

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO *IN SITU* DE ANALITOS DE INTERESSE
ALIMENTÍCIO EMPREGANDO TRATAMENTO DE IMAGENS
DIGITAIS DE *SPOT TESTS***

Luzia Pires dos Santos Benedetti *

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de MESTRE
EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho

* Bolsista: CAPES

São Carlos
2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B462da

Benedetti, Luzia Pires dos Santos.

Determinação *in situ* de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de *spot tests* / Luzia Pires dos Santos Benedetti. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

78 f.

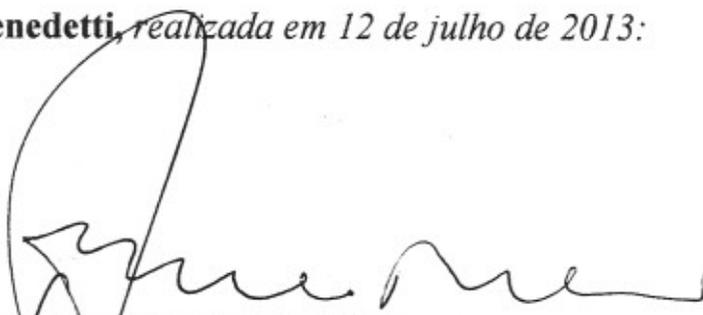
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Química analítica. 2. Imagens digitais. 3. RGB. 4. Etanol. 5. Sulfito. I. Título.

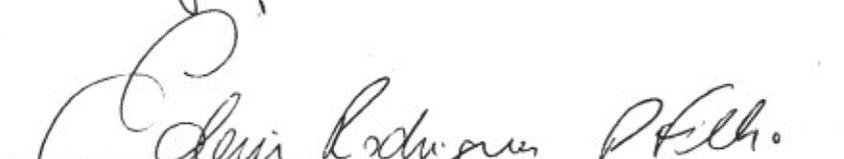
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata **Luzia Pires dos Santos Benedetti**, realizada em 12 de julho de 2013:*



Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho



Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho



Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza

Azul da Cor do Mar

(Tim Maia)

Ah!

Se o mundo inteiro me pudesse ouvir

Tenho muito pra contar

Dizer que aprendi...

E na vida a gente tem que entender

Que um nasce pra sofrer

Enquanto o outro ri...

Mas quem sofre sempre tem que procurar

Pelo menos vir a achar

Razão para viver...

Ver na vida algum motivo pra sonhar

Ter um sonho todo azul

Azul da cor do mar...

“Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito” (Chico Xavier).

“Um grande estímulo na vida é saber que alguém confia em nós, e de nós se espera grandes coisas.”

A ti, meu amor,
este trabalho eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado esposo, Edegar Benedetti Filho, sem o qual eu não teria chegado até aqui. Sua força e apoio foram fundamentais durante esta longa caminhada, sempre me levantando a cada queda.

Aos meus queridos pais: José Neves dos Santos e Maria Belmira Pires dos Santos que, mesmo distantes, sempre estiveram torcendo e rezando por mim.

Ao Vagner Bezerra dos Santos pela incalculável ajuda durante o desenvolvimento do meu trabalho de mestrado. Sempre à disposição, seu apoio nas incontáveis discussões foi essencial para a resolução de muitas questões.

Ao Prof. Dr. Valdomiro Lacerda Martins, da UFAM, pela contribuição referente às questões relacionadas aos tratamentos estatísticos.

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho pela orientação, incentivo e paciência em todos os momentos, contribuindo com meu aprendizado e crescimento profissional.

Ao querido amigo Jorge, pelo apoio nos momentos difíceis, companheirismo e compreensão, além das discussões e contribuições.

Ao Willian L., pelas contribuições e agradável companhia no dia-a-dia.

Ao Thiago Guerreiro pela atenção, amizade, alegria, contribuições e tranquilidade que me passava em todos os momentos.

À querida amiga Rafaela, por todo o companheirismo e amizade, tão importantes durante todo esse período, sempre com palavras de apoio e otimismo.

A todos do LABBES e LaBIE que, apesar da pouca convivência, sempre estiveram a disposição para contribuir de alguma forma com meu trabalho.

A todos os colegas que adquiri durante esta jornada, seja no laboratório, ou durante as disciplinas cursadas.

À todos os funcionários do Departamento de Química, especialmente às secretárias da pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciani, pela colaboração.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANN	Rede Neural Artificial (do inglês, Artificial Neural Network)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais (do inglês, Association of Official Analytical Chemists)
ASA	Ácido acetilsalicílico (do inglês, Acetylsalicylic Acid)
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada (do inglês, Charge-Coupled Device)
CRT	Tubos de raios catódicos (do inglês, Cathode Ray Tube)
CV	Coeficiente de Variação (do inglês, coefficient of variation)
DIB	Baseado em Imagens Digitais (do inglês, Digital image-based)
DIB-FES	Espectrometria de Emissão em Chama Baseada em Imagens Digitais (do inglês, Digital image-based-Flame Emission Spectroscopy)
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura (do inglês, Food and Agriculture Organization)
INS	Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares (do inglês, International Numbering System)
JECFA	Comitê de Especialistas da FAO/OMS em Aditivos Alimentares (do inglês, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
HLS	Matiz, Luminosidade e Saturação (do inglês, Hue, Lightness and Saturation)

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High Performance/Pressure Liquid Chromatography)
HPLC-FID	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ionização em chama (do inglês High Performance/Pressure Liquid Chromatography – Flame Ionization Detector)
LD	Limite de detecção (do inglês, Limit, of Detection)
LED	Diodo Emissor de Luz (do inglês, Light Emission Diode)
LQ	Limite de quantificação (do inglês, Limit of Quantification)
LS-SVM	Máquinas de Vetores de suporte por mínimos quadrados (do inglês, Least-Squares Support Vector Machines)
MLR	Regressão Linear Múltipla (do inglês, Multiple Linear Regression)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Regressão de componentes principais (do inglês, Principal Component <i>Regression</i>)
PLS	Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, Partial Least Squares)
PPO	Polifenol oxidase (do inglês, Polyphenol oxidase)
PTFE	Politetrafluoretileno (do inglês, Polytetrafluoroethylene)
RGB	Vermelho, Verde e Azul (do inglês, Red, Green and Blue)
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, Relative Standard Deviation)

SD Desvio padrão (do inglês, Standard Deviation)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Fórmulas químicas e números de identificação dos agentes sulfitantes	19
TABELA 3.1 – Especificações de cada câmera utilizada na captura das imagens das soluções reagentes	28
TABELA 3.2 – Amostras de bebidas utilizadas para a determinação de etanol.....	29
TABELA 3.3 – Amostras selecionadas para a determinação de sulfito.....	29
TABELA 3.4 – Características dos corantes utilizados para a calibração do sistema	32
TABELA 3.5 – Curvas analíticas (mol L^{-1}) obtidas para cada um dos corantes na calibração do sistema.....	33
TABELA 4.1 – Resultados de média, moda e desvio padrão (SD) dos canais RGB da mesma imagem, da seleção de áreas sem brilho e com brilho, obtidas do corante amarantho $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 11).....	44
TABELA 4.2 – Valores de média, desvio padrão (SD) e desvio padrão relativo (RSD) do tratamento das imagens, utilizando a Câmera 1 e a Câmera 5.....	45
TABELA 4.3 – Resultados da determinação do teor de etanol em amostras comerciais ($n = 3$).....	50
TABELA 4.4 – Percentagem de recuperação de etanol nas amostras analisadas ($n=4$).....	51
TABELA 4.5 – Efeito de alguns interferentes em potencial na determinação do teor de etanol ($n = 8$).....	53
TABELA 4.6 – Resultado da determinação de sulfito em amostras comerciais ($n = 3$)	56
TABELA 4.7 – Porcentagem de recuperação de sulfito para as amostras analisadas	58
TABELA 4.8 – Efeito de alguns interferentes em potencial na determinação da concentração de sulfito ($n=6$).....	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Representação geométrica do cubo de cores RGB.....	6
FIGURA 1.2 – Representação dos modelos de cor RGB e CMYK [17].....	7
FIGURA 1.3 – Representação do círculo cromático, representando o modelo HSB.....	8
FIGURA 1.4 – Espectro eletromagnético destacando a região do visível [18].....	13
FIGURA 1.5 – Representação das cores de um objeto em relação à luz incidente sobre este.....	14
FIGURA 1.6 – Distribuição de dióxido de enxofre e das espécies ionizadas de dióxido de enxofre em diferentes pHs.....	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 3.1 – Sistema usado na captura das imagens: visão lateral mostrando os detalhes da caixa (A); visão frontal, mostrando a placa de porcelana com a câmera digital acoplada no topo (B).....	30
FIGURA 3.2 – Sistema utilizado na captura e tratamento das imagens.....	31
FIGURA 3.3– Imagens obtidas de cada corante na placa de porcelana, no intervalo de concentração em quantidade de matéria por litro (mol L^{-1}) de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ (terceira calibração).....	34
FIGURA 3.4 – (Imagem do <i>software</i> ImageJ aberto, mostrando os dados obtidos da área selecionada da primeira cavidade da placa de porcelana ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), do corante Amaranth na faixa de concentração em quantidade de matéria por litro (mol L^{-1}) de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ (terceira calibração); o histograma obtido e os resultados numéricos de RGB (canal, média, moda e desvio padrão).....	35
FIGURA 4.1 – Representação ilustrativa do interior da caixa para obtenção das imagens: quantidade e disposição dos LEDs na parte superior interna (A); placa de porcelana acondicionada no fundo da caixa (B).....	42
FIGURA 4.2 – Diferentes regiões selecionadas de uma mesma imagem do corante amaranth $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (primeira cavidade da placa), mostrando a seleção de uma região sem brilho (A); e de uma região com brilho (B).....	Erro! Indicador não definido.

FIGURA 4.3 – Correlação entre $-\log(I/I_0)$ e concentração do etanol (canal R).....**Erro! Indicador não definido.**

FIGURA 4.4 – Curva analítica utilizada para a determinação de etanol (faixa linear de trabalho: 1 a 20 %v/v; Coeficiente linear: - 0,001; Coeficiente angular: 0,03; r: 0,999; LD: 0,25% v/v; LQ: 0,85% v/v).....47

FIGURA 4.5 – Fotografia da placa de porcelana (toque) referente à solução obtida da reação entre etanol com dicromato de potássio em meio ácido, na faixa de concentração de 1 a 50% v/v (curva analítica).....47

FIGURA 4.6 – Espectro de absorção dos padrões de etanol e do branco.....49

FIGURA 4.7 – Fotografias das placas de porcelana para estudo da interferência de metanol, acetato de etila e 2-butanona, nas proporções de 1:1, cujas cores das soluções são comparadas as da curva de calibração.....52

FIGURA 4.8– Correlação entre $-\log(I/I_0)$ e concentração do sulfito (canal B)..... 54

FIGURA 4.9– Curva analítica usada para a determinação de sulfito (Faixa linear de trabalho: $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ = 8,0 mg/L a 240 mg/L; Coeficiente linear: 0,037; Coeficiente angular: 250,92; r: 0,997; LD: $3,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ = 2,64 mg/L; LQ: $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ = 8,0 mg/L).....54

FIGURA 4.10– Fotografia da placa de porcelana (toque) referente à solução obtida da reação entre sulfito, 1,10-fenantrolina e nitrato de ferro (III) em meio ácido, na faixa de concentrações em quantidade de matéria por litro (molL⁻¹ de SO₃²⁻) de: $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ (curva analítica).....55

FIGURA 4.11 – Fotografias das placas de porcelana empregadas no estudo da interferência de ácido ascórbico na determinação de sulfito.....59

RESUMO

DETERMINAÇÃO *IN SITU* DE ANALITOS DE INTERESSE ALIMENTÍCIO EMPREGANDO TRATAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS DE *SPOT TESTS*. Neste trabalho foi desenvolvido um método analítico simples, rápido e de baixo custo, para realizar determinações *in situ* de etanol e íon sulfito em amostras de produtos alimentícios. O método utilizado foi baseado em imagens digitais capturadas por câmeras fotográficas e/ou celulares, utilizando um sistema construído para este fim. A técnica utilizada foi a colorimetria indireta, em que foi medida a intensidade de luz refletida pela solução, abordando o modelo de cores RGB. A quantificação dos analitos foi realizada a partir do método da curva de calibração, utilizando um *software* de tratamento de imagens para se obter os valores numéricos de cada uma das três cores primárias (vermelha (R), verde (G) e azul (B)). No primeiro procedimento foi determinado o teor (em %) de etanol em bebidas, obtendo-se limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) da ordem de 0,25 e 0,85 %, respectivamente, com uma curva analítica linear no intervalo de 1 a 20 % v/v ($r = 0,999$), utilizando o canal R por ter apresentado melhor linearidade e resultados mais próximos do método espectrofotométrico utilizado como método referência, a um nível de confiança de 95 %. O percentual de recuperação nas amostras comerciais variou entre 85,0 e 106 %. Na sequência, foi determinado sulfito em amostras de vinhos, vinagres e sucos, obtendo-se LD e LQ da ordem de $3,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, com uma curva analítica linear de $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,997$), utilizando o canal B por ter apresentado melhor linearidade e resultados mais próximos do método de referência, baseado na titulação iodométrica, com um nível de confiança de 95 %. O percentual de recuperação de sulfito nas amostras comerciais variou entre 84,4 e 103 %.

ABSTRACT

IN SITU DETERMINATION OF FOOD ANALYTES EMPLOYING DIGITAL IMAGES PROCESSING BY SPOT TESTS. In this work a simple, fast and inexpensive analytical method was developed to carry out *in situ* determinations of ethanol and sulfite ions in food samples. The method was based on digital images captured by cameras and / or mobile phones, using a proper device for this purpose. Indirect colorimetry was employed, where it was measured the intensity of the light reflected by the solution, employing the *RGB color model*. The quantification of the analytes was performed by calibration curve method, using image processing software to obtain the numerical values for each one of the three primary colors (red (R), green (G) and blue (B)). In the first procedure, it was determined the ethanol concentration in drinks, obtaining limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.25 and 0.85 %, respectively, with a linear calibration curve in the range from 1 to 20 % v / v ($r = 0.999$), using the R channel due to better linearity and results in close agreement to the spectrophotometric method used as reference method, with a confidence level of 95 %. The recovery study was carried out in six commercial samples and the recovery percentage ranged between 85.0 and 106%. The sulfite ions were determined in wines, vinegars and juices samples, with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of $3.3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ and $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectively, and with a linear calibration curve from 1.0×10^{-4} to $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0.997$) using the B channel supplying a good linearity and results in close agreement to the iodometric titration method employed as reference method, at a confidence level of 95 %. The recovery percentage of sulfite in commercial samples ranged between 84.4 and 103%.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1- <i>Spot tests</i>	2
1.2- Métodos <i>screening</i> de análises.....	4
1.3- Sistemas de padrões de cores RGB.....	5
1.4- O uso de imagens digitais em química analítica	8
1.5- Teorias das cores	13
1.6- Etanol.....	14
1.7- Métodos para determinação de etanol em bebidas	15
1.8- Sulfitos	18
1.9- Métodos para a determinação de sulfito	21
2 - OBJETIVOS	27
2.1- Objetivos gerais	26
2.2- Objetivos específicos	26
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
3.1- Calibração do sistema	28
3.1.1- Determinação de Etanol	28
3.1.2- Determinação de Sulfito	29
3.1.3- Equipamentos utilizados.....	29
3.1.4- Desenvolvimento do aparato para aquisição das imagens.....	30
3.1.5- Otimização dos parâmetros operacionais.....	31
3.1.6- Procedimento para calibração do sistema.....	32
3.1.7- Avaliação do procedimento de calibração do sistema.....	36
3.2- Método analítico para a quantificação dos analitos	36
3.2.1- Determinação do teor de etanol	37
3.2.2- Parâmetros estudados para a determinação de etanol	37
3.2.3- Método de referência para etanol.....	38
3.3- Determinação de sulfito (expresso em mg de SO ₂ /L).....	38
3.3.1- Parâmetros estudados para a determinação de sulfito.....	39

3.3.2- Método de referência para sulfito	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1- Otimização dos parâmetros operacionais	42
4.1.1- Calibração do sistema	44
4.1.2- Avaliação do procedimento de calibração do sistema	45
4.2- Determinação do teor de etanol	46
4.2.1- Curva analítica do etanol	46
4.2.2- Método de referência para etanol	49
4.2.3- Testes de recuperação	51
4.2.4- Testes de interferência em potencial	52
4.3- Determinação de sulfito	54
4.3.1- Curva analítica do sulfito	54
4.3.2- Método de referência para sulfito	56
4.3.3- Testes de recuperação	57
4.3.4- Testes de interferência em potencial	58
5- CONCLUSÕES	62
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICES	72

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1- *Spot tests*

O *spot test*, ou análise de toque, é uma técnica aplicada às reações químicas sensíveis e seletivas, e sua principal característica é a manipulação de pequenos volumes de reagentes e da solução a ser analisada [1]. Neste tipo de análise, gotas de reagentes são adicionadas a gotas de uma amostra com a concentração da espécie química de interesse desconhecida, obtendo-se, como resultado, a formação de um precipitado [1] ou a evolução de uma reação colorimétrica [1, 2], indicando a presença do analito de interesse na amostra.

É uma técnica simples [2, 3], rápida, de baixo custo operacional [2, 3] e bastante confiável [3], aplicável a compostos orgânicos ou inorgânicos [1], podendo ser empregada em determinações semi-quantitativas [2] ou quantitativas [4] para diversas espécies químicas. Entre as matrizes que podem ser avaliadas via *spot tests*, estão urina e sangue em análises clínicas, em resíduos de armas de fogo, drogas e venenos em estudos forenses, controle de qualidade do ar, da água, solos, plantas, e em estudos de adulteração ou composição de alimentos [3]. Na grande maioria das vezes, os *spot tests* são realizados sobre papéis de filtro, onde a superfície de contato permite distinguir diferentes concentrações por meio da intensidade da cor desenvolvida [2], sendo a concentração do analito proporcional à intensidade dessa cor [4].

Desde o seu surgimento, várias empresas têm investido em *spot tests* compactos para análises qualitativas e também quantitativas, especialmente para análises de água, urina e sangue com o objetivo de fornecer procedimentos com resposta rápida quanto à presença ou ausência de certas substâncias [3] (*screening analysis*). Atualmente, são largamente utilizados em testes de gravidez e para o controle do diabetes [2].

Segundo Kompany-Zareh *et al.* [5], os *spot tests* foram desenvolvidos até por volta da década de 1960, sendo as análises baseadas apenas sob o ponto de vista qualitativo. Ainda hoje, como um método quantitativo, sua aplicação não costuma ser tão usual e, segundo o autor, isso talvez se deva à dificuldade em manusear quantidades diminutas de reagentes com precisão, ou devido à existência de uma grande variedade de técnicas analíticas instrumentais mais atrativas que

apresentam baixos limites de detecção, como a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massas acoplado, por exemplo. Ainda assim, seu potencial quantitativo é inegável, existindo na literatura diversos trabalhos que os utilizam desta forma [2, 4-9].

A origem dos *spot tests* é desconhecida mas, segundo Fritz Feigl [10], em 1834, Friedlieb Ferdinand Runge usou papel de filtro impregnado com amido e iodeto de potássio para detectar cloreto livre, sendo este papel reagente comercializado desde então [3]. A partir dos seus estudos com cromatografia, Runge foi um dos pioneiros a usar papel em reações químicas, sendo por isso considerado o criador das análises de *spot tests* [3]. Já o desenvolvimento moderno dos *spot tests* é atribuído a Fritz Feigl, o qual contribuiu significativamente no desenvolvimento e aprimoramento da técnica, realizando aplicações tanto em reações orgânicas como em inorgânicas [3]. E devido às inúmeras vantagens, esta técnica continua sendo bastante utilizada atualmente.

Zeraik *et al.* [1] desenvolveram um *spot test* para o monitoramento da atividade da enzima peroxidase num procedimento de purificação. A enzima foi obtida a partir do extrato de batata doce e o ensaio baseado na reação entre o peróxido de hidrogênio e o guaiacol, a qual é catalisada pela presença da peroxidase, produzindo o tetraguaiacol colorido. Nas frações que apontavam a presença da peroxidase, a atividade foi determinada. A absorvância do tetraguaiacol formado foi medida em 470 nm, e a sensibilidade do procedimento espectrofotométrico foi de $26.600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ϵ_{470}) (usando cubeta de quartzo com caminho ótico de 1cm), com um limite de detecção de 12,4 μg de guaiacol.

Paciornick *et al.* [2] desenvolveram um método para quantificação de mercúrio baseado na reação colorimétrica obtida entre o vapor de mercúrio e iodeto cuproso. Um scanner comercial foi utilizado para capturar a imagem, a qual foi analisada a fim de estabelecer uma relação quantitativa entre os componentes da cor e a concentração de mercúrio, sendo a sua intensidade relacionada à concentração na amostra original. Diferentes modelos de separação de cor foram comparados quanto à sensibilidade, frente à variação da concentração de mercúrio. O modelo HLS (*Hue, Lightness, Saturation*) apresentou os melhores resultados, mostrando a relação linear mais sensível entre o valor da componente H e a concentração de mercúrio. Os limites de detecção foram estimados em $0,007 \mu\text{g g}^{-1}$.

