



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Titulação em fluxo-batelada com detecção baseada
em filmes digitais para determinação da acidez total
de vinhos tintos**

Jéssica Mirelly Almeida de Santana



**João Pessoa - PB
Dezembro/2018**



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Titulação em fluxo-batelada com detecção baseada
em filmes digitais para determinação da acidez total
de vinhos tintos**



Jéssica Mirelly Almeida de Santana

Orientador: Edvan Cirino da Silva

***Bolsista (Capes)**

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

João Pessoa - PB
Dezembro/2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S232t Santana, Jéssica Mirelly Almeida de.

Titulação em fluxo-batelada com detecção baseada em filmes digitais para determinação da acidez total de vinhos tintos / Jéssica Mirelly Almeida de Santana. - João Pessoa, 2018.

71 f. : il.

Orientação: Edvan Cirino da Silva.

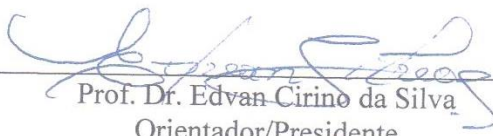
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Filmes digitais. 2. fluxo-batelada. 3. titulação ácido-base. 4. vinhos tintos. 5. acidez total. I. Silva, Edvan Cirino da. II. Título.

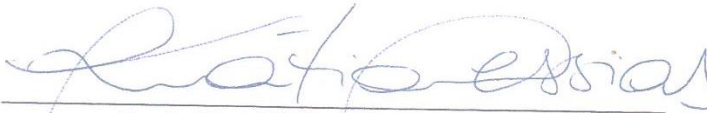
UFPB/CCEN

Titulação em fluxo-batelada com detecção baseada em filmes digitais para determinação da acidez total de vinhos tintos.

Dissertação de Mestrado apresentada pela aluna Jéssica Mirelly Almeida de Santana e aprovada pela banca examinadora em 04 de dezembro de 2018.


Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva
Orientador/Presidente


Profa. Dra. Ana Paula Silveira Paim
Examinadora


Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinadora

Aos meus pais, Genivaldo e Valquiria, minha
irmã, Gleyce e minha avó Luzinete,
com muito carinho eu dedico.

Agradecimento

- A Deus pelo dom de vida, por ter me inundado com o seu amor e me sustentado com sua mão poderosa.
- Aos meus amados pais, Valquiria Almeida e Genivaldo Lemos, pela constante presença, carinho e apoio.
- A minha avó Luzinete José por suas constantes orações, por todo carinho dedicado e incentivo.
- A toda minha família, pela constante presença, carinho e apoio.
- Ao Professor Edvan Cirino da Silva pela orientação, contribuições acadêmicas, científicas e seus ensinamentos.
- Ao Professor Ricardo Alexandre pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.
- Ao Dr. Stefani Yuri, pela sua disponibilidade, conhecimento, empenho e ajuda em todas as etapas deste trabalho.
- Ao Doutorando Lucas Siqueira, por suas contribuições na parte experimental deste trabalho.
- A todos os amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria (LAQA);
- Ao LAQA, na pessoa do professor Mário Ugulino, para o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Programa de Pós-Graduação do DQ/CCEN/UFPB.
- A Universidade Federal da Paraíba.
- Aos funcionários do DQ/CCEN/UFPB.
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida para o desenvolvimento dessa pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Caracterização geral do problema.....	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2 Objetivos Específicos	3
1.3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
1.3.1 Vinhos tintos.....	4
1.3.1.2 Parâmetros físico-químicos e Controle de qualidade.....	8
1.3.1.3 Métodos de determinação da acidez total de vinho tinto	9
1.3.2 Analisadores em Fluxo.....	12
1.3.2.1 Analisador em Fluxo Segmentado.....	12
1.3.2.2 Analisador por Injeção em Fluxo	13
1.3.2.3 Analisador em Fluxo Monosegmentado.....	13
1.3.2.4 Analisador por Injeção Sequencial	13
1.3.2.5 Analisador em Fluxo com Multicomutação	14
1.3.2.6 Analisador em Fluxo-Batelada	14
1.3.3 Imagem Digital.....	16
1.3.3.1 Modelo de cor RGB.....	18
1.3.3.2 Filme Digital.....	20
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 Soluções, Reagentes e Amostras	22
2.2 Equipamentos	22
2.3 Sistema de titulação baseado em filmagem digital.....	23
2.3.1 Estudo da vazão dos tubos das válvulas solenoides	27
2.3.2 Escolha da região para obtenção dos valores de RGB	27
2.3.3 Procedimento de titulação FBT-DM	28
2.3.4 Os tempos de acionamento	31
2.3.5 Programa para controle das Válvulas	32
2.3.6 Tratamento e análise dos filmes digitais.....	34
2.3.7 Determinação da razão entre as vazões dos tubos de bombeamento das soluções de titulante e amostra (RV)	34
2.3.8 Cálculo da concentração da acidez total de vinho tinto.....	34
2.3.9 Procedimento para obtenção do volume do ponto final da titulação.....	35
2.4 Método de referência para determinação de acidez total	36
2.5 Testes estatísticos para validação dos resultados analíticos	36
2.5.1 Teste <i>t</i> emparelhado baseado no conceito de intervalo de confiança	37
2.5.2 Teste <i>t</i> emparelhado baseado no teste de hipóteses	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1 Estudo da vazão dos canais das válvulas solenoides	40
3.2.1 Rotação da Bomba Peristáltica	41
3.2.2 Escolha da componente de cor	42

3.2.3 Posicionamento da janela para o tratamento dos dados RGB	43
3.4 Curvas das titulações de vinho tinto	44
3.5 Determinações de acidez total dos vinhos tintos	46
4 CONCLUSÕES	49
4.1 PERSPECTIVAS.....	50
REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Estrutura química geral das antocianinas.....	5
FIGURA 1.2 – Variações de cores observadas durante a titulação de vinho tinto.....	6
FIGURA 1.3 – Espectros de absorção obtidos de uma amostra de vinho tinto diluída 1:10 (v/v) em meio ácido (a) e em meio alcalino (b) para cada incremento de volume do titulante.....	6
FIGURA 1.4 – Possíveis transformações estruturais das antocianinas encontradas em soluções aquosas.	7
FIGURA 1.5 – Representação geométrica do modelo RGB.....	18
FIGURA 2.0 – Fotografia do sistema automático de análise em fluxo-batelada proposto.....	23
FIGURA 2.1 – Fotografia do sistema de detecção de análise.....	24
FIGURA 2.2 – Esquema do funcionamento de válvulas solenoides de três vias permitindo a passagem do fluxo de solução em dois sentidos: (a) fluxo para a direita quando desligada (OFF) e (b) fluxo para a esquerda quando ligada (ON).....	25
FIGURA 2.3 – Ilustração a webcam.....	27
FIGURA 2.4 – Regiões estudadas para escolha da melhor área para realização das análises. (a) Janela Central com orientação espacial (X,Y) de 180x111. (b) Janela superior com orientação espacial (X,Y) de 187x107. (c) Janela direita com orientação espacial (X,Y) de 222x108. (d) Janela esquerda com orientação espacial (X,Y) de 188x113. (e) Janela inferior com orientação espacial (X,Y) de 190x144.....	28

FIGURA 2.5 – Diagrama esquemático FBT-DM. Câmara de mistura (CM), bomba peristáltica (BP), barra magnética (BM), agitador magnético (AM), webcam (WC) e válvulas solenoides (V1 a V4).....28

Figura 2.6 – Diagrama do sistema fluxo-batelada para titulação FBT-DM em modo de espera. (—) Linhas de fluxo vazia ou estacionada e (—) preenchida com solução; (- - -) Linha de fluxo alternativa; (BP) Bomba peristáltica; (V1 a V4) válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura.....29

FIGURA 2.7 – Etapa de análise 2-i do procedimento de titulação DM: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida com solução; (BP) Bomba peristáltica; (V1 a V4) válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura.....29

FIGURA 2.8 – Etapa de análise 2-ii do procedimento de titulação DM: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida com solução; (BP) Bomba peristáltica; (V1 a V4) válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura.....30

FIGURA 2.9 – Etapa de limpeza do procedimento de titulação DM: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida com solução; (BP) Bomba peristáltica; (V1 a V4) válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura.....31

FIGURA 2.10. Diagrama dos tempos (em segundos) usado para os tempos de abertura das válvulas V1, V2, V3 e V4, respectivamente.....32

FIGURA 2.11 – Interface do programa de controle do acionamento das válvulas, as colunas: (I) controle do tempo de acionamento das válvulas solenoides ; (II) procedimentos analíticos , (III) leitura do sinal analítico.....33

