



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS

**USO DE IMAGENS DIGITAIS PARA DETERMINAÇÃO
QUANTITATIVA DE METANOL EM BEBIDAS ALCOÓLICAS**

JOSIANE AMORIM REIS

ITACOATIARA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS

**USO DE IMAGENS DIGITAIS PARA DETERMINAÇÃO
QUANTITATIVA DE METANOL EM BEBIDAS ALCOÓLICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Valdomiro Lacerda Martins

ITACOATIARA

2017

JOSIANE AMORIM REIS

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R375u Reis, Josiane Amorim
 Uso de Imagens Digitais para Determinação do Teor de Metanol
 em Bebidas Alcoólicas / Josiane Amorim Reis. 2017
 66 f.: il.; 31 cm.

 Orientador: Valdomiro Lacerda Martins
 Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos
 Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

 1. Metanol em bebidas . 2. Scanner na química. 3. Componentes
 RGB. 4. Imagens digitais e espectrofotometria. 5. Método do ácido
 cromotrópico. I. Martins, Valdomiro Lacerda II. Universidade
 Federal do Amazonas III. Título

USO DE IMAGENS DIGITAIS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE METANOL EM BEBIDAS ALCOÓLICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração em Ciências Ambientais.

Aprova em 31 de Julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Valdomiro Lacerda Martins, Presidente
Universidade Federal do Amazonas


Dra. Margarida Carmo de Souza
Universidade Federal do Amazonas


Dr. Alex Martins Ramos
Universidade Federal do Amazonas

À Deus, ao meu pai, à minha mãe,
irmã, ao meu filho e meus amigos,
pela força inestimável que vocês
deram para a realização deste
trabalho

AGRADECIMENTOS

- ✚ A Deus por ser tão grandioso em minha vida, pela minha saúde, pela sabedoria concedida e pelo seu infinito amor.
- ✚ Ao professor Dr. Valdomiro Lacerda Martins pela atenção, orientação, paciência e instrução durante a realização deste trabalho.
- ✚ Ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia- ICET, pelo laboratório de química cedido, assim como pelos materiais e equipamentos utilizados.
- ✚ Aos integrantes do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Para Recursos Amazônicos Dra. Camila Martins de Oliveira, Dr. Pierre André de Souza, Dra. Fabiana Paschoal, Dr. Bruno Sant'ana Sampaio, Dr. Gustavo Hattori, pelos ensinamentos transmitidos.
- ✚ Em especial agradeço ao professor Dr. Alex Martins e a Profa. Dra. Margarida Carmo pelas contribuições no exame de qualificação.
- ✚ As mestrandas Ana Greyce, Elessandra Matos Clóvis pela amizade, companheirismo e apoio desde o início do trabalho.
- ✚ A todos os meus amigos e colegas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho com seu apoio, carinho compreensão e acima de tudo, a amizade e incentivo nos momentos difíceis.
- ✚ Em especial ao meu cônjuge Leondenis Monteiro pela sua paciência amizade e carinho, ao meu pai José Reis pelo apoio nos momentos difíceis e minha mãe Valdemira Amorim por toda força e dedicação e carinho, a minha irmã Josilane Amorim por suas chatices cotidianas, coragem e incentivo que fazem com eu perceba que posso ir mais além.
- ✚ A FAPEAM, pela bolsa concedida.

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a
vida com paixão, perder com classe e vencer com
ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e
a vida é "muito" para ser insignificante.

Augusto Branco

RESUMO

Preocupados com a sustentabilidade os químicos analíticos têm desenvolvido procedimentos de análise química que visam minimizar o consumo de reagentes e amostras aliadas a redução de custos operacionais. Dessa forma, nos últimos anos os métodos Baseados em Imagens Digitais (DIB) têm sido frequentemente usados como uma alternativa para determinações quantitativas em química analítica, principalmente em amostras de interesse ambiental, alimentícios, bebidas e fármacos. Neste trabalho propõe-se um método baseado em imagens digitais para determinação de metanol em bebidas alcoólicas. O sistema proposto usa um scanner para aquisição das imagens geradas de acordo com o sistema RGB (Red, Green, Blue). A determinação do metanol é baseada em uma reação de oxidação do metanol. Após a reação uma imagem é capturada e uma região da imagem é selecionada para decomposição dos pixels nos valores das componentes RGB. A curva analítica é obtida relacionando o logaritmo da razão entre a norma da solução do branco e a norma das soluções de calibração em função das concentrações dessas soluções. O teor de metanol foi determinado em (mL/ 100mL de álcool anidro) nas amostras de cachaça, aguardente, licor de jambú, cupuaçu e cacau. A fim de ilustrar a viabilidade do método proposto, foram realizadas análises em sete amostras de bebidas. Os resultados foram comparados com os obtidos por espectrofotometria e ao se aplicar o teste t emparelhado verificou-se que não há estatisticamente diferença significativa entre os resultados obtidos com os dois métodos para um nível de 95% de confiança.

Palavras chave: Metanol em bebidas, Scanner na química, Componentes RGB, Imagens digitais e espectrofotômetro, Método do ácido cromotrópico.

ABSTRACT

Concerned about sustainability, analytical chemists have developed chemical analysis procedures that aim to minimize the consumption of reagents and samples combined with the reduction of operating costs. Thus, in recent years, Digital Image Based (DIB) methods have often been used as an alternative to quantitative determinations in analytical chemistry, especially in samples of environmental interest, food, beverages and drugs. This work proposes a method based on digital images for the determination of methanol in alcoholic beverages. The proposed system uses a scanner to acquire images generated according to the RGB (Red, Green, Blue) system. The determination of methanol is based on an oxidation reaction of methanol. After the reaction an image is captured and a region of the image is selected for decomposition of the pixels into the values of the RGB components. The analytical curve is obtained by relating the logarithm of the ratio between the white solution standard and the norm of the calibration solutions as a function of the concentrations of these solutions. The methanol content was determined in (mL / 100 mL of anhydrous alcohol) in the samples of cachaça, brandy and liqueur of jambú, cupuaçu and cocoa. In order to illustrate the viability of the proposed method, analyzes were performed on seven beverage samples. The results were compared with those obtained by spectrophotometry and when applying the paired t-test it was found that there was no statistically significant difference between the results obtained with the two methods at a 95% confidence level.

Keywords: Methanol in beverages, Scanner in chemistry, RGB components, Digital images and spectrophotometry, Chromotropic acid method

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma do Processo Produtivo da cachaça e do aguardente.....	21
Figura 2: Desesterificação da pectina e liberação do metanol.....	23
Figura 3: Mecanismo de reação entre formaldeído e ácido cromotrópico proposto por GEORGHIOU e HO (1989).	25
Figura 4: Esquema mostrando os componentes principais de um espectrofotômetro....	26
Figura 5: A focalização da luz pela córnea e o cristalino.	27
Figura 6: Absorção dos comprimentos de onda do espectro visível pelas células fotorreceptoras. Adaptada da referência de Filho e Neto, 1999	28
Figura 7: Representação geométrica do cubo de cores RGB	29
Figura 8: Representação dos modelos de cor RGB e CMYK	30
Figura 9: Sistema de captura de imagens digitais: computador (a), scanner (b), microplaca (c).....	36
Figura 10: Interface do programa ImageJ utilizado para o tratamento e seleção da área das imagens	37
Figura 11: Janela do programa ImageJ apresentando os resultados das análises das componentes RGB da área selecionada.....	38
Figura 12: Procedimento para determinação do metanol	39
Figura 13: Estudo do posicionamento da microplaca sobre o vidro do scanner	44
Figura 14: Estudo do volume adicionado na microplaca.	45
Figura 15: Informações colorimétricas durante leituras consecutivas.....	46
Figura 16: Diferentes regiões selecionadas de uma mesma imagem do padrão de metanol com concentração 0,1%, mostrando a seleção de diferentes regiões.	46
Figura 17: Gráfico dos valores médios individuais das componentes R, G e B das imagens digitais capturadas para as soluções de calibração.....	48
Figura 18: Curvas Analíticas para determinação de metanol em cachaça e aguardente de abacaxi (A e B) e em licores (C e D).....	49
Figura 19: Resíduos deixados pelas curvas analíticas por espectrofotometria (●) e imagens digitais (◆).	50
Figura 20: Imagens da microplaca com as soluções da curva analítica (A) e amostras de cachaça e aguardente de abacaxi (B), soluções da curva e amostras de licores (C).....	53
Figura 21: Espectro de absorção dos padrões metanol e do branco.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites máximos de concentração de produtos secundários presentes na cachaça.....	19
Tabela 2: Equações da análise de variância ANOVA para ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados.	40
Tabela 3: Resultados de média, moda e desvio padrão (SD) dos canais RGB da mesma imagem, da seleção de áreas sem interferência da borda (C) e com interferência da borda (B, D, E, F), obtidas do padrão de metanol com concentração 0,1% (Figura 13).	47
Tabela 4: Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas para ANOVA.	51
Tabela 5: Anova para o modelo linear das curvas de calibração para determinação de metanol.	52
Tabela 6: LOD e LOQ para os métodos espectrofotométrico e imagens digitais	52
Tabela 7: Resultados da determinação do teor de metanol em amostras de cachaça, aguardente de abacaxi e licores de cacau, cupuaçu e jambú.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância

DIB: Digital Image-Based (Baseada em imagens digitais)

IBRAC: Instituto Brasileiro de Cachaça

IAL: Instituto Adolfo Lutz

MAPA: Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento

PIXEL: Menor elemento de uma imagem

RGB: Red, Green, Blue (Vermelho, Verde, Azul)

UV-Vis: Ultravioleta visível

µL: Microlitro

CMY: Cyan, Magenta, Yellow (Ciano, Magenta, Amarelo)

CMYK: Cyan, Magenta, Yellow, Black (Ciano, Magenta, Amarelo, Preto)

LOD: Limit of detection (limite de detecção)

LOQ: Limit of quantitation (limite de quantificação)

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO 1</i>	15
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Caracterização do problema e proposta de solução	16
1.2 Objetivos	17
1.2.1 Objetivo geral.....	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	17
1.3 Fundamentação Teórica	18
1.3.1 Bebidas fermento-destilladas	18
1.3.2 Importância da determinação do metanol em bebidas	22
1.3.3 Métodos para determinação de metanol em etanol	23
1.3.4 Método de referência para determinação de metanol em bebidas	25
1.3.5 Imagens digitais.....	26
1.3.6 Sistema de cores RGB.....	28
1.3.7 Uso do scanner para aquisição das imagens.....	31
1.3.8 Imagens digitais em química analítica	31
<i>CAPÍTULO 2</i>	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Reagentes, amostras e soluções	35
2.2 Equipamentos utilizados	35
2.3 Sistema para aquisição das Imagens Digitais	35
2.4 Software para tratamento das Imagens	36
2.5 Construção da curva de calibração para determinação do teor de metanol	38
2.6 Procedimento para avaliação de desempenho dos métodos	40
2.7 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ).....	41
2.8 Testes estatísticos para validação dos resultados analíticos	42

2.7.1 Aplicação do teste t emparelhado baseado no teste de hipótese	42
<i>CAPÍTULO 3</i>	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 Estudo dos parâmetros operacionais	44
3.2 Validação das curvas analíticas para determinação do metanol	48
3.3 Determinação de metanol usando o método espectrofotométrico e o método proposto	54
<i>CAPÍTULO 4</i>	57
4 CONCLUSÃO	58
<i>CAPÍTULO 5</i>	60
5 REFERÊNCIAS	61

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS



1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema e proposta de solução

Mundialmente a indústria de bebidas alcoólicas apresenta importância significativa em diferentes países. No Brasil, Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Alimentação – ABIA (2017) a indústria faturou em 2016, R\$ 117,0 bilhões o que equivale a 1,9 % do PIB brasileiro. Neste setor, a busca por novos sabores e a exigência dos consumidores por produtos de qualidade impulsionam os investimentos. (VIANA, 2017).

No estado do Amazonas a produção de diferentes bebidas alcoólicas como vinhos, aguardentes e licores a partir de diversas frutas e hortaliças como o Açaí, Cupuaçu, Abacaxi, Jambú e Cacau tem ganhado destaque no mercado, tornando se uma tecnologia muito importante para o desenvolvimento agroindustrial da região amazônica (OLIVEIRA, *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; PARENTE, 2014).

No processo produtivo destas bebidas há geração de compostos secundários que se formam juntamente com o álcool etílico durante o processo de fermentação. No entanto, alguns compostos são indesejáveis à bebida devido, principalmente, as suas propriedades tóxicas, dentre estes destaca-se o metanol, constituinte naturalmente presente nas bebidas alcoólicas (ZACARONI *et al.*, 2011).

A ingestão de bebidas alcoólicas com concentrações elevadas de metanol pode causar intoxicação, que varia desde dor de cabeça, náuseas e vômitos até cegueira e morte (NAGATO, *et al.*, 2001). O limite máximo segundo a Portaria nº 126 de 24 junho de 2005 que estabelece o regulamento de avaliação de conformidade é de 0,25 mL/100mL de álcool anidro, para cachaça e 20 µg/100mL de álcool anidro para aguardente de fruta.

A característica das bebidas fermento-destiladas está relacionada à presença e a concentração destes compostos secundários, logo, a obtenção de um produto de boa qualidade necessita da realização de análises físico-químicas, as quais são importantes para o controle de qualidade e certificação do produto que é fundamental para garantir a saúde do consumidor (VIANA, 2016).

Nos últimos anos novos métodos usando imagens digitais vem sendo propostos como uma alternativa para o controle de qualidade de alimentos (MASAWAT *et al.*, 2015; DOMINGUEZ e CENTURIÓN, 2015) bebidas alcólicas (BENEDETTI *et al.*, 2015), fármacos (SOUZA *et al.*, 2014) e também para a quantificação de analitos de interesse ambiental (DAMASCENO *et al.*, 2015; PASSARETTI FILHO *et al.*, 2015). Essa nova

tendência oferece algumas vantagens como baixo consumo de amostra, curto tempo de análise, portabilidade, capacidade de integração de múltiplas etapas analíticas em um único sistema (NETO et al., 2016; LIMA et al., 2016).

As análises por imagens digitais podem ser obtidas por diversos aparelhos, como câmeras digitais, scanners, *webcams*, microscópio óptico portátil e celulares (BENEDETTI et al., 2015; GOMES et al., 2008; SOUZA et al., 2014). Este método caracteriza-se por ser uma alternativa de baixo custo, em relação aos métodos tradicionais de referência. Nas análises por imagens digitais a cor digitalizada fornece valores numéricos que podem ser utilizados de modo análogo à espectrofotometria de absorção molécula (GODINHO et al., 2008; LYRA et al., 2011).

Neste contexto, o presente trabalho busca contribuir para o desenvolvimento da Ciência e Tecnologia dos Alimentos com enfoque para a área de Tecnologia de Bebidas, no tocante ao desenvolvimento de uma metodologia baseada em imagens digitais para a determinação do teor de metanol em cachaça, aguardentes e licores de frutas da Amazônia, comparando o mesmo, com o método espectrofotométrico. Outro ponto importante nesta metodologia é o fato de que com ela é possível minimizar o consumo de reagentes químicos com o uso de microplacas com 96 micropoços (volume máximo de 400 μ L cada poço), contribuindo assim, com o meio ambiente e, conseqüentemente, atendendo os anseios da química verde com perspectivas sustentáveis.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método analítico simples e de baixo custo instrumental, baseado em imagem digital (DIB) obtida com *scanner*, que possibilite a determinação do teor de metanol em cachaça, aguardentes e licores de frutas da Amazônia.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar o teor de metanol em amostras de aguardente, licor e cachaça.
- Construir curvas de calibração baseadas nos valores de cor obtidos a partir dos componentes vermelho-verde-azul (RGB) das imagens digitais.

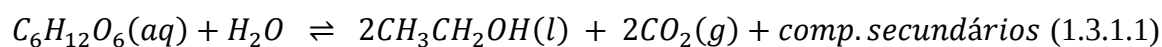
- Relacionar as imagens digitais com as concentrações das amostras de cachaça, determinando a concentração para a espécie em estudo.
- Avaliar o desempenho da metodologia proposta em termos das figuras de mérito e validação do método.

1.3 Fundamentação Teórica

1.3.1 Bebidas fermento-destiladas

Segundo o Decreto nº 6.871 de 2009, bebida é o produto de origem vegetal industrializado ou a polpa de fruta destinado à ingestão humana em estado líquido, sem finalidade medicamentosa ou terapêutica, os preparados sólidos e líquidos para bebida, a soda e os fermento-destilados alcoólicos de origem animal e as bebidas elaboradas com a mistura de substâncias de origem vegetal e animal (Brasil, 2009).

