÇÃO GERAL	12
2.1 Ondas acústicas ou sonoras.....	12
2.1.1 Propagação de ondas acústicas.....	14
2.1.2 Temperatura e propagação de ondas acústicas.....	18
2.2 Medidas acústicas em líquidos.....	19
2.2.1 Frequência sonora.....	19
2.2.2 Sensores de ondas acústicas.....	19
2.2.2.1 Transdutores digitais de ondas acústicas.....	20
2.2.2.2 Métodos para medidas acústicas em líquidos.....	21
2.3 Quimiometria.....	22
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DO ESPECTRÔMETRO DE SOM	29
RESUMO	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1 Reagentes e soluções.....	32
2.2 Etapas do desenvolvimento e evolução do instrumento.....	33
2.2.1 Primeira etapa	33
2.2.1.1 Comportamento de soluções	37
2.2.1.2 Efeito da distância entre os transdutores da célula de som.....	37
2.2.2 Segunda etapa	37
2.2.3 Terceira etapa.....	39
2.2.3.1 Efeito da temperatura.....	40
2.2.4 Quarta etapa	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.1 Etapas do desenvolvimento e evolução do instrumento.....	41
3.1.1 Primeira etapa	41
3.1.1.1 Comportamento de soluções.....	42
3.1.1.2 Efeito da distância entre os transdutores da célula de som.....	48
3.1.2 Segunda etapa	51

3.1.3 Terceira etapa.....	52
3.1.3.1 Efeito da temperatura.....	52
3.1.4 Quarta etapa	53
4 CONCLUSÃO	54
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CAPÍTULO 3: APLICAÇÕES DO ESPECTRÔMETRO DE SOM.....	57
RESUMO	58
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1 Reagentes, condições das células de som e tratamento de dados.....	60
2.2 Soluções puras de sacarose e etanol e a mistura dos analitos.....	61
2.3 Diferentes tipos de vinhos.....	62
2.4 Soluções puras de sacarose, etanol e ácido acético e a mistura dos analitos.....	63
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1 Soluções puras de sacarose e etanol e a mistura dos analitos.....	64
3.2 Diferentes tipos de vinhos.....	73
3.3 Soluções puras de sacarose, etanol e ácido acético e a mistura dos analitos.....	81
4 CONCLUSÃO	97
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
CONCLUSÃO GERAL	99
POTENCIALIDADES DO INSTRUMENTO.....	100
APÊNDICE A	101
APÊNDICE B	103

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 JUSTIFICATIVA

A inspiração para este trabalho surgiu a partir do interesse na matriz leite humano, em que este é o único alimento energético, nutricional e imunológico consumido em quantidades satisfatórias pelos neonatos (NÓBREGA; CAMPOS, 1996; ALMEIDA, 1999). Para seu uso em bancos de leites, é necessário garantir que esse produto esteja dentro de padrões de qualidade química e biológica, de maneira a garantir a segurança alimentícia e o bom desenvolvimento de neonatos (SOUZA; SILVA, 2010).

Diante do exposto, o desenvolvimento de instrumentos e procedimentos analíticos que permitam a determinação dos parâmetros de interesse em leite humano, como proteínas totais, lipídeos e lactose, com as figuras de mérito adequadas, em que se utilize um volume reduzido de amostra, praticidade no uso, robustez e que sejam portáteis seria conveniente.

Entretanto, o leite humano é uma matriz muito complexa, sendo necessário certos cuidados ao analisá-la, devido à variedade de analitos presentes em uma única amostra. Assim, para o desenvolvimento de um novo instrumento ou método, ao invés de iniciar o trabalho com uma matriz tão complexa, tornou-se mais adequado o uso de soluções puras de alguns analitos (sacarose, lactose, etanol e ácido acético) para que posteriormente fosse possível analisar componentes majoritários em matrizes líquidas, partindo daquelas mais simples, como por exemplo, o teor alcoólico em vinhos, até se tornar possível a análise daquelas mais complexas.

Dentre as alternativas para se alcançar a proposta acima citada, pode-se utilizar as ondas acústicas, na faixa do ultrassom, que podem se propagar através de meios sólidos, líquidos ou gasosos. O método baseado na propagação destas ondas que são transferidas para o meio em estudo emprega sensores acústicos para detectá-las, sejam elas contínuas ou pulsadas. Logo, estas ondas são monitoradas de acordo com suas características, como atenuação e velocidade de propagação em função da frequência (McCLEMENTS; FAIRLEY, 1991; EGGERS; KAATZE, 1996). Tanto os detectores quanto a fonte de ondas acústicas utilizados são usualmente materiais piezoelétricos.

Uma das vantagens de se utilizar a propagação de ondas acústicas está no fato de ser um método não destrutivo, com a possibilidade de ser não invasivo e poder ser usado em aplicações de linha (WITHERS, 1996). Dessa maneira, a utilização delas se torna vantajosa em análises para várias matrizes, como alimentos (MENG *et al.*, 2006; MOHAMMADI *et al.*, 2014), fármacos (STILLHART; KUENTZ, 2012) dentre outras (PALITÓ *et al.*, 2019).

Contudo, a instrumentação necessária para o trabalho, ou seja, para a obtenção de um espectro de frequência com ultrassom, é cara e bastante complicada. Assim, neste trabalho

optamos por desenvolver uma nova técnica, baseada na obtenção de espectros de ondas acústicas na faixa de frequência audível pelo ser humano, ou seja, a região sonora, compreendida entre 20 Hz e 20 kHz, visando a eficiência e o baixo custo.

Durante os estudos preliminares, percebeu-se que a parte primordial do trabalho era o desenvolvimento de um instrumento bem estruturado, para que análises de componentes majoritários em matrizes líquidas se tornassem possíveis.

Assim, este trabalho buscou o desenvolvimento de um instrumento analítico que utilizasse a região sonora que fosse capaz de reconhecer padrões e distinguir diferentes soluções líquidas e que permitisse a determinação de componentes majoritários em matrizes líquidas, de forma mais simples, prática, rápida, robusta e com um custo reduzido.

2 INTRODUÇÃO GERAL

2.1 Ondas acústicas ou sonoras

O movimento das partículas causado por uma perturbação que se propaga através de um meio ou no vácuo é chamado de onda. Aquelas ondas que não dependem de um meio para se propagarem são chamadas de ondas eletromagnéticas, dentre as quais tem-se a luz. Já a propagação do som se dá através de ondas acústicas mecânicas (ou sonoras) que necessitam de um meio para se propagarem. Deste modo, a transmissão do som ocorre devido a movimentos ordenados e periódicos das moléculas do meio, onde a energia vai sendo passada para moléculas adjacentes sem que haja transferência de massa (HALLIDAY; RESNICK, 2008).

Estas ondas podem ser descritas como longitudinais ou de compressão (que se propagam de forma paralela em direção a sua trajetória através do material) que são aquelas observadas em fluidos como gases e líquidos, e como ondas transversais ou de cisalhamento (que se propagam de forma perpendicular em direção a sua trajetória através do material) que também são observadas em sólidos, além das ondas longitudinais. As formas de propagação das ondas acústicas são mostradas na Figura 1 (BARBETA; MARZZULLI, 2000; PATIST; BATES, 2008).

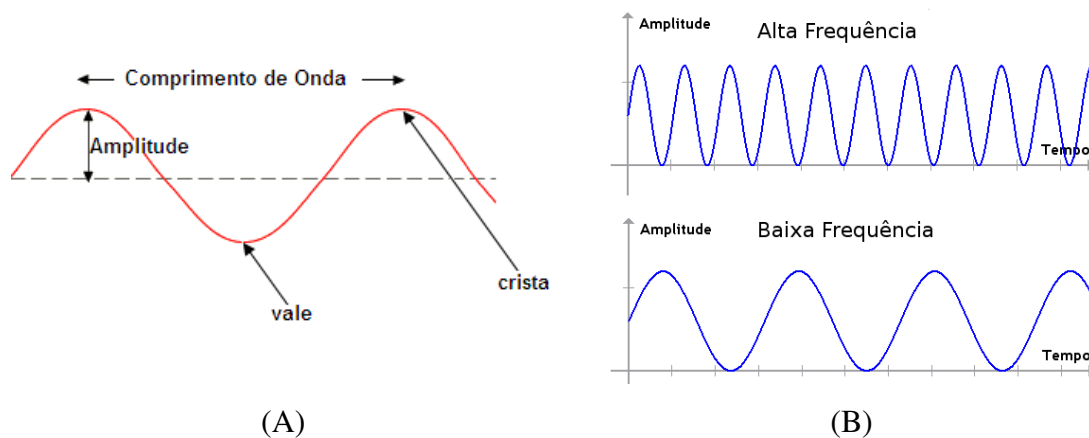
Figura 1 - Tipos de ondas acústicas: (A) Longitudinal; (B) Transversal.



Fonte: Adaptado de TORLEY; BHANDARI, 2007.

As características básicas de uma onda são o seu comprimento (λ) que é a distância que corresponde a uma oscilação completa, ou seja, a distância entre duas cristas ou dois vales; a frequência (f) que é a taxa de repetições que ocorrem em um intervalo de tempo definido (número de oscilações por segundo); a amplitude (A) que é a distância que vai do eixo de propagação da onda a uma crista ou vale; a intensidade (I) que é a quantidade de energia contida no movimento vibratório e provoca uma maior ou menor amplitude na vibração ou na onda acústica; e a sua velocidade (v) que é a relação entre o comprimento de onda e o período de oscilação (TORLEY; BHANDARI, 2007; SOUZA, 2011). Algumas destas características são mostradas na Figura 2.

Figura 2 - Propriedades básicas de uma onda acústica: (A) comprimento de onda (λ) e amplitude (A); (B) Frequência (f).



Fonte: BISTAFA, 2006; OLIVEIRA, 2019.

2.1.1 Propagação de ondas acústicas

Quando um meio sofre uma perturbação mecânica, esta irá se propagar fazendo com que o sistema abandone seu estado de equilíbrio, dando origem a uma onda propagante. A transmissão de uma onda propagante é medida através da velocidade da onda, que não depende da amplitude, comprimento de onda ou período (HALLIDAY; RESNICK, 2008).

A medida da velocidade de um pulso que se propaga por um meio qualquer pode ser expressa pela Equação 1.

$$v = \frac{d}{t} \quad (1)$$

em que: v é a velocidade da frente de onda; d é a distância percorrida pela onda; t é o tempo gasto para percorrer a distância d .

Para ondas longitudinais planas, a velocidade é dada como mostrado na Equação 2 (CHRISTENSEN, 1988).

$$v = \frac{\omega}{k} = \frac{2\pi f}{k} \quad (2)$$

em que: ω é a frequência angular, que pode ser associada a movimentos que se repetem de uma mesma forma em um mesmo período de tempo e k , o número de onda (que é a contagem, em unidade, do comprimento de onda).

O cálculo para dispersão é mostrado na Equação 3.

$$k^2 = \rho_0 K \omega^2 \quad (3)$$

em que: ρ_0 é a densidade específica do meio pelo qual se propaga a onda; K é o Módulo de Young (módulo de elasticidade, associado a resistência a deformação elástica do material).

Para se obter a velocidade de um pulso como função da densidade e coeficiente elástico do meio pelo qual se propaga, isola-se ω da Equação 3, o substituindo na Equação 2, como mostrado na Equação 4.

$$v = \frac{1}{\sqrt{\rho_0 K}} \quad (4)$$

Logo, de acordo com a Equação 4, verifica-se que alterações na densidade e módulo de elasticidade do meio sob estudo mudarão a velocidade com que o sinal se propaga pela amostra (CHRISTENSEN, 1988).

A impedância acústica (Z), que causa uma “resistência” à propagação da onda, influencia a velocidade da mesma. Por sua vez, a impedância acústica depende do estado físico do meio em que a onda acústica se propaga (sendo menor para sólidos e alta para gases) (WELLS, 1977; DORABIATO, 2007; HALLIDAY; RESNICK, 2008).

A impedância acústica específica (z) é definida pela razão entre a pressão acústica (p) e a velocidade da onda (v), como mostra a Equação 5:

$$z = \frac{p}{v} \quad (5)$$

E a impedância acústica (Z), por sua vez, é a razão entre a impedância específica e a superfície de propagação (S), como mostra a Equação 6:

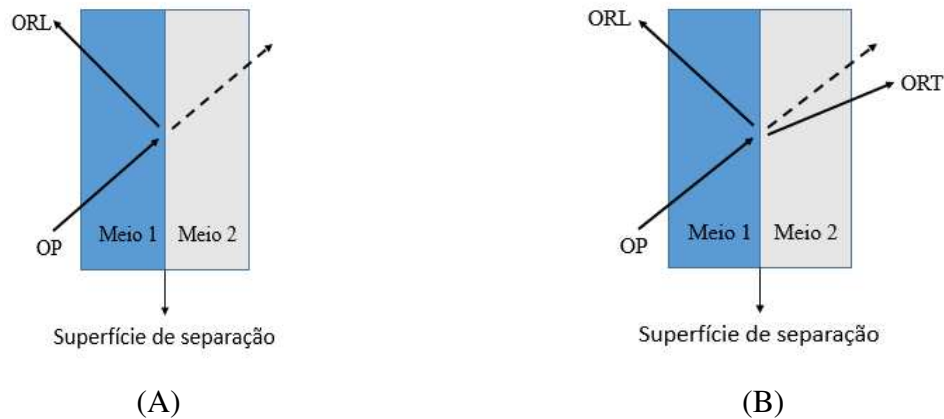
$$Z = \frac{z}{S} \quad (6)$$

Logo, ela também pode ser definida pela multiplicação entre a densidade do meio (ρ) e a velocidade (v) da onda, como mostra a Equação 7:

$$Z = \rho \cdot v \quad (7)$$

Em um meio de propagação finito, ou seja, que é delimitado por outro meio cuja impedância acústica é diferente do primeiro, as propriedades do meio se alteram no momento em que a onda chega na interface com outros meios, havendo assim reflexão e/ou refração da onda, como mostrado na Figura 3. A reflexão e refração das ondas depende da diferença entre a impedância acústica característica de cada meio em ambos os lados de uma interface, em que quanto maior for essa diferença, maior será a fração de energia refletida e menor a fração de energia transmitida (BISCEGLI, 2004; COVACEVICE, 2012).

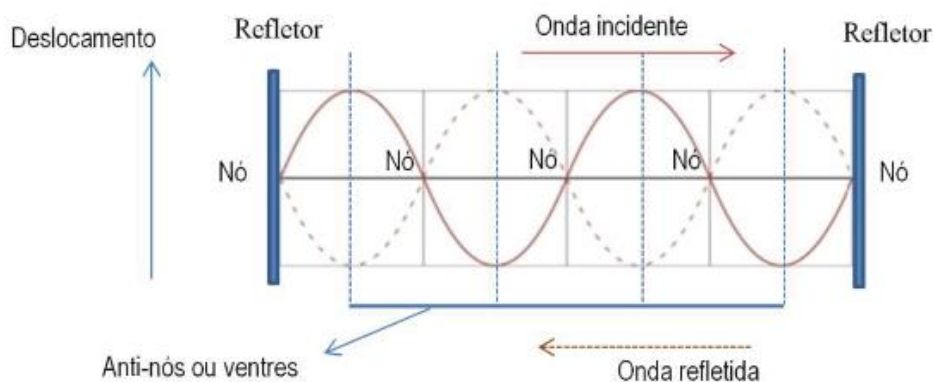
Figura 3 - Diagrama esquemático representando a reflexão (A) e refração (B) de ondas propagantes, em que OP (onda propagante); ORL (onda refletida) e ORT (onda refratada).



Fonte: Adaptado de BISCEGLI, 2004.

O mecanismo de reflexão é responsável pelas ondas estacionárias em meios chamados 'guias de onda', que são meios que confinam a onda em uma série de sucessivas reflexões internas em suas paredes (Figura 4) e armazenam a energia dessa onda, o que pode atribuir maior sensibilidade ao sensor de onda acústica - que será discutido posteriormente. O caminho entre os dois refletores é realizado várias vezes, sendo retracado as mesmas posições que são relacionadas com alguns comprimentos de onda específico, e, portanto, por frequências específicas, que estão relacionados com a distância entre as superfícies (COVACEVICE, 2012; CAVALCANTE, 2013).

Figura 4 – Reflexões internas das ondas estacionárias.



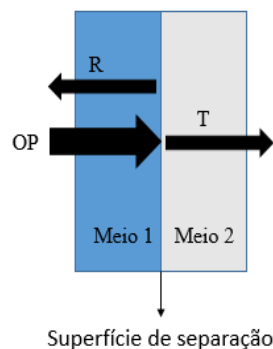
Fonte: CAVALCANTE, 2013.

De acordo com as distâncias entre as superfícies refletoras, considerando um tubo fechado nos dois extremos, pode-se determinar a maior onda possível, que terá a metade de um comprimento de onda, equivalente à distância entre os refletores (CAVALCANTE, 2013).

A refração está associada a mudança de velocidade e de direção que sofre a onda sonora ao passar de um meio a outro. Assim, estes mecanismos podem ocorrer por ondas incidentes normalmente ou obliquamente às paredes de um meio (BISCEGLI, 2004).

Toda vez que uma onda se propaga por determinado meio e muda de um meio para outro, esta sofre atenuação, que é o decaimento da intensidade do sinal, causado por efeitos de absorção, reflexão/refração e espalhamento, como mostrado na Figura 5 (BISCEGLI, 2004). Este espalhamento ocorre devido ao choque entre a onda propagante e as partículas com dimensões da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda, desta forma, parte da energia é desviada para todas as direções (FISH, 1990). Já a absorção se refere ao processo de dissipação da energia da onda através da transformação em energia térmica, causando a diminuição da intensidade da mesma. Ela está diretamente relacionada à frequência da onda, ao tempo de relaxação e à viscosidade do meio (WELLS, 1977; HEDRICK *et al.*, 1995).

Figura 5 - Diagrama esquemático representando a atenuação de uma onda propagante, em que OP (intensidade do sinal da onda propagante); R (intensidade do sinal da onda refletida) e T (intensidade do sinal da onda transmitida).



Fonte: Adaptado de BISCEGLI, 2004.

Assim, considerando-se um sistema linear, o coeficiente de atenuação (μ_α) é medido em função da amplitude (A), de acordo com a Equação 8, que é análoga à Lei de Beer-Lambert-Bouger para ondas eletromagnéticas.

$$A_x = A_0 e^{-\mu_\alpha x} \quad (8)$$

em que: A_x é a amplitude de pico no ponto x , A_0 é a amplitude de pico no ponto x igual a zero e μ_α é dado pela Equação 9.

$$\mu_{\alpha} = -\frac{1}{x} \ln \left(\frac{A_0}{A_x} \right) = \frac{\ln(A_x/A_0)}{x} \quad (9)$$

2.1.2 Temperatura e propagação de ondas acústicas

A amplitude de uma onda acústica está associada a energia que ela transporta. E a frequência da onda e da fonte emissora não são dependentes do meio pelo qual a onda se propaga. Porém, a velocidade e o comprimento de onda são alterados de acordo com as características do meio. Portanto, uma mudança no meio de propagação de uma onda acústica altera sua velocidade e comprimento, logo a frequência mantém-se constante (Equação 10) (RAMALHO JUNIOR; FERRARO; SOARES 2003).

$$v = f \cdot \lambda \quad (10)$$

A temperatura influencia diretamente na velocidade de propagação das ondas acústicas (Equação 11), devido ao aumento da agitação térmica com o aumento da mesma, diminuindo a densidade do meio, aumentando a dispersão, dentre outros fatores. De uma maneira geral, quanto maior a temperatura maior será a velocidade de propagação do som, considerando-se a mesma pressão atmosférica (HALLIDAY; RESNICK, 2008).

$$v = v_0 \sqrt{\frac{T}{T_0}} \quad (11)$$

onde v_0 é a velocidade do som a 0°C e é igual 331,45 m/s; T é a temperatura absoluta.

Outro parâmetro que é influenciado pela temperatura é o coeficiente de atenuação. A atenuação pode ser causada por diversos efeitos, dentre os quais está a absorção, que é diretamente associada à viscosidade do meio. A viscosidade é uma propriedade inerente de líquidos devido à sua relação com as forças intermoleculares, em que quanto maior estas forças, mais unidas estão as moléculas, dificultando a propagação das ondas acústicas. Logo, a viscosidade geralmente diminui com o aumento de temperatura, devido as moléculas possuírem maior energia de translação e rotação, o que permite romper as barreiras energéticas de interações intermoleculares com maior facilidade (HALLIDAY; RESNICK, 2008).

2.2 Medidas acústicas em líquidos

Para se extrair informações sobre um determinado meio, torna-se necessário obter parâmetros sobre a propagação de uma onda neste. Logo, esta propagação será influenciada pela impedância acústica e atenuação, uma vez que estas dependem do meio em estudo (BHARDWAJ, 2002; NELLIGAN, 2003).

Em meios líquidos, um dos parâmetros utilizados é a velocidade de propagação da onda, que está relacionada com a densidade do meio e a elasticidade (ou compressibilidade), ou seja, com forças intermoleculares, em que ela varia de acordo com a impedância acústica (NUSSENZVEIG, 1990). O outro parâmetro utilizado é coeficiente de atenuação, onde a atenuação, como já explicitado anteriormente, é causada por efeitos como a absorção, reflexão/refração e espalhamento.

2.2.1 Frequência sonora

A faixa de frequências sonora percebida pelo ser humano compreende de cerca de 20 Hz a cerca de 20 kHz, enquanto as ondas acústicas com frequência abaixo do limite de audição humana (abaixo de 20 Hz) são denominadas infrassônicas e aquelas acima do limite de audição humana (acima de 20 kHz) são chamadas de ultrassônicas (SILVA, 2012; SCHUINA, 2014).

Quando se trata de medidas acústicas, mede-se a propagação das ondas através de suas características, como velocidade e a atenuação em função da frequência (STILLHART; KUENTZ, 2012).

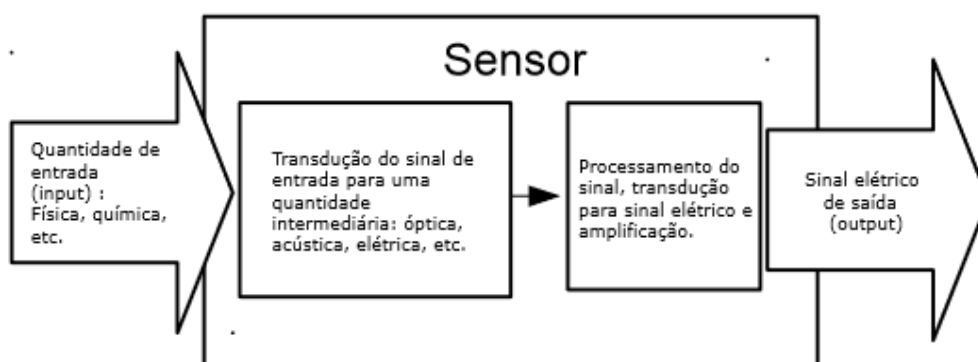
2.2.2 Sensores de ondas acústicas

Os dispositivos de medição capazes de detectar diversas propriedades, sejam elas físicas, químicas ou biológicas são chamados de sensores. Um sensor detecta variações em algum parâmetro, emitindo como resposta um sinal (geralmente elétrico), que pode ser uma função biunívoca do parâmetro de interesse, permitindo sua quantificação. Um exemplo de sensor é um biossensor potenciométrico para glicose, onde a enzima glicose oxidase é imobilizada na superfície de um eletrodo íon-seletivo para H^+ . A oxidação da glicose pelo oxigênio dissolvido é catalisada pela enzima e a variação do pH do meio devido à formação do ácido glicônico é medida pelo eletrodo íon-seletivo (transdutor), gerando uma diferença de

potencial elétrico (sinal) que é medido por um pHmetro. A diferença de potencial pode ser diretamente proporcional à concentração de glicose no meio (BANKAR *et al.*, 2009).

O sinal elétrico gerado pelo transdutor do sensor pode ser uma corrente elétrica, uma diferença de potencial, um pulso digital, etc. Em um sensor típico, ocorre o processo de transdução, que converte uma informação monitorada (*input*) em uma informação que o mecanismo de funcionamento do sensor seja capaz de entender (por exemplo, um sensor de luz detecta luminosidade e, por transdução, essa informação corresponde a um comprimento de onda, intensidade ou frequência) e em seguida outro processo de transdução converte essa informação para um sinal de saída (*output*) elétrico. Existem também sensores que possuem circuitos que podem ampliar esse sinal, tornando-o robusto, de maior sensibilidade a outros dispositivos de análise. Na Figura 6 é mostrado um diagrama de um sensor típico (COVACEVICE, 2012).

Figura 6 - Funcionamento básico de um sensor.



Fonte: COVACEVICE, 2012.

Sensores podem ser caracterizados de acordo com a sensibilidade (medida da magnitude do sinal de *output* para uma dada magnitude do *input*); resolução (capacidade de resposta do sensor para um valor mínimo de variação no *input*) - se a variação real for menor que esse valor mínimo, o sensor não enxergará essa medida; e seletividade (capacidade de distinguir quantidades diferentes a serem detectadas) (COVACEVICE, 2012).

2.2.2.1 Transdutores digitais de ondas acústicas

Os transdutores são sensores ressoadores utilizados na produção de ondas acústicas em substratos piezoelétricos através do fenômeno piezoelétrico inverso, que consiste na produção

de vibrações mecânicas em um substrato através da aplicação de um potencial elétrico alternado. Logo, também existem aqueles que utilizam a deformação dos elementos piezoelétricos tanto para produzir energia sônica no material examinado, quanto para coletar parte da energia sônica que não foi dissipada e atravessou o material em questão (COVACEVICE, 2012; MORAIS *et al.*, 2017).

Quando são utilizados estes transdutores piezoelétricos, comumente eles são acondicionados em suportes plásticos para que possam receber proteção mecânica e elétrica (BISCEGLI, 2004).

2.2.2.2 Métodos para medidas acústicas em líquidos

Existem dois métodos mais comuns que são utilizados para se analisar líquidos através de medidas acústicas: a transmissão-recepção e o pulso-eco.

Na transmissão-recepção são utilizados dois transdutores, em que um desempenha a função de transmissor e o outro de receptor. Neste método um pulso elétrico é aplicado ao transdutor transmissor, sendo este convertido em uma onda acústica que se propaga em direção ao transdutor receptor, que vai convertê-la em sinal elétrico, como mostra a Figura 7. Neste método a transmissão e recepção da onda pode ocorrer no modo pulsado ou no contínuo (DORABIATO, 2007).

Figura 7 - Método transmissão-recepção. São utilizados dois transdutores, sendo um transmissor (T) e um receptor (R).

