

Desenvolvimento de método colorimétrico para determinação de metanol em etanol hidratado combustível, gasolina automotiva, bebidas alcoólicas e vinagre

Dissertação apresentada ao Instituto de Química à Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química.

Orientador:

Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan

Co-orientador:

Prof. Dr. Marcos Roberto Monteiro

Araraquara

2022

M691d Modesto, Larissa Alves de Mello
Desenvolvimento de método colorimétrico para determinação de metanol em etanol hidratado combustível, gasolina automotiva, bebidas alcoólicas e vinagre
/ Larissa Alves de Mello Modesto. -- Araraquara, 2022
118 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Danilo Luiz Flumignan
Coorientador: Marcos Roberto Monteiro

1. Formaldeído. 2. Etanol. 3. Gasolina. 4. Bebidas alcoólicas. 5. Falsificação.
I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento de método colorimétrico para determinação de metanol em etanol combustível anidro e hidratado, gasolina automotiva, bebidas alcoólicas destiladas e vinagre"

AUTORA: LARISSA ALVES DE MELLO MODESTO

ORIENTADOR: DANILO LUIZ FLUMIGNAN

COORIENTADOR: JOSE EDUARDO DE OLIVEIRA

COORIENTADOR: MARCOS ROBERTO MONTEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANILO LUIZ FLUMIGNAN (Participação Virtual)
Departamento de Química / Instituto de Química - UNESP -
Araraquara

DocuSigned by:

326DC165953E449...

Dr. LUIZ FILIPE PAIVA BRANDÃO (Participação Virtual)
ANP - Brasília / Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

DocuSigned by:

05BCA7E419A344E...

Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 14 de fevereiro de 2022

Dados Curriculares

Formação acadêmica

- 2018 Mestrado em Química Analítica (Araraquara)
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, Brasil
Orientador: Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto Monteiro
- 2012 - 2016 Graduação em Química - Opção Tecnológica - Ênfase em Materiais.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Orientador: Fábio Henrique Barros de Lima

Formação complementar

- 2009 - 2010 Técnico em Química. (Carga horária: 2000h).
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

Vínculo institucional

- 2018 - Atual Bolsa de Mestrado CAPES
Projeto: Desenvolvimento de kit colorimétrico para determinação e quantificação de metanol em etanol combustível anidro e hidratado e gasolina automotiva.

2. Instituto de Química de São Carlos (USP) - IQSC-USP

Vínculo institucional

- 2012 - 2016 - Bolsa Tutoria Acadêmico- Científica (IQSC-USP) - 2012.
Projeto: Experimentos para estudantes do ensino médio para o programa universidade aberta
- Bolsa de Iniciação Científica CNPq/PIBIC (IQSC-USP) - 2013 – 2014. Projeto: Reforma eletroquímica de etanol para produção de hidrogênio.
- Bolsa de Iniciação Científica CNPq/PIBIC (IQSC-USP) - 2014-2015. Projeto: Desenvolvimento de eletrocatalisadores nanoestruturados a base de tungstênio e estanho para dispositivos de eletro-conversão de energia.

- Programa Unificado de Bolsas de Estudos (IQSC-USP) – 2015 - 2016. Projeto: Células a combustível regenerativas: síntese e investigação da atividade de eletrocatalisadores nanoestruturados.

Produção

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. MODESTO, L. A. M.; LIMA, F. H. B.

Desenvolvimento de Eletrocatalisadores Nanoestruturados a base de Tungstênio para Dispositivos de Eletro-conversão de Energia In: 23º SIICUSP (Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP), 2015, São Carlos.

2. MODESTO, L. A. M.; LIMA, F. H. B.

Reforma eletroquímica de etanol para a produção de hidrogênio In: Workshop de Iniciação Científica- 40 anos do Bacharelado em Química- Comissão de Pesquisa- IQSC, 2013, São Carlos.

Patentes Registradas

1. MODESTO, L. A. M.; MONTEIRO, M. R.; FLUMIGNAN, D. L.

Método colorimétrico quantitativo e kit portátil para detecção do teor (%) de metanol em etanol, gasolina, bebidas alcoólicas destiladas e vinagre, 2021.

Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020210247975.

Data de depósito: 08/12/2021.

Depositante/Titular: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

2. MODESTO, L. A. M.; MONTEIRO, M. R.; FLUMIGNAN, D. L.

Método quantitativo para detecção do teor (%) de metanol em etanol combustível, gasolina e bebidas alcoólicas destiladas incolores e não açucaradas, 2020.

Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020200100432.

Data de depósito: 19/05/2020.

Depositante/Titular: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Participação em eventos

1. Apresentação de pôster na Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019. (Congresso)

Título: Colorimetric Method for Detect Methanol in Ethanol Fuel Fraud.

2. Apresentação de pôster no 23º SIICUSP (Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP), 2015. (Simpósio)

Título: Desenvolvimento de Eletrocatalisadores Nanoestruturados a base de Tungstênio para Dispositivos de Eletro-conversão de Energia.

3. Apresentação de pôster no 22º SIICUSP (Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP), 2014. (Simpósio)

Título: Reforma eletroquímica de etanol para a produção de hidrogênio.

4. Apresentação de pôster no Workshop de Iniciação Científica- 40 anos do Bacharelado em Química - Comissão de Pesquisa-IQSC (USP), 2013.

Título: Reforma Eletroquímica de etanol para a produção de hidrogênio.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
cujo apoio foi fundamental para que
eu chegasse até aqui.*

Agradecimentos

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan, pela orientação, confiança e disponibilidade durante este período;

Ao meu co-orientador, o Prof. Dr. Marcos Roberto Monteiro, pela disponibilidade, apoio e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus pais Lucy e Maurício, por todo amor, incentivo, confiança, exemplos e apoio incondicional;

Ao Lucas, por ser um irmão maravilhoso e pelo auxílio no inglês;

A toda minha família e amigos, por sempre torcerem por mim;

Aos meus avós, por sempre orarem por mim;

Ao Anderson, pelo apoio, paciência, companheirismo e orientação no plano de validação.

Aos químicos Letícia, Naiara e Beatriz, pela participação voluntária nos ensaios duplo-cego. A Letícia e Camila, pelo auxílio no planejamento experimental. A Rafaela, ao Gabriel e ao Prof. Dr. Paulo Clairmont por cederem seus dispositivos portáteis para teste. Ao Rafael, pelo auxílio na análise de determinação de cromo.

Ao Cempeqc, pelo acolhimento, parceria e ensinamentos.

Às amigas Isabela, minha fotógrafa de amostras, Carol e Letícia, por sempre me ajudarem em tudo que precisei. Acima de tudo, obrigada por estarem comigo nesse período.

À banca, por contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Instituto, em especial a Wennia e ao Albertinho por ajudarem a tornar este trabalho possível.

À agência de inovação da UNESP (AUIN), em especial a Sabrina, ao Renan e ao Tiago, pelo apoio na proteção intelectual.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos, muito obrigada!

Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: ele também é uma criança confrontando fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fadas.

Marie Curie

Resumo

Em 2010, ocorreram as primeiras constatações de metanol em etanol combustível e gasolina no Brasil. O metanol é tóxico para o ser humano e para o meio ambiente, além de não ser reconhecido como combustível pela Agência Nacional do Petróleo (ANP), apenas como insumo industrial. O limite de metanol em etanol e gasolina é 0,5% em volume e sua adição é proibida. No caso de bebidas alcoólicas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina um limite máximo de 20mg/100ml, já que o metanol pode ser formado no processo de produção ou ser propositalmente adicionado.

Considerando este cenário, desenvolveu-se neste trabalho dois métodos colorimétricos para determinação de metanol baseados em (a) oxidação da amostra com dicromato de potássio e posterior coloração do formaldeído com ácido cromotrópico e (b) oxidação da amostra com permanganato de potássio, descoloração do óxido de manganês formado e posterior coloração do formaldeído com ácido cromotrópico.

O método (a) apresenta linearidade de 0,2 a 0,6% de metanol (v/v) e é seletivo para etanol hidratado combustível, gasolina C, vodka, cachaça e whisky. Já o método (b) apresenta linearidade de 0,2 a 0,7% (v/v) e é seletivo para etanol hidratado combustível, gasolina C, vodka, cachaça, whisky e vinagre de álcool. Ambos apresentam limite de detecção igual a 0,2% (v/v) em etanol combustível e gasolina, abaixo do limite de especificação de 0,5% (v/v).

Ademais, ambos os métodos oferecem o mesmo tributo de amostra “conforme” e “não conforme” que a cromatografia gasosa, além de serem rápidos (máximo 25 minutos), permitirem análise em batelada e possibilitarem realização em campo por meio de “kits rápidos de análise”, sendo qualquer pessoa treinada capaz de operar. Estes kits poderiam ser utilizados por postos revendedores de combustível, produtores de eventos, usinas, distribuidoras, agências reguladoras, bares e por toda a população que queira ter uma garantia de qualidade dos combustíveis e bebidas consumidos e revendidos.

Abstract

In 2010, the first findings of methanol in fuel ethanol and gasoline have occurred in Brazil. Methanol is toxic to humans and the environment, in addition to not being recognized as a fuel by the Agência Nacional do Petróleo (ANP), only as an industrial input. The limit of methanol in ethanol and gasoline is 0.5% by volume and its addition is prohibited. In the case of alcoholic beverages, the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determines a maximum limit of 20mg/100ml, since methanol can be formed in the production process or be added on purpose.

Considering this scenario, two colorimetric methods for methanol determination were developed in this work, based on (a) oxidation of the sample with potassium dichromate and subsequent staining of formaldehyde with chromotropic acid and (b) oxidation of the sample with potassium permanganate, decolorization of the manganese oxide formed and subsequent staining of formaldehyde with chromotropic acid.

Method (a) shows linearity from 0.2 to 0.6% methanol (v/v) and is selective for hydrated fuel ethanol, gasoline C, vodka, cachaça and whiskey. Method (b) has linearity from 0.2 to 0.7% (v/v) and is selective for hydrated fuel ethanol, gasoline C, vodka, cachaça, whiskey and alcohol vinegar. Both have a detection limit equal to 0.2% (v/v) in fuel ethanol and gasoline, below the specification limit of 0.5% (v/v).

Furthermore, both methods offer the same “conforming” and “nonconforming” sample tribute as gas chromatography, in addition to being fast (maximum 25 minutes), allowing batch analysis and enabling field performance through “quick test kits analysis”, being any trained person capable of operating. These kits could be used by gas stations, event producers, power plants, distributors, regulatory agencies, bars and by the entire population that wants to have a guarantee of the quality of fuel and beverages consumed and resold.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição das irregularidades em amostras de gasolina	27
Figura 2- Distribuição das irregularidades em amostras de etanol hidratado...	27
Figura 3- Reação de produção de metanol em bebidas alcoólicas a partir da pectina	29
Figura 4- Método $K_2Cr_2O_7$: Fluxograma de etapas	46
Figura 5- Método $KMnO_4$: Fluxograma de etapas	53
Figura 6- Teste do ácido cromotrópico em: formaldeído, ácido fórmico, acetaldeído, ácido acético e água (da esquerda para a direita).....	63
Figura 7- Reação entre ácido cromotrópico e formaldeído.....	64
Figura 8- Possível composto formado pela reação entre ácido cromotrópico e formaldeído.....	65
Figura 9 - Método $K_2Cr_2O_7$:Reação entre etapa de oxidação e etapa colorimétrica	65
Figura 10- Método $K_2Cr_2O_7$ em (a) EHC e (b) EHC com 0,5% de metanol PA	66
Figura 11- Método $K_2Cr_2O_7$ em gasolina	67
Figura 12- Teste de proveta realizado em GCC, GCA e GCP, respectivamente	67
Figura 13- Método $K_2Cr_2O_7$ aplicado a bebidas alcoólicas e a solução açucarada	68
Figura 14- Método $K_2Cr_2O_7$ -Linearidade: Oxidação em metanol + etanol de a) 0 a 0,6% e b) 0,7 a 50%	69
Figura 15- Método $K_2Cr_2O_7$ - Linearidade: Reação colorimétrica em metanol + etanol de a) 0 a 0,6% e b) 0,7 a 100%	70
Figura 16- Método $K_2Cr_2O_7$: Seletividade em EHA e EHC.	71
Figura 17- Método $K_2Cr_2O_7$: Seletividade em gasolina Comum e Premium e Aditivada	72
Figura 18- Método $K_2Cr_2O_7$: Seletividade em vodka, vinagre e whisky.....	72
Figura 19- Método $K_2Cr_2O_7$: Limite de Detecção (LD) em EHC.	74
Figura 20- Método $K_2Cr_2O_7$: Limite de Detecção (LD) em GCC, GCP e GCA.	74
Figura 21- Método $K_2Cr_2O_7$: Cromatograma da amostra teste e controle positivo antes das fortificações em EHC a) completo e b) ampliado.....	75 e 76

Figura 22- Método $K_2Cr_2O_7$:Cromatograma da amostra padrão antes da fortificação em EHC a) completo e b) ampliado.	76 e 77
Figura 23- Método $K_2Cr_2O_7$: Teste de formação de tributo com EHC	77
Figura 24- Método $K_2Cr_2O_7$: Cromatograma da amostra teste e controle positivo antes das fortificações em GCC a) completo e b) ampliado.	78 e 79
Figura 25- Método $K_2Cr_2O_7$: Cromatograma da amostra padrão antes da fortificação em GCC a) completo e b) ampliado.....	79 e 80
Figura 26- Método $K_2Cr_2O_7$: Teste de formação de tributo com GCC.	80
Figura 27- Método $K_2Cr_2O_7$: Determinação de cromo III por espectrometria no uv-visível.....	81
Figura 28- Método $K_2Cr_2O_7$: Determinação de cromo III- Gráfico de Absorbância x concentração	82
Figura 29- Planejamento Fatorial (I): Gráfico de Pareto	84
Figura 30- Planejamento Fatorial (I): Gráficos da desejabilidade.....	85
Figura 31- Planejamento Fatorial (II): Gráfico de Pareto	87
Figura 32- Planejamento Fatorial (III): Gráfico de Pareto.....	88
Figura 33- Planejamento Fatorial (III): Gráfico de superfície.....	88
Figura 34- Planejamento Fatorial (III): Gráfico de contorno	89
Figura 35- Planejamento Fatorial (III): Caminho de ascendência.	89
Figura 36- Método $KMnO_4$ em a) Etanol PA e EHC e b) Etanol PA e EHC + 0,5% metanol PA	92
Figura 37- Método $KMnO_4$ em gasolina comum.....	93
Figura 38- Método $KMnO_4$ em bebidas alcoólicas e solução açucarada	94
Figura 39- Método $KMnO_4$: Linearidade em metanol + etanol de a) 0 a 0,3% e b) 0,4 a 0,7% c) 0,8 a 5% d) 10 e 20%.....	95
Figura 40- Sugestão de escala padrão para comparação colorimétrica	95
Figura 41- Método $KMnO_4$: Seletividade em EHA.	96
Figura 42- Método $KMnO_4$: Seletividade em gasolina.	96
Figura 43- Método $KMnO_4$: Seletividade em a) bebidas alcoólicas e b) vinagre.	97
Figura 44- Método $KMnO_4$: Limite de Detecção (LD) em EHC e em EHA	98
Figura 45- Método $KMnO_4$: Limite de Detecção (LD) em GCC, GCA e GCP...99	
Figura 46- Método $KMnO_4$: Cromatograma da amostra teste e controle positivo antes das fortificações em EHC a) completo e b) ampliado.....	100

Figura 47- Método KMnO_4 : Cromatograma da amostra padrão antes da fortificação em EHC a) completo e b) ampliado	101
Figura 48- Método KMnO_4 : Teste de formação de tributo com EHC.....	102
Figura 49- Método KMnO_4 : Cromatograma da amostra teste e controle positivo antes das fortificações em GCC a) completo e b) ampliado	103
Figura 50- Método KMnO_4 : Cromatograma da amostra padrão antes da fortificação em GCC a) completo e b) ampliado.....	104
Figura 51- Método KMnO_4 : Teste de formação de tributo com GCC.	105
Figura 52- Método KMnO_4 Cromatograma da amostra desconhecida- Teste de performance a) completo e b) ampliado	107 e 108
Figura 53- Teste de performance com EHC para a) Método $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e b) Método KMnO_4	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Percentual de não conformidades por metanol em etanol combustível e gasolina de 2013 a 2020.	28
Tabela 2- Propriedades físico-químicas do etanol e do metanol	31
Tabela 3- Reações colorimétricas de identificação do formaldeído.....	33
Tabela 4- Descrição da tabela ANOVA.....	43
Tabela 5- Variáveis do planejamento fatorial 2^3 (I)	54
Tabela 6- Condições cromatográficas da análise de metanol em EHC....	61 e 62
Tabela 7- Método $K_2Cr_2O_7$: Análise RGB para bebidas alcoólicas e vinagre ...	73
Tabela 8- Método $K_2Cr_2O_7$: Valores de absorbância para quantificação de Cromo (III)	81
Tabela 9- Respostas experimentais do planejamento fatorial 2^3 (I).....	83 e 84
Tabela 10- Variáveis do planejamento fatorial 2^3 (II).....	85
Tabela 11- Respostas experimentais do planejamento fatorial 2^3 (II).	86
Tabela 12- Variáveis do planejamento fatorial 2^2	87
Tabela 13- Respostas experimentais do planejamento fatorial 2^2	87
Tabela 14- ANOVA do planejamento fatorial 2^2	90
Tabela 15- Efeitos do planejamento fatorial 2^2	91
Tabela 16- Método $KMnO_4$: Análise RGB para bebidas alcoólicas e vinagre...	97
Tabela 17- Seletividade para bebidas alcoólicas com os fotômetros (1) e (2)	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância (do Inglês *Analysis of Variance*)

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANVISA – Agência Nacional da Vigilância Sanitária

Cempec – Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados

DIC – Detector por Ionização de Chama

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

NBR – Norma Brasileira

MON – Motor Octane Number

RON – Research Octane Number

MBTE – Éter Metil-tec-butílico

ISO – International Organization for Standardization

PMQC – Programa de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis

EHC – Etanol Hidratado Combustível

EHA– Etanol Hidratado Aditivado

EHCP – Etanol Hidratado Combustível Premium

GCC – Gasolina Comum tipo C

GCA – Gasolina Aditivada tipo C

GCP – Gasolina Premium tipo C

SQR – Soma Quadrática da Regressão

SQres – Soma Quadrática Residual

SQt – Soma Quadrática Total

PA – Pronto para análise

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1. GASOLINA AUTOMOTIVA E ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	22
2.1.1. GASOLINA AUTOMOTIVA.....	22
2.1.2. ETANOL COMBUSTÍVEL	23
2.1.3. PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA QUALIDADE DOS COMBUSTÍVEIS E AÇÕES DE FISCALIZAÇÃO	25
2.1.4. FISCALIZAÇÃO DO ABASTECIMENTO EM NOTÍCIAS	26
2.2. BEBIDAS ALCOÓLICAS E VINAGRE.....	28
2.2.1. VODKA, WHISKY E CACHAÇA	28
2.2.2. VINAGRE.....	30
2.3. METANOL	30
2.3.1. METANOL E ETANOL (COMPARAÇÃO).....	31
2.3.2. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE METANOL EM ETANOL – HISTÓRICO	32
2.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	37
2.4.1. ENSAIO LIMITE.....	37
2.4.2. SELETIVIDADE.....	38
2.4.3. LIMITE DE DETECÇÃO (LD)	39
2.4.4. ROBUSTEZ	39
2.4.5. LINEARIDADE.....	40
2.4.6. EXATIDÃO/ RECUPERAÇÃO/ TENDÊNCIA / VERACIDADE.....	41
2.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL.....	41
2.5.1. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)	42
2.6. DETECÇÃO EM MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS.....	44
3. OBJETIVOS.....	45
3.1. OBJETIVOS GERAIS	45
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. TESTE DE SELETIVIDADE DO AGENTE CROMOGÊNICO	46
4.2. MÉTODO DA OXIDAÇÃO COM DICROMATO DE POTÁSSIO ($K_2Cr_2O_7$)	46
4.2.1. PREPARO DE SOLUÇÕES	47

4.2.1.1. SOLUÇÃO DE DICROMATO DE POTÁSSIO ($K_2Cr_2O_7$)	47
4.2.1.2. SOLUÇÃO DE ÁCIDO CROMOTRÓPICO ($C_{10}H_8O_8S_2$)	47
4.2.2. MÉTODO EM ETANOL PA E ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL.....	47
4.2.3. MÉTODO EM GASOLINA	48
4.2.4. MÉTODO EM BEBIDAS ALCOÓLICAS E VINAGRE	48
4.2.5. VALIDAÇÃO	49
4.2.5.1. LINEARIDADE.....	49
4.2.5.2. SELETIVIDADE.....	49
4.2.5.2.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL.....	49
4.2.5.2.2. GASOLINA.....	50
4.2.5.2.3. BEBIDAS ALCOÓLICAS DESTILADAS E VINAGRE	50
4.2.5.3. LIMITE DE DETECÇÃO	50
4.2.5.3.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	50
4.2.5.3.2. GASOLINA.....	51
4.2.5.4. TESTE DE FORMAÇÃO DE TRIBUTO	51
4.2.5.4.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	51
4.2.5.4.2. GASOLINA.....	52
4.2.6. QUANTIFICAÇÃO DO CROMO III	52
4.3. MÉTODO DA OXIDAÇÃO COM PERMANGANATO DE POTÁSSIO ($KMnO_4$).....	53
4.3.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL.....	53
4.3.2. PREPARO DE SOLUÇÕES	54
4.3.2.1. SOLUÇÃO DE PERMANGANATO DE POTÁSSIO ($KMnO_4$)	54
4.3.2.2. SOLUÇÃO DE SULFITO DE SÓDIO (Na_2SO_3)	54
4.3.2.3. SOLUÇÃO DE ÁCIDO CROMOTRÓPICO ($C_{10}H_8O_8S_2$)	54
4.3.3. MÉTODO EM ETANOL PA E ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL.....	54
4.3.4. MÉTODO EM GASOLINA	55
4.3.5. MÉTODO EM BEBIDAS ALCOÓLICAS E VINAGRE	56
4.3.6. VALIDAÇÃO	57
4.3.6.1. LINEARIDADE.....	57
4.3.6.2. SELETIVIDADE.....	57
4.3.6.2.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	57
4.3.6.2.2. GASOLINA.....	58
4.3.6.2.3. BEBIDAS ALCOÓLICAS DESTILADAS E VINAGRE	58
4.3.6.3. LIMITE DE DETECÇÃO.....	58
4.3.6.3.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	58
4.3.6.3.2. GASOLINA.....	59
4.3.6.4. TESTE DE FORMAÇÃO DE TRIBUTO	59
4.3.6.4.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	59
4.3.6.4.2. GASOLINA.....	60
4.3.6.5. TESTE DO ESPECTROFOTÔMETRO PORTÁTIL EM BEBIDAS.....	60
4.3.6.5.1. TESTE DE SELETIVIDADE PARA BEBIDAS ALCOÓLICAS E VINAGRE	60
4.3.6.6. TESTE DE PERFORMANCE PARA ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	61
4.3.6.6.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	61
4.3.6.6.2. ANÁLISE COLORIMÉTRICA.....	62

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1. TESTE DE SELETIVIDADE DO AGENTE CROMOGÊNICO	63
5.2. MÉTODO DA OXIDAÇÃO COM DICROMATO DE POTÁSSIO ($K_2Cr_2O_7$)	63
5.2.1. MÉTODO EM ETANOL PA E ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL.....	65
5.2.2. MÉTODO EM GASOLINA	66
5.2.3. MÉTODO EM BEBIDAS ALCOÓLICAS	68
5.2.4. VALIDAÇÃO	69
5.2.4.1. LINEARIDADE.....	69
5.2.4.2. SELETIVIDADE.....	71
5.2.4.2.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	71
5.2.4.2.2. GASOLINA.....	71
5.2.4.2.3. BEBIDAS ALCOÓLICAS E VINAGRE	72
5.2.4.2.3.1. ANÁLISE DE IMAGEM POR RGB.....	73
5.2.4.3. LIMITE DE DETECÇÃO.....	73
5.2.4.3.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	73
5.2.4.3.2. GASOLINA.....	74
5.2.4.4. TESTE DE FORMAÇÃO DE TRIBUTO	75
5.2.4.4.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	75
5.2.4.4.2. GASOLINA.....	78
5.2.5. QUANTIFICAÇÃO DE CROMO III.....	81
5.3. MÉTODO DA OXIDAÇÃO COM PERMANGANATO DE POTÁSSIO ($KMnO_4$).....	82
5.3.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL	83
5.3.2. MÉTODO EM ETANOL PA E ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL.....	91
5.3.3. MÉTODO EM GASOLINA	92
5.3.4. MÉTODO EM BEBIDAS ALCOÓLICAS	93
5.3.5. VALIDAÇÃO	94
5.3.5.1. LINEARIDADE.....	94
5.3.5.2. SELETIVIDADE.....	95
5.3.5.2.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	95
5.3.5.2.2. GASOLINA.....	96
5.3.5.2.3. BEBIDAS ALCOÓLICAS E VINAGRE	96
5.3.5.2.3.1. ANÁLISE DE IMAGEM POR RGB.....	97
5.3.5.3. LIMITE DE DETECÇÃO.....	98
5.3.5.3.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	98
5.3.5.3.2. GASOLINA.....	99
5.3.5.4. TESTE DE FORMAÇÃO DE TRIBUTO	99
5.3.5.4.1. ETANOL HIDRATADO COMBUSTÍVEL	99
5.3.5.4.2. GASOLINA.....	102
5.3.5.5. TESTE COM FOTÔMETRO PORTÁTIL	105

5.3.5.5.1. SELETIVIDADE EM BEBIDAS ALCOÓLICAS E VINAGRE	105
5.3.5.6. TESTE DE PERFORMANCE EM EHC	106
5.3.5.6.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	106
5.3.5.6.2. ANÁLISE COLORIMÉTRICA	108
 6. CONCLUSÕES	 110
 7. REFERÊNCIAS.....	 111

1. INTRODUÇÃO

A instabilidade geopolítica dos principais produtores de petróleo no mundo causa um forte impacto nos preços de seus produtos derivados. Tal situação reflete no Mercado brasileiro, atingindo toda a cadeia de combustíveis. Apesar das resoluções da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), há inúmeros relatos de práticas fraudulentas que comprometem a qualidade dos combustíveis, além de gerar prejuízo ao fisco, à sociedade e ao meio ambiente.¹

Uma das adulterações que vêm chamando a atenção dos órgãos reguladores e que causa forte impacto na política de preços e na saúde pública é a adição de metanol no etanol e na gasolina. Atualmente, a legislação brasileira não permite seu uso como combustível, sendo permitida somente sua aplicação como solvente ou como insumo na indústria de transformação, pois o metanol é extremamente tóxico e causa sérios danos ao meio ambiente e a saúde pública.²

De acordo com a Resolução Nº 807, de 23.01.2020 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a quantidade máxima permitida de metanol na gasolina automotiva é de 0,5% (v/v).³ Este valor limítrofe também se aplica ao etanol combustível, anidro e hidratado, de acordo com a Resolução ANP Nº 19, de 15.4.2015.⁴

No caso de bebidas alcoólicas, o uso de matérias-primas de baixa qualidade, além da hidrólise de pectinas no processo de fabricação podem levar o produto final a conter metanol, porém a ingestão deste composto causa intoxicação grave com risco de morte. Sendo assim, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina que a concentração de metanol na água ardente de cana, na cachaça, na vodca e no whisky não deve ultrapassar 20mg/100mL.^{5,6,7}

No vinagre de vinho, o metanol pode ser formado a partir da hidrólise da pectina da uva e pode ser liberado durante a maceração na vinificação e como não é oxidado pelas bactérias acéticas, a quantidade inicialmente presente no vinho passa para o vinagre. A legislação brasileira não estabelece limites para o teor de metanol em vinagres.⁸

Tendo em vista as questões envolvendo o metanol, buscou-se neste

trabalho o desenvolvimento de um método colorimétrico capaz de determinar metanol em etanol combustível, gasolina, bebidas alcoólicas destiladas e vinagre. Atualmente, o método mais empregado para tal finalidade é a cromatografia gasosa, que além de ter um alto custo instrumental, necessita de infraestrutura laboratorial, analistas especializados e exige um tempo elevado para análise e emissão dos resultados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gasolina Automotiva e Etanol Hidratado Combustível

2.1.1. Gasolina Automotiva

Pela Resolução Nº 807, de 23.01.2020, atualmente vigente, a ANP estabelece as especificações das gasolinas de uso automotivo e as diretrizes de controle de qualidade a serem seguidas pelos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional.³

De acordo com a Resolução, as gasolinas automotivas classificam-se em:

I - Gasolina A Comum: combustível produzido a partir de processos utilizados nas refinarias, centrais de matérias-primas petroquímicas e formuladores, destinado aos veículos automotivos que possuem motores de ignição por centelha, isento de componentes oxigenados;

II - Gasolina A Premium: combustível de elevada octanagem, produzido a partir de processos utilizados nas refinarias, centrais de matérias-primas petroquímicas e formuladores, destinado aos veículos automotivos que possuem motores de ignição por centelha que exija uma gasolina com maior octanagem, isento de componentes oxigenados;

III - Gasolina C Comum: combustível obtido a partir da mistura de gasolina A comum e de etanol anidro combustível, nas proporções definidas pela legislação em vigor;

IV - Gasolina C Premium: combustível obtido a partir da mistura de gasolina A premium e de etanol anidro combustível, nas proporções definidas pela legislação em vigor.³

O procedimento de medição de octanagem da gasolina é o método RON (Research Octane Number). Para incrementar o RON de uma gasolina, adiciona-se hidrocarbonetos com alta resistência à detonação, podendo ser tolueno, MBTE (Éter Metil-tec-butílico) ou álcoois. No Brasil, faz-se uso de etanol para este fim, já que tal aplicação possui vantagens econômicas, sociais, ambientais e técnicas, devido ao alto calor latente de evaporação do etanol, que traz vantagens para o desempenho do motor.⁹

Atualmente, a Gasolina Premium tem octanagem mínima de 97 unidades, medida pelo índice RON e até 50 mg/kg de teor de enxofre. Já a Gasolina Comum possui teor de enxofre de até 50 mg/kg e octanagem mínima de 93 unidades, medida pelo método RON.³

Ainda segundo a Resolução Nº 807 da ANP, somente distribuidores de combustíveis líquidos estão autorizados a realizar a adição de etanol anidro combustível à gasolina A, para formulação da gasolina C, devendo atender à regulamentação vigente da ANP, atualmente valendo a proporção de 27% (v/v).³

A mesma Resolução determina que o teor máximo de metanol permitido na gasolina é 0,5% v/v, sendo proibida sua adição. A quantificação deve ser realizada quando houver suspeita de contaminação, que pode ser indicada por métodos que identifiquem qualitativamente a presença de metanol, com base na ISO 1388-8, ou em outros métodos que se tornem normalizados. Caso seja utilizada a ISO 1388-8, qualquer mudança de coloração, de incolor para azul no tubo de ensaio da amostra (indicativo da presença de metanol) ou ainda na obtenção de resultados inconclusivos, exige-se a confirmação pelo método cromatográfico ABNT NBR 16041.³

2.1.2. Etanol Combustível

O etanol, ou álcool etílico, de fórmula molecular C_2H_5OH , é composto por dois átomos de carbono, seis átomos de hidrogênio e um oxigênio e possui massa molar igual a 46,07 g/mol. A 25 ° C, sua densidade é igual a 0,7851 g/cm³.¹⁰

No Brasil, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar surgiu na tentativa de amenizar as sucessivas crises do setor açucareiro e reduzir a dependência do petróleo importado. Assim, no início do século XX, ocorreram as primeiras ações para implantar o etanol na matriz energética brasileira. Em 1975, foi lançado o Programa Nacional do Álcool (Pro-álcool), já que apesar dos aumentos sucessivos do preço do petróleo e das políticas governamentais de subsídios, o etanol ainda não era economicamente viável para atender às necessidades do mercado consumidor. Porém, na década de 80, quando os subsídios foram retirados, o Brasil já era um grande exportador de açúcar. No início do século XXI, havia no país um setor sucroalcooleiro estruturado e competitivo, devido a

alta relevância do mercado interno de etanol e dos novos mercados do açúcar. Em 2003, com o advento dos veículos flex-fuel, o setor ganhou ainda mais impulso.¹¹

Com contribuição significativa do etanol, o Brasil chegou a alcançar autossuficiência em combustíveis líquidos. Ademais, devido a redução de seus custos de produção e ao aumento do preço internacional do petróleo, o etanol tornou-se um biocombustível altamente competitivo em relação à gasolina, tanto no mercado interno quanto no externo.¹¹

As matrizes energéticas com grande potencial para substituir adequadamente os derivados de petróleo são aquelas obtidas a partir de biomassa, já que biomassa seca contém cerca de metade da energia contida na mesma massa de petróleo. Há vários possíveis combustíveis derivados de biomassa, dentre eles, ganham destaque as plantas lignocelulósicas, que podem fornecer etanol, metanol e outros álcoois ou, alternativamente, um gás. Atualmente, o etanol é produzido, principalmente, a partir da cana-de-açúcar, do milho, da beterraba e do sorgo. Após a fermentação da matéria-prima, o álcool é obtido na concentração de 10 a 14%, portanto uma destilação fracionada é necessária.¹¹

A partir da Resolução Nº 19, de 15.04.2015, atualmente vigente, a ANP estabelece as especificações do Etanol Anidro Combustível e do Etanol Hidratado Combustível, além das obrigações quanto ao controle de qualidade a serem seguidas pelos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional.⁴

De acordo com esta Resolução, os álcoois etílicos que podem ser usados como combustível se dividem em:

I- Etanol Anidro Combustível (EAC): Etanol Combustível destinado a mistura com gasolina A na formulação da gasolina C, deve possuir teor de etanol de no mínimo, 98% em volume;

II - Etanol Combustível: biocombustível proveniente da fermentação de biomassa renovável, destinado ao uso em motores a combustão interna e que possui como principal componente o etanol;

III - Etanol Hidratado Combustível (EHC): Etanol Combustível utilizado em motores a combustão interna, deve possuir teor de etanol de no mínimo, 94,5% em volume;

IV - Etanol Hidratado Combustível Premium (EHCP): Etanol Hidratado Combustível, com massa específica a 20°C variando entre 799,7 e 802,8 kg/m³ e deve possuir teor mínimo de etanol de 96,3% em volume.

