

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA BASEADA EM IMAGENS DIGITAIS DE SPOT TESTS PARA DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM CACHAÇA

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY BASED ON DIGITAL IMAGES OF SPOT TESTS FOR DETERMINATION OF ETHANOL IN CACHAÇA

K. D. PESSOA¹, W. T. SUAREZ¹, M. O. K. FRANCO¹, M. F. dos REIS¹, R. P. L. MOREIRA¹, V. B. dos SANTOS²

¹ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, Brasil

² Universidade Federal do Pará, Faculdade de Química, Brasil

E-mail: keniadiasbja@yahoo.com.br

article info

Article history:

Received 6 July 2016

Accepted 3 January 2017

Available online 6 January 2017

PALAVRAS-CHAVE: Validação de método; Imagens digitais; Spot test; Etanol, Cachaça.

KEYWORDS: Validation of method; Digital image; Spot test; Ethanol; Sugar cane spirits.

RESUMO: *A análise de imagens digitais é um método analítico baseado na decomposição da imagem, cujos os valores RGB variam proporcionalmente com a concentração do analito. Para a determinação de etanol, empregou-se a reação de oxidação-redução na qual o cromo (VI) é reduzido a cromo (III) ou cromo (II), sendo o etanol oxidado a aldeído acético, gerando mudança da cor amarelo-alaranjada para verde-azulada. Foi obtida uma curva analítica linear no intervalo de 10 a 70 % v/v de etanol, com coeficiente de regressão $r^2 = 0,991$. Os limites de detecção e de quantificação foram iguais à 1,72 % v/v e 5,74 % v/v. Seis amostras de cachaça foram analisadas empregando o método proposto e um método picnométrico, e concluiu-se que três delas apresentaram teor de etanol fora da faixa permitida pela legislação. O método analítico baseado em imagens digitais mostrou-se versátil, preciso, exato, de custo baixo e com baixa geração de resíduos, muito útil para análises in situ.*

ABSTRACT: *Digital image analysis is an analytical method based on the decomposition of the image through an RGB color model, which values of RGB varies in proportion to the analyte concentration. For the determination of ethanol, it was employed the reaction of redox in which chromium (VI) is reduced to chromium (III) or chromium (II) and the ethanol is oxidized to acetaldehyde, generating change in the yellow-orange color to blue-green. By determining the ethanol content, a linear calibration curve in the range from 10 to 70% v/v ethanol was obtained, with a coefficient of regression $r^2 = 0.9910$. Limits of detection and quantification respectively equal to 1.72 % v/v and 5.74% v/v also were obtained. six cachaça samples were analyzed using the digital image and the picnometric method. The results showed that three of them had ethanol content outside the range permitted by law. Besides the image capture system is versatile, accurate, precise, low cost, low waste generation, being it very useful for situ analysis.*

1. INTRODUÇÃO

A cachaça é uma bebida tipicamente brasileira, obtida a partir do caldo de cana fermentado. É o segundo destilado mais consumido no país e o terceiro no mundo, sendo produzida por milhares de produtores espalhados por vários estados brasileiros, diferenciando-se pelas características culturais e históricas de cada região (LIMA et al, 2009).

Atualmente, o agronegócio da bebida caracteriza-se por uma busca incessante de pesquisas que melhorem a qualidade do produto, visando atender a demanda crescente do mercado interno e externo (MACHADO, 2010). Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos com alta sensibilidade, robustez, rapidez e baixo custo de implementação torna-se uma alternativa interessante para a análise de substâncias químicas presentes na cachaça (FRANCO et al., 2017).

Os métodos analíticos baseados em imagens digitais de spot test têm se tornado alternativas promissoras para a determinação de analitos de interesse alimentício, uma vez que o spot test (testes em escala reduzida, pontuais) envolve procedimentos simples, rápidos, práticos e baseados em baixo consumo de reagentes (FRANCO; SUAREZ; SANTOS, 2016; MASAWAT; HARFIELD; NAMWONG, 2015; MATIAS; VILA; TUBINO, 2004). Além disso, o desempenho dos dispositivos digitais tem apresentado melhora significativa nos últimos anos, enquanto seus custos têm reduzido (PESSOA et al., 2017).

Neste trabalho é relatado o desenvolvimento, otimização e validação de metodologia analítica para determinação do teor de etanol em amostras comerciais de cachaça. Tal metodologia foi baseada na análise de imagens digitais de spot test. As imagens foram capturadas por uma câmera fotográfica contendo um sensor do tipo CCD (charge coupled device), em um sistema construído para esta finalidade.

Este sensor é capaz de converter a radiação incidente em um sinal elétrico e, posteriormente em dados digitais armazenáveis, os bits. A resposta analítica gera uma imagem baseada no modelo de cores RGB (CACIANO DE SENA et al, 2013), no qual são utilizadas três matrizes para armazenar as informações contidas em uma imagem. Os valores da cor vermelha são armazenados na matriz R (red), cor verde na matriz G (green) e cor azul na matriz B (blue). A combinação das matrizes R, G e B permite a aquisição de aproximadamente 16 milhões de cores (GOMES et al, 2008).