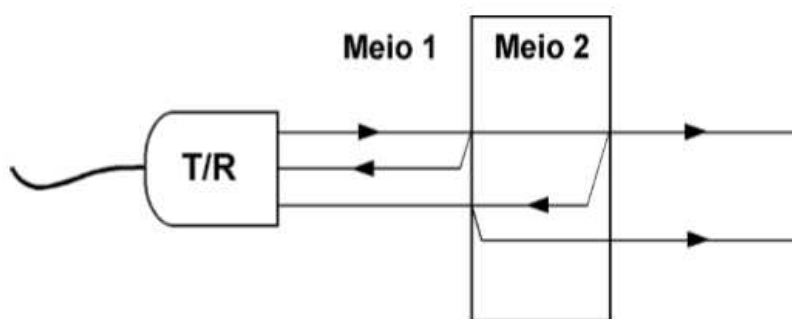


Fonte: DORABIATO, 2007.

No método pulso-eco é empregado apenas um transdutor que atua tanto como transmissor quanto receptor da onda acústica. Neste, o pulso elétrico é aplicado no transdutor sendo este convertido em onda acústica, que vai se propagar pelo meio 1. Quando encontra uma

interface (por exemplo, meios 1 e 2, como mostra a Figura 8) uma parte do sinal é refletido e a outra parte continua a se propagar pelo meio 2. Ao encontrar outra interface, o pulso novamente sofre transmissão e reflexão e assim sucessivamente. Desta forma, os ecos gerados pelas interações entre o pulso inicial e as interfaces são detectados pelo transdutor, que passa a atuar como receptor. Por este método, somente é possível a utilização de ondas acústicas pulsadas (DORABIATO, 2007).

Figura 8 - Método pulso-eco. Apenas um transdutor é utilizado para transmissão (T) e recepção (R) de ondas acústicas do meio a ser analisado.



Fonte: DORABIATO, 2007.

Neste trabalho foi utilizado o método transmissão-recepção para as medidas acústicas em líquidos.

2.3 Quimiometria

Devido as várias técnicas instrumentais de análises químicas atreladas ao crescente desenvolvimento computacional e a conseqüente complexidade dos dados obtidos, torna-se necessário a utilização conjunta de métodos matemáticos capazes de retirar a máxima informação destes resultados (PARREIRA, 2003). Desta forma, a quimiometria se refere as técnicas e operações associadas com a manipulação matemática e interpretação de dados químicos, sendo uma ferramenta importante em todas as partes da química quantitativa, mas principalmente no campo da química analítica (ADAMS, 1995). Com seu surgimento, houve o desenvolvimento de muitos métodos utilizados no processamento e interpretação de dados, os quais não foram passíveis de serem analisados (OLIVEIRA, 2008).

O crescimento da quimiometria proporcionou o desenvolvimento de novas ferramentas para tratamento de dados de acordo com o objetivo do estudo, como otimização de processos,

classificação de dados, determinações quantitativas, entre outros. Ela possibilita a análise estatística de dados químicos, simulações e planejamento de experimentos (SCHNEIDER *et al.*, 2018). Logo, os métodos quimiométricos podem ser aplicados em dados multivariados tanto em análises qualitativas (análise exploratória e reconhecimento de padrões) como quantitativas (calibração) (PARREIRA, 2003). Um exemplo de análise qualitativa é a análise de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*).

A PCA é uma manipulação matemática da matriz de dados para reduzir a dimensionalidade original da mesma, baseada na correlação entre as variáveis (PEZZOLO, 2008). Ela torna possível a interpretação visual da estrutura dos dados através de novos vetores independentes (SCHNEIDER *et al.*, 2018).

A partir dos dados originais é construído um novo conjunto de vetores, criando-se um conjunto de novas variáveis linearmente independentes (*scores*) para descrever estes dados, em que cada novo vetor é expresso em termos da combinação linear das antigas variáveis. Estes conjuntos são chamados de componentes principais (PC) (STRANG, 1976). A primeira componente principal (PC1) é a combinação linear de máxima variância dos dados originais. Já a PC2, que é ortogonal à PC1, apresenta a maior variância dos dados originais neste subespaço. Logo, as componentes seguintes são ortogonais às anteriores e descrevem a variância restante (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; FERREIRA, 2015). Desta maneira, os dados multivariados são projetados em um novo sistema de coordenadas, que traz muito mais informações, permitindo observar as diferenças entre as variáveis e possíveis relações entre as amostras (VARMUZA; FILZMOSE, 2009; FERREIRA, 2015).

Na PCA, amostras atípicas influenciam profundamente, sendo necessário encontrá-las e eliminá-las ou corrigi-las antes de aplicar o método aos dados em questão (WOLD, 1987). Porém, antes disso, em alguns casos é necessário um pré-tratamento dos dados, para que as amostras se adequem ao conjunto de maneira a maximizar ou minimizar o efeito de certas variáveis em todo sistema (PARREIRA, 2003).

A calibração multivariada se baseia na construção de um modelo matemático para relacionar a saída do sinal de um instrumento às propriedades de amostras, em que será feita uma previsão destas propriedades a partir do modelo obtido (OLIVEIRA, 2008). Um dos métodos de regressão multivariada é classificado como quadrados mínimos inverso - (*ILS – Inverse Least Squares*), dentro do qual estão a regressão por componentes principais (PCR – *Principal Component Regression*) e regressão por quadrados mínimos parciais (PLS – *Partial Least Squares*), em que a característica básica destes está em como a relação entre as variáveis medidas e a concentração é modelada (PARREIRA, 2003).

A PLS relaciona uma ou mais variáveis resposta com diversas variáveis independentes, baseada no uso de fatores. A PLS identifica fatores, como combinações lineares das variáveis independentes, que melhor modelam as variáveis dependentes (resposta). Além disso, também trabalha com conjuntos de dados com variáveis altamente correlacionadas e que apresentam ruído aleatório considerável (PUC-RIO, S.d.).

Juntamente a estas técnicas de estatística multivariada, podem ser aplicados métodos de validação, como a validação cruzada. Neste método de validação algumas amostras de calibração são deixadas de fora da construção do modelo e utilizadas para predição e cálculo dos resíduos. Repete-se este processo com outros subconjuntos de amostras de calibração até que todas as amostras sejam utilizadas para predição. Em seguida, todos os resíduos são combinados para computar a variância residual da validação e o valor do erro médio quadrático da previsão e uma calibração final é então calculada com todas as amostras (PUC-RIO, S.d.).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. J. **Chemometrics in analytical spectroscopy**. Royal Society of London: Chemistry, 1995.

ALMEIDA, J.A.G. **Amamentação: um híbrido natureza-cultura**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1999. 120p.

BANKAR, S. B. BULE, M. V.; SINGHAL, R. S.; ANANTHANARAYAN, L. Glucose oxidase - An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 489-501, 2009.

BARBETA, V. B.; MARZZULLI, C. R. Experimento didático para determinação da velocidade de propagação do som no ar, assistido por computador. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 4, 2000.

BARROS NETO, B. D.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, p. 1401-1406, 2006.

BHARDWAJ, M. C. **Non contact ultrasound: the final frontier in non destructive analysis**. Boalsburg: Second Wave Systems, 2002.

BISCEGLI, C. I. **Conceitos da física do ultra-som**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, USP, 2004.

BISTAFA, S. R. **Acústica aplicada ao controle de ruído**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

CAVALCANTE, M. A. Novas tecnologias no estudo de ondas sonoras. **Cad. Bras. Ens. Fis.**, v. 30, n. 3, p. 579-613, 2013.

CHRISTENSEN, D. A. **Ultrasonic Bioinstrumentation**. 1. ed. s. l.: Wiley, 1988.

COVACEVICE, A. C. T. **Sensores baseados em ondas acústicas: introdução e aplicações**. 2012. Trabalho de conclusão de curso (Física) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

DORABIATO, L. F. **Sistema de ultra-som para caracterização de leite bovino**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

EGGERS, F.; KAATZE, U. Broad-band ultrasonic measurement techniques for liquids. **Measurement Science & Technology**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 1996.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2015.

FISH, P. J. **Physics and instrumentation of diagnostic medical ultrasound**. Chichester; New York; New York, NY, USA: Wiley Distributed in the U.S.A., Canada, and Japan by A.R. Liss, 1990.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R. **Fundamentos de física, volume 2: gravitação, ondas e termodinâmica**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 2, 2008.

HEDRICK, W. R.; HYKES, D. L.; STARCHMAN, D. E. **Ultrasound Physics and Instrumentation**. 3. ed. St Louis Mo: Moby, 1995.

McCLEMENTS, D. J.; FAIRLEY, P. Ultrasonic pulse echo reflectometer. **Ultrasonics**, v. 29, p. 58-62, 1991.

MENG, G.; JAWORSKI, A. J.; WHITE, N. M. Composition measurements of crude oil and process water emulsions using thick-film ultrasonic transducers. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 45, p. 383-391, 2006.

MOHAMMADI, V.; GHASEMI-VARNAMKHASTI, M.; EBRAHIMI, R.; ABBASVALI, M. Ultrasonic techniques for the milk production industry. **Measurement**, v. 58, p. 93-102, 2014.

MORAIS, D.; RODRIGUES, D. L.; POSSANI, D.; CORREIA, F. C. Ondas Ultrassônicas: teoria e aplicações industriais em ensaios não-destrutivos. **Revista Brasileira de Física Tecnológica Aplicada**, v. 4, n. 1, p. 16-33, 2017.

NELLIGAN, T. J. **An introduction to ultrasonic material analysis**. Waltham: General Electric, 2003.

NÓBREGA, F.J., CAMPOS, A.L.R. **Distúrbios nutricionais e fraco vínculo mãe/filho**. Rio de Janeiro: Revinter. 1996.

NUSSENZVEIG, H. M. **Curso de Física Básica, v. 2**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1990.

OLIVEIRA, C. L. **Fenômenos ondulatórios**. Disponível em: <<http://www.lief.if.ufrgs.br/~cloliveira/introducao.html>>. Acesso em: jul., 2019.

OLIVEIRA, I. K. **Aplicação de quimiometria e espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de biodiesel e mistura biodiesel/diesel**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

PALITÓ, T. T. C.; ASSAGRA, Y. A. O.; ALTAFIM, R. A. P.; CARMO, J. P.; ALTAFIM, R. A. C. Low-cost electro-acoustic system based on ferroelectret transducer for characterizing liquids. **Measurement**, v. 131, p. 42-29, 2019.

PARREIRA, T. F. **Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariada**. 2003. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 147-154, 2008.

PEZZOLO, A. L. To See the World in a Grain of Sand: Recognizing the Origin of Sand Specimens by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy and Multivariate Exploratory Data Analysis. **Journal of Chemical Education**, v. 88, 1304-1308, 2011.

PUC-RIO. **Certificação Digital N° 0114349/CA**. S.d..

RAMALHO JUNIOR, F.; FERRARO, N. G.; SOARES, P. A. T. **Os Fundamentos da Física**. 8. ed. São Paulo: Moderna, 2003.

SCHNEIDER, M.; VACARO, B. B.; MARCELO, M. C. A.; FERRÃO, M. F. Métodos de Análise Exploratória Aplicadas ao Ensino de Espectroscopia na Região do Infravermelho. **Revista Virtual de Química**, v. 10, 2018.

STRANG, G. **Linear Algebra and its Applications**. 2. ed. Nova Iorque: Academic Press, 1976.

SCHUINA, G. L. **Utilização de ultrassom na conservação de suco de laranja: Efeito sobre características físico-químicas, enzimáticas, microbiológicas e sensorias**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.

SILVA, B. C. A. S. **Estudo das incertezas na medição de espessura por ultrassom em peças aeronáuticas**. 2012. Dissertação (Mestre em Engenharia Mecânica e Tecnologia de Materiais) – Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca, Rio de Janeiro, 2012.

SOUZA, A. R. **Experimentos em ondas mecânicas**. 2011. Dissertação (Mestre em Ensino de Física). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SOUZA, P. P. R.; SILVA, J. A. Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 7–14, 2010.

STILLHART, C.; KUENTZ, M. Comparison of high-resolution ultrasonic resonator technology and Raman spectroscopy as novel process analytical tools for drug quantification in self-emulsifying drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, p. 29-37, 2012.

TORLEY, P. J.; BHANDARI, B. R. Ultrassoud in food processing and preservation. In: RAHMAN, M. S. (Ed.) **Handbook of food preservation**. 2. ed. Boca Raton: Editora CRC Press, cap. 19, p. 713-732, 2007.

VARMUZA, K.; FILZMOSE, P. **Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2009.

WELLS, P. N. T. **Biomedical ultrasonics**. London ; New York: Academic Press, 1977.

WITHERS, P. M. Ultrasonic, acoustic and optical techniques for the non-invasive detection of fouling in food processing equipment. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p. 293-298, 1996.

WOLD, S. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratoystems**, v. 2, p. 37-52, 1987

CAPÍTULO 2

**DESENVOLVIMENTO DO ESPECTRÔMETRO
DE SOM**

RESUMO

Nesta etapa do trabalho buscou-se desenvolver um instrumento que utilizasse a faixa de frequência audível pelo ouvido humano (som) e as medidas do coeficiente de atenuação e velocidade de propagação, que permitisse a determinação de componentes majoritários em matrizes líquidas. Para isso, foi construído um instrumento utilizando transdutores digitais de elementos piezoelétricos como células de som, além de materiais de baixo custo para toda a montagem. Foram obtidos espectros para toda faixa de frequência sonora do instrumento (100 Hz a 20 kHz) para soluções puras de sacarose, etanol e lactose e soluções de leites integral e zero lactose, em que observou-se que estes apresentavam diferentes perfis, sendo um indício da possibilidade de que o instrumento seria capaz de realizar análises qualitativas, confirmando-se esta hipótese através de PCA's obtidas para os dados. Também foi observada a variação da intensidade do sinal analítico de acordo com o teor da solução em estudo para algumas faixas de frequência, indicando também a possibilidade de realização de análises quantitativas, em que um estudo com as soluções puras de etanol confirmou tal hipótese utilizando a seleção de frequência para quantificação, com auxílio do *software R*, em que aquela que apresentou um melhor ajuste foi a de 8,5 kHz ($R^2 = 0,9969$). Também foi realizado um estudo para examinar as distâncias entre os transdutores da célula de som, variando-se as distâncias de 2,5 a 15 mm, constando-se que quanto maior a distância utilizada, maior será a atenuação. Novas células de som foram construídas ao longo do trabalho, realizando ajustes necessários que foram sendo notados durante as etapas de desenvolvimento, como rigidez da célula de som, controle de temperatura, redução do volume de amostra, para que se tornasse possível o desenvolvimento de um instrumento adequado para as análises de componentes majoritários em matrizes líquidas.

1 INTRODUÇÃO

O ultrassom é muito utilizado para limpeza de materiais, processos químicos, preparação de emulsão e suspensão e degaseificação de solventes (LORIMER, MASON, 1987), além de ser usado para análise de imagem (SUSLICK, 1989).

Todavia, cada vez mais tem-se utilizado em indústrias técnicas de ultrassom para análise e modificação de alimentos (McCLEMENTS, 1995). A partir de medidas das propriedades ultrassônicas da amostra (velocidade ultrassônica, coeficiente de atenuação, impedância ultrassônica) tem sido possível determinar a composição química de alguns produtos alimentícios, como por exemplo os lácteos, e calcular o índice crioscópico (POOVEY; MASON, 1998).

Desde que o método baseado na propagação de ondas acústicas começou a ser utilizado, vários trabalhos foram desenvolvidos, sendo este bastante utilizado na análise de líquidos, com muitas aplicações na análise de leites. Entretanto, tais trabalhos não utilizavam a faixa do som em suas análises.

Em 1981 foram realizados estudos baseados nas propriedades ultrassônicas do leite para determinar teor de gordura e sólidos totais simultaneamente (ATHERTON; NEWLANDER, 1981). Em 1990 foi proposto um método de medição da concentração de dois constituintes (gordura e proteína) de soluções lácteas, utilizando-se uma célula ultrassônica ressonante em duas temperaturas diferentes (DION; BARWICZ, 1990). Em 1995 foi construída uma célula para medição de densidade de líquidos (água destilada, etanol e óleo de mamona) através do método pulso-eco, utilizando um pulso senoidal de 1,6 MHz (ADAMOWSKI *et al.*, 1995). Em 2005 foi proposto um método de determinação da concentração de vários componentes (gorduras, proteínas, lactose e células somáticas) de uma amostra de leite bovino, utilizando a faixa do ultrassom, em que a concentração era obtida a partir da medição de vários parâmetros acústicos e elétricos (atenuação a uma dada temperatura (α), derivada da atenuação em função da temperatura (da/dt), velocidade do som a certa temperatura (V_t), derivada da velocidade do som em função da temperatura (dV/dt) e condutividade elétrica) obtidos da amostra sob ensaio (PRIEV *et al.*, 2005). Em 2009 foi realizado um estudo sobre a caracterização de leite fluido utilizando técnicas de ultrassom e redes neurais artificiais, em que foram medidos o teor de gordura e a quantidade de água adicionada ao leite (NAZÁRIO *et al.*, 2009). Em 2015 foi apresentado um modelo de avaliação e classificação de amostras de leite cru quanto a sua integridade baseado em um sistema de *fuzzy logic*, em que foram avaliados parâmetros como o coeficiente de atenuação e a velocidade de propagação de ondas nas amostras utilizando um

equipamento de ultrassom (ALVES *et al.*, 2015). Também em 2015 foi realizado um comparativo entre o método oficial (butirômetro de Gerber) recomendado pela legislação brasileira e os equipamentos eletrônicos de medição fotométrica e de espectroscopia de ultrassom para quantificação dos lipídios totais do leite ovino (PELLEGRINI; RICHARDS, 2015). Em 2019, foi apresentado um estudo para determinação das propriedades físico-químicas e acústicas de óleo de rícino, para várias temperaturas através da técnica ultrassônica (ALVARÉZ *et al.*, 2019).

Desta maneira, torna-se interessante o desenvolvimento de um instrumento que utilize ondas acústicas e a faixa de frequência audível pelo ser humano capaz de analisar componentes majoritários em matrizes líquidas, de uma forma rápida, prática, simples, robusta e a baixo custo, podendo este, posteriormente ser miniaturizado e utilizado em qualquer local, devido a sua portabilidade.

Ao se desenvolver esta nova técnica de medidas baseadas na propagação de ondas acústicas, além da vantagem de um instrumento de baixo custo, devido ao tipo de material usado em sua montagem não gerar um alto valor agregado, sua montagem também se fez de forma robusta, facilitando a coleta dos dados a serem analisados.

Entretanto, quando se trata de análise de dados em química, alguns destes obtidos através de algumas técnicas instrumentais apresentam certa complexidade, não sendo possível extrair informações importantes apenas utilizando tratamentos de dados convencionais. Assim, a quimiometria aparece como uma aliada a análise estatística de dados químicos.

Diante do exposto, torna-se interessante aplicar métodos quimiométricos, como a PCA, para tratar os dados obtidos utilizando o espectrômetro de som e extrair o máximo de informação possível.

Neste capítulo, foram apresentadas as etapas de desenvolvimento de um instrumento analítico que utilizou a faixa de frequência percebida pelo ouvido humano (som) para análise de componentes majoritários em matrizes líquidas. Foi apresentada a evolução no desenvolvimento do espectrômetro de som até sua versão mais adequada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e soluções

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico e todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água tipo 1 (MiliQ® Reference A+). O etanol utilizado

foi adquirido da LS Chemicals (99,7% (v/v)), a lactose anidra foi obtida a partir da Vetec, o açúcar utilizado para preparar as soluções de sacarose foi da marca Alvinho, o leite integral e zero lactose utilizados foram da marca Camponesa.

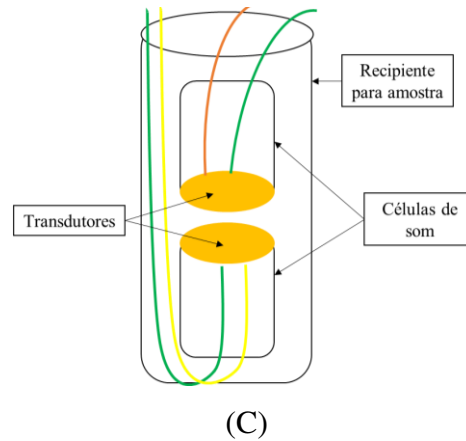
2.2 Etapas do desenvolvimento e evolução do instrumento

2.2.1 Primeira etapa

Foi desenvolvido e montado o primeiro protótipo do espectrômetro de som e seu circuito para uso com método transmissão-recepção (DORABIATO,2007). Confeccionou-se uma célula de som (Figura 9), com tubos de acrílico (também utilizados como recipiente para a amostra) composta por dois transdutores piezoelétricos. Os discos piezoelétricos foram imobilizados pelas bordas nos tubos de acrílico do mesmo diâmetro dos discos com policianometacrilato (Super Bonder[®]) e acetato de polivinila (Rendicolla[®]). Fitas de PTFE foram utilizadas para evitar vazamentos. Foram confeccionadas células com distância entre os transdutores de 2,5; 5; 10 e 15 mm. Entre as medidas a célula foi lavada com água tipo 1.

Figura 9 - (A) Primeira célula de som confeccionada para o espectrômetro de som; (B) Transdutor piezoelétrico; (C) Desenho esquemático da célula de som.





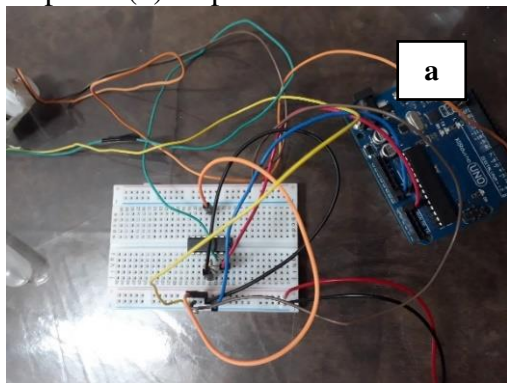
Fonte: A autora.

O circuito do espectrômetro de som foi montado como mostrado na Figura 10. Existe um circuito referente ao transdutor (elemento piezoelétrico) emissor das ondas (fonte) e outro referente ao transdutor receptor (detector) das ondas. Com auxílio do microprocessador Arduino Uno (<https://www.arduino.cc/>), foram geradas ondas quadradas em frequências entre 100 Hz e 20 kHz.

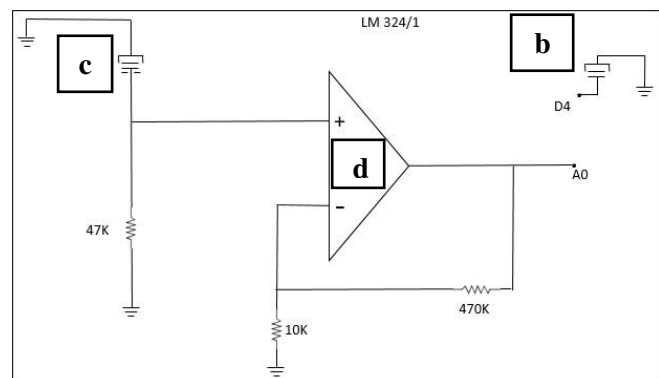
O sinal do segundo elemento piezoelétrico que atuou como detector foi coletado em um amplificador operacional 741, com amplificação de 47 vezes, e a resposta gerada foi enviada para o conversor analógico-digital de 10 bits do Arduino UNO.

Os elementos piezoelétricos tinham diâmetro de 20 mm, espessura igual a 0,33 mm e frequência de máxima oscilação foi igual a 20 kHz.

Figura 10 - (A) Montagem do circuito do espectrômetro de som – (a) microprocessador Arduino Uno; (B) Desenho esquemático do circuito – (b) transdutor emissor, (c) transdutor receptor e (d) amplificador.



(A)

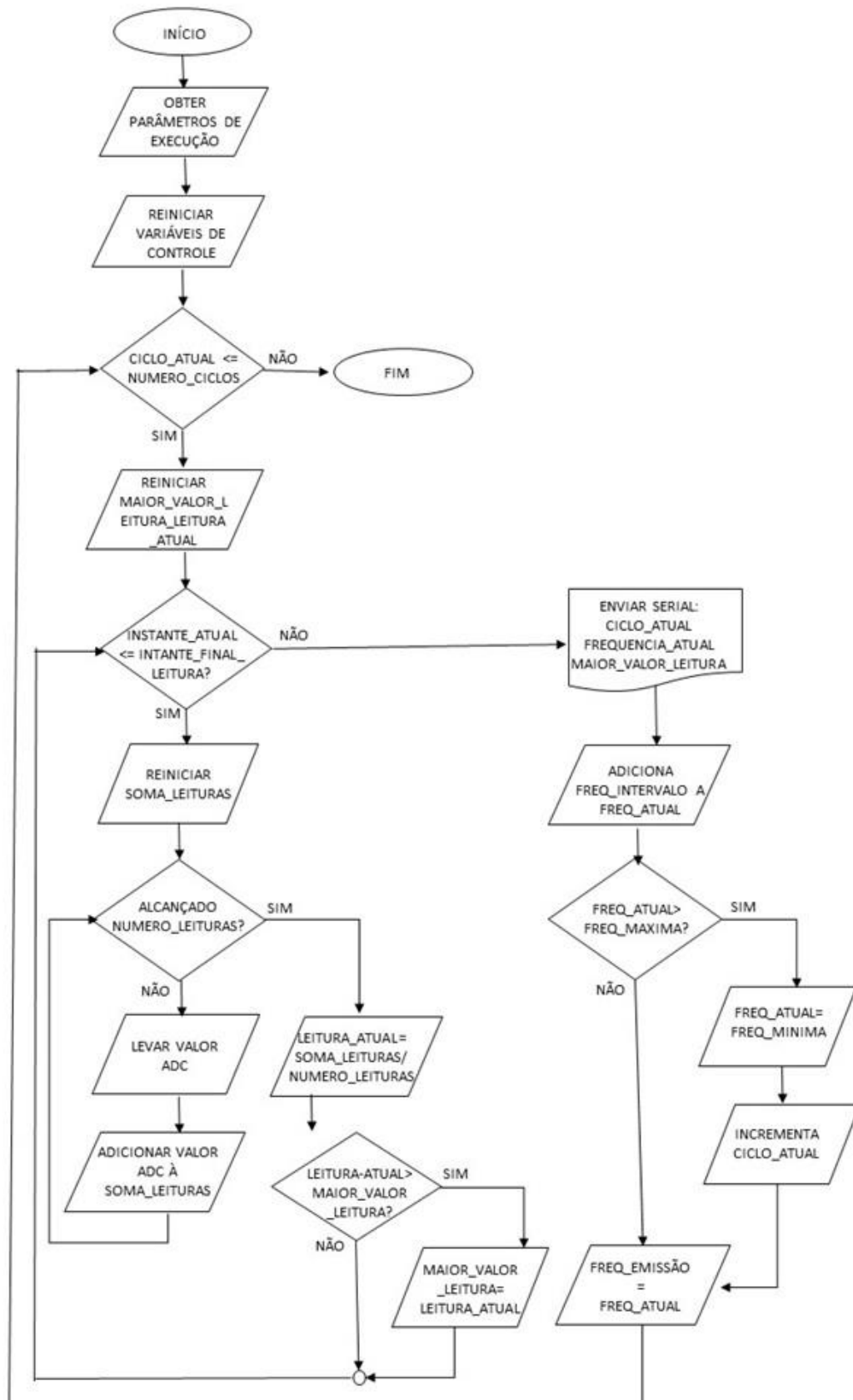


(B)

Fonte: A autora.