Pela mesma resolução, a ANP também estabelece que o teor máximo de metanol permitido em etanol combustível, seja anidro, hidratado comum ou premium é de 0,5% em volume. O valor medido deverá estar presente no Boletim de Conformidade emitido pelo distribuidor de Etanol. Sendo assim, métodos que identifiquem a presença de metanol de maneira qualitativa com base na norma ISO 1388-8, bem como outros métodos que venham a ser normalizados para este fim podem ser utilizados. Caso seja utilizada a norma ISO 1388-8, qualquer mudança de coloração de incolor para azul, que indique a presença de metanol, ou ainda a obtenção de resultados inconclusivos, exige que a quantificação seja determinada pelo método cromatográfico ABNT NBR 16041.⁴

Se o Fornecedor de Etanol Combustível optar por não realizar a análise de metanol pelos métodos indicados, o campo "Resultado" do Certificado de Qualidade deverá ser deixado em branco, porém, deve-se declarar expressamente que o etanol combustível contém teor de metanol abaixo do limite da especificação, de 0,5% em volume, e que assume toda e qualquer responsabilidade pelo não atendimento à especificação.⁴

2.1.3. Programa de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis e Ações de Fiscalização

O Programa de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis (PMQC) foi instituído pela ANP em 1998. Os objetivos deste Programa são identificar os focos de não conformidade para direcionar as fiscalizações, além de gerar subsídios para ações do Ministério Público, Procons e Secretarias de Fazenda.¹²

A cada mês, são coletadas amostras de gasolina, etanol hidratado combustível e diesel em postos revendedores escolhidos por sorteio. As amostras são analisadas em relação a diversos parâmetros de qualidade no Centro de Pesquisas e Análises Tecnológicas da ANP, em Brasília e nos laboratórios de universidades e instituições de pesquisa contratados pela Agência. Os resultados obtidos no PMQC são publicados regularmente pela ANP no Boletim de Monitoramento de Qualidade dos Combustíveis.¹²

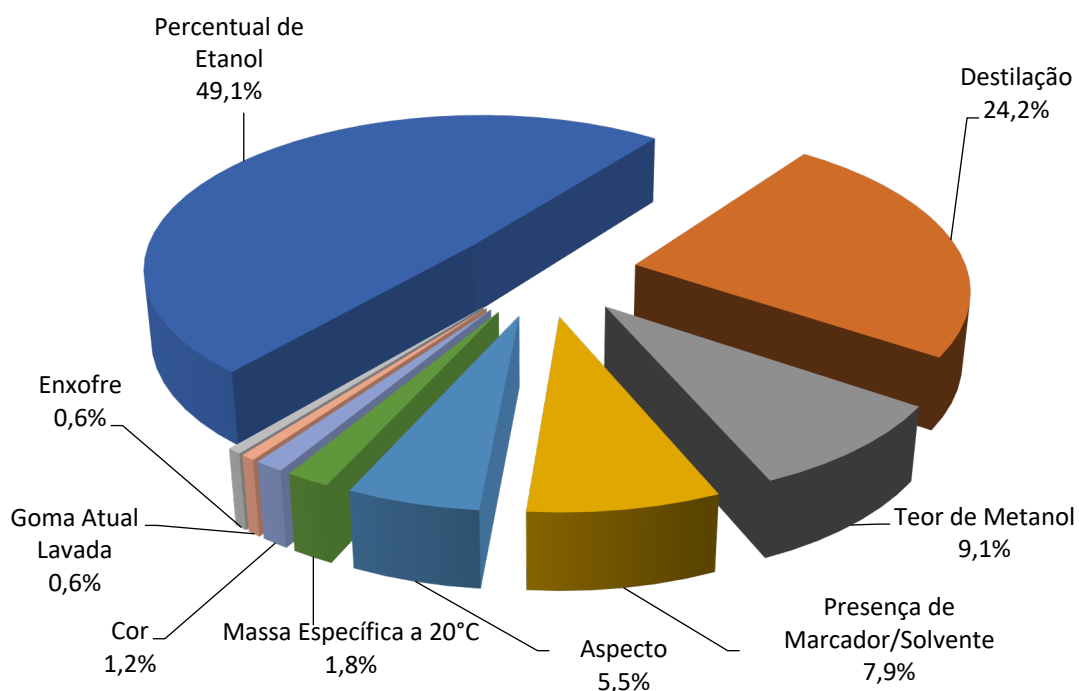
Ao mesmo tempo, fiscais podem autuar e interditar estabelecimentos regulados, recolher amostras de combustíveis e outros produtos para análises físico-químicas, além de atuar em forças-tarefas em conjunto com outros órgãos públicos. Portanto, é papel da Fiscalização da ANP e de alguns órgãos conveniados lacrar bombas e fechar postos revendedores, entre outras medidas corretivas, como interdição de equipamentos e instalações, apreensão de bens e produtos, além de aplicar penalidades na forma de multa, cancelamento de registro do posto revendedor e revogação da autorização de funcionamento.¹²

2.1.4. Fiscalização do Abastecimento em Notícias

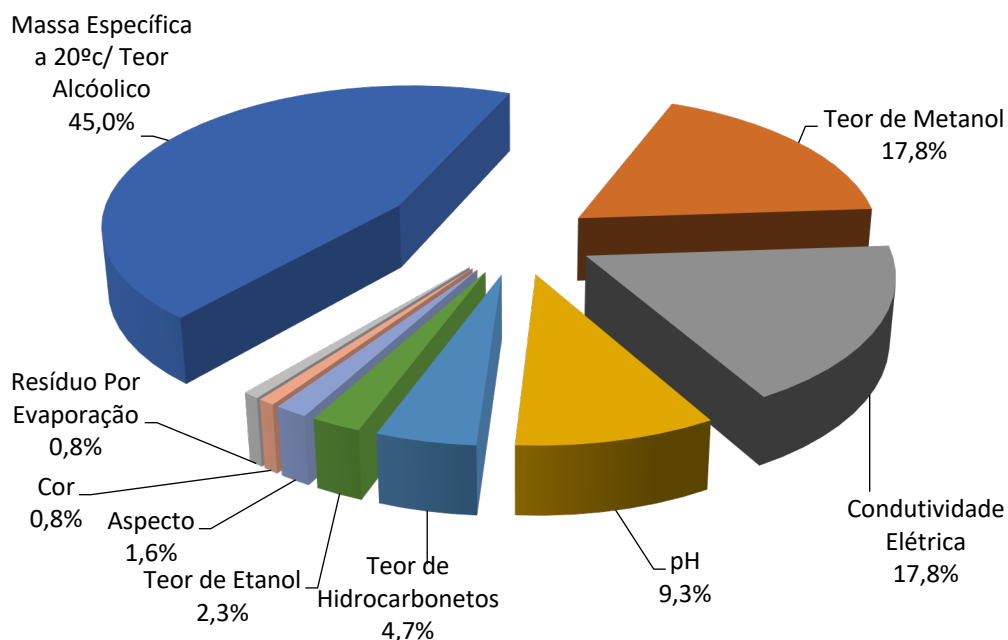
A ANP publica semestralmente o boletim Fiscalização do Abastecimento em Notícias, que sintetiza os principais resultados das ações de fiscalização.¹³

O combustível é considerado “não conforme” quando há desvio em relação a qualquer um dos itens da especificação definida pela Agência Reguladora. Isso pode ocorrer devido a adulteração, que é a adição ilegal de qualquer substância ao produto ou a alguma contaminação que possa surgir nas etapas de produção. Também vale destacar que, devido a natureza volátil dos combustíveis, os mesmos estão suscetíveis a perdas por evaporação, que a depender da intensidade podem retirá-los da especificação vigente.

Na edição do 1º Semestre de 2021 é possível verificar que o combustível com maior número de irregularidades no período analisado foi a gasolina, sendo o percentual de metanol acima do permitido responsável por 9,1% das autuações (Figura 1).¹³

Figura 1- Distribuição das irregularidades em amostras de gasolina

Já para o etanol hidratado, o teor de metanol foi responsável por 17,8% das irregularidades (Figura 2).¹³

Figura 2- Distribuição das irregularidades em amostras de etanol hidratado

A Tabela 1 apresenta o percentual das irregularidades referentes ao teor de metanol verificadas em Etanol Hidratado Combustível (EHC) e gasolina

segundo o balanço anual de fiscalizações da ANP, entre 2013, início do controle deste parâmetro a 2020, último balanço anual lançado até o momento. Assim, é possível notar que as adições ilegais de metanol seguem afetando a gasolina e principalmente o etanol hidratado, mesmo com o monitoramento da qualidade realizado pelo PMQC.

Tabela 1- Percentual de não conformidades por metanol em etanol combustível e gasolina de 2013 a 2020.

Ano	EHC (%)	Gasolina (%)
2013 ¹⁴	16	14
2014 ¹⁵	7	7
2015 ¹⁶	18	6
2016 ¹⁷	43,7	4,7
2017 ¹⁸	37	20
2018 ¹⁹	22	15
2019 ²⁰	16	6
2020 ²¹	15,6	6

2.2. Bebidas alcoólicas e vinagre

2.2.1. Vodca, whisky e cachaça

Pelo Decreto 6871/2009 de 05 de junho de 2009, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define;

I - Cachaça é denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume, a 20 °C, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares até 6g/L. A cachaça que contiver açúcares em quantidade superior a 6g/L e inferior a 30 g/L será denominada cachaça adoçada.

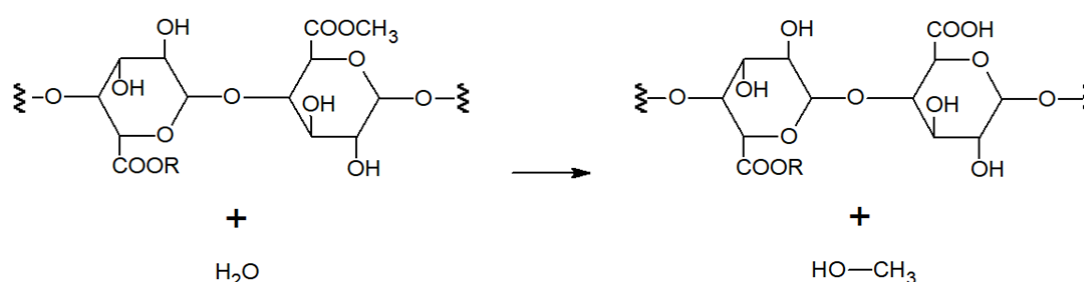
II - Vodca, vodka ou wodka é a bebida com graduação alcoólica de 36% a 54% em volume, a 20 °C, obtida de álcool etílico potável de origem agrícola ou de destilado alcoólico simples de origem agrícola retificado, seguidos ou não de filtração por carvão ativado, como forma de atenuar os caracteres organolépticos da matéria-prima original. Poderá ser adicionada de açúcares até 2g/L.

III - Uísque, whisky ou whiskey é a bebida com graduação alcoólica de 38% a 54% em volume, a 20 °C, obtida do destilado alcoólico simples de cereais envelhecido, parcial ou totalmente maltados, podendo ser adicionado de álcool etílico potável de origem agrícola, ou de destilado alcoólico simples de cereais, bem como de água para redução da graduação alcoólica e caramelo para correção da cor.²²

No Brasil, realiza-se a análise de voláteis em bebidas alcoólicas para verificar se as características do produto estão de acordo com a legislação vigente, devido a formação de compostos secundários durante a fermentação. Um desses compostos é o metanol, que está naturalmente presente em bebidas alcoólicas destiladas e fermentadas, e pode ser facilmente absorvido pelo organismo, acumulando-se no sangue, nos músculos e nos olhos. Para o ser humano, o consumo de 20 mL de metanol pode causar cegueira e o de 60 mL pode ser mortal sem tratamento adequado.²³

Desconsiderando a adição intencional de metanol (adulteração) em bebidas alcoólicas destiladas e fermentadas, sua presença está associada à atividade da enzima pectinase em meio ácido, que promove a degradação da pectina, um polissacarídeo que está presente na parede celular vegetal. Obtém-se como produto de degradação ácido galacturônico e metanol conforme a Figura 3.²³

Figura 4- Reação de produção de metanol em bebidas alcoólicas a partir da pectina



Em relação ao teor de metanol em bebidas, o MAPA determina a partir da Portaria Nº 339, de 28 de junho de 2021, da Instrução Normativa MAPA Nº 29 de 19 de setembro de 2012 e da Instrução Normativa MAPA Nº 15, de 31 de março de 2011, que a concentração de metanol na aguardente de cana e na cachaça, na vodca e no whisky não devem ultrapassar 20mg/100mL, respectivamente.^{5,6,7}

2.2.2. Vinagre

Segundo a Instrução Normativa nº 14, de 8 de fevereiro de 2018, o MAPA define que vinagre de vinho é o produto obtido a partir da fermentação acética do vinho.²⁴ Já o vinagre de álcool é obtido através da fermentação acética do fermentado alcoólico de mistura hidroalcoólica originária do álcool etílico potável de origem agrícola, de acordo com a Instrução Normativa nº 6, de 3 de abril de 2012.²⁵

O parâmetro de qualidade mais importante para o vinagre é a acidez volátil ou teor do ácido acético proveniente da oxidação do álcool no processo de acetificação. O vinagre para consumo deve ter entre 4% e 6% de ácido acético. Já o grau alcoólico representa o resíduo do processo de acetificação. Todo vinagre deve ter uma porcentagem alcoólica de no máximo 1,0% (v/v), caso contrário, as bactérias acéticas, na ausência de um substrato alcoólico, podem degradar o ácido acético presente.⁸

No vinagre, o metanol provém do vinho utilizado na acetificação, podendo ser formado a partir da hidrólise da pectina da uva e pode ser liberado durante a maceração na vinificação. Como não é oxidado pelas bactérias acéticas, a quantidade inicialmente presente no vinho passa para o vinagre. A legislação brasileira não estabelece limites para o teor de metanol em vinagres.⁸

2.3. Metanol

O metanol, ou álcool metílico, de fórmula molecular CH_3OH , é um álcool formado por um átomo de carbono, quatro átomos de hidrogênio e um de oxigênio, com massa molar igual a 32,04 g/mol. A 25 °C, sua densidade é igual a 0,7918 g/cm³.²⁶

O metanol possui relevância na indústria química, pois é utilizado como matéria-prima para síntese de diversos produtos, como formaldeído, metil terc-butílico éter (MTBE) e ácido acético, que, por sua vez, são utilizados na produção de adesivos, solventes, pisos e revestimentos. No mercado brasileiro, possui papel crucial na produção do biodiesel, que é um combustível renovável adicionado ao diesel de origem fóssil.²⁷

Em escala industrial, o metanol é majoritariamente obtido a partir do gás natural pelo processo de reforma ou gaseificação do carvão e a maior parte deste álcool é direcionada para a produção de formaldeído.²⁷

Considerando a toxicidade do produto, seu potencial como adulterador do etanol hidratado combustível e da gasolina C, além dos riscos à saúde e à segurança pública e privada quando armazenado e movimentado sem controle, a ANP passou a regulamentar o metanol pelas Resoluções ANP N° 696/2017 e N° 697/2017, incluindo-o na definição de solvente e adequando seus atos normativos a fim intensificar seu controle no território nacional.^{27,28,29}

A partir da Resolução N° 696, de 31.08.2017, a ANP classifica o metanol como solvente e intensifica o controle da Agência sobre este produto.²⁸ Já a Resolução ANP N° 697, de 31.08.2017, estabelece o registro obrigatório dos dutos e terminais que movimentam metanol.²⁹

2.3.1. Metanol e etanol (comparação)

Tanto o metanol quanto o etanol são líquidos a temperatura ambiente de 25 ° C, incolores, translúcidos e miscíveis em água. Suas características físico-químicas são muito semelhantes, conforme a Tabela 2, de modo que a distinção entre ambos em uma mistura se torna inviável ou com pouca precisão. Ambos os álcoois são inflamáveis, porém metanol em combustão produz chama incolor, além de ser altamente tóxico e corrosivo.³⁰

Tabela 2- Propriedades físico-químicas do etanol e do metanol

Propriedades	Etanol	Metanol
Fórmula Molecular	C ₂ H ₅ OH	CH ₃ OH
Temperatura de Fusão (° C)	-114	-98
Temperatura de Ebulição (° C)	78	64
Densidade (g/cm ³)	0,7851	0,7918
Índice de Refração (n ²⁰)	1,360-1363	1,328-1,330

2.3.2. Métodos de detecção de metanol em etanol – Histórico

Ao longo da história, diversos métodos foram desenvolvidos para determinar metanol em etanol, de modo qualitativo e quantitativo, para aplicação principalmente a bebidas alcoólicas. Porém, a similaridade química entre estes álcoois, além dos interferentes contidos nas matrizes prejudicavam a seletividade e a sensibilidade de tais métodos.³⁰

Em 1920, Alexander Gettler avaliou a confiabilidade, a especificidade, a sensibilidade e a influência de interferentes de vários métodos para determinar metanol existentes até aquele momento, e com isso, publicou um estudo crítico, utilizando como matriz mais de 250 licores.³¹

Segundo o autor, os testes para álcool metílico podem ser divididos em dois grupos: (A) oxidação do álcool metílico a formaldeído, posteriormente identificado por reação colorimétrica; (B) teste realizado diretamente na amostra alcoólica. Em ambos os casos, realizou-se, previamente, uma destilação fracionada do licor, para concentrar e liberar os álcoois da mistura não volátil.

Métodos do Grupo A: a oxidação pode ser feita por um dos seguintes procedimentos: submersão de uma espiral de cobre incandescente no líquido; passagem de vapores de álcool e ar através de um tubo sobre cobre quente; uso de platina finamente dividida ou através da reação com algum agente oxidante, podendo ser: permanganato alcalino; dicromato de potássio e ácido sulfúrico; ácido crômico; persulfato de sódio e ácido sulfúrico; peróxido de manganês e ácido sulfúrico; peróxido de chumbo e ácido ou álcali; peróxido de hidrogênio e álcali.

É extremamente improvável que a oxidação produza somente aldeído e não prossiga até a geração dos ácidos carboxílicos correspondentes. Ademais, há sempre um traço de formaldeído proveniente do etanol, equivalente a 1%. Após a oxidação, é necessário consumir o excesso do agente oxidante, adicionando-se ácido sulfuroso em ebulição, ou ácido oxálico. Depois, as reações de identificação do formaldeído podem ser realizadas com reagentes cromóforos, sintetizados na Tabela 3, junto com a cor resultante.

Tabela 3- Reações colorimétricas de identificação do formaldeído.

Classificação do Reagente	Reagentes	Cor
Fenilhidrazina	1. Cloridrato de fenilhidrazina, cloreto férrico e ácido clorídrico ou sulfúrico concentrado	Carmim
Fenilhidrazina	2. Cloridrato de fenilhidrazina, cloreto de ferro e ácido sulfúrico concentrado	Carmim
Fenilhidrazina	3. Cloridrato de fenilhidrazina, nitroprussiato de sódio, hidróxido de sódio	Azul escuro
Fenilhidrazina	4. Cloridrato de fenilhidrazina, ferricianeto de potássio, ácido clorídrico concentrado	Vermelho
Fenilhidrazina	5. Cloridrato de fenilhidrazina, acetato de sódio e ácido sulfúrico e fervura	Amarelo esverdeado
Fenilhidrazina	6. Cloridrato de fenilhidrazina, cloreto de manganês e ácido clorídrico concentrado	Rosa
Fenol	7. Fenol e ácido sulfúrico	Vermelho
Fenol	8. Resorcina, hidróxido de sódio e aquecimento	Vermelho
Fenol	9. Resorcina e ácido sulfúrico	Vermelho
Fenol	10. Resorcina, ácido clorídrico e fervura	Vermelho
Alcaloide	11. Morfina, ácido sulfúrico concentrado	Violeta/azul
Alcaloide	12. Morfina, leite, ácido sulfúrico concentrado	Azul
Alcaloide	13. Codeína, ácido sulfúrico concentrado	Roxo
Proteínas	14. Leite, cloreto férrico e aquecimento	Violeta
Proteínas	15. Leite, ácido sulfúrico, cloreto férrico	Violeta
Proteínas	16. Albumina, cloreto férrico, ácido sulfúrico	Violeta
Proteínas	17. Albumina, ácido nitroso, ácido clorídrico e aquecimento	Violeta
Proteínas	18. Peptona, cloreto férrico, ácido clorídrico e aquecimento	Violeta
Amina	19. Difenilamina, ácido sulfúrico	Verde
Amina	20. Dimetilanilina, peróxido de chumbo, ácido acético e aquecimento	Azul
Amina	21. Carbazol, ácido acético glacial quente, ácido clorídrico ou sulfúrico	Precipitado branco
Amina	22. Carbazol, ácido sulfúrico concentrado	Azul
Peróxido	23. Peróxido de benzoíla, ácido sulfúrico	Vermelho
Triarilmetano	24. Fcsina, ácido sulfúrico	Violeta

Os testes colorimétricos que foram mais sensíveis e geraram uma resposta confiável para os licores foram os de número 1, 3, 18 e 24.³¹

Já os Métodos do Grupo B são baseados na interação direta do álcool metílico com o reagente adicionado, podendo ser:

1. Sulfonato de alizarina de sódio em solução alcalina: produz uma cor violeta com álcool etílico e metílico. Se cristais de ácido oxálico são adicionados, o metanol produz precipitado viscoso.
2. Iodo e fósforo vermelho: produzem iodeto de metila, que é tratado com anilina e hidróxido de sódio. As bases oleosas que sobem ao topo são removidas e oxidadas com uma mistura de areia, cloreto de sódio e nitrato cúprico sob aquecimento. O produto é absorvido com álcool quente, que se torna vermelho se apenas o etanol estiver presente e violeta se houver qualquer quantidade de metanol.
3. Iodo e fósforo vermelho: geram iodeto de metila, que, destilado com nitrato de prata, gera nitrometano. Adiciona-se amônia e vanilina em aquecimento. Se o metanol estiver presente, surge uma cor vermelha.
4. Bórax: quando misturado com álcool metílico e inflamado gera chama verde.
5. Ácido selênico e traços de brometo de prata: precipitam o etanol, mas não o metanol.
6. Hidroxilamina e hidróxido de potássio em ebulição por 7 horas em refluxo: geram cianeto, que é identificado com sulfocianeto de amônio.
7. Determina-se o índice de refração do destilado obtido por um refratômetro de imersão, a 20°C. A adição de metanol ao etanol diminui o índice de refração de maneira proporcional a quantidade presente e realiza-se o cálculo quantitativo por interpolação.

O procedimento mais usado para detecção de metanol em licores pelo autor foi destilar a matriz e dividir o produto em duas porções: destilado I, e destilado II. O segundo foi testado com as reações do grupo B, já ao destilado A, adicionou-se ácido sulfúrico a 10%, 6g de dicromato de potássio e deixou-se repousar por 10 minutos. Depois, realizou-se uma destilação para obter o formaldeído e por último, realizou-se os testes do grupo A.

Contudo, o autor concluiu que todos os métodos do grupo B requerem uma grande quantidade de amostra e não são sensíveis. Ademais, na maioria das vezes, os testes são longos e envolvem muitas etapas. Era necessário confirmar os testes colorimétricos do grupo A com algum método do grupo B.

Além disso, a oxidação feita com a espiral de cobre incandescente libera formaldeído, que era detectado através do odor, comprometendo a saúde do analista. Métodos que liberam cianeto ou utilizam chumbo também são contraindicados devido a toxicidade.³¹

Em 1921, Chapin descreveu um método para determinar metanol em etanol, baseado na adição de ácido fosfórico e solução de permanganato de potássio 3% à amostra, que permanece em repouso por 30 minutos. Em seguida, adiciona-se ácido oxálico 10% e deixa-se repousar por 2 minutos até o desaparecimento da cor castanha. Depois, adiciona-se ácido sulfúrico concentrado e mantém-se o frasco em repouso para as temperaturas se equilibrarem. Por fim, adiciona-se Reagente de Schiff e o frasco permanece em repouso até o aparecimento da cor, que pode levar de 0,5 a 2 horas. Este método, além de demandar um alto tempo, exige purificação das matrizes por destilação quando houver algum interferente do reagente de Schiff, que é o caso de carboidratos e gliceróis.³²

Em 1948, Boos propôs um método para determinação de metanol, onde primeiramente, o material orgânico é diluído em água e posteriormente destilado. Depois, adiciona-se ácido fosfórico diluído e solução de permanganato de potássio e aguarda-se a oxidação por 10 minutos. Então, bissulfito de sódio é adicionado para reduzir o excesso de permanganato. Depois, resfria-se a solução num banho de gelo com agitação enquanto ácido sulfúrico concentrado é adicionado. Em seguida, adiciona-se ácido cromotrópico e coloca-se o frasco num banho-maria a 60°C por 15 minutos, e depois resfria-se o frasco em banho de gelo. Por fim, realiza-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro.³³

Em 1981, foi publicada a ISO 1388-7:1981, que especifica um método fotométrico para a determinação do teor de metanol em etanol para uso industrial. A metodologia é baseada na conversão do metanol presente em formaldeído com uma solução de permanganato de potássio e ácido fosfórico. Em seguida, realiza-se uma reação do formaldeído gerado com ácido cromotrópico (ácido 4,5-dihidroxi-naftaleno-2,7-dissulfônico). Por último, realiza-se a medição fotométrica da coloração violeta obtida no comprimento de onda de 570 nm. O método é aplicável a produtos com teor de metanol entre 0,01 e 0,20 % (v/v).³⁴

Em 1981, também foi publicada a ISO 1388-8:1981, que especifica outro método para a determinação do teor de metanol em etanol para uso industrial, aplicável a produtos com teores entre 0,10 e 1,50 % (v/v). O princípio baseia-se na conversão do metanol em formaldeído com permanganato de potássio e ácido fosfórico, seguida da reação do formaldeído gerado com o reagente de Schiff. A comparação visual da cor obtida com as soluções colorimétricas padrão contendo quantidades conhecidas de formaldeído indicam a concentração de metanol presente na amostra.³⁵ Em 2021, a Associação Brasileira de Normas Técnicas criou a ABNT NBR 16943, baseada no método da ISO 1388-8:1981, com acréscimo de um medidor de cor digital.³⁶

Segundo a Resolução ANP Nº 19, de 15.04.2015 ¹, alterada pela Resolução ANP Nº 740, de 15.08.2018,³⁷ que regulamentam o etanol combustível, e segundo a Resolução ANP Nº 807, de 23.01.2020 ², que regulamenta a gasolina, nas análises de monitoramento da qualidade e de fiscalização, a determinação quantitativa de metanol é realizada pelo método cromatográfico da norma ABNT NBR 16041. Vale destacar que, se durante a utilização do método colorimétrico da ISO 1388-8 ocorrer qualquer mudança de coloração da amostra para azul, indicativo da presença de metanol, ou ainda na obtenção de resultados inconclusivos, é necessária sua confirmação por cromatografia gasosa. Neste método, a amostra é injetada num cromatógrafo a gás, sendo seus componentes separados em coluna capilar porosa e detectados através de ionização por chama de hidrogênio. A identificação de metanol na amostra é feita por comparação do tempo de retenção com o de um padrão analisado nas mesmas condições e a quantificação é realizada por padronização externa. 38

Já o MAPA possui o “Manual de Métodos e Análises de Bebidas e Vinagres (Métodos 16 e 24)” onde apresenta-se um método colorimétrico para quantificação de metanol em bebidas e vinagres. O Método 16, descreve uma metodologia colorimétrica semelhante ao trabalho de Boos, com leitura espectrométrica da cor gerada a 575 nm e no fim, a concentração de metanol (%) é dada através de um cálculo. ³⁹ No Método 24, a metodologia é um pouco mais simples, mas ainda depende de um banho-maria de 20 minutos ao adicionar a solução de ácido cromotrópico e da leitura de absorbância da solução em espectrofotômetro em 570 nm.⁴⁰

2.4. Validação de métodos analíticos

A validação visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos e que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação estabelecidos. Trata-se de um estudo experimental e integralmente documentado, que proporciona rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para tomada de decisões.^{41,42}

Os parâmetros de desempenho segundo o Guia de Validação do INMETRO devem estar claramente descritos no procedimento e relatório de validação e devem incluir, quando aplicável:

- Seletividade
- Linearidade / Faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade
- Limite de Detecção (LD)
- Limite de Quantificação (LQ)
- Tendência/Recuperação
- Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade)
- Robustez⁴³

A validação parcial deve avaliar, pelo menos, os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade. Além disso, os ensaios devem ser realizados com padrões e amostras similares ou idênticas àquelas que serão analisadas rotineiramente e durante o planejamento e a execução da validação, os parâmetros que serão estudados devem ser determinados conforme a categoria atribuída ao ensaio.^{41,42}

2.4.1. Ensaio limite

A RDC N° 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, divide a categoria Teste de Impurezas em Ensaio Quantitativo ou Ensaio Limite. Para ensaio limite, o método deve permitir averiguar se a quantidade do analito está acima ou abaixo de um nível previamente estabelecido, sem o quantificar com exatidão. Para isso, os parâmetros de validação necessários são seletividade e limite de detecção.⁴¹

De acordo com o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica para fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários do MAPA, o ensaio limite se enquadra na categoria II, que são testes quali-quantitativos para determinação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos veterinários e matérias-primas. Os parâmetros que devem ser estudados para validar o ensaio limite são: seletividade, limite de detecção e robustez.⁴²

Já o INMETRO, de acordo com o documento “Orientação sobre validação de métodos analíticos”, classifica como qualitativo um método onde consta no relatório de validação os parâmetros: seletividade, limite de detecção e opcionalmente robustez.⁴³

2.4.2. Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada pela sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra. Para métodos quantitativos e ensaios limite, a seletividade deve ser demonstrada através da comprovação de que a resposta provém exclusivamente do analito, sem interferência do diluente, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação.⁴¹ Um método que produz respostas para diferentes analitos, mas que é capaz de distinguir entre eles é seletivo.⁴³ Para atingir o nível necessário de seletividade, pode ser necessária a combinação de dois ou mais métodos de identificação.⁴¹

Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção entre compostos com determinadas estruturas. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos, em relação ao material de referência ou padrão conhecido e em amostras contendo o analito, e de resultados negativos obtidos com amostras que não contém o analito.⁴² Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas.