O uso do modelo RGB como resposta analítica está fundamentado no fato de que os valores das matrizes R, G e B variam proporcionalmente com a coloração desenvolvida em uma reação colorimétrica (DAMASCENO et al., 2015). Este efeito pode ser empregado para estabelecer uma relação entre os componentes da cor e a concentração do analito de interesse, e é com base neste princípio que as análises quantitativas empregando imagens digitais são realizadas (PACIORNIK et al, 2006).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Aquisição e análise das imagens digitais

Para garantir a eficiência da aquisição das imagens digitais e minimizar os efeitos de sombra ou reflexo causados pela luz externa, foi utilizado um dispositivo construído conforme mostra figura 1. Este consistia em: uma caixa plástica na cor preta de dimensões 21 x 15 x 7 cm, contendo uma bateria Unipower de 12 V e 1,3 A/h; quatro LEDs (*Light Emitting Diodes*) de luz branca BLUEX de 20 a 100 mA com potenciômetros para controle de intensidade; uma chave liga/desliga e conectores para acoplar um carregador de bateria 12 V. Na parte interna da caixa foi aplicada uma camada de tinta preta fosca, para evitar reflexões internas. Na parte superior da caixa foi feita uma abertura circular para acoplar a objetiva de uma câmera digital convencional. No interior da caixa havia espaço suficiente para acomodar uma placa de porcelana CHIAROTTI, contendo 12 cavidades, na qual as reações colorimétricas foram realizadas. Os produtos colorimétricos foram fotografados com uma câmera SONY CYBER-SHOT DSC-S730 de resolução 7.2 Megapixels. A função *flash* da câmera não foi utilizada, para evitar brilho excessivo. A luminosidade era dada pelo arranjo de LEDs. Os demais parâmetros (foco, balanço de branco e sensibilidade) foram mantidos no modo automático.



Figura 1 - Dispositivo utilizado para aquisição das imagens digitais.

Após a captura das imagens, as mesmas foram analisadas no software livre *ImageJ*. As imagens foram carregadas no programa mencionado, sendo selecionada uma área retangular de dimensões $w \times h = 32 \times 26$ pixels. Em seguida foi aplicado o comando “*Analyze* → *Tools* → *Color Histograms*”, para obter os valores médios dos canais RGB. A resposta analítica (RA) foi calculada através da seguinte equação:

$$RA = -\log(I_r / I_o) \quad (1)$$

Onde I_r é o valor médio de R, G ou B da amostra e I_o é o valor médio de R, G ou B do branco. A equação 1 é similar ao cálculo de transmitância em espectrofotometria, porém, no caso de imagens digitais, o que se avalia é a intensidade da radiação refletida que atinge o detector da câmera digital. Porém existe uma correlação entre a radiação refletida e a absorvida, pois, quanto maior a absorção, menor será a intensidade da radiação refletida e vice-versa.

2.2. Otimização dos parâmetros operacionais do sistema de captura de imagens

Os parâmetros operacionais foram avaliados com o objetivo de se buscar melhor desempenho do sistema de captura de imagem. Soluções estoque de concentração $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L dos corantes Azul de Comassie Brilhante, Tartrazina e Direct Red 80 foram preparadas pela dissolução do respectivo corante em água destilada. As demais soluções foram obtidas a partir de diluições das soluções estoque. Todos os estudos foram realizados em triplicata ($n=3$).

Para verificar o canal de resposta (R, G ou B) de cada corante, uma varredura espectral na faixa de comprimentos de onda da região visível do espectro eletromagnético foi realizada, utilizando um espectrofotômetro HITACHI U-2000 e empregando soluções de concentração $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L.

Para verificar a homogeneidade da iluminação nas cavidades da placa de porcelana, foram adicionados 800 μ L da solução do corante Azul Brilhante $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L em cada cavidade. Foram mantidas fixas a intensidade luminosa dentro da caixa e a posição da placa de porcelana, a qual foi centralizada entre os LEDs. Os resultados foram avaliados através do teste de Tukey.

Para avaliar o efeito da intensidade luminosa sobre a resposta analítica, variou-se a intensidade luminosa incidente em cinco níveis diferentes: 20, 35, 90, 240 e 980 LUX. As medidas da intensidade luminosa foram realizadas através de um luxímetro Minipa MLM-1011. O estudo foi realizado empregando-se 800 μ L da solução do corante Azul Brilhante $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L.

Para avaliar o efeito do volume de amostra sobre a resposta analítica, variou-se o volume da solução do corante Azul Brilhante $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L de 100 a 800 μ L (com incrementos de 100 μ L) nas cavidades da placa de porcelana. A intensidade luminosa foi mantida fixa.

Para verificar se os canais R, G e B respondiam linearmente em função da concentração do analito, foram construídas curvas analíticas empregando-se os corantes Azul Brilhante, Tartrazina e Direct Red 80. As mesmas foram testadas na faixa de concentração

entre $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L. Empregou-se a intensidade luminosa e o volume determinados nos estudos anteriores. A qualidade das curvas foi avaliada através do coeficiente de determinação r^2 .