O fluxograma do funcionamento do *software* no Arduino Uno é mostrado na Figura 11. Inicialmente, foram inseridos os valores dos parâmetros para a realização das leituras: frequência mínima e máxima da faixa a ser analisada, “degraus” de frequência (intervalos de frequência), intervalo de tempo em cada frequência, número de pontos coletados em cada frequência e número de varreduras a serem realizadas. Em seguida foram realizadas as leituras de acordo com as condições definidas. O sinal analítico obtido em cada frequência foi a Intensidade (I), medida como tensão pico a pico. Após serem cumpridas todas as condições definidas inicialmente, finalizavam-se as leituras.

Figura 11 - Fluxograma responsável pelo funcionamento do espectrômetro de som.



Fonte: A autora.

2.2.1.1 Comportamento de soluções

Foram obtidos espectros para toda faixa de frequência do protótipo do espectrômetro, com a célula de som mergulhada em diferentes soluções puras de sacarose (0 a 10% (m/v)), etanol (0 a 50% (v/v)), lactose (0 a 10% (m/v)) e soluções de leite integral e leite zero lactose (0 a 100% (v/v)),

Análise qualitativa - PCA

Foram realizadas análises de componentes principais (PCA) com os espectros obtidos para diferentes soluções, com auxílio do *software OriginLab2018*.

Análise quantitativa – seleção de frequências

Um *script* no *software R* foi criado para permitir selecionar uma dada frequência e obter a curva analítica (APÊNDICE A).

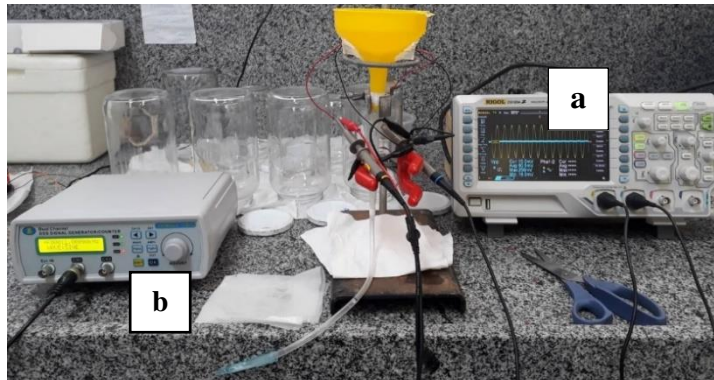
2.2.1.2 Efeito da distância entre os transdutores da célula de som

Foram construídas células de som com distância distintas entre os transdutores piezoelétricos para avaliar o efeito destas (2,5; 5; 10 e 15 mm). Foram utilizadas soluções puras de sacarose de 0 a 40% (m/v).

2.2.2 Segunda etapa

Foi desenvolvido e montado um sistema do espectrômetro de som, formado por um gerador de sinal (Dual Channel/DDS Signal Generator/Counter), responsável pela oscilação do elemento piezoelétrico fonte, uma nova célula de som e um osciloscópio (Rigol modelo D1054Z), para leitura do sinal diretamente do elemento piezoelétrico (Figura 12).

Figura 12 - Sistema para o espectrômetro de som com o osciloscópio (a) que obtém seu sinal de um gerador de sinal (b).



Fonte: A autora.

Foi confeccionada uma célula de som (Figura 13) com tubos de acrílico e dois transdutores piezoelétricos (fonte e detector), com as mesmas características já apresentadas na construção da primeira célula de som. Nesta, os tubos de acrílico foram dispostos em um funil de polipropileno, atuando como recipiente para a amostra, mantendo-se a distância entre os transdutores de 2,5 mm. A nova célula foi montada de forma rígida, em que a solução foi adicionada e retirada através de sondas nasogástricas. O tipo de onda gerada neste sistema foi a onda senoidal e o volume utilizado para total recobrimento da célula de som foi de 100 mL. Entre as medidas, a lavagem do sistema passou a ser feita com detergente e água tipo 1.

Figura 13 - Célula de som construída para o sistema do espectrômetro de som com o osciloscópio.



Fonte: A autora.

Um *software* chamado *PUTTY* foi desenvolvido para a inserção dos parâmetros de análise no sistema e transmissão via Wi-Fi dos dados após a coleta completa destes.

A inserção dos parâmetros de análise no sistema passou a ser realizada em um *notebook* onde o *software* foi instalado, sendo estes os mesmos já explicitados anteriormente (página 35). Após iniciar a análise para determinada faixa de frequência, o sistema foi colocado em modo *off-line*, evitando qualquer interferência nas análises.

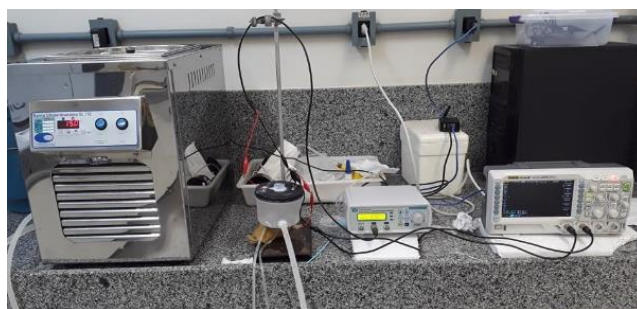
2.2.3 Terceira etapa

A terceira etapa consistiu em uma mudança na célula de som. Os tubos de acrílico com os dois transdutores piezoelétricos foram dispostos em uma seringa descartável de polipropileno de 50 mL, formando o recipiente para a amostra. A distância entre os transdutores foi mantida em 2,5 mm. Esta célula foi disposta dentro de um recipiente de polipropileno, que foi usado como “camisa de água” para se fazer o controle de temperatura. A temperatura da “camisa” foi controlada através do uso de um banho ultratermostático (Solab, SL 152). Toda montagem do sistema está mostrada na Figura 14. A nova célula foi montada de forma rígida, em que a solução era adicionada através de uma micropipeta automática e retirada da mesma através de sondas nasogástricas conectadas no fundo da célula. O volume utilizado para total recobrimento da célula de som foi de 5,0 mL.

Figura 14 - (A) Nova célula de som com controle de temperatura; (B) montagem de todo sistema com o ultratermostato.



(A)



(B)

Fonte: A autora.

2.2.3.1 Efeito da temperatura

Foram obtidos espectros para a faixa de frequência de 100 Hz até 15 kHz, com a célula de som completamente mergulhada em água tipo 1 variando-se a uma temperatura (10, 15, 20 e 25 °C). Para conseguir o total recobrimento da célula foi utilizado um volume de 5,0 mL, sendo realizadas três varreduras.

2.2.4 Quarta etapa

Uma nova célula de som para controle de temperatura foi confeccionada com tubos de acrílico e dois transdutores piezoelétrico, com uma distância entre os transdutores de aproximadamente 4,0 mm, sendo os tubos de acrílico dispostos em uma seringa descartável de polipropileno de 50 mL, que foi o recipiente para a amostra.

Toda montagem do sistema está mostrada na Figura 15, em que os procedimentos para medição foram os mesmos utilizados para a célula de som obtida na terceira etapa. O volume utilizado para total recobrimento da célula de som foi de 12,5 mL.

Figura 15 - (A) Célula de som com controle de temperatura do laboratório; (B) montagem de todo sistema.



(A)



(B)

Fonte: A autora.

O controle de temperatura desta célula foi realizado controlando-se a temperatura do laboratório através do uso de um ar-condicionado, em que a temperatura da amostra foi medida antes e após cada varredura com um termômetro digital.

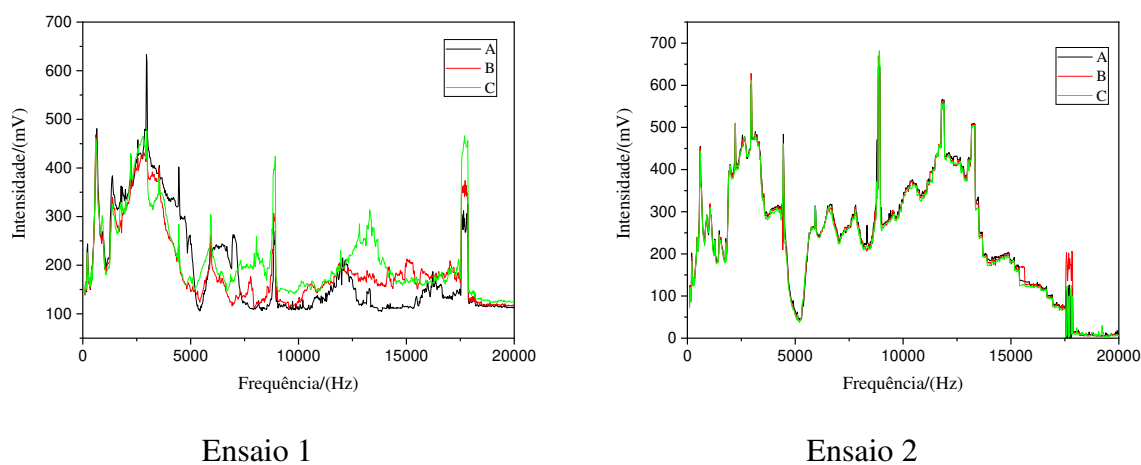
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Etapas do desenvolvimento e evolução do instrumento

3.1.1 Primeira etapa

Na Figura 16 são mostrados os espectros obtidos para solução pura de sacarose de 8% (m/v). A formação de bolhas de gás entre os transdutores comprometeu a repetibilidade (Ensaio 1). Elas foram formadas devido à uma diferença de potencial entre as faces expostas dos transdutores, causando uma eletrólise e devido a entrada de solução na célula. A correção destes problemas foi feita corrigindo a diferença de potencial e vedando-se melhor a célula. Desta maneira, houve melhora na repetibilidade (Ensaio 2), como mostrado na Figura 16.

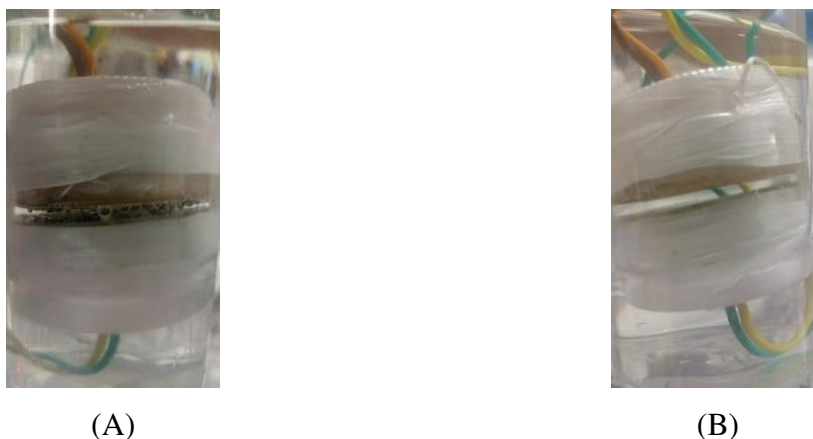
Figura 16 - Espectros para a solução pura de sacarose 8% (m/v), em que A, B e C se referem as repetições para cada solução.



Fonte: A autora.

As células com e sem eletrólise são apresentadas na Figura 17.

Figura 17 - Células de som: com eletrólise (A) e sem eletrólise (B).



Fonte: A autora.

3.1.1.1 Comportamento de soluções

Foram obtidos espectros para soluções puras de sacarose, etanol, lactose e soluções de leite integral e zero lactose.

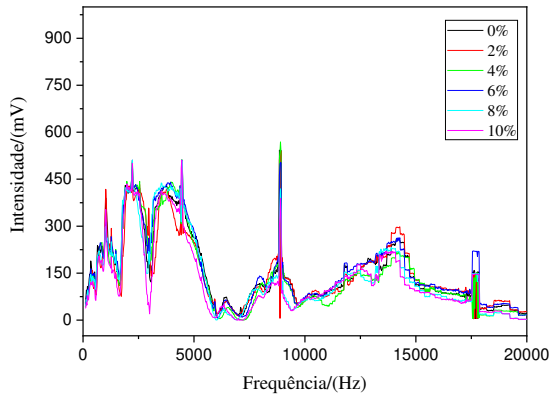
Os parâmetros utilizados nesta varredura estão apresentados na Tabela 1.

Parâmetros	Valores
Frequência mínima	100 Hz
Frequência máxima	20 kHz
“Degrau” de frequência	25 Hz
Intervalo em cada frequência	500 ms
Número de pontos	100
Número de varreduras	1 a 3

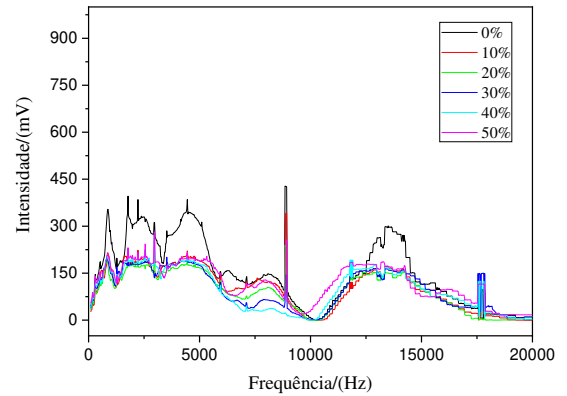
Tabela 1 - Parâmetros para varredura em toda faixa de frequência do instrumento.

Na Figura 18 são mostrados os espectros obtidos para todas as soluções e seus respectivos teores.

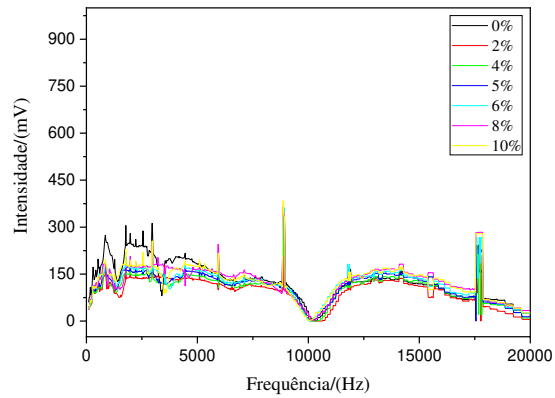
Figura 18 - Espectros de som para as soluções puras de sacarose, etanol, lactose e soluções de leite integral e zero lactose.



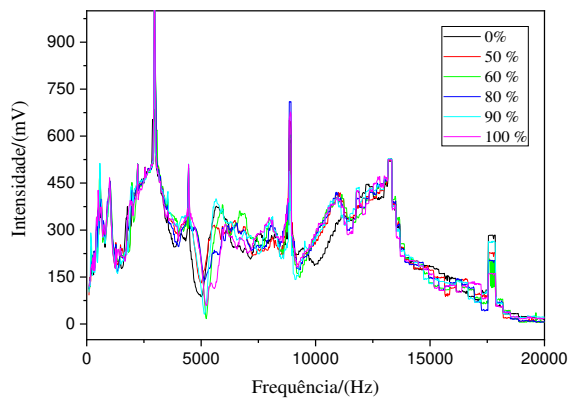
Sacarose %(m/v)



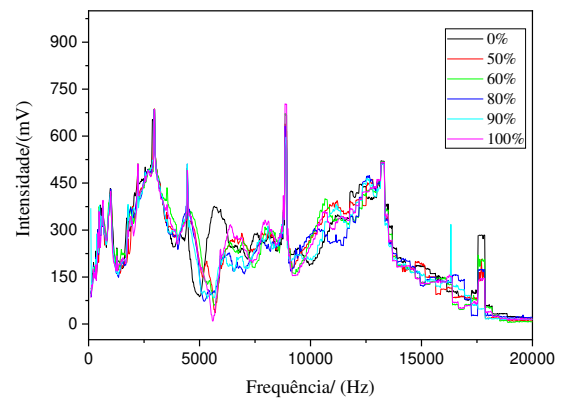
Etanol %(v/v)



Lactose %(m/v)



Leite integral %(v/v)



Leite zero lactose %(v/v)

Fonte: A autora.

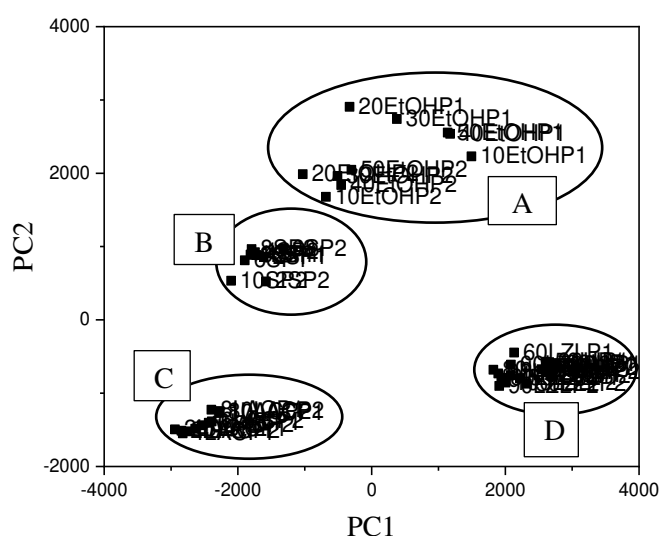
Os espectros apresentaram diferentes perfis e intensidade do sinal analítico de acordo com o tipo de solução, sendo este um indício de que o instrumento seria capaz discriminar soluções, ou seja, realizar análises qualitativas.

Análise qualitativa – PCA

Na Figura 19 são mostrados os *scores* da primeira e segunda componentes da análise de componentes principais (PCA) para os espectros das soluções puras de sacarose, etanol, lactose e soluções de leite integral e zero lactose.

Observou-se claramente a discriminação entre todas as soluções. A PC2 foi particularmente adequada para a distinção de soluções contendo etanol, sacarose e lactose. A PC1 foi capaz de distinguir entre as soluções de lactose e as soluções contendo leites (integral e zero lactose).

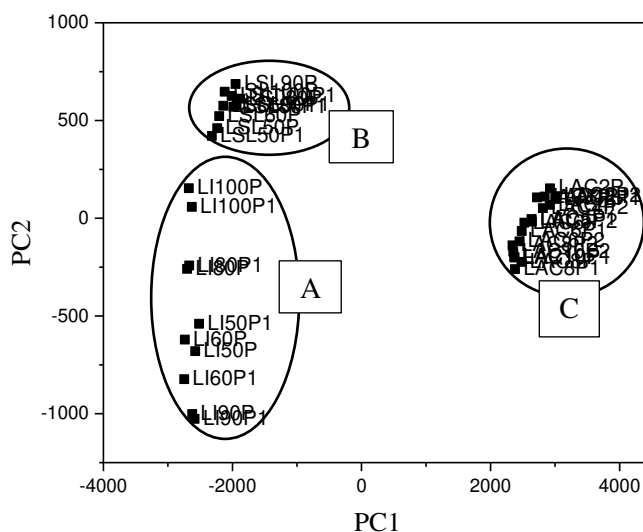
Figura 19. PCA obtida para as soluções de etanol (A), sacarose (B), lactose (C) e leites (D).



Fonte: A autora.

As soluções de lactose e as soluções contendo leites (integral e zero lactose) foram analisadas em separado das soluções de etanol e sacarose (Figura 20). Novamente a PC1 permitiu a discriminação entre as soluções de leites e solução de lactose, mas também foi possível distinguir os dois tipos de leites analisados entre si com a PC2.

Figura 20 - PCA obtida para as soluções de leite integral (A), leite zero lactose (B) e lactose (C).



Fonte: A autora.

O fato de haver uma separação entre os teores do leite integral em relação ao eixo da PC2 e a mesma não ser observada para lactose se deve ao fato do leite apresentar outros componentes em sua composição.

Com estes resultados, comprovou-se a possibilidade de serem realizadas análises qualitativas utilizando o espectrômetro de som.

Análise quantitativa – seleção de frequências

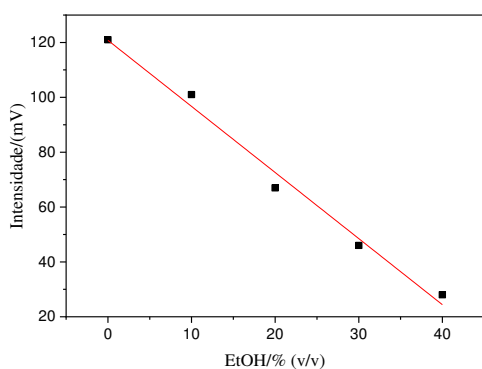
Para confirmar a possibilidade de quantificação, optou-se por prosseguir os estudos utilizando os espectros obtidos para as soluções puras de etanol e o *script* criado no *software R*.

Desta forma, foi realizada a análise visual dos espectros e a seleção da faixa de frequência a ser analisada. Esta seleção foi feita de acordo com aquelas regiões em que foi observada uma maior diferença na intensidade do sinal analítico para cada teor de etanol. A partir dessa seleção, as curvas analíticas obtidas a cada 500 Hz foram avaliadas.

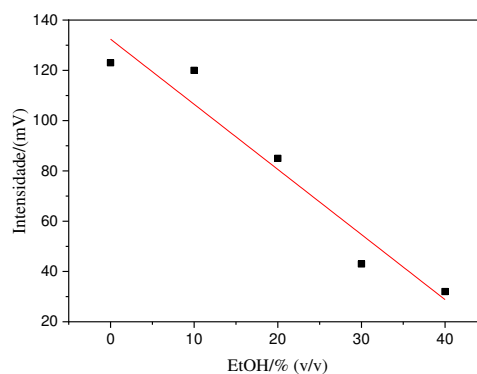
Assim, para as soluções de etanol, as faixas de frequências estudadas foram de 6,5 a 9 kHz e 10 a 13 kHz. Nas frequências 7; 7,5; 8; 8,5 kHz observou-se um comportamento linear com inclinação negativa, enquanto que, para as frequências 12 e 12,5 kHz, a inclinação foi positiva (Figura 21). É difícil até o momento atribuir as frequências na faixa do som às características químicas da composição das soluções. Todo o trabalho está baseado em uma

busca empírica por regiões lineares, ou ao menos unívocas na relação entre a concentração de analitos e a intensidade (amplitude) medida.

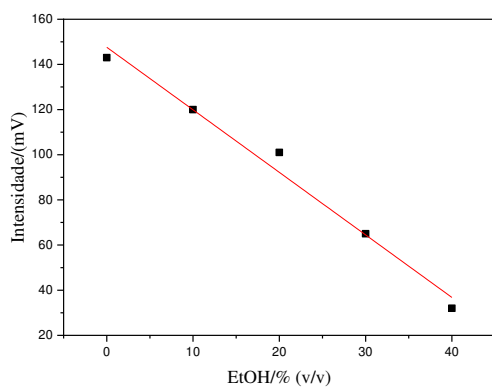
Figura 21 – Curvas analíticas para soluções puras de etanol obtidas em diferentes frequências. As condições de obtenção do espectro são apresentadas na Tabela 1.



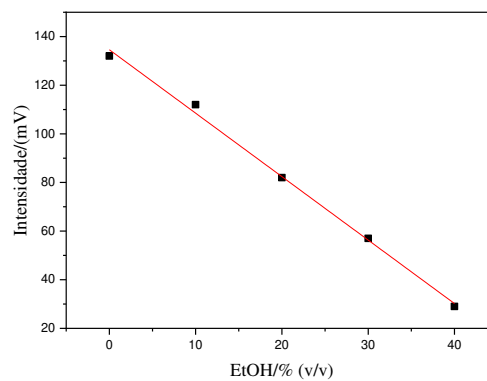
7 kHz



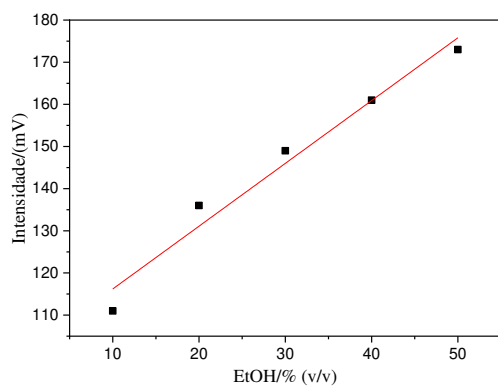
7,5 kHz



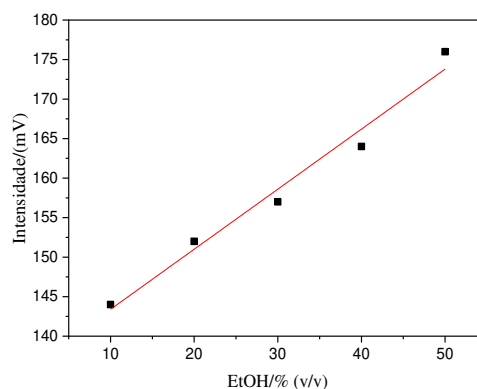
8 kHz



8,5 kHz



12 kHz



12,5 kHz

Fonte: A autora.

Os parâmetros dos modelos lineares obtidos (Equações 12 a 17) para as curvas apresentadas na Figura 21 são mostradas na Tabela 2.

Frequência (kHz)	Inclinação (S) (mV/%)	Branco	S_{res}* mV	rA** (%EtOH)	R²_{aj}***
7	-2,41 ± 0,15	120,80 ± 3,72	4,80	5,97	0,9843 (12)
7,5	-2,59 ± 0,38	132,40 ± 9,35	12,1	14,0	0,9184 (13)
8	-2,77 ± 0,20	147,60 ± 4,94	6,37	6,90	0,9791 (14)
8,5	-2,61 ± 0,08	134,60 ± 2,05	2,65	3,05	0,9959 (15)
12	1,49 ± 0,15.	101,30 ± 4,99	4,75	9,56	0,9604 (16)
12,5	0,76 ± 0,07	135,80 ± 2,23	2,12	8,37	0,9770 (17)

Tabela 2 – Parâmetros dos modelos lineares obtidos em cada frequência selecionada.

