



**UnB**

INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TITULAÇÃO AUTOMÁTICA COM DETECÇÃO DIGITAL RGB E USO DE  
SERINGA MICROVOLUMÉTRICA

DISCENTE: LUCAS PINTO BERNAR

ORIENTADOR: PROF. DR. ALEXANDRE FONSECA

BRASÍLIA, DF  
2017

**Lucas Pinto Bernar**

**Titulação Automática com Detecção Digital RGB e uso de seringa  
microvolumétrica**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de Brasília.

ORIENTADOR: PROF. DR. ALEXANDRE FONSECA

BRASÍLIA - DF  
2017

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Lucas Pinto Bernar**, matrícula nº **15/0170467**, intitulada “**Titulação Automática com Detecção Digital RGB e uso de seringa microvolumétrica.**”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 13 de julho de 2017.

Prof. Dr. Alexandre Fonseca  
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Simone Monteiro e Silva  
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Valéria Regina Bellotto  
Membro Titular (IQ/UnB)

Dr. Márcio Talhavini  
Membro Suplente (INC/PF)

Em 13 de julho de 2017.

"Jovem, quando eu era um garoto eu caí em um buraco, me machuquei e não conseguia sair. Eu poderia ter morrido lá mas um estranho apareceu e me salvou. Ele disse que era sua obrigação. A ajuda que um dia ele recebeu, ele deveria ajudar dez outros que em troca devem ajudar outros dez. Assim as boas ações se espalhariam como as ondas formadas por uma pedra que se atira em um lago. Eu era um de seus dez e você agora é um dos meus. Então, eu passo essa obrigação a você."

Mestre Po

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Renato e Brazília, por todo o suporte dado para que eu pudesse chegar até onde queria. Aos meus irmãos, Rafael e Lígia, meus grandes amigos. À Nazaré que cuida e dá muito carinho para minha filha. À minha filha Eva e seu amor incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Alexandre Fonseca, que me ajudou tanto em momentos profissionais quanto pessoais. Ao CNPQ, pelo apoio financeiro dado ao projeto.

A todos os integrantes do Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica, Prof. Ana Cristi, Camila, Taynara, Pamela, Fabiana, Jorge, Juliana, Catarina, Luana e Jéssica. Agradeço a Vitória pelas análises com o titulador automático.

A todos os membros do "Zoológico" e nosso famigerado "Papado", Igor Melo, Gabriel Aleixo, Lucas Camacho, Beto, Tom, Jack e Luciano Miranda.

## Resumo

No presente trabalho, o sinal RGB de imagens digitais foi utilizado para construção de um titulador automático capaz de realizar um número variado de titulações. O equipamento construído pode ser uma alternativa a outros procedimentos devido à sua precisão e capacidade de realizar várias análises diferentes com o mesmo instrumento de detecção do ponto final. Para isso, como um primeiro passo, imagens digitais de 5 titulações foram gravadas por uma câmera *webcam* comum em ensaios com amostras reais feitos utilizando uma bomba-seringa de elevada precisão controlada por um computador. Curvas de titulação foram construídas com seu sinal RGB e analisadas por meio de várias transformações matemáticas (primeiras, segundas derivadas e suas combinações) para gerar algoritmos de detecção automática do ponto final. Estes algoritmos foram testados através da medição do erro de titulação de soluções padrão. As titulações analisadas foram as determinações de ácido acético em vinagres com NaOH, dureza de água mineral com EDTA, cloretos em águas de coco com Nitrato de Prata, ácido ascórbico em comprimidos de vitamina C com iodo e açúcares redutores em amostras de vinhos e cervejas com tiosulfato de sódio. Para os procedimentos considerados, de neutralização, complexação, precipitação, oxi-redução e açúcares redutores foram obtidos, respectivamente, 0,10%, 1,16%, 0% , 0% e -0,67% de erro relativo à procedimentos clássicos de titulação. Os testes para obtenção dos algoritmos foram comparados aos métodos clássicos e verificou-se que não há diferenças significativas em um intervalo de confiança de 95% e o sinal RGB é suficientemente exato para determinar o ponto final das titulações consideradas. Esta configuração, aliada à natureza multivariada do sinal RGB, traz uma poderosa e barata forma de análise quantitativa.

**Palavras-Chave:** titulação automática; RGB; detecção digital; açúcares redutores; seringa microvolumétrica; neutralização; complexação; precipitação.

## Abstract

In this assay, the RGB signal of digital images is used to craft a versatile automatic titrator. In order to achieve this, digital images of 5 titrations of real samples were recorded by a common webcam. The titrations were conducted using a syringe-pump controlled by a personal computer. Titration curves are drawn with RGB signal and analysed by some mathematical transformations (first, second derivatives and combinations of it) to generate algorithms for automatic detection of titration end-point. This are evaluated by determining the titration errors of standard solutions. The titrations studied were the determination of acetic acid in vinegars with NaOH, mineral water hardness with EDTA, chlorides in coconut water with silver nitrate, ascorbic acid in vitamin C tablets with iodide and reducing sugars in wines and beer samples with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . To the procedures involved, neutralization, complexation, precipitation, redox and reducing sugars were obtained, 0,10%, 1,16%, 0%, 0% e 0,67% of errors, respectively. Those tests were compared to classical methods and no significant differences were found in a 95% confidence level. The methodology developed will be applied to a smartphone and every step of the method will be conducted by Bluetooth communication. This configuration, allied to the multivariate nature of the RGB signal, brings a powerful and unexpensive way of quantitative analysis.

**Keywords:** automatic titration; RGB; digital detection; reducing sugars; syringe pump; neutralization; complexation; precipitation.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução e Objetivos</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>4</b>
2.1	Titulações Volumétricas . . . . .	4
2.1.1	Titulação de Neutralização: ácido acético e hidróxido de sódio . . . . .	7
2.1.2	Titulação de Complexação: Dureza da água . . . . .	8
2.1.3	Titulação de Precipitação: determinação de cloretos . . . . .	8
2.1.4	Titulação de Oxi-redução: determinação de ácido ascórbico . . . . .	9
2.2	Titulações Automáticas . . . . .	10
2.3	Imagens Digitais . . . . .	12
2.4	Titulação de Açúcares Redutores . . . . .	14
<b>3</b>	<b>Material e Métodos</b>	<b>18</b>
3.1	Desenvolvimento do Titulador Automático . . . . .	18
3.2	Programa em C# . . . . .	20
3.3	Reagentes e Soluções . . . . .	24
3.3.1	Titulação de Neutralização . . . . .	24
3.3.2	Titulação de Complexação . . . . .	24
3.3.3	Titulação de Precipitação . . . . .	24
3.3.4	Titulação de Oxi-redução . . . . .	25
3.3.5	Titulação de açúcares redutores . . . . .	25
3.4	Avaliação dos Algoritmos propostos para detecção dos pontos finais . . . . .	26
3.4.1	Neutralização: Amostras de Vinagre . . . . .	26
3.4.2	Complexação: Amostras de água mineral . . . . .	27
3.4.3	Precipitação: Amostras de Água de coco . . . . .	28
3.4.4	Oxi-redução: Amostras de Vitamina C . . . . .	29
3.4.5	Açúcares Redutores: Amostras de vinho, cerveja e xarope de glicose . . . . .	29
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>31</b>
4.1	Procedimento de Titulação Preliminar . . . . .	31
4.2	Estudos de Avaliação dos Algoritmos . . . . .	33
4.2.1	Titulação de Neutralização . . . . .	33
4.2.2	Titulação de Complexação . . . . .	37
4.2.3	Titulação de Precipitação . . . . .	42
4.2.4	Titulação de Oxi-redução . . . . .	46
4.2.5	Titulação de açúcares redutores . . . . .	50
<b>5</b>	<b>Conclusões</b>	<b>70</b>

## Lista de Tabelas

1	Parâmetros da câmara <i>webcam</i> . . . . .	20
2	Amostras de vinagre comerciais. . . . .	27
3	Amostras de água mineral. . . . .	28
4	Amostras de água de coco. . . . .	28
5	Amostras de vinho, cerveja e xarope. . . . .	30
6	Comparação entre titulação preliminar e procedimento comum. Valores de precisão representados pelo desvio-padrão da concentração das amostras. . . . .	31
7	Algoritmos de titulação preliminar . . . . .	32
8	Erros da titulação preliminar . . . . .	32
9	Resultados das análises de titulação clássica de amostras de vinagre. . . . .	34
10	Resultado das análises de neutralização de vinagre determinado por 6 algoritmos. Valores de concentração (C) em %v/v. . . . .	34
11	Resultados das análises de titulação da amostra de biftalato de potássio 0,10 mol/L. . . . .	35
12	Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de 1º derivada de R. . . . .	36
13	Resultados das análises de titulação clássica de amostras de água mineral. . . . .	38
14	Resultado das análises de dureza de água mineral determinado por 7 algoritmos. Valores em de concentração(C) em mmol/L. . . . .	39
15	Resultados da titulação com detecção automática da solução de $Mg^{2+}$ 1000 mg/L com EDTA 0,001 mol/L. . . . .	40
16	Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de (R - G) das amostras de água mineral. $GL=2$ , $t$ -crítico=4,3. . . . .	41
17	Resultados das análises de titulação clássica de amostras de água de coco. . . . .	42
18	Resultado das análises do teor de Cloretos em água de coco determinado por 4 algoritmos. Valores em mol/L. . . . .	43
19	Resultados das análises de titulação da amostra de NaCl 0,049 mol/L. . . . .	45
20	Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de $\frac{dG}{dV}$ das amostras de água de coco. $GL=2$ , $t$ -crítico = 4,3. . . . .	45
21	Resultado das análises de padronização da solução de iodo utilizada. Valores em mol/L. . . . .	47
22	Resultados das análises de titulação clássica de amostras de vitamina C. . . . .	48
23	Resultado das análises de ácido ascórbico nos comprimidos de Vitamina C para 6 algoritmos. Valores em mol/L. . . . .	48
24	Resultados das análises de titulação da amostra de ácido ascórbico 0,05 mol/L. . . . .	49
25	Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de $\frac{dR}{dV}$ das amostras de vitamina C. $GL=2$ , $t$ -crítico=4,3. . . . .	49
26	Resultado das análises para cálculo da constante K. Valores em g/L. . . . .	57
27	Resultado das análises de determinação das amostras de cervejas clara, xarope de glicose e soro de glicose. Valores em g/L. . . . .	61
28	Resultados das análises de titulação clássica de amostras de xarope, cerveja e soro. . . . .	62
29	Resultados das análises de titulação de uma solução de glicose 10 g/L. . . . .	62
30	Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de $\frac{dR}{dV}$ das amostras de soluções incolores. $GL=2$ ; $t$ -crítico=4,3. . . . .	64
31	Resultados das análises de titulação clássica de amostras de cervejas escuras e vinhos. . . . .	68

32	Resultado das análises de determinação das amostras de cervejas escuras e vinhos. Valores em g/L. . . . .	68
33	Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de $\frac{dR}{dV}$ das amostras de soluções coloridas. . . . .	69

## Lista de Figuras

1	Uma curva sigmoideal da titulação de um ácido forte com NaOH. . . . .	5
2	Curva de titulação de ácido diprótico com NaOH. . . . .	6
3	Transformação da fenoftaleína em uma reação ácido-base. . . . .	7
4	Diferença entre dissacarídeos redutores e não redutores. . . . .	15
5	Esquema do titulador automático. . . . .	18
6	Imagem dentro do titulador. Vista por cima. . . . .	19
7	Titulador montado. (A) Caixa de ambiente de luz controlada com b�quer e c�mera <i>webcam</i> . (B) Bomba-seringa. . . . .	20
8	Tela de Interface do Usu�rio do programa em C#. 1. V�deo da titula�o que ocorre. 2. Ajustes de Par�metros. 3. Ajustes da c�mera. 4. Dados de entrada da titula�o. 5. Inicia procedimento de limpeza da seringa. 6. Inicia titula�o preliminar. 7. Inicia procedimento comum de titula�o. 8. Prepara a seringa para os outros procedimentos. 9. Para qualquer procedimento sendo executado. 10. Visualiza�o do sinal RGB coletado. 11. Requisita o status da bomba. 12. Gr�fico do sinal RGB exibido em tempo real. 13. Dados de sa�da (volume e concentra�o). 14. �ltima fotografia obtida. 15. Log do programa. . . . .	22
9	Intervalo de 5 adi�es de NaOH na titula�o de uma amostra de vinagre. . . . .	33
10	Curva de titula�o de neutraliza�o. . . . .	34
11	Intervalo de 5 adi�es de NaOH na titula�o de biftalato de pot�ssio. . . . .	36
12	Sinal de B e sua 1� derivada em rela�o ao volume de NaOH utilizado. . . . .	37
13	Intervalo de 5 adi�es de EDTA na titula�o de dureza de �gua mineral. . . . .	37
14	Curva de titula�o de complexa�o. . . . .	38
15	Intervalo de 5 adi�es de EDTA na titula�o autom�tica de $Mg^{2+}$ 1000 ppm. . . . .	39
16	Sinal das 1� derivadas de R,G e B de uma titula�o de complexa�o com 20 $\mu$ L de incremento de volume. . . . .	40
17	Sinal R, G e a curva (R - G) de uma titula�o com detec�o autom�tica. . . . .	41
18	Intervalo de 5 adi�es de $AgNO_3$ na titula�o autom�tica para determina�es de cloretos. . . . .	42
19	Curva RGB de uma titula�o de precipita�o. . . . .	43
20	Curva e 1� derivada de B obtida da titula�o de uma das amostras de �gua de coco com $AgNO_3$ 0,049 mol/L . . . . .	44
21	Intervalo de 5 adi�es de $AgNO_3$ na titula�o com algoritmo implementado para determina�es de cloretos. . . . .	45
22	Curva obtida da titula�o de 1 mL de NaCl 0,049 mol/L com $AgNO_3$ 0,049 mol/L . . . . .	45
23	Intervalo de 5 adi�es de $I_2$ na titula�o autom�tica para determina�es de vitamina C. . . . .	46
24	Intervalo de 5 adi�es de $I_2$ na titula�o autom�tica de padroniza�o do iodo. . . . .	46
25	Sinal RGB de uma titula�o de oxi-redu�o de Vitamina C com iodo 0,03 mol/L. . . . .	47
26	Derivadas de R, G e B em uma titula�o de vitamina C com iodo 0,03 mol/L. . . . .	48
27	Sinal R e sua primeira derivada na titula�o autom�tica de oxi-redu�o para vitamina C. . . . .	50
28	Intervalo de 5 adi�es de $I_2$ na titula�o com algoritmo implementado para determina�es de �cido asc�rbico. . . . .	50
29	Sinal RGB de uma amostra de glicose na titula�o utilizando indicador amido. . . . .	52

30	Intervalo de 20 adições de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na titulação de uma amostra de glicose utilizando indicador amido. . . . .	53
31	Sinal das derivadas de R,G e B de uma amostra de glicose na titulação utilizando indicador amido. . . . .	54
32	Intervalo de 20 adições de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na titulação de uma amostra de glicose utilizando indicador amidoglicolato de sódio. . . . .	55
33	Derivada de B de uma amostra de glicose na titulação utilizando indicador amidoglicolato de sódio. . . . .	56
34	Intervalo de 6 adições de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na titulação de uma amostra de cerveja clara (a), xarope de glicose (b) e soro de glicose (c). . . . .	58
35	Sinal RGB de uma amostra de cerveja clara na titulação de açúcares redutores com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,055 mol/L. . . . .	59
36	Sinal RGB de uma amostra de xarope de glicose na titulação de açúcares redutores com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,055 mol/L. . . . .	59
37	Sinal RGB de uma amostra de soro de glicose na titulação de açúcares redutores com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,055 mol/L. . . . .	60
38	Intervalo de 6 adições de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na titulação do branco. . . . .	60
39	Sinal RGB do branco na titulação de açúcares redutores com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,055 mol/L. . . . .	61
40	Sinal da derivada de R para a amostra de cerveja Heineken. . . . .	63
41	Sinal da derivada de R para a amostra de xarope de glicose. . . . .	63
42	Sinal da derivada de R para a amostra de soro de glicose. . . . .	64
43	Intervalo de 6 adições de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na titulação de cerveja Xingu. . . . .	65
44	Intervalo de 10 adições de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na titulação de vinho tinto Assemblage. . . . .	65
45	Intervalo de 10 adições de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na titulação de Vinho tinto Dom Bosco. . . . .	65
46	Sinal RGB da amostra de vinho Dom Bosco na titulação com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,055 mol/L. . . . .	66
47	Sinal RGB da amostra de vinho Assemblage na titulação com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,055 mol/L. . . . .	67
48	Sinal RGB da amostra de cerveja Xingu (Escura) na titulação com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,055 mol/L. . . . .	68

# 1 Introdução e Objetivos

Métodos volumétricos de análise, também chamados de titulações volumétricas, são amplamente utilizados em química analítica para a determinação de um vasto número de substâncias. Tais métodos são utilizadas em laboratórios, de escolas e faculdades a centros de pesquisa e de controle de qualidade. Entre suas vantagens estão a elevada precisão (da ordem de 0,1 %), baixo custo e facilidade de utilização. Em muitas áreas, os procedimentos volumétricos são insubstituíveis [1] como por exemplo análises de alcalinidade e dureza de águas.

De maneira geral, estes métodos se baseiam em uma reação completa e estequiométrica de um reagente de concentração exatamente conhecida (solução titulante) com a substância de interesse (analito) contida em uma dada solução (da amostra) e para a qual se deseja determinar a sua concentração (solução titulada). Em sua forma clássica, o ponto final da titulação é usualmente determinado pela mudança de cor de um indicador, facilmente identificada pelo operador, que interrompe a adição do titulante ao titulado e determina a concentração da substância na amostra a partir de relações estequiométricas e volumétricas [2].

Existem, no entanto, algumas desvantagens no uso dos métodos volumétricos clássicos. A sensibilidade e seletividade destes métodos costuma ser inferior à de métodos instrumentais. Além disso, titulações podem ser trabalhosas quando há um número considerável de análises a serem executadas. Nestes casos, os métodos instrumentais são mais rápidos e baratos [1]. No caso de titulações com indicadores colorimétricos, há ainda a necessidade de um operador capacitado e qualificado para tal. Capacitado no sentido de poder visualizar corretamente o ponto de viragem do indicador. Uma porcentagem relativamente alta da população (5%) é daltônica, possuindo dificuldades para distinguir certas cores [3]. O analista também deve ser qualificado, pois o mesmo deve conhecer a mudança de cor de forma que não introduza erros sistemáticos à titulação. Neste quesito, a subjetividade com que é identificada o ponto final também prejudica a veracidade das análises volumétricas em um ambiente industrial, por exemplo. Não é incomum que sejam solicitadas novas análises em caso de desvios e a subjetividade acrescenta mais um fator de incerteza dos inúmeros envolvidos no controle de um processo químico.

O método de titulação é um procedimento automatizável e, em conjunto com os fatores descritos acima, esforços foram empreendidos e bem sucedidos na tarefa. Por ser um procedimento manual, um número grande de determinações a serem executadas acaba prejudicando a precisão e exatidão das análises, principalmente em titulações com indicadores colorimétricos. Além disso, uma quantidade relativamente grande de reagentes e amostras é consumida. A detecção do ponto final por instrumentos em conjunto com ferramentas de programação podem ser utilizadas para determinar de forma objetiva o ponto final de titulação e eliminar o problema de subjetividade da análise. Tituladores automáticos com diversas formas de detecção [4] são conhecidos e relatados na literatura, existindo vários modelos comerciais.

O avanço da tecnologia de aquisição de imagens digitais tornou disponível câmeras de vídeo baseadas em dispositivos de carga acoplada (CCD, do inglês *charged-coupled device*) [5] e em óxidos de metais semicondutores (CMOS, do inglês *complementary metal-oxide semiconductor*), capazes de capturar imagens digitais com até 24 bits (16,7 milhões de cores). Várias unidades de medida são utilizadas para interpretar as cores digitais, a mais famosa refere-se ao sistema

RGB (vermelho, verde e azul), onde cada canal de 8 bits representa uma das cores básicas (Vermelho, azul e verde). Devido à natureza multivariada deste sinal, uma quantidade considerável de informações podem ser extraídas de suas imagens, tornando-o muito atraente do ponto de vista da Química Analítica. O sinal RGB já foi utilizado em conjunto com ferramentas quimiométricas para realizar discriminações de alimentos [6], realizar análises de luminescência [7], interpretação de imagens atmosféricas [8], marcação de células clonadas [9] e outros.

Grupos de pesquisa demonstraram recentemente o potencial deste tipo de detecção em conjunto com a análise volumétrica [10] [11]. Ao mesmo tempo em que se obtém objetividade do ponto final, estes instrumentos são bem mais baratos quando comparados à um eletrodo para medidas potenciométricas, por exemplo, que necessitam de manutenção e calibração periódica [12] e, além disso, uma única câmera poderia ser o detector de um número variado de titulações, tornando as imagens digitais especialmente adequadas para a padronização de reagentes por exemplo. A detecção por imagens, aliada à utilização de indicadores cromogênicos específicos, pode, inclusive, ser uma solução aos problemas de seletividade e sensibilidade dos métodos clássicos de titulação. Pablos e colaboradores, por exemplo, desenvolveram um agente cromogênico capaz de detectar especificamente TNT em vapores em concentrações em uma faixa micromolar [13].

Além disso, classicamente, titulações com indicadores visuais consomem uma quantidade considerável de reagentes. Existem seringas microvolumétricas capazes de realizar adições de titulante na faixa de  $\mu\text{L}$  e isto possibilita a utilização de pequenos volumes de amostra e, consequentemente, um volume menor de titulante sem diminuir a precisão das análises. Esta abordagem contribui para os conceitos de Química Verde [14], afinal um grande número de titulações são necessárias em um laboratório de pesquisas, principalmente na padronização dos reagentes utilizados.

Devido à estes fatores, importantes de um ponto de vista prático, procurou-se uma aplicação onde as vantagens da titulação RGB pudessem realmente oferecer facilidade de operação e um aumento na exatidão e precisão do método. A determinação de açúcares redutores é importante para testar a qualidade de produtos alimentícios como bebidas e xaropes [15]. Existe uma grande variedade de métodos que estimam ou determinam estes teores [16], entre eles, sua determinação redutométrica por meio de uma titulação, inicialmente desenvolvida por Somogy. De forma geral, o procedimento consiste em reagir uma quantidade conhecida de íons cobre com os analitos em um meio fortemente básico e, em seguida, determinar a quantidade restante destes íons em uma titulação iodométrica. Como o método exige o controle adequado das condições reacionais [17] e analisa uma quantidade variada de amostras contendo açúcares redutores, um analista experiente é necessário para a correta condução dos procedimentos e muitas variações do procedimento foram surgindo devido a esta dificuldade de reprodutibilidade. Além disso, os métodos envolvem a titulação de um branco, para determinar a quantidade exata de íons cobre presentes na solução e o resultado é dado pela diferença entre as duas titulações tornando difícil precisar o resultado na hora de avaliar amostras intensamente coloridas [17] devido às diferenças existentes entre a coloração do branco (incolor) e da amostra (colorida). Neste sentido, a titulação RGB pode eliminar a subjetividade com que se determina estes pontos finais ao mesmo tempo em que padroniza as metodologia de análise existentes.

Com base nestas considerações, é possível estabelecer como objetivo construir e testar um titulador automático robusto capaz de realizar um número variado de titulações. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

1. Estabelecer um arranjo fluídico único e robusto para a realização das principais medidas volumétricas clássicas (ácido-base, precipitação, oxi-redução e complexação).
2. Testar e validar uma metodologia para determinação de açúcares redutores em amostras comerciais de vinho, cerveja e xaropes.
3. Minimizar significativamente as quantidades de reagentes necessários aos procedimentos assim como os volumes de resíduos gerados.
4. Atingir resultados estatisticamente semelhantes ou superiores àqueles obtidos por meio de metodologia clássica no que se refere à precisão, exatidão e sensibilidade.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Titulações Volumétricas

Titulação é um processo de análise química onde uma quantidade de algum constituinte de uma amostra é determinada adicionando à mesma, uma quantidade exata de outra substância com os quais os constituintes desejados reagem em uma proporção finita e conhecida. A análise geralmente é conduzida por adição gradual de uma solução padrão de titulante à amostra de laboratório. A adição termina quando o ponto final é atingido. Idealmente, este ponto é exatamente o ponto de equivalência química da titulação [2].

No ponto de equivalência, uma quantidade exatamente equivalente de titulante foi adicionada à amostra. Não é possível determinar este ponto experimentalmente, sua posição pode ser apenas estimada pela observação de algumas variações físicas associadas com a condição de equivalência. O ponto experimental em que a reação se completa é marcado por essa variação e chamado de ponto final da titulação. Este sinal pode ser a mudança de cor de algum indicador ou uma mudança em alguma propriedade elétrica medida durante a titulação. A diferença entre o ponto final e o ponto de equivalência é chamada de erro de titulação, mantido tão pequeno quanto possível pela escolha adequada de um sinal de ponto final e um meio para detectá-lo. [18]

Para uso em uma análise volumétrica, uma reação deve satisfazer os seguintes critérios:

1. Deve haver uma reação simples que pode ser expressa por uma equação química; a substância a ser determinada deve reagir completamente em proporções estequiométricas.
2. A reação deve ser relativamente rápida.
3. Deve haver uma alteração em alguma propriedade física ou química da solução no ponto de equivalência ou em suas proximidades.
4. Um indicador deve estar disponível, e por uma mudança em suas propriedades físicas (formação de cor ou precipitado), defina claramente o ponto final da reação.

A detecção do ponto final também pode ser feita medindo-se: o potencial entre um eletrodo indicador e outro de referência (titulação potenciométrica); a mudança na condutividade elétrica da solução (titulação condutométrica); a corrente que passa por uma célula de titulação entre um eletrodo indicador e um eletrodo de referência não-polarizado em uma determinada força eletromotriz aplicada (titulação amperométrica); ou a mudança na absorvância da solução (titulação espectrofotométrica).

O gráfico da resposta do sinal *versus* a quantidade de titulante adicionado é chamado de curva de titulação. Este sinal deve ser algum parâmetro com grande variação na região do ponto de equivalência, como o pH no caso de uma titulação potenciométrica de um ácido com uma base ou o valor da variável R (vermelho) na mesma titulação com detecção digital de cor e com auxílio de indicador. Nestes casos, as curvas de titulação assumem um formato sigmoidal como o da Figura 1.

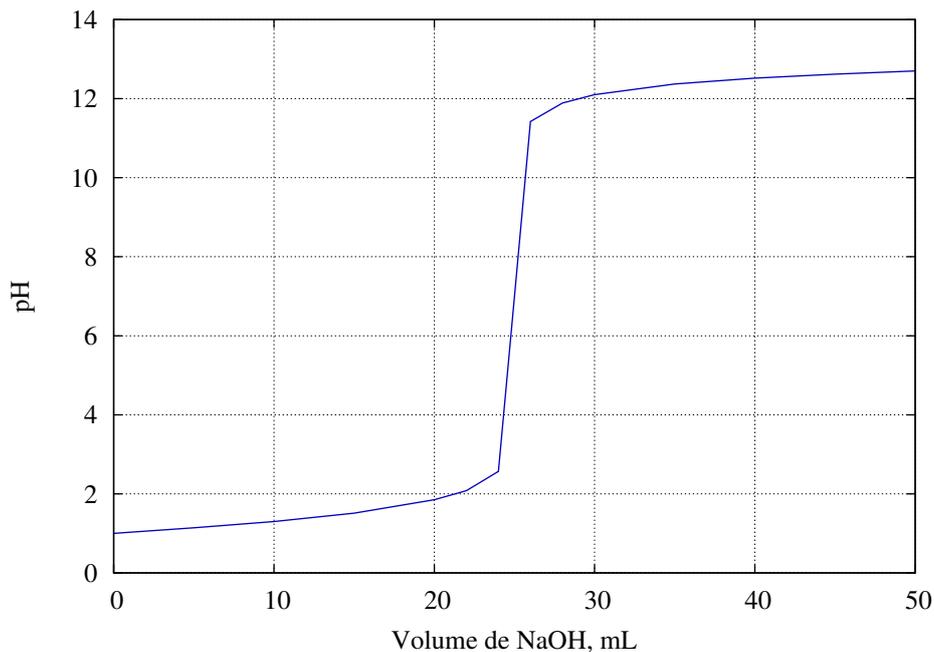


Figura 1: Uma curva sigmoide da titulação de um ácido forte com NaOH.

Em titulações como a da Figura 1, o ponto final pode ser representado como o ponto onde a inclinação é máxima (primeira derivada do valor de pH atinge seu maior valor) e este é considerado um ponto de inflexão (segunda derivada atinge valor zero). Estas propriedades são a base para a detecção automática do ponto final de titulações potenciométricas.

Isto é válido para titulações que envolvem estequiometria de reagentes 1:1, sendo verdade para boa parte das titulações ácido-base e complexométricas. Para estequiometrias diferentes, a curva não é simétrica próximo ao ponto de equivalência e este não se encontra no centro da região abrupta da curva e ele não é um ponto de inflexão exemplificado pela Figura 2. Na prática, as condições são escolhidas de modo que as curvas sejam abruptas o suficiente para que este ponto seja uma boa estimativa do ponto de equivalência independentemente da estequiometria. [19]

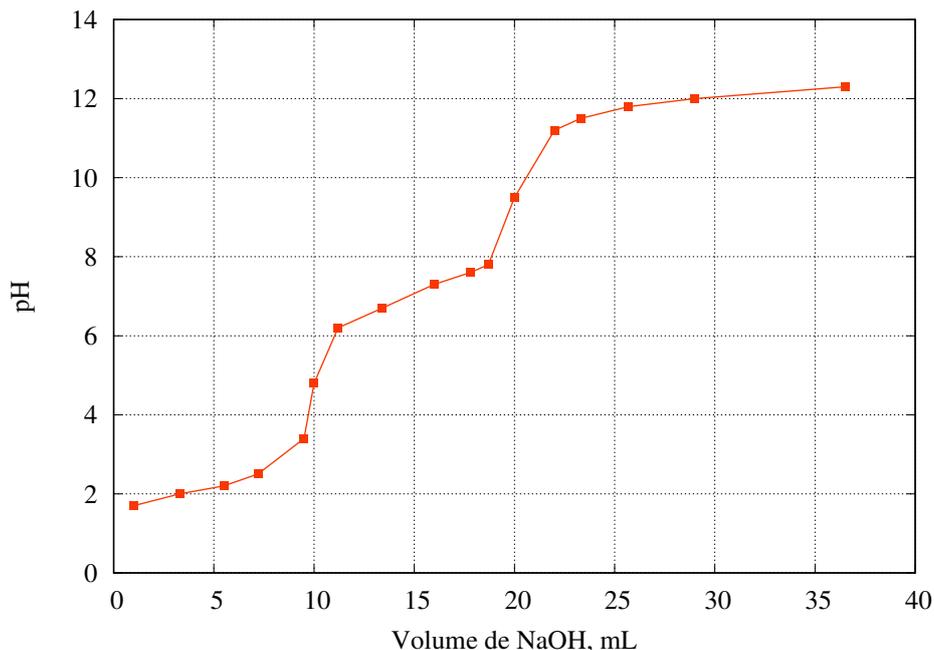


Figura 2: Curva de titulação de ácido diprótico com NaOH.