2.3. Determinação de etanol em cachaça

Preparo das soluções

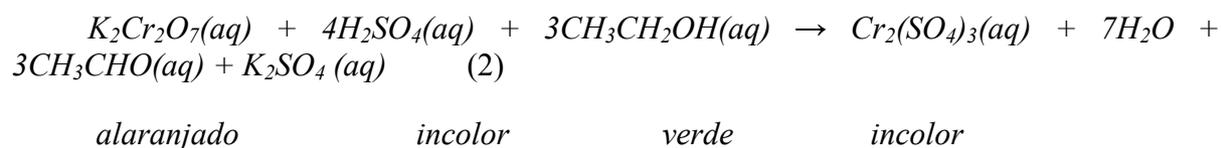
As soluções padrão de etanol foram preparadas pela diluição de etanol absoluto em água destilada.

As soluções de dicromato de potássio foram preparadas pela dissolução do sal em água destilada.

As soluções de ácido sulfúrico foram preparadas pela diluição de ácido sulfúrico concentrado (18,0 mol/L), de pureza 95% em água destilada.

Reação colorimétrica

Para a determinação de etanol, empregou-se a reação de óxido-redução, na qual o cromo (VI) é reduzido a cromo (III) ou cromo (II) e o etanol é oxidado a aldeído acético, gerando mudança da cor amarelo-alaranjada para verde-azulada, conforme descrito na equação abaixo:



Inicialmente, foram realizados ensaios para escolha da concentração da solução de ácido sulfúrico e de dicromato de potássio que gerasse um gradiente de cores. As soluções de ácido sulfúrico foram testadas nas concentrações 4,5 mol/L, 9,0 mol/L, 13,5 mol/L e 18,0 mol/L. As soluções de dicromato de potássio foram testadas nas concentrações 0,038; 0,075; 0,150 e 0,225 mol/L. Ademais, para verificar o efeito do tempo sobre a resposta analítica, a reação foi monitorada durante 20 min, em intervalos de 2 min. Todos os estudos foram realizados em triplicata (n=3).

Para ambos os estudos supracitados, a reação foi realizada diretamente nas cavidades da placa de porcelana, sendo utilizadas soluções de etanol nas seguintes concentrações: 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 55 % v/v.

Os volumes foram fixados em 100 μ L de ácido, 300 μ L de dicromato e 200 μ L de

solução de etanol (ou amostra de cachaça, no caso da análise de amostras reais).

O branco analítico foi obtido pela substituição da solução de etanol por água destilada.

Após a adição das soluções reagentes nas cavidades, o meio foi agitado com um bastão de vidro.

Validação do método

Os procedimentos realizados na validação do método foram baseados nas orientações propostas no documento DOQ-CGCRE-008, do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2011) e na Resolução RE nº 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

O efeito de possíveis interferentes na determinação de etanol foi avaliado através do sinal analítico obtido após a realização das reações colorimétricas. Diferentes proporções entre o analito e os interferentes foram testadas, sendo mantida fixa a concentração da solução de etanol em 20 % v/v. Os possíveis interferentes testados foram metanol, propanol, isobutanol, acetaldeído e acetato de etila. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3).

O erro relativo percentual sobre o sinal analítico do etanol foi calculado através da equação (3).

$$E\% = (S_{\text{analito} + \text{interferente}} - S_{\text{analito sem interferente}} / S_{\text{analito sem interferente}}) \times 100 \quad (3)$$

Para verificar a linearidade do método, foram preparadas soluções aquosas de etanol em concentrações entre 10 e 70 % v/v, em sete níveis diferentes. Após a realização da reação colorimétrica, obteve-se o sinal analítico para cada concentração. Os dados foram plotados em um gráfico da intensidade de cor em função da concentração de etanol (% v/v). Cada nível de concentração foi preparado em replicata (n=7). A regressão dos pontos foi feita pelo Método dos Mínimos Quadrados. A qualidade do ajuste linear foi avaliada pelo coeficiente de determinação (r^2) e pela realização da análise de variância (ANOVA).

O estudo do efeito de matriz foi feito através da comparação dos parâmetros da curva analítica obtida para soluções aquosas de etanol com os parâmetros da curva analítica matrizada. Esta última foi preparada pelo método de adição de padrão, em sete níveis de concentração diferentes, sendo cada nível preparado em replicata (n=7). A curva matrizada foi preparada para uma cachaça envelhecida e uma cachaça não envelhecida, sendo utilizada intensidade de cor em função da concentração do padrão de etanol (% v/v). O procedimento consistiu na adição de 5,0 mL da amostra de cachaça em balões de 10,0 mL, nos quais também foram adicionados diferentes volumes de etanol absoluto, a fim de obter os padrões nas concentrações iguais a 0, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 % v/v. O volume do balão foi completado com água destilada.

Os coeficientes angulares das curvas analíticas aquosa e matrizadas foram comparadas através do teste estatístico F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e do teste t

(Student) de comparação de médias (INMETRO, 2003).