*S_{res}: estimativa do desvio padrão dos resíduos; **rA: resolução Analítica; ***R²_{aj}: coeficiente de determinação ajustado.

O melhor modelo linear foi aquele obtido na frequência igual a 8,5 kHz, tanto em relação à inclinação quanto às incertezas associadas e ao coeficiente de determinação e principalmente, à resolução Analítica (rA) (Equação 18) (MATIAS *et al.*, 2021), que representa a menor diferença de concentração que pode ser determinada. A resolução analítica é correlacionada com o coeficiente de determinação, porém muito mais útil por não ser um termo relativo.

$$rA = \frac{3s_{res}}{S} \quad (18)$$

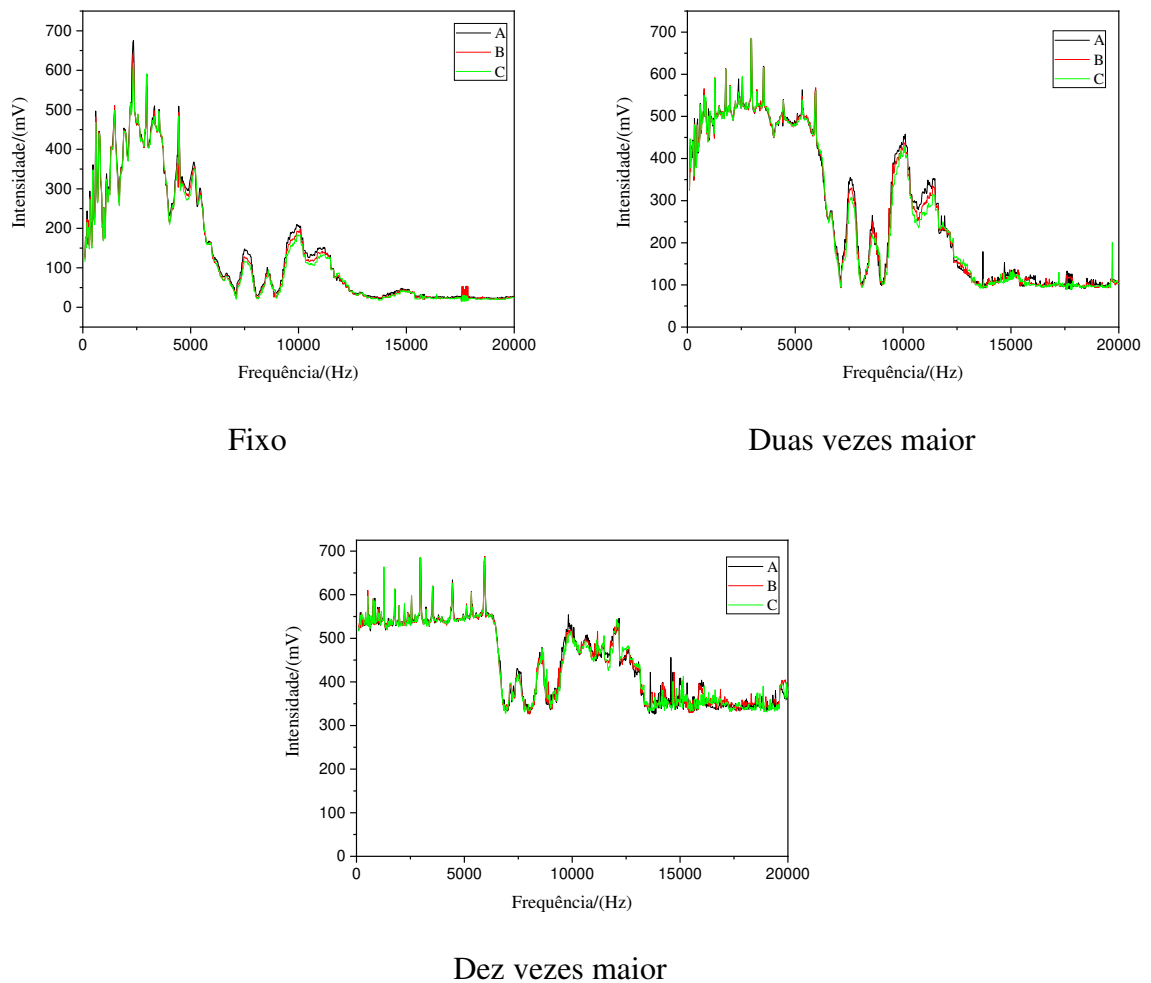
Com estes resultados, comprovou-se que o espectrômetro de som foi capaz de realizar análises quantitativas, pelo menos de soluções puras.

Até este momento do trabalho foram ressaltadas as potencialidades do instrumento. Foi realizada a prova de conceito do instrumento desenvolvido, em que foi confirmada sua capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em líquidos. Contudo, alguns ajustes ainda foram necessários para corrigir problemas em relação a repetibilidade e adequar o instrumento.

3.1.1.2 Efeito da distância entre os transdutores da célula de som

Os parâmetros utilizados estão apresentados na Tabela 1 (página 42). Foram realizados ensaios com o amplificador fixo do circuito mais um amplificador com um ganho de sinal em duas ou dez vezes. O uso do amplificador adicional foi para avaliar o comportamento do espectro em regiões com elevada atenuação. Na Figura 22 são mostrados os ensaios referentes a célula com 10 mm de distância e para água tipo 1. Observou-se que ao aumentar o ganho do sinal apenas em duas vezes já houve a saturação (“estouro de escala”) na faixa de 100 Hz a 6 kHz, sem, entretanto, amplificar nenhum sinal a partir de 13 kHz.

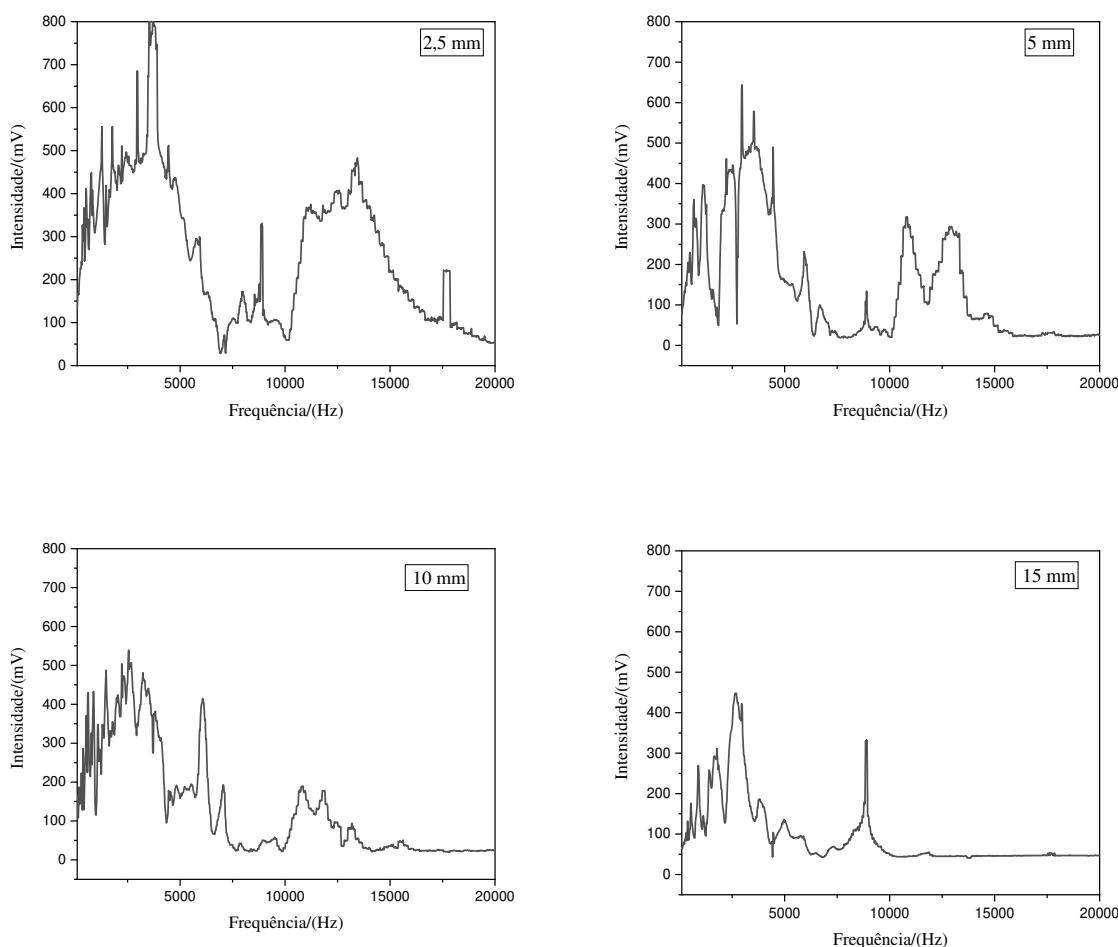
Figura 22 - Espectros para diferentes amplificadores para água tipo 1, em que foram realizadas três repetições (A, B e C).



Fonte: A autora.

O comportamento para todas as distâncias entre os transdutores foi o mesmo apresentado na Figura 22. Portanto, o melhor tipo de amplificador a ser usado para todas as células foi o fixo que já existia no circuito. Os espectros para uma solução pura de sacarose de 6% (m/v) obtidos para as células de som com diferentes distâncias entre os transdutores com este amplificador são mostrados na Figura 23.

Figura 23 - Espectros para solução pura de sacarose 6% (m/v) com as células de som com distâncias de 2,5; 5; 10 e 15 mm entre os transdutores.



Fonte: A autora.

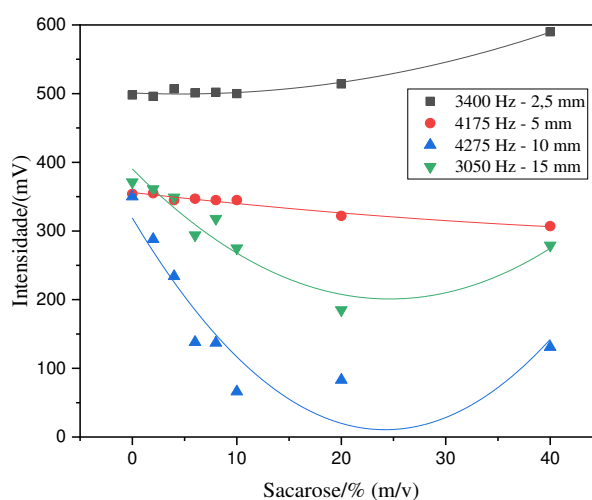
Quanto maior a distância entre os transdutores, maior a atenuação do sinal. Em alguns casos, essa atenuação permitiu uma melhor resolução do sinal enquanto que em outros, eliminou algumas bandas.

A célula de 2,5 mm foi aquela que apresentou uma maior faixa de frequência com sinal analítico, sendo esta de até aproximadamente 17,5 kHz. Comparada com as demais, pode-se

observar a diminuição da resolução dos picos. Essa baixa resolução pode estar associada à reflexão das ondas e intensificação dos *overtons*. Por outro lado, a célula com 15 mm apresentou uma atenuação muito acentuada a partir de aproximadamente 10 kHz.

Ao comparar alguma frequência sonora que poderia vir a ser utilizada para quantificação de sacarose, observou-se que o comportamento não foi o mesmo para cada distância entre os transdutores (Figura 24), visto que se tratava de células diferentes. Portanto, cada célula de som apresentará um comportamento individual em relação a faixas de frequência para quantificação de analitos, fato este que também pode ser observado devido a cada célula apresentar perfis diferentes para a mesma solução. Na Figura 24 são apresentadas as curvas analíticas para o modelo quadrático para as diferentes distâncias entre os transdutores em uma faixa de frequências próximas.

Figura 24 – Curvas analíticas para soluções de sacarose obtidas para a faixa de frequência de 3 a 4,3 kHz para as diferentes distâncias entre os transdutores piezoelétricos.



Fonte: A autora

Os coeficientes de determinação ajustados (R^2_{aj}) foram iguais a 0,9808; 0,9444; 0,7977 e 0,8711 para as distâncias de 2,5; 5; 10 e 15 mm, respectivamente. Houve um melhor ajuste do modelo aos dados na frequência de 3,4 kHz para a distância entre os transdutores de 2,5 mm, considerando toda faixa de concentrações trabalhada. Além disso, observou-se que quanto maior a distância entre os transdutores, menor foi o ajuste do modelo aos dados.

Para prosseguir com os próximos estudos, visto que a distância de 2,5 mm entre os transdutores foi a que apresentou maior faixa de frequência com sinal analítico e um melhor

ajuste do modelo considerando toda faixa de concentração trabalhada, esta foi a distância utilizada.

3.1.2 Segunda etapa

Nesta etapa foi utilizada uma nova montagem do sistema para o espectrômetro de som com o osciloscópio e a célula de som foi mantida rígida, em que para adicionar e retirar a solução analisada foram usadas sondas nasogástricas. O aumento da rigidez da célula foi realizado com o objetivo de aumentar a repetibilidade e eliminar sinais espúrios, devido a alteração do sistema quando a mesma era mergulhada e retirada da solução manualmente (primeira etapa).

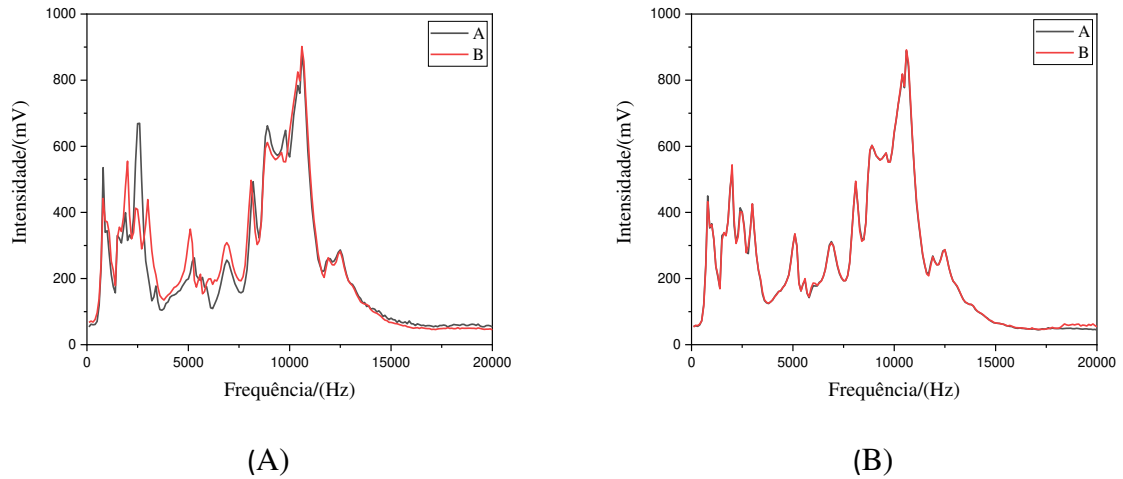
O sistema de coleta dos dados também foi alterado. Um osciloscópio foi utilizado para simplificar o aparato experimental, além de conseguir um sinal mais puro e informações sobre este, tais como ângulo das fases entre ambos sinais e a amplitude pura e RMS.

A mudança no tipo de onda utilizada foi realizada devido a ruídos que poderiam estar sendo causados ao se utilizar ondas quadradas. Uma onda quadrada alterna entre os dois níveis, que podem ou não incluir o zero. Para a obtenção eletrônica das ondas quadradas gera-se uma grande faixa de harmônicas que podem gerar radiação eletromagnética ou pulsos de corrente podendo interferir em circuitos próximos, causando ruídos ou erros. Para evitar estes problemas em circuitos muito sensíveis, tais como conversores analógico-digitais de precisão, as ondas senoidais são utilizadas (O'MALLEY, 2014).

Os parâmetros utilizados são os mesmos apresentados na Tabela 1 (página 42).

A condição da superfície do elemento piezoelétrico foi avaliada lavando-se a superfície com detergente ou não (Figura 25). De acordo com a Figura 25A, notou-se falta de repetibilidade nos espectros obtidos devido a pequenas bolhas que se prendiam à superfície dos transdutores piezoelétricos ao adicionar a amostra no recipiente para a realização da análise. Na Figura 25B, além da lavagem convencional, foi feita a lavagem apenas com detergente, em que a formação de um filme hidrofóbico na superfície dos transdutores pelo detergente, cuja cabeça aniônica estaria direcionada para o material pôde auxiliar na prevenção à formação de bolhas na superfície.

Figura 25 - Espectros para toda faixa de frequência para água tipo 1, em que (A) se refere aos espectros sem repetibilidade devido a presença de bolhas e (B) se refere aos espectros das repetições sem a presença de bolhas.



Fonte: A autora.

Observou-se que acima de 15 kHz recorrentemente não houve sinal analítico, logo, para os próximos estudos, a faixa de frequência utilizada foi diminuída, diminuindo também o tempo para aquisição dos dados.

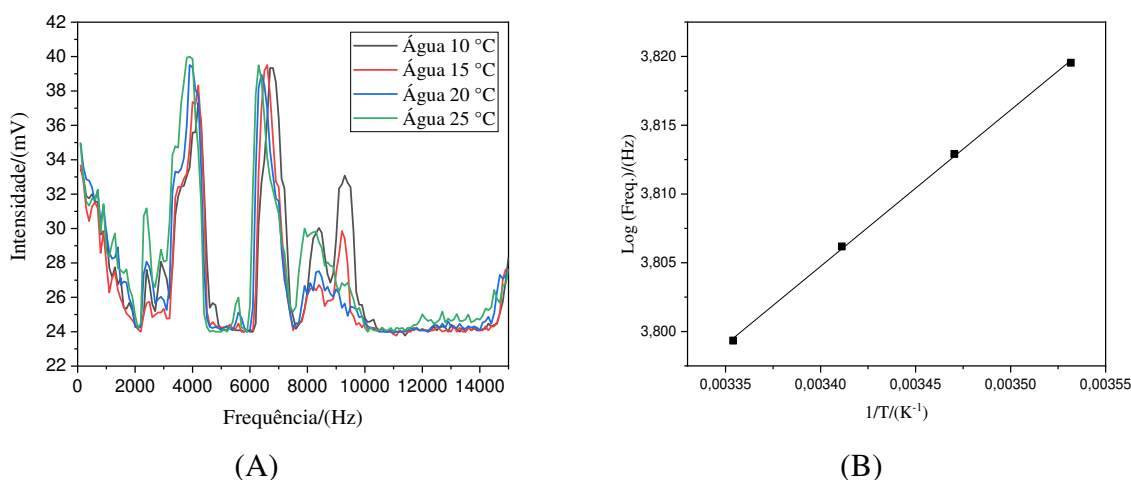
3.1.3 Terceira etapa

3.1.3.1 Efeito da temperatura

Os parâmetros utilizados nestas varreduras estão apresentados na Tabela 1 (página 42).

Na Figura 26 são mostrados as médias dos espectros obtidos para quatro valores de temperaturas distintos.

Figura 26 – (A) Comparação da média dos espectros obtidos para as diferentes temperaturas (10, 15, 20 e 25 °C); (B) Gráfico de Van't Hoff para dependência de propriedades termodinâmicas com a temperatura para a faixa de 6,5 kHz.



Fonte: A autora.

A temperatura influenciou no sinal analítico obtido, tanto na frequência, na região ao redor de 4kHz e de 6,5 kHz enquanto que, em outras regiões, afetou a intensidade do sinal.

Para a faixa de 6,5 kHz observou-se um comportamento linear do logaritmo da frequência de pico com a recíproca da temperatura absoluta (Figura 26B), associado ao gráfico de Van't Hoff para dependência de propriedades termodinâmicas com a temperatura. Esse comportamento sugere alterações nas propriedades do solvente, tal como densidade ou a viscosidade. A intensidade, associada à atenuação, por sua dependência com essas propriedades também foram alteradas nas faixas.

Confirmou-se que a variação da temperatura influenciava no sinal analítico obtido, talvez devido à alteração na densidade e viscosidade e por consequência na velocidade de propagação das ondas acústicas e no coeficiente de atenuação. Logo, o controle de temperatura se tornou essencial para evitar problemas com a repetibilidade.

3.1.4 Quarta etapa

Com os resultados obtidos, uma nova célula de som com todas as adequações necessárias foi construída.

A distância de 4,0 mm entre os transdutores foi utilizada nesta célula, devido ao fato já observado anteriormente (segunda etapa) que acima de 15 kHz não houve sinal analítico, visto que não foi usada a faixa acima da mesma devido a gerar apenas ruídos.

A temperatura de 20 °C foi utilizada devido a facilidade de conseguir controlar a mesma apenas utilizando o controle de temperatura do laboratório através do uso de um ar-condicionado. Para todas as soluções, antes e após as varreduras, a temperatura foi medida com um termômetro digital, não ultrapassando a variação de $\pm 0,5$ °C, valores estes adequados, visto que não causaram deslocamento nos espectros.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos durante as etapas do desenvolvimento do espectrômetro de som foi obtido um instrumento adequado e bem estruturado para a obtenção de espectros de intensidade na faixa de frequência de 100 Hz a 15 kHz, associada à faixa de som audível ao ser humano.

Nesta parte do trabalho observou-se as potencialidades do instrumento, sendo possível a realização de análises qualitativas para matrizes líquidas variadas, em que ele conseguiu discriminar adequadamente as diferentes soluções. Além disso, o instrumento apresentou um bom desempenho para realização de análises quantitativas, pelo menos, até o momento, para o teor de analitos em soluções puras.

Com os estudos e resultados obtidos até o momento, um leque de possibilidades de aplicação utilizando o instrumento desenvolvido foi aberto, como a análise de componentes majoritários em matrizes autênticas (não simuladas) líquidas. Além disso, também existe a oportunidade de se obter resultados mais consistentes e adequados, através do uso de alguns pré-tratamentos, por exemplo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWSKI, J. C.; BUIOCHI, F.; SIMON, C.; SILVA, E. C.N.; SIGELMANN, R. A. Ultrasonic Measurement of Density of Liquids. **Journal of the Acoustical Society of America**, v.97, p.354-361, 1995.

ALVARÉZ, J. G. U.; SILVA, C. A. M.; SARAIVA, S. S.; FILETE, A. M. Sistema de medição ultrassônica para a determinação de propriedades físicas e acústicas de líquidos. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**, n. 27, 2019.

ALVES, L. B.; POLETTI, E. C. C.; ARNOLD, F. J. Método de identificação leite cru adulterado via ultrassom e regras fuzzy. **Biomatemática**, v. 25, p. 31-44, 2015.

ATHERTON, H.V.; NEWLANDER, J.A. **Chemistry and testing of dairy products**. 4. ed. Westport: Avi, 1981. p.395.

DION, J. L.; BARWICZ, A. Practical Ultrasonic Spectrometric Measurement of Solution Concentration by a Tracking Technique. **IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control**, v. 37, p.190-195, 1990.

DORABIATO, L. F. **Sistema de ultra-som para caracterização de leite bovino**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

LORIMER, J. P.; MASON, T. J. Sonochemistry. Part 1 – The physical aspects. **Chemical Society Reviews**, v. 16, p. 239-274, 1987.

MATIAS, A. A.; OLIVEIRA, A. F.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. A simple green reduction strategy to substitute cadmium in analytical reduction of nitrate in griess–ilosway method. **Química Nova**, v. 44, n. 2, p. 147-153 , 2021.

McCLEMENTS, D.J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, n.9, p.293-299, 1995.

NAZÁRIO, S. L. S.; BUIOCHI, F.; KITANO, C.; ISEPON, J. S.; ADAMOWSKI, J. C.; HIGUTI, R. T. Caracterização de leite bovino utilizando ultra-som e redes neurais artificiais. **Revista controle & automação**, v. 20, n. 4, p. 627-636, 2009.

O'MALLEY, J. **Análise de circuitos**. 2. ed., Porto Alegre: Bookman, 2014.

PELLEGRINI, L. G.; RICHARDS, N. S. P. S. Quantificação de gordura no leite ovino: estudo comparativo dos resultados obtidos por metodologia oficial e por equipamentos eletrônicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 4, p. 206-215, 2015.

POOVEY, M.J.W.; MASON, T.J. **Ultrasound in food processing**. New York: Blackie Academic Professional, 1998. 282p.

PRIEV, ABA; PONOMAREV, VIKTOR; SARVAZYAN, ARMEN. **Method and Apparatus for Determining the Composition of Fluids**. United States Patent US, 6.920.399, 2005.

SUSLICK, K. S. The Chemical Effects of Ultrasound. **Scientific American**, v. 2, p. 80-86, 1989.

CAPÍTULO 3

APLICAÇÕES DO ESPECTRÔMETRO DE SOM

RESUMO

Ao se desenvolver um novo instrumento analítico, uma das formas de comprovar que o mesmo funciona adequadamente para realizar o tipo de análise ao qual foi proposto é através de sua aplicação, em que ele deve ser utilizado na análise de algumas matrizes. Nesta etapa do trabalho, foram apresentadas algumas aplicações do espectrômetro de som, em que se utilizou um osciloscópio para as análises com o intuito de simplificar o aparato experimental e para evitar o tempo de desenvolvimento do sistema eletrônico de coleta de dados, além de tornar possível a obtenção de um sinal mais puro e informações sobre o sinal analítico gerado. A célula de som foi mantida rígida, o volume utilizado foi fixo, além da temperatura ter sido monitorada e controlada. Foram obtidos os espectros para soluções puras de sacarose e etanol e para a mistura destes analitos, em que para as soluções puras foram obtidas as frequências utilizadas para quantificação, sendo aquelas de 5,5 e 8,1 kHz para as soluções de sacarose e as de 8,7 e 10,9 kHz para as soluções de etanol. Através da PCA para as soluções puras de sacarose e etanol e a mistura dos analitos notou-se a necessidade de se usar uma nova estratégia para quantificação dos componentes em misturas, em que esta foi a PLS. Foram analisadas amostras de variados tipos de vinhos, sendo seus teores alcoólicos obtidos através de um modelo de previsão gerados a partir da PLS. E por último foram analisadas soluções puras de sacarose, etanol e ácido acético e a mistura de seus analitos, confirmando-se que a PLS poderia ser usada tanto para a análise do teor de analitos em soluções puras quanto para análise de analitos em uma mistura. A aplicação de pré-tratamentos mostrou-se apropriada quando a resposta obtida a partir dos dados originais não foi adequada. Os resultados obtidos nesta parte do trabalho mostraram que o instrumento desenvolvido foi apropriado e eficaz para análises qualitativas e quantitativas de componentes majoritários em matrizes líquidas.