Matias *et al.* [4] desenvolveram um método para a determinação quantitativa de ácido acetilsalicílico (ASA) em medicamentos comerciais utilizando procedimentos *spot test* e refletância difusa. O método baseou-se na formação de um complexo de cor roxa intensa entre o ácido salicílico, obtido a partir da hidrólise alcalina do ASA, e íons Fe(III). As determinações não necessitaram de separação prévia e a medida da refletância da mistura final foi realizada diretamente. Este método apresentou um desvio padrão relativo (RSD) de 0,9%, com um limite de determinação quantitativa de 0,6 mg de ASA na solução de trabalho. Em comparação com o método de referência, o desvio padrão relativo foi de 0,6%.

Ribeiro *et al.* [11] desenvolveram um método de *spot test* simples e rápido para determinar metildopa em formulações farmacêuticas de modo quantitativo, utilizando a espectroscopia de refletância difusa a 410 nm. O método foi baseado na reação entre metildopa e íons molibdato, formando um complexo de cor amarela na superfície do papel de filtro. A curva analítica obtida a partir do gráfico de densidade óptica do sinal de refletância vs. log da concentração de metildopa foi linear entre $6,30 \times 10^{-3}$ a $1,89 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com um coeficiente de correlação de 0,998. O limite de detecção obtido foi de $2,74 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (RSD = 1,02%). Os resultados obtidos por este método foram comparados com o método oficial, com um nível de confiança de 95%.

1.2- Métodos *screening* de análises

Métodos *screening* são procedimentos analíticos realizados com objetivo de identificar um composto ou grupos de compostos com o menor número de etapas possíveis e, com o mínimo de manipulação da amostra [12].

Estes ensaios são realizados com o intuito de confirmar a presença ou ausência de certa substância sob análise, fazendo uso de técnicas rápidas e de baixo custo. Basicamente, é um método que visa responder “sim” ou “não” quanto à presença de determinada espécie na amostra [12]. Caso a resposta seja positiva quanto à presença de determinada espécie, novas amostras são selecionadas, para posterior investigação mais detalhada do problema [13].

Entre as principais metodologias utilizadas em análises de *screening*, estão: sistemas empregando sensores químicos, métodos com imunoensaios e

testes com papel de filtro [13]. Estes e outros métodos podem ser miniaturizados ou simplificados para realizar análises em campo.

Alguns métodos convencionais de análise são projetados para fornecer informações detalhadas (qualitativa e/ou quantitativa) sobre os analitos em uma amostra, o que pode ser desnecessário em alguns casos [14], especialmente quando se deseja uma resposta imediata. Sendo assim, é importante o desenvolvimento de métodos que forneçam informações analíticas mais rápidas, precisas, de execução em campo e com baixo custo operacional e, neste contexto, o desenvolvimento de metodologias do tipo *screening* é uma tendência importante em química analítica [14].

1.3- Sistemas de padrões de cores RGB

Avanços significativos na eletrônica e programação têm possibilitado a obtenção de novas tecnologias para a aquisição e tratamento de dados aplicados em diferentes áreas da ciência, sobretudo na química [15].

O uso de câmeras fotográficas, *webcams*, *scanners* e celulares com câmeras fotográficas embutidas, têm-se tornado ferramentas analíticas poderosas no desenvolvimento de procedimentos analíticos para as mais variadas aplicações. Isso é possível graças ao desenvolvimento de dispositivos integrados com melhores resoluções, o que lhes confere melhor desempenho na aquisição e processamento das imagens.

Softwares comerciais altamente eficientes estão facilmente disponíveis – mesmo para uso em computadores pessoais – permitindo que o usuário possa coletar um grande conjunto de dados e obter resultados estatisticamente significativos [2].

Assim que as imagens são digitalizadas, as informações de cor são convertidas em matrizes numéricas e armazenadas na memória do computador [2]. Dessa forma, a imagem é mostrada em matrizes de dígitos binários (0 e 1), que se transformam numa estrutura quadriculada, chamada matriz de pontos, sendo que cada ponto, ou unidade básica, equivale a um pixel na imagem, e cada pixel apresentando uma intensidade específica [2].

Diversos modelos podem ser abordados para o estudo das cores. A maioria dos métodos analíticos baseados no uso de imagens digitais emprega o

modelo de cores RGB (do inglês, *Red*, *Green* e *Blue*), que utiliza as cores primárias, vermelha, verde e azul, e o conceito fundamental de que todas as demais cores são baseadas nas várias combinações destas [2]. Este modelo é chamado aditivo porque utiliza a luz transmitida para exibir as cores [16], e a combinação linear destas três cores primárias geram todas as demais cores percebidas no espectro [2], o que permite a aquisição de cerca de 16,7 milhões de cores diferentes (256^3) [17].

O espaço de cor RGB pode ser melhor visualizado a partir da representação geométrica desse sistema em um espaço tridimensional cúbico conhecido como cubo de cor (Figura 1.1).

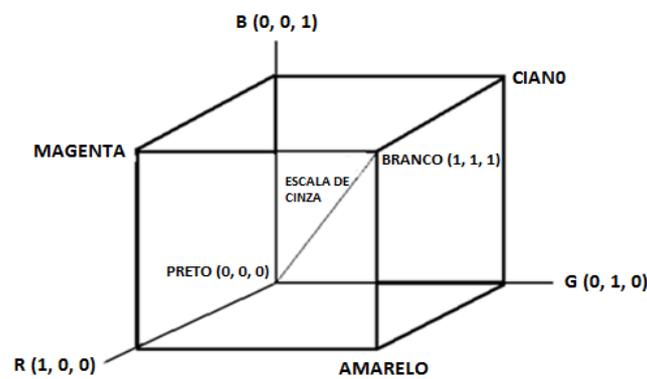


FIGURA 1.1: Representação geométrica do cubo de cores RGB.

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

O modelo RGB baseia-se na detecção de cor característica do olho humano, o qual possui células sensíveis (chamadas cones) a estas três regiões do espectro eletromagnético [2]. É o padrão utilizado nos tubos de raios catódicos (CRT), como telas de TV e computadores, sendo a gama de cores exibidas dependente do dispositivo em questão [16].

O uso do padrão RGB como resposta analítica está fundamentado no fato de que os valores de RGB variam proporcionalmente com a cor em uma reação colorimétrica. Este efeito pode, muitas vezes, estar associado à variação da concentração de uma substância de interesse e, é baseado neste princípio que as análises baseadas em imagens digitais são empregadas em química quantitativa.

Um segundo modelo de cor, conhecido pelas siglas CMY, ou CMYK, é baseado nas cores usadas nas impressoras, Ciano, Magenta e Amarelo – do inglês *Cyan*, *Magenta* e *Yellow*. É chamado de modelo subtrativo porque as demais cores são obtidas através da absorção sucessiva de luz pelas camadas de tinta [2]. Quando a luz branca incide sobre tintas translúcidas, certos comprimentos de onda são absorvidos, enquanto outros são refletidos para os olhos [16]. A combinação destas três cores primárias deveriam absorver todos os comprimentos de onda da luz e, assim, produzir a cor preta. No entanto, isso não acontece, e um tom castanho escuro é produzido [16]. Isso se deve ao fato de as tintas utilizadas para impressão não serem totalmente puras. Sendo assim, uma quarta cor, a cor preta (do inglês, *black*) se faz necessário para produzir um preto verdadeiro, ou preto puro.

Como pode ser visto na Figura 1.2, as cores primárias do modelo aditivo RGB, são as respectivas cores secundárias do modelo subtrativo CMYK. Em outras palavras, as cores primárias de um modelo é a respectiva cor secundária do outro.

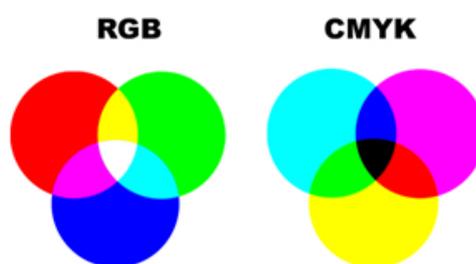


FIGURA 1.2: Representação dos modelos de cor RGB e CMYK [18].

Um terceiro modelo chamado HSB (do inglês *Hue*, *Saturation* e *Brightness*), é baseado nas componentes Matiz (comprimento de onda ou frequência da radiação), Saturação (corresponde à quantidade de luz branca misturada à matiz), e Brilho (descreve a intensidade da cor – número de fótons que atingem o olho) [19].

A Figura 1.3 apresenta este modelo, cuja principal característica é que a representação cognitiva da informação de cor é dada por um único parâmetro: a componente H a qual é representada por um círculo, onde vermelho (R) é representado por 0° ; amarelo (Y) por 60° ; Verde (G) por 120° ; Ciano (C) por 180° ; Azul (B) por 240° e Magenta (M) por 300° [2]. A saturação é representada pela distância do centro às bordas do círculo; e o brilho pelo eixo perpendicular ao centro [19].

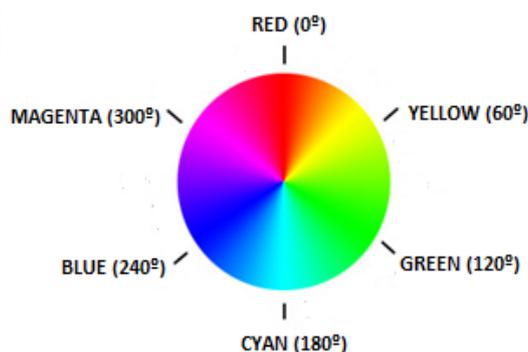


FIGURA 1.3: Representação do círculo cromático, representando o modelo HSB.

1.4- O uso de imagens digitais em química analítica

A tecnologia das câmeras digitais têm tido uma melhora significativa nos últimos anos e seu uso se disseminou por grande parte da população, acompanhando o aumento da inclusão digital. Conseqüentemente, é possível obter câmeras digitais cada vez melhores e a menores custos. Com isso, a combinação de fotografia digital com os testes colorimétricos, oferece uma opção interessante para aquisição de dados qualitativos e quantitativos em determinações analíticas [20].

As câmeras digitais comerciais mais comuns são baseadas no uso de sensores do tipo dispositivos de carga acoplada, conhecidos na literatura pela sigla CCD (*Charge-Coupled Device*). Estes sensores apresentam boa resolução e a possibilidade de gerar uma grande quantidade de informações por imagem, vantagem essa que é superior a de muitos espectrofotômetros e espectrofluorímetros, nos quais uma varredura espectral é necessária. Além disso, estes equipamentos utilizam dispositivos óticos como lentes, monocromadores e grades de difração, que são responsáveis pelo aumento no custo de aquisição destes tipos de equipamentos.

O trabalho de Monemi *et al.* [21] foi um dos primeiros a utilizar imagens digitais para fins analíticos. Em um ensaio quimiluminescente usando capilares de vidro, e uma câmera CCD, os autores determinaram a proteína ligante do retinol (RBP). A faixa linear de trabalho ficou entre $0,11 \text{ pg mL}^{-1}$ a 11 ng mL^{-1} , com um coeficiente de correlação de 0,98.

Maleki *et al.* [22] têm empregado o uso de câmeras digitais como sensores para a determinação simultânea de Al (III) e Fe (III) em ligas empregando o cromo azul S como reagente cromogênico. Tanto o Al (III) quanto o Fe (III) foram determinados no intervalo de concentração de $0,25$ a 4 mg mL^{-1} com exatidão e precisão satisfatórias.

Gaião *et al.* [23] empregaram uma *webcam* como detector do ponto final em titulações ácido-base (*DIB – digital image-based*). Assim como na titulação convencional, há uma descontinuidade nas curvas de titulação (variação das componentes RGB da imagem) próximo ao ponto de equivalência. Para cada pixel da imagem obtida pela *webcam*, o valor de cor das componentes RGB foi baseado no produto $2R \times 2G \times 2B$, e então o valor médio de todos os pixels da imagem foi usado para construir as curvas de titulação.

Lyra *et al.* [24] por sua vez, têm empregado *webcams* como detectores em técnicas de emissão atômica em chama (*DIB-FES*). O método *DIB-FES* emprega uma *webcam* para capturar imagens que estão associadas à radiação emitida pelo analito numa chama de ar-butano. Como o detector da *webcam* é baseado no sistema RGB, um novo modelo matemático foi desenvolvido a fim de construir as curvas *DIB-FES*. Nesta abordagem, cada imagem é decomposta nas três componentes individuais R, G e B e seus valores usados para definir um vetor posição no espaço tridimensional RGB. O método *DIB-FES* foi aplicado na determinação de lítio, sódio e cálcio em drogas antidepressivas de soro fisiológico e água, obtendo-se excelente precisão e exatidão. Os limites de detecção (LD) foram de $0,9$; $0,4$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ para lítio, sódio e cálcio, respectivamente.

Safavi *et al.* [25] exploraram imagens digitais para desenvolver um sensor óptico visando à determinação de pH, empregando diversos indicadores ácido-base e modelos matemáticos como Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares – PLS*) e Redes Neurais Artificiais (*Artificial Neural Network – ANN*).

Lima *et al.* [26] apresentam a combinação de imagens digitais e um microanalisador de fluxo batelada (*DIB-µm FBA*) como uma nova estratégia para a

execução de análises químicas quantitativas. Este sistema utiliza imagens digitais obtidas a partir de uma webcam com sensor CCD, com base no modelo de cor RGB. O analisador foi utilizado para a determinação de taninos em chá verde empregando o método do tartarato ferroso. As curvas estudadas foram lineares de 10,0 a 100,0 mg L⁻¹ de ácido tânico, e o limite de detecção foi de 2,74 mg L⁻¹.

Kompany-Zareh *et al.*[27] aplicaram calibração baseada em imagens digitais para determinar ferro (III), como um catalisador na oxidação do índigo carmim, utilizando íons bromato. Durante a reação, o produto incolor foi produzido e a concentração de Fe³⁺ foi dependente do tempo gasto para que a cor da solução desaparecesse. O esvaecimento da cor foi registrado por vídeo como uma mudança nos padrões das cores vermelha, azul e verde (%RBG). Íons Fe³⁺ foi determinado numa faixa de 6 a 16 ppm, em pH 2, a 25°C. O limite de detecção dos íons foi de 1,994 ppm.

Alguns pesquisadores têm empregado *webcams* como sensores para o desenvolvimento de métodos baseados em titulação ácido-base. Tôrres *et al.* [28] determinaram a acidez total de vinhos tintos por meio de titulação ácido-base sem o uso de indicador e sem pré-tratamento da amostra. As antocianinas presentes no vinho mudam de cor de acordo com o pH. Valores de RGB foram utilizados para construir a curva de calibração, e a partir da variação de cor das imagens obtidas durante a titulação, o ponto final pode ser localizado com exatidão e precisão.

Byrne *et al.* [20] investigaram os meios de tratamento da alta densidade de pontos das matrizes geradas pela imagem digital. Foi utilizada uma câmera digital com CCD de alta resolução, onde cada ponto da matriz de uma imagem colorida foi tomada e processada utilizando o *software* de desenvolvimento LabVIEW, para retornar aos valores numéricos dos componentes da cor vermelha, verde e azul de cada ponto.

Lampen *et al.* [29] usaram as imagens digitais adquiridas pela câmera da sonda Mars Pathfinder (IMP) para obter informações sobre as propriedades químicas e mineralógicas das pedras e do solo do planeta Marte, usando técnicas espectroscópicas e fotométricas. Mars Pathfinder foi a primeira sonda espacial desde as missões Viking na década de 1970, e foi construída e operada pelo Laboratório de Propulsão a Jato (JPL), em Pasadena – CA, sendo lançada em 04 de dezembro de 1996 de Cabo Canaveral, Flórida.

Yam *et al.* [16] desenvolveram um método simples que utiliza a combinação de câmera digital, computador e *software* de tratamento gráfico para medir e analisar a cor da superfície de produtos alimentícios. As imagens obtidas dos produtos alimentares podem ser vistas na tela de um computador ou impressos em papel para análise qualitativa de cor e estrutura. Informações quantitativas tais como a distribuição de cor e médias (em termos dos valores de L^* , a^* e b^*) também podem ser determinados facilmente. Na análise qualitativa (aspectos não facilmente quantificados), os termos subjetivos como “mais leve”, “mais escuro”, e “mais atraente” foram usados para descrever ou comparar as amostras de alimentos. Em outras pesquisas, apenas informação quantitativa (como a cor média) foi relatada.

Santos *et al.* [30] propuseram um método *screening* de baixo custo para detectar e quantificar adulteração em amostras de leite de vaca. O estudo de adulteração foi realizado com água e com NaOH, e as imagens digitais das amostras adulteradas foram obtidas utilizando um scanner de mesa. Para avaliar as informações a partir das imagens, foram utilizados 10 parâmetros de cor: vermelho, verde, azul, matiz, saturação, valor, cores relativas (r, g, e b), e intensidade. Para a adulteração com água, foram propostos os modelos de regressão linear múltipla (MLR), regressão de componentes principais (PCR), e de mínimos quadrados parciais (PLS). Cada imagem gravada foi recortada, e os valores de RGB convertidos para o sistema HSV. Os desvios padrões obtidos para o leite adulterado com água, para cada cor, foram de 0,26% para H, e 6,28% para S. A adulteração com NaOH, por sua vez, foi investigada usando análise dos componentes principais (PCA).

Lupetti *et al.* [31] desenvolveram um método didático simples para monitorar o escurecimento dos tecidos de frutas causadas pela enzima oxidase de polifenóis. As imagens capturadas de diversas frutas em diferentes momentos foram analisadas por meio do método de Monte Carlo (reprodutibilidade de 95%) e por programas de tratamento de imagens digitais.

Ramanathan *et al.* [32] desenvolveram um método simples, confiável e de baixo custo para monitoramento de negro de carbono no ar, baseado no uso de um telefone celular. O método utiliza imagens capturadas pelo telefone, as quais são comparadas com uma escala de referência calibrada (também incluída na fotografia) para estimar o teor de negro de carbono. O sistema também integra um filtro amostrador miniaturizado junto ao telefone celular, que coleta, analisa e transmite os

dados em tempo real, via *wireless*. A concentração de negro de carbono variou de 0,1 a 1 $\mu\text{g m}^{-3}$ no sul da Califórnia; e de 10 a 200 mg m^{-3} na zona rural da Índia.

Borin *et al.* [33] desenvolveram um procedimento baseado em imagens digitais obtidas de *scanners* para a determinação de *Lactobacillus* em leite fermentado fazendo uso de ferramentas quimiométricas para executar e validar os modelos de calibração empregados na análise qualitativa e quantitativa. Os resultados obtidos utilizando máquina de vetor de suporte com mínimos quadrados (LS-SVM) apresentou uma média de erros de 10%.

Além do uso de imagens, na literatura têm sido reportados procedimentos baseados no uso de vídeos para o monitoramento de alguns procedimentos analíticos.

Novales *et al.* [34] empregaram um procedimento baseado no uso de um instrumento de imagem de vídeo para monitoramento rápido e não destrutivo de sistemas dispersos como emulsões e suspensões para estudos de sedimentação, coalescência, inversão de fase de floculação, entre outros. O método pode ser aplicado para análises de qualquer tipo de emulsão ou suspensão, como água em óleo e óleo em água, uma vez que o método baseia-se apenas nas variações de intensidades de níveis de cinza nas imagens.

Sena *et al.* [35] desenvolveram um procedimento empregando análise de imagem de vídeo projetado para otimizar a detecção de baixas concentrações de sulfato de bário em suspensão coloidais. Para tal, uma *webcam* convencional foi utilizada como sensor de baixo custo. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles empregando o método turbidimétrico como referência, e baseado nos resultados obtidos, os autores justificam que esse tipo de procedimento é uma boa ferramenta alternativa ao uso do método turbidimétrico e pode ser utilizado também em outros sistemas deste tipo, como em estudos de precipitação de outros sais inorgânicos e até mesmo em estudos de cristalizações. A *webcam* foi configurada para capturar imagens de 24 bits a uma taxa de 30 imagens/s, com uma resolução espacial 640 × 480 pixels. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram avaliados para concentrações abaixo de 15 mg L^{-1} , e variaram de 0,51 a 0,84; e de 1,70 a 2,80, respectivamente, dependendo da configuração utilizada – configuração A: brilho 60% e ganho 50%; ou configuração C: brilho 60% e ganho 100%.

1.5- Teorias das cores

A cor pode ser definida como a aparência subjetiva da luz, a qual é detectada pelo olho após sua interação com a matéria [19], ou seja, é a percepção visual individual de diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético. Mas o olho humano pode visualizar as cores apenas numa pequena parte desse espectro – chamado espectro visível (Figura 1.4), nos comprimentos de onda da luz num intervalo entre 400 nm (mínimo, cor violeta) a 700 nm (máximo, cor vermelha) [19].

