

KENIA DIAS PESSOA

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA BASEADA EM IMAGENS DIGITAIS DE *SPOT TEST* PARA
DETERMINAÇÃO DE COBRE E ETANOL EM CACHAÇA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P475d
2016 Pessoa, Kenia Dias, 1988-
Desenvolvimento, otimização e validação de
metodologia analítica baseada em imagens digitais de
spot test para determinação de cobre e etanol em
cachaça / Kenia Dias Pessoa. - Viçosa, MG, 2016.
xvii, 64f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.
Orientador : Willian Toito Suarez.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f.57-61.

1. Química analítica - Metodologias. 2. Cachaça -
Análise. 3. Cobre. 4. Etanol. 5. Processamento de
imagem. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-graduação
em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 543.17

KENIA DIAS PESSOA

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA BASEADA EM IMAGENS DIGITAIS DE *SPOT TEST* PARA
DETERMINAÇÃO DE COBRE E ETANOL EM CACHAÇA**

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

APROVADA: 19 de maio de 2016.

César Reis

Efraim Lázaro Reis

Willian Toito Suarez
(Orientador)

“UM GRANDE ESTÍMULO NA VIDA É
SABER QUE ALGUÉM CONFIA EM NÓS,
E DE NÓS ESPERA GRANDES COISAS”.

AUTOR DESCONHECIDO

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Maria Lúcia e Antônio, pelo amor,
apoio incondicional e força
necessária para enfrentar os
momentos de dificuldade.*

*“Lembre-se de Deus em tudo o que
fizer, e Ele lhe mostrará o caminho
certo.”*

Provérbios 3:6

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de luz, sabedoria, inspiração, amor e proteção em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Maria Lúcia e Antônio, e ao meu irmão, Pablo, por todo amor, confiança e incentivo.

Ao professor Willian Toito Suarez, pela orientação e paciência.

À professora Renata Pereira Lopes Moreira pela amizade, pela imensa disposição em ajudar, por sempre “estender a mão” nos momentos difíceis e pelas contribuições ao longo do mestrado.

À estagiária Marina pela ajuda na execução do experimento e pela imensa dedicação na realização do mesmo.

Ao Vagner Bezerra, pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Química e aos colegas de laboratório.

Às amigas de república, por tornarem a rotina mais alegre e descontraída, e em especial, à Fernanda Moraes, por sempre me ouvir e me ajudar nos momentos difíceis.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de pesquisa.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos que acreditaram e torceram por mim.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Cachaça.....	2
2.2. Spot test.....	3
2.3. Teoria das cores.....	4
2.4. Digitalização de imagens.....	5
2.5. Modelo de cor RGB em imagens digitais.....	6
2.6. Métodos analíticos baseados em imagens digitais de spot test.....	7
2.6.1. Processo de formação de imagem digital em uma câmera.....	11
2.7. Validação de métodos analíticos.....	12
2.7.1. Seletividade.....	13
2.7.2. Linearidade e faixa linear.....	14
2.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação.....	14
2.7.4. Precisão.....	15
2.7.4.1. Repetitividade.....	15
2.7.4.2. Precisão intermediária.....	15
2.7.4.3. Reprodutibilidade.....	15
2.7.5. Veracidade.....	16
2.7.6. Robustez.....	16

3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	17
4.1. Aquisição e análise das imagens digitais.....	17
4.2. Otimização dos parâmetros operacionais do sistema de captura de imagens.....	17
4.2.1. Homogeneidade da iluminação na caixa.....	18
4.2.2. Intensidade luminosa.....	18
4.2.3. Volume de solução nas cavidades da placa.....	19
4.2.4. Resposta dos canais R, G e B em função da concentração.....	19
4.3. Determinação de cobre em cachaça.....	19
4.3.1. Preparo das soluções.....	19
4.3.2. Reação colorimétrica.....	21
4.3.3. Validação do método.....	22
4.3.3.1 Seletividade.....	22
4.3.3.2. Linearidade.....	23
4.3.3.3. Efeito de matriz.....	23
4.3.3.4. Limite de detecção e limite de quantificação.....	23
4.3.3.5. Veracidade.....	24
4.3.3.6. Precisão.....	25
4.3.3.6.1. Repetitividade e precisão intermediária.....	25
4.3.3.7. Robustez.....	25
4.3.3.8. Análise de amostras comerciais de cachaça.....	26
4.4. Determinação de etanol em cachaça.....	26

4.4.1. Preparo das soluções.....	26
4.4.2. Reação colorimétrica.....	27
4.4.3. Validação do método.....	28
4.4.3.1 Seletividade.....	28
4.4.3.2. Linearidade.....	28
4.4.3.3. Efeito de matriz.....	28
4.4.3.4. Limite de detecção e limite de quantificação.....	29
4.4.3.5. Veracidade.....	29
4.4.3.6. Precisão.....	30
4.4.3.6.1. Repetitividade e precisão intermediária.....	30
4.4.3.7. Robustez.....	30
4.4.3.8. Análise de amostras comerciais de cachaça.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. Otimização dos parâmetros operacionais do sistema de captura de imagens.....	31
5.1.1. Homogeneidade da iluminação na caixa.....	33
5.1.2. Intensidade luminosa.....	34
5.1.3. Volume de solução nas cavidades da placa.....	34
5.1.4. Resposta dos canais R, G e B em função da concentração.....	36
5.2. Determinação de cobre em cachaça.....	37
5.2.1. Reação colorimétrica.....	37
5.2.2. Validação do método.....	38
5.2.2.1 Seletividade.....	38
5.2.2.2. Linearidade.....	40
5.2.2.3. Efeito de matriz.....	41

5.2.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação.....	42
5.2.2.5. Veracidade.....	43
5.2.2.6. Precisão.....	43
5.2.2.6.1. Repetitividade e precisão intermediária.....	43
5.2.2.7. Robustez.....	44
5.2.2.8. Análise de amostras comerciais de cachaça.....	45
5.3. Determinação de etanol em cachaça.....	46
5.3.1. Reação colorimétrica.....	47
5.3.2. Validação do método.....	48
5.3.2.1 Seletividade.....	48
5.3.2.2. Linearidade.....	49
5.3.2.3. Efeito de matriz.....	51
5.3.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação.....	52
5.3.2.5. Veracidade.....	52
5.3.2.6. Precisão.....	53
5.3.2.6.1. Repetitividade e precisão intermediária.....	53
5.3.2.7. Robustez.....	53
5.3.2.8. Análise de amostras comerciais de cachaça.....	54
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espectro eletromagnético destacando a região da radiação visível.

Figura 2: Representação de um pixel em uma imagem digital.

Figura 3: Representação geométrica do modelo de cores RGB, segundo Gonzalez e Woods (2008).

Figura 4: Processo de formação de imagem digital em uma câmera, segundo Choi, Lee e Lee (2013).

Figura 5: Equipamento utilizado para aquisição das imagens digitais.

Figura 6: Esquema da reação de formação do quelato entre íons cobre (II) e cuprizona.

Figura 7: Espectros de varredura para os corantes Azul de Comassie Brilhante **(A)**, Direct Red 80 **(B)** e Tartrazina **(C)**.

Figura 8: Numeração **(A)** e gráfico da intensidade de cor do canal R **(B)**, referentes às cavidades da placa de porcelana, empregando o corante Azul Brilhante.

Figura 9: Gráfico do sinal analítico em função da intensidade luminosa para o corante Azul Brilhante.

Figura 10: Imagem da placa de porcelana com diferentes alíquotas de amostra **(A)**, gráfico da resposta analítica em função dos diferentes volumes adicionados nas cavidades da placa **(B)**.

Figura 11: Curvas analíticas construídas para os corantes Azul Brilhante **(A)**, Direct Red 80 **(B)** e Tartrazina **(C)**.

Figura 12: Gráfico da resposta analítica em função do tempo de reação.

Figura 13: Escala de cores (A) e curva analítica (B), obtidas pela análise de soluções-padrão contendo Cu (II).

Figura 14: Curvas analíticas construídas para Cu (II) em água (---) e matrizada (—).

Figura 15: Curvas analíticas construídas para Cu (II) em água, empregando as câmeras 7.2 MP (---) e Sony Cyber-shot DSC-W610 14.1 MP (—).

Figura 16: Gráfico da resposta analítica em função do tempo de reação, obtido para a solução de etanol 50 % v/v.

Figura 17: Escala de cores (A) e curva analítica (B), obtidas pela análise de soluções aquosas de etanol.

Figura 18: Curvas analíticas construídas para etanol em água (---), em cachaça não envelhecida (—) e em cachaça envelhecida (.....).

Figura 19: Curvas analíticas construídas para etanol em água, empregando a câmera de 7.2 MP (---), de 14.1 MP (.....) e o smartphone (—).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Graduação alcoólica e teores de componentes secundários e de contaminantes estabelecidos para a cachaça (BRASIL, 2005).

Tabela 2: Parâmetros a serem avaliados durante a validação de acordo com o tipo de ensaio (INMETRO, 2011).

Tabela 3 : Efeito de possíveis interferentes na determinação de Cu (II) (n=3).

Tabela 4: Porcentagens de recuperação de Cu (II), obtidas para os três níveis de concentração estudados.

Tabela 5: Coeficientes de variação obtidos para os três níveis de concentração estudados, em um intervalo de seis dias.

Tabela 6: Resultados obtidos para a variação do pH do tampão empregado na reação colorimétrica, em três níveis de concentração diferentes.

Tabela 7: Determinação da concentração de Cu (II) em amostras comerciais de cachaças não envelhecidas e envelhecidas (n = 3).

Tabela 8: Efeito de possíveis interferentes na determinação de etanol (n=3).

Tabela 9: Porcentagens de recuperação de etanol obtidas para os três níveis de concentração estudados.

Tabela 10: Coeficientes de variação obtidos para os três níveis de concentração estudados, em um intervalo de três dias.

Tabela 11: Determinação do teor de etanol em amostras comerciais de cachaças não envelhecidas e envelhecidas (n = 3).

LISTA DE SIGLAS

AE – Amostra Envelhecida

ANE – Amostra Não Envelhecida

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists* (Associação de Química Analítica Oficial)

CCD – *Charge Coupled Device* (Dispositivo de Carga Acoplada)

CMOS – *Complementary Metal Oxide Semiconductor* (Semicondutor Óxido Metálico Complementar)

CMY – *Cyan, Magenta e Yellow* (Ciano, Magenta e Amarelo)

CV – Coeficiente de Variação

HLS – *Hue, Lightness e Saturation* (Matiz, Luminosidade e Saturação)

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LD – Limite de Detecção

LEDs – *Light Emitting Diodes* (Diodos de Emissão de Luz)

LQ – Limite de Quantificação

RGB – *Red, Green and Blue* (Vermelho, Verde e Azul)

RSD – *Relative Standard Deviation* (Desvio Padrão Relativo)

SD – *Standard Deviation* (Desvio Padrão)

RESUMO

PESSOA, Kenia Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2016. **Desenvolvimento, otimização e validação de metodologia analítica baseada em imagens digitais de *spot test* para determinação de cobre e etanol em cachaça.** Orientador: Willian Toito Suarez.

Neste trabalho é relatado o desenvolvimento, otimização e validação de metodologia analítica para determinação do teor de cobre e de etanol em amostras comerciais de cachaça. O método foi baseado na análise de imagens digitais de *spot test* realizado com os analitos de interesse, as quais foram capturadas por uma câmera fotográfica, em um sistema construído para esta finalidade. O princípio do método é baseado na medida das tonalidades obtidas após a ocorrência da reação colorimétrica, empregando o modelo de cor RGB, cujos componentes da cor variam proporcionalmente com a concentração do analito. Para a determinação de cobre em cachaça, empregou-se a cuprizona, um reagente orgânico bidentado, que forma com o cobre um quelato azul em meio alcalino. Para essa metodologia foi obtida uma curva analítica linear no intervalo de concentração de 0,75 a 5,00 mg/L do íon metálico, com coeficiente de determinação $r^2 = 0,9988$ e limites de detecção e de quantificação respectivamente iguais a 0,078 mg/L e 0,75 mg/L. Para os estudos de veracidade, realizados em três níveis de concentração diferentes, as porcentagens de recuperação variaram de 98,32 a 104,24%. A comparação dos resultados obtidos para a análise de amostras de cachaça empregando o método desenvolvido e o método de referência mostrou que não houve diferenças significativas entre ambos os métodos, os quais foram analisados através do teste t pareado, a 95% de confiança. A análise de onze amostras de cachaça mostrou que apenas uma delas apresentou concentração de cobre acima do valor permitido pela legislação. Para a determinação de etanol, empregou-se a reação de óxido-redução na qual o cromo (VI) é reduzido a cromo (III) ou cromo (II), sendo o etanol oxidado a aldeído acético, gerando mudança da cor amarelo-alaranjada para verde-azulada. Na determinação do teor de etanol, foi obtida uma curva analítica linear no intervalo de 10 a 70 % v/v de etanol, com coeficiente de determinação $r^2 = 0,9910$ e limites de detecção e de quantificação respectivamente iguais a 1,72 % v/v e 5,74 % v/v.

Para os estudos de veracidade, realizados em três níveis de concentração diferentes, as porcentagens de recuperação variaram de 98,25 a 99,56%. A comparação dos resultados obtidos para a análise de amostras de cachaça empregando o método desenvolvido e o método de referência mostrou que não houve diferenças significativas entre ambos os métodos, os quais foram analisados através do teste t pareado, a 95% de confiança. A análise de seis amostras de cachaça mostrou que três delas apresentaram teor de etanol fora da faixa permitida pela legislação. A metodologia desenvolvida para a determinação do teor de cobre e etanol em amostras de cachaça é de fácil execução, baixo custo e consumo de reagentes e, portanto, minimiza a geração de resíduos. Ademais o sistema de captura de imagens é polivalente e robusto, podendo ser empregado em análises *in situ*.

ABSTRACT

PESSOA, Kenia Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2016. **Development, optimization and validation of analytical methodology based on spot test of digital images for determination of copper and ethanol in cachaça.** Adviser: Willian Toito Suarez.

In this work it is carried out the development, optimization and validation of analytical methodology for determination of copper content and ethanol in cachaça samples. The method was based on digital image analysis spot test performed with the analytes of interest, captured by a camera in a system built for this purpose. The principle of the method is measurement of tones obtained after the occurrence of the colorimetric reaction employing the RGB color model, color components which varies in proportion to the analyte concentration. For the determination of copper content, it was used the cuprizone a bidentate organic reagent, which forms with the copper a blue chelate in an alkaline medium. After the optimized parameters it was obtained a linear calibration curve over the concentration range 0.75 to 5.00 mg/L metal ion, with a coefficient of determination $r^2 = 0.9988$ and limits of detection and quantification respectively equal to 0.078 mg/L and 0.75 mg/L. For the accuracy studies conducted in three different concentration levels, the recovery percentages ranged from 98.32 to 104.24%. Comparison of results for the cachaça samples analysis using the developed method and the reference method showed no significant differences between both methods, which were analyzed using the paired t-test, 95% confidence. The analysis of eleven cachaça samples showed that only one of them presented a concentration of copper above the amount allowed by law. For the determination of ethanol, it was employed the reaction of redox in which chromium (VI) is reduced to chromium (III) or chromium (II) and the ethanol is oxidized to acetaldehyde, generating change in the yellow-orange color to blue-green. By determining the ethanol content, a linear calibration curve in the range from 10 to 70% v/v ethanol was obtained, with a coefficient of determination $r^2 = 0.9910$ and limits of detection and quantification respectively equal to 1.72 % v/v and 5.74% v/v. For the accuracy studies conducted in three different concentration levels, the recovery percentages ranged from 98.25 to 99.56%. Comparison of results for

the cachaça samples analysis using the developed method and the reference method showed no significant differences between both methods, which were analyzed using the paired t-test, 95% confidence. The analysis of six cachaça samples showed that three of them had ethanol content outside the range permitted by law. The methodologies developed for the determination of the copper content, and ethanol content samples are easy to implement, low cost and reagent consumption and thus minimize the generation of waste. Besides the image capture system is versatile and robust and can be used in situ analysis.

1. INTRODUÇÃO

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

Atualmente, o agronegócio da bebida caracteriza-se por uma busca incessante de pesquisas que melhorem a qualidade do produto, visando atender a demanda crescente do mercado interno e externo. Para isto, buscase o desenvolvimento ou o aprimoramento de práticas de fabricação que resultem em produtos padronizados e com qualidade comprovada nos aspectos físico-químicos e sensoriais (MACHADO, 2010). Portanto, o desenvolvimento de métodos analíticos com alta sensibilidade, robustez, rapidez e baixo custo de implementação torna-se uma alternativa interessante para a análise de componentes e contaminantes presentes na cachaça.

