



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Determinação da Acidez Total de Vinhos Tintos Empregando
Titulações Baseadas em Imagens Digitais**

Adamastor Rodrigues Tôrres

**JOÃO PESSOA – PB – BRASIL
2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Determinação da Acidez Total de Vinhos Tintos Empregando
Titulações Baseadas em Imagens Digitais**

Adamastor Rodrigues Tôrres

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva

**João Pessoa – PB - Brasil
2010**

T693d Tôrres, Adamastor Rodrigues.
Determinação da acidez total de vinhos tintos empregando
titulações baseadas em imagens digitais / Adamastor Rodri-
gues Tôrres.- João Pessoa, 2010.
60f.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
Orientador: Edvan Cirino da Silva
1. Química. 2. Vinhos tintos – acidez - Imagens Digitais
(DIB). 3. Imagens Digitais (DIB) – acidez – vinhos tintos.

UFPB/BC

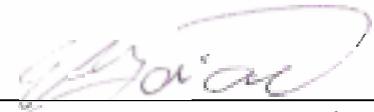
CDU: 54(043)

Determinação da Acidez Total de Vinhos Tintos Empregando Titulações Baseadas em Imagens Digitais.

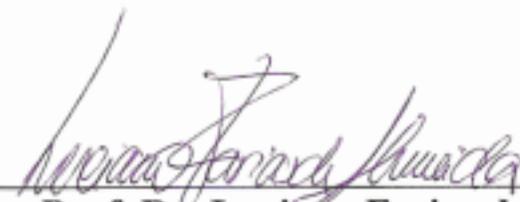
Aprovada pela banca examinadora:



Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Edvaldo da Nóbrega Gaião
Examinador



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Examinador

DEDICO a Deus pela bênção e
permissão em poder realizar meus
projetos humanos.

Agradecimentos

- A Deus pelo dom da vida, da ciência e do entendimento.
- Aos meus pais Adamastor Tôrres e Fátima Rodrigues, meus irmãos Luís Tôrres e Fred, e ao meu avô Inácio Rodrigues.
- A Maythe Gonçalves pelos momentos divididos nas últimas etapas deste trabalho.
- Aos professores Edvan Cirino da Silva e Mário César Ugulino de Araújo pelo acolhimento no LAQA, pela oportunidade de trabalho, seus ensinamentos, confiança em minha pessoa, contribuições acadêmicas, científicas e sugestões.
- Ao irmãozinho e co-orientador de coração Wellington da Silva Lyra pela sua disponibilidade, conhecimento, empenho e ajuda em todas as etapas deste trabalho.
- Aos professores Edvaldo da Nóbrega Gaião, Luciano Farias de Almeida e Sérgio Ricardo Bezerra dos Santos por todas suas sugestões na pré-defesa e na defesa.
- Aos mestrandos Stefani Iury e Renato Allan pela ajuda e colaboração na parte experimental.
- Ao colega e professor Márcio Coelho pelos momentos de orientação pessoal e exemplo de dedicação à pesquisa.
- Ao LAQA, na pessoa do professor Mário Ugulino, para o desenvolvimento deste trabalho.
- A todos os amigos que ganhei durante este período no LAQA ...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO.	vii
ABSTRACT	viii

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Caracterização geral do problema e proposta de solução	2
1.2. Objetivos	4
1.2.1. Objetivo geral	4
1.2.2. Objetivos específicos	4
1.3. Vinhos tintos.....	5
1.3.1. Composição, propriedades físico-químicas e controle de qualidade .	5
1.3.2. Discriminação entre acidez real, acidez titulável e acidez total.....	7
1.3.3. Antocianinas	8
1.4. Titulação de neutralização	12
1.4.1. Detecção do ponto final	13
1.4.2. Curvas de titulação	13
1.5. Revisão da literatura	16
1.5.1. Métodos para determinação da acidez total em vinhos	16
1.5.2. Método de referência para determinação de acidez total.. ..	18
1.6. Imagens digitais em química analítica	18

CAPÍTULO II

2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1. Soluções, amostras e reagentes.....	27
2.2. Equipamentos	27

2.3. Sistema de titulação baseado em imagens digitais.....	28
2.4. Procedimento de titulação DIB.....	29
2.4.1 Softwares para controle do sistema de titulação DIB.....	31
2.5. Software para tratamento das imagens digitais.....	33
2.6. Testes estatísticos para validação dos resultados analíticos.....	36
2.6.1. Aplicação do teste t emparelhado baseado no teste de hipóteses.....	37
2.6.2. Aplicação do teste t emparelhado baseado no conceito de intervalo de confiança.....	38
CAPÍTULO III	
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1. Estudo dos incrementos de volume do titulante.....	40
3.2. Imagens digitais e espectros de absorção durante uma titulação DIB.....	41
3.3. Curvas de titulação e localização do ponto final.....	45
3.4. Determinações de acidez total dos vinhos tintos.....	47
CAPÍTULO IV	
4. CONCLUSÕES	51
4.1. Propostas futuras.....	52
CAPÍTULO V.....	
5. REFERÊNCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Estrutura química geral das antocianinas.....	8
FIGURA 1.2. Esquema ilustrando as possíveis mudanças estruturais de uma antocianina genérica em meio aquoso em função do pH	10
FIGURA 1.3. Variações de cores observadas, obtidas com extrato de uva, para diferentes pH's.....	11
FIGURA 1.4. Tipos de curvas de titulação: (a) curva sigmóide e (b) curva de segmento linear.....	14
FIGURA 2.1. Foto do sistema de titulação de vinhos tintos baseada em imagens digitais. O zoom destacado na foto ilustra o posicionamento da webcam diante da célula de fluxo	28
FIGURA 2.2 Diagrama esquemático do sistema de titulação DIB: Am – solução da amostra, Tit – solução do titulante, BP – bomba peristáltica, V ₁ - válvula da amostra, V ₂ - válvula do titulante, V ₃ – válvula para transferência da solução resultante, WC- webcam, CF- célula de fluxo, L- lâmpada fluorescente, AV – acionador de válvulas, IC – interface de controle, CP – computador portátil, AM – agitador magnético e BM – barra magnética.....	30
FIGURA 2.3 Curvas de calibração das válvulas solenóides (a) do titulante e (b) da amostra.....	31
FIGURA 2.4 Janela principal do programa desenvolvido para Titulação DIB. A seta em vermelho aponta a janela cuja mensagem informa o momento de captura da imagem	32
FIGURA 2.5 Janela principal do software “ <i>Valor de Cor</i> ” para o tratamento das imagens digitais.....	33
FIGURA 2.6 Esquema da rotina do cálculo do valor RGB pelo programa “ <i>Valor de Cor</i> ”	34
FIGURA 2.7 Janela para definição das coordenadas da região de interesse nas imagens. A seta indica a região delimitada pelo usuário (definida pelo retângulo) para o cálculo do “Valor de Cor”	35
FIGURA 2.8 Janela do cálculo do valor de cor e valor médio das componentes RGB	36

- FIGURA 3.1.** Curvas de titulação DIB com incrementos de 0,2 mL (pontos azuis) nas vizinhanças do ponto final (a) e sua respectiva segunda derivada (b).....41
- FIGURA 3.2.** Imagens digitais obtidas durante a titulação do vinho tinto para incrementos de volume de titulante e o respectivo pH da solução.....42
- FIGURA 3.3.** Espectros de absorção obtidos de uma amostra de vinho tinto diluída 1:10 (v/v) em meio ácido (a) e em meio alcalino (b) para cada incremento de volume do titulante.....42
- FIGURA 3.4.** Estrutura molecular das espécies de antocianinas encontradas em soluções aquosas.....43
- FIGURA 3.5.** Variação das componentes do sistema de cores RGB ao longo da titulação das amostras de vinho tinto. Onde: C_B =valor da componente para o branco e C_i =valor da componente para uma dada adição de titulante.....45
- FIGURA 3.6.** Curvas de titulação DIB (a) e sua respectiva curva de segunda derivada (b).....45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 Padrões de identidade e qualidade do vinho e derivados da uva e do vinho.....6

TABELA 3.1 Resultados das médias de três determinações da acidez total de vinhos tintos, em termos de g/L de ácido tartárico, obtidos pelos métodos de titulação (DIB e potenciométrica).....48

LISTA DE ABREVIATURAS

MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
OIV	Office International de la Vigne et du Vin
IAL	Instituto Adolfo Lutz
pH	Potencial hidrogeniônico
LED	Diodo emissor de luz
DBBQ	3,5-di-t-butil -1,2-benzoquinona
DIB	Baseada em imagens digitais
RBP	Proteína ligante do retinol
RGB	Vermelho-verde-azul
HSV	Matiz - saturação - valor
CMYK	Ciano-magenta-amarelo-preto
PIXEL	Elemento de imagem
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CMOS	Semicondutor metal-óxido complementar
APS	Sensor de pixel ativo
PCA	Análise de componentes principais
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos
UV-Vis	Ultravioleta-visível
USB	Universal serial bus

RESUMO

Título: “Determinação da Acidez Total de Vinhos Tintos Empregando Titulações Baseadas em Imagens Digitais”

Neste trabalho, propõe-se o uso de imagens digitais, capturadas com uma *Webcam*, para determinação da acidez total de vinhos tintos por meio de titulação ácido-base sem a utilização de indicador externo. As imagens digitais apresentam a cor da radiação emergente que é complementar à da radiação absorvida por moléculas de antocianinas presentes nos vinhos. Cada imagem, gerada de acordo com o sistema vermelho-verde-azul (RGB), fornece uma matriz de valores dos componentes R, G e B cujas médias definem o valor de cor obtido como: $2^{\bar{R}} \cdot 2^{\bar{G}} \cdot 2^{\bar{B}}$. Esse valor foi adotado como resposta analítica para a construção das curvas de titulação baseadas em imagens digitais (DIB). Para a localização mais precisa do ponto final, foram geradas as curvas de titulação com base nos valores da segunda derivada da resposta analítica. As antocianinas apresentam diferentes cores de acordo com o pH do meio e, a partir das variações do valor de cor das imagens obtidas durante a titulação dos vinhos tintos, o ponto final pôde ser detectado com precisão. O método oficial recomenda o uso da titulação potenciométrica para a determinação da acidez total de vinhos tintos. Este método requer diluição da amostra antes da titulação que deve ser efetuada até um valor fixo de pH (8,2-8,4). A fim de ilustrar a viabilidade do método proposto, foram realizadas titulações envolvendo a determinação da acidez total em dez amostras de vinhos tintos. Os resultados foram comparados com os obtidos pela titulação potenciométrica usada como método de referência. Constatou-se que não há diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados, aplicando-se o teste *t* emparelhado ao nível de 95% de confiança. O método proposto produziu resultados com uma precisão melhor que a do método oficial. Essas características vantajosas da titulação DIB são atribuídas à natureza trivariada das medidas associadas às imagens digitais.

Palavras-chaves: Imagens digitais, Sistema de cores RGB, Titulação ácido-base, Vinhos Tintos e Acidez total.

ABSTRACT

Title: “**Determination of Total Acidity in Red Wines Employing Digital Image-Based Titrations** ”

This work proposes the use of digital images captured by a Webcam for determination of total acidity in red wines by means of an acid-base titration without using an external indicator. Digital images present the colour of the emergent radiation, which is complementary to the radiation absorbed by molecules of anthocyanines presents in wines. Each image, generated according to RGB system, yields a matrix of the values of the R, G and B components whose averages define a the colour value obtained as: $2^{\bar{R}} \cdot 2^{\bar{G}} \cdot 2^{\bar{B}}$. This value was adopted as analytical response to build titrations curves based on digital images (DIB). For a more precise localization of the end point, titrations curves were generated on the basis of the second derivative values of the analytical response. Anthocyanines present different colours according to medium pH and, from the variation of the colour values of the images obtained during the titration of the red wines, the end point could be detected with precision. The official method recommends the use of potentiometric titration for determination of total acidity in red wines. This method requires a dilution of the sample before the titration that must be carried out until a fixed value of pH (8.2 – 8.4). In order to illustrate the feasibility of the proposed method titrations involving the determination of total acidity in ten red wines samples were carried out. Results were compared to the ones obtained by potentiometric titration used as reference method. No statistic difference has been observed between the results by applying the paired *t*-test at 95% confidence level. The proposed method yielded results with a better precision than the official method. These advantageous characteristics are attributed to the trivariate nature of the measures associated to digital images.

Key words: Digital images, RGB colour system, Acid-base titration, Red wines and Total acidity.

INTRODUÇÃO

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização geral do problema e proposta de solução

Nas últimas décadas, a elaboração e o consumo de vinhos têm crescido cada vez mais no âmbito internacional (BARROS, 1990; BENASSI, 1997 e NASCIMENTO, 2005). O vinho pode ser definido, de acordo com a portaria nº 229 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), como sendo a bebida obtida da fermentação alcoólica do mosto de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 1988). O mosto simples de uva é o produto obtido pelo esmagamento ou prensagem da uva com a presença ou não de suas partes sólidas. Sendo assim, não se recomenda o uso do termo vinho para produtos obtidos de quaisquer outras matérias-primas (ANDRADE et al., 2008).

A obtenção de vinhos de boa qualidade necessita da realização de análises físico-químicas, as quais são fundamentais para a monitoração do processo e identificação de possíveis alterações. Dessa maneira, uma vez detectado algum problema pode-se intervir no processo para efetuar as correções pertinentes. Entre as propriedades importantes, destacam-se o pH e a acidez que, além de contribuírem para uma boa fermentação do mosto, participam das características organolépticas dos vinhos, influenciando na estabilidade e coloração. A acidez volátil relaciona-se principalmente com a presença dos ácidos acético, fórmico e butírico e permite inferir sobre a sanidade dos vinhos. Por exemplo, vinhos vinificados corretamente, nos quais foi acrescentado dióxido de enxofre, apresentam baixa acidez volátil (NASCIMENTO, 2005). A acidez total é usada durante o processamento e no término das operações para padronização dos vinhos (BARROS, 1990).

As substâncias que conferem características ácidas ao mosto ou ao vinho são ácidos orgânicos relativamente fracos. Por isso, quando mostos e vinhos são titulados com base forte, o ponto de equivalência será maior que 7,0, usualmente entre 7,8 e 8,3 (BARROS, 1990).

O ácido tartárico é o mais forte entre os ácidos orgânicos do vinho e, por isso, influi de modo determinante no pH e nas características sensoriais dos vinhos (RIZZON e MIELE, 2001). Este fato motiva o uso da unidade “gramas/Litro de ácido

tartárico” para exprimir a acidez total de uma amostra de vinho (ZOECKLEIN, 1995 e DARIAS-MARTÍN et al., 2003). O método de determinação da acidez total em vinhos é descrito por várias instituições como a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (ZOECKLEIN, 1995), Office International de la Vigne et du Vin - OIV (1969) e Instituto Adolfo Lutz - IAL (2008). Em geral, os métodos preconizados envolvem a titulação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de base, usando fenolftaleína como indicador. A observação visual da mudança de cor no indicador é uma prática tradicional para detecção do ponto final em titulações (CARDWELL et al., 1991), porém essa observação é dificultada quando amostras coloridas são tituladas (AFONSO e AGUIAR, 2004; OSAWA, GONÇALVES e RAGAZZI, 2006). Por esta razão, as instituições acima citadas recomendam a titulação potenciométrica quando as amostras são coloridas, como no caso do vinho tinto (OIV, 1969 e IAL, 2008).

Os vinhos tintos apresentam uma matriz que absorve radiação eletromagnética numa ampla faixa do espectro visível, cujas posições das bandas modificam com o pH devido à presença das antocianinas provenientes da uva (GARCIA e REIS, 2006; MALACRIDA e MOTTA, 2006). Além disso, outra característica muito interessante dessa matriz é que ocorre uma mudança de cor quando a acidez é neutralizada.

Neste trabalho, propõe-se uma metodologia baseada em imagens digitais para a determinação de acidez de vinhos tintos por intermédio de titulação ácido-base sem o uso de indicador tendo em vista a mudança natural da cor da matriz com a neutralização. Como meio de detectar essa mudança de cor e encontrar o ponto final da titulação, utilizou-se uma webcam para a obtenção das imagens digitais tal qual no trabalho de Gaião et al. (2006).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

- Propor uma metodologia baseada em imagens digitais, capturadas com uma *Webcam*, para determinação de acidez total de vinhos tintos por meio de titulação ácido-base sem o uso de indicador.

1.2.2. Objetivos específicos

- Associar as imagens digitais aos espectros de absorção no visível dos vinhos tintos durante a titulação para estudar as características absorventes da matriz;
- Construir curvas de titulação baseadas nos valores de cor obtidos a partir dos componentes vermelho-verde-azul (RGB) das imagens digitais;
- Desenvolver um sistema automático para a implementação da titulação de vinhos baseada em imagens digitais;
- Desenvolver um programa computacional para gerenciar o sistema automático;
- Aplicar a estratégia proposta na determinação da acidez total de vinhos tintos;
- Avaliar o desempenho da metodologia proposta, comparando-se os resultados de sua aplicação com os da titulação potenciométrica mediante testes estatísticos aplicados aos resultados das determinações analíticas.

1.3. Vinhos tintos

1.3.1. Composição, propriedades físico-químicas e controle de qualidade

O vinho compreende uma matriz complexa que, além de água, açúcar e álcool, contém uma grande variedade de substâncias inorgânicas e outras orgânicas (NASCIMENTO, 2005). Os vinhos contêm uma mistura complexa de ácidos orgânicos, sendo os mais importantes o tartárico, málico, succínico, acético, cítrico e láctico. Os ácidos tartárico, málico e cítrico são provenientes da própria uva e seus teores se modificam durante a maturação e os processos de fermentação. Já os ácidos láctico, succínico e acético são originários do metabolismo de bactérias e leveduras (BENASSI, 1997).

Vinhos de qualidade são obtidos de uvas com teores de sólidos solúveis totais, polifenóis e antocianinas (tintos), o mais elevado possível, enquanto que a acidez total deve ser baixa (BEVILAQUIA, 1995).

Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos. Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos (MALACRIDA e MOTTA, 2005).

Os compostos fenólicos possuem grande importância na alta qualidade dos vinhos tintos. Eles são responsáveis pela adstringência e amargura, além de contribuir na estabilidade da cor do vinho. Foi demonstrado que o perfil dos compostos fenólicos de um vinho é influenciado por práticas vinícolas e diferentes técnicas enológicas. A variedade, o vinhedo, e região onde as uvas são cultivadas afetam toda a composição fenólica dos vinhos (CLIFF, KING e SCHLOSSER, 2007).

Na análise visando ao controle de qualidade dos vinhos, as determinações físico-químicas usuais são: exame preliminar, densidade relativa, álcool em volume, pH, acidez total, acidez volátil, acidez fixa, extrato seco, açúcares redutores em glicose, açúcares não redutores em sacarose, sulfatos, extrato seco reduzido, relação álcool em peso/extrato seco reduzido, cinzas, cloretos (IAL, 2008). De acordo com o MAPA (BRASIL, 1999), os padrões de qualidade dos vinhos deverão obedecer aos limites apresentados na Tabela 1.1.

TABELA 1.1 Padrões de identidade e qualidade do vinho e derivados da uva e do vinho.

Propriedades físico-químicas	mínimo	máximo
Álcool etílico em graus GL, a 20° C	7,0	9,9
Acidez total em meq/L	55,0	130,0
Acidez volátil (corrigida), em meq/L	-	20,0
Extrato seco reduzido, em g/L	13,0	-
Sulfatos totais, em sulfato de potássio, em g/L	-	1,0
Anidrido sulfuroso total, em g/L	-	0,35
Cloretos totais, em cloreto de sódio, em g/L	-	0,20
Cinzas, em g/L, tintos	1,5	-
Álcool metílico, em g/L	-	0,35

Fonte: Adaptado de BRASIL, 1999

Os compostos fenólicos são importantes em enologia, uma vez que participam da cor do vinho, das características gustativas de suavidade, dureza, do sabor adstringente e, de alguma forma, do aroma que, por sua vez são influenciados pelo pH e acidez volátil. O teor de ácido presente no vinho varia de 1 a 8%. A acidez total quando elevada é sinal de alterações microbianas nos vinhos (FREITAS, 2006).

A acidez volátil está relacionada principalmente à presença dos ácidos acético, fórmico e butírico, que permite inferir sobre a sanidade dos vinhos. Vinhos com altos teores de acidez volátil indicam que organismos não desejáveis, particularmente o *Acetobacter*, estão presentes, e que provavelmente, o vinho pode virar vinagre. Portanto, vinhos vinificados corretamente, nos quais foi acrescentado dióxido de enxofre, apresentam baixa acidez volátil (BARROS, 1990; NASCIMENTO, 2005).

1.3.2. Discriminação entre acidez real, acidez titulável e acidez total

Na determinação da acidez de vinhos, observa-se o emprego indiscriminado dos termos acidez real, acidez titulável e acidez total em trabalhos acadêmicos, científicos e em procedimentos para análises e controle de qualidade de vinhos, como relatado a seguir.

Diversos trabalhos encontrados na literatura empregam dois dos termos citados ou se referem à apenas um deles para a determinação da acidez em vinhos (RUNYAN, 1901; CARDWELL et al., 1991; RANGEL e TÓTH, 1998; HONORATO et al., 1999; GAIÃO et al., 1999; OHTSUKI et al., 2000; GARCIA e REIS, 2006).

A medida da acidez total é definida como a concentração dos ácidos orgânicos na uva ou vinho. Neste caso, a acidez total corresponde a todos os ácidos da matriz, dissociados e não dissociados. Por outro lado, a acidez titulável consiste na neutralização dos íons H_3O^+ resultantes da dissociação incompleta dos ácidos orgânicos fracos, os quais são titulados com uma base padrão. Sendo assim, os termos acidez titulável e acidez total são utilizados indistintamente pelos órgãos AOAC e OIV por se referirem à mesma medida (DARIAS-MARTÍN et al., 2003).

GAMA e AFONSO (2007) relataram a origem da proposição do conceito de pH para exprimir a acidez de um meio (geralmente aquoso) e a evolução de sua medida. A origem da definição do pH pode ser encontrada no desenvolvimento da química de soluções aquosas ocorrido durante o século XIX. A teoria da dissociação eletrolítica proposta por Svante Arrhenius desempenhou um papel fundamental para a consolidação desse conceito. Não obstante, Louis Pasteur foi o primeiro a reconhecer em 1875, por intermédio dos seus estudos de fermentação, que a acidez real é bem diferente da acidez total. Isto porque ácidos com mesmo número de hidrogênios ionizáveis não têm necessariamente a mesma força.

PATO (1999) afirma que os ácidos fracos presentes no vinho (ácidos tartárico, málico, láctico e succínico) se ionizam na água de forma incompleta, e a concentração de íons H_3O^+ , constitui o que se chama “acidez real”, a qual é traduzida pela notação logarítmica de Sørensen, onde $pH = -\log [H_3O^+]$.

Em face do exposto, não se observa um consenso geral com respeito às diferentes possibilidades para exprimir a acidez dos vinhos. Neste trabalho, adotou-se o termo preconizado pela Instrução Normativa nº 24, de 08 de setembro de 2005, do MAPA, que considera a acidez total ou titulável como sendo a reação de

neutralização dos ácidos com solução padronizada de base, até o ponto de equivalência ou potenciômetro até pH = 8,2 (BRASIL, 2005 e IAL, 2008).

1.3.3. Antocianinas

As antocianinas (das palavras gregas *anthos*= flor e *kianos*= azul) são pigmentos da classe dos flavonóides e responsáveis pela maioria das cores azul, roxa e todas as tonalidades de vermelho encontradas em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas. São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas (MALACRIDA e MOTTA, 2006).

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonóides, compostos fenólicos caracterizados pelo núcleo básico flavílico (cátion 2-fenilbenzopirílio) que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio.

A molécula de antocianina, representada na figura 1.1, é constituída por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, freqüentemente, um grupo de ácidos orgânicos (MALACRIDA e MOTTA, 2006). Nas antocianinas, uma ou mais hidroxilas das posições 3, 5 e 7 estão ligadas a açúcares (grupos R''), aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos.

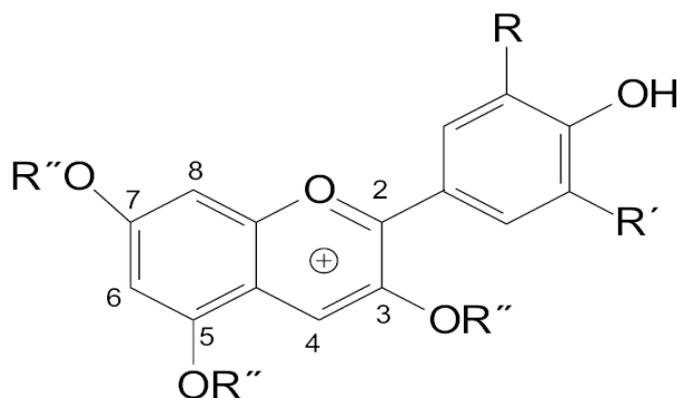


FIGURA 1.1. Estrutura química geral das antocianinas

Adaptado de MALACRIDA e MOTTA (2006)

Os diferentes grupos R e R' e açúcares (R'') ligados nas posições 3, 5 ou 7, assim como os ácidos a eles ligados, caracterizam os diferentes tipos de

antocianinas (TERCI e ROSSI, 2002). Quando livres dos açúcares, as antocianinas são chamadas de antocianidinas (RAMOS et al., 2000).

Entre as antocianidinas mais conhecidas, dezoito ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes como corantes em alimentos (MALACRIDA e MOTTA, 2006).

Existe um grande interesse no estudo das antocianinas em diversas áreas, como na saúde, devido ao seu grande potencial terapêutico, na indústria, com destaque para as aplicações na fabricação de vinhos e como corantes naturais, e também na área de ensino em química, onde servem como indicadores de pH (MARÇO, POPPI e SCARMINIO, 2008).

Apesar de possuir a mesma origem biossintética de outros flavonóides naturais, as antocianinas diferem destes por absorver fortemente na região visível do espectro (STRINGHETA e BOBBIO, 2000).

As antocianinas podem apresentar diferentes formas estruturais, as quais podem assumir diferentes colorações. Essas formas podem sofrer interferências de diversos fatores, destacando-se entre estes a temperatura, o valor do pH e possíveis ligações com outras substâncias químicas (copigmentos). O pH é o fator que mais influencia na coloração das antocianinas, visto que, em função de sua acidez ou alcalinidade, estas podem apresentar diferentes estruturas (BORDIGNON et al, 2009).

A propriedade destes compostos apresentarem cores diferentes, dependendo do pH do meio em que eles se encontram, faz com que estes pigmentos possam ser utilizados como indicadores naturais de pH.

COUTO, RAMOS e CAVALHEIRO (1998) realizaram um experimento didático empregando extratos de flores contendo antocianinas em titulações ácido – base e os resultados do volume correspondente ao ponto final das titulações foram comparados com os obtidos por potenciometria. Nos sistemas de titulação ácido fraco – base forte, os erros foram menores que 2%.

SOARES, CAVALHEIRO e ANTUNES (2001) quantificaram ácido acético em vinagres na presença de extratos de antocianinas e os resultados foram comparados com aqueles obtidos usando indicadores convencionais, neste caso, a fenolftaleína. Os erros relativos ao indicador convencional se mostraram bastante satisfatórios em termo de análise volumétrica, obtendo-se erros menores que 1% em relação à fenolftaleína, na titulação de vinagres de vinho branco e vinagre de álcool.

Para o vinagre de vinho tinto a viragem do indicador natural não foi tão nítida, devido à presença de outros compostos da uva.

As mudanças estruturais que ocorrem com a variação do pH e que são responsáveis pelo aparecimento das espécies com colorações diferentes, incluindo o amarelo em meio fortemente alcalino, podem ser explicadas pelo esquema das principais transformações mostradas na figura 1.2 (TERCI e ROSSI, 2002), facilmente identificadas e relacionadas, pela simples observação visual, de acordo com a figura 1.3.

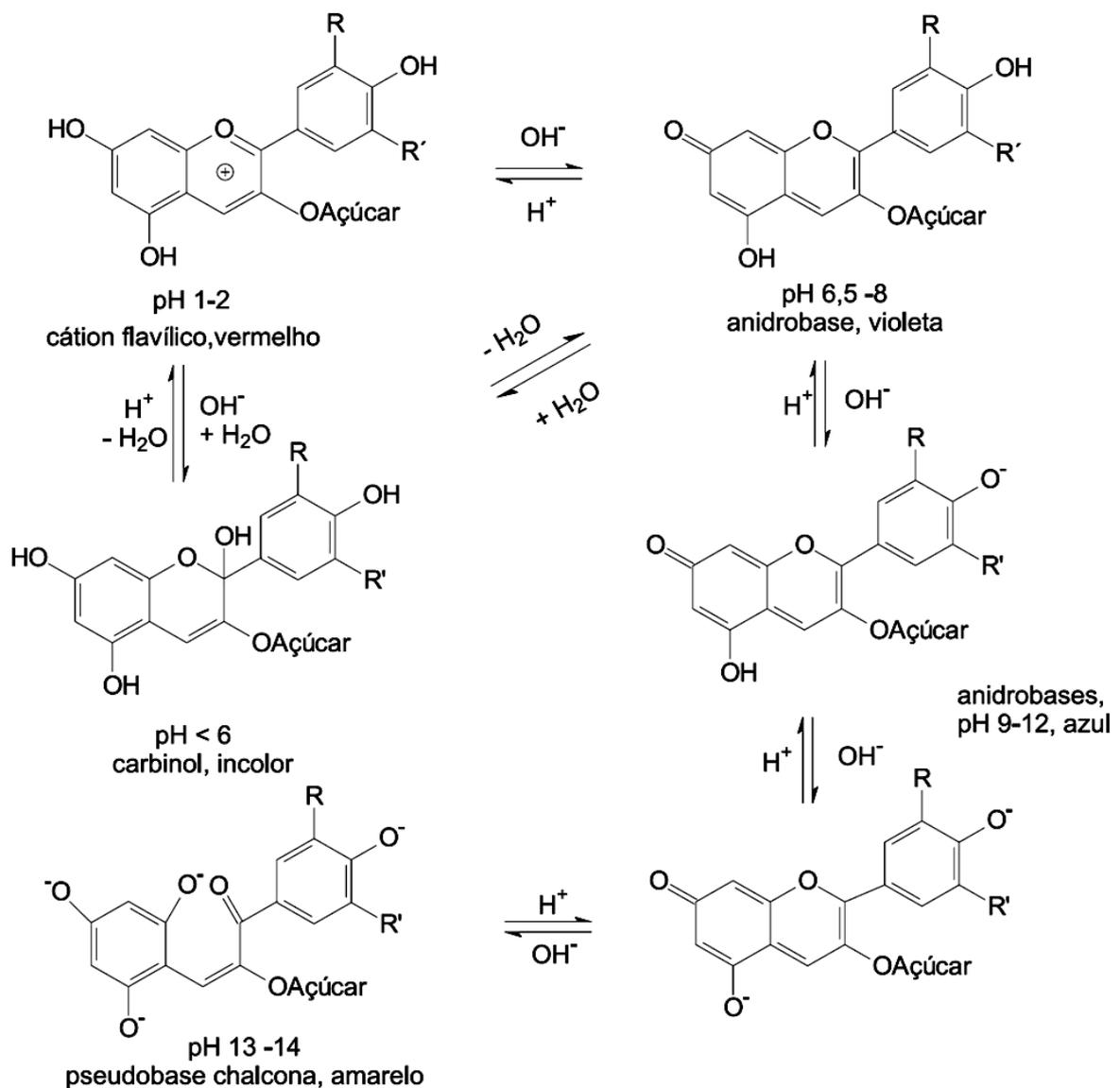


Figura 1.2. Esquema ilustrando as possíveis mudanças estruturais de uma antocianina genérica em meio aquoso em função do pH
(Adaptado de TERCI e ROSSI, 2002)

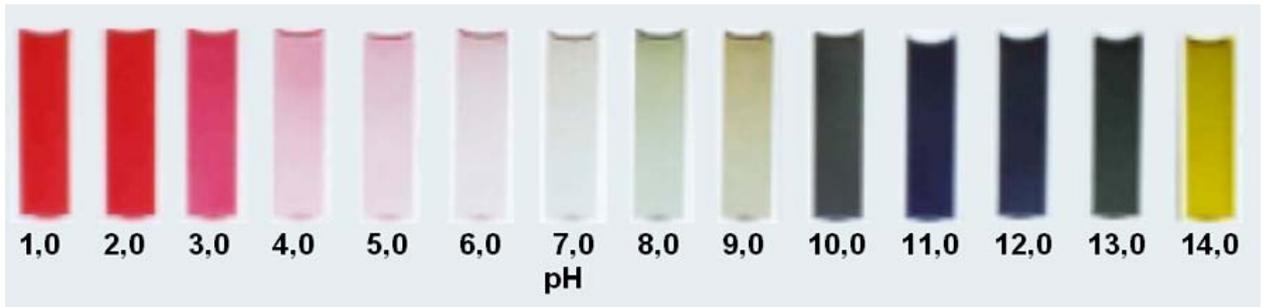


FIGURA 1.3. Variações de cores observadas, obtidas com extrato de uva, para diferentes pH's
(Adaptado de TERCI e ROSSI, 2002)

Como se observa na figura 1.2, de modo geral, em meio extremamente ácido (pH entre 1,0-2,0), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico. Para um meio com pH maior que 2,0, é observado um equilíbrio entre o cátion flavílico e uma estrutura conhecida como carbinol (incolor). Com o aumento do pH, as antocianinas perdem a cor até se tornarem praticamente incolores em pH aproximadamente 6,0, devido à predominância da espécie carbinol.

Em valores de pH acima de 6,0, tanto a estrutura carbinol quanto a anidrobases (violeta) podem formar a espécie anidrobases ionizadas (azul). A formação da anidrobases ionizadas (azul) ocorre com a ruptura do anel heterocíclico quando formada a partir da estrutura carbinol, o que, dependendo do tipo de antocianina, pode tornar a reação irreversível.

A formação da anidrobases ionizadas (azul) a partir da anidrobases quinoidal (violeta) pode ocorrer por dois caminhos diferentes: de maneira direta, resultado de um aumento brusco de pH, ou com um aumento gradual de base entre os valores de pH 6,5 e 9,0. Ao iniciar-se a ionização das antocianinas, são formadas estruturas de anidrobases que exibem coloração azul. Em meio extremamente alcalino, observa-se o equilíbrio entre formas ionizadas de chalconas, apresentando coloração amarelada (MARÇO, POPPI e SCARMINIO, 2008).

Como visto na figura 1.2 e na figura 1.3, em pH próximo à neutralidade, as antocianinas apresentam-se praticamente incolores. Entretanto, as antocianinas encontram-se sempre associadas às partes coloridas das plantas, indicando que fatores físico-químicos incomuns devem estabilizá-las naturalmente. Um desses fatores pode ser a presença de compostos chamados copigmentos, tais como flavonóides não antociânicos, alcalóides, aminoácidos e nucleosídeos, entre outros (FALCÃO et al., 2003).

Podem existir três mecanismos básicos de estabilização de antocianinas, que são a copigmentação intramolecular, a copigmentação intermolecular e a auto associação. A copigmentação intramolecular somente ocorre quando o pigmento e o copigmento são partes de uma única molécula, ou seja, quando o cromóforo da antocianina e um resíduo de ácido cinâmico (copigmento) estão covalentemente ligados ao mesmo resíduo de açúcar. Na copigmentação intermolecular predominam, provavelmente, forças de Van der Waals e efeitos hidrofóbicos em meio aquoso como resultado do “empilhamento” entre a molécula de antocianina e o copigmento. A auto-associação ocorre quando as antocianinas estão presentes em concentrações mais elevadas (STRINGHETA e BOBBIO, 2000).