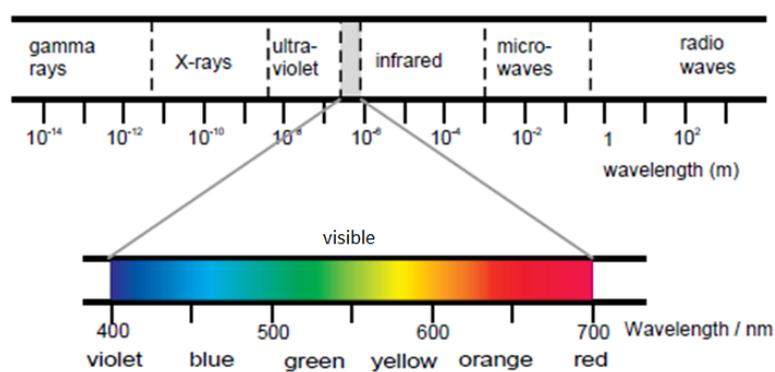


FIGURA 1.4: Espectro eletromagnético destacando a região do visível [19].

Em 1704, o físico inglês Isaac Newton em seu livro *Optics*, apresentou sua teoria do que era a luz, chamado de Modelo Corpuscular, que considerava a luz como um feixe de pequenas partículas ou corpúsculos [19]. Atualmente, todas as experiências mostram que a luz e sua interação com a matéria são melhores descritas em termos de fótons.

Independente da forma como é descrita, a luz não tem cor como tal. A cor, ou mais precisamente, sua percepção, é o resultado da combinação entre o cérebro e o olho, que discrimina a luz de diferentes comprimentos de onda ou energias [19].

A cor que vemos se deve a muitos fatores, incluindo a propagação de energia da fonte de luz, a adição ou subtração de energia durante as interações com outros materiais e da sensibilidade do olho de cada indivíduo [19]. Se uma substância absorve seletivamente certos comprimentos de onda da região visível do

espectro eletromagnético, a cor resultante é dita complementar e é formada pela combinação dos comprimentos de ondas restantes [17]. Desta forma, a cor percebida por um corpo representa a radiação que não é absorvida, sendo por isso denominada cor complementar. Assim, um objeto é azul porque absorve, preferencialmente, a luz vermelha e verde, refletindo a cor azul (Figura 1.5). Se o objeto reflete intensamente a radiação, muito pouco é absorvido e por isso vemos a cor branca; mas se pouco é refletido, a radiação incidente é majoritariamente absorvida, e por isso vê-se a cor preta. No entanto, o caso intermediário é o que geralmente ocorre na natureza.

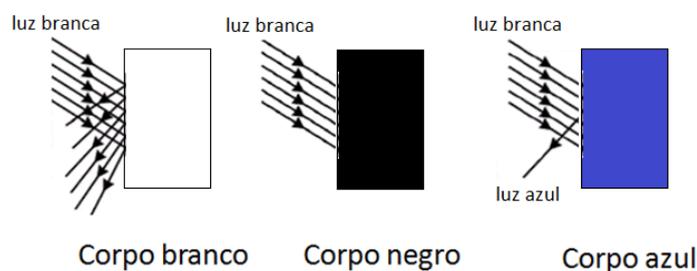


FIGURA 1.5: Representação das cores de um objeto em relação à luz incidente sobre este.

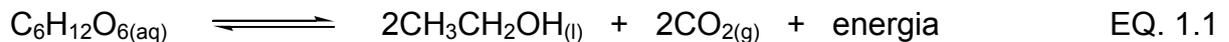
Se uma fotografia ou cena real é observada, o olho humano imediatamente associa os comprimentos de onda refletidos com os padrões de cores e o cérebro interpreta as imagens [17]. Uma câmera digital trabalha de forma análoga ao olho humano, capturando a cena e convertendo-a em dados numéricos. Na forma digital, as imagens podem ser manipuladas de várias formas, fazendo uso de uma grande variedade de programas computacionais, conforme discutido anteriormente [17].

1.6- Etanol

O etanol, também conhecido como álcool etílico, é um líquido incolor de odor característico e miscível em água, podendo ser obtido a partir da fermentação ou destilação de diferentes biomassas, como mandioca, milho, sorgo, ou mesmo de frutas. No Brasil, a fonte principal deste composto é a cana-de-açúcar e, em geral, é usado em diversas aplicações, como solvente industrial (em fármacos, tintas, cosméticos, entre outros), desinfetantes domésticos e hospitalares e, principalmente, como combustível de carros e motos [36].

O etanol está presente em todas as bebidas alcoólicas, e sendo uma substância depressora do sistema nervoso central, é capaz de provocar mudanças indesejáveis no comportamento de quem o consome como euforia (estágio inicial), falta de coordenação motora, dores de cabeça ou mesmo coma (consumo excessivo), sendo que seu consumo frequente pode ocasionar dependência. Seus efeitos podem variar, de acordo com o organismo e estrutura física de cada um, devido às diferenças na capacidade de metabolizar o álcool [37].

As bebidas alcoólicas podem ser divididas em dois grandes grupos principais, de acordo com o método de produção, podendo ser fermentadas (como vinhos e cervejas) ou destiladas (aguardentes em geral). Em qualquer um dos casos, o etanol está presente, o que caracteriza as bebidas em alcoólicas e não alcoólicas. Na produção de qualquer bebida alcoólica, independente se fermentadas ou destiladas, o processo fermentativo é o primeiro passo da fabricação. Esse processo envolve a transformação da glicose ($C_6H_{12}O_6$) em etanol (CH_3CH_2OH) e dióxido de carbono (CO_2) a partir da ação de micro-organismos (bactérias ou leveduras), em condições anaeróbias (EQ. 1.1) [38].



Durante o processo fermentativo, o teor de etanol produzido chega à no máximo 14%, e acima deste teor, o etanol formado destrói as enzimas e a fermentação cessa [36]. Assim, para se obter bebidas com teores alcoólicos mais elevados, recorre-se ao processo de destilação, que pode produzir bebidas com um teor alcoólico de até 70%. Com isso é possível obter bebidas com diferentes teores alcoólicos a partir da mesma matéria prima. É o caso, por exemplo, do malte, que produz tanto a cerveja (bebida fermentada), quanto o uísque (bebida destilada).

1.7- Métodos para determinação de etanol em bebidas

Com o uso do etanol em bebidas sendo legal e largamente aceitável, o custo social e pessoal do seu abuso é enorme. A cada dia, mais pessoas se tornando usuárias e até mesmo alcoólatras, há uma crescente preocupação quanto à pureza e aos teores de etanol nas bebidas [39]. Mas o custo instrumental, assim como as dificuldades na manipulação, tem dificultado sua detecção de modo preciso

e exato, tanto nos ensaios *in vivo*, como no teste do bafômetro, por exemplo, como em bebidas [39].

Existem diversos métodos para a determinação da concentração de etanol em bebidas alcoólicas, os quais se subdividem em métodos físicos, químicos e enzimáticos [40].

O método oficial designado pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para a determinação de etanol em bebidas alcoólicas é a picnometria [40], cujo princípio se baseia na diferença de densidade entre as substâncias. O método consiste em medir a massa de um volume conhecido do líquido analisado usando um picnômetro, cujo volume tenha sido calibrado previamente em termos de peso de água pura, a 20°C [40, 41]. Desta relação de massas e volumes resulta a densidade relativa à água e, a partir de valores pré-tabelados, o percentual de álcool por volume pode ser determinado [41].

Medidas da concentração de etanol em bebidas também podem ser realizadas por outro método físico conhecido, a refratometria. Como o índice de refração de uma solução varia regularmente com a concentração do soluto, o teor de etanol pode ser estimado por meio de seu índice de refração comparado com valores pré-tabelados como referência [40].

Devido às vantagens analíticas utilizando sistemas em fluxo, diversos métodos para a determinação de teores alcoólicos em bebidas foram propostos empregando esta técnica.

Fletcher & Staden [42] desenvolveram um método de análise de injeção sequencial com detecção espectrofotométrica para determinar o teor de etanol em bebidas alcoólicas. Foi utilizado dicromato de potássio 0,2 mol L⁻¹ em ácido sulfúrico 4,0 mol L⁻¹, sendo o etanol monitorado em 600 nm, comprimento de onda na qual a interferência do dicromato é minimizada. O método foi linear até 6% (v/v) de etanol ($R^2 = 0,9995$), apresentando um limite de detecção de 0,09% (v/v). O desvio padrão (n = 10) foi menor que 1% e uma frequência analítica de 19 amostras h⁻¹, sendo gastos cerca de 200 µL de reagente por análise.

Uma proposta espectrofotométrica para a determinação do teor de álcool em bebidas foi desenvolvida por Lau & Luk [43]. O método é simples e relativamente rápido (cerca de 15 minutos), e baseia-se na reação colorimétrica entre etanol e Ce (IV). A curva de calibração foi linear até 0,78% v/v, com desvio padrão relativo de 5,0% ao nível de 0,34% v/v de etanol.

Pais *et al.* [44] propuseram um sistema de injeção sequencial com detecção espectrofotométrica para a determinação enzimática de etanol em vinhos. A determinação foi baseada na reação enzimática envolvendo etanol e NAD^+ (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo) na presença de álcool desidrogenase. Uma unidade de difusão gasosa foi introduzida para executar uma diluição em linha. Os resultados obtidos para as amostras apresentaram boa reprodutibilidade e um desvio padrão relativo inferior a 1%. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,05 e 0,3 % v/v, respectivamente.

Nitrato de cério IV e amônio têm sido usados para análises qualitativas de etanol. Pinyou *et al.* [45] desenvolveram um método colorimétrico em fluxo para a determinação de etanol em diversas bebidas, baseado na reação do etanol com íon cério IV em meio ácido, produzindo um complexo de cor vermelha. Neste método foi empregada uma célula de difusão gasosa para permear o etanol e assim melhorar a seletividade. O sinal do detector foi registrado num computador, sendo a altura do pico diretamente proporcional à concentração de etanol na solução injetada. Curvas de calibração foram construídas e utilizadas para quantificação de etanol nas amostras. Os desvios padrões relativos para 11 injeções repetidas de 1,0, 5,0 e 10,0% de etanol (v / v) foram 1,2, 0,5 e 0,3, respectivamente, com um limite de detecção de 0,03% v/v.

Hnaien *et al.* [46] desenvolveram um biossensor condutométrico para determinação de álcoois alifáticos primários de cadeia curta. O biossensor foi preparado imobilizando álcool oxidase de *Hansenula sp.* e *catalase* de fígado bovino numa membrana foto reticulada de álcool polivinílico na superfície de microeletrodos interdigitados. O sensor foi aplicado com sucesso para a determinação de etanol em diferentes bebidas alcoólicas, com resposta linear até $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ de etanol e limite de detecção de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (S/N = 3).

Wen *et al.* [47] desenvolveram um biossensor para medir etanol em vinhos no qual a enzima álcool oxidase foi imobilizada numa membrana da casca de ovo (película entre a casca e a clara), utilizando quitosana como suporte e um sensor de oxigênio comercial. A determinação de etanol foi baseada na depleção do teor de oxigênio dissolvido, após a exposição a uma solução de etanol. O biossensor respondeu linearmente para concentrações de etanol entre $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $0,80 \text{mmol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ (S/N = 3), com tempo de resposta de 1 min. A fim de determinar a estabilidade de armazenamento do biossensor, sua

sensibilidade a etanol $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$ foi avaliada periodicamente, em intervalos de 3 dias durante meses e com isso concluiu-se que o biossensor retém cerca de 86,6% da sua sensibilidade original após 3 meses de armazenamento. O biossensor era armazenado em tampão fosfato (pH 7,4, 25 mmol L^{-1}) a 4 C° , quando não utilizado.

Kirgöz *et al.* [48] desenvolveram um biossensor que permite a detecção de duas substâncias diferentes, aspartame e etanol, sem nenhum pré-tratamento das amostras. O sensor possui um sistema bioenzimático, composto de carboxilesterase e álcool oxidase sequencialmente integradas sobre a superfície de um eletrodo compósito de grafite epoxy (GECE). Na determinação de etanol – em vinhos e cervejas – o biossensor desenvolvido mostrou-se linear na faixa de $2,5$ a $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com um tempo de resposta de 70 s. Os desvio padrão (SD) e coeficiente de correlação (CV) calculados foram de $\pm 0,055 \text{ mol L}^{-1}$ e 0,4%, respectivamente. Para a determinação de aspartame, a linearidade foi de $2,5$ a $400 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com um tempo de resposta de 170 segundos, e os desvios padrão (SD) e coeficientes de correlação (CV) foram de $\pm 4,92$ e 3,9%, respectivamente.

Yarita *et al.* [49] propuseram um método para determinação de etanol em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ionização em chama (HPLC-FID), usando água pura na fase móvel e sílica gel (C30) na fase estacionária. Os resultados obtidos indicaram que o método proposto é eficaz para a determinação de etanol, com um desvio padrão relativo de 1%.

1.8- Sulfitos

Os termos “agente sulfitante” e “sulfito” são utilizados como referência às seguintes espécies: dióxido de enxofre gasoso ou aos sais de sódio, potássio e cálcio de hidrogenossulfito (bissulfito), dissulfito (metabissulfito) ou íons de sulfito [50]. Estes compostos são utilizados como aditivos alimentares, atuando como conservantes, inibindo a ação provocada pelas bactérias, fungos e leveduras em alimentos ácidos; e como antioxidantes, na inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático tanto durante o processo de produção, quanto na estocagem. Atuam também como agentes redutores, provocando a diminuição dos níveis de oxigênio (O_2) do meio, e desta forma evitam o crescimento de micro-organismos aeróbios. Os sulfitos podem ser adicionados em diferentes formas (Tabela 1.1) e em diversos alimentos, desde bebidas a produtos farmacêuticos [50].

TABELA 1.1: Fórmulas químicas e números de identificação dos agentes sulfitantes [50]

Substância	Fórmula	INS*
Dióxido de enxofre	SO ₂	220
Metabissulfito de sódio	Na ₂ S ₂ O ₅	223
Metabissulfito de potássio	K ₂ S ₂ O ₅	224
Sulfito de cálcio	CaSO ₃ · 2H ₂ O	226
Sulfito de sódio	Na ₂ SO ₃	221
Sulfito de potássio	K ₂ SO ₃	225
Hidrogenossulfito de potássio	KHSO ₃	228
Hidrogenossulfito de cálcio	Ca(HSO ₃) ₂	227
Hidrogenossulfito de sódio	NaHSO ₃	222

*INS = **International Numbering System** (Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares)

Segundo Pizzoferrato *et al.* [51], o íon sulfito pode reagir por adição com compostos que apresentam grupos carbonílicos, ligações duplas carbono-carbono, quinonas, compostos heterocíclicos nitrogenados ou também por clivagem de ligações dissulfeto (como nas proteínas).

Os sulfitos podem ser encontrados nos alimentos em duas formas distintas: livre ou ligado. Sulfito livre é definido como o dióxido de enxofre que não está associado a nenhum tipo de composto, constituindo uma mistura de dióxido de enxofre (SO₂), íons bissulfito ou hidrogeno sulfito (HSO₃⁻) e sulfito (SO₃²⁻), em um equilíbrio químico dinâmico. Essas espécies são prontamente convertidas a dióxido de enxofre assim que o meio se torna ácido. Já o sulfito ligado, é aquele associado a algum composto que contenha os grupos funcionais acima mencionados, e desta forma, o teor de sulfito total irá corresponder à soma das formas livre e ligada [50].

Os agentes sulfitantes, uma vez incorporados aos alimentos ou bebidas, tornam-se quimicamente equivalentes, e a distribuição das espécies no meio é dependente dos valores de pH [50]. Na Figura 1.6, está ilustrada as porcentagens de cada espécie em relação ao pH, em solução aquosa. O íon hidrogenossulfito é a espécie que predomina entre os pHs 3 e 7; em pHs inferiores a 3 e maiores que 7, as espécies predominantes são o dióxido de enxofre e sulfito, respectivamente [50].

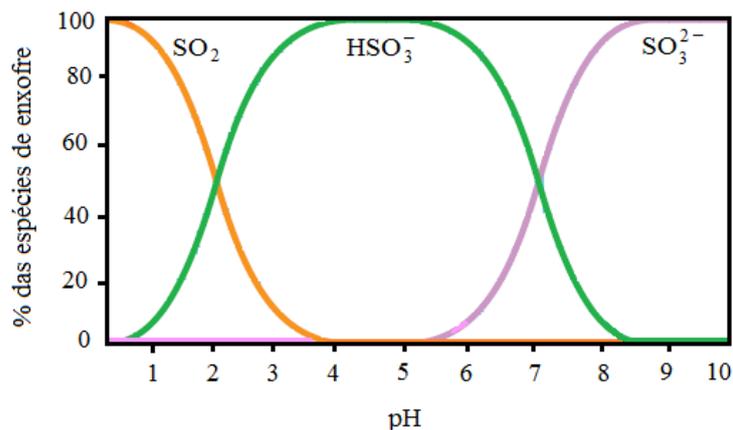
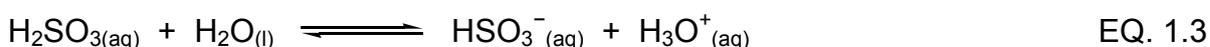
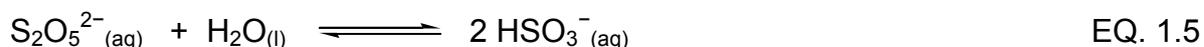


FIGURA 1.6: Distribuição de dióxido de enxofre e das espécies ionizadas de dióxido de enxofre em diferentes pHs.

As equações 1.2 a 1.4 apresentam os equilíbrios químicos envolvidos para as espécies de enxofre que, em meio aquoso, formam ácido sulfuroso (pK_a 1,91 e 7,18), íon hidrogenossulfito e sulfito [52], além da forma molecular, SO_2 :



A espécie metabissulfito ($S_2O_5^{2-}$), quando em solução aquosa, é convertida a hidrogeno sulfito (HSO_3^-) e está representada na Equação 1.5:



Embora largamente utilizado na indústria alimentícia, a ingestão de agentes sulfitantes têm sido associadas a diversas patologias, tais como náusea, irritação gástrica local, urticária e broncoespasmos em indivíduos asmáticos sensíveis [53, 54]. Pessoas com reduzida atividade da enzima sulfito oxidase, responsável por realizar a conversão de sulfito a sulfato, também apresentaram diversos distúrbios neurológicos [50].

O uso de conservantes e outros aditivos alimentares em diferentes países são limitados por leis específicas. No Brasil, estes são fiscalizados e

controlados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que estabelece quais aditivos são permitidos para cada categoria de alimento e também seus limites máximos permitidos, levando-se em conta o efeito esperado no alimento, mas sem oferecer riscos à saúde. O emprego destes compostos segue critérios restritos apoiados em regulamentações e sugestões emitidas a nível mundial por comitês de especialistas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização para Alimentação e Agricultura (FAO), os quais administram o JECFA (Comitê de Especialistas da FAO/OMS em Aditivos Alimentares) [55].

Com base em estudos toxicológicos, o JECFA estabelece a ingestão diária aceitável (IDA) de todos os aditivos, sendo que para os sulfitos, essa ingestão diária aceitável é de 0,7 mg de sulfito por kg de massa corpórea/dia, expressa como SO_2 [50]. Já no Brasil, segundo a Resolução RDC nº 34 da ANVISA, de 09 de março de 2011, o limite máximo de sulfito permitido para a ingestão diária é de 350 mg L^{-1} , expresso como SO_2 [56, 57].

Muitos estudos já foram realizados alertando a respeito do uso excessivo de agentes sulfitantes, especialmente em alimentos que são consumidos *in natura*, como as frutas desidratadas e bebidas alcoólicas. Estes estudos demonstram que muitas pessoas podem ultrapassar a ingestão diária aceitável pelo consumo destes tipos de alimentos [50].

1.9- Métodos para a determinação de sulfito

Diversos métodos já foram desenvolvidos para a determinação deste analito. Muitos utilizam soluções ácidas ou básicas para promover a conversão das várias formas de sulfito a dióxido de enxofre. O procedimento de Monier-Williams foi um dos primeiros procedimentos adotados para a determinação de sulfitos em alimentos e bebidas, e é baseado na separação do dióxido de enxofre da matriz alimentar por aquecimento com ácido clorídrico. Uma vez liberado, o dióxido de enxofre é coletado em uma solução de peróxido de hidrogênio, e em seguida oxidado a ácido sulfúrico. Posteriormente, o ácido é titulado com uma solução de hidróxido de sódio. A quantidade de ácido sulfúrico gerada na reação é proporcional à concentração de dióxido de enxofre na amostra. Esta determinação quantifica sulfitos totais, correspondendo ao sulfito livre mais uma fração dos sulfitos ligados [50].

No Brasil, principalmente nas indústrias de vinho, a titulação iodométrica, baseada no método de Ripper, para a quantificação de sulfitos totais (livre e ligado) em bebidas, é o método mais comumente utilizado [58]. No entanto, é um método que apresenta baixa precisão e sendo susceptível a erros sistemáticos [59]. A maior dificuldade na obtenção de bons resultados por este método está na interpretação do ponto de viragem para amostras de vinho tinto, pois este produto apresenta variações nas cores e a presença de adutos formados pela ligação entre as antocianinas e os íons hidrogenossulfito dificultam a obtenção de resultados com apreciável exatidão. Para contornar este problema analítico, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector eletroquímico foi implantada em algumas indústrias para a determinação de SO_2 total em vinhos [50] e assim minimizar os erros nas análises.