Os métodos analíticos baseados em imagens digitais de *spot test* têm se tornado alternativas promissoras para a determinação de analitos de interesse alimentício, uma vez que o *spot test* envolve procedimentos simples, rápidos, baseados em baixo consumo de reagentes. Além disso, o desempenho dos dispositivos digitais têm apresentado melhora significativa nos últimos anos, enquanto seus custos têm reduzido.

Neste trabalho é relatado o desenvolvimento, otimização e validação de metodologia analítica para determinação do teor de cobre e de etanol em amostras comerciais de cachaça. Tal metodologia foi baseada na análise de imagens digitais de *spot test*, empregando os analitos de interesse, sendo as imagens capturadas por uma câmera fotográfica, em um sistema construído para esta finalidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cachaça

Segundo a legislação brasileira, o termo cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada até 6 g L⁻¹ de açúcares, expressos em sacarose (BRASIL, 2005). É constituída principalmente por etanol e água, e também por compostos secundários tais como: álcoois superiores, ácidos, ésteres, fenóis, compostos nitrogenados e sulfurados, aldeídos, açúcares, entre outros, que são responsáveis pela caracterização e qualidade da bebida (ODELLO et al, 2009).

A produção da cachaça ocorre em quase todos os estados brasileiros, havendo mais de 30 mil produtores e sendo produzidas mais de 4 mil marcas (IBRAC, 2014). O estado de São Paulo é o maior produtor (44%), seguido por Pernambuco (12%), Ceará (11%), Minas Gerais (8%), Goiás (8%) e Rio de Janeiro (8%), sendo o restante da produção nacional dividida entre Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Paraíba (EMBRAPA, 2014). Este produto vem conquistando espaço tanto no mercado interno quanto externo, sendo hoje a segunda bebida mais consumida no Brasil e o terceiro destilado mais consumido no mundo (LIMA et al, 2009).

A Instrução Normativa n.13, de 29 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005) estabelece padrões de identidade e de qualidade que a cachaça deve atender, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Graduação alcoólica e teores de componentes secundários e de contaminantes estabelecidos para a cachaça (BRASIL, 2005).

Componente	Unidade	Limite	
		Mínimo	Máximo
Graduação alcoólica	% v/v* a 20°C	38,00	48,00
Açúcares	g L ⁻¹	6,00	30,00
Acidez volátil, em ácido acético	mg/100 mL*	-	150,00
Ésteres, em acetato de etila	mg/100 mL*	-	200,00
Aldeídos, em acetaldeído	mg/100 mL*	-	30,00
Furfural + hidroximetilfurfural	mg/100 mL*	-	5,00
Álcoois superiores**	mg/100 mL*	-	360,00
Congêneres***	mg/100 mL*	200,00	650,00
Álcool metílico	mg/100 mL*	-	20,00
Álcool sec-butílico (butan-2-ol)	mg/100 mL*	-	10,00
Álcool n-butílico (butan-1-ol)	mg/100 mL*	-	3,00
Acroleína (propenal)	mg/100 mL	-	5,00
Carbamato de etila	µg L ⁻¹	-	150,00
Cobre	mg L ⁻¹	-	5,00
Arsênio	µg L ⁻¹	-	100,00
Chumbo	µg L ⁻¹	-	200,00
Extrato seco	g L ⁻¹	-	6,00

* de álcool anidro

** Álcoois superiores: isobutílico + isoamílico + propílico

*** Congêneres: acidez volátil + ésteres + aldeídos + furfural + hidroximetilfurfural + álcoois superiores

Segundo LABANCA et al (2006), a cachaça produzida em alambique de cobre apresenta melhor qualidade sensorial em relação a cachaça produzida em alambiques confeccionados com outros materiais tais como aço inox, alumínio e porcelana. O emprego de equipamentos de cobre nos alambiques favorece a redução da acidez e dos níveis de aldeídos e compostos sulfurosos, os quais conferem sabor e odor estranhos à bebida. No entanto, durante o processo de destilação em alambiques de cobre, ou durante o tempo que o alambique não está em uso, há formação de um composto comumente conhecido como azinhavre (carbonato básico de cobre [CuCO₃Cu(OH)₂]). Essa substância é dissolvida pelos vapores alcoólicos acidificados, contaminando a

bebida com cobre (II), cuja presença em elevadas concentrações é indesejável, pois é prejudicial à saúde humana.

A mais conhecida enfermidade decorrente do acúmulo de cobre nos tecidos é a doença de Wilson, que é um transtorno congênito que se transmite por herança autossômica recessiva, associada a um defeito no transporte de cobre, com diminuição de ceruloplasmina, provocando um acúmulo patológico do metal, principalmente no fígado e cérebro. Além disso, estudos têm demonstrado que o cobre está associado à formação de carbamato de etila em cachaças, o qual é uma substância potencialmente cancerígena (LIMA et al, 2009).

2.2. Spot test

O *spot test* é um método aplicado a reações químicas sensíveis e seletivas, cuja principal característica é a manipulação de pequenos volumes do analito e do(s) reagente(s) (ZERAİK, SOUZA e FATIBELLO-FILHO, 2008). Neste método, gotas de uma amostra são colocadas em contato com gotas do(s) reagente(s) em uma superfície de contato porosa, como papel de filtro. Caso seja positivo o resultado da reação entre o(s) reagente(s) e a substância a ser analisada, é gerado um sinal específico, tal como modificação de cor. A superfície de contato permite a distinção entre diferentes concentrações, através da intensidade de cor desenvolvida (PACIORNIK et al, 2006).

O *spot test* envolve procedimentos simples, rápidos, de baixo custo e baixo consumo de reagentes, sendo aplicável tanto para compostos orgânicos como inorgânicos (ZERAİK, SOUZA e FATIBELLO-FILHO, 2008) e pode ser realizado em equipamentos portáteis para análises *in situ*. Estes equipamentos podem ser construídos, inclusive, com materiais de uso doméstico (LUIZ, PEZZA e PEZZA, 2013). Tais vantagens possibilitam o desenvolvimento de métodos analíticos que visam os princípios da Química Verde, cujo objetivo é desenvolver métodos e técnicas que reduzam ou eliminem o uso e a geração de substâncias nocivas para a saúde humana e para o ambiente (LUIZ, PEZZA e PEZZA, 2013).

Estes métodos têm sido amplamente empregados em diversas aplicações, tais como: análises clínicas, ambientais, de alimentos e de água

(LUIZ, PEZZA e PEZZA, 2012). Na literatura há vários procedimentos empregando *spot tests*, como por exemplo, determinação de ácido acetilsalicílico e dipirona em produtos farmacêuticos, determinação de potássio em soro sanguíneo, detecção de espécies adulterantes em urina, análise de Fe(III) em aço sintético, controle de nitritos em água, determinação do íon amônio em águas residuárias, entre outros (ZERAIK, SOUZA e FATIBELLO-FILHO, 2008).

2.3. Teoria das cores

A cor pode ser definida como a aparência subjetiva da luz, sendo detectada pelo olho após interagir com a matéria. A faixa do espectro eletromagnético à qual o sistema visual humano é sensível se estende aproximadamente de 400 a 700 nm, sendo denominada região visível (TILEY, 2011), conforme mostrado na Figura 1.

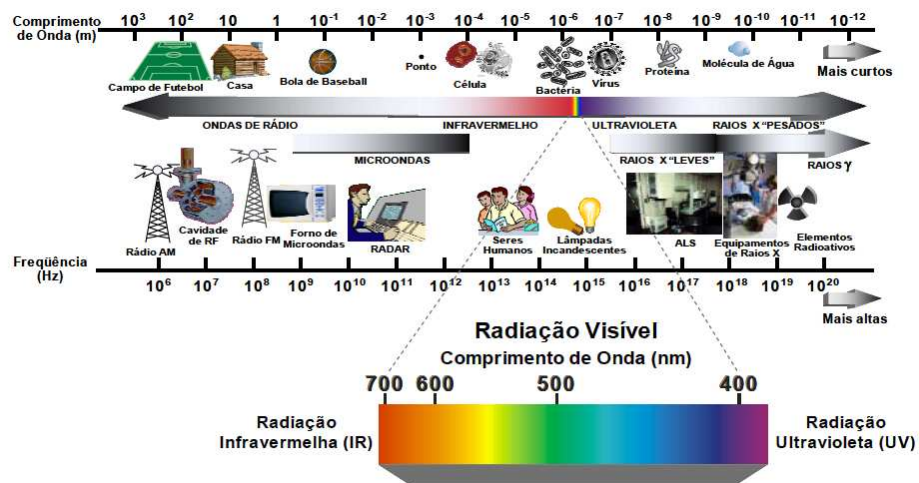


Figura 1: Espectro eletromagnético destacando a região da radiação visível (QUEIROZ e GOMES, 2006).

Dentro dessa faixa, o olho percebe comprimentos de onda diferentes como cores distintas (TILEY, 2011).

Uma substância colorida absorve seletivamente comprimentos de onda da região visível do espectro eletromagnético e a coloração resultante, a qual é

conhecida como cor complementar, é composta pelos comprimentos de ondas restantes, ou seja, pelos comprimentos de onda que são refletidos pela substância (GOMES et al, 2008).

Uma imagem pode ser classificada como resultado de um estímulo luminoso. Quando uma cena real ou fotografia é observada, o olho humano associa os comprimentos de onda refletidos com o padrão de cores e o cérebro humano interpreta as imagens. Os dispositivos eletrônicos de captura de imagens digitais funcionam de forma análoga ao olho humano (GOMES et al, 2008).

2.4. Digitalização de imagens

Para uma cena real ser convertida em uma imagem digital, a cena deve ser capturada por um dispositivo eletrônico, como uma câmera fotográfica ou scanner, e o sinal gerado deve ser convertido em uma forma numérica (GOMES et al, 2008). Na forma digital, a imagem pode ser manipulada e analisada para medir vários parâmetros tais como: área, forma, intensidade de cor, entre outros, através de programas computacionais (PACIORNIK et al, 2006).

A forma mais usual para conversão de uma cena real em uma imagem digital consiste na delimitação de uma área que é dividida em um número finito de posições (x, y), sendo cada posição denominada elemento de imagem ou pixel, cada qual apresentando uma intensidade específica, como mostrado na Figura 2 (GOMES et al, 2008).

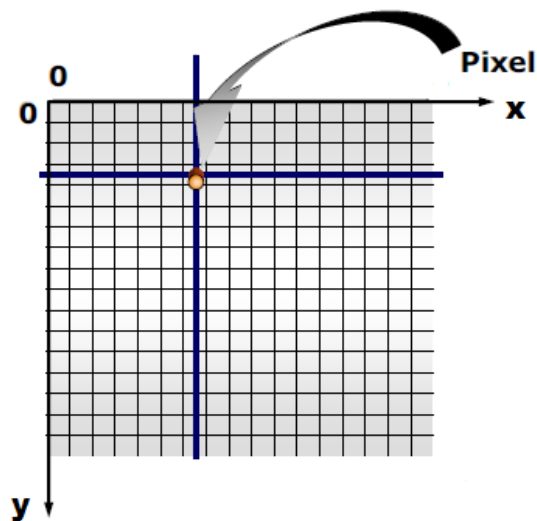


Figura 2: Representação de um pixel em uma imagem digital. Adaptado de Queiroz e Gomes, 2006.

2.5. Modelo de cor RGB em imagens digitais

As imagens digitais coloridas podem ser representadas por diferentes modelos de cores, tais como RGB (do inglês *red*, *green* e *blue*), CMY (do inglês *cyan*, *magenta* e *yellow*), HLS (do inglês *hue*, *lightness* e *saturation*) (PACIORNIK et al, 2006), os quais foram criados para permitir a especificação das cores em um formato padronizado (GONZALEZ e WOODS, 2008).

O modelo RGB é reconhecido como o sistema de cor mais amplo e mais aceito (LOPEZ-MOLINERO et al, 2010). Neste modelo, são empregadas as cores primárias vermelha, verde e azul, sendo utilizada a luz transmitida para exibição das cores (YAM e PAPADAKIS, 2004), e as demais cores são geradas pela combinação linear destas três cores, motivo pelo qual o modelo é dito aditivo. As intensidades das cores geradas são armazenadas em 256 níveis, sendo adotada uma escala de 0 a 255, em que 0 representa a cor preta pura e 255 representa a cor branca pura (PACIORNIK et al, 2006).

Este modelo pode ser representado em um espaço tridimensional cúbico, conforme mostrado na Figura 3.

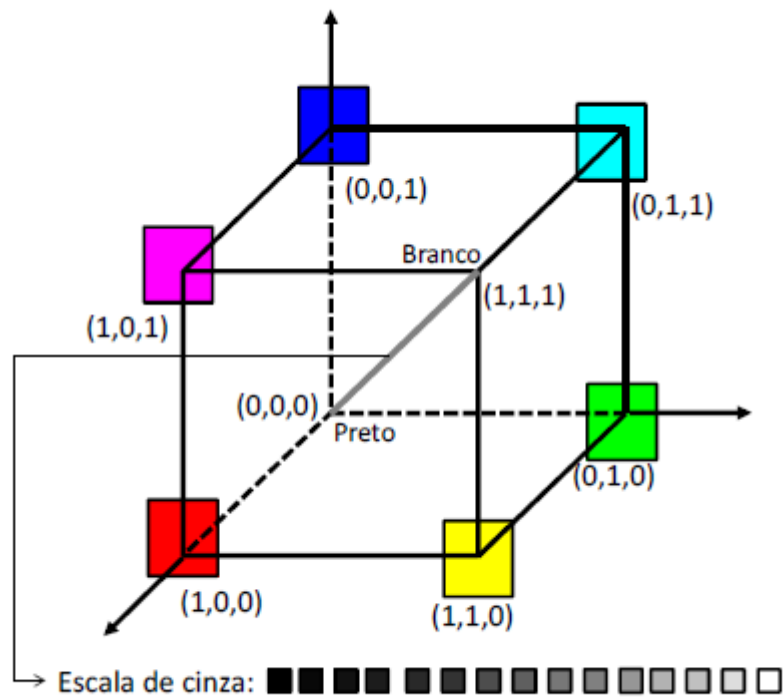


Figura 3: Representação geométrica do modelo de cores RGB segundo, Gonzalez e Woods (2008).

Neste cubo, as cores primárias (vermelha, verde e azul) e as cores secundárias (ciano, magenta e amarelo) estão representadas nos vértices, com valores normalizados de 0 a 1, os quais representam as intensidades de cor de 0 a 255, respectivamente. Na origem (0, 0, 0) está localizada a cor preta pura, a qual não recebe contribuição de nenhuma das cores primárias, e na extremidade oposta (1, 1, 1) está localizada a cor branca pura, a qual recebe contribuição das três cores primárias em suas máximas intensidades. Na diagonal está localizada a escala de cinza, na qual as três cores primárias apresentam a mesma contribuição ($R = G = B$) (GONZALEZ e WOODS, 2008).

2.6. Métodos analíticos baseados em imagens digitais de *spot test*

O desempenho de dispositivos digitais tais como câmeras fotográficas, webcams, scanners e celulares com câmeras fotográficas embutidas tem melhorado significativamente nos últimos anos, enquanto seus custos têm reduzido. Além disso, vários softwares altamente eficientes para edição de

imagens digitais como Adobe Photoshop, Paintshop Pro e Vegas estão disponíveis, permitindo que as imagens sejam facilmente manipuladas pelo usuário, até mesmo em computadores de uso pessoal (CHOI, LEE e LEE, 2013).

O uso de câmeras com sensores CCD (*Charge Coupled Device*) e CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*) tem sido introduzido na química analítica por diferentes razões tais como rápida captura de imagens, estabilidade de fundo e boa linearidade, promovendo assim uma oportunidade para o desenvolvimento de novos métodos analíticos com alta sensibilidade, robustez, rapidez e baixo custo de implementação (CACIANO DE SENA et al, 2013).

Apesar das câmeras CMOS serem menores, mais rápidas e mais baratas do que as câmeras CCD, estas últimas apresentam melhor qualidade de imagem e têm sido mais amplamente utilizadas como detector, já que foram desenvolvidas antes das câmeras CMOS (KOMPANY-ZAREH et al, 2012).

Estes sensores são capazes de converter a intensidade da luz incidente em valores digitais armazenáveis, os bits, e a resposta analítica gera uma imagem baseada no modelo de cores RGB (CACIANO DE SENA et al, 2013), no qual são utilizadas três matrizes para armazenar as informações contidas em uma imagem. Os valores da cor vermelha são armazenados na matriz R (red), da cor verde na matriz G (green) e da cor azul na matriz B (blue), sendo cada matriz em um sensor diferente. Como o armazenamento é restrito, a intensidade de radiação em cada sensor é armazenada com 8 bits, totalizando 256 níveis para a região do visível. A combinação das matrizes R, G e B permite a aquisição de aproximadamente 17 milhões de cores (GOMES et al, 2008).