A reação de copigmentação é provavelmente o principal mecanismo de interação molecular envolvido em variações da cor e da adstringência durante a produção e envelhecimento dos vinhos. Fatores como o etanol, luz, pH, temperatura, estruturas e concentrações do copigmento e da antocianina, entre outros, influenciam significativamente a reação de copigmentação (FALCÃO et al., 2003).

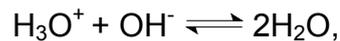
Outra propriedade das antocianinas está relacionada aos seus efeitos benéficos sobre a nutrição e saúde, devido as suas propriedades antioxidantes, pois são carreadoras diretas de radicais livres e desta forma desempenham um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, modulação da inflamação, inibição da agregação plaquetária, prevenção do câncer e de sua progressão. As antocianinas presentes no vinho tinto foram associadas com a redução da incidência de doenças cardíacas (VOLP et al., 2008).

1.4. Titulação de neutralização

A titulometria, também chamada de volumetria ou titrimetria, é baseada em uma reação com estequiometria conhecida entre o analito e o reagente (titulante). O volume de titulante necessário para reagir completamente com o analito é usado para determinar a concentração do analito. Esse volume exato é denominado ponto de equivalência (ou estequiométrico), o qual está associado à condição de equivalência química. Não obstante, a titulação experimental fornece apenas o volume do ponto final cujo valor deve estar o mais próximo possível do volume do ponto de equivalência. A diferença entre o volume do ponto final e o estequiométrico

define o erro absoluto da titulação (SKOOG et al., 2006). O erro relativo é obtido dividindo-se o erro absoluto pelo volume do ponto de equivalência ou, em termos percentuais, multiplicando-se o resultado por 100 (cem).

A titulação ou volumetria de neutralização (ou ácido-base) é uma técnica de análise quantitativa baseada na reação entre os íons H_3O^+ e OH^- :



cuja extensão é governada pelo produto iônico da água (BACCAN et al., 2004).

1.4.1. Detecção do ponto final

Nas titulações, as concentrações dos analitos são determinadas a partir da estequiometria das reações envolvidas e do volume (ou massa) do titulante correspondente ao ponto final. A estequiometria das reações é revelada através da detecção do ponto final da titulação. Este ponto pode ser encontrado visualmente ou através do emprego de um sensor que responde a alterações na propriedade monitorada. (ROCHA e REIS, 2000).

Uma das estratégias mais usadas para detectar o ponto final de titulações baseia-se no uso da variação de cor de algumas substâncias chamadas indicadores (BACCAN et al., 2004), que permitem que as alterações nas propriedades absorventes da solução sejam perceptíveis, até certo ponto, pelo analista. Outra maneira de detecção do ponto final é através do uso das curvas de titulação.

1.4.2. Curvas de titulação

As curvas de titulação visam à determinação do volume do ponto final e são construídas a partir dos sinais da propriedade (absorção molecular, pH, condutividade, etc) relacionada com a concentração do analito em função do volume de titulante. As curvas de titulação podem ser construídas manualmente ou de forma automática por meio de equipamentos adequados (SKOOG et al., 2006 e MENDHAM et al., 2002).

A forma da curva depende de alguns fatores tais como: a reação de titulação, a espécie monitorada (indicador, titulante, analito ou produto formado), bem como a técnica instrumental escolhida (espectrofotometria, condutimetria ou potenciometria, por exemplo). O volume do ponto final da titulação é assinalado por uma descontinuidade que ocorre numa determinada região da curva, nas proximidades do ponto de equivalência da mesma (GAIÃO et al., 2006).

Dois perfis de curvas de titulação são encontrados nos métodos titulométricos. No primeiro tipo, chamado curva sigmóide, as observações importantes são confinadas a uma pequena região (tipicamente de $\pm 0,1$ a $\pm 0,5$ mL) ao redor do ponto de equivalência. Em um segundo tipo de curva, denominada curva com segmentos lineares, as medidas são feitas nos dois lados, porém usam-se os pontos distantes do ponto final para sua localização. Isto decorre do fato de que, nessa região, as medidas analíticas estão associadas aos equilíbrios químicos envolvidos na reação de titulação (SKOOG et al., 2006). A figura 1.4 mostra os dois tipos de curvas encontradas nos métodos titulométricos.

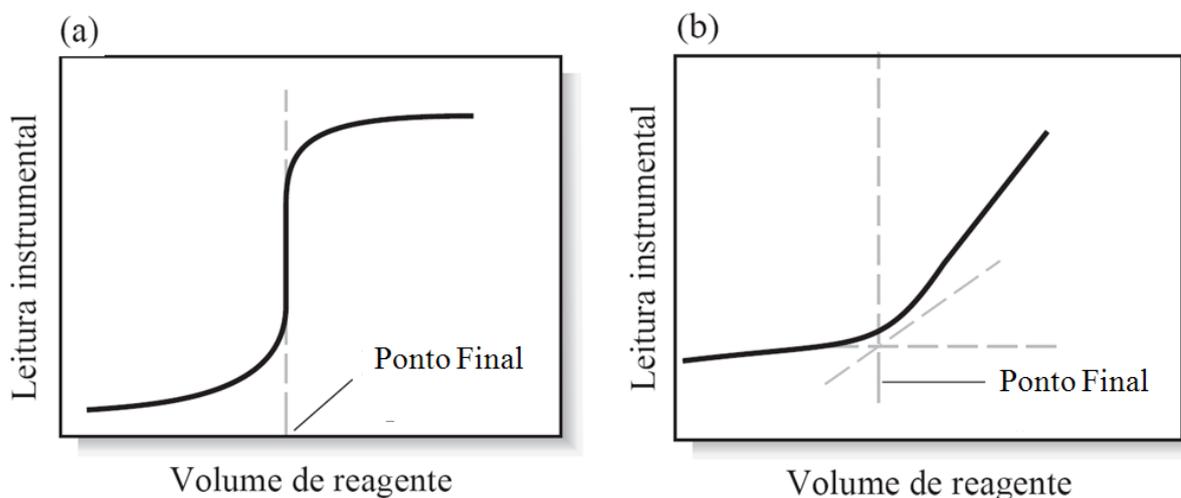


FIGURA 1.4. Tipos de curvas de titulação: (a) curva sigmóide e (b) curva de segmento linear

Adaptado de SKOOG et al. (2006)

O ponto final pode corresponder ao ponto de inflexão da curva de titulação. A determinação do ponto final de titulações potenciométricas de ácidos e bases geralmente está associada com a determinação do ponto de inflexão da curva de titulação obtida ao plotar-se o potencial (ou pH) medido como função do volume de titulante adicionado (COSTA, 1989).

De um modo geral, o ponto final de uma titulação pode ser detectado mais facilmente pelo exame da curva de titulação e sua primeira e segunda derivadas (MENDHAM et al., 2002).

O método da primeira derivada (dpH/dV) pode fornecer o ponto de inflexão da curva de titulação com uma maior precisão. Como resultado, obtém-se uma curva em forma de pico cujo máximo ou mínimo corresponde geralmente ao ponto final da titulação (SKOOG et al., 2006). No método da segunda derivada (d^2pH/dV^2), o ponto final da titulação é localizado como sendo o ponto da curva cuja segunda derivada é nula. (COSTA, 1989).

Entretanto, a determinação do ponto de equivalência vai se tornando cada vez mais difícil à medida que titulamos ácidos e bases mais fracas, e quando as soluções dos mesmos vão se tornando mais diluídas. A razão destas dificuldades, visualizadas pela simples observação das curvas de titulação, são devidas às pequenas inflexões que as mesmas apresentam nas proximidades do ponto de equivalência (ALEIXO e GODINHO, 1984).

Nas curvas de titulação que possuem simetria, o ponto de inflexão coincide com o ponto final da titulação. Normalmente, curvas de titulação de ácido forte com base forte apresentam simetria, enquanto titulações de ácidos fracos com base forte, ou vice-versa, não apresentam simetria em suas curvas (COSTA, 1989).

Um método alternativo para determinação do ponto final de eletrólitos fracos é o gráfico de Gran, proposto em 1950. Este método baseia-se no uso de funções lineares em relação ao volume de titulante. Se dV/dpH , em vez de dpH/dV , é plotado contra o volume, V , determinadas vantagens são obtidas. Nas curvas diferenciais de dV/dpH são obtidas duas retas que se interceptam no ponto de equivalência. Se a curva é traçada durante o curso da titulação, a posição aproximada do ponto final geralmente pode ser calculada antes que ele seja alcançado e, conseqüentemente, os incrementos de dV reduzidos (GRAN, 1950). Outra vantagem é que o método produz um gráfico linear que pode revelar a constante de dissociação do ácido e o volume de base requerido para alcançar o ponto final (ALEIXO e GODINHO, 1984; COSTA, 1989 e SKOOG et al., 2006).

1.5. Revisão de literatura

1.5.1. Métodos para determinação de acidez total em vinhos tintos

Várias metodologias são descritas na literatura com o propósito de determinar a acidez total. Desde o século passado, a análise de amostras coloridas sempre preocupou os químicos analíticos. Os indicadores comuns muitas vezes dão resultados insatisfatórios em virtude da dificuldade de se detectar o ponto final.

RUNYAN (1901) testou uma mistura de indicadores composta por verde de malaquita e “collarin” para a determinação da acidez total em vinhos tintos. Neste processo, o vinho foi diluído de 1:30 e a titulação foi realizada da base para o ácido. A mudança de cor, para esta mistura de indicadores, foi melhor observada quando colocada contra a luz. Os resultados indicaram uma maior diferença, em gL^{-1} de ácido tartárico, para os vinhos tintos.

CARDWELL et al. (1991), propuseram uma técnica em fluxo descontínuo utilizando um detector óptico, com uma janela de comprimento de onda que é capaz de discriminar entre a cor da matriz e a cor do indicador, para a determinação da acidez titulável e da acidez total de vinhos e vinagres respectivamente. Este sistema alternativo baseava-se na escolha da combinação ideal entre a janela espectral - o indicador - e o diodo emissor de luz (LED), para a viabilidade da técnica.

RANGEL e TÓTH (1998) desenvolveram um sistema em fluxo para determinação seqüencial da acidez total, baseada numa pseudotitulação, e de ácido tartárico, baseado na formação de um complexo colorido com vanadato, de vinhos tintos e brancos. Esta metodologia envolveu diálise *in-line* antes da injeção para diluir as amostras e para evitar interferência da matriz da amostra na detecção espectrofotométrica. Usando fenolftaleína como indicador, o comprimento de onda foi monitorado em 500 nm, o que permitiu diminuir a absorção da solução indicadora para ser monitorada na determinação da acidez total.

GAIÃO et al. (1999) propuseram um sistema automático de titulação por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação da acidez total em vinhos brancos e tintos. O titulador proposto explora gradientes de concentração gerados no fluxo do sistema de injeção e não exige a construção de curvas analíticas baseadas em várias soluções-padrão de ácido tartárico. Um fotômetro a base de LED foi usado na medida espectrofotométrica e púrpura de m-

cresol foi escolhido como indicador ácido-base. As absorvâncias dos vinhos tintos injetados no sistema em fluxo não foram detectadas no comprimento de onda (LED amarelo) utilizado.

HONORATO et al. (1999) apresentaram um sistema híbrido flow-batch como uma nova abordagem automatizada para titulação. O ponto final é encontrado por meio do método de Fibonacci. A viabilidade da abordagem foi demonstrada na titulação de vinhos brancos com NaOH utilizando púrpura de m-cresol como indicador. O sistema se mostrou particularmente atrativo para a determinação da acidez de vinhos. Entretanto, a aplicação do sistema proposto à análise de vinhos tintos foi dificultada pelas variações da absorvância da amostra com o pH. Isto levou a variações no sinal medido perto do ponto de equivalência, afetando a comparação com o sinal de referência, prejudicando assim a aplicação do algoritmo de Fibonacci. Este problema pode ser superado pela escolha apropriada da combinação do comprimento de onda/indicador.

Nos estudos de Ohtsuki et al. (2000) o teor de acidez total do vinho foi determinado por voltametria com base na redução da quinona, 3,5-di-t-butil -1,2-benzoquinona (DBBQ). A DBBQ demonstrou ser uma quinona adequada como reagente para esta determinação devido ao seu potencial de redução, estabilidade e solubilidade em etanol contendo ácidos orgânicos. Nos voltamogramas da DBBQ obtidos com ácidos orgânicos tais como ácido tartárico, cítrico e málico, um pico simples e bem definido apareceu cuja altura foi proporcional à concentração de ácido total a 0,1 V durante a varredura catódica do potencial. A partir do método de adição padrão, utilizando uma solução padrão de ácido tartárico, o teor de acidez total no vinho foi calculado. A cor da amostra e sua turbidez não causaram interferência nos resultados da análise.

GARCIA e REIS (2006) desenvolveram um procedimento automático para a determinação da acidez total no vinho tinto, combinando a instrumentação, o software, e uma estratégia de trabalho baseado na abordagem flow-batch empregando multicomutação. O sistema de fluxo compreendia um injetor automático e válvulas solenóides de três vias, que foram controladas por um microcomputador através de um cartão de interface eletrônica. O controle do software foi desenvolvido com a capacidade de reconhecer o ponto final da titulação utilizando fenolftaleína como indicador externo.

Na determinação da acidez total em termos da massa de ácido tartárico presente nos vinhos, as metodologias mencionadas acima, necessitam do uso de um indicador externo, como também combinam a escolha deste indicador com a janela espectral emitida pelo LED, visto que os vinhos tintos absorvem a radiação eletromagnética numa ampla faixa do espectro visível, na qual aumenta com o pH do meio (GARCIA e REIS, 2006) devido às antocianinas presentes na uva (MALACRIDA e MOTTA, 2006).

1.5.2. Método de referência para determinação de acidez total

A determinação de qualquer parâmetro físico-químico de vinhos é realizada em conformidade com um protocolo estabelecido por órgãos oficiais. Instituições como a AOAC (ZOECKLEIN, 1995), OIV (1969), IAL (2008), assim como o MAPA (BRASIL, 2005), estabelecem suas recomendações para a determinação da acidez total em vinhos tintos.

O método recomendado pelo IAL (2008), como também pelo MAPA (BRASIL, 2005), se baseia na titulação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de álcali, com uso de indicador fenoftaleína para soluções claras de vinho e outras bebidas alcoólicas fermentadas ou com o pHmetro para soluções escuras. O procedimento consiste na titulação de uma alíquota da amostra descarbonatada com solução de hidróxido de sódio padronizada, até pH = 8,2-8,4.

1.6. Imagens digitais em química analítica

GELADI e GRAHN (1996) definiram imagem como sendo a reprodução de um objeto real ou cena, preservada em um meio. Como exemplo dessa definição de imagens podemos citar uma pintura a óleo, uma aquarela, uma fotografia, uma escultura, etc.

MACHADO, LEITE e SOUKI (2004) definiram imagem digital como sendo nada mais do que uma série de dígitos binários (0 e 1), ou seja, um longa seqüência desses dois números que, então, se “transformam” numa estrutura, geralmente

quadriculada, denominada *pixel*, que representam uma intensidade de luz e de cor, onde todos estes pixels em conjunto irão formar a imagem digital.

As imagens digitais podem ser produzidas por diversos aparelhos, incluindo câmeras de vídeo e fotográficas digitais, scanners, aparelhos de raios-X, microscópios eletrônicos, aparelhos de ultra-som e radares, como também webcams e telefones celulares (MACHADO, LEITE e SOUKI, 2004).

No campo da química analítica, diversos trabalhos foram publicados na literatura, envolvendo o uso de imagens digitais obtidas a partir de algum destes aparelhos eletrônicos. Os transdutores de imagem monitoram a radiação incidente de forma contínua e reversível para aquisição de imagens. No mercado estão disponíveis os transdutores do tipo dispositivos de carga acoplada (CCD) e os semicondutores metal-óxido complementar (CMOS) (LYRA, 2008). Alguns trabalhos encontrados na literatura discorrem sobre as câmeras CCD e as imagens digitais, como sendo ferramentas promissoras em medidas analíticas de cunho geral.

O uso de imagem em química começou com a utilização do microscópio, mas este instrumento nunca foi um assunto importante em química como foi para biologia, fisiologia, medicina e geologia. Isso mudou quando o microscópio eletrônico e depois o microscópio de íon se tornaram disponíveis, com possibilidade de mapeamento das concentrações dos elementos (GELADI e GRAHN, 1996). Sendo assim, diversos trabalhos foram publicados envolvendo este dispositivo.

FASSETT, ROTH e MORRISON (1977) obtiveram a quantificação de imagens da espectrometria de massa de íons secundários produzidos por um microscópio de íon e processamento de imagem digital. O filme negativo da imagem do íon é convertido em uma matriz de densidades de ponto que mantém a resolução espacial da imagem original. Técnicas de análise de imagem são demonstradas, incluindo características da análise e correlação-cruzada usando transformada de Fourier.

FASSET e MORRISON (1978) desenvolveram uma metodologia para tornar multielementar as medidas de íons secundários por processamento de imagem digital. Os autores utilizaram técnicas de processamento de imagens para lidar com informações químicas contidas dentro de micrografias de íons. A metodologia foi aplicada para análise de ferro policristalino.

DRUMMER e MORRISON (1980) perceberam as diversas vantagens em se obter resultados diretos a partir das imagens. O modo de imagem explora todo o potencial da capacidade do microscópio de íons de proporcionar informação espacial que é muitas vezes perdida ou severamente comprometida em volumes de análises por espectrometria de massa de íons secundários. Além disso, observaram vantagens em comparação à digitalização de imagens de microsonda, incluindo os tempos de aquisição de imagens substancialmente diminuídos, aumentos da resolução, e muitas vezes, maior precisão, com o compromisso entre o tempo e o número total de contagens registradas normalmente eliminadas.