FIGURA 2.12 – Matriz de frames por segundos para a acidez total de vinhos tintos.....33

FIGURA 3.1 – Curvas de calibração referentes à válvula 1 (a) e válvula 2 (b) utilizada no FBT proposto. Líquido bombeado: água destilada, 10 replicatas para cada tempo de acionamento, por válvula. Rotação da bomba peristáltica: 40 rpm.40

- FIGURA 3.2** – Curvas de titulação obtidas com diferentes rotações (a) 40; (b) 80 e (c) 100 rpm. As linhas (–, –, –) representam a análise em triplicata.....41
- FIGURA 3.3** – Curva de titulação observada para (a) canal red, (b) canal blue e (c) canal green para análise de titulação em vinhos tintos..... 42
- FIGURA 3.4** – Avaliação da posição das janelas correspondente a localização. (a) curva de titulação para a janela na posição central com área de 36x45 pixels. (b) curva de titulação para janela na posição superior com área de 12x45 pixels. (c) curva de titulação para janela na posição esquerda com área 32x7 pixels. (d) curva da titulação para janela na posição direita com área de 37x9 pixel. (e) curva da titulação para janela na posição inferior com área de 6x45 pixels. As linhas (– , –, –) representam a análise em triplicata.....43
- FIGURA 3.5** – Curva sigmoide da titulação em vinhos tintos obtida pelo método proposto.....44
- FIGURAS 3.6** –Curva da titulação em vinhos tintos. (a) primeira derivada e (b) segunda derivada.....45
- FIGURA 3.7** – Curva sigmoide para os dados suavizados da titulação em vinhos tintos obtida pelo método proposto.....45
- FIGURA 3.8** – Curvas de (a) primeira e (b) segunda derivada para os dados suavizados da titulação de uma amostra de vinho tinto.....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.0 - Teores máximos e mínimos para alguns de vinhos.....	8
Tabela 1.1 - Valores referentes ao número de bits e a variância no conjunto de cores.....	17
Tabela 1.2 – Resultado da combinação de duas cores primárias.....	19
Tabela 1.3 - Resultados das médias de cinco determinações (N = 5) da acidez total de vinhos tintos, em termos de g/L de ácido tartárico, obtidos pelos métodos proposto FBT-DM e de referência.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Dispositivo de carga acoplada
DIB	Baseada em imagens digitais
FBA	Analizador em Fluxo-Batelada
FIA	Analizador por Injeção em Fluxo
FPS	Quadros por segundo
HSI	Hue, Saturação, Intensidade
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LED	Diodo emissor de luz
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MFA	Analizador em Fluxo com Multicomutação
MSFA	Analizador em Fluxo Monosegmentado
OIV	Office International de la Vigne et du Vin
pH	Potencial hidrogeniônico
PIXEL	Elemento de imagem
RI	Região de interesse
RGB	Vermelho-verde-azul
SIA	Analizador por Injeção Sequencial
US	Universal serial bus
VPF	Volume do ponto final

Resumo

Titulação em fluxo-batelada com detecção baseado em filmes digitais para determinação da acidez total de vinhos tintos

Autora: Jéssica Mirelly Almeida de Santana

Orientador: Edvan Cirino da Silva

Este estudo propõe uma nova metodologia baseada na detecção por filmagem digital, utilizando uma webcam incorporada a um titulador automático em fluxo-batelada (FBT-DM), para determinação de acidez total de vinhos tintos. O princípio químico da titulação baseia-se na presença das antocianinas na matriz dos vinhos oriundas da uva, as quais apresentam diferentes estruturas e colorações de acordo com o pH do meio. No processo de titulação, a webcam grava o filme digital apenas durante a adição do titulante na câmara de mistura, registrando as variações de cor decorrentes da reação ácido-base no interior de câmara. Enquanto o filme é gravado, este é decomposto em quadros ordenados sequencialmente a uma taxa constante de 30 quadros por segundo (FPS). Ao final da titulação, o programa extrai os valores de R, G e B da sequência de imagens digitais resultantes do filme para obter resposta analítica usada na construção da curva de titulação. Apenas a componente R foi usada como resposta analítica para esse propósito. As curvas de titulação foram obtidas em tempo real, plotando-se o sinal analítico (canal R-red) versus o volume do titulante. O método proposto foi aplicado à análise de onze amostras de vinhos tintos e validado contra a titulação potenciométrica usada como método de referência. Constatou-se que não há diferenças, estatisticamente significativas, entre os resultados do método proposto e o de referência aplicando o teste *t* emparelhado ao nível de 95% de confiança. O titulador FBT-DM permitiu analisar 26 amostras h^{-1} com desvio padrão relativo inferior a 3,0% na determinação da acidez total expressa em g.L^{-1} de ácido tartárico. O consumo de amostra e reagente titulante foi de, respectivamente, 1,6 e 2,0 mL por análise. As amostras de vinhos tintos apresentaram concentração entre 10,5 a 14,9 g L^{-1} de ácido tartárico.

Palavras-chaves: Filmes digitais, fluxo-batelada, titulação ácido-base, vinhos tintos e acidez total.

ABSTRACT

This study proposes a new methodology based on the detection by digital filming, using a webcam incorporated to a automatic batch-flow titrator (FBT-DM), to determine the total acidity of red wines. The chemical principle of titration is based on the presence of anthocyanins in the matrix of wines from the grape, which have different structures and colorations according to the acidity or alkalinity of the medium. In the titration implementation, the webcam records the digital film only during addition of the titrant in the mixing chamber, recording the color variations resulting from the acid-base reaction in the chamber interior. As the movie is recorded, it is decomposed into frames ordered sequentially at a constant rate of 30 frames per second (FPS). At the end of the titration, the software extracts the R, G, and B values of the resulting digital image sequence from the film to calculate the analytical response used in the construction of the titration curve. Only The R component was used as the analytical response for this purpose. The titration curves are obtained in real time by plotting the analytical signal (R-red channel) versus the titrant volume. The proposed method was used to analyze the samples of red wines and validated against potentiometric titration used as a reference method. It was found that there were no statistically significant differences between the results of the proposed method and the reference method by applying the paired *t*-test to the 95% confidence level. The FBT-DM titrator allow to analyse of 26 h⁻¹ samples with relative standard deviation of less than 3.0% in the determination of the total acidity expressed as g.L⁻¹ of tartaric acid. The sample and titrant reagent consumption was respectively 1,6 and 2,0 ml per analysis. The samples of red wines presented concentration between 10.5 and 14.9 g L⁻¹ of tartaric acid.

Keywords: Digital movies, flow–batch analyzer, acid-base titration, red wines and total acidity.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização geral do problema

De acordo com PORTARIA Nº 229, de 25 de outubro de 1988, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o vinho é a bebida da fermentação alcoólica do mosto de uva sã, fresca e madura. É uma das mais nobres bebidas alcoólicas consumidas no mundo, constituída por uma mistura complexa, formada por mais de 600 compostos presentes em diferentes concentrações (ALPUIM, 1997). As substâncias que predominam no vinho são os açúcares, compostos aromáticos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos.

Os vinhos tintos apresentam uma matriz que absorve radiação eletromagnética em uma ampla faixa do espectro visível, cujas posições das bandas modificam com a mudança de pH devido à presença das antocianinas e os ácidos orgânicos provenientes da uva (GARCIA e REIS, 2006; MALACRIDA e MOTTA, 2006).

A acidez do vinho é uma das propriedades que favorecem uma boa fermentação do mosto, e contribuem com as características organolépticas dos vinhos, influenciando na estabilidade e coloração. Os vinhos contêm uma mistura complexa de ácidos orgânicos, sendo os mais importantes o tartárico, málico, succínico, acético, cítrico e lático. Os principais ácidos orgânicos moderadamente fracos que conferem características ácidas ao vinho são os ácidos tartárico, málico e cítrico, provenientes da uva. Enquanto que os ácidos lático, succínico e acético são originários do metabolismo de bactérias e leveduras. (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).— (BENASSI, 1997).

Entre os ácidos orgânicos do vinho, o ácido tartárico é o mais forte influenciando de forma determinante no pH e nas características sensoriais dos vinhos, e, por essa razão, a representação da acidez total de uma amostra de vinho é expressa em unidade “gramas/Litro de ácido tartárico” (ZOECKLEIN, 1995 e DARIAS-MARTÍN et al., 2003).

A literatura reporta, por diversos órgãos oficiais como a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (ZOECKLEIN, 1995), Office International de la Vigne et du Vin - OIV (1969), Instituto Adolfo Lutz - IAL (2008), Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2005), métodos de determinação para acidez total em vinhos. Normalmente os métodos referem-se à titulação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de base, usando como indicador a fenolftaleína.