Anderson *et al.* [60], propuseram um método para determinar sulfitos (SO_2 e SO_3^{2-}) em alimentos, baseado na extração com ácido fosfórico e análise por cromatografia iônica com detector eletroquímico. Os resultados obtidos são concordantes com aqueles empregando o método de Monier-Williams para uma variedade de matrizes. A cromatografia iônica ofereceu alta velocidade, maior sensibilidade e baixo custo, sendo uma alternativa às técnicas convencionais para a determinação de sulfito em alimentos.

Pizzoferrato *et al.* [61] propuseram um procedimento de Monier-Williams modificado empregando-se a técnica de HPLC para a detecção de sulfitos em diversas matrizes alimentícias. O SO_2 foi coletado, oxidado a sulfato com peróxido de hidrogênio, e neutralizado com hidróxido de sódio. As soluções neutralizadas foram diluídas e injetadas num aparelho de HPLC constituída de uma coluna de troca aniônica. A eluição se deu com uma solução de hidrogenoftalato de potássio ($0,15 \text{ g L}^{-1}$; pH 5,7) a uma taxa de 3 mL/min e detecção espectrofotométrica (UV-vis), a 280 nm . Este método foi comparado com o método de Monier-Williams, e apresentou bom limite de detecção e resolução cromatográfica elevada, evitando assim a interferências de outros compostos voláteis.

Safavi & Ensafi [62] desenvolveram um método empregando um sistema em fluxo para determinação de sulfito. O procedimento foi baseado na reação de adição entre o sulfito com verde brilhante, em pH 7 e a 25°C . A reação é monitorada espectrofotometricamente e mede a diminuição da absorbância do corante a 615 nm . A diminuição da absorbância se deve ao descoramento do

corante, passando de azul (forma +R, solução neutra) para incolor (solução alcalina), devido à presença do sulfito (um nucleófilo). O limite de detecção foi de 5 ng/ml de sulfito, e desvio padrão relativo de 1%.

Corbo & Bertotti [63] propuseram um método por injeção em fluxo (FIA) para a quantificação de sulfito em bebidas alcoólicas e não alcoólicas. O método é baseado na detecção amperométrica (0,60 V vs Ag/AgCl (NaCl_{sat})) do analito numa superfície de cobre em meio alcalino (solução 1 mol L⁻¹ de NaOH), após passar por uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE). Assim como o sulfito, o etanol, presente nas bebidas alcoólicas, também é eletroativo e permeia através da membrana. Desta forma, num primeiro momento, apenas o etanol foi medido, a partir da manipulação do pH, restringindo a passagem do sulfito pela membrana hidrofóbica (condição alcalina). Isto foi possível através da operação em condições alcalinas (NaOH 1 mol L⁻¹), em que S (IV) existe como o ânion sulfito (SO₃²⁻), e não permeia através da membrana de PTFE. Em seguida, trabalhou-se com uma solução de H₂SO₄ 1 mol L⁻¹, como doador de prótons, no qual tanto o sulfito quanto o etanol são oxidados. Desta forma, foi realizada a medida de ambos, etanol e sulfito juntos, no eletrodo de cobre (0,40 V vs. Ag/AgCl (NaCl_{Sat.})), sendo a concentração de sulfito determinada pela diferença. A repetibilidade da resposta do eletrodo nesta configuração FIA foi avaliada como 4% (n = 20), o limite de detecção do método foi de 0,04 mmol L⁻¹ (S/N = 3) e a frequência de amostragem foi de 50 h⁻¹.

Rawal & Pundir *et al.* [64] propuseram um biossensor para a determinação de sulfito em vinhos branco, tinto e rosé. A enzima sulfito oxidase purificada das folhas de jabolão (*Syzygium cumini*) foi imobilizada junto a nano partículas de azul da Prússia/polipirrolina (PBNPs/PPY), formando um filme eletrodepositado na superfície de um eletrodo de ouro. O biossensor apresentou uma ótima resposta dentro de 2 s, quando operado a 20 mV s⁻¹, em tampão Tris-HCl, 0,1 mol L⁻¹, pH 8,0, mantido a uma temperatura de 30°C. A curva analítica foi linear de 0,5 a 1.000 µmol L⁻¹ e o limite de detecção foi de 0,1 µmol L⁻¹ (S/N = 3). O percentual de sulfito recuperado ficou em torno de 95,0 %. Quando armazenado em baixas temperaturas (4°C), o eletrodo pôde ser utilizado por 300 vezes, num período de quatro meses.

Sartori *et al.* [65] determinaram sulfito em vinhos branco e tinto usando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro em um filme de poli(cloridrato de alilamina). Esta abordagem

fornece um método eficiente para imobilizar polifenol oxidase (PPO) obtida a partir do extrato bruto de batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). O método é baseado no efeito inibitório de sulfito na atividade da PPO. Sendo assim, a determinação de sulfito ocorreu de forma indireta. A técnica utilizada foi voltametria de pulso diferencial e a curva analítica foi linear de 0,5 a 22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um limite de detecção de 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos com o biossensor estiveram de acordo com os obtidos com o método de referência – iodométrico – com um nível de confiança de 95%.

Capítulo 2 - OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais

Desenvolver métodos analíticos simples, rápidos e de baixo custo, que possibilite a determinação *in situ* de alguns analitos de interesse alimentício. Neste método também deverá ser minimizado o consumo de reagentes químicos, contribuindo assim, com o meio ambiente, por envolver procedimentos em química verde com perspectivas sustentáveis.

2.2- Objetivos específicos

– Testar a aplicabilidade de um *software* livre no tratamento das imagens obtidas e correlacionar estes dados com a concentração de etanol e sulfito em amostras alimentícias.

– Comparar os resultados do método proposto com os de referência a fim de verificar sua eficiência quanto à exatidão, precisão e outros parâmetros analíticos de desempenho.

Capítulo 3 – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1- Calibração do sistema

O sistema proposto (caixa com iluminação interna controlada e o emprego de um *software* para o tratamento das imagens) foi calibrado utilizando os corantes PA: Azul de Comassie brilhante – Azul Brilhante (Vetec[®]), Amarantho (Aldrich Chemical Company, Inc. [®]) e Tartrazina (Sigma Aldrich[®]), os quais foram preparados por dissolução e posterior diluição em água deionizada. As especificações das câmeras/celulares utilizados estão apresentadas na Tabela 3.1.

TABELA 3.1: Especificações de cada câmera utilizada na captura das imagens das soluções reagentes

Modelo / Marca	Resolução em Megapixel (MP)
Cyber-shot / Sony (Câmera digital 1)	12.0
DSC-W50 / Sony (Câmera digital 2)	6.0
FinePixA500 / Fujifilm (Câmera digital 3)	5.1
GT-C6112 / Samsung (Câmera digital 4)	2.0
Q9 / Aony* (Câmera digital 5)	0.3

* Padrão VGA (*Video Graphics Array*) – máxima resolução = 640 × 480 pixels

3.1.1- Determinação de Etanol

A solução de dicromato de potássio PA (Synth[®]) 0,05 mol L⁻¹ foi preparada por dissolução do sal em água deionizada.

O ácido sulfúrico PA, 95- 98 % (Qhemis[®]) foi utilizado diretamente na forma concentrada, 18 mol L⁻¹.

As soluções padrões de etanol foram preparadas diluindo etanol absoluto PA (Qhemis[®]) em água deionizada.

As amostras de bebidas alcoólicas e de álcool comercial foram obtidas no comércio da cidade de São Carlos – SP. Algumas foram analisadas diretamente, e outras foram diluídas com água deionizada para adequação na curva analítica. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Estas amostras estão apresentadas na Tabela 3.2.

TABELA 3.2: Amostras de bebidas utilizadas para a determinação de etanol

Cerveja (A ₁)	Álcool comercial (D ₁)
Vinho branco (B ₁)	Vodka (E ₁)
Vinho branco (C ₁)	Cachaça (F ₁)

3.1.2- Determinação de Sulfito

A solução de Fe³⁺ 0,05 mol L⁻¹ – a partir de nitrato de ferro (III) nonahidratado (Merck[®]) – foi preparada dissolvendo o sal em uma solução de ácido sulfúrico PA, 95-98 % (Qhemis[®]) 0,5 mol L⁻¹.

A solução de 1,10-fenantrolina 0,05 mol L⁻¹, assim como as soluções padrões de sulfito de sódio anidro, 98 %, P.A. (ambos Synth[®]) foram preparadas em tampão de ácido acético/acetato (ambos Vetec[®]), pH 4,5. As soluções padrões de sulfito de sódio foram preparadas diariamente, sempre evitando exposição ao ar para prevenir sua oxidação. A concentração real da solução foi determinada adicionando-se um excesso de iodo e realizando uma titulação de retorno com solução padrão de tiosulfato de sódio PA.

As amostras utilizadas foram obtidas no comércio da cidade de São Carlos – SP. Algumas foram analisadas diretamente, e outras foram diluídas com água deionizada para adequação na curva de calibração. Estas amostras estão apresentadas na Tabela (3.3).

TABELA 3.3: Amostras selecionadas para a determinação de sulfito

Vinho branco (A ₂)	Vinho rosé (D ₂)
Vinagre de álcool (B ₂)	Suco de caju concentrado (E ₂)
Água de coco (C ₂)	Suco de caju pronto para beber (F ₂)

3.1.3- Equipamentos utilizados

Um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-vis 2550 com duplo feixe e cubeta de quartzo de 1 cm foi utilizado no método comparativo para a determinação de etanol.

Para sulfito, foi realizado titulação iodométrica como método comparativo, na qual foram utilizados basicamente, buretas e Erlenmeyers.

No mais, para ambos os métodos, foram utilizados apenas vidrarias simples de laboratório, entre as quais, uma placa de porcelana (toque), para realizar as reações de *spot test*.

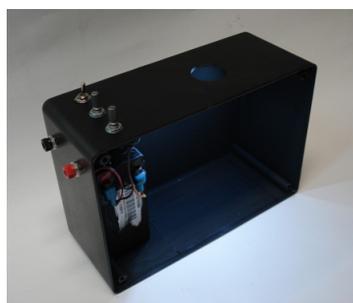
Micropipetas Eppendorf automáticas de volumes variáveis foram utilizadas para garantir a transferência de volumes precisos dos reagentes na placa de porcelana.

Uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D, com precisão de $\pm 0,01$ mg foi utilizada na medição das massas dos reagentes.

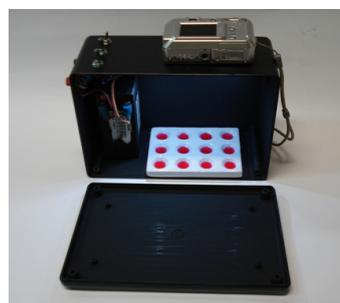
Cinco diferentes câmeras digitais, incluindo as câmeras de dois telefones celulares (Tabela 3.1), foram utilizadas para o procedimento de calibração do sistema, sendo que para as determinações dos analitos propostos, etanol e sulfito, foi utilizada apenas uma destas câmeras.

3.1.4- Desenvolvimento do aparato para aquisição das imagens

Foi construído um dispositivo para acondicionar uma placa de porcelana (toque) e uma câmera digital para capturar as imagens das cores desenvolvidas nas reações químicas entre o analito e o reagente dos métodos propostos, como mostrado na Figura 3.1. O uso deste aparato teve o objetivo de evitar saturações (excesso de brilho) ou sombra, em um ambiente com luminosidade controlada.



(A)



(B)

FIGURA 3.1: Sistema usado na captura das imagens: visão lateral mostrando os detalhes da caixa (A); visão frontal, mostrando a placa de porcelana com a câmera digital acoplada no topo (B).

O dispositivo de captura de imagens é, basicamente, uma caixa plástica na cor preta de dimensões 21 × 15 × 7 cm, composta de uma bateria (Unipower, 12 V de 1,3 ampères/ hora); quatro LEDs (*Light Emitting Diodes*) de luz branca (Bluex, 12 V) de 20 a 100 mA (ultra brilho) com controle de intensidade (potenciômetro); chave de liga/desliga e conectores para acoplar um carregador de bateria de 12 V.

No interior da caixa, há espaço suficiente para acomodar uma placa de porcelana de 12 cavidades (poços); e na parte superior há uma abertura circular para acomodar a objetiva (lente) de uma câmera fotográfica digital convencional.

A reação ocorre na placa, fora ou dentro da caixa, a qual é devidamente fechada. A câmera digital é acoplada no topo, de onde são capturadas as imagens, e em seguida estas imagens são transferidas a um microcomputador via cabo USB ou cartão de memória, e posteriormente analisadas (Figura 3.2). Para o tratamento das imagens foi usado um *software* comercial livre chamado ImageJ [66], além dos programas Excel 2007 e Origin 6.0™.



FIGURA 3.2: Sistema utilizado na captura e tratamento das imagens.

3.1.5- Otimização dos parâmetros operacionais

Estudou-se a quantidade dos LEDs, sua melhor disposição na parte superior interna da caixa, e distância destes à placa de porcelana, assim como a intensidade da luz incidente sobre a mesma e o volume de solução em cada cavidade da placa. Para minimizar ainda mais os efeitos de saturação (excesso de brilho devido a maior incidência da luz), a parte interna da caixa recebeu uma cobertura de tinta preta fosca. Desta forma, garantiu-se um ambiente mais homogêneo, com minimização de reflexos, gerando assim, menor interferência.

Foram realizados tratamentos matemáticos utilizando os parâmetros de média e moda (dados obtidos pelo *software* ImageJ), para verificar qual parâmetro apresentava uma melhor resposta, levando-se em conta fatores como inclinação da curva analítica (sensibilidade analítica) e desvio padrão.

Também foram selecionados diferentes tamanhos de área ($w \times h$) das imagens para verificar se haveria interferência nos resultados obtidos.

Diferentes regiões da imagem foram selecionadas pelo *software* ImageJ, sendo escolhidas regiões com e sem brilho (maior e menor incidência da luz dos LEDs, respectivamente) a fim de verificar variações nos valores de RGB.

Todos estes parâmetros foram estudados utilizando cinco diferentes câmeras digitais, incluindo as câmeras de dois telefones celulares. As especificações de cada câmera estão listadas na Tabela 3.1.

3.1.6- Procedimento para calibração do sistema

O sistema proposto foi ajustado de modo a responder de forma eficiente às determinações analíticas. Assim, a calibração permitiu verificar o comportamento dos corantes frente às variações das concentrações, ou seja, como o sistema estava respondendo, de modo a garantir a reprodutibilidade e precisão das medidas, sendo, por isso, ajustados diversos parâmetros.

A calibração foi realizada utilizando os corantes: Azul de Comassie Brilhante; Amaranto e Tartrazina, cujas principais características podem ser vistas na Tabela 3.4.

TABELA 3.4: Características dos corantes utilizados para a calibração do sistema [18]

Corante Utilizado	Cor Complementar	Cor Absorvida	Intervalo de comprimento de onda (nm)
Azul Brilhante	Azul Esverdeado	Vermelho (R)	605 – 700
Amaranto	Vermelho	Verde (G)	500 – 560
Tartrazina	Amarelo	Azul (B)	435 – 480

Curvas analíticas explorando as faixas lineares de calibração foram obtidas para avaliar a variabilidade dos valores médios de R, G e B, bem como

testes de repetibilidade e precisão. Foi necessária a obtenção de três curvas analíticas, sendo a primeira de caráter exploratório, verificando regiões de maior linearidade e sensibilidade (inclinação da curva analítica); sendo as demais otimizadas, quanto às faixas lineares e sensibilidades analíticas, trabalhando com regiões cada vez menores até a obtenção de uma região linear com um número significativo de pontos, neste caso, até a terceira calibração.

Os intervalos de concentração em quantidade de matéria por litro (mol L^{-1}) para cada corante na calibração do sistema podem ser vistos na Tabela 3.5.

TABELA 3.5: Curvas analíticas (mol L^{-1}) obtidas para cada um dos corantes na calibração do sistema

Calibração	Intervalo de concentração em quantidade de matéria por litro (mol L^{-1}) para cada corante
Primeira	$1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-2}$
Segunda	$1,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4}$
Terceira	$1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$

Para calibrar o sistema, primeiramente foi preparada uma solução de cada corante, a qual foi diluída com água deionizada, de acordo com a Tabela 3.3. Uma vez realizada as diluições, estas soluções foram adicionadas nas cavidades da placa de porcelana, partindo da solução mais concentrada para a mais diluída, até o volume total de cada cavidade da placa ($800 \mu\text{L}$). A última cavidade da placa foi preenchida com água destilada (branco), sendo a partir desta obtidos os valores em unidades arbitrárias.

Após a adição das soluções na placa de porcelana, esta era levada à caixa, e uma única imagem capturada.

O procedimento acima descrito – diluição das soluções, adição na placa de porcelana e captura da imagem – foi realizado em triplicata para cada corante, sendo as imagens capturadas com as cinco câmeras descritas na Tabela 3.1. Para cada procedimento de diluição, uma única imagem era capturada. Após a captura, as imagens eram transferidas ao microcomputador via cabo USB.

As imagens das placas com as respectivas soluções dos corantes azul brilhante, amaranto e tartrazina, no intervalo de concentração em quantidade de matéria por litro (mol L^{-1}) de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ (terceira calibração), podem ser vistas na Figura 3.3.

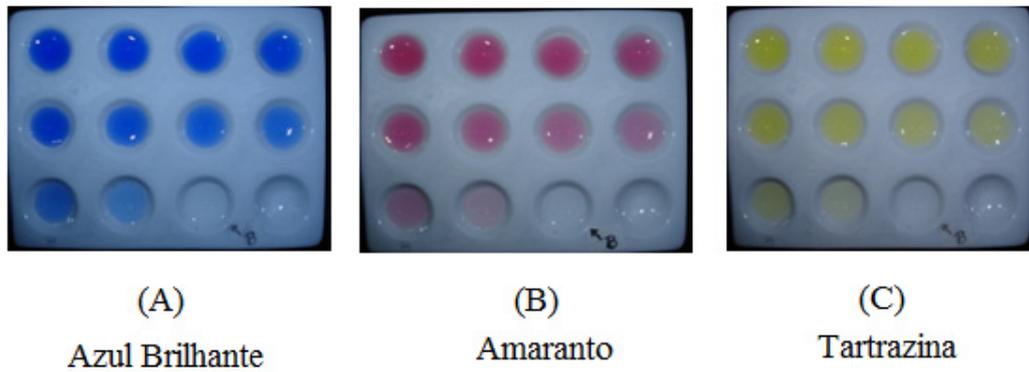


FIGURA 3.3: Imagens obtidas de cada corante na placa de porcelana, no intervalo de concentração em quantidade de matéria por litro (mol L^{-1}) de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ (terceira calibração)

No tratamento das imagens empregando-se o *software* comercial, foi empregada a primeira imagem capturada (primeira diluição), a qual foi tratada em triplicata. Em seguida, a segunda e terceira imagens (segunda e terceira diluição, respectivamente) foram tratadas apenas uma vez cada. Para o tratamento das imagens, seguiram-se os seguintes passos:

- Abriu-se o programa.
- Em *File* → *Open*, uma janela foi aberta para a escolha de uma imagem do arquivo desejado.
- Escolhida a imagem, o tamanho de área desejado ($w \times h = 32 \times 26$) foi selecionado.

Em *Analyze* → *Tools* → *Color Histograms*, foram obtidos os valores (*results*) da média, moda e desvio padrão de cada canal R, G e B da área selecionada, e também um histograma mostrando a região de máxima absorção de cada canal, variando de 0 (máxima absorção) a 255 (mínima absorção). Estes dados podem ser observados na Figura 3.4, em que foi utilizado o corante Amaranato na faixa de concentração em mol L^{-1} de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ (terceira calibração). A figura mostra os dados da área selecionada, da primeira cavidade da placa de porcelana ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

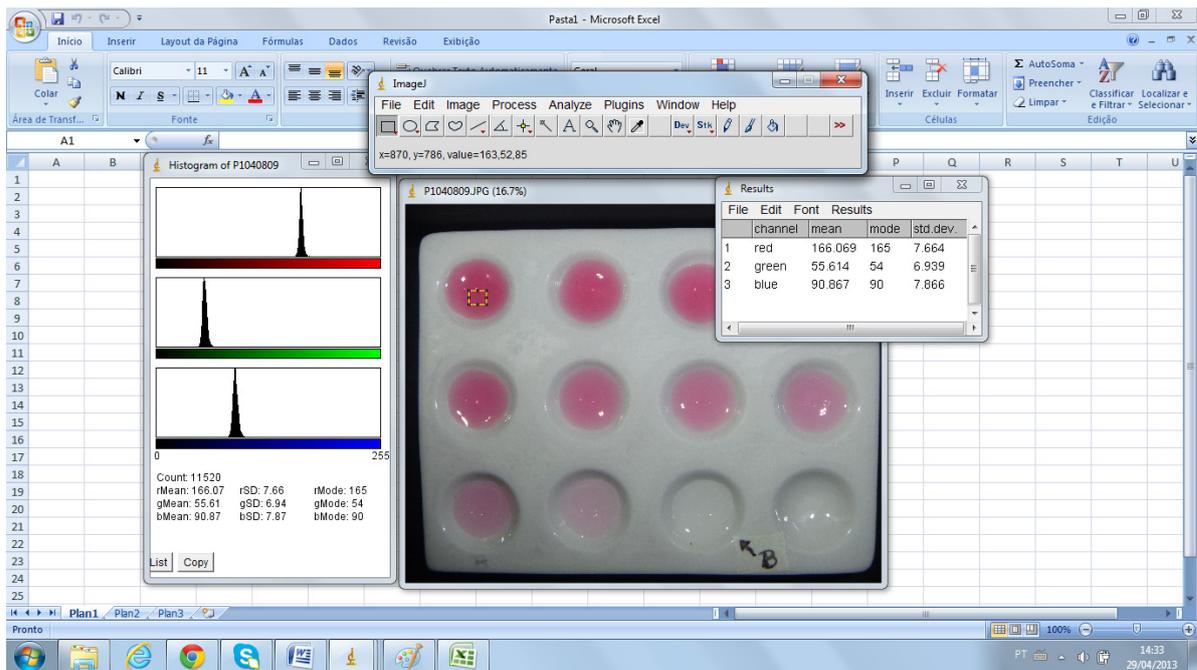


FIGURA 3.4: Imagem do *software* ImageJ aberto, mostrando os dados obtidos da área selecionada da primeira cavidade da placa de porcelana ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), do corante Amaranth na faixa de concentração em mol L^{-1} de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ (terceira calibração); o histograma obtido e os resultados numéricos de RGB (canal, média, moda e desvio padrão).