As bebidas alcoólicas podem ser divididas em dois grupos principais, de acordo com o método de produção, podendo ser fermentadas (como vinhos e cervejas) ou destiladas (aguardentes em geral). Em qualquer um dos casos, o etanol está presente, o que caracteriza as bebidas em alcoólicas e não alcoólicas. Na produção de qualquer bebida alcoólica, independente se fermentadas ou destiladas, o processo fermentativo é o primeiro passo da fabricação. Esse processo envolve a transformação da glicose ($C_6H_{12}O_6$) em etanol (CH_3CH_2OH) e dióxido de carbono (CO_2) a partir da ação de microrganismos (bactérias ou leveduras), em condições anaeróbias reação 1.3.1.1 (FERREIRA e MONTES 1999).



Durante o processo de fabricação destas bebidas, ocorrem diversas reações químicas que proporcionam a incorporação de grande variedade de compostos a essa, sendo responsáveis junto a todo o processo pela qualidade da bebida. Dentre estes compostos, citam-se os fenólicos, que atuam como antioxidantes, combatendo os radicais livres, evitando diferentes doenças, sendo benéficos para saúde (MENDONÇA et al., 2014).

1.3.1.1 Cachaça: Controle de qualidade e Legislação

O Brasil é um dos maiores produtores de cachaça do mundo, porém sua exportação é bastante limitada, prejudicando o desenvolvimento econômico dos estados e consequentemente do país. A principal limitação na exportação ocorre devido à presença de contaminantes indesejáveis. Logo, cada vez mais vem se exigindo que o processo de fabricação seja baseado em práticas criteriosamente determinadas para obtenção de um produto padronizado e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais (CARDOSO, 2013 apud MEDONÇA et al, 2014).

A cachaça deve se enquadrar no Padrão de Identidade e Qualidade, com base na Portaria nº 126, de 24 de junho de 2005, que estabelece o regulamento de avaliação da conformidade da cachaça objetivando os procedimentos para certificação, garantindo um nível adequado de confiança, quanto à conformidade do produto em relação às normas e regulamentos aplicáveis. A Tabela 1 mostra a tolerância máxima permitida para os constituintes da cachaça.

Tabela 1: Limites máximos de concentração de produtos secundários presentes na cachaça.

Item Analisado	Tolerâncias
Grau alcoólico	38% a 48 % volume a 20 °C
Cobre	Máximo 5mg/ litro de produto
Acidez volátil (expresso em ácido acético)	Máximo 0,150g/100 ml (álcool anidro)
Aldeídos (expresso em aldeído acético)	Máximo 0,030g/100 ml (álcool anidro)
Furfural	Máximo 0,005g/100 ml (álcool anidro)
Álcoois superiores	Máximo 0,360g/100 ml (álcool anidro)
Soma dos componentes secundários	0,200 a 0,650g/100 ml (álcool anidro)
Metanol (Álcool metílico)	Máximo 0,25ml/100 ml (álcool anidro)
Carbamato de Etila	Máximo 0,150mg/L

A cachaça segundo a Instrução Normativa nº 13, de 30 de junho de 2005, é definida como sendo toda aguardente de cana-de-açúcar, que apresenta graduação alcoólica entre trinta e oito e quarenta e oito em v/v, a 20 °C, quando obtida do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6 g L⁻¹, expressas em sacarose (BRASIL, 2005b).

1.3.1.2 Aguardentes e licores de frutas amazônicas

O elevado índice de perdas na comercialização de frutas faz com que apenas uma pequena parcela chegue à mesa do consumidor. A utilização de sucos de frutas para elaboração de bebidas alcoólicas é uma forma de aproveitamento com o intuito de evitar o desperdício quando não se tem um consumo imediato, também agregando valor às bebidas regionais. A partir dos fermentados de frutas, por meio de destilação se obtêm as aguardentes de frutas sendo necessário à adaptação do processo de produção de acordo com a matéria prima (ALVARENGA *et al.*, 2013)

Conforme o decreto 6.871 de 4 de Junho de 2009. Aguardente de fruta é a bebida com graduação alcoólica de trinta e seis a cinquenta e quatro por cento em volume, a 20 °C, obtida de destilado alcoólico simples de fruta, ou pela destilação de mosto fermentado de fruta. A destilação deverá ser efetuada de forma que o destilado tenha o aroma e o sabor dos elementos naturais voláteis contidos no mosto fermentado, derivados do processo fermentativo ou formados durante a destilação.

Segundo Oliveira e colaboradores (2012) a produção de aguardente é importante para o desenvolvimento agroindustrial da região amazônica. Existem muitos estudos sobre análises e controle de qualidade da aguardente-de-cana, entretanto há pouco na literatura sobre as aguardentes de frutas.

Os frutos do cupuaçuzeiro apresentam grande potencial para a elaboração de aguardentes, devido principalmente às suas características sensoriais exóticas. Esta planta é oriunda da floresta amazônica, e desde muito tempo os seus frutos têm sido utilizados para alimentação da população ribeirinha e de classe sociais mais baixas desta região (PEREIRA *et al.*, 2014)

O licor é outra bebida que pode ser produzida a partir de diferentes frutas e segundo a legislação brasileira. Decreto nº 6.871 de 4 de Junho de 2009, licor é a “bebida com graduação alcoólica de 15 a 54 % de (v/v), a 20 °C, e um percentual de açúcar superior a 30 g/L, elaborado com álcool etílico potável ou destilado simples de origem agrícola, ou bebidas alcoólicas adicionadas de extrato ou substâncias de origem vegetal ou animal, substâncias aromatizantes, saborizantes, corantes e outros aditivos permitidos por lei”

1.3.1.3 Produção de cachaça, aguardentes e licores

A **figura 1**, mostra o processo produtivo de cachaça e aguardentes que pode ser resumido conforme os seguintes estágios: preparação da matéria prima, seguida da extração do caldo, preparo do mosto, fermentação e posteriormente à destilação, do qual, por meio de uma coluna de destilação, se extrai a cachaça e o aguardente (BOGUSZ JUNIOR et al., 2006).

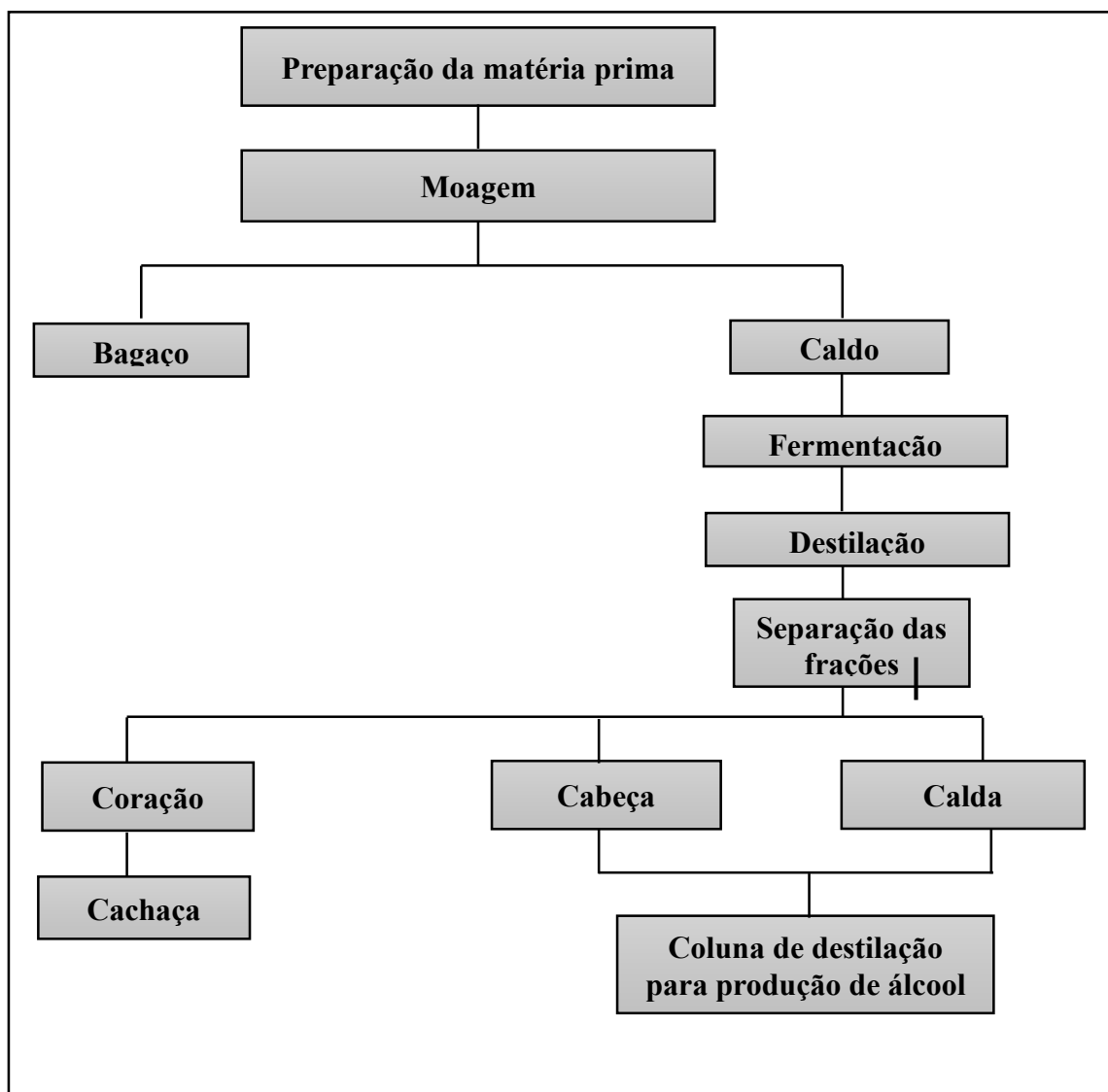


Figura 1: Fluxograma do Processo Produtivo da cachaça e do aguardente

No processo de produção **figura 1**, o caldo é inicialmente fermentado na presença de O_2 , que após consumido pela levedura em seu processo de reprodução, inicia a fermentação anaeróbia, etapa na qual as enzimas das leveduras presentes no mosto transformam o açúcar em etanol, com desprendimento de CO_2 , nesta reação bioquímica a enzima invertase quebra a

sacarose em glicose e frutose, que depois são degradadas à etanol e CO₂ (PERAZOLLI *et al.*, 2013).

Após a fermentação ocorre o processo de destilação. A primeira fração destilada, é chamada de cabeça que corresponde a cerca de 10% do volume total destilado, nela é encontrada a maior parte dos voláteis como o metanol (ZACARONI *et al.*, 2011). O coração é a parte utilizada na fabricação da cachaça, corresponde a cerca de 80% do destilado, e é constituído basicamente pelo etanol e alguns aldeídos e ésteres. A última parte é a cauda, formada por ácidos e álcoois superiores, correspondente a cerca de 10% do volume total.

O licor é produzido normalmente a partir de três ingredientes: álcool, xarope de açúcar e aromatizante, podendo, em alguns casos, lhe ser adicionado corante e aguardentes. O preparo de licores de frutas, em geral, o processo está baseado na maceração ou na infusão de frutas em álcool potável, ou na destilação de macerados aromáticos com base de frutas. Há de se considerar que, na elaboração de licores, a qualidade do produto final depende não só das matérias-primas empregadas, mas também do processo de preparação (PENHA, 2006).

1.3.2 Importância da determinação do metanol em bebidas

O metanol (CH₃OH) é o álcool alifático mais simples. É um líquido incolor livremente miscível com água e outros álcoois, transparente, volátil e altamente inflamável. O metanol é produzido a partir da destilação de madeira. Este álcool simples é constituinte de muitos solventes disponíveis comercialmente que encontram aplicações extensivas tanto em indústrias como em casa (YAN-YAN ZHAN, et al ,2010).

Este álcool é absorvido por inalação e por exposição oral. Os envenenamentos ocorrem devido a absorção através da pele e inalação no ar, mas a maioria das intoxicações desastrosas estão relacionadas à ingestão do próprio metanol ou bebidas contendo metanol (VASKOVA, 2014)

Incidências de contaminação por metanol em bebidas tradicionais aumentaram globalmente e causaram morte em alguns países como Nigéria, Índia e Indonésia. A fonte de contaminação não foi claramente estabelecida na maioria dos países. Houve especulações que os vendedores sem escrúpulos poderiam ter adulterado as bebidas com metanol. Porém, o mais provável que o mesmo tenha sido produzido por microrganismos durante a fermentação tradicional (OHIMAIN, 2016).

A Produção de metanol em bebidas tradicionalmente fermentadas pode estar ligada às atividades de pectinase. Estudos mostraram que algumas bebidas fermentadas tradicionais são propensas a contaminação inclusive cachaça e vinhos de uva (OHIMAIN, 2016).

O Instituto Adolfo Lutz, no período de 1976 a 1996, registrou quatro episódios de intoxicações graves associadas à ingestão de bebidas. Em todos esses casos, altos níveis de metanol foram confirmados pelas análises, em amostras de bebidas clandestinas ou elaboradas sem as boas práticas de fabricação (BADOLATO, E.S.G.; DURAN M. C, 2000).

O metanol é originado da degradação da pectina um polissacarídeo presente na cana de açúcar. A molécula de pectina é um composto formado pela associação de moléculas de ácido galacturônico, que possuem fragmentos de moléculas de metanol, as quais são liberadas durante o processo de fermentação e é facilmente absorvido pelo organismo e se acumula em tecidos como o sangue, músculo e olhos (CARUSO et al, 2010).

A degradação pode ocorrer pela reação de desesterificação com liberação de metanol e formação de pectatos em meio ácido **figura 2**. (CANTERI, et al., 2012)

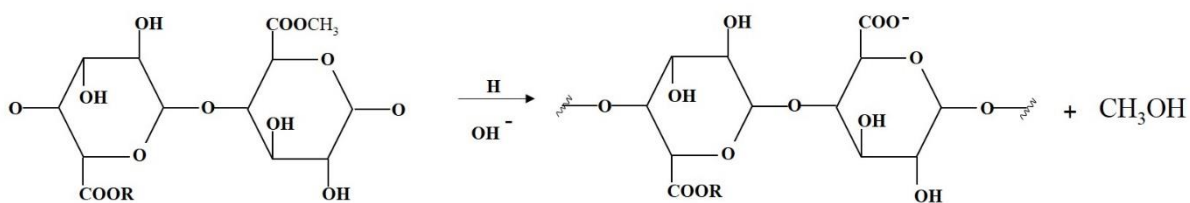


Figura 2: Desesterificação da pectina e liberação do metanol

Por ser um contaminante orgânico altamente tóxico, o metanol tornou-se alvo de muitas pesquisas, visando estas atenderem os padrões de identidade e a qualidade da bebida para que não ofereçam riscos à saúde. Em pequenas quantidades pode causar dor de cabeça, vertigem, náusea e vomito, o consumo de aproximadamente 20 mL causa cegueira e 60mL é fatal se não for tratado (PÉRES *et al.*, 2012).

No organismo, o metanol é oxidado a ácido fórmico e posteriormente a CO_2 , provocando uma acidose grave (diminuição do pH sanguíneo), afetando o sistema respiratório podendo levar ao coma e até mesmo à morte. Sua ingestão, mesmo em quantidades reduzidas, em longos períodos de consumo, pode ocasionar cegueira (MAIA *et al.* apud CARDOSO *et al.*, 1998).

1.3.3 Métodos para determinação de metanol em etanol

Alguns métodos analíticos são usados para detecção e quantificação de metanol em etanol começando pela cromatografia gasosa (CARUSO et al, 2010; NAGATO e ALABURDA, 2010; NAGATO et al, 2001). Os métodos cromatográficos são bastante utilizados, mas atestam contra si o fato de requererem analistas bem treinados, serem onerosos em termos instrumentais e usarem solventes orgânicos, gerando resíduos químicos que merecem atenção especial no descarte. Alternativa intermediária seria o uso da espectrofotometria, com destaque para o método do ácido cromotrópico, o qual apresenta rapidez, simplicidade, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade e baixo custo relativo, quando comparado aos demais procedimentos existentes na literatura (FAGNANI et al, 2009).

Determinar metanol em etanol sempre foi um desafio e uma meta para os químicos, principalmente para aplicar esses conhecimentos a bebidas alcólicas. Diversos foram, os problemas encontrados principalmente por causa da similaridade química entre o metanol e o etanol e a presença de interferentes em amostras reais. Os métodos desenvolvidos sempre esbarravam em questões como seletividade e sensibilidade (MARTINS et al., 2015).