No estudo da seletividade é necessário verificar a existência de efeito matriz, ou seja, possíveis interferências causadas por substâncias que compõem

a matriz, gerando fenômenos que diminuem ou ampliam a resposta da amostra.⁴²

2.4.3. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção refere-se à menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições estabelecidas para o ensaio, incluindo todas as etapas do método.⁴³

A determinação do limite de detecção pode ser realizada através de: método visual, razão sinal-ruído ou determinação do branco ou de parâmetros da curva de calibração. Para métodos visuais, o limite de detecção é determinado pela menor concentração para a qual é possível constatar o efeito visual esperado.³⁹

Experimentalmente, realiza-se análises de amostras com concentrações de analito conhecidas ou por valores de propriedades conhecidos e pela definição de um nível mínimo em que o analito pode ser detectado com confiança, indubitavelmente. Em geral, realiza-se diluições sucessivas até encontrar a menor concentração ou menor valor de propriedade que pode ser diferenciado do branco.⁴³

2.4.4. Robustez

A robustez é um parâmetro que indica a capacidade do método em resistir a pequenas variações das condições analíticas que podem ocorrer na rotina, como tempo, temperatura, pH, diferentes fabricantes de insumos e colunas cromatográficas. A robustez é um parâmetro opcional de validação, muitas vezes associada a estudos de otimização.^{41,43}

No caso de métodos quantitativos, o impacto das variações estudadas deverá ser avaliado com os mesmos critérios da exatidão. Já no caso de métodos qualitativos, deve-se apenas verificar se as variações propostas interferem na resposta analítica.⁴¹

Para determinar a robustez, deve-se identificar os fatores que possam influenciar nos resultados. Depois, deve-se variar um de cada vez, ou realizar um planejamento fatorial completo ou fracionário, que permitem avaliar a

influência de vários fatores no mesmo estudo. É preferível o planejamento experimental fracionário, pois exige menor número de experimentos, sendo mais rápido, eficiente e econômico, além de ordenar a influência de cada variação no resultado final.

Identificados os fatores mais significativos para o resultado da medida, um novo estudo mais detalhado deve ser realizado apenas com eles, para estabelecer uma faixa de variação aceitável, que não comprometa a exatidão, a precisão e o resultado. Para os fatores que afetam significativamente o resultado, as faixas permitidas de suas variações devem ser identificadas no procedimento de análise, ressaltando-se os cuidados especiais com os mesmos.⁴²

Caso seja verificado que a função resposta do procedimento não é influenciada ou é fracamente influenciada por pequenas variações dos fatores, o método analítico é classificado como robusto.⁴²

2.4.5. Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Para determinação da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 concentrações diferentes da substância química de referência para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata. Essas soluções devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas frações diluídas de uma mesma solução de referência.⁴¹

Faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade. Sempre que possível, a concentração mais esperada deve se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior de concentração, o fator limitante é o valor mínimo de quantificação. Já no limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta da medição.⁴³

2.4.6. Exatidão/ Recuperação/ Tendência / Veracidade

A exatidão (ANVISA), recuperação/tendência (INMETRO) ou veracidade (MAPA) de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método avaliado em relação a um valor convencionalmente aceito como verdadeiro.⁴¹

A recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos que podem surgir e das perdas advindas das etapas da marcha analítica realizadas até a leitura do resultado, como, limpeza, diluição, pré-concentração, derivatização, extração, digestão, secagem, entre outros.⁴²

Os procedimentos que podem ser utilizados para avaliar a recuperação são: uso de materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais, comparação com método de referência ou validado e realização de ensaios de comparação.⁴³

A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 réplicas em cada nível. As amostras para avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas frações diluídas de uma mesma solução de referência.⁴¹

2.5. Planejamento experimental fatorial

Uma forma de demonstrar a robustez de um método é através de um planejamento fatorial, que permite estudar o efeito simultâneo de um conjunto de fatores sobre uma resposta. Um planejamento fatorial em dois níveis é representado por 2^k , onde 2 representa o número de níveis e k o número de fatores. Esses níveis podem ser quantitativos, como dois valores numéricos ou qualitativos, como dois operadores e podem ser expressos na forma de níveis “alto” (+1) e “baixo” (-1) de um fator. Os dados experimentais devem ser obtidos e correlacionados através de uma equação matemática, do tipo $Y = f(X)$, sendo X uma variável ou fator independente, onde os níveis são os diferentes valores atribuídos a estas variáveis, e Y a variável dependente ou resposta correspondente à medida quantitativa da influência que os níveis escolhidos exercem sobre o processo.⁴⁴

O planejamento fatorial com dois níveis supõe que os efeitos dos fatores são lineares. Quando os termos de interação entre os fatores são adicionados, o modelo é capaz de representar alguma torção que haja no plano. Dependendo da curvatura desse plano, gera-se um modelo quadrático, chamado de modelo de superfície de resposta de segunda ordem, que está descrito pela Equação 1:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \varepsilon \text{ Eq. (1)}$$

A introdução do ponto central nos planejamentos fatoriais 2^k permite a exploração de 3 níveis de cada fator, sendo possível então verificar se há ou não falta de ajuste no modelo. O ponto central corresponde ao nível 0, intermediário aos níveis + e - para k fatores. Assim, as observações ocorrem nos níveis (-, -), (-, +), (+, -) e (+, +), e (0,0).⁴⁴

Uma vantagem do emprego do ponto central é que se os pontos fatoriais do planejamento não forem replicados, os pontos centrais são utilizados para a estimativa do erro com n-1 graus de liberdade, onde n é o número de experimentos realizados no ponto central.⁴⁴

2.5.1. Análise de variância (ANOVA)

A análise de variância ou ANOVA é utilizada para a avaliação numérica da qualidade do ajuste do modelo. A análise de variância pelo método dos mínimos quadrados de um modelo linear está resumida na .⁴⁴

Tabela 4- Descrição da tabela ANOVA.

Parâmetro	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F
Regressão	$SQr = \sum_{i=1}^n (\hat{y} - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQr = \frac{SQr}{p - 1}$	$F = \frac{MQr}{MQres}$
Resíduo	$SQres = \sum_{i=1}^n (y - \hat{y})^2$	$n - p$	$MQres = \frac{SQres}{n - p}$	-
Total	$SQt = \sum_{i=1}^n (y - \bar{y})^2$	$n - 1$	-	-
Erro puro	$SQep = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - m$	$MQep = \frac{SQep}{n - m}$	-
Falta de ajuste	$SQfaj = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (\hat{y}_i - \hat{y}_i)^2$	$m - p$	$MQfaj = \frac{SQfaj}{m - p}$	$F = \frac{MQfaj}{MQep}$

i e j = níveis de experimentação;

n_i = número de repetições no nível i;

m = número de níveis distintos da variável independente;

$n = \sum n_i$ = número total de observações;

p = número de parâmetros do modelo;

$\hat{y}_i$ = valor estimado ou previsto pelo modelo ajustado, para a variável resposta em função do nível do fator;

y_i = valor experimental observado na variável resposta ou variável dependente, em função do nível da variável independente;

$\bar{y}_i$ = valor médio de y_i ;

F = distribuição F de Snedecor com graus de liberdade das somas de quadrados envolvidos.

Onde,

Soma Quadrática da Regressão (SQR): soma dos desvios das previsões feitas pelo modelo, em relação à média global.

Soma Quadrática Residual (SQres): soma das diferenças entre os valores observados e os valores previstos.

Soma Quadrática Total (SQt): soma dos desvios dos valores observados, em relação à média global.

A Soma Quadrática Total pode ser expressa pela Equação 2:

$$SQ_t = SQR + SQ_{res} \quad \text{Eq. (2)}$$

A Equação 2 mostra que, em um modelo bem ajustado, a SQ_t deve ser aproximadamente igual à SQR .

2.6. Detecção em métodos analíticos utilizando imagens digitais

Imagem digital é a representação de uma cena por meio de um conjunto de elementos discretos e de tamanhos finitos, chamados de pixels, colocados em um arranjo bidimensional. A cada pixel é associado um valor, no caso de imagens de tons de cinza, ou um conjunto de três valores (R – red, G – green, B – blue) para representar uma cor.

Como o armazenamento é restrito, a intensidade de radiação é armazenada com 8 bits, totalizando 256 níveis para a região do espectro visível. A combinação das três matrizes (R, G e B) permite a aquisição de 16 milhões de possibilidades de cores. A digitalização de uma imagem por um scanner geralmente usa uma barra de radiação que atinge a imagem, transferindo radiação suficiente para o sensor. Com a reflexão da radiação, o sensor pode reconstituir e armazenar a imagem digital. A resposta analítica que uma imagem gera representa os seus padrões de cores: vermelho, verde e azul (RGB), com valores entre 0 e 255. O branco é formado quando se tem a combinação dos códigos 255 Red (vermelho), 255 Green (Verde) e 255 Blue (Azul). Já o preto é formado por 0 Red, 0 Green e 0 Blue. O modelo RGB é um modelo somatório das cores que usa os valores de três cores primárias para fornecer a cor exibida.

A variação das três cores pode formar outras cores do espectro eletromagnético (380 – 730 nm). Por exemplo, um objeto de cor azul terá valores máximos para o componente blue quanto mais intensa for sua tonalidade, enquanto os componentes G e R sofrem um decréscimo proporcional.⁴⁵

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo geral desenvolver um método de análise colorimétrico para determinação de metanol em amostras de etanol hidratado combustível, gasolina C, bebidas alcoólicas e vinagre. Deseja-se adaptar o método desenvolvido em um kit colorimétrico de análise em campo que permita aprovar ou reprovar amostras. Ademais, os produtos das reações não devem causar impacto ambiental e o kit deve ser de fácil manuseio, de modo que seu uso não seja limitado a analistas de laboratório.

3.2. Objetivos Específicos

O trabalho tem como objetivos específicos elaborar um método colorimétrico para detecção de metanol através da:

- (a) Oxidação dos álcoois com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e posterior coloração do produto de oxidação do metanol com ácido cromotrópico ($C_{10}H_8O_8S_2$),
- (b) Oxidação dos álcoois com permanganato de potássio ($KMnO_4$), descoloração do excesso de permanganato com sulfito de sódio (Na_2SO_3) e posterior coloração do produto de oxidação do metanol com ácido cromotrópico.

Ademais, espera-se validar os dois métodos segundo as diretrizes da ANP e do MAPA, para possibilitar suas aplicações em campo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

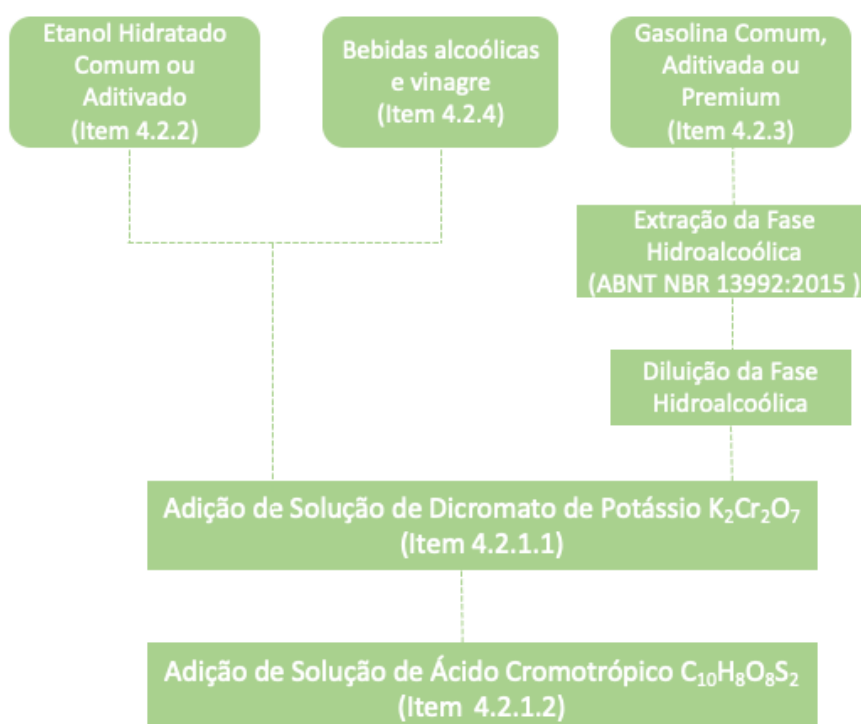
4.1. Teste de seletividade do agente cromogênico

Para avaliar a seletividade do ácido cromotrópico frente aos principais produtos gerados a partir da oxidação do metanol e do etanol, adicionou-se uma solução de ácido cromotrópico 0,5% (m/m) em ácido sulfúrico 15 mol/L em: formaldeído PA, ácido fórmico PA, acetaldeído PA, ácido acético PA e água (branco). Nestes ensaios foram utilizados 300 µL de amostra, 500 µL de solução de ácido cromotrópico e 6 mL de água para diluir a cor e facilitar a visualização do resultado.

4.2. Método da Oxidação com Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$)

A aplicação do método em gasolinas, etanol hidratado combustível, bebidas alcoólicas e vinagre ocorre segundo o fluxograma da Figura 4.

Figura 5- Método $K_2Cr_2O_7$: Fluxograma de etapas



4.2.1. Preparo de Soluções

4.2.1.1. Solução de Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$)

Para a etapa de oxidação dos álcoois, uma solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) foi preparada com 1g de dicromato de potássio PA, 40 mL de água destilada e 10 mL de ácido sulfúrico PA.⁴⁶

4.2.1.2. Solução de Ácido Cromotrópico ($C_{10}H_8O_8S_2$)

Na etapa colorimétrica, preparou-se primeiramente uma solução de ácido sulfúrico 18 mol/L. Em seguida, adicionou-se 0,5 g de sal dissódico de ácido cromotrópico dihidratado ($C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot 2H_2O$) a 49,5 g da solução de ácido sulfúrico 18 mol/L previamente preparada.

4.2.2. Método em Etanol PA e Etanol Hidratado Combustível

Etapa A- Oxidação

Para etanol PA e Etanol Hidratado Combustível Comum ou Aditivado, não há preparo de amostra, então, a 5 mL de etanol, adicionou-se 2 mL de solução de dicromato de potássio preparada conforme item 4.2.1.1. A oxidação ocorre instantaneamente.

Etapa B- Reação Colorimétrica

Em seguida, preparou-se uma solução de ácido cromotrópico 0,5% (m/m) em ácido sulfúrico 18 mol/L, conforme item 4.2.1.2. Por fim, a 1 mL da solução final da etapa A, adicionou-se 3 mL de solução de ácido cromotrópico. Aguardou-se cerca de 7 minutos para que ocorresse uma mudança de cor significativa.

4.2.3. Método em Gasolina

Etapa A- Extração da fase hidroalcoólica

Para as gasolinas comum, premium e aditivada, é necessário a extração da fase hidroalcoólica. Para isso, aplicou-se o método ABNT NBR 13992:2015, usado para determinar teor de etanol anidro combustível na gasolina, onde foram adicionados 50 mL da amostra numa proveta de 100 mL, junto com uma solução de NaCl 10% (m/v) até completar o volume de 100 mL. Em seguida, realizou-se 10 inversões e colocou-se a proveta numa superfície plana e nivelada por 10 minutos em repouso.⁴⁷ Por fim, extraiu-se a fase hidroalcoólica (fase inferior) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, diluiu-se-a na proporção de 1 mL da fase hidroalcoólica em 9 mL de água e seguiu-se para a etapa de oxidação com dicromato de potássio.

Etapa B- Oxidação

Para a reação de oxidação, a 5 mL de amostra, adicionou-se 10 mL de solução de dicromato de potássio, preparada conforme item 4.2.1.1, mantendo-se a mistura em repouso por 10 minutos para a reação ocorrer.

Etapa C- Reação Colorimétrica

Em seguida, preparou-se uma solução de ácido cromotrópico 0,5% (m/m) em ácido sulfúrico 18 mol/L conforme item 4.2.1.2. Por fim, a 1 mL da solução final da Etapa A, adicionou-se 3 mL de solução de ácido cromotrópico. Aguardou-se cerca de 7 minutos para que ocorresse uma mudança de cor significativa.

4.2.4. Método em Bebidas alcoólicas e Vinagre

Etapa A- Oxidação

Para bebidas alcoólicas e vinagre, utilizou-se vodca, whisky, cachaça comercial e artesanal, coquetel alcoólico e vinagre de álcool. Não houve preparo

prévio, então, a 5 mL de amostra, adicionou-se 4 mL de solução de dicromato de potássio, preparada conforme item 4.2.1.1. A reação ocorre em 5 minutos.

Etapa B- Reação Colorimétrica

Em seguida, para a etapa colorimétrica, preparou-se uma solução de ácido cromotrópico 0,5% (m/m) em ácido sulfúrico 18 mol/L, conforme item 4.2.1.2. Por fim, a 1 mL da solução final da etapa A, adicionou-se 3 mL de solução de ácido cromotrópico. Aguardou-se 10 minutos para obter-se como resultado uma mudança de cor significativa.

4.2.5. Validação

4.2.5.1. Linearidade

Na primeira etapa de reação, preparou-se amostras contendo as seguintes concentrações de metanol em etanol: 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; 0,8%; 0,9%; 1%; 5%; 10%; 20%; 50% e 100%. Em seguida, avaliou-se a adição de 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 mL da solução de $K_2Cr_2O_7$ em 5mL de cada amostra para determinar a melhor condição de oxidação.

Na segunda etapa, para colorir o produto de oxidação proveniente do metanol, preparou-se soluções de ácido cromotrópico 0,5% (m/m) em soluções de ácido sulfúrico a 15 mol/L, 17 mol/L e 18 mol/L, na proporção de 1mL da primeira etapa e 3 mL da segunda etapa. Em 7 minutos observou-se mudança de cor significativa.

4.2.5.2. Seletividade

4.2.5.2.1. Etanol Hidratado Combustível

Para determinar a seletividade do método, utilizou-se como matriz: Etanol Hidratado Combustível Comum (EHC) e Etanol Hidratado Aditivado (EHA), que foram fortificados no limite máximo de especificação da Resolução ANP N° 19,

igual a 0,5% (v/v) de metanol. Depois seguiu-se com a aplicação do método como descrito no item 4.2.2, nas amostras antes e depois da fortificação.

4.2.5.2.2. Gasolina

Para determinar a seletividade do método, utilizou-se como matriz: Gasolina Comum tipo C (GCC), Gasolina Aditivada tipo C (GCA) e Gasolina Premium tipo C (GCP), que foram fortificadas no limite máximo de especificação da Resolução ANP N° 807, igual a 0,5% (v/v) de metanol. Depois seguiu-se com a aplicação do método como descrito no item 4.2.3, nas amostras antes e depois da fortificação.

4.2.5.2.3. Bebidas alcoólicas destiladas e vinagre

Para determinar a seletividade do método, utilizou-se como matriz: vodka (Absolut Vanila®), whisky (Ballantine's®) e vinagre de álcool (Vitalia®), que foram fortificadas no limite máximo de especificação do MAPA, igual a 20mg/100mL. Depois, seguiu-se com a aplicação do método como descrito no item 4.2.4, nas amostras antes e depois da fortificação. Ao final, tirou-se uma fotografia dos tubos de ensaio com as amostras apoiados numa estante para tubos de ensaio branca, com um fundo branco atrás e embaixo da estante, além de uma luminária de lâmpada de LED entre o fundo branco e a estante. Em seguida, realizou-se a medida RGB das amostras pelo medidor de cor digital do sistema Apple iOS.

4.2.5.3. Limite de Detecção

4.2.5.3.1. Etanol Hidratado Combustível

Para determinar o limite de detecção, utilizou-se como matriz: Etanol Hidratado Combustível Comum (EHC) e Etanol Hidratado Aditivado (EHA), que foram fortificados com 0,2% (v/v) de metanol. Depois, aplicou-se o método como descrito no item 4.2.2, nas amostras antes e depois da fortificação.

4.2.5.3.2. Gasolina

Para determinar o limite de detecção, utilizou-se como matriz: Gasolina Comum tipo C (GCC), Gasolina Aditivada tipo C (GCA) e Gasolina Premium tipo C (GCP), que foram fortificadas com 0,2% (v/v) de metanol. Depois, aplicou-se o método como descrito no item 4.2.3, nas amostras antes e depois da fortificação.

4.2.5.4. Teste de Formação de Tributo

Para determinar a capacidade do método em se comportar como ensaio limite e desse modo formar tributo de amostra “conforme” ou “não conforme”, realizou-se uma espécie de ensaio duplo-cego, onde o voluntário responsável por preparar a amostra não participou da execução do ensaio e o analista responsável pela execução do ensaio não participou do preparo da amostra.

4.2.5.4.1. Etanol Hidratado Combustível

Selecionou-se uma amostra de Etanol Hidratado Combustível Comum (EHC) livre de metanol, de acordo com ensaio de cromatografia gasosa. Depois, um voluntário preparou 3 amostras-teste fortificadas com 0,4% ou 0,6% (v/v) de metanol PA, para que fosse explorada a região crítica de formação de tributo, já que, como o limite de especificação da ANP pela Resolução N° 19 é 0,5% (v/v), uma amostra que contém 0,4% está “conforme” e uma que contém 0,6% está “não conforme” às especificações da ANP.

No momento do ensaio, o analista fortificou a mesma amostra, com 0,5% (v/v) de metanol, para servir como controle positivo, ou seja, garantir que a amostra não contém nenhum interferente, e que a cor gerada provém somente do analito. Também utilizou-se uma outra amostra de EHC livre de metanol, de acordo com análise de cromatografia gasosa, que foi fortificada com 0,5% de metanol para servir como padrão, ou seja, no momento da análise, as amostras teste foram comparadas com a padrão para formar o tributo de “conforme” e “não conforme”. Em seguida, as cinco amostras foram submetidas as etapas de reação do método, conforme descrito no item 4.2.2.

4.2.5.4.2. Gasolina

Selecionou-se uma amostra de Gasolina Comum tipo C (GCC) livre de metanol, de acordo com análise de cromatografia gasosa. Depois, um voluntário preparou 3 amostras-teste fortificadas com 0,4% ou 0,6% (v/v) de metanol PA, para que fosse explorada a região crítica de formação de tributo, já que, como o limite de especificação da ANP pela Resolução nº 807 é 0,5% (v/v), uma amostra que contém 0,4% está “conforme” e uma que contém 0,6% está “não conforme” às especificações da ANP.

No momento da análise, o analista fortificou a mesma amostra, com 0,5%(v/v) de metanol, para servir como controle positivo, ou seja, garantir que a amostra não contém nenhum interferente, e que a cor gerada provém somente do analito. Também utilizou-se outra amostra de GCC livre de metanol, de acordo com o resultado de cromatografia gasosa, que foi fortificada com 0,5%(v/v) de metanol para servir como padrão, ou seja, no momento da análise, as amostras teste foram comparadas com a padrão para formar o tributo de “conforme” ou “não conforme”. Em seguida, as cinco amostras foram submetidas as etapas do método conforme descrito no item 4.2.3.

4.2.6. Quantificação do Cromo III

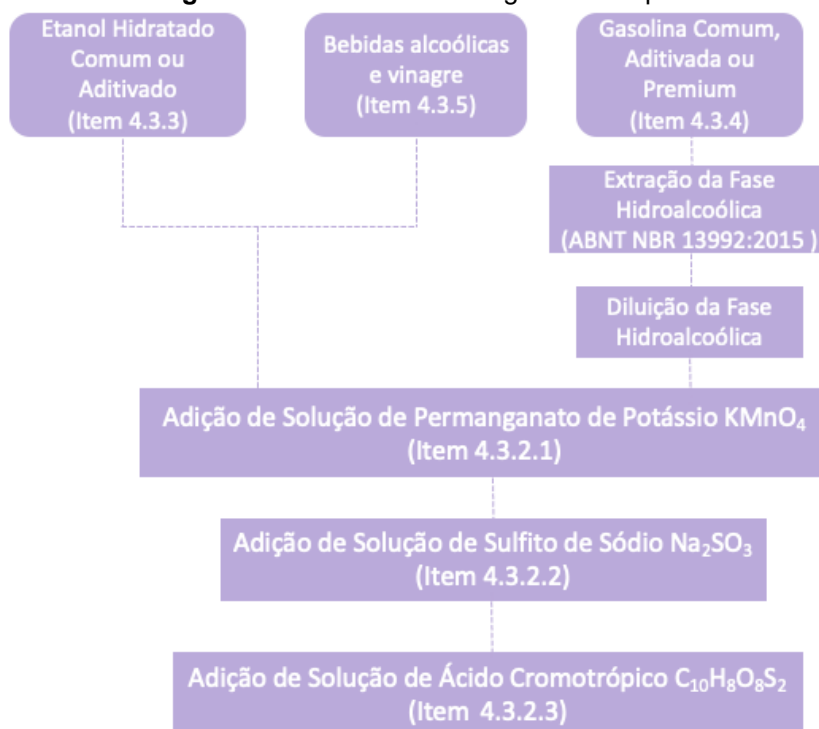
Segundo a Resolução CONAMA Nº 430, de 13 de maio de 2011, a concentração máxima de Cromo III que pode ser lançada como efluente é 1,0 mg/L.⁴⁸ Como o método gera como resíduo Cromo III, realizou-se uma análise de quantificação por espectroscopia de UV/Visível.

Para isso, utilizou-se como branco uma solução contendo 40 mL de água e 10 mL de ácido sulfúrico PA. Em seguida, preparou-se uma solução estoque numa concentração de 8 g/L de $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Então, construiu-se a curva analítica com 5 pontos, correspondendo às concentrações de 4, 3, 2, 1,5 e 1 g/L. Depois, realizou-se a leitura da amostra, que consistia em 5 mL de solução de etanol com 0,5% (v/v) de metanol e 2 mL de solução oxidante de dicromato de potássio, preparada conforme item 4.2.1.1. Realizou-se a leitura em espectrômetro de UV/Visível em 410 nm.

4.3. Método da Oxidação com Permanganato de Potássio (KMnO_4)

A realização do método em gasolina, etanol hidratado combustível, bebidas alcoólicas e vinagre ocorre segundo o fluxograma da Figura 5.

Figura 6- Método KMnO_4 : Fluxograma de etapas



4.3.1. Planejamento Experimental Fatorial

Para otimizar a etapa de oxidação, realizou-se um planejamento experimental fatorial com réplica e ponto central, utilizando-se 3 variáveis, sendo V_1 (volume de H_3PO_4), V_2 (tempo de reação) e V_3 (volume da solução oxidante de KMnO_4). A solução oxidante foi preparada a partir de 3g de KMnO_4 PA em 50 mL de água, que foi adicionada a 5 mL de solução de metanol 0,5% em etanol (v/v). O planejamento está apresentado na Tabela 5. O fator usado como resposta foi a massa de MnO_2 formada durante a oxidação. A adição do ponto central no planejamento introduz o nível (0), intermediário aos níveis (+) e (-). Assim, os estudos ocorrem nos níveis (-,-), (-,+), (+,-) e (+,+), além do ponto central (0,0). Todos os pontos foram realizados com réplica, totalizando 18 experimentos.