O uso do indicador é habitual por permitir a observação visual da mudança de cor no momento da identificação do ponto final em titulações. No entanto, essa observação é dificultada quando são tituladas amostras com matriz colorida. Em razão disso, os órgãos oficiais recomendam a titulação potenciométrica quando as amostras são coloridas, como no caso do vinho tinto (CARDWELL et al., 1991).

Este procedimento titulométrico convencional é considerado o principal método a ser utilizado para a validação de métodos secundários, realizada manualmente são titulações geralmente trabalhosas e demoradas que apresenta quantidades significativas de reagentes e amostra, elevada geração de resíduos, baixa frequência analítica, etc (HONORATO et al. 1999).

Uma alternativa para superar esses inconvenientes, que são comuns em procedimentos titulométricos convencionais, consiste na introdução de sistemas automáticos em fluxo para a implementação de titulações proporcionando aos métodos muitas vantagens, tais como um menor custo e maior rapidez, versatilidade e flexibilidade, etc (LIMA, et al. 2016 e TÔRRES et al. 2010).

No que diz respeito à dificuldade na detecção visual do ponto final, técnicas instrumentais podem ser utilizadas. Recentemente, métodos de detecção, mais acessíveis e independentes do sistema de análise levou ao surgimento de uma técnica alternativa baseada na análise de imagem digital (DI) (GAIÃO et al. 2006). Estes métodos empregam o sistema de cor RGB (do inglês: Red Green Blue) onde os valores individuais das cores primárias variam de 0 a 255 (8 bits). Esse método apresenta precisão e exatidão, apesar disso são ainda obtidas manualmente, o que resulta consumo elevado de tempo (GAIÃO et al. 2006).

Visando superar essa questão, realizou-se a filmagem digital, devido sua capacidade de registrar as imagens em movimento se apresenta como uma alternativa eficiente, aumentando a frequência analítica, a precisão e a exatidão no que concerne à detecção do ponto final da titulação. (LIMA et al. 2016).

Nesse contexto, o presente estudo visa desenvolver uma nova metodologia baseada na detecção por filmagem digital, utilizando uma webcam incorporada a um titulador automático em fluxo-batelada (FBT-DM), para determinação de acidez total de vinhos tintos por meio de reação de titulação ácido-base sem o uso de indicador, tendo em vista a mudança natural da cor da matriz.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método titulométrico em fluxo-batelada baseada na detecção por filme digital (FBT-DM) visando à determinação de acidez total de vinhos tintos sem o uso de indicador.

1.2.2 Objetivos Específicos

- I. Montar um sistema automático de análise em fluxo-batelada, acoplado a uma webcam para aquisição dos filmes digitais, para implementar as titulações de vinhos;
- II. Testar e definir qual a melhor componente de cor do RGB para construção das curvas de titulação;
- III. Avaliar os parâmetros ótimos de fluxo do titulador como: localização e posição da janela, velocidade de rotação da bomba peristáltica, etc;
- IV. Aplicar a metodologia proposta à determinação da acidez total de vinhos tintos;
- V. Testar o nível de confiabilidade da metodologia de detecção proposta, comparando os resultados de sua aplicação com os da titulação potenciométrica mediante testes estatísticos usuais em química analítica.

1.3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.3.1 Vinhos tintos

O surgimento desta bebida é incerto, uma vez que não se pode determinar exatamente a região e época do primeiro vinho produzido, entretanto sua descoberta é atribuída à pré-história e às antigas civilizações egípcias, babilônicas e grego-romana, referindo-se às primeiras reações químicas (fermentação e oxidação) observadas pela população (ANDRADE, 2008 e DIAS, 2010).

A implantação da videira no Brasil sucedeu em 1532, por Martin Afonso de Souza, mas foi entre o final do século XIX e início do século XX que começou a produção de vinhos pelos imigrantes italianos, na serra Gaúcha/RS, o estado com maior produção nacional de vinho, cerca de 90% (MORAES, 2012). A produção de vinho no Brasil também foi desenvolvida em outros estados como: São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia, Santa Catarina, Mato Grosso e Pernambuco (SILVA, 2009 e MALHEIRO, 2010).

1.3.1.1 Composição e propriedades colorimétricas da matriz

O vinho é uma das mais nobres bebidas alcoólicas constituídas por mais de 600 compostos presentes em diferentes níveis de concentração. Na realidade, os vinhos possuem uma matriz complexa que engloba predominantemente açúcares, compostos aromáticos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos (ALPUIM, 1997). Além desses compostos, destacam-se as antocianinas que são responsáveis pela coloração vermelha intensa dos vinhos tintos.

As antocianinas provêm dos frutos e flores, sendo de fundamental importância como corantes naturais que podem ser usados na indústria alimentícia (RIBEIRO et al. 2011). São pigmentos pertencentes à classe dos flavonoides, sendo encontrados no vinho dependendo da uva empregada na sua fabricação. As antocianinas são pigmentos necessários para estabilidade da cor do vinho tinto. (CORREIA, 2014)

As antocianinas provavelmente representa o mais importante grupo de pigmentos naturais solúveis em água que são altamente instáveis em temperaturas elevadas. Possivelmente uma estrutura identificada pelo cátion flavílico (cátion 2-fenilbenzopirílio), representado por dois anéis benzênicos ligados por uma molécula de três átomos de carbonos e condensados por um oxigênio (MALACRIDA e MOTTA, 2006).

Conforme a **Figura 1.1**, a estrutura geral das antocianinas é formada por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, regulamente um grupo de

ácidos orgânicos. (TÔRRES et al. 2010 e DONGNAN et al. 2017). Nas antocianinas, uma ou mais hidroxilas das posições 3, 5 e 7 estão ligadas a açúcares (grupos R''), aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos. Os diferentes grupos R e R' e açúcares (R''), bem como os ácidos a eles ligados, identifica os diferentes tipos de antocianinas (TERCI e ROSSI, 2002). Ao estar livres dos açúcares, as antocianinas são chamadas de antocianidinas (RAMOS et al. 2000).

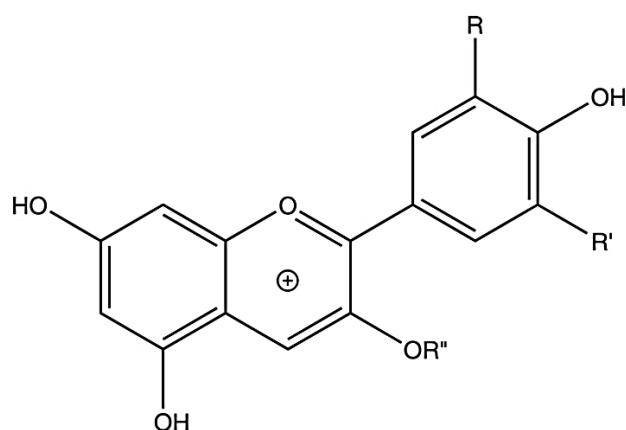


Figura 1.1– Estrutura genérica geral das antocianinas. Adaptado: Tôrres, 2010.

Em solução aquosa, as antocianinas podem apresentar diferentes formas estruturais em equilíbrio. Essas estruturas podem sofrer interferência de diversos fatores, entre estes, temperatura, pH e possíveis ligações com outras substâncias químicas, possibilitando moléculas de antocianinas com diversas colorações. O principal fator que mais influencia na coloração das antocianinas é o pH. Dessa forma, a propriedade das antocianinas apresentarem cores diferentes, dependendo do pH do meio em que elas se encontram, faz com que estes pigmentos possam ser utilizados como indicadores naturais de pH (TERCI e ROSSI, 2002).

As antocianinas presentes nos vinhos tintos são capazes de absorver radiação eletromagnética em uma ampla faixa do espectro visível com o a mudança de pH, característica que permite a quantificação das antocianinas por métodos espectrofotométricos. (TEIXEIRA et al. 2008). Sua coloração resulta da radiação emergente que não é absorvida (transmitida), sendo por isso denominada cor complementar.

Na **Figura 1.2** pode ser observado a relação entre as imagens digitais obtidas durante a titulação de vinho tinto e o pH medido após as adições do volume de titulante, ao passo que a **Figura 1.3** mostra os espectros registrados após as mesmas adições realizadas na amostra diluída na proporção 1:10 (v/v).