Em 1910, Denigés, propôs um método para detectar metanol em etanol com uma boa precisão, atendendo os requisitos desejados. Este método não gerava formaldeído a partir de etanol. Nessa metodologia o etanol era oxidado apenas para acetaldeído, o qual não gerava cor na presença do reagente de Schiff (solução de rosanilina e sulfito em ácido sulfúrico), em função da alta acidez do meio. Seu método foi melhorado por Chapin em 1921, o qual virou referência quanto a metodologia qualitativa e quantitativa para determinação de metanol em etanol (MARTINS et al, 2015).

Na metodologia de Denigés, a detecção de metanol na presença de etanol pode ser dividido em três etapas: I) oxidação lenta da amostra diluída na presença de solução de permanganato de potássio com ácido fosfórico, formando apenas formaldeído a partir do metanol; II) posterior adição de uma solução de ácido oxálico acidificada com ácido sulfúrico, para consumir o excesso de permanganato e formar o íon Mn^{2+} , deixando a solução incolor; III) adição do reagente de Schiff na amostra tratada, para observar a formação ou não formação de cor na amostra. O reagente de Schiff reage com formaldeído, gerando uma cor azul-violeta, a qual varia com a concentração de formol na amostra e com o tempo. O reagente de Schiff não reage com o acetaldeído formado a partir da oxidação do etanol, de modo que, na ausência de metanol a amostra permanece incolor (MARTINS et al, 2015).

O método do ácido cromotrópico **figura 3**, foi proposto por Georghiou e Ho, neste duas moléculas do ácido cromotrópico são unidas quando reagem com uma de formaldeído, em meio fortemente ácido (H_2SO_4) e sob aquecimento em banho-maria, através de uma ponte metilênica.

Esta estrutura intermediária é desidratada numa etapa seguinte, na posição dos grupos (-OH) fenólicos, formando-se um heterociclo. Por último, uma etapa de oxidação produz a estrutura colorida de interesse analítico, um composto dibenzoxantílico monocatiônico, planar e aromático, responsável por uma banda de absorção da luz visível na região entre 570-580 nm (FAGNANI; PEZZA e PEZZA, 2009).

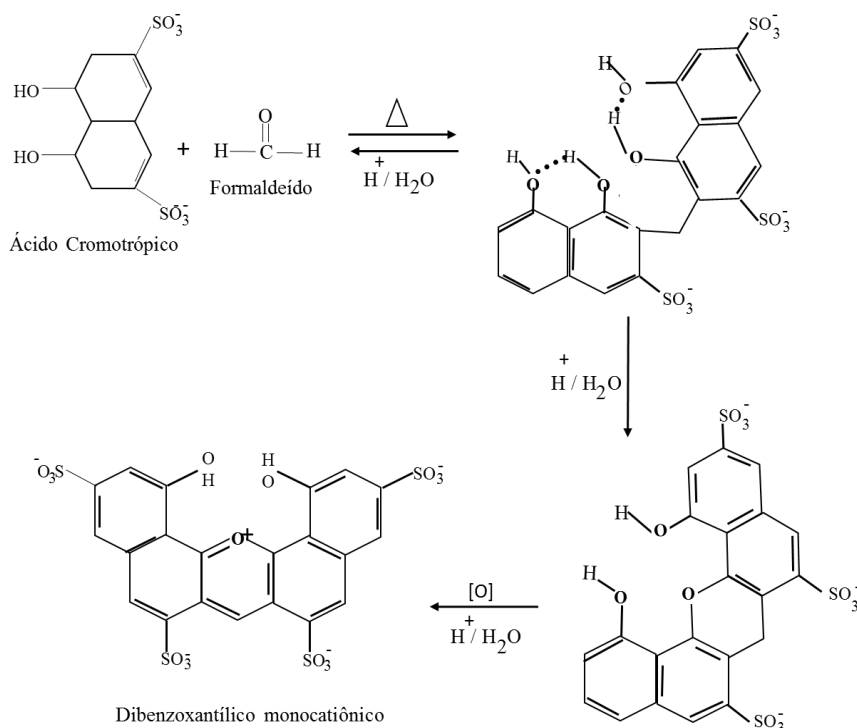


Figura 3: Mecanismo de reação entre formaldeído e ácido cromotrópico proposto por GEORGHIOU e HO (1989).

1.3.4 Método de referência para determinação de metanol em bebidas

A maneira mais comum de determinar a quantidade de uma substância que pode formar coloração é através do uso de espectrofotômetros que operam nas regiões do ultravioleta com comprimento de onda entre 180 e 400 nm; e luz visível entre 400 e 780 nm (SKOOG et al., 2006).

Teoricamente, qualquer equipamento capaz de detectar variação da intensidade da coloração de uma solução é capaz de possibilitar medidas quantitativas quando a coloração da amostra é comparada com a coloração de soluções de referência com concentrações conhecidas do analito (GOMES et al., 2008).

Esses equipamentos apresentam basicamente uma fonte contínua (por exemplo, uma lâmpada de tungstênio) que emite radiação, um monocromador para seleção de uma faixa estreita de comprimentos de onda que atingem a solução contendo o analito, um compartimento

para posicionamento da amostra e um dispositivo para detecção da medida da intensidade de radiação **figura 4**.

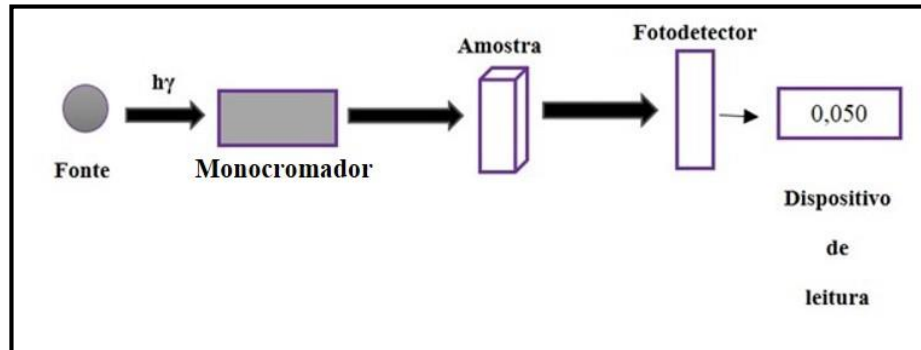


Figura 4: Esquema mostrando os componentes principais de um espectrofotômetro

Uma substância colorida absorve seletivamente comprimentos de onda da região visível do espectro eletromagnético. A coloração resultante é a cor complementar e é composta pela combinação dos comprimentos de ondas restantes. Durante o processo de absorção a energia é seletivamente transferida para moléculas e íons e promove elétrons de valência do estado fundamental para estados mais energéticos (SKOOG et al, 2006).

1.3.5 Imagens digitais

1.3.5.1 O sistema visual humano

O sistema visual humano é composto pelo olho, que captura a luz e a transforma em sinais elétricos, e o cérebro, que processa esses sinais e os interpreta como visão (FILHO; NETO 1999). A visualização de todo o espectro de cores é possibilitada pela interação entre os três elementos da cor: luz, objeto e observador.

A luz refletida pelo objeto ao atingir o globo ocular é capturada pela córnea, e então atinge a íris, que controla a quantidade de luz que penetra no olho através da pupila. Após atingir a córnea e ter sido selecionada pela íris, a radiação eletromagnética chega ao cristalino, que, passando pelo vítreo, focalizando nitidamente sobre a retina, formando a imagem invertida do objeto, como ilustra a **figura 5** (LEÃO, 2005).

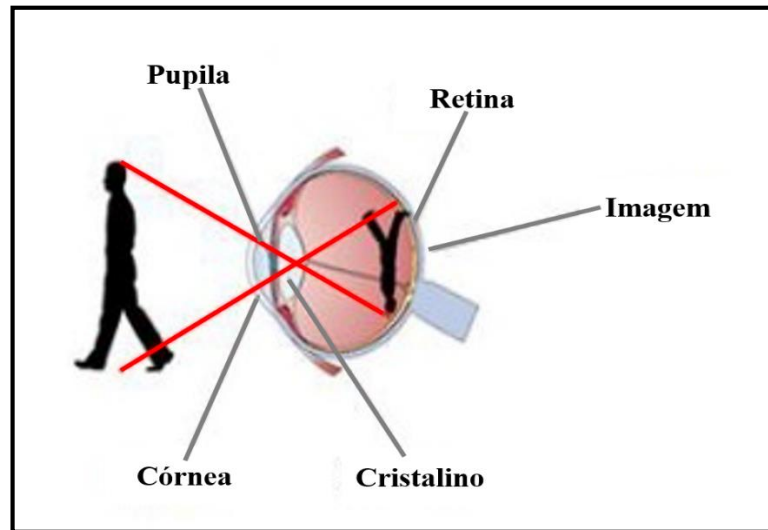


Figura 5: A focalização da luz pela córnea e o cristalino. Adaptada da fonte: <http://www.drvisao.com.br/imagens/olho.jpg>. Acessado: 15 de novembro de 2016.

A membrana mais interna do olho é a retina, situada na sua parede posterior. Quando o olho focaliza uma cena, a imagem correspondente é projetada sobre a retina, na qual estão distribuídos dois tipos de receptores de luz discretos: os cones e os bastonetes. Os cones são em número de 6 a 7 milhões em cada olho e estão localizados na porção central da retina, chamada de fóvea. Eles são altamente sensíveis a cor e cada qual está conectado a uma terminação nervosa dedicada. O número de bastonetes é bastante maior, cerca de 75 a 150 milhões, distribuídos em toda a superfície da retina. Os bastonetes servem para dar uma visão geral da imagem captada no campo de visão (FILHO; NETO, 1999).

Existem três tipos de cones, que diferem entre si pela sensibilidade, as faixas de comprimentos de onda curtos (S), médios (M) e longos (L), do espectro visível, denominados de cone azul, verde e vermelho, respectivamente, pois correspondem às faixas de comprimentos de onda das cores azul, verde e vermelho. Todas as cores do espectro visível percebidas pelo olho humano derivam da combinação dessas três cores primárias aditivas. A Figura 3 apresenta a sensibilidade relativa de cada um dos tipos de células cone para todo o espectro de luz visível.

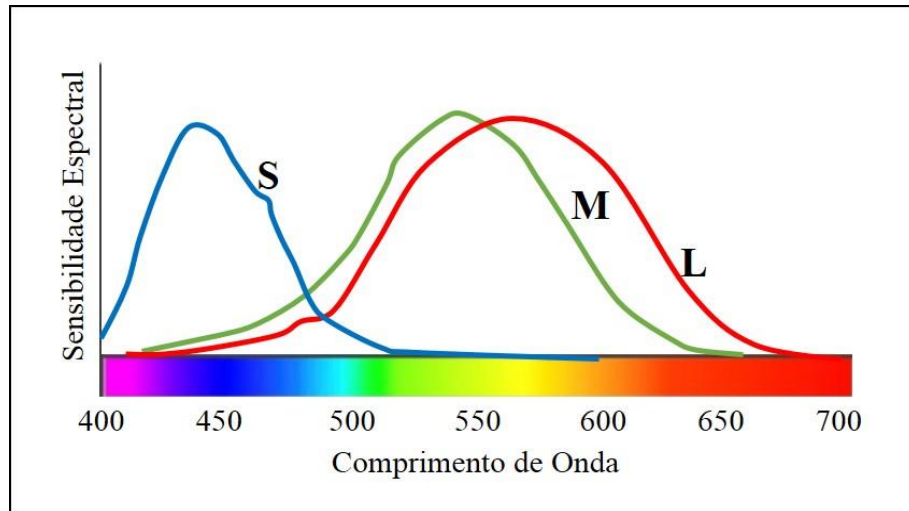


Figura 6: Absorção dos comprimentos de onda do espectro visível pelas células fotorreceptoras. Adaptada da referência de Filho e Neto, 1999

Como mostra a **figura 6** os cones azuis absorvem comprimentos de onda mais curtos, na faixa da luz azul, com pico de absorção em 435,8nm, já os cones verdes absorvem comprimentos de onda médios, com pico em aproximadamente, 546,1nm. E os cones vermelhos absorvem em faixas de comprimentos de onda mais longos com maior absorção em 700nm (MARQUES, 1999).

1.3.6 Sistema de cores RGB

Para Gomes e colaboradores (2008) o padrão RGB é um modelo somatório das cores que usa os valores de três cores primárias para fornecer a cor exibida, onde em uma fotografia, o olho humano associa os comprimentos de onda refletidos com os padrões de cores e o cérebro humano interpreta as imagens.

Diversos modelos podem ser abordados para o estudo das cores. A maioria dos métodos analíticos baseados no uso de imagens digitais emprega o modelo de cores RGB (do inglês, Red, Green e Blue) que utiliza as cores vermelha, verde e azul, o conceito fundamental é que todas as demais cores são baseadas nas várias combinações destas três cores percebidas no espectro, o que permite a aquisição de cerca de 16,7 milhões de cores diferentes (PACIORNIK *et al.*, 2006). O espaço de cor RGB pode ser melhor visualizado a partir da representação geométrica desse sistema em um espaço tridimensional cúbico conhecido como cubo de cor, **figura 7**.

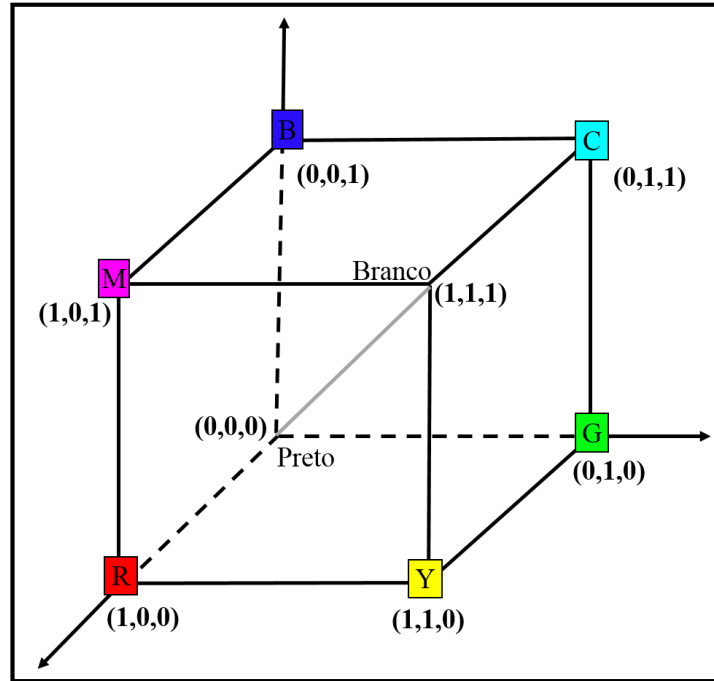


Figura 7: Representação geométrica do cubo de cores RGB

Neste cubo, as cores vermelha, verde, azul, magenta, ciano e amarelo são representadas nos vértices do cubo, com intensidades variando de 0 a 255 (8 bits por canal) – ou, de 0 a 1, respectivamente, como valores normalizados. Na origem (0, 0, 0), encontra-se o preto puro, ou ausência de cor, a qual não possui contribuição de nenhuma das cores primárias; e na extremidade oposta, encontra-se o branco, ou máximo de cor, a qual recebe a contribuição das três cores em suas intensidades máximas (255, 255, 255; ou 1, 1, 1). Na diagonal, encontra-se a escala de cinza, formada pela adição das três cores nas mesmas proporções ($R = G = B$).

Matematicamente, no modelo RGB **figura 8a**, as cores são dadas pela **Equação 1.1**.

$$C = r \cdot R + g \cdot G + b \cdot B \quad (1.1)$$

onde R, G e B é a intensidade de tom das cores vermelho, verde e azul, que compõem a cor C, e r, g e b são os coeficientes tricromáticos, que fornecem a proporção percentual das cores vermelho, verde e azul, e são dados pelas **Equação 1.2**, **Equação 1.3** e **Equação 1.4**, respectivamente.

$$r = \frac{R}{R + G + B} \quad (1.2)$$

$$g = \frac{G}{R + G + B} \quad (1.3)$$

$$b = \frac{R}{R + G + B} \quad (1.4)$$

Os coeficientes r , g e b são normalizados, portanto, a soma dos três coeficientes é dada pela **Equação 1.5**.

$$r + g + b = 1 \quad (1.5)$$

Segundo Benedetti (2013) as análises baseadas em imagens digitais em química usam o padrão RGB figura 6a, como resposta analítica pelo fato de que os valores de cor RGB variam proporcionalmente com a cor em uma reação colorimétrica. E este efeito é associado com a variação da concentração do analito.