O uso de imagens digitais representa uma atual oportunidade para o desenvolvimento rápido e direto de determinações quantitativas, particularmente quando combinadas com métodos colorimétricos ou cromogênicos, que podem ser analisados a partir de dados do modelo de cores RGB (LOPEZ-MOLINERO et al, 2010).

As câmeras digitais têm sido amplamente utilizadas em determinações quantitativas baseadas em reações colorimétricas (CHOODUM et al, 2013), uma vez que os dados do modelo RGB podem ser lidos diretamente nos

sensores CCD dessas câmeras (LOPEZ-MOLINERO et al, 2010). Esta aplicação baseia-se nas medidas das tonalidades obtidas nas imagens digitais após a ocorrência da reação colorimétrica. Embora a cor seja subjetiva, ela facilita a quantificação, através do uso de modelos de cores e dispositivos de edição de imagem (CHOODUM et al, 2013).

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

Choodum e colaboradores (2013) desenvolveram um método para determinação de trinitrotolueno em solo, empregando um *iPhone* e uma câmera digital como detectores. Segundo os autores, o método apresentou baixos limites de detecção, precisão satisfatória e faixa linear ampla, além de ser rápido, economicamente viável e aplicável para análises *in situ*.

Morais e Lima (2014) desenvolveram um método para análise simultânea de glicose, creatinina, triglicerídios, colesterol total e proteína total em sangue humano, empregando um *scanner* como detector. De acordo com os autores, o método pode ser usado para substituição de ensaios espectrofotométricos tradicionalmente empregados em análises bioquímicas, reduzindo a quantidade de reagentes e resíduos gerados, e conseqüentemente, os custos das análises, além de aumentar a frequência analítica em relação ao método tradicional.

Souza e colaboradores (2014) avaliaram o desempenho de dispositivos eletrônicos para captura de imagens digitais após a realização de ensaios colorimétricos em microzonas impressas, a fim de determinar o teor de ferro (II) em medicamentos. Os dispositivos testados foram um microscópio óptico portátil, um celular com câmera de 5 Megapixels, uma câmera digital de 7,2 Megapixels e o *scanner* de uma impressora multifuncional. Os resultados mostraram que todos os dispositivos testados possuem elevado potencial de aplicação como detectores colorimétricos, além de vantagens como: acessibilidade, portabilidade e baixo custo.

2.6.1. Processo de formação de imagem digital em uma câmera

A sequência das etapas de processamento de imagens é muito semelhante em todas as câmeras digitais (BAYRAM, SENCAR e MEMON, 2008). A figura 4 mostra o processo de formação de uma imagem digital em uma câmera.

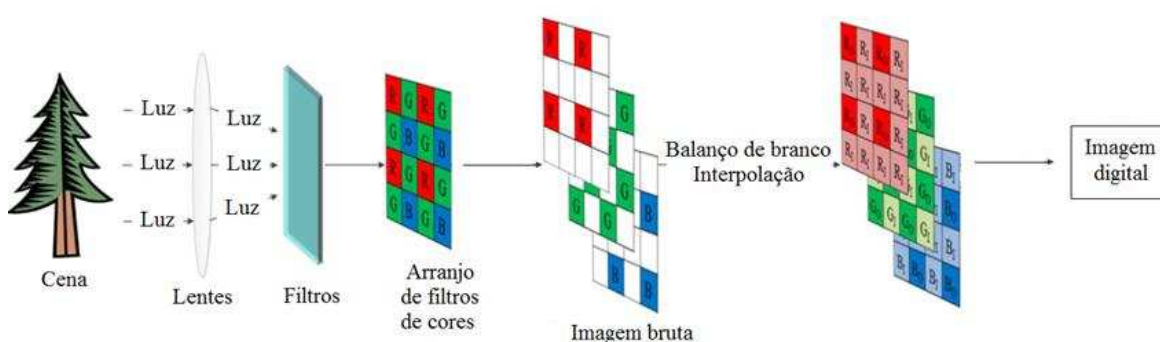


Figura 4: Processo de formação de imagem digital em uma câmera, segundo Choi, Lee e Lee (2013).

A luz refletida da cena passa através de lentes, sendo transmitida e convergida para filtros de suavização e de corte de infravermelhos, os quais embaçam a imagem de entrada e bloqueiam a radiação infravermelha, respectivamente (CHOI, LEE e LEE, 2013).

Os sensores CCD e CMOS medem a intensidade da luz, mas não identificam as informações de cores. Assim, um arranjo de filtros de cores é colocado em frente ao sensor para separação das informações de cor. Cada filtro permite apenas que a cor desejada passe através dele. Por exemplo, a luz que passa através de um filtro vermelho inclui apenas o componente vermelho e assim o sensor pode reconhecer a cor da luz como vermelha. O padrão de filtros de cores mais utilizado em câmeras digitais comerciais é o padrão Bayer (CHOI, LEE e LEE, 2013), o qual baseia-se no uso de três filtros, vermelho, verde e azul, sendo as demais cores geradas pela combinação das intensidades dessas três cores, ou seja, tal padrão é baseado no modelo de cores RGB (GOMES et al, 2008).

Após passar pelo arranjo de filtros, a luz chega até o sensor e sua intensidade é medida, sendo formada a imagem bruta. Em seguida, esta passa

por um processo de balanço de branco e de interpolação do arranjo de filtros de cores (CHOI, LEE e LEE, 2013), sendo finalmente obtida a imagem digital. A operação de balanço de branco é realizada para remoção de cores irreais, para que os objetos percebidos na cor branca, pelo sistema visual humano, apareçam em branco na imagem digital (BAYRAM, SENCAR e MEMON, 2008), e a interpolação é realizada para preenchimento de pixels, uma vez que a imagem bruta apresenta muitos pixels vazios (CHOI, LEE e LEE, 2013).

2.7. Validação de métodos analíticos

A necessidade de se demonstrar a qualidade das medições químicas, principalmente através de sua comparabilidade e confiabilidade, vem sendo cada vez mais exigida. Neste contexto, para que um método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por um processo de avaliação denominado validação (RIBANI et al, 2004). A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) disponibilizam documentos para o procedimento de validação de métodos, os quais são, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003 e o guia INMETRO DOQ-CGCRE-008, de julho de 2011.

Os principais parâmetros a serem avaliados durante a validação, também conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e figuras analíticas de mérito são: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez (RIBANI et al, 2004). Estes parâmetros podem variar de acordo com o tipo de ensaio, conforme mostrado na Tabela 2 (INMETRO, 2011).

Tabela 2: Parâmetros a serem avaliados durante a validação de acordo com o tipo de ensaio (INMETRO, 2011).

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do componente (ou analito) em maior teor (1)	Análise de elementos menores e traços (2)	Propriedades físicas
Precisão		✓	✓	✓
Seletividade	✓	✓	✓	✓
Tendência/recuperação		✓	✓	✓
Robustez	✓	✓	✓	✓
Sensibilidade/linearidade/ faixa de trabalho		✓	✓	✓
Limite de detecção	✓		✓	
Limite de quantificação			✓	

(1) Dependendo da faixa de concentração do analito pode não ser necessária a determinação dos limites de detecção e de quantificação – componentes maiores com concentração entre 1 a 100%.

(2) São considerados como de menor teor concentrações entre 0,01 a 1% e elementos traços aqueles cuja concentração está abaixo de 0,01%.

2.7.1. Seletividade

A seletividade de um método analítico é a capacidade que este possui de medir exatamente as substâncias de interesse na presença de outros componentes, que possam interferir na análise (ANVISA, 2003). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2011).

Para avaliação da seletividade, podem ser feitos experimentos que envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com presença e ausência do analito e avaliação da capacidade de identificação do analito na presença de interferentes. Caso não haja disponibilidade de interferentes, a avaliação de medição do analito é feita por diferentes métodos,

técnicas ou através de variações nas condições experimentais (INMETRO, 2011).

2.7.2. Linearidade e faixa linear

A linearidade de resposta de um método corresponde à capacidade do mesmo demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico denominado faixa linear (ANVISA, 2003).

Este parâmetro pode ser verificado através da curva analítica, cuja qualidade é estimada através do coeficiente de correlação r , sendo que quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão (RIBANI et al, 2004). Segundo o INMETRO (2011), uma outra alternativa para avaliação da linearidade seria através da análise de variância (ANOVA) na equação da regressão linear.

2.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada por um determinado procedimento experimental, mas não necessariamente quantificada (RIBANI et al, 2004). O LD para um procedimento analítico pode variar de acordo com o tipo de amostra, mas durante um processo de validação é suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser diferenciada do sinal do branco/ruído (INMETRO, 2011).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, em condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Ambos parâmetros podem ser calculados de diferentes formas: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo este último o método mais confiável estatisticamente (RIBANI et al, 2004).

2.7.4. Precisão

A precisão é a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, sob condições definidas, repetidos para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões (RIBANI et al, 2004). As três formas mais usuais de expressá-la são através da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, as quais são geralmente expressas pelo desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD) (INMETRO, 2011).

Segundo Ribani e colaboradores (2004), em métodos de quantificação envolvendo macro quantidades, é requerido um CV de 1 a 2%, porém em métodos de análises de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra.

2.7.4.1. Repetitividade

A repetitividade, também denominada precisão intra-corrída, representa o grau de concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação (ANVISA, 2003).

2.7.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária, também conhecida como precisão inter-corrída, representa a concordância entre resultados do mesmo laboratório, mas sob condições variadas e definidas, tais como: dias diferentes, analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003).

2.7.4.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial representa a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, e deve ser considerada em estudos geralmente aplicados à padronização de metodologias analíticas, como por exemplo, para inclusão de métodos analíticos em farmacopéias (ANVISA, 2003).

2.7.5. Veracidade

A veracidade representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor tido como verdadeiro (ANVISA, 2003). É sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, isto é, está associada a valores de precisão (RIBANI et al, 2004).

Os processos geralmente adotados para avaliar a veracidade de um método são: uso de materiais de referência, comparação de métodos, adição padrão e ensaios de recuperação (RIBANI et al, 2004).

2.7.6. Robustez

A robustez de um método mede sua capacidade de resistência a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ANVISA, 2003).

Para determinar a robustez de um método, o INMETRO (2011) recomenda o teste de Youden, o qual também permite ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Desenvolver um método colorimétrico de análise para determinação de cobre e etanol em cachaças, baseado em análise de imagens digitais de *spot test*, obtidas a partir de uma câmera fotográfica com sensor CCD.

3.2. Objetivos específicos

- Otimizar os parâmetros operacionais do sistema construído para aquisição das imagens digitais;
- Otimizar as reações colorimétricas para cobre e etanol;
- Validar a metodologia para análise de cobre e etanol em cachaça;

- Aplicar a metodologia para determinação de cobre e etanol em amostras comerciais de cachaça e verificar se os teores destes analitos estão de acordo com os limites permitidos pela legislação brasileira.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Aquisição e análise das imagens digitais

Para garantir a eficiência na aquisição das imagens digitais e minimizar os efeitos de sombra ou reflexo causados pela luz externa, foi utilizado um equipamento construído conforme descrito por Benedetti (2013), com pequenas adaptações. Este equipamento consistia em uma caixa plástica na cor preta de dimensões 21 x 15 x 7 cm, contendo uma bateria Unipower de 12V e 1,3 àmperes/hora, quatro LEDs (*Light Emitting Diodes*) de luz branca BLUEX de 20 a 100 mA com potenciômetros para controle de intensidade, uma chave liga/desliga e conectores para acoplar um carregador de bateria 12V. Na parte interna da caixa foi aplicada uma camada de tinta preta fosca, para garantir maior homogeneidade do ambiente. Na parte superior da caixa foi feita uma abertura circular para acoplar a lente de uma câmera digital convencional. No interior da caixa havia espaço suficiente para acomodar uma placa de porcelana CHIAROTTI, contendo 12 cavidades, na qual as reações colorimétricas foram realizadas. Os produtos colorimétricos foram fotografados com uma câmera SONY CYBER-SHOT DSC-S730 de resolução 7.2 Megapixels. A função *flash* da câmera não foi utilizada na captura das imagens, e os demais parâmetros (foco, balanço de branco e sensibilidade) foram mantidos no modo automático.

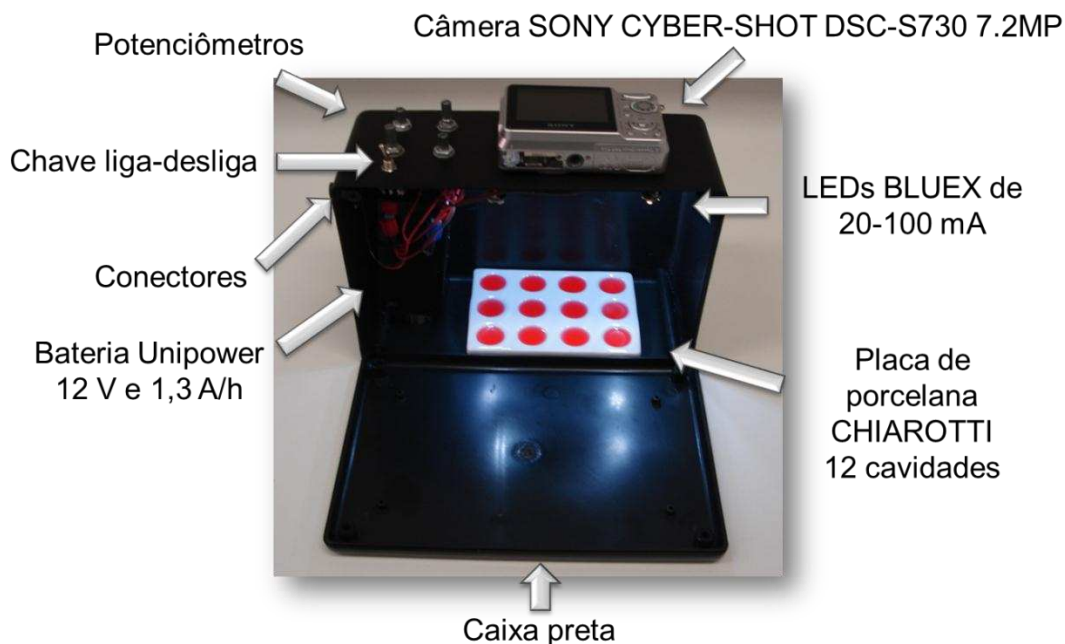


Figura 5: Equipamento utilizado para aquisição das imagens digitais.

Após a captura das imagens, as mesmas foram analisadas no software comercial livre *ImageJ*. As imagens foram carregadas no programa mencionado, sendo selecionada uma área retangular de dimensões $w \times h = 32 \times 26$ pixels e em seguida aplicado o comando “*Analyze* → *Tools* → *Color Histograms*”, para obter os valores médios das intensidades de cor dos canais RGB.

A resposta analítica, ou seja, intensidade de cor (I_{nt}), foi calculada a partir da fórmula:

$$I_{nt} = -\log(I_x / I_o) \quad (1)$$

Onde I_x é o valor médio da intensidade de cor do canal R, G ou B da amostra e I_o é o valor médio da intensidade de cor do branco. Estes valores médios podem variar de 0 a 255.

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

Os parâmetros operacionais (homogeneidade da iluminação, intensidade luminosa, volume de solução nas cavidades da placa, resposta dos canais R, G e B em função da concentração) do sistema foram avaliados com o objetivo de se buscar melhor desempenho do sistema de captura de imagem. Soluções estoque de concentração $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L dos corantes Azul de Comassie Brilhante, Tartrazina e Direct Red 80 foram preparadas pela dissolução do respectivo corante em água destilada, sendo as demais soluções obtidas a partir de diluições das soluções estoque.

Para verificar o canal de resposta (R, G ou B) de cada corante, foi feita uma varredura espectral na faixa de comprimento de onda de 400 – 700 nm para Azul Brilhante e Direct Red 80 e de 300 – 700 nm para Tartrazina, utilizando um espectrofotômetro HITACHI U-2000 e empregando soluções de concentração $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L.

4.2.1. Homogeneidade da iluminação na caixa

Para verificar a homogeneidade da iluminação nas cavidades da placa de porcelana, foram adicionados 800 μ L da solução do corante Azul Brilhante $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L em cada cavidade, sendo mantidas fixas a intensidade luminosa dentro da caixa e a posição da placa de porcelana, a qual foi centralizada entre os LEDs. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3), sendo capturada uma imagem para cada ensaio. Os resultados foram avaliados através do teste de Tukey.

4.2.2. Intensidade luminosa

Para avaliar o efeito da intensidade luminosa sobre a resposta analítica empregou-se um luxímetro Minipa MLM-1011 variando a intensidade luminosa incidente em cinco níveis diferentes: 20, 35, 90, 240 e 980 LUX. Este estudo foi realizado adicionando-se 800 μ L da solução do corante Azul Brilhante $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, em três cavidades da placa de porcelana. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3), sendo capturada uma imagem para cada intensidade avaliada.