Tabela 5- Variáveis do planejamento fatorial $2^3(I)$

Variáveis	(-)	0	(+)
1: Volume de H_3PO_4	4 mL	8 mL	12 mL
2: Tempo de reação	10 min	35 min	60 min
3: Volume de solução $KMnO_4$	1 mL	3 mL	5 mL

4.3.2. Preparo de Soluções

4.3.2.1. Solução de Permanganato de Potássio ($KMnO_4$)

A solução de permanganato de potássio foi preparada a partir de 0,75 g de permanganato de potássio PA, 2 mL de ácido orto-fosfórico PA e completou-se com água destilada em balão volumétrico até 50 mL.

4.3.2.2. Solução de Sulfito de Sódio (Na_2SO_3)

A solução de sulfito de sódio 0,05 mol/L foi preparada adicionando-se 0,315 g de sulfito de sódio PA num balão volumétrico de 50 mL e completando-se o volume com água destilada.

4.3.2.3. Solução de Ácido Cromotrópico ($C_{10}H_8O_8S_2$)

Primeiramente, preparou-se uma solução de ácido sulfúrico 16,5 mol/L. Em seguida, adicionou-se 0,5 g de sal dissódico de ácido cromotrópico dihidratado ($C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot 2 H_2O$) a 49,5 g da solução de ácido sulfúrico 16,5 mol/L.

4.3.3. Método em Etanol PA e Etanol Hidratado Combustível

Etapa A- Oxidação

Para a oxidação, a 1 mL de Etanol PA ou Etanol Hidratado Combustível, adicionou-se 1,6 mL de solução de permanganato de potássio, preparada segundo item 4.3.2.1. A reação ocorreu em 2 minutos.

Etapa B- Descoloração

Em seguida, seguiu-se para a etapa da descoloração do MnO_2 formado na oxidação. Para isso, adicionou-se 4 mL da solução de sulfito de sódio preparada conforme item 4.3.2.2. A amostra se tornou incolor instantaneamente.

Etapa C- Reação Colorimétrica

Por fim, a 1 mL da solução resultante da etapa B, adicionou-se 3 mL da solução de ácido cromotrópico preparada conforme item 4.3.2.3. Aguardou-se cerca de 10 minutos para ocorrer uma mudança de cor significativa.

4.3.4. Método em Gasolina

Etapa A- Extração da fase hidroalcoólica

Para a gasolina comum, premium ou aditivada, é necessária a extração da fase hidroalcoólica. Para isso, utilizou-se o método ABNT NBR 13992:2015, para determinar teor alcoólico em gasolina, onde colocou-se 50 mL da amostra numa proveta de 100 mL, junto com solução de NaCl 10% (m/v) até completar o volume de 100 mL. Em seguida, realizou-se 10 inversões e colocou-se a proveta numa superfície plana e nivelada por 10 minutos em repouso.⁴⁷ Por fim, extraiu-se a fase hidroalcoólica (fase inferior) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, diluiu-se-a na proporção de 1 mL da fase hidroalcoólica em 9 mL de água e seguiu-se para a etapa de oxidação. Então, a 1 mL de fase hidroalcoólica diluída, adicionou-se 1,6 mL de solução de permanganato de potássio, preparada conforme item 4.3.2.1 e aguardou-se 5 minutos.

Etapa B- Descoloração

Em seguida, seguiu-se para a etapa da descoloração do MnO_2 formado na oxidação. Para isso, adicionou-se 9 mL da solução de sulfito de sódio preparada conforme item 4.3.2.2. A solução se tornou incolor instantaneamente.

Etapa C - Reação Colorimétrica

Em seguida, para a etapa colorimétrica, preparou-se uma solução de ácido cromotrópico 0,5% (m/m) em ácido sulfúrico 16,5M, conforme item 4.3.2.3. Por fim, a 1 mL da solução final da etapa A, adicionou-se 3 mL de solução de ácido cromotrópico. Aguardou-se cerca de 10 minutos para ocorrer uma mudança de cor significativa.

4.3.5. Método em Bebidas alcoólicas e Vinagre

Etapa A- Oxidação

Para bebidas alcoólicas e vinagre, utilizou-se vodca, cachaça comercial, coquetel alcoólico e vinagre. A 1 mL de amostra, adicionou-se 1,6 mL de solução de permanganato de potássio, preparada conforme item 4.3.2.1. A reação ocorreu em 5 minutos.

Etapa B- Descoloração

Em seguida, seguiu-se para a etapa da descoloração do MnO_2 formado na oxidação da etapa A. Para isso, adicionou-se 4 mL da solução de sulfito de sódio preparada conforme item 4.3.2.2. A solução se tornou incolor instantaneamente.

Etapa C- Reação Colorimétrica

Em seguida, para a etapa colorimétrica, preparou-se uma solução de ácido cromotrópico 0,5% (m/m) em ácido sulfúrico 16,5M, conforme item 4.3.2.3. Por fim, a 1 mL da solução final da etapa A, adicionou-se 3 mL de solução de ácido cromotrópico. Aguardou-se cerca de 10 minutos para obter-se como resultado uma mudança de cor significativa.

4.3.6. Validação

4.3.6.1. Linearidade

Primeiramente, testou-se substituir o ácido fosfórico por ácido sulfúrico na etapa de oxidação para avaliar o efeito. Depois, para a primeira etapa de reação, preparou-se amostras nas concentrações: 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%; 0,7%; 0,8%; 0,9%; 1%; 5%; 10%; 20%; 50%; 100% de metanol PA em etanol PA. Aplicou-se as condições (-) do planejamento experimental para a etapa de oxidação, ou seja, 0,75 g de permanganato de potássio, 2 mL de solução de ácido ortofosfórico e a 1 mL de solução alcoólica, adicionou-se 1,6 mL de solução oxidante. Aguardou-se 2 minutos para oxidação ocorrer.

Em seguida, adicionou-se 4 mL da solução de sulfito de sódio preparada conforme item 4.3.2.2 e a descoloração aconteceu instantaneamente.

Na última etapa, para colorir o produto de oxidação proveniente do metanol, preparou-se soluções de ácido cromotrópico 0,5% (m/m) em soluções de ácido sulfúrico a 10, 12, 14, 15, 16, 16,5, 17 e 18 mol/L, na proporção de 1 mL da etapa B e 3 mL da etapa C. Em 10 minutos observou-se uma mudança de cor significativa.

4.3.6.2. Seletividade

4.3.6.2.1. Etanol Hidratado Combustível

Para determinar a seletividade, utilizou-se como matriz: Etanol Hidratado Combustível Comum (EHC) e Etanol Hidratado Aditivado (EHA), que foram fortificados no limite máximo de especificação da Resolução ANP N° 19, igual a 0,5% (v/v) de metanol PA. Depois seguiu-se com a aplicação do método como descrito no item 4.3.3, nas amostras antes e depois da fortificação.

4.3.6.2.2. Gasolina

Para determinar a seletividade, utilizou-se como matriz: Gasolina Comum tipo C (GCC), Gasolina Aditivada tipo C (GCA) e Gasolina Premium tipo C (GCP), que foram fortificadas no limite máximo de especificação da Resolução ANP N° 807, igual a 0,5% (v/v) de metanol PA. Depois seguiu-se com a aplicação do método como descrito no item 4.3.4, nas amostras antes e depois da fortificação.

4.3.6.2.3. Bebidas alcoólicas destiladas e vinagre

Para determinar a seletividade, utilizou-se como matriz: vodka (Absolut-Vanila®), whisky (Ballantine's®), cachaça comercial de grau alcoólico igual a 37% (Cabaré®) e vinagre de álcool (Vitalia®), que foram fortificadas no limite máximo de especificação do MAPA, igual a 20mg/100mL. Depois, seguiu com a aplicação do método como descrito no item 4.3.5, nas amostras antes e depois da fortificação. Ao final, tirou-se uma fotografia dos tubos de ensaio com as amostras apoiados numa estante para tubos de ensaio branca, com um fundo branco atrás e embaixo da estante, além de uma luminária de lâmpada de LED entre o fundo branco e a estante. Em seguida, realizou-se a medida RGB das amostras pelo medidor de cor digital do sistema Apple iOS.

4.3.6.3. Limite de Detecção

4.3.6.3.1. Etanol Hidratado Combustível

Para determinar o limite de detecção, utilizou-se como matriz: Etanol Hidratado Combustível Comum (EHC) e Etanol Hidratado Aditivado (EHA), que foram fortificados com 0,2% (v/v) de metanol PA. Depois seguiu-se com a aplicação do método como descrito no item 4.3.3, nas amostras antes e depois da fortificação.

4.3.6.3.2. Gasolina

Para determinar o limite de detecção, utilizou-se como matriz: Gasolina Comum tipo C (GCC), Gasolina Aditivada tipo C (GCA) e Gasolina Premium tipo C (GCP), que foram fortificadas com 0,2% (v/v) de metanol PA. Depois seguiu-se com a aplicação do método como descrito no item 4.3.4, nas amostras antes e depois da fortificação.

4.3.6.4. Teste de Formação de Tributo

Para determinar a capacidade do método em se comportar como ensaio limite e dessa forma ser capaz de formar tributo de amostra “conforme” ou “não conforme”, realizou-se uma espécie de ensaio duplo-cego, onde o voluntário responsável por preparar a amostra não participou do ensaio e o analista responsável pelo ensaio não participou do preparo da amostra.

4.3.6.4.1. Etanol Hidratado Combustível

Selecionou-se uma amostra de Etanol Hidratado Combustível (EHC) livre de metanol, de acordo com ensaio de cromatografia gasosa. Posteriormente, um voluntário preparou 3 (três) amostras-teste fortificadas com 0,4% ou 0,6% (v/v) de metanol PA, para que fosse explorada a região crítica de formação de tributo, já que, como o limite de especificação da ANP pela Resolução N° 19 é 0,5% (v/v), uma amostra que contém 0,4% está “conforme” e uma que contém 0,6% está “não conforme”.

No momento da análise, o analista fortificou a mesma amostra, com 0,5% (v/v) de metanol, para servir como controle positivo, ou seja, garantir que a amostra não contém nenhum interferente, e que a cor gerada provém somente do analito. Também utilizou-se uma outra amostra de EHC livre de metanol, segundo análise de cromatografia gasosa, que foi fortificada com 0,5% (v/v) de metanol para servir como padrão, ou seja, no momento da análise, as amostras teste foram comparadas com a padrão para formar o tributo de “conforme” ou “não conforme”. Em seguida, as cinco amostras foram submetidas as etapas do método como descrito no item 4.3.3.

4.3.6.4.2. Gasolina

Selecionou-se uma amostra de Gasolina Comum tipo C (GCC) livre de metanol, de acordo com ensaio de cromatografia gasosa. Depois, um voluntário preparou 3 amostras-teste fortificadas com 0,4% ou 0,6% (v/v) de metanol PA, para que fosse analisada a região crítica de formação de tributo, já que o limite de especificação da ANP pela Resolução nº 807 é 0,5% (v/v). Assim, uma amostra que contém 0,4% está “conforme” e uma que contém 0,6% está “não conforme”. No momento da análise, o analista fortificou a mesma amostra, com 0,5% (v/v) de metanol, para servir como controle positivo, ou seja, garantir que a amostra não contém nenhum interferente, e que a cor gerada provém somente do analito. Também utilizou-se outra amostra de GCC livre de metanol, segundo análise de cromatografia gasosa, que foi fortificada com 0,5% (v/v) de metanol para servir como padrão, ou seja, no momento da análise, as amostras teste foram comparadas com a padrão para formar o tributo de “conforme” ou “não conforme”. Em seguida, as cinco amostras foram submetidas as etapas do método como descrito no item 4.3.4.

4.3.6.5. Teste do espectrofotômetro portátil em bebidas

Para as bebidas alcoólicas e vinagre, onde a fortificação no limite máximo de especificação do MAPA (20mg/100mL) gera resultados pouco visíveis a olho nu, foram realizados testes em dois espectrômetros experimentais portáteis, desenvolvidos pelos pesquisadores Gabriel Baroffaldi Piassalonga e Rafaela Silva Lamarca, sob orientação do Professor Doutor Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes, do Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica do Instituto de Química da UNESP em Araraquara.

4.3.6.5.1. Teste de Seletividade para bebidas alcoólicas e vinagre

Utilizou-se como matriz, vodka (Absolut Vanília®), whisky (Ballatine's®) e vinagre (Vitalia®), onde realizou-se as etapas de reação do método segundo o item 4.3.5, nas amostras originais e nas fortificadas com metanol PA na

concentração do limite de especificação do MAPA, igual a 20mg/100mL, para verificar se o sinal gerado seria diferente para o branco e para amostras com metanol.

4.3.6.6. Teste de performance para Etanol Hidratado Combustível

Realizou-se uma análise de performance frente ao método oficial da ABNT NBR 16041 segundo a Resolução ANP Nº19. Para isso, uma mesma amostra de Etanol Hidratado Combustível (EHC), fortificada por um voluntário com metanol PA, de modo aleatório, foi analisada por cromatografia gasosa e pelos dois métodos colorimétricos desenvolvidos neste trabalho.

4.3.6.6.1. Análise Cromatográfica

Aparelhagem

- ✓ Cromatógrafo a gás Shimadzu, com injetor Split/splitless, amostrador automático de headspace e Detector de Ionização por Chama (DIC);
- ✓ Coluna capilar de sílica fundida e camada porosa à base de estireno/divinilbenzeno (tipo Q), de alta temperatura, com dimensões 10 m x 0,32 mm x 10 µm e retentor de partículas de 2,5 µm x 0,32 µm, conectado à coluna.

As condições cromatográficas dos ensaios realizados estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6- Condições cromatográficas da análise de metanol em EHC

Parâmetro	Condição
Programação de Temperatura do Forno	
Temperatura inicial	85 °C, mantida por 2 minutos
Taxa de aquecimento	35 °C/min
Temperatura final	260 °C, mantida por 11 minutos
Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura do detector	280 °C
Razão do divisor de fluxo do injetor	50:1
Vazão: ar sintético para o detector	300 mL/min

Vazão: gás N₂ para o detector	30 mL/min
Vazão: gás H₂ para o detector	30 mL/min
Pressão do gás de arraste H₂	32,27 kPa
Velocidade do gás de arraste H₂	72 cm/s
Pressão do gás de arraste N₂	58,67 kPa
Velocidade do gás de arraste N₂	64 cm/s
Pressão do gás de arraste He	62,88 kPa
Velocidade do gás de arraste He	63 cm/s
Volume de injeção de amostra	0,5 µL

4.3.6.6.2. Análise Colorimétrica

Para a análise colorimétrica, preparou-se uma amostra padrão similar ao Etanol Hidratado Combustível (EHC), misturando-se etanol PA com 7,5% de água destilada em volume (teor máximo de água permitido pela Resolução ANP Nº19). Em seguida, realizou-se o ensaio colorimétrico utilizando-se três amostras. A primeira era composta pela amostra padrão previamente preparada fortificada com 0,5% (v/v) de metanol PA. A segunda era composta da amostra desconhecida fortificada com 0,5% (v/v) de metanol PA, para atuar como controle positivo, e a terceira era a amostra desconhecida, que estava sendo analisada por cromatografia gasosa durante a rotina de análises do CEMPEQC/UNESP.

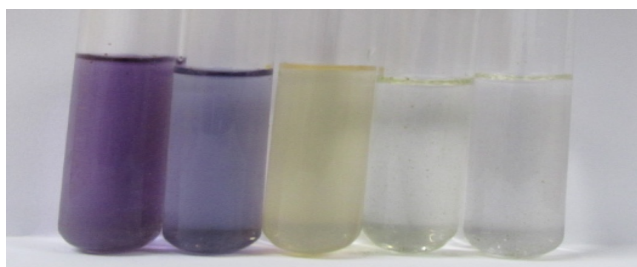
As três amostras foram divididas em duas alíquotas iguais, sendo que na primeira aplicou-se o método do dicromato de potássio, como descrito no item 4.2.2, e a na segunda, aplicou-se o método do permanganato de potássio, conforme item 4.3.3. Por último, a amostra desconhecida era comparada com a amostra padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste de seletividade do agente cromogênico

A partir da oxidação de uma amostra contendo etanol e metanol, os quatro principais produtos formados são: formaldeído e ácido fórmico, a partir do metanol e acetaldeído e ácido acético a partir do etanol. Ao observar a Figura 6, nota-se que, da esquerda para a direita, ao reagir uma solução de ácido cromotrópico em meio ácido com os quatro produtos, no caso do formaldeído, formou-se um composto roxo, no caso do ácido fórmico, formou-se um composto azul, já com o acetaldeído, formou-se um composto amarelado e com ácido acético não há geração de cor. A última amostra é um branco, composta apenas por ácido cromotrópico em água, nas mesmas proporções das amostras contendo os álcoois e não foi observada formação de cor.

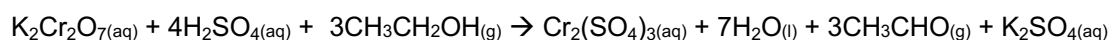
Figura 7- Teste do ácido cromotrópico em: formaldeído, ácido fórmico, acetaldeído, ácido acético e água (da esquerda para a direita)



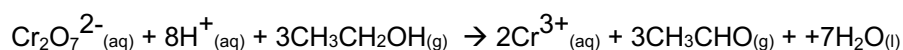
5.2. Método da Oxidação com Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$)

Etapa A- Oxidação

A primeira etapa do método consiste em oxidar os álcoois da amostra com dicromato de potássio em meio ácido, representada pela reação 1, na forma global ou pela reação 2, na forma iônica.⁴⁹



Reação 1



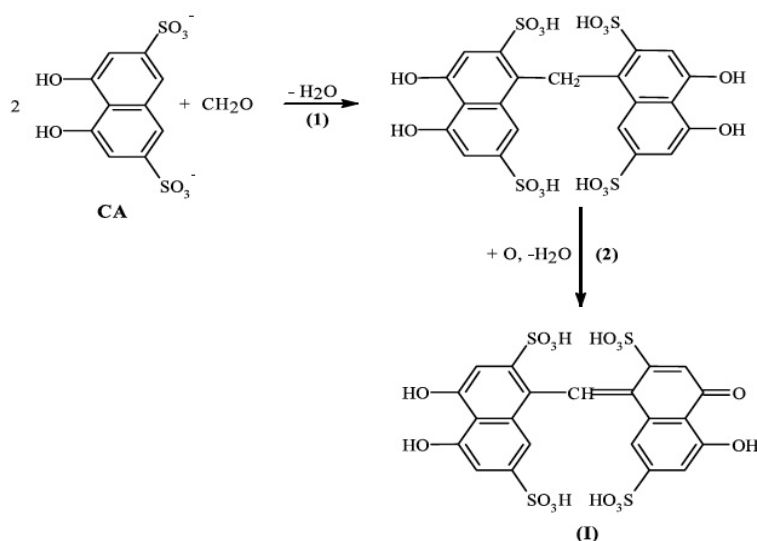
Reação 2

Etapa B- Reação Colorimétrica

Em seguida, para a etapa colorimétrica, utiliza-se uma solução de ácido cromotrópico ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_8\text{S}_2$) 0,5% (m/m) em meio ácido. Se houver metanol, o mesmo será oxidado a formaldeído na primeira etapa, que por sua vez reagirá com o ácido cromotrópico em meio ácido.

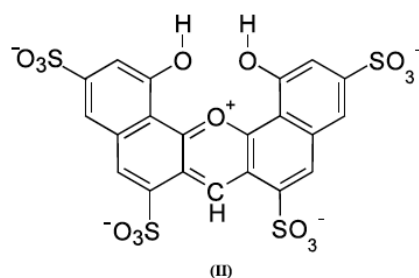
O mecanismo de reação ainda não foi completamente definido. O mais citado envolve duas etapas, como mostrado na Figura 7, sendo o composto (I) responsável pela absorção de luz entre 570 e 580 nm. Segundo Feigl, o H_2SO_4 participa de ambas as etapas, primeiro como desidratante e, posteriormente como oxidante, sendo reduzido a ácido sulfuroso.⁵⁰

Figura 8- Reação entre ácido cromotrópico e formaldeído.



Uma estrutura alternativa proposta para o cromogênio formado entre ácido cromotrópico e formaldeído é o composto (II), apresentado na Figura 8. A origem deste cromogênio nunca foi inequivocamente provada, e os resultados obtidos por técnicas de RMN apoiam a hipótese de que o composto formado possui estrutura mono-catiônica de dibenzoxantílio (II) e não o p-quinoidal (I) que é mais comumente citado.⁵⁰

Figura 9- Possível composto formado pela reação entre ácido cromotrópico e formaldeído.

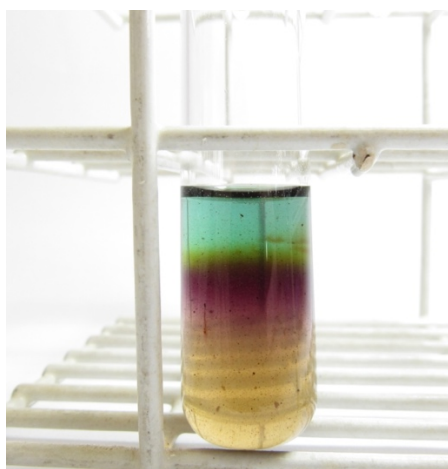


5.2.1. Método em Etanol PA e Etanol Hidratado Combustível

Durante o desenvolvimento do método, foi possível notar que, a solução de dicromato de potássio, preparada conforme o item 4.2.1.1, possui coloração alaranjada, devido ao cromo estar presente com estado de oxidação +6 no íon $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$.

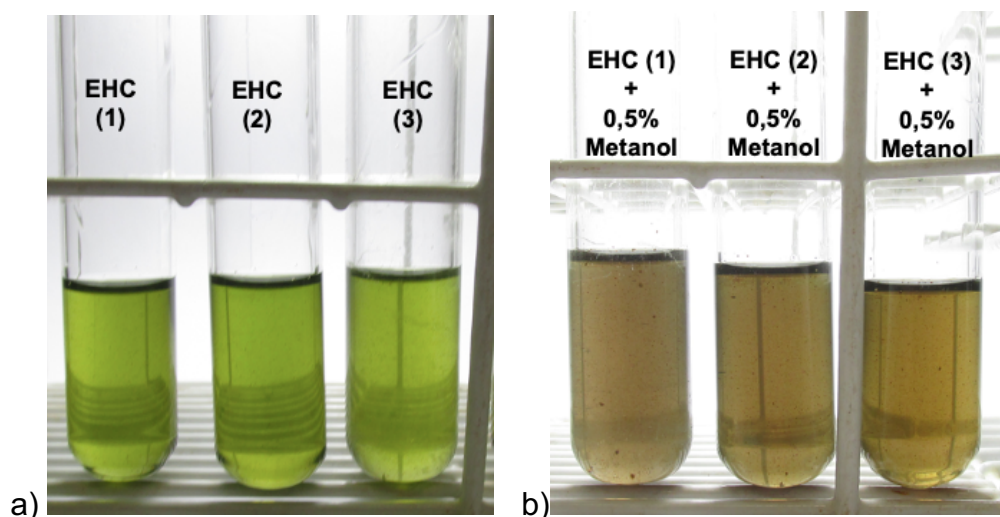
Então, o íon dicromato oxida o álcool a aldeído e se reduz para o estado de oxidação +3, tornando a solução verde (etapa A). A Figura 9 mostra o momento da adição da solução de ácido cromotrópico (etapa B), preparada conforme o item 4.2.1.2 na solução resultante da etapa A, utilizando como amostra etanol PA fortificado com metanol PA a 0,5% (v/v). Nota-se a coloração roxa resultante do composto formado entre o ácido cromotrópico e o formaldeído. Ao agitar o tudo de ensaio, a solução se homogeniza na tonalidade castanha, devido a mistura de verde com roxo.

Figura 10 - Método $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$:Reação entre etapa de oxidação e etapa colorimétrica



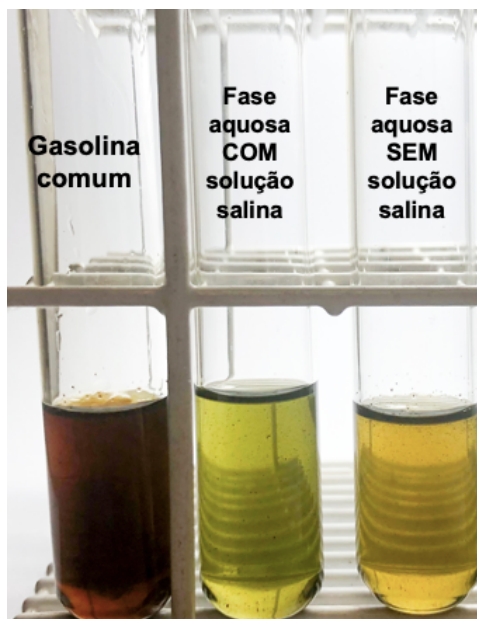
Em seguida, aplicou-se o método em três amostras de Etanol Hidratado Combustível (EHC), cujos resultados estão apresentados na Figura 10a. Depois, as mesmas foram fortificadas com metanol PA e submetidas a sequência de reações do método. Os resultados estão apresentados na Figura 10b.

Figura 11- Método $K_2Cr_2O_7$ em (a) EHC e (b) EHC com 0,5% de metanol PA



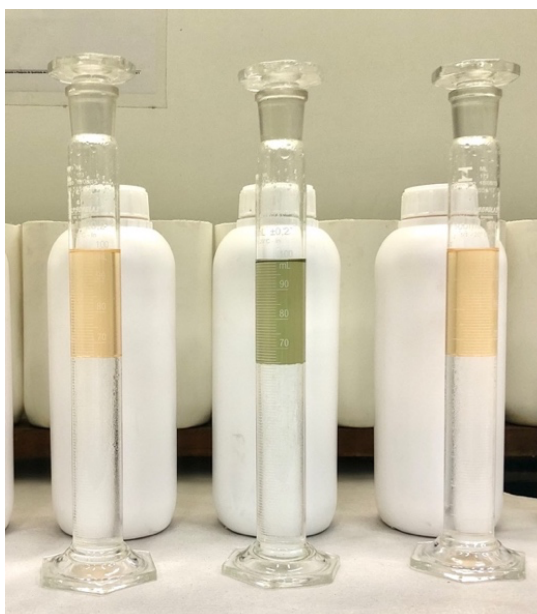
5.2.2. Método em Gasolina

Primeiro, testou-se aplicar o método diretamente na amostra de gasolina comum tipo C. Depois, testou-se o método na fase aquosa da mesma amostra de gasolina, que foi extraída com e sem o uso da solução salina da metodologia descrita na norma ABNT NBR 13992:2015.⁴⁷ Os resultados estão apresentados na Figura 11. Nota-se que sem a extração, a amostra se torna marrom escura, devido a oxidação dos componentes orgânicos da gasolina. Na fase hidroalcoólica (fase inferior) extraída sem a solução salina, a amostra se torna amarelada, porque a extração não foi eficiente e os componentes orgânicos restantes interferem no método. Já na fase hidroalcoólica extraída com solução salina, a coloração gerada é verde, similar a reação realizada no etanol, concluindo-se que a extração foi eficiente.

Figura 12- Método $K_2Cr_2O_7$ em gasolina

Para tornar o método prático para aplicação em campo, a análise de metanol pode ser realizada com o resíduo do teste de proveta descrito na ABNT NBR 13992:2015 para determinar o teor alcoólico em gasolina.

Neste sentido, basta extrair 1 mL da fase hidroalcoólica (fase inferior) com uma pipeta de Pasteur, diluir em 9 mL de água e seguir com o método colorimétrico. A Figura 12 mostra um exemplo de teste de proveta sendo realizado em amostras de GCC, GCA e GCP.

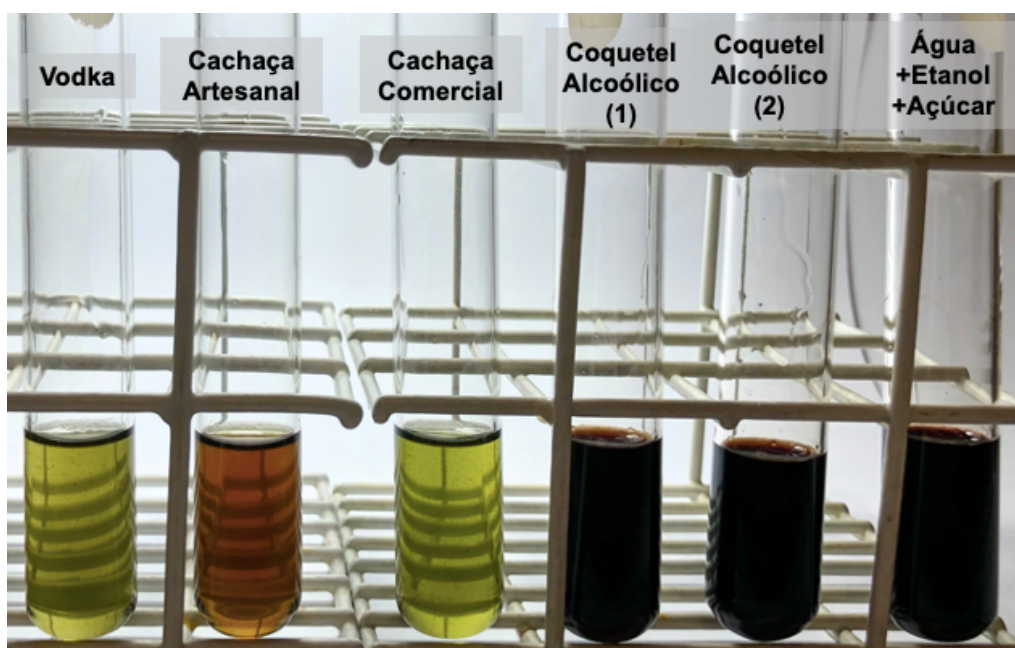
Figura 13- Teste de proveta realizado em GCC, GCA e GCP, respectivamente

5.2.3. Método em Bebidas alcoólicas

Aplicou-se o método em bebidas alcoólicas, sendo elas: Vodka (Absolut-Vanília[®]); Cachaça Artesanal (Claudionor[®]); Cachaça Comercial (51[®]); Coquetel Alcoólico 1 (Corote[®]); Coquetel Alcoólico 2 (Do Barril[®]). Ao final, notou-se que apenas as amostras de vodka e cachaça comercial se tornaram verdes, já a cachaça artesanal e ambos os coquetéis alcoólicos se tornaram castanhos. Em seguida, verificou-se que as amostras que assumiram coloração castanha continham açúcar em sua composição.

Então, aplicou-se o método numa solução formada por: 4,5g de etanol PA, 0,5g de açúcar e 9,5g de água destilada, que também se tornou castanha escura, semelhante aos coquetéis alcoólicos. Analisando a Figura 13, foi possível concluir que a coloração castanha observada nas amostras foi gerada pelo açúcar presente em suas composições. Sendo assim, dentre as bebidas alcoólicas, apenas a vodka e a cachaça comercial da marca 51 foram selecionadas para a validação do método.