Um segundo modelo de cor conhecido pelas siglas CMY **figura 8b** ou CMYK, é baseado nas cores usadas nas impressoras, Ciano, Magenta e Amarelo – do inglês (Cyan, Magenta e Yellow). É chamado de modelo subtrativo porque as demais cores são obtidas através da absorção sucessiva de luz pelas camadas de tinta (PACIORNIK *et al.*, 2006). Quando a luz branca incide sobre tintas translúcidas, certos comprimentos de onda são absorvidos, enquanto outros são refletidos para os olhos (YAM, 2004).

A combinação das cores primárias CMY deveriam absorver todos os comprimentos de onda da luz e, assim, produzir a cor preta. No entanto, isso não acontece, e um tom castanho escuro é produzido (YAM, 2004). Isso se deve ao fato de as tintas utilizadas para impressão não serem totalmente puras. Sendo assim, uma quarta cor, a cor preta (do inglês, black) se faz necessário para produzir um preto verdadeiro, ou preto puro.

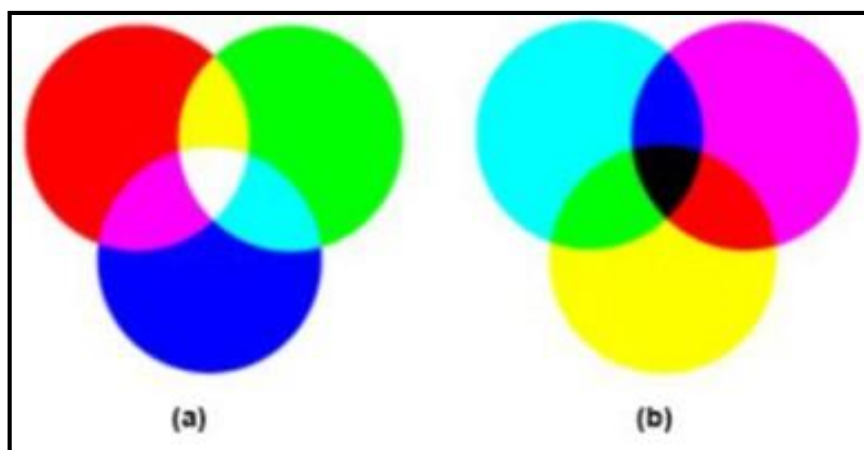


Figura 8: Representação dos modelos de cor RGB e CMYK

1.3.7 Uso do scanner para aquisição das imagens

O scanner é um aparelho de leitura ótica que permite converter imagens, fotos ilustrações e textos em papel, num formato digital. A digitalização de uma imagem por um scanner geralmente usa uma barra de radiação que atinge a imagem, transferindo radiação suficiente para o sensor. Com a reflexão da radiação, o sensor pode reconstituir e armazenar a imagem digital (GOMES et al., 2008).

1.3.8 Imagens digitais em química analítica

Machado e colaboradores (2004) definiram imagem digital como uma série de dígitos binários (0 e 1), ou seja, uma sequência desses dois números que, então, se “transformam” numa estrutura quadriculada, denominada pixel, que representam uma intensidade de luz e de cor, onde todos estes pixels formam a imagem digital.

Yam e colaboradores (2004) desenvolveram um método simples que utiliza a combinação de câmera digital, computador e software de tratamento gráfico para medir e analisar a cor da superfície de produtos alimentícios. As imagens obtidas dos produtos alimentares podem ser vistas na tela de um computador ou impressos em papel para análise qualitativa de cor e estrutura.

Maleki e colaboradores (2004) utilizaram imagens digitais para determinar de forma simultânea Al(III) e Fe(III), presentes em ligas usando cromo azurol S (CAS) como reagente cromogênico.

Ao se utilizar um dispositivo baseado no sistema RGB para aquisição das imagens, cada pixel resulta da combinação das cores vermelho, verde e azul em diferentes proporções e intensidades. Pode formar qualquer cor, variando do preto na ausência de qualquer radiação ao branco quando se tem a contribuição máxima das intensidades de R, G e B (MIOT *et al.*, 2006).

Gaião e colaboradores (2006) determinaram HCl, H₃PO₄ e alcalinidade total em água mineral e da torneira utilizando uma titulação baseada em imagens digitais adquiridas por uma câmera (webcam) cujos dados foram tratados utilizando-se o modelo de cores RGB. Os autores concluíram que as imagens digitais são viáveis para aplicações analíticas, principalmente, quando o ponto final é de difícil visualização.

Na química analítica muitas análises baseiam-se na capacidade de determinadas substâncias formarem compostos coloridos, que podem ser quantificados por métodos

colorimétricos, como é o caso da reação que ocorre para a determinação do metanol (GOMES et al., 2008).

O uso de metodologias baseadas em imagens digitais está muito difundido pois está associado ao desenvolvimento de diversos setores como aplicações industriais, comunicações e pesquisas. Na Química, no entanto, vem sendo utilizada como uma alternativa satisfatória para determinações quantitativas (GODINHO et al., 2008; ANDRADRE, 2012).

As aplicações variam em diversas matrizes, como no controle de qualidade de alimentos e bebidas, monitoramento ambiental, entre outros (BENEDETTI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013; GODINHO et al., 2008; GOMES et al., 2008).

Godinho e colaboradores (2008) usaram um scanner de mesa como dispositivo de captura de imagens para classificar refrigerantes do tipo Cola, Laranja e Guaraná e ao mesmo tempo, realizou análises físico-químicas para determinar o teor de sacarose, de ácido sórbico e o pH.

Gomes e colaboradores (2008) realizou um experimento para determinação de ácido ascórbico presente em comprimidos de aspirina fazendo uso de imagens digitais e a formação do complexo azul da Prússia. As imagens foram digitalizadas com o uso de um scanner de mesa e foi utilizado o padrão RGB para tratamento numérico das mesmas, verificou-se após a comparação dos resultados obtidos com aqueles provenientes da espectrofotometria, que o método pode ser utilizado em laboratório de graduação que eventualmente não dispõem de espectrofotômetro, uma vez que os resultados foram satisfatórios.

Lyra e colaboradores (2009) desenvolveram um método espectrométrico de emissão em chama baseada em imagens digitais. Um modelo matemático foi proposto para construção das curvas analíticas e estimar as figuras de mérito. Esta modelagem consistia na decomposição da imagem em suas componentes individuais R, G e B e seus valores foram usados para definir um vetor posição no espaço tridimensional RGB. A norma deste vetor foi adotada como o valor baseado em RGB (reposta analítica) e se revelou estar relacionada linearmente com a concentração do analito. O método foi aplicado na determinação de lítio em comprimidos antidepressivos, sódio em soro fisiológico e cálcio em águas.

Tôrres (2010), determinaram a acidez total em vinhos tintos utilizando titulação ácido-base sem uso de indicador e imagens obtidas por uma webcam. Os resultados obtidos por este método apresentaram ser mais precisos do que os métodos de referência.

Lyra e colaboradores (2011) utilizaram imagens digitais para determinar diclofenaco de sódio e dipirona sódica em drogas injetáveis. Em todos os trabalhos as imagens foram capturadas por webcam.

Santos e colaboradores (2012) propuseram um método screening de baixo custo para detectar e quantificar adulteração em amostras de leite de vaca. O estudo de adulteração foi realizado com água e com NaOH, e as imagens digitais das amostras adulteradas foram obtidas utilizando um scanner de mesa. Para avaliar as informações a partir das imagens, estas foram recortadas e os valores de RGB convertidos para o sistema HSV.

Souza e colaboradores (2014) avaliaram o desempenho analítico de quatro dispositivos eletrônicos para captura de imagens digitais, microscópio óptico portátil, celular, uma câmera digital e o modo scanner de uma impressora, para detecção de microzonas impressas. Nesta avaliação o scanner apresentou melhor desempenho e foi utilizado para a determinação quantitativa de sulfato ferroso em dois tipos de medicamentos.

Dominguez e Centurión (2015) usaram a metodologia baseada em imagens digitais para quantificar a cor em amostras de mel na argentina. Eles utilizaram como dispositivo de captura uma webcam e o modelo de cores HSB combinado com calibração multivariada, concluindo que o método proposto era uma excelente estratégia para quantificar a cor de mel.

Os trabalhos publicados têm demonstrado que a metodologia baseada em imagens digitais é uma boa alternativa para determinação quantitativa e qualitativa de alimentos e produtos farmacêuticos, além de ser economicamente viável.

No presente trabalho utilizou-se imagens digitais para estabelecer uma relação quantitativa entre os componentes da cor e a concentração do metanol. Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados com aqueles obtidos por espectrofotometria para comprovar sua viabilidade analítica.

CAPÍTULO 2

MATÉRIAIS E MÉTODOS



2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes, amostras e soluções

Na determinação do metanol foi utilizada a metodologia adaptada do IAL, 2008, onde primeiramente foi preparado uma solução de permanganato de potássio a 3% (Synth) em solução de ácido fosfórico a 15% (Nuclear). Preparou-se uma solução do reagente cromogênico sal dissódico dihidratado do ácido cromotrópico a 5% (Vetec).

Na sequência preparou-se o destilado da amostra para a determinação da graduação alcoólica diluída para uma concentração de álcool etílico 5,5% em volume. Também foi preparado um branco de álcool etílico a 5,5% (Cinética).

As 4 amostras de cachaça foram adquiridas nos mercados locais da cidade de Itacoatiara, enquanto as amostras de cacauari foram adquiridas no município de Urucurituba e a amostra de aguardente de abacaxi foi produzida no laboratório.

Água recém destilada e deionizada foi sempre utilizada na preparação das soluções.

2.2 Equipamentos utilizados

Um espectrofotômetro Bel, modelo LGS 53 e cubeta de quartzo de 1 cm foi utilizado no método comparativo para a determinação de metanol.

Para o método proposto foram utilizados apenas vidrarias simples de laboratório, entre as quais, uma microplaca de polipropileno, para realizar a captura das imagens.

Micropipetas automáticas da marca (Kasvi) de volumes variáveis foram utilizadas para garantir a transferência de volumes precisos dos reagentes na microplaca.

Uma balança analítica Shimadzu, modelo AUY 220, com precisão de $\pm 0,1$ mg foi utilizada na medição das massas dos reagentes. Uma chapa aquecedora e banho de gelo foram usados no procedimento. Um scanner HP Scanjet G2710 foi utilizado para a captura de imagens na determinação do analito.

2.3 Sistema para aquisição das Imagens Digitais

Foi construído um aparato para acondicionar uma microplaca de polipropileno para capturar as imagens da cor desenvolvida na reação química entre o analito e o reagente, como mostrado na **figura 9**. O uso deste aparato teve como objetivo evitar a presença de luminosidade do ambiente externo.

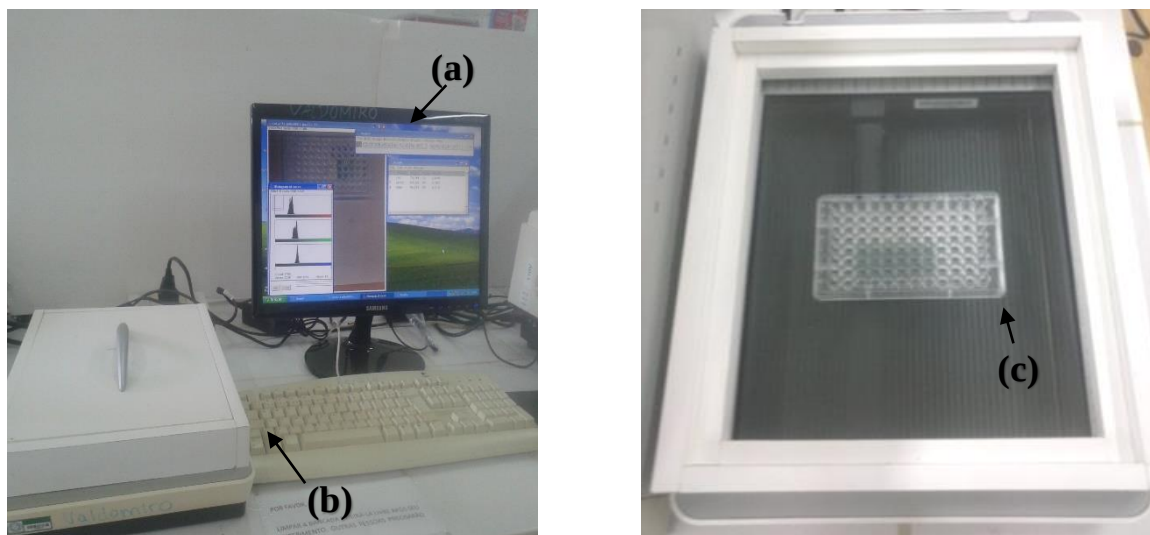


Figura 9: Sistema de captura de imagens digitais: computador (a), scanner (b), microplaca (c).

O sistema de aquisição de dados baseado na captura de imagens digitais é constituído por um computador com processador AMD LE 1620 2,4 GHZ. Um *scanner* HP Scanjet G2710 adaptado com uma caixa medindo 36 x 26 x 4 cm. No interior da caixa há espaço suficiente para acomodar uma microplaca com 96 cavidades (poços). Para a aquisição das imagens digitais, após o posicionamento da microplaca sobre a superfície do scanner devidamente nivelado horizontalmente, as soluções foram adicionadas as cavidades da microplaca com um volume de 350 μ L e em seguida a caixa foi fechada e as amostras foram digitalizadas. Para obtenção do sinal analítico o scanner foi configurado para aquisição de imagens digitais com resolução de 300 dpi e o arquivo obtido foi salvo na extensão JPG. Posteriormente o arquivo JPG foi aberto no software image J.

2.4 Software para tratamento das Imagens

As imagens obtidas durante as análises, usando o sistema proposto, foram tratadas com o programa ImageJ. Esse software é de domínio público, escrito em linguagem Java. O programa é capaz de calcular a área e retornar os valores médios de RGB compreendidos na

área selecionada, que posteriormente são armazenados e convertidos em seus respectivos valores de norma RGB em uma planilha eletrônica.

A interface do programa de tratamento ImageJ de uma área selecionada, pode ser visualizado na **figura 10**.

Para o tratamento das imagens, seguiram-se os seguintes passos: Abriu-se o programa. Em File → Open, uma janela foi aberta para a escolha de uma imagem do arquivo desejado. Escolhida a imagem, o tamanho de área desejado ($w \times h = 45 \times 45$) foi selecionado. Em Analyze → Tools → Color Histograms, foram obtidos os valores (results) da média, moda e desvio padrão de cada canal R, G e B da área selecionada. Em Edit → Copy, era possível copiar estes resultados (média, moda e desvio padrão) e transferi-los ao Excel, onde os dados numéricos da cor absorvida (vermelho (R), verde (G) ou azul (B)) eram tratados. No Excel calculou-se a média dos valores usando a equação do log da norma.