FIORI (1988) relata os avanços na eletrônica óptica e o desenvolvimento de computadores poderosos e baratos que têm estendido a capacidade do microscópio eletrônico quantificar diretamente a imagem e os elementos que compõe a amostra. Começando pela formação da imagem, seguido pela descrição dos sinais analíticos e os detectores para estes sinais, assim como o hardware necessário, Fiori discute também a construção da imagem analítica através da microscopia eletrônica.

COOKE (1988) faz uma revisão sobre a evolução da microscopia química que ocorreu entre janeiro de 1986 e novembro de 1987, de acordo com os documentos do Chemical Abstracts. A ênfase foi colocada sobre os avanços na técnica de microscopia e instrumentação relevantes para potenciais métodos analíticos. O uso de imagens estava presente em várias técnicas citadas no artigo de revisão publicado por Cooke.

LEE et al. (1991) demonstrou que a resolução de imagens em microscopia eletroquímica de varredura pode ser substancialmente melhorada usando técnicas de processamento digital de imagens.

GELADI e ESBENSEN (1989) afirmaram que imagens podem conter informação útil em química e muitos métodos químicos podem gerar dados em imagens. Para os autores a relação entre imagem e as propriedades físicas/químicas de um objeto em estudo é dependente do comportamento do espectro no sistema de imagem. Muitos tipos de parâmetros físicos (variáveis) podem ser utilizados para propósitos em imagens. Algumas variáveis permitem a extração da informação química, e o mais importante, é que a interpretação de

resultados pode ser baseada na observação visual ao invés de olhar uma lista de números.

BYRNE et al. (2000) investigou os meios de tratamento da alta densidade de pontos das matrizes geradas pela imagem digital. Usando uma câmera digital CCD de alta resolução, um ponto da matriz de uma imagem a cores foi tomada e processada utilizando o software de desenvolvimento LabVIEW, para retornar aos valores numéricos dos componentes da cor vermelho, verde e azul de cada ponto. A aplicação da imagem digital como um detector para reações colorimétricas mostrou um grande potencial para medidas que envolvam a produção química da mudança de cor, oferecendo uma alta produção de medidas em análises qualitativas e quantitativas.

WITHAGEN, GROEN e SCHUTTE(2007) analisaram diferentes tipos de câmeras para sua utilização em medidas experimentais. Baseando-se em experimentos foi verificado um modelo geral de câmera CCD. Este modelo inclui ganho de offset, ruído aditivo e multiplicativo, e correção gama. Para diversas câmeras, exceto para uma webcam típica, este modelo geral mantém-se. Para a webcam, no estudo do ruído, a parte do ruído aditivo é mais importante que a parte do ruído multiplicativo sobre a escala de intensidade. Em geral, os estudos demonstraram que o modelo CCD é suficiente para todas as câmeras, exceto para webcams de baixa qualidade. Resultados para webcam mostraram que é perigoso escolher um modelo de câmera geral e assumir a sua validade. É importante validar o modelo para cada câmera específica utilizada. Como apenas uma câmera foi testada, os valores do parâmetro do modelo não são necessariamente válidos para outras câmeras do mesmo tipo.

TRIGO JÚNIOR (2007) estudou a medida da qualidade de imagens de câmeras digitais usando entropia informacional. A grandeza definida como entropia informacional mede a taxa na qual uma fonte fornece informação. Os transdutores de imagem do tipo CCD ou CMOS são importantes para esta informação. Uma entropia informacional alta está associada com uma grande variação nos valores de intensidade dos pixels da imagem, enquanto uma imagem com entropia baixa possui pixels mais uniformes e pouca informação pode ser obtida das imagens. O estudo conclui que as imagens que apresentam maior complexidade são aquelas em que a entropia informacional é maior, tanto para a entropia em um único canal como também para as imagens em RGB.

MONEMI et al. (1999) utilizaram uma câmera CCD como sistema de detecção em um ensaio quimioluminescente para determinação da proteína ligante do retinol (RBP). A quimioluminescência emitida a partir dos capilares de vidro foi detectada por uma varredura lenta da câmera CCD num tempo de exposição otimizado.

LAMPEN et al., (2000) usaram as imagens digitais adquiridas pela câmera para obter informações sobre as propriedades químicas e mineralógicas das pedras e do solo do planeta Marte.

MALEKI, SAVAFI e SEDAGHATPOUR (2004) empregaram uma câmera digital como sistema de detecção para determinação simultânea de alumínio (III) e ferro (III) em aços usando cromazurol S como reagente cromogênico. Os valores RGB associados às imagens dos complexos formados com o reagente foram usados na construção de um modelo de redes neurais artificiais.

No que diz respeito ao uso de imagens digitais, obtidas particularmente por uma webcam, destacam-se os trabalhos de Gaião et al. (2006), Lyra (2008) e recentemente o trabalho de Wongvilai et al. (2010). A webcam é uma câmera digital de baixo custo que captura imagens digitais de modo quase instantâneo. Esse tipo de câmera utiliza comumente um CCD ou CMOS como sensor de imagem.

GAIÃO et al., (2006), explorou o uso de imagens digitais em química analítica, empregando uma webcam como detector do ponto final em titulações de neutralização. Para cada pixel da imagem obtida pela webcam, o valor de cor das componentes RGB foi baseado no produto $2^R \times 2^G \times 2^B$, e então o valor médio de todos os pixels da imagem foi usado para construir as curvas de titulação. A viabilidade da técnica requer uma variação das componentes RGB da imagem e uma descontinuidade nas curvas de titulação onde está o ponto final associado à condição de equivalência química.

LYRA (2008) desenvolveu um método espectrométrico de emissão em chama baseada em imagens digitais. Um método matemático foi proposto para construção das curvas analíticas e estimar as figuras de mérito desenvolvido. Esta modelagem consistia na decomposição da imagem em suas componentes individuais R, G e B e seus valores foram usados para definir um vetor posição no espaço tri-dimensional RGB. A norma deste vetor foi adotada como o valor baseado em RGB (reposta analítica) e se revelou estar relacionada linearmente com a

concentração do analito. O método foi aplicado na determinação de lítio em comprimidos antidepressivos, sódio em soro fisiológico e cálcio em águas.

WONGVILAI et al. (2010) utilizaram uma webcam como um detector de baixo custo para um simples reator *lab-on-chip*. O sistema proposto utiliza uma webcam para monitorar as mudanças de cor, em tempo real, do indicador fenolftaleína na zona contínua de uma reação de neutralização ácido-base. O desaparecimento da cor rosa do indicador, quando a solução ácida difundia na solução básica, foi registrada como a mudança no valor das componentes RGB. Esta mudança estava relacionada com a concentração do ácido.

HUANG e ZHANG (2008) caracterizaram o espectro de cores das chamas de metano em várias condições de queima utilizando modelos de cor RGB e HSV (matiz, saturação e valor) em vez de resolver o espectro físico real. Os resultados demonstram que cada tipo de chama tem sua própria característica de distribuição, tanto no espaço RGB como HSV. Também foi observado que valores médios de B e de G no modelo RGB representam bem o CH^* e C_2^* de emissão do metano pré-misturado na chama. Essas características podem ser utilizadas para a medida e monitoramento de chamas. O sistema de imagens utilizado neste estudo é uma câmera digital CCD.

O uso de imagens obtidas por scanner em química analítica foi descrita inicialmente no trabalho de Shishkin Yu et al. (2004). Neste trabalho, os autores estudaram a possibilidade de usar um scanner de mesa e um software de processamento de imagem digital para a avaliação numérica da intensidade da cor das substâncias adsorvidas em espuma de poliuretano. O método permite realizar a digitalização das imagens de amostras coloridas de espuma de poliuretano usando um scanner de mesa. A quantificação das substâncias adsorvidas baseava-se na construção de curvas analíticas a partir das medidas de luminosidade do canal selecionado (R, G ou B) em função da concentração das soluções de calibração.

Gomes et al. (2008) realizou a determinação de ácido ascórbico pela digitalização das amostras no scanner, e uma região da imagem obtida foi selecionada para tratamento. Os valores médios das cores primárias vermelho (R), verde (G) e azul (B) foram calculadas através de programa computacional para cada amostra. O princípio da técnica foi baseada na reação entre o ácido ascórbico, hexacianoferrato de potássio e cloreto de ferro (III) para formar o complexo azul da Prússia.

SOLDAT, BARAK e LEPORE (2009) também utilizaram um scanner para obter as imagens digitais e explorá-las com finalidade analítica. Neste artigo, os autores demonstraram que a análise de imagem digital digitalizada de microplacas em scanner pode substituir um espectrofotômetro comum para vários procedimentos quantitativos em microescala. Esta descoberta permite baixo custo e micro-quantificação de diversos compostos ser demonstrada em laboratório. O método foi utilizado na determinação de vários íons de interesse ambiental.

MARTINEZ et al., (2008) desenvolveram um sistema que utiliza dispositivos baseados em papel microfluídico para execução de vários ensaios colorimétricos para simples testes de diagnóstico. Os resultados dos ensaios colorimétricos foram obtidos com dois tipos de celulares com câmera, um scanner portátil, um scanner de mesa e uma câmera digital. Os celulares com câmera são portáteis e cada vez mais acessíveis, leves e equipados com alta resolução (≥ 2 megapixels). Neste trabalho foi utilizado o sistema de cores primárias subtrativas: ciano, magenta, amarelo e preto (CMYK).

O uso de imagens digitais também está relacionado com trabalhos envolvendo o emprego de métodos quimiométricos de classificação.

MATOS et al. (2003) demonstrou o uso de Análise de Componentes Principais (PCA) de imagens para classificar e prever imagens de diferentes formatos, tamanhos, cores e tamanhos de partícula. Com a PCA de imagens foi possível separar diferentes figuras geométricas (círculos, triângulos e losangos) e classificar algumas amostras. Além disso, foi apresentada a possibilidade de empregar a PCA de imagens para separar três tamanhos de partícula: 63, 150 e 600 μm . As imagens foram digitalizadas a partir de um scanner.

PEREIRA e BUENO (2007) desenvolveram uma metodologia analítica para complementar a avaliação da qualidade de tintas utilizando imagens digitalizadas obtidas por um scanner. Aplicando PCA e análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foi possível identificar o melhor desempenho da pintura evitando interpretações subjetivas.

GODINHO et al., (2008) objetivaram classificar os refrigerantes dos tipos Cola, Laranja e Guaraná, utilizando PCA das imagens dos refrigerantes, obtidas em um *scanner* comum. Ao mesmo tempo, resultados de análises físico-químicas, para algumas marcas, foram correlacionados com os resultados obtidos da PCA. As componentes principais resultaram em diferentes padrões de agrupamento da

amostra nas parcelas de pontuação de acordo com histogramas RGB. pH, ácido ascórbico e medidas de sacarose também foram correlacionados com as marcas analisadas através de parcelas de pontuação PCA das imagens digitalizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Capítulo 2

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Soluções, Reagentes e Amostras

Uma solução-padrão de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir do reagente de grau analítico NaOH (Synth). Sua padronização foi realizada de acordo com procedimento descrito na literatura (JEFFERY et al., 1992). A solução padronizada foi utilizada como titulante na determinação da acidez das amostras de vinhos tintos.

Dez amostras de vinhos tintos (secos e suaves) de diferentes marcas e lotes foram adquiridas em supermercados da cidade de João Pessoa-PB.

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

2.2. Equipamentos

Uma webcam Clone, modelo 11090-CL, provida de sensor de imagens do tipo CMOS (LYRA, 2008), foi empregada na captura das imagens digitais do sistema titulométrico.

Uma bomba peristáltica Ismatec, modelo IPC, equipada com 8 canais e 12 roletes, foi usada na propulsão dos fluidos por intermédio de tubos de bombeamento de Tygon[®] com diâmetro interno de 1,14 mm. Para o transporte das soluções-amostras envolvidas no processo de titulação, foram utilizados tubos de Teflon[®] com 0,8 mm de diâmetro interno.

Três válvulas solenóides de três vias (*three-way*), da Cole Parmer, modelo EW-01540-13, foram usadas para introduzir os incrementos de volume de amostra e titulante no sistema analítico (ALMEIDA, 2007).

Uma interface de controle NI USB-6008 da National Instruments foi empregada para o acionamento das válvulas solenóides. Este equipamento permite o interfaceamento de instrumentos analíticos ao microcomputador, sendo uma tendência natural em todos os laboratórios de análises de rotina e/ou pesquisa (GAIÃO et al., 2004).

Um agitador magnético IKA da Lab Disc, modelo White, foi utilizado para girar uma barra magnética presente no interior do erlenmeyer.

Um pHmêtro Metrohm, modelo 713, foi usado na titulação potenciométrica implementada para obtenção dos valores de referência da acidez total das amostras dos vinhos tintos.

Um notebook com processador Intel Core2Duo, HD de 120 Gigabyte e memória de 2 Gigabyte (sistema operacional Windows XP[®]) foi empregado para controlar o sistema automático de titulação baseada em imagens digitais.

2.3. Sistema de titulação baseado em imagens digitais

O sistema titulométrico consiste de um(a): webcam, cela de fluxo, bomba peristáltica, agitador magnético, notebook, válvulas solenóides de três vias, acionador de válvulas e fonte de iluminação. Todo o sistema foi montado e colocado dentro de uma caixa de madeira com aproximadamente 32 x 54 x 36 cm³ e paredes internas cobertas com folhas de papel branco, como mostrado na Figura 2.1.

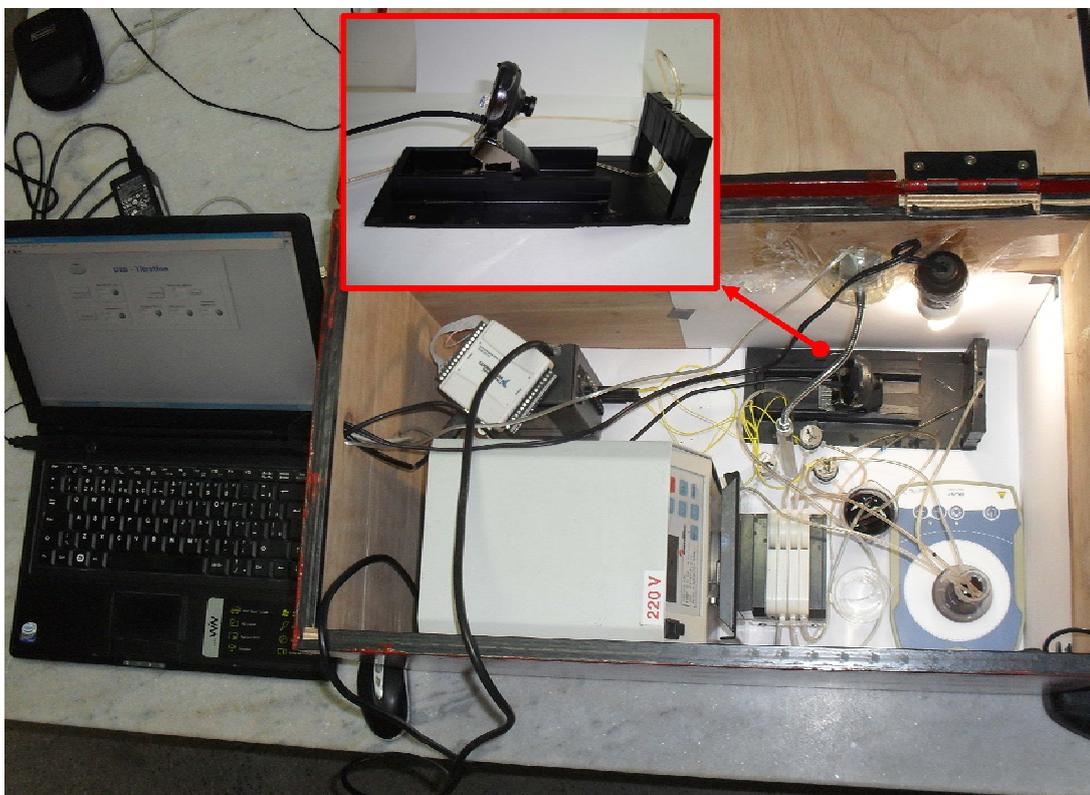


FIGURA 2.1. Foto do sistema de titulação de vinhos tintos baseada em imagens digitais. O zoom destacado na foto ilustra o posicionamento da webcam diante da célula de fluxo.

A câmera usa conexão Universal Serial Bus (USB) na sua comunicação com o computador (MIGUEL, CAVALCANTE e SILVA, 2006; LYRA, 2008). A webcam foi conectada à porta USB de um notebook Core2Duo e configurada para capturar imagens digitais com 24 bits (16.7 milhões de cores) à taxa de 30 quadros/s e 640 pixels x 480 pixels de resolução espacial. As imagens foram capturadas e armazenadas como arquivo “jpg” usando o programa fornecido pelo fabricante da webcam.

Como ilustrado no zoom do retângulo em vermelho da Figura 2.1, a webcam foi posicionada defronte à cela de fluxo confeccionada a partir de um tubo de vidro com 4 mm de diâmetro e 4,5 cm de comprimento (ARAÚJO et al., 1996). A fim de minimizar interferências da luz ambiente, o sistema de titulação baseado em imagens digitais (DIB) foi colocado dentro da caixa de madeira. Além disso, as paredes internas da caixa foram cobertas com uma folha de papel branco com o intuito de proporcionar uma iluminação uniforme e reduzir a luminosidade e a reflexão especular. As soluções coloridas foram iluminadas apenas com a luz de uma lâmpada fluorescente de 5 W.

O sistema analítico foi controlado pelo notebook, por intermédio de uma interface de controle, a qual acionava as válvulas da amostra de vinho tinto e do titulante. Uma conexão USB possibilitou também o controle da bomba peristáltica.