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram calculados a partir de parâmetros da curva analítica aquosa, através das equações (4) e (5), respectivamente.

$$LD = (3 \times SD) / S \quad (4)$$

$$LQ = (10 \times SD) / S \quad (5)$$

Onde SD é a estimativa do desvio padrão da resposta do branco e S é o coeficiente angular da curva analítica.

A veracidade do método também foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos nas análises de amostras de cachaças com os resultados fornecidos pelo método da Picnometria, seguindo o procedimento recomendado pela A.O.A.C., 2006 para execução do último. Os resultados obtidos por ambos os métodos foram comparados através do teste t pareado.

A repetitividade foi avaliada através de ensaios de recuperação em três níveis de concentração diferentes, sendo estes iguais a 15; 20 e 25 % v/v. Neste procedimento, amostras de uma cachaça envelhecida foram preparadas pelo método de adição de padrão. As amostras foram preparadas e analisadas no mesmo dia, e o coeficiente de variação (CV) foi determinado através da equação a seguir:

$$CV (\%) = (SD / C_{experimental}) \times 100 \quad (6)$$

Onde SD é a estimativa do desvio-padrão da concentração média do analito determinada experimentalmente na amostra fortificada e $C_{experimental}$ é a concentração média do analito determinada experimentalmente na amostra fortificada. Os ensaios foram feitos em replicatas ($n=7$).

Para avaliar a precisão intermediária, os ensaios descritos para avaliar a repetitividade foram igualmente efetuados, porém em um intervalo de três dias após a realização do estudo da repetitividade.

A robustez do método foi verificada através da troca da câmera SONY CYBER-SHOT DSC-S730 de resolução 7.2 Megapixels por uma câmera SONY CYBER-SHOT DSC-W610, de resolução 14.1 Megapixels e também por uma câmera de um smartphone LG L70, de resolução 8 Megapixels. O efeito da troca da câmera sob a resposta analítica foi avaliado pela

comparação das curvas analíticas aquosas construídas para os três dispositivos. Os ensaios foram realizados em replicatas (n=7).

O método validado foi aplicado para determinação do teor de etanol em amostras de cachaças não envelhecidas e envelhecidas, coletadas em supermercados das cidades de Viçosa e de Bom Jesus do Amparo – Minas Gerais. Os ensaios foram feitos em triplicata (n=3).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Otimização dos parâmetros operacionais do sistema de captura de imagens

Segundo Choodum et al (2013), os canais R, G e B absorvem comprimentos de onda da luz na faixa de 580-700 nm, 500-580 nm e 400-500 nm, respectivamente. Portanto, pelos espectros obtidos para os corantes, observou-se que o Azul de Comassie Brillante apresenta resposta na região do canal R, o Direct Red 80 na região do canal G e a Tartrazina na região do canal B.

Após a realização do teste de Tukey, a 95% de confiança, os resultados mostraram que iluminação na caixa apresentava homogeneidade.

A medida em que se aumentou a intensidade luminosa, os sinais analíticos tiveram suas intensidades diminuídas. Para prosseguimento dos estudos, a intensidade luminosa foi fixada em 20 LUX, devido à maior magnitude do sinal analítico. Nesta condição é possível medir menores concentrações, o que é desejável quando é feita a análise de amostras com analitos em baixas concentrações.

Quando foram empregados volumes de 400 a 800 μL a intensidade do sinal analítico permaneceu praticamente constante, sendo ligeiramente maior para 600 μL . A partir de 600 μL , as regiões com brilho aparecem apenas nas bordas das cavidades da placa, sendo obtidas regiões mais homogêneas quando se empregou volumes de 600 a 800 μL .

Segundo Souza e colaboradores (2014), a resposta analítica pode ser afetada pelo volume de amostra, pois a altura da alíquota define o caminho óptico. Percebeu-se que a seleção de região com brilhos geram valores RGB maiores quando comparados àqueles obtidos de regiões sem brilho. Da mesma forma, a seleção de regiões com alguma sombra conduzem a valores RGB menores. Assim, o volume de amostra deve ser ajustado de modo que as regiões nas cavidades da placa fiquem homogêneas, evitando o aparecimento de regiões com excesso de brilho ou sombra.

Assim, optou-se por utilizar o volume de 600 μL para prosseguimento dos estudos, uma vez que a resposta analítica é ligeiramente mais intensa nesse volume e as regiões com brilhos apareceram apenas nas extremidades da placa. Além disso, a utilização de volumes menores permite a redução no consumo de reagentes e resíduos gerados.

As faixas lineares obtidas para os corantes Azul Brillante, Tartrazina e Direct Red 80

foram, respectivamente, $1,75 \times 10^{-5}$ a $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L, $1,00 \times 10^{-6}$ a $8,35 \times 10^{-5}$ mol/L e $1,00 \times 10^{-6}$ a $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L. Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos foram superiores a 0,9900 e estão de acordo com as normas da ANVISA, indicando, portanto, que os canais R, G e B respondem linearmente a uma determinada faixa de concentração do analito.