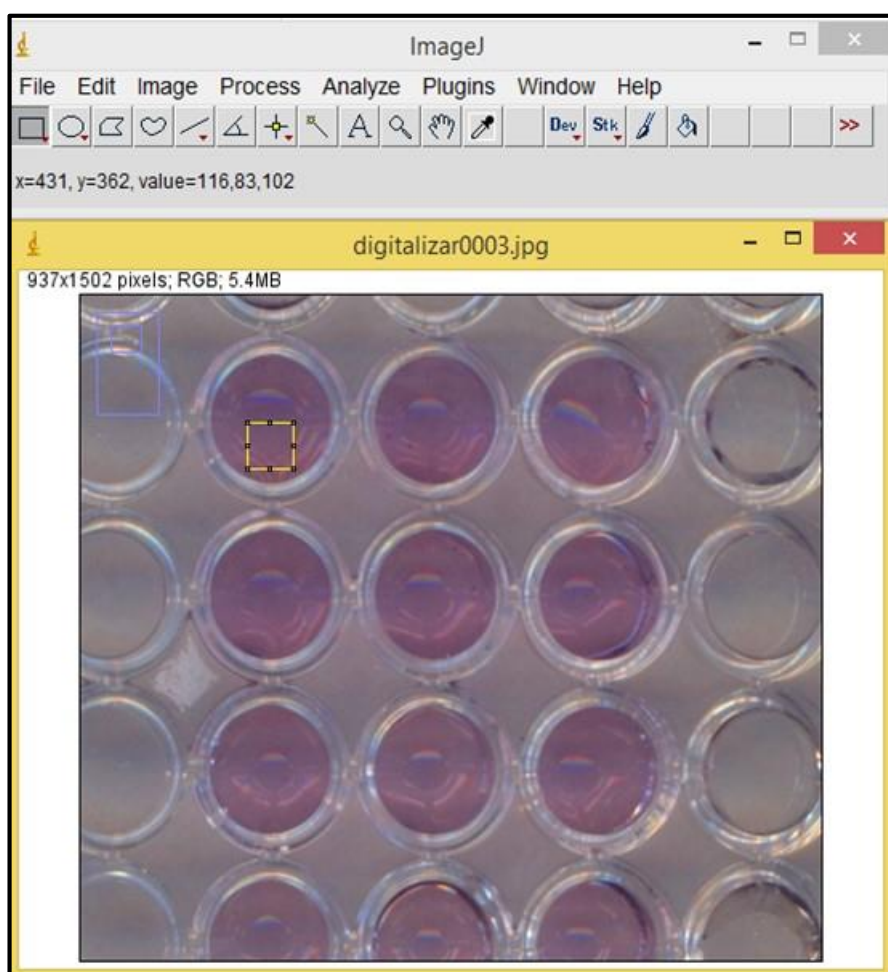
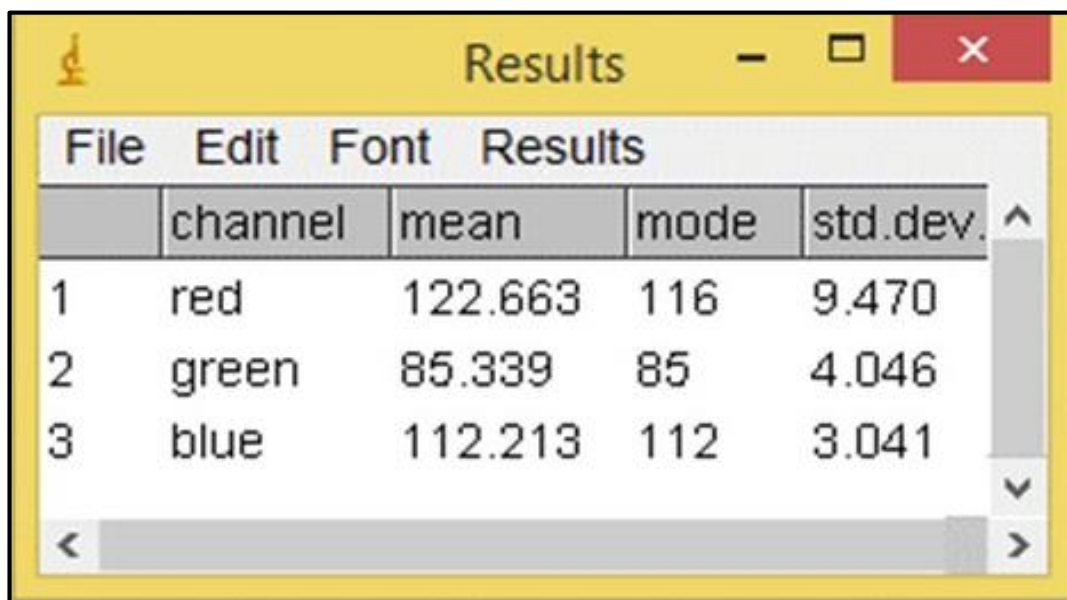


Figura 10: Interface do programa ImageJ utilizado para o tratamento e seleção da área das imagens

O software verifica todos os pixels (coluna por coluna) para extrair as componentes RGB de cada pixel e calcular o valor médio, moda e desvio para cada componente RGB, conforme solicitado pelo usuário. Os resultados são exibidos em uma janela **figura 11** e em seguida, armazenados no computador.



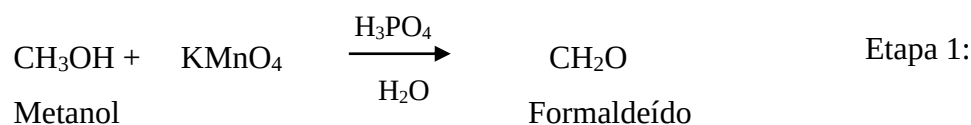
The screenshot shows the 'Results' window in ImageJ. It contains a table with the following data:

	channel	mean	mode	std.dev.
1	red	122.663	116	9.470
2	green	85.339	85	4.046
3	blue	112.213	112	3.041

Figura 11: Janela do programa ImageJ apresentando os resultados das análises das componentes RGB da área selecionada.

2.5 Construção da curva de calibração para determinação do teor de metanol

Para determinação do teor de metanol a primeira etapa ocorre com a oxidação do metanol pelo permanganato de potássio, formando formaldeído, reação descrita a seguir.



Na segunda etapa, **Figura12**, duas moléculas do ácido cromotrópico são unidas quando reagem com uma de formaldeído, em meio fortemente ácido (H_2SO_4) e sob aquecimento em banho-maria, através de uma ponte metilênica. Esta estrutura intermediária é desidratada em uma etapa seguinte, na posição dos grupos (-OH) fenólicos, formando-se um heterociclo. Por último, uma etapa de oxidação produz a estrutura colorida de interesse analítico, um composto dibenzoxantílico monocatiônico (GEORGHIU e HO, 1989).

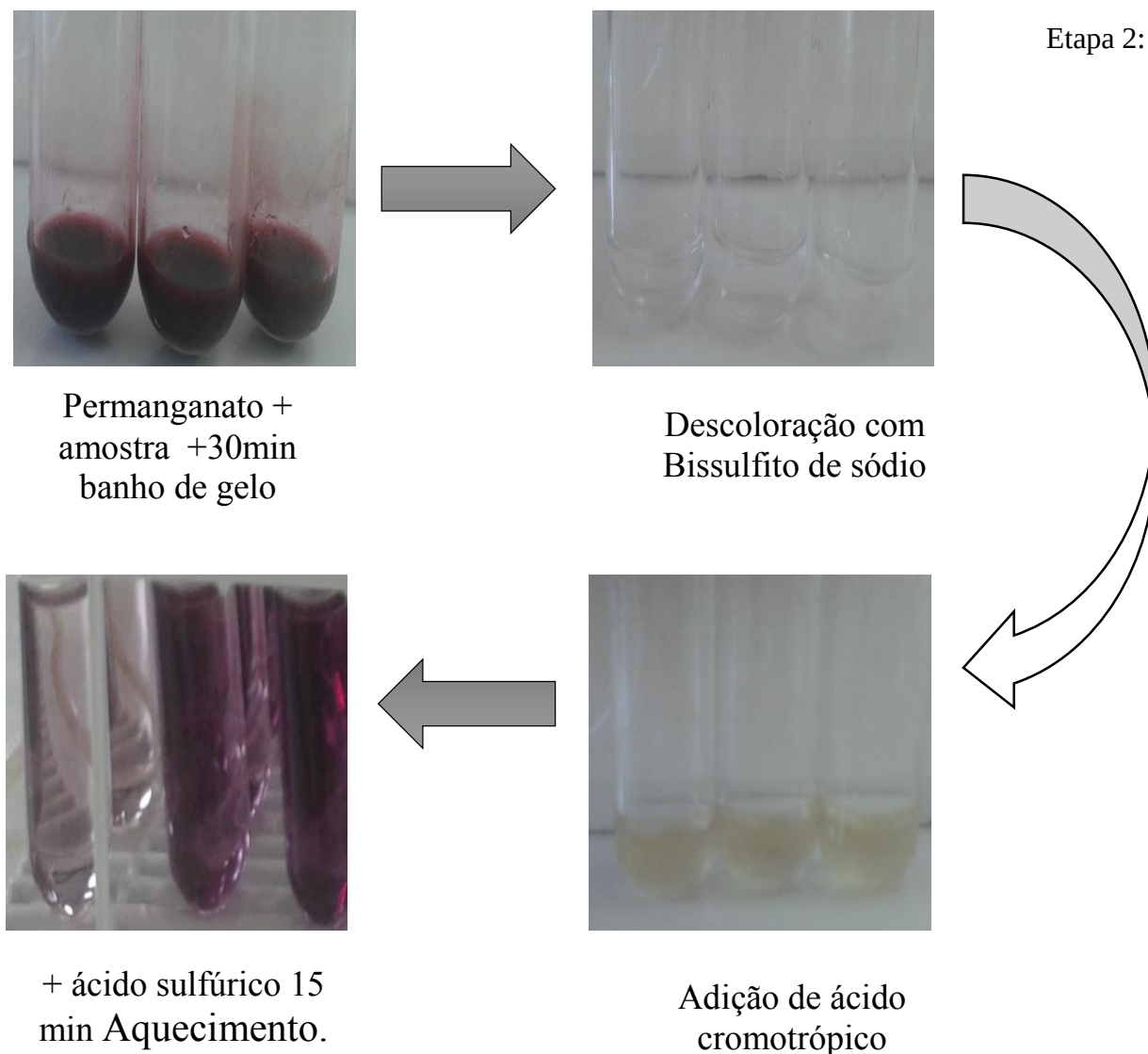


Figura 12: Procedimento para determinação do metanol

As soluções de padrão de metanol foram preparadas em diferentes níveis de concentração na faixa de trabalho de 0,01 a 0,1 (v/v%) em triplicata. Pipetou-se a solução de permanganato de potássio para um tubo de ensaio, deixando resfriar em banho de gelo e depois adicionou-se as soluções padrão de metanol, deixando reagir por mais 20 minutos. A solução resultante foi descorada com bissulfito de sódio e adicionada à solução de ácido cromotrópico, acrescentando também ácido sulfúrico lentamente. A solução foi colocada em banho de água quente (60-75) °C por 15 minutos e depois resfriada e completado o volume com água destilada a temperatura ambiente. Em seguida realizou-se a medida da absorbância no comprimento de onda de 575 nm e a digitalização das imagens no scanner. Para determinação das concentrações das amostras seguiu-se o mesmo procedimento substituindo a solução padrão pela amostra.

2.6 Procedimento para avaliação de desempenho dos métodos

O modelo de calibração somente pode ser usado para estimar a concentração do analito se for capaz de descrever o comportamento dos valores experimentais de maneira satisfatória. Portanto, o modelo obtido não pode apresentar evidências de falta de ajuste e deve refletir uma regressão estatística significativa (PIMENTEL e BARROS NETO, 1996). Desta forma, a validação do modelo pode ser realizada por meio de uma análise de variância (ANOVA), cujas equações estão definidas na tabela 2.

Tabela 2: Equações da análise de variância ANOVA para ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum (\hat{y} - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Total	$SQ_{ep} = \sum (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - 1}$

Onde o índice i indica o nível da variável x; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x; p é o número de coeficientes de regressão do modelo linear; n é o número total de medidas (réplicas autênticas nos níveis de concentração); m é o número de níveis distintos da variável independente (níveis de concentração do analito).

A validação pelo método dos mínimos quadrados, aplicando-se a ANOVA, consiste de teste de falta de ajuste, teste de significância da regressão e análise dos resíduos.

O teste de falta de ajuste compara, para os vários níveis da variável x, a média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) com a média quadrática devida ao erro puro (MQ_{ep}). Assim, se a razão $(MQ_{faj})/(MQ_{ep})$ for menor que o valor do ponto de distribuição F, referentes aos graus de liberdade de MQ_{faj} e MQ_{ep} e para um nível de 95% de confiança, temos um modelo sem evidência de falta de ajuste. Neste caso, as duas médias quadráticas refletirão apenas os erros

aleatórios associados aos dados. Caso contrário, conclui-se que há evidência de falta de ajuste e o modelo deve ser melhorado (ALMEIDA, 2012)

No teste F de significância da regressão, compara-se a razão entre a média quadrática devido à regressão (MQ_{reg}) e a média quadrática residual (MQ_r) com o valor do ponto da distribuição F_{v_{reg}, v_r} referente aos graus de liberdade a um certo nível de confiança. Em geral, emprega-se um nível de 95% de confiança. Se a referida razão for maior que o valor de F (de pelo menos cinco vezes como recomendado), conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa e mais ajustado estará o modelo aos dados experimentais (PIMENTEL e BARROS NETO, 1996).

Na análise de resíduos verifica-se o comportamento dos erros de previsão do modelo (resíduos) em relação aos dados experimentais. No gráfico de resíduos é possível identificar o tipo de erro experimental associado aos dados experimentais. Caso os resíduos apresentem algum perfil ou estrutura têm-se um erro sistemático. Caso os resíduos se distribuam aleatoriamente em torno de zero teremos apenas erros aleatórios (ANDRADE, 2012)

2.7 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

Geralmente o LOD é um parâmetro que se determina quando se desenvolvem novos métodos, o limite de detecção pode ser entendido como a menor concentração do analito que pode ser detectada por um dado método analítico, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas (SKOOG et al, 2006). O limite de detecção pode ser determinado pela **equação 2.1**.

$$LOD = \frac{3 \cdot s}{m} \quad (2.1)$$

onde s é o desvio padrão da resposta e m é o coeficiente angular da curva de calibração ($y = mx + b$).

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (AMARANTE JUNIOR et al., 2001). O limite de quantificação (LOQ) pode ser expresso pela **equação 2.2**.

$$LOQ = \frac{10 \cdot s}{m} \quad (2.2)$$

2.8 Testes estatísticos para validação dos resultados analíticos

Os resultados das determinações realizadas por imagens digitais e espectrofotometria foram comparados aplicando-se testes estatísticos descritos na literatura (SKOOG et al, 2006). Cada amostra foi analisada em triplicata para utilização das médias nos testes estatísticos.

2.7.1 Aplicação do teste t emparelhado baseado no teste de hipótese

O teste de hipóteses é, usualmente, utilizado na formulação do teste t emparelhado usado para avaliar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os resultados de dois métodos analíticos. Para aplicar o teste t emparelhado, calculam-se as diferenças entre os valores de concentração para cada par de resultados assim como a média dessas diferenças (TORRÊS, 2010). Além disso, assumindo-se que se Δ é a diferença média verdadeira entre os resultados dos métodos, pode-se testar a hipótese nula (H_0) de que $\Delta = 0$. Sendo assim, o teste t pareado pode ser aplicado com base na **Equação 2.3**.

$$t = \frac{d - 0}{sd/\sqrt{n}} \quad (2.3)$$

Onde n é o número de amostras analisadas por ambos os métodos e sd é o desvio padrão das diferenças. Após o cálculo do valor de t , deve ser comparado a um valor crítico de $t_{\text{crítico}}$ para o número de graus de liberdade (v) dado por $v = n-1$ e nível de confiança desejado. Geralmente, adota-se o nível de 95% de confiança como um bom compromisso entre confiança estatística e precisão. Como resultado, se o valor de t for maior que o de $t_{\text{crítico}}$, a hipótese nula é rejeitada, o que revela uma diferença sistemática significativa entre os resultados no nível de confiança adotado. Isto significa que há uma probabilidade menor que 2,5% (em cada cauda) ou de 5% no total das diferenças nos valores advirem de erros aleatórios (SKOOG et al, 2006). Caso contrário, não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados dos métodos analíticos.

CAPÍTULO 3

RESSULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo dos parâmetros operacionais

Inicialmente foi avaliado o posicionamento da microplaca sobre o vidro do scanner. Observou-se que quando a microplaca era digitalizada nas posições (A, C, D e F), **figura 13**, as imagens tinham maior influência de brilho e reflexo das bordas dos poços. Os desvios padrões para essas posições foram 1,46; 1,46; 0,98 e 1,13, respectivamente. Neste estudo, verificou-se visualmente que os efeitos eram minimizados nas posições (B e E), Figura 10. O estudo também mostrou que na posição (B) o desvio era maior (1,26), enquanto que na posição (E) o desvio padrão era menor (0,78), sendo esta última utilizada no experimento. O estudo foi realizado utilizando-se oito poços em cada extremidade e no meio da microplaca. A resolução para as imagens usada no trabalho foi de 300 dpi.