- Em *Edit* → *Copy*, era possível copiar estes resultados (média, moda e desvio padrão) e transferi-los ao Excel, onde os dados numéricos da cor absorvida (vermelho (R), verde (G) ou azul (B)) eram tratados.

- No Excel calculou-se a média dos valores de $-\log(I/I_0)$, para cada canal (RGB), assim como os valores de desvio padrão e desvio padrão relativo. No programa Origin™, apenas por comodidade, foram gerados os gráfico de $-\log(I/I_0)$ vs. concentração de cada corante (mol L^{-1}).

A equação logarítmica usada é análoga àquela empregada no cálculo de transmitância utilizado em colorimetria. Contudo, neste caso, como é utilizada uma imagem digital, tem-se uma medida da cor complementar associada à refletância da luz incidente, onde I_0 é o sinal de RGB do branco, que neste caso é água destilada; e I é o sinal de RGB para uma dada concentração do corante [67].

Para a determinação dos analitos propostos, etanol e sulfito, I_0 é, também, o sinal de RGB do branco, mas neste caso, tem-se toda a composição da matriz da amostra, exceto o analito; e I é o sinal de RGB para uma dada concentração destes analitos (na curva de calibração).

3.1.7- Avaliação do procedimento de calibração do sistema

Para avaliar a precisão dos procedimentos de preparo das soluções e do tratamento dos dados analíticos, três procedimentos idênticos de diluição foram realizados e imagem de cada procedimento foi capturada.

Para esta avaliação, escolheram-se duas imagens, sendo uma capturada com a câmera de maior resolução (Câmera 1 = 12 MP), e outra com a câmera de menor resolução (Câmera 5 = 0.3 MP). De cada imagem, foram selecionadas, aleatoriamente, três diferentes concentrações para realizar o tratamento. Então, as imagens foram devidamente selecionadas com o auxílio do programa ImageJ e determinados seus respectivos valores de RGB para cada corante e, em seguida, estes valores foram convertidos em $-\log(I/I_0)$.

3.2- Método analítico para a quantificação dos analitos

A partir de testes preliminares com algumas amostras e também a partir dos resultados obtidos no processo de calibração do procedimento analítico e do sistema de obtenção das imagens, observou-se que os resultados obtidos sofreram pouca influência quanto à resolução da câmera utilizada. O parâmetro sensibilidade, o qual esta correlacionada com a resolução das câmeras não foi muito crítico, uma vez que as concentrações dos analitos nas amostras eram relativamente altas, e as absorvidades dos compostos eram elevadas levando a sensibilidades analíticas satisfatórias com todas as câmeras empregadas. De fato, com uma câmera de 12 MP apresentando uma resolução 40 vezes melhor que uma de 0,3 MP, resultados satisfatórios foram encontrados para ambas. No apêndice A, é possível fazer esta verificação por meio de gráficos de regressão, em que foram usadas as cinco diferentes câmeras para monitorar o canal de máxima absorção de cada corante, a partir dos dados da terceira calibração.

Sendo assim, para a determinação dos analitos propostos, optou-se por utilizar apenas uma das câmeras digitais, sendo a Câmera Sony DSC-W50 6.0MP (Câmera 2) pois, além dos resultados obtidos serem independentes da resolução, esta era a câmera mais facilmente disponível.

3.2.1- Determinação do teor de etanol

Para a determinação do teor de etanol, foram selecionadas seis diferentes amostras de bebidas alcoólicas e uma de álcool comercial, de acordo com a Tabela 3.2. A reação utilizada foi a de redução do dicromato de potássio em meio ácido [68], como descrita na equação 3.1:



A reação se processa em meio ácido, o qual é capaz de levar à redução do íon Cr (VI) (laranja) a Cr (III) (verde) ou a Cr (II) (azul), ao mesmo tempo em que oxida o etanol a aldeído acético.

Esta reação evolui com o tempo e, dependendo da concentração de etanol e do tipo de ácido, o íon Cr (IV) passa rapidamente para Cr (II), o que pode ser observado pela mudança da cor laranja para azul.

Esta é a mesma reação utilizada nos bafômetros mais simples, descartáveis, os quais utilizam uma mistura de dicromato de potássio e sílica, umedecidos com ácido sulfúrico. A detecção da embriaguez por esse instrumento é visual, sendo a coloração inicial amarelo-alaranjada, devido ao dicromato, e ao final é verde-azulada, devido a mistura de Cr (III) e Cr (II) [68].

3.2.2- Parâmetros estudados para a determinação de etanol

Os testes iniciais foram realizados com gotas, utilizando pipetas *Pasteur* de vidro. Nesta fase foi estudada a proporção em volume de cada solução reagente que deveria ser adicionada nas cavidades da placa de porcelana a fim de se obter uma escala de cores, essencial para uma análise rápida e semi-quantitativa do tipo *screening*. Após estes testes, os volumes foram aferidos com pipetas automáticas para melhor precisão e exatidão na transferência dos volumes.

Após as soluções reagentes serem adicionadas na placa de porcelana, cada cavidade era agitada com um bastão de vidro (lavagem do bastão com água deionizada entre uma cavidade e outra) e aguardado o tempo necessário para ocorrer a reação, sendo em seguida capturada a imagem.

Nos teste iniciais, optou-se por utilizar o ácido sulfúrico concentrado; no entanto, outros ácidos também foram testados. Estes incluíram:

- Solução de água régia (mistura de ácido clorídrico com ácido nítrico, na proporção de 3:1, respectivamente);
- Solução piranha (mistura de ácido sulfúrico com peróxido de hidrogênio na proporção de 3:1, respectivamente);
- Ácido nítrico concentrado;
- Ácido clorídrico concentrado.

Foram estudadas diferentes concentrações de dicromato de potássio, sendo: 0,5; 0,1; 0,05 e 0,02 mol L⁻¹.

Como a reação evolui com o tempo (variando a cor da solução), os seguintes tempos foram estudados: 2, 4, 6, 10, 12, 14 e 15 minutos. Nesta etapa, o objetivo era realizar a reação no menor tempo possível e com a máxima sensibilidade, assim como obter uma escala de cores para possibilitar, num primeiro momento, uma análise *screening*.

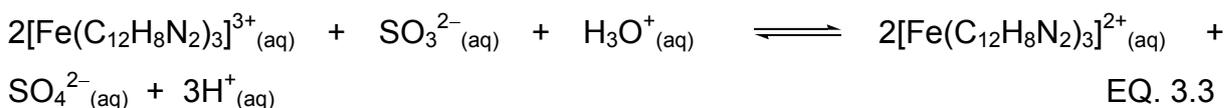
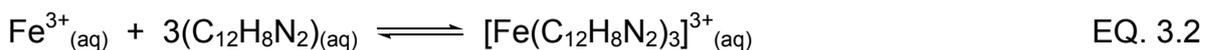
3.2.3- Método de referência para etanol

O método de referência para etanol foi o espectrofotométrico [39]. Neste caso, empregou-se a mesma reação utilizada na placa de toque. Após o preparo da reação de modo similar, estas necessitaram ser diluídas convenientemente antes de serem analisadas no espectrofotômetro.

Para o cálculo do teor de etanol, utilizou-se o comprimento de onda de maior absorção do dicromato, em aproximadamente 350 nm – região do UV. Assim, o método foi empregado analisando-se o desvanecimento da cor da solução de dicromato, haja vista que a coloração amarela diminuía, enquanto as cores verdes e azuis se sobrepunham, conforme o aumento no teor de etanol.

3.3- Determinação de sulfito (expresso em mg de SO₂/L)

Para a determinação de sulfito, foram selecionadas 6 diferentes amostras, de acordo com a Tabela 3.3. A reação utilizada foi a de Fe (III) com 1,10-fenantrolina (C₁₂H₈N₂), de acordo com as equações 3.2 e 3.3:



Nesta reação, a 1,10-fenantrolina reage com o Fe (III) formando o complexo $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{3+}$ que é incolor. Assim que SO_3^{2-} é adicionado, este reduz os íons Fe (III) à Fe (II), formando o complexo $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$ de cor vermelha, que pode ser monitorado em 500 nm [69].

Durante a reação, os íons sulfito (SO_3^{2-}) passam a sulfato (SO_4^{2-}). O estado de oxidação do enxofre passa de +4 para +6 (2 elétrons envolvidos), e o complexo de ferro com fenantrolina passa de +3 para +2 (um elétron envolvido). Desta forma, têm-se uma estequiometria de 1 para 2.

A reação foi realizada em meio ácido, utilizando solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para preparar a solução de Fe (III). Um meio tamponante de ácido acético/acetato pH 4,5, foi usado na preparação da curva padrão de sulfito e na preparação da solução de 1,10-fenantrolina, com o objetivo de garantir a estabilidade das espécies participantes da reação, e evitar a redução dos íons Fe (III) a Fe (II), e sua posterior hidrólise.

3.3.1- Parâmetros estudados para a determinação de sulfito

Como a reação ocorreu em meio ácido, testou-se um tampão de ácido acético/acetato em diferentes pHs, sendo 3,5; 4,5 e 5,5, para preparar as soluções padrões de sulfito e de 1,10-fenantrolina.

Diferentes concentrações dos ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico foram utilizadas para preparar a solução de $\text{Fe}^{3+} 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, as quais foram devidamente testadas na reação.

Assim como na reação para determinação de etanol, a reação para determinação de sulfito também evolui com o tempo, intensificando a cor da solução. Assim, os seguintes tempos de reação foram estudados: 3, 5, 10 e 15 minutos.

O volume ideal de cada solução reagente, em cada cavidade da placa de porcelana, também foi ajustado para esta reação, de modo a resultar numa escala de cores, útil para análises *screening*.

3.3.2- Método de referência para sulfito

O método de referência utilizado para determinar sulfito foi a iodimetria [70] – método direto de titulação com iodo. Procedeu-se com a titulação direta do analito (agente redutor) por uma solução padrão de iodo em iodeto de potássio, usando suspensão de amido como indicador redox. A presença de íons iodeto permitiu a formação de um complexo de amido-iodo de cor azul intensa, indicando o ponto estequiométrico na titulação.

Com os dados obtidos, calculou-se a concentração de sulfito nas amostras, expressando os resultados em termos de mg de SO₂/L.

Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Otimização dos parâmetros operacionais

Os LEDs foram testados em algumas configurações e/ou disposições, assim como a sua quantidade. Note que cada LED é constituído por outros quatro LEDs acoplados ao mesmo. O número de LEDs e a configuração adotada é descrita na Figura 4.1.

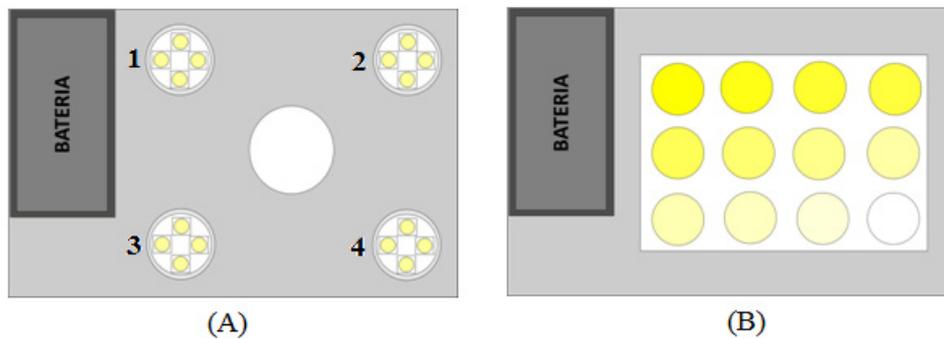


FIGURA 4.1: Representação ilustrativa do interior da caixa para obtenção das imagens: quantidade e disposição dos LEDs na parte superior interna, numerados de 1 a 4 (A); placa de porcelana acondicionada no fundo da caixa (B).

O volume ideal para cada cavidade da placa foi ajustado para 800 μ L, e desta forma os fenômenos relacionados com excesso de brilho ou sombra foram amenizados, e as imagens obtidas apresentaram região homogênea maior, facilitando a seleção da área a ser analisada via software.

Quando empregado os valores de média ou moda de cada canal R, G e B, não foi observado variações dos resultados obtidos quando qualquer destes métodos, média ou moda, foram utilizados. O tamanho da área selecionada das imagens ($w \times h$) também não alterou os dados obtidos, desde que esta fosse mantida constante para todos os experimentos realizados.

No entanto, foi observado que a seleção de diferentes regiões da imagem (da mesma cavidade da placa de porcelana), alterou significativamente os valores encontrados. Observou-se que, uma vez selecionadas as regiões com mais brilho, como por exemplo, a imagem de emissão do LED na cavidade (como se fosse sua imagem especular), estas apresentaram valores de RGB maiores que as regiões sem brilho. Da mesma forma, as regiões com alguma sombra, apresentaram valores de RGB menores. Para minimizar estes efeitos, uma calibração minuciosa foi

realizada empregando-se os reguladores de potência de cada LED (potenciômetros), e também a melhor disposição destes, para homogeneização da iluminação interna, evitando a incidência direta de luz nas cavidades da placa de porcelana e, desta forma, padronizando a iluminação interna.

O *flash* das câmeras foi desnecessário, como forma de diminuir a dependência da qualidade e da configuração da câmera utilizada. Mesmo com esses cuidados, evitou-se a seleção destas áreas, a fim de se obter pixels mais representativos, em termos dos valores de RGB. É interessante observar que a iluminação artificial a base de LEDs é importante no caso de alguns modelos de câmeras de celulares ou de *webcams*, os quais, não possuem *flash*. Além disso, esta iluminação é importante por manter um padrão nas fotografias, seja em qualquer ambiente, ou horário do dia, conferindo maior portabilidade ao método digital desenvolvido.

Na Figura 4.2 são mostradas duas regiões diferentes, selecionadas de uma mesma imagem, obtida de uma solução do corante amarantho $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (primeira cavidade da placa).

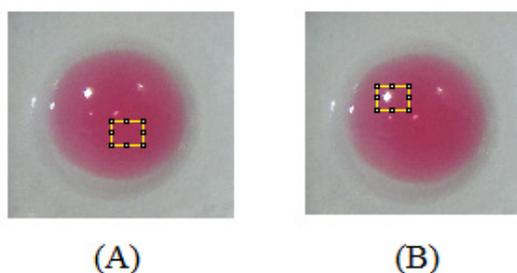


FIGURA 4.2: Diferentes regiões selecionadas de uma mesma imagem do corante amarantho $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (primeira cavidade da placa), mostrando a seleção de uma região sem brilho (A); e de uma região com brilho (B).

Na Tabela 4.1, é possível observar a variação nos valores de RGB deste corante nestas condições. Como o corante é vermelho, sua cor complementar é verde (G). Quando selecionada a região com brilho, não apenas o valor de G, mas também os de R e de B aumentaram, indicando uma menor absorção dos três canais (cores vermelha, verde e azul).

TABELA 4.1: Resultados de média, moda e desvio padrão (SD) dos canais RGB da mesma imagem, da seleção de áreas sem brilho e com brilho, obtidas do corante amarantho $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 4.2).

Região sem brilho				Região com brilho			
Canal	Média	Moda	SD	Canal	Média	Moda	SD
R	162	163	2	R	171	165	21
G	55	54	2	G	88	85	43
B	89	89	2	B	119	110	36

Pelos resultados apresentados na Tabela 4.1. observou-se que a seleção da região com brilho, conduziu a valores de RGB mais próximos dos valores do branco (255) como discutido anteriormente. Assim evitou-se selecionar estas regiões das imagens capturadas em todos os ensaios realizados.

Quanto aos estudos das diferentes resoluções em pixels das câmeras, estes revelaram que a resolução não é um parâmetro essencial na obtenção de resultados exatos e precisos, os quais sofreram pouca influência quando diferentes câmeras foram utilizadas, mesmo quando confrontadas as câmeras 1 e 5 (12.0MP e 0.3MP, respectivamente). Os resultados foram similares, indicando a não necessidade de uma máquina com alta resolução (e, conseqüentemente, com alto valor comercial) para realizar a captura das imagens. Essas observações podem ser confirmadas a partir dos gráficos de regressão dos três corantes, listados no Apêndice A, em que foram utilizadas as cinco câmeras para capturar as imagens, a partir dos dados da terceira calibração. De fato, mesmo a câmera 1 com uma resolução 40 vezes melhor que a câmera 5, as sensibilidades analíticas obtidas não aumentaram na mesma ordem de grandeza.

4.1.1- Calibração do sistema

Num primeiro momento, foram monitorados os três canais, R, G e B, para cada solução de corante. Neste ponto, pôde-se observar qual dos canais respondia linearmente com a concentração. Após este estudo, focou-se no canal cuja absorção era máxima para cada solução do corante, sendo monitorado o canal R para azul brilhante, o canal G para amarantho, e o canal B para o tartrazina, medindo-se os valores de RGB da cor complementar associada à refletância da radiação incidente. Os gráficos de regressão dos canais R, G e B de cada corante

nas faixas de concentração em quantidade de matéria por litro (mol L^{-1}) de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ (terceira calibração) podem ser vistos no Apêndice A, cujas imagens foram capturadas com as cinco câmeras digitais.

A intensidade da cor complementar para cada corante nas diferentes concentrações produziram dados que obedecem a uma relação linear.

4.1.2- Avaliação do procedimento de calibração do sistema

Avaliou-se a precisão do procedimento e do tratamento dos dados analíticos, assim como a repetibilidade do método de diluição dos corantes. Na Tabela 4.2 é possível verificar a precisão do método a partir dos valores de desvio padrão (SD) e de desvio padrão relativo (RSD).

TABELA 4.2: Valores de média, desvio padrão (SD) e desvio padrão relativo (RSD) do tratamento das imagens, utilizando a Câmera 1 e a Câmera 5.

Câmera 1			Câmera 5		
Corante amarantho (canal G)			Corante amarantho (canal G)		
Média	SD	RSD	Média	SD	RSD
0,456	0,002	0,439	0,629	0,003	0,477
0,297	0,002	0,763	0,404	0,004	0,990
0,1717	0,0005	0,2912	0,233	0,001	0,430
Corante azul brilhante (canal R)			Corante azul brilhante (canal R)		
Média	SD	RSD	Média	SD	RSD
1,34	0,010	0,75	2,081	0,004	0,192
1,01	0,020	1,98	1,13	0,010	0,88
0,528	0,004	0,758	0,636	0,002	0,314
Corante tartrazina (canal B)			Corante tartrazina (canal B)		
Média	SD	RSD	Média	SD	RSD
1,19	0,010	0,84	1,092	0,008	0,733
0,680	0,004	0,588	0,577	0,002	0,347
0,350	0,001	0,286	0,346	0,002	0,578

Como os desvios padrões relativos (RSD) foram menores do que 2,0% pode-se inferir que o método de calibração do sistema foi adequado e preciso.

4.2- Determinação do teor de etanol

4.2.1-Curva analítica do etanol

A curva analítica do etanol foi obtida diluindo etanol anidro PA em água deionizada, nas seguintes concentrações (% v/v de etanol/água): 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50.

Por se tratar de uma reação colorimétrica, na qual a cor resultante não é pura, mas sim uma mistura de cores onde qualquer canal pode ser utilizado, optou-se, primeiramente, por monitorar os três canais, R, G e B, verificando qual respondia linearmente com a variação da concentração. Sendo assim, o canal R foi selecionado por atender a este requisito, sendo utilizado para a determinação de etanol nas amostras. Neste caso, levou-se em conta apenas a absorção da cor vermelha (canal R).

No Apêndice B, são mostrados os gráficos de RGB obtidos a partir da curva analítica do etanol, mostrando o comportamento de cada canal.

Na Figura 4.3 é apresentada a curva analítica para o etanol no intervalo de concentração de 1 a 50 %v/v; enquanto a Figura 4.4 apresenta a região linear da curva analítica utilizada para a determinação do teor de etanol nas amostras.