As reações empregadas em análises volumétricas pertencem a quatro classes principais:

1. Reações de neutralização: São largamente utilizadas para determinar quantidades de ácidos e bases. Também podem ser utilizadas para monitorar o progresso de reações que produzem ou consomem íons hidrogênio. Estas reações incluem a titulação de bases livres (ou aquelas formadas de sais de ácidos fracos por hidrólise) com um ácido padrão e a titulação de ácidos livres (ou aqueles formados pela hidrólise de sais de bases fracas) com uma solução de base padrão. Nesta categoria também se incluem as titulações em solventes não-aquosos. [1]
2. Reações com formação de complexos: São utilizadas para a determinação de cátions. Nestas reações, um íon metálico reage com um ligante adequado para formar um complexo e o ponto de equivalência é determinado por um indicador ou método instrumental apropriado. No caso de titulações volumétricas, o ácido etilenodiaminotetracético, comumente como sal dissódico de EDTA, é um importante reagente para este tipo de titulação. [18]
3. Reações de precipitação: Baseiam-se em reações que produzem compostos iônicos de solubilidade limitada. Embora a taxa lenta com que os precipitados sejam formados limite o número de agentes precipitantes que podem ser utilizados, um único agente precipitante, o nitrato de prata, pode ser utilizado para realizar a determinação de halogenios, mercaptanas, ácidos graxos e muitos outros ânions inorgânicos bivalentes. [1]
4. Reações de oxi-redução: Estão inclusas todas as reações que envolvem mudanças no número de oxidação ou transferência de elétrons entre os reagentes. As soluções padrão utilizadas são agentes redutores ou oxidantes. [1]

As reações utilizadas são descritas a seguir para que seja verificado como ocorre as transições de cores nas titulações estudadas e para entender algumas peculiaridades e problemas que surgem ao realizar estas determinações.

### 2.1.1 Titulação de Neutralização: ácido acético e hidróxido de sódio

O objetivo de titular uma solução ácida com uma solução alcalina padrão é determinar a quantidade de ácido que é exatamente equivalente à quantidade de base presente. Este é o ponto de equivalência e a solução remanescente contém o sal correspondente a reação realizada. Se ambos forem eletrólitos fortes, a solução será neutra e possuirá um pH de 7. Se um destes for um eletrólito fraco, o sal será hidrolisado até certo ponto e a solução no ponto de equivalência será levemente ácida ou alcalina. Para qualquer titulação, o ponto final correto será caracterizado por um valor finito da concentração de íons hidrogênio da solução, seu valor dependendo da natureza do ácido e da base presente e sua concentração em solução.

Um grande número de substâncias, chamados de indicadores ácido-base, mudam de coloração de acordo com a concentração de íons hidrogênio da solução. Estes compostos realizam esta mudança em determinada faixa de pH. A posição deste intervalo varia imensamente com os indicadores utilizados.

Acredita-se que as mudanças de coloração dos indicadores são devido à mudanças estruturais que inclui a produção de compostos de ressonância. O indicador de fenoftaleína, utilizado nas análises de neutralização passa pelas transformações da Figura 3. Ao ser tratada com base diluída o anel de lactona (1) se abre para formar o trifenilcarbinol (2) que perde água e se transforma em um composto resonante de cor vermelha (3). Em excesso de hidroxila, a cor vermelha desaparece pela formação do composto 4. [1]

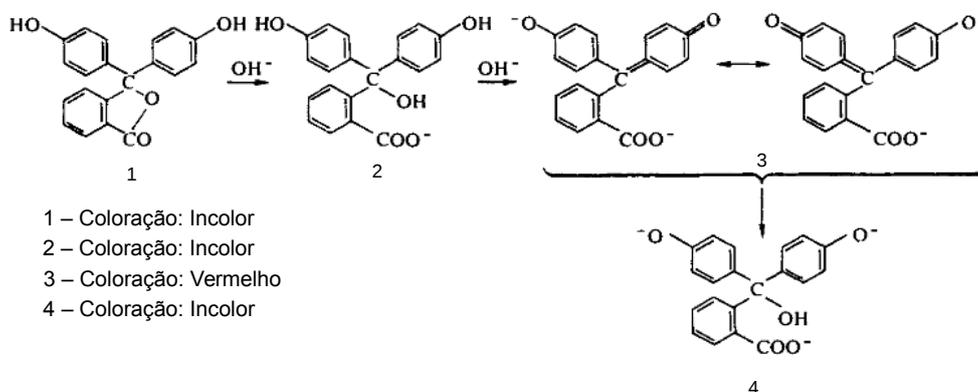
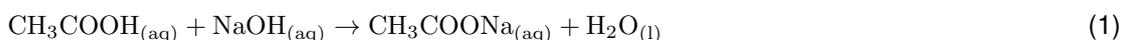


Figura 3: Transformação da fenoftaleína em uma reação ácido-base.

A reação considerada, de ácido acético e hidróxido de sódio, se trata de uma reação de um ácido fraco com uma base forte e por isso, o pH no ponto de equivalência é em torno de 8,7. Esta reação pode ser representada pela seguinte equação química:



Esta reação é de fácil execução e visualização do ponto final pois não há presença de precipitado e suas soluções são incolores facilitando a titulação. Cuidados devem ser tomados com

o pH das soluções utilizadas pois as reações de neutralização com estes indicadores são extremamente dependentes do valor de pH, como explicado acima.

### 2.1.2 Titulação de Complexação: Dureza da água

A determinação de dureza da água é realizada através da titulação com EDTA na presença do indicador negro de eriocromo T. Os íons de cálcio e magnésio presentes na amostra de água formam complexos com o indicador. Estes complexos, são menos estáveis do que aqueles formados entre os metais e o EDTA. Ao titular a amostra com EDTA, íons livres destes metais são progressivamente complexados pelo EDTA até que os metais são deslocados do complexo M-In para deixar o indicador livre como na reação abaixo:



A mudança de cor do indicador é dependente da concentração de íons hidrogênio em solução e na faixa de pH de 7 a 11, em que o indicador apresenta uma coloração azul bem forte, muitos metais formam complexos vermelhos de coloração extremamente sensível, amostras com concentrações molares de  $10^{-6}$  de magnésio exibem uma distinta coloração vermelha com o indicador.

O indicador negro de eriocromo T trata-se do 1-(1-hidróxi-2-naphtylazo)-6-nitro-2-naftol-4-sulfonato de sódio e doa seu próton bem antes da faixa de pH 7 a 12, sendo de grande interesse para ser utilizado como indicador de íons metálicos. Nesta faixa, a adição de sais metálicos produz uma mudança de coloração do azul para o vermelho como na reação:



Esta mudança de coloração pode ser observada para os íons de Mg, Mn, Zn, Cd, Hg, Pb, Cu, Al, Fe, Ti, Co, Ni e Pt. Para manter o pH (10) constante, uma solução-tampão é adicionada. Quando íons Cálcio são titulados com EDTA um complexo de cálcio relativamente estável é formado e a transição do vermelho para o puro azul não acontece. Com os íons de magnésio um complexo menos estável é formado e, conseqüentemente, em uma titulação contendo íons de cálcio e magnésio na presença deste indicador, o EDTA reage primeiro com os íons de cálcio, então com os íons de magnésio e finalmente com o complexo M-In. Como o complexo magnésio-indicador é vermelho e o indicador livre é azul, a cor da solução muda de vermelho para azul no ponto final.

Se íons de magnésio não estiverem presentes em solução, estes devem ser adicionados pois são requeridos para a mudança de coloração. Um procedimento comum é adicionar uma pequena quantidade de cloreto de magnésio para a solução de EDTA antes de ser padronizada. [1]

### 2.1.3 Titulação de Precipitação: determinação de cloretos

Para determinar cloretos, uma solução neutra de íons cloreto com nitrato de prata, uma pequena quantidade de solução de cromato de potássio é adicionada para servir como indicador. No ponto final, os íons cromato se combinam com os íons prata para formar o cromato de prata,

um composto vermelho quase insolúvel. Esta reação deve ser conduzida em uma solução neutra ou levemente alcalina, na faixa de pH entre 6,5 - 9. Em solução ácida, a seguinte reação ocorre:



O  $\text{HCrO}_4^-$  é um ácido fraco, conseqüentemente a concentração de íons cromato é reduzida e o produto de solubilidade do cromato de prata pode não ser excedido. Em soluções muito alcalinas, hidróxido de prata pode ser precipitado.

Em pH neutro, conforme o nitrato de prata vai sendo adicionado, um precipitado de cloreto de prata é formado conforme a reação abaixo:



Quando todos os íons cloreto tiverem reagido, o nitrato de prata em excesso adicionado irá reagir com os íons cromato para formar o precipitado de cromato de prata.

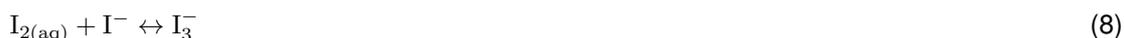


A concentração de íons cromato em solução é muito importante e deve ser considerada na preparação do procedimento. Concentrações elevadas são marcadas por um distinto laranja na solução que torna difícil detectar o aparecimento da coloração do cromato de prata.

O produto de solubilidade do cromato de prata aumenta com a elevação de temperatura então estas titulações devem ser conduzidas em temperatura ambiente. [18]

#### 2.1.4 Titulação de Oxi-redução: determinação de ácido ascórbico

A determinação de ácido ascórbico é realizada através de uma titulação com uma solução contendo iodo. O potencial de redução do sistema reversível dado pela equação 7 é 0,5345 V. Esta equação refere-se a uma solução saturada na presença de iodo sólido. Esta meia-reação irá ocorrer quando a concentração de íons iodeto for relativamente baixa por exemplo, em uma titulação do iodo com um agente oxidante forte como o permanganato de potássio. No começo, quando há um excesso de íons iodeto, o íon tri-iodeto é formado:

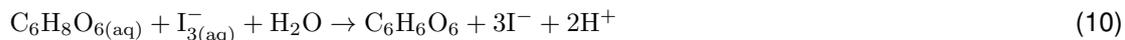


A reação é então melhor escrita como:



Iodo ou o íon tri-iodeto é um agente oxidante muito mais fraco do que permanganato de potássio, dicromato de potássio ou sulfato de cério (IV). Na maioria das titulações diretas, uma solução de iodo e iodeto de potássio é empregada.

Na titulação de oxidação-redução do ácido ascórbico, o íon tri-iodeto atua como agente oxidante do ácido através da seguinte reação:



Desde que a vitamina C permaneça em solução, o íon tri-iodeto reage rapidamente e é convertido para iodeto. Entretanto, quando toda a vitamina C do complexo estiver oxidada, iodeto e o íon tri-iodeto estarão presentes. Estes reagem com o amido para formar um complexo azul-negro, visível a concentrações muito pequenas de iodo. A sensibilidade da cor é tal que a coloração azul é visível quando a concentração de iodo é de  $2 \times 10^{-5}$  M e a concentração de iodeto é maior do que  $4 \times 10^{-4}$  M a 20 °C. A sensibilidade de cores decai com o aumento da temperatura da solução. A 50 °C, a sensibilidade é cerca de dez vezes menor do que a 25 °C. A sensibilidade também diminui com a adição de solventes como o etanol, nenhuma cor é obtida em soluções contendo mais do que 50 % de etanol. O amido não pode ser utilizado em um meio fortemente ácido devido à hidrólise do amido.

Amidos podem ser separados em dois componentes majoritários, amilose e amilopectina, existentes em diferentes proporções em várias plantas. Amilose, um composto de cadeia não ramificada, abundante no amido da batata, dá uma cor azul com o iodo e a sua cadeia assume uma forma de espiral. Amilopectina com sua estrutura de cadeia ramificada, forma um composto púrpura vermelho, provavelmente por adsorção.

A grande vantagem do amido é seu custo e ele possui uma série de desvantagens: insolubilidade em água fria; instabilidade das suspensões em água; o complexo formado com o iodo é insolúvel, o que impede sua adição no início da titulação (é recomendado que o amido seja adicionado apenas bem perto do ponto final); algumas vezes, um "deslocamento" do ponto final ocorre, marcado quando as soluções se encontram diluídas.

A maior parte das desvantagens deste indicador estão ausentes no amidoglicolato de sódio. Ele é prontamente solúvel em água quente e sua solução é estável por muitos meses. Ele não forma um complexo insolúvel com iodo e este indicador pode ser adicionado em qualquer estágio da reação. O ponto final dado pelo indicador é intenso e não há deslocamento do ponto final. [1]

## 2.2 Titulações Automáticas

Como titulações volumétricas são procedimentos que podem se tornar laboriosos, muitas tentativas foram realizadas para automatizar o procedimento. Desde a década de 1930 [20], várias publicações descreveram alguma forma de titulador automático, parcial ou total. No sentido de automatizar o processo de titulação, pode-se dividir o procedimento de duas formas:

1. Quanto à forma de adição de titulante: o advento de bombas de seringa e peristálticas permitiu realizar adições de titulante com maior precisão em todos os níveis, possibilidade de automação das etapas preliminares (adição de reagentes e descarte de resíduos), além de aumentar a frequência analítica. Um novo tipo de titulação também se tornou possível com as bombas automáticas e tecnologia de injeção em fluxo (FIA): as titulações em fluxo contínuo. [21]

2. Quanto à forma de detecção do ponto final de titulação: a detecção automática do ponto final é vantajosa no que diz respeito a eliminar erros sistemáticos oriundos da subjetividade com que se determina esse ponto em titulações colorimétricas. Detecções espectrofotométricas e potenciométricas são as principais formas de medição atualmente, embora a tecnologia de imagens digitais tenha demonstrado recentemente seu potencial [5]. Aliada à programação de computadores, algoritmos podem ser utilizados para cálculo automático do ponto final [22].

Na década de 1920, as indústrias necessitavam imensamente de controle de pH preciso em seus processos, especialmente no refino de cana-de-açúcar. Eletrodos de pH comerciais só ficaram disponíveis durante a década de 1930. Um dos primeiros equipamentos (e que pode ser considerado um titulador) foi desenvolvido e aplicado em uma refinaria de cana-de-açúcar em Porto Rico. Este equipamento utilizava um eletrodo de tungstênio-calomelano e dispensava carbonato de sódio sólido para controle (fazendo dele um titulador gravimétrico). Entretanto a falta de conhecimento na época a respeito das reações com o carbonato de sódio impediu sua implementação total. Não era entendido como o sinal deveria responder às adições de titulante. [20]

Nesta época, os eletrodos eram muito lentos para atingir o equilíbrio, muito complexos para uso em uma fábrica, muito vulneráveis a contaminações e havia muitas variações em sua calibração. Holven [23], em um estudo publicado em 1929, concluiu que até que houvessem eletrodos confiáveis, controles de pH ainda teriam que esperar.

No mesmo ano, dois químicos da Universidade de Nova York desenvolveram um titulador automático que fazia uso de uma fotocélula para detectar a mudança de cor de um indicador. Um relé era usado para acionar a bureta e quando ocorria a viragem do indicador, outro relé acionado pela fotocélula fechava a bureta no ponto final da titulação [20].

Em 1943, químicos trabalhando em uma companhia de combustíveis desenvolveram e automatizaram um titulador para análise de mercaptanas em gasolina. O dispositivo era desenhado para uso de um operador não-treinado e o ponto final da titulação era determinado medindo-se o potencial da célula. Após esse fato, uma gama de tituladores automáticos começaram a aparecer na literatura. Em 1948, cerca de nove tituladores potenciométricos tinham sido descritos. Um destes, utilizava uma seringa ligada a um motor para adicionar o titulante e sua velocidade podia ser variada para obter diferentes velocidades de titulação. [20]

A década de 1960 trouxe as titulações espectrofotométricas, onde uma célula de titulação podia ser colocada no lugar do compartimento de amostra e uma válvula solenóide controlava a abertura e fechamento da bureta. Dispositivos de gravação que calculavam primeiras, segundas e terceiras derivadas também ficaram disponíveis e começaram a ser utilizados para cálculo do ponto final. Durante esta década, Mullen descreve que várias publicações automatizavam e testavam métodos clássicos de titulações ácido-base ou complexométricas [24].

Com o advento dos microprocessadores e computadores, grande interesse começou a ser mostrado para converter as informações obtidas dos registradores para os computadores da época. Vários trabalhos foram publicados utilizando conversores analógico-digitais (A/D) para

filtrar e amplificar o sinal de tituladores da época. Os dados eram processados em computadores para gerar gráficos de erro, curvas de titulação e detecção automática do ponto final [25] [26]. Nas décadas de 1970 e 1980, trabalhos envolvendo análises em fluxo e titulação começaram a demonstrar o interesse crescente em criar uma forma de método com mínimo envolvimento do operador [27] [28] [29].

Em 1983, um grupo de pesquisadores utilizou um LED (diodo emissor de luz) vermelho e um fotoresistor para detectar o ponto final na determinação de dureza da água. Os resultados obtidos foram muito semelhantes aos realizados com titulações manuais. Apesar de ser utilizado para apenas uma determinação, LED de outras cores poderiam ser utilizados para outras determinações [30].

Com o procedimento de titulação praticamente todo automatizado, nas décadas de 1990 e 2000 muitas tentativas de otimização com variados graus de sucesso foram utilizadas. Os tituladores em fluxo da época sofriam de baixa precisão apesar da elevada frequência analítica e muitas tentativas foram realizadas para corrigir esses efeitos. Várias técnicas foram testadas para diminuir quantidade de reagentes, aumentar precisão e exatidão das medidas ou facilitar a condução de muitas titulações (redução de tempo e necessidade reduzida de habilidade técnica) [31] [22] [32] [33].

Estas novas características dos procedimentos de titulação possibilitaram que a metodologia seja aplicada para variadas finalidades no sentido de obter eficácia e eficiência ao se reduzir a quantidade de reagentes necessários ao mesmo tempo em que sejam obtidos ganhos de exatidão e precisão, além de reduzir o tempo de análise e eliminar a subjetividade com que se determina os pontos finais. Além disso, estas características são um passo a ser dado para miniaturizar o equipamento de titulação e realizar determinações *in situ*. O controle fino da adição de titulante é uma etapa crítica para que isto aconteça devido à relação existente entre a mesma e o volume de amostra. Só é possível reduzir o volume de amostra se este controle for obtido.

## 2.3 Imagens Digitais

Dispositivos de carga-acoplada (CCD) são dispositivos que realizam movimentação de cargas elétricas. Usualmente, estas cargas são convertidas em sinais digitais que podem ser interpretados por um computador pessoal ou microchip. O CCD é largamente utilizado em imagens digitais para construção de câmeras de vídeo e máquinas fotográficas. Em um dispositivo para captura de imagens, esta é projetada através de uma lente em uma matriz (bidimensional no caso de câmeras) de capacitores (região fotoativa feita de uma camada de  $\text{SiO}_2$ ). Cada capacitor então acumula uma carga proporcional a intensidade da luz naquele local. Um circuito de controle (O CCD propriamente dito) faz com que cada capacitor transfira seu conteúdo à seu vizinho. O último capacitor lança sua carga em um amplificador que converte este sinal em uma voltagem. Repetindo esse processo, o circuito converte todo o conteúdo da matriz em uma sequência de voltagens que podem ser digitalizadas e armazenadas.

Dispositivos semelhantes, os sensores CMOS (do inglês, *Complementary Metal-oxide semiconductor*), constituídos de um circuito integrado conectado a uma matriz de sensores de pixel (cada um contendo um fotodetector e um amplificador), surgiram como uma alternativa ao CCD por serem mais baratos e mais rápidos. Além disso, eles geralmente consomem menos energia e são

mais fáceis de construir. Eles são comumente utilizados em câmeras de celulares, webcams e câmeras digitais de bolso.

A luz projetada nos sensores CMOS gera um sinal que pode ser interpretado de diversas maneiras digitalmente. Não só quanto à sua intensidade mas também quanto à seus parâmetros de cores. Um modelo de cores é um modelo matemático que descreve como as cores podem ser representadas por números e ao aplicar um modelo específico é possível extrair informações relacionadas às cores do objeto de estudo. É possível então, utilizando a eletrônica correta e ferramentas de programação, converter os sinais em diversas formas existentes de interpretar as cores. Modelos como CIE XYZ (do francês, *Commission Internationale de l'éclairage*) RGB (do inglês, *Red, Green, Blue*), HSV (do inglês *Hue, Saturation, Value*), HSL (do inglês *Hue, Saturation, Lightness*) e CMYK (do inglês, *Cyan, Magenta, Yellow, Black*) são alguns dos tipos disponíveis.

O sistema de cores aditivas RGB é de particular interesse para a química analítica moderna. Este sistema separa as informações de luz em três cores (vermelho, verde e azul) que se adicionam para formar um espectro complexo. Cada cor é representada digitalmente por um canal de 8 bits (0-255) gerando mais de 16 milhões de cores possíveis. Sua fácil correlação com a visão humana (antes da era digital o sistema RGB possuía uma sólida teoria baseada na percepção humana das cores), fez com que praticamente todo dispositivo que lide com interpretação de imagens utilize uma variação deste modelo de cores. O fato do sistema ser de três variáveis, o torna atrativo pela facilidade de interpretação dos resultados, possibilitando uma boa compreensão de reações que podem ser analisadas por uma titulação colorimétrica. Trabalhos envolvendo a discriminação de alimentos [6] através de seu formato e coloração e quantificação de sulfito em bebidas [34] são algumas das aplicações. Isto é possível graças a possibilidade de relacionar os valores de RGB da imagem como um todo à parâmetros pré-selecionados através de algoritmos especialmente preparados.

O primeiro trabalho publicado envolvendo a utilização do sinal de RGB para a quantificação da concentração de analitos foi proposto por Maleki et al. em 2004 para quantificação simultânea de  $Al^{3+}$  e  $Fe^{3+}$  em ligas metálicas utilizando um agente cromogênico [35]. Uma rede neural foi utilizada para relacionar os valores de RGB às concentrações de analitos. Devido à complexidade da interpretação de resultados, o uso de uma rede neural pode facilitar a pesquisa e otimização de um método de quantificação.

Em 2006, um grupo de pesquisa brasileiro desenvolveu um titulador automático utilizando uma câmera CCD WebCam para detecção do ponto final. Foram estudadas as titulações de HCl e  $H_3PO_4$  com NaOH. A solução era titulada enquanto recirculava e passava por uma célula de fluxo onde a câmera fazia a leitura dos valores de RGB. Para detecção do ponto final, os valores de RGB foram combinados para gerar o sinal e utilizado para construir curvas de primeira e segunda derivadas para detecção do ponto final. Os valores de precisão e exatidão foram comparados com titulação espectrofotométrica e boa compatibilidade foi encontrada [5]. Em 2009, o mesmo grupo adaptou o uso de uma câmera CCD para utilizar em conjunto com um espectrofotômetro de chama [36].

Em 2010, Nazarenko e colaboradores testaram várias tecnologias de aquisição de imagens (incluindo uma WebCam e um *smartphone*) para o desenvolvimento de um titulador automático

de baixo custo para uso em laboratórios de ensino. Os pesquisadores adaptaram com sucesso as titulações clássicas de ácido-base, complexométrica com EDTA e de precipitação. [3]

Utilizando uma abordagem baseada em uma titulação, Kompany-Zareh et al (2012) realizaram a determinação de  $\text{Fe}^{3+}$  em amostras de sangue utilizando uma câmera CCD. O  $\text{Fe}^{3+}$  é catalisador na oxidação de corante índigo. Um produto incolor é formado e o tempo para esse produto desaparecer depende da concentração de  $\text{Fe}^{3+}$ . Esse desaparecimento da cor foi gravado como %RGB e utilizado para determinar o teor do analito [37].

Torres et. al, em 2011, demonstraram o potencial da detecção digital ao determinar a acidez de vinhos sem utilizar nenhum indicador, mostrando que câmeras CCD e o sistema RGB possuem boa sensibilidade para identificar pequenas variações em imagens [10]. Outro grupo, utilizando polímeros especialmente desenvolvidos conseguiram quantificar TNT [13] e Hg [38] em meios aquosos em pequenas concentrações. As mudanças de cores dos polímeros foram correlacionadas com os valores de RGB obtidos por câmeras de celulares.

Lima et. al desenvolveram em 2016 uma nova forma de titulação baseada na gravação de imagens com uma câmera CCD e a rápida titulação de uma amostra. O sistema proposto, chamada de análise em fluxo-batelada (FBA) mescla a elevada frequência analítica da análise em fluxo com os pequenos volumes gastos de uma titulação em batelada miniaturizada. O sinal RGB é gravado durante o tempo da titulação e utilizado em cálculos para determinar a concentração do analito. Elevadas taxas de análise puderam ser obtidas, acima de 100 análises por hora, apesar de que variações na viscosidade das soluções possam acrescentar incertezas ao valor final [11].

## 2.4 Titulação de Açúcares Redutores

No presente trabalho, foram realizadas titulações que são extensamente descritas na literatura e seus métodos são bastante semelhantes entre si. Para testar as capacidades do titulador, foi escolhida um aplicação de grande interesse prático e que apresentasse dificuldades utilizando a metodologia existente onde a titulação automática RGB pudesse oferecer um ganho de exatidão e/ou precisão. A titulação de açúcares redutores através de iodometria possui diversas metodologias publicadas, exemplificando a dificuldade de reprodutibilidade dos métodos [16]. Além disso, a metodologia perde bastante exatidão (ou não é possível realizar a análise) quando as amostras são intensamente coloridas [39].

Neste sentido, a forma objetiva como a câmera *webcam* determina o ponto final pode ser uma forma de eliminar estas dificuldades ou pelo menos minimizá-la.

Um açúcar redutor é um carboidrato que, em solução básica, é oxidado por um agente oxidante fraco (um agente capaz de oxidar aldeídos mas não alcoóis). A propriedade característica dos açúcares redutores é que, em meio aquoso, produzem um ou mais compostos contendo um grupo aldeído. Todos os monossacarídeos são açúcares redutores, juntamente com alguns dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Exemplos incluem: glicose, frutose, maltose, galactose, cellobiose.

Os monossacarídeos podem atuar como agentes redutores pois possuem um grupo aldeído (aldoses) ou um grupo cetona (cetoses) como é o caso da frutose. O grupo aldeído pode ser oxidado via uma reação redox já as cetonas não podem ser oxidadas sem a decomposição do açúcar. As cetoses precisam primeiro passar por uma série de mudanças para produzir um grupo aldeído e atuar como açúcares redutores.

No caso dos dissacarídeos, eles podem ser classificados como redutores ou não. Quando há a presença de ligações glicosídicas entre seus carbonos anoméricos, não podem se converter a uma forma de cadeia aberta e formar um grupo aldeído e por isso são classificados como não redutores. É o caso da sacarose e trehalose. A maltose, no entanto, mantém uma parte redutora em sua estrutura que pode se converter a um aldeído. A Figura 4 ilustra a presença destas ligações.

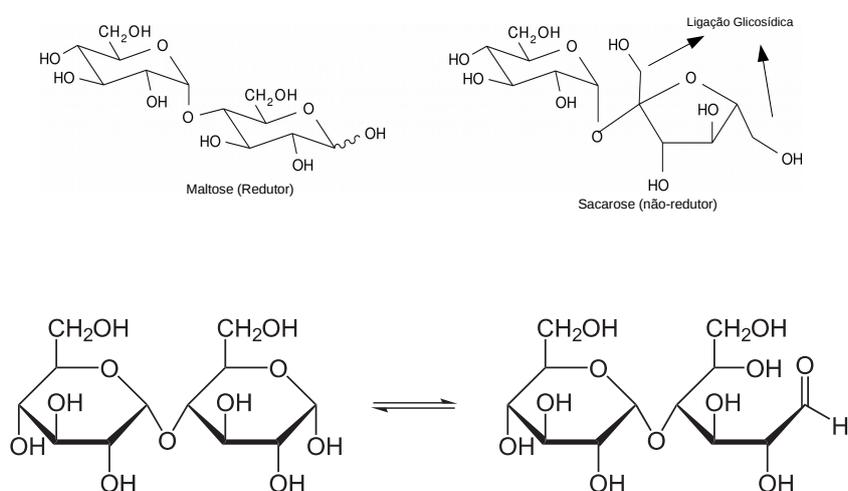


Figura 4: Diferença entre dissacarídeos redutores e não redutores.

A parte da molécula com um carbono anomérico livre que não participa da ligação glicosídica é capaz de se converter a uma forma de cadeia aberta. Esta é a parte redutora do dissacarídeo. De forma similar, os polissacarídeos também só possuem uma parte redutora se não houver ramificações.

Muitos açúcares podem ser considerados redutores, entre eles todos os monossacarídeos, glicose, frutose e todas as pentoses. Alguns dissacarídeos como a maltose também são redutores. Estas substâncias estão presentes na matriz de uma gama de produtos naturais e sintéticos. Estruturalmente, os açúcares redutores devem conter um grupo aldeído ou cetona capaz de ser oxidado. Hexoses e pentoses em equilíbrio com suas formas de aldeídos e cetonas se enquadram nesta categoria.

Hexoses e pentoses possuem a característica de existir em solução aquosa em duas ou mais formas (cíclicas e não-cíclicas) em equilíbrio. A forma não-cíclica é menos comum e está presente em pequenas quantidades em vinhos e sucos. Em solução alcalina, os açúcares passam por uma reação e se transformam em suas versões não-cíclicas. Esta forma possui um grupo aldeído no final de sua cadeia e este grupo é oxidado.

Tecnicamente, a frutose não deveria se comportar como um açúcar redutor em condições normais porém a frutose pode ser convertida a glicose e mannose em condições alcalinas pelo mecanismo de ceto-enol tautomerismo [40]. A redução da frutose com cobre também é atribuída pela decomposição da cadeia carbônica, onde produtos com capacidades redutoras são formados. Frutose geralmente oxida mais rápido e a temperaturas mais baixas do que a glicose.

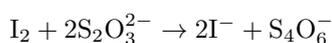
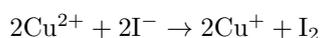
Na determinação de açúcares redutores, os açúcares são oxidados enquanto reduzem o cobre de cobre (II) para cobre (I) através de uma reação com o reagente de *Fehling* [41]. As reações que ocorrem são as seguintes:



A forma reduzida do cobre exibe uma coloração característica amarelo/laranja/vermelho que depende do sal de cobre(I) formado. As mudanças de coloração desta reação podem ser complicadas pela oxidação e subsequente degradação dos compostos de açúcar. Variáveis que influenciam nesta reação são o tipo e concentração de açúcares presentes, a concentração de base e a temperatura e tempo de reação. Baixas temperaturas e alta concentração de base favorecem a formação de um precipitado de óxido de cobre.

Tartarato de sódio e potássio são incluídos na mistura de reagentes pois auxilia na precipitação do óxido de cobre ao mesmo tempo em que mantém os produtos oxidados dos açúcares e o cobre (II) em solução. Esta substância forma um complexo com os íons de cobre (II) e impede que estes precipitem como hidróxido de cobre (II). Este não é um agente oxidante muito bom, porém a alcalinidade garante que estes consigam realizar esta tarefa. Íons cobre (I) não formam um complexo com o tartarato e precipitam da solução.