4.2.3. Volume de solução nas cavidades da placa

Para avaliar o efeito do volume de amostra sobre a resposta analítica, variou-se o volume da solução do corante Azul Brilhante $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L de 100 a 800 μ L (com incrementos de 100 μ L) nas cavidades da placa de porcelana, mantendo fixa a intensidade luminosa determinada em 4.2.2. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3), sendo capturada uma imagem para cada ensaio.

4.2.4. Resposta dos canais R, G e B em função da concentração

Para verificar se os canais R, G e B respondiam linearmente em função da concentração do analito, foram construídas curvas analíticas empregando-se os corantes Azul Brilhante, Tartrazina e Direct Red 80, cujas faixas foram testadas de $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L a $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L, utilizando a intensidade luminosa e o volume determinados em 4.2.2 e 4.2.3, respectivamente. As curvas foram construídas em triplicata (n=3), sendo capturada uma imagem para cada curva. A qualidade das curvas foram avaliadas através do coeficiente de determinação r^2 .

4.3. Determinação de cobre em cachaça

4.3.1. Preparo das soluções

A solução estoque de Cu (II) 500 mg/L foi preparada pela dissolução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em água destilada, sendo armazenada à temperatura ambiente. As demais soluções de Cu (II) em diferentes concentrações foram obtidas pela diluição da solução estoque em água destilada.

A solução estoque de cuprizona (bis(ciclohexanona) oxalildihidrazona) 500 mg/L foi preparada em uma mistura etanol – água destilada 60% (v/v), sendo armazenada a 4 °C. As demais soluções em diferentes concentrações foram obtidas pela diluição da solução estoque em etanol – água destilada 60% (v/v).

A solução tampão fosfato 0,250 mol/L em pH 8,0 foi preparada pela dissolução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NaH_2PO_4 em água destilada, sendo armazenada à temperatura ambiente.

4.3.2. Reação colorimétrica

Para a determinação de cobre em cachaça, empregou-se como ligante a cuprizona, um reagente orgânico bidentado, que forma com o cobre um quelato azul em meio ligeiramente alcalino, conforme mostrado na Figura 6.

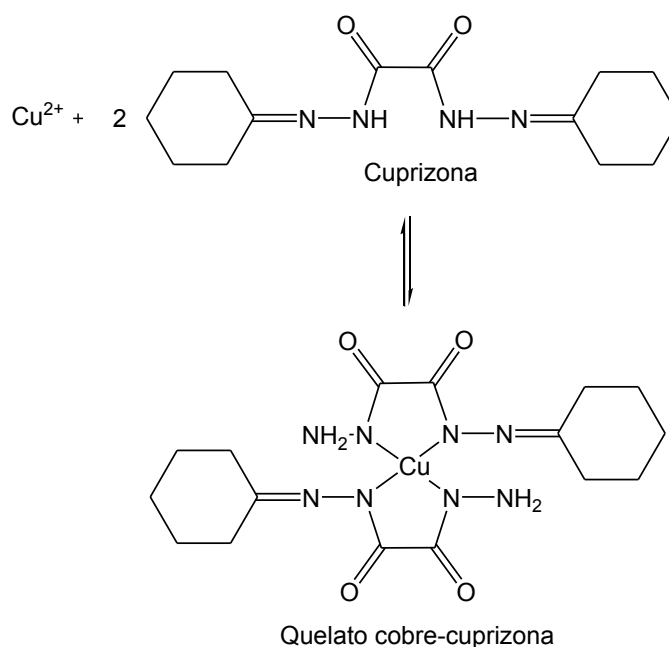


Figura 6: Esquema da reação de formação do quelato entre íons cobre (II) e cuprizona.

Inicialmente, foram realizados ensaios para escolha da concentração da solução de cuprizona que gerasse uma escala de cores. Foram empregadas soluções em quatro concentrações diferentes: 44,0 mg/L, 88,0 mg/L, 132 mg/L e 176 mg/L de cuprizona. Ademais, para verificar o efeito do tempo sobre a resposta analítica, a reação foi monitorada durante 10 min, em intervalos de 1 min, empregando uma solução de Cu (II) 1,25 mg/L. Ambos os ensaios foram realizados apenas uma vez ($n=1$), sendo capturada uma imagem para cada ensaio.

Para ambos os experimentos supracitados, a reação foi realizada diretamente nas cavidades da placa de porcelana, sendo utilizadas soluções de Cu (II) nas seguintes concentrações: 0,75; 1,25; 2,50; 3,75; 5,0 e 6,25 mg/L.

Os volumes foram fixados em 100 µL de tampão, 400 µL de solução de Cu (II) (ou amostra de cachaça, no caso da análise de amostras reais) e 100 µL de cuprizona, obtendo-se assim o volume ótimo determinado em 4.2.3.

O branco analítico foi obtido pela substituição da solução de Cu (II) por água destilada. Para a análise de amostras reais, ou seja, cachaças envelhecidas e não envelhecidas, o branco analítico consistiu na substituição da cachaça não envelhecida por água destilada e, no caso da cachaça envelhecida, a solução de cuprizona foi substituída por água destilada.

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

Como a cor resultante após a reação colorimétrica pode ser uma mistura de cores, em que qualquer canal pode ser empregado na análise, foram monitorados os canais R, G e B, para verificar qual destes apresentava resposta linear com a variação da concentração.

4.3.3. Validação do método

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

4.3.3.1 Seletividade

O efeito de possíveis interferentes na determinação de Cu (II) foi avaliado através do sinal analítico obtido após a realização das reações colorimétricas. Diferentes proporções entre o analito e os interferentes foram testadas, tais como 1:1, 1:5 e 1:10, sendo mantida fixa a concentração de Cu (II) em 2,0 mg/L. Os possíveis interferentes testados foram Pb (II), Fe (II), Fe

(III), Ni (II), Mn (II), Al (III) e Zn (II). Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3), sendo capturada uma imagem para cada ensaio.

O erro relativo percentual sobre o sinal analítico do Cu (II) foi calculado através da equação:

$$E\% = (S_{\text{analito + interferente}} - S_{\text{analito sem interferente}} / S_{\text{analito sem interferente}}) \times 100 \quad (2)$$

4.3.3.2. Linearidade

Para verificar a linearidade do método, foram preparadas soluções de Cu (II) em concentrações entre 0,25 e 7,50 mg/L, em sete níveis diferentes, e realizada a reação colorimétrica. Obteve-se o sinal analítico para cada concentração e os dados foram plotados em um gráfico da intensidade de cor em função da concentração de Cu (II) (mg/L). Cada nível de concentração foi preparado em replicata (n=7). A regressão dos pontos foi feita pelo Método dos Mínimos Quadrados e a qualidade do ajuste linear foi avaliada pelo coeficiente de determinação (r^2) e pela realização da análise de variância (ANOVA), utilizando as ferramentas estatísticas do Excel.

4.3.3.3. Efeito de matriz

O estudo do efeito de matriz foi feito através da comparação dos parâmetros da curva analítica obtida para soluções aquosas do padrão de Cu (II) com os parâmetros da curva analítica matrizada. Esta última foi preparada conforme descrito em 3.3.3.2., porém utilizando como solvente uma cachaça não envelhecida, isenta de Cu (II). As médias das respostas dos analitos de ambas as curvas analíticas foram comparadas através do teste estatístico F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e do teste t (*Student*) de comparação de médias (INMETRO, 2003), utilizando as ferramentas estatísticas do Excel.

4.3.3.4. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram calculados a partir de parâmetros da curva analítica obtida em 4.3.3.2., através das equações 3 e 4, respectivamente:

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

$$LQ = (10 \times SD) / S \quad (4)$$

Onde SD é a estimativa do desvio padrão da resposta do branco ($n=7$) e S é o coeficiente angular da curva analítica.

4.3.3.5. Veracidade

A veracidade do método foi avaliada através de ensaios de recuperação em três níveis de concentração diferentes, sendo estes iguais a 0,75; 2,88 e 5,00 mg/L. Neste procedimento, amostras de cachaça não envelhecida isenta de Cu (II) foram fortificadas em cada nível de interesse e em seguida foi realizada a reação colorimétrica. A recuperação percentual foi determinada através da equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = (C_{\text{experimental}} / C_{\text{teórica}}) \times 100 \quad (5)$$

Onde $C_{\text{experimental}}$ é a concentração média do analito determinada experimentalmente na amostra fortificada e $C_{\text{teórica}}$ é a concentração do analito adicionada na amostra não fortificada.

Os ensaios foram feitos em replicatas ($n=7$), e cada solução do analito foi adicionada em uma cavidade aleatória da placa de porcelana, sendo capturada uma única imagem.

A veracidade do método também foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos nas análises de amostras de cachaças com os resultados fornecidos por um método de referência, ou seja, Espectrometria de Absorção Atômica. As amostras de cachaças foram analisadas em um espectrômetro AGILENT TECHNOLOGIES, modelo 240 FS AA. Os resultados obtidos por ambos os métodos foram comparados através do teste t pareado, empregando as ferramentas estatísticas do Excel.

4.3.3.6. Precisão

A precisão do método foi avaliada através de um estudo intralaboratorial, sendo analisadas a repetitividade e a precisão intermediária.

4.3.3.6.1. Repetitividade e precisão intermediária

A repetitividade foi avaliada através de ensaios de recuperação em três níveis de concentração diferentes, sendo estes iguais a 0,75; 2,88; e 5,00 mg/L. Neste procedimento, amostras de cachaça não envelhecida isenta de Cu (II) foram fortificadas em cada nível de interesse, as quais foram preparadas e analisadas no mesmo dia, sendo em seguida realizada a reação colorimétrica. O coeficiente de variação (CV) foi determinado através da equação:

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

Onde SD é a estimativa do desvio-padrão da concentração média do analito determinada experimentalmente na amostra fortificada e $C_{\text{experimental}}$ é a concentração média do analito determinada experimentalmente na amostra fortificada.

Os ensaios foram feitos em replicatas ($n=7$), e cada solução do analito foi adicionada em uma cavidade aleatória da placa de porcelana, sendo capturada uma única imagem.

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

4.3.3.7. Robustez

A robustez do método foi verificada através da variação do pH do tampão e através da troca da câmera por um modelo diferente. O efeito do pH sob a resposta analítica foi avaliado pela variação do pH em $\pm 0,2$ unidades, ou

seja, foram testados os valores de pH 7,8 e 8,2. Os ensaios foram feitos em triplicata, sendo capturada uma imagem para cada ensaio.

O erro relativo percentual sobre o sinal analítico do Cu (II) foi calculado através da equação:

$$E\% = (S_{pH} - S_{pH\ 8,0} / S_{pH\ 8,0}) \times 100 \quad (7)$$

Onde S_{pH} é o sinal analítico obtido para Cu (II) em tampão fosfato no valor de pH testado e $S_{pH\ 8,0}$ é o sinal analítico obtido para Cu (II), empregando tampão fosfato em pH = 8,0.

O efeito da troca da câmera sob a resposta analítica foi avaliado pela comparação de duas curvas analíticas construídas conforme descrito em 4.3.3.2, sendo as imagens de uma das curvas capturadas através de uma câmera Sony Cyber-shot DSC-W610 de resolução 14.1 Megapixels. Os ensaios foram realizados em replicatas (n=7), sendo capturada uma imagem para cada ensaio.

4.3.3.8. Análise de amostras comerciais de cachaça

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

4.4. Determinação de etanol em cachaça

4.4.1. Preparo das soluções

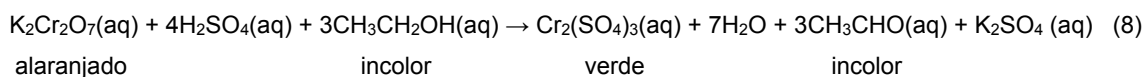
As soluções padrão de etanol foram preparadas pela diluição de etanol absoluto em água destilada.

As soluções de dicromato de potássio 0,038; 0,075; 0,150 e 0,225 mol/L foram preparadas pela dissolução do sal em água destilada.

As soluções de ácido sulfúrico 4,50; 9,00 e 13,5 mol/L foram preparadas pela diluição de ácido sulfúrico concentrado (18,0 mol/L), de pureza 95% em água destilada.

4.4.2. Reação colorimétrica

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



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

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

Os volumes foram fixados em 100 µL de ácido, 300 µL de dicromato e 200 µL de solução de etanol (ou amostra de cachaça, no caso da análise de amostras reais), obtendo assim o volume ótimo determinado em 4.2.3.

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

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

4.4.3. Validação do método

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

4.4.3.1 Seletividade

O efeito de possíveis interferentes na determinação de etanol foi avaliado através do sinal analítico obtido após a realização das reações colorimétricas. Diferentes proporções entre o analito e os interferentes foram testadas, tais como 1:1, 1:0,5 e 1:0,1, sendo mantida fixa a concentração da solução de etanol em 20 % v/v. Os possíveis interferentes testados foram metanol, propanol, isobutanol, acetaldeído e acetato de etila. Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3), sendo capturada uma imagem para cada ensaio.

O erro relativo percentual sobre o sinal analítico do etanol foi calculado através da equação (2), descrita em 4.3.3.1.

4.4.3.2. Linearidade

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

4.4.3.3. Efeito de matriz

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

Os coeficientes angulares das curvas analíticas aquosa e matrizadas foram comparadas através do teste estatístico F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e do teste t (*Student*) de comparação de médias (INMETRO, 2003), utilizando as ferramentas estatísticas do Excel.

4.4.3.4. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método foram calculados a partir de parâmetros da curva analítica obtida em 4.4.3.2., através das equações (3) e (4), descritas em 4.3.3.4.

4.4.3.5. Veracidade

A veracidade do método foi avaliada através de ensaios de recuperação em três níveis de concentração diferentes, sendo estes iguais a 15; 20; e 25 % v/v. Neste procedimento, amostras de uma cachaça envelhecida foram preparadas pelo método de adição de padrão, descrito em 4.4.3.3. As concentrações dos padrões recuperadas foram determinadas através da equação da reta.

Os ensaios foram feitos em replicatas ($n=7$), e cada solução do analito foi adicionada em uma cavidade aleatória da placa de porcelana, sendo capturada uma única imagem.

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

4.4.3.6. Precisão

A precisão do método foi avaliada através de um estudo intralaboratorial, sendo analisadas a repetitividade e a precisão intermediária.

4.4.3.6.1. Repetitividade e precisão intermediária

A repetitividade foi avaliada através de ensaios de recuperação em três níveis de concentração diferentes, sendo estes iguais a 15; 20 e 25 % v/v. Neste procedimento, amostras de uma cachaça envelhecida foram preparadas pelo método de adição de padrão, descrito em 4.4.3.3. As amostras foram preparadas e analisadas no mesmo dia, e o coeficiente de variação (CV) foi determinado através da equação (6), descrita em 4.3.3.6.1.

Os ensaios foram feitos em replicatas (n=7), e cada solução do analito foi adicionada em uma cavidade aleatória da placa de porcelana, sendo capturada uma única imagem.

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

4.4.3.7. Robustez

A robustez do método foi verificada através da troca da câmera por um modelo diferente e também por um smartphone. O efeito da troca da câmera sob a resposta analítica foi avaliado pela comparação de duas curvas analíticas construídas conforme descrito em 4.3.3.2, sendo as imagens de uma das curvas capturadas através de uma câmera Sony Cyber-shot DSC-W610, de

resolução 14.1 Megapixels e de uma câmera de um smartphone LG L70, de resolução 8 Megapixels. Os ensaios foram realizados em replicatas (n=7), sendo capturada uma imagem para cada ensaio.

4.4.3.8. Análise de amostras comerciais de cachaça

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Segundo Choodum et al (2013), os canais R, G e B absorvem comprimentos de onda da luz na faixa de 580-700 nm, 500-580 nm e 400-500 nm, respectivamente. Portanto, pelos espectros obtidos para os corantes, mostrados na Figura 7, percebe-se que o Azul de Comassie Brilhante apresenta resposta na região do canal R, o Direct Red 80 na região do canal G e a Tartrazina na região do canal B.