1 INTRODUÇÃO

Uma forma de medir qualquer grandeza física é através do uso de um osciloscópio conectado adequadamente a um transdutor. Este dispositivo pode gerar um sinal elétrico a partir do estímulo de outros tipos de grandezas, como o som, a luz ou calor. Ele permite visualizar graficamente o comportamento de sinais elétricos em função do tempo (ALVES, 1998).

Apesar de os osciloscópios digitais permitirem a análise de sinais transitórios, que são aqueles que só acontecem uma vez, como os pulsos, eles são mais adequados para medir sinais periódicos, como as ondas (senoidais, quadradas, triangulares, etc.) (ALVES, 1998).

Já para tentar minimizar ruídos, alguns pré-processamentos e pré-tratamentos tornam-se interessantes antes de se tratar e analisar dados, buscando-se extrair toda informação importante destes.

Os pré-processamentos são aplicados às variáveis para tornar as matrizes mais adequadas para os tratamentos de dados, sendo aplicado individualmente a cada variável e concomitantemente sobre todas as amostras (SOUZA, 2010).

Dentre estes pré-processamentos, podem ser citados a centralização na média, que consiste em calcular o valor médio para cada variável (coluna) e subtrair o valor obtido de cada elemento da variável. O auto escalonamento, que é baseado tanto na centralização na média como no escalonamento da variância, que consiste em cada elemento de uma coluna ser dividido pelo desvio padrão da coluna (SOUZA, 2010). E também a correção multiplicativa de sinal (MSC) que é utilizada para corrigir efeitos de espalhamento de luz (FERREIRA, 2015).

Os pré-tratamentos, que são aplicados aos dados das amostras, são utilizados para eliminar ou diminuir ruídos que não trazem nenhuma informação química, o que aumenta a relação sinal/ruído.

Entre estes pré-tratamentos, pode-se citar alguns alisamentos, como o método de Savitzky-Golay, em que a partir de um polinômio de ordem baixa e da seleção de um número de pontos, um novo valor é obtido para substituir o ponto do meio, sendo o procedimento realizado repetidas vezes até que todos os pontos sejam suavizados. A medida que o número de pontos selecionados é aumentado, o ruído é cada vez menor, logo um número muito grande de pontos pode também eliminar o sinal analítico obtido (BEEBE *et al.*, 1997). A Transformada Rápida de Fourier, do inglês *Fast Fourier Transform* (FFT) é uma ferramenta que realiza a mudança entre as variáveis tempo e frequência de sinais (GONÇALVES, 2004). Basicamente consiste em a partir de uma quantidade h como função do tempo $h(t)$, determinar sua correspondente quantidade H como função da frequência $H(f)$ (CONSTANTINO; SILVA,

2000). A Transformada Wavelet é muito utilizada para separação do ruído do sinal desejado (MISITI *et al.*, 2007). Ela se fundamenta em aproximar uma função por uma combinação linear de funções básicas, de forma a se obter uma representação da função original no domínio das frequências e no domínio temporal (SANTOS, 2007).

Entretanto, quando se utilizam técnicas instrumentais em que é gerada uma grande quantidade de sinais, como curvas e picos, a resposta obtida não é resultado. Assim, é necessário fazer a conversão da resposta instrumental no dado químico de interesse, através de técnicas de estatística multivariada, por exemplo. Uma técnica de análise de dados multivariados que pode ser utilizada é a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS – *Partial Least Squares*).

Desta forma, para averiguar o funcionamento de um instrumento que está sendo desenvolvido, é interessante a análise de alguma amostra autêntica, ou seja, aquelas não simuladas, como por exemplo, o vinho, que é uma bebida obtida da fermentação alcoólica da uva madura e fresca ou suco de uva fresco, sendo formado por elementos constituintes da uva e aqueles obtidos da fermentação alcoólica do seu sumo. Dentre estes, o álcool tem um efeito de concentrar a viscosidade e o corpo do líquido. Além disso, quando seu teor está acima de 13% (v/v) pode ser responsável pela doçura do vinho, apesar de não conter açúcares residuais. Tem também um papel essencial na conservação dos vinhos já que dificulta ou impede o desenvolvimento bacteriano, o que torna importante sua quantificação (MAZZOCHI; IDE, 1994).

Nesta parte do trabalho foram apresentados os resultados utilizando um osciloscópio com o intuito de simplificar o aparato experimental, evitar o tempo de desenvolvimento do sistema eletrônico de coleta de dados e obter mais informações sobre o sinal analítico gerado, além de iniciar os estudos com amostras autênticas, sendo neste caso, variados tipos de vinhos. Foi utilizada uma célula de som, mantida rígida, um volume fixo de amostra, em que este foi reduzido, além de ter sido feito o monitoramento e controle da temperatura.

Foram apresentados os resultados para as células de som obtidas na segunda e quarta etapas do desenvolvimento do espectrômetro de som.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes, condições das células de som e tratamento dos dados

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico e todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água tipo 1 (MiliQ® Reference A+). O etanol utilizado

foi adquirido da LS Chemicals (99,7% (v/v)), o açúcar utilizado para preparar as soluções de sacarose foi da marca Alvinho e o ácido acético foi adquirido da Vetec (99,7 % (v/v)). Foram utilizados vinhos de diferentes marcas, mas dos tipos: tinto (Cabernet, Merlot e mistura de uvas), branco (Riesling), de seco a suave.

Foram obtidos os espectros para a faixa de frequência do sistema do espectrômetro com o osciloscópio com a célula de som, com volume de amostra de 100 mL de solução pura de sacarose e etanol e a mistura destes analitos, além dos diferentes tipos de vinhos. A temperatura foi monitorada durante os ensaios.

Também foram obtidos os espectros para soluções puras de sacarose, etanol e ácido acético e a mistura destes, com a célula de som com volume de amostra igual a 12,5 mL. A temperatura foi controlada através do condicionamento da temperatura do laboratório, com auxílio de um ar-condicionado, em que esta foi medida antes e após cada varredura, através de um termômetro digital.

Entre todas as varreduras foi feita a lavagem do sistema com detergente e água tipo 1.

Após a execução dos ensaios foram efetuados os tratamentos dos dados obtidos. Foram analisados os resultados sem pré-processamentos e também após a centralização na média, auto escalonamento e a correção multiplicativa de sinal (MSC).

Foram realizados alguns tratamentos quimiométricos, como a PCA e também a PLS, obtendo-se gráficos do modelo de previsão, resíduos e probabilidade normal dos resíduos. As PLS's também foram obtidas para os pré-tratamentos método de Savitzky-Golay, FFT e Transformada Wavelet. Estes tratamentos quimiométricos foram realizados pelo *software OriginLab2018*.

2.2 Soluções puras de sacarose e etanol e a mistura dos analitos

Os espectros foram obtidos com a célula de som completamente mergulhada em soluções puras de sacarose (0 a 10% (m/v)) e etanol (0 a 50% (v/v))

Também foram obtidos os espectros para diferentes proporções da mistura de sacarose e etanol, como mostradas na Tabela 3. As condições experimentais foram definidas com auxílio de um planejamento de multivariáveis baseado na Matriz de *Doehlert*, para duas variáveis, que foram os teores % (m/v) de sacarose e % (v/v) de etanol.

Mistura – sacarose/etanol	
% Sacarose (m/v)	% Etanol (v/v)
2	20
2	40
4	10
4	30
6	20
6	40

Tabela 3 – Proporções de sacarose/etanol para a mistura obtidas a partir da Matriz de *Doehlert*.

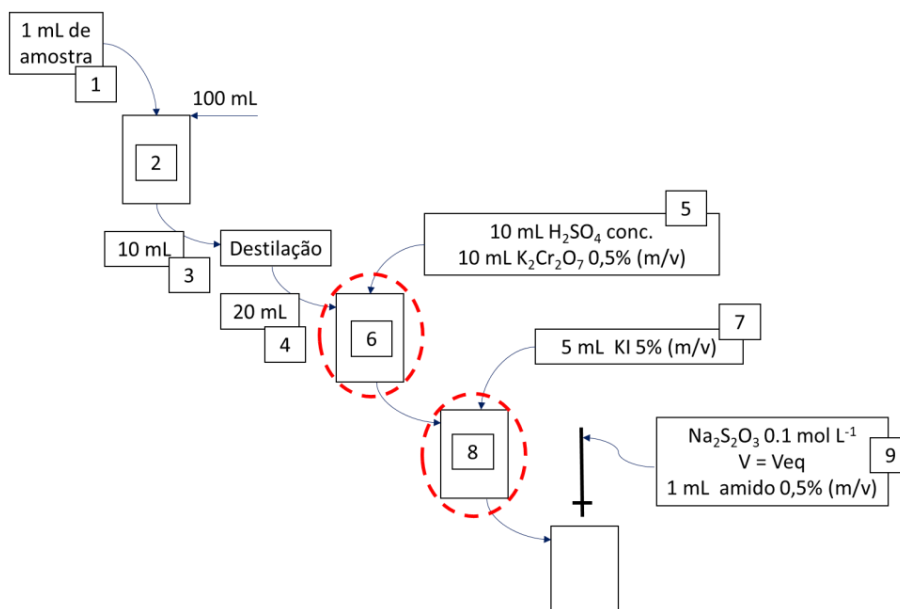
Para conseguir o total recobrimento da célula foi utilizado um volume de 100 mL de solução e a temperatura foi mantida a aproximadamente 20 °C.

2.3 Diferentes tipos de vinhos

Foram obtidos os espectros para os diferentes tipos de vinhos com a célula de som completamente mergulhada em 100 mL de solução. Os teores alcoólicos dos vinhos foram obtidos através de um modelo de previsão a partir de uma PLS. As varreduras de cada amostra foram realizadas com a temperatura sendo monitorada e mantida em torno de 20 °C.

Conjuntamente com estas análises, também foi medido o teor alcoólico, através de uma destilação seguida de uma titulação redox com dicromato de potássio. Para a destilação foi utilizado destilador de nitrogênio (Marconi, modelo MA-036). O cálculo do teor alcoólico (APÊNCIDE B) foi feito através do processo de diluição utilizando o diagrama esquemático apresentado na Figura 27.

Figura 27 - Diagrama esquemático para medir o teor alcoólico em vinhos utilizando a destilação e a titulação redox com dicromato. H_2SO_4 – ácido sulfúrico; $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ – dicromato de potássio; KI – iodeto de potássio; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ – tiosulfato de sódio.



Fonte: A autora.

Na Figura 27, a numeração apresentada representa cada etapa realizada durante todo o processo de diluição. As setas representam o que foi adicionado ou transferido para um recipiente, sendo referente a mudança de etapa. Quando a seta é representada na lateral de um recipiente (100 mL, etapa 2), indica que o volume foi completado. Quando ocorre uma transferência quantitativa da solução de um recipiente para outro, esta é representada por um círculo pontilhado, indicando que todo conteúdo foi transferido (etapas 6 e 8).

2.4 Soluções puras de sacarose, etanol e ácido acético e a mistura dos analitos

Foram obtidos os espectros com a célula de som completamente mergulhada 12,5 mL das soluções.

O controle de temperatura foi feito pelo condicionamento da temperatura do laboratório, com auxílio de ar-condicionado, em que as temperaturas das soluções foram medidas antes e após cada varredura, através de um termômetro digital, de forma que estas ficavam em aproximadamente $20 \pm 0,5$ °C. Como o volume de amostra foi reduzido nesta célula, tornou-se mais fácil manter a mesma temperatura durante as varreduras.

Foram analisadas soluções puras de sacarose (0 a 10 %(m/v)), etanol (0 a 50 %(v/v)) e ácido acético (0 a 1,0 %(v/v)).

Também foram analisadas soluções da mistura dos analitos citados acima em diferentes proporções, em que estas foram definidas através de um planejamento experimental para misturas (Tabela 4).

Misturas	Analitos		
	Sacarose %(m/v)	Etanol %(v/v)	Ácido acético %(v/v)
M0	0	0	0
M1	50	2	0,2
M2	10	2	1
M3	25	2	0,5
M4	33	2	03
M5	17	2	0,7
M6	17	3	0,3
M7	33	3	0,2
M8	10	3	0,7
M9	25	5	0,2
M10	10	5	0,5
M11	17	7	0,2
M12	10	7	0,3
M13	10	10	0,2

Tabela 4 – Proporções de sacarose, etanol e ácido acético para a mistura obtida a partir de um planejamento experimental para misturas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Soluções puras de sacarose e etanol e a mistura dos analitos

A fim de averiguar como a concentração de um analito influencia na medida da concentração de um segundo analito em uma solução em que ambos estão presentes, para que posteriormente componentes majoritários em amostras autênticas pudessem ser analisados, selecionou-se os analitos sacarose e etanol para realizar os próximos estudos. Estes foram

selecionados devido a representarem alguns dos componentes majoritários presentes em bebidas alcoólicas, como os vinhos, em que o teor alcoólico dos mesmos seria analisado em uma próxima etapa do trabalho.

Contudo, antes de fazer o estudo de uma mistura de sacarose e etanol, tornou-se interessante a análise de soluções puras destes.

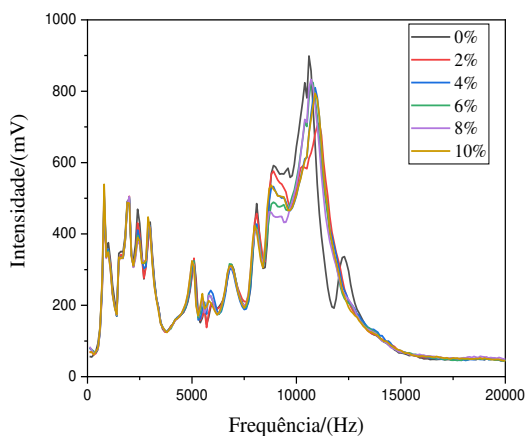
Os parâmetros utilizados estão apresentados na Tabela 5.

Parâmetros	Valores
Frequência mínima	100 Hz
Frequência máxima	20 kHz
“Degrau” de frequência	100 Hz
Intervalo em cada frequência	10 s
Número de pontos	100
Número de varreduras	1

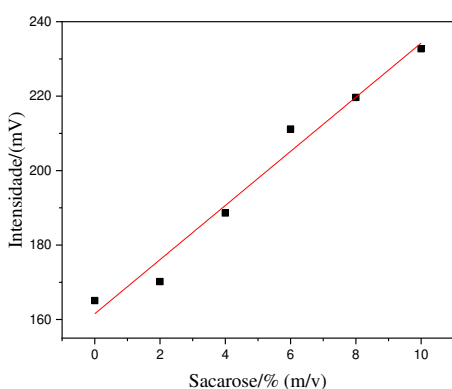
Tabela 5 - Parâmetros para varredura em toda faixa de frequência do sonora do sistema.

Na Figura 28A são mostrados os espectros obtidos para as soluções puras de sacarose. É possível observar a variação nos espectros apenas em duas regiões, ao redor de 5 kHz e ao redor de 10 kHz. As melhores curvas analíticas foram obtidas para as frequências em 5,5 kHz e 8,1 kHz, que apresentaram comportamento linear e quadrático, respectivamente. (Figura 28B e 28C).

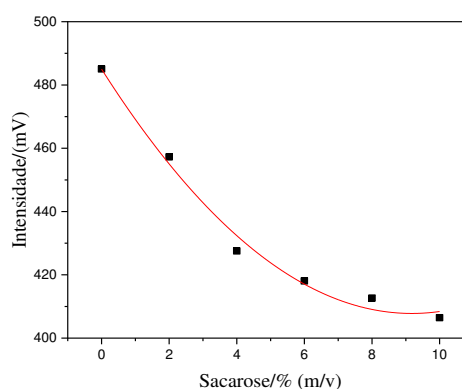
Figura 28 - (A) Espectros obtidos para as diferentes soluções puras de sacarose % (m/v). (B) Curva analítica obtida para a frequência de 5,5 kHz. (C) Curva analítica obtida para a frequência de 8,1 kHz.



(A)



(B)



(C)

Fonte: A autora.

A equação da reta obtida para a curva analítica apresentada na Figura 28B está apresentada na Equação 19:

$$I = 7,27 \pm 0,57. \%(sac) + 161,54 \pm 3,43 \quad (19)$$

O coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) foi igual a 0,9764, enquanto o desvio padrão dos resíduos, igual a 4,73 mV. A resolução analítica foi igual a 1,95% (m/v).

A equação da reta obtida para a curva analítica apresentada na Figura 28C está apresentada na Equação 20:

$$I = 0,92 \pm 0,16. \%(sac)^2 - 16,83 \pm 1,67. \%(sac) + 485,03 \pm 3,55 \quad (20)$$

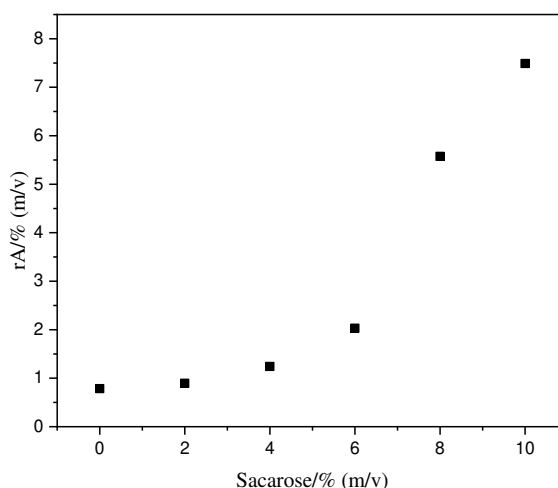
O coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) foi igual a 0,9835, enquanto o desvio padrão dos resíduos, igual a 3,92. A resolução analítica foi igual a 7,50% (m/v), o que é um valor alto, considerando-se a faixa analítica até 10%(m/v).

A resolução analítica para o um modelo quadrático é apresentada na Equação 21:

$$rA = \frac{3s_{res}}{s} = \frac{3s_{res}}{2Qc+I} \quad (21)$$

O comportamento da resolução analítica em função da concentração é apresentado na Figura 29. Ainda que tenha sido obtido um coeficiente de determinação acima de 0,9, pode-se observar que, acima de 6%(m/v) de sacarose, a resolução se torna maior que 1,95 %(m/v). Como a rA representa a menor diferença de concentração que pode ser determinada e a concentração das soluções de sacarose variaram de 0 a 10 %(m/v), a faixa analítica foi mais estreita que aquela para o modelo linear, sendo a mesma adequada até a concentração de sacarose de 6 %(m/v).

Figura 29 – Comportamento da rA em função da concentração de sacarose para a frequência de 8,1 kHz.

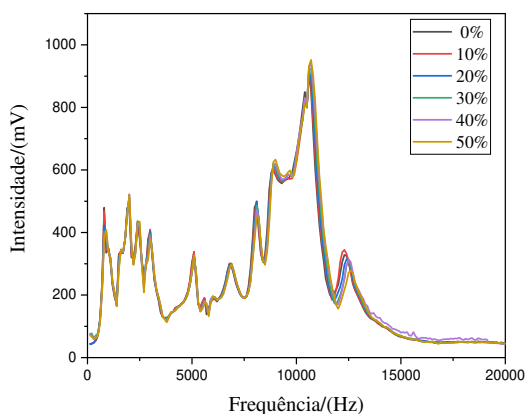


Fonte: A autora

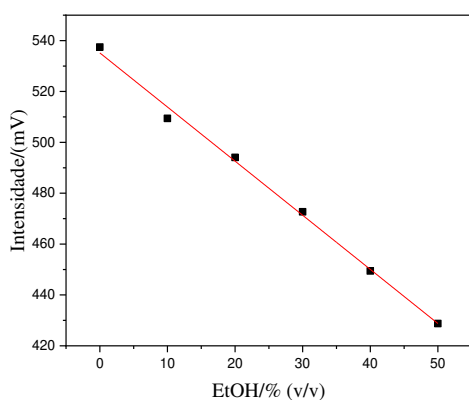
Na Figura 30A são mostrados os espectros obtidos para as soluções puras de etanol. É possível observar a variação nos espectros apenas em duas regiões, ao redor de 8 kHz e ao redor

de 11 kHz. Na Figura 30B e 30C são apresentadas as curvas analíticas para as frequências em que o modelo linear, 8,7e 10,9 kHz, melhor se ajustou aos dados.

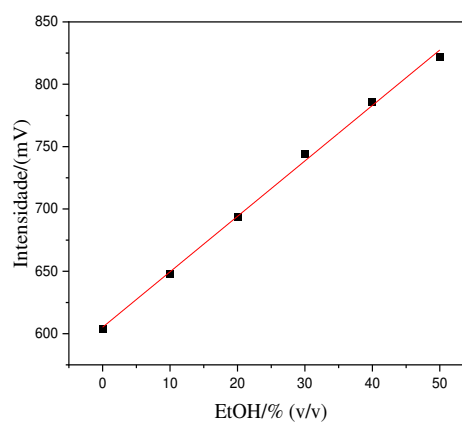
Figura 30 - (A) Espectros obtidos para as diferentes soluções de etanol %(v/v). (B) Curva analítica obtida para a frequência de 8,7 kHz. (C) Curva analítica obtida para a frequência de 10,9 kHz.



(A)



(B)



(C)

Fonte: A autora.

A equação da reta obtida para a curva analítica apresentada na Figura 30B está apresentada na Equação 22:

$$I = -2,13 \pm 0,07. \%(EtOH) + 535,17 \pm 1,97 \quad (22)$$

O coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) foi igual a 0,9953, enquanto o desvio padrão dos resíduos, igual a 2,72. A resolução analítica foi igual a 3,84% (v/v).

A equação da reta obtida para a curva analítica apresentada na Figura 30C está apresentada na Equação 23:

$$I = 4,45 \pm 0,10\%(EtOH) + 605,15 \pm 3,03 \quad (23)$$

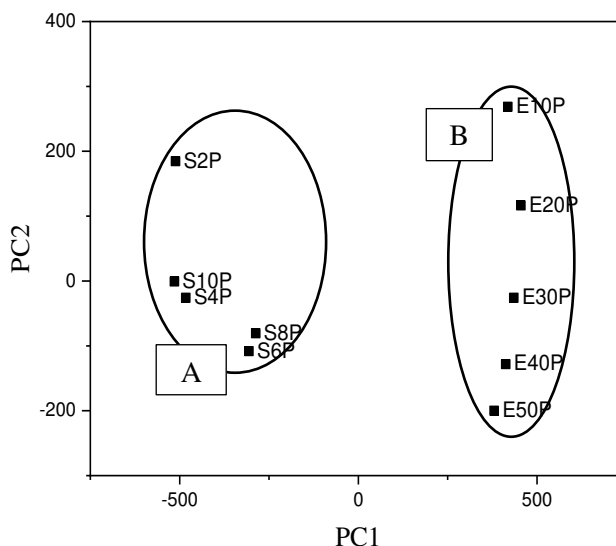
O coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) foi igual a 0,9975, enquanto o desvio padrão dos resíduos, igual a 4,18. A resolução analítica foi igual a 2,81% (v/v).

A resolução analítica para curva analítica representada pela Figura 30C, mostrou-se mais adequada, além de um melhor ajuste do modelo aos dados.

Alguns pré-processamentos foram aplicados aos dados obtidos para os dois analitos, como centralização na média, o auto escalonamento e a correção multiplicativa de sinal (MSC), com o intuito de melhorar o sinal analítico obtido. Logo, não houve uma melhora e por isso estes não foram apresentados.

Desta forma, foram obtidas as frequências em que seria possível medir o teor de sacarose e etanol em soluções puras dos mesmos. Também foi obtida a PCA para os dados referentes as duas soluções (Figura 31), observando-se uma clara discriminação entre ambas.

Figura 31 - PCA para os dados originais obtidos para soluções puras de sacarose (A) e etanol (B).



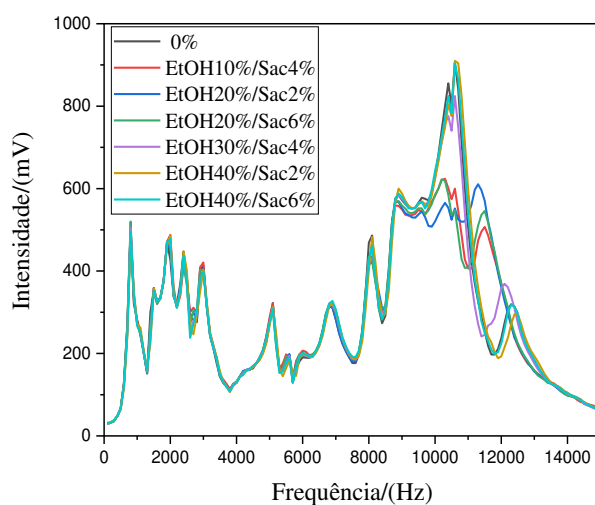
Fonte: A autora.

De acordo com a PCA acima, pelo eixo da PC1 foi possível observar uma discriminação entre as soluções de sacarose e etanol. Pelo eixo da PC2 observou-se para as soluções de etanol uma distinção de acordo com os teores, visto que esta distinção seguiu uma ordem crescente de

teores considerando da parte superior para inferior da PCA, apresentando uma tendência linear. Os dados obtidos para as soluções de sacarose apresentaram uma tendência quadrática.

Em um segundo momento foram obtidos os espectros para misturas dos analitos (sacarose/etanol), com o objetivo de avaliar o comportamento destes juntos. Na Figura 32 é mostrado os espectros obtidos para as soluções da mistura sacarose/etanol.

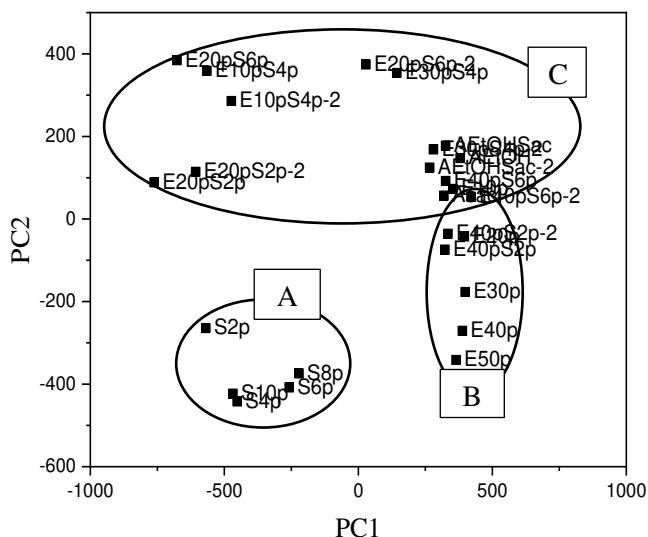
Figura 32 - Espectros obtidos para soluções da mistura sacarose %(m/v)/etanol %(v/v) para os dados originais.



Fonte: A autora.