2.4. Procedimento de titulação DIB

O procedimento de titulação consiste, inicialmente, no bombeamento de um determinado volume de amostra para o erlenmeyer onde, em seguida, são efetuados incrementos da solução titulante. Transcorrido o tempo de mistura, a solução resultante para cada adição do titulante é transferida até a célula de fluxo, onde as imagens digitais são capturadas pela webcam. O analista digita apenas o tempo requerido para cada etapa da titulação nas caixas especificadas e aciona o botão de cada uma delas. A rotina desenvolvida para o funcionamento do sistema de análise proposto é baseada na relação entre o tempo de acionamento das válvulas e o volume de amostra e/ou titulante requerido na titulação. Um diagrama esquemático, usado para descrever o procedimento analítico envolvendo a titulação DIB, é mostrado na Figura 2.2.

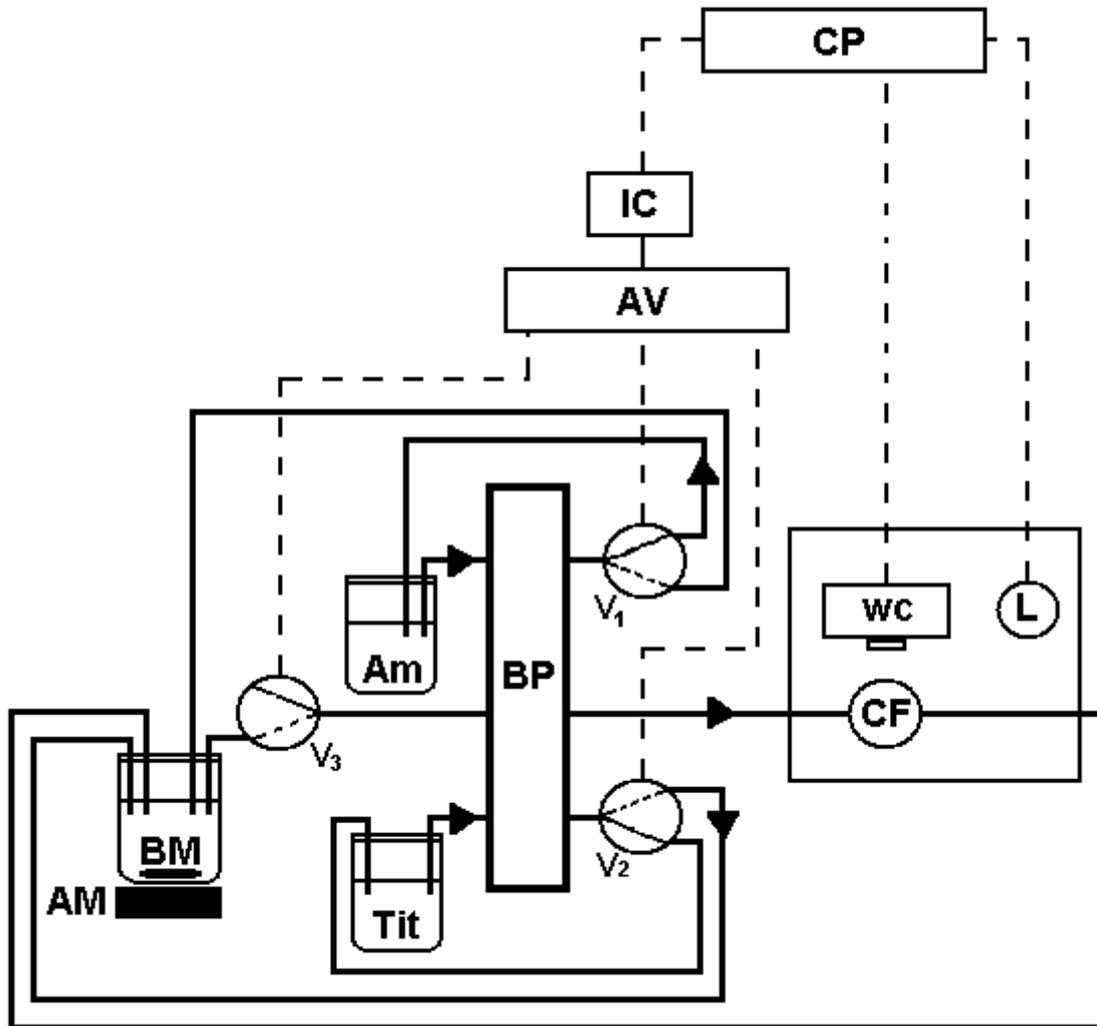


FIGURA 2.2 Diagrama esquemático do sistema de titulação DIB: Am – solução da amostra, Tit – solução do titulante, BP – bomba peristáltica, V_1 - válvula da amostra, V_2 - válvula do titulante, V_3 – válvula para transferência da solução resultante, WC- webcam, CF- célula de fluxo, L- lâmpada fluorescente, AV – acionador de válvulas, IC – interface de controle, CP – computador portátil, AM – agitador magnético e BM – barra magnética.

Inicialmente, quando as válvulas V_1 , V_2 e V_3 estão desligadas (OFF), as soluções da amostra e titulante, respectivamente, retornam aos seus recipientes, enquanto a válvula V_3 fica apenas aspirando o ar. O sistema aciona primeiramente a válvula V_1 (ON) e um volume de 10 mL da amostra de vinho tinto é bombeada para o erlenmeyer. Em seguida, a V_2 é acionada (ON) para a adição de incrementos de 1,0 mL de titulante ($\text{NaOH } 0,1000 \text{ mol L}^{-1}$) e 0,2 mL próximo ao ponto final. Terminado o tempo de mistura, a válvula V_3 é acionada e a solução resultante é aspirada para a célula de fluxo. Quando a célula é preenchida, a bomba peristáltica é desligada, o fluxo é interrompido e as imagens digitais são capturadas pela webcam. Após a

captura das imagens, a bomba peristáltica é ligada e a solução resultante retorna ao erlenmeyer para uma nova adição do titulante. O processo de titulação é repetido sucessivamente para dezoito adições de titulante.

As válvulas solenóides foram calibradas relacionando o tempo de abertura e o volume desejado em cada etapa da titulação. Para isso, foi estudada a faixa de volume requerido para a válvula do titulante e da amostra. Foram construídas curvas de calibração correlacionando-se a quantidade em massa do fluido injetado em função do tempo, como ilustrado na Figura 2.3.

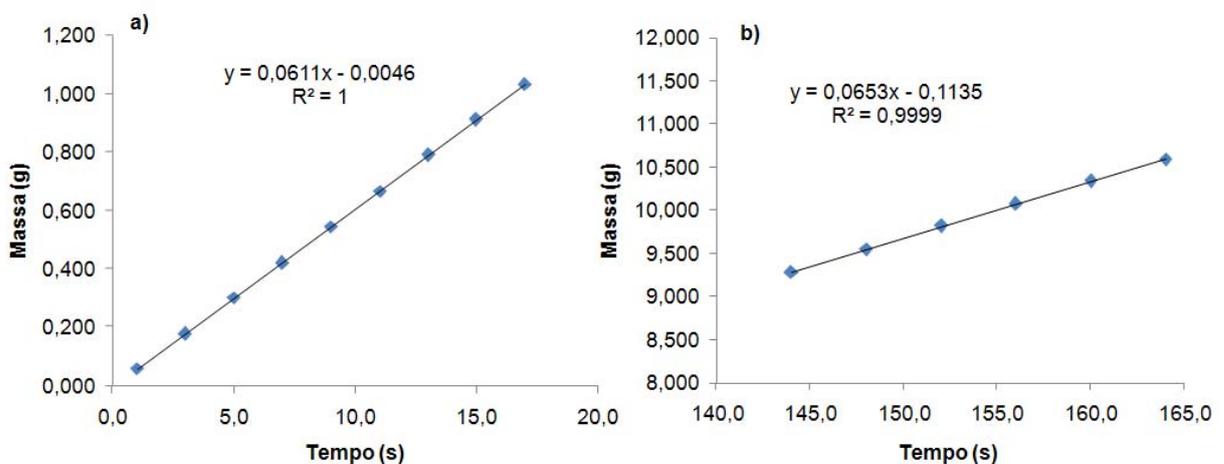


FIGURA 2.3 Curvas de calibração das válvulas solenóides (a) do titulante e (b) da amostra.

No presente trabalho, para a adição de 10 mL da amostra necessitou-se de 155,4 s e, para incrementos de 1,0 e 0,2 mL do titulante, requereu-se o tempo de 16,6 e 3,3 s respectivamente. Para misturar as soluções (amostras e titulante), um tempo de 15 s foi suficiente e 15 s foram necessários para o transporte da mistura do erlenmeyer até o preenchimento completo da célula de fluxo. Esses mesmos intervalos de tempo foram utilizados para a obtenção da imagem digital do branco.

2.4.1. Softwares para controle do sistema de titulação DIB

O software de controle do sistema de titulação baseado em imagens digitais (DIB) foi escrito em ambiente LabVIEW 5.1[®] da National Instruments. Esse programa é facilmente executado, pois apresenta uma interface gráfica contendo botões e caixas com funções explícitas, como observado em sua tela principal ilustrada na Figura 2.4.

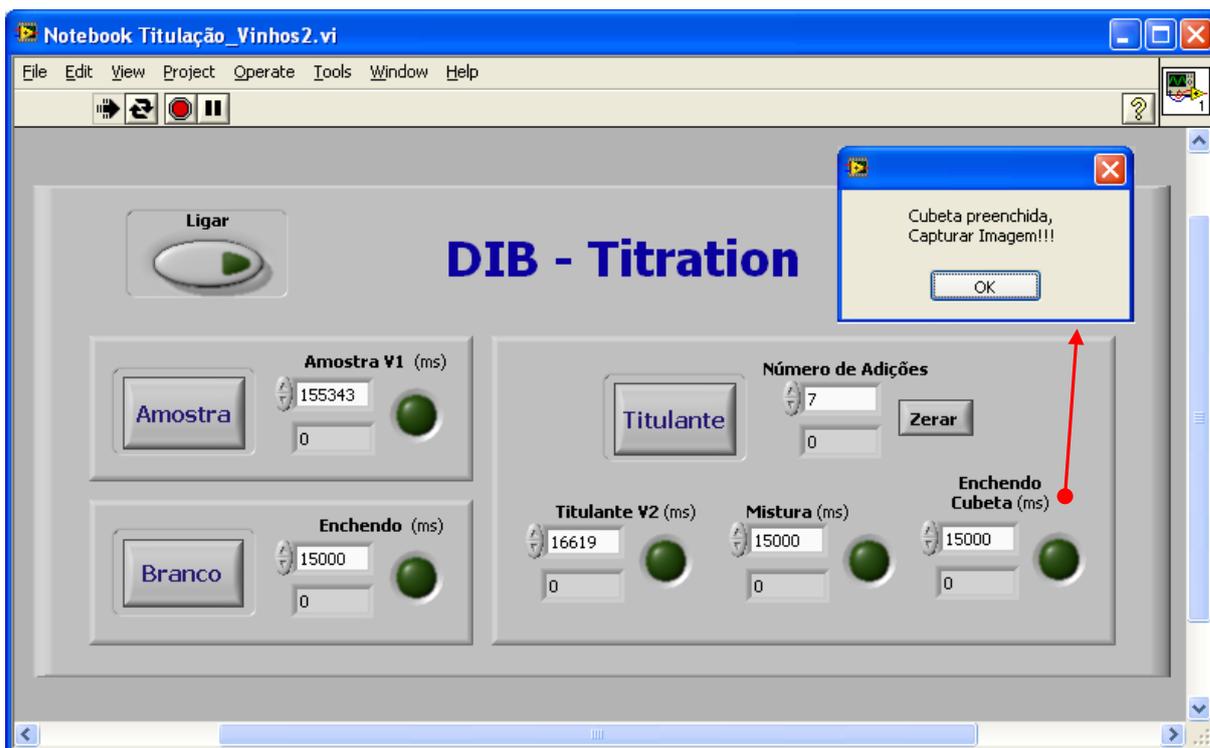


FIGURA 2.4 Janela principal do programa desenvolvido para Titulação DIB. A seta em vermelho aponta a janela cuja mensagem informa o momento de captura da imagem.

Inicialmente, realizou-se um estudo de vazão de amostra e titulante com a finalidade de certificar o volume liberado pelas válvulas solenóides. Após o estudo, verifico-se que as válvulas funcionavam a uma vazão constante de $0,06 \text{ mL s}^{-1}$. A fim de facilitar a operacionalização do programa, o tempo usado para o acionamento das válvulas solenóides era convertido em milissegundos.

Quando a célula de fluxo é preenchida, uma janela com a mensagem “**Cubeta preenchida, Capturar Imagem**” é exibida, o fluxo do sistema é interrompido e a imagem após cada adição do titulante é capturada pela webcam.

Na caixa “**Número de Adições**” o usuário tem a opção de escolher quantas adições de titulante devem ser realizadas durante a titulação, e terminada as adições, o botão “**Zerar**” faz uma nova contagem para a amostra seguinte.

2.5. Software para tratamento das imagens digitais

Para o tratamento das imagens digitais adquiridas na titulação, utilizou-se um software *lab-made* escrito em linguagem Object Pascal usando o Delphi® como ferramenta de desenvolvimento. O Delphi® foi escolhido para o desenvolvimento deste software, por ser uma linguagem de fácil assimilação e por possuir instruções que permitem o tratamento das imagens obtidas pela webcam. Além disso, o programa escrito em Delphi® é executado em ambiente Windows® tornando-o bastante amigável ao usuário, uma vez que eles são baseados em janelas. A Figura 2.4 apresenta a janela principal do software desenvolvido para o tratamento das imagens digitais.

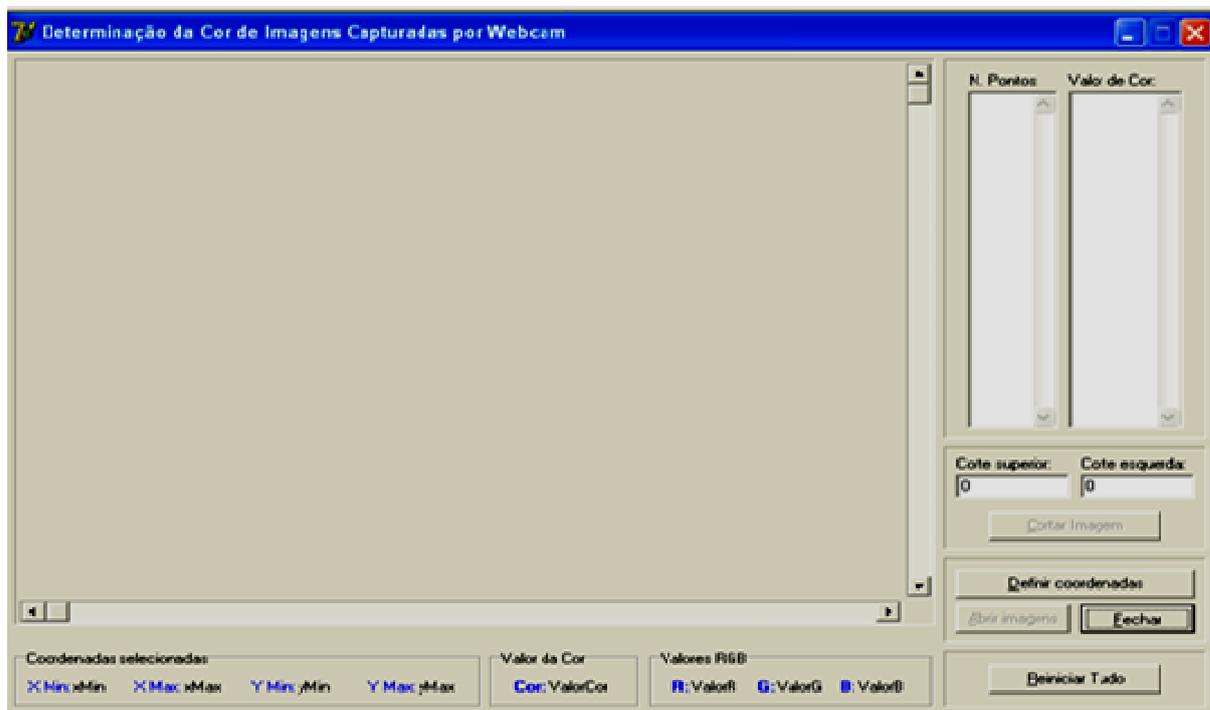


FIGURA 2.5 Janela principal do software “*Valor de Cor*” para o tratamento das imagens digitais.

Um esquema da rotina de funcionamento do programa computacional “Valor de Cor” é apresentada mais detalhadamente na Figura 2.6 onde, inicialmente, o usuário seleciona com o mouse do computador a região da primeira imagem da titulação, no caso o branco (água destilada), que será usada para o cálculo do valor de cor baseado em RGB. O programa usa as mesmas coordenadas da região delimitada pelo usuário para todas as imagens obtidas. Em seguida, o programa realiza uma varredura (coluna por coluna) dos pixels da região delimitada, calcula o valor de cor RGB para cada pixel e posteriormente a média de todos os valores

RGB. Este valor médio é usado para construir as curvas de titulação baseadas em imagens digitais (GAIÃO et al., 2006).

Os cálculos do valor de cor baseado em RGB são baseados no produto $2^R \cdot 2^G \cdot 2^B$, onde R, G e B são as componentes vermelho, verde e azul, respectivamente.