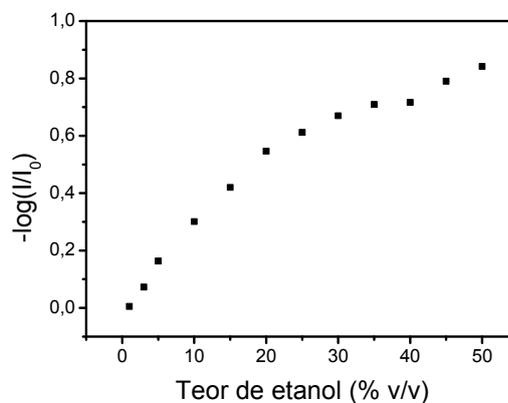


FIGURA 4.3: Correlação entre $-\log(I/I_0)$ e concentração do etanol (canal R).

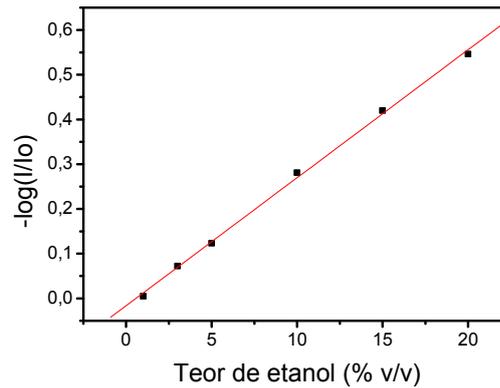


FIGURA 4.4: Curva analítica utilizada para a determinação de etanol (faixa linear de trabalho: 1 a 20 %v/v; Coeficiente linear: - 0,001; Coeficiente angular: 0,03; r: 0,999; LD: 0,25% v/v; LQ: 0,85% v/v)

A região linear de 1 a 20 %v/v da curva analítica foi utilizada devido os resultados calculados utilizando esta região serem os mais próximos dos valores obtidos empregando o método de referência.

Na Figura 4.5 é apresentada uma fotografia da placa de porcelana (toque) contendo soluções de etanol com dicromato de potássio em meio ácido, empregadas para a obtenção da curva analítica no intervalo de concentração de 1 a 50% v/v. A curva analítica para etanol foi feita em triplicata.

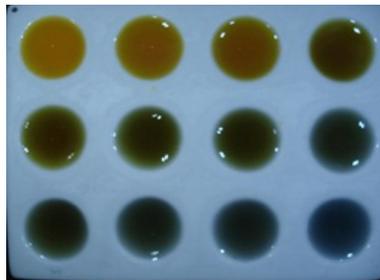


FIGURA 4.5: Fotografia da placa de porcelana (toque) referente à solução obtida da reação entre etanol com dicromato de potássio em meio ácido, na faixa de concentração de 1 a 50% v/v (curva analítica).

Conforme discutido previamente, observou-se a presença de imagens especulares da emissão de luz dos LEDs nas margens das cavidades da placa de porcelana (pontos luminosos devido ao excesso de brilho), como mostrado na Figura 4.5. Contudo, a área útil e representativa dos pixels não foi afetada, existindo ainda muitas regiões possíveis de serem analisadas. Sendo assim, esta foi a melhor configuração obtida e a empregada nos demais estudos, tanto para determinar etanol quanto para determinar sulfito.

A seguir discutir-se-ão os estudos realizados para a seleção das melhores condições experimentais para a determinação de etanol em bebidas e em etanol comercial.

No estudo da acidez da reação do etanol com o reagente cromogênico, foram empregados os ácidos sulfúrico, nítrico e clorídrico, nas formas concentrada (18,0, 14,0 e 12,0 mol L⁻¹, respectivamente) e diluída (ácido sulfúrico 1,8 e 3,5 mol L⁻¹; ácido nítrico 1,4 e 2,8 mol L⁻¹ e ácido clorídrico 1,2 e 2,4 mol L⁻¹). Testaram-se, também, solução de água régia (ácido clorídrico e ácido nítrico, 3:1, respectivamente) e solução piranha (ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, 3:1, respectivamente). Curvas analíticas lineares foram obtidas apenas quando empregados os ácidos sulfúrico e nítrico concentrados, sendo selecionado o ácido sulfúrico devido ao tempo da reação ter sido menor – a escala de cores foi obtida em menor tempo.

A solução piranha oxidou muito rapidamente o Cr (VI) a Cr (II), evidenciado pela intensa cor azul em todas as cavidades da placa de porcelana; por outro lado, o ácido clorídrico reagiu muito lentamente, e a escala de cores não foi perceptível, e todas as cavidades da placa apresentaram tons de amarelo. Em ambas as situações, uma curva analítica linear não foi possível. Os ácidos diluídos não deram resposta quanto à mudança de cores, permanecendo a cor amarela do dicromato, devido aos seus menores potenciais oxidantes.

A melhor concentração em quantidade de matéria por litro (mol L⁻¹) de dicromato de potássio foi 0,05. Concentrações maiores resultaram em cores muito intensas; enquanto concentrações menores geraram escalas de cores bastante discretas, dificultando uma análise *screening* eficaz.

O tempo da reação foi ajustado em 12 minutos, pois, tanto abaixo quanto acima deste, torna-se difícil a discriminação e interpretação dos valores de RGB pelo *software*, devido à perda do gradiente de cores e sensibilidade. Ou seja, abaixo de 12 minutos, as cores permaneceram em tons amarelos; enquanto que acima deste, praticamente todas as cavidades da placa de porcelana mudaram a cor de amarelo para azul. Isso interferiu nos resultados, pois, em ambos os casos, os valores de RGB de todas as cavidades da placa ficaram praticamente constantes, impossibilitando a obtenção de uma curva analítica linear.

O volume final ideal foi de 835 µL para cada cavidade da placa de porcelana. Isto foi bem próximo do volume usado na calibração do sistema (800 µL),

e desta forma, conseguiu-se manter uma razão volumétrica de cada reagente capaz de gerar uma escala de cores no tempo otimizado. Esta razão volumétrica ficou assim estabelecida:

- 640 μL de solução de dicromato de potássio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$;
- 160 μL de cada solução padrão ou amostra;
- 35 μL de ácido sulfúrico concentrado, $18,0 \text{ mol L}^{-1}$;
- 12 minutos de reação;
- Captura da imagem;
- Tratamento dos dados.

4.2.2- Método de referência para etanol

No método de referência para a determinação de etanol, a região espectral de máxima absorção do dicromato foi em aproximadamente 350 nm, correspondente à absorção de $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}_{(\text{aq})}$. Na Figura 4.6 está apresentado o espectro de absorção (UV-vis) obtido do branco e dos padrões de etanol para um tempo de reação de 12 minutos.

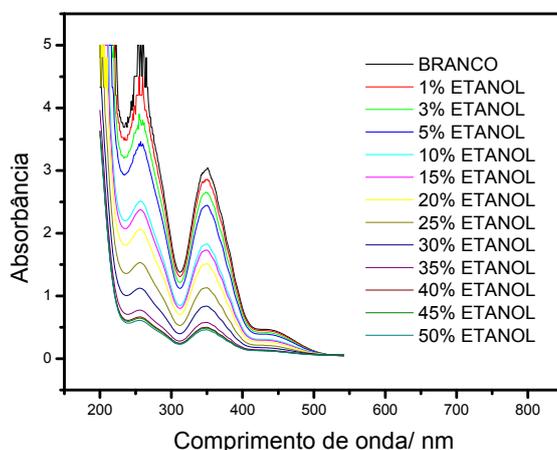


FIGURA 4.6: Espectro de absorção dos padrões de etanol e do branco

Durante a reação, a cor laranja do íon $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}_{(\text{aq})}$ foi substituída pelas cores verde ou azul, referentes às espécies Cr (III) ou Cr (II), respectivamente. Sendo a concentração de dicromato mantida constante, o esvaecimento da cor da solução foi proporcional à concentração de etanol, promovendo a diminuição do sinal de absorbância.

Na Tabela 4.3 estão apresentados os valores de etanol encontrados empregando-se o método proposto e comparados com aqueles empregando o método de referência, assim como os respectivos erros relativos.

TABELA 4.3: Resultados da determinação do teor de etanol em amostras comerciais ($n = 3$)

Amostras	Método de Referência (%v/v)	Método Proposto (%v/v)	Erro Relativo (%)
Cerveja (A ₁)	6,63 ± 0,01	6,7 ± 0,4	+ 1,0
Vinho branco (B ₁)	16,31 ± 0,07	17,7 ± 0,7	+ 8,5
Vinho branco (C ₁)	22,07 ± 0,03	24,8 ± 0,8	+ 12,4
Álcool comercial (D ₁)	54,78 ± 0,07	54,3 ± 0,2	- 0,9
Vodca (E ₁)	30,07 ± 0,08	26,3 ± 0,2	- 12,5
Cachaça (F ₁)	30,21 ± 0,05	28,2 ± 0,2	- 6,7

Observa-se que tanto os vinhos como a vodca apresentaram erros relativos maiores que as demais amostras. No caso dos vinhos, por se tratar de uma matriz complexa, isso se deve, possivelmente, à presença de outras espécies redutoras no meio, as quais são oxidadas juntamente com o etanol, como alcoóis superiores e sulfitos, por exemplo. A vodca, por sua vez, é aparentemente livre de substâncias que possam interferir na determinação de etanol, sendo outras possibilidades investigadas.

Os resultados obtidos empregando-se os dois métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado. O valor do teste t obtido foi de 1,01, valor menor que o tabelado (2,57), a um nível de confiança de 95%. Sendo assim, pode-se afirmar que os métodos apresentam desvios padrões compatíveis. Além disso, pelos resultados obtidos, pode-se concluir que o método desenvolvido apresentou uma boa precisão em relação ao método de referência (espectrofotométrico), com erros relativos aceitáveis.

As amostras (C₁), (D₁), (E₁) e (F₁) foram previamente diluídas em água deionizada para adequação na curva de calibração (faixa linear de 1 a 20 % v/v).

4.2.3- Testes de recuperação

Testes de recuperação foram feitos para avaliar possíveis efeitos de matriz nas amostras. Em cada amostra, realizaram-se duas adições de soluções de etanol em concentrações diferentes, sendo a primeira de 5%; e a segunda de 10% v/v. Cada adição de etanol (5% e de 10%) foi realizada em duplicata, utilizando duas cavidades da placa de porcelana de cada vez, perfazendo assim quatro replicatas ($n=4$). Os valores recuperados, acompanhados dos respectivos valores de desvio padrão com $n = 4$, e das porcentagens de recuperação, podem ser visualizados na Tabela 4.4.

TABELA 4.4: Percentagem de recuperação de etanol nas amostras analisadas ($n=4$)

Amostra	Adicionado (%)	Recuperado (%)	Recuperação (%)
A ₁	5,00	5,1 ± 0,7	102
	10,0	8,5 ± 0,5	85,0
B ₁	5,00	5,1 ± 0,6	102
	10,0	9,2 ± 0,1	92,0
C ₁	5,00	5,3 ± 0,3	106
	10,0	8,7 ± 0,5	87,0
D ₁	5,00	4,8 ± 0,6	96,0
	10,0	9,2 ± 0,3	92,0
E ₁	5,00	4,7 ± 0,8	94,0
	10,0	9,1 ± 0,4	91,0
F ₁	5,00	5,2 ± 0,5	104
	10,0	9,1 ± 0,5	91,0

Observa-se na Tabela 4.4, que os valores de etanol recuperado nas amostras variaram entre 85,0 e 106 % (valor médio de 95,5 %). Estes valores estão dentro da faixa de recuperação aceitáveis [71], indicando que não houve efeito de matriz significativo nas determinações de etanol empregando-se o método proposto.

4.2.4- Testes de interferência em potencial [72]

Para o teste de interferência em potencial na determinação de etanol, foram preparadas soluções das seguintes substâncias: metanol, acetato de etila e 2-butanona, as quais foram adicionadas numa solução padrão de etanol a 15,0 % v/v (valor de referência), nas proporções 1:1; 1:10 e 1:100 (analito:possível interferente, respectivamente).

Na Figura 4.7 está apresentada uma fotografia da placa de porcelana para estudo destes possíveis interferentes. As cores resultantes nas condições de 1:1 são comparadas com aquelas obtidas na curva de calibração.

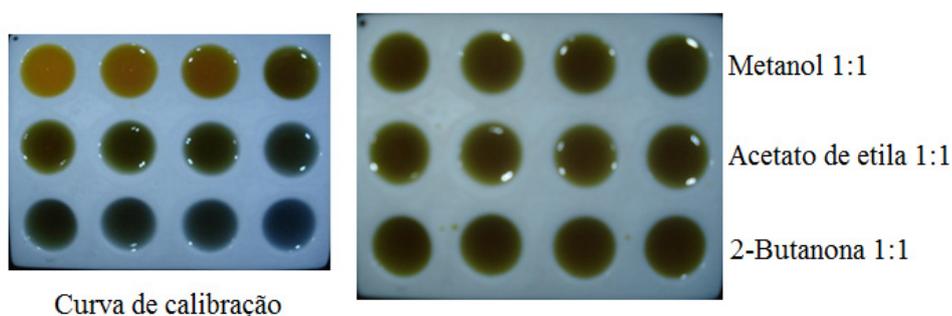


FIGURA 4.7: Fotografias das placas de porcelana para estudo da interferência de metanol, acetato de etila e 2-butanona, nas proporções de 1:1, cujas cores das soluções são comparadas as da curva de calibração.

Como mostrado na Figura 4.7, as cores das soluções resultantes foram bastante intensas já na proporção de 1:1, de modo que nas demais proporções, 1:10 e 1:100, a determinação do teor de etanol ficaria comprometida, uma vez que a cor resultante seria ainda mais intensa. Sendo assim, optou-se por determinar o mínimo de cada substância que seria necessário para alterar o valor de etanol encontrado. Deste modo, os interferentes foram avaliados novamente, nas proporções de; 1:1; 1:0,1 (10 vezes mais diluído) e 1:0,01 (100 vezes mais diluído). Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 4.5.

TABELA 4.5: Efeito de alguns interferentes em potencial na determinação do teor de etanol (n = 8)

Interferente	Proporção	Etanol (%)	Erro relativo (%)
Metanol	1:1	38,5 ± 0,4	+ 157
	1:0,1	17,5 ± 0,3	+ 16,7
	1:0,01	15,4 ± 0,5	+ 2,7
Acetato de etila	1:1	19,6 ± 0,5	+ 30,7
	1:0,1	16,4 ± 0,4	+ 9,3
	1:0,01	15,9 ± 0,3	+ 6,0
2-Butanona	1:1	16,3 ± 0,4	+ 8,7
	1:0,1	16,1 ± 0,1	+ 7,3
	1:0,01	15,6 ± 0,1	+ 4,0

De acordo com a Tabela 4.5, a interferência do metanol é muito intensa na determinação de etanol, uma vez que este apresenta estrutura funcional semelhante ao etanol, competindo com as mesmas reações e reagindo prontamente com os mesmos reagentes, proporcionando desta forma as mesmas escalas de cores obtidas no método com o etanol contido, com cinética mais rápida.

As demais substâncias causaram algum tipo de interferência por terem certo caráter redutor neste meio reacional, conforme as interferências positivas encontradas.

A escolha destes potenciais interferentes ocorreu mediante alguns trabalhos encontrados na literatura e nos rótulos de alguns produtos, e também por serem encontrados como subprodutos da fermentação e/ou destilação nas bebidas contendo etanol. Contudo, vale salientar que estes se encontram em concentrações muito menores que as estudadas, estando presentes em quantidades mínimas, sendo o etanol o componente majoritário.

4.3- Determinação de sulfito

4.3.1- Curva analítica do sulfito

A curva analítica do sulfito foi preparada nas seguintes concentrações em quantidade de matéria por litro (mol L^{-1} de SO_3^{2-}): $1,0 \times 10^{-4}$; $5,0 \times 10^{-4}$; $1,0 \times$

10^{-3} ; $1,5 \times 10^{-3}$; $2,0 \times 10^{-3}$; $2,5 \times 10^{-3}$; $3,0 \times 10^{-3}$; $3,5 \times 10^{-3}$; $4,0 \times 10^{-3}$; $4,5 \times 10^{-3}$ e $5,0 \times 10^{-3}$.

Para este analito, também foram monitorados os três canais, R, G e B, verificando qual respondia de forma linear com a variação da concentração. Neste caso, o canal B foi selecionado por atender a este requisito, sendo utilizado para a determinação de sulfito nas amostras. Sendo assim, os valores encontrados foram calculados levando-se em conta apenas a absorção da radiação eletromagnética referente à cor azul (canal B).

No Apêndice B, estão apresentados os gráficos de RGB obtidos a partir da curva de calibração do sulfito, demonstrando o comportamento de cada canal.

Na Figura 4.8 está apresentada a curva analítica para sulfito, no intervalo de $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; enquanto que na Figura 4.9 está apresentada a região linear da curva analítica utilizada para a determinação da concentração de sulfito nas amostras.

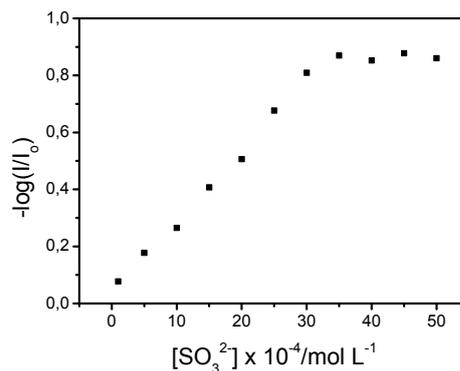


FIGURA 4.8: Correlação entre $-\log(I/I_0)$ e concentração do sulfito (canal B).

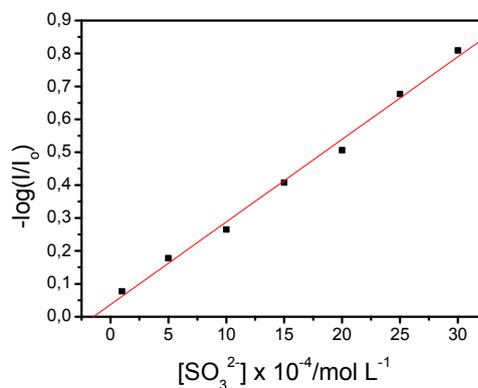


FIGURA 4.9: Curva analítica usada para a determinação de sulfito (Faixa linear de trabalho: $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ = 8,0 mg/L a 240 mg/L; Coeficiente linear: 0,037; Coeficiente angular: 250,92; r: 0,997; LD: $3,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ = 2,64 mg/L; LQ: $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ = 8,0 mg/L)

A região linear de $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ da curva analítica foi utilizada devido os resultados calculados utilizando esta região apresentarem melhor concordância com aqueles obtidos empregando-se o método de referência.

Na Figura 4.10 é apresentada uma fotografia da placa de porcelana contendo soluções de sulfito de sódio, 1,10-fenantrolina e nitrato de ferro (III) em meio ácido, empregadas para a obtenção da curva analítica, no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A curva analítica para sulfito foi feita em triplicata.



FIGURA 4.10: Fotografia da placa de porcelana (toque) referente à solução obtida da reação entre sulfito, 1,10-fenantrolina e nitrato de ferro (III) em meio ácido, na faixa de concentrações em quantidade de matéria por litro (mol L⁻¹ de SO₃²⁻) de: $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ (curva analítica)

A seguir, serão discutidos os estudos realizados para a seleção das melhores condições experimentais para a determinação de sulfito nas amostras.

As soluções de sulfito de sódio e de 1,10-fenantrolina foram preparadas em tampão de ácido acético/acetato nos seguintes pHs: 3,5, 4,5 e 5,5. Independente do pH do meio tamponante, curvas analíticas lineares foram obtidas em todas as situações, não havendo diferenças significativas nas reações colorimétricas (escala de cores). Desta forma, optou-se por preparar as soluções em tampão acetato, pH 4,5, com objetivo de prevenir sua oxidação, evitando as conversões das espécies em função do pH, tal como na Figura 1.6.

A solução de nitrato de ferro (III) ($[Fe^{3+}] = 0,05$ mol L⁻¹) foi preparada nos ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico, nas concentrações em quantidade de matéria por litro (mol L⁻¹): 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0. Como os resultados obtidos foram independentes das concentrações ou tipos de ácidos testados, optou-se por utilizar ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ (pH 0,3) para preparar as soluções de Fe (III), e assim prevenir sua hidrólise.

Quanto ao tempo da reação, assim como no método do etanol, o objetivo era obter máxima sensibilidade no menor tempo possível (escala de cores \times tempo). Como esta reação também evolui com o tempo (intensificando a cor da solução), este foi ajustado para 5 minutos, sendo suficiente para obter uma curva analítica linear satisfatória, além de garantir uma análise *screening* eficaz.

O volume foi ajustado em 800 μL para cada cavidade da placa de porcelana, ficando a razão volumétrica ficou assim estabelecida:

- 160 μL de Fe^{3+} 0,05 mol L^{-1} ;
- 480 μL de solução padrão ou amostra;
- 160 μL de solução de 1,10-fenantrolina 0,05 mol L^{-1} ;
- 5 minutos de reação;
- Captura da imagem.
- Tratamento dos dados

4.3.2- Método de referência para sulfito

Os valores calculados levaram em conta o fato de que, em meio ácido, o desvio do equilíbrio é deslocado para a formação de SO_2 ($\text{pH} < 3,0$) (Figura 1.6).