Para analisar o comportamento das soluções puras dos analitos e destes em uma mistura foi obtida a PCA para os dados, como mostrado na Figura 33.

Figura 33 - PCA para os dados obtidos para soluções puras de sacarose (A) e etanol (B) e da mistura sacarose/etanol (C).

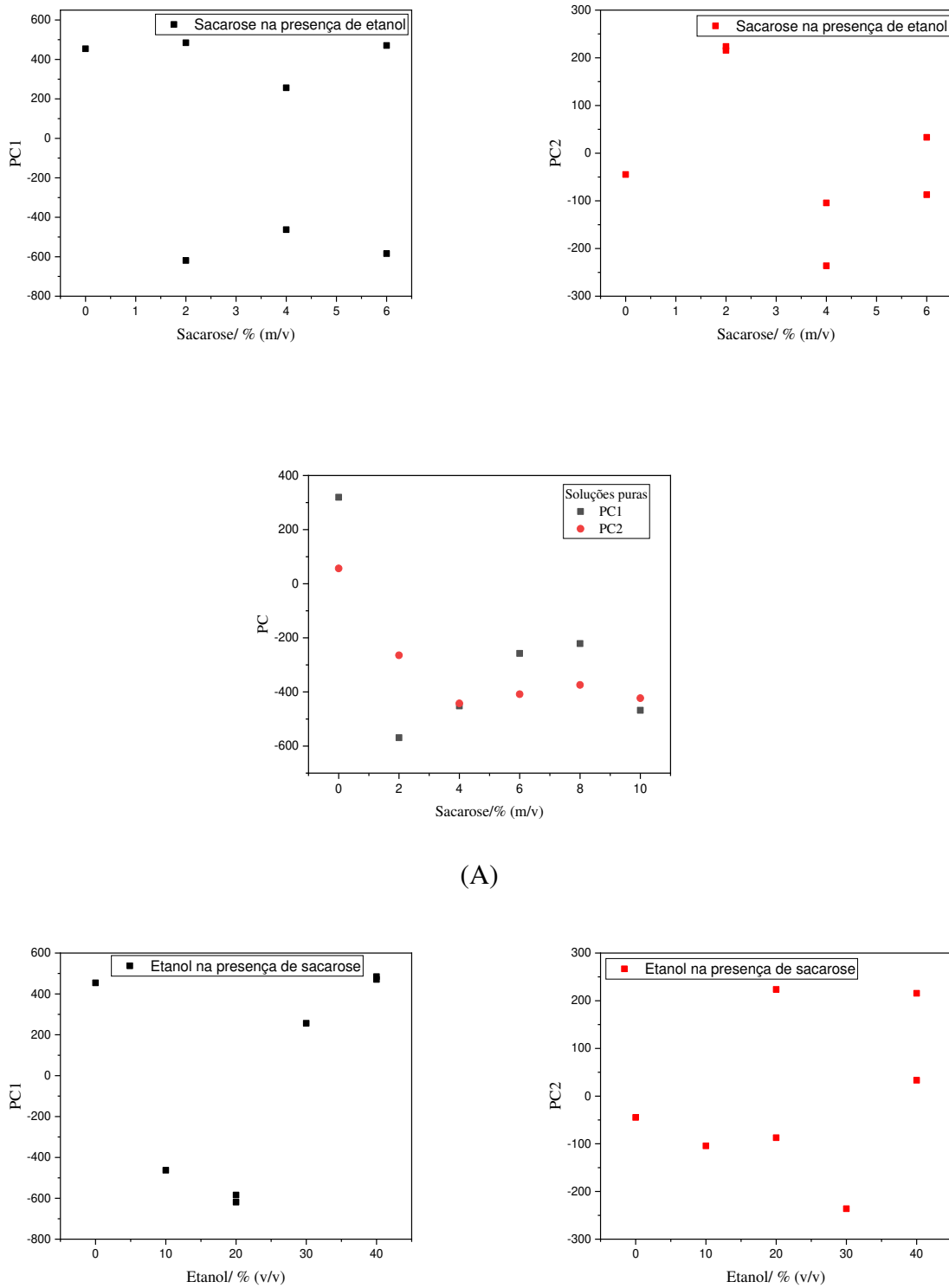


Fonte: A autora.

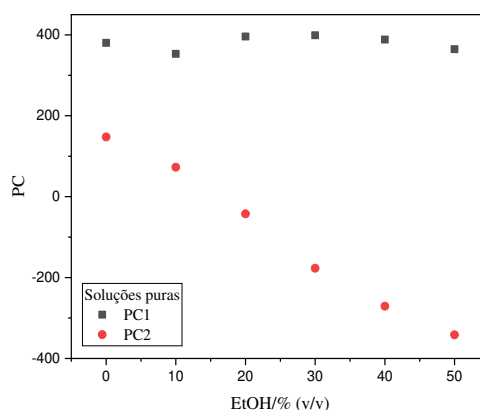
De acordo com a PCA acima, pelo eixo da PC1 foi possível observar uma discriminação entre as soluções puras de sacarose e etanol. Pelo eixo da PC2 observou-se para as soluções da mistura uma discriminação em relação as soluções puras dos analitos (sacarose e etanol). Portanto, o instrumento mais uma vez mostrou-se adequado na distinção entre diferentes soluções. Porém, constatou-se que analitos em uma mistura apresentaram um comportamento diferente de quando estão em uma solução pura.

Teores variados de um analito na presença do outro com um teor fixo alteram as medidas obtidas. Fica claro observar a diferença nas medidas para os teores de sacarose (2, 4 e 6 % (m/v)), nos gráficos para PC1 e PC2 de sacarose na presença de etanol. Logo, o comportamento foi diferente para as soluções puras de sacarose (Figura 34A). O mesmo pode ser observado para os teores de etanol (20 e 40 % (v/v)) na presença de sacarose e para as soluções puras de etanol (Figura 34B).

Figura 34 – PC x teor para os analitos em uma mistura e em soluções puras: (A) sacarose; (B) etanol.



(A)



(B)

Fonte: A autora

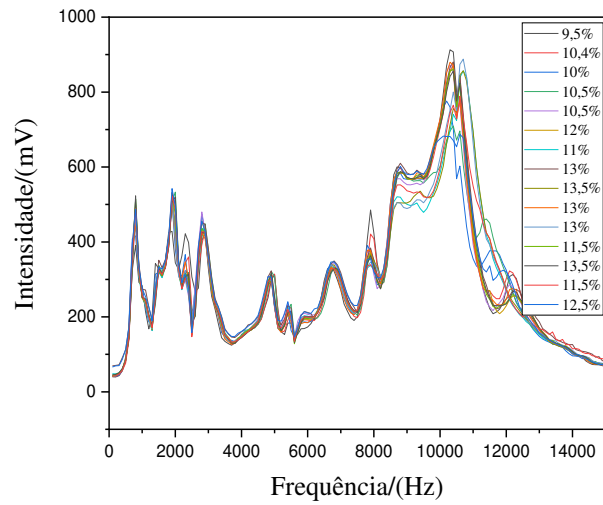
Os analitos em uma mistura apresentaram um comportamento diferente de quando estão em soluções puras, talvez por afetarem a mesma frequência (de maneira aditiva) ou por sinergismo, ou seja, a presença de um dos analitos afeta a sensibilidade analítica em uma frequência do outro analito. Esses efeitos inviabilizam o uso da estratégia de seleção de frequência para a quantificação, sendo necessários modelos tais como regressão múltipla ou PLS. Foi escolhida a análise por PLS devido à sua capacidade de identificar e quantificar os dois fenômenos citados automaticamente.

Após averiguar que para analisar quantitativamente algum componente em uma mistura de vários analitos seria necessária uma nova estratégia e esta ser definida, na próxima etapa do trabalho foram analisados os teores alcoólicos em diferentes tipos de vinhos.

3.2 Diferentes tipos de vinhos

Na Figura 35 são apresentados os espectros para os tipos de vinhos. Os parâmetros utilizados nestas varreduras foram os mesmos apresentados na Tabela 5 (página 65).

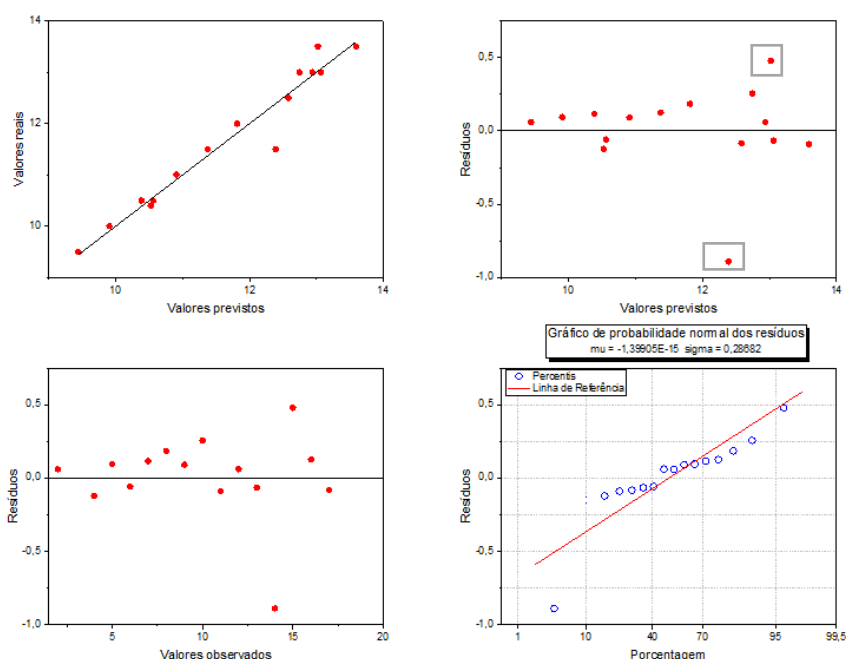
Figura 35 - Espectros para todos os tipos de vinhos analisados – teor de etanol: %*(v/v)*.



Fonte: A autora.

Também foi medido o teor alcoólico, através de uma destilação seguida de uma titulação redox com dicromato, com o intuito de comparar com os resultados obtidos utilizando o espectrômetro de som. Para obter o teor alcoólico utilizando o espectrômetro de som, foi obtido o modelo de previsão a partir da PLS, como mostrado na Figura 36. Para esta PLS foi utilizada uma validação cruzada.

Figura 36 - Gráficos dos modelos de previsão, resíduos e probabilidade normal dos resíduos para todos os tipos de vinhos.



Fonte: A autora.

De acordo com a Figura 36, observou-se a presença de *outliers*. Para um melhor ajuste do modelo aos dados, foram retirados os *outliers* e aplicados pré-tratamentos como método de Savitzky-Golay, FFT e Transformada Wavelet, antes de se obter a PLS, sendo este último o que apresentou valores mais baixos para os resíduos (Figura 37).

A escolha do pré-tratamento mais adequado foi feita de acordo com os valores obtidos para os resíduos, em que quanto menor foram estes valores, melhor o modelo previsto se ajustava aos dados, como mostrado na Tabela 6.

	Resíduo máximo	Resíduo mínimo
Dados originais	0,478	-0,890
Sem <i>outliers</i>	0,014	-0,012
Savitzky-Golay (5 pontos)	0,025	-0,033
Savitzky-Golay (10 pontos)	0,069	-0,096
FFT (3 pontos)	0,072	-0,091
FFT (5 pontos)	0,386	-0,574

Wavelet (50 % <i>cutoff</i>)	0,011	-0,005
-------------------------------	-------	--------

Tabela 6 – Resíduos obtidos para os modelos de previsão para os dados originais e após a aplicação dos pré-tratamentos.

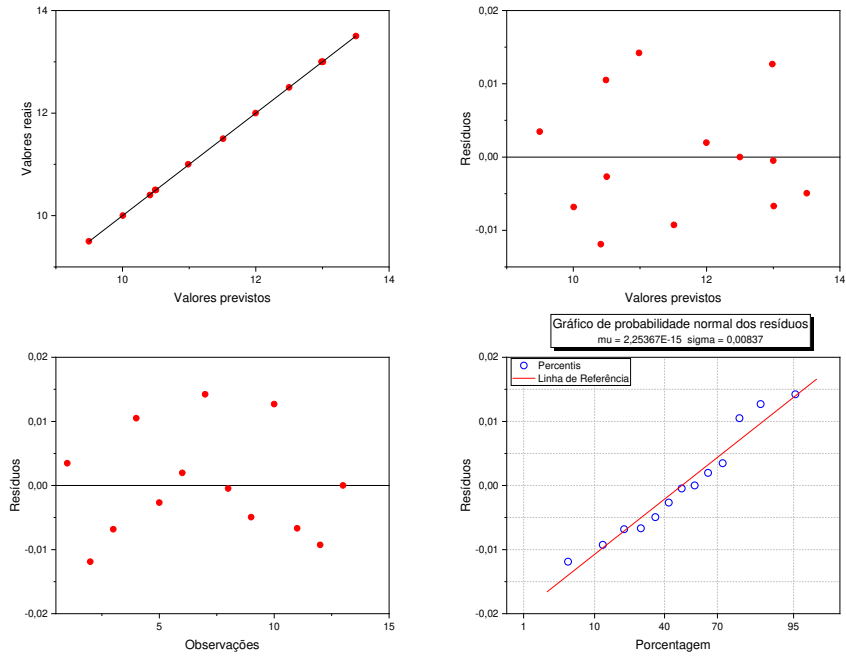
De acordo com a Tabela 6, os dados originais e o modelo de previsão FFT 5 pontos não apresentaram um bom ajuste, como valores para os resíduos mais elevados. Os outros pré-tratamentos foram suficientes para que o modelo se ajustasse bem aos dados. Contudo, dentre eles, aquele que apresentou valores mais baixos para os resíduos foi o pré-tratamento Transformada Wavelet (50% *cutoff*), sendo este utilizado na obtenção do modelo de previsão.

Nas Figuras 37A e B, são mostrados as PLS's sem os *outliers* para os dados originais e para aqueles em que foi aplicado o pré-tratamento Transformada Wavelet.

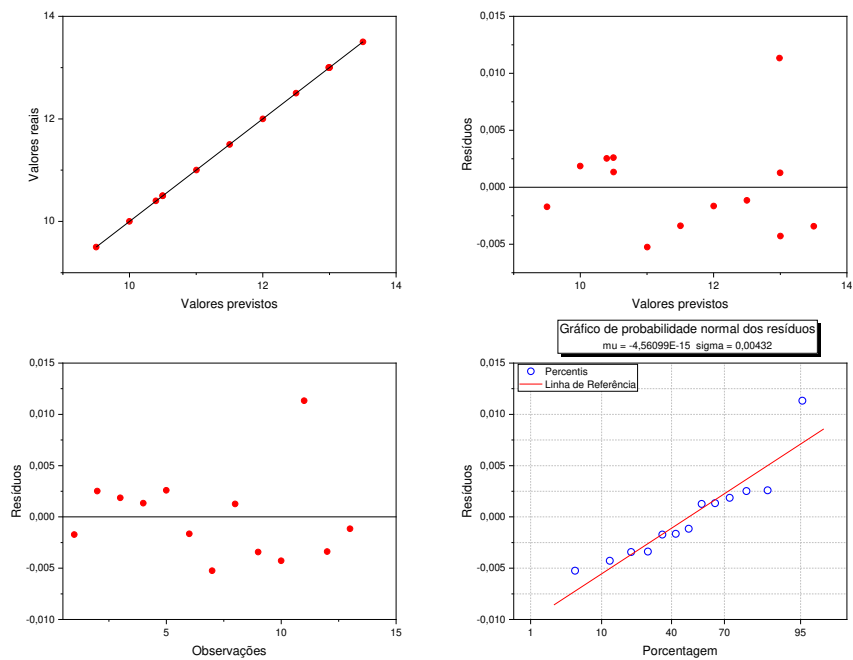
Os gráficos de resíduos mostraram que houve uma distribuição aleatória dos dados obtidos em relação ao modelo. Com a retirada de *outliers*, o modelo previsto se ajustou melhor aos dados, além dos resíduos ficarem menores (Figura 37A). Com a Transformada Wavelet foi possível obter resíduos ainda menores (Figura 37B).

A Transformada Wavelet é utilizada para separação do ruído do sinal desejado (MISITI *et al.*, 2007), sendo isto feito através da seleção de um “*cutoff*”, que varia de 0 a 100%. Quanto maior este valor, menor será o ruído. Portanto, este deve ser escolhido cuidadosamente, para que o alisamento dos espectros não seja exagerado e se perca o sinal reposta. Desta forma, foi utilizado um *cutoff* de 50%.

Figura 37 - Gráficos dos modelos de previsão, resíduos e probabilidade normal dos resíduos para os tipos de vinhos (A) sem *outliers* e (B) Transformada Wavelet sem *outliers*.



(A)



(B)

Fonte: A autora.

O gráfico de probabilidade normal dos resíduos verifica se houve uma distribuição normal da variância, em que os dados devem ficar o mais próximo da linha de referência. Neste caso, houve um bom ajuste para as PLS's sem os *outliers* e após a Transformada Wavelet.

Na Tabela 7 são mostrados os resultados obtidos para os teores alcoólicos as amostras de vinho.

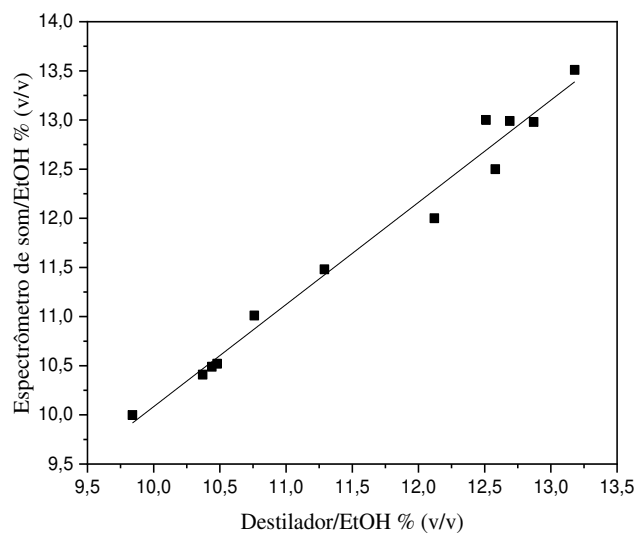
Vinhos*	Destilador %(v/v)	Espectrômetro de som %(v/v); $S_{res} = 0,012$	Erro relativo (%)
Branco suave	9,730 ± 0,001	9,501	2,353
Tinto seco	10,37 ± 0,003	10,41	-0,386
Tinto suave	9,840 ± 0,002	9,998	-1,606
Tinto seco	10,48 ± 0,002	10,52	-0,382
Tinto suave	10,44 ± 0,002	10,49	-0,480
Tinto Merlot	12,12 ± 0,002	12,00	0,991
Branco Riesling	10,76 ± 0,003	11,01	-2,323
Tinto Cabernet Sauvignon	12,69 ± 0,001	12,99	-2,364
Tinto Cabernet Sauvignon	13,18 ± 0,003	13,51	-2,504
Tinto Cabernet Sauvignon e Merlot	12,51 ± 0,002	13,00	-3,917
Tinto Merlot	12,87 ± 0,003	12,98	-0,855
Branco Riesling	11,29 ± 0,002	11,48	-1,682
Tinto Cabernet Sauvignon	12,58 ± 0,002	12,50	0,636

Tabela 7 - Teores alcoólicos para as amostras de vinhos. *Para algumas das amostras de vinhos, o tipo de uva não foi descrito no rótulo.

Os teores obtidos para as amostras de vinho com o espectrômetro de som foram comparados com o método da destilação seguida de uma titulação, em que estes resultados se mostram bem próximos, com um erro relativo muito pequeno, variando de -3,917 a 2,353%.

Na Figura 38 é apresentado o gráfico de correlação entre os resultados obtidos para ambos os métodos. O modelo obtido é apresentado na Equação 24.

Figura 38 - Gráficos de correlação entre os teores alcoólicos para os vinhos obtidos pelo método da destilação seguido de uma titulação redox e pelo espectrômetro de som.



Fonte: A autora

$$\hat{E} = (1,04 \pm 0,05)D - (0,309 \pm 0,531) \quad (24)$$

onde D se refere às concentrações de etanol obtidas pelo método do destilador e \hat{E} , o valor estimado das concentrações de etanol obtidas pelo método do espectrômetro de som.

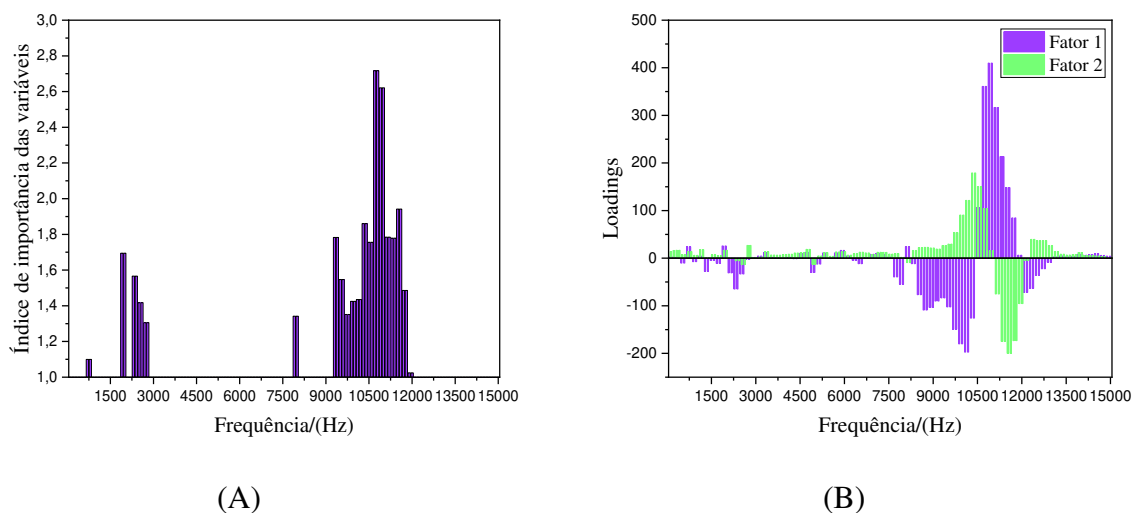
Não foram observadas diferenças aditivas entre os métodos, uma vez que o termo constante da Equação 24, não difere significativamente de zero, a um nível de confiança de 95%. O p-valor foi igual a 0,15, ou seja, há 15% de chance de errar ao admitir a diferença de zero, que é muito maior do que o nível de significância aceitável de 5%.

Também não foi observado erro matricial entre os métodos, uma vez que a inclinação não difere significativamente de 'um', com p-valor igual a 0,22.

Como vantagens do uso do espectrômetro em relação ao método da destilação, além da praticidade na realização das análises, também houve a possibilidade de redução no tempo de análise. Na destilação consome-se certo tempo para destilar o vinho, além de ser dividida em muitas etapas que demandam cuidado, visto que se utilizam reagentes perigosos, como ácido sulfúrico concentrado, sendo o tempo de análise estimado em 40 min. A análise com o espectrômetro foi realizada em torno de 25 min, sem a necessidade de nenhum outro reagente. Além disso, a análise através do espectrômetro de som é não destrutiva.

A partir da PLS também foi possível obter as faixas de frequência que foram mais importantes para alcançar os resultados obtidos. Para isso, foram obtidos gráficos do Índice de variáveis importantes e de *Loadings*, como mostrado na Figura 39.

Figura 39 – Gráfico do Índice de variáveis importantes (A) e gráfico de *Loadings* (B).



Fonte: A autora.

A partir dos gráficos apresentados na Figura 39, a faixa de frequência que mais influenciou para prever os teores de etanol em vinhos foi aquela de aproximadamente 9 até 12 kHz. Para uma pequena faixa entre aproximadamente 1 a 3 kHz também houve influência. O índice de importância das variáveis maior que 1 é considerado razoável para descartar variáveis irrelevantes, o que significa que uma variável selecionada terá uma influência acima da média no modelo explicando o sinal analítico (COCCHI *et al.*, 2018). Os *loadings*, são os pesos que cada variável apresenta, ou seja, quanto cada variável contribui (FERREIRA, 1999). Desta forma, quanto maior o valor absoluto do *loading*, mais importante é aquela faixa de frequência.

Para as soluções puras de etanol, foram encontradas como frequências para sua quantificação aquelas de 8,7 e 10,9 kHz, através do método de seleção de frequências, em que estas estão dentro da faixa encontrada para as medidas do teor alcoólico nas amostras de vinhos através da PLS.

As faixas de frequência que mais influenciaram na obtenção dos modelos de previsão foram importantes do ponto de vista do tempo de análise, visto que a partir delas torna-se possível reduzir a faixa utilizada nas varreduras, o que leva a uma redução do tempo gasto.

3.3 Soluções puras de sacarose, etanol e ácido acético e a mistura dos analitos

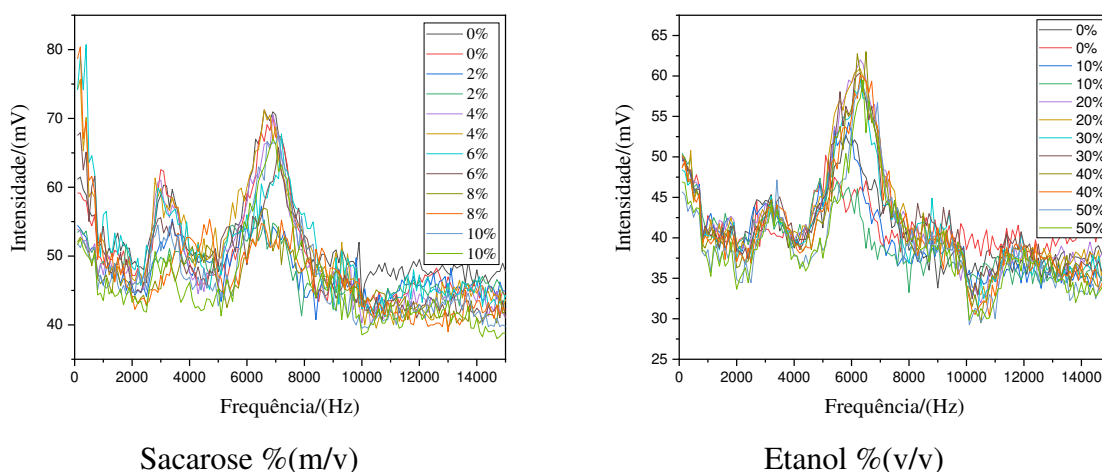
Nesta etapa do trabalho, com o intuito de simular amostras de vinhos, em que anteriormente foi analisado o teor alcoólico, foram utilizados os analitos sacarose, etanol e ácido acético, representando os açúcares, etanol e ácidos orgânicos, respectivamente, que são componentes dos vinhos. Além de analisar quantitativamente o teor dos componentes majoritários simultaneamente em uma mistura, nesta etapa também foi verificada a possibilidade de quantificar analitos com teores variando de mais elevados a mais baixos.