Nesta reação, o cobre está presente em excesso e o cobre (II) residual que permanece após a reação com os açúcares é reduzido com iodo e determina-se a quantidade de cobre em uma titulação de retorno com tiosulfato de sódio. As reações ocorrem como abaixo:



Existem muitos procedimentos diferentes para realizar esta determinação, todos utilizando o mesmo princípio em essência porém com pequenas variações. As metodologias de Lane-Eynon, Benedict, Luff-Schoorl, Musson-Walker, Somogyi-Nelson são descritas na literatura [42]. As mudanças envolvem principalmente o complexante utilizado e a forma de conduzir a titulação. Para determinações mais precisas, a metodologia mais utilizada é a descrita neste trabalho, a metodologia descrita por Rebelein [45]. Neste procedimento, realizam-se duas titulações, uma do branco e outra da amostra e assim erros provenientes das próprias características do método são minimizados.

Nesta metodologia, um branco é realizado e se determina a quantidade de açúcares redutores indiretamente através da quantidade de cobre existente no branco e na amostra. O complexante utilizado é o tartarato de sódio e potássio. Outras metodologias utilizam citrato de sódio (método de Benedict) [43] ou realizam adições de substâncias para corrigir efeitos de interferentes (método de Luff-Schoorl) [44].

### 3 Material e Métodos

Esta seção trata da descrição do desenvolvimento do titulador automático, do funcionamento e operacionalidade do programa em C#, do preparo de soluções e amostras e dos procedimentos de análises de todas as titulações consideradas, tanto no titulador construído quanto de forma clássica.

#### 3.1 Desenvolvimento do Titulador Automático

O titulador foi construído de forma a ser versátil e ao mesmo tempo robusto para poder realizar uma série de reações diferentes com mínima ou nenhuma modificação das partes que o compõem. Essencialmente, o procedimento que o equipamento realiza é semelhante ao realizado em uma titulação comum. No entanto, a adição de titulante passa a ser feita com uma bomba-seringa e a mudança de cores registrada por uma câmera *webcam* via computador que monitora as mudanças de R, G e B e gerencia o volume adicionado de titulante. O titulador também é equipado com um agitador magnético *lab-made*. Para realizar as titulações RGB, um ambiente de iluminação controlada foi necessário. Neste caso, o béquer contendo a solução titulada permanece em uma câmara fechada contendo um arranjo com 3 LED brancos. A Figura 5 mostra o esquema utilizado.

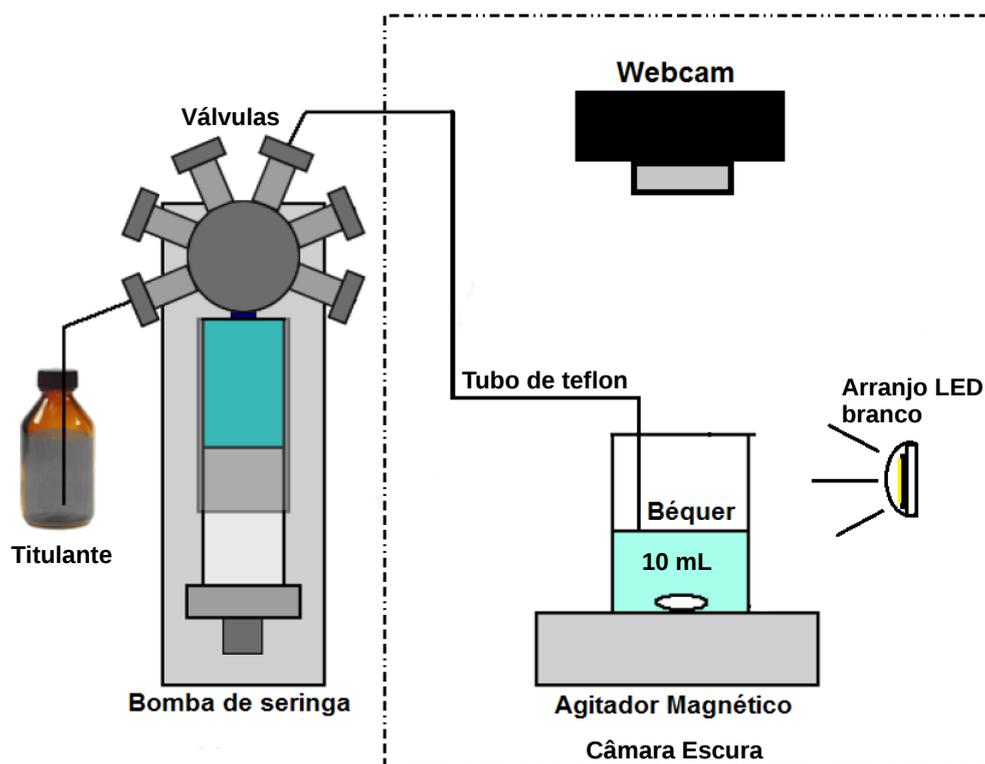


Figura 5: Esquema do titulador automático.

A bomba-seringa utilizada, *Hamilton PSD/4*, é capaz de dispensar pequenos volumes com elevada precisão (0,05%). O volume mínimo dispensável depende da resolução utilizada e do volume da seringa de vidro com êmbolo de *teflon* que é conectada ao módulo controlador. No presente trabalho, uma seringa com volume de 5,00 mL (*Model 1010.5 TLL SYR*, Hamilton) foi

utilizada de forma que incrementos de  $0,21 \mu\text{L}$  ou  $1,66 \mu\text{L}$  podem ser conseguidos dependendo da resolução escolhida.

Acoplada à bomba, uma válvula de 7 vias permite a conexão com diferentes linhas de fluxo. No caso deste titulador, apenas duas vias foram utilizadas, uma para abastecimento da seringa com a solução de titulante e outra com destino ao béquer contendo o titulado. Tubos de PTFE (politetrafluoretileno) com 0,8 mm de diâmetro interno foram utilizados para o transporte dos fluidos. A bomba-seringa foi conectada ao um microcomputador através de porta serial RS-232 e uma fonte AC/DC com saída de 24V e 2,0 A foi utilizada para realizar a alimentação elétrica para o equipamento.

Para armazenar o titulado foi utilizado um béquer de 10 mL com uma pequena barra magnética de 0,5 cm de comprimento. O agitador utilizado foi montado no próprio laboratório a partir de uma ventoinha para computadores, imãs e um potenciômetro para regular as rotações por minuto, sendo posicionado abaixo do béquer.

Uma caixa de madeira de 23 x 22 x 15 cm foi utilizada para controle de iluminação fornecida por uma lâmpada LED montada lateralmente ao béquer. Para obter uma luz difusa, uma pequena tira de papel na frente do LED foi utilizada conforme ilustra a Figura 6

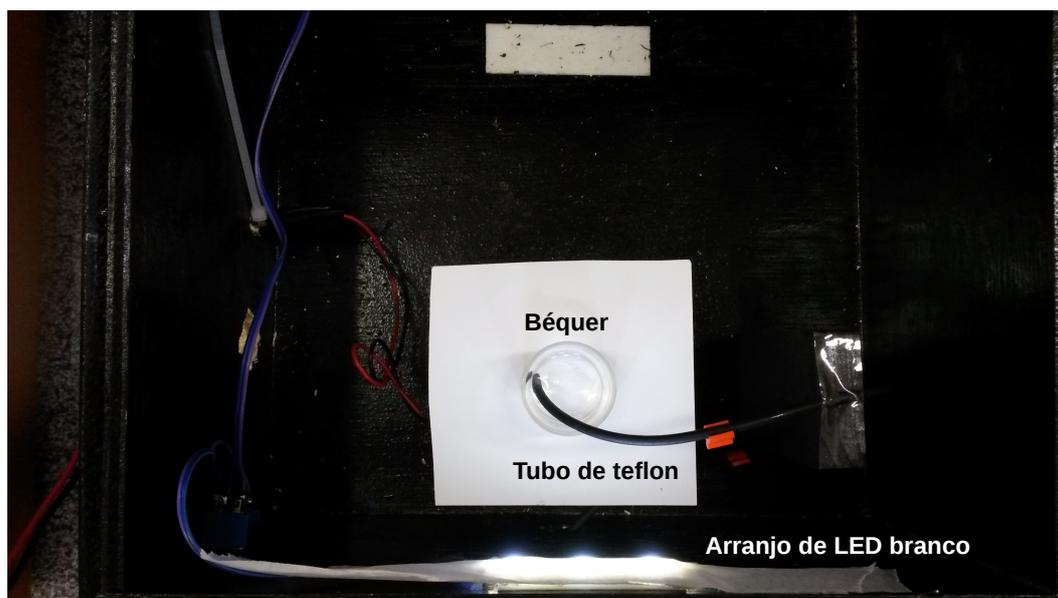


Figura 6: Imagem dentro do titulador. Vista por cima.

Para a captura de imagens e do sinal RGB foi utilizada uma câmera CMOS *webcam* de 16 MP (Modelo WC045, Multilaser) com uma lente de vidro de 2 camadas. Apesar de possuir um LED próprio, a iluminação fornecida pela câmera, posicionada acima do béquer, cria um brilho intenso na área de aquisição do sinal RGB, pois mesmo com iluminação mínima, provoca sua saturação. A comunicação entre o microcomputador e a câmera era realizada através de uma conexão USB e os parâmetros de imagem utilizados para a captura dos sinais são listados na Tabela 1. As fotos obtidas pela *webcam* possuíam uma resolução de 640 x 480.

Tabela 1: Parâmetros da câmera *webcam*.

Parâmetro	Valor
Brilho	128
Contraste	148
Saturação	90
Nitidez	3
Gama	4
Luz de Fundo	1

O controle de todo o *hardware*, o controle da bomba-seringa e suas válvulas e aquisição do sinal RGB com a câmera *webcam*, foi realizado por um microcomputador através de um *software* escrito na linguagem C# descrito na subseção 3.2. A Figura 7 exhibe o aparato experimental.



Figura 7: Titulador montado. (A) Caixa de ambiente de luz controlada com bquer e câmera *webcam*. (B) Bomba-seringa.

### 3.2 Programa em C#

O programa de computador em C# utilizado para controle do equipamento e aquisição do sinal RGB foi escrito utilizando a IDE (do inglês, *Integrated Development Environment*) *Visual Studio Express 2013*. Foi utilizado um computador pessoal com processador *Intel Core i3 2.93 GHz*, 2 Gb de memória RAM e sistema operacional *Windows 7*.

O *software* final desenvolvido realiza todas as funções básicas para condução dos experimentos e operação da bomba-seringa. O programa é capaz de executar as seguintes operações:

- Inicialização a bomba-seringa e ambientação da seringa e tubos com a solução de titulante.

Comandos são enviados à bomba que aspiram um volume de 1500  $\mu L$  (cerca de 3 vezes o volume do tubo que transporta a solução titulante até o béquer). Este volume é dispensado e descartado.

- Procedimento de titulação preliminar no qual o titulante é adicionado de forma contínua enquanto o sinal RGB é registrado a cada segundo. Quando o sistema atinge determinada variação de cores (dependente de cada titulação), a titulação é interrompida e estima-se um volume onde o ponto final se encontra.
- Procedimento de titulação no qual primeiramente o titulante é adicionado até 80% do volume determinado na titulação preliminar e depois acrescentado em pequenos volumes. A cada pequeno incremento, um intervalo de tempo para aquisição do sinal é considerado para homogeneização e estabilização do sinal. As adições continuam até um valor pré-determinado, denominado de *threshold*, e a titulação continua por mais 15 adições de titulante.
- Modificação de parâmetros: É possível selecionar os valores de vários parâmetros como: incremento de volume, intervalo de captura das imagens, área e posição da região de interesse (região de aquisição do sinal RGB), volume da titulação preliminar e tipo de titulação a ser executada (neutralização, complexação, precipitação, oxi-redução e de açúcares reductores). A última fotografia realizada também é exibida.
- Interface em tempo real: os valores de R, G e B são plotados em um gráfico a cada incremento de volume, mostrando em tempo real a curva de titulação da reação considerada.
- Utiliza um algoritmo específico para cada titulação para determinação de seu ponto final. Este algoritmo pode ser construído com as 1º, 2º derivadas dos valores de R,G ou B ou uma combinação linear entre estes valores.
- É possível inserir dados de entrada como concentração do titulante e volume da amostra que, em conjunto com o tipo de titulação escolhida, realizam ao final da titulação o cálculo da concentração do analito.
- Procedimento de limpeza: Para manter o correto funcionamento da bomba-seringa e garantir sua vida útil, deve-se lavá-la com pelo menos duas vezes seu volume com água destilada.

A Figura 8 destaca os principais componentes do *software* exibidas em sua tela de interface com o usuário. É importante lembrar que, para que a coleta de dados seja coerente com as imagens observadas, é preciso haver sincronia entre os comandos enviados à bomba-seringa e a aquisição do sinal RGB. Isto é obtido através da correta comunicação entre o *software* e a bomba. É possível obter valores para o *status* da bomba (ocupada ou não) e também dados da posição absoluta da seringa. Desta forma, é possível sincronizar e controlar com mais precisão os movimentos da mesma.

Independentemente do tipo de titulação realizada, uma análise sempre é conduzida após o usuário adicionar a amostra e o indicador ao béquer e colocá-lo sob a câmera. A janela de leitura é posicionada para obtenção do sinal RGB e são realizadas as seguintes etapas de acordo com a programação do *software*:

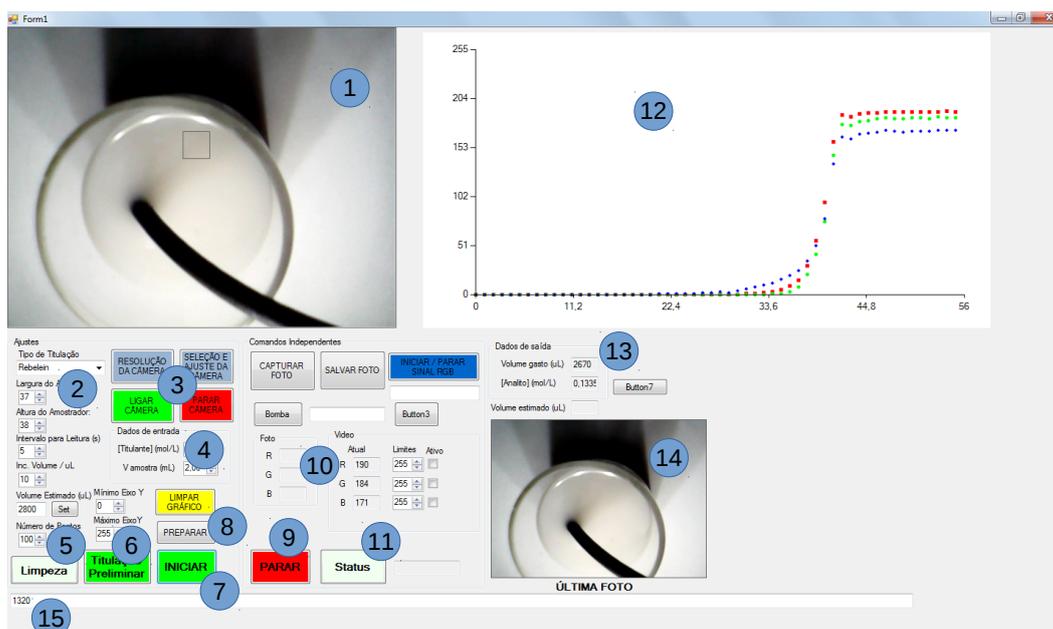


Figura 8: Tela de Interface do Usuário do programa em C#. 1. Vídeo da titulação que ocorre. 2. Ajustes de Parâmetros. 3. Ajustes da câmera. 4. Dados de entrada da titulação. 5. Inicia procedimento de limpeza da seringa. 6. Inicia titulação preliminar. 7. Inicia procedimento comum de titulação. 8. Prepara a seringa para os outros procedimentos. 9. Para qualquer procedimento sendo executado. 10. Visualização do sinal RGB coletado. 11. Requisita o status da bomba. 12. Gráfico do sinal RGB exibido em tempo real. 13. Dados de saída (volume e concentração). 14. Última fotografia obtida. 15. Log do programa.

1. Realiza-se a titulação preliminar onde uma vazão constante de titulante de 1 mL/min é adicionada a uma amostra de sacrifício enquanto o sinal RGB é capturado a cada segundo. Para cada titulação, há um valor máximo específico de uma ou mais variáveis que compõem o sinal relacionado com a mudança de cores nas vizinhanças do ponto de equivalência. Quando este ponto é atingido, guarda-se a posição da seringa onde isto aconteceu e este volume é utilizado para realizar mais rapidamente outras titulações da mesma amostra.
2. Com uma nova amostra, realiza-se o procedimento de titulação onde uma quantidade igual a 80% do volume estimado na etapa anterior é adicionado rapidamente a uma vazão de 8,57 mL/min. Neste momento, nenhum sinal RGB é registrado. Após a adição deste volume, aguarda-se 30 segundos para homogeneização da mistura.
3. A titulação prossegue então na seguinte ordem, realiza-se uma determinada adição de volume e aguarda-se um intervalo de tempo conforme foram definidos nos parâmetros (cada titulação possui valores pré-definidos).
4. Realiza-se a aquisição do sinal extraindo-se os valores de R, G e B de cada *pixel* dentro da região de interesse, um quadrado (ou retângulo) com tamanho e posição determinadas pelo usuário. O sinal RGB se torna a média dos valores destes *pixels*. Logo em seguida, plota-se estes números em um gráfico que vai sendo atualizado conforme novos valores são recebidos.

Deste momento em diante, o que o programa executa depende do tipo de titulação sendo

realizada. Após adquirir o sinal RGB, o programa deve testar se estes valores correspondem de alguma forma ao ponto final de titulação. Este teste consiste no algoritmo propriamente dito e, de forma geral, funciona da seguinte forma:

1. Os valores obtidos de RGB são utilizados para cálculo de um valor específico. Este valor pode ser as 1<sup>o</sup> ou 2<sup>o</sup> derivadas dos valores de R, G ou B ou até uma combinação linear entre estes valores.
2. Esse valor é comparado a um limite pré-definido chamado de *threshold*.
3. Dependendo do resultado desta comparação, podem ocorrer duas situações:
  - (a) se o valor for menor que o *threshold*, a titulação prossegue, retornando ao passo de adição de titulante.
  - (b) se o valor for maior que o *threshold*, a titulação prossegue mas apenas por mais 15 adições de titulante para compor um conjunto de dados mais amplo para a determinação.

Quando a titulação chega a seu fim, um método matemático simples é aplicado em todos os valores calculados e determina o ponto final da titulação. Estes métodos consistem em calcular as derivadas pelo teorema do valor médio e, em seguida, calcular seus máximos ou mínimos, dependendo da necessidade. Os métodos para cálculo destes valores são bem simples e se encontram na biblioteca básica do C#. Os cinco métodos foram analisados para identificar que tipo de curva produzia um sinal mais distinto e com pouco ruído. Foram avaliadas as seguintes curvas descritas abaixo:

1. Neutralização:  $\frac{dR}{dV}, \frac{dG}{dV}, \frac{dB}{dV}, \frac{d^2R}{dV^2}, \frac{d^2G}{dV^2}, \frac{d^2B}{dV^2}$ .
2. Complexação:  $\frac{dR}{dV}, \frac{dG}{dV}, \frac{dB}{dV}, \frac{dR}{dV} - \frac{dG}{dV}, \frac{dR}{dV} + \frac{dG}{dV}, \frac{dR}{dV} + \frac{dB}{dV} - \frac{dR}{dV}, R - G$
3. Precipitação:  $\frac{dR}{dV}, \frac{dG}{dV}, \frac{dB}{dV}, \frac{dR}{dV} - \frac{dG}{dV}$
4. Oxi-redução:  $\frac{dR}{dV}, \frac{dG}{dV}, \frac{dB}{dV}, \frac{d^2R}{dV^2}, \frac{d^2G}{dV^2}, \frac{d^2B}{dV^2}$ .
5. Açúcares Redutores:  $\frac{dR}{dV}, \frac{dG}{dV}, \frac{dB}{dV}, \frac{d^2R}{dV^2}, \frac{d^2G}{dV^2}, \frac{d^2B}{dV^2}$ .

Para construir os algoritmos, foram selecionadas as seguintes curvas e os seguintes *thresholds*, incluindo os *thresholds* das titulações preliminares.

1. Neutralização:  $\frac{d^2R}{dV^2}$  e -2000 de *threshold*.
2. Complexação:  $R - G$  e 0 de *threshold*.
3. Precipitação:  $\frac{dR}{dV} - \frac{dG}{dV}$  e 1500 de *threshold*.
4. Oxi-redução:  $\frac{dR}{dV}$  e -2000 de *threshold*.
5. Açúcares redutores:  $\frac{dR}{dV}$  e 3 de *threshold*.

O *threshold* para a titulação de açúcares redutores é bem menor que os outros, pois quando este algoritmo foi construído, já havia sido incluído em seu método uma forma para cálculo da derivada em relação ao volume utilizado e não com os pontos da titulação. Neste caso, é necessário amplificar o sinal por um valor K de 10000. No caso da titulação de açúcares isto não foi necessário.

### 3.3 Reagentes e Soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas em água purificada por osmose reversa. Para facilitar o raciocínio, os reagentes e seu preparo foram organizados conforme a titulação em que são utilizados.

#### 3.3.1 Titulação de Neutralização

Uma solução de fenolftaleína (Synth, PA-ACS) 1% foi preparada dissolvendo-se 1,00 g do reagente em 50 mL de etanol (Anidrol, 99,5%) e depois completado o volume para 100 mL com água.

Uma solução de NaOH (Sigma-Aldrich, 98%) 0,1 mol/L foi preparada dissolvendo-se 4 g de hidróxido de sódio em 1,00 L. A solução foi padronizada em uma titulação com biftalato de potássio (Sigma-Aldrich, 99,95%) 0,1 mol/L preparado com o reagente seco em estufa a 110 °C por duas horas antes do preparo de solução. Para a padronização utilizou-se o indicador de fenolftaleína preparado anteriormente.

#### 3.3.2 Titulação de Complexação

Para preparar uma solução de EDTA (Vetec, 99%) 0,001 mol/L, 0,3722 g do reagente seco em estufa à 80 °C foi dissolvido em 1,00 L de água. A padronização foi realizada com uma solução de  $\text{Ca}^{2+}$  0,001 mol/L preparada da seguinte forma: 0,05 g de carbonato de cálcio (Synth, 99%) seco por duas horas em estufa foram dissolvidos em 25 mL de água destilada e 5 mL de HCl (Chemco, 36,5%) concentrado. Depois de dissolver todo o carbonato, a solução foi fervida por 3 minutos para expelir o dióxido de carbono e transferida para um balão de 500 mL para ter seu volume completado. O EDTA foi padronizado titulando-se 25,00 mL da solução de íons  $\text{Ca}^{2+}$  adicionada a 10 mL de solução-tampão pH 10 e com indicador negro de eriocromo T.

Uma solução-tampão pH 10 foi preparada a partir de 142 mL de uma solução de hidróxido de amônio (Vetec, 29%). Medindo-se o pH da solução, adicionou-se cloreto de amônio (Vetec, 99,5%) suficiente até que o pH da solução fosse ajustado em 10. Em seguida, transferiu-se a solução para balão volumétrico de 250 mL e completou-se seu volume com água.

O indicador de negro de eriocromo T (J.T. Baker) foi preparado primeiramente misturando-se 0,20 g do indicador a 40 g de NaCl (Dinâmica, 99%). Uma mistura de 30 mL de água destilada e 10 mL de etanol foi utilizada para dissolver o indicador. A solução foi filtrada e acondicionada em um frasco de vidro âmbar de 40 mL.

#### 3.3.3 Titulação de Precipitação

Uma solução do indicador cromato de potássio  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  5% (Synth, 99%) foi preparada dissolvendo-se 5 g do reagente em 100 mL de água. Uma solução padrão de Cloreto de Sódio (Dinâmica, 99%) 0,05 mol/L foi preparada dissolvendo-se 1,461 g do sal puro e seco em 500 mL de água destilada.

Uma solução de Nitrato de Prata (Merck, 99,8%) 0,05 mol/L foi preparada dissolvendo-se 8,4935 g do sal em 1,00 L de água. A solução foi padronizada através da titulação de 25 mL da solução de Cloreto de Sódio 0,05 mol/L na presença de 1 mL do indicador cromato de potássio. Um branco também foi titulado envolvendo uma quantidade de água igual ao volume final da solução titulada. Este branco foi titulado com o nitrato de prata até que a cor do branco correspondesse a da amostra titulada e o volume obtido era descontado nas titulações posteriormente.

### 3.3.4 Titulação de Oxi-redução

Soluções de vitamina C foram preparadas a partir de pastilhas comerciais de três marcas diferentes, dissolvendo-se o comprimido (4 g) moído em 250 mL de água. A solução de  $I_2$  0,05 mol/L foi preparada dissolvendo-se 20 g de iodeto de potássio (Dinâmica, 99%)(livre de iodato) em 30 a 40 mL de água em um balão de 1,00 L provido de rolha esmerilhada. Uma massa de 12,7 g de iodo ressublimado foi transferida para o balão e agitado a frio para dissolver todo o iodo. Após a temperatura da solução normalizar, completou-se o volume com água destilada. Para armazenamento, a solução foi acondicionada em frascos de vidro âmbar e mantida em local escuro e fresco.

Para a padronização do iodo, uma solução de tiosulfato de sódio (Dinâmica, 99,5%) 0,05 mol/L foi preparada dissolvendo-se 12,4105 g de  $Na_2S_2O_3$  em 500 mL de água. À esta solução, acrescentou-se 50 mL de solução de NaOH 1 mol/L e completou-se o volume do balão para 1,00 L. A solução de tiosulfato foi padronizada com uma solução de iodato de potássio (Ecibra, 99,5%) 0,02 mol/L preparada dissolvendo-se 4,28 g do sal em água e completando seu volume em balão aferido de 1,00 L. Uma alíquota de 25 mL desta solução foi tratada com 1 g de iodeto de potássio sólido e 3,00 mL de ácido sulfúrico (Vetec, 95-99%) 1,0 mol/L. Esta solução foi titulada com o tiosulfato até ficar amarelo pálido e diluída para 200 mL, foi adicionado 2,00 mL de solução de amido e continuado a titulação até o desaparecimento da cor azul. O mesmo procedimento foi realizado com a solução de iodo.

Uma suspensão de amido (Dinâmica) foi preparada fazendo-se uma pasta com 0,1 g de amido solúvel e água e transferindo-se a mesma, com agitação constante, à 100 mL de água em ebulição. Depois de ferver por 1 minuto, a suspensão foi deixada para esfriar e depois adicionou-se 2 g de iodeto de potássio. Ela era mantida em um frasco arrolhado e sempre preparada antes das análises realizadas.

Uma solução padrão de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, 99%) 0,05 mol/L foi preparada dissolvendo-se 0,8806 g do reagente em água. Em seguida, transferiu-se este conteúdo para um balão de 100 mL e completou-se seu volume. Uma solução sempre era preparada antes do uso devido à fácil oxidação do ácido ascórbico.

### 3.3.5 Titulação de açúcares redutores

Uma solução de sulfato de cobre pentahidratado (Dinâmica, 98%) foi preparada dissolvendo-se 41,92 g do reagente em 600 mL de água tratada com 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (Vetec, 95-99%). Após a completa dissolução do reagente, a solução foi transferida para um balão de 1,00 L e completou-se seu volume com água.

Preparou-se uma solução de tartarato de sódio e potássio (Dinâmica, 99%) dissolvendo-se 346 g do sal tetrahidratado em 600 mL de água destilada. Por sua difícil dissolução, a mistura foi colocada em um banho ultrassônico. Após a dissolução do sal, foi adicionado 80 g de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich, 98%). Após a solução esfriar, transferiu-se a solução para um balão aferido de 1,00 L e completou-se seu volume.

A solução de iodeto de potássio (Dinâmica, 99%) foi preparada pesando-se 300 g do reagente e realizando sua dissolução em uma mistura de 600 mL de água e 100 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L.

Uma solução de ácido sulfúrico (Vetec, 95-99%) 28% foi preparada adicionando cuidadosamente 175 mL de ácido sulfúrico concentrado a 825 mL de água. Após sua homogeneização e diminuição da temperatura, foi acondicionada em frasco âmbar.

Uma solução de amidoglicolato de sódio (Dinâmica) foi preparado pesando-se 20 g de iodeto de potássio e o dissolvendo com uma pequena quantidade (cerca de 15 a 30 mL) de uma solução preparada com 500 mL de água e 10 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L. O restante da solução foi utilizado para dissolver 10 g de amidoglicolato de sódio sob agitação magnética. Em seguida, a mistura foi aquecida até a completa dissolução do reagente (a solução passa de branca a uma cor opalescente). Aguardou-se a mistura esfriar e o iodeto de potássio foi adicionado. Transferiu-se a solução para um balão de 1,00 L e completou-se seu volume.

Uma solução de tiosulfato de sódio (Dinâmica, 99,5%) foi preparada dissolvendo-se 13,78 g de tiosulfato pentahidratado em água. Adicionou-se 50 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L e completou-se seu volume para 1,00 L. A solução foi padronizada conforme descrita na seção 3.3.4.

Uma solução de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich, 98%) 1 mol/L foi preparada dissolvendo-se 40 g do reagente em água e aguardado esfriar para completar seu volume para 1,00 L de solução.

### **3.4 Avaliação dos Algoritmos propostos para detecção dos pontos finais**

Para avaliar o comportamento do sinal RGB frente à diferentes titulações e construir algoritmos capazes de determinar o ponto final das reações com precisão e exatidão, um número variado de amostras foi titulado e os dados de RGB foram armazenados para posterior aplicação dos algoritmos. Isto foi feito com o intuito de gerar um número suficiente de análises onde os algoritmos pudessem ser testados e avaliados quando comparados a uma titulação volumétrica clássica por seu erro relativo e desvio-padrão associado às análises. Foram avaliadas amostras de vinagre (neutralização), água mineral (complexação), água de coco (precipitação), vitamina C (oxi-redução) e amostras de glicose, cerveja e vinho (açúcares redutores). Os estudos foram divididos em seções para cada tipo de titulação.

#### **3.4.1 Neutralização: Amostras de Vinagre**

A primeira titulação consistiu na determinação do teor de ácido acético em amostras de vinagre através da titulação com hidróxido de sódio na presença do indicador de fenoftaleína. Foram

analisadas (em triplicata) amostras de seis marcas diferentes. A Tabela 2 reúne as informações a respeito das amostras:

Tabela 2: Amostras de vinagre comerciais.

Número	Tipo	Marca	[HAc](%v/v)
1	Vinagre de Arroz	Miyako	4,5
2	Vinagre de Maçã	Qualitá	4,5
3	Vinagre de Vinho branco	Castelo	4,5
4	Vinagre de Vinho tinto	Castelo	4,5
5	Vinagre de Vinho tinto	Qualitá	4,5
6	Vinagre temperado	Kenko	4,5

Para os ensaios com o titulador automático, as amostras de vinagre foram preparadas realizando a diluição, diretamente no béquer de análise, de 130  $\mu$ L de vinagre, 2 mL de água e 3 gotas de indicador. Uma região de interesse de 37 x 38 pixels foi utilizada para captura do sinal RGB e esta foi posicionada de forma que a agitação e tubo de adição de titulante não interferisse na aquisição de imagens. Este tubo sempre era posicionado no fundo do béquer para promover melhor homogeneização durante a agitação. As amostras foram tituladas com NaOH 0,1 mol/L até que tivessem ultrapassado o ponto final de titulação. Foi utilizado um incremento de volume de 20  $\mu$ L e um intervalo de leitura de 8 segundos.