Figura 14- Método $K_2Cr_2O_7$ aplicado a bebidas alcoólicas e a solução açucarada



5.2.4. Validação

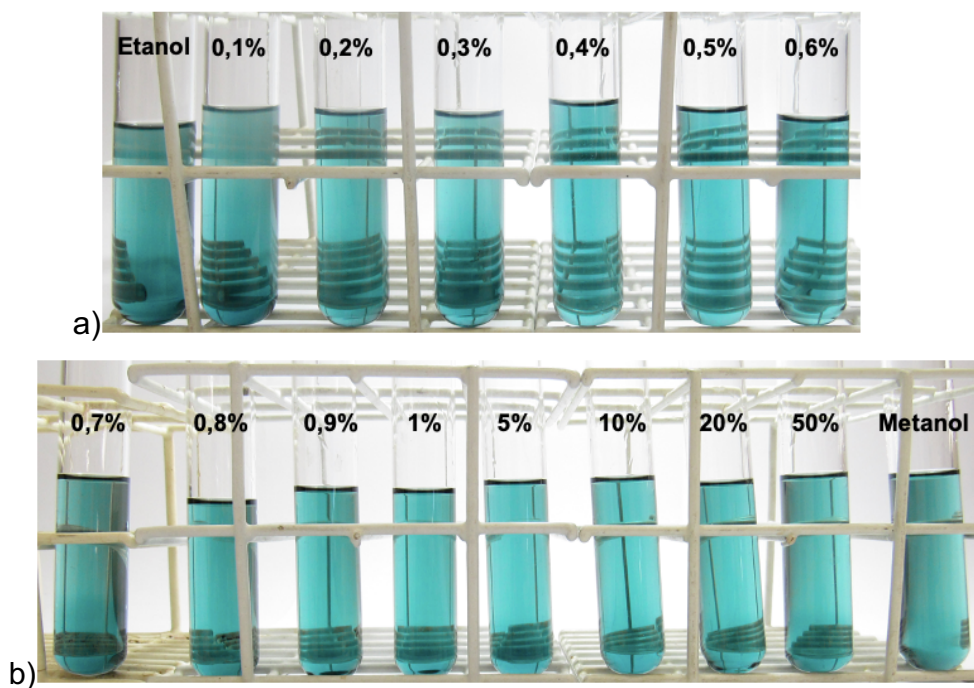
5.2.4.1. Linearidade

Obteve-se resultados relevantes a partir de 2 mL de solução de dicromato de potássio, optando-se então por utilizar 2 mL. Na etapa colorimétrica, obteve-se resultados significativos para diferenciação entre as cores com solução de ácido sulfúrico 18 mol/L.

Após a adição da solução de dicromato de potássio, as amostras se oxidam de maneira igual, tornando-se verdes, independente da concentração de metanol em etanol.

A Figura 14 (a) apresenta a reação de oxidação em amostras de metanol PA em etanol PA nas concentrações de 0,0% a 0,6% (v/v). Já a Figura 14 (b) apresenta a mesma reação aplicada a amostras de metanol PA em etanol PA de 0,7% a 100% (v/v).

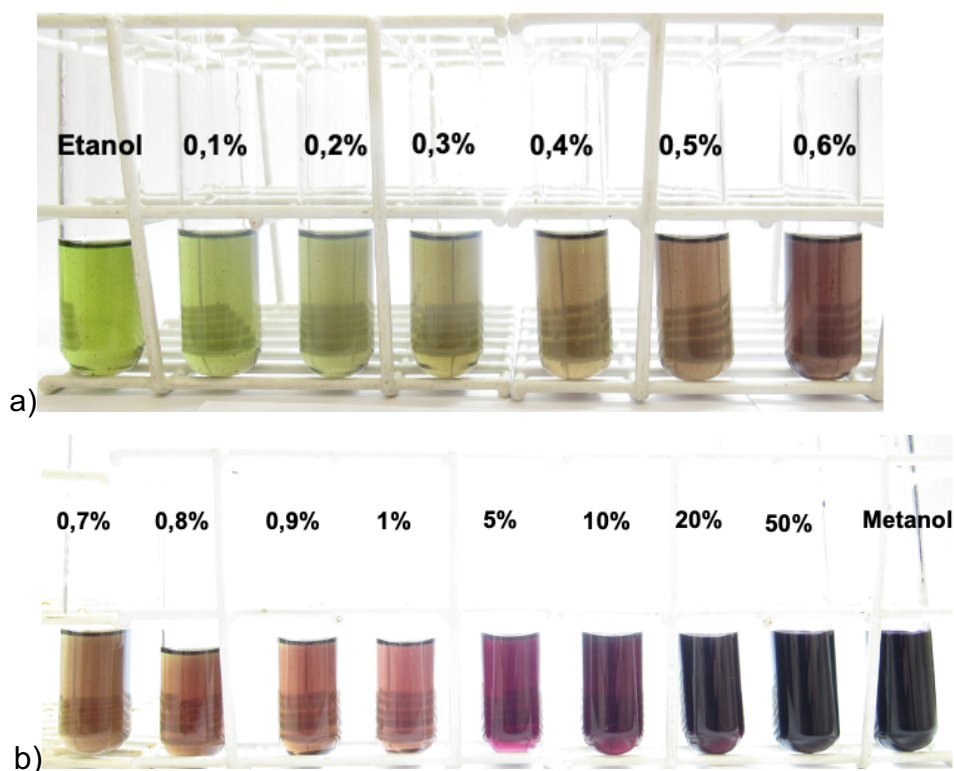
Figura 15- Método $K_2Cr_2O_7$ -Linearidade: Oxidação em metanol + etanol de a) 0 a 0,6% e b) 0,7 a 50%



Em seguida, aplicou-se 3 mL de solução de ácido cromotrópico em ácido sulfúrico 18 mol/L a 1 mL da solução resultante da etapa A. Os resultados estão apresentados nas Figuras 15 (a) e 15 (b).

Ao final da reação, nota-se visualmente uma linearidade de 0 a 0,6% de metanol em etanol, contendo o limite máximo de especificação da ANP de 0,5% em volume, sendo a tonalidade marrom castanho resultante da mistura entre verde e roxo quando a amostra é homogeneizada. De 0,7% a 0,9%, as tonalidades de castanho são visualmente similares. A partir de 1%, o roxo se sobressai linearmente até 10%. A partir de 20%, a tonalidade roxa não permite a distinção visual, pois se torna intensa próxima ao preto. Vale lembrar que a partir de 0,5% (v/v), todas as amostras já estão fora da especificação.

Figura 16- Método $K_2Cr_2O_7$ - Linearidade: Reação colorimétrica em metanol + etanol de a) 0 a 0,6% e b) 0,7 a 100%

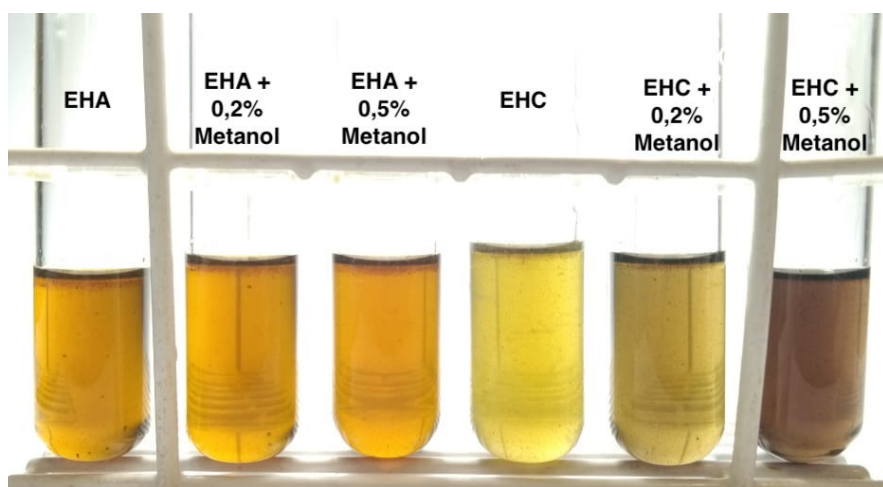


5.2.4.2. Seletividade

5.2.4.2.1. Etanol Hidratado Combustível

Avaliou-se em um mesmo experimento a seletividade e o limite de detecção em Etanol Hidratado Combustível Comum (EHC) e em Etanol Hidratado Aditivado (EHA). Na Figura 16, é possível notar que no caso do EHA, os aditivos interferem no método, fazendo com que todas as amostras fiquem da mesma cor. Já no caso do EHC, é possível notar uma escala entre as três amostras, indubitavelmente de maneira visual, já que, no EHC, o método gerou uma coloração verde e com 0,5% de metanol, gerou uma coloração marrom castanho. Conclui-se que o método é seletivo para EHC no limite de especificação da Resolução ANP N° 19, igual a 0,5% (v/v), mas não é seletivo para EHA. Sendo assim, seguiu-se os ensaios de validação apenas com o EHC.

Figura 17- Método $K_2Cr_2O_7$: Seletividade em EHA e EHC.

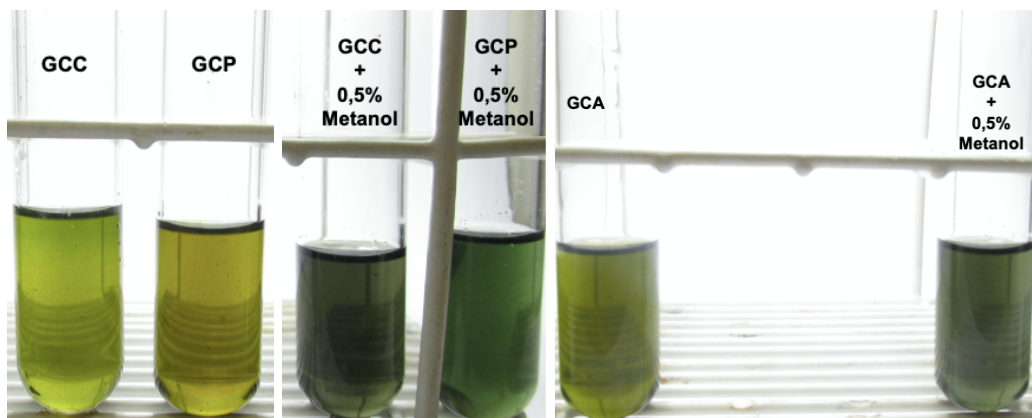


5.2.4.2.2. Gasolina

Avaliou-se a seletividade em amostras de Gasolina Comum tipo C (GCC), Gasolina Premium tipo C (GPC) e Gasolina Aditivada tipo C (GCA). Na Figura 17, é possível notar que em todos os casos, as amostras fortificadas apresentaram um tom de verde mais intenso que antes da fortificação, concluindo-se que o método é seletivo para gasolina, seja ela GCC, GCP ou

GCA, no limite de especificação de 0,5% de metanol em volume, segundo a Resolução ANP N° 807.

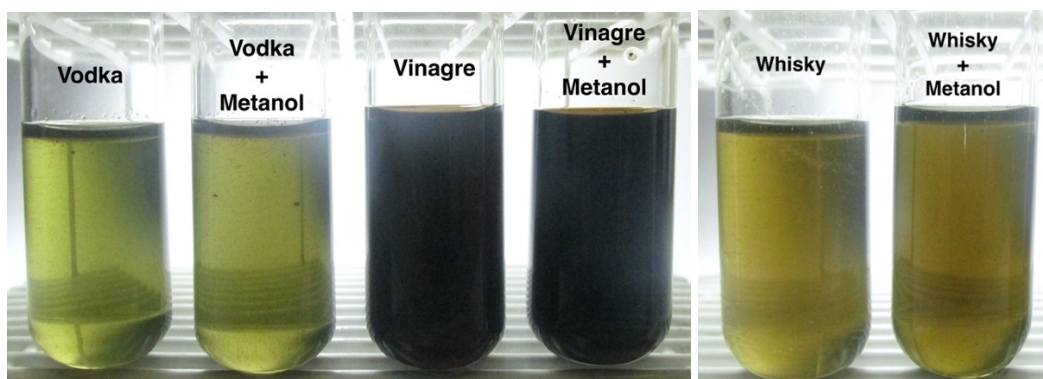
Figura 18- Método $K_2Cr_2O_7$: Seletividade em gasolina Comum e Premium e Aditivada



5.2.4.2.3. Bebidas alcoólicas e vinagre

Avaliou-se a seletividade do método para vodka (Absolut Vanila[®]), vinagre de álcool (Vitalia[®]) e whisky (Ballantine's[®]). Analisando-se a Figura 18, é possível notar que para vodka e whisky, há uma diferença colorimétrica sutil entre as amostras antes e depois da fortificação com metanol PA. Já no caso do vinagre, as duas amostras ficaram castanho escuro. Conclui-se que o método é seletivo para vodka e whisky no limite de especificação do MAPA, igual a 20mg/100mL. Porém é necessário um instrumento de medição digital ou espectrofotométrico para realizar a quantificação. Já em vinagre, o método não é seletivo.

Figura 19- Método $K_2Cr_2O_7$: Seletividade em vodka, vinagre e whisky



5.2.4.2.3.1. Análise de Imagem por RGB

Os resultados em valores de R, G e B medidos para as amostras de vodka e whisky antes e depois da fortificação estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Método $K_2Cr_2O_7$: Análise RGB para bebidas alcoólicas e vinagre

Amostra	Valores RGB		
	R	G	B
Vodka	186	214	85
Vodka + Metanol (20mg/100mL)	144	159	66
Whisky	161	153	25
Whisky + Metanol (20mg/100mL)	122	112	8

Na Tabela 7, nota-se que, como as amostras tem tonalidade esverdeada, os valores de G (green-verde) são mais altos que R (red-vermelho) e B (blue-azul). Ao comparar os valores de RGB das amostras originais com as amostras fortificadas com metanol, nota-se que os valores de RGB reduziram tanto para vodka quanto para whisky, indicando que quando há metanol a 20mg/100mL, o método gera uma coloração mais escura, já que no sistema RGB, o preto tem código (0,0,0). Conclui-se que é possível comprovar a seletividade do método para vodka e whisky, no limite máximo de especificação permitido pelo MAPA tanto a olho nu, quanto pela análise de imagem.

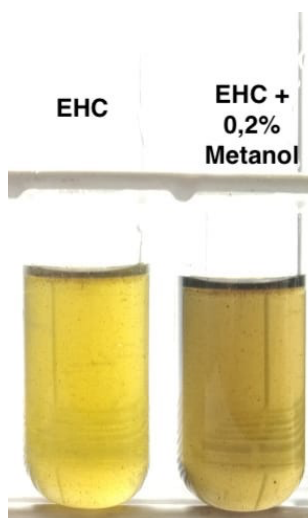
5.2.4.3. Limite de Detecção

5.2.4.3.1. Etanol Hidratado Combustível

A Figura 19 apresenta o resultado do teste de limite de detecção em Etanol Hidratado Combustível (EHC), sendo possível notar que o verde da amostra que contém 0,2% de metanol em volume está indubitavelmente mais escuro que da amostra antes da fortificação. Testou-se a reação numa solução de EHC com 0,1% de metanol (v/v), mas não foi possível distinguir visualmente de modo indubitável as amostras antes e depois da fortificação. Com isso, conclui-se que o limite de detecção do método em EHC é 0,2% (v/v), abaixo do

limite de especificação de 0,5% de metanol (v/v), segundo Resolução ANP N° 19.

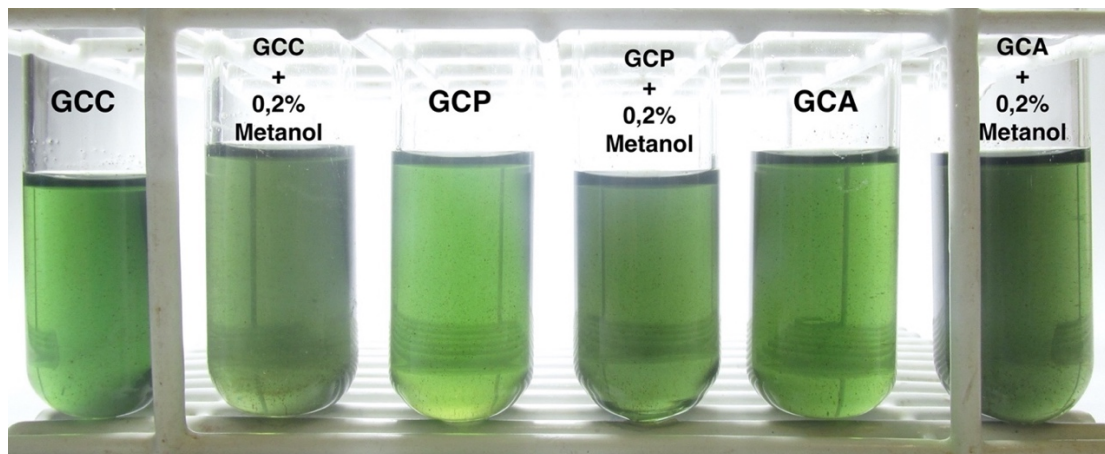
Figura 20- Método $K_2Cr_2O_7$: Limite de Detecção (LD) em EHC.



5.2.4.3.2. Gasolina

A Figura 20 apresenta a determinação do limite de detecção em gasolinas, nas matrizes Gasolina Comum tipo C (GCC), Gasolina Premium tipo C (GCP) e Gasolina Aditivada tipo C (GCA). Em todos os casos, observa-se que o verde da amostra que contém 0,2% de metanol em volume está indubitavelmente mais escuro que nas amostras antes da fortificação. Com isso, conclui-se que o limite de detecção do método em GCC, GCP e GCA é 0,2% (v/v), abaixo do limite de especificação de 0,5% de metanol (v/v), segundo Resolução ANP N° 807.

Figura 21- Método $K_2Cr_2O_7$: Limite de Detecção (LD) em GCC, GCP e GCA.

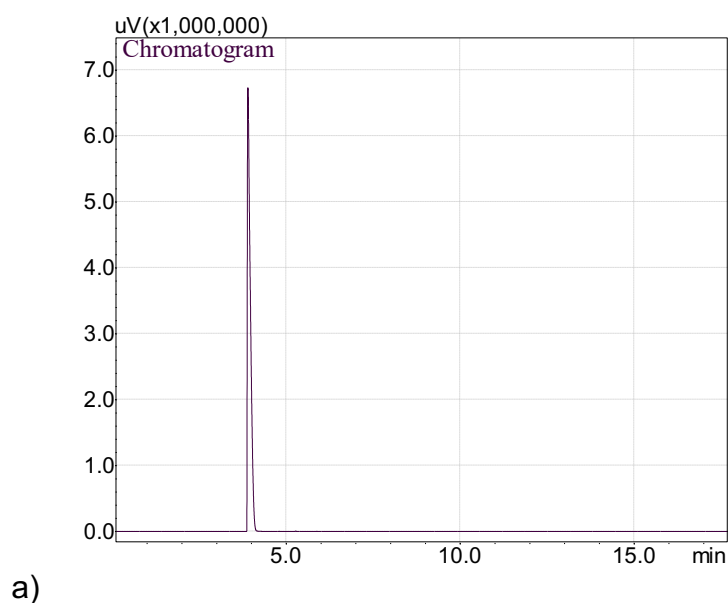


5.2.4.4. Teste de Formação de Tributo

5.2.4.4.1. Etanol Hidratado Combustível

Na Figura 21-a, se encontra o cromatograma da amostra de Etanol Hidratado Combustível (EHC) escolhida para ser fortificada como amostras-teste pelo voluntário e como controle positivo pelo analista. Já na figura 21-b, observa-se a ampliação da região de 2,5 minutos, onde apareceria o pico de metanol se houvesse. A amostra selecionada para ser usada como padrão, também é originalmente isenta de metanol, devido a ausência de pico na região de 2,5 minutos, como mostra o comatograma completo na Figura 22-a e a região de interesse ampliada na Figura 22-b.

Figura 22- Método $K_2Cr_2O_7$: Cromatograma da amostra teste e controle positivo antes das fortificações em EHC a) completo e b) ampliado.



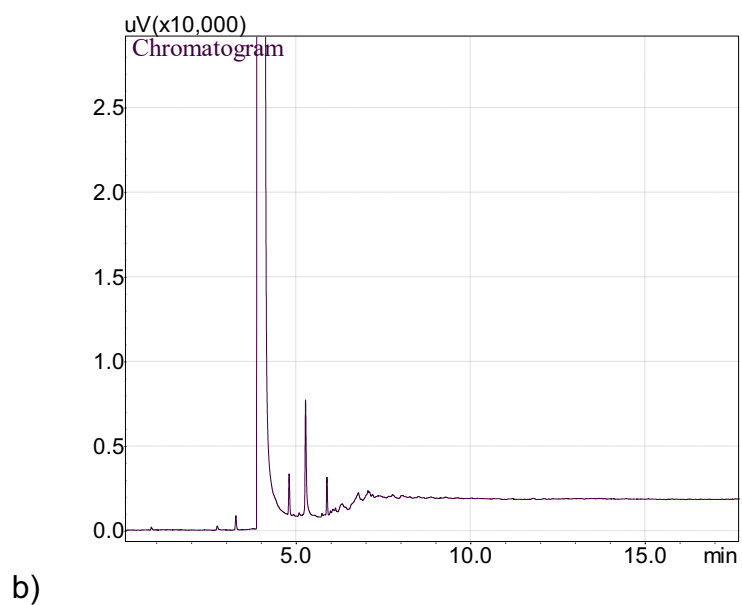
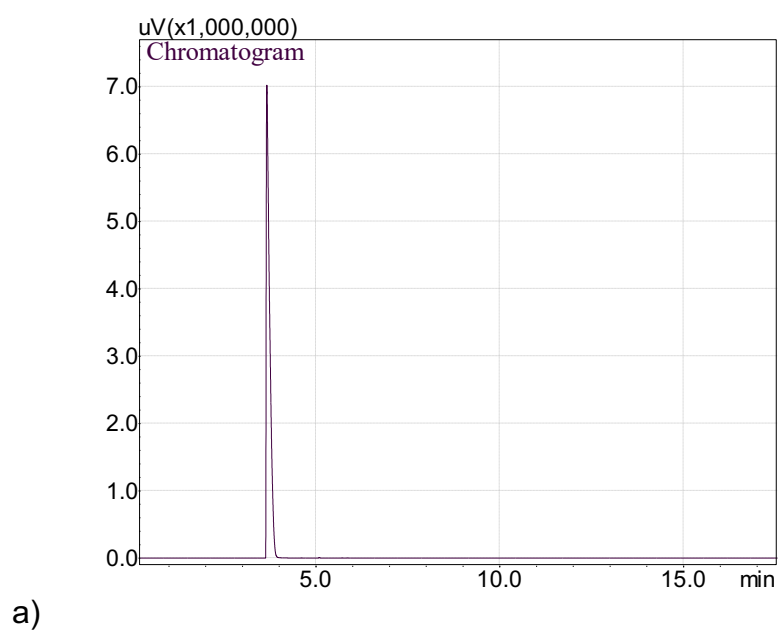
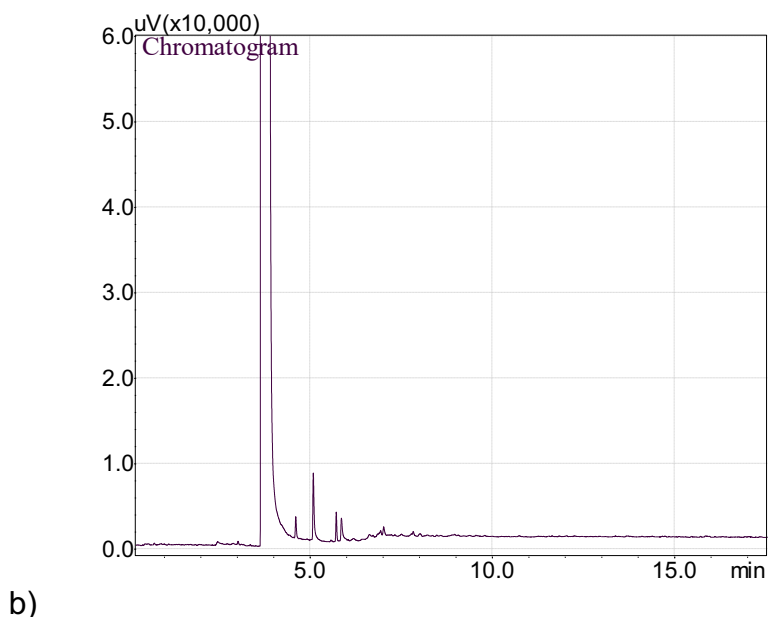


Figura 23- Método $K_2Cr_2O_7$:Cromatograma da amostra padrão antes da fortificação em EHC a) completo e b) ampliado.

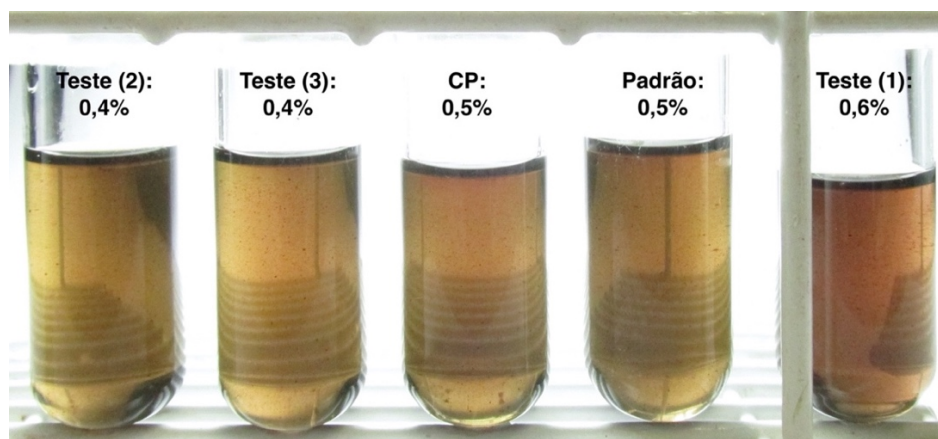




Após realizar as etapas de reação do método nas amostras padrão, controle positivo e testes, obteve-se o resultado apresentado na Figura 23.

O analista notou que as amostras padrão e controle positivo estavam com a mesma tonalidade, ou seja, a amostra selecionada para as fortificações-teste não continha nenhum interferente que diminuísse a eficácia da reação, caso tivesse, a amostra controle-positivo ficaria mais clara que a padrão. O analista também chegou a conclusão assertiva de que o voluntário havia fortificado a Amostra-teste (1) com 0,6% de metanol (v/v), porque esta ficou mais escura que a padrão, e as Amostras-teste (2) e (3) com 0,4% (v/v), porque ficaram mais claras que a padrão, sendo possível formar o tributo de “não conforme” para a amostra (1) e “conforme” para as amostras (2) e (3).

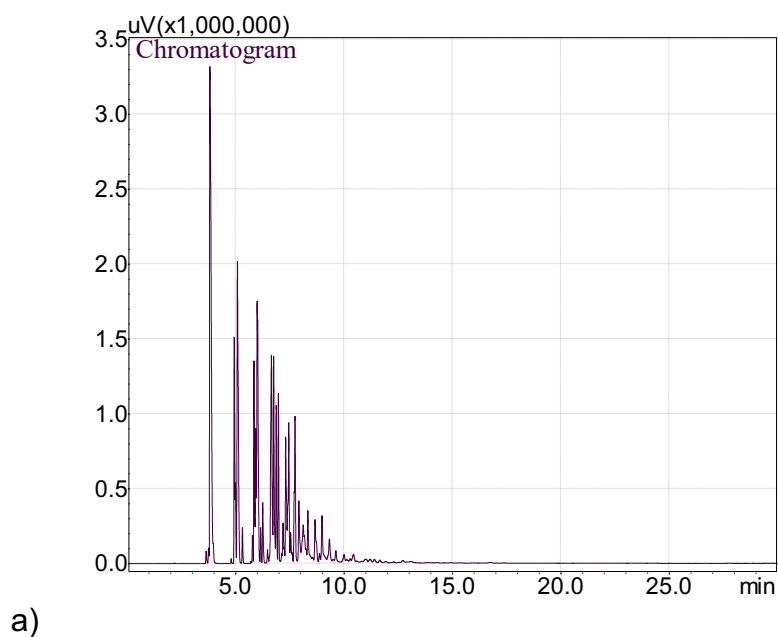
Figura 24- Método $K_2Cr_2O_7$: Teste de formação de tributo com EHC



5.2.4.4.2. Gasolina

A Figura 24-a apresenta o cromatograma completo da Gasolina Comum tipo C (GCC) escolhida para ser fortificada como amostras-teste pelo voluntário e como controle positivo pelo analista e a 24-b apresenta a região de 2,5 minutos ampliada, onde apareceria o pico do metanol se houvesse. A amostra selecionada para ser usada como padrão, também estava isenta de metanol, devido a ausência de pico na região de 2,5 minutos, conforme observado no cromatograma completo na Figura 25-a e a região de interesse ampliada na Figura 25-b.

Figura 25- Método $K_2Cr_2O_7$: Cromatograma da amostra teste e controle positivo antes das fortificações em GCC a) completo e b) ampliado.