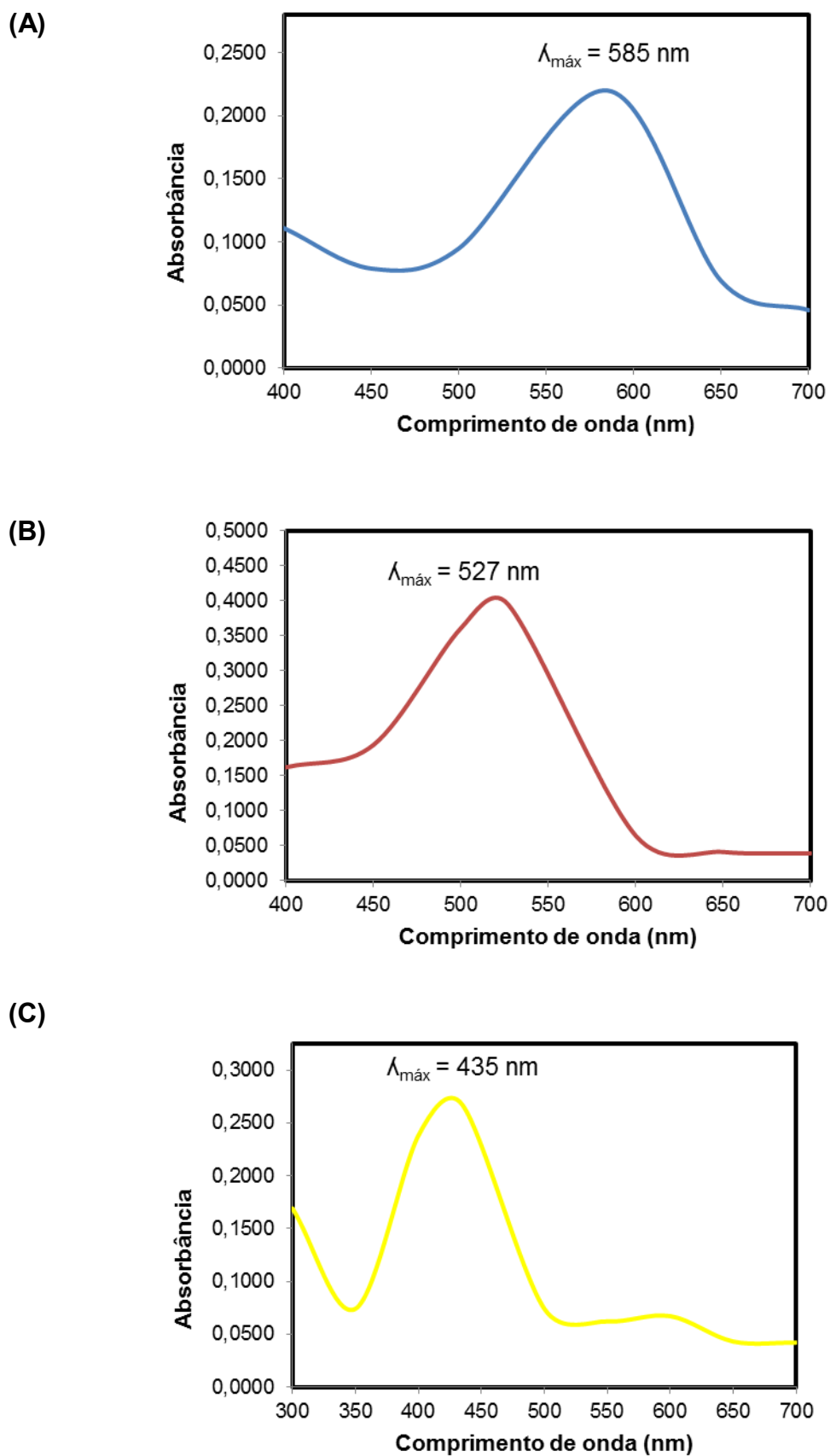


Figura 7: Espectros de varredura para os corantes Azul de Comassie Brilhante (A), Direct Red 80 (B) e Tartrazina (C).

5.1.1. Homogeneidade da iluminação na caixa

Após a realização do teste de Tukey, a 95% de confiança, os resultados mostraram que a intensidade de luz incidida nas cavidades 1, 4, 8 e 12 era diferente da intensidade luminosa nas demais cavidades, conforme mostrado na Figura 8.

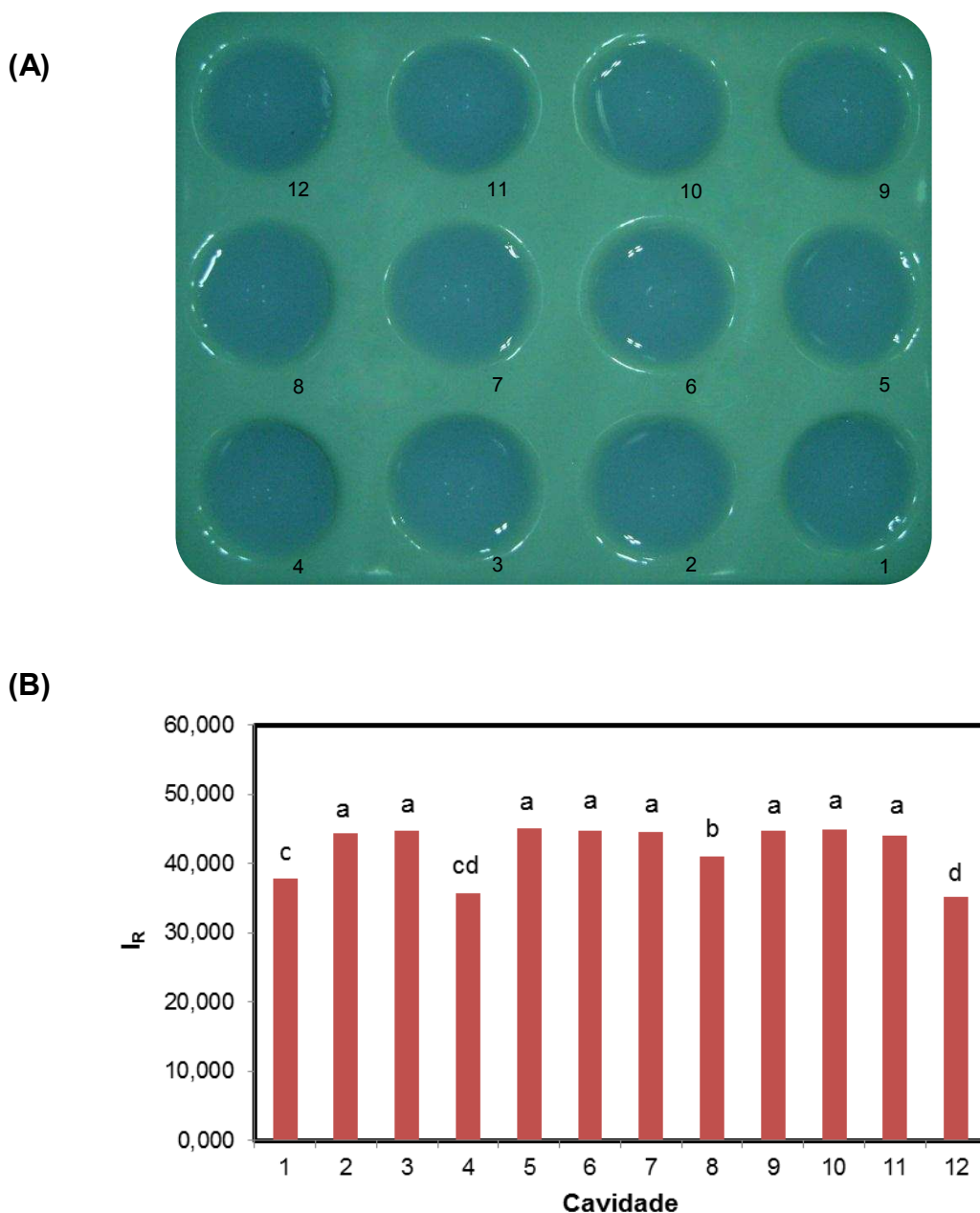


Figura 8: Numeração (A) e gráfico da intensidade de cor do canal R (B), referentes às cavidades da placa de porcelana, empregando o corante Azul Brillhante.

Vale ressaltar que, no teste de Tukey, as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Assim, optou-se por não utilizar as cavidades 1, 4, 8 e 12 no prosseguimento dos estudos.

5.1.2. Intensidade luminosa

A intensidade luminosa dentro do sistema de captura de imagens foi estudada no intervalo de 20 a 980 LUX. Conforme mostrado na Figura 9, à medida em que se aumentou a intensidade luminosa, os sinais analíticos tiveram suas intensidades diminuídas. Portanto, para prosseguimento dos estudos, optou-se por fixar a intensidade luminosa em 20 LUX devido à maior magnitude do sinal analítico, pois nesta condição é possível medir menores concentrações do analito, o que é desejável quando é feita a análise de amostras com analitos em baixas concentrações.

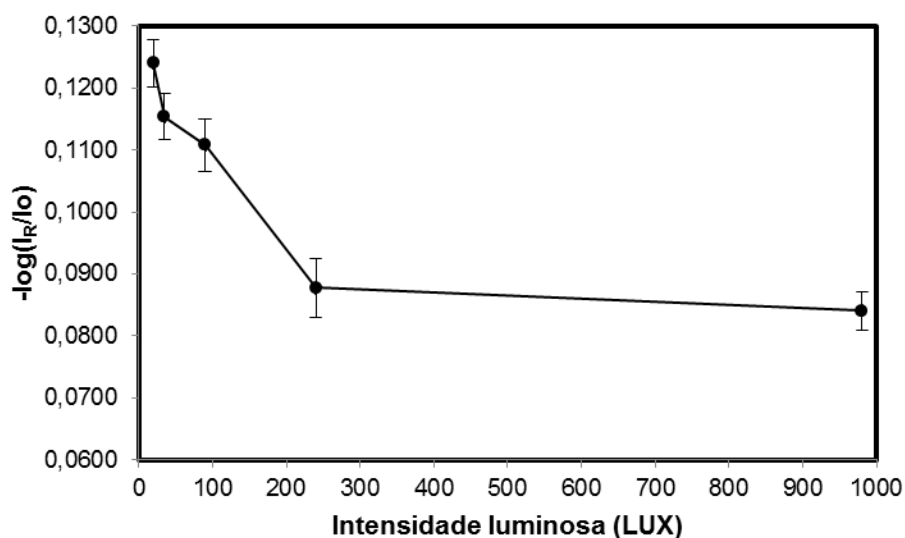


Figura 9: Gráfico do sinal analítico em função da intensidade luminosa para o corante Azul Brilhante.

5.1.3. Volume de solução nas cavidades da placa

Na Figura 10, é mostrada a imagem da placa de porcelana com diferentes alíquotas de corante e o gráfico da resposta analítica em função dos diferentes volumes adicionados nas cavidades da placa.

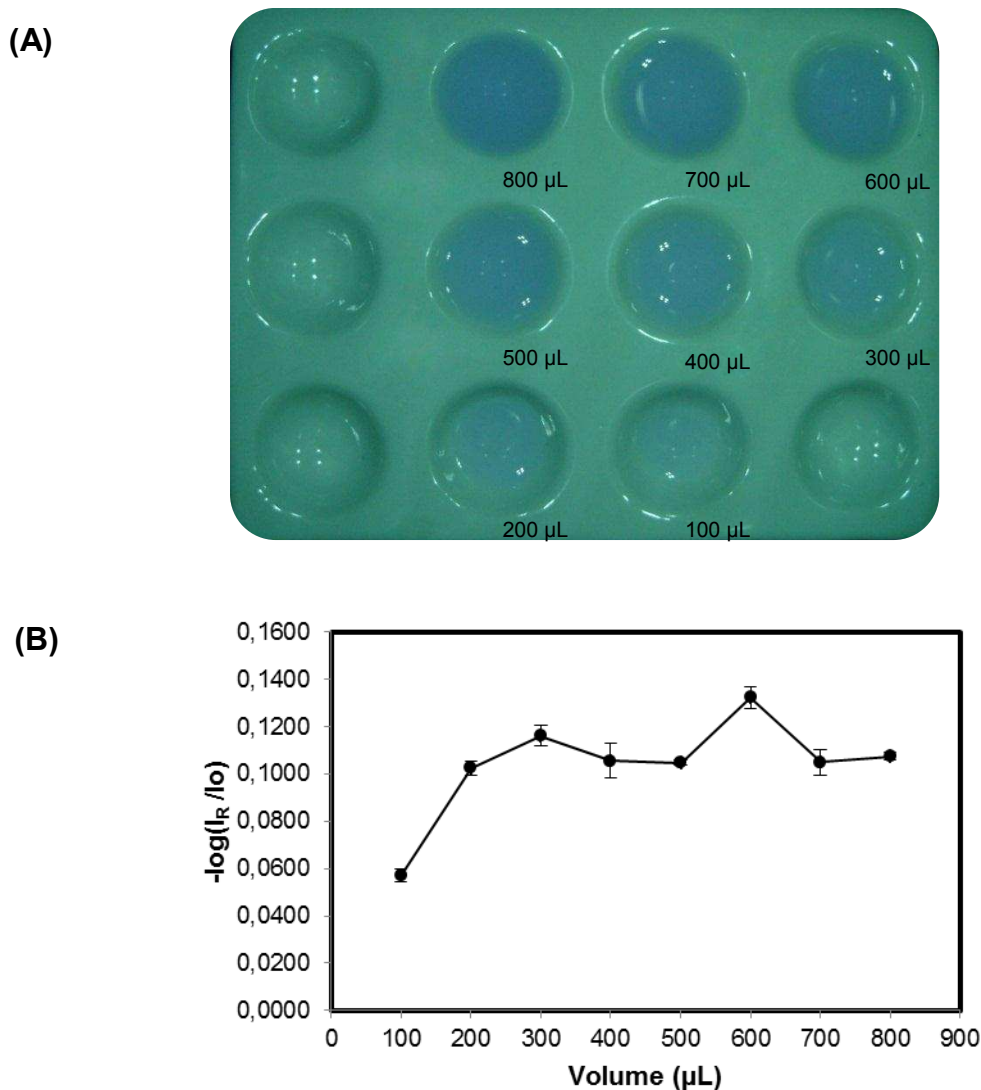


Figura 10: Imagem da placa de porcelana com diferentes alíquotas de amostra (A), gráfico da resposta analítica em função dos diferentes volumes adicionados nas cavidades da placa (B).

Conforme mostrado na Figura 10(B), quando foram empregados volumes de 400 a 800 µL, a intensidade do sinal analítico permaneceu praticamente constante, sendo ligeiramente maior para 600 µL. Na figura 10(A), pode-se observar que a partir de 600 µL, as regiões com brilho aparecem apenas nas bordas das cavidades da placa, sendo obtidas regiões mais homogêneas quando se empregou volumes de 600 a 800 µL.

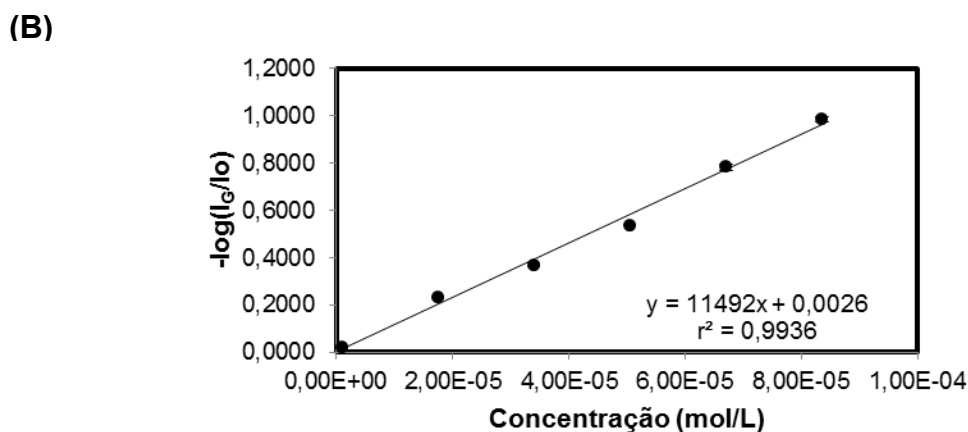
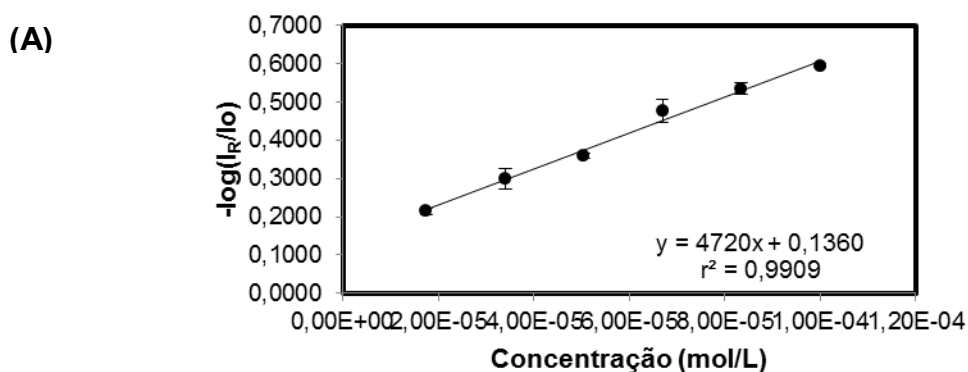
Segundo Souza e colaboradores (2014), a resposta analítica pode ser afetada pelo volume de amostra, pois a altura da alíquota define o caminho óptico. Segundo Benedetti (2013), a seleção de região com brilhos geram

valores RGB maiores quando comparados àqueles obtidos de regiões sem brilho. Da mesma forma, a seleção de regiões com alguma sombra conduz a valores RGB menores. Assim, o volume de amostra deve ser ajustado de modo que as regiões nas cavidades da placa fiquem homogêneas, evitando o aparecimento de regiões com excesso de brilho ou sombra.