A titulação clássica foi realizada com 4,00 mL de vinagre e diluindo este volume para cerca de 50 mL com água. Após adicionar 3 gotas de fenoftaleína, as amostras foram tituladas com a NaOH 0,1 mol/L utilizando uma bureta de 50,0 mL (precisão 0,1 ml).

Os sinais coletados e suas respectivas imagens foram analisados para verificar que tipo de transformação (1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> derivada) de um ou mais valores (R, G, B ou uma combinação destes) pudesse gerar uma forma de determinar, com precisão e exatidão suficientes, a concentração de ácido acético determinada pela metodologia clássica. Foram realizadas as seguintes transformações do sinal RGB:

$$\frac{dR}{dV}, \frac{dG}{dV}, \frac{dB}{dV}, \frac{d^2R}{dV^2}, \frac{d^2G}{dV^2}, \frac{d^2B}{dV^2}.$$

Avaliou-se o algoritmo escolhido realizando a determinação da concentração de uma solução de biftalato de potássio 0,1 mol/L. Para esta análise, foram utilizados 1,00 mL desta solução, 3,00 mL de água e 2 gotas de indicador. A análise foi realizada no titulador automático da mesma forma que as realizadas com as amostras de vinagre. A titulação clássica foi realizada com 4,00 mL de biftalato e diluído para um volume de 50 mL com água destilada. A amostra foi titulada com a solução de hidróxido de sódio na presença de 2 gotas de indicador.

### 3.4.2 Complexação: Amostras de água mineral

A titulação por complexação consistiu na determinação da dureza de amostras de água mineral através da titulação com EDTA (em meio básico) na presença do indicador EBT. As amostras analisadas se encontram na Tabela 3.

Tabela 3: Amostras de água mineral.

Número	Marca
1	São Lourenço
2	Schin
3	Minalba
4	Nestlé
5	Indaiá

As análises no titulador automático foram realizadas adicionando ao béquer 2,00 mL de água mineral, 1,00 mL de solução-tampão pH 10 e 3 gotas de indicador Eriocromo T. O béquer era posicionado de forma que uma região de interesse de 37 x 38 pixels ficasse disponível para captura de imagens sem interferência do tubo de adição de titulante ou da agitação. De forma semelhante ao procedimento de neutralização, o tubo sempre era posicionado no fundo do béquer. O incremento de volume e o intervalo entre as adições e as capturas de imagem eram, respectivamente, 50  $\mu$ L e 5 segundos. As amostras foram tituladas com uma solução de EDTA 0,001 mol/L. As titulações clássicas foram realizadas com 50 mL de água mineral, 2 mL de solução-tampão pH 10 e 3 gotas do indicador e tituladas com EDTA 0,001 mol/L. Não houve necessidade de adição de magnésio às amostras consideradas.

As transformações avaliadas para a titulação de complexação foram as seguintes:

$$\frac{dR}{dV}, \frac{dG}{dV}, \frac{dB}{dV}, \frac{dR}{dV} - \frac{dG}{dV}, \frac{dB}{dV} + \frac{dR}{dV}, \frac{dG}{dV} + \frac{dB}{dV} - \frac{dR}{dV}, R - G$$

O algoritmo escolhido foi avaliado determinando-se a concentração já conhecida de uma solução de íons  $\text{Ca}^{2+}$  0,001 mol/L preparada conforme a seção 3.3.2. Foi adicionado ao béquer 50  $\mu$ L desta solução, 1,00 mL de água, 1,00 mL de solução-tampão pH 10, 2 gotas de indicador e 2 gotas de  $\text{MgCl}_2$ . A titulação clássica foi realizada tomando-se uma alíquota de 25,00 mL de solução de íons cálcio, 1 mL de solução-tampão, 2 gotas de indicador e 0,1 mL de  $\text{MgCl}_2$ .

### 3.4.3 Precipitação: Amostras de Água de coco

A titulação avaliada foi a determinação de cloretos em amostras de água de coco utilizando como indicador o Cromato de Potássio e titulando-se com Nitrato de Prata. As amostras analisadas se encontram na Tabela 4.

Tabela 4: Amostras de água de coco.

Número	Marca
1	Kero Coco
2	Sococo
3	Ducoco
4	Coco do Vale
5	Puro Coco

As amostras foram preparadas tomando-se uma alíquota de 50,00 mL de água de coco e procedendo sua neutralização com uma solução de Carbonato de Cálcio 0,01 mol/L e, em seguida, coletou-se 1,00 mL desta mistura e adicionou-se ao béquer de 10 mL. Acrescentou-se 2,00 mL de água e 1 gota do indicador. Para os parâmetros, foram selecionados 10  $\mu$ L de incremento

de volume e 10 segundos de intervalo de tempo. Uma região de interesse de 37 x 38 pixels foi utilizada. As titulações clássicas foram realizadas neutralizando 50 mL de água de coco com carbonato de cálcio. Uma alíquota de 25,00 mL foi retirada e acrescentada de 1 gota do indicador. Tanto as amostras analisadas com o titulador e com o método clássico foram realizadas com uma solução de Nitrato de Prata 0,05 mol/L.

As curvas avaliadas para determinação de um ponto final foram as seguintes:

$$\frac{dR}{dV}, \frac{dG}{dV}, \frac{dB}{dV}, \frac{dR}{dV} - \frac{dG}{dV}$$

O algoritmo escolhido foi avaliado determinando-se a concentração já conhecida de uma solução de NaCl 0,05 mol/L preparada conforme a seção 3.3.3. Foi adicionado ao béquer 1,00  $\mu$ L desta solução, 2,00 mL de água e 25  $\mu$ L de indicador. Foi mantido o intervalo de 10 s entre as leituras e utilizado 20  $\mu$ L de incremento de volume para adição do EDTA. A titulação clássica foi realizada tomando-se uma alíquota de 25,00 mL de solução de NaCl e 2 gotas de indicador.

#### 3.4.4 Oxi-redução: Amostras de Vitamina C

A titulação avaliada foi a determinação de ácido ascórbico em amostras de Vitamina C através da titulação com iodo 0,05 mol/L e na presença do indicador de amido. Foram analisadas pastilhas de 3 marcas diferentes.

Para as análises com o titulador automático, as soluções de vitamina C foram preparadas dissolvendo-se o comprimido moído em 250 mL de água. Uma alíquota de 200  $\mu$ L foi retirada e misturada com 2,50 mL de água e 2 gotas do indicador. Devido à volatilidade do iodo, antes das análises era realizado sua padronização adicionando ao béquer, 250  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 mol/L, 2,50 mL de água e 2 gotas de indicador de amido. O incremento de volume e intervalo de tempo foram, tanto para a padronização quanto para as análises propriamente ditas, respectivamente, 10  $\mu$ L e 5 segundos.

As titulações clássicas foram realizadas com  $\frac{dR}{dV}, \frac{dG}{dV}, \frac{dB}{dV}, \frac{d^2R}{dV^2}, \frac{d^2G}{dV^2}, \frac{d^2B}{dV^2}$ .

As imagens e dados obtidos foram utilizados para selecionar um algoritmo capaz de determinar o ponto final de titulação com boa precisão e exatidão.

O algoritmo selecionado foi avaliado através de uma análise de uma solução padrão de ácido ascórbico 0,05 mol/L. Repadronização do iodo foi realizada com 100  $\mu$ L de tiosulfato de sódio, 2,50 mL de água e 2 gotas de indicador. Um intervalo entre as leituras de 10 s e 10  $\mu$ L de incremento de volume foram utilizados. O teste foi realizado adicionando-se ao béquer 100  $\mu$ L da solução de ácido ascórbico, 2,50 mL de água e 2 gotas de indicador. Intervalo de leitura de 8 s e 10  $\mu$ L de incremento de volume.

#### 3.4.5 Açúcares Redutores: Amostras de vinho, cerveja e xarope de glicose

A determinação de açúcares redutores foi realizada por meio de uma titulação onde o cobre está presente em excesso e reage com os açúcares redutores. O cobre residual que permanece é reduzido com iodo e este é determinado por uma titulação de retorno com tiosulfato de sódio.

Para obter um resultado, é necessário determinar a quantidade de cobre em um branco feito com água e após isto, determina-se a concentração de açúcares pela diferença de volume das duas titulações. Foram analisadas amostras de vinho, cerveja e xarope para visualizar suas curvas de titulação e poder construir um algoritmo capaz de determinar o ponto final. As amostras se encontram na Tabela 5.

Tabela 5: Amostras de vinho, cerveja e xarope.

Número	Tipo	Marca
1	Cerveja Preta	Xingu
2	Cerveja Preta	Caracu
3	Cerveja Clara	Heineken
4	Cerveja Clara	Bohemia
5	Vinho Tinto de Mesa	Dom Bosco
6	Vinho Tinto Suave	Assemblage
7	Xarope de Glicose	Karo

As amostras de cerveja foram desgaseificadas durante meia hora em banho ultrassônico sem aquecimento antes da realização das medidas. A amostra de vinho Dom Bosco necessitou de diluição para poder ser analisada pois sua concentração de açúcares ultrapassava o limite do método. Foi realizada uma diluição de 1:10 com água. O xarope foi preparado para ser analisado dissolvendo-se cerca de 1,0 g do xarope em 100 mL de água.

Em seguida, todas as amostras seguiram o mesmo procedimento. Em um erlenmeyer foi adicionado 10 mL da solução de sulfato de cobre, 10 mL do complexante Tartarato de sódio e potássio e 2 mL da amostra. Esta mistura foi aquecida até sua ebulição. Após 2 minutos nesta condição, a solução foi resfriada em água corrente por dois a três minutos até que atingisse a temperatura ambiente. Foi adicionada à amostra, então, 10 mL da solução de iodeto de potássio 30%, 10 mL da solução de ácido sulfúrico 28% e 10 mL da solução de amido glicolato de sódio.

Para o titulador automático, uma alíquota de 4,00 mL desta solução preparada foi coletada e adicionada ao béquer para análise. Os parâmetros utilizados foram 10  $\mu\text{L}$  de incremento de volume e 5 segundos de intervalo de tempo. Uma região de interesse de 37 x 38 pixels foi utilizada para as capturas de imagens.

A calibração do instrumento (determinação de sua constante) foi realizada com uma solução 10 g/L de glicose preparada a partir de padrão primário (*Sigma-Aldrich*). O preparo do padrão e sua análise foram realizadas de forma idêntica à descrita para as amostras.

As curvas analisadas foram  $\frac{dR}{dV}$ ,  $\frac{dG}{dV}$ ,  $\frac{dB}{dV}$ ,  $\frac{d^2R}{dV^2}$ ,  $\frac{d^2G}{dV^2}$ ,  $\frac{d^2B}{dV^2}$ .

As análises clássicas foram realizadas tomando-se todo o volume preparado e titulando-se com bureta com a solução de tiosulfato de sódio.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Procedimento de Titulação Preliminar

O procedimento de titulação preliminar foi criado com o objetivo de estimar a posição do ponto final em caso de amostras desconhecidas e, ao mesmo tempo, acelerar o procedimento de titulação. Além disso, com esta estimativa, é possível utilizar menores incrementos de volume nas vizinhanças do ponto final, aumentando a precisão das medidas.

Para avaliar o procedimento, comparou-se os tempos de análise obtidos com e sem o uso desta etapa. Os desvios-padrão também foram comparados, para verificar a influência na precisão ao usar incrementos de volumes menores. A Tabela 6 exhibe estas informações. Estes testes foram realizados com as amostras de solução-padrão preparadas para avaliar os algoritmos.

Tabela 6: Comparação entre titulação preliminar e procedimento comum. Valores de precisão representados pelo desvio-padrão da concentração das amostras.

Titulação	c/ preliminar			s/ preliminar		
	Tempo (s)	$\Delta V$ ( $\mu\text{L}$ )	s (mmol/L)	Tempo (s)	$\Delta V$ ( $\mu\text{L}$ )	s (mmol/L)
Neutralização	155	20	100	448	20	100
Complexação	284	20	0,2	725	50	10
Precipitação	164	20	0,5	560	10	0,1
Oxi-redução	154	10	0,5	520	10	0,5
Açúcares Redutores	762	10	0,2	3295	10	2

A duração das análises foi calculada considerando-se apenas o tempo que leva para realizar a adição de titulante e não a preparação de amostras. Além disso, a duração das titulações preliminares inclui o tempo para análise da amostra de sacrifício e mais o tempo do procedimento comum, para fins de comparação. Pode-se visualizar que esta mudança diminuiu o tempo das análises em uma média de 68% em relação aos valores sem a utilização da titulação preliminar. Um ganho deste tipo permite que um número bem maior de análises possam ser executadas no instrumento mesmo considerando o tempo extra quando se realiza as titulações preliminares. Em procedimentos como a determinação de açúcares redutores, em que é necessário também realizar a titulação de um branco (mais demorado que a análise de amostras), o ganho é dobrado.

É possível verificar também um ganho de precisão em uma das titulações. Com um tempo menor de análise, pode-se escolher valores menores de incremento de volume. Como a titulação automática aqui descrita é um procedimento ponto-a-ponto, isto é, realiza a aquisição de sinal de forma discreta e não contínua, a cada adição de titulante. O incremento de volume funciona então como uma espécie de "resolução" do instrumento e quanto menor for o seu valor, menor irá ser a diferença de volume entre titulações da mesma amostra que obtenham resultados diferentes por um ou dois pontos, diminuindo seu desvio-padrão e melhorando sua precisão. Um dos maiores obstáculos para que se utilize as menores adições de volume é o tempo de análise devido à espera após a adição de cada incremento, a titulação acaba por se tornar tão demorada que o ganho de precisão não é compensado. Foi possível observar este problema para a titulação de complexação que, por utilizar um reagente de baixa concentração (EDTA 0,001 mol/L), acaba por consumir um volume maior de titulante, tornando o procedimento extremamente demorado quando se utiliza um incremento de 10  $\mu\text{L}$ , por exemplo. Com a titulação preliminar, foi possível baixar de 50  $\mu\text{L}$  para 20  $\mu\text{L}$  e obter um aumento da precisão.

No caso da titulação de precipitação, observa-se que houve um aumento do incremento de volume quando a titulação preliminar foi usada. Este aumento refere-se ao fato de que, com 10  $\mu\text{L}$ , a variação do sinal aproxima-se do ruído gerado pela formação de precipitado no béquer e o algoritmo tem dificuldades para identificar o ponto final de titulação.

O algoritmo utilizado pela titulação preliminar é bem simples e todas as titulações testadas usam uma abordagem semelhante, mudando apenas alguns detalhes. De fato, todas as titulações apresentam uma variação significativa de seus valores R, G e/ou B em torno do ponto final de titulação e isto foi utilizado para construir um algoritmo que identificava este momento. Os valores de RGB não são absolutos e uma mesma coloração pode apresentar valores diferentes em câmeras diferentes ou em uma iluminação diferente, uma boa estimativa de volume é atingida quando considera-se um valor limite para alguma das variáveis do sinal. A titulação é interrompida quando este valor é atingido.

Como há mudança de cores durante uma titulação colorimétrica e consegue-se estimar a extensão desta mudança de cores que levam a um ponto final aproximado, pode-se escolher um valor das variáveis que sabemos que será atingido. Por exemplo, é fácil imaginar que os valores de R irão se elevar durante uma titulação de um ácido com uma base na presença do indicador de fenoftaleína, pois a solução ficará rosada. O mesmo pode ser feito com outras titulações. Abaixo se encontram os algoritmos selecionados para cada titulação. É importante salientar que o maior objetivo desta titulação era acelerar o procedimento de titulação normal.

Tabela 7: Algoritmos de titulação preliminar

Titulação	Variável RGB	Limite
Neutralização	G	100
Complexação	R - G	0
Precipitação	G	175
Oxi-redução	R	80
Açúcares Redutores	R	80

A estimativa dos volumes finais das titulações preliminares podem ser avaliadas comparando-se os valores obtidos durante este procedimento e os valores obtidos pela titulação comum. Esta comparação é apresentada na Tabela 8 considerando-se os valores dos erros existentes entre um e outro.

Tabela 8: Erros da titulação preliminar

Titulação	Volume Estimado ( $\mu\text{L}$ )	Volume Real ( $\mu\text{L}$ )	Erro (%)
Neutralização	1025	1000	+2,50
Complexação	1100	1000	+10,00
Precipitação	1080	1000	+8,00
Oxi-redução	932	1000	+6,76
Açúcares Redutores	1876	1721	+9,00

Pode-se verificar que as diferenças são pequenas e que a adição mais rápida de 80% desse volume final estimado pela titulação preliminar é razoável pois todos os erros se encontram em uma faixa menor do que essa. Vale destacar que, parte das diferenças observadas se devem à

dificuldade de homogeneização durante uma adição de volume tão grande rapidamente, por isso a diferença entre os volumes da titulação de complexação, por exemplo, que tem seu algoritmo preliminar idêntico ao da titulação comum. Como já foi dito, o maior objetivo seria diminuir o tempo das análises e não obter a maior precisão durante este procedimento. Tendo isto em vista, pode-se dizer que o procedimento de titulação preliminar atingiu seu objetivo.

## 4.2 Estudos de Avaliação dos Algoritmos

Para obter pontos finais de titulação que fossem os mais próximos possíveis dos pontos determinados pela titulações clássicas e visualizar a possibilidade de determinar automaticamente estes pontos, comparou-se os resultados obtidos através dos erros de titulação para cada algoritmo testado. Além disso, os resultados foram comparados estatisticamente.

### 4.2.1 Titulação de Neutralização

A reação considerada, de ácido acético com hidróxido de sódio (um ácido fraco com uma base forte) na presença do indicador fenoftaleína, tem seu ponto final determinado pelo momento em que a cor rosa é identificada na solução e permanece por mais de 30 segundos. Esta reação, de determinação simples e conhecida, foi estudada com o objetivo de observar o comportamento do sinal RGB em uma mudança de cores facilmente identificável (do incolor para o rosa) e verificar se esta podia ser detectada por transformações de 1º e 2º derivadas [5].

A viragem está associada ao ponto de equivalência da reação pode ser visualizada com as imagens obtidas de uma titulação de uma amostra de vinagre na Figura 9, recortadas em um tamanho igual à região de interesse de 37 x 38 *pixels*.

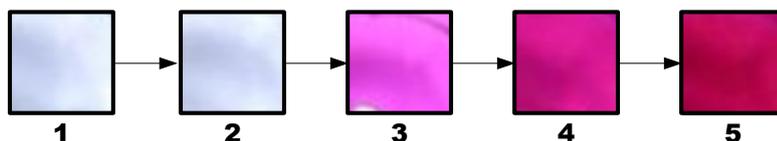


Figura 9: Intervalo de 5 adições de NaOH na titulação de uma amostra de vinagre.

O gráfico na Figura 10 mostra a variação dos sinais R, G e B com a extensão da titulação com o volume de NaOH adicionado. Observa-se grande variação dos sinais em torno do momento de mudança de cores que a solução passa. Além disso, o momento em que a coloração rosa surge é identificado por uma pequena elevação no valor de R (ponto 3), a coloração se intensifica (passando do ponto final) apenas quando as variáveis G e B assumem, respectivamente, valores abaixo de 160 e 100.

Capturando imagens e relacionando-as com o sinal RGB obtido é possível analisar a mudança de coloração em cada adição de volume e, desta forma, escolher que algoritmo teria o menor erro de titulação e precisão adequada com os volumes considerados. De posse destas informações, buscou-se manipular matematicamente os valores de R, G e B para gerar uma curva com um ponto distinto o suficiente dos demais (para detecção) associado com a condição de equivalência com exatidão e precisão adequadas. As primeiras e segundas derivadas fornecem um resultado

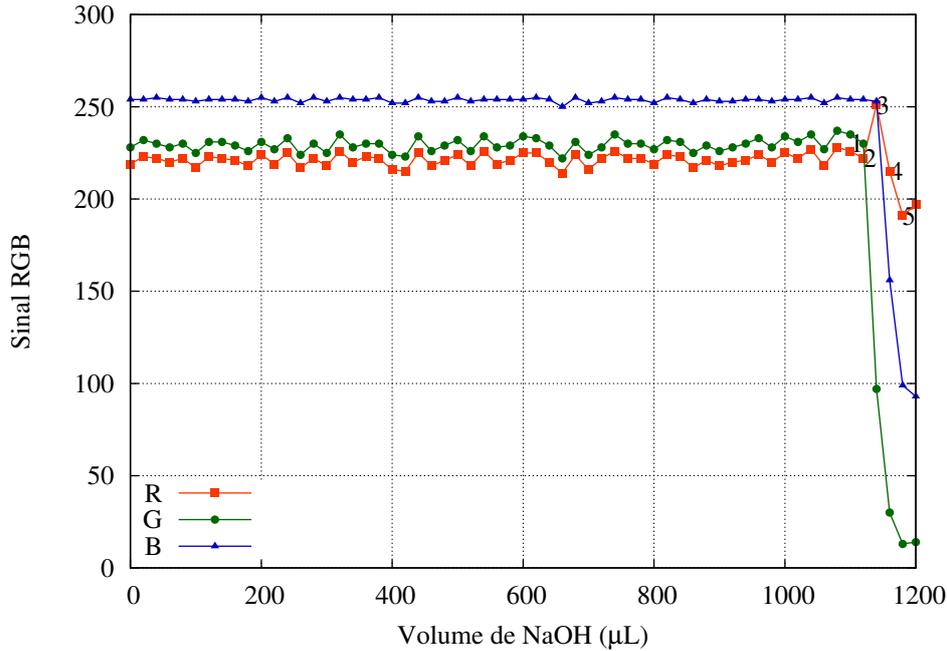


Figura 10: Curva de titulação de neutralização.

conhecido na literatura [5] e foram as transformações realizadas. Os resultados dos algoritmos foram comparados à titulação clássica de neutralização realizada. A Tabela 9 mostra os valores para cada amostra realizada.

Tabela 9: Resultados das análises de titulação clássica de amostras de vinagre.

Amostra	[H.Ac] (%v/v)	s
1	4,49	0,05
2	4,34	0,02
3	4,46	0,03
4	4,67	0,06
5	4,48	0,03
6	4,46	0,03

Enquanto, a Tabela 10 reúne as informações dos valores de concentração (C), desvio-padrão (s) e erros relativos às suas respectivas medidas clássicas (E%) obtidas para as amostras de vinagre considerando todos os 6 algoritmos construídos e comparando o resultado obtido com suas respectivas titulações clássicas.

Tabela 10: Resultado das análises de neutralização de vinagre determinado por 6 algoritmos. Valores de concentração (C) em %v/v.

Algoritmo			Vinagre 1			Vinagre 2			Vinagre 3			Vinagre 4			Vinagre 5			Vinagre 6		
Tipo	Deteção	Threshold	C	s	E(%)															
dR	Min.	-1	4,47	0,05	0,45	4,32	0,01	0,46	4,47	0,01	0,22	4,69	0,02	0,43	4,47	0,01	0,22	4,47	0,02	0,22
dG	Min.	-2	4,39	0,06	2,23	4,46	0,04	2,76	4,62	0,04	3,59	4,85	0,09	3,85	4,62	0,03	3,03	4,59	0,02	2,69
dB	Min.	-2	4,47	0,09	0,45	4,32	0,01	0,46	4,45	0,05	0,67	4,69	0,05	0,43	4,45	0,02	0,67	4,47	0,01	0,22
d <sup>2</sup> R	Zero	-0,3	4,47	0,05	0,45	4,34	0,03	0,00	4,49	0,03	0,67	4,69	0,03	0,43	4,45	0,03	0,67	4,47	0,02	0,22
d <sup>2</sup> G	Zero	-0,5	4,35	0,06	3,12	4,44	0,03	2,30	4,60	0,05	3,14	4,83	0,08	3,43	4,60	0,03	2,68	4,62	0,03	3,59
d <sup>2</sup> B	Zero	-0,5	4,47	0,05	0,45	4,32	0,02	0,46	4,45	0,03	0,22	4,70	0,02	0,64	4,47	0,03	0,22	4,48	0,03	0,45

Em todos os algoritmos construídos, o desvio-padrão dos resultados apresentou valores com-

parados (ou menores em alguns casos) àqueles obtidos durante a titulação clássica. Este fato mostra que não houve perdas de precisão por diminuir o volume de amostra de 4 mL para 130  $\mu$ L. Um procedimento de titulação clássico tem sua precisão garantida pelo grande volume de amostra, assim torna-se mais difícil passar do ponto final pela quantidade de matéria presente [18]. Provavelmente, este é um efeito da grande precisão da seringa microvolumétrica que permite a adição de volumes extremamente pequenos (na ordem de  $\mu$ L) compensando o pequeno volume de amostra presente no bquer.

Os resultados mostram que boa exatidão e precisão podem ser obtidas quando o algoritmo utilizado para detecção do ponto final é construído a partir das derivadas dos valores de R e B. A Tabela 10 mostra que erros abaixo de 0,5% foram obtidos para as derivadas de ambas. Apesar de que valores um pouco melhores foram obtidos para as derivadas de R, não há como descartar que a variável B também pode ser satisfatoriamente utilizada para este fim. Os resultados obtidos pelas derivadas de G foram os que apresentaram maior erro e sempre eram superiores aos valores da titulação clássica. Aparentemente, os valores de G demoram um pouco mais para variar e revelar o ponto final. Conclui-se então que a variável G não é adequada para realizar esta determinação.

Os algoritmos também foram testados através do erro obtido em uma amostra de concentração exatamente conhecida, neste caso, uma solução de biftalato de potássio 0,1 mol/L. A Tabela reúne os resultados obtidos por cada algoritmo nesta determinação.

Tabela 11: Resultados das análises de titulação da amostra de biftalato de potássio 0,10 mol/L.

Algoritmo	[H.Ac] (%v/v)	s	Erro (%)
$\frac{dR}{dV}$	0,1001	0,002	0,10
$\frac{dG}{dV}$	0,1033	0,001	3,33
$\frac{dB}{dV}$	0,1001	0,001	0,10
$\frac{d^2R}{dV^2}$	0,1001	0,002	0,10
$\frac{d^2G}{dV^2}$	0,1029	0,001	2,90
$\frac{d^2B}{dV^2}$	0,1002	0,001	0,20

Novamente, os melhores resultados foram obtidos pelos algoritmos das variáveis R e B, sendo que os algoritmos de G apresentam um erro sistemático, os algoritmos sempre determinam um volume do ponto final um pouco maior do que o real. O algoritmo construído com a 1º derivada de R apresentou resultado de ótima exatidão e precisão conseguindo determinar corretamente a concentração de biftalato de potássio, juntamente com a 1º derivada de B. A variável R, no entanto, não possui grande variação de seus valores em torno do ponto de equivalência. Há uma variação média de 15% contra 38% da variável B, fazendo com que seu *threshold* seja pequeno e mais suscetível à interferências externas. Como mencionado, apesar de que a 1º derivada ter atingido um ótimo resultado, não há como descartar que os outros algoritmos avaliados (exceto por aqueles da variável G) também poderiam ser utilizados para esta determinação, o erro considerado foi bem pequeno para estas operações. Além disso, é possível que a maior variação de B consiga melhores resultados para amostras de menores concentrações. Optou-se pelo algoritmo construído com a 1º derivada de B por alguns motivos detalhados a seguir.

1. Facilidade de implementação: É um pouco mais fácil calcular a 1º derivada de uma função do que calcular sua 2º derivada. De fato, para calcular a 2º derivada numericamente é

necessário que se calcule a primeira. Além disso, a biblioteca de métodos do C# já inclui uma implementação para obter os máximos e mínimos de funções, enquanto que é um pouco mais difícil implementar um método que calcule o volume onde a segunda derivada é zero (entre os dois extremos da curva).

2. Os erros obtidos com a derivada de B foram pequenos, menores do que 1%.
3. A variável B é mais sensível do que R, fazendo com que seu *threshold* seja maior em módulo e menos suscetível a ruídos. É possível que concentrações menores consigam ser determinadas.
4. Os algoritmos construídos com o sinal G, apesar de apresentar maior variação de seu valor (87%), apresentaram erros sistemáticos.

Os resultados obtidos com a 1º derivada de B foram comparados com sua titulação clássica em um teste-t apresentados na Tabela 12. Como os valores do teste-t não ultrapassaram o valor crítico do teste com 2 graus de liberdade (4,3003) conclui-se que não há diferenças significativas em um nível de 95% de confiança para nenhuma das amostras analisadas, entre os métodos clássico e automático.

Tabela 12: Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de 1º derivada de R.

Amostra	Automática		Clássica		Teste-t 95%	Erro Relativo (%)
	[H.Ac] (%v/v)	s	[H.Ac] (%v/v)	s		
1	4,47	0,05	4,49	0,05	0,4899	+0,45
2	4,32	0,01	4,34	0,02	1,5492	+0,46
3	4,45	0,01	4,46	0,03	0,5448	+0,22
4	4,69	0,02	4,67	0,06	0,5478	+0,46
5	4,45	0,01	4,48	0,03	0,5478	+0,22
6	4,47	0,02	4,46	0,03	0,4804	+0,22

Realmente, é possível comparar os resultados obtidos pelas imagens da titulação de neutralização com biftalato de potássio com a curva da 1º derivada de B e notar que o ponto final indicado pelo algoritmo é o mesmo que o indicado pelas imagens. Esta comparação pode ser feita com as imagens da Figura 11 e 12.

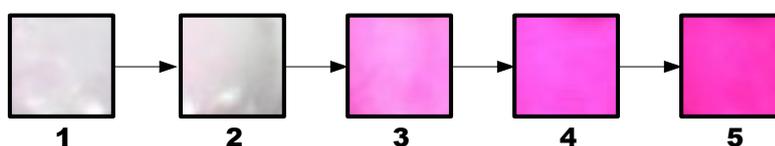


Figura 11: Intervalo de 5 adições de NaOH na titulação de biftalato de potássio.

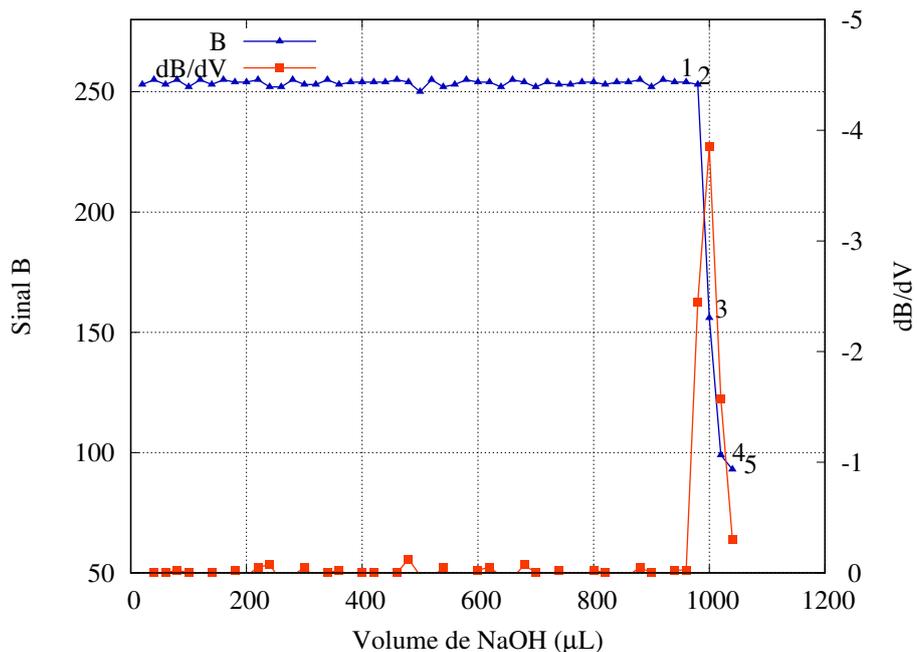


Figura 12: Sinal de B e sua 1<sup>o</sup> derivada em relação ao volume de NaOH utilizado.