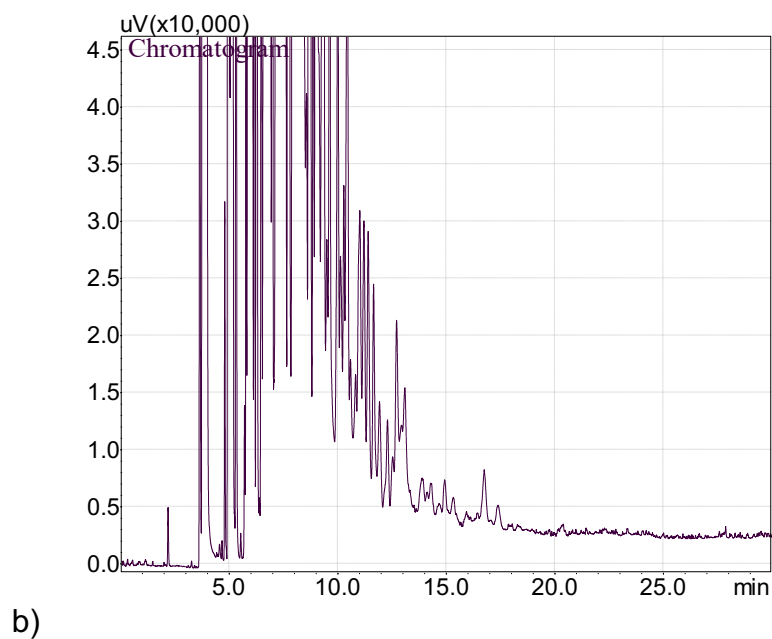
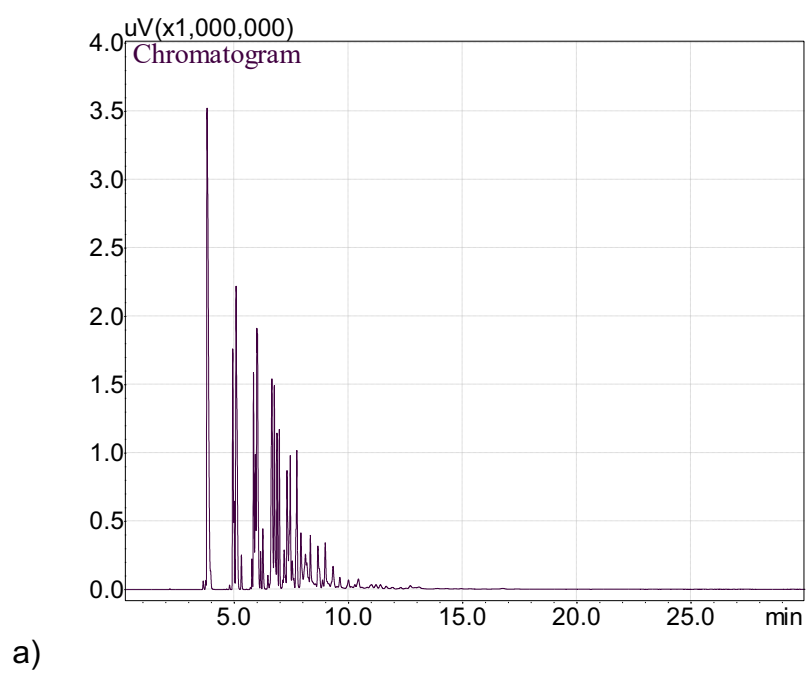
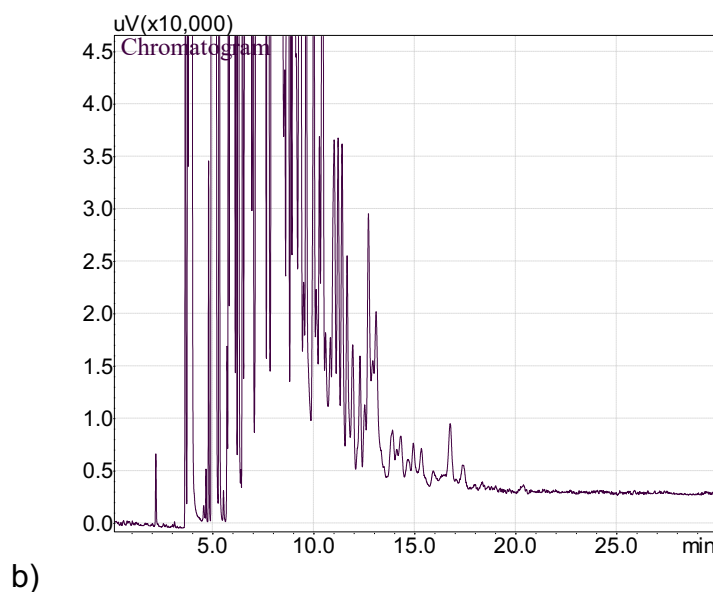


Figura 26- Método $K_2Cr_2O_7$: Cromatograma da amostra padrão antes da fortificação em GCC

a) completo e b) ampliado

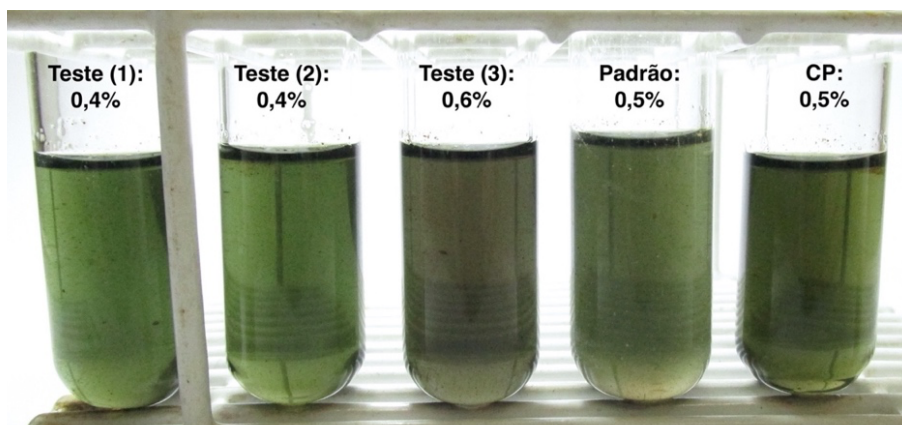




Após realizar as etapas de reação do método com as amostras padrão, controle positivo e testes, obteve-se o resultado apresentado na Figura 26.

O analista notou que a amostra controle-positivo estava um pouco mais escura que a padrão, o que significa que ela está apta para ser usada como amostra teste, pois a mesma não contém nenhum interferente que diminua a ação do método, se tivesse, a amostra controle-positivo estaria mais clara que a padrão. O analista também chegou a conclusão assertiva de que o voluntário havia fortificado as Amostras-teste (1) e (2) com 0,4% de metanol (v/v), porque ficaram mais claras que a padrão, e a (3) com 0,6% (v/v), porque ficou mais escura que a padrão, sendo possível formar o tributo de “conforme” para as amostras (1) e (2) e “não conforme” para a amostra (3).

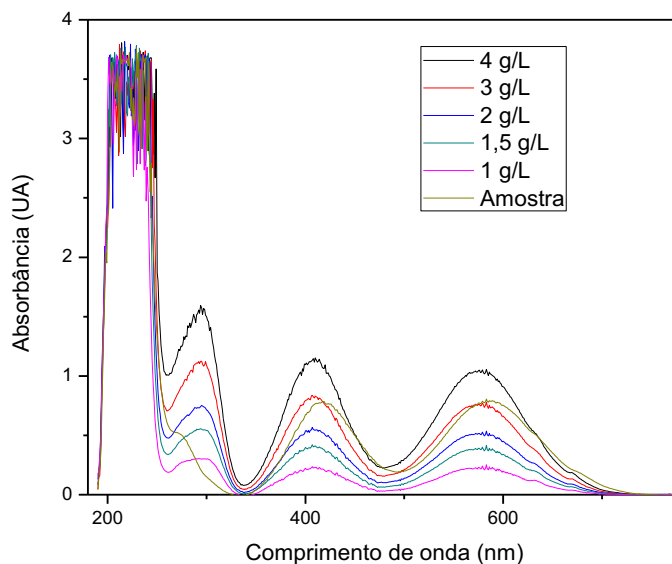
Figura 27- Método $K_2Cr_2O_7$: Teste de formação de tributo com GCC.



5.2.5. Quantificação de cromo III

O perfil espectral da análise de quantificação de cromo III por UV/Vis está apresentada na Figura 27.

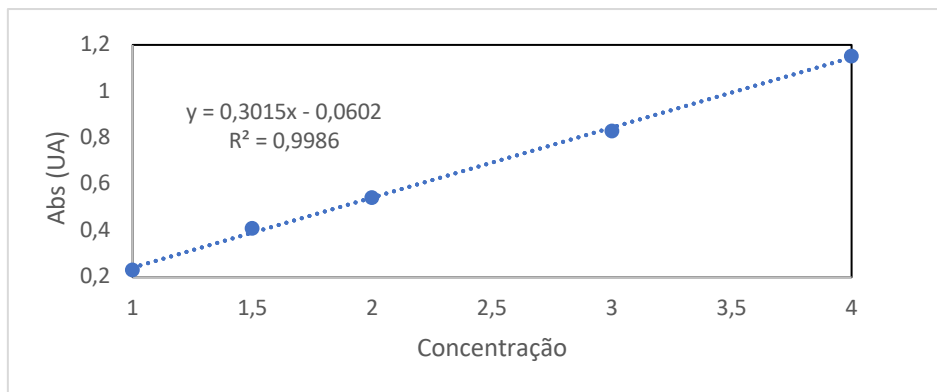
Figura 28- Método $K_2Cr_2O_7$: Determinação de cromo III por espectrometria no uv-visível.



Os valores de absorbância adquiridos no comprimento de onda igual a 410 nm estão apresentados na Tabela 8 e a reta construída a partir desses resultados está na Figura 28.

Tabela 8- Método $K_2Cr_2O_7$: Valores de absorbância para quantificação de Cromo (III)

Concentração em g/L	Valor de Abs
1,0	0,2303
1,5	0,4111
2,0	0,5429
3,0	0,8296
4,0	1,1524

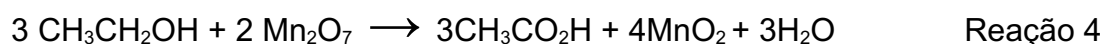
Figura 29- Método $K_2Cr_2O_7$: Determinação de cromo III- Gráfico de Absorbância x concentração

A partir da reta, obteve-se a equação $y = 0.3015x - 0,0602$. Substituindo-se o valor de y pela absorbância obtida na leitura da amostra, encontrou-se a concentração (valor de x) como sendo 2739,9 mg/L. Como a Resolução CONAMA nº 430 de 13/05/2011,⁴⁸ permite que o cromo III seja lançado como efluente até a concentração de 1 mg/L, e considerando que no final da análise, após a adição da solução de ácido cromotrópico, haverá 4 mL de cromo III em solução numa concentração de 684,9 mg/L, seria necessária uma diluição em água até o volume de 2,7 L, para que o resíduo pudesse ser lançado como efluente em termos de cromo III. Portanto, os resíduos de reação devem ser encaminhados para tratamento.

5.3. Método da Oxidação com Permanganato de Potássio ($KMnO_4$)

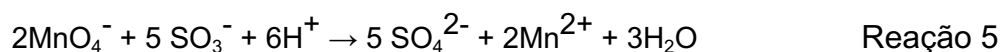
Etapa A- Oxidação

A primeira etapa do método consiste em oxidar os álcoois presentes na amostra com permanganato de potássio em meio ácido, representada pelas reações 3 e 4.²³



Etapa B- Descoloração

A Etapa B consiste no consumo do MnO_2 formado e do excesso de MnO_4^- vindo da solução de permanganato de potássio na etapa de oxidação, representada pela reação 5.



Etapa C- Reação Colorimétrica

A reação entre o formaldeído gerado na etapa de oxidação e o ácido cromotrópico em meio ácido ocorre conforme item 5.2.

5.3.1. Planejamento Experimental Fatorial

A variável dependente (y-Resposta) utilizada no planejamento experimental foi a massa de MnO_2 formada durante a oxidação dos álcoois com permanganato de potássio em meio ácido. Os valores de massa obtidos experimentalmente estão apresentados na Tabela 9.

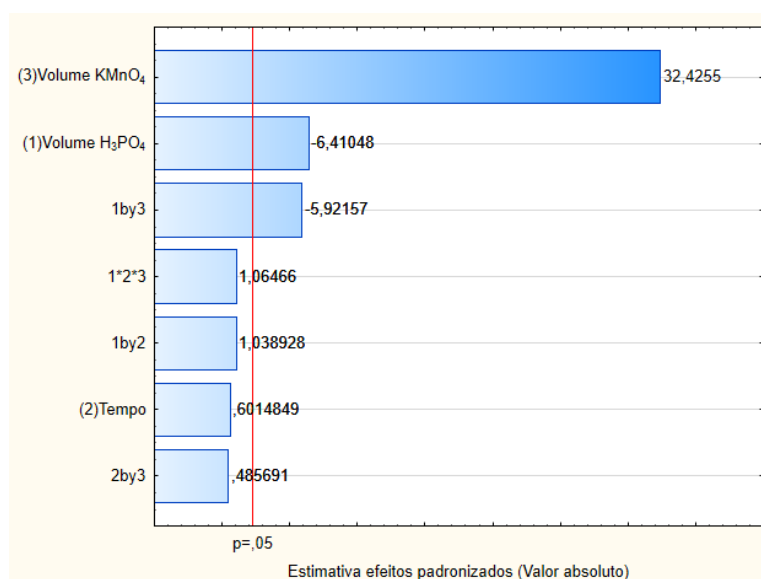
Tabela 9- Respostas experimentais do planejamento fatorial $2^3(\text{I})$

Ensaio	$V_1(\text{Volume H}_3\text{PO}_4)$	$V_2(\text{Tempo})$	$V_3(\text{Volume KMnO}_4)$	y (Resposta)
1	-1	-1	-1	0,0571
2	-1	-1	-1	0,0566
3	-1	-1	1	0,3827
4	-1	-1	1	0,3361
5	-1	1	-1	0,0597
6	-1	1	-1	0,0562
7	-1	1	1	0,3622
8	-1	1	1	0,3408
9	0	0	0	0,1339
10	0	0	0	0,1486
11	1	-1	-1	0,0600

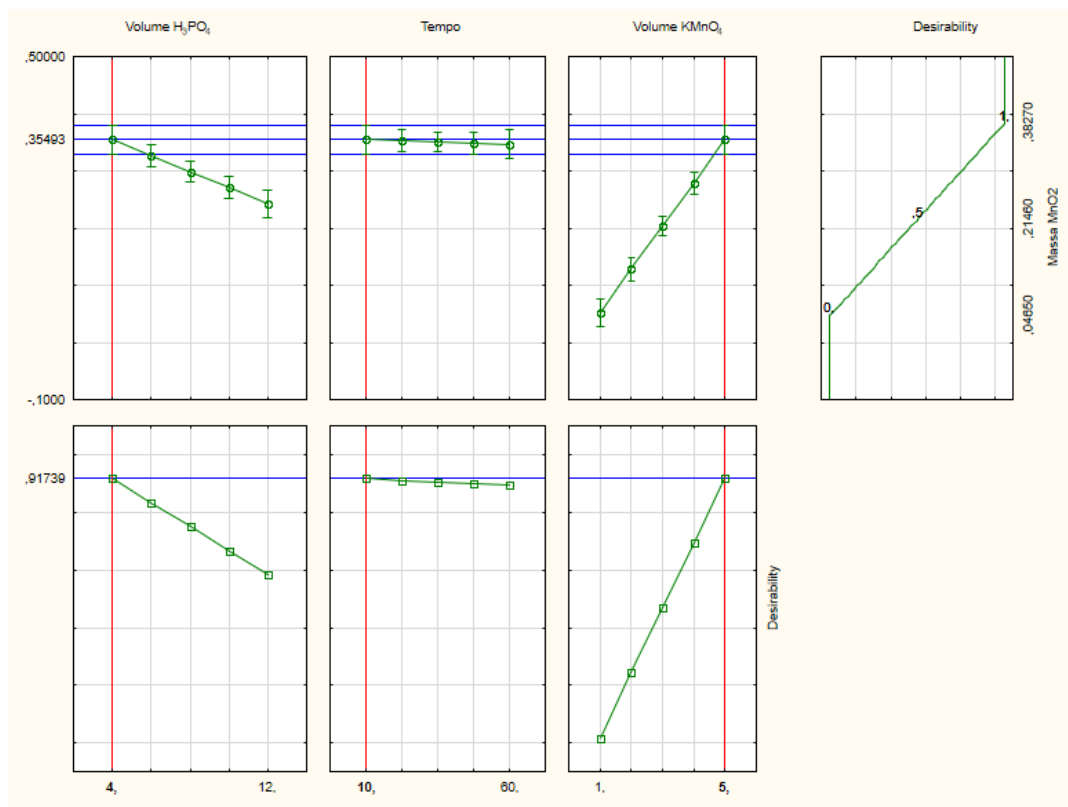
12	1	-1	-1	0,0465
13	1	-1	1	0,2583
14	1	-1	1	0,2361
15	1	1	-1	0,0580
16	1	1	-1	0,0499
17	1	1	1	0,2857
18	1	1	1	0,2583

Para analisar a significância dos parâmetros do modelo, construiu-se o Gráfico de Pareto, na Figura 29, no qual observa-se que os parâmetros significativos para a reação de oxidação são o volume de KMnO_4 adicionado a 5 mL de solução alcoólica, o volume de H_3PO_4 , que é o catalisador da oxidação a temperatura ambiente, além da interação entre essas duas variáveis. A variável “tempo” não é significativa para a resposta.

Figura 30- Planejamento Fatorial (I): Gráfico de Pareto



Os gráficos de desejabilidade (Figura 30) indicam que, uma diminuição do volume de H_3PO_4 , um aumento no volume de KMnO_4 , além de uma diminuição no tempo de reação seriam favoráveis a resposta.

Figura 31- Planejamento Fatorial (I): Gráficos da desejabilidade.

Com os resultados do primeiro modelo, optou-se por fixar o tempo em 2 minutos e realizar um novo planejamento fatorial com réplica e ponto central, utilizando-se 3 variáveis, sendo V_1 (volume de H_3PO_4), V_2 (massa $KMnO_4$ utilizada no preparo da solução oxidante) e V_3 (volume da solução oxidante de $KMnO_4$ adicionado a 5 mL de uma solução de etanol com 0,5% de metanol). O planejamento das variáveis está apresentado na Tabela 10. Já os valores de massa obtidos experimentalmente (Resposta) estão na Tabela 11.

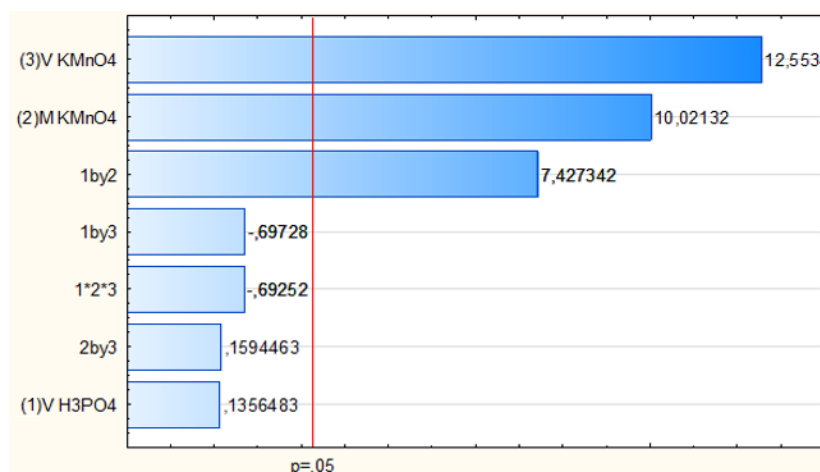
Tabela 10- Variáveis do planejamento fatorial $2^3(II)$

Variáveis	(-)	0	(+)
1: Volume de H_3PO_4	2mL	4mL	6mL
2: Massa $KMnO_4$ (solução)	0,25g	0,50g	0,75g
3: Volume de $KMnO_4$ (amostra)	2mL	5mL	8mL

Tabela 11- Respostas experimentais do planejamento fatorial 2^3 (II).

Ensaio	V₁(Volume H₃PO₄)	V₂(Massa KMnO₄)	V₃ (Volume KMnO₄)	y (Massa MnO₂)
1	-1	-1	-1	0,0066
2	-1	-1	-1	0,0054
3	-1	-1	1	0,0320
4	-1	-1	1	0,0339
5	-1	1	-1	0,0154
6	-1	1	-1	0,0149
7	-1	1	1	0,1212
8	-1	1	1	0,1336
9	0	0	0	0,0386
10	0	0	0	0,0456
11	1	-1	-1	0,0051
12	1	-1	-1	0,0067
13	1	-1	1	0,0323
14	1	-1	1	0,0333
15	1	1	-1	0,0182
16	1	1	-1	0,0298
17	1	1	1	0,1014
18	1	1	1	0,1419

Para analisar a significância dos parâmetros do modelo, construiu-se o Gráfico de Pareto da Figura 31, na qual observa-se que os fatores principais para favorecer a reação de oxidação são o volume de KMnO₄ adicionado a 5 mL de solução alcoólica, a massa de KMnO₄ adicionada na solução oxidante, além da interação entre essas duas variáveis. Também foi possível notar que o fator volume de H₃PO₄ não apresentou efeito significativo para o aumento da resposta.

Figura 32- Planejamento Fatorial (II): Gráfico de Pareto

Através dos resultados anteriores, construiu-se um novo planejamento experimental, apenas com as variáveis significativas, fixando-se o volume de H_3PO_4 em 2 mL e o tempo de reação em 2 minutos e seguiu-se aumentando a massa de KMnO_4 na solução oxidante e o volume da solução de KMnO_4 na amostra, de modo a encontrar uma condição ótima para a resposta. A Tabela 12 mostra os novos valores usados no planejamento e a Tabela 13 mostra os valores de massa de MnO_2 obtidos. Foi acrescentado um ponto central e realizou-se réplica em todos os pontos, totalizando 10 experimentos.

Tabela 12- Variáveis do planejamento fatorial 2^2 .

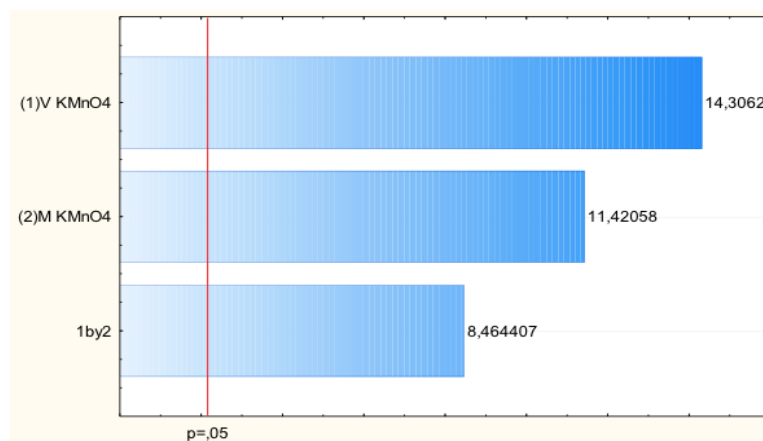
Variáveis	(-)	0	(+)
1: Massa KMnO_4	0,75g	1,0g	1,25g
2: Volume de solução KMnO_4	8mL	11mL	14mL

Tabela 13- Respostas experimentais do planejamento fatorial 2^2 .

Ensaio	V_1 (Massa KMnO_4)	V_3 (Volume KMnO_4)	y (Massa MnO_2)
1	-1	-1	0,1212
2	-1	-1	0,1336
3	-1	1	0,2577
4	-1	1	0,2587
5	0	0	0,2681
6	0	0	0,2820
7	1	-1	0,2138
8	1	-1	0,2339
9	1	1	0,3948
10	1	1	0,4171

O gráfico de Pareto gerado, apresentado na Figura 32 mostra que as variáveis volume de solução de KMnO_4 na amostra, massa de KMnO_4 na solução oxidante e a interação entre as duas variáveis foram significativas para a resposta, não restando nenhuma variável desprezível.

Figura 33- Planejamento Fatorial (III): Gráfico de Pareto



Com o modelo proposto, foi possível visualizar a superfície de resposta gerada na Figura 33 e o gráfico de contorno na Figura 34, que permitem concluir que a região do ótimo foi atingida, pois obteve-se respostas na região vermelho escuro dos gráficos.

Figura 34- Planejamento Fatorial (III): Gráfico de superfície

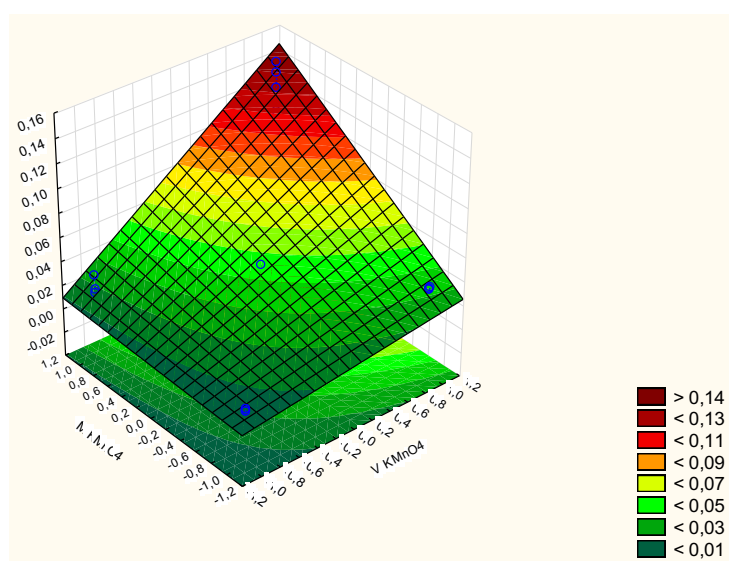
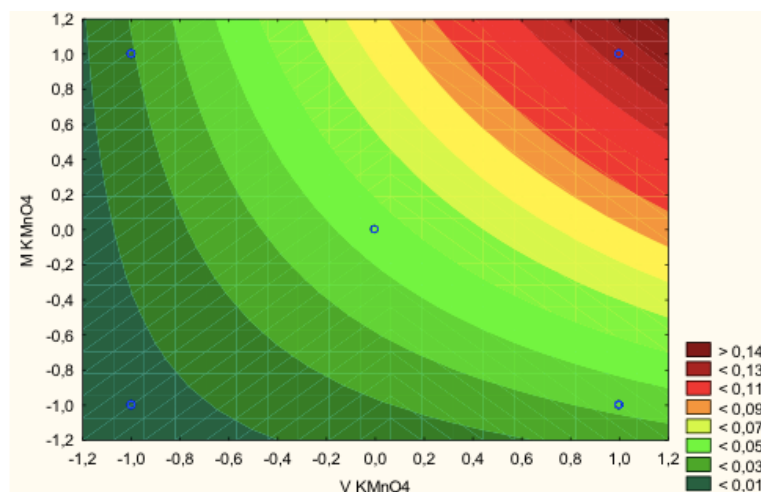


Figura 35- Planejamento Fatorial (III): Gráfico de contorno

A Figura 35 representa o caminho de ascendência para analisar a faixa de linearidade do modelo. Sendo alfa o valor codificado para o caminho de ascendência e extrapolando-se os próximos valores, nos quais as duas variáveis serão positivas, nota-se que o modelo não perde a linearidade na faixa estudada.

Figura 36- Planejamento Fatorial (III): Caminho de ascendência.

Variável A: Volume KMnO4		Variável A: Volume KMnO4		Variável A: Volume KMnO4	
-1	2	-1	2	-1	2
0	5	0	5	0	5
1	8	1	8	1	8
α	2	α	3	α	4
$+\alpha$	11	$+\alpha$	14	$+\alpha$	17

Variável B: Massa KMnO4		Variável B: Massa KMnO4		Variável B: Massa KMnO4	
-1	0,25	-1	0,25	-1	0,25
0	0,50	0	0,5	0	1
1	0,75	1	0,75	1	0,75
α	2	α	3	α	4
$+\alpha$	1,00	$+\alpha$	1,25	$+\alpha$	2

Com os resultados obtidos, foi possível construir uma ANOVA (Análise de Variância), apresentada na Tabela 14, onde estão relacionados diversos parâmetros do modelo proposto.

Tabela 14- ANOVA do planejamento fatorial 2².

Fator	SS	GL	MS	F_(exp)	F_(tab)	p-valor
(1) Volume KMnO₄	0,017391	1	0,017391	204,6683		0,000000
(2) Massa KMnO₄	0,011083	1	0,011083	130,4296		0,000000
Interação entre (1) e (2)	0,006088	1	0,006088	71,6462		0,000001
Falta de ajuste	0,000023	1	0,000023	0,2759	5,14	0,608259
Erro puro	0,001105	13	0,000085			
Total SS	0,035690	17				
SQR	0,96839					

Sendo SS a soma dos quadrados, GL os graus de liberdade, MS a média quadrática, SQR a soma quadrática da regressão, F_(exp) o valor de F experimental e F_(tab) o valor de F teórico (tabelado).

A análise da variância na Tabela 14 confirma as observações realizadas anteriormente, pois a partir da análise do F_{exp} e do valor de *p*, podemos confirmar que as variáveis volume da solução de KMnO₄ adicionada na amostra (V₁) e massa de KMnO₄ adicionada na solução (V₂), além da interação entre elas são estatisticamente significativas a 95%, pois apresentam valores de *p* menores que 0,05, dessa forma pode-se propor um modelo utilizando somente os efeitos mais significativos para a reação de oxidação. Já o valor de *p* da falta de ajuste é maior que 0,05, mostrando que a falta de ajuste do modelo é desprezível.

A Tabela 15 mostra que a variável volume de solução oxidante de KMnO₄ na solução alcoólica tem mais efeito do que massa de KMnO₄ na solução oxidante, mas as duas variáveis são consideravelmente mais significativas para a resposta que a interação entre elas. Também é possível obter a equação do modelo, que é capaz de prever as respostas geradas alterando-se o valor das variáveis.

$$y = 0,078 \times (V \text{ KMnO}_4) + 0,061 \times (M \text{ KMnO}_4) + 0,01 \times (V \text{ KMnO}_4) \times (M \text{ KMnO}_4) + 0,258$$

Tabela 15- Efeitos do planejamento fatorial 2²

Fator	Efeito	Erro Puro	Coefficiente Regressão	Erro Puro
(1) Volume KMnO ₄	0,065937	0,004609	0,032969	0,002305
(2) Massa KMnO ₄	0,052637	0,004609	0,026319	0,002305
Interação entre (1) e (2)	0,039013	0,004609	0,019596	0,002305

O tempo de reação se manteve em 2 minutos, já que tempo não é uma variável significativa. Com o planejamento experimental, concluiu-se que a melhor condição para a etapa de oxidação do método é: 2 mL de H₃PO₄, 1,25g de KMnO₄ e 14 mL de solução de KMnO₄ em 5 mL de amostra, ou seja, nível (+1). Porém, ao realizar a oxidação nessas condições, formou-se tanta massa de MnO₂ que, na segunda etapa, que consistia em descolorir a amostra, a solução de Na₂SO₃ 0,05 mol/L não conseguiu consumir todo o MnO₂, nem com a adição do sal na forma sólida.

Avaliou-se então, as condições do ponto central: 2 mL de H₃PO₄, 1,0g de KMnO₄ e 11 mL de solução de KMnO₄ em 5 mL de amostra e então foi possível levar a reação até o final das três etapas. Porém, utilizando-se as condições do nível (-1) do planejamento, ou seja, 0,75g de KMnO₄, 2 mL de H₃PO₄ e adicionando-se 8 mL de solução oxidante a 5mL de amostra, foi possível levar a reação até o final e obteve-se distinção colorimétrica visual. Então, optou-se por realizar a validação do método nas condições do nível (-1), por trazer vantagens econômicas e gerar menos resíduos.