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

5.1.4. Resposta dos canais R, G e B em função da concentração

Na Figura 11 são mostradas as curvas lineares obtidas para os corantes Azul Brilhante, Direct Red 80 e Tartrazina.



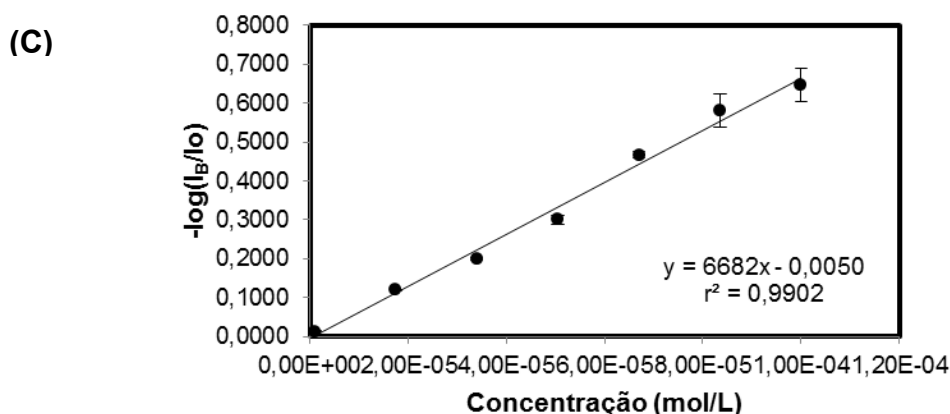


Figura 11: Curvas analíticas construídas para os corantes Azul Brilhante (A), Direct Red 80 (B) e Tartrazina (C).

As faixas lineares foram, respectivamente, $1,75 \times 10^{-5}$ a $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L, $1,00 \times 10^{-6}$ a $8,35 \times 10^{-5}$ mol/L e $1,00 \times 10^{-6}$ a $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L. Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos foram superiores a 0,9900 e estão de acordo com as normas da ANVISA (2003), indicando, portanto, que os canais R, G e B respondem linearmente a uma determinada faixa de concentração dos analitos.

5.2. Determinação de cobre em cachaça

5.2.1. Reação colorimétrica

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

Para as diferentes concentrações de cuprizona testadas, obteve-se uma escala de cores para as soluções 132 e 176 mg/L de cuprizona. Para as concentrações 44 e 88 mg/L, as cores permaneceram praticamente as mesmas em todas as cavidades.

Na faixa prévia de concentrações de Cu (II) utilizada, foram obtidas curvas lineares apenas quando foram empregadas soluções de cuprizona para as quais foi possível observar a escala de cores, ou seja, soluções 132 e 176

mg/L de cuprizona. Assim, prosseguiu-se os experimentos empregando a solução de cuprizona 132 mg/L.

Os resultados obtidos para o estudo do tempo de reação são mostrados na Figura 12. A cuprizona reage instantaneamente com o cobre, gerando um sinal analítico que foi aumentando até o tempo de 7 minutos de reação. Após esse tempo, houve um decréscimo do sinal analítico, provavelmente devido a instabilidade do quelato gerado. Portanto, o tempo de reação selecionado para prosseguimento dos estudos foi de 7 minutos.

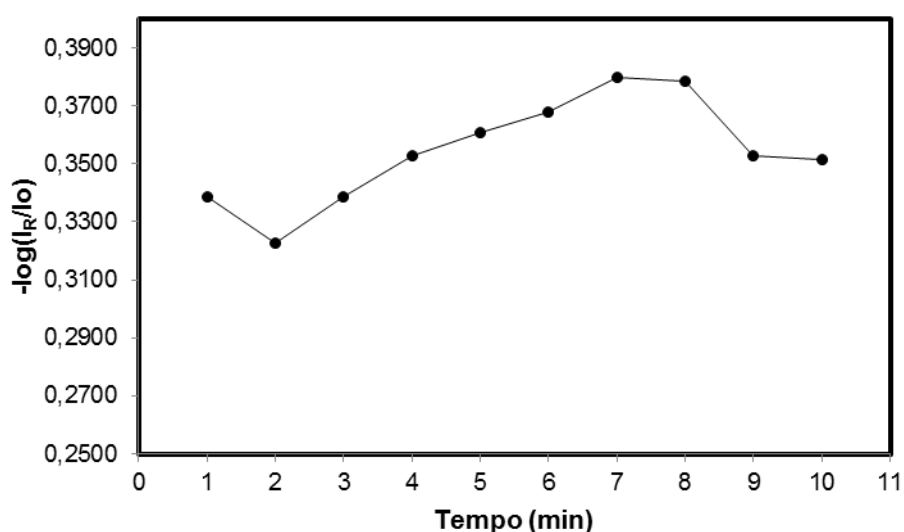


Figura 12: Gráfico da resposta analítica em função do tempo de reação.

5.2.2. Validação do método

5.2.2.1 Seletividade

Para verificar a seletividade do método, o efeito de possíveis interferentes sobre o sinal analítico do Cu (II) foi avaliado. Foram testados cátions que poderiam estar presentes em cachaças, conforme descrito por Pinto et al (2005), os quais, conseqüentemente, poderiam formar quelatos com a cuprizona. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Efeito de possíveis interferentes na determinação de Cu (II) (n=3).

Interferente	Proporção de Cu (II) : interferente	Erro relativo (%)
^a Chumbo (II)	1:0,1	- 9,94
	1:0,5	- 6,46
	1:1	+ 6,02
Ferro (II)	1:1	+ 5,52
	1:5	- 6,73
	1:10	- 12,44
Ferro (III)	1:1	- 7,13
	1:5	- 9,85
	1:10	- 10,81
^a Níquel (II)	1:0,01	- 5,53
	1:0,1	- 12,15
	1:0,5	- 10,10
Manganês (II)	1:1	- 8,36
	1:5	- 22,31
	1:10	- 13,96
Alumínio (III)	1:1	+ 8,20
	1:5	+ 7,42
	1:10	- 4,54
Zinco (II)	1:1	+ 0,13
	1:5	- 1,79
	1:10	- 1,52

^aA proporção do possível interferente foi reduzida, uma vez que nas demais proporções estudadas a interferência foi intensa.

Considerando erros relativos de até 5%, todos os cátions analisados apresentaram interferência sobre o sinal analítico do Cu (II), exceto Zn (II). Entretanto, os possíveis interferentes foram analisados por Espectrometria de Absorção Atômica em todas as amostras de cachaças utilizadas neste trabalho. O alumínio foi encontrado em seis amostras, porém em concentrações abaixo do limite de quantificação. O zinco foi encontrado em duas amostras, porém também em concentrações abaixo do limite de quantificação. O ferro foi encontrado em apenas uma amostra, em concentração abaixo do limite de quantificação. Os demais metais não foram detectados nas amostras de cachaças.

Estudos realizados por Caldas et al (2011), empregando Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES),

mostraram que os metais supracitados foram encontrados em concentrações sempre mais baixas que a concentração de cobre em amostras de cachaça.

Portanto, os metais analisados não são considerados interferentes em potencial na determinação de Cu (II) empregando cuprizona como agente quelante, para determinação deste metal em amostras de cachaça.

5.2.2.2. Linearidade

Os resultados de regressão mostraram que as variáveis estão linearmente correlacionadas na faixa de concentração entre 0,75 e 5,00 mg/L de Cu (II), conforme mostrado na Figura 13.

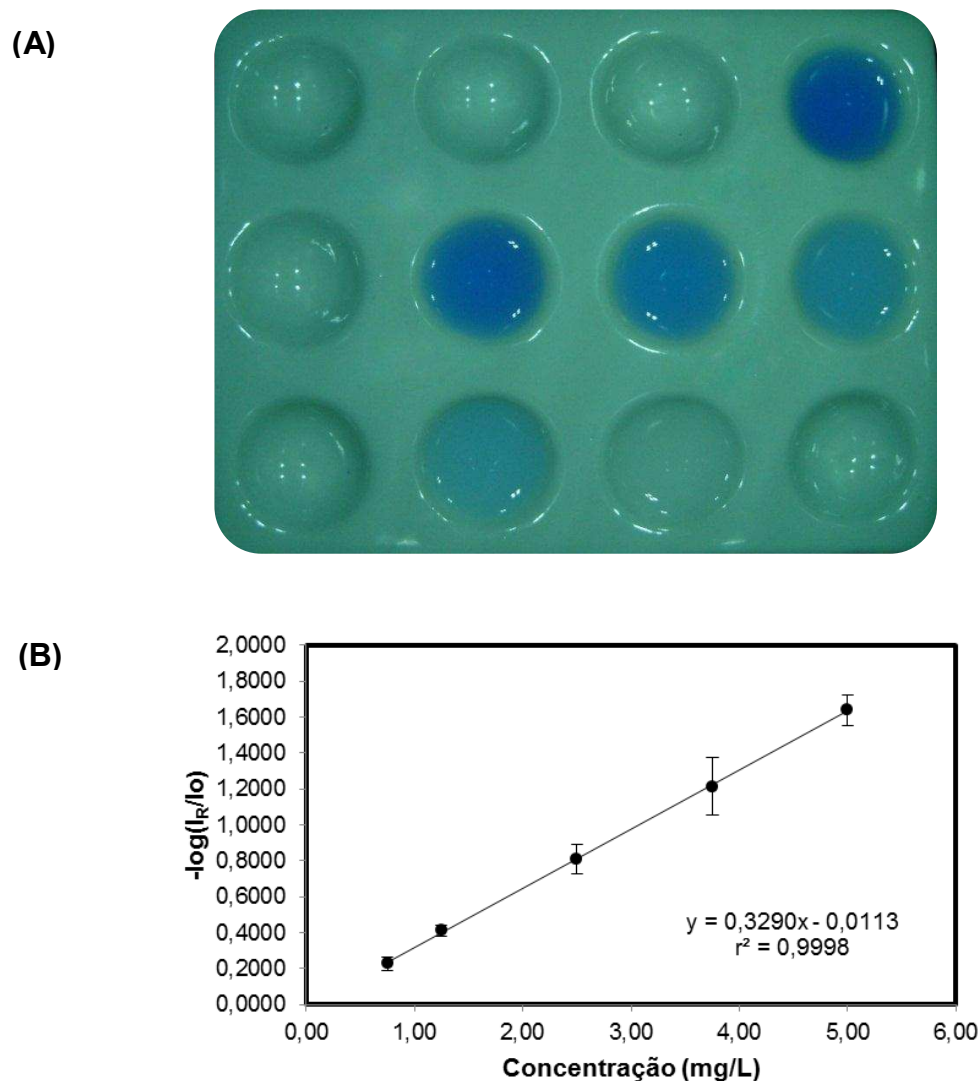


Figura 13: Escala de cores (A) e curva analítica (B), obtidas pela análise de soluções-padrão contendo Cu (II).

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

O documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2011) sugere que a linearidade seja avaliada através de testes estatísticos. Assim, a qualidade das curvas analíticas foi averiguada através da análise de variância (ANOVA) na regressão, a 95% de confiança. É importante ressaltar que a hipótese nula é que não existe correlação entre x e y . O valor de p -valor = 1×10^{-6} foi menor que $\alpha = 0,05$ e, portanto, a hipótese nula foi rejeitada, o que demonstra uma correlação significativa.

5.2.2.3. Efeito de matriz

Segundo o documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2003), para avaliação do efeito de matriz devem ser preparados dois grupos de amostras, um com a matriz e outro isento desta, devendo ambos os grupos apresentar concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse. Primeiramente, aplica-se o teste F para avaliar as variâncias das replicatas em cada nível de concentração. Em seguida, aplica-se o teste t para comparação de médias, cuja fórmula a ser empregada depende dos resultados obtidos no teste F . Caso $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, pode-se concluir que não há efeito de matriz.

Assim, a influência dos componentes da cachaça na quantificação de Cu (II) foi avaliada pela comparação de curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções de Cu (II) preparadas em água destilada e em cachaça isenta do analito em estudo, conforme mostrado na Figura 14.

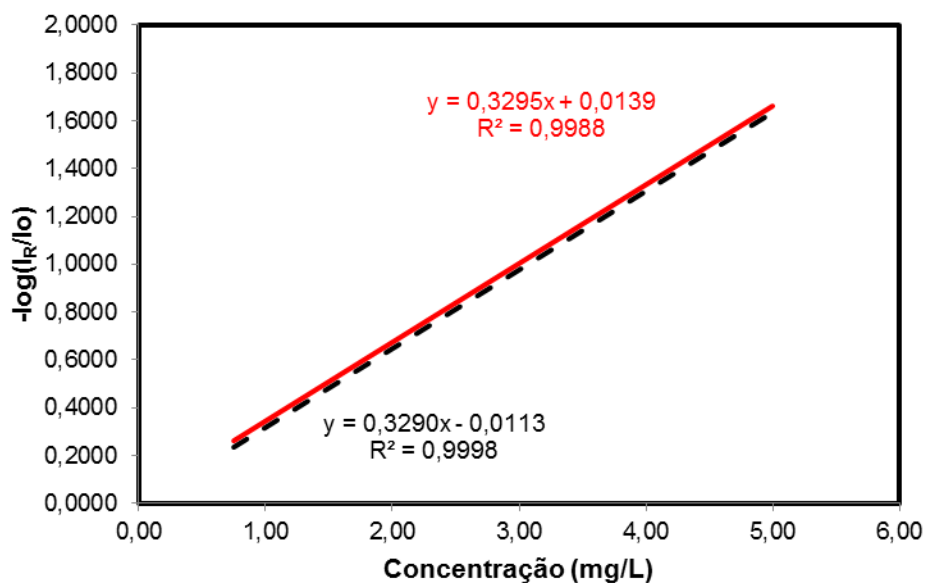


Figura 14: Curvas analíticas construídas para Cu (II) em água (---) e matrizada (—).

Após a realização dos testes estatísticos, a 95% de confiança, os resultados mostraram que os componentes da cachaça não interferem na quantificação de Cu (II), pois $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ para todos os níveis de concentração.

5.2.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação, calculados com base nos parâmetros da curva analítica, foram respectivamente iguais a 0,078 mg/L e 0,261 mg/L.

Segundo o documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2011), é recomendado adotar o limite de quantificação como a concentração mais baixa da curva analítica para análise em nível de traços. Esse limite deve ser testado com amostras independentes, para verificar se a veracidade e precisão obtidas são satisfatórias. Assim, a veracidade e precisão para o primeiro ponto da curva analítica, ou seja, 0,75 mg/L de Cu (II), foram avaliadas conforme descrito nos itens 4.3.3.5 e 4.3.3.6. Os resultados obtidos, descritos em 5.2.2.5 e 5.2.2.6, foram satisfatórios e, portanto, o primeiro ponto da curva foi adotado como o limite de quantificação do método.

5.2.2.5. Veracidade

Para avaliar a veracidade do método, foram feitos ensaios de recuperação nos níveis 0,75, 2,88 e 5,00 mg/L, conforme descrito no item 4.3.3.5. Os resultados obtidos para a recuperação de Cu (II) em cachaça isenta do analito são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Porcentagens de recuperação de Cu (II), obtidas para os três níveis de concentração estudados.

Concentração (mg/L)	Recuperação (%) (n=7)
0,75	104,24
2,88	98,87
5,00	98,32

Os resultados de recuperação foram comparados com os valores descritos por Brito et al (2003), cuja recomendação é que o intervalo de recuperação esteja entre 80 a 110%, para níveis de concentração de 100 ppb a 10 ppm. Portanto, todos os valores obtidos para a recuperação de Cu (II) foram satisfatórios.

Além dos ensaios de recuperação, a veracidade também foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos através do método desenvolvido com os resultados fornecidos por Espectrometria de Absorção Atômica, conforme mostrado na tabela 7, disposta no item 5.2.2.8. Como $t_{\text{calculado}} = 1,29 < t_{\text{tabelado}} = 2,31$, a 95% de confiança, podendo-se concluir que os resultados obtidos foram satisfatórios.

5.2.2.6. Precisão

5.2.2.6.1. Repetitividade e precisão intermediária

A repetitividade e a precisão intermediária do método foram verificadas através de ensaios de recuperação nos níveis 0,75, 2,88 e 5,00 mg/L e de seus

respectivos coeficientes de variação, conforme descrito no item 4.3.3.5. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Coeficientes de variação obtidos para os três níveis de concentração estudados, em um intervalo de seis dias.