3.2. Determinação de etanol em cachaça

Reação colorimétrica

A cor resultante após a realização da reação colorimétrica pode ser uma mistura de cores e, conseqüentemente, qualquer canal pode ser empregado nas análises. Assim, foram monitorados os canais R, G e B para verificar qual deles apresentava resposta linear em função da concentração. O canal R atendeu a este requisito, sendo portanto, empregado para a determinação de etanol nos estudos realizados.

Para as diferentes concentrações de ácido sulfúrico e dicromato de potássio, foram obtidas curvas analíticas lineares, na faixa prévia testada, apenas quando foram utilizadas soluções de concentrações 4,5 mol/L e 0,075 mol/L, respectivamente.

Para as demais soluções de ácido sulfúrico, foram obtidas colorações azuladas na maioria das cavidades. Para a solução de dicromato em concentração inferior à supracitada, a coloração permaneceu amarelada na maioria das cavidades. Para soluções em concentração maiores, foram obtidas colorações esverdeadas bastante intensas na maioria das cavidades, não sendo observada uma escala de cores. Em todos os casos, os valores RGB permaneceram praticamente constantes, impossibilitando a obtenção de curvas analíticas lineares.

O tempo de reação foi fixado em 4 minutos. Em valores inferiores a esse, a coloração nas cavidades da placa permaneceu amarelada. Em valores superiores, a coloração azulada começou a prevalecer nas cavidades, interferindo nos valores RGB e, conseqüentemente, na intensidade do sinal analítico.

Validação do método

Para verificar a seletividade do método, foram testadas substâncias que poderiam ser encontradas como subprodutos da fermentação e/ou destilação em bebidas contendo etanol, conforme descrito por Pinheiro et al (2003) e na Instrução Normativa n.13, de 29 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005). Os resultados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito de possíveis interferentes na determinação de etanol ($n=3$)

Interferente	Proporção de etanol:interferente	Erro relativo (%)
Metanol	1:1	+ 34,70
	1:0,5	+ 25,91
	1:0,1	+ 11,94
	1:0,05	+ 4,13
	1:0,01	+ 3,77
Propanol	1:1	+ 48,89
	1:0,5	+ 14,23
	1:0,1	- 1,01
Isobutanol	1:0,5	+ 44,78
	1:0,1	+ 13,53
	1:0,01	- 3,52
Acetaldeído	1:1	+ 88,44
	1:0,5	+ 64,09
	1:0,1	+ 22,09
	1:0,05	+ 9,32
	1:0,01	- 0,28
Acetato de etila	1:0,5	+ 5,05
	1:0,1	- 4,39

Dentre as substâncias testadas, todas apresentaram interferência bastante significativa na determinação de etanol, exceto o acetato de etila. A interferência produzida pelo metanol, propanol e isopropanol pode ser explicada pelo fato dessas substâncias apresentarem estrutura funcional semelhante ao etanol, competindo com as mesmas reações e os mesmos reagentes. Já o acetaldeído apresenta certo caráter redutor no meio reacional.

Os resultados de regressão mostraram que as variáveis estão linearmente correlacionadas na faixa de concentração entre 10 e 70 % v/v de etanol, conforme mostrado na Figura 2.