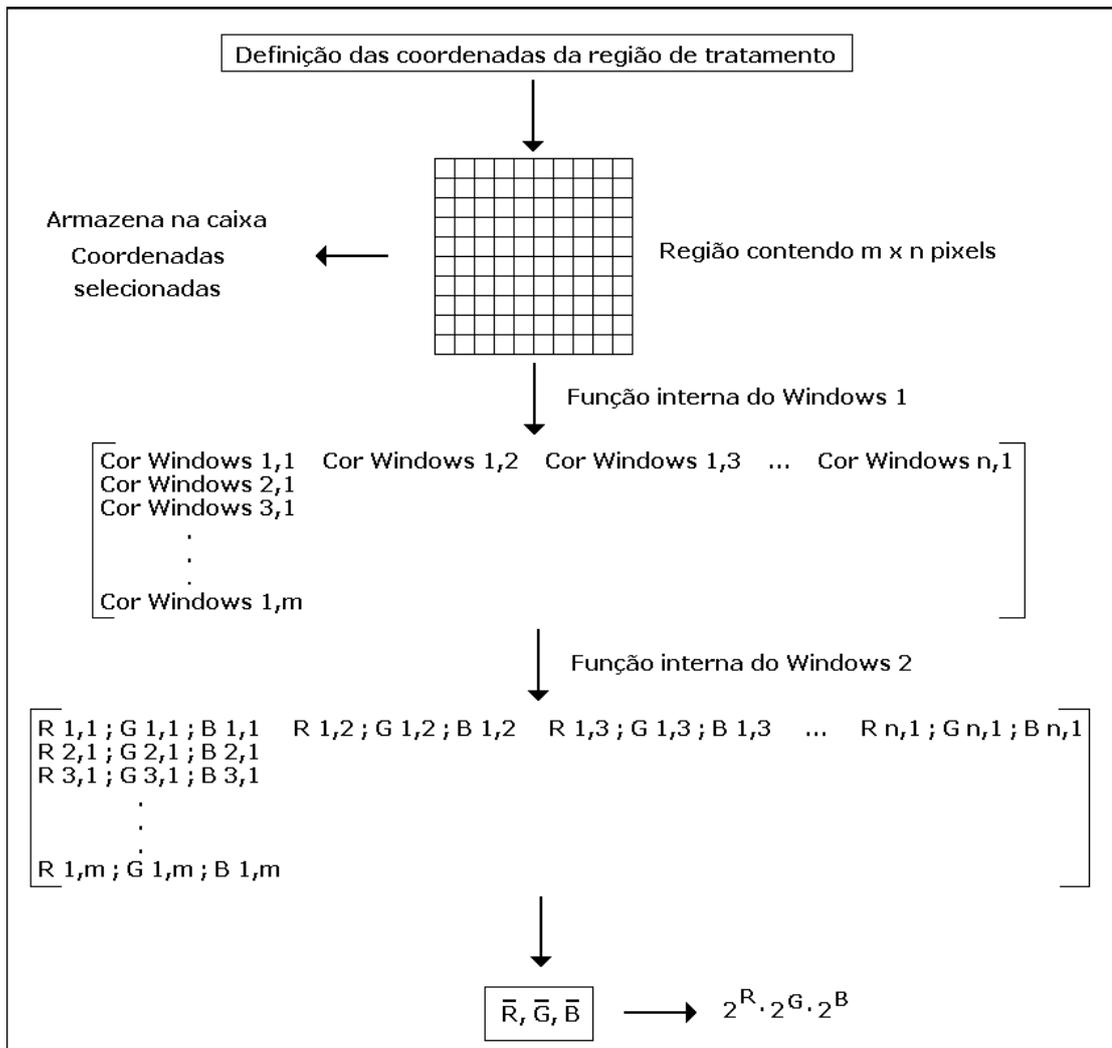


FIGURA 2.6. Esquema da rotina do cálculo do valor RGB pelo programa “Valor de Cor”

Adaptado de LYRA (2008)

As operações descritas pelo esquema anterior, envolvendo o tratamento dos *pixels* podem ser compreendidas da seguinte maneira de acordo com as figuras 2.7 e 2.8 seguintes:

1) **Definição das coordenadas da região de interesse nas imagens digitais:** ao acionar o botão “*Definir coordenadas*” abre-se uma janela na qual o operador seleciona o diretório destinado ao armazenamento das imagens digitais e a primeira imagem do conjunto, referente ao branco, é usada na seleção da região de

interesse. Com o auxílio do *mouse* o usuário delimita a região de trabalho e suas coordenadas ficam armazenadas na caixa “*Coordenadas selecionadas*”.

FIGURA 2.7 Janela para definição das coordenadas da região de interesse nas imagens. A seta indica a região delimitada pelo usuário (definida pelo retângulo) para o cálculo do “Valor de Cor”.

2) **Definição das componentes RGB das imagens obtidas:** ao acionar o botão “***Abrir imagens***” abre-se novamente a janela do diretório da “*etapa 1*” para seleção das imagens digitais obtidas durante a titulação. O programa faz uma varredura de todos os *pixels* da região selecionada na “*etapa 1*”, coluna por coluna, e calcula o valor “*Cor do Windows*” destes por meio da função interna do *Windows 1*, que converte a cor num valor numérico. Por meio da função interna do *Windows 2*, o valor “*Cor do Windows*” é decomposto nas componentes R, G e B para todos os *pixels*. Os valores médios de cada componente da imagem são calculados e armazenados na caixa “*Valores RGB*”.

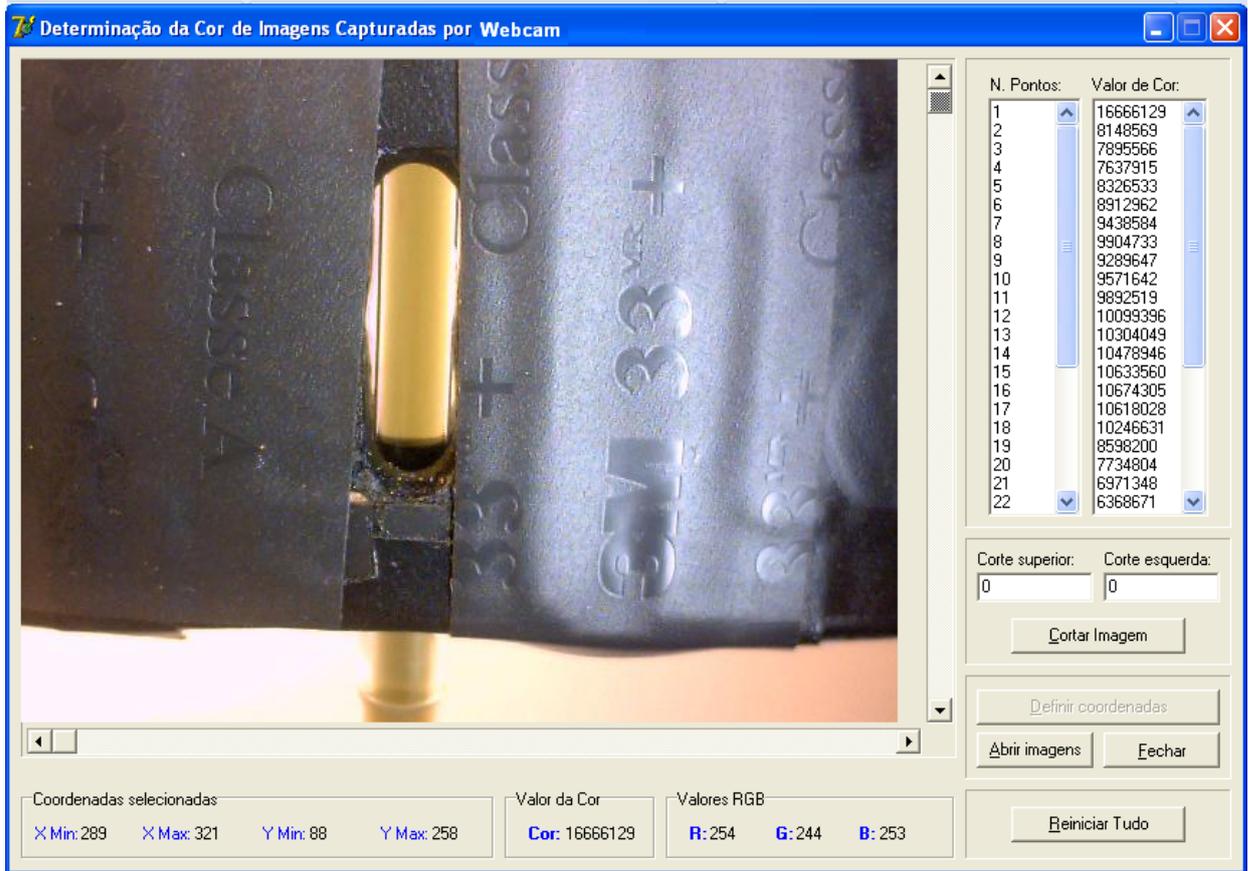


FIGURA 2.8 Janela do cálculo do valor de cor e valor médio das componentes RGB

3) **Valor de cor baseado em RGB:** a caixa “Valor de Cor” da Figura 2.7 fornece o resultado do valor de cor obtido no cálculo de $2^R \cdot 2^G \cdot 2^B$ para cada imagem. O valor médio de cada componente R, G e B da imagem utilizado no cálculo pode ser visualizado na caixa “Valores RGB”. Na coluna “Nº Pontos” e “Valor de Cor” têm-se o número de imagens obtidas durante a titulação e o valor de cor para cada imagem respectivamente.

As titulações baseadas em imagens digitais foram sempre realizadas a fim de certificar que o titulante era adicionado em excesso, gerando uma descontinuidade na curva de titulação.

2.6. Testes estatísticos para validação dos resultados analíticos

Os resultados das determinações realizadas por intermédio das titulações DIB e potenciométrica foram comparados aplicando-se testes estatísticos descritos na literatura (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2007 e SKOOG, et al., 2006).

Cada amostra foi analisada em triplicata para utilização das médias nos testes estatísticos.

2.6.1. Aplicação do teste t emparelhado baseado no teste de hipóteses

O teste de hipóteses é, usualmente, utilizado na formulação do teste t emparelhado usado para avaliar se existem diferenças sistemáticas estatisticamente significativas entre os resultados de dois métodos analíticos. Neste trabalho, os resultados referem-se às concentrações de ácido tartárico (g L^{-1}) obtidas nas titulações DIB (método proposto) e potenciométrica (método de referência). Essas concentrações exprimem a medida da acidez total das amostras de vinhos tintos analisadas.

Para implementar o teste t emparelhado, calculam-se as diferenças (d_i) entre os valores de concentração para cada par de resultados assim como a média dessas diferenças (\bar{d}). Além disso, assumindo-se que se Δ é a diferença média verdadeira entre os resultados dos métodos, pode-se testar a hipótese nula (H_0) de que $\Delta = 0$. Sendo assim, o teste t pareado pode ser aplicado com base na expressão:

$$t = \frac{\bar{d} - 0}{s_d / \sqrt{n}} \quad (2.1)$$

onde n é o número de amostras analisadas por ambos os métodos e s_d é o desvio padrão das diferenças dado por:

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{n-1}} \quad (2.2)$$

Após o cálculo do valor de t , este deve ser comparado a um valor crítico de $t_{\text{crít}}$ para o número de graus de liberdade (ν) dado por $\nu = n - 1$ e nível de confiança desejado. Geralmente, adota-se o nível de 95% de confiança como um bom compromisso entre confiança estatística e precisão. Como resultado, se o valor de t for maior que o de $t_{\text{crít}}$, a hipótese nula é rejeitada o que revela uma diferença sistemática significativa entre os resultados no nível de confiança adotado. Isto

significa que há uma probabilidade menor que 2,5% (em cada cauda) ou de 5% no total das diferenças nos valores advirem de erros aleatórios (SKOOG, et al., 2006). Caso contrário, não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados dos métodos analíticos.

2.6.2. Aplicação do teste *t* emparelhado baseado no conceito de intervalo de confiança

O conceito de intervalo de confiança também pode ser explorado para a aplicação do teste *t* emparelhado. Novamente, sua implementação requer o cálculo da média (\bar{d}) das diferenças (d_i) entre os valores de concentração para cada par de resultados. Admitindo-se que Δ é a diferença média verdadeira entre os resultados dos dois métodos, o intervalo de confiança para Δ é dado pela equação 2.4

$$\Delta = \bar{d} \pm t_v \frac{S_d}{\sqrt{n}} \quad (2.3)$$

onde n é o número de amostras, s_d desvio padrão da média das diferenças e t_v é o ponto de distribuição *t* correspondente ao número de graus de liberdade (v) no nível de confiança desejado (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2007).

A interpretação do intervalo de confiança é realizada da seguinte maneira: (i) se o valor “zero” estiver contido dentro do intervalo construído, não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados dos dois métodos. Neste caso, a hipótese nula não pode ser rejeitada e a média das diferenças (\bar{d}) deve ser um ponto da distribuição *t* com $\Delta = 0$; (ii) caso contrário, existe uma diferença sistemática significativa entre os resultados dos métodos ao nível adotado de confiança estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo 3

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo dos incrementos de volume do titulante

Na titulação de ácidos fracos o valor de pH no ponto de equivalência depende da concentração do analito (ácido presente). No caso do ácido tartárico ($K_{a1} \approx 9,20 \times 10^{-4}$ e $K_{a2} \approx 4,31 \times 10^{-5}$), ele não pode ser determinado em uma solução aquosa por titulação até o ponto de equivalência devido suas constantes de dissociação. Isso faz com que, na prática, uma titulação potenciométrica a um valor fixo de pH (no caso até pH = 8,2) seja realizada (GOLOVNEV, ROMANOVA e BUSYGINA, 2000).

Titulações cujas curvas apresentam inflexões pouco acentuadas exigem do químico muita experiência no planejamento adequado das adições do titulante, tornando-se necessário, geralmente, o cálculo prévio, segundo equações gerais das curvas de titulação (MEDEIROS e CARVALHO, 1991). Além disso, técnicas de análise instrumental que empregam medidas com base em pontos de inflexão podem ter sua precisão comprometida devido à necessidade de diferenciação do sinal, que é muito sensível ao ruído instrumental (MARTINS, et al., 2003).

PRENESTI, et al. (2004) estudaram os equilíbrios químicos homogêneos e heterogêneos que estão envolvidos com as várias modificações que ocorrem durante a vida dos vinhos. Os autores verificaram que durante a titulação ácido-base dos vinhos, um primeiro ponto de inflexão foi encontrado em torno de pH 7,5, e que a presença de vários compostos no vinho aumenta a capacidade tampão na matriz. Além disso, observou-se que a inflexão na curva de titulação (em torno de pH 7,5) se assemelha à de um ácido fraco.

Para evitar que o efeito tampão dos vinhos dificultasse a localização do ponto final da titulação DIB pelo método da segunda derivada, um estudo envolvendo a quantidade de titulante que deveria ser adicionado foi realizado. De acordo com a Figura 3.1 (b), adições de 0,2 mL de titulante próximo ao ponto final foram escolhidas neste trabalho para a construção das curvas de titulações DIB, sem prejuízo para o método da segunda derivada. Esse é menor incremento do titulante que assegura o melhor compromisso entre uma localização precisa do ponto final da titulação DIB e as variações de cor detectáveis pela webcam. Para as outras regiões, foram efetuados incrementos de 1,0 mL de titulante (Figura 3.1 (a)),

com o intuito de, em face do efeito tampão, obter variações de cor mais expressivas, assim como tornar o processo de titulação mais rápido.

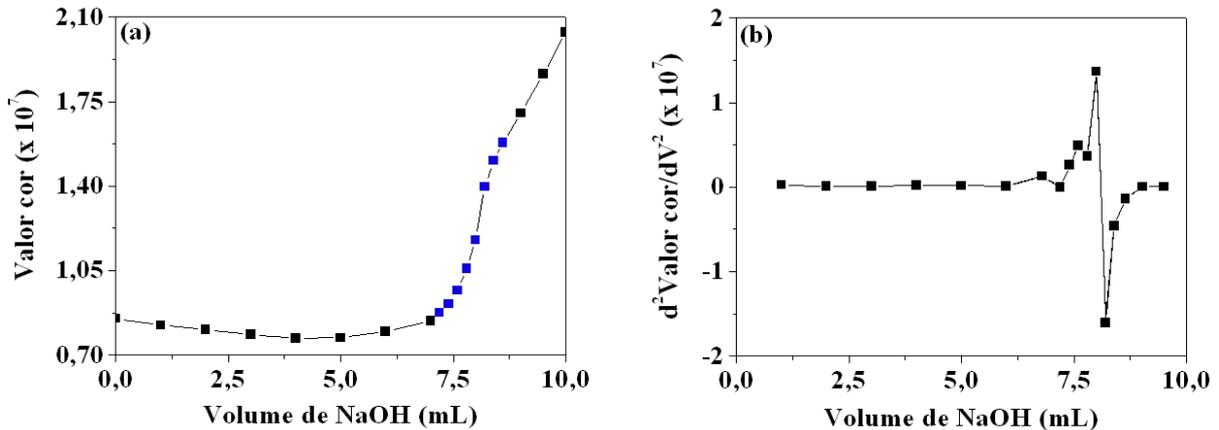


FIGURA 3.1. Curvas de titulação DIB com incrementos de 0,2 mL (pontos azuis) nas vizinhanças do ponto final (a) e sua respectiva segunda derivada (b).

3.2. Imagens digitais e espectros de absorção obtidos durante uma titulação DIB

Uma substância colorida absorve seletivamente radiações com comprimentos de onda da região visível do espectro eletromagnético. A coloração da solução resulta da radiação emergente que não é absorvida (transmitida), sendo por isso denominada cor complementar (GOMES, et al., 2008).

As imagens digitais apresentam a cor da radiação emergente, a qual é a cor complementar da radiação absorvida pelas espécies moleculares absorventes (antocianinas). Desse modo, as imagens digitais estão associadas diretamente com o fenômeno de absorção molecular que fornece a base da espectrofotometria UV-Vis.

VERSARI, BOULTON e PARPINELLO (2008) afirmam que a cor total dos vinhos resulta da combinação de três componentes: copigmentação (8-30%), total de antocianinas livres (24-35%) e pigmentos poliméricos (35-63%). De acordo com estes autores, o vinho tinto é uma matriz complexa e, apesar de sua cor poder ser medida por técnicas espectrais, a relação entre a cor do vinho e sua composição química é difícil de explicar.

A figura 3.2 mostra a associação entre as imagens digitais obtidas durante a titulação de vinho tinto e o pH medido após as adições do volume de titulante,

enquanto a figura 3.3 apresenta os espectros registrados após as mesmas adições realizadas na amostra diluída de 1:10 (v/v).