Podemos concluir que este algoritmo determina satisfatoriamente a quantidade de ácido acético em amostras diluídas (vinagres) de acordo com a metodologia clássica existente e adaptada para uso automático em um titulador com detecção baseada em imagens digitais. O sistema foi capaz de analisar com exatidão e precisão amostras incolores e coloridas.

#### 4.2.2 Titulação de Complexação

A determinação de dureza da água em uma titulação de complexação com EDTA e indicador negro de eriocromo T possui algumas características que tornam interessante estudar o comportamento de seu sinal RGB. Frequentemente, o ponto final de amostras diluídas não é nítido o suficiente, o que costuma gerar um erro de titulação maior e uma menor precisão [1]. Vários procedimentos são descritos na literatura para melhorar esta nitidez. Isto se deve principalmente ao dicroísmo [1] que a solução exibe próximo ao seu ponto final. A Figura 13 exemplifica este comportamento em um intervalo de 5 adições de EDTA 0,001 mol/L na titulação de uma amostra de água mineral.

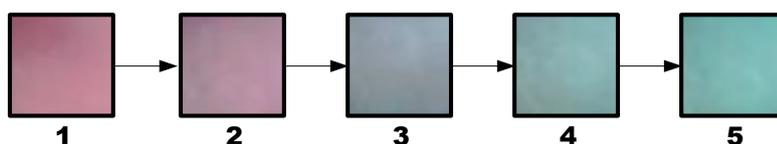


Figura 13: Intervalo de 5 adições de EDTA na titulação de dureza de água mineral.

Um analista experiente utiliza o dicroísmo da solução a seu favor pois antecipa a presença do ponto final e consegue identificar com precisão o momento em que a solução assume apenas a coloração azul do indicador EBT devido à sua relativa alta intensidade de coloração. Quando as

concentrações de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  são pequenas, a intensidade de cores é menor, tornando mais difícil identificar o momento em que apenas a cor azul permanece em solução.

Neste contexto, buscou-se estudar o comportamento do sinal RGB das titulações de água mineral no sentido de obter um algoritmo capaz de determinar com exatidão e precisão seu ponto final de titulação, fazendo uso ou não da característica de dicroísmo. Amostras de água mineral normalmente possuem uma baixa dureza (<60 mg/L) e são naturalmente boas candidatas para estas análises. O gráfico da Figura 14 exibe o comportamento do sinal RGB de uma destas titulações.

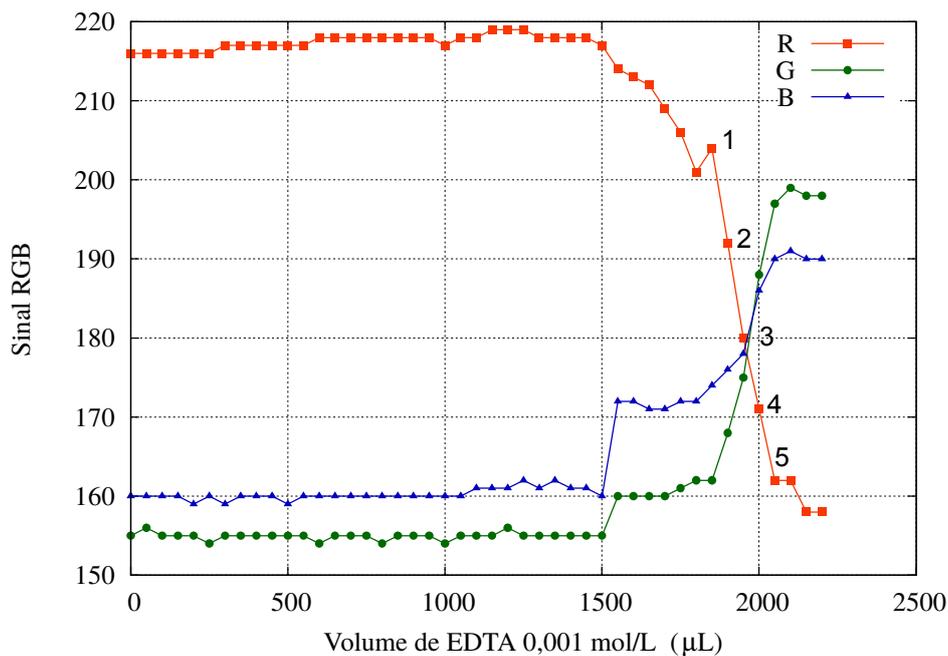


Figura 14: Curva de titulação de complexação.

Ao avaliar este sinal, percebe-se que enquanto os valores de R decrescem, os valores de G e B se elevam quando da aparição da cor azul. Observando esta particularidade, optou-se por testar combinações destes valores (ou de suas derivadas) além das derivadas individuais. Os pontos finais de titulação encontrados desta maneira foram comparados àqueles obtidos pelo procedimento clássico e o resultado destas análises se encontram na Tabela 13. A Tabela 14 reúne as informações obtidas com a determinação do ponto final das amostras utilizando os algoritmos considerados.

Tabela 13: Resultados das análises de titulação clássica de amostras de água mineral.

Amostra	Dureza (mmol/L)	s
1	1,54	0,01
2	1,01	0,01
3	0,85	0,01
4	1,44	0,01
5	0,85	0,01

Tabela 14: Resultado das análises de dureza de água mineral determinado por 7 algoritmos. Valores em de concentração(C) em mmol/L.

Algoritmo			Água 1			Água 2			Água 3			Água 4			Água 5		
Tipo	Deteção	Threshold	C	s	E(%)	C	s	E(%)	C	s	E(%)	C	s	E(%)	C	s	E(%)
$\frac{dR}{dV}$	Mín.	-0,20	1,54	0,01	0,00	0,99	0,01	-1,65	0,85	0,01	0,00	1,45	0,01	0,69	0,86	0,02	1,18
$\frac{dG}{dV}$	Máx.	0,15	1,54	0,01	0,00	1,03	0,01	1,98	0,85	0,01	0,00	1,46	0,02	1,39	0,87	0,02	2,35
$\frac{dB}{dV}$	Máx.	0,10	1,54	0,01	0,00	1,02	0,02	0,99	0,84	0,02	-1,57	1,46	0,02	1,39	0,86	0,02	1,18
$\frac{dR}{dV} - \frac{dG}{dV}$	Mín.	-0,30	1,54	0,01	0,00	1,02	0,02	0,99	0,85	0,01	0,00	1,45	0,01	0,69	0,86	0,02	1,18
$\frac{dB}{dV} - \frac{dR}{dV}$	Máx.	0,25	1,54	0,01	0,00	1,01	0,02	0,00	0,85	0,01	0,00	1,45	0,01	0,69	0,86	0,02	1,18
$\frac{dG}{dV} + \frac{dB}{dV} - \frac{dR}{dV}$	Máx.	0,40	1,54	0,01	0,00	1,02	0,02	0,99	0,85	0,01	0,00	1,45	0,01	0,69	0,86	0,02	1,18
R - G	Zero	0	1,54	0,01	0,00	1,01	0,01	0,00	0,84	0,01	-0,78	1,46	0,01	1,62	0,86	0,01	1,18

Todos os algoritmos proporcionam bons valores de precisão, novamente demonstrando a capacidade da seringa microvolumétrica ao realizar titulações com pequenos volumes de amostra. A precisão, indicada pelo desvio-padrão de todas as medidas encontraram-se na faixa de 0,01 a 0,02 mmol/L, de acordo com o procedimento clássico.

Para uma titulação de complexação, o sinal RGB não passa por grande variação de sinal. Em média, ao longo de toda a análise, os valores de R, G e B variam 45%, 25% e 15% respectivamente. Isto reflete na escolha dos valores dos *thresholds* dos algoritmos construídos com derivadas. Se a variação dos valores de R, G e B não forem grandes o suficiente, seus máximos (ou mínimos) são menores e *thresholds* menores devem ser selecionados para interromper o procedimento. Desta forma, o processo se torna mais suscetível a ruídos e possui menores chances de detectar corretamente o ponto final da análise de soluções diluídas.

Neste contexto, buscou-se avaliar qual destes algoritmos conseguia determinar corretamente a concentração das amostras (de acordo com a titulação clássica) e também sua capacidade de detecção automática do ponto final. Pode-se observar também que os maiores valores (em módulo) de *threshold* foram obtidos pelos algoritmos construídos com a adição ou subtração das derivadas do sinal RGB. Além disso, o algoritmo construído com  $\frac{dB}{dV} - \frac{dR}{dV}$  proporcionou os menores erros percentuais e, em 3 amostras, obteve resultado igual à titulação clássica.

Um problema surge quando tenta-se avaliar, por quaisquer motivos, a titulação automática com um incremento de volume menor. Para os ensaios com a solução de  $Mg^{2+}$  1000 ppm, foi utilizado um incremento de volume de 20  $\mu$ L para identificar que tipo de efeito esta mudança provocaria em uma solução de concentração conhecida e elevada o suficiente para desconsiderar efeitos de uma diluição excessiva. Nestes casos, o que se observa (Figura 15) é uma dificuldade natural de identificar o ponto final pela mudança gradual em que se sucede a passagem de uma cor para outra. Mesmo observando as fotografias uma a uma, fica difícil identificar com clareza onde a coloração muda do roxo para o azul.

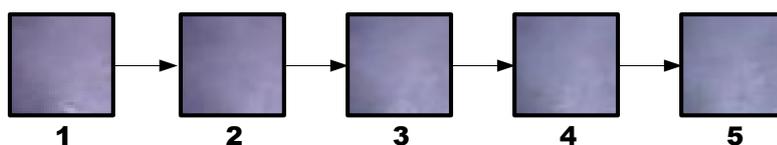


Figura 15: Intervalo de 5 adições de EDTA na titulação automática de  $Mg^{2+}$  1000 ppm.

Já havia sido observado para as titulações com 50  $\mu$ L de incremento de volume, a pequena

variação dos valores de R, G e B no momento das mudanças de coloração e que efeito isto provoca em suas derivadas. Realmente, nestes casos, o que ocorre é que não é possível determinar o ponto final baseado nestes algoritmos. Conforme o gráfico da Figura 16 exemplifica, não há um ponto nestas curvas suficientemente distinto que possa ser utilizado para parar a titulação automaticamente e nem calcular o ponto final. Como os valores de RGB apresentam gradientes pequenos, suas derivadas são pequenas e pouco distinguíveis dos ruídos do equipamento.

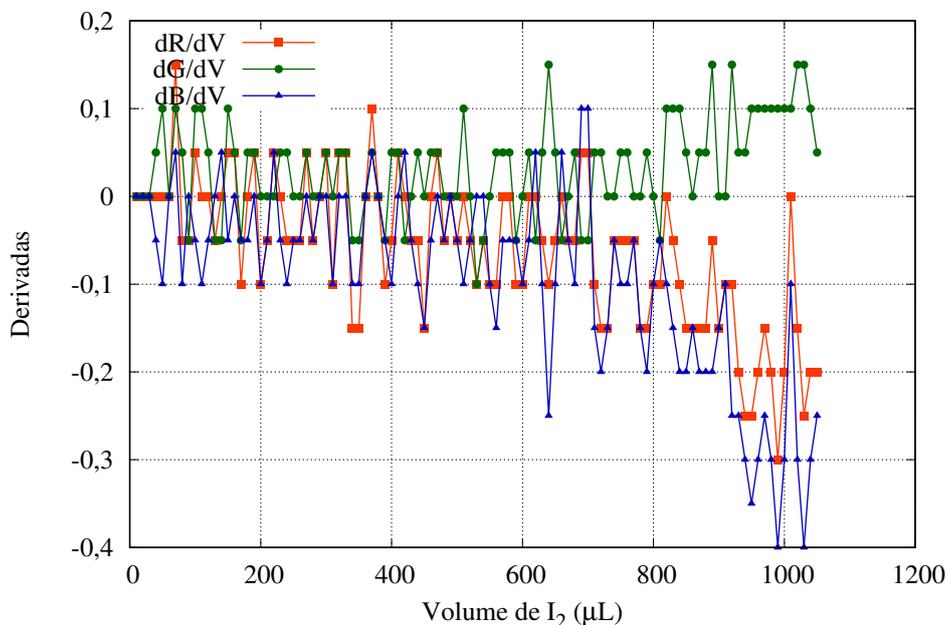


Figura 16: Sinal das 1º derivadas de R,G e B de uma titulação de complexação com 20 µL de incremento de volume.

De todos os algoritmos construídos, apenas aquele que não depende de nenhuma derivada conseguiu determinar o ponto final da solução padrão com boa precisão e exatidão utilizando um incremento de volume de 20 µL. Inicialmente, foi pensado que pela variação menor dos sinais, o valor de R - G talvez não convergisse para o *threshold* determinado de 0. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos para este algoritmo.

Tabela 15: Resultados da titulação com detecção automática da solução de Mg<sup>2+</sup> 1000 mg/L com EDTA 0,001 mol/L.

Parâmetro	Valor
Volume de EDTA gasto (mL)	2,033
[Mg <sup>2+</sup> ] encontrada (mol/L)	0,0407
[Mg <sup>2+</sup> ] real (mol/L)	0,0410
Erro relativo (%)	1,16
s (mol/L)	0,0002

Por não depender de uma variação e sim de um valor absoluto (o momento onde os valores de R e G são no mínimo iguais), o sinal R - G torna-se um ótimo candidato como algoritmo quando são necessários menores incrementos de volume. O gráfico da Figura 17 exemplifica a forma deste sinal.

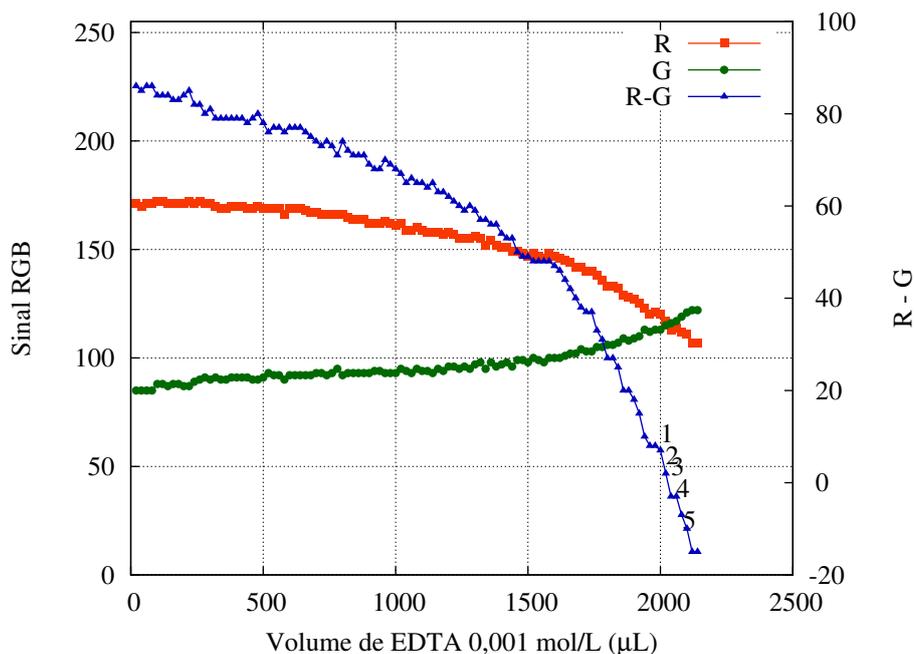


Figura 17: Sinal R, G e a curva (R - G) de uma titulação com detecção automática.

O algoritmo construído com (R - G) foi escolhido para as titulações de dureza da água pelos seguintes motivos:

1. O algoritmo é independente do incremento de volume utilizado. O sinal R - G conseguiu determinar automaticamente o ponto final das titulações tanto das amostras de água quanto das amostras de solução-padrão. Os algoritmos com derivadas conseguiram realizar esta tarefa apenas com o uso de incrementos maiores.
2. O algoritmo conseguiu determinar com boa precisão e exatidão a dureza das amostras de água e da amostra de solução-padrão.
3. O algoritmo é de fácil implementação e possui facilidade de interpretação para a solução de problemas.

Os pontos finais das titulações automáticas de amostras de água mineral foram comparados às suas respectivas titulações clássicas por um teste-t. Não foram identificadas diferenças significativas em um nível de confiança de 95%. O resultado do teste se encontra na Tabela 16.

Tabela 16: Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de (R - G) das amostras de água mineral. GL=2, t-crítico=4,3.

Amostra	Automática		Clássica		Teste-t 95%	Erro Relativo(%)
	Dureza (mmol/L)	s	Dureza (mmol/L)	s		
1	1,54	0,01	1,54	0,01	0	0,00
2	1,01	0,01	1,01	0,01	0	0,00
3	0,84	0,01	0,85	0,01	1,2247	-0,78
4	1,46	0,01	1,44	0,01	0,5695	+1,62
5	0,86	0,01	0,85	0,01	0,5477	+1,18

### 4.2.3 Titulação de Precipitação

Inicialmente, pensou-se que a determinação do teor de cloretos através da titulação com nitrato de prata poderia ser de difícil execução no titulador automático tendo em vista que a formação de precipitado em um volume reduzido como o do béquer de análise (10 mL) tornaria difícil a obtenção de um sinal livre de ruídos. Além disso, a transição de cores empregando-se método de Mohr não é tão nítida quanto de outras titulações, também por causa da existência de precipitado. Nestas condições e analisando as imagens da Figura 18, correspondente à titulação de uma das amostras de água de coco, podemos visualizar que a formação do precipitado de AgCl dá uma certa opacidade à solução e é possível identificar o ponto final pelo aparecimento de uma coloração mais avermelhada correspondente ao cromato de prata.

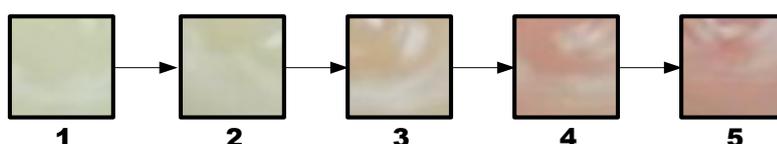


Figura 18: Intervalo de 5 adições de  $\text{AgNO}_3$  na titulação automática para determinações de cloretos.

Buscou-se então avaliar a forma do sinal RGB e que manipulações matemáticas poderiam ser realizadas proporcionando um ponto final condizente com a titulação clássica. A mudança de cores da Figura 18 pode ser relacionada com sua respectiva curva de titulação da Figura 19. O aumento de opacidade da solução pode ser verificado pela elevação lenta de todos os valores R, G e B, ocasionado pela formação de precipitado. Conforme a adição de volume continua, este mesmo fenômeno produz algum ruído na curva, principalmente nos valores de B. Entretanto, pouco ruído é produzido nos valores de R e G evidenciando uma das vantagens deste tipo de detecção, a natureza multivariada do sinal RGB permite que este tipo de obstáculo possa ser contornado quando seleciona-se corretamente a variável de detecção do algoritmo.

Os resultados obtidos pela titulação clássica (Tabela 17) foram comparados àqueles obtidos com os algoritmos para avaliar sua exatidão. Os algoritmos e seus resultados para as amostras de água de coco se encontram na Tabela 18 e foram construídos no sentido de minimizar o ruído do precipitado formado e facilitar a identificação do ponto final. Por curiosidade, também construiu-se algoritmos com a variável de maior ruído (B) para verificar que impacto seria obtido em sua exatidão e precisão.

Tabela 17: Resultados das análises de titulação clássica de amostras de água de coco.

Amostra	$[\text{Cl}^-]$ (mol/L)	s
1	0,043	0,001
2	0,049	0,001
3	0,054	0,001
4	0,048	0,001
5	0,040	0,001

Como mencionado, pensou-se que o ruído e opacidade do precipitado de AgCl seria um problema para a detecção automática do ponto final, principalmente para a variável B. O que se

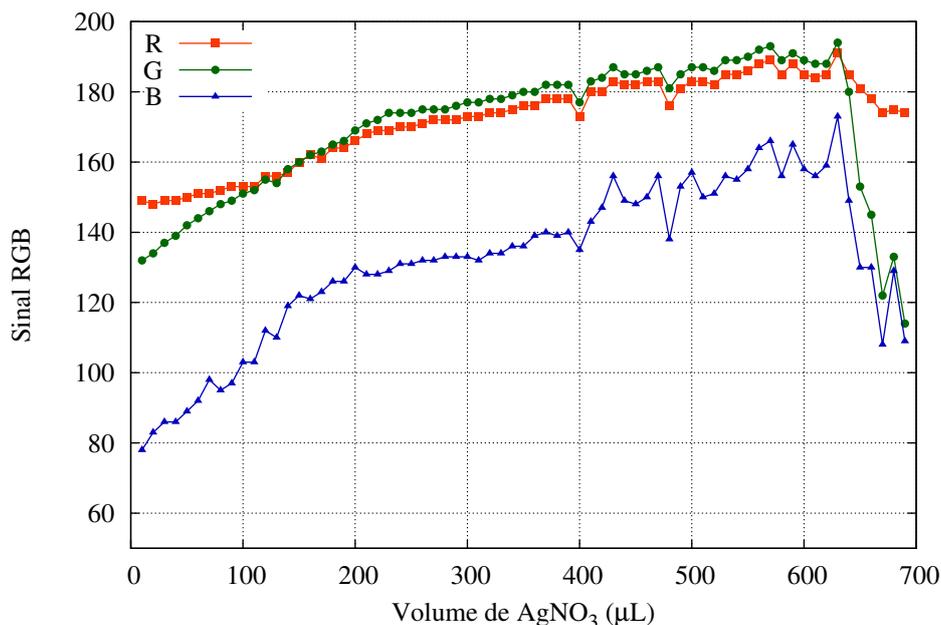


Figura 19: Curva RGB de uma titulação de precipitação.

Tabela 18: Resultado das análises do teor de Cloretos em água de coco determinado por 4 algoritmos. Valores em mol/L.

Algoritmo			AC 1			AC 2			AC 3			AC 4			AC 5		
Tipo	Deteção	Threshold	C	s	E(%)	C	s	E(%)	C	s	E(%)	C	s	E(%)	C	s	E(%)
$\frac{dR}{dV}$	Min.	-1,0	0,043	0,002	-1,16	0,049	0,003	0	0,054	0,002	0,93	0,048	0,0008	0,21	0,039	0,002	-1,18
$\frac{dG}{dV}$	Min.	-1,0	0,043	0,002	-1,16	0,049	0,002	0	0,054	0,002	0,93	0,048	0,002	0,21	0,040	0,002	0
$\frac{dB}{dV}$	Min.	-1,0	0,043	0,003	-1,16	0,049	0,002	0	0,054	0,002	0,93	0,048	0,002	0,21	0,039	0,002	-1,18
$\frac{dR}{dV} + \frac{dG}{dV}$	Min.	-2,0	0,043	0,001	-1,17	0,049	0,002	0	0,054	0,001	0,93	0,048	0,002	0,21	0,040	0,002	-0,77

observou, no entanto, é que todos os algoritmos testados conseguiram determinar corretamente a concentração de cloretos com boa precisão e exatidão. Imaginou-se também que este ruído poderia dificultar a escolha de *threshold* adequado. Em outras palavras, se o ruído fosse capaz de produzir um pico de máximo ou mínimo das derivadas comparável (da mesma magnitude) àquele obtido durante o ponto final da titulação, ficaria muito difícil escolher um *threshold* capaz de diferenciar entre um e outro e a titulação seria interrompida erroneamente.

Para que se tenha segurança durante esta operação é necessário que quaisquer picos nas derivadas gerados por ruído sejam bem inferiores àqueles encontrados para o ponto final. Desta forma, é possível escolher um valor de *threshold* que seja atingido durante o ponto final mas nunca por um ruído de qualquer espécie. Conforme mostra a Figura 20, mesmo o ruído da variável B não é capaz de produzir um pico da mesma magnitude daquele ligado ao ponto final.

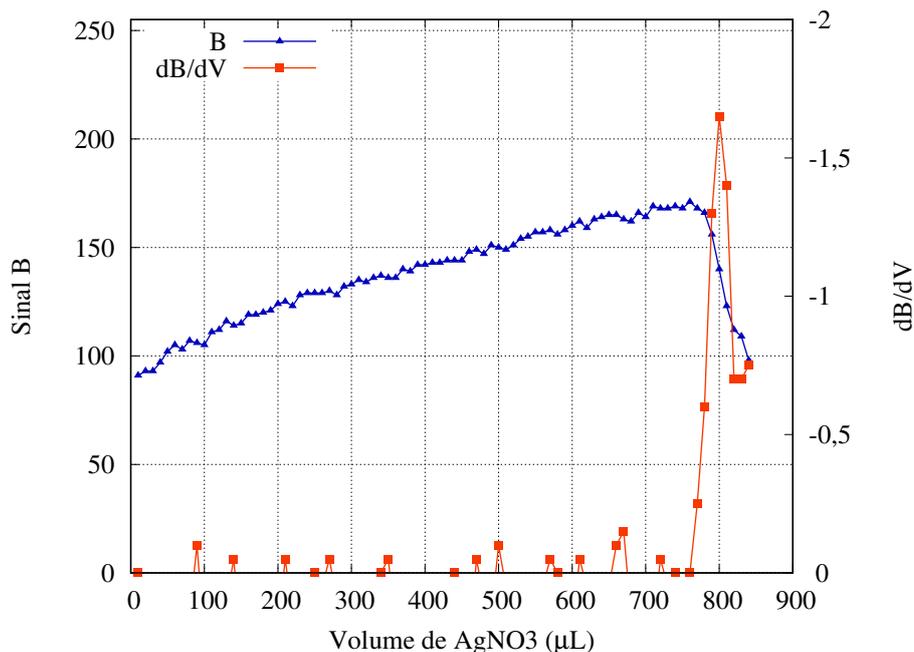


Figura 20: Curva e 1º derivada de B obtida da titulação de uma das amostras de água de coco com  $\text{AgNO}_3$  0,049 mol/L

Mesmo assim, na tentativa de minimizar estes efeitos, criou-se algoritmos baseados na soma dos valores das derivadas. Este ruído está relacionado com as condições de agitação e mistura no béquer de análise e é um tanto aleatório, não há garantias de que este afete todas as variáveis por igual. Já o ponto final de titulação é algo comum ao sinal RGB como um todo e a adição das derivadas ocasiona uma amplificação do valor máximo ou mínimo da curva obtida ao mesmo tempo em que minimiza os ruídos. A curva  $\frac{dR}{dV} + \frac{dG}{dV}$  exemplifica justamente essa tentativa. São as variáveis que apresentam menor ruído e sua adição permite a utilização de um *threshold* maior de -2,0.

Porém, estudando a Tabela 18 verifica-se problemas com esta abordagem. Primeiramente, a determinação feita apenas com a derivada de G conseguiu resultados mais exatos que este algoritmo que, apesar de ser construído com esta derivada, também sofre influência do valor da derivada de R que, em alguns casos, determinou o teor de cloretos com um erro um pouco maior do que aqueles determinados com a 1º derivada de G. Em segundo lugar, esta elevação do *threshold* não é tão vantajosa já que o ruído não apresentou a magnitude imaginada.

Os algoritmos também foram comparados através do erro de titulação de uma solução de NaCl de concentração exatamente conhecida e seu resultado é exibido na Tabela 19. Exceto por aquele construído com a variável B, os outros algoritmos conseguiram determinar corretamente a concentração da solução.

Pelos aspectos levantados e pelo que foi observado, o algoritmo  $\frac{dG}{dV}$  foi selecionado. Não houve necessidade de utilizar as derivadas combinadas. As determinações realizadas com este algoritmo foram comparadas à sua titulação clássica através de um teste-t exibido na Tabela 20. Não houveram diferenças significativas em um nível de confiança de 95 %.

Tabela 19: Resultados das análises de titulação da amostra de NaCl 0,049 mol/L.

Algoritmo	[Cl <sup>-</sup> ] (mol/L)	s	Erro (%)
$\frac{dR}{dV}$	0,049	0,002	0
$\frac{dG}{dV}$	0,049	0,001	0
$\frac{dB}{dV}$	0,048	0,001	2,04
$\frac{dR}{dV} + \frac{dG}{dV}$	0,049	0,002	0

Tabela 20: Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de  $\frac{dG}{dV}$  das amostras de água de coco. GL=2, t-crítico = 4,3.

Amostra	Automática		Clássica		Teste-t	Erro
	[Cl <sup>-</sup> ] (mol/L)	s	[Cl <sup>-</sup> ] (mol/L)	s	95%	Relativo(%)
1	0,043	0,002	0,043	0,001	0	+1,16
2	0,049	0,003	0,049	0,001	0	0,00
3	0,055	0,002	0,054	0,001	0,7746	+0,93
4	0,048	0,0008	0,048	0,001	0	+0,21
5	0,040	0,002	0,040	0,001	0	0,00

Conforme mostram o gráfico e as imagens das Figuras 21 e 22, o algoritmo atende às necessidades de exatidão e precisão de acordo com o procedimento clássico.

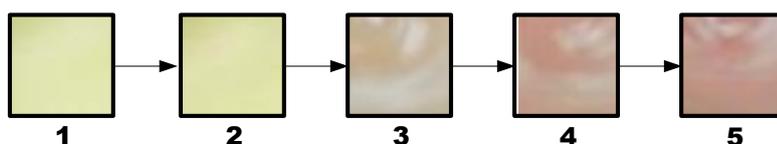


Figura 21: Intervalo de 5 adições de AgNO<sub>3</sub> na titulação com algoritmo implementado para determinações de cloretos.

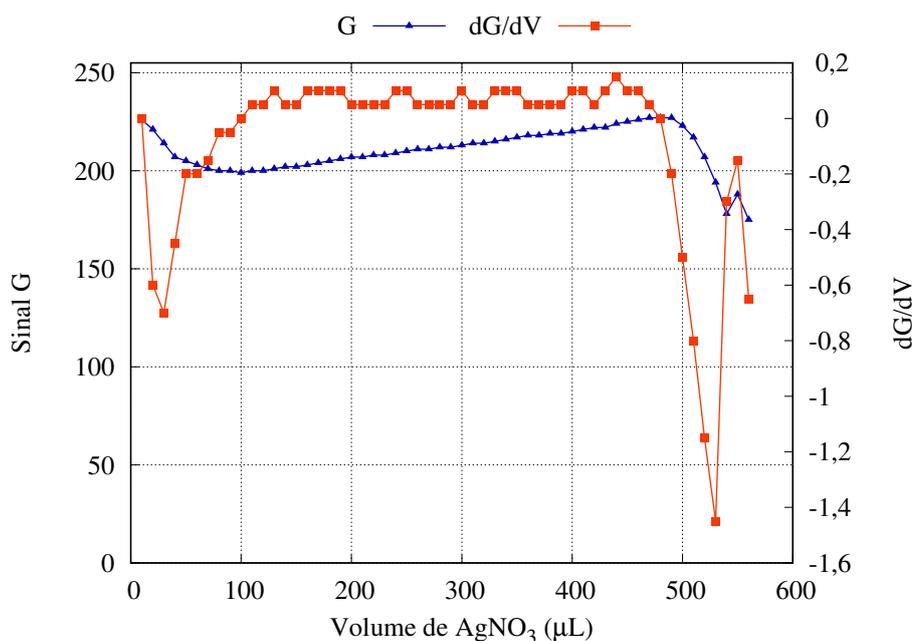


Figura 22: Curva obtida da titulação de 1 mL de NaCl 0,049 mol/L com AgNO<sub>3</sub> 0,049 mol/L

#### 4.2.4 Titulação de Oxi-redução

A determinação de ácido ascórbico nas amostras de vitamina C através da titulação com uma solução de iodo pode, muitas vezes, ser inacurada em função da volatilidade e instabilidade da solução de iodo com que estas titulações são realizadas [18]. De posse desta informação, optou-se por realizar a padronização do iodo imediatamente antes de seu uso com uma solução de tiosulfato de sódio, para checar sua concentração. Além disso, como a mudança de cores da solução sendo titulada é facilmente identificável (a solução passa do incolor para azul), avaliou-se a possibilidade de um único algoritmo poder realizar ambas as detecções, tanto da padronização do iodo como das amostras analisadas. A comparação entre estas duas titulações exemplifica este comportamento nas Figuras 23 e 24.