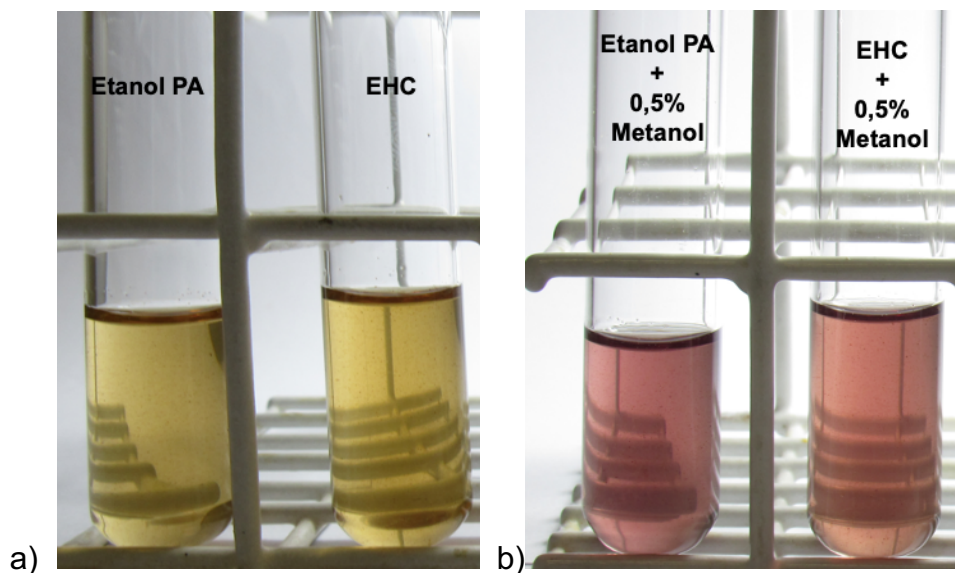
5.3.2. Método em Etanol PA e Etanol Hidratado Combustível

Fortificou-se uma amostra de etanol PA e de EHC com 0,5% de metanol PA em volume, em seguida, aplicou-se o método segundo o item 4.3.3 nas amostras antes e depois da fortificação.

O resultado está apresentado na Figura 36, sendo possível observar que o EHC fortificado com 0,5% de metanol (v/v) gera uma tonalidade violeta um pouco mais clara que o etanol PA fortificado na mesma concentração, provavelmente devido a quantidade de água presente no Etanol Hidratado Combustível, que pode chegar a até 7,5% (v/v). Mas ambas as amostras estão

indubitavelmente diferentes das originais, onde o método resultou numa coloração amarelada.

Figura 37- Método KMnO_4 em a) Etanol PA e EHC e b) Etanol PA e EHC + 0,5% metanol PA

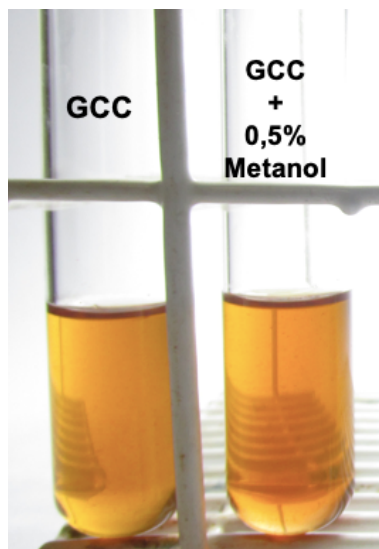


5.3.3. Método em Gasolina

Como o método da oxidação com permanganato de potássio possui uma etapa de descoloração, avaliou-se aplicar as etapas de reação diretamente numa amostra de gasolina comum tipo C. O resultado se encontra na Figura 37, sendo possível notar que tanto a amostra original quanto a que passou por uma fortificação com 0,5% de metanol PA em volume se tornaram alaranjadas, não possibilitando distinção visual entre ambas. Ou seja, mesmo com a etapa de descoloração, é necessário realizar a extração da fase hidroalcoólica seguida de diluição em água antes da oxidação.

Para tornar o método prático para aplicação em campo, a análise de metanol pode ser realizada após o teste de proveta para determinar o teor alcoólico, segundo o método ABNT NBR 13992:2015. Depois, basta extrair 1 mL da fase hidroalcoólica com uma pipeta de Pasteur, diluir em 9mL de água e seguir com a análise colorimétrica.

Figura 38- Método KMnO_4 em gasolina comum



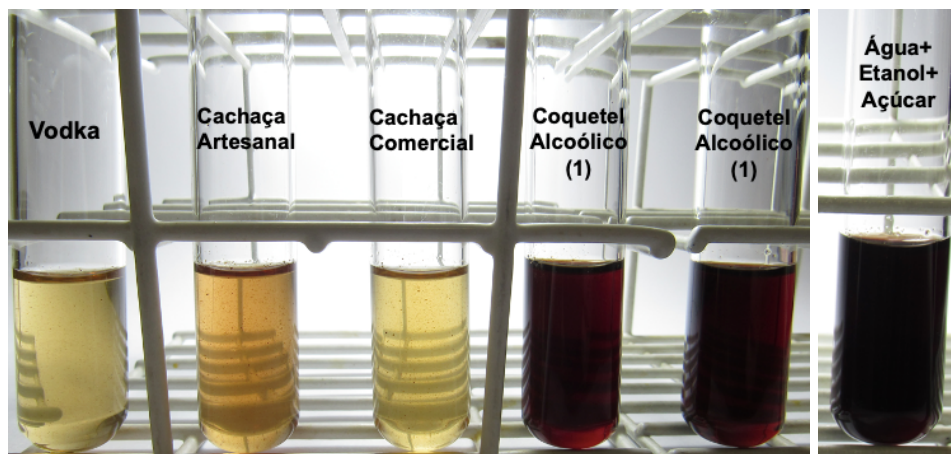
5.3.4. Método em Bebidas alcoólicas

Em primeiro lugar, aplicou-se o método em bebidas alcoólicas, sendo elas: Vodka (Absolut-Vanília®); Cachaça Artesanal (Claudionor®); Cachaça Comercial (51®); Coquetel Alcoólico 1 (Corote®); Coquetel Alcoólico 2 (Do Barril®). Ao final, notou-se que apenas as amostras de vodka e cachaça comercial assumiram coloração amarelada no final das reações, já a cachaça artesanal e ambos os coquetéis alcoólicos ficaram castanho-escuros, sendo que todas continham açúcar em sua composição.

Então, aplicou-se o método numa solução formada por: 4,5g de etanol PA, 0,5g de açúcar e 9,5g de água destilada, que também se tornou marrom. Os resultados estão apresentados na Figura 38. Foi possível concluir que a coloração castanha das amostras está associada a presença de açúcar na composição das matrizes.

Contudo, das bebidas alcoólicas, apenas a vodka e a cachaça comercial foram selecionadas para seguir com a validação.

Figura 39- Método KMnO_4 em bebidas alcoólicas e solução açucarada



5.3.5. Validação

5.3.5.1. Linearidade

Primeiramente, testou-se substituir o ácido fosfórico por ácido sulfúrico na etapa de oxidação. A reação ocorre, porém, há risco de explosão. Por questões de segurança, optou-se por usar um ácido fraco como catalisador, ou seja, o ácido orto-fosfórico PA. Depois, na etapa colorimétrica, testou-se fazer a solução de ácido cromotrópico 0,5% (m/m) em solução de ácido sulfúrico 10; 12; 14; 15; 16; 16,5 e 18 mol/L. Ao final da reação, notou-se que com 10 e 12 mol/L, não houve formação do composto violeta. Com 14 mol/L, a cor surgiu só em metanol PA. Com 15 mol/L, a cor se formou por alguns segundos numa amostra de metanol 0,5% (v/v) em etanol. A partir de 16 mol/L, houve uma formação de cor com boa distinção entre as amostras, obtendo-se um resultado ótimo com 16,5 mol/L, sendo essa a concentração da solução de ácido sulfúrico selecionada.

As Figuras 39-a e b apresentam o método aplicado em amostras de metanol PA de 0,0% a 0,7% (v/v) em etanol PA. Já as Figuras 39-c e d apresentam a mesma reação aplicada a amostras de metanol PA de 0,8% a 20% (v/v) em etanol PA.

Ao final da reação, nota-se visualmente que a intensidade da coloração violeta aumenta linearmente conforme aumenta-se a concentração de metanol na amostra. A Figura 40 traz uma sugestão de escala padrão que pode ser usada

para comparação com uma amostra, afim de estimar a quantidade de metanol presente.

Figura 40- Método KMnO_4 : Linearidade em metanol + etanol de a) 0 a 0,3% e b) 0,4 a 0,7% c) 0,8 a 5% d) 10 e 20%

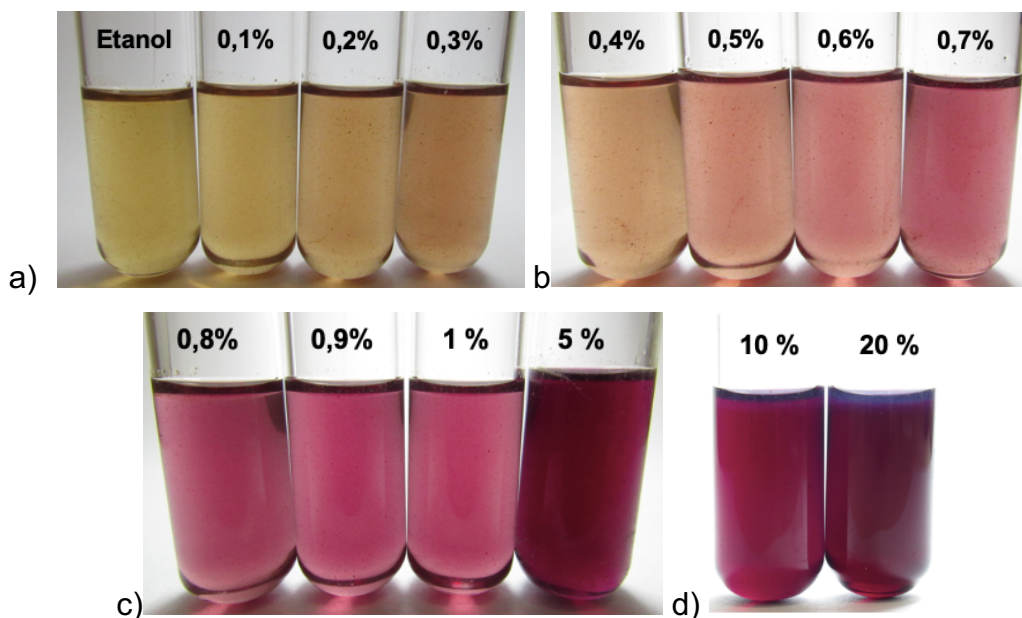
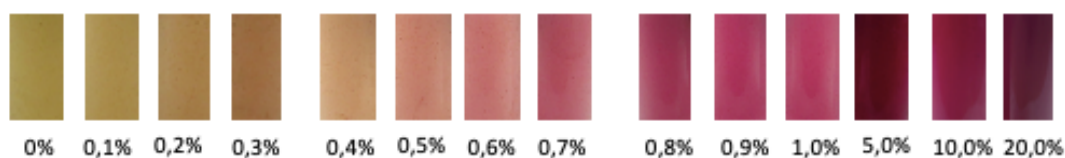


Figura 41- Sugestão de escala padrão para comparação colorimétrica

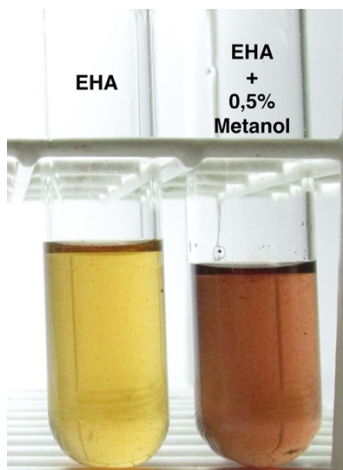


5.3.5.2. Seletividade

5.3.5.2.1. Etanol Hidratado Combustível

Avaliou-se a seletividade do método em Etanol Hidratado Combustível Comum (EHC) e em Etanol Hidratado Aditivado (EHA), conforme apresentado nas Figuras 36 e 41, respectivamente. Em ambos os casos, o método apresentou uma coloração amarelada para a amostra original e violeta para a amostra fortificada com 0,5% de metanol (v/v). Conclui-se que o método é seletivo para EHC e para EHA no limite de especificação da Resolução ANP N°19.

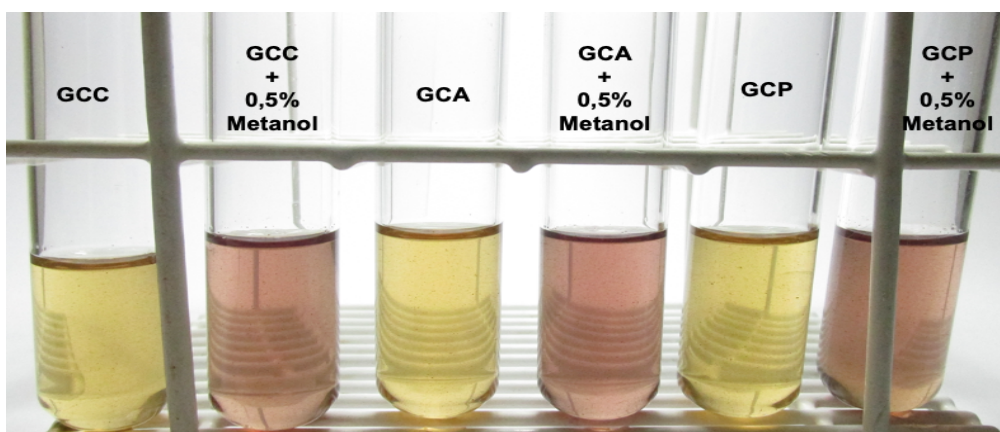
Figura 42- Método KMnO_4 : Seletividade em EHA.



5.3.5.2.2. Gasolina

Avaliou-se a seletividade em amostras de Gasolina Comum tipo C (GCC), Gasolina Premium tipo C (GPC) e Gasolina Aditivada tipo C (GCA). Na Figura 42, é possível notar que em todos os casos, as amostras fortificadas apresentaram um tom de violeta, enquanto as amostras originais apresentaram um tom amarelado. Conclui-se que o método é seletivo para gasolina, seja ela GCC, GCP ou GCA, no limite de especificação da Resolução ANP N° 807 de 0,5% (v/v) de metanol.

Figura 43- Método KMnO_4 : Seletividade em gasolina.

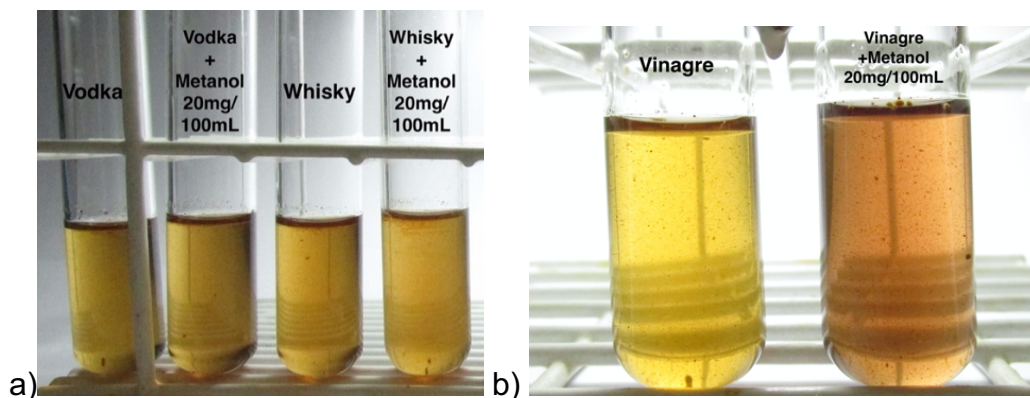


5.3.5.2.3. Bebidas alcoólicas e vinagre

Avaliou-se a seletividade do método em vodka (Absolut-Vanília®), whisky (Ballantine's®) e vinagre de álcool (Vitalia®). Analisando a imagem da Figura 43,

é possível notar que apenas em vinagre há diferença visual entre as amostras originais e as fortificadas com metanol PA. Sendo assim, pode-se concluir que o método é seletivo a olho nu para vinagre no limite de especificação do MAPA, igual a 20mg/100mL.

Figura 44- Método KMnO_4 : Seletividade em a) bebidas alcoólicas e b) vinagre.



5.3.5.2.3.1. Análise de Imagem por RGB

Os resultados em valores de R, G e B medidos para as amostras de vodka, whisky e vinagre antes e depois da fortificação estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16- Método KMnO_4 : Análise RGB para bebidas alcoólicas e vinagre

Amostra	Valores RGB		
	R	G	B
Vodka	192	185	75
Vodka + Metanol (20mg/100mL)	158	116	0
Whisky	207	177	48
Whisky + Metanol (20mg/100mL)	199	152	0
Vinagre	254	243	56
Vinagre + Metanol (20mg/100mL)	208	126	15

Observando os resultados da Tabela 16, ao comparar os valores de RGB das amostras originais com as amostras fortificadas com metanol, nota-se que os mesmos reduziram para as três matrizes, o que indica que quando há

metanol, o método gera como resultado uma tonalidade mais escura, que tende ao preto, o qual possui código (0,0,0) no sistema RGB.

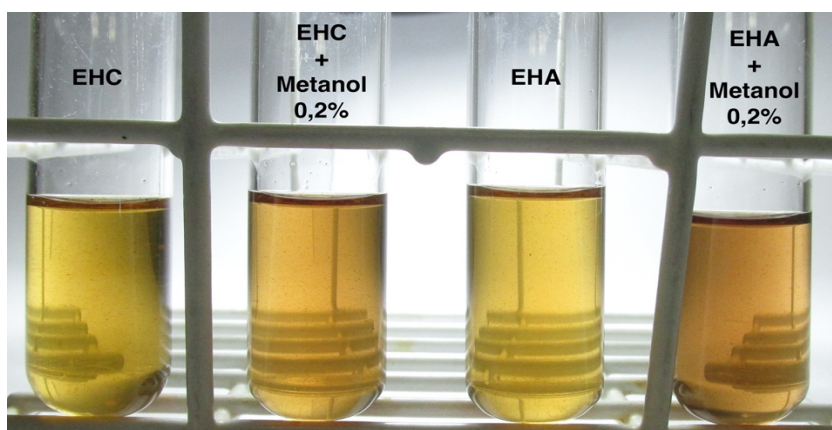
Portanto, é possível comprovar a seletividade do método no limite máximo de especificação do MAPA igual a 20mg/100mL para vodka, whisky e para vinagre, apesar do MAPA não indicar limite máximo para este último, por meio da análise de imagem.

5.3.5.3. Limite de Detecção

5.3.5.3.1. Etanol Hidratado Combustível

A Figura 44 apresenta a determinação do limite de detecção em Etanol Hidratado Combustível Comum (EHC) e Etanol Hidratado Aditivado (EHA), sendo possível notar que em ambos os casos, as amostras que contém 0,2% de metanol (v/v) estão levemente violeta, enquanto as amostras originais apresentam coloração amarelada. Testou-se a reação em soluções de EHC e EHA com 0,1% de metanol (v/v), mas não foi possível distinguir visualmente as amostras antes e depois da fortificação. Com isso, conclui-se que o limite de detecção do método em EHC e em EHA é 0,2% (v/v), abaixo do limite de especificação de 0,5% de metanol em volume, segundo Resolução ANP Nº 19.

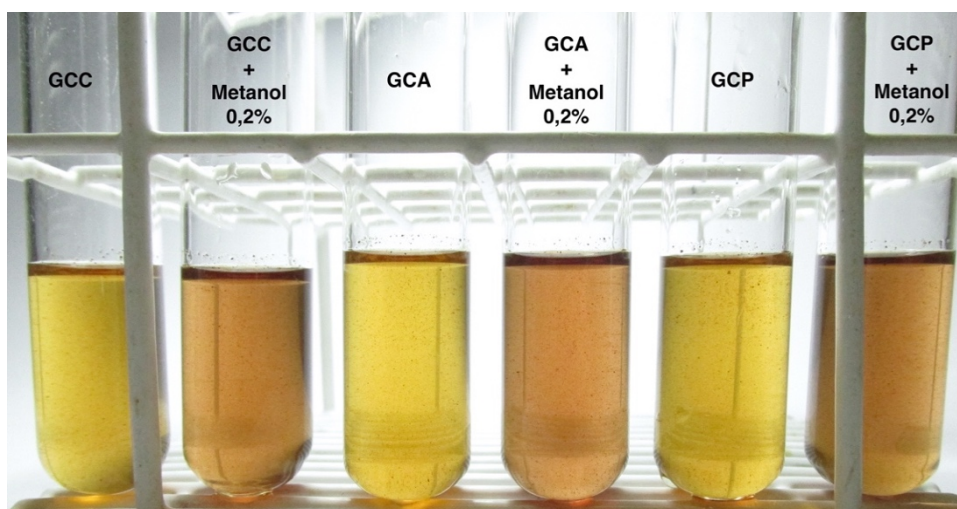
Figura 45- Método KMnO_4 : Limite de Detecção (LD) em EHC e em EHA



5.3.5.3.2. Gasolina

A Figura 45 apresenta a determinação do limite de detecção nas matrizes Gasolina Comum tipo C (GCC), Gasolina Aditivada tipo C (GCA) e Gasolina Premium tipo C (GCP). Em todos os casos, observa-se que as amostras que contém 0,2% de metanol (v/v) estão indubitavelmente com tonalidade de violeta, enquanto as mesmas amostras antes da fortificação estão amareladas. Com isso, conclui-se que o limite de detecção do método em GCC, GCA e GCP é 0,2% (v/v), abaixo do limite de especificação de 0,5% de metanol (v/v), segundo Resolução ANP N° 807.

Figura 46- Método KMnO_4 : Limite de Detecção (LD) em GCC, GCA e GCP.



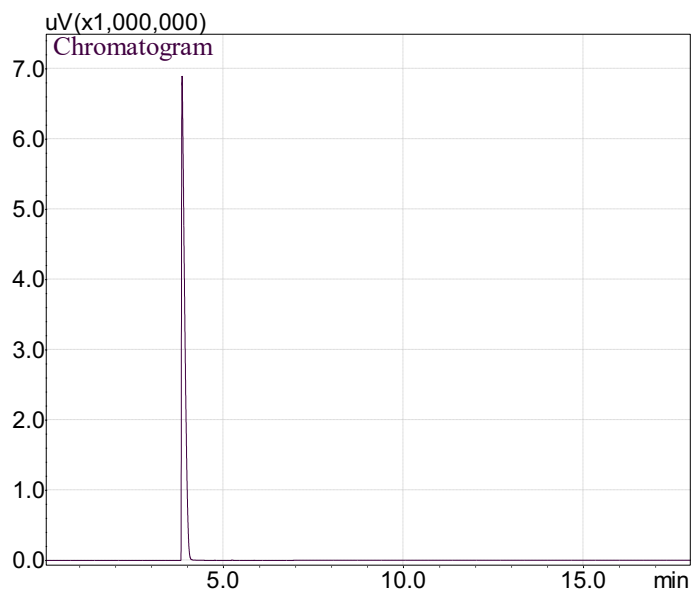
5.3.5.4. Teste de Formação de Tributo

5.3.5.4.1. Etanol Hidratado Combustível

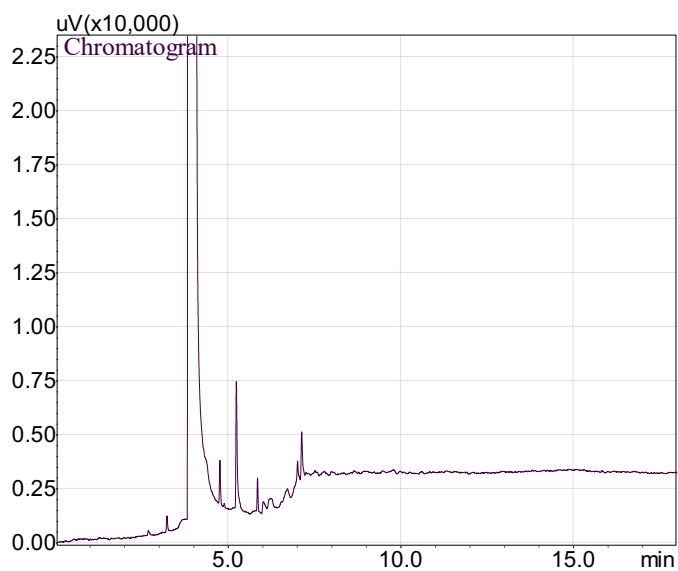
Na Figura 46-a e b, observa-se nos cromatogramas completo e ampliado na região do tempo de retenção do metanol, de aproximadamente 2,5 minutos, que a amostra de Etanol Hidratado Combustível (EHC) escolhida para ser fortificada como amostras-teste pelo voluntário e como controle positivo pelo analista é originalmente isenta de metanol. A amostra selecionada para ser usada como padrão, também é originalmente isenta de metanol, devido a

ausência de pico na região de 2,5 minutos nos cromatogramas da Figura 47-a (completo) e b (ampliado na região de interesse).

Figura 47- Método KMnO_4 : Cromatograma da amostra teste e controle positivo antes das fortificações em EHC a) completo e b) ampliado.

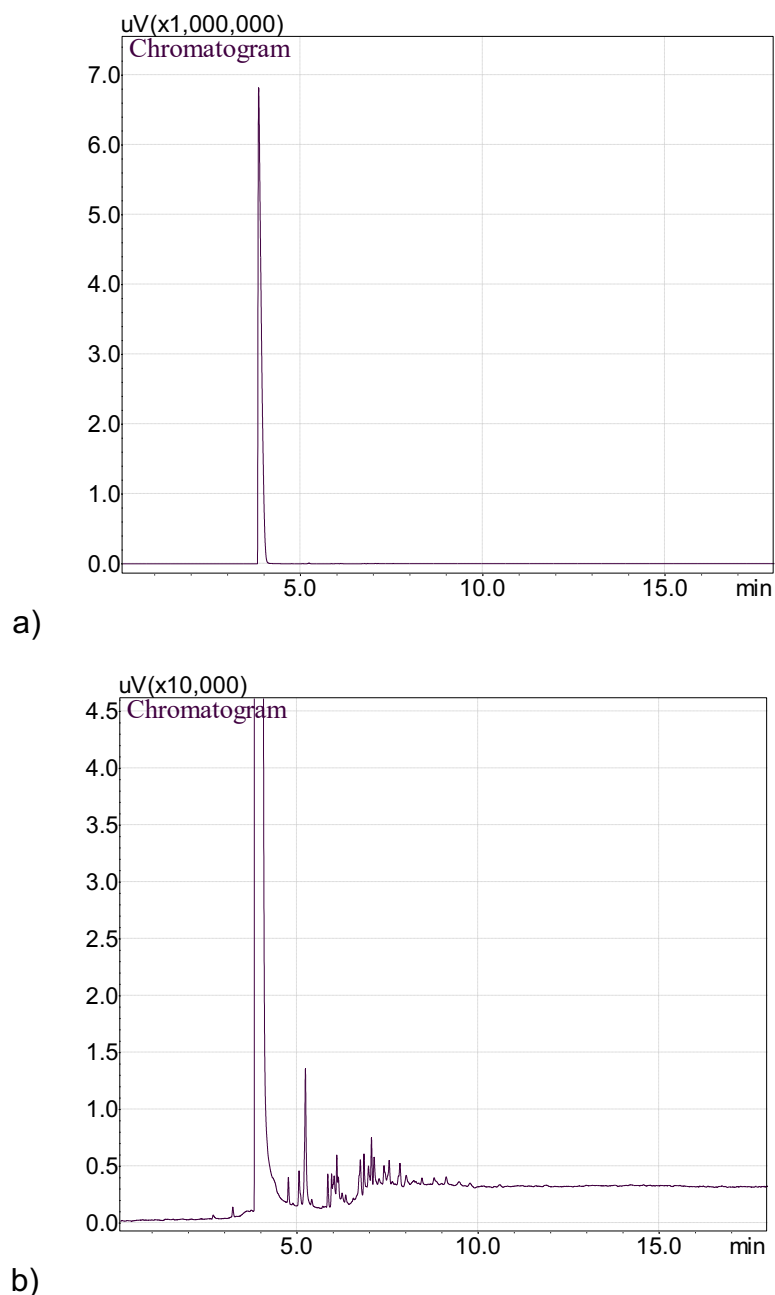


a)



b)

Figura 48- Método KMnO_4 : Cromatograma da amostra padrão antes da fortificação em EHC a) completo e b) ampliado

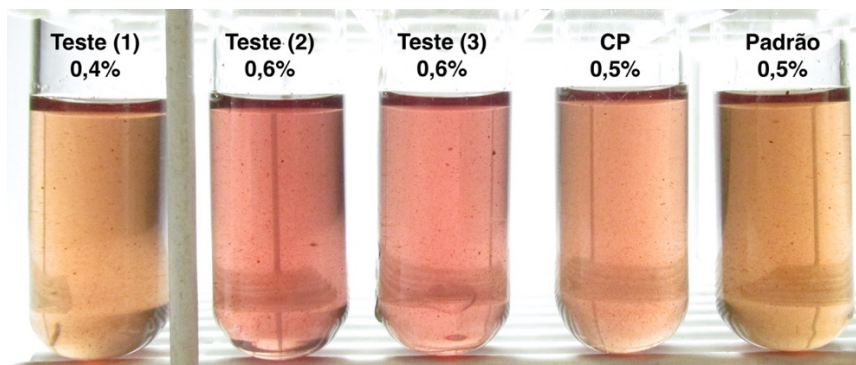


Após realizar as etapas de reação do método nas amostras padrão, controle positivo e testes, obteve-se o resultado apresentado na Figura 48.

O analista notou que a tonalidade das amostras padrão e controle positivo estavam próximas, ou seja, a amostra selecionada para as fortificações-teste não continha nenhum interferente. Após análise visual, o analista concluiu assertivamente que o voluntário havia fortificado a Amostra-teste (1) com 0,4% de metanol (v/v), porque esta ficou mais clara que a padrão, e as Amostras-teste

(2) e (3) com 0,6% (v/v), porque ficaram mais escuras que a padrão. Sendo assim, foi possível formar o tributo de “conforme” para a amostra (1) e “não conformes” para as amostras (2) e (3).

Figura 49- Método KMnO_4 : Teste de formação de tributo com EHC.