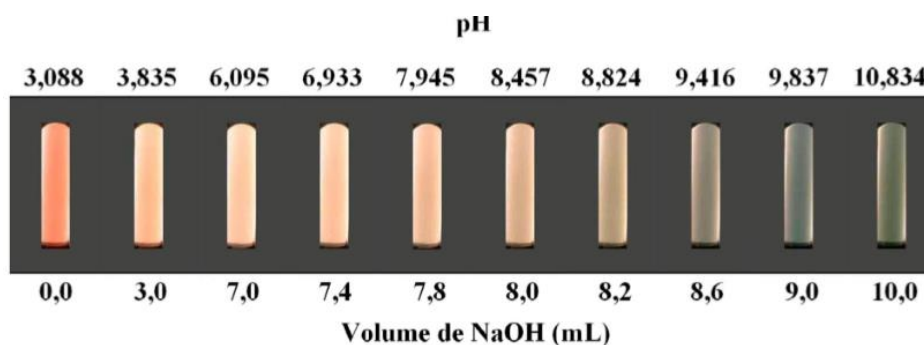


Figura 1.2 – Variações de cores observadas durante a titulação de vinho tinto. Fonte: Tôrres, 2010.

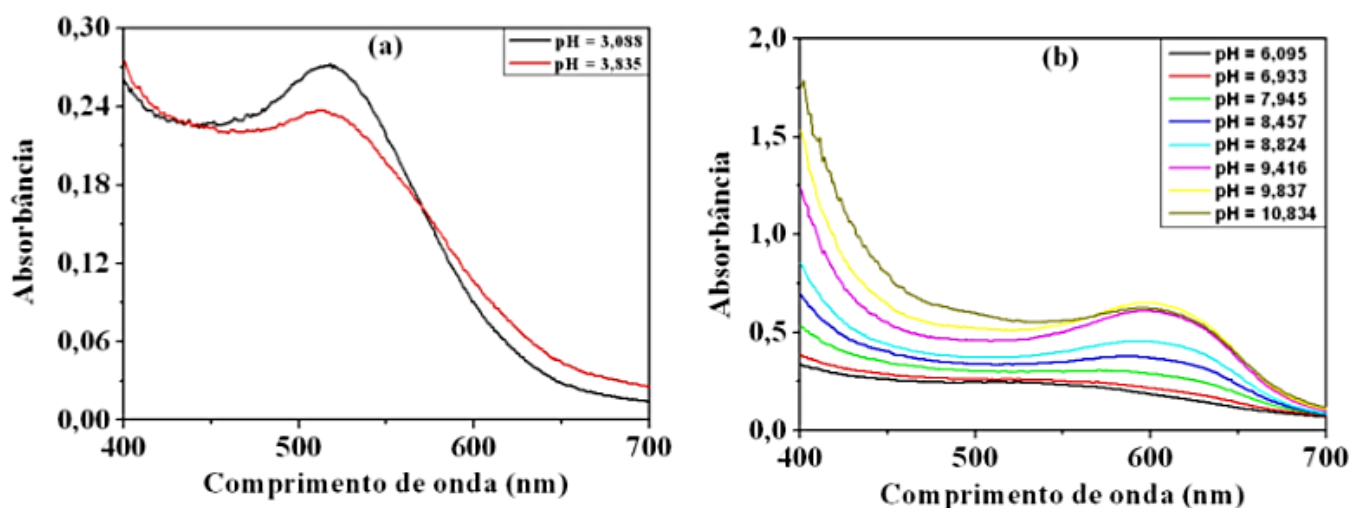


Figura 1.3 – Espectros de absorção obtidos de uma amostra de vinho tinto diluída 1:10 (v/v) em meio ácido (a) e em meio alcalino (b) para cada incremento de volume do titulante. Fonte: Tôrres, 2010.

Ao observar a [Figura 1.3](#), pode-se notar que em meio ácido, predomina a coloração vermelha. Após o ponto final, a cor muda para verde e um aumento na absorbância é verificado em meio alcalino (CORTES, RAMOS e CAVALHEIRO, 2007). Também revelam que os diferentes perfis espectrais com a variação do pH é devido à predominância de diferentes estruturas de antocianinas em cada meio. (TÔRRES, 2010)

Em soluções aquosas podem existir quatro espécies de antocianinas em equilíbrio: cátion flavílico (AH^+), base quinoidal (A), pseudobase carbinol (B), e chalcona (C) como observado na [Figura 1.4](#) (MARÇO e SCARMÍNIO, 2007). As quais representam às diferentes estruturas químicas das antocianinas depende do pH do meio em que elas se encontram, sendo estas responsáveis pela mudança de cor apresentada pela amostra de vinho tinto durante titulação, bem como pelos diferentes espectros apresentados.(TÔRRES, 2010)

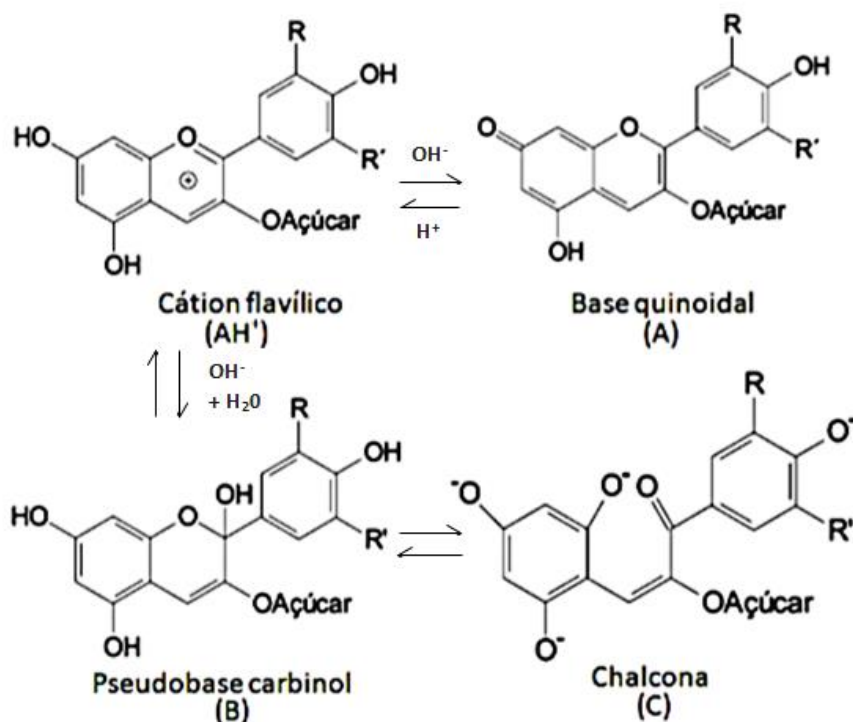
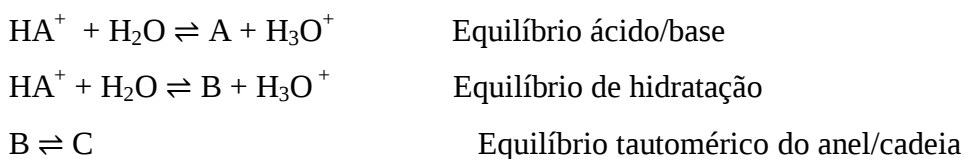


Figura 1.4 – Possíveis transformações estruturais das antocianinas encontradas em soluções aquosas. Adaptado de MARÇO e SCARMÍNIO (2007).

A medida que o pH é elevado desloca o equilíbrio entre os numerosos cromóforos, como resultado, as quantidades relativas de todas essas formas estruturais modificam-se conforme os equilíbrios químicos descritos pelas equações abaixo (MARÇO e SCARMÍNIO, 2007):



Em meio ácido ($\text{pH} < 2$), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico (AH^+). O aumento do pH causa a desprotonação, formando a estrutura base quinoidal (A), concomitantemente, ocorre a hidratação do cátion flavílico (AH^+), formando a estrutura pseudobase carbinol (B) (CAVALCANTI et al. 2011).

As reações das antocianinas em meio aquoso e as propostas de mecanismos envolvidos nestas reações ainda podem ser consideradas objetos de estudos, visto que não são completamente entendidas.

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

1.3.1.2 Parâmetros físico-químicos e Controle de qualidade

Tendo em vista a importância do controle de qualidade em alimentos e bebidas, o vinho deve obedecer aos respectivos padrões de identidade e qualidade definidos na legislação vigente. Geralmente, cada País estabelece sua legislação que controlará tais procedimentos.

No Brasil o órgão responsável por criar e fiscalizar as legislações de controle de qualidade em alimentos e bebidas é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. A Instrução Normativa Nº14, de 08 de fevereiro de 2018, atualiza os padrões de identidade e qualidade do vinho com suas leis e normas, regulariza e controla a circulação e elaboração dos vinhos.