Dia	Coeficientes de variação (%) (n = 7)		
	0,75 mg/L	2,88 mg/L	5,00 mg/L
1º	10,0	8,9	8,4
6º	14,4	10,2	11,5

Segundo Brito et al (2003), são aceitos coeficientes de variação de até 16% para níveis de concentração na ordem de 10^{-6} (ppm). Portanto, todos os valores obtidos para os coeficientes de variação foram satisfatórios.

5.2.2.7. Robustez

A robustez do método foi verificada através da variação do pH do tampão empregado na reação colorimétrica e da troca da câmera digital, conforme descrito em 4.3.3.7. Os resultados obtidos para o efeito do pH são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados obtidos para a variação do pH do tampão empregado na reação colorimétrica, em três níveis de concentração diferentes.

pH	Erro relativo (%) (n = 3)		
	0,75 mg/L	2,88 mg/L	5,00 mg/L
7,8	- 3,22	-3,95	- 4,08
8,2º	- 3,80	- 4,79	- 3,38

Como os erros relativos foram inferiores a 5% para ambos os valores de pH testados nos diferentes níveis de concentração, conclui-se que a variável pH não apresentou efeito significativo na determinação de Cu (II).

O efeito da troca da câmera na quantificação de Cu (II) foi avaliada pela comparação de curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções de Cu (II) preparadas em água destilada, conforme mostrado na Figura 15.

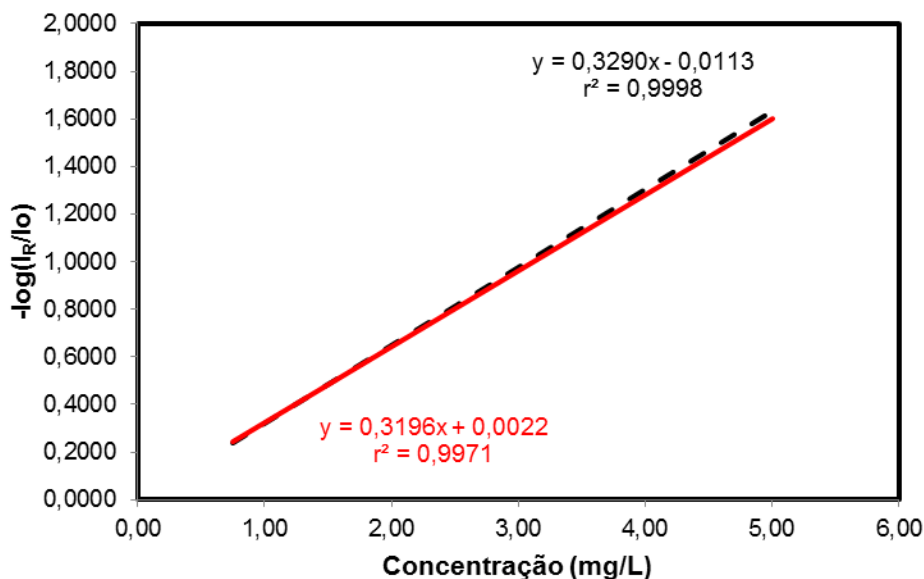


Figura 15: Curvas analíticas construídas para Cu (II) em água, empregando as câmeras 7.2 MP (---) e Sony Cyber-shot DSC-W610 14.1 MP (—).

Após a realização dos testes estatísticos, a 95% de confiança, os resultados mostraram que a troca da câmera não apresentou efeito significativo na quantificação de Cu (II), pois $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ para todos os níveis de concentração.

Benedetti (2013) avaliou o efeito da troca da câmera na determinação de analitos de interesse alimentício baseado em análise de imagens digitais. Foram testadas cinco câmeras de modelos e resoluções diferentes, das quais duas eram câmeras de celulares. Os resultados obtidos foram similares, indicando que a troca da câmera não interfere significativamente nos mesmos.

5.2.2.8. Análise de amostras comerciais de cachaça

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de Cu (II) em amostras de cachaças não envelhecidas e envelhecidas, obtidas em

supermercados das cidades de Viçosa e Bom Jesus do Amparo. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Determinação da concentração de Cu (II) em amostras comerciais de cachaças não envelhecidas e envelhecidas (n = 3).

Amostra	Método proposto (mg/L)	Método de referência (mg/L)	Erro relativo (%)
^a ANE1	3,82 ± 0,35	4,19 ± 0,04	- 8,70
^a ANE2	1,64 ± 0,23	1,82 ± 0,01	-9,77
^a ANE3	2,22 ± 0,18	2,09 ± 0,02	+ 6,26
^a ANE4	1,03 ± 0,11	1,02 ± 0,03	+ 1,01
^a ANE5	<LQ	<LQ	-
^a ANE6	1,78 ± 0,15	1,93 ± 0,01	- 7,61
^a ANE7	<LD	<LD	-
^b AE8	2,99 ± 0,18	2,79 ± 0,01	+ 7,16
^b AE9	1,86 ± 0,34	1,97 ± 0,02	- 5,41
^b AE10	3,14 ± 0,21	3,41 ± 0,03	- 8,03
^b AE11	40,60 ± 0,40	43,30 ± 0,04	- 6,26

^aANE = amostra não envelhecida. ^bAE = amostra envelhecida

Traços de Cu (II) foram encontrados na maioria das amostras analisadas. Na amostra ANE5 foi encontrada uma concentração de Cu (II) abaixo do limite de quantificação. Apenas na amostra ANE7 tal analito não foi detectado.

De acordo com a Instrução Normativa n.13, de 29 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005), o limite máximo permitido de Cu (II) em cachaças é de 5,00 mg/L. Assim, todas as amostras analisadas apresentaram teores do analito dentro do limite permissível, exceto a amostra AE11, cuja concentração de Cu (II) foi aproximadamente oito vezes superior ao valor da legislação.

5.3. Determinação de etanol em cachaça

5.3.1. Reação colorimétrica

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

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

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

O tempo de reação foi fixado em 4 minutos. Em valores inferiores a esse, a coloração nas cavidades da placa permaneceu amarelada; já em valores superiores, a coloração azulada começou a prevalecer nas cavidades, interferindo assim nos valores RGB e, conseqüentemente, na intensidade do sinal analítico, conforme mostrado na Figura 16.

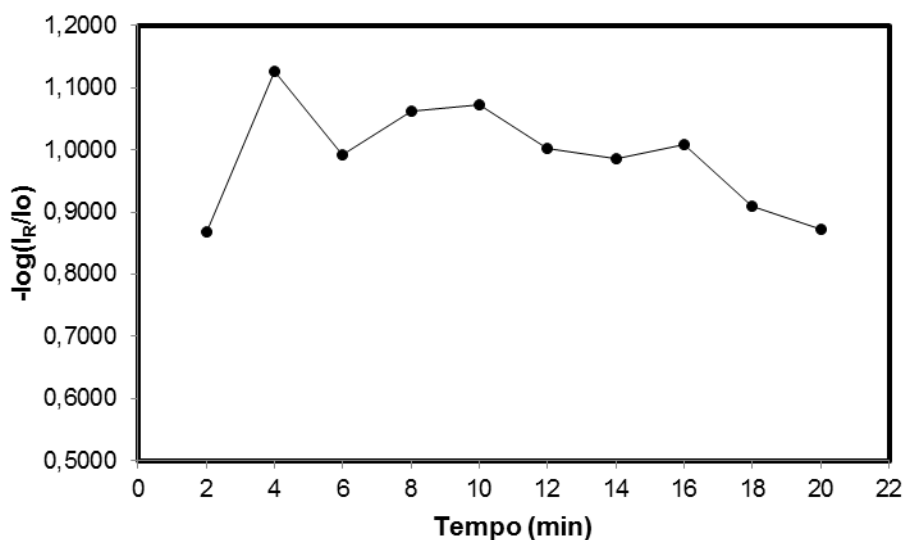


Figura 16: Gráfico da resposta analítica em função do tempo de reação, obtido para a solução de etanol 50 % v/v.

5.3.2. Validação do método

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

5.3.2.1 Seletividade

Para verificar a seletividade do método, o efeito de possíveis interferentes sobre o sinal analítico do etanol foi avaliado. Foram testadas substâncias que poderiam ser encontradas como subprodutos da fermentação e/ou destilação em bebidas contendo etanol, conforme descrito por Pinheiro et al (2003) e na Instrução Normativa n.13, de 29 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005). Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Efeito de possíveis interferentes na determinação de etanol (n=3).

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

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

5.3.2.2. Linearidade

Os resultados de regressão mostraram que as variáveis estão linearmente correlacionadas na faixa de concentração entre 10 e 70 % v/v de etanol, conforme mostrado na Figura 17.

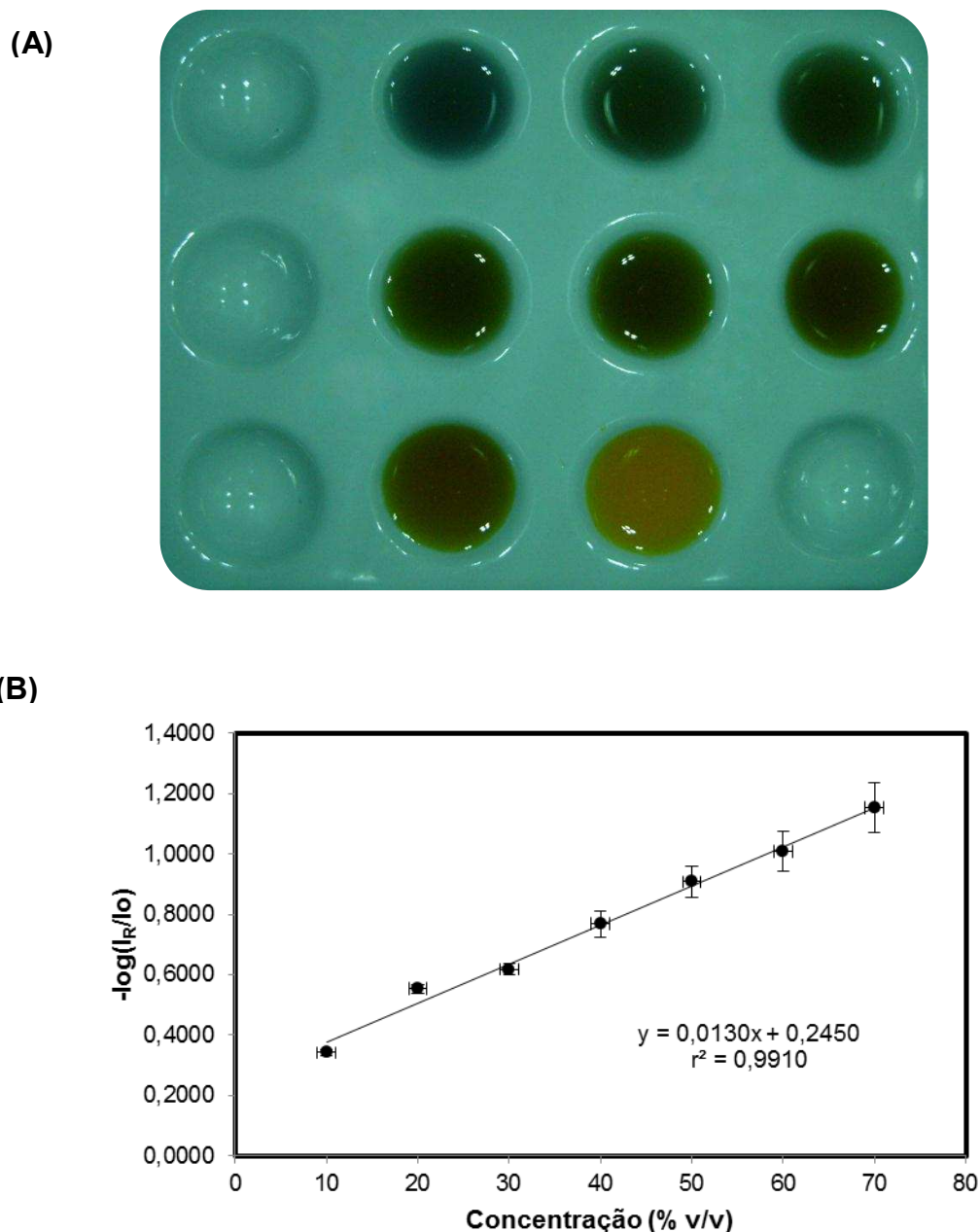


Figura 17: Escala de cores (A) e curva analítica (B), obtidas pela análise de soluções aquosas de etanol.

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

O documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2011) sugere que a linearidade seja avaliada através de testes estatísticos. Assim, a qualidade das curvas analíticas foi averiguada através da análise de variância (ANOVA) na regressão, a 95% de confiança. É importante ressaltar que a hipótese nula é

que não existe correlação entre x e y . O valor de p -valor = $2,62 \times 10^{-6}$ foi menor que $\alpha = 0,05$ e, portanto, a hipótese nula foi rejeitada, o que demonstra uma correlação significativa.

5.3.2.3. Efeito de matriz

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

Assim, a influência dos componentes da cachaça na quantificação de etanol foi avaliada pela comparação de curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções de etanol preparadas em água destilada e em cachaça envelhecida e não envelhecida, sendo as últimas construídas pelo método de adição padrão, conforme mostrado na Figura 18.

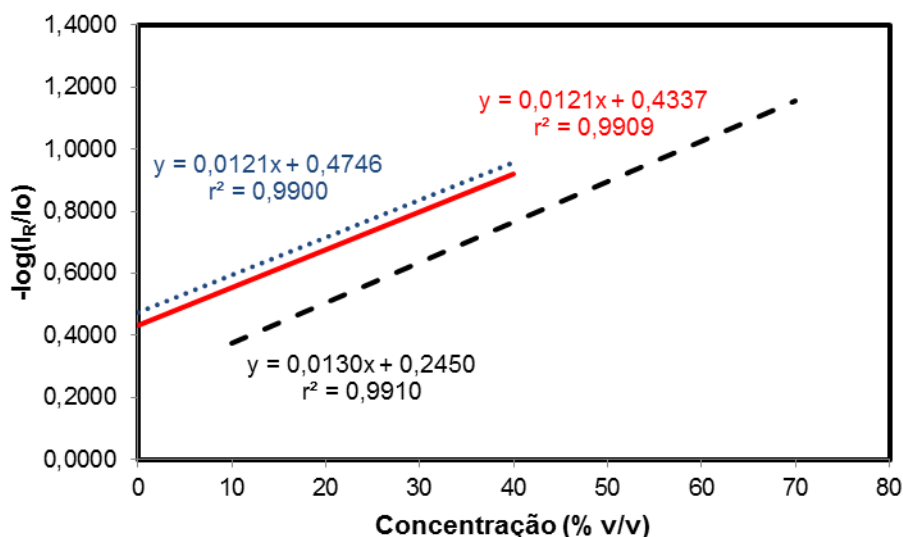


Figura 18: Curvas analíticas construídas para etanol em água (---), em cachaça não envelhecida (—) e em cachaça envelhecida (.....).

Após a realização dos testes estatísticos, a 95% de confiança, os resultados mostraram que os componentes da cachaça interferem na

quantificação de etanol, pois para a cachaça envelhecida $t_{\text{calculado}} = 3,19 > t_{\text{tabelado}} = 2,18$ e para a cachaça não envelhecida $t_{\text{calculado}} = 2,94 > t_{\text{tabelado}} = 2,18$.

5.3.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação

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

5.3.2.5. Veracidade

Para avaliar a veracidade do método, foram feitos ensaios de recuperação nos níveis 15, 20 e 25 % v/v, conforme descrito no item 4.4.3.5. Os resultados obtidos para a recuperação de etanol são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Porcentagens de recuperação de etanol obtidas para os três níveis de concentração estudados.

Concentração (% v/v)	Recuperação (%) (n=7)
15	99,56
20	98,25
25	98,79

Os resultados de recuperação foram comparados com os valores descritos como Brito et al (2003), cuja recomendação é que o intervalo de recuperação esteja entre 98 a 102%, para níveis de concentração superiores a 10%. Portanto, os resultados obtidos foram satisfatórios.

Além dos ensaios de recuperação, a veracidade também foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos através do método desenvolvido com os resultados fornecidos pelo método da Picnometria, seguindo o procedimento recomendado pela A.O.A.C., 2006. Os resultados são mostrados na tabela 11, disposta no item 4.3.2.8. Como $t_{\text{calculado}} = - 1,20 < t_{\text{tabelado}} = 2,57$, a 95% de confiança, pode-se concluir que os resultados obtidos foram satisfatórios.

5.3.2.6. Precisão

5.3.2.6.1. Repetitividade e precisão intermediária

A repetitividade e a precisão intermediária do método foram verificadas através de ensaios de recuperação nos níveis 15, 20 e 25 % v/v e de seus respectivos coeficientes de variação, conforme descrito no item 4.4.3.6. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Coeficientes de variação obtidos para os três níveis de concentração estudados, em um intervalo de três dias.