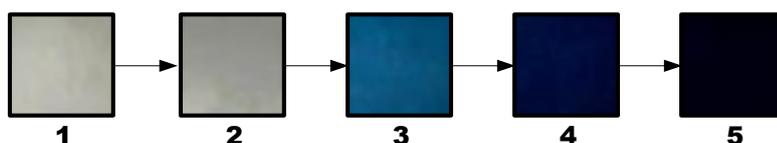


Figura 23: Intervalo de 5 adições de  $I_2$  na titulação automática para determinações de vitamina C.

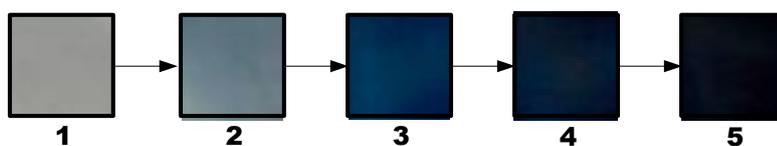


Figura 24: Intervalo de 5 adições de  $I_2$  na titulação automática de padronização do iodo.

Este comportamento também pode ser visualizado nas curvas obtidas para as titulações de vitamina C e a padronização do iodo, exibidas nos gráficos 25. Percebe-se que as curvas são bastante semelhantes pois utilizam o mesmo indicador de amido. Todas as variáveis apresentam grande variação em torno do ponto de equivalência e poderiam ser utilizadas para a construção de curvas embora os valores de R apresentem uma queda um pouco mais acentuada.

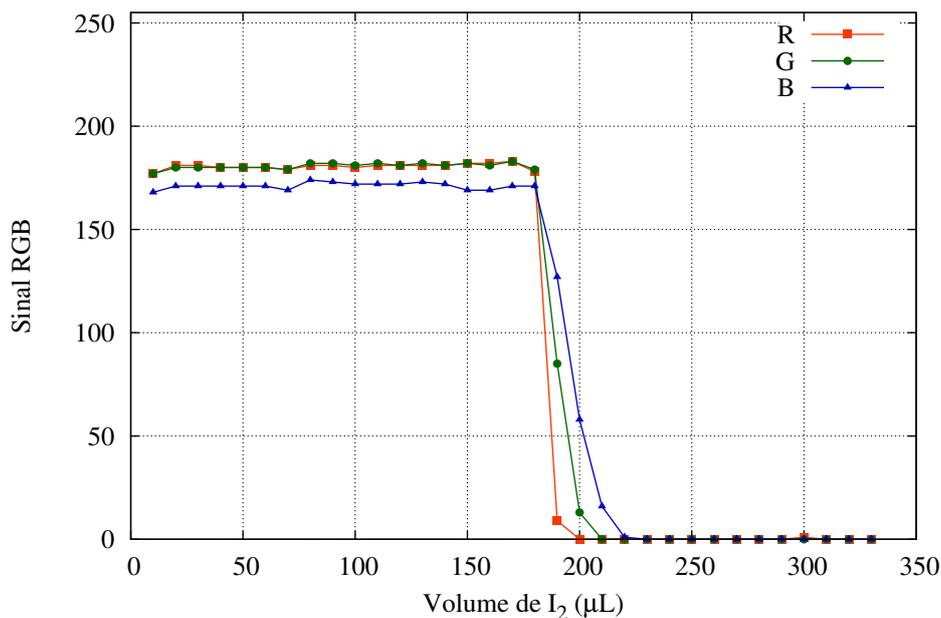


Figura 25: Sinal RGB de uma titulação de oxi-redução de Vitamina C com iodo 0,03 mol/L.

Buscou-se avaliar então as duas titulações para encontrar um algoritmo que conseguisse obter o ponto final das duas reações. Como se trata de um ponto final de fácil identificação, foram testadas somente derivadas simples das variáveis. As Tabelas 21 e 23 possuem as informações a respeito dos algoritmos testados para ambas as titulações. As análises das soluções de iodo foram realizadas quando das análises de vitamina C onde soluções de iodo foram recém-preparadas.

Tabela 21: Resultado das análises de padronização da solução de iodo utilizada. Valores em mol/L.

Algoritmo			Iodo 1			Iodo 2		
Tipo	Detecção	Threshold	C	$\sigma$	Erro	C	$\sigma$	Erro
$\frac{dR}{dV}$	Mín.	-2,0	0,026	0,001	0,0	0,027	0,001	+2,0
$\frac{dG}{dV}$	Mín.	-2,0	0,026	0,001	0,0	0,027	0,001	+2,0
$\frac{dB}{dV}$	Mín.	-2,0	0,026	0,001	0,0	0,026	0,001	0
$\frac{d^2R}{dV^2}$	Zero	0	0,026	0,001	0	0,027	0,001	+2,0
$\frac{d^2G}{dV^2}$	Zero	0	0,026	0,001	0	0,027	0,001	+2,0
$\frac{d^2B}{dV^2}$	Zero	0	0,026	0,001	0	0,027	0,001	+2,0

Os valores encontrados para a solução de iodo foram ligeiramente menores do que o projetado de 0,03 mol/L e confirmado pela titulação clássica desta solução. Estas análises indicam que os algoritmos são suficientemente exatos para realizar esta determinação e a 1<sup>o</sup> derivada de B é capaz de calcular os resultados exatamente. Os resultados das titulações clássicas de vitamina C se encontram na Tabela 22.

Tabela 22: Resultados das análises de titulação clássica de amostras de vitamina C.

Amostra	[AA] (mol/L)	s
1	0,0233	0,001
2	0,0231	0,001
3	0,0228	0,001

Tabela 23: Resultado das análises de ácido ascórbico nos comprimidos de Vitamina C para 6 algoritmos. Valores em mol/L.

Algoritmo			Vit 1			Vit 2			Vit 3		
Tipo	Deteção	Threshold	C	$\sigma$	Erro	C	$\sigma$	Erro	C	$\sigma$	Erro
$\frac{dR}{dV}$	Mín.	-1,0	0,023	0,001	+1,29	0,023	0,001	+0,62	0,023	0,001	-0,95
$\frac{dG}{dV}$	Mín.	-1,0	0,024	0,001	+3,00	0,024	0,001	+3,72	0,025	0,001	+7,66
$\frac{dB}{dV}$	Mín.	-1,0	0,024	0,001	+3,00	0,024	0,001	+3,72	0,024	0,001	+3,36
$\frac{d^2R}{dV^2}$	Zero	0	0,023	0,001	+1,29	0,023	0,001	+1,29	0,023	0,001	-0,95
$\frac{d^2G}{dV^2}$	Zero	0	0,024	0,001	+3,00	0,024	0,001	+3,72	0,025	0,001	+7,66
$\frac{d^2B}{dV^2}$	Zero	0	0,024	0,001	+3,00	0,024	0,001	+3,72	0,024	0,001	+3,66

O mesmo não foi observado durante a titulação automática de amostras de vitamina C. Os *thresholds* utilizados para a padronização de iodo tiveram que ser reduzidos, pois o sinal gerado durante esta titulação foi muito menos intenso, necessitando que um valor menor fosse escolhido para as 1º derivadas. Entretanto, observa-se que todas as derivadas utilizadas são capazes de obter o ponto final com boa exatidão. Além disso, é possível observar que todos os erros obtidos com as variáveis R, B ou G apresentam valores positivos detectando uma quantidade maior do que a titulação clássica devido à variação em seus sinais só ser detectada com excesso de I<sub>2</sub> (aumento da cor azul).

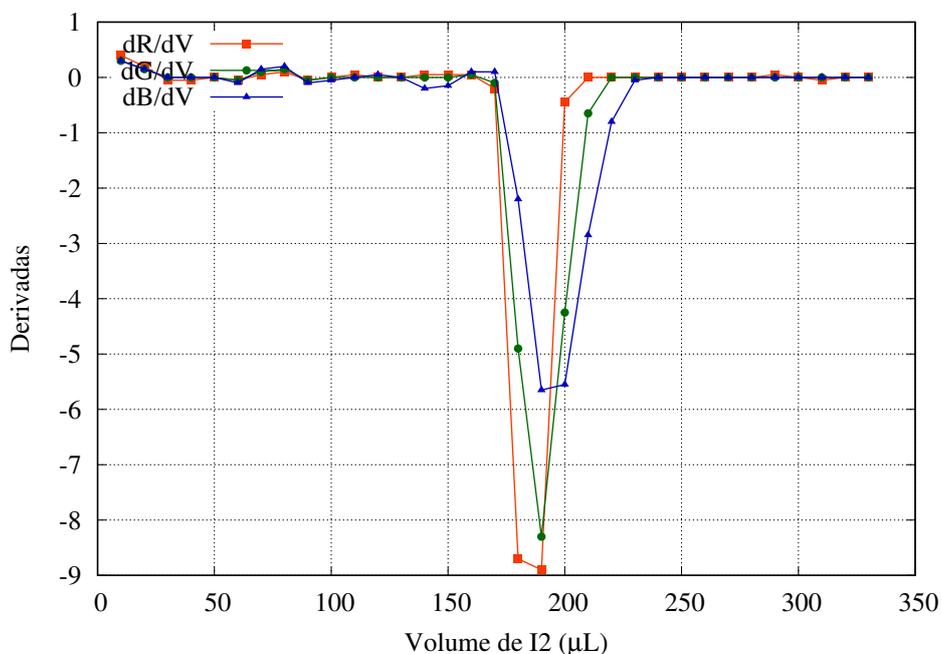


Figura 26: Derivadas de R, G e B em uma titulação de vitamina C com iodo 0,03 mol/L.

A Figura 26 demonstra que mesmo o sinal de R sendo mais intenso que o de outras variáveis,

o mesmo ponto final é obtido para todas as derivadas. O erro de titulação de uma solução-padrão de ácido ascórbico de 0,05 mol/L também foi analisada e comparada pelos algoritmos. Os resultados são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Resultados das análises de titulação da amostra de ácido ascórbico 0,05 mol/L.

Algoritmo	[AA] (mol/L)	s	Erro (%)
$\frac{dR}{dV}$	0,050	0,002	0
$\frac{dG}{dV}$	0,051	0,001	2,00
$\frac{dB}{dV}$	0,051	0,001	2,00
$\frac{d^2R}{dV^2}$	0,050	0,002	0
$\frac{d^2G}{dV^2}$	0,051	0,002	2,00
$\frac{d^2B}{dV^2}$	0,051	0,002	2,00

Os melhores resultados foram obtidos pelas derivadas de R e sua 1º derivada foi escolhida como algoritmo para esta determinação pelos seguintes motivos. Os valores de R são aqueles que passam por maiores mudanças durante o ponto final e  $\frac{dR}{dV}$  possui melhor capacidade para determinar concentrações menores sem risco de interromper prematuramente a titulação. Suas derivadas conseguiram os melhores resultados e esta curva é fácil de implementar e interpretar. A 1º derivada de R também conseguiu determinar com boa exatidão a concentração de iodo na solução de titulante e este também foi o algoritmo escolhido para esta análise. O algoritmo selecionado foi comparado à sua titulação clássica através de um teste-t exibido na Tabela 25. Não foram encontradas diferenças significativas em um nível de confiança de 95%.

Tabela 25: Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de  $\frac{dR}{dV}$  das amostras de vitamina C. GL=2, t-crítico=4,3.

Amostra	Automática		Clássica		Teste-t 95%	Erro Relativo(%)
	[AA] (mol/L)	s	[AA] (mol/L)	s		
1	0,023	0,001	0,02330	0,001	0,00168	+1,29
2	0,023	0,001	0,02314	0,001	0,00135	+1,62
3	0,023	0,001	0,02322	0,001	2,415	-0,95

As imagens e sua respectiva curva de titulação são exibidas nas Figuras 27 e 28.

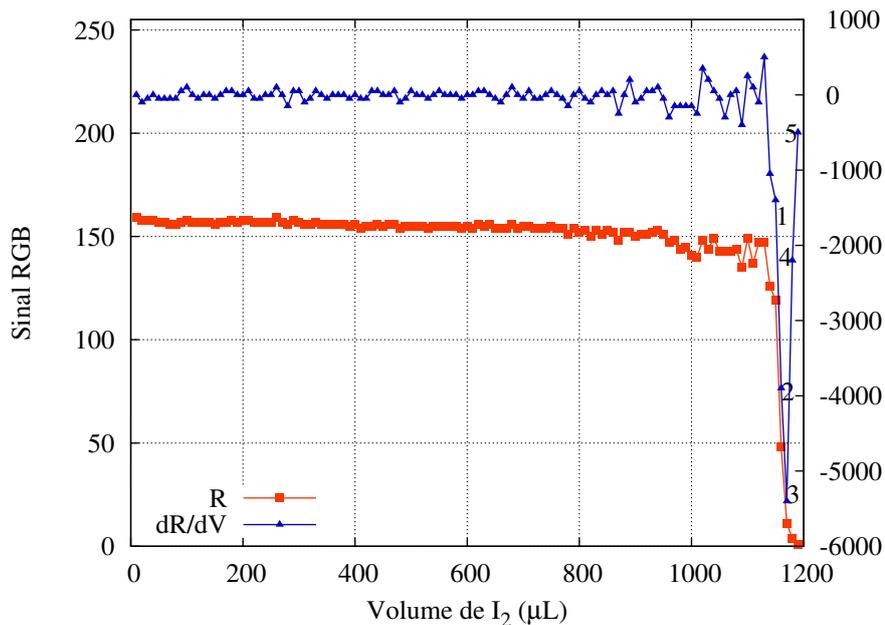


Figura 27: Sinal R e sua primeira derivada na titulação automática de oxi-redução para vitamina C.

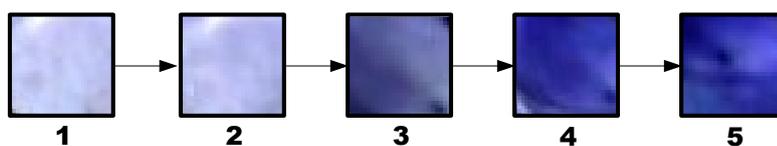


Figura 28: Intervalo de 5 adições de I<sub>2</sub> na titulação com algoritmo implementado para determinações de ácido ascórbico.

#### 4.2.5 Titulação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores conforme a metodologia descrita por Rebelein [45], é, de muitas formas semelhante a determinação de ácido ascórbico nos comprimidos de vitamina C. Este método também se trata de uma titulação de oxi-redução utilizando iodo como reagente e amido como indicador porém existem algumas diferenças que devem ser destacadas.

Neste procedimento o açúcar redutor reage com uma solução de Cu<sup>2+</sup> em excesso e o restante é reduzido por uma solução de iodeto de potássio. O iodo formado, por sua vez, é determinado em uma titulação com tiosulfato de sódio na presença do indicador de amido em meio ácido. Para determinar a quantidade de açúcares, realiza-se a titulação de um branco para saber a quantidade de íons Cu<sup>2+</sup> presentes em um mesmo volume de solução preparada com água destilada. A concentração de açúcares é determinada pela diferença entre as duas titulações.

Isto implica em algumas dificuldades quando se tem a intenção de quantificar estas substâncias de forma visual. Uma delas refere-se à reação entre o açúcar redutor e o complexo formado pelo sal de Rochelle (tartarato de sódio e potássio) e os íons Cu<sup>2+</sup> em solução. Esta

etapa deve ser conduzida sob aquecimento por um período de tempo determinado e depois, a solução é resfriada para temperatura ambiente. Além disso, a reação de complexação do cobre com o tartarato não é completamente conhecida. Devido à dificuldade de reprodutibilidade desta etapa tendo em vista o grande número de equipamentos disponíveis para estas operações, recomenda-se que seja determinado uma constante de relação entre os íons  $\text{Cu}^{2+}$  complexados e os açúcares redutores através da quantificação de uma solução de concentração exatamente conhecida de glicose 10 g/L.

Outra dificuldade refere-se a necessidade de quantificar açúcares redutores em amostras coloridas. Esta metodologia é bastante utilizada na titulação de vinhos e mostos, amostras que podem ser naturalmente escuras. Em procedimentos deste tipo que envolvem a titulação de um branco, deve-se tomar cuidados para que a mesma referência de coloração do ponto final seja utilizada em ambos. Em amostras intensamente coloridas, onde outros compostos afetam a coloração da solução, esta distinção nem sempre pode ser realizada.

Além disso, a coloração pode ser tão intensa que o indicador de amido não consegue determinar com clareza o ponto final. Em virtude disto, recomenda-se que amostra seja descolorida com carvão ativado. Esta etapa é considerada pouco reprodutível e pode impactar o resultado final [45]. Há também o problema de absorção do iodo presente na amostra pelas moléculas de amido [1] e por isso o indicador deve ser adicionado apenas próximo do ponto final de titulação.

A titulação de açúcares redutores possui um variado número de aplicações na indústria, principalmente nas indústrias de açúcar e bebidas, e estes desafios tornam interessante estudar o comportamento de seu sinal RGB e construir um ou mais algoritmos capazes de realizar a determinação automática do ponto final com exatidão e precisão frente a um número variado de amostras. Para isso, considerações foram feitas a respeito do indicador utilizado (seção 4.2.5.1), determinação e cálculo da constante de padronização K (seção 4.2.5.2) e testes dos algoritmos para amostras incolores (seção 4.2.5.3) e coloridas (seção 4.2.5.4).

#### **4.2.5.1 Avaliação e escolha do indicador**

Inicialmente, as titulações seriam realizadas com amido como indicador porém ao observar o formato do sinal RGB (Figura 29) e as possíveis complicações em seu uso para esta determinação (amostras coloridas e absorção do iodo), imaginou-se que o indicador amidoglicolato seria adequado para solucionar estes problemas ao mesmo tempo em que obtém um sinal RGB mais distinto e intenso do que o com amido.

Devido às dificuldades existentes no uso do indicador de amido nas titulações de Rebelein, imaginou-se que as mesmas dificuldades seriam observadas na titulação automática. As imagens da Figura 30 mostram uma titulação de uma amostra de glicose fazendo uso do indicador de amido. É possível identificar que a titulação necessita de muitas adições de titulante para que a mudança de coloração ocorra completamente. É de se esperar então que a variação dos valores de R, G e B não seja muito acentuada, verificado no gráfico da Figura 29.

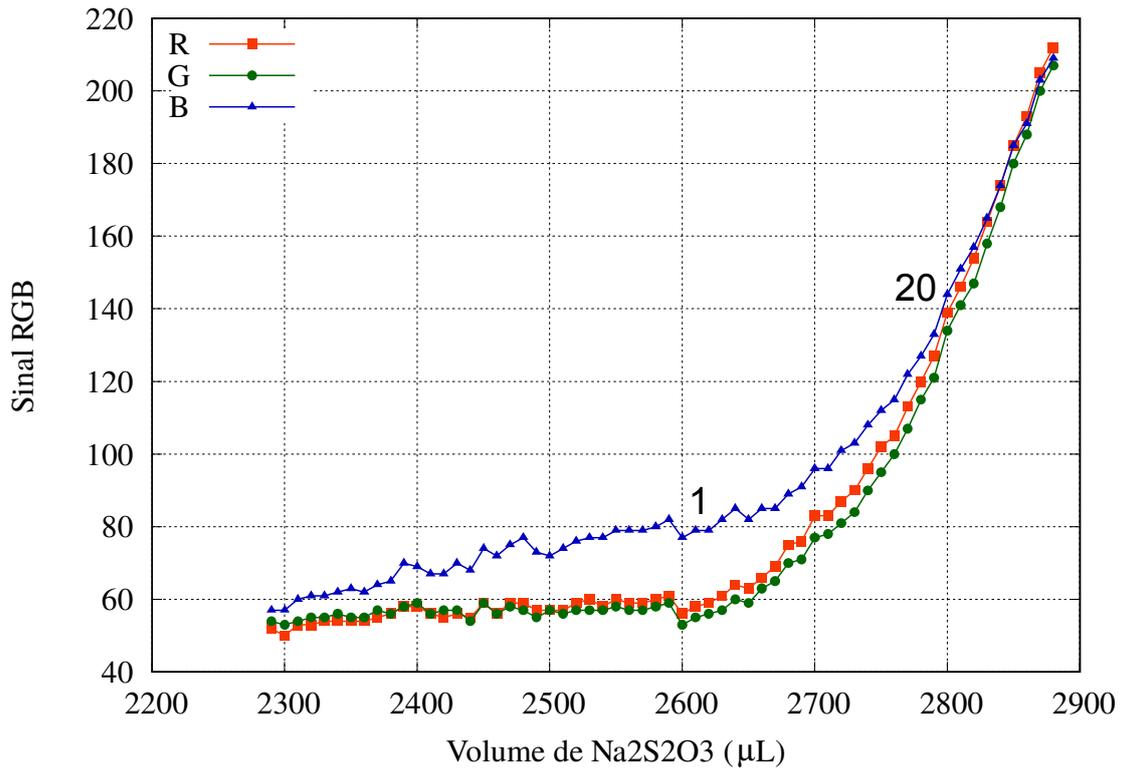


Figura 29: Sinal RGB de uma amostra de glicose na titulação utilizando indicador amido.

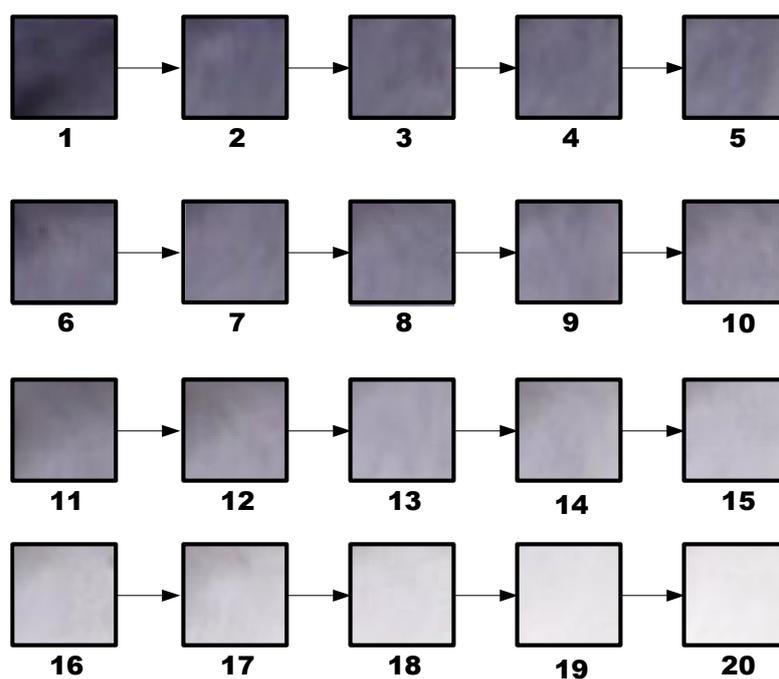


Figura 30: Intervalo de 20 adições de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  na titulação de uma amostra de glicose utilizando indicador amido.

O formato do sinal RGB se assemelha àquele obtido para uma titulação espectrofotométrica onde o ponto final é dado por uma transformação de Gram do sinal considerado [18] e o cálculo de suas derivadas não é adequado para a construção de um titulador automático (Figura 31). Nestes casos, as derivadas do sinal RGB nunca assumem valores muito distintos do ruído da própria titulação e não é possível selecionar nem um *threshold* e nem um ponto final através destas curvas.

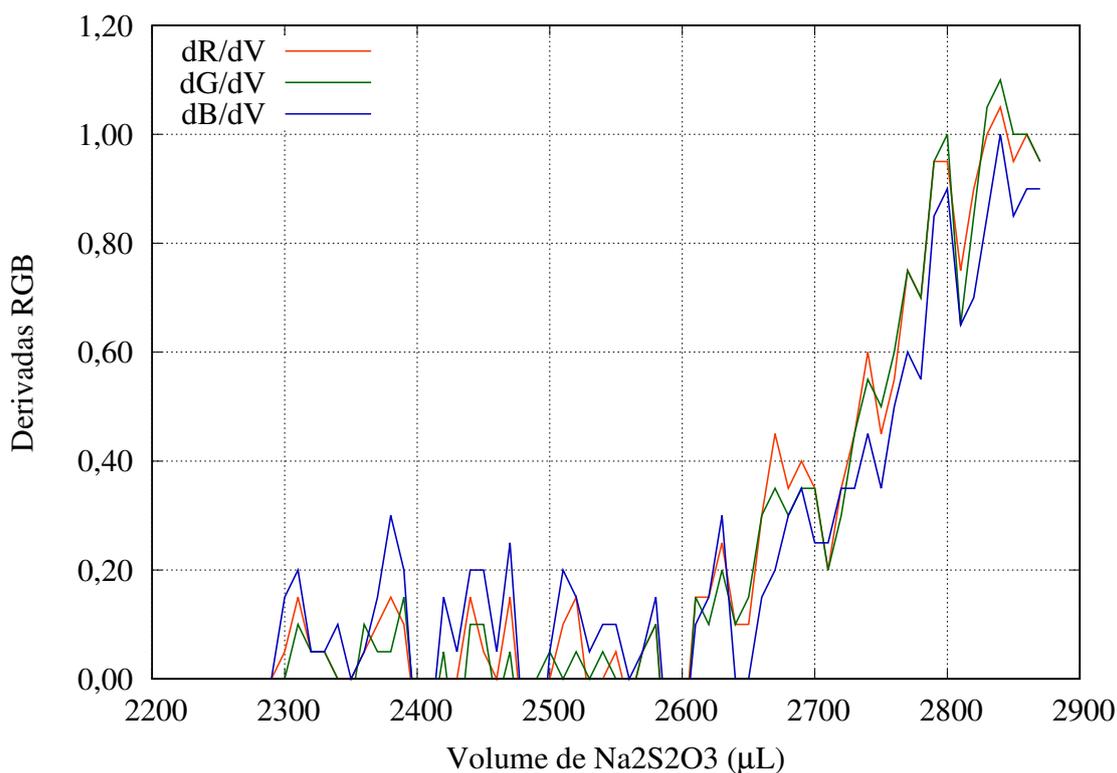


Figura 31: Sinal das derivadas de R,G e B de uma amostra de glicose na titulação utilizando indicador amido.

Diferentes das outras titulações estudadas, os valores destas derivadas elevam-se conforme a titulação prossegue e não existe um pico distinto que sinalize o fim da titulação. Estabelecer um *threshold* para que se interrompa o procedimento pode ser arriscado tendo em vista que o sinal também é bastante ruidoso. A chance de que a titulação seja interrompida prematuramente nas vizinhanças do *threshold* é maior.

Seria possível construir um algoritmo capaz de realizar a determinação da concentração de açúcares redutores através de uma transformação de Gram, porém todo o sistema para interromper automaticamente a titulação é baseado em encontrar um ponto distinto em uma curva capaz de detectar o momento da mudança de coloração da amostra. Viabilizar um novo modo de realizar isso poderia consumir uma enorme quantidade de tempo. Por este motivo, buscou-se na literatura alternativas de indicadores.

O amidoglicolato de sódio é um amido modificado e pode substituir este indicador em titulações de oxi-redução. Este indicador possui a vantagem de ser bem mais solúvel e estável que uma solução de amido, permanecendo ativa por vários meses. Além disso, a coloração do composto formado pelo íon  $I_3^-$  com o amidoglicolato é bem mais intensa, sugerindo que este indicador possa ser utilizado para determinar açúcares em amostras intensamente coloridas. As imagens da Figura 32 exemplificam este comportamento na titulação de uma amostra de glicose. O mesmo número de *frames* foi utilizado para comparação da rapidez com que a viragem ocorre em ambas as titulações.

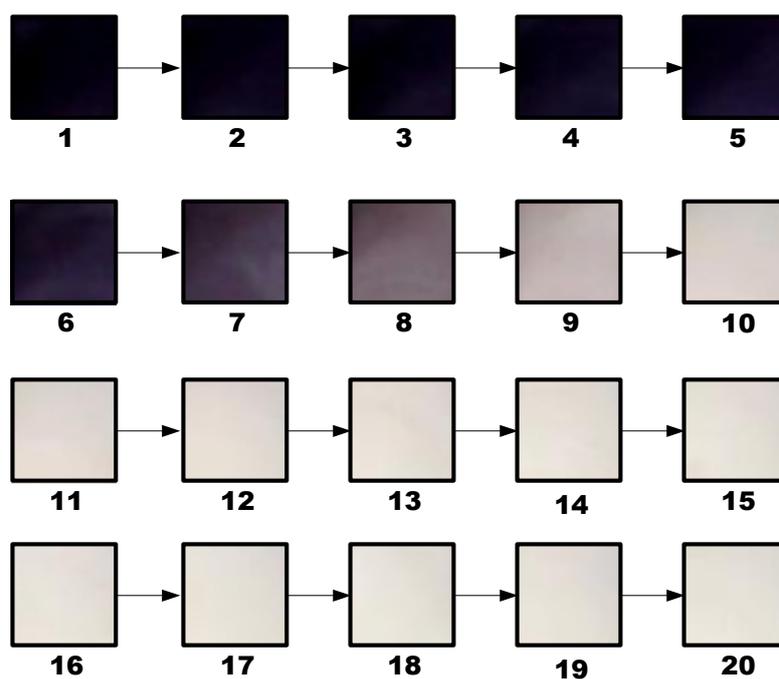


Figura 32: Intervalo de 20 adições de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  na titulação de uma amostra de glicose utilizando indicador amidoglicolato de sódio.

A transição de cores é muito mais rápida e intensa com este indicador e o sinal RGB assume uma forma sigmoidal semelhante às titulações de neutralização e oxi-redução. Além disso, a coloração obtida é de um azul muito mais intenso e vai se transformando em um lilás conforme a titulação avança. Tudo isto faz com que suas derivadas fiquem com um sinal bem distinto quando ocorre a mudança de cores. A Figura 33 exibe o comportamento da derivada da variável B.