Por meio das análises físico-químicas pode-se avaliar a qualidade dos vinhos nos termos das normas vigentes, pois é através desse monitoramento que é possível identificar possíveis alterações nos teores máximos e mínimos para alguns constituintes do vinho. De acordo com a regulamentação do MAPA (BRASIL, 1999), os padrões de qualidade dos vinhos deverão obedecer aos limites apresentados na **Tabela 1.0**.

Tabela 1.0 - Teores máximos e mínimos para alguns constituintes de vinhos.

	Teor mínimo	Teor máximo
Graduação alcoólica, % v/v a 20°C	8,6	14,0
Acidez total, mEq L⁻¹ (pH 8,2)	40	130
Acidez volátil, mEq L⁻¹	-	20
Cinzas, g L⁻¹	1,5	-
Extrato seco reduzido, g L⁻¹	21,0	-

Fonte: Adaptado de MAPA, 2018.

Os limites apresentados na **Tabela 1.0** devem ser cumpridos, para assim estabelecer os padrões de qualidade dos vinhos (BRASIL, 1999). Entre as propriedades físico-químicas apresentadas na tabela, destacam-se a acidez do vinho tinto, a qual pode ser definida como

acidez volátil e acidez total. A acidez volátil designa o conjunto de ácidos acético, fórmico e butírico (NASCIMENTO, 2005). Altos teores de acidez volátil em vinhos indica a presença de organismos indesejáveis, tais como o *Acetobacter* que provavelmente pode modificar as características do vinho, transformando-o em vinagre. A acidez total ou titulável é determinada pela reação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de base, até o ponto de equivalência que ocorre em $\text{pH} = 8,2$ (BRASIL, 2005 e IAL, 2008). Os principais ácidos orgânicos moderadamente fracos que conferem características ácidas ao vinho são os ácidos tartárico, málico e cítrico, provenientes da uva. Como o ácido tartárico é o mais forte entre os ácidos orgânicos do vinho, influi de modo determinante nas características sensoriais dos vinhos e no pH (RIZZON e MIELE, 2001). Por esta razão a representação da acidez total de uma amostra de vinho é definida com o uso da unidade gramas/Litro (g/L) de ácido tartárico.

1.3.1.3 Métodos de determinação da acidez total de vinho tinto

♦ Princípio dos métodos de titulação ácido-base

A acidez total de uma amostra de vinho é determinada, geralmente, por procedimentos titulométricos que envolvem o uso de uma solução padronizada de álcali, o uso de indicador fenolftaleína e a diluição da amostra antes da titulação. O volume de titulante necessário para reagir completamente com o analito é usado para determinar a concentração do analito. Esse volume exato é denominado ponto de equivalência (ou estequiométrico), o qual está associado à condição de equivalência química, experimentalmente denominado ponto final. O volume do ponto final deve estar o mais próximo possível do volume do ponto de equivalência, sua identificação é realizada pela variação da cor do indicador. Entretanto, há diferença entre o ponto de equivalência e ponto final, é chamada de erro absoluto da titulação. Dividindo-se o erro absoluto pelo volume do ponto de equivalência se obtém o erro relativo ou, em termos percentuais, multiplicando-se o resultado por 100 (cem). (SKOOG et al., 2006 e MENDHAM et al., 2002).

Ao tratar de amostras coloridas, como no caso do vinho tinto, a observação visual da mudança de cor do indicador é dificultada para soluções escuras. Por consequência, a determinação de acidez total de uma amostra de vinho tinto é realizada por titulação potenciométrica, que se baseia na titulação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de álcali até pH próximo a 8,2-8,4. Como recomendado por diversos órgãos oficiais, tais como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A titulação ou volumetria ácido-base, quando realizada em um meio aquoso, consiste de um processo de análise quantitativa baseada na reação de neutralização entre íons $\text{H}_3\text{O}^+_{(\text{aq})}$ e $\text{OH}^-_{(\text{aq})}$ de acordo com a equação:



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

♦ Métodos titulométricos automáticos reportados na literatura

Para determinar a acidez total de amostras de vinhos diversas metodologias são relatadas na literatura. Desde o princípio, a análise de amostras coloridas sempre preocupou os químicos analíticos. Visto que o uso de indicadores comuns muitas vezes apresenta resultados insatisfatórios em razão da dificuldade de se detectar o ponto final.

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

No trabalho de Honorato e colaboradores (1999) foi proposto um titulador em fluxo-batelada para determinação espectrofotométrica da acidez de vinhos brancos com NaOH utilizando m-cresol roxo como indicador. O ponto final foi encontrado aplicando-se o método Fibonacci. Contudo, o emprego do sistema proposto à análise de vinhos tintos foi dificultado pelas variações da absorbância da amostra com o pH, isso levou a variações no sinal medido próximo ao ponto de equivalência.

Fernandes e colaboradores (2006) desenvolveram um analisador em fluxo por multicomutação com detecção espectrofotométrica para a determinação de ácido tartárico em vinho tinto sem tratamento prévio da amostra. O procedimento consiste na reação do ácido tartárico com o vanadato de sódio, no qual o composto formado foi monitorado em um comprimento de onda de 490 nm. Com este analisador foram obtidas concentrações entre 0,5 e 10,0 g l⁻¹ de ácido tartárico (r = 0,9998). A aplicação do teste t emparelhado revelou não existir diferença sistemática significativa entre os resultados dos métodos proposto e de referência ao nível de 90% de confiança.

Garcia e Reis (2006) propuseram um procedimento automatizado para titulação fotométrica de vinho tinto, empregando multicomutação em fluxo-batelada. A detecção fotométrica foi realizada utilizando um fotômetro caseiro baseado em LED. O dispositivo de mistura, o LED e o fotodetector foram acoplados à câmara de titulação para formar uma unidade compacta e de pequeno porte. O controle do programa foi desenvolvido com a capacidade de reconhecer o ponto final da titulação utilizando fenolftaleína como indicador.

Tôres e colaboradores (2011) determinaram a acidez total de vinhos tintos por meio de titulação ácido-base sem o uso de indicador externo, explorando apenas as imagens capturadas com uma webcam. Os resultados foram comparados com os obtidos pela titulação potenciométrica usada como método de referência. Constatou-se que não há diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados, aplicando-se o teste t emparelhado ao nível de 95% de confiança e a frequência analítica de 11 amostras por hora.

Reis e colaboradores (2017) desenvolveram um procedimento de titulação fotométrica totalmente automático, empregando um analisador em fluxo por multicomutação para determinação da acidez em suco de frutas, vinagre e vinho branco. O procedimento de titulação fotométrica emprega uma bomba de seringa caseira para propulsão dos fluídos, válvulas solenóides, fotômetro caseiro baseado em LED, a aquisição de dados e controle do programa fundamenta-se no conceito de busca binária. Nas metodologias de análise em fluxo as bombas de seringa têm sido empregadas para propulsão de fluido. No entanto, apenas alguns métodos de titulação empregando tais dispositivos foram propostos. Na configuração proposta não houve necessidade de manutenção, incluindo as seringas. Esta é uma vantagem comparativa referente ao uso de bombas peristáltico, onde os tubos de bombeamento sofrem danos com o uso e devem ser substituído. Este analisador obteve uma precisão de 1,2%, frequência analítica de 15 amostras por hora e ao aplicar o teste t pareado aos resultados, não foram observadas diferenças significativas no nível de 95% confiança. O sistema proposto apresenta a robustez necessária para ser usado em atividades de pesquisa, bem como em trabalhos de laboratório de rotina.

Na determinação da acidez total em termos da massa de ácido tartárico presente nos vinhos, grande parte das metodologias mencionadas acima necessita do uso de um indicador.

Em soluções aquosas, a escolha de um indicador adequado para uma titulação ácido-base é realizada por meio da faixa de pH em que ele muda de cor. Essa transição deve coincidir com a faixa de pH que engloba o intervalo de equivalência da curva de titulação (pH 8,2 - 8,4). Isso explica a utilização de diferentes indicadores para a mesma finalidade. Por

exemplo, a faixa de pH para os indicadores fenolftaleína e purpura de m-cresol são pH 8,0–10,0; pH 7,4 – 9,0, respectivamente. (BARBOSA, 2005)

No entanto, o uso de indicadores ocasiona o erro de titulação, que consiste no erro químico causado pelo fato dos valores de pH no intervalo de transição do indicador ser diferente do intervalo de transição para região de equivalência da curva de titulação (BARBOSA, 2005).

Por essas razões, a importância de determinar a acidez total de vinhos tintos tendo em vista a mudança natural da cor da matriz, como meio de detectar essa mudança de cor e encontrar o ponto final da titulação.