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

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

5.3.2.7. Robustez

A robustez do método foi verificada através da troca da câmera por uma câmera de modelo diferente e por um smartphone, conforme descrito em 4.4.3.7. O efeito da troca da câmera na quantificação de etanol foi avaliada pela comparação de curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções de etanol em água destilada, conforme mostrado na figura 19.

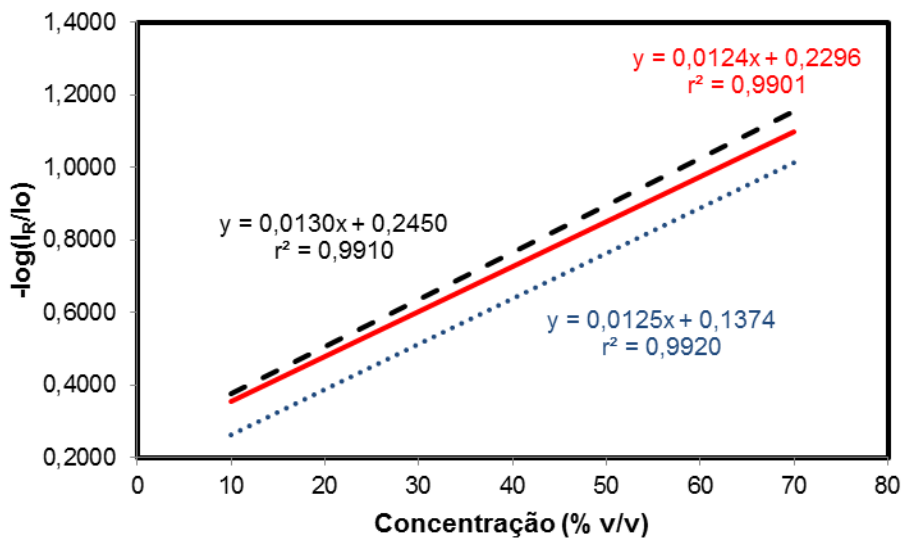


Figura 19: Curvas analíticas construídas para etanol em água, empregando a câmera de 7.2 MP (---), de 14.1 MP (.....) e o smartphone (—).

Após a realização dos testes estatísticos, a 95% de confiança, os resultados mostraram que a troca da câmera não apresentou efeito significativo na quantificação de etanol, pois ao comparar os coeficientes angulares das curvas analíticas, $t_{\text{calculado}} = 1,93 < t_{\text{tabelado}} = 2,18$ para o smartphone e $t_{\text{calculado}} = 1,77 < t_{\text{tabelado}} = 2,18$ para a câmera de modelo diferente.

5.3.2.8. Análise de amostras comerciais de cachaça

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de etanol em amostras de cachaças não envelhecidas e envelhecidas, obtidas em supermercados das cidades de Viçosa e Bom Jesus do Amparo. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Determinação do teor de etanol em amostras comerciais de cachaças não envelhecidas e envelhecidas (n = 3).

Amostra	Método proposto %(v/v)	Método de referência %(v/v)	Erro relativo (%)
ANE4	36,3 ± 1,3	35,3 ± 0,1	+ 2,8
ANE5	34,6 ± 1,1	35,9 ± 0,1	- 3,6
ANE7	38,7 ± 1,2	39,4 ± 0,1	- 1,8
AE1	40,3 ± 1,7	41,7 ± 0,1	- 3,4
AE2	40,7 ± 1,7	40,5 ± 0,1	+ 0,7
AE3	34,9 ± 1,0	35,4 ± 0,2	- 1,4

De acordo com a Instrução Normativa n.13 de 29 de junho de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005), a cachaça deve apresentar graduação alcoólica de 38 a 48 % v/v. Assim, as amostras ANE3, AE4 e AE5 apresentaram teores alcoólicos dentro da faixa permitida, já nas demais amostras os teores alcóolicos estavam abaixo do valor mínimo estabelecido pela legislação.

6. CONCLUSÕES

O método desenvolvido para a determinação de cobre em cachaça apresentou vantagens como praticidade, rapidez, baixo custo, reduzido consumo de reagentes e de geração de resíduos, além de não necessitar de um profissional capacitado para executá-lo. Essas vantagens tornaram o método de fácil execução e, portanto, adequado para análises *in situ*.

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

Na etapa de validação do método, algumas cavidades da placa de porcelana não foram utilizadas, por apresentar valores de intensidade de cor discrepantes, os quais podem ser explicados pela falta de homogeneidade da iluminação dentro do equipamento. Com o intuito de tornar tal iluminação homogênea, novos estudos estão sendo realizados, empregando materiais difusores como policarbonato e/ou adicionando fitas de LEDs dentro do sistema.

O sistema para captura de imagens é de fácil construção e emprega componentes de baixo custo, ademais, é versátil e robusto, podendo ser empregado em análises *in situ*. Além disso, o método de *spot test* associado a análise de imagens digitais permite o uso de aparatos comuns à sociedade moderna, tais como câmeras digitais, smartphones, webcams, etc. Por fim, o método pode ser utilizado em análises químicas, clínicas, médicas, forenses, ambientais, sendo uma ferramenta analítica com elevado potencial.

O método foi aplicado na análise de amostras comerciais de cachaças envelhecidas e não envelhecidas. Entre as dez amostras analisadas quanto ao teor de cobre, apenas uma delas apresentou concentração do íon metálico acima do valor permitido pela legislação. Em relação ao teor de etanol, entre as seis amostras analisadas, três apresentaram concentração fora da faixa estabelecida pela legislação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<<http://www.labint-online.com/featured-articles/water-testing-by-simple-uvvisible-spectrophotometric-analysis/index.html>>, acessado em 19/03/2014.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, DF, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Gaithersburg: A.O.A.C, 2005, chapter 26. p.2.

BAYRAM, S.; SENCAR, H. T.; MEMON, N. Classification of digital camera-models based on demosaicing artifacts. **Digital Investigation**, v. 5, n. 1, p. 49-59, 2008.

BENEDETTI, L. P. S. **Determinação *in situ* de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de *spot tests***. 2013. 76p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.15, de 29 de junho de 2005. **Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça**.

BRITO, M. N.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; POLESE, L; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticida: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente**. v. 13, p. 129-146, 2003.

CACIANO DE SENA, R.; SOARES, M.; PEREIRA, M. L. O.; SILVA, R. C. D.; ROSÁRIO, F. F; SILVA, J. F. C. A simple method based on the application of a CCD camera as a sensor to detect low concentrations of barium sulfate in suspension. **Sensors**, v. 11, n. 1, p. 864-875, 2011.

CALDAS, L. F. S.; FRANCISCO, B. B. A.; NETTO, A. D. P.; CASSELA, R. J. Multivariate optimization of a spectrophotometric method for copper determination in Brazilian sugar-cane spirits using Doehlert design. **Microchemical Journal**, v. 99, p. 118-124, 2011.

CHOI, C.-H.; LEE, H.-Y.; LEE, H.-K. Estimation of color modification in digital images by CFA pattern change. **Forensic Science International**, v. 226, n. 1, p. 94-105, 2013.

CHOODUM, A.; KANATHARANA, P.; WONGNIRAMAİKUL, W.; DAEID, N. N. Using the iPhone as a device for a rapid quantitative analysis of trinitrotoluene in soil. **Talanta**, v. 115, p. 143-149, 2013.

DING, X.; XIE, H.; KANG, Y. J. The significance of copper chelators in clinical and experimental application. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 4, p. 301-310, 2011.

EMBRAPA: Agência de Informação. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>> Acessado em 14/04/2014.

GOMES, M. S.; TREVISAN, L. C.; NÓBREGA, J. A.; KAMOGAWA, M. Y. Uso de Scanner em Espectrofotometria de Absorção Molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1577-1581, 2008.

GONZALEZ, R. C; WOODS, R. E. **Digital Image Processing**. Estados Unidos da América, Pearson, 2008.

IBRAC. Instituto Brasileiro da Cachaça. Disponível em <<http://www.ibraccachacas.org>> Acessado em 14/04/2014.

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2011.

KOMPANY-ZAREH, M.; TAVALLALI, H.; SHAKERNASAB, N.; KHOSHKAM, M.; SHAMSDIN, E. Image based kinetic determination of iron (III) in blood samples using a CCD camera. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, v. 107, n. 1, p. 49-61, 2012.

LABANCA, R. A.; GLÓRIA, M. B. A.; GOUVEIA, V. J. P.; AFONSO, R. J. C. F. Determinação dos teores de cobre e grau alcóolico em aguardentes de cana produzidas no estado de Minas Gerais. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1110-1113, 2006.

LIMA, A. J. B; CARDOSO, M. G; GUIMARÃES, L. G. L. Efeito de substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 845-848, 2009.

LOPEZ-MOLINERO, A.; LIÑAN, D.; SIPIERA, D.; FALCON, R. Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 2, p. 380-385, 2010.

LUIZ, V. H. M.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of nitrite in meat products and water using dapsone with combined spot test/diffuse reflectance on filter paper. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2546-2551, 2012.

LUIZ, V. H. M.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Rapid determination of furosemide by combined spot test/diffuse reflectance spectroscopy to detect doping in sport. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 68-72, 2013.

MACHADO, A. M. R. **Carbamato de etila, acroleína e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**: caracterização e quantificação em cachaças provenientes de cana-de-açúcar com adubação nitrogenada e acondicionadas em vidros e "bombonas" de Pead. 2010. 270p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

MASSON, J; CARDOSO, M. G; VILELA, F. J.; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R.; ANJOS, J. P. Parâmetros físico-químicos e cromatográficos em aguardentes de cana queimada e não queimada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1805-1810, 2007.

MORAIS, C., L. M.; LIMA, C. M. G. A colorimetric microwell method using a desktop scanner for biochemical assays. **Talanta**, v. 126, p. 145-150, 2014.

ODELLO, L.; BRACESCHI, G. P.; SEIXAS, F. R. F.; SILVA, A. A.; GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Avaliação sensorial de cachaça. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1839-1844, 2009.

PACIORNIK, S.; YALLOUZ, A. V.; CAMPOS R. C.; GANNERMAND, D. Scanner Image Analysis in the Quantification of Mercury using Spot-Tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 156-161, 2006.

PINHEIRO, P. C.; LEAL, M. C.; ARAÚJO, D. A.. Origem, produção e composição química da cachaça. **Química Nova na Escola**, n. 18, p. 3-8, 2003.

PINTO, A. R. et al. **Manual de normalização de trabalhos acadêmicos**. Viçosa, MG, 2011. 70 p. Disponível em: Viçosa, MG, 2011. 70 p. Disponível em: <http://www.bbt.ufv.br/> Acesso em: 12/12/2015.

PINTO, F. G.; ROCHA, S. S.; CANUTO, M. H.; SIEBALD, G. L.; SILVA, J. B. B. Determinação de cobre e zinco em cachaça por Espectrometria de Absorção Atômica com chama usando calibração por ajuste de matriz. **Revista Analytica**, n. 17, p. 48 - 50, 2005.

QUEIROZ, J. E. R.; GOMES, H. M. Introdução ao Processamento Digital de Imagens. **RITA**, v. 13, n. 2, p. 11-42, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SOUZA, F. R.; JÚNIOR, G. F. D.; GARCIA, P. T.; COLTRO, W. K. T. Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1171-1176, 2014.

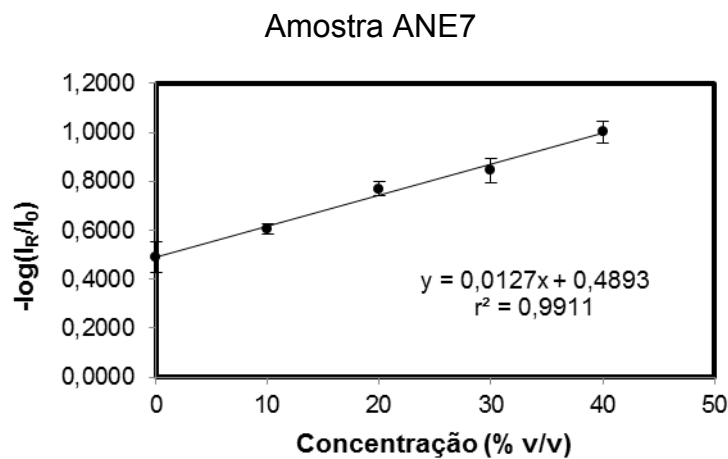
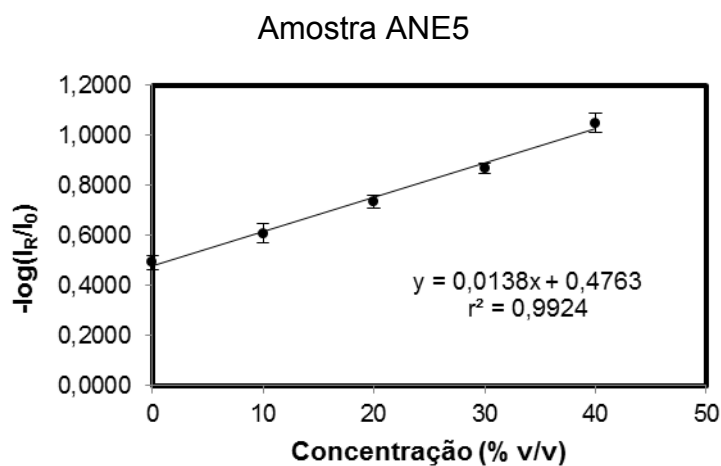
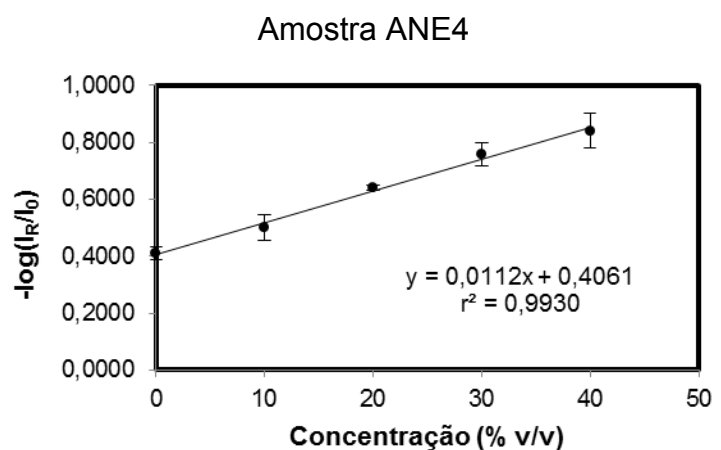
TILLEY, R. J. D. **Colour and the Optical Properties of Materials – An Exploration of the Relationship Between Light, the Optical Properties of Materials and Colour**. 2^a Edition, John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, United Kingdom, 2011.

YAM, K. L.; PAPADAKIS, S. E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 1, p. 137-142, 2004.

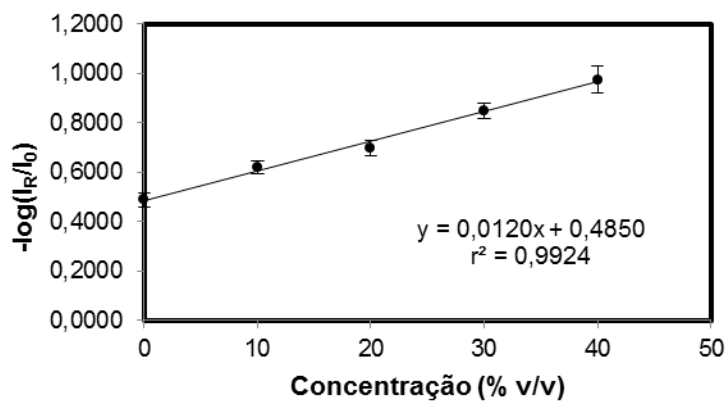
ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

ANEXO

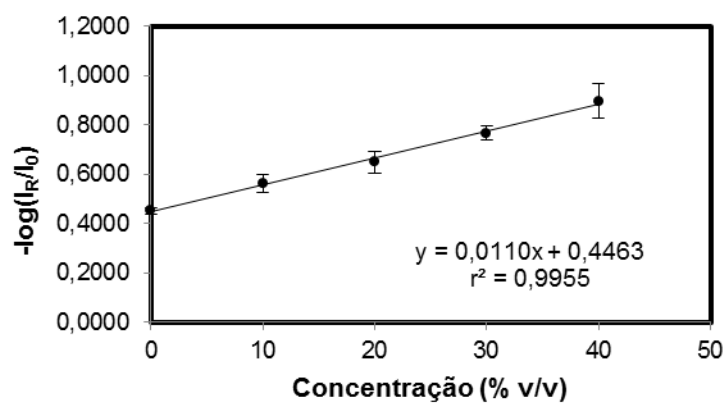
Anexo 1: Curvas analíticas obtidas pelo método de adição padrão para a determinação do teor de etanol em amostras de cachaças envelhecidas e não envelhecidas.



Amostra AE1



Amostra AE2



Amostra AE3