Primeiramente foram analisadas qualitativamente e quantitativamente as soluções puras dos analitos.

Na Figura 40 são apresentados os espectros para as soluções puras de sacarose, etanol e ácido acético, com temperatura de $20 \pm 0,5$ °C para uma célula de som com 4,0 mm de distância entre os transdutores.

Os parâmetros utilizados nestas varreduras estão apresentados na Tabela 5 (página 65).

Figura 40 - Espectros obtidos para as soluções puras de sacarose, etanol e ácido acético a $20 \pm 0,5$ °C.



De acordo com o eixo da PC1 foi possível observar uma clara discriminação entre as soluções dos três analitos (sacarose, etanol e ácido acético).

Também foram obtidas as PLS's com validação cruzada para as soluções puras de sacarose, etanol e ácido acético, a partir dos dados originais e com aplicação dos pré-tratamentos método de Savitzky-Golay, FFT e Transformada Wavelet, em que os valores dos resíduos obtidos são apresentados na Tabela 8.

		Resíduo máximo	Resíduo mínimo
Sacarose 0 a 10 %(m/v)	Dados originais	0,924	-2,090
	Sem água (0%)	0,172	-0,110
	Savitzky-Golay (5 pontos)	0,064	-0,050
	Savitzky-Golay (10 pontos)	0,018	-0,013
	FFT (3 pontos)	0,024	-0,021
	FFT (5 pontos)	0,088	-0,081
	Wavelet (50 % <i>cutoff</i>)	0,053	-0,048
Etanol 0 a 50 %(v/v)	Dados originais	0,016	-0,019
	Savitzky-Golay (5 pontos)	0,114	-0,229
	Savitzky-Golay (10 pontos)	0,001	-0,001
	FFT (3 pontos)	0,014	-0,019
	FFT (5 pontos)	0,016	-0,011
	Wavelet (50 % <i>cutoff</i>)	0,131	-0,241
Ácido acético 0 a 1,0 %(v/v)	Dados originais	0,010	-0,016
	Savitzky-Golay (5 pontos)	0,092	-0,122
	Savitzky-Golay (10 pontos)	0,105	-0,141
	FFT (3 pontos)	0,110	-0,151
	FFT (5 pontos)	0,130	-0,163
	Wavelet (50 % <i>cutoff</i>)	0,088	-0,118

Tabela 8 – Resíduos obtidos para os modelos de previsão para os dados originais e após a aplicação dos pré-tratamentos.

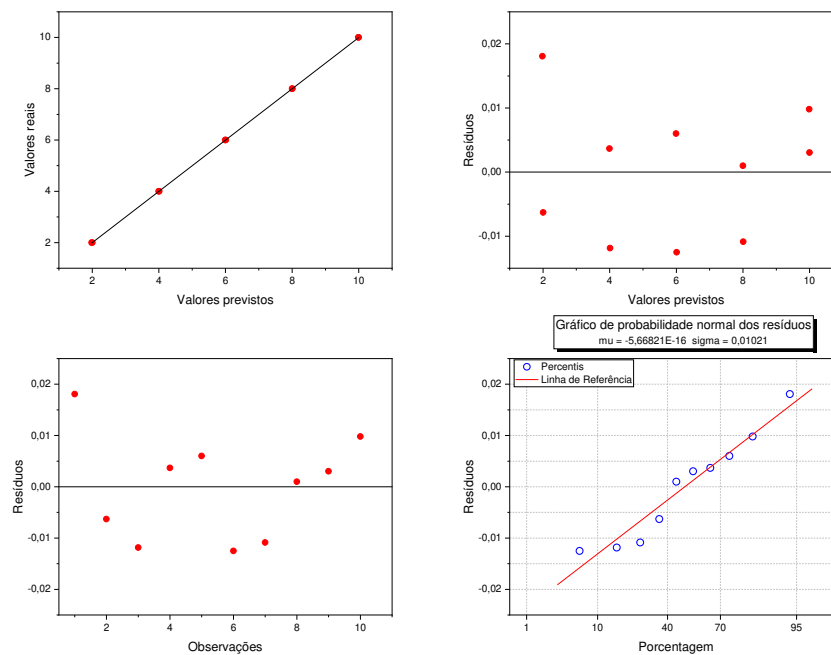
O modelo de previsão que apresentou menores valores para os resíduos para as soluções de sacarose e etanol, foi o pré-tratamento Savitzky-Golay (10 pontos). Já para as soluções de

ácido acético não foi necessário a aplicação de nenhum pré-tratamento para melhorar o ajuste do modelo aos dados.

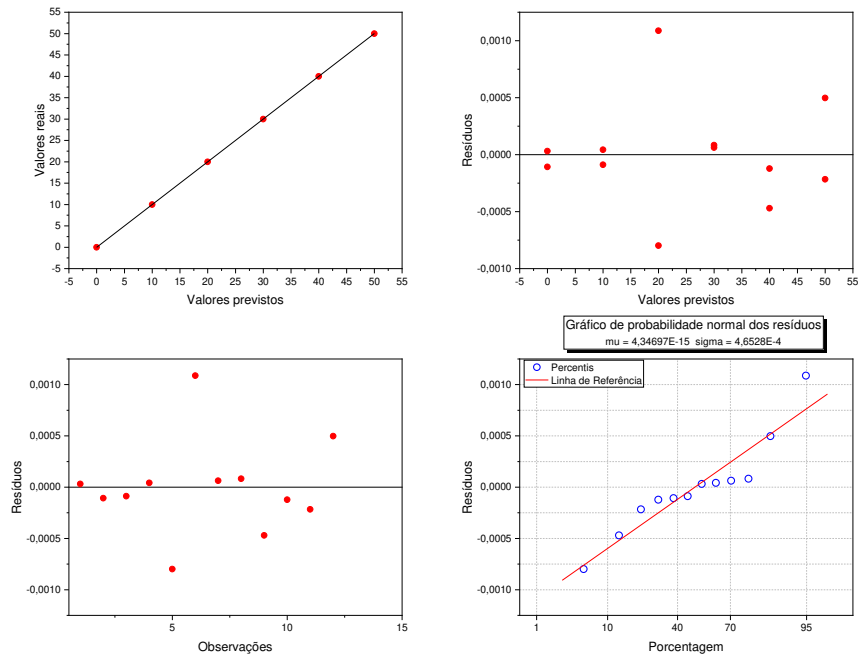
Portanto, observou-se que pré-tratamentos, em alguns casos, melhoram as respostas analíticas, sendo necessário buscar para cada amostra o pré-tratamento mais adequado. Vários pré-tratamentos podem ser suficientes para um mesmo conjunto de dados, de forma que a escolha destes depende do propósito da análise.

Os gráficos do modelo de previsão, resíduos e probabilidade normal dos resíduos a partir da PLS para as três soluções puras são mostrados na Figura 42. Estas PLS's são aquelas que apresentaram um valor mais baixo para os resíduos após aplicação de um dos pré-tratamentos.

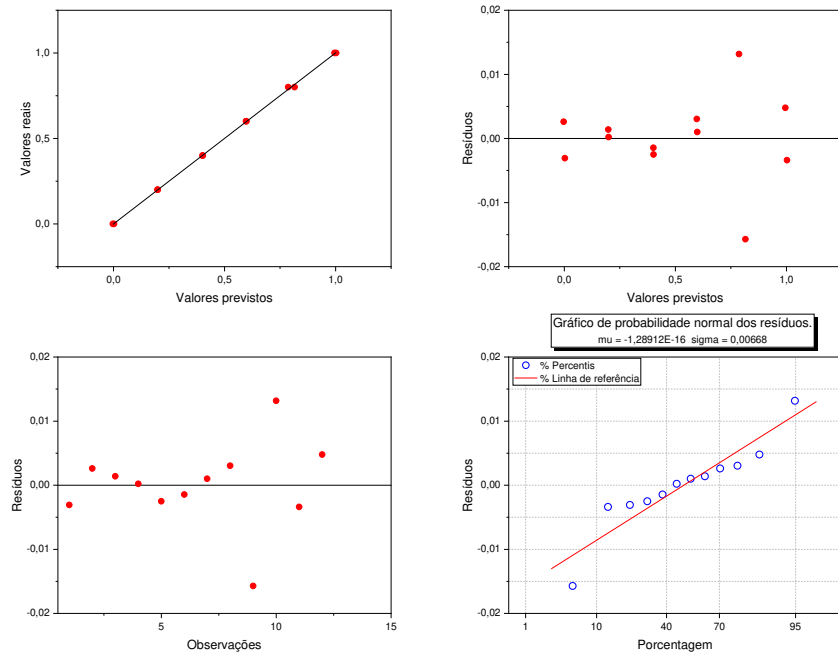
Figura 42- Gráficos do modelo de previsão, resíduos e probabilidade normal dos resíduos obtidos a partir da PLS para as duas varreduras das soluções puras de sacarose % (m/v), etanol % (v/v) e ácido acético % (v/v) a $20 \pm 0,5$ °C.



Sacarose – Savitzky-Golay (10 pontos)



Etanol – Savitzky-Golay (10 pontos)



Ácido acético – sem alisamento

Fonte: A autora.

No método de Savitzky-Golay deve-se selecionar um número de pontos para que estes sejam suavizados e quanto maior o número de pontos selecionados, menor se torna o ruído. Porém, um número muito grande de pontos pode também eliminar o sinal analítico (BEEBE *et al.*,1997). Desta forma, foram utilizados 10 pontos para o alisamento da sacarose e do etanol.

O modelo de previsão ficou bem mais adequado para as soluções de etanol, o que pode ser devido a estas soluções apresentarem teores mais elevados.

A partir dos gráficos de modelo de previsão da Figura 42, foi possível prever os teores dos analitos em estudo, como mostrado na Tabela 9.

	Valores reais	Valores previstos	Erro relativo (%)
Sacarose%(m/v)	2,000	1,982	0,904
	2,000	2,006	-0,315
	4,000	4,012	-0,297
	4,000	3,993	0,165
	6,000	5,994	0,100
	6,000	6,013	-0,208
	8,000	8,011	-0,136
	8,000	7,999	0,012
	10,00	9,997	0,030
	10,00	9,990	0,098
Etanol%(v/v)	0,000	$-3,129 \cdot 10^{-5}$	0,0000
	0,000	$1,075 \cdot 10^{-4}$	0,0000
	10,00	10,00	$-9,000 \cdot 10^{-4}$
	10,00	9,999	$4,000 \cdot 10^{-4}$
	20,00	20,00	$-4,000 \cdot 10^{-4}$
	20,00	19,99	0,005
	30,00	29,99	$2,000 \cdot 10^{-4}$
	30,00	29,99	$2,000 \cdot 10^{-4}$
	40,00	40,00	-0,001
	40,00	40,00	$-3,000 \cdot 10^{-4}$
	50,0	50,00	$-4,000 \cdot 10^{-4}$
	50,0	49,99	0,001
Ácido acético%(v/v)	0,000	0,003	0,000

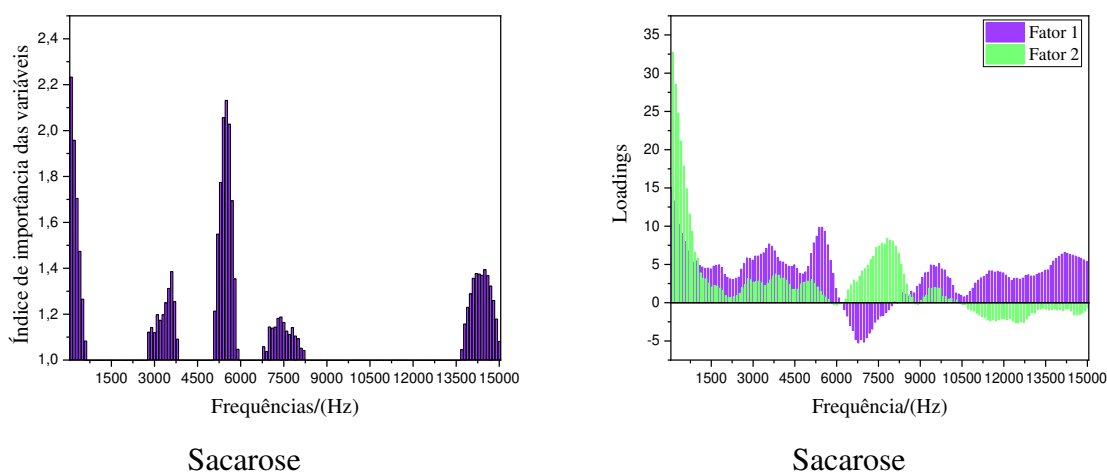
0,000	0,003	0,000
0,200	0,199	0,685
0,200	0,199	0,105
0,400	0,403	-0,628
0,400	0,401	-0,365
0,600	0,599	0,167
0,600	0,597	0,503
0,800	0,816	-1,964
0,800	0,787	1,645
1,000	1,003	-0,340
1,000	0,995	0,479

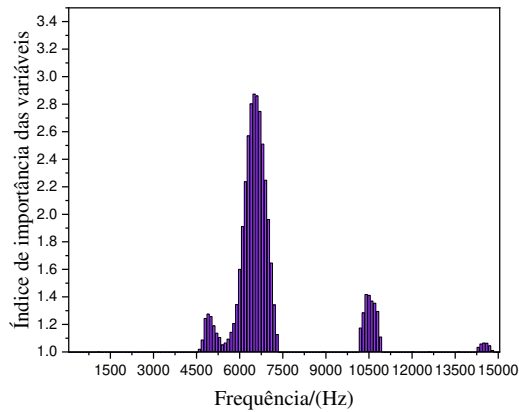
Tabela 9 – Teores previstos a partir da PLS para as soluções de sacarose, etanol (Savitzky-Golay) e ácido acético (sem alisamento).

Os teores obtidos para as soluções puras de sacarose, etanol e ácido acético foram bem próximos dos valores reais, com um erro relativo muito pequeno, variando de -1,964 a 1,645%.

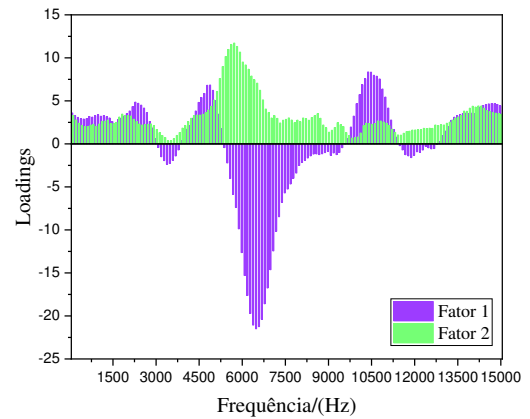
A partir das PLS's também foi possível definir as faixas de frequência que foram mais importantes para alcançar os resultados obtidos. Para isso, foram obtidos gráficos do Índice de variáveis importantes e de *Loadings*, como mostrado na Figura 43.

Figura 43 – Gráfico do Índice de variáveis importantes (esquerda) e gráfico de *Loadings* (direita) para sacarose, etanol (Savitzky-Golay – 10 pontos) e ácido acético (sem alisamento).

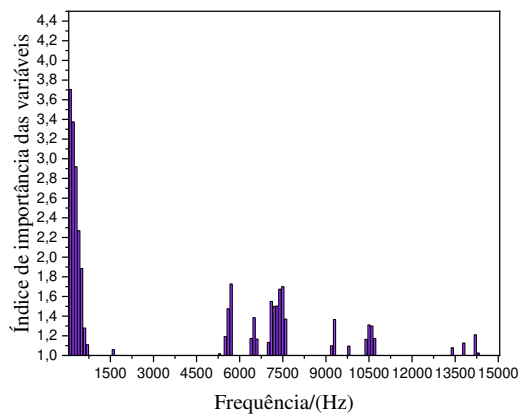




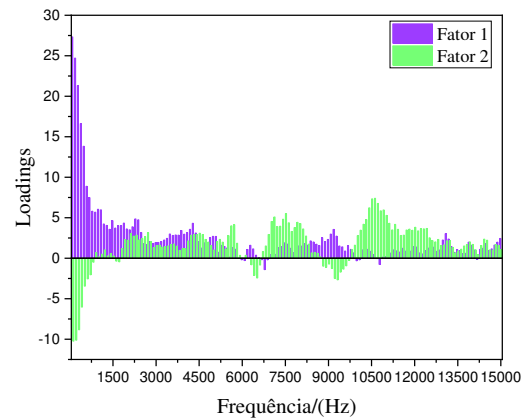
Etanol



Etanol



Ácido acético



Ácido acético

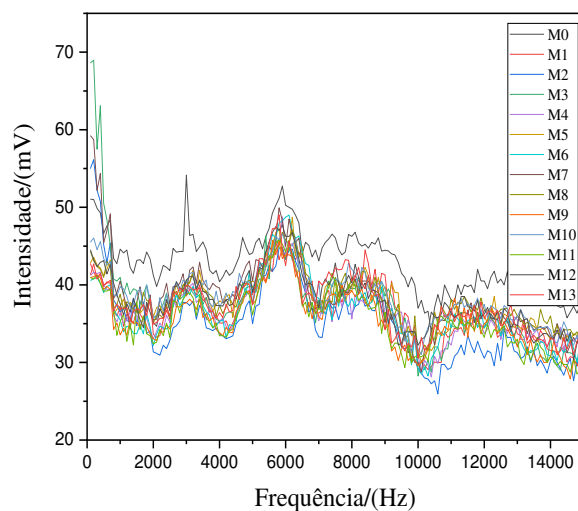
Fonte: A autora.

A partir dos gráficos acima, verificou-se que as faixas de frequência que mais influenciaram para prever os teores de sacarose foram aquelas de aproximadamente de 100 até 500 Hz e 5 até 6 kHz. Para o etanol foi aquela de aproximadamente 4,5 até 7,5 kHz. Para o ácido acético foram aquelas de aproximadamente de 4,5 até 6 kHz e 7,5 até 8 kHz. A partir delas torna-se possível reduzir a faixa utilizada nas varreduras, reduzindo o tempo gasto na análise.

Após as análises das soluções puras, foram obtidos os espectros para a mistura dos analitos (sacarose, etanol e ácido acético), que estão apresentados na Figura 44.

Os parâmetros utilizados nestas varreduras estão apresentados na Tabela 5 (página 65). Logo, foi realizada apenas uma varredura.

Figura 44- Espectros obtidos para uma varredura para a mistura das soluções de sacarose %(m/v), etanol %(v/v) e ácido acético %(v/v) a $20 \pm 0,5$ °C.



Fonte: A autora.

Foram obtidas as PLS's para a mistura em função dos teores de sacarose, etanol e ácido acético, a partir dos dados originais e com aplicação dos pré-tratamentos método de Savitzky-Golay, FFT e Transformada Wavelet com validação cruzada, em que os valores dos resíduos obtidos são apresentados na Tabela 10. Não foi possível obter as PLS com validação cruzada para alguns pré-tratamentos para as soluções de sacarose.

		Resíduo máximo	Resíduo mínimo
Dados originais		-	-
Sacarose 0 a 10 %(m/v)	Savitzky-Golay (5 pontos)	0,476	-0,316
	Savitzky-Golay (10 pontos)	0,744	-0,483
	FFT (3 pontos)	0,408	-0,479
	FFT (5 pontos)	0,996	-0,610
	Wavelet (50 % <i>cutoff</i>)	-	-
Dados originais		$2,000 \cdot 10^{-5}$	$-1,000 \cdot 10^{-5}$
Etanol 0 a 50 %(v/v)	Savitzky-Golay (5 pontos)	0,145	-0,166
	Savitzky-Golay (10 pontos)	3,155	-4,317
	FFT (3 pontos)	0,926	-0,901
	FFT (5 pontos)	4,525	-5,494

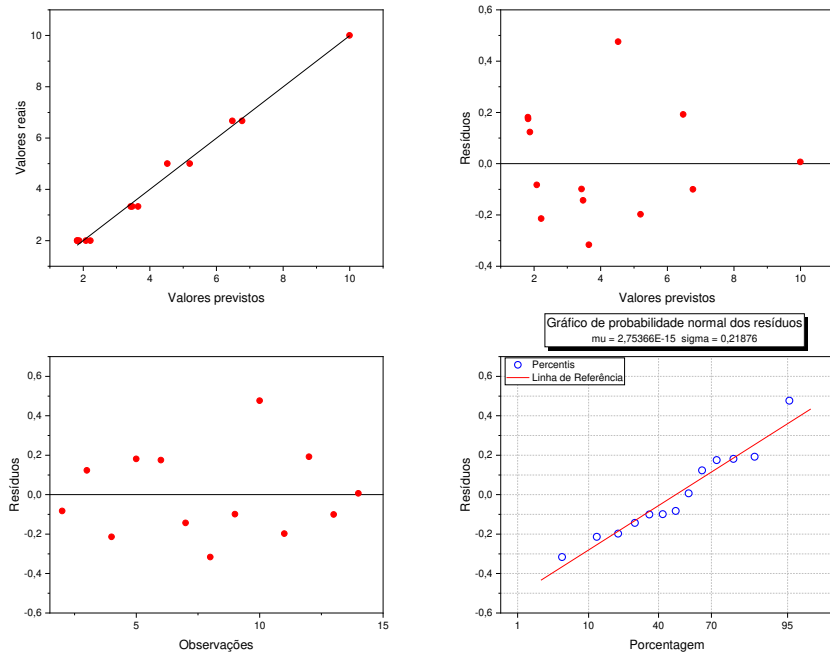
	Wavelet (50 % <i>cutoff</i>)	0,063	-0,044
	Dados originais	0,034	-0,034
Ácido acético 0 a 1,0 %(v/v)	Savitzky-Golay (5 pontos)	$4,000.10^{-5}$	$-4,000.10^{-5}$
	Savitzky-Golay (10 pontos)	$5,000.10^{-4}$	$-4,000.10^{-4}$
	FFT (3 pontos)	$4,000.10^{-5}$	$-2,000.10^{-5}$
	FFT (5 pontos)	0,001	$-7,000.10^{-5}$
	Wavelet (50 % <i>cutoff</i>)	0,064	-0,052

Tabela 10 – Resíduos obtidos para os modelos de previsão para os dados originais e após a aplicação dos pré-tratamentos.

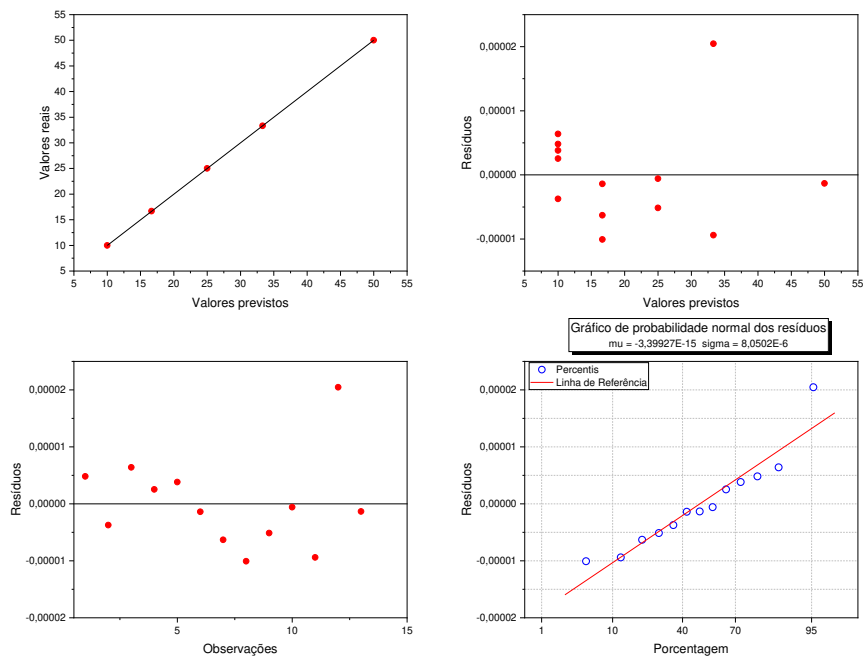
O modelo de previsão em que os valores para os resíduos foram mais baixos para a sacarose foi o pré-tratamento Savitzky-Golay (5 pontos). Para os teores de etanol, os valores de resíduos para os dados sem nenhum pré-tratamento foram os menores. Já para os teores de ácido acético, o modelo de previsão após o pré-tratamento FFT (3 pontos) foi o que apresentou menores valores para os resíduos.

A partir dos espectros obtidos na Figura 44, foram obtidos os gráficos do modelo de previsão, resíduos e probabilidade normal dos resíduos através da PLS. Na Figura 45 são mostradas aquelas que apresentaram menores valores para os resíduos.

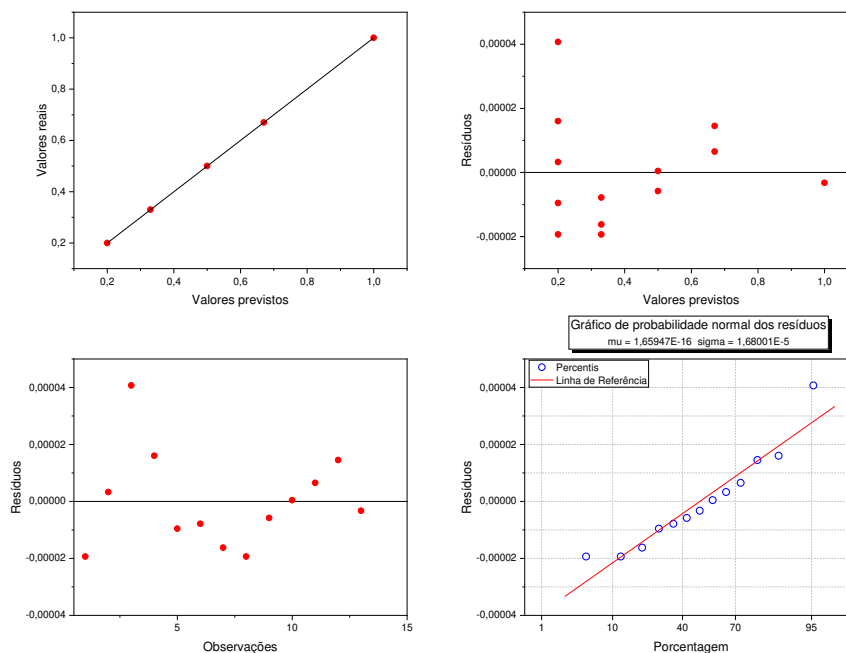
Figura 45- Gráficos do modelo de previsão, resíduos e de probabilidade normal dos resíduos para sacarose %(m/v), etanol %(v/v) e ácido acético %(v/v) a partir da mistura a $20 \pm 0,5$ °C.