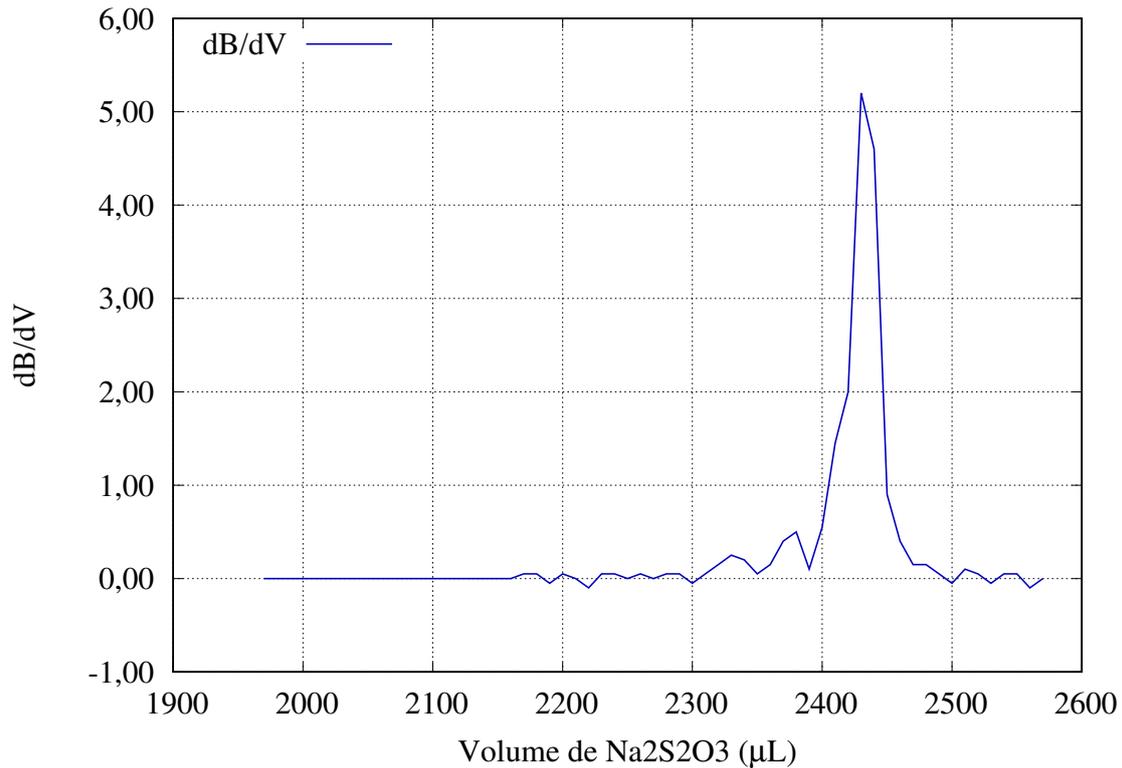


Figura 33: Derivada de B de uma amostra de glicose na titulação utilizando indicador amidoglicolato de sódio.

Tendo em vista estas condições, o indicador de amidoglicolato de sódio atende as necessidades e, além disso, pode ser adicionado antes de iniciar as titulações sem nenhum efeito de absorção do amido, este indicador foi utilizado em todos os testes subsequentes.

#### 4.2.5.2 Determinação da constante de padronização (K)

Para que seja possível realizar a determinação de açúcares redutores, é necessário reagir uma determinada quantidade de amostra com sulfato de cobre. Isto é realizado na presença de um complexo do metal com tartarato de sódio e potássio e necessita de aquecimento por um tempo determinado para que a reação se complete. Tendo em vista a dificuldade de reprodutibilidade associada à esta reação (vidrarias, equipamentos e tempos diferentes de aquecimento e resfriamento), os analisadores potenciométricos necessitam de uma calibração para minimizar estes efeitos. Este procedimento foi testado para a titulação automática RGB.

Normalmente, isto é realizado através de uma titulação utilizando uma solução de glicose de concentração exata de 10 g/L e determina-se a relação entre os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e os açúcares redutores. Devido às limitações do procedimento, o cobre consegue oxidar apenas uma quantidade determinada de glicose [46]. Valores reportados se encontram na faixa de 5,8 a 6 para o cálculo deste fator [47].

Nesta etapa também aproveita-se para ajustar a quantidade de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em solução pois existe uma determinada quantidade onde a relação estequiométrica entre estes íons e os açú-

cares redutores é praticamente linear, então é desejável que as titulações encontrem-se em determinada faixa. Controlar a quantidade destes também permite que seja controlado a máxima concentração que pode ser avaliada pelo método. Valores de 25-30 mL para a determinação do branco são desejáveis na titulação clássica.

A constante foi obtida através da titulação clássica de uma solução 10 g/L de glicose realizada em triplicata e depois avaliado sua constante de padronização. O valor obtido para a constante K foi de 5,82. A constante foi testada com soluções de 5 e 7,5 g/L de glicose posteriormente. Os resultados se encontram na Tabela 26.

Tabela 26: Resultado das análises para cálculo da constante K. Valores em g/L.

Amostra	[Glicose]	s	Erro (%)
10 g/L	9,93	0,01	-0,67
5 g/L	4,98	0,02	-0,5
7,5 g/L	7,45	0,01	-0,7

Pode-se visualizar que a constante se encontra dentro dos valores reportados e que não foi preciso ajustar a quantidade de íons  $\text{Cu}^{2+}$  presentes em solução. Além disso, com a constante, foi possível avaliar com boa precisão e exatidão as concentrações das soluções de 5,0 e 7,5 g/L.

#### **4.2.5.3 Avaliação do algoritmo de detecção das amostras de cerveja clara, xarope e soro de glicose**

As amostras de cervejas claras, de xarope e soro de glicose, após diluídas, ficaram bem semelhantes e imaginou-se que o mesmo algoritmo seria capaz de determinar o ponto final das titulações consideradas. De fato, como mostra a Figura 34, apesar de haver diferenças na coloração das amostras após sua titulação, a mudança de cor do azul-negro para o creme-branco é suficientemente rápida para que se determine o ponto final com essa variação.

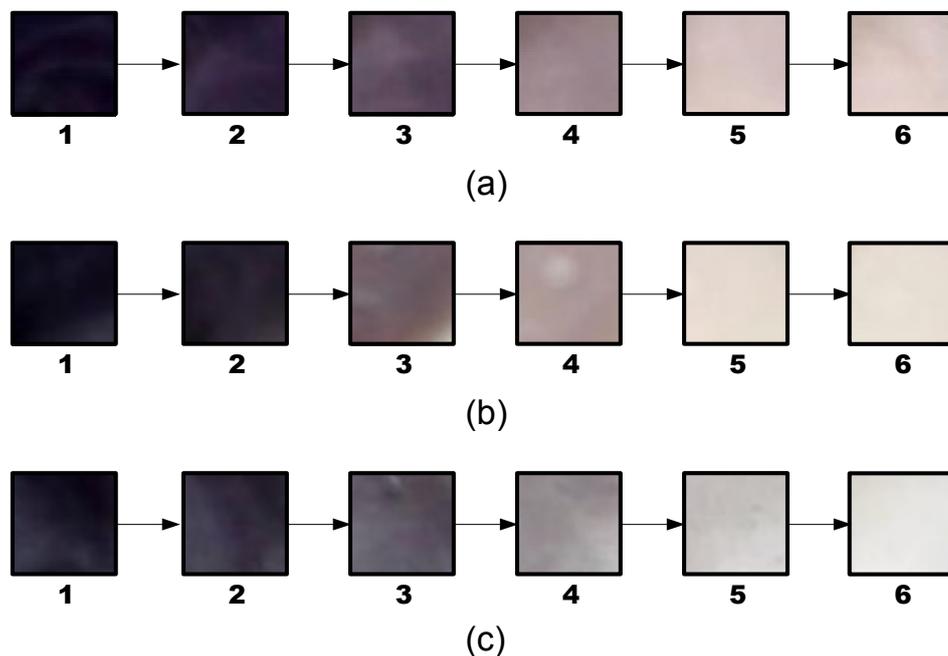


Figura 34: Intervalo de 6 adições de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  na titulação de uma amostra de cerveja clara (a), xarope de glicose (b) e soro de glicose (c).

As diferenças nas colorações nas amostras já tituladas correspondem principalmente ao íon  $\text{Cu}^+$  formado e seus sais que podem ser de diferentes cores (amarelo/laranja/vermelho). A intensidade destas cores depende da quantidade de óxido formado, ou seja, é dependente de cada amostra. Realmente, percebe-se uma pequena diferença na coloração corresponde a quantidade de óxido de cobre existente após a reação. Quanto mais açúcares a solução possuir, maior será a quantidade de óxido formado e conseqüentemente maior será a coloração avermelhada após a viragem do indicador. Porém, a variação do sinal é tão intensa que indica não haver influência na determinação do ponto final. Os gráficos das Figuras 35, 36 e 37 mostram como ocorre a variação do sinal RGB para as titulações de xarope, cerveja clara e soro de glicose.

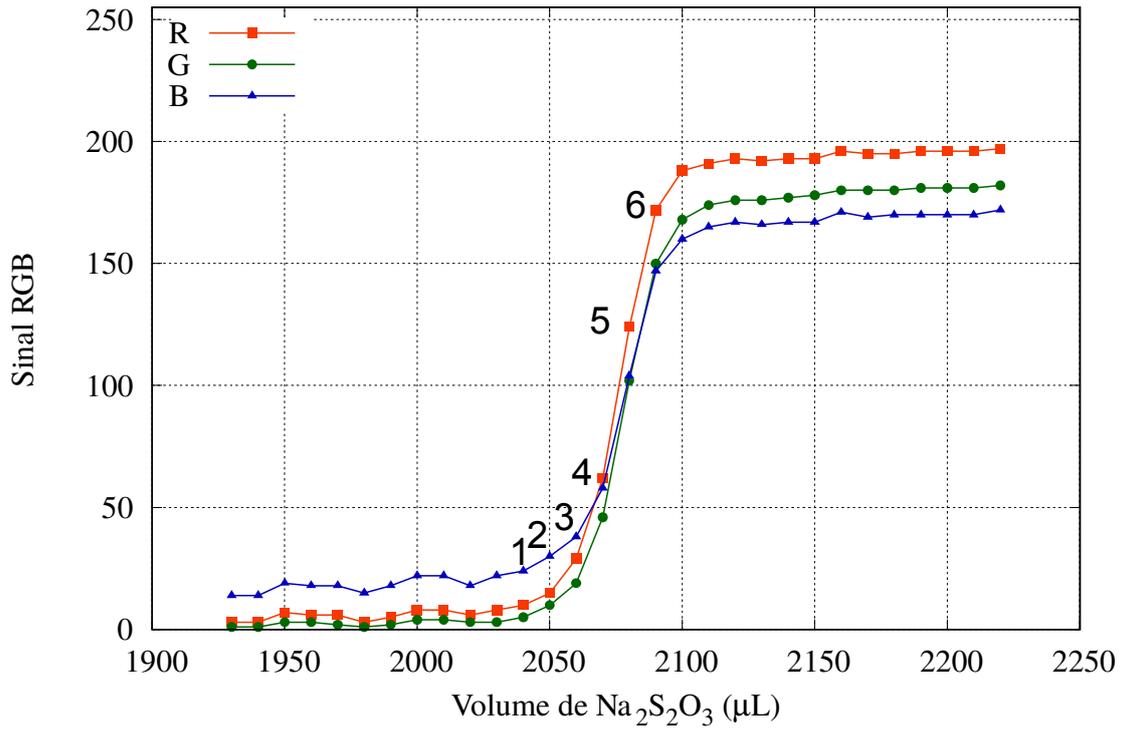


Figura 35: Sinal RGB de uma amostra de cerveja clara na titulação de açúcares redutores com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,055 mol/L.

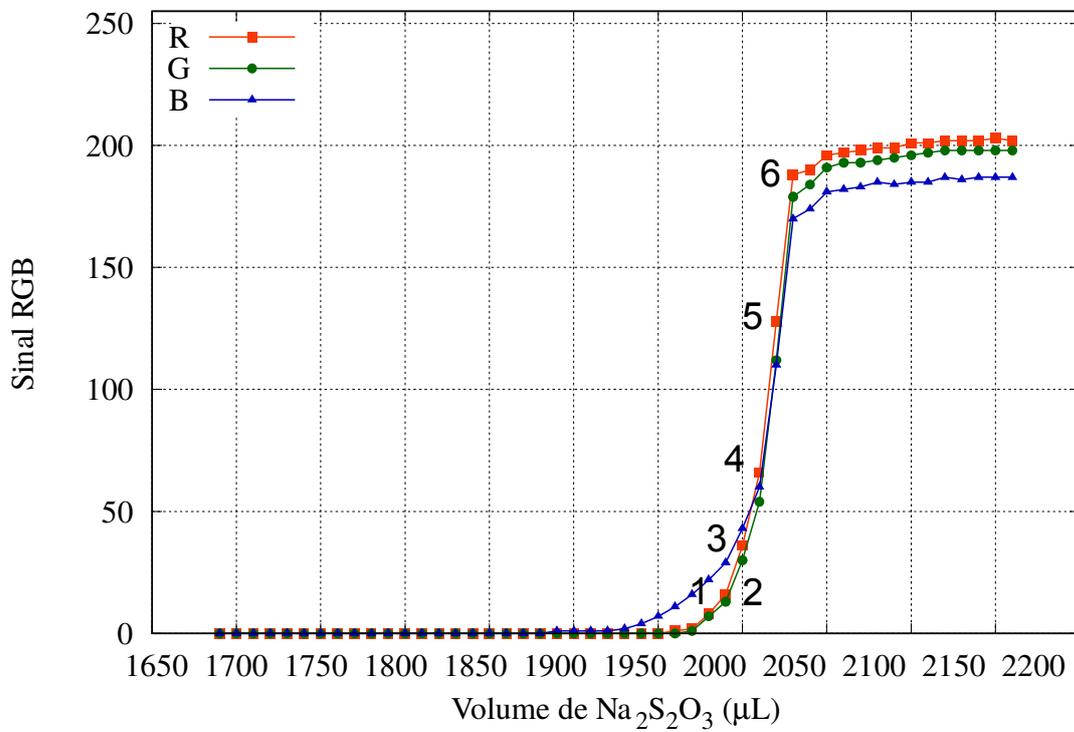


Figura 36: Sinal RGB de uma amostra de xarope de glicose na titulação de açúcares redutores com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,055 mol/L.

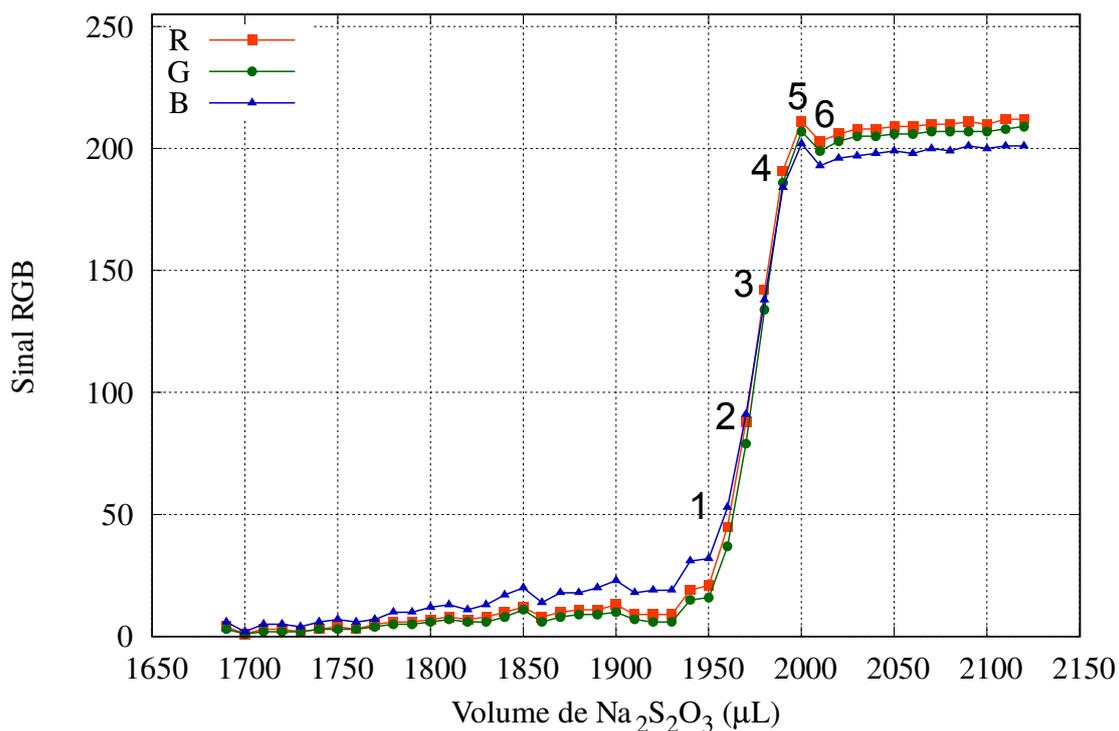


Figura 37: Sinal RGB de uma amostra de soro de glicose na titulação de açúcares redutores com Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,055 mol/L.

Pode-se perceber que, quanto mais intenso é a concentração de açúcares redutores, mais óxido de cobre (I) é formado e, conseqüentemente, um valor maior de R é atingido. Observando as imagens do branco (Figura 38) e seu respectivo sinal RGB (Figura 39), pode-se visualizar que estas diferenças são mínimas e que o formato e até mesmo valores da curva RGB são bastante semelhantes e quantidade de óxido de cobre exerce pouco efeito na curva. Se houvesse muitas diferenças entre as curvas, seria difícil construir um algoritmo adequado para todas as amostras pois a determinação de açúcares redutores é baseada na subtração da titulação do branco com a amostra. A exatidão desta análise depende justamente de selecionar a mesma coloração nas duas titulações para que nenhum erro seja incluído. Curvas muito diferentes entre o branco e as amostras implicaria na construção de dois algoritmos diferentes que poderiam acrescentar erros ao procedimento.

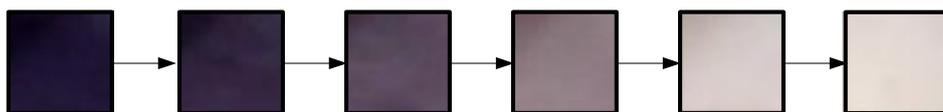


Figura 38: Intervalo de 6 adições de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na titulação do branco.

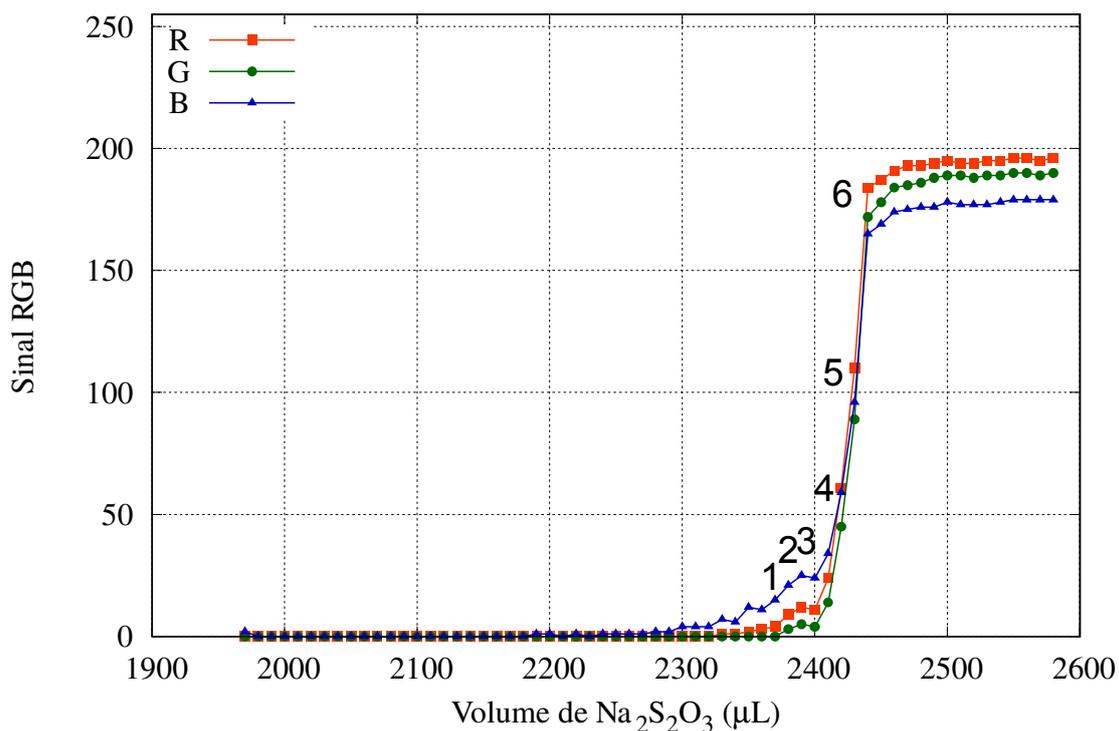


Figura 39: Sinal RGB do branco na titulação de açúcares redutores com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,055 mol/L.

A partir destas suposições e hipóteses, testou-se os seguintes algoritmos encontrados na Tabela 27 com seus respectivos resultados. Pelo formato da curva RGB, supôs-se que 1º e 2º derivadas seriam o suficiente para realizar esta determinação. Os valores do branco também foram inclusos para comparação com as amostras.

Tabela 27: Resultado das análises de determinação das amostras de cervejas clara, xarope de glicose e soro de glicose. Valores em g/L.

Algoritmo			Branco			Xarope de Glicose			Soro de Glicose			Cerveja Clara		
Tipo	Deteção	Threshold	V(µL)	s	E(%)	C	s	E(%)	C	s	E(%)	C	s	E(%)
$\frac{dR}{dV}$	Máx.	2,0	2430	0	+5,05	4,62	0,1	+5,86	9,83	0,1	+4,76	2,83	0,05	-0,35
$\frac{dG}{dV}$	Máx.	2,0	2430	0	+5,05	4,62	0,1	+5,86	9,83	0,1	-4,11	2,87	0,1	+1,11
$\frac{dB}{dV}$	Máx.	2,0	2430	0	+5,05	4,62	0,1	+5,86	9,83	0,1	-4,11	2,87	0,1	+1,11
$\frac{d^2R}{dV^2}$	Zero	0	2428	4	+4,97	4,61	0,1	+5,65	9,83	0,1	-4,11	2,98	0,1	+5,05
$\frac{d^2G}{dV^2}$	Zero	0	2432	4	+5,14	4,61	0,1	+5,65	9,83	0,1	-4,11	2,98	0,1	+5,05
$\frac{d^2B}{dV^2}$	Zero	0	2432	4	+5,14	4,61	0,1	+5,65	9,83	0,1	-4,11	2,98	0,1	+5,05

Os resultados da Tabela 27, apesar de concordarem entre si para os diferentes algoritmos, apresentaram erros da ordem de 5% em comparação com sua titulação clássica (Tabela 28). Pode-se verificar também que os valores de desvio-padrão são bastante elevados. A provável causa destes fenômenos é o fato de que, para analisar a amostra no titulador automático, uma alíquota de 4 mL dos 52 mL era retirada e a quantidade de açúcares redutores na amostra era determinada através da relação de volume existente entre a amostra original e sua alíquota, neste caso, 13. Isto faz com que uma pequena variação do volume de titulante utilizado gere uma grande variação dos valores de concentração de açúcares. Além disso, este desvio-padrão é afetado tanto pelo branco quanto pela amostra, aumentando-o ainda mais. Isto pode ser verificado

para as titulações clássicas também.

A única amostra que apresentou resultados bem próximos de sua titulação clássica foram os da amostra de cerveja. Os algoritmos de 1º derivadas obtiveram resultados próximos a 1%.

Tabela 28: Resultados das análises de titulação clássica de amostras de xarope, cerveja e soro.

Amostra	[AR] (g/L)	s
Xarope de Glicose	4,41	0,2
Soro de Glicose	10,25	0,2
Cerveja Clara	2,84	0,2

O erro de titulação para uma solução padrão de glicose 10 g/L também foi obtido e comparado com os algoritmos escolhidos, exibido na Tabela 29. Para esta amostra, algoritmos baseados nas 1º derivadas obtiveram melhores resultados do que suas segundas derivadas.

Tabela 29: Resultados das análises de titulação de uma solução de glicose 10 g/L.

Algoritmo	[AR] (g/L)	s	Erro (%)
$\frac{dR}{dV}$	9,93	0,05	-0,67
$\frac{dG}{dV}$	9,93	0,05	-0,67
$\frac{dB}{dV}$	9,93	0,05	-0,67
$\frac{d^2R}{dV^2}$	9,73	0,05	-2,67
$\frac{d^2G}{dV^2}$	9,73	0,05	-2,67
$\frac{d^2B}{dV^2}$	9,73	0,05	-2,67

Embora para as amostras o resultado tenha apresentado uma grande variação, mostradas em seu desvio-padrão, isto não foi observado para a amostra de glicose 10 g/L e seu resultado também foi bem melhor em termos de exatidão. Como a amostra de cerveja também apresentou resultados muito próximos a de sua titulação clássica para os três primeiros algoritmos, é provável a existência de algum erro sistemático provavelmente associado as etapa de separar uma alíquota para análise. Entretanto, o algoritmo que apresentou os melhores resultados foi a 1º derivada de R e seu sinal pode ser visualizado nas Figuras 40, 41 e 42.

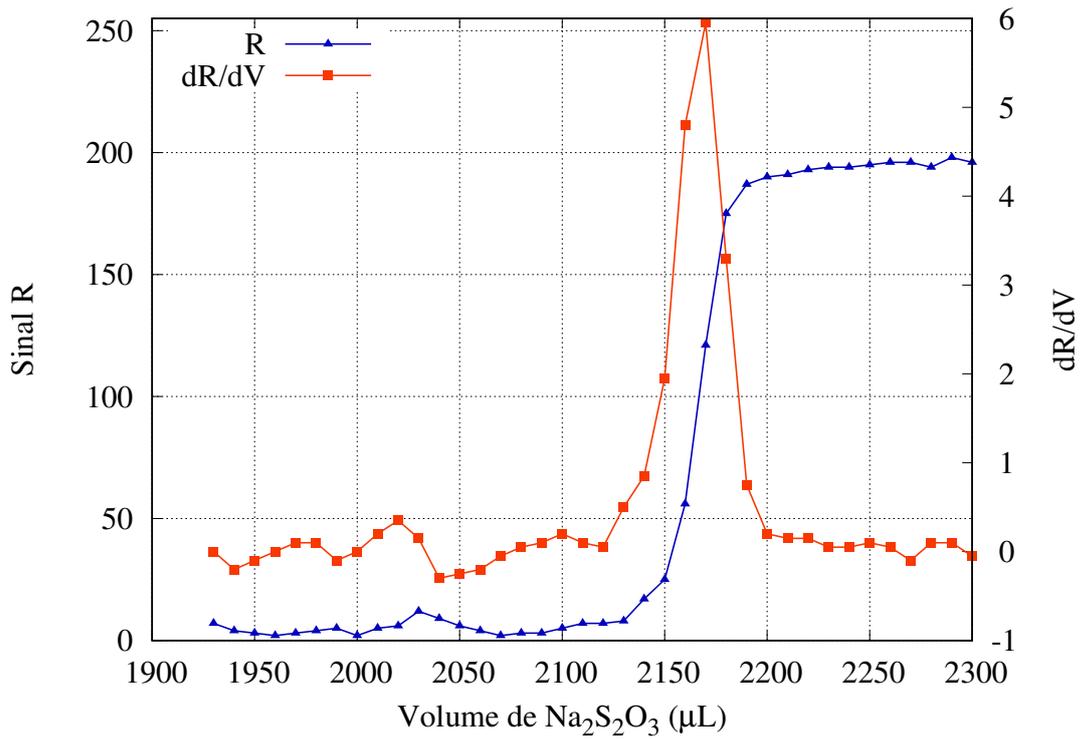


Figura 40: Sinal da derivada de R para a amostra de cerveja Heineken.

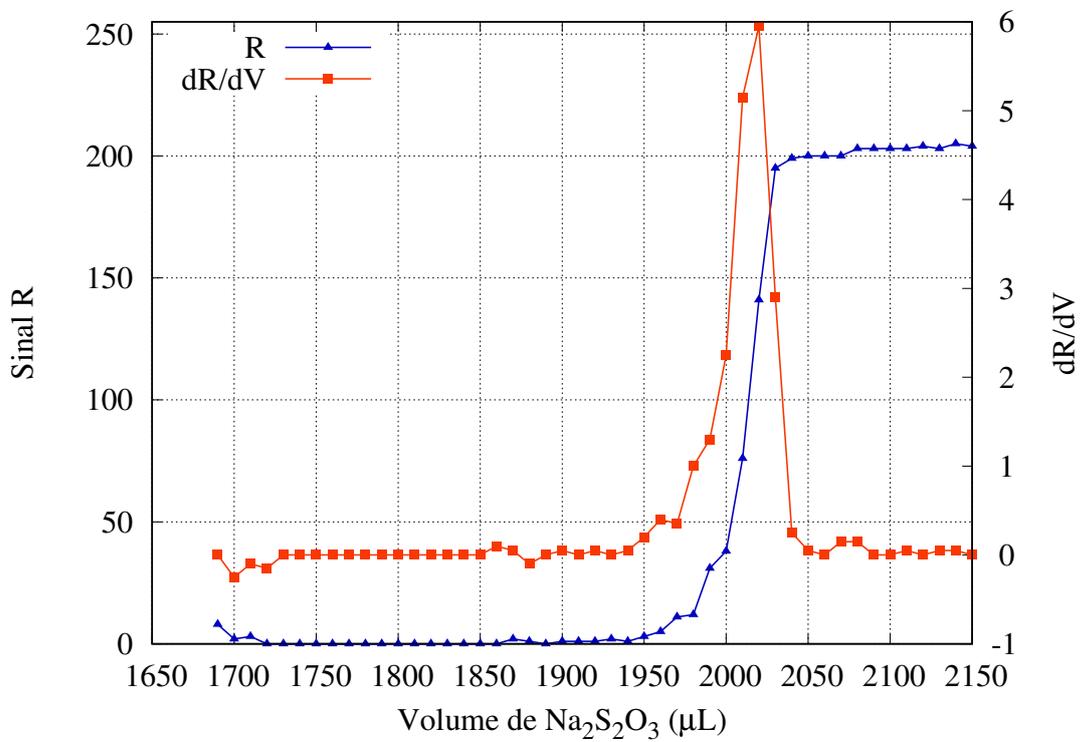


Figura 41: Sinal da derivada de R para a amostra de xarope de glicose.