5.3.5.4.2. Gasolina

Nos cromatogramas das Figuras 49-a e b, é possível observar que a amostra de Gasolina Comum tipo C (GCC) escolhida para ser fortificada pelo voluntário como amostra-teste e como controle positivo pelo analista está isenta de metanol, devido a ausência de pico na região de 2,5 minuto, bem como a amostra selecionada para servir de padrão, cujos cromatogramas estão apresentados nas Figuras 50-a (completo) e b (ampliado na região de interesse).

Figura 50- Método KMnO_4 : Cromatograma da amostra teste e controle positivo antes das fortificações em GCC a) completo e b) ampliado

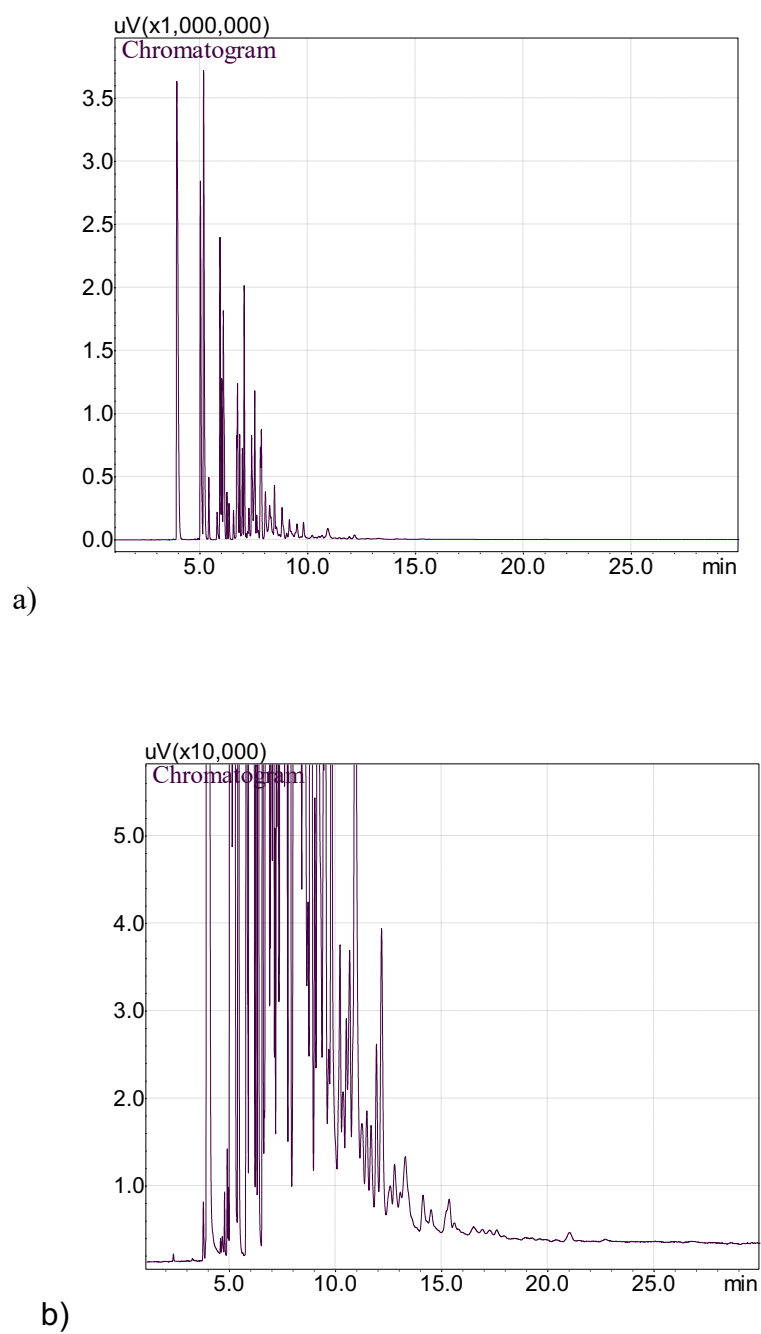
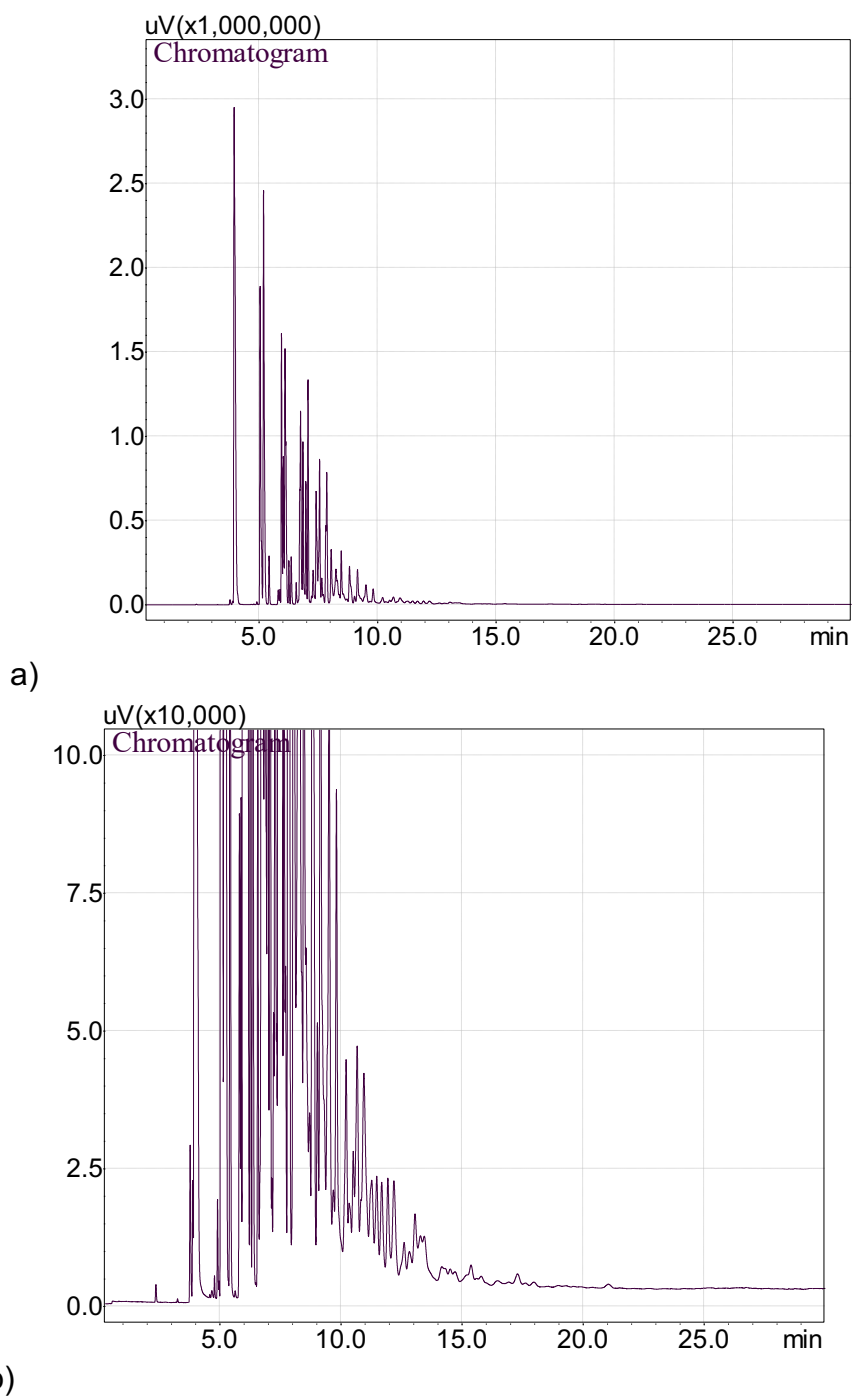


Figura 51- Método KMnO_4 : Cromatograma da amostra padrão antes da fortificação em GCC a) completo e b) ampliado

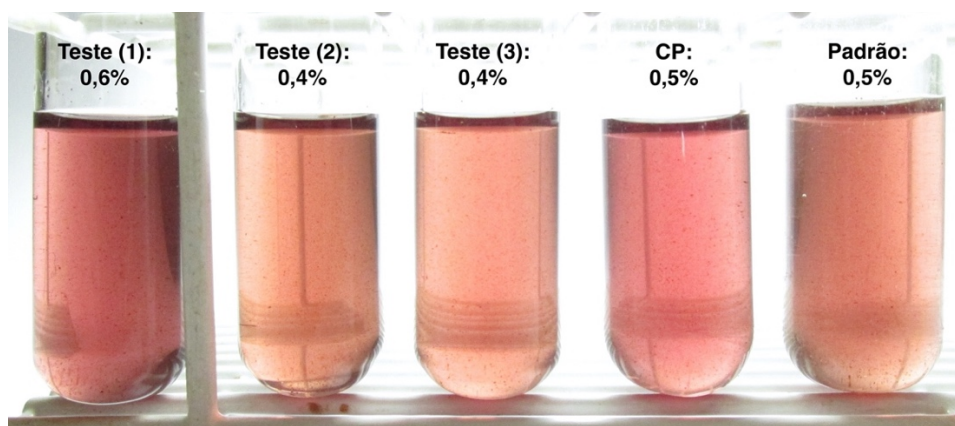


Após realizar as etapas de reação do método nas amostras padrão, controle positivo e testes, obteve-se o resultado apresentado na Figura 51.

O analista notou que a amostra controle-positivo estava um pouco mais escura que a padrão, o que significa que ela está apta para ser usada como amostra-teste, pois a mesma não contém nenhum interferente que diminua a

ação dos reagentes do ensaio. O analista também chegou a conclusão assertiva de que a Amostra-teste (1) estava fortificada com 0,6% de metanol (v/v), porque ficou mais escura que a padrão, e as amostras (2) e (3) estavam com 0,4% (v/v), porque ficaram mais claras que a padrão, sendo possível atribuir o tributo de “não conforme” a amostra (1) e “conforme” às amostras (2) e (3).

Figura 52- Método KMnO_4 : Teste de formação de tributo com GCC.



5.3.5.5. Teste com Fotômetro Portátil

5.3.5.5.1. Seletividade em bebidas alcoólicas e vinagre

As amostras de bebidas alcoólicas analisadas pelo método foram medidas nos fotômetros portáteis desenvolvidos pelos pesquisadores Rafaela Silva Lamarca e Gabriel Baroffaldi Piassalonga, sob orientação do Professor Doutor Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes, no Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica do Instituto de Química da Unesp em Araraquara. Os dados adquiridos com as amostras analisadas geram sinais resistência (1), e um sinal digital em bits (2). Os resultados obtidos são apresentados Tabela 17.

Tabela 17- Seletividade para bebidas alcoólicas com os fotômetros (1) e (2)

Amostra	Dispositivos Portáteis	
	(1)k Ω	(2) Bits
Vodka	1189	835
Vodka + Metanol (20mg/100mL)	1339	771
Whisky	1155	736
Whisky + Metanol (20mg/100mL)	1269	656
Vinagre	1430	846
Vinagre + Metanol (20mg/100mL)	1641	426

No caso do espectrômetro portátil (1), notou-se que para as três matrizes analisadas, vodka, whisky e vinagre, o sinal gerado pelo dispositivo era sempre maior quando a amostra era fortificada com metanol a 20mg/100mL. Este dispositivo utiliza um fotoresistor, cuja resistência elétrica aumenta proporcionalmente com a luz incidente. Portanto, quando há metanol na amostra, a resistência do sensor diminui e a corrente aumenta.

Já para o dispositivo (2) que gera sinal digital, o sinal da amostra fortificada era sempre menor que da original. Este dispositivo utiliza um fotodiodo, ou seja, quando há metanol presente na amostra e esta consequentemente se torna mais escura, menor é a luz que chega no sensor e consequentemente menos energia ele "gera".

Ambos os dispositivos portáteis de medição demonstraram seletividade para as três matrizes analisadas no limite de especificação do MAPA, já que os sinais para as amostras fortificadas eram sempre distintos que das amostras originais.

5.3.5.6. Teste de Performance em EHC

5.3.5.6.1. Análise Cromatográfica

A análise cromatográfica determinou que a amostra desconhecida de EHC continha 4,1% (m/m) de metanol em sua composição, segundo cromatograma da Figura 52, sendo "a", o cromatograma completo e "b", a região

na qual aparece o pico do metanol ampliada. Em seguida, determinou-se a massa específica da amostra a 20°C, igual a 0,80998 g/cm³ e realizou-se a conversão em (v/v) segundo a Equação 5.

$$V_i = \frac{M_i \times D_a}{D_i} \quad \text{Eq.(5)}$$

Onde:

V_i = volume percentual do componente i;

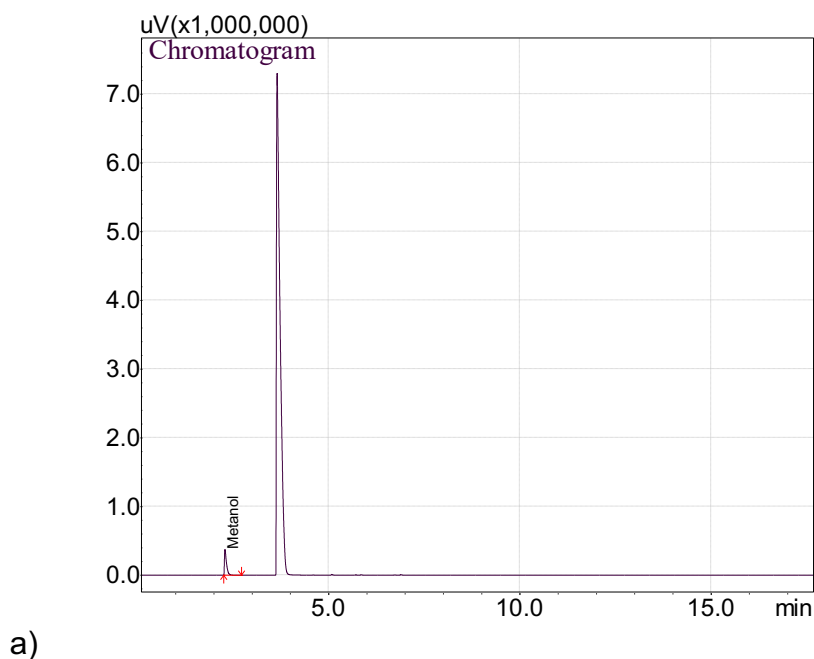
M_i = massa percentual do componente i;

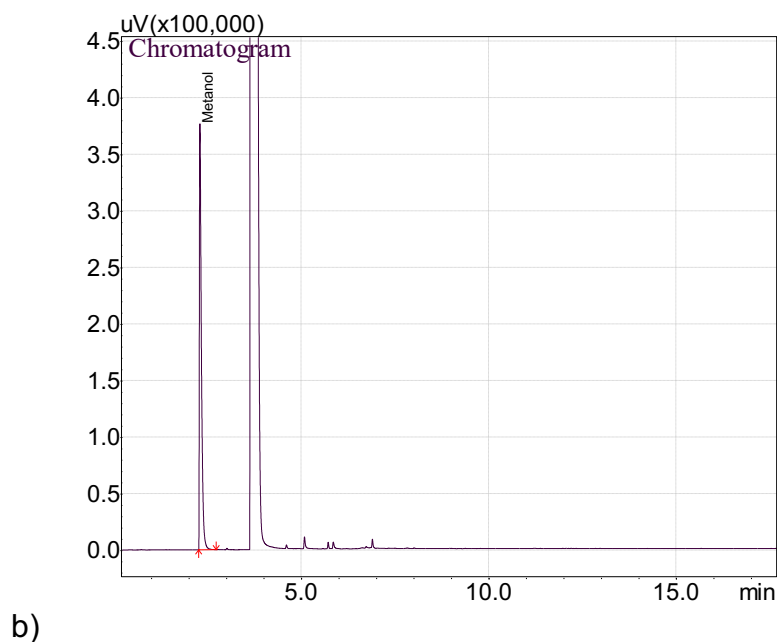
D_i = massa específica do componente i a 20°C, expressa em (kg/m³), sendo o valor para o metanol de 791,4 kg/m³.

D_a = massa específica da amostra em estudo a 20°C, expressa em (kg/m³).

Considerando-se $M_i = 4,1\%$ (m/m); $D_i = 791,4$ g/cm³ e $D_a = 0,80998$ kg/cm³, obteve-se $V_i = 4,2\%$ (v/v).

Figura 52- Método KMnO₄ Cromatograma da amostra desconhecida- Teste de performance a) completo e b) ampliado





5.3.5.6.2. Análise Colorimétrica

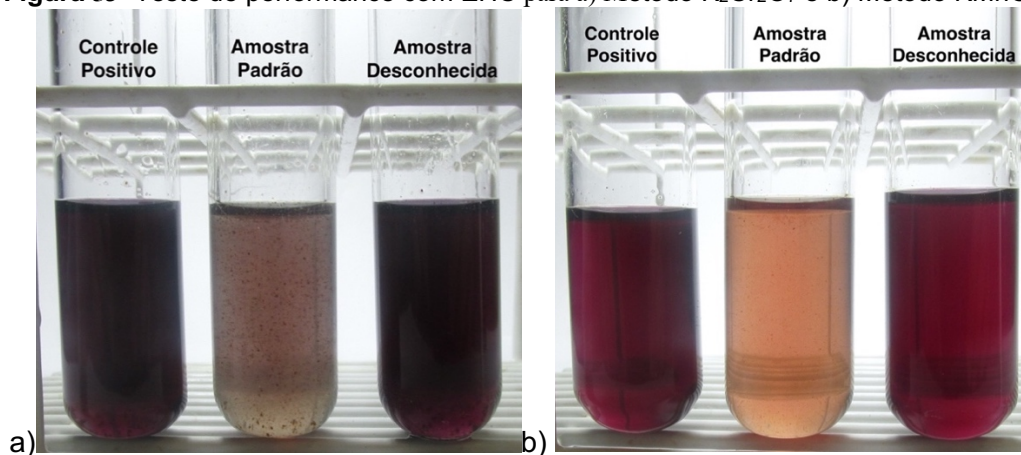
Ao mesmo tempo em que a amostra desconhecida era analisada por cromatografia gasosa, realizou-se também as análises colorimétricas. Para tornar o método fácil e eficiente para possibilitar aplicação em campo, no momento da análise, fortificou-se a amostra padrão (neste experimento usou-se etanol PA com 7,5% de água em volume, simulando uma amostra de EHC livre de metanol) com 0,5% de metanol em volume. Depois, fortificou-se a própria amostra desconhecida com 0,5% de metanol em volume, para agir como controle positivo.

Como a amostra controle ficou mais escura que o padrão, a amostra desconhecida não contém nenhum interferente que diminua a ação do método, portanto a cor gerada provém apenas do analito.

Após a análise colorimétrica das três amostras, pelos dois métodos, observou-se que a amostra desconhecida estava sempre mais escura que a padrão. Então, chegou-se à conclusão de que esta amostra continha mais que 0,5% de metanol em volume, sendo portanto uma amostra “não conforme”. Já a análise de cromatografia gasosa determinou que a amostra desconhecida continha 4,2% (v/v) de metanol, ou seja, a concentração está acima do limite de especificação da Resolução ANP Nº 19, de 0,5% em volume (não conforme).

Portanto, os dois métodos foram assertivos em formar o tributo de “não conforme” para a amostra desconhecida. A Figura 53-a, mostra a análise colorimétrica com método do dicromato de potássio, e a Figura 53-b, mostra a análise colorimétrica com o método do permanganato de potássio.

Figura 53- Teste de performance com EHC para a) Método $K_2Cr_2O_7$ e b) Método $KMnO_4$



6. CONCLUSÕES

Os métodos apresentados neste trabalho se mostraram mais rápidos que o método oficial da ABNT NBR 16041:2015, baseado na cromatografia gasosa, por permitirem análise em batelada, além de não dependerem de aparelhagem laboratorial e analistas especializados e possuírem maior viabilidade econômica.

Para gasolina, quando os métodos são aplicados na fase hidroalcoólica, ambos se mostram eficientes. Assim, eles podem ser combinados com a análise de teor de etanol anidro combustível (ABNT NBR 13992:2015), não sendo necessário acrescentar uma etapa extra às rotinas de análise.

Ambos os métodos são seletivos para Etanol Hidratado Combustível (EHC) e Gasolina Tipo C comum (GCC), aditivada (GCA) ou premium (GCP), no limite de especificação das Resoluções ANP Nº 19 e Nº 807 igual a 0,5% (v/v). Os testes de seletividade foram expandidos para bebidas alcoólicas destiladas, como cachaça não açucarada, vodka e whisky, no limite de especificação do MAPA, igual a 20mg/100mL, gerando resultados positivos. O método da oxidação com KMnO_4 também se mostrou seletivo para vinagre de álcool a 20mg/100mL. Embora a legislação brasileira não estabeleça limites de metanol em vinagres, o MAPA estimula tal controle através de seus manuais de análises.

Ambos os métodos são lineares e com limite de detecção em EHC, GCC, GCA ou GCP de 0,2% de metanol (v/v), valor abaixo do limite de especificação de 0,5% (v/v). Os métodos também foram capazes de formar tributo de amostra “conforme” ou “não conforme” de maneira assertiva em todos os testes realizados com EHC e GCC, sendo, portanto, um “ensaio limite”.

Vale ressaltar que, os métodos apresentados são capazes de compor “kits rápidos” para aplicação em campo, desde que um cuidado seja tomado no manejo do ácido sulfúrico concentrado e no descarte dos resíduos.

Como próximos passos, é importante estudar uma maneira de tratar os resíduos gerados durante as reações, além de avaliar os possíveis métodos de detecção, como disco de cor, fotômetros portáteis e análise por RGB, para assim possibilitar a elaboração de protótipos para serem aplicados em campo. Também seria interessante seguir com uma validação para método quantitativo.

7. REFERÊNCIAS

1 PEDROSA, Oswaldo. A crise do petróleo e os desafios do pré-sal. EGV Energia: Caderno de opinião. [S.L.], fev 2016. Disponível em: https://bibliotecadigital.fgv.br/dspace/bitstream/handle/10438/19208/Oswaldo_Pedrosa_Petróleo.pdf. Acesso em: 08 jan. 2022.

2 FREITAS C.M. Interesses sociais e avaliação técnica de risco: o caso do metanol. Lua Nova, [S.l.], dez 1993. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ln/a/VwBLhbtPqKzwQgj4qbMb9Gdk/?lang=pt>. Acesso em: 08 jan. 2022.

3 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **RESOLUÇÃO ANP Nº 807 DE 23.01.2020**. [Brasília]: Diário Oficial da União, 2020.

4 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **RESOLUÇÃO ANP Nº 19 DE 15.04.2015**. [Brasília]: Diário Oficial da União, 2015.

5 MINISTRO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **PORTARIA Nº 339 DE 28 DE JUNHO DE 2021**. [Brasília]: Diário Oficial da União, 2021.

6 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA MAPA Nº 29 DE 19/09/2012**. [Brasília]: Diário Oficial da União, 2012.

7 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA MAPA Nº 15**, de 31.03.2011. [Brasília]: Diário Oficial da União, 2011.

8 EMBRAPA. **Sistema de produção de vinagre. Composição do vinagre**. Disponível em:

<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/composicao.htm>. Acesso em: 20 nov. 2021.

9 ABREU, Ricardo (org.). **A Nova Especificação Anp Da Gasolina No Brasil**. 2020. Elaborada por Grupo Idea. Disponível em: <http://www.ideaonline.com.br/conteudo/a-nova-especificacao-anp-da-gasolina-no-brasil-por-ricardo-abreu.html>. Acesso em: 04 jan. 2022.

10 EQUISTAR CHEMICALS. **ETHYL ALCOHOL HANDBOOK**. Houston: Equistar Chemicals, 2003.

11 LEITE, Rogério Cerqueira. **O etanol combustível no Brasil**. Embrapa. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/etanol3_000g7gq2cz702wx5ok0wtedt3xdrmfk.pdf. Acesso em: 06 jan. 2022.

12 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Programa de Monitoramento da Qualidade dos Combustíveis**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/qualidade-de-produtos/programas-monitoramento/programa-de-monitoramento-da-qualidade-dos-combustiveis>. Acesso em: 04 jan. 2022.

13 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Fiscalização do Abastecimento em Notícias: 1º Semestre de 2021**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bfan/boletim-fiscalizacao-n20.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2022.

14 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Fiscalização do Abastecimento em Notícias: Balanço Anual 2013**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bfan/boletim-fiscalizacao-n05.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2022.

15 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Fiscalização do Abastecimento em Notícias: Balanço Anual 2014**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bfan/boletim-fiscalizacao-n07.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2022.

16 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Fiscalização do Abastecimento em Notícias: Balanço Anual 2015**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bfan/boletim-fiscalizacao-n09.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2022.

17 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Fiscalização do Abastecimento em Notícias: Balanço Anual 2016**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bfan/boletim-fiscalizacao-n11.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2022.

18 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Fiscalização do Abastecimento em Notícias: Balanço Anual 2017**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bfan/boletim-fiscalizacao-n13.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2022.

19 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Fiscalização do Abastecimento em Notícias: Balanço Anual 2018**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bfan/boletim-fiscalizacao-n15.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2022.

20 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Fiscalização do Abastecimento em Notícias: Balanço Anual 2019**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bfan/boletim-fiscalizacao-n17.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2022.

conteudo/publicacoes/boletins-anp/bfan/boletim-fiscalizacao-n17.pdf. Acesso em: 04 jan. 2022.

21 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Fiscalização do Abastecimento em Notícias: Balanço Anual 2020**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins-anp/bfan/boletim-fiscalizacao-n19.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2022.

22 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **DECRETO 6871/2009 DE 05 DE JUNHO DE 2009**. [Brasília]: 2009.

23 REIS, Josiane Amorim *et al.* Determinação de metanol em bebidas alcoólicas utilizando colorimetria por imagens digitais. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, [S.L.], v. 7, n. 16, p. 455-468, ago. 2020. Disponível em: <http://revista.ecogestaobrasil.net/v7n16/v07n16a01.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2022.

24 MINISTRO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 14, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2018**. [Brasília]: Diário Oficial Da União, 2018.

25 MINISTRO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 6, DE 3 DE ABRIL DE 2012**. [Brasília]: Diário Oficial Da União, 2018.

26 LEE, Sunggyu. **Handbook of Alternative Fuel Technologies**. Boca Raton: Crc Press, 2007.

27 ANP. **Metanol**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural/metanol>. Acesso em: 06 jan. 2022.

28 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **RESOLUÇÃO Nº 696, DE 31 DE AGOSTO DE 2017.** [Brasília]: Diário Oficial da União, 2017.

29 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **RESOLUÇÃO Nº 697, DE 31 DE AGOSTO DE 2017.** [Brasília]: Diário Oficial da União, 2017.

30 MARTINS, Guilherme Bandeira Cândido. **DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PORTÁTIL PARA ANÁLISE DE METANOL EM ETANOL E DETECÇÃO DE ALDEÍDOS VISANDO A UTILIZAÇÃO EM COMBUSTÍVEIS E OUTROS PRODUTOS COMERCIAIS.** 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação, Bacharelado em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

31 GETTLER, Alexander. **CRITICAL STUDY OF METHODS FOR THE DETECTION OF METHYL ALCOHOL.** Elsevier, Nova York, v. 42, n. 2, p. 311-328, jun. 1920. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021925818871496?token=85F6EF54C21AC377A61C02B0D2DD05DAD6DE4C518228D778560F4A6DC83A94B645D5CF354182DEB864C70B5CFD54C50A&originRegion=us-east-1&originCreation=20220114022420>. Acesso em: 07 jan. 2022.

32 CHAPIN, Robert M.. Improved Deniges Test for the Detection and Determination of Methanol in the Presence of Ethyl Alcohol. **The Journal Of Industrial And Engineering Chemistry**, Washington, v. 13, n. 6, p. 543-545, jun. 1921.

33 BOOS, R. N. **Quantitative Colorimetric Microdetermination of Methanol with Chromotropic Acid Reagent.** Analytical Chemistry, v. 20, n. 10, p. 964-965, out. 1948.

34 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 1388-7:1981**: Ethanol for industrial use — Methods of test — Part 7: Determination of methanol content (methanol contents between 0,01 and 0,20 % (V/V)) — Photometric method. [S.I.]: 1981.

35 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 1388-8:1981**: Ethanol for industrial use — Methods of test — Part 8: Determination of methanol content (methanol contents between 0,10 and 1,50 % (V/V)) — Visual colorimetric method. [S.I.]: 1981

36 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16943**: Etanol combustível - Determinação do teor de metanol em etanol combustível e gasolina automotiva pelo método fotométrico. Rio de Janeiro, 2021. 6 p.

37 AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **RESOLUÇÃO ANP N° 740 DE 15.08.2018**. [Brasília]: Diário Oficial da União, 2018.

38 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 16041:2015**. Etanol Combustível- Determinação dos teores de metanol e etanol por cromatografia gasosa. Rio de Janeiro: 2015. 7 p.

39 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **MÉTODO 16**: Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres- Álcool Metílico. [S.L.].2 p.

40 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **MÉTODO 24**: Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres- Metanol. [S.L.].2 p.

41 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. [Brasília]: Diário Oficial da União, 2017.

42 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica- Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários.** [Brasília]: 2011. 78 p.

43 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **DOQ-CGCRE-008:** Orientação Sobre Validação De M Todos Analíticos. Revisão 05 ed. Rio de Janeiro: 2016. 31 p.

44 SANTOS, Letícia Karen dos. **Avaliação da Aplicação do Processo de Hidroesterificação na Produção de Biodiesel a partir de Matérias-Primas de Baixa Qualidade.** 2016. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

45 CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 55, 2015, Goiânia. **Uso do sistema de cor RGB para quantificação de fósforo em efluentes.**

46 ENCONTRO NACIONAL DE ENSINO DE QUÍMICA, 18., 2016, Santa Catarina. **UTILIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS DE QUÍMICA FORENSE NO ENSINO DE QUÍMICA.** Santa Catarina: Eneq, 2016. 10 p.

47 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT:NBR 13992:2015.** Gasolina automotiva - Determinação do teor de etanol anidro combustível (EAC). Rio de Janeiro: 2015.

48 CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO Nº 430, DE 13 DE MAIO DE 2011.** [Brasília]: Diário Oficial da União, 2011.

49 BRAATHEN, Christian. Hálito Culpado: o princípio químico do bafômetro. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 5, p. 3-5, maio 1997.

50 FAGNANI, E. *et al.* Chromotropic acid /formaldehyde reaction in strongly acidic media. The role of dissolved oxygen and replacement of concentrated sulphuric acid. **Talanta**, Araraquara, v. 60, p. 171-176, fev. 2003.