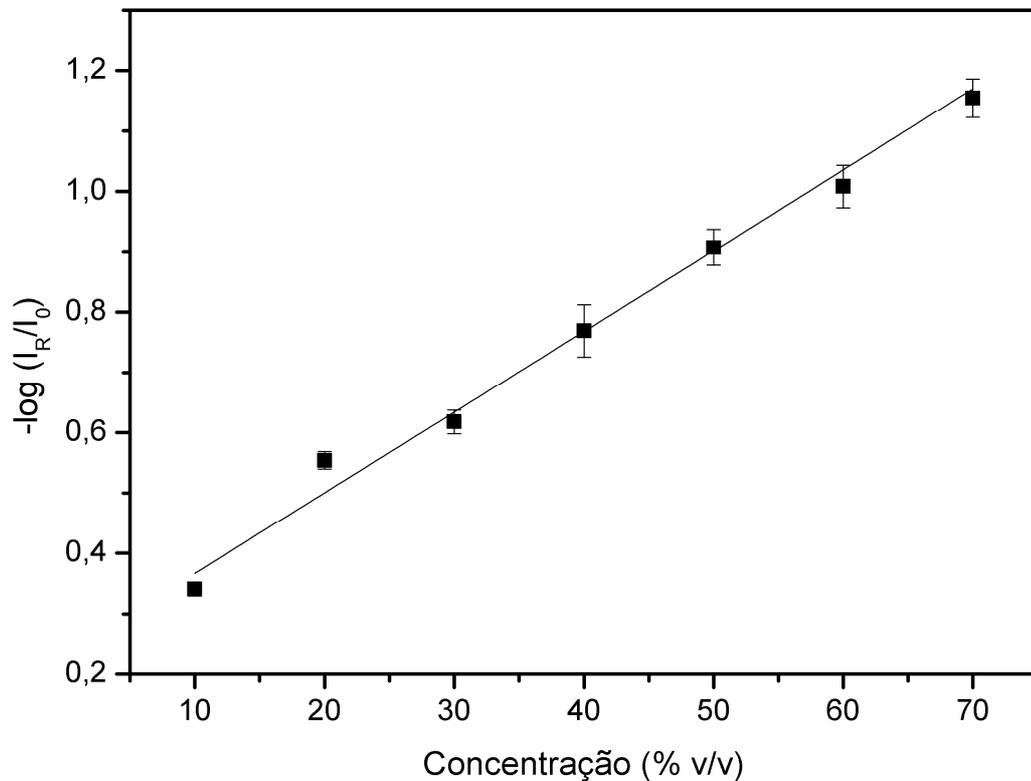


Figura 2. Curva analítica obtida pela análise de soluções aquosas de etanol

O coeficiente de determinação (r^2) obtido está de acordo com as normas da ANVISA (2003), indicando, portanto, que existe uma resposta linear na faixa supracitada.

O documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2011) sugere que a linearidade seja avaliada através de testes estatísticos. Assim, a qualidade das curvas analíticas foi averiguada através da análise de variância (ANOVA) na regressão, a 95% de confiança. É importante ressaltar que a hipótese nula é que não existe correlação entre x e y . O valor de p -valor = $2,62 \times 10^{-6}$ foi menor que $\alpha = 0,05$ e, portanto, a hipótese nula foi rejeitada, o que demonstra uma correlação significativa.

Segundo o documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2003), um procedimento alternativo para a avaliação do efeito de matriz é a comparação das inclinações de um par de curvas analíticas. Caso as inclinações de ambas as curvas de regressão linear forem as mesmas, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito.

Assim, a influência dos componentes da cachaça na quantificação de etanol foi avaliada pela comparação de curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções de etanol preparadas em água destilada e em cachaça envelhecida e não envelhecida, sendo as últimas construídas pelo método de adição padrão, conforme mostrado na Figura 3.

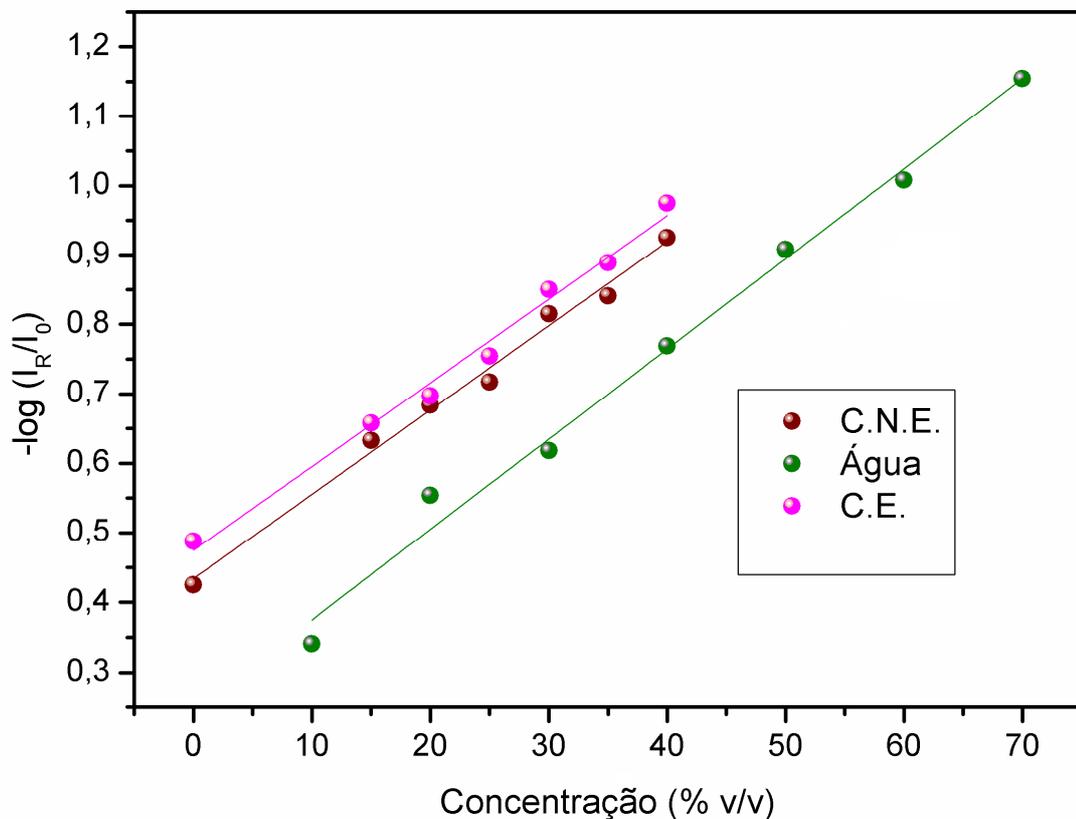


Figura 3. Curvas analíticas construídas para etanol em água, em cachaça não envelhecida (C.N.E.) e em cachaça envelhecida (C.E.).