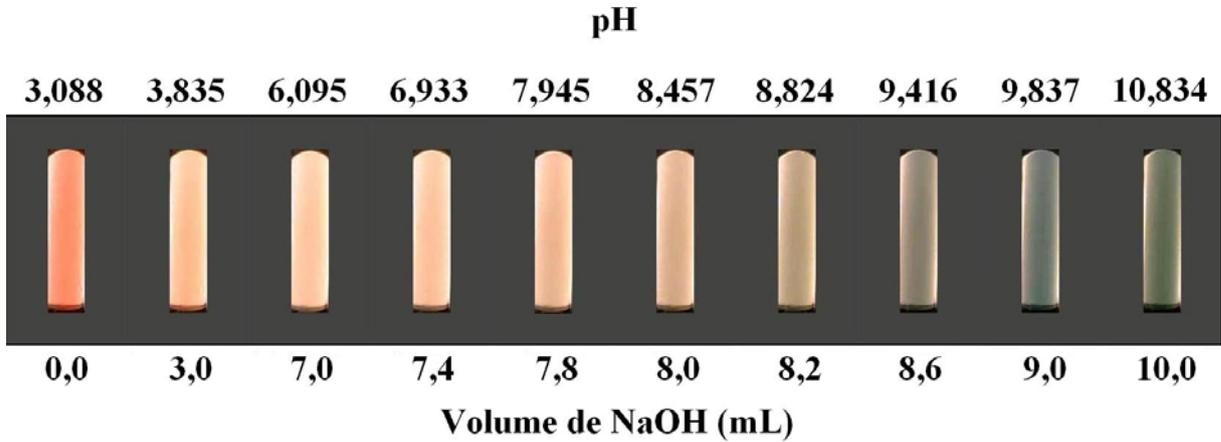


FIGURA 3.2. Imagens digitais obtidas durante a titulação do vinho tinto para incrementos de volume de titulante e o respectivo pH da solução.

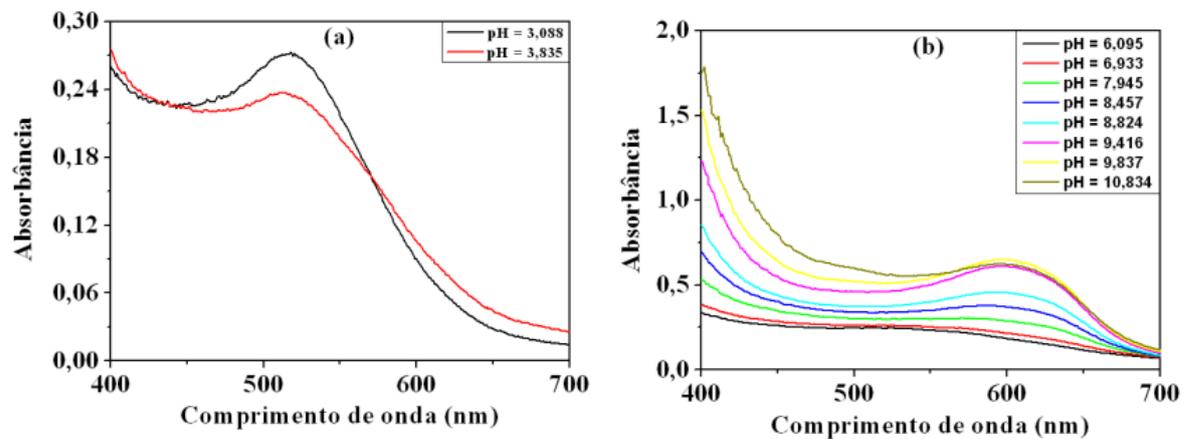


FIGURA 3.3. Espectros de absorção obtidos de uma amostra de vinho tinto diluída 1:10 (v/v) em meio ácido (a) e em meio alcalino (b) para cada incremento de volume do titulante.

As antocianinas presentes nos vinhos são capazes de absorver radiação na região do espectro visível conferindo uma variedade de cores, como pode ser observado pelas imagens da Figura 3.2, dependendo do meio em que se encontram.

O pH é o fator mais importante no que diz respeito à coloração das antocianinas, e dependendo do grau de acidez ou alcalinidade, as antocianinas

adotam diferentes estruturas químicas em meio aquoso (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002).

Tal fato pode ser observado por meio dos espectros registrados ao longo da titulação na Figura 3.3 que revelam a existência de diferentes perfis espectrais dependendo do pH, devido à predominância de diferentes estruturas em cada meio (MARÇO, POPPI e SCARMÍNIO, 2008).

Observando as imagens obtidas, pode-se notar que em meio ácido, predomina a coloração vermelha e a absorbância varia lentamente para valores menores. Após o ponto final, a cor muda para verde, e um aumento na absorbância é verificado em meio alcalino (CORTES, RAMOS e CAVALHEIRO, 2007).

Em soluções aquosas, quatro espécies da molécula de antocianina podem existir em equilíbrio: o cátion flavílico (AH^+), a base quinoidal (A), a pseudobase carbinol (B) e a espécie chalcona (C) (MARÇO e SCARMÍNIO, 2007). As espécies mostradas na Figura 3.4 correspondem às diferentes estruturas químicas das antocianinas quando se varia o pH do meio, sendo estas responsáveis pela mudança de cor apresentada pela amostra de vinho tinto ao longo da titulação, como também pelos diferentes espectros apresentados.

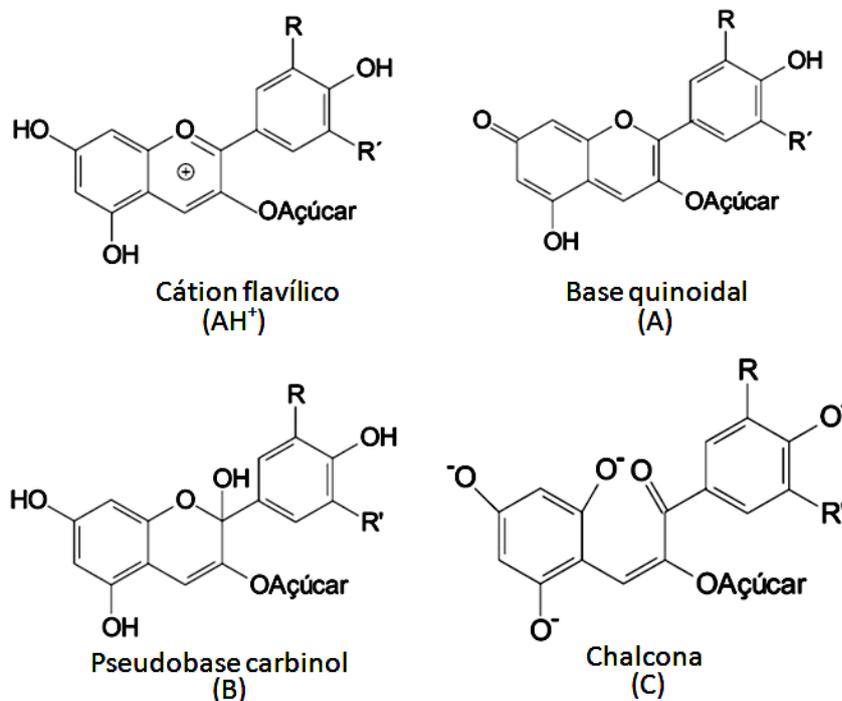


FIGURA 3.4. Estrutura molecular das espécies de antocianinas encontradas em soluções aquosas

Adaptado de MARÇO e SCARMÍNIO (2007)

O aumento do pH desloca o equilíbrio entre os numerosos cromóforos e, conseqüentemente, as quantidades relativas de todas essas formas estruturais variam de acordo com os equilíbrios químicos abaixo.



Em valores de pH acima de 9,0, as antocianinas ocorrem principalmente nas formas ionizadas da base quinoidal (A) e chalcona (C) (MARÇO, et al., 2005). As reações das antocianinas em meio aquoso e as propostas de mecanismos envolvidos nestas reações ainda podem ser consideradas objetos de estudos, uma vez que não são completamente entendidas.

As principais reações estudadas são aquelas relacionadas à perda da coloração das antocianinas (TERCI, 2004). O principal fator no desvanecimento da coloração das antocianinas é a alta reatividade do cátion flavílico frente a reagentes nucleofílicos, neste caso H_2O e OH^- (MARÇO, et al., 2005).

As cores observadas nas imagens digitais na Figura 3.2, ao longo da titulação, são resultantes da interação de nosso sistema visual com a parte do espectro eletromagnético que denominamos luz visível (GOUVEIA-MATOS, 1999).

LYRA (2008) afirma que a mistura das cores primárias vermelho, verde e azul, em diferentes combinações e níveis variados de intensidades pode simular todas as cores existentes no espectro da região do visível.

A Figura 3.5 mostra a variação das componentes vermelho, verde e azul, das imagens digitais obtidas pela webcam ao longo da titulação das amostras de vinho tinto.

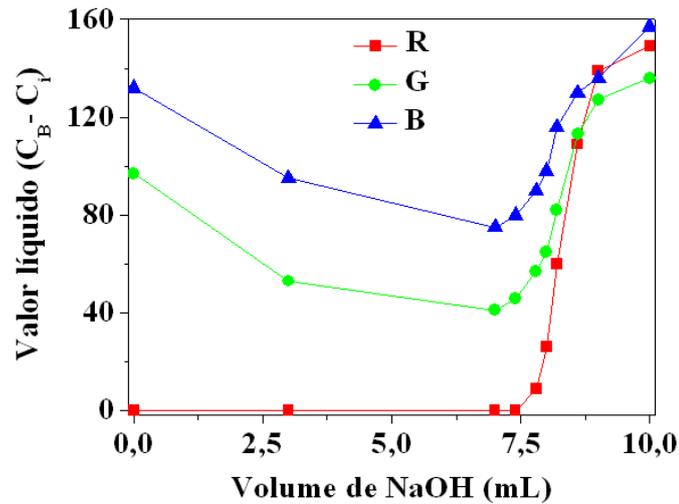


FIGURA 3.5. Variação das componentes do sistema de cores RGB ao longo da titulação das amostras de vinho tinto. Onde: C_B =valor da componente para o branco e C_i =valor da componente para uma dada adição de titulante.

3.3. Curvas de titulação e localização do ponto final

Inicialmente, vale lembrar que o método oficial preconizado pelo IAL (2008) recomenda que as titulações de vinhos tintos sejam efetuadas usando pHmêtro e que as amostras sejam tituladas até um valor fixo de pH (8,2-8,4), não necessitando assim da construção da curva de titulação potenciométrica, bastando apenas que o analista verifique o volume de titulante gasto até este valor e efetue os cálculos.

Para o método proposto, curvas de titulação foram construídas a fim de localizar o ponto final da titulação. A Figura 3.6 mostra a curva de titulação DIB e sua respectiva segunda derivada.

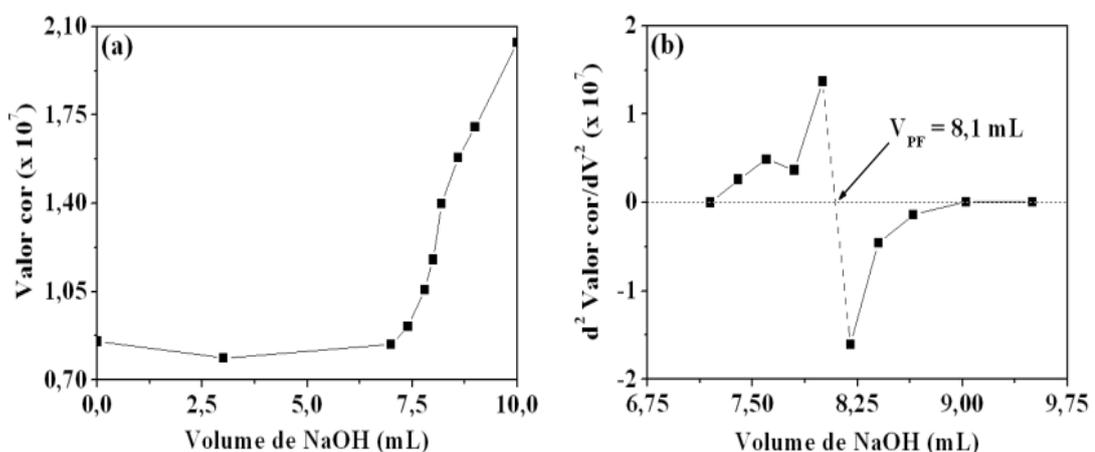


FIGURA 3.6. Curvas de titulação DIB (a) e sua respectiva curva de segunda derivada (b)

O ponto de inflexão desta curva foi determinado empregando-se o método derivativo. As curvas de segunda derivada revelam o ponto final da titulação fundamentando-se no conceito matemático de que a segunda derivada indica a mudança de sentido da concavidade de uma dada curva (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

As seguintes equações foram utilizadas para o cálculo das segundas derivadas das curvas de titulação.

- Equações para o cálculo das primeiras derivadas:

$$\frac{\Delta R}{\Delta V} = \frac{R_{(i+1)} - R_i}{V_{(i+1)} - V_i} \quad \text{e} \quad V_{\text{médio}} = \frac{V_{(i+1)} + V_i}{2}$$

- Equações para o cálculo das segundas derivadas:

$$\frac{\Delta^2 R}{\Delta V_{\text{médio}}} = \frac{\Delta((\Delta R/\Delta V))}{\Delta V_{\text{médio}}} = \frac{((\Delta R/\Delta V))_{i+1} - ((\Delta R/\Delta V))_i}{(V_{\text{médio}})_{i+1} - (V_{\text{médio}})_i} \quad \text{e}$$

$$\overline{V}_{\text{médio}} = \frac{(V_{\text{médio}})_{i+1} + (V_{\text{médio}})_i}{2}$$

Onde R é a resposta analítica e V é o volume do titulante, $i=0,1,2,3,\dots,n$, e n é o número de pontos de titulação que foram usados no cálculo derivativo. As curvas de segunda derivada foram construídas usando o valor de $\overline{V}_{\text{médio}}$

Analisando os gráficos da Figura 3.6 (a) e a Figura 3.5, percebe-se que a variação mais pronunciada do valor de cor na curva de titulação DIB deve-se a contribuição das três componentes (vermelha, verde e azul) antes do ponto final da titulação. Antes deste ponto a componente vermelha mantém-se constante, e variações ocorrem para as componentes verde e azul, fato que permite a visualização da cor vermelha das imagens. Após o ponto final da titulação DIB, as

variações das três componentes em diferentes combinações e intensidades levam às cores exibidas pelas amostras de vinho tinto em meio alcalino.

No gráfico da Figura 3.6 (b), no cruzamento do zero, indicado por uma seta na curva de segunda derivada da titulação dos vinhos tintos, o valor fornecido do volume do ponto final (V_{PF}) foi semelhante para as titulações DIB e potenciométrica. Na titulação potenciométrica, para esta mesma amostra de vinho tinto da Figura 3.6, o volume de NaOH consumido no ponto final também foi de 8,1 mL (volume do titulante para qual o pH se enquadra na faixa preconizada pelo método oficial).

O ponto de inflexão da curva de titulação DIB, observado na curva da segunda derivada da Figura 3.6 (b), encontra-se num valor de pH relacionado com a neutralização de todos os ácidos fracos presentes na matriz da amostra do vinho tinto (figura 3.2).

Os resultados acima atestam uma boa concordância entre o método titulométrico proposto e o recomendado pelos órgãos oficiais.

3.4. Determinações de acidez total dos vinhos tintos

O método proposto (titulação DIB) foi aplicado na determinação da acidez total de dez amostras de vinho tinto (secos e suaves) e os resultados foram comparados com os obtidos pelo método de referência (titulação potenciométrica). A tabela 3.1 apresenta os resultados, em termos de concentração de ácido tartárico em g/L, obtidos nessas determinações.

TABELA 3.1 Resultados das médias de três determinações da acidez total de vinhos tintos, em termos de g/L de ácido tartárico, obtidos pelos métodos de titulação (DIB e potenciométrica).

AMOSTRAS	TITULAÇÃO	
	DIB	POTENCIOMÉTRICA
1	11,4 ± 0,2	11,4 ± 0,2
2	12,3 ± 0,2	12,2 ± 0,2
3	11,9 ± 0,0	12,4 ± 0,1
4	12,3 ± 0,2	12,1 ± 0,1
5	11,8 ± 0,1	12,0 ± 0,3
6	12,3 ± 0,2	12,6 ± 0,3
7	12,2 ± 0,1	12,3 ± 0,2
8	12,0 ± 0,1	11,7 ± 0,2
9	12,4 ± 0,1	12,2 ± 0,2
10	12,2 ± 0,1	12,1 ± 0,1

Pode-se observar uma boa concordância entre os resultados da aplicação dos métodos titulométricos, dada a proximidade dos valores obtidos para a concentração de ácido tartárico. De fato, a aplicação do teste *t* emparelhado, baseado no teste de hipóteses, revelou não existir diferença sistemática significativa entre os resultados dos métodos ao nível de 95% de confiança. Essa inferência pode ser corroborada pelo teste *t* emparelhado baseado no intervalo de confiança construído para a diferença média verdadeira (Δ). Para o nível de 95% de confiança, os limites desse intervalo são:

$$\Delta = [-0,4038; 0,3638]$$

Como se pode observar o intervalo contém o valor “zero”, evidenciando que não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados ao nível de confiança adotado. Por conseguinte, a hipótese nula de $\Delta = 0$ não pode ser rejeitada (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2007).

Conforme preconizado pelo MAPA (BRASIL, 1999), todas as amostras analisadas neste estudo apresentaram padrão de qualidade para comercialização quanto à acidez total, como indicado na tabela 1.1. (Seção 1.3).