1.3.2 Analisadores em Fluxo

Segundo IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) os analisadores em fluxo são classificados conforme o processamento da amostra e (ou) reagente (contínuo ou intermitente), tal como as características do fluxo (segmentado, não-segmentado ou monosegmentado) (ZAGATTO et al., 2002). Assim sendo, os analisadores são classificados como:

- Analisador em Fluxo Segmentado (do inglês: Segmented Flow Analyser – SFA);
- Analisador por Injeção em Fluxo (do inglês: Flow Injection Analyser – FIA);
- Analisador em Fluxo Monosegmentado (do inglês: Monosegmented Flow Analyser – MSFA);
- Analisador por Injeção Sequencial (do inglês: Sequential Injection Analyser – SIA);
- Analisador em Fluxo com Multicomutação (do inglês: Multicommutation in Flow Analyser – MFA);
- Analisador em Fluxo-Batelada (do inglês: Flow-batch Analyser – FBA).

1.3.2.1 Analisador em Fluxo Segmentado

A pesquisa pioneira englobando sistemas de análises em fluxo foi desenvolvida por Skeegs, intitulado de analisador de fluxo contínuo. Esse sistema consiste na introdução de fluxo de amostra segmentada com várias bolhas de ar, o que proporciona a separação entre amostras, reduzindo a dispersão e intercontaminação das amostras no fluido carregador durante o percurso analítico. A desvantagem deste analisador é devido à necessidade de utilizar um dispositivo (desborbulhador) para a remoção das bolhas, a fim de que não alcance

o detector. Atualmente esse sistema é conhecido por analisador em fluxo segmentado (SKEEGS, 1957).

1.3.2.2 Analisador por Injeção em Fluxo

Esse sistema consiste na inserção da amostra em um fluido carregador que transporta a mesma para o detector sem o uso de segmentos de bolhas de ar. Durante o percurso analítico em direção ao detector a mistura da amostra com o reagente ocorre apenas por dispersão e os equilíbrios físico e químico não são atingidos. Como resultado, estes analisadores apresentam diminuição na sensibilidade do método, ao comparar com outros analisadores automáticos. Outra desvantagem ao comparar com outros analisadores automáticos é devido a sua baixa flexibilidade, pois caso seja preciso modificar uma configuração física do sistema, novos parâmetros devem ser analisados (RUZICKA E HANSEN, 1975).

1.3.2.3 Analisador em Fluxo Monosegmentado

Essa técnica consiste na inserção da amostra e de reagente entre duas bolhas de ar, o que possibilita a minimização da dispersão das amostras no fluido carregador. Consequentemente, há uma alta sensibilidade e menor intercontaminação das amostras durante sua residência no percurso analítico, sendo assim bastante eficiente para reações de cinética lenta (PASQUINI E OLIVEIRA, 1985).

1.3.2.4 Analisador por Injeção Sequencial

Nesse sistema, a inserção de volume pré-determinados de amostra e reagente geralmente ocorre através de uma seringa e uma válvula seletora com várias portas de entrada e apenas uma de saída. As amostras e reagentes são aspirados para uma bobina coletora, na qual pode ocorrer a homogeização, separação e mistura das soluções. Posteriormente é invertido o fluxo, e a solução é bombeada para o sistema de detecção (RUZICKA E MARSHALL, 1990). Ao comparar com outros analisadores automáticos, observa-se que a desvantagem deste analisador está relacionada com a forma sequencial de aspiração das soluções, que pode comprometer a velocidade analítica. (SANTOS, 2010)

1.3.2.5 Analisador em Fluxo com Multicomutação

Reis e colaboradores propuseram, em 1994, o analisador em fluxo com multicomutação, esse sistema fundamenta-se na inserção de amostra e reagentes de modo alternado e consecutivo. Refere-se a sistemas em fluxo projetados com comutadores discretos, controlados por computadores. Como resultado, o controle do acionamento das válvulas é realizado via um acionador de válvulas ou interface eletrônica, que são controlados pelo computador, com o intuito de inserir volumes precisos de alíquotas, de amostra e reagentes que serão transportados pelo carregador em direção ao detector (Reis et al. 1994).

1.3.2.6 Analisador em Fluxo-Batelada

Esse sistema foi proposto em 1999 por Honorato e colaboradores, como alternativa aos métodos existentes de analisadores automáticos em fluxo. Nesse trabalho, o objetivo foi desenvolver uma titulação automática, que opera com uma única solução padrão (titulante) e não requer curvas analíticas, trata-se de uma titulação em batelada que ocorre no interior de uma câmara de mistura.

Para implementação do sistema em fluxo-batelada os seguintes componentes são necessários:

- Câmara de mistura
- Válvulas solenoides,
- Agitador magnético,
- Bomba peristáltica,
- Acionador de válvulas,
- Detector;
- Computador, etc.

A câmara de mistura ou câmara reacional é o principal componente do analisador em fluxo-batelada, pois é possível realizar diversos procedimentos analíticos, tais como: acondicionamento dos fluidos, diluições, método de adição padrão, pré-tratamento da amostra, preparo de soluções padrão e detecção do analito. Também é possível obter melhores condições de misturas dos fluidos ao empregar o uso de uma barra magnética no interior da câmara de mistura, controlada através de um agitador magnético.

As principais características dos analisadores em fluxo-batelada são descritas a seguir MOREIRA, P. N. T. (2009):

- Usa-se uma câmara de mistura e válvulas solenoides de três vias (para direcionar os fluidos);
- São controlados por auxílio de um computador, garantindo precisão no tempo de acionamento das válvulas e, conseqüentemente, nos volumes dos fluidos adicionados na câmara;
- Conforme o método analítico desenvolvido, a adição da amostra, reagentes, soluções-padrão, indicadores, etc, no interior da câmara aberta são realizados em fluxo usando um processo de multicomutação simultânea e/ou intermitente dos fluidos;
- A amostra é processada em batelada, assim, as medidas podem ser realizadas com a máxima sensibilidade do sinal analítico.
- A medida do sinal analítico pode ser medido em fluxo contínuo ou em fluxo interrompido, na própria câmara ou fora dela;
- Ao comparar com outros analisadores em fluxo, métodos clássicos bem estabelecidos, são mais fáceis de serem automatizados;
- Oferecem alta flexibilidade na adaptação de diversas metodologias, possibilitando simples ajustes no programa de controle. Como por exemplo, alterar parâmetros como a faixa de concentração para uma curva analítica.
- São bastante versáteis, uma vez que, sem modificar as configurações físicas do sistema, possibilita, mudando apenas o programa de controle, a implementação de diversos procedimentos analíticos (titulação, adições de analito, preparação de soluções de calibração, exploração de gradientes de concentração, etc.);
- Compreende as características favoráveis dos analisadores em fluxo e em batelada, proporcionando aos analisadores fluxo-batelada uma universalidade de aplicações, pois qualquer procedimento analítico pode, a princípio, ser implementado.

Em síntese, os sistemas em fluxo-batelada oferecem uma instrumentação simples, de fácil operação, versáteis, flexíveis, apresentam procedimentos analíticos rápidos e precisos, com baixo consumo de reagentes e amostras, baixo custo por análise, alta frequência (ou velocidade) analítica, alta precisão e exatidão, baixa geração de resíduos, assim como menor contaminação e manipulação de amostras e reagentes (ZAGATTO et al. 2009 e ANDRADE, 2012). Suas características permitem a adaptação de uma webcam para a aquisição de imagens ou vídeos digitais na própria câmara de mistura e reação.

Sistemas automáticos em fluxo, empregando detecção baseada em imagem digital, têm permitido o desenvolvimento de métodos com grande potencial analítico. A automatização dos procedimentos (titulação, adição de padrão, etc) tem proporcionado aos métodos desenvolvidos muitas vantagens, tais como um menor custo e maior rapidez, versatilidade e flexibilidade, etc. Quando a detecção é realizada por imagem é possível, por exemplo, realizar uma titulação sem uso de indicador explorando a mudança de cor da própria matriz (TÔRRES et al. 2010).

1.3.3 Imagem Digital

A imagem é definida como uma reprodução de um objeto real ou cena preservada em um meio. As imagens são de grande relevância nas relações da comunicação humana, pois são representações da realidade que nos cerca. Dessa forma, são de fundamental importância para diversos ramos do conhecimento como, medicina, biologia, análise química, astronomia, artes, automação industrial, etc. A primeira imagem digital produzida por Russell Kirsch em 1957. Trata-se da imagem de um bebê, em uma fotografia de dimensões 5x5 cm, registrada com 176 pixels em preto e branco (GELADI E GRAHN, 1996).