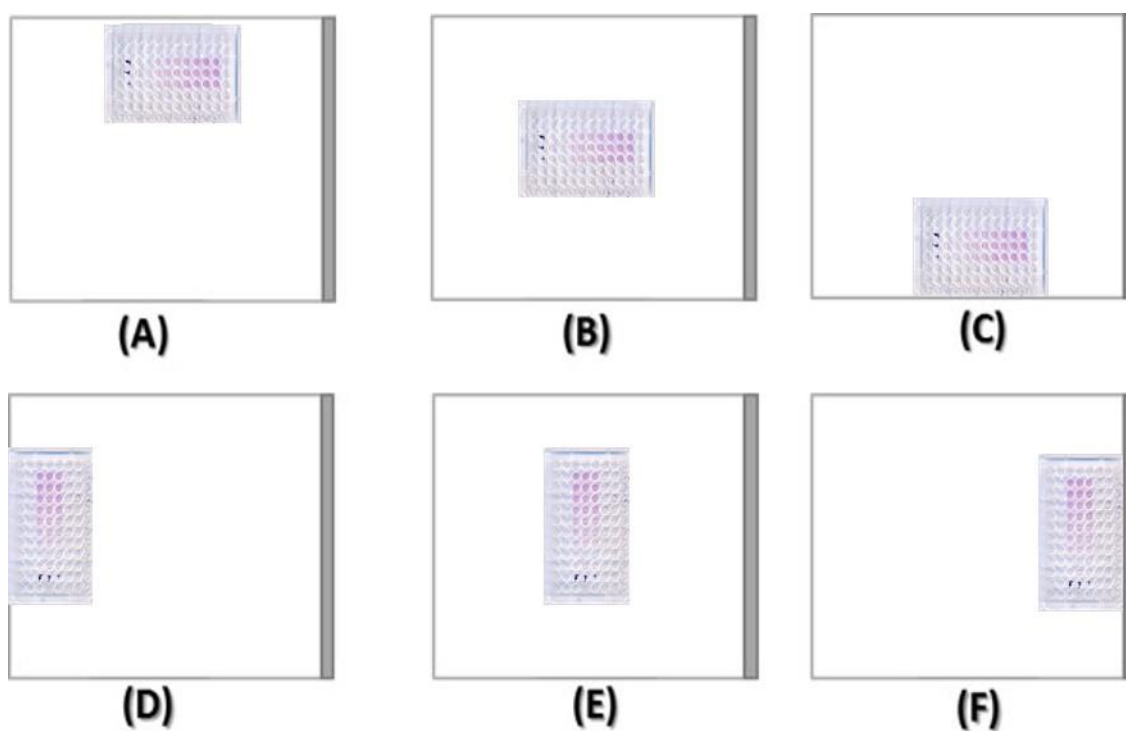


Figura 13: Estudo do posicionamento da microplaca sobre o vidro do scanner

O efeito do volume de amostra na microplaca foi investigado. Pois, segundo Souza e colaboradores (2014), a variação do volume interfere diretamente na resposta analítica obtida e a altura do volume define o comprimento do caminho óptico, diante deste contexto alíquotas

entre 50 μL e 400 μL das soluções padrões foram adicionadas nos poços da microplaca, **figura 14**.

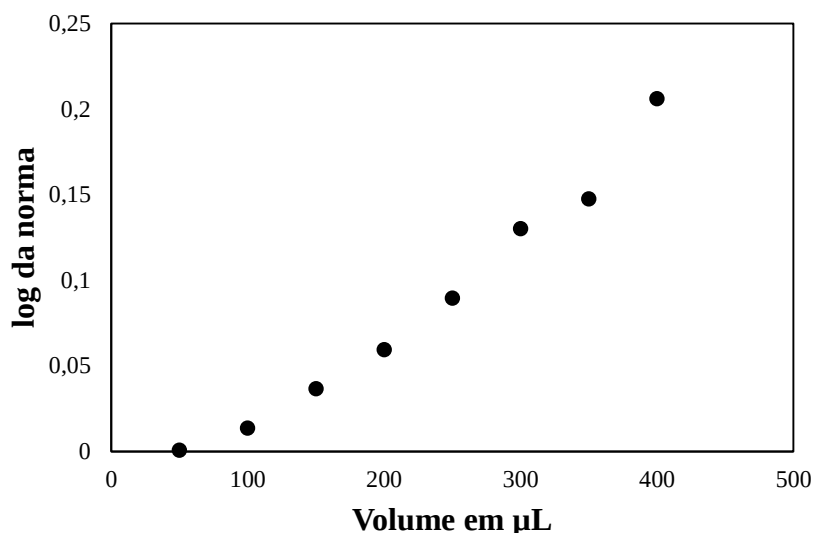


Figura 14: Estudo do volume adicionado na microplaca.

Como observado, há uma boa correlação entre as alíquotas de 50 a 400 μL . No entanto, para os volumes extremos, ocorreu um desvio relacionado ao preenchimento incompleto do poço e a formação de uma calota esférica. Para a alíquota de 50 μL , pode-se afirmar que esse volume não foi suficiente para preencher totalmente o poço da microplaca. Como consequência, a resposta analítica nesse volume foi afetada devido a interferência da leitura na região sem amostra. Por outro lado, a adição do volume de 400 μL provocou a formação de uma calota esférica que refletiu dentro do poço quando a imagem foi digitalizada. Portanto, do ponto de vista prático, a adição de 350 μL foi adotada, neste volume o excesso de brilho foi amenizado e as imagens obtidas apresentaram regiões mais nítidas das soluções contidas nestes poços, facilitando a seleção da área a ser analisada via software. Quando empregado os valores de média ou moda de cada canal R, G e B, não foi observado variações dos resultados obtidos.

A reprodutibilidade das imagens capturadas foi avaliada a partir de uma sequência de leituras consecutivas com (resolução de 300 dpi), conforme mostrado na **figura 15**, concluiu-se que as duas primeiras leituras apresentaram valores diferentes das demais sugerindo que o leitor CCD do *scanner* passa por uma estabilização nas primeiras leituras realizadas o que corroborou com o estudo realizado por Souza e colaboradores (2014), que recomenda que as três primeiras leituras sejam descartadas para certificar a estabilidade na captura das imagens.

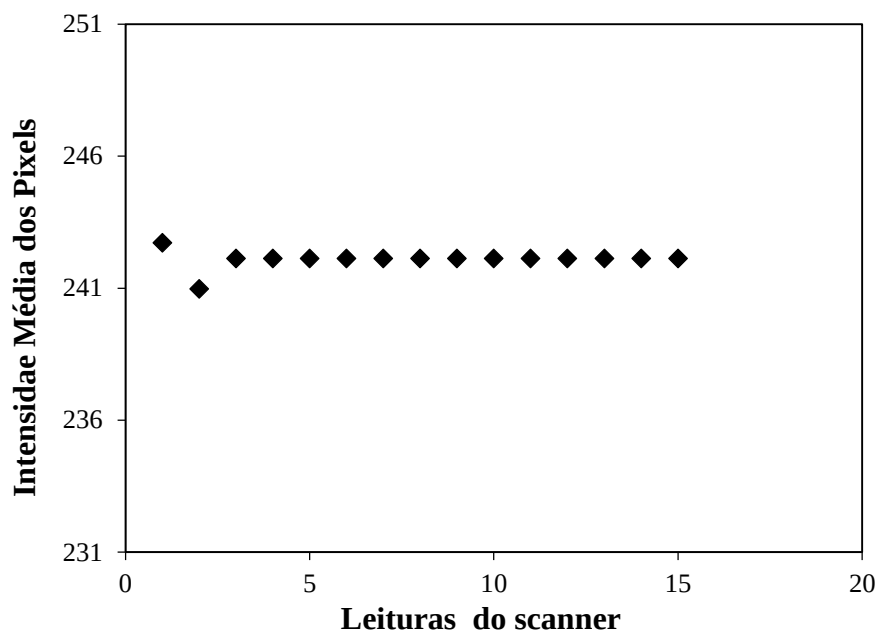


Figura 15: Informações colorimétricas durante leituras consecutivas.

Assim como a reprodutibilidade das leituras sequenciais e a posição da microplaca, o tamanho da área de seleção no poço da microplaca foi investigado a fim de avaliar o efeito na resposta colorimétrica em função da intensidade média dos pixels. O tamanho da área selecionada das imagens ($w \times h$) não alterou significativamente os dados obtidos, desde que esta fosse mantida constante. No entanto, foi observado que a seleção de diferentes regiões da imagem (da mesma cavidade da microplaca), **figura 16**, alterava significativamente os valores encontrados.

As análises foram realizadas usando uma área de tamanho 45×45 pixels, região (A). Para esta região selecionada a curva analítica forneceu $r^2 = 0,999$, enquanto que para as regiões (B), (C), (D), (E) e (F), com área de 25×25 pixels, as curvas forneceram $r^2 = 0,99$, sendo assim a região (A) foi utilizada neste trabalho.

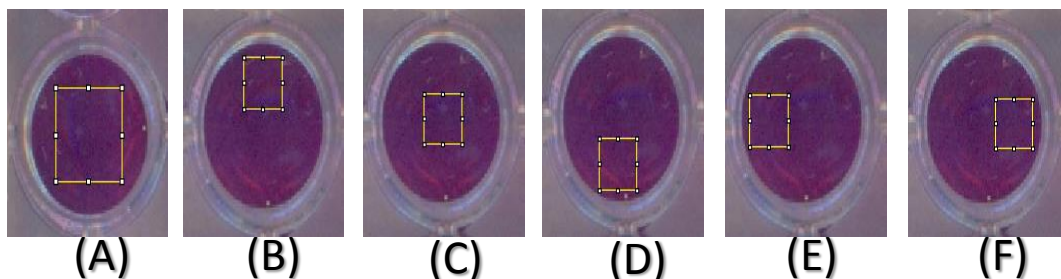


Figura 16: Diferentes regiões selecionadas de uma mesma imagem do padrão de metanol com concentração 0,1%, mostrando a seleção de diferentes regiões.

Na **figura 16** foram estudadas seis regiões diferentes, selecionadas de uma mesma imagem, obtida de uma das soluções do padrão de metanol com concentração 0,1%.

Na tabela 3 estão representados os valores médios RGB mostrando que na posição (B) os valores são sempre menores que na região (D), figura 12.

Tabela 3: Resultados de média, moda e desvio padrão (SD) dos canais RGB da mesma imagem, da seleção de áreas sem interferência da borda (C) e com interferência da borda (B, D, E, F), obtidas do padrão de metanol com concentração 0,1% (Figura 13).

	Canais	Média	Moda	SD		Canais	Média	Moda	SD
A	R	88	87	6	D	R	97	96	9
	G	39	39	6		G	38	38	5
	B	93	89	6		B	92	93	4
B	R	86	87	6	E	R	88	87	5
	G	38	40	6		G	38	39	6
	B	91	89	6		B	93	96	5
C	R	83	84	5	F	R	87	89	5
	G	36	39	6		G	38	39	5
	B	92	92	5		B	93	94	5

A partir do cálculo do teste t observou-se que, para um nível de confiança de 95% ($P=0,05$), existem diferenças significativas entre as medidas realizadas com áreas de seleção de tamanhos diferentes. Portanto, no decorrer de uma análise colorimétrica baseada na captura de imagens digitais deve-se utilizar o mesmo tamanho da área de seleção de modo a obter informações colorimétricas de alta confiabilidade.

A **figura 17** apresenta um gráfico dos valores médios de cada componente R, G e B correspondentes às imagens digitais capturadas para as soluções de calibração de metanol.

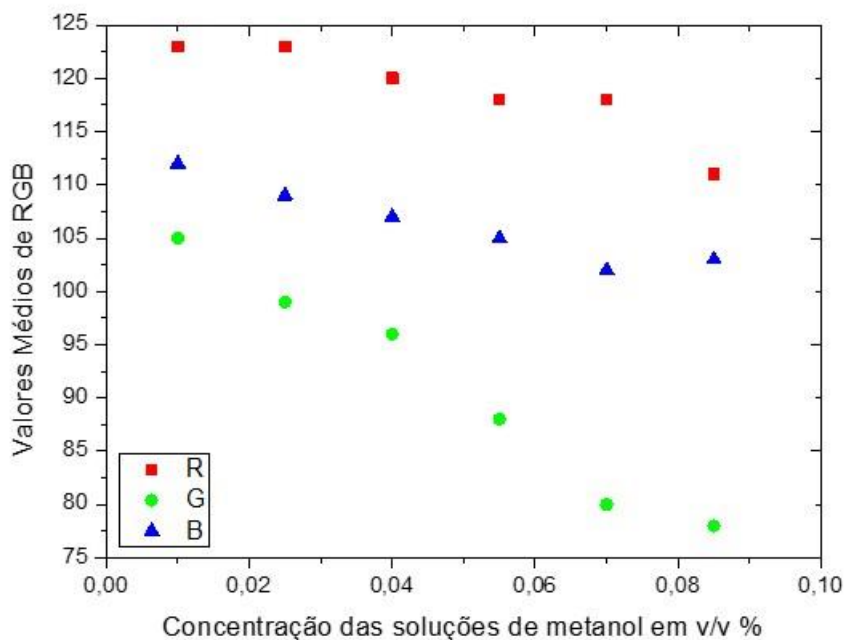


Figura 17: Gráfico dos valores médios individuais das componentes R, G e B das imagens digitais capturadas para as soluções de calibração

A componente G (green) predomina sobre as demais e responde linearmente em quase toda a faixa de trabalho. Desse modo, a adoção de somente a contribuição do canal G para a resposta analítica pode levar a curvas analíticas não lineares, assim como valores subestimados para a concentração do analito nas amostras.

Em face dos argumentos acima, os valores da norma foram adotados como resposta analítica determinados a partir dos valores médios das três componentes (R, G e B). Para isso, o modelo matemático proposto por Lyra e colaboradores (2009) baseado na norma de vetor foi adotado para obtenção da resposta analítica, uma vez que contempla as três componentes simultaneamente.

3.2 Validação das curvas analíticas para determinação do metanol

O ensaio para determinação de metanol foi conduzido de modo que pudesse ser feita a comparação do sistema de detecção proposto com o método de referência (espectrofotometria na região do visível).

A **figura 18** mostra as curvas analíticas obtidas com as soluções do padrão de metanol, sendo construída uma curva para imagens registrando-se os valores do log da norma das componentes RGB em função da concentração (Figuras A e C) e por espectrofotometria registrando-se os valores de absorbância em função da concentração (Figuras B e D).

As curvas A e B foram usadas para determinar metanol em cachaça e aguardente de abacaxi e as curvas C e D para as amostras de licores de cacau (*Theobroma cacao*), de jambú (*Acmella oleracea*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). Ambos os métodos, exibem um

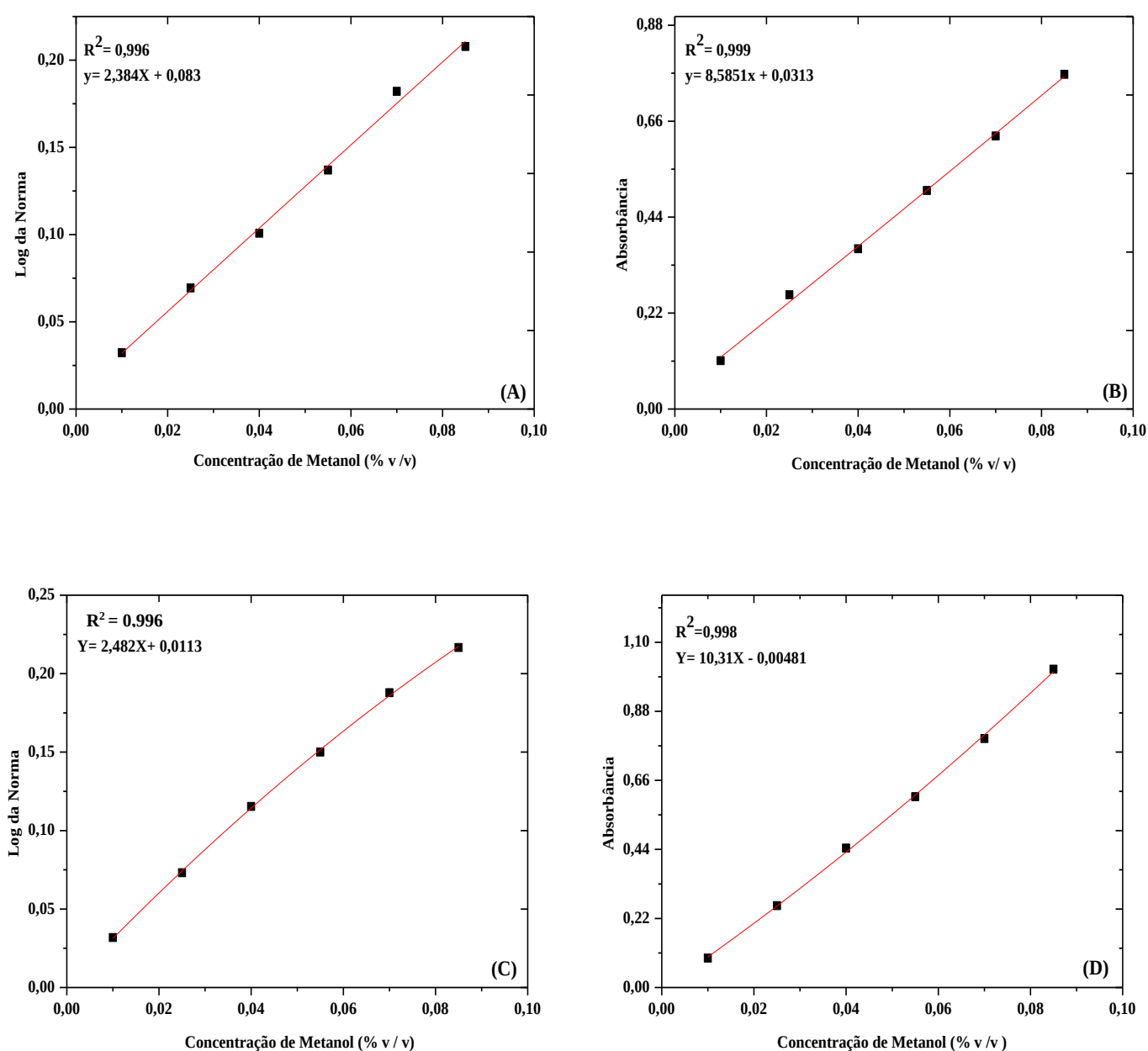


Figura 18: Curvas Analíticas para determinação de metanol em cachaça e aguardente de abacaxi (A e B) e em licores (C e D).

comportamento linear entre a resposta analítica e a concentração dos analitos em suas soluções. Essa inferência, baseada inicialmente em uma inspeção visual, é confirmada mediante a análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos **figura 19**, e principalmente, pela aplicação da ANOVA.