CONCLUSÕES

Capítulo 4

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, demonstrou-se que imagens digitais, capturadas com uma *Webcam*, possibilitam a implementação de uma nova estratégia de titulação ácido-base para a determinação de acidez total de vinhos tintos sem o uso de indicador. Para atingir esse objetivo, a metodologia proposta se baseia nas propriedades absorventes inerentes à matriz das amostras de vinho tinto. De fato, as antocianinas apresentam diferentes cores de acordo com o pH do meio e, a partir das variações do valor de cor das imagens obtidas nas titulações, o ponto final foi localizado com precisão sem a necessidade do uso de indicador e diluição da amostra.

O desempenho da metodologia proposta foi avaliado por meio de titulações envolvendo a determinação da acidez total em dez amostras de vinhos tintos. Os resultados foram comparados com os obtidos pela titulação potenciométrica usada como método de referência. A aplicação do teste *t* emparelhado revelou que não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados, ao nível de 95% de confiança. O método proposto produziu resultados com uma precisão melhor que os da titulação potenciométrica recomendada como método oficial. Essa melhor característica de desempenho, exibida pela titulação DIB, pode ser atribuída à natureza trivariada das medidas associadas às imagens digitais.

O software desenvolvido para a realização automática da titulação DIB é de fácil execução, além de minimizar os esforços humanos. Entretanto, sua performance analítica precisa ser otimizada dado que o tempo de análise do sistema titulométrico DIB pode ser reduzido ainda mais, quando comparado ao método de referência. Além do mais, usando uma *Webcam* como detector de radiação na região do visível, a estratégia proposta oferece uma alternativa economicamente viável frente ao emprego dos pHmêtros convencionais, os quais são mais onerosos. Adicionalmente, destaca-se ainda como vantagem uma maior vida útil da webcam quando comparada com os eletrodos de vidro, cujas medidas de pH envolvem um contato direto entre a membrana do eletrodo e a matriz da amostra.

4.1. Propostas futuras

Com o término deste estudo, novas propostas de investigação surgiram a fim de estabelecer por completo a viabilidade das titulações baseadas em imagens digitais, tanto no que diz respeito à titulação de amostras coloridas, como também na titulação baseadas em outros tipos de reações (oxidação-redução, precipitação, etc).

A realização de titulações de vinagres tintos, por exemplo, onde o indicador encontra-se na própria amostra, já se encontra em andamento. Todavia, deve ser investigada a possibilidade de aplicar a metodologia proposta a sistemas que envolvam titulações de soluções coloridas baseadas em outros tipos de reações: titulações de oxi-redução, titulações permanganométricas onde o indicador é o titulante, as titulações iodométricas onde o indicador encontra-se na amostra e as titulações com dicromato, etc.

Em relação à automação do sistema titulométrico DIB, novas configurações de fluxos podem ser avaliadas com o intuito de melhorar a performance analítica, permitindo, por exemplo, um maior número de análises por hora. Essa motivação advém do fato do sistema titulométrico, implementado neste trabalho, basear-se em uma configuração de *closed-flow*.

REFERÊNCIAS

Capítulo 5

5. REFERÊNCIAS

- ABBASPOUR, A., KHAJEHZADEH, A. e GHAFFARINEJAD, A., A simple and cost-effective method, as na appropriate alternative for visible spectrophotometry: development of a dopamine biosensor, *Analyst*, **134**: 1692, 2009
- AFONSO, J. C.; AGUIAR, R. de M.; GOMES, L. M. B., Análise química de sais de cobre fabricados entre 1877 e 1995, *Química Nova*, **27**: 678, 2004
- ALEIXO, L. M. e GODINHO, O. E. S., Discussão sobre o uso de métodos lineares na determinação de volume de equivalência de titulações potenciométricas. Aplicações em experimentos didáticos, *Química Nova*, **7**: 32, 1984
- ALMEIDA, L., F. de, *Um analisador fluxo-batelada com bomba pistão aplicado à preparação de soluções de calibração e microemulsões: Determinação de metais em água mineral e gasolina por GF-AAS*, Recife, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPE, 2007. Tese de doutorado, 129p
- ANDRADE, M. F. de, et al., Análise multivariada de parâmetros físico-químicos em amostras de vinhos tintos comercializados na região metropolitana do Recife, *Química Nova*, **31**: 296, 2008
- ARAÚJO, M. C. U. de, et al., Uma célula espectrofotométrica simples para sistemas de análise química em fluxo contínuo, *Química Nova*, **19**:86, 1996
- BACCAN, N. et al., **Química Analítica Quantitativa Elementar**, 3ª ed., São Paulo: Edgar Blucher, 2004.
- BARROS, F. G., *Determinação condutométrica e colorimétrica de acidez volátil de vinagres e vinhos por injeção em fluxo*, Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química, UNICAMP, 1990. Dissertação de mestrado, 97p
- BARROS NETO, B. B., SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 3ª Ed. Campinas: Editora Unicamp, 2007.
- BENASSI, M. de T., *Metodologia analítica para avaliação de parâmetros físico-químicos e sensoriais de qualidade em vinhos Riesling Itálico nacionais*, Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1997. Tese de doutorado, 164p
- BEVILAQUIA, G. A. P., Avaliações físico-químicas durante a maturação de videiras cultivadas no rio grande do sul, *Revista Brasileira de Agrociência*, **1**: 151, 1995
- BORDIGNON Jr, C. L., et al., Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **29**: 183, 2009

BRASIL, Ministério da Agricultura, Portaria nº 229, de 25 de outubro de **1988**. Disponível em < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis> >. Acessado em: 14 de janeiro de 2010

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Coordenação de Inspeção Vegetal CIV/DDIV, Serviço de Inspeção Vegetal SIV/DFA/RS. Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho e Derivados da Uva e do Vinho, **1999**.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Instrução Normativa nº 24, de 08 de setembro de **2005**. Disponível em < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis> >. Acessado em: 14 de janeiro de 2010

BYRNE, L., et al., Digital imaging as a detector for generic analytical measurements, Trends in Analytical Chemistry, **19: 517 , 2000**

CABRITA, L., FOSSEN, T. e ANDERSEN, É. M., Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions, Food Chemistry, **68: 101, 2000**

CARDWELL, T. J. et al., Determination of titratable acidity of wines and total acidity of vinegars by discontinuous flow analysis using photometric end-point detection, Analyst, **116: 1051, 1991**

CARVALHO, A. A. de, et al., O mundo das imagens digitais, Revista Matéria, **8:167, 2003**

CIENFUEGOS, F. e VAITSMAN, D., **Análise Instrumental**, 1ª Ed., Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda., 2000.

CLIFF, M. A.; KING, M. C. e SCHLOSSER, J., Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines, Food Research International **40: 92, 2007**

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C. e SANDI, D., Corantes alimentícios, B.Ceppa, **20: 203, 2002**

COOKE, P. M., Chemical microscopy, Analytical Chemistry, **60: 212, 1988**

CORTES, M. S.; RAMOS, L. A. e CAVALHEIRO, E. T. G., Titulações espectrofotométricas de sistemas ácido-base utilizando extrato de flores contendo antocianinas, Química Nova, **30: 1014, 2007**

COSTA, W. F. da, *Estudos sobre linearização de curvas de titulações potenciométricas*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química, UNICAMP, 1989. Tese de doutorado, 241p

COUTO, A. B., RAMOS, L. A. e CAVALHEIRO, E. T. G., Aplicação de pigmentos de flores no ensino da química, Química Nova, **21: 221, 1998**

DARIAS-MARTIN, J., et al., Comparative study of methods for determination of titrable acidity in wine, *Journal of Food Composition and Analysis*, **16: 555, 2003**

DRUMMER, D. M. e MORRISON, G. H., Digital image processing for image quantification in ion microscope analysis, *Analytical Chemistry*, **52: 2147, 1980**

FALCÃO, L. D., et al., Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão, *B.Ceppa*, **21: 351, 2003**

FASSET, J. D e MORRISON, G. H., Digital image processing in ion microscope analysis: study of crystal structure effects in secondary ion mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **50: 1861, 1978**

FASSET, J. D.; ROTH, J. R. e MORRISON, G. H., Quantitation of secondary ion mass spectrometric images by microphotodensitometry and digital image processing, *Analytical Chemistry*, **49: 2322, 1977**

FIORI, C. E., The new electron microscopy: imaging the chemistry of nature, *Analytical Chemistry*, **60: 86, 1988**

FLOWERS, P. A., Potentiometric measurement of transition ranges and titration errors for acid/base indicators, *Journal of Chemical Education*, **74: 846, 1997**

FREITAS, D. M. de, *Variações dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (Vitis vinifera) tintas em diferentes ambientes*, Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UFSM, 2006, Tese de Doutorado, 42p

GAIÃO, E. N. et al., An automated flow-injection titrator for spectrophotometric determinations of total acidity in wines, using a single standard solution and gradient calibration, *Analyst*, **124: 1727, 1999**

GAIÃO, E. N., et al., Uma interface lab-made para aquisição de sinais analógicos instrumentais via porta paralela do microcomputador, *Química Nova*, **27: 825, 2004**

GAIÃO, E. N. et al., Digital image-based titrations, *Analytica Chimica Acta*, **570: 283, 2006**

GAMA, M. da S. e AFONSO, J. C., De Svante Arrhenius ao peagâmetro digital: 100 anos de medida de acidez, *Química Nova*, **30: 232, 2007**

GARCIA, A. J. C. e REIS, B. F., Instrumentation and automated photometric titration: Procedure for total acidity determination in red wine employing a multicommutated flow system, *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, **83247: 1, 2006**

GELADI, P. e ESBENSEN, K., Can Image Analysis Provide Information Useful in Chemistry?, *Journal of Chemometrics*, **3: 419, 1989**

GELADI, P. e GRAHN, H., **Multivariate Image Analysis**. First Edition, New York: John Wiley & Sons Ltd., 1996.

GODINHO, M. da S., et al., Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA), *Química Nova*, **31:1485, 2008**

GOLOVNEV, N. N., ROMANOVA, O. S. e BUSYGINA, N. V., Potentiometric determination of weak bases by titration to a fixed pH value, *Journal of Analytical Chemistry*, **55:457, 2000**

GOMES, M. S., et al., Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico, *Química Nova*, **31:1577, 2008**

GOUVEIA-MATOS, J. A. de M., Mudança nas cores dos extratos de flores e do repolho roxo, *Química Nova na Escola*, **10: 6, 1999**

GRAN, G., Determination of the equivalent point in potentiometric titrations, *Acta Chemica Scandinavica*, **4: 559, 1950**

HONORATO, R. S., et al., A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimization algorithm for end point search, *Analytica Chimica Acta*, **396: 91, 1999**

HUANG, H-W. e ZHANG, Y., Flame colour characterization in the visible and infrared spectrum using a digital camera and image processing, *Measurement Science and Technology*, **19: 1, 2008**

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª ed., 1ª Ed. Digital, São Paulo: 2008.

JEFFERY, G. H. et al., **Vogel: Análise Química Quantitativa**, 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992.

LAMPEN, P. et al, Spectroscopic and photometric evaluation of images from the Mars pathfinder camera, *Analytica Chimica Acta*, **420: 229, 2000**

LEÃO, A. C. *Gerenciamento de cores para imagens digitais*. Belo Horizonte, Programa de Pós-Graduação em Artes Visuais, UFMG, 2005. Dissertação de mestrado, 135p

LEE, C., et al., Scanning electrochemical microscopy: improvement of image resolution by digital processing techniques, *Analytical Chemistry*, **63: 2442, 1991**

LYRA, W. da S., *Espectrometria de Emissão em Chama Baseada em Imagens Digitais*, João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2008. Dissertação de mestrado, 103p

MACHADO, A. W.; LEITE, E. B. e SOUKI, B. Q., Fotografia Digital em Ortodontia: Parte I – Conceitos Básicos, *Jornal Brasileiro de Ortodontia e Ortopedia Facial*, **9: 11, 2004**

MALACRIDA, C. R. e MOTTA, S. da, Compostos fenólicos totais e antocianinas em sucos de uva, *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, **25: 659, 2005**

MALACRIDA, C. R. e MOTTA, S. da, Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade, *B.Ceppa*, **24: 59, 2006**

MALEKI, N.; SAVAFI, A.; SEDAGHATPOUR, F., Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera, *Talanta*, **64: 830, 2004**

MARÇO, P. H., et al., Exploratory analysis of simultaneous degradation of anthocyanins in the calyces of flowers of the *Hibiscus sabdariffa* species by PARAFAC model, *Analytical Sciences*, **21: 1523, 2005**

MARÇO, P. H. e SCARMÍNIO, I. S., Q-mode curve resolution of UV–vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acidic solutions, *Analytica Chimica Acta* **583: 138, 2007**

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. e SCARMINIO, I. S., Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais, *Química Nova*, **31: 1218, 2008**

MARTINEZ, A. W., et al., Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis, *Analytical Chemistry*, **8: 3699, 2008**

MARTINS, V. L., et al., A multiscale wavelet data treatment for reliable localization of inflection points for analytical purposes, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **43: 1725, 2003**

MATOS, G. D., et al., Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: pca e pca de imagens, *Revista Analytica*, **Nº 06, Agosto/Setembro 2003**, 38-50p

MEDEIROS, J. A. e CARVALHO, M. L. C. P. de, Sistema simples de titulação potenciométrica contínua, *Química Nova*, **14: 282, 1991**

MENDHAM, J. et al., **Vogel: Análise Química Quantitativa**. 6ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2002.

MIGUEL, N. B.; CAVALCANTI, J. H. F. e SILVA, L. B. da, Análise inteligente da dinâmica do professor e de alunos numa sala de aula. *Anais do 14º Congresso Brasileiro de Ergonomia, 4º Fórum Brasileiro de Ergonomia e 2º ABERGO JOVEM -*

II Congresso Brasileiro de Iniciação em Ergonomia, Curitiba-PR, 2006, vol. único, p.1-8

MONEMI, N. et al, CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein, *Analytica Chimica Acta*, **387: 21, 1999**

NASCIMENTO, J. A., Screening analysis de vinhos usando um sistema automático em fluxo batelada, espectrometria uv-vis e métodos quimiométricos, João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFPB, 2005, 112p

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN. Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins, OIV, 1969. A10, p. 1–3

OHTSUKI, S., et al., Determination of the total acid content in wine based on the voltammetric reduction of quinone, *Electroanalysis* **13: 404, 2001**

PATO, M. A. S., Influência dos principais ácidos do vinho na acidez real (pH), *Ciência e Técnica Vitivinícola*, **14: 55, 1999**

PEREIRA, F. M. V. e BUENO, M. I. M. S., Image evaluation with chemometric strategies for quality control of paints, *Analytica Chimica Acta* **588: 184, 2007**

PRENESTI, E., et al., Acid-base chemistry of red wine: analytical multi-technique characterisation and equilibrium-based chemical modelling, *Analytica Chimica Acta*, **507: 263, 2004**

RAMOS, L. A., et al., Utilização do extrato bruto de frutos de *solanum nigrum l* no ensino de química, *Eclética Química*, **25: 229, 2000**

RANGEL, A. O. S. S. e TÓTH, I. V., Sequential determination of titratable acidity and tartaric acid in wines by flow injection spectrophotometry, *Analyst*, **123: 661, 1998**

RIZZON, L. A. e MIELE, A., Concentração de ácido tartárico dos vinhos da serra gaúcha, *Ciência Rural*, **31: 893, 2001**

RUNYAN, E. G., A new indicator for use in determining total acidity of wines, *Journal of the American Chemical Society*, **23: 402, 1901**

ROCHA, F. R. P. e REIS, B. F., A low-cost device for automatic photometric titrations, *Journal of Chemical Education*, **77: 258, 2000**

SHISHKIN YU, L., et al., Use of a Scanner and Digital Image-Processing Software for the Quantification of Adsorbed Substances, *Journal of Analytical Chemistry*, **59: 102, 2004**

SKOOG, D. A., et al., **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª ed., São Paulo: Thomson, 2006.

SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. e ANTUNES, P. A., Aplicação de extratos brutos de flores de quaresmeira e azaléia e da casca de feijão preto em volumetria ácido-base. Um experimento didático para cursos de análise quantitativa, *Química Nova*, **24: 408, 2001**

SOLDAT, D. J.; BARAK, P. e LEPORE, B. J., Microscale colorimetric analysis using a desktop scanner and automated digital image analysis, *Journal of Chemical Education* **86: 617, 2009**

STRINGHETA, P. C. e BOBBIO, P. A., Copigmentação das Antocianinas, *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **14: 34, 2000**

TERRA, J. e ROSSI, A. V., Sobre o desenvolvimento da análise volumétrica e algumas aplicações atuais, *Química Nova*, **28: 166, 2005**

TERCI, D. B. L e ROSSI, A. V., Indicadores Naturais de pH: usar papel ou solução?, *Química Nova*, **25: 684, 2002**

TERCI, D. B. L., *Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas*, São Paulo, Departamento de Química Analítica, UNICAMP, 2004, Tese de doutorado, 213p

TRIGO JUNIOR, T. W., *Medida da qualidade de imagens de câmeras digitais usando entropia informacional*, São Paulo, Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle, Escola Politécnica da USP, 2007, Tese de doutorado, 140p

VERSARI, A., BOULTON, R. B. e PARPINELLO, G. P., A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines, *Food Chemistry*, **106: 397, 2008**

VOLP, A. C. P., et al., Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde, *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, **23: 141, 2008**

WILSON, T. V.; NICE, K e GUREVICH, G., Como funcionam as câmeras digitais. Disponível em: < <http://eletronicos.hsw.uol.com.br/cameras-digitais.htm> > Acessado em 09 de fevereiro de 2010.

WITHAGEN, P. J.; GROEN, F. C. A. e SCHUTTE, K., CCD color camera characterization for image measurements, *IEEE transactions on instrumentation and measurement*, **56: 199, 2007**

WONGVILAI, W., et al., Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach, *Talanta*, **81: 1137, 2010**

ZOECKLEIN, B. W., et al., **Wine analysis and production**, First Edition, New York: Chapman & Hall, 1995.