Após a realização dos testes estatísticos, a 95% de confiança, os resultados mostraram que os componentes da cachaça interferem na quantificação de etanol, pois para a cachaça envelhecida $t_{\text{calculado}} = 3,19 > t_{\text{tabelado}} = 2,18$ e para a cachaça não envelhecida $t_{\text{calculado}} = 2,94 > t_{\text{tabelado}} = 2,18$.

O limite de detecção e o limite de quantificação, calculados com base nos parâmetros da curva analítica, foram respectivamente iguais a 1,72 % v/v e 5,74 % v/v.

A veracidade também foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos através do método desenvolvido com os resultados fornecidos pelo método da Picnometria, seguindo o procedimento recomendado pela A.O.A.C., 2006. Os resultados são mostrados na Tabela 3. Como $t_{\text{calculado}} = -1,20 < t_{\text{tabelado}} = 2,57$, a 95% de confiança, pode-se concluir que os resultados obtidos foram satisfatórios.

Os resultados obtidos para os estudos de repetitividade e precisão intermediária são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Coeficientes de variação obtidos para os três níveis de concentração estudados, em um intervalo de três dias

Dia	Coeficientes de variação (%) ($n = 7$)		
	15 % v/v	20 % v/v	25 % v/v
1°	1,94	1,09	1,31
3°	2,22	1,85	2,71

Segundo Brito et al (2003), são aceitos coeficientes de variação de até 2,8% para níveis de concentração superiores a 10%. Portanto, todos os valores obtidos para os coeficientes de variação foram satisfatórios.

As curvas analíticas obtidas a partir da troca da câmera são mostradas na Figura 4.

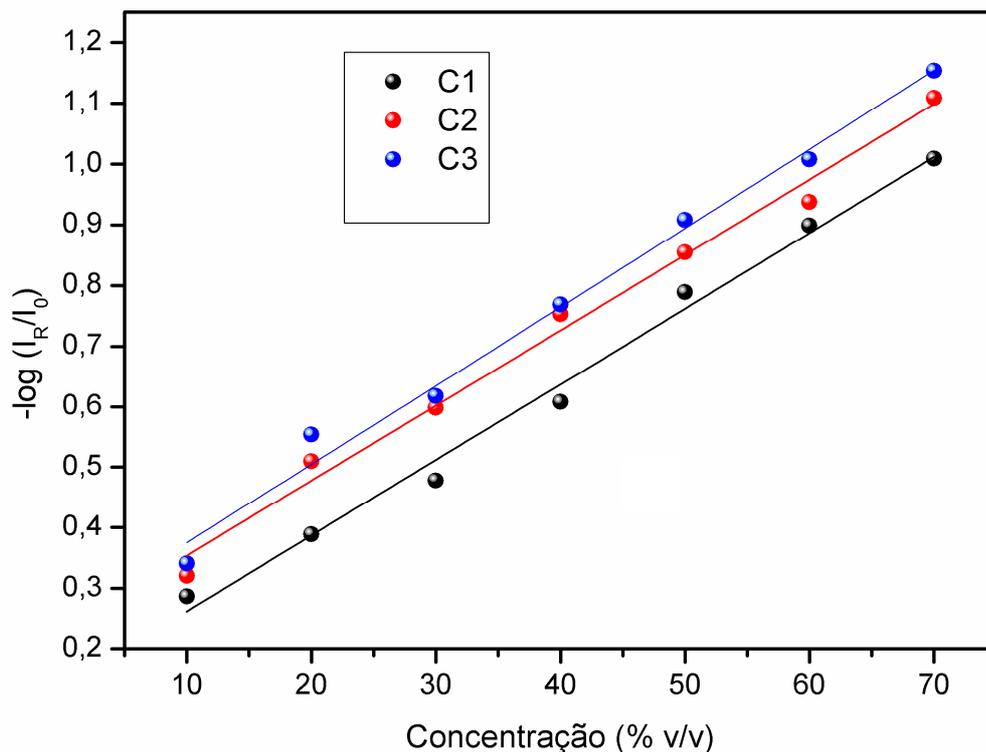


Figura 4. Curvas analíticas construídas para etanol em água, empregando a câmera de 7.2 MP (C2), de 14.1 MP(C3) e o smartphone (C1).

Após a realização dos testes estatísticos, a 95% de confiança, os resultados mostraram que a troca da câmera não apresentou efeito significativo na quantificação de etanol ao

comparar os coeficientes angulares das curvas analíticas, $t_{\text{calculado}} = 1,93 < t_{\text{tabelado}} = 2,18$ para o smartphone e $t_{\text{calculado}} = 1,77 < t_{\text{tabelado}} = 2,18$ para a câmera de modelo diferente.