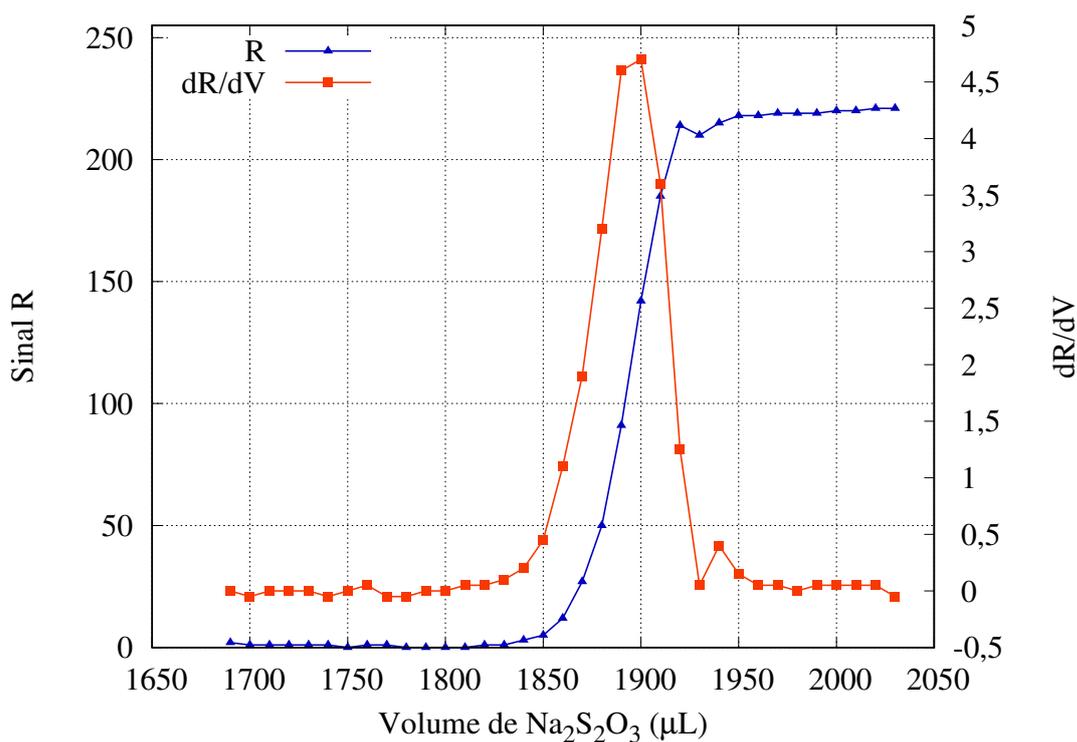


Figura 42: Sinal da derivada de R para a amostra de soro de glicose.

Um teste-t entre os resultados obtidos por este algoritmo e suas respectivas titulações clássicas foi realizado e se encontra na Tabela 30.

Tabela 30: Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de  $\frac{dR}{dV}$  das amostras de soluções incolores. GL=2; t-crítico=4,3.

Amostra	Automática		Clássica		Teste-t 95%	Erro Relativo(%)
	[AR] (g/L)	s	[AR] (g/L)	s		
Cerveja	2,83	0,05	2,84	0,2	0,084	+5,86
Xarope	4,62	0,1	4,41	0,2	1,62	+4,76
Soro	9,83	0,1	10,25	0,2	3,25	-0,35

#### 4.2.5.4 Avaliação do algoritmo de detecção das amostras coloridas

As amostras de cervejas escuras e vinhos possuem uma determinação um tanto mais complexa no sentido de fazer a detecção do ponto final de titulação de forma visual. Isto acontece porque, além de haver a formação de sais de cobre (I), há também a presença de compostos que produzem pigmentação das amostras. Estas substâncias são as antocianinas no caso dos vinhos [45] e no caso das amostras de cerveja são provenientes das reações de Maillard que ocorrem durante a brassagem do malte e das reações de caramelização dos açúcares durante seu malteamento [48]. Em amostras tituladas com o indicador de amido, a presença destas substâncias pode ser tão significativa que não é possível realizar a determinação de açúcares redutores nestas amostras sem antes efetuar sua descoloração com carvão ativado. As imagens das Figuras 43 e 44, mostram a pigmentação formada nas amostras já tituladas de vinho e cerveja.

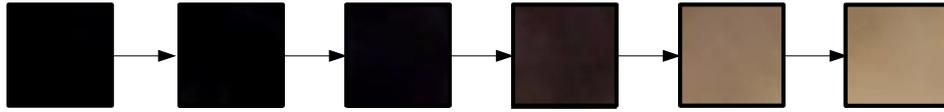


Figura 43: Intervalo de 6 adições de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  na titulação de cerveja Xingu.

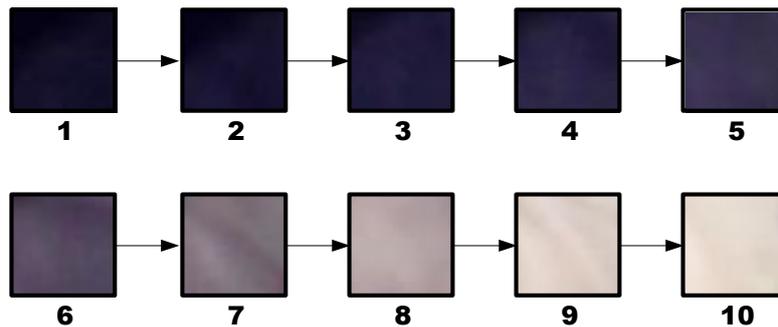


Figura 44: Intervalo de 10 adições de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  na titulação de vinho tinto Assemblage.

Observa-se que a coloração obtida no ponto final de titulação é influenciada pela pigmentação já existente na amostra e pela quantidade de açúcares redutores presente devido à formação do óxido de cobre. As amostras de cervejas escuras, por exemplo, assumiram o tom marrom da Figura 43 enquanto que as amostras de vinho assumiram um tom lilás. Além disso, a mudança de coloração foi bem mais rápida para as amostras de cerveja do que de vinho. Isto pode ser um efeito da concentração de açúcares redutores ou algum composto presente na composição do vinho. A Figura 45 mostra as imagens da titulação de Vinho Dom Bosco que, por conter grande quantidade de açúcares, teve que ser diluído para que uma análise conseguisse ser realizada.

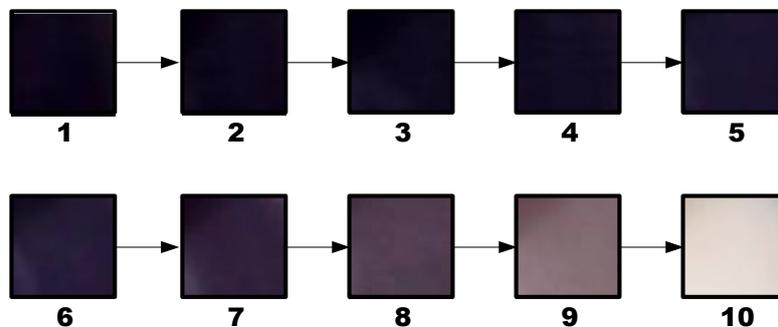


Figura 45: Intervalo de 10 adições de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  na titulação de Vinho tinto Dom Bosco.

Mesmo com uma concentração de açúcares reduzida, ainda se observa lentidão na viragem,

além de uma coloração mais forte de azul durante a titulação. Provavelmente este efeito é causado por alguma substância presente nos dois vinhos. Houve, então, uma necessidade de avaliar se as derivadas seriam suficientes para realizar esta determinação. Quanto mais demorado a viragem do indicador, menores serão os máximos de suas derivadas e conseqüentemente um *threshold* menor deve ser escolhido, sendo mais vulnerável a ruídos (interrupção prematura da titulação). Os gráficos exibem o sinal RGB da titulação de vinho Dom Bosco (Figura 46) e do Assemblage (Figura 47).

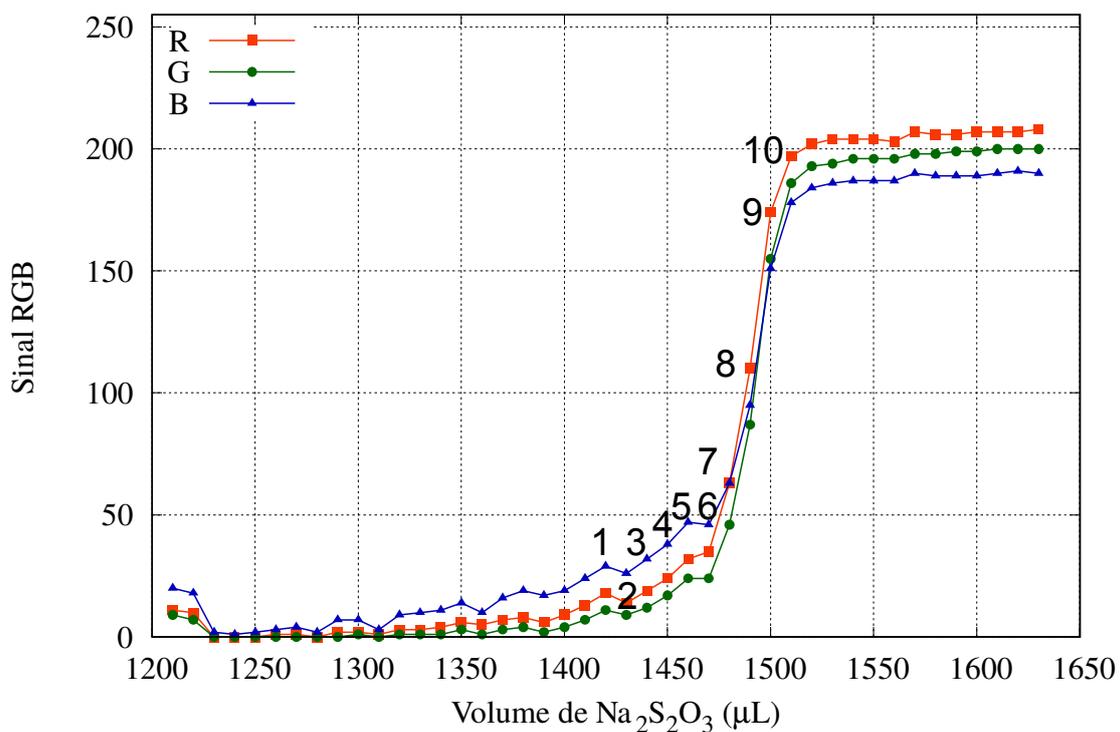


Figura 46: Sinal RGB da amostra de vinho Dom Bosco na titulação com Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,055 mol/L.

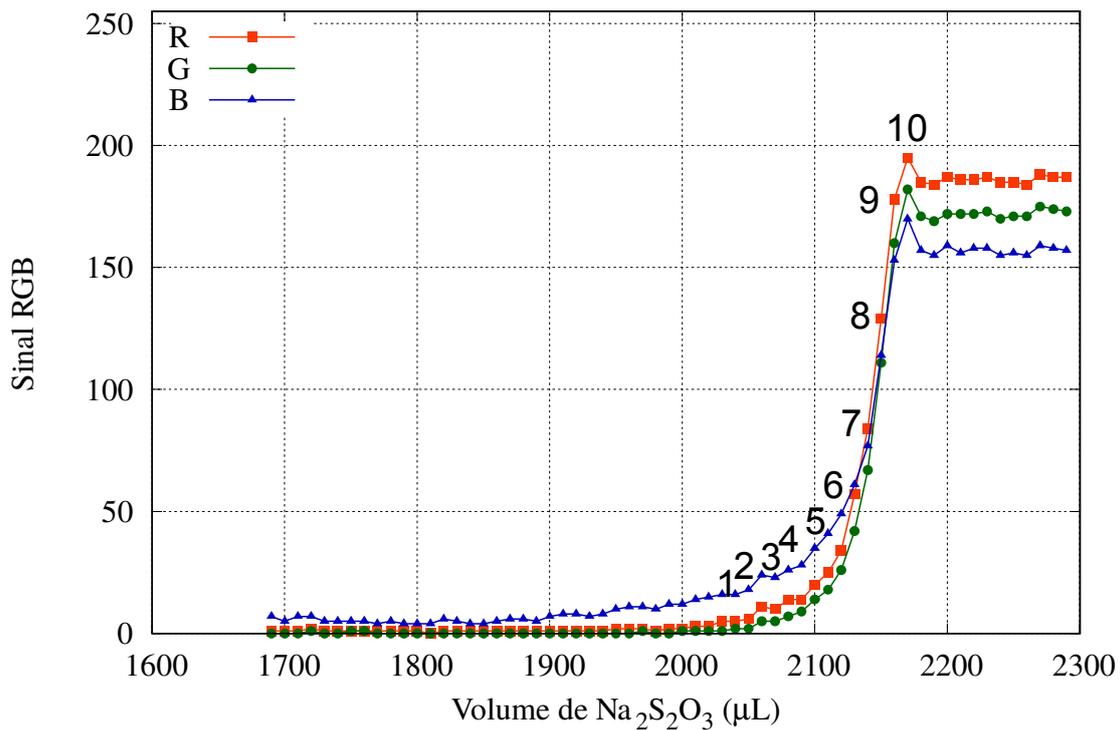


Figura 47: Sinal RGB da amostra de vinho Assemblage na titulação com Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,055 mol/L.

Estes gráficos podem ser comparados àquele obtido pela cerveja Xingu na Figura 48. A pigmentação formada nesta titulação diferencia seu sinal RGB das outras, com valores mais dispersos de R, G e B. Seus valores também saem bastante atenuados quando comparados às titulações de vinho. A velocidade com que se observa a mudança completa de coloração é maior no entanto e isto pode ser observado nas curvas.

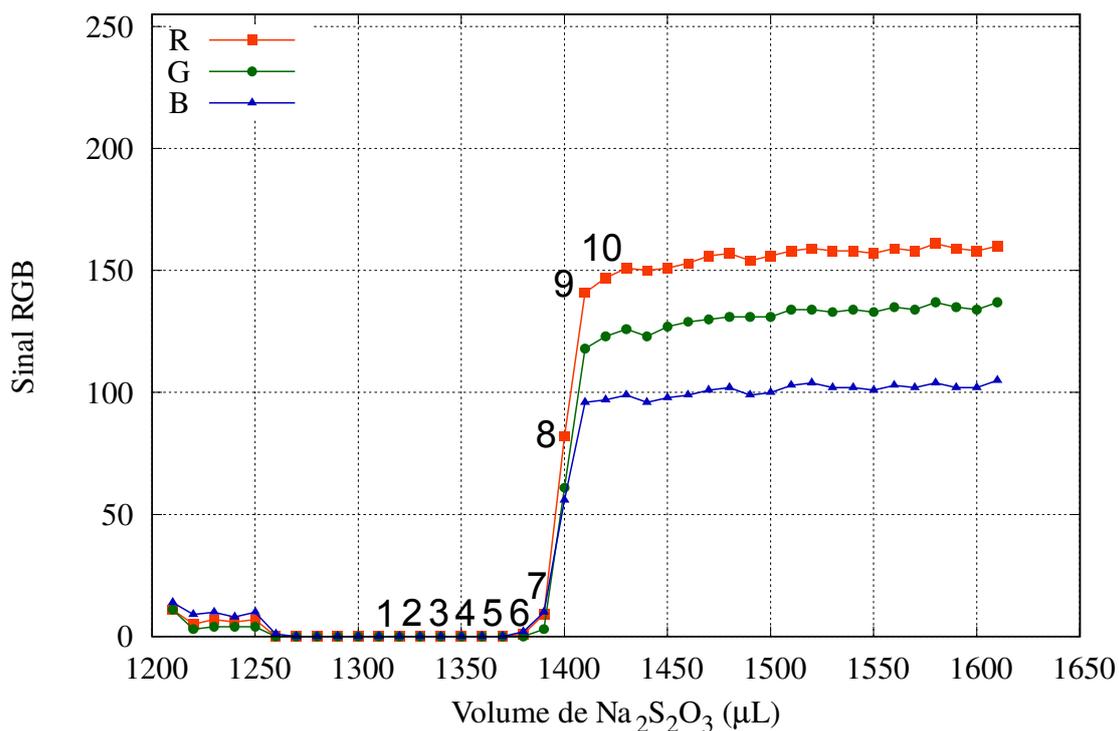


Figura 48: Sinal RGB da amostra de cerveja Xingu (Escura) na titulação com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,055 mol/L.

Os algoritmos testados foram aqueles mais associados a este formato de curva focando nas 1º e 2º derivadas. Estes resultados foram comparados a sua respectiva titulação clássica cujos resultados são apresentados na Tabela 31. Os resultados das titulações das amostras se encontram na Tabela 32.

Tabela 31: Resultados das análises de titulação clássica de amostras de cervejas escuras e vinhos.

Amostra	[AR] (g/L)	s
Cerveja Xingu	13,37	0,2
Cerveja Caracu	19,39	0,2
Vinho Dom Bosco	103,44	1,3
Vinho Assemblage	3,58	0,2

Tabela 32: Resultado das análises de determinação das amostras de cervejas escuras e vinhos. Valores em g/L.

Algoritmo			Xingu			Caracu			Assemblage			Dom Bosco		
Tipo	Deteção	Threshold	C	s	E(%)	C	s	E(%)	C	s	E(%)	C	s	E(%)
$\frac{dR}{dV}$	Máx.	2,0	13,26	0,4	-0,82	19,29	0,22	-0,51	3,20	0,1	-10,61	105,78	1,3	+2,26
$\frac{dG}{dV}$	Máx.	2,0	13,26	0,3	-0,82	19,29	0,3	-0,51	3,20	0,1	-10,61	105,78	1,3	+2,26
$\frac{dB}{dV}$	Máx.	2,0	13,26	0,4	-0,82	19,29	0,3	-0,51	3,20	0,1	-10,61	105,78	1,3	+2,26
$\frac{d^2R}{dV^2}$	Zero	0	13,11	0,2	-1,94	19,07	0,1	-1,65	3,20	0,1	-10,61	105,78	1,4	+2,26
$\frac{d^2G}{dV^2}$	Zero	0	13,11	0,2	-1,94	19,07	0,2	-1,65	3,20	0,1	-10,61	105,78	1,4	+2,26
$\frac{d^2B}{dV^2}$	Zero	0	13,11	0,2	-1,94	19,07	0,2	-1,65	3,20	0,1	-10,61	105,78	1,4	+2,26

Bons resultados de exatidão puderam ser obtidos para as primeiras derivadas dos valores de

R, G e B. Percebe-se também uma certa tendência de estimar uma concentração de açúcares um pouco menor do que sua titulação clássica, fato que não foi observado nas amostras incolores. A amostra de vinho Assemblage foi a única que obteve um resultado com um erro de cerca de 10% diferente da amostra de vinho Dom Bosco que obteve bons resultados. O vinho Assemblage não precisou passar por uma diluição para ser analisado por sua pequena quantidade de açúcares enquanto que o mesmo não pode ser dito para o vinho Dom Bosco. A presença deste erro em uma amostra não diluída sugere a presença de algum interferente na composição do vinho que tem sua influência amenizada pela diluição.

Com os resultados, escolheu-se a 1º derivada de R como algoritmo para determinar a concentração de açúcares redutores. Seu resultado acompanhado de um teste-t pode ser visualizado na Tabela 33.

Tabela 33: Teste-t a um nível de 95% de confiança para o algoritmo de  $\frac{dR}{dV}$  das amostras de soluções coloridas.

Amostra	Automática		Clássica		Teste-t 95%	Erro Relativo(%)
	[AR] (g/L)	s	[AR] (g/L)	s		
Xingu	13,26	0,4	13,37	0,2	0,8228	-0,82
Caracu	19,29	0,05	19,39	0,2	0,7595	-0,51
Assemblage	3,20	0,05	3,58	0,2	3,4689	-10,61
Dom Bosco	105,78	1,3	103,44	1,3	2,2214	+2,26

## 5 Conclusões

O equipamento desenvolvido bem como os algoritmos testados foram considerados eficazes na realização dos procedimentos de titulação em comparação com os métodos clássicos. O uso da seringa microvolumétrica permitiu que se mantivesse os valores de precisão dos métodos ao mesmo tempo em que se reduzem os volumes de amostra, importantes para os procedimentos de titulação. O equipamento também foi capaz de realizar titulações automáticas onde a subjetividade com que se determina o ponto final pode ocasionar problemas (formação de precipitado, dicróismo e titulações com brancos de amostras). Vale a pena destacar que estas condições ainda podem ser otimizadas tanto para o volume das amostras analisadas quanto para os algoritmos utilizados, testando casos específicos.

O titulador também obteve uma boa frequência analítica e facilidade de manuseio do equipamento e seu *software*. Com algumas modificações, o instrumento pode ser facilmente utilizado para realizar padronizações de reagentes em um laboratório, por exemplo, e obter um referencial objetivo para determinar o ponto final destas análises. Apesar de que o titulador foi testado para algumas titulações, estas são bastante gerais e algumas modificações e testes permitem que novos procedimentos sejam adicionados com os mesmos algoritmos ou não.

Além disso, o sistema de detecção do ponto final com uma câmera *webcam* não entra em contato com a amostra e uma única câmera pode ser o detector de várias titulações. Este fato, aliado ao *software* livre e aberto desenvolvido, permite que novos métodos sejam adicionados e a completa alteração dos mesmos sem que seja realizada nenhuma alteração física no equipamento. Isto pode ser estendido ainda para a realização de um número variado de titulações ocorrendo ao mesmo tempo, pois é possível fazer com que uma única câmera *webcam* consiga capturar imagens de várias titulações, mudando apenas o arranjo fluídico utilizado.

O estudo do sinal RGB das titulações em comparação com suas imagens e algoritmos possibilitou que houvesse um aprendizado na forma como as variações de coloração influenciam na determinação automática do ponto final e isto pode ser utilizado para avaliar novos indicadores em outras titulações. A utilização de amidoglicolato de sódio possibilitou a análise de amostras intensamente coloridas, indisponível quando se utiliza amido como indicador na titulação de açúcares redutores.

## Referências

- [1] Arthur Israel Vogel, J Mendham, R C Denney, J D Barnes, and M J K Thomas. *Análise Química Quantitativa*. LTC, Rio de Janeiro, 2002.
- [2] D.A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, and R. S. Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*. Cengage Learning, São Paulo, 2006.
- [3] Alexander Y. Nazarenko. Optical sensors for manual and automatic titration in undergraduate laboratory. *Spectroscopy Letters*, 43(7/8):555 – 560, 2010.
- [4] Fabiano Barbieri Gonzaga and Lidiane Rodrigues Cordeiro. Precise determination of hypochlorite in commercial bleaches with established traceability using automatic potentiometric titration. *Accreditation and Quality Assurance*, 19(4):283–287, 2014.
- [5] Edvaldo da Nobrega Gaião, Valdomiro Lacerda Martins, Wellington da Silva Lyra, Luciano Farias de Almeida, Edvan Cirino da Silva, and Mário César Ugulino Araújo. Digital image-based titrations. *Analytica Chimica Acta*, 570(2):283 – 290, 2006.
- [6] Giorgia Foca, Francesca Masino, Andrea Antonelli, and Alessandro Ulrici. Prediction of compositional and sensory characteristics using {RGB} digital images and multivariate calibration techniques. *Analytica Chimica Acta*, 706(2):238 – 245, 2011.
- [7] Chunxue Yuan, Shohei Saito, Cristopher Camacho, Stephan Irle, Ichiro Hisaki, and Shigehiro Yamaguchi. A pi-conjugated system with flexibility and rigidity that shows environment-dependent rgb luminescence. *Journal of the American Chemical Society*, 135:8842–8845, 2013.
- [8] Nicholas J. Elmer, Emily Berndt, and Gary J. Jedlovec. Limb correction of modis and viirs infrared channels for the improved interpretation of rgb composites. *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology*, 33(5):1073 – 1087, 2016.
- [9] Kristoffer Weber, Michael Thomaschewski, Daniel Benten, and Boris Fehse. Rgb marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. *Nature Protocols*, 7:839+, 2012.
- [10] Adamastor Rodrigues Tôrres, Wellington da Silva Lyra, Stéfani Iury Evangelista de Andrade, Renato Allan Navarro Andrade, Edvan Cirino da Silva, Mário César Ugulino Araújo, and Edvaldo da Nobrega Gaião. A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid–base titration without indicator. *Talanta*, 84(3):601 – 606, 2011.
- [11] Ricardo Alexandre C. Lima, Luciano F. Almeida, Wellington S. Lyra, Lucas A. Siqueira, Edvaldo N. Gaião, Sérgio S.L. Paiva Junior, and Rafaela L.F.C. Lima. Digital movie-based on automatic titrations. *Talanta*, 147:226 – 232, 2016.
- [12] Erzsébet Néher-Neumann. *Advanced Potentiometry: Potentiometric Titrations and Their Systematic Errors*. Springer Netherlands, 1 edition, 2009.
- [13] Jesus L. Pablos, Miriam Trigo-Lopez, Felipe Serna, Felix C. Garcia, and Jose M. Garcia. Solid polymer substrates and smart fibres for the selective visual detection of tnt both in vapour and in aqueous media. *RSC Adv.*, 4:25562–25568, 2014.
- [14] Wanessa R. Melchert, Boaventura F. Reis, and Fábio R.P. Rocha. Green chemistry and the evolution of flow analysis. a review. *Analytica Chimica Acta*, 714:8 – 19, 2012.

- [15] Raquel P Sartini, Cláudio C Oliveira, Elias A.G Zagatto, and H Bergamin Filho. Determination of reducing sugars by flow injection gravimetry. *Analytica Chimica Acta*, 366(1):119 – 125, 1998.
- [16] F. Schneider (Ed.). *Sugar Analysis, Official and tentative methods recommended by the International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA)*. ICUMSA, Peterborough, 1979.
- [17] Merja Paloposki Eero Rajakyla. Determination of sugars (and betaine) in molasses by high-performance liquid chromatography: Comparison of the results with those obtained by the classical lane-eynon method. *Journal of chromatography A*, 282:595–602, 1983.
- [18] David S. Hage and James D. Carr. *Química Analítica e Análise Quantitativa*. Pearson Prentice Hall, São Paulo, 2012.
- [19] Daniel C. Harris. *Análise Química Quantitativa*. LTC, Rio de Janeiro, 2001.
- [20] Kevin Olsen. The first 110 years of laboratory automation: Technologies, applications, and the creative scientist. *Journal of Laboratory Automation*, 17(6):469–480, 2012.
- [21] J. Marcos, A. íos, and M. Valcárcel. Automatic titrations in unsegmented flow systems based on variable flow-rate patterns. *Analytica Chimica Acta*, 261(1):489 – 494, 1992.
- [22] Ivan P. Zubkov and John A. Lynch. Development of algorithms for automated spectrophotometric titrations. *Microchemical Journal*, 90(1):13 – 18, 2008.
- [23] A L Holven. Experimental application of automatic ph recorders to sugar-refinery alkalinity control. *Industrial & engineering chemistry*, 21:965–970, 1929.
- [24] Anthony Mullen. Multifunction automatic recording photometric titrator. *Analytical chemistry*, 32:103–106, 1960.
- [25] L.P. Rigdon, G.J. Moody, and J.W. Frazer. Determination of residual chlorine in water with computer automation and a residual-chlorine electrode. [assay of standards prepared from deionized water, two sources of public water, and one from a swimming pool]. *Anal. Chem.; (United States)*, 50:3, Mar 1978.
- [26] G M Hieftje. New, directly digital automatic titration apparatus. *Analytical chemistry*, 44:1616–1621, 1972.
- [27] J.A. Bietz and Paul A. Sandford. Reaction of sodium hypochlorite with amines and amides: Automation of the method. *Analytical Biochemistry*, 44(1):122 – 133, 1971.
- [28] G. Nagy, Zs. Fehér, K. Tóth, and E. Pungor. A novel titration technique for the analysis of streamed samples—the triangle-programmed titration technique. *Analytica Chimica Acta*, 91(2):87 – 96, 1977.
- [29] J Ruzicka. Flow injection analysis: Part ix. a new approach to continuous flow titrations. *Analytica Chimica Acta*, 92:235–249, 1977.
- [30] Athos Bellomo, Alessandro de Robertis, and Carlo D'Arrigo. Semi-automatic end-point detection in the determination of total hardness in water. *Analytica Chimica Acta*, 149:401 – 403, 1983.

- [31] Jan Yperman, An De Backer, Ann Vos, Dirk Franco, Jules Mullens, and Lucien C. Van Poucke. Automated iodimetric determination of  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{3+}$  in the superconductor YBCO using a modified gran plot technique. *Analytica Chimica Acta*, 273(1):511 – 519, 1993.
- [32] Karin Carlsson and Bo Karlberg. Micro-volume flow titration and screening the dissociation constants ( $\text{pK}_a$ ) of weak acids. *Analytica Chimica Acta*, 434(1):149 – 156, 2001.
- [33] Aimin Tan and Cailin Xiao. An automatic back titration method for microchemical analysis. *Talanta*, 44(6):967 – 972, 1997.
- [34] Luzia Pires dos Santos Benedetti, Vagner Bezerra dos Santos, Tiago Almeida Silva, Edemar Benedetti-Filho, Valdomiro Lacerda Martins, and Orlando Fatibello-Filho. A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages. *Anal. Methods*, 7:7568–7573, 2015.
- [35] N. Maleki, A. Safavi, and F. Sedaghatpour. Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a {CCD} camera. *Talanta*, 64(4):830 – 835, 2004.
- [36] Wellington Silva Lyra, Vagner Bezerra dos Santos, Amália Geiza Gama Dionízio, Valdomiro Lacerda Martins, Luciano Farias Almeida, Edvaldo Nóbrega Gaião, Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz, Edvan Cirino Silva, and Mário César Ugulino Araújo. Digital image-based flame emission spectrometry. *Talanta*, 77(5):1584 – 1589, 2009.
- [37] M. Kompany-Zareh, H. Tavallali, N. Shakernasab, M. Khoshkam, and E. Shamsdin. Image based kinetic determination of iron(III) in blood samples using a CCD camera. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 107(1):49–61, 2012.
- [38] Hamid El Kaoutit, Pedro Estevez, Felix C. Garcia, Felipe Serna, and Jose M. Garcia. Sub-ppm quantification of  $\text{Hg}^{2+}$  in aqueous media using both the naked eye and digital information from pictures of a colorimetric sensory polymer membrane taken with the digital camera of a conventional mobile phone. *Anal. Methods*, 5:54–58, 2013.
- [39] J. L. Whitman Wanda L. Dagget, Arthur W. Campbell. The electrometric titration of reducing sugars. *Journal of American Chemical Society*, 45:1043–1045, 1923.
- [40] Thomas Barclay, Milena Ginic-Markovic, Martin R. Johnston, Peter Cooper, and Nikolai Petrovsky. Observation of the keto tautomer of D-fructose in  $\text{D}_2\text{O}$  using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 347(1):136 – 141, 2012.
- [41] Thomas G. Hörner and Peter Klüfers. The species of Fehling's solution. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2016(12):1798–1807, 2016.
- [42] Tadeu Alcides MARQUES, Érick Malheiros RAMPAZO, Rafael Rebes ZILLIANI, Patricia Angélica Alves MARQUES, and Fabio BENINCASA. Automated sugar analysis. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36:70 – 75, 03 2016.
- [43] S. R. Benedict. The detection and estimation of reducing sugars. *Journal of Biochemistry*, 5:485–487, 1908.
- [44] Giorgio Marrubini, Adele Papetti, Emiliano Genorini, and Alessandro Ulrici. Determination of the sugar content in commercial plant milks by near infrared spectroscopy and Luff-Schoorl total glucose titration. *Food Analytical Methods*, 10(5):1556–1567, 2017.

- [45] Zoecklein, Fugelsang, Gump, and Nury. *Production Wine Analysis*. Van Nostrand, Reinhold, 1990.
- [46] Singh S. V., Saxena O. C., and M. P. Singh. Mechanism of copper (ii) oxidation of reducing sugars. *Journal of American Chemical Society*, 92:537–541, 1970.
- [47] Hatanaka Chitoshi and Yoshiaki Kobara. Determination of glucose by a modification of somogyi-nelson method. *Agric. Biol. Chem.*, 44:2943–2949, 1980.
- [48] Wolfgang Kunze. *Technology Brewing and Malting*. VLB, Berlin, 2014.