Na Tabela 4.6 estão apresentados os valores de sulfito encontrados empregando-se o método proposto, expressos em mg/L de SO_2 , comparados com os obtidos empregando-se o método de referência, e os respectivos erros relativos.

TABELA 4.6: Resultado da determinação de sulfito em amostras comerciais ($n = 3$)

Amostras	Método de Referência (mg/L)	Método Proposto (mg/L)	Erro Relativo (%)
Vinho branco (A_2)	111 \pm 1	106 \pm 1	- 4,5
Vinagre (B_2)	65 \pm 1	69,0 \pm 0,5	+ 6,2
Água de coco (C_2)	86,4 \pm 0,7	88 \pm 1	+1,9
Vinho rosé (D_2)	233 \pm 4	242 \pm 1	+3,9
Suco de caju concentrado (E_2)	317 \pm 8	309 \pm 6	- 2,5
Suco de caju (F_2)	160 \pm 1	158 \pm 5	- 1,3

Como visto na Tabela 4.6, os valores encontrados são concordantes com o método de referência, e os erros relativos estão dentro do limite aceitável. Os valores encontrados empregando-se ambos os métodos foram comparados aplicando-se o teste t pareado. Como o t obtido (1,83) foi menor que o t tabelado (2,57), pode-se afirmar que não existe diferença significativa entre os resultados encontrados empregando-se o método proposto, quando comparados com os resultados obtidos usando-se o método de referência (titulação iodométrica), a um nível de confiança de 95 %.

As amostras (D₂) e (E₂) foram previamente diluídas com água deionizada para adequação na curva de calibração (faixa linear de $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, equivalentes a 8,0 a 240 mg/L, respectivamente). A amostra de suco de caju concentrado foi analisada imediatamente após a diluição, dispensando qualquer pré-tratamento, sendo o excesso de polpa fator indiferente na determinação de sulfito.

4.3.3- Testes de recuperação

Para avaliar possíveis efeitos de matriz, foram realizados testes de recuperação nas amostras. Os testes foram realizados fazendo duas adições de sulfito diferentes, sendo a primeira 32,0 mg/L de SO₃²⁻, e a segunda 64,0 mg/L de SO₃²⁻. Cada adição foi realizada em duplicata, utilizando duas cavidades da placa de porcelana de cada vez, perfazendo assim quatro replicatas ($n=4$), e em seguida, capturadas as imagens. Os valores recuperados, acompanhados dos respectivos valores de desvio padrão, com $n = 4$, e das porcentagens de recuperação, podem ser visualizados na Tabela 4.7).

TABELA 4.7: porcentagem de recuperação de sulfito para as amostras analisadas

Amostra	SO ₃ ²⁻ adicionado (mg/L)	SO ₃ ²⁻ recuperado (mg/L)	Recuperação (%)
A ₂	32,0	32 ± 1	100
	64,0	55 ± 2	85,9
B ₂	32,0	27 ± 2	84,4
	64,0	58 ± 3	90,6
C ₂	32,0	30 ± 2	93,7
	64,0	63 ± 3	98,4
D ₂	32,0	33 ± 2	103
	64,0	57 ± 2	89,1
E ₂	32,0	32 ± 2	100
	64,0	60 ± 2	93,8
F ₂	32,0	28 ± 2	87,5
	64,0	60 ± 2	93,8

Observa-se na Tabela 4.7, que os percentuais de recuperação do sulfito nas amostras ficaram entre 84,4 e 103% (valor médio de 93,7). Estes valores estão dentro da faixa de recuperação aceitável [71], indicando que não houve efeito de matriz significativo nas determinações de sulfito empregando-se o método proposto.

4.3.4- Testes de interferência em potencial [65]

Para testar o efeito de interferência em potencial na determinação de sulfito, ácido ascórbico, frutose, sacarose e etanol, foram adicionados nas proporções de 1:1, 1:10 e 1:100 (analito: interferente em potencial, respectivamente), numa solução padrão de sulfito a 61 mg/L (valor de referência).

O ácido ascórbico mostrou um elevado poder interferente, como pode ser visualizado na Figura 4.11, que mesmo na proporção de 1:1 a reação apresentou uma cor bastante intensa, intensidade esta que foi maior que aquela obtida com a solução de referência de sulfito, impossibilitando assim a quantificação do sulfito nestas condições. Na Tabela 4.8 são mostrados os resultados obtidos nas

condições estabelecidas 1:1 do analito:ácido ascórbico evidenciando assim a alta interferência do ascorbato na determinações do sulfito.

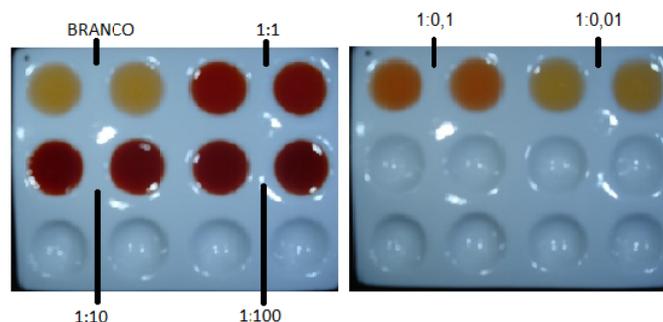


FIGURA 4.11: Fotografias das placas de porcelana empregadas no estudo da interferência de ácido ascórbico na determinação de sulfito.

Sendo assim, optou-se por adicionar o ácido ascórbico na proporção de 1:0,1 (10 × menos) e de 1:0,01 (100 × menos), ou seja, diluições sucessivas até a obtenção de valores de interferência toleráveis. As demais substâncias foram adicionadas nas proporções previamente estudadas, 1:1, 1:10 e 1:100. Os resultados obtidos nos testes de interferência podem ser visualizados na Tabela 4.8.

TABELA 4.8: Efeito de alguns interferentes em potencial na determinação da concentração de sulfito ($n=6$)

Interferente	Proporção	Valor Encontrado (mg/L)	Erro Relativo (%)
Ácido Ascórbico	1:1	> Limite superior da curva	-
	1:0,1	150 ± 2	146
	1:0,01	58,6 ± 0,1	- 3,9
Frutose	1:1	55,1 ± 0,6	- 9,7
	1:10	56,7 ± 0,7	- 7,0
	1:100	68 ± 1	11,5
Sacarose	1:1	50,0 ± 0,1	- 18,0
	1:10	71 ± 1	16,4
	1:100	75,4 ± 0,1	23,6
Etanol	1:1	57 ± 1	- 6,6
	1:10	58 ± 1	- 4,9
	1:100	88 ± 1	44,3

Como pode ser observado na Figura 4.11 e na Tabela 4.8, o ácido ascórbico é um importante interferente nesta reação. De fato, ele interfere por ser uma espécie fortemente redutora, assim como os sulfitos. Assim, a determinação de sulfitos em amostras as quais foram adicionadas ácido ascórbico fica comprometida, levando a erros positivos nos teores de sulfito encontrado.

O etanol em concentração 100 vezes aquela do analito causou uma interferência de 44,3%, não causando interferência importante em concentração de 10 vezes àquela do sulfito.

Capítulo 5 - CONCLUSÕES

5- CONCLUSÕES

Na determinação de etanol em bebidas, os melhores resultados analíticos foram aqueles calculados utilizando o canal R e com região linear de 1 a 20 %v/v ($r = 0,999$). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados foram de 0,25 e 0,85 %v/v, respectivamente. Os resultados obtidos, quando comparados com o método de referência (espectrofotométrico), apresentaram um erro relativo que variou de +12,4 a -12,5 %, e pela aplicação do teste t pareado com limite de confiança de 95%, observou-se não existir diferenças significativas entre os dois métodos, estando dentro de um erro relativo aceitável, uma vez que o valor de t obtido (1,01) foi menor que o t tabelado (2,57).

Verificaram-se ainda possíveis interferências na determinação de etanol, sendo o metanol a substância que apresentou maior influência nos resultados, alterando o valor de etanol empregado como referência, com erros relativos superiores a 100%, mesmo na proporção de 1:1.

Na determinação de sulfito, por sua vez, os melhores resultados analíticos foram aqueles calculados utilizando o canal B e região linear de $1,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,997$). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados foram $3,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} = 2,64 \text{ mg/L}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} = 8,0 \text{ mg/L}$, respectivamente.

Os resultados obtidos, quando comparados com o método de referência (titulação iodimétrica), apresentaram um erro relativo que variou de +6,2 a -4,5 %, e pela aplicação do teste t pareado com limite de confiança de 95%, observou-se não existir diferenças significativas entre os dois métodos, estando dentro de um erro relativo aceitável, uma vez que t obtido (1,83) foi menor que o t tabelado (2,57).

O ácido ascórbico interfere na determinação de sulfito mesmo na razão de concentração de 1:0,1 (analito:interferente), sendo possível determinar o analito com baixa interferência somente quando o ácido o ácido ascórbico estiver em concentração 100 vezes menor do que aquela do analito.

O desenvolvimento do aparato portátil para a captura de imagens das reações químicas mostrou-se eficiente, haja vista que as concentrações dos analitos encontradas foram concordantes com os valores de referência (o que pôde ser verificado pela aplicação do teste t pareado). Além disso, o sistema é de fácil

operação, e de baixo custo na sua confecção, e uma vez otimizado, as medidas são obtidas rapidamente e com boa precisão.

O método também é robusto, com aplicabilidade para diversas reações químicas com geração de cor, podendo ainda, com uma única imagem, obter resultados referentes aos padrões, à amostra, e ao branco, aumentando assim a frequência analítica.

Além disso, na aplicação do método para a determinação de etanol e sulfito, todas as amostras foram analisadas imediatamente, não necessitando de nenhum pré-tratamento, apenas realizando diluições quando necessário para adequação na curva de analítica.

Ressalta-se, ainda, que se trata de um método econômico, gastando pouco reagente, fator importante quando se trabalha com materiais de custo elevado, ou de alto grau de toxicidade, desta forma, satisfazendo alguns princípios da Química Verde.

Capítulo 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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*. **31**(4): 731, 2008.
2. PACIORNIK, S.; YALLOUZ, A. V.; CAMPOS R. C.; GANNERMAND, D. “Scanner Image Analysis in the Quantification of Mercury using Spot-Tests”. *J. Braz. Chem. Soc.* **17**(1): 156, 2006.
3. JUNGREIS, E. *Spot Test Analysis: clinical, environmental, forensic and geochemical applications*. Vol. 75, John Willey & Sons, 1926.
4. MATIAS, A. A.; VILA, M. D. C. & TUBINO, M. “Quantitative Reflectance Spot Test for the Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Preparations”. *J. Braz. Chem. Soc.* **15**(2): 327, 2004.
5. KOMPANY-ZAREH, M.; MANSOURIAN, M.; RAVAAEE, F.”simple method for colorimetric spot-test quantitative analysis of Fe(III) using a computer controlled hand-scanner”. *Analytica Chimica Acta*. **471**(1): 97, 2002.
6. TUBINO, M.; de SOUZA, R.; HOEHRN. F. “Rapid quantitative turbidimetric spot test analysis of potassium in blood serum”. *J. Braz. Chem. Soc.* **15** (5): 635, 2004.
7. 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*. **134** (4): 2.546, 2012.
8. PETER, F.; REYNOLDS, R. G. “Quantitative analysis of human serum cholesterol by thin-layer chromatographic spot test”. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **143** (2): 153, 1977.
9. 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*. 109: 68, 2013.
10. FEIGL F. & ANGER V.; *Spot tests in inorganic analysis*, Ralph E. Oesper (Trad.), 6th ed., Elsevier: Amsterdam, 1972.
11. RIBEIRO, P. R. S.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. “Determination of Methyldopa in Pharmaceutical Formulations by Combined Spot Test-Diffuse Reflectance Spectroscopy”. *J. Braz. Chem. Soc.* **17**(4): 674, 2006.
12. MUÑOZ-OLIVAS, R. “Screening Analysis: An overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses”. *Trends in Analytical Chemistry*. **23**(3): 2004.
13. http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/areas_contaminadas/anexos/download/6100.pdf, acessado em 09/05/2011, acessado em 09/05/2011.

14. TOLEDO, C.; VALLE, L.; NARVÁEZ, J; RICHTER, P. "Screening Method for Rapid Determination of Polychlorinated Biphenyls in Transformer Oil by Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry" *J. Braz. Chem. Soc.* **18**(5): 937, 2007.
15. PAMBOUKIAN, S. V. D.; PEDROTTI, J. J. "Desenvolvimento de Instrumentação Analítica e *Software* para Controle, Aquisição e tratamento de Dados Analíticos". *Revista Mackenzie de Engenharia e Computação.* **12**(1): 32, 2012.
16. YAM, K. L.; PAPADAKIS, S. E. "A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces." *Journal of Food Engineering.* **61**(1): 137, 2004.
17. 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.* **31**(6): 1577, 2008.
18. <http://midiawaybsb.com.br/2012/05/12/qual-a-diferenca-de-rgb-e-cmyk/>, acessado em 20/03/2013.
19. 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.* 2ª Edition, John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, United Kingdom, 2011.
20. BYRNE, L.; BAKER, J.; PENNARUN-THOMAS, G.; DIAMOND, D.; EDWARDS, S. "Digital imaging as a detector for generic analytical measurements". *Trends in analytical chemistry.* **19**(8): 517, 2000.
21. MONEMI, N. RAMANATHAN, K.; LARSSON, P-O.; DANIELSSON, B.; BENAMARK, S.; KHAYYAMI, M. "CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein". *Analytica Chimica Acta.* **387**(1): 21, 1999.
22. MALEKI, N.; SAFAVI, A.; SEDAGHATPOUR, F. "Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera." *Talanta.* **64**(4), 830, 2004.
23. GAIÃO, E. N.; MARTINS, V. L.; LYRA, W. S.; ALMEIDA, L. F.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U. "Digital image-based titrations". *Analytica Chimica Acta.* **570**(2): 283, 2006.
24. LYRA, W. S.; SANTOS, V. B.; DIONÍZIO, A. G. G.; MARTINS, V. L.; ALMEIDA, L. F.; GAIÃO, E. D.; DINIZ, P. H. G. D.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U. "Digital image-based flame emission spectrometry". *Talanta.* **77**(5): 1584, 2009.
25. SAFAVI, A.; MALEKI, N.; ROSTAMZADEH, A.; MAESUM, S. "CCD camera full range pH sensor array". *Talanta.* **71**(1): 498, 2007.
26. LIMA, M. B.; ANDRADE, S. I. E.; ALMEIDA, L. F.; ARAÚJO, M. C. U. "A digital image-based micro-flow-batch analyzer." *Microchemical journal.* 106, 238, 2013.

27. 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*. **107**(1): 49, 2012.
28. TÔRRES, A. R.; LYRA, W. S.; ANDRADE, S. I. E.; ANDRADE, R. A. N.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U.; GAIÃO, E. D. "Review : A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid–base titration without indicator." *Talanta*. **84**(3): 601, 2011. .
29. LAMPEN, P.; TRAUTHAN, F.; DUMMEL, A.; ARNOLD, G.; JAUMAN, R. "Spectroscopic and photometric evaluation of images from the Mars Pathfinder camera". *Analytica Chimica Acta*, **420**(2): 229, 2000.
30. SANTOS, P. M.; WENTZELL, P. D.; PEREIRA-FILHO, E. R. "Scanner Digital Images Combined with Color Parameters: A Case Study to Detect Adulterations in Liquid Cow's Milk." *Food Analytical Methods*. **5**(1): 89, 2012.
31. LUPETTI, K. O; CARVALHO, L. C.; MOURA, A. F.; FATIBELLO-FILHO, O. "Análise De Imagem Em Química Analítica: Empregando Metodologias simples e Didáticas Para Entender e Prevenir o Escurecimento de Tecidos Vegetais." *Química Nova*. **28**(3): 548, 2005.
32. RAMANATHAN, N.; LUKAC, M.; AHMED, T.; KAR, A.; PRAVEEN, P. S.; HONLES, T.; LEONG, I.; REHMAN, I. H.; SCHAUER, J. J.; RAMANATHAN, V. "A cell phone based system for large-scale monitoring of black carbon." *Atmospheric Environment*. **45**(26): 4481, 2011.
33. BORIN, A.; FERRÃO, M. F.; MELLO, C.; CORDI, L.; PATACA, L. C. M.; DURÁN, N.; POPPI, R. J. "Quantification of Lactobacillus in fermented milk by multivariate image analysis with least-squares support-vector machines." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **387**(3): 1105, 2007. .
34. NOVALES, B.; PAPINEAU, P.; SIRE, A.; AXELOS, M. A. V. "Characterization of emulsions and suspensions by video image analysis." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **221**(1-3): 81, 2003.
35. SENA, R. C.; 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*. **11**(1): 864, 2011.
36. MATOS, E. H. S. F. "Dossiê Técnico: Etanol." SBRT, UNB – Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico, Dezembro 2007. Disponível em: <http://sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/Mjg4>, acessado em 14/03/2013.
37. <http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/index.php>, acessado em 11/03/2013.
38. FERREIRA, E. C.; MONTES, R. "A química da produção de bebidas alcoólicas". *Química Nova na Escola*. (10): 50, 1999.

39. SUMBHATE, S.; NAYAK, S.; GOUPALE, D.; TIWARI, A.; JADON, R. S. "Colorimetric Method for the Estimations of ethanol in Alcoholic Drinks". *Journal of Analytical Techniques*. **1**(1): 1, 2012.
40. REIS, J. P. Z. *Dosagem de etanol utilizando álcool desidrogenase de levedura de panificação*. Araraquara, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição – UNESP, 2006. Dissertação de Mestrado, 66p.
41. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª edição – 1ª edição digital; Capítulo IX; Bebidas Alcoólicas. Instituto Adolpho Lutz, disponível em http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=20&func=startdo wn&id=10, acessado em 24/02/2013.
42. FLETCHER, P. J. & STADEN, J. F. "Determination of ethanol in distilled liquors using sequential injection analysis with spectrophotometric detection". *Analytical Chimica Acta*. **499**(1-2): 123, 2003.
43. LAU, O. W. & LUK, S. F. "Spectrophotometric method for the determination of ethanol in beverages and beer samples using cerium (IV) as reagent". *Int. J. Food Sci. Technol.* **29**(4): 469, 1994.
44. PAIS, T. F. M.; VIDIGAL, S. S. M. P.; TÓTH, I. V. & RANGEL, A. O. S. S. "Sequential injection system for the enzymatic determination of ethanol in alcoholic beverages with in-line dilution". *Food Control*. **30**(2): 616, 2013.
45. PINYOU, P.; YOUNGVISES, N. & JAKMUNEE, J. "Flow injection colorimetric using acidic ceric nitrate as reagent for determination of ethanol". *Talanta*. **84**(3): 745, 2011.
46. HNAIEN, M.; LAGARDE, F. & JAFFREZIC-RENAULT, N. "A rapid and sensitive alcohol oxidase/catalase conductometric biosensor for alcohol determination". *Talanta*. **81**(1-2): 222, 2010.
47. WEN, G.; ZHANG, Y.; SHUANG, S. & DONG, C. "Application of a biosensor for monitoring of ethanol". *Biosensors and Bioelectronics*. **23**(1): 121, 2007.
48. KIRGÖZ, Ü. A.; ODACI, D.; TIMUR, S.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S.; BESÜN, N. & TELEFONCU, A. "A biosensor based on graphite epoxy composite electrode for aspartame and ethanol detection". *Analytica Chimica Acta*. **570**(2): 165, 2006.
49. YARITA, T.; NAKAJIMA, R.; OTSUKA, S.; IHARA, T.; TAKATSU, A. & SHIBULAWA, M. "Determination of ethanol in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography-flame ionization detection using pure water as mobile phase". *Journal Chromatography A*. **976**(1-2): 387, 2002.
50. MACHADO, R. M. D.; TOLEDO, M. C. F.; VICENTE, E. "Sulfitos em alimentos". *Brazilian Journal of Food Technology*. **9**(4): 265, 2006.