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de etanol em amostras de cachaças não envelhecidas e envelhecidas. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Determinação do teor de etanol em amostras comerciais de cachaças não envelhecidas (ANE) e envelhecidas (AE) ($n = 3$)

Amostras	Método Proposto % (v/v)	Método de Referência % (v/v)	Erro relativo (%)
ANE1	36,3 ± 1,3	35,3 ± 0,1	+ 2,8
ANE2	34,6 ± 1,1	35,9 ± 0,1	- 3,6
ANE3	38,7 ± 1,2	39,4 ± 0,1	- 1,8
AE1	40,3 ± 1,7	41,7 ± 0,1	- 3,4
AE2	40,7 ± 1,7	40,5 ± 0,1	+ 0,7
AE3	34,9 ± 1,0	35,4 ± 0,2	- 1,4

De acordo com a Instrução Normativa n.13 de 29 de junho de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005), a cachaça deve apresentar graduação alcoólica de 38 a 48 % v/v. Assim, as amostras AN1, AN2 e AE3 apresentaram teores alcoólicos dentro da faixa permitida, já nas demais amostras os teores alcoólicos estavam abaixo do valor mínimo estabelecido pela legislação.

4. CONCLUSÕES

O método desenvolvido para a determinação de etanol em cachaça é promissor, pois todos os parâmetros de validação avaliados apresentaram resultados satisfatórios. Além disso, apresenta algumas vantagens em relação à Picnometria, visto que esta técnica necessita de controle acurado de temperatura, do uso de uma balança de precisão e de análise de uma amostra por vez.

O sistema para captura de imagens é de fácil construção e emprega componentes de baixo custo, ademais, é versátil e robusto, podendo ser empregado em análises *in situ*. Além disso, o método de *spot test* associado à análise de imagens digitais permite o uso de aparatos comuns à sociedade moderna, tais como câmeras digitais, smartphones, webcams, etc. Por

fim, o método pode ser utilizado em análises químicas, clínicas, médicas, forenses, ambientais, sendo uma ferramenta analítica com elevado potencial.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Gaithersburg: A.O.A.C, 2005, chapter 26. p.2.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 jun. 2005.
- BRITO, M. N.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; POLESE, L; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticida: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.
- CACIANO DE SENA, R.; SOARES, M.; PEREIRA, M. L. O.; SILVA, R. C. D.; ROSÁRIO, F. F; SILVA, J. F. C. A simple method based on the application of a CCD camera as a sensor to detect low concentrations of barium sulfate in suspension. **Sensors**, Switzerland, v. 11, n. 1, p. 864-875, 2013.
- CHOODUM, A.; KANATHARANA, P.; WONGNIRAMAİKUL, W.; DAEID, N. N. Using the iPhone as a device for a rapid quantitative analysis of trinitrotoluene in soil. **Talanta**, local de publicação, v. 115, p. 143-149, 2013.
- DAMASCENO, D.; TOLEDO, T. G.; GODINHO, M. S.; SILVA, C.P.; OLIVEIRA. S.B.; OLIVEIRA, A. E. Análise multivariada de imagens na química: um experimento para determinação do pH de águas potáveis. **Quim. Nova**, v. 38, n. 6, p. 836–841, 2015.
- FRANCO, M. O. K.; SUAREZ, W. T.; SANTOS, V. B. Digital Image Method Smartphone-Based for Furfural Determination in Sugarcane Spirits. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 2, p. 508–515, 2017.
- FRANCO, M. O. K.; SUAREZ, W. T.; MAIA, M. V.; SANTOS, V. B. Smartphone Application for Methanol Determination in Sugar Cane Spirits Employing Digital Image-Based Method. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 6, p. 2102–2109, 2017.

- GOMES, M. S.; TREVISAN, L. C.; NÓBREGA, J. A.; KAMOGAWA, M. Y. Uso de Scanner em Espectrofotometria de Absorção Molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1577-1581, 2008.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 04. Rio de Janeiro, jul.2011. DOQ-CGCRE-008.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 01. Rio de Janeiro, mar.2003. DOQ-CGCRE-008.
- LIMA, A. J. B; CARDOSO, M. G; GUIMARÃES, L. G. L. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 845-848, 2009.
- MACHADO, A. M. R. **Carbamato de etila, acroleína e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**: caracterização e quantificação em cachaças provenientes de cana-de-açúcar com adubação nitrogenada e acondicionadas em vidros e "bombonas" de Pead. 2010. 270p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- MASAWAT, P.; HARFIELD, A.; NAMWONG, A. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk. **Food Chemistry**, v. 184, p. 23–29, 2015.
- MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Quantitative Reflectance Spot Test for the Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Preparations. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 15, n. 2, p. 327–330, 2004.
- PACIORNIK, S.; YALLOUZ, A. V.; CAMPOS R. C.; GANNERMAND, D. Scanner Image Analysis in the Quantification of Mercury using Spot-Tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 156-161, 2006.
- PESSOA, K. D.; SUAREZ, W. T.; REIS, M. F.; FRANCO, M. O. K.; MOREIRA, R. P. L.; SANTOS, V. B. A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 310–316, out. 2017.
- PINHEIRO, P. C.; LEAL, M. C.; ARAÚJO, D. A.. Origem, produção e composição química da cachaça. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 18, p. 3-8, 2003.
- SOUZA, F. R.; JÚNIOR, G. F. D.; GARCIA, P. T.; COLTRO, W. K. T. Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 7, p. 1171-1176, 2014.