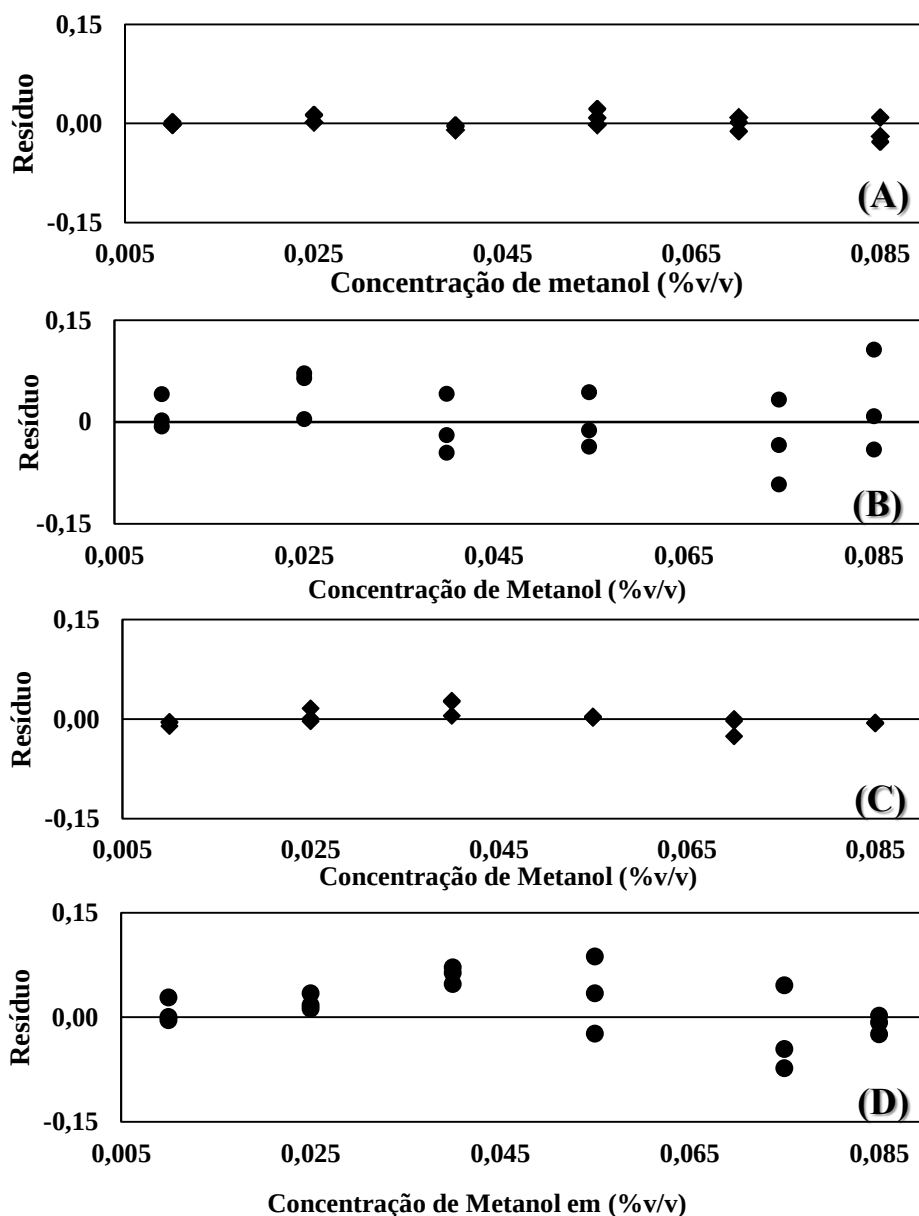


Figura 19: Resíduos deixados pelas curvas analíticas por espectrofotometria (●) e imagens digitais (◆).

Pode-se observar na **figura 19**, uma distribuição aleatória ao longo da faixa de concentração das soluções padrões. De fato, não se observa nenhum perfil ou estrutura sistemática que evidencie uma falta de ajuste do modelo linear tanto para o método proposto como para o método de referência.

Os resultados da aplicação da anova para corroborar na validação dos modelos utilizando o método de imagens digitais e o método espectrofotométrico são mostrados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas para ANOVA.

Analito	Fonte de variação	SQ		MQ	
		Imagens Digitais	Espectrofotometria	Imagens Digitais	Espectrofotometria
Cachaça e Aguardente	Reg (1)	0,02378	0,30833	0,02378	0,30833
	Res (16)	0,00247	0,04225	0,00015	0,00264
	E. p. (4)	0,00138	0,03040	0,00035	0,00760
	F.aj. (12)	0,00036	0,00395	0,00003	0,00032
Licores	Reg (1)	0,02577	0,4208	0,02577	0,42085
	Res (16)	0,00269	0,03359	0,00016	0,00210
	E. p. (4)	0,00096	0,0155	0,00024	0,00387
	F.aj. (12)	0,00057	0,00603	0,00004	0,00050

Os valores entre parênteses indicam o número de graus de liberdade. Reg.: Regressão, Res.: Resíduos, F. aj.: Falta de ajuste, E. p.: Erro puro.

Após o cálculo das médias quadráticas, estes valores foram utilizados nos testes de falta de ajuste e significância de regressão, cujos resultados encontram-se na Tabela 5. Para isso, comparou-se o valor da razão MQ_{faj}/MQ_{ep} com o valor de $F_{4,12}$ (ponto de distribuição F para 4 e 12 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%) que é igual a 3,26. Como MQ_{faj}/MQ_{ep} é menor que $F_{4,12}$, então não existe evidencia de falta de ajuste do modelo linear ajustado aos dados experimentais. Sendo assim, comparando-se o quociente MQ_{R}/MQ_{r} é muito maior que o valor ponto de distribuição $F_{1,16}$ (4,29), conclui-se que a regressão é altamente significativa.

Tabela 5: Anova para o modelo linear das curvas de calibração para determinação de metanol.

	Métodos	Cachaça e Aguardente	Licores
MQfaj	Espectrofotometria	0,043	0,130
MQep	Imag-Digitais	0,088	0,201
MQreg	Espectrofotometria	116,75	200,45
MQr	Imag-Digitais	153,49	152,9
GL	Falta de ajuste	4 e 12 respectivamente	
	Significância de regressão	1 e 16 respectivamente	
F_{v1, v2}	Falta de ajuste	3,26	
	Significância de regressão	4,29	

Uma vez que os modelos lineares não apresentaram evidência estatística de falta de ajuste e resultam de regressões altamente significativas, as curvas analíticas correspondentes podem ser usadas para fins de quantificação.

Após a validação das curvas analíticas, os valores de LOD, LOQ foram encontrados para o método proposto e o de referência. Os valores obtidos para essas figuras de mérito são mostrados na tabela 6.

Tabela 6: LOD e LOQ para os métodos espectrofotométrico e imagens digitais

Método	Imagens digitais	Espectrofotométrico
LOD	0,0097	0,0093
LOQ	0,0324	0,0311

Pode-se observar que o método de referência apresenta valores de LOD e LOQ menores que o método de imagens digitais.

A **figura 20-A**, mostra as soluções digitalizadas para obtenção das curvas analíticas com concentrações no intervalo de 0,01 a 0,085 (%v/v). Na **figura 20-B** encontra-se as soluções das amostras para determinação de metanol em cachaça e aguardente, sendo a coloração da aguardente de abacaxi semelhante a solução do branco, as demais amostras apresentaram coloração mais intensa indicando maior concentração de metanol. A **figura 20-C** mostra as soluções dos padrões com concentrações variando no intervalo de 0,01 a 0,1 % v/v (4D-4F e 10D-10F). Para obtenção das curvas analíticas e amostra de licor de jambú (3B-5B), licor de cupuaçu (6B-8B) e licor de cacau (9B-11B).

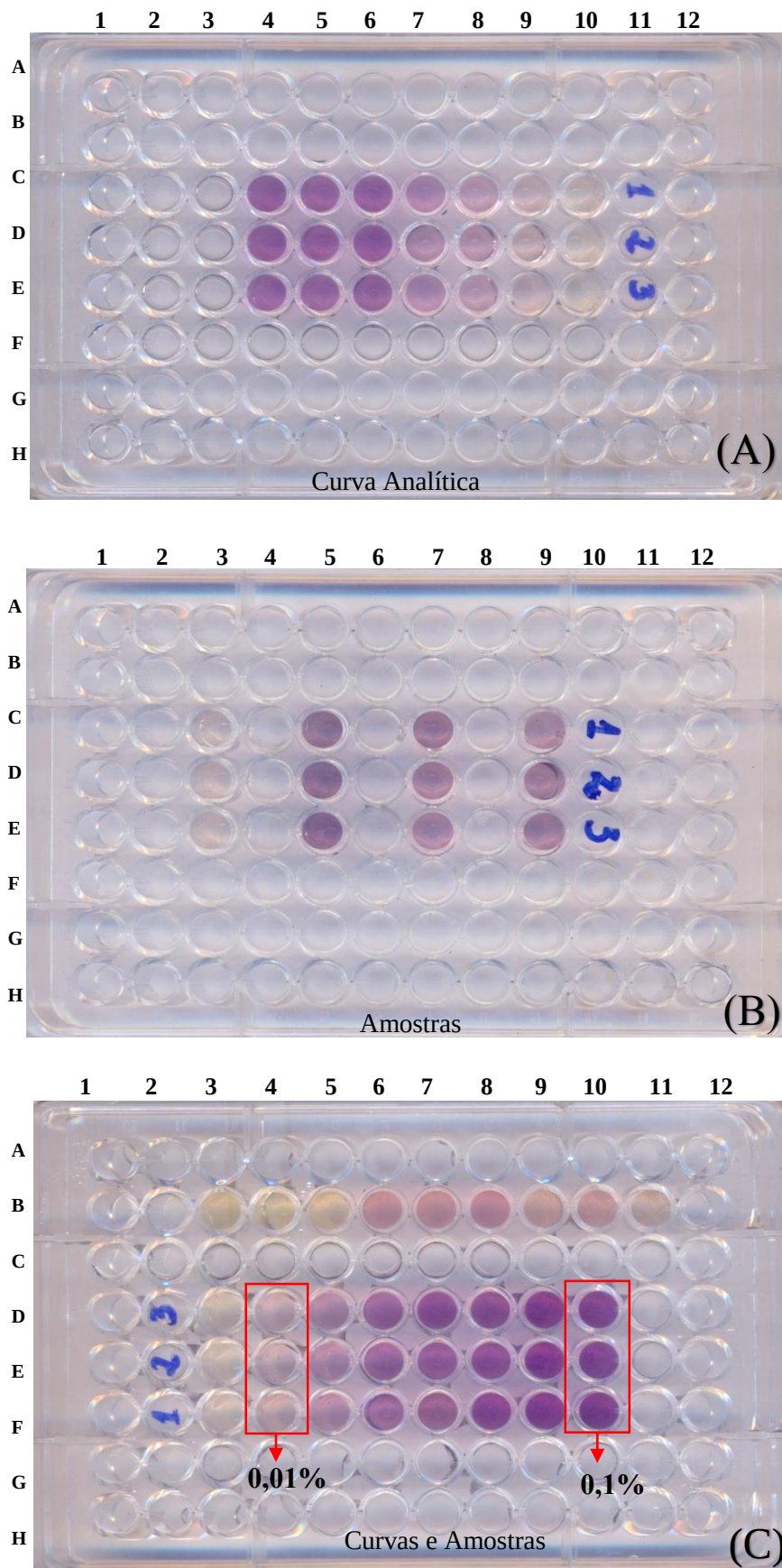


Figura 20: Imagens da microplaca com as soluções da curva analítica (A) e amostras de cachaca e aguardente de abacaxi (B), soluções da curva e amostras de licores (C).

3.3 Determinação de metanol usando o método espectrofotométrico e o método proposto

No método espectrofotométrico para determinação de metanol, a região espectral de máxima absorção do ácido cromotrópico foi em aproximadamente 575 nm, correspondente à absorção do composto dibenzoxantílico monocatiônico. A **figura 21** apresenta o espectro de absorção (UV-Vis) obtido do branco e dos padrões de metanol.

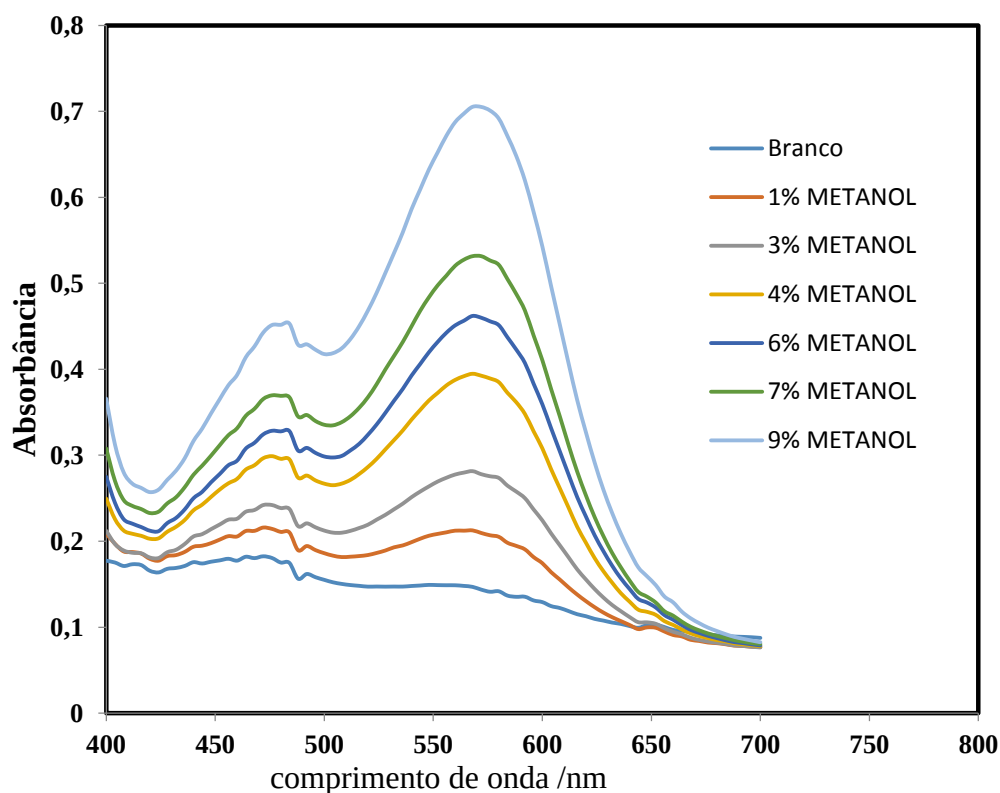


Figura 21: Espectro de absorção dos padrões metanol e do branco.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores de metanol encontrados empregando-se o método proposto e comparados com aqueles empregando o método de referência, assim como o erro relativo associado as concentrações.

Pode-se observar uma boa concordância entre os resultados da aplicação dos métodos, dada a proximidade dos valores obtidos para a concentração de metanol. O valor do teste t emparelhado obtido foi de 0,658, valor menor que o $t_{\text{crítico}}$ 2,44. De fato, a aplicação do teste t emparelhado, baseado no teste de hipóteses, revelou não existir diferença significativa entre os resultados dos métodos ao nível de 95% de confiança.