51. PIZZOFERRATO, L.; LULLO G.; QUATTUCCI, E. "Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry-HPLC", *Food Chemistry*. **43** (2): 275, 1998.
52. SARTORI, E.R.; TAKEDA, H.H. & FATIBELLO-FILHO, O., "Glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film for the voltammetric determination of sulfite in foods". *Electroanalysis*. **23**(11): 2526, 2011.
53. MACHADO, R. M. D. ; TOLEDO, M. C. F. ; VICENTE, E. "Sulfite content in some Brazilian wines: analytical determination and estimate of dietary exposure". *European Food Research and Technology*. **229**(3): 383, 2009.
54. MACHADO, R. M. D. ; TOLEDO, M. C. F. ; ALMEIDA, C. A. S. ; VICENTE, E. "Analytical determination of sulphites in fruit juices available on the Brazilian market". *Brazilian Journal of Food Technology*. **11**(3): 226, 2008.
55. www.anvisa.gov.br/, acessado em 18/03/2013.
56. FAVERO, D M.; RIBEIRO, C. S. G.; AQUINO, A. D. "Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população". *Segurança Alimentar e Nutricional*. **18** (1): 11, 2011.
57. MORENO, R. G. M.; ALIPÁZAGA, M. V.; MEDEIROS, M. H. G.; COICHEY, N. "Lesões em DNA induzidas pela autooxidação de s(iv) na presença de íons metálicos de transição". *Química Nova*. **29** (5): 1.086, 2006.
58. BRASIL. Instrução Normativa nº 24, de 08 de setembro de 2005. Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. Diário oficial da união, DF, 20 de setembro de 2005.
59. VAHL, J. M. & CONVERSE, J. E. "Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: collaborative study". *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. **63**(2): 194, 1980.
60. ANDERSON, C.; WARNER, C. R.; DANIELS, D. H.; PADGETT, K. L. "Ion chromatographic determination of sulfites in foods". *Journal Association Official Analytical Chemists*. **69**(1): 14, 1986.
61. PIZZOFERRATO, L.; QUATTRUCCI, E.; DI LULLO, G. "Evaluation of an HPLC method for the determination of sulphiting agents in foods". *Food Additives and Contaminants*. **7**(2): 189, 1990.
62. SAFAVI, A.; ENSAFI, A. A. "Kinetic spectrophotometric determination of traces of sulphite". *Analytical Chimica Acta*. **252**(1-2): 121, 1991.
63. CORBO, D. & BERTOTTI, M. "Use of a copper electrode in alkaline medium as an amperometric sensor for sulphite in a flow-through configuration". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **374**(3): 416, 2002.

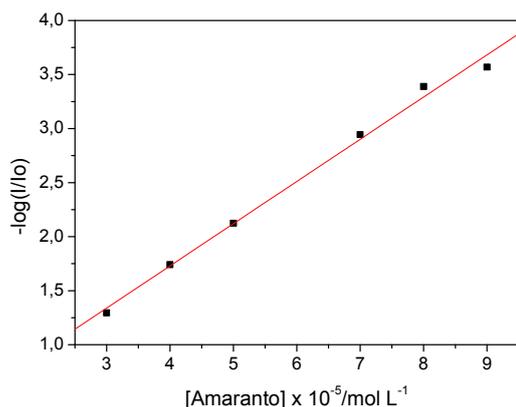
64. RAWAL, R. & PUNDIR, C. S. "Development of electrochemical sulfite biosensor based on SO_x/PBNPs/PPY modified Au electrode". *Biochemical Engineering Journal*. **71**(2): 30, 2013.
65. SARTORI, E. R.; VICENTINI, F. C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly(allylamine hydrochloride) film". *Talanta*. **87**, 235, 2011.
66. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, acessado em 24/02/2013.
67. KOHL, S. K.; LANDMARK, J. D.; STICKLE, D. F. "Demonstration of Absorbance Using Digital Color Image Analysis and Colored Solutions". *Journal of Chemical Education*. **83** (4): 644, 2006.
68. BRAATHEN, PER C. "Hálito Culpado: O Princípio Químico do Bafômetro." *Química Nova na Escola*. (5): 3, 1997.
69. VIEIRA, H. J.; FATIBELLO-FILHO, O. "Determinação Indireta de N-Acetil-L-Cisteína por Injeção em Fluxo Empregando Ce(IV) e Ferroína". *Química Nova*. **28** (5): 797, 2005.
70. CIESIELSKI, W.; ZAKRZEWSKI, R. "Iodimetric Titration of Sulfur Compounds in Alkaline Medium". *Chemia Analityczna*. (51): 653, 2006.
71. BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. "validação de métodos analíticos: estratégia e Discussão". *Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. **13**: 129, 2003.
72. CHRISTENSEN, E.; N. & STACKLER, B. "Quantitative determination of ethanol in wine by gas chromatography". *Amer. J. Enol. Viticult.* **25** (4): 1974.
73. WANG, J.; YU, J.; KONG, X. Z.; & HOU, L. "Spectrophotometric determination of EDTA in aqueous solution through ferroin formation using sodium sulfite as the reducer". *Chemosphere*. **91**: 351, 2013.

APÉNDICES

A) Gráficos de regressão de cada corante, no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (terceira calibração), obtidos com as cinco câmeras, demonstrando que suas diferentes resoluções não alteram significativamente os resultados obtidos.

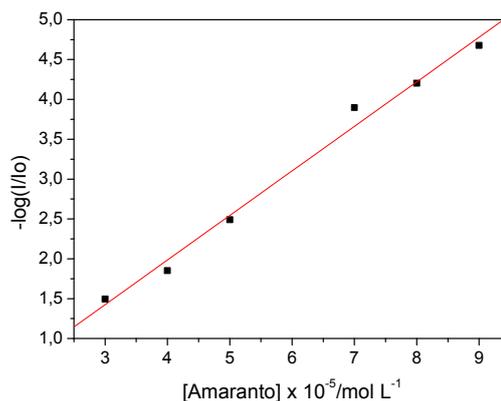
Corante amaranço (canal G)

Câmera 1 (12.0MP)



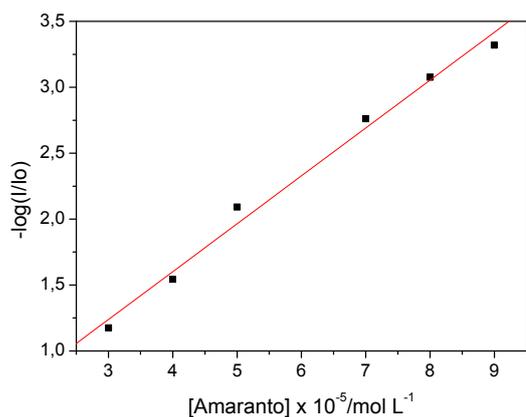
Coeficiente Linear: $0,017 \pm 0,001$
 Sensibilidade Analítica: 3.905,02
 Coeficiente de Regressão (r): 0,996

Câmera 2 (6.0MP)



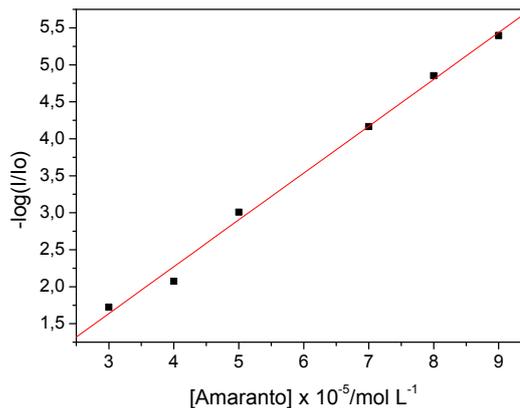
Coeficiente Linear: $-0,025 \pm 0,002$
 Sensibilidade Analítica: 5.590,40
 Coeficiente de Regressão (r): 0,994

Câmera 3 (5.1MP)



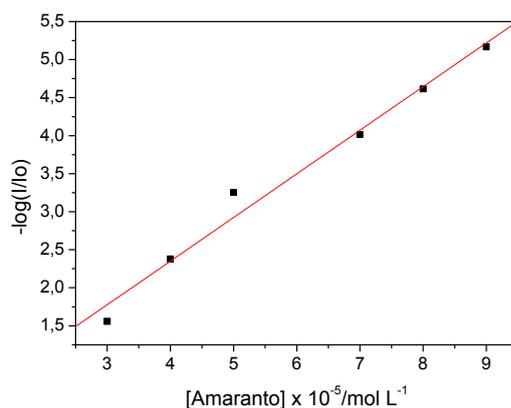
Coeficiente Linear: $0,01 \pm 0,01$
 Sensibilidade Analítica: 3.632,63
 Coeficiente de Regressão (r): 0,994

Câmera 4 (2.0MP)



Coeficiente Linear: $-0,03 \pm 0,01$
 Sensibilidade Analítica: 6.332,60
 Coeficiente de Regressão (r): 0,997

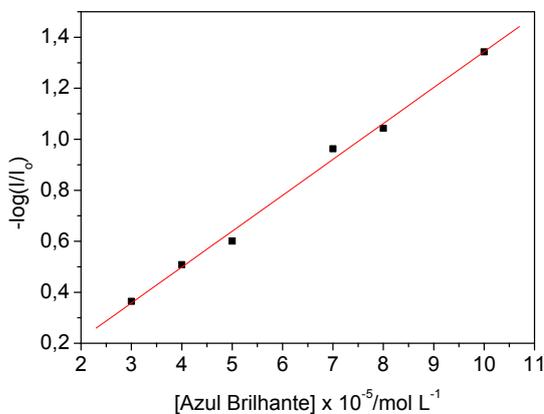
Câmera 5 (0.3MP)



Coeficiente Linear: $0,05 \pm 0,02$
 Sensibilidade Analítica: 5.737,83
 Coeficiente de Regressão (r): 0,991

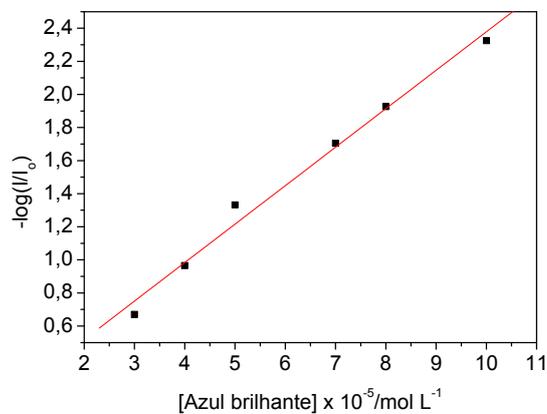
Corante azul brilhante (canal R)

Câmera 1 (12.0MP)



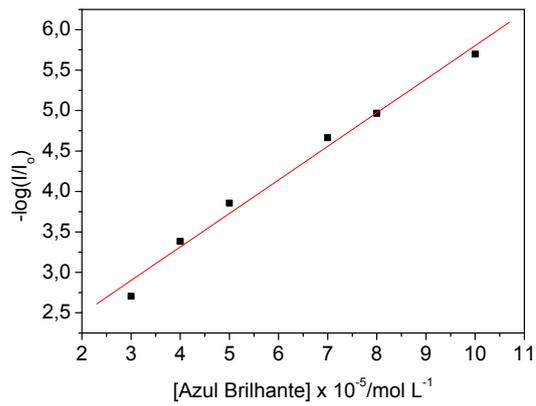
Coeficiente Linear: $0,07 \pm 0,03$
 Sensibilidade Analítica: 14.078,60
 Coeficiente de Regressão (r): 0,997

Câmera 2 (6.0MP)



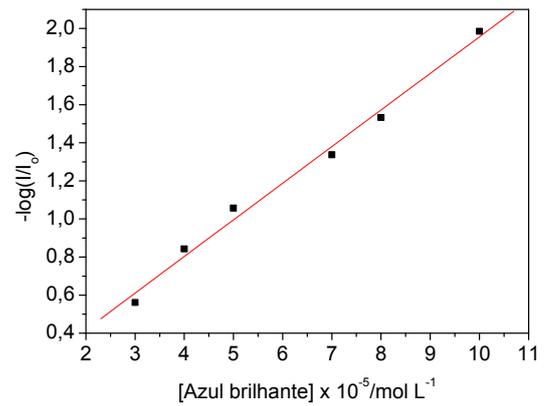
Coeficiente Linear: $0,5 \pm 0,09$
 Sensibilidade Analítica: 23.253,80
 Coeficiente de Regressão (r): 0,994

Câmera 3 (5.1MP)



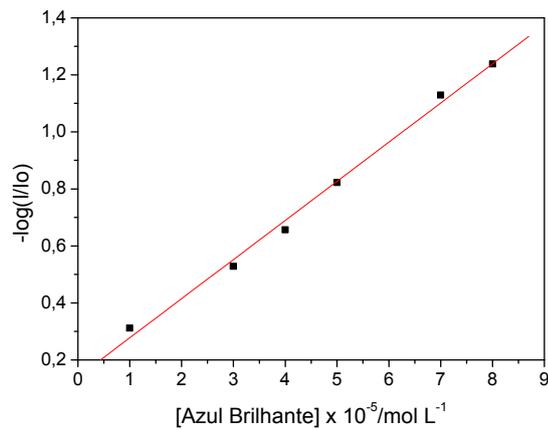
Coeficiente Linear: $0,2 \pm 0,02$
 Sensibilidade Analítica: 4.146,34
 Coeficiente de Regressão (r): 0,993

Câmera 4 (2.0MP)



Coeficiente Linear: $0,3 \pm 0,06$
 Sensibilidade Analítica: 19.229,17
 Coeficiente de Regressão (r): 0,995

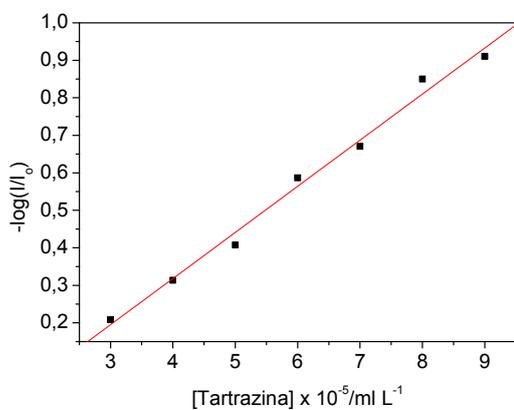
Câmera 5 (0.3MP)



Coeficiente Linear: $0,14 \pm 0,02$
 Sensibilidade Analítica: 13.731,73
 Coeficiente de Regressão (r): 0,997

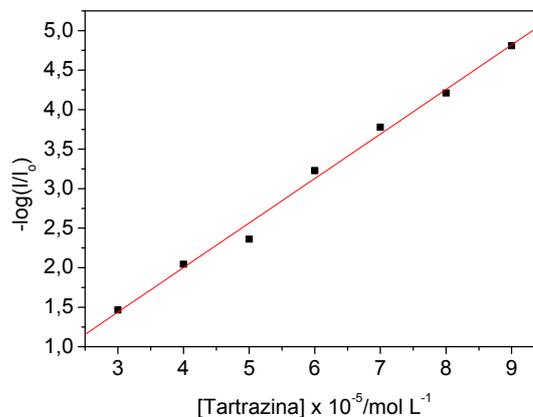
Corante Tartrazina (canal B)

Câmera 1 (12.0MP)



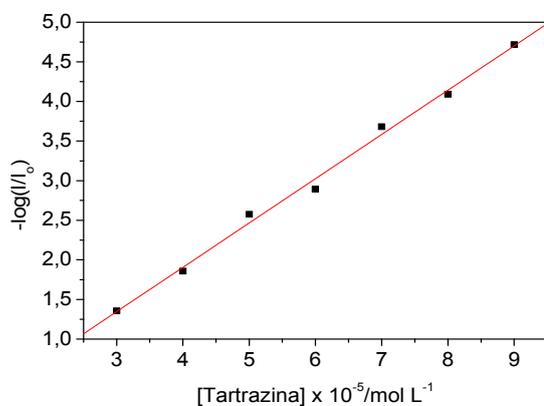
Coeficiente Linear: $- 0,20 \pm 0,003$
 Sensibilidade Analítica: 12.298,37
 Coeficiente de Regressão (r): 0,995

Câmera 2 (6.0MP)



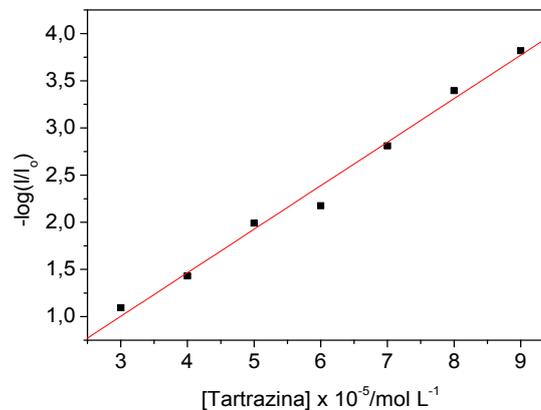
Coeficiente Linear: $- 0,30 \pm 0,01$
 Sensibilidade Analítica: 5.635,93
 Coeficiente de Regressão (r): 0,996

Câmera 3 (5.1MP)

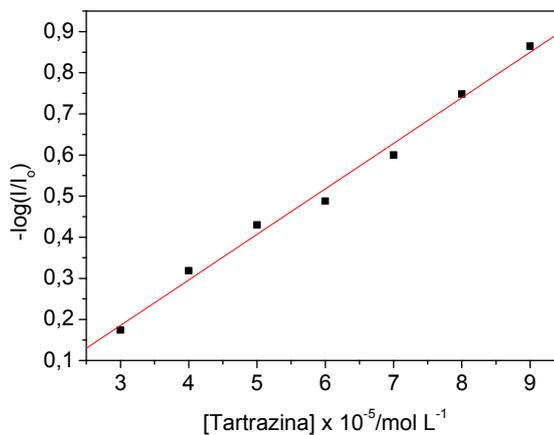


Coeficiente Linear: $- 0,03 \pm 0,01$
 Sensibilidade Analítica: 5.593,49
 Coeficiente de Regressão (r): 0,997

Câmera 4 (2.0MP)

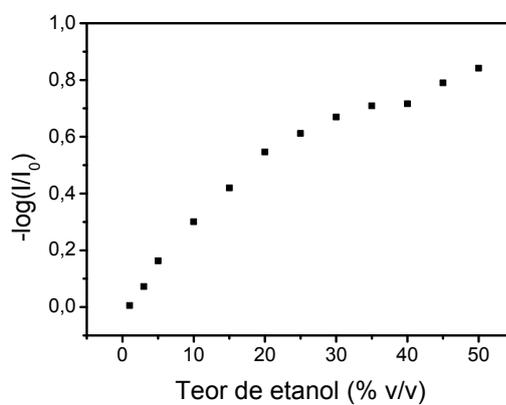


Coeficiente Linear: $- 0,4 \pm 0,01$
 Sensibilidade Analítica: 4.0614,10
 Coeficiente de Regressão (r): 0,994

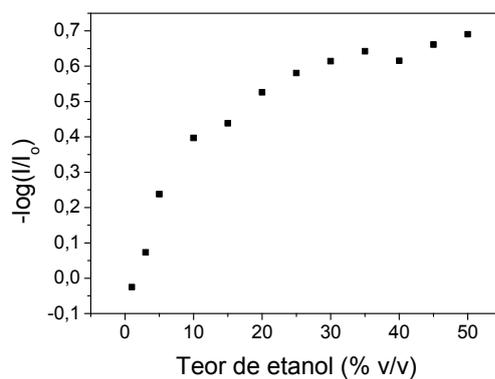
Câmera 5 (0.3MP)

Coeficiente Linear: $-0,14 \pm 0,03$
Sensibilidade Analítica: 11.077,92
Coeficiente de Regressão (r): 0,995

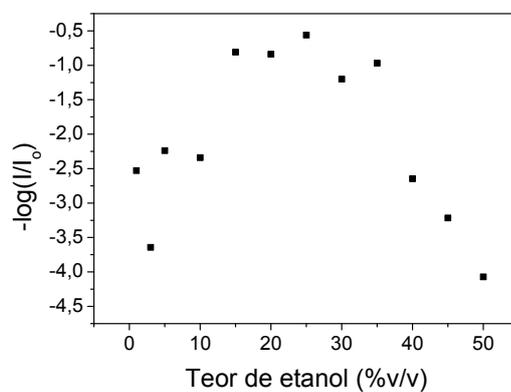
B) Gráficos de RGB obtidos a partir da curva analítica do etanol e do sulfito, respectivamente, demonstrando o comportamento de cada canal, utilizando a câmera digital 2 (DSC-W50 / Sony):

➤ ETANOL**Canal R**

Canal G

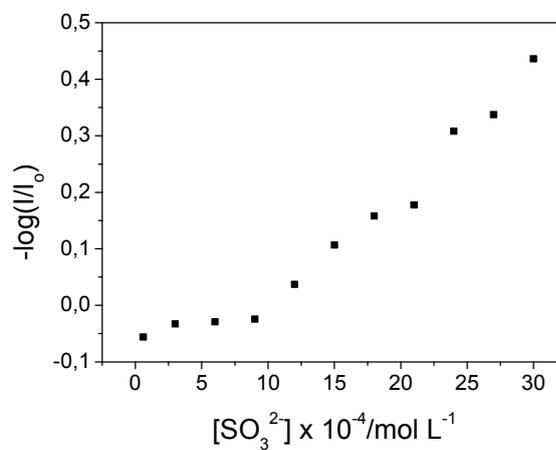


Canal B

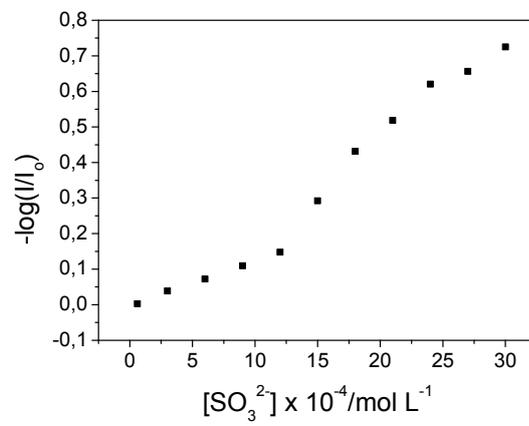


➤ **SULFITO**

Canal R



Canal G



Canal B