A imagem digital é constituída por um conjunto de pixels. A palavra pixel é uma abreviação do inglês *picture element*, que em português significa elemento de figura. Assim sendo, o formato mais comum para o pixel é a forma retangular ou quadrada. (GONZALEZ et al. 2000 e ALBUQUERQUE, 2002) . A quantidade de cores que cada pixel pode assumir refere-se à profundidade da cor e independe da resolução da imagem, assim a cor de um único pixel em uma imagem é representada pela quantidade de bits (GAIÃO, 2006).

Uma imagem digital pode apresentar um conjunto de cores, dependerá da quantidade de bits presentes, podendo variar de duas cores (1-bit, por exemplo: branco ou preto) até milhões de cores (24-bits, 32-bits, 48-bits e outros), conforme mostra a **tabela 1.1**. (LEÃO, 2005).

Tabela 1.1 - Valores referentes ao número de bits e a variância no conjunto de cores.

Número de bits	Quantidade de cores (valores aproximados)
1	2
8	256
16	65.536
24	16,7 milhões
30	1 bilhão
32	4 bilhões
36	68 bilhões
48	281 trilhões

Fonte: adaptado de Leão, 2005

Outros aspectos importantes que definem a imagem digital são a resolução e a cor. A primeira consiste na quantidade de pixels de que é formada a imagem digital (TÔRRES, 2010). A cor refere-se à percepção da luz por células fotorreceptoras do olho humano (SIQUEIRA, 2016). A retina é uma camada fina de tecido nervoso sensível à luz localizada no interior do olho. Possui dois tipos de células fotorreceptoras: os cones e os bastonetes. Os cones permitem a distinção das cores e detalhes de objetos, enquanto que o componente majoritário, os bastonetes, são sensíveis a todos os comprimentos de onda e detectam a intensidade da luz. (GONZALES, 2000)

Os principais modelos de cores utilizados em diferentes aplicações visando o processamento de imagens são o RGB (Red, Green, Blue) , HSI (Hue, Saturation, Intensity) (GONZALES, 2000) e HLS (Hue, Lightness, Saturation).

1.3.3.1 Modelo de cor RGB

Nos últimos anos o uso de câmeras fotográficas, webcams, scanners e celulares com câmera embutida, estão sendo bastante explorado como ferramentas analíticas para aquisição e tratamento de dados aplicados na química analítica, realizando determinações qualitativas e quantitativas com desempenho adequado. Dessa forma, o modelo RGB é uma alternativa de baixo custo visando obter resultados analíticos precisos, por meio dos níveis de cores no padrão RGB (vermelho, verde, azul). (FONSECA, 2016)

No modelo de cor RGB, a profundidade de cor de um pixel é de 24 bits, sendo 8 bits para cada componente R, G e B, que corresponde a 256 diferentes tonalidades para o vermelho (R), verde (G) e azul (B), gerando aproximadamente 16,7 milhões de possibilidades de tons diferentes de cor. (LIMA et al. 2016 e GAIÃO et al. 2006)

O modelo de cor RGB é representado geometricamente em um espaço tridimensional denominado por cubo de cores, como mostrado na [Figura 1.5](#).

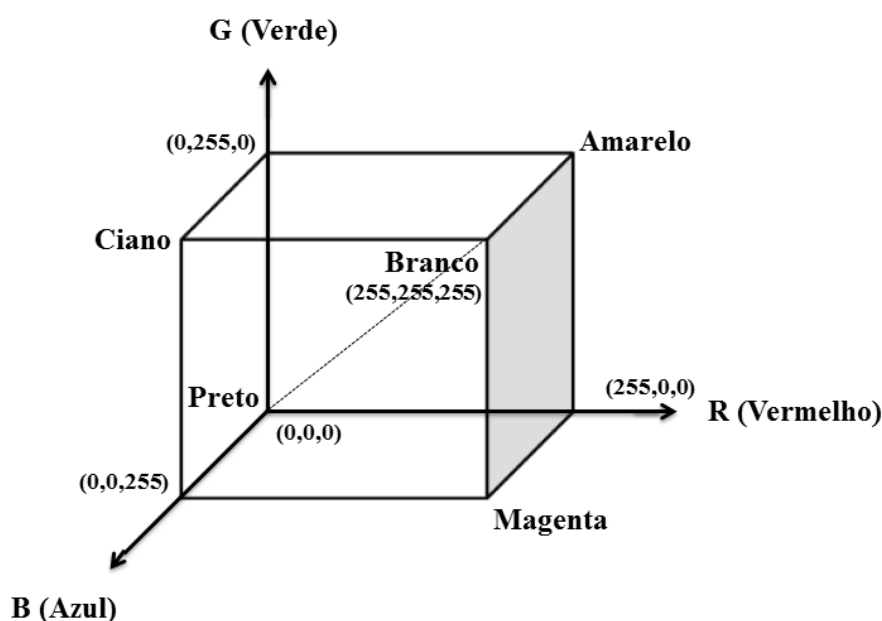


Figura 1.5 – Representação geométrica do modelo RGB. Adaptado de Siqueira, 2016.

Como ilustrado na [Figura 1.5](#), nas arestas têm-se as cores primárias R, G ou B em uma matriz tridimensional. Enquanto que nas faces há uma mistura de duas cores primárias formando assim as cores secundárias, como mostra a [tabela 1.2](#). A diagonal principal deste cubo representa a escala de cinza.

Tabela 1.2 – Resultado da combinação de duas cores primárias.

Combinação de duas cores primárias	Cores secundárias
Vermelho + verde	Amarelo
Vermelho + Azul	Magenta
Azul + Verde	Ciano

O cubo de cores (**Figura 1.5**) está representado por cada componente que assume valores de coordenadas cartesianas variando de 0 (preto – ausência de cor) a 255 (branco - combinação de todas as cores primárias em máxima intensidade) e a combinação deles resulta em todas as cores possíveis, que corresponde a 256 níveis de tonalidades para o vermelho (R), verde (G) e azul (B) respectivamente (FONSECA, 2016 e LIMA et al. 2016):

- Vermelho (R = 255, G = 0 e B = 0)
- Verde (R = 0, G = 255 e B = 0)
- Azul (R = 0, G = 0 e B = 255)
- Amarelo (R = 255, G = 255 e B = 0)
- Ciano (R = 0, G = 255 e B = 255)
- Magenta (R = 255, G = 0 e B = 255)
- Preto (R = 0, G = 0 e B = 0)
- Branco (R = 255, G = 255 e B = 255)

Segundo Benedetti “a maioria dos métodos analíticos baseados no uso de imagens digitais emprega o modelo de cores RGB”. (BENEDETTI, 2013)

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

1.3.3.2 Filme Digital

Os filmes digitais são uma sequência de imagens formadas por bitmaps ortogonais (frames). Quadro ou frame são as imagens que, quando reproduzidas a uma frequência constante resultam na sensação de movimento. A proporção na qual um dispositivo de imagem produz imagens consecutivas é expressa em quadros por segundo (FPS). Este termo técnico é empregado para gráficos de computador, câmeras de vídeo e sistemas de captura de movimento. (SIQUEIRA et al. 2016)

A introdução da técnica de imagem digital (DI) apresenta-se com grande potencial no tratamento para detecção de ponto final, em razão de sua capacidade de superar a enorme dificuldade com que métodos tradicionais lidam com a formação das cores intermediárias do indicador e outras amostras de cores para conseguir detectar visualmente e de maneira precisa o ponto final (TÔRRES, 2011). Esta nova abordagem para a detecção mostrou ser precisa e exata, contudo são ainda obtidas manualmente, consumindo elevado tempo (GAIÃO et al. 2006).

Lima e colaboradores (2016) desenvolveram um titulador automático baseado em filmes digitais, que utiliza o coeficiente de correlação de Pearson para determinar o ponto final de titulações de amostras de óleos comestíveis por meio dos valores obtidos para a componente de cor matiz (H). Os resultados obtidos pelo titulador proposto apresentaram valores concordantes com os de referência.

Siqueira e colaboradores (2016) desenvolveram um titulador em fluxo-batelada com detecção a base de filmagem digital e correlação de Pearson para a determinação de dureza total e alcalinidade total em águas minerais. No método foi utilizado uma câmera digital para a captura das filmagens, e os valores das componentes RGB são utilizados para calcular os valores de coeficiente de correlação de Pearson (r). Nesta estratégia, a detecção do ponto final de titulação é realizada através da correlação estatística das imagens obtidas a partir de um filme digital do sistema reacional. O método foi aplicado na análise de águas minerais e os resultados foram comparados com a titulação clássica, não apresentando diferenças estatisticamente significativas com aplicação do teste t pareado a 95% de confiança.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Soluções, Reagentes e Amostras

Uma solução de hidróxido de sódio $0,0986 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada a partir do reagente de grau analítico NaOH (Synth). Sua padronização foi realizada de acordo com procedimento descrito na literatura (JEFFERY et al., 1992).