Tabela 7: Resultados da determinação do teor de metanol em amostras de cachaça, aguardente de abacaxi e licores de cacau, cupuaçu e jambú.

Amostras	Imagens ^a	Imagens digitais (% v/v)	Espectrofotometria (% v/v)	Erro Relativo (%)
A	(B) 9C-9E	0,046	0,050	7,8
B	(B) 7C-7E	0,043	0,047	9,6
C	(B) 5C-5E	0,067	0,065	-3,5
D	(B) 3C-3E	ND	ND	ND
E	(C) 3B-5B	ND	ND	ND
F	(C) 6B-8B	0,026	0,024	-7,3
G	(C) 9B-11B	0,015	0,014	-4,5

*. Não Detectado – ND: Amostras de Cachaça (A, B, C), Aguardente de Abacaxi (D), Licor de Jambú (E) Licor de Cupuaçu (F), Licor de cacau (G). (a) figura 20.

A amostra (D) analisada é a aguardente de abacaxi da região produzido de forma caseira e bidestilado no laboratório de química. Segundo a literatura as bebidas fermento destiladas de fruta possuem teor de metanol mais alto que a cachaça. Nas amostras de licor de jambú (E) não foi encontrado metanol dentro do limite de detecção do método. Contudo, nas amostras de licor de cupuaçu (F) e de cacau (G) o metanol estava presente em baixas concentrações.

Resultados similares foram encontrados no trabalho de Silva e colaboradores (2009) sobre a Qualidade Físico-Química e Sensorial de aguardentes de polpa de banana e banana integral submetidas à hidrólise enzimática. Os teores de metanol encontrados neste trabalho foram de 0,093 mL/100 mL de álcool anidro para polpa de banana e de 0,053 mL/100 mL de álcool anidro para banana integral.

No trabalho de Flores e Schenato (2012) foi analisado a presença de metanol em cachaças de alambique e cachaça industrial, o cromóforo empregado nas análises foi o sal dissódico do ácido cromotrópico ($C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot 2H_2O$), tendo sido encontrado 0,069% de metanol em cachaça de alambique e 0,0676% de metanol em cachaça industrial, valores abaixo do limite tolerado pela legislação brasileira, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Apesar dos teores baixos de metanol observados nas amostras analisadas, convém salientar os casos de intoxicação seguida de morte ocorridos no estado da Bahia, em 1989, devido à ingestão de aguardentes contaminadas com metanol, bem como a constatação de 4 casos fatais ocorridos no período de dezembro de 1992 a janeiro de 1993, na região do ABC, na Grande São Paulo. Em uma pesquisa realizada por Badolato e colaboradores (2000), foram analisadas 608 amostras de diversas bebidas alcoólicas no período de abril de 1993 a agosto de 1999. Verificou-se que 391 amostras eram falsificadas e dentre estas amostras uma aguardente apresentou concentração elevada de metanol, causa da cegueira ocorrida nas pessoas que a consumiram.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO



4 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou a viabilidade do uso de imagens digitais usando scanner como dispositivo de captura para implementar um novo método de quantificação do metanol em bebidas alcoólicas. Para atingir esse objetivo, a metodologia proposta baseou-se na oxidação do metanol pelo permanganato de potássio formando formaldeído, que reagiu com o ácido cromotrópico em meio fortemente ácido, produzindo uma solução de coloração púrpura. A solução resultante foi transferida para uma microplaca e as imagens digitais foram capturadas por scanner e convertidas em valores de R, G e B para obtenção da curva analítica.

O sistema montado para a determinação do analito possui alta versatilidade e flexibilidade analítica, assim como o software é de fácil execução para aquisição dos valores de cor. O uso do scanner como fotodetector e da microplaca, aliado ao baixo consumo de reagentes e amostras, tornam as análises muito menos dispendiosas. Entretanto, sua performance analítica pode ser otimizada dado que o tempo de análise pode ser reduzido ainda mais, quando comparado ao método de referência.

Na determinação do teor de metanol os melhores resultados para imagens foram aqueles calculados utilizando o log da norma com região linear de 0,01 a 0,085% (v/v) ($r^2 = 0,996$). O desempenho da metodologia proposta foi avaliado por meio da reação colorimétrica envolvendo a determinação de metanol em sete amostras de bebidas. Os resultados foram comparados com os obtidos pela espectrofotometria usada como método de referência.

A aplicação do teste t emparelhado demonstrou que não existe diferença estatisticamente significativa entre os resultados, ao nível de 95% de confiança.

Uma abordagem educacional a esta proposta, é a utilização de imagens digitais para implementação de estudos de espectrofotometria molecular sem a necessidade de um espectrofotômetro. Ressalta-se, ainda, que se trata de um método econômico, consumindo pouco reagente, fator importante quando se trabalha com materiais de custo elevado, ou de alto grau de toxicidade, desta forma, satisfazendo alguns princípios da química verde.

4.1 Perspectivas futuras

- ✚ Este trabalho tem como expectativas futuras a aplicação do método para determinação de outros contaminantes como furfural e aldeído acético em bebidas, metanol em biodiesel.

- ✚ Tem-se ainda em vista, para estudos futuros, a aplicação usando o método do ácido cromotrópico para determinar formaldeído em saneantes e nitrogênio em solo.
- ✚ No campo da imagem digital, pretende-se explorar outros modelos de cores, como o HSI (matiz, saturação e intensidade) como resposta analítica.

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS



5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, José Berivaldo Sales. Um método quimiluminescente baseado em imagens digitais para determinação de Cr (VI) em águas usando um sistema fluxo batelada. 2012.81f. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- ALVARENGA, L.M. et al. Avaliação da fermentação e dos compostos secundários em aguardente de banana e manga. Alim. Nutr. Braz. J. Food Nutr., Araraquara, v. 24, n. 2, p. 195-201, abr./jun. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. Números do setor. Disponível em < faturamento <http://www.abia.org.br/vsn/anexos/faturamento2016.pdf>>. Acesso em: 09 de agosto de 2017.
- ANDRADE, Stéfani Iury Evangellista de. Um Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem Digital para Determinação de Al(III) e Cr(VI) em Águas. 2012. 87f. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- AMARANTE JUNIOR, Ozelito Possidônio de et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. Cad. Pesq., v. 12, p. 116-131, 2001.
- BADOLATO, E.S.G.; DURAN M. C.; Risco de intoxicação por metanol pela ingestão de bebidas alcoólicas. Revista de Psiquiatria Clínica, vol 27, num 2, 2000.
- BOGUSZ JUNIOR, Stanislau, et al. Composição Química Da Cachaça Produzida Na Região Noroeste Do Rio Grande Do Sul, Brasil, v. 26, n. 4, p. 793–798, 2006.
- BENEDETTI, Luzia Pires dos Santos. Determinação in situ de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de spot tests. 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

- BENEDETTI, L. P. dos Santos et al. A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages. *Anal. Methods*, v. 7, n. 18, p. 7568–7573, 2015.
- BRASIL, 2005a. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Portaria INMETRO nº 126, de 24 de junho de 2005. Aprova o Regulamento de Avaliação da Conformidade da Cachaça.
- BRASIL, 2005b. 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.
- CARDOSO, M. G. et al. Cachaça: Qualidade e Produção. *Boletim Técnico Série Extensão, lavras: [s.n]*, v. VIII, n. 53, p. 1-26, 1999
- CARUSO, Miriam Solange Fernandes; NAGATO, Letícia Araújo Farah; ALABURDA, Janete. Benzo (A) pireno, Carbamato de etila e metanol em cachaça. *Quim. Nova*, v. 33, n. 9, p. 1973-1976, 2010.
- CANTERI, Maria H. G. et al. Pectina: da matéria-prima ao produto final. *Polímeros*, vol. 22, n. 2, p. 149-157, 2012
- DAMASCENO, Deangelis, et al. 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
- DOMINGUEZ, M. A.; CENTURIÓN, M. E. Application of digital images to determine color in honey samples from Argentina. *Microchemical Journal*, v. 118, p. 110–114, 2015
- FAGNANI, Enelton; PEZZA, Leonardo; PEZZA, Helena Redigolo. Determinação Espectrofotométrica de Hexametilenotetramina (HMT) em Medicamentos, Utilizando Ácido Cromotrópico e Forno de Micro-ondas. *Quim. Nova*, v. 32, n. 9, p. 2458-2463, 2009
- FERREIRA, Edilene Cristina; MONTES, Ronaldo. “A química da produção de bebidas alcoólicas”. *Química Nova na Escola*. n. 10, nov. 1999.

- FLORES, Jéssica Silveira; SCHENATO, Rossana Angélica. Análise de Metanol em Cachaça Industrial e de Alambique no Rio Grande do Sul. 13^a Mostra de Pesquisa, Ensino e Extensão. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul Câmpus Porto Alegre, 2012
- GAIÃO, Edvaldo Nobrega, et al. U. Digital image-based titrations. *Anal. Chim. Acta*, v. 570, p. 283-290, jun. 2006
- GEORGHIOU, Paris E.; HO, Keung (Jimmy) Chi. The chemistry of the chromotropic acid method for the analysis of formaldehyde. *CAN. J. CHEM.*, v. 67, 1989.
- GODINHO, Mariana S., et al. Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA), *Quim. Nova*, v. 31, n. 6, p. 1485-1489, 2008
- GOMES, Marcos S.; Trevisan, Lilian C.; Nóbrega, Joaquim A. Uso de Scanner em Espectrofotometria de Absorção Molecular: Aplicação em Experimento Didático Enfocando a Determinação de Ácido Ascórbico. *Quim. Nova*, v. 31, n. 6, p. 1577-1581, 2008.
- IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4^a ed., 1^a Ed. Digital, São Paulo: 2008.
- LEÃO, Alexandre Cruz. Gerenciamento de cores para imagens digitais. 2005. 135f. Dissertação (Mestrado em artes visuais) – Curso de Pós-Graduação em Artes Visuais, UFMG, Belo Horizonte.
- LIMA, Ricardo Alexandre C., et al. Digital movie-based on automatic titrations. *Talanta*, v. 147, p. 226–232, 2016.
- LYRA, Wellington Silva, et al. “Digital image-based flame emission spectrometry”. *Talanta*, v. 77, n. 5, p. 1584, 2009.

- LYRA, Wellington Silva, et al. Indirect determination of sodium diclofenaco, sodium dipyrone and calcium gluconate in injection drugs using digital image-based (webcam) flame emission spectrometric method. *Analytical Methods*, v. 3, p. 1975-1980, 2011
- MACHADO, A. W.; LEITE, E. B.; SOUKI, B. Q. Fotografia Digital em Ortodontia: Parte I – Conceitos Básicos. *Jornal Brasileiro de Ortodontia e Ortopedia Facial, Curitiba*, v. 9, n. 49, p. 11-16, jan/fev, 2004
- MALEKI, N.; SAFAVI, A.; SEDAGHATPOUR, F. Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera. *Talanta*, v. 64, n. 4, p. 830-835, nov. 2004
- FILHO, Ogê Marques. Hugo Vieira. *Processamento Digital de Imagens*, Rio de Janeiro: Brasport, 1999.
- MARTINS, G. B. C.; MONTENEGRO, Mateus A.; SUAREZ Paulo A. Z. Kit colorimétrico para detecção de metanol em etanol combustível para o monitoramento da qualidade de combustíveis, *Quim. Nova*, v. 38, n. 2, 280-284, 2015.
- MASAWAT, Prynja; HARFIELD, Antony; NAMWONG, Anam. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk. *FOOD CHEMISTRY*, v. 184, p. 23–29, 2015.
- MENDONÇA, João Guilherme Pereira, et al. Avaliação Dos Padrões De Identidade E De Qualidade De Aguardentes De Frutas, e-xacta, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 31-41, 2014.
- MIOT, Hélio Amante; PAIXÃO, Maurício Pedreira; PASCHOAL, Francisco Macedo. Fundamentos da fotografia digital em Dermatologia. *An. Bras Dermatol.* v. 81, n. 2, 174-80, 2006.
- MOTA, Deolinda et al. Teores De Metanol em Aguardentes Vínicas e Bagaceiras Portuguesas. Unidade Departamental de Silvicultura e Recursos Naturais, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Portugal 2009.

- NAGATO, Letícia Araújo Farah et al. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao instituto adolfo lutz em são paulo, v. 21, n. 1, p. 39–42, 2001.
- NETO, G. F. S.; FONSECA, Classificação de águas minerais baseada em imagens digitais obtidas por smartphones. *Quim. Nova*, v. 39, n. 7, p. 876–881, 2016.
- OHIMAIN, Elijah Ige. Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension. *SpringerPlus* v. 5, n.1607, 2016
- OLIVEIRA, L. F. et al. Uso de imagens digitais e análise de componentes principais na identificação dos níveis de Cr (vi) em amostras de solos. *Rev. Virtual Quim.* v. 5, n. 2|, p.169-178, 2013.
- OLIVEIRA, Tamara Kassia Lima, et al. Produção de aguardente a partir da polpa do açaí. Congresso Norte e Nordeste de Pesquisa e Inovação VII CONNEPI. Palmas Tocantins 2012.
- PACIORNIK, S.; YALLOUZ, A. V.; CAMPOS R. C.; GANNERMAND, D. “Scanner Image Analysis in the Quantification of Mercury using Spot-Tests”. *J. Braz. Chem. Soc.* São Paulo, v.17, n. 1, jan/fev, 2006.
- PARENTE, Gisleânia Dourado Landim. Cinética da fermentação e da destilação na produção de aguardente de abacaxi. 2014. 75f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal Paraíba.
- PASSARETTI FILHO, J.; PETRUCI, J. F. DA S.; CARDOSO, A. A. Development of a simple method for determination of NO₂ in air using digital scanner images. *Talanta*, v. 140, n. 2, p. 73–80, 2015.
- PENHA, Edegar das Mercês. Licor de frutas. Embrapa Agroindústria de Alimentos. – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.
- PERAZOLLI, Leinig Antônio, et al. A História e a Química da Cachaça. p. 14–17, 2013.

- PEREIRA, Adejanildo da Silva, et al. Produção de fermentado alcoólico misto de polpa de açaí e cupuaçu: aspectos cinéticos, físico-químicos e sensoriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 8, n. 1, p. 1216–1226, 2014.
- PÉRES, Laura O. et al. Conductive polymer gas sensor for quantitative detection of methanol in Brazilian sugar-cane spirit. *Food Chemistry*, v. 130, p. 1105–1107, 2012.
- SANTOS, Poliana M.; WENTZELL, Peter D.; PEREIRA-FILHO, Edenir R. Scanner Digital Images Combined with Color Parameters: A Case Study to Detect Adulterations in Liquid Cow's Milk. *Food Analytical Methods*, v. 5 n. 1, p. 89-95, 2012.
- SILVA, Maria Borges de Lima da, et al. Qualidade físico-química e sensorial de aguardentes de polpa de banana e banana integral submetidas à hidrólise enzimática. *Alim. Nutr.*, Araraquara v. 20, n. 2, p. 217-221, abr./jun. 2009
- Segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) – 2012. Ronaldo Laranjeira (Supervisão) [et al.], São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014
- SKOOG, D. A; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. São Paulo: CENGAGE Learning, 2006.
- SOUZA, Fabrício Ribeiro de, et al. Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. *Quim. Nova* v. 37, n. 7, p. 1171–1176, 2014.
- TÔRRES, Adamastor Rodrigues. Determinação da acidez total de vinhos tintos empregando titulações baseadas em imagens digitais. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- VIANA, Fernando Luiz E. Indústria de bebidas alcoólicas. *Caderno setorial ETENE*, Ano 2, n. 2, fevereiro, 2017

- VASKOVA, H. Spectroscopic determination of methanol content in alcoholic drinks International Journal of Biology and Biomedical Engineering. Vol. 8, 2014.
- VIANA, Edilson Jardin. Diagnóstico da cadeia produtiva e avaliação físico-química de cachaças do Estado.2016. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.
- YAN-YAN ZHAN, et al. A novel visible spectrophotometric method for the determination of methanol using sodium nitroprusside as spectroscopic probe. Journal of the Chinese Chemical Society, vol. 57, p. 230-235, 2010
- YAM, Kit L.; PAPADAKIS, Spyridon E. “A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. “Journal of Food Engineering, v. 61, p. 137-142, 2004.
- ZACARONI, Lidiany Mendonça et al. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. Quim. Nova v. 34, n. 2, p. 320–324, 2011.