Sacarose – Savitzky-Golay (5 pontos)



Etanol – sem alisamento



Ácido acético – FFT (3 pontos)

Fonte: A autora.

No método de Savitzky-Golay para a sacarose foram utilizados 5 pontos para o alisamento, de forma que este número de pontos não eliminou o sinal analítico. Para o etanol não foi preciso nenhum pré-tratamento. Já para o ácido acético foi utilizada a FFT com 3 pontos, visto que para um número de pontos maior que este, reduzia-se o sinal analítico.

A partir dos gráficos de modelo de previsão da Figura 45, foi possível prever os teores de sacarose, etanol e ácido acético em uma mistura destes, como mostrado na Tabela 11.

	Valores reais	Valores previstos	Erro relativo (%)
Sacarose % _(m/v)	2,000	2,083	-4,129
	2,000	1,877	6,154
	2,000	2,214	-10,72
	2,000	1,819	9,054
	2,000	1,825	8,737
	3,300	3,473	-5,251
	3,300	3,646	-10,50
	3,300	3,429	-3,912

	5,000	4,524	9,520
	5,000	5,198	-3,955
	6,700	6,478	3,313
	6,700	6,770	-1,050
	10,00	9,993	0,069
	10,00	10,00	0,000
	10,00	10,00	0,000
	10,00	9,999	$1,000 \cdot 10^{-4}$
	10,00	10,00	0,000
	10,00	10,00	0,000
	17,00	16,67	1,941
	17,00	16,67	1,941
	17,00	16,67	1,941
	25,00	25,00	$-4,000 \cdot 10^{-5}$
	25,00	25,00	0,000
	33,00	33,33	-1,000
	33,00	33,33	-0,999
	50,00	50,00	0,000
	0,200	0,200	-0,010
	0,200	0,200	0,000
	0,200	0,199	0,020
	0,200	0,199	0,010
	0,200	0,200	0,005
	0,300	0,330	-10,00
	0,300	0,330	-10,00
	0,300	0,330	-10,00
	0,500	0,500	-0,002
	0,500	0,500	0,000
	0,700	0,669	4,287
	0,700	0,669	4,287
	1,000	1,000	0,000

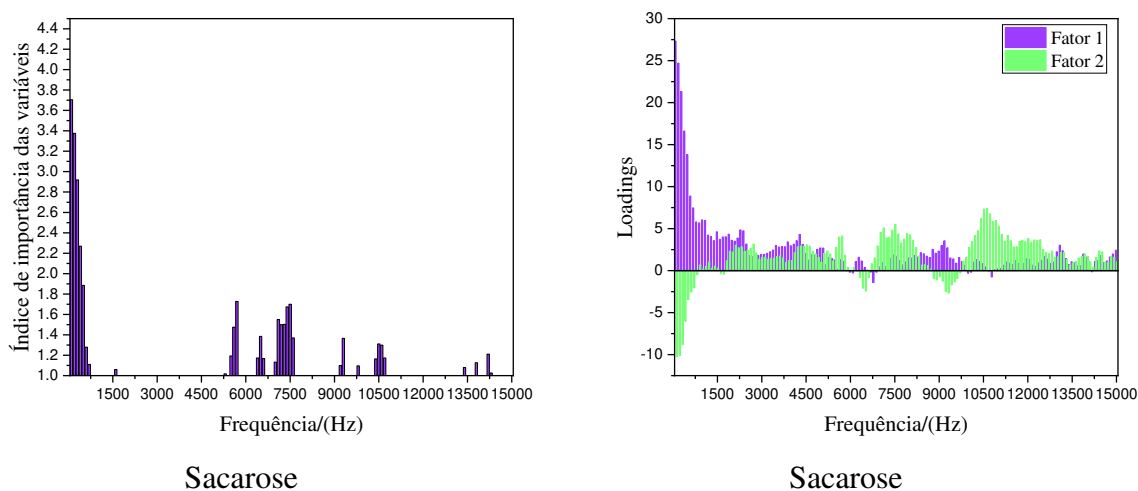
Tabela 11 – Teores previstos a partir da PLS para sacarose (Savitzky), etanol (sem alisamento) e ácido acético (FFT) em uma mistura a $20 \pm 0,5$ °C.

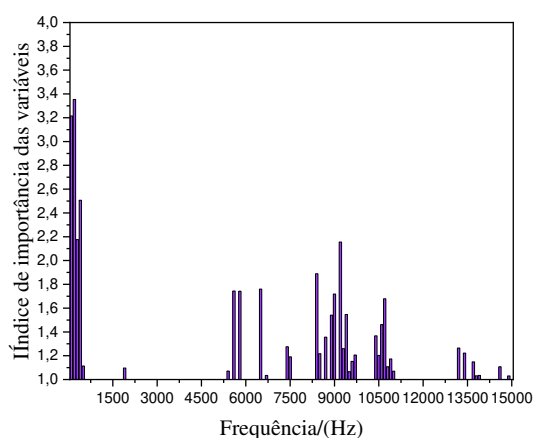
Como já observado anteriormente, o comportamento dos analitos foi diferente em uma mistura em relação as soluções puras. Os teores obtidos para sacarose, etanol e ácido acético em uma mistura ficaram próximos dos valores esperados, com um erro relativo variando de -10,72 a 9,054%, sendo os maiores valores para a sacarose e ácido acético. Para o etanol este valor não foi maior que $\pm 2,0\%$. Portanto, este maior valor para os teores dos analitos na mistura foi devido a influência que o teor de um analito causa na medida de outro analito.

Na mistura, os modelos de previsão e os resíduos obtidos para o etanol apresentaram-se mais ajustados, o que mostrou que maiores teores são mais fáceis de quantificar, ou seja, componentes majoritários. Logo, também foi possível prever os teores dos outros analitos (sacarose e ácido acético) na mistura.

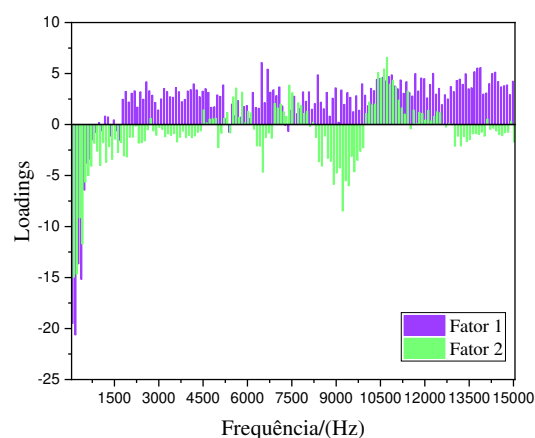
A partir da PLS obtida na Figura 45 também foi possível obter as faixas de frequência que foram mais importantes para atingir os resultados obtidos. Para isso, foram obtidos gráficos do Índice de variáveis importantes e para os *Loadings*, como mostrado na Figura 46.

Figura 46 – Gráfico do Índice de variáveis importantes (esquerda) e gráfico de *Loadings* (direita) para sacarose (Savitzky-Golay – 5 pontos), etanol (sem alisamento) e ácido acético (FFT – 3 pontos).

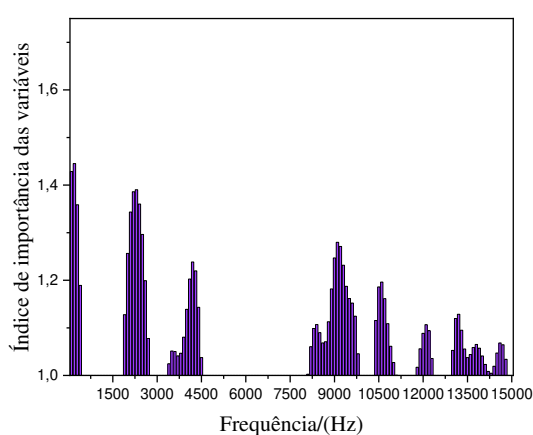




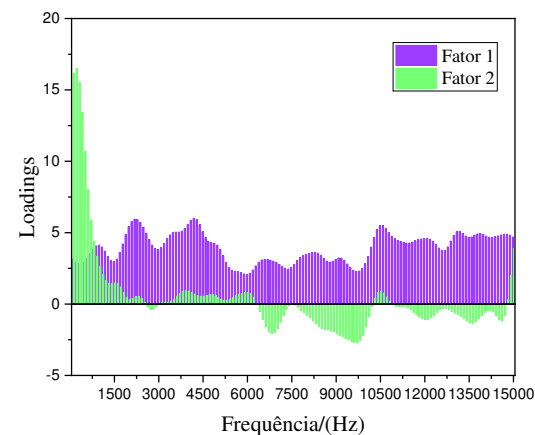
Etanol



Etanol



Ácido acético



Ácido acético

Fonte: A autora.

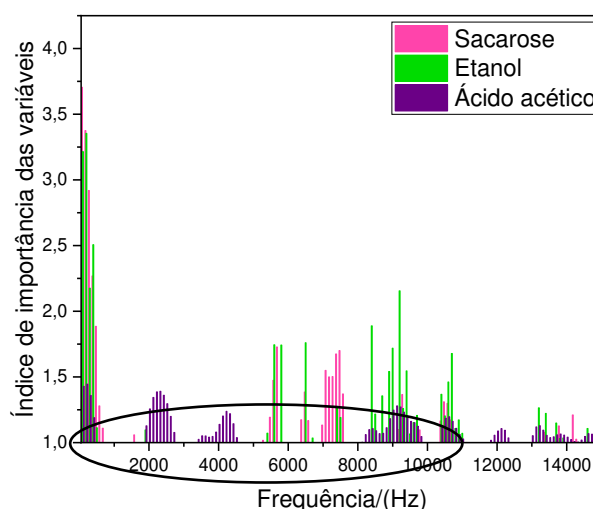
De acordo com os gráficos acima, verificou-se que as faixas de frequência que mais influenciaram para prever os teores de sacarose foram aquelas de aproximadamente 5 até 7,5 kHz. Para o etanol foi aquela de aproximadamente 8 até 10 kHz. Para o ácido acético foram aquelas de aproximadamente de 2 até 4,5 kHz e 8 até 10 kHz. Para todos os analitos, houve uma faixa de frequência de aproximadamente 100 Hz a 1 kHz que apresentou um alto índice de importância das variáveis e também valores absolutos altos para os *loadings*, e por estar presente para os três analitos, foi considerada importante para prever os teores. Existem outras faixas que também são importantes, visto que o índice de importância das variáveis foi maior que 1. Os *loadings* estavam de acordo com o índice de importância das variáveis, como pode ser verificado na Figura 46.

Outro fator importante a ser destacado foram as faixas de frequência que mais influenciaram os modelos de previsão das soluções dos analitos e da mistura. Para as soluções

de sacarose, uma das faixas que mais influenciou foi aquela de 5 a 6 kHz, já para a sacarose na mistura foi aquela de 5 a 7,5 kHz. Para as soluções de ácido acético, uma das faixas que mais influenciou foi aquela de 7,5 a 8 kHz, já para o analito na mistura foi aquela de 8 a 10 kHz. Para as soluções de etanol, as faixas que mais influenciaram na previsão do modelo foram aquelas de 4,5 a 7,5 kHz e 9,5 a 11 kHz, já para o etanol na mistura foi 8 até 10 kHz. A pequena diferença nestas faixas se deveu ao comportamento das soluções do analito puro ser diferente de quando ele está em uma mistura e sob a influência de vários analitos.

No caso da mistura dos analitos, também seria possível a redução da faixa de frequência para as varreduras, podendo esta ser aquela de 100 Hz a 11 kHz, como mostrado na Figura 47.

Figura 47 – Sobreposição dos gráficos do Índice de variáveis importantes para sacarose (Savitzky-Golay – 5 pontos), etanol (sem alisamento) e ácido acético (FFT – 3 pontos).



Fonte: A autora.

Por fim, de acordo com a Figura 47, apesar de existirem faixas de frequência coincidentes que influenciam na obtenção de modelos de previsão, foi observado que também existem aquelas diferentes para cada analito na mistura. Para a sacarose uma faixa de frequência em torno de 7,5 kHz, para o etanol em torno de 9 kHz e para o ácido acético em torno de 2 a 4 kHz. Tal fato é o responsável pela obtenção de modelos de previsão para as quantidades de diferentes analitos, simultaneamente, em uma mesma amostra.

4 CONCLUSÃO

Neste capítulo, mostrou-se que o espectrômetro de som foi eficaz para realizar análises qualitativas e quantitativas de componentes majoritários em matrizes líquidas.

Além de mais uma vez se mostrar adequado para análise qualitativa, se mostrou capaz de realizar análises quantitativas não só em soluções puras, mas também naquelas compostas por vários analitos.

O espectrômetro de som se mostrou muito prático, em que não foi necessário o uso de reagentes, mesmo durante a análise de vários componentes de uma mistura. Além disso, é muito robusto, visto que ruídos externos, como pessoas conversando ou qualquer outro barulho próximo, não causaram interferência durante as análises

A célula de som rígida, o volume fixo e o controle de temperatura foram fatores importantes para as medidas, constatando-se que a temperatura foi um fator de suma importância e esta deve ser controlada para que não haja problemas quanto a repetibilidade. Além do volume utilizado nas análises ter sido reduzido.

E por fim, constatou-se a possibilidade de redução no tempo de análise, sendo esta mais uma vantagem do instrumento proposto.

Desta forma, o instrumento desenvolvido, chamado de espectrômetro de som, foi adequado para análise tanto dos teores em soluções puras, como dos componentes majoritários em soluções compostas por vários analitos, o que torna possível a aplicação a diferentes amostras autênticas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. F. **ABC do Osciloscópio**. 2. ed. Porto: Editora do Instituto Superior de Engenharia do Porto, 1998.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. New York: John Wiley & Sons, 1997.

COCCHI, M.; BIANCOLILLO, A.; MARINI, F. Chapter 10 – Chemometric Methods for Classification and Feature Selection. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 82, p.265-299, 2018.

CONSTANTINO, M. G.; SILVA, G. V. J. A transformada de Fourier em basic. **Química nova**, v. 23, n. 3, p. 413-417, 2000.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química nova**, v. 22, n. 5, 1999.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2015.

GONÇALVES, L. A. **Um estudo sobre a Transformada Rápida de Fourier e seu uso em processamento de imagens**. 2004. Dissertação (Mestrado em Matemática Aplicada) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

MAZZOCHI, C. L.; IDE, G. M. Características de alguns vinhos produzidos em Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, v. 7, n. 3, p. 17-19, 1994.

MISITI, M.; MISITI, Y.; OPPENHEIM, G.; POGGI, J. M. **Wavelets and their applications**. [S.l.]: ISTE Ltd USA, 2007. ISBN9781905209316.

SANTOS, M. A. **Investigação das periodicidades do QUASAR 3c 273 pelas transformadas de Fourier e Wavelet de suas curvas de luz em rádio**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2007.

SOUZA, A. M. **Análise exploratória multivariada empregando o perfil cromatográfico de compostos carbonílicos na atmosfera da cidade de São Paulo**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de um espectrômetro de som, baseado na medida da atenuação de ondas acústicas na faixa do som para análise de componentes majoritários em matrizes líquidas. No Capítulo 1 foi discutido sobre a fundamentação teórica em que ele foi baseado. A parte teórica mostrou-se muito importante para se chegar a adequação do instrumento, tornando possível a identificação e correção de fatores que causavam problemas em seu funcionamento.

No Capítulo 2 foram apresentadas as etapas envolvidas no desenvolvimento do espectrômetro de som até sua última versão. Cada etapa foi fundamental para o entendimento do comportamento do instrumento, principalmente em relação à célula de som utilizada para realizar as medidas. Com isso foi possível a realizar os ajustes necessários para desenvolver um instrumento que cumprisse a finalidade a qual foi proposto.

No Capítulo 3, utilizando as melhores configuração e células, confirmou-se a adequação do instrumento, em que este se mostrou eficaz na realização de análises qualitativas e quantitativas de componentes majoritários em matrizes líquidas. Além de analisar soluções puras, também foi possível análise de matrizes autênticas, como vinhos e misturas, em que a concentração de vários analitos foram determinadas simultaneamente. Com os resultados obtidos, um leque de possibilidades de novas matrizes líquidas a serem analisadas foi aberto.

Desta forma, o presente trabalho conseguiu desenvolver um instrumento que cumpriu a finalidade desejada, de forma adequada e eficiente, mostrando-se muito prático e robusto durante a realização das análises. Além disso, o custo na montagem do mesmo foi baixo.

POTENCIALIDADES DO INSTRUMENTO

- Sugere-se aplicar o espectrômetro de som na análise de várias matrizes tais como produtos lácteos (leite, soro de queijo etc.) para determinação de teor de proteínas, lactose, dentre outros analitos; álcool combustível, para determinação do teor de água e presença de adulterantes; em caldo de cana para a determinação do teor de sacarose; e na gasolina, para determinação do teor de etanol; em efluentes industriais.
- Adequação da instrumentação, com gerador de ondas e analisador de sinal próprios, uma vez que o funcionamento do protótipo já foi totalmente ajustado. Nesta etapa ele também poderá ser finalizado esteticamente.
- Realização de novos tratamentos quimiométricos, como a seleção de variáveis, com o intuito de eliminar faixas de frequência que não são importantes para as análises e assim, diminuir o tempo de análise.
- Redução ainda maior do volume de amostra utilizado para as análises para que possa ser utilizado na análise de amostras pouco disponíveis, como o leite humano.
- Obtenção de uma nova célula de som com controle de temperatura feito através de placas Peltier, para melhorar o controle de temperatura e facilidade de uso e transporte.
- Modificação das superfícies dos elementos piezoelétricos para aumentar a estabilidade química e física.
- Relacionar as frequências de absorção com estruturas dos analitos e interações intermoleculares (químicas).

APÊNDICE A

```

getwd()
library(signal);
#pasta dos arquivos .txt
setwd("D:/Doutorado/Projeto/Espectrometro de som/Álcool");
arq.name<-readline(prompt="qual o nome do arquivo?"); #nome do arquivo a ser tratado
#
# cria a matriz spect_all: 1o coluna,frequencia em Hz;
#
arq.name<-paste0(arq.name, ".txt",collapse=NULL);
spect_all<-read.csv(arq.name, header=TRUE, sep="\t");
#
str(spect_all);
names<-colnames(spect_all[2:7]);
dim_spect<-dim(spect_all);
#
# vetor conc tem os valores de concentração, na ordem das colunas do arquivo de texto.
#
conc<-c(rep(c(0,10,20,30,40,50),c(1,1,1,1,1,1)));
nome.coluna.spect_all<-c("Freq /Hz",conc);
colnames(spect_all)<-nome.coluna.spect_all;
#
#kilo_freq: vetor coluna de frequência em kHz. Não precisa ser incorporada à spect_all.
#
kilo_freq<-spect_all[,1]*1e-3;
#
# espectros de frequencia sem smoothing (alisamento)
#
matplot(kilo_freq,spect_all[,c(2,3,4,5,6,7)],ylab="intensidade /bit",xlab="Frequência
/kHz",type="l");
legend("topright", inset=0.01, legend=names, col=c(1:7),pch=15:19,bg=NULL, horiz=F)

```

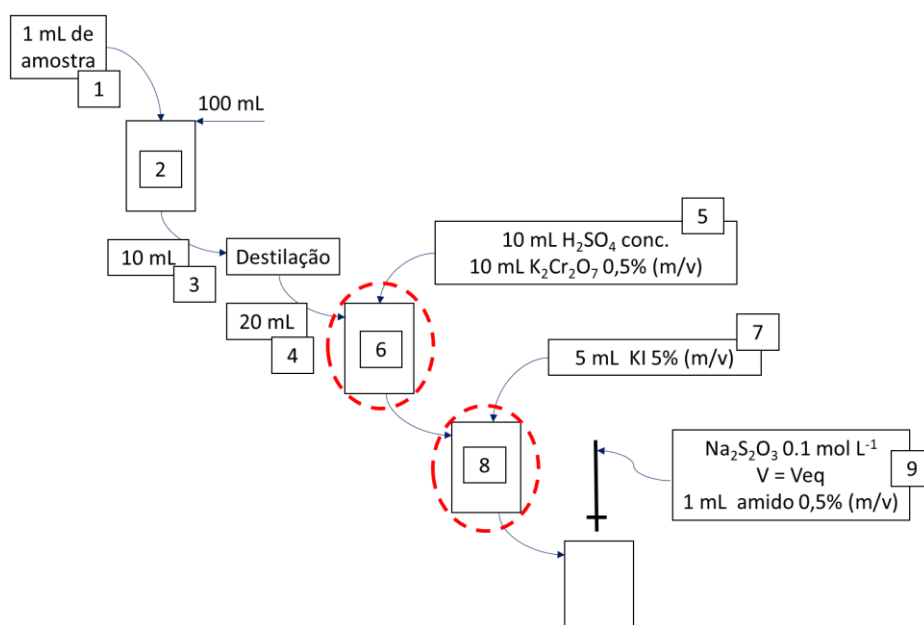
```

#
# construir gráfico 3D ou contorno para (c,freq, intensidade)
#
#
#tratamento do sinal - smoothing by Savitsky-Golay function
##golay_2_31_2<-apply(c1,1,sgolayfilt,p=3,n=31,m=2)
#
c4<-spect_all[,2];
dados.linha<-c(spect_all[,2],spect_all[,2]);
for (i in 3:7){
c2<-sgolayfilt(spect_all[,i],p=3,n=11,m=0,ts=1)
# colocar todos dados em um vetor para salvar dados e importar no Statistica (Gráfico 3D)
c4<-cbind(c4,c2)
dados.linha<-rbind(dados.linha,spect_all[,i])
#
}
#write.csv(dados.linha,"D:/Doutorado/Projeto/Espectrometro de som/Álcool/trat.alcool")
matplot(kilo_freq,c4,ylab="intensidade /bit",xlab="Frequência /kHz",type="l");
type="l")
legend("topright", inset=0.01, legend=names, col=c(1:7),pch=15:19,bg=NULL, horiz=F)
#
#seleção de uma frequência
#
freq<-1
##while (freq==0){
freq<-as.integer(readline(prompt="Qual frequência em kHz?"));
linha<-as.integer(((dim_spect[1]/(spect_all[dim_spect[1],1]-spect_all[1,1]))*freq*1e3);
plot(conc[1:6],spect_all[linha,c(2,3,4,5,6,7)],ylab="Intensidade/bit",xlab="Concentração")
#write.csv(spect_all[linha,c(2,3,4,5,6,7)],"D:/Doutorado/Projeto/Espectrometro de
som/Álcool/freq")
abline(conc[3:7],spect_all[linha,c(3,4,5,6,7)], col="blue")
}

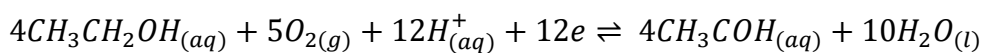
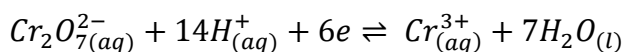
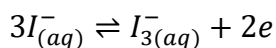
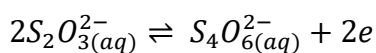
```

APÊNDICE B

Cálculo de teor alcoólico pelo método da destilação seguido de uma titulação redox.



Fonte: A autora.



$$\frac{n(S_2O_3^{2-})}{n(I_3^-)} = \frac{2}{1} \quad \frac{n(Cr_2O_7^{2-})}{n(I_3^-)} = \frac{1}{3} \quad \frac{n(Cr_2O_7^{2-})}{n(EtOH)} = \frac{1}{2}$$

Supondo um $V_{eq} = 6 \text{ mL}$

$$n_9(S_2O_3^{2-}) = c_9(S_2O_3^{2-}) \cdot V_{eq} = \frac{0,1 \text{ mol}}{L} \cdot 0,006 L = 6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$\frac{n_9(S_2O_3^{2-})}{n_8(I_3^-)} = \frac{2}{1} \quad n_8(I_3^-) = \frac{n_9(S_2O_3^{2-})}{2} = \frac{6,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}}{2} = 3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$\frac{n_8(Cr_2O_7^{2-})_{I_3^-}}{n_8(I_3^-)} = \frac{1}{3} \quad n_8(Cr_2O_7^{2-})_{I_3^-} = \frac{n_8(I_3^-)}{3} = \frac{3,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}}{3} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n_5(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{total}} = n_8(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{I}_3^-} + n_6(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{EtOH}}$$

$$n_6(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{EtOH}} = n_5(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{total}} - n_8(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{I}_3^-}$$

$$n_6(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{EtOH}} = c_5(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}) \cdot V_5 - 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n_6(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{EtOH}} = 0,017 \text{ mol/L} \cdot 0,01 \text{ L} - 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n_6(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{EtOH}} = 1,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} - 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} = 7,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$$

$$\frac{n_6(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{EtOH}}}{n_6(\text{EtOH})} = \frac{1}{2} \quad n_6(\text{EtOH}) = 2 \cdot n_6(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{\text{EtOH}} = 2 \cdot 7,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} = 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n_6(\text{EtOH}) = n_4(\text{EtOH}) = n_3(\text{EtOH}) = 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$m_3(\text{EtOH}) = n_3(\text{EtOH}) \cdot MM(\text{EtOH}) = 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \frac{46,07 \text{ g}}{\text{mol}} = 6,45 \cdot 10^{-3} \text{ g}$$

$$V_3(\text{EtOH}) = \frac{m_3(\text{EtOH})}{d(\text{EtOH})} = \frac{6,45 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{0,789 \text{ g/cm}^3} = 8,17 \text{ cm}^3 = 8,17 \text{ mL}$$

$$C_3(\text{EtOH}) = \frac{V_3(\text{EtOH})}{V_3} = \frac{8,17 \text{ mL}}{0,010 \text{ L}} = \frac{0,817 \text{ mL}}{\text{L}} = \frac{0,082 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$$

$$C_2(\text{EtOH}) = C_3(\text{EtOH}) = \frac{0,082 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$$

$$V_2(\text{EtOH}) = C_2(\text{EtOH}) \cdot V_2 = \frac{0,082 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \cdot 100 \text{ mL} = 0,082 \text{ mL}$$

$$V_1(\text{EtOH}) = V_2(\text{EtOH}) = 0,082 \text{ mL}$$

$$C_1(\text{EtOH}) = \frac{V_1(\text{EtOH})}{V_1} = \frac{0,082 \text{ mL}}{0,001 \text{ L}} = \frac{82 \text{ mL}}{\text{L}} = \frac{8,2 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 8,2\% \text{ EtOH}(v/v)$$