Onze amostras de vinhos tintos (secos e suaves) de diferentes marcas e lotes foram doadas por vinícolas do Vale do Submédio do São Francisco (VSMSF).

2.2 Equipamentos

Uma webcam da Microsoft LifeCam, modelo H5D-00013.

Uma bomba peristáltica Ismatec, modelo IPC, equipada com 8 canais e 8 roletes, foi usada na propulsão dos fluidos por intermédio de tubos de bombeamento de Tygon® com diâmetro interno de 1,52 mm.

Para o transporte das soluções e amostras envolvidas no processo de titulação, foram utilizados tubos de Teflon® com 0,8 mm de diâmetro interno.

No FBT-DM foram utilizadas quatro válvulas solenoides de três vias da Cole Parmer®, modelo RZ 01540–11.

Utilizou-se uma interface de controle arduino UNO, é uma placa de microcontrolador baseado no ATmega328P.

Utilizou-se um acionador de válvulas baseado em circuito integrado ULN 2003 para controlar o acionamento das válvulas solenoides.

Um agitador magnético IKA da Lab Disc, modelo White.

Um pHmêtro Metrohm, modelo 914, foi usado na titulação potenciométrica implementada para obtenção dos valores de referência da acidez total das amostras dos vinhos tintos.

Um computador com processador Intel Core2Duo, HD de 120 Gigabyte e memória de 2 Gigabyte (sistema operacional Windows XP®) .

2.3 Sistema de titulação baseado em filmagem digital

O titulador fluxo batelada baseado em filmagem digital (FBT-DM) foi construído utilizando: um computador, uma bomba peristáltica, quatro válvulas solenoides, um acionador de válvula, uma webcam, uma câmara de mistura e reação (Câmara FBT), um agitador magnético e uma placa arduino UNO. Sua organização física está ilustrada na **Figura 2.0**.

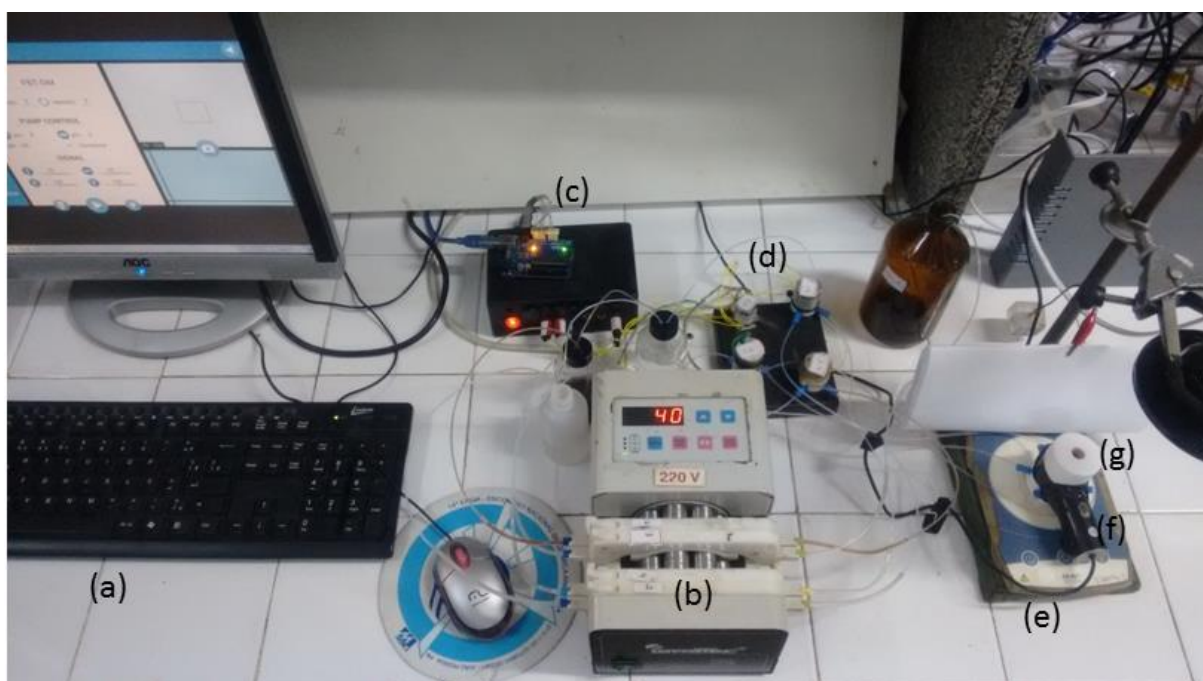


Figura 2.0 – Fotografia do FBT-DM. (a) Computador, (b) bomba peristáltica, (c) acionador de válvulas, (d) válvulas solenoide, (e) agitador magnético, (f) webcam, (g) Câmara de mistura.

A fim de se obter uma melhor condição de iluminação para a gravação da filmagem durante o procedimento de titulação, foi utilizada uma lâmpada LED de 2,5W (Modelo SMD), posicionada a uma distância de 13 cm acima da câmara de mistura. Além disso, a mudança de coloração apresentada durante o procedimento de titulação foi melhor observada posicionando-se uma placa recoberta com papel branco a uma distância de 3 cm de uma das janelas da câmara de mistura. Como pode ser visto na **Figura 2.1**.

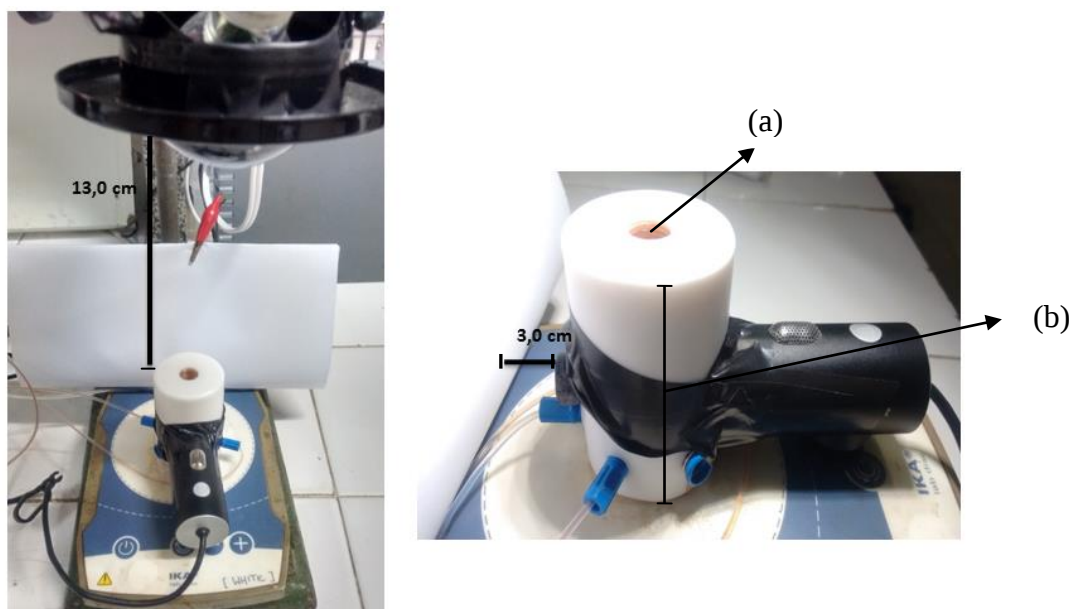


Figura 2.1 - Fotografia do sistema de detecção de análise. (a) diâmetro interno da câmara de mistura com 1 cm. (b) 5 cm de altura da câmara de mistura.

Nas seções a seguir, apresenta-se uma descrição do conjunto de dispositivos interconectados, tais como câmara de mistura, bomba peristáltica, válvulas solenoides, acionador de válvulas, agitador magnético, webcam e um microcomputador, que engloba o sistema titulador em fluxo-batelada.

➤ Computador

Para aquisição e controle dos dados, um computador com processador Intel Core2Duo, HD de 120 Gigabyte e memória de 2 Gigabyte, integrado a uma interface de controle Arduino foi empregado.

➤ Acionador de válvulas com interface arduino

O acionador de válvulas foi desenvolvido para controlar a abertura das válvulas solenoides. Este dispositivo é baseado em um circuito integrado ULN 2003, que é capaz de controlar até sete canais simultaneamente e de forma independente, com capacidade total de corrente de 500 mA. O circuitos de acionamento das válvulas são programados para, quando receberem uma tensão maior que 3,8 V em suas portas de entradas, enviarem um tensão de 12V, gerando uma corrente de 150 mA nas portas de saída (onde estão conectadas as válvulas) fornecendo uma potência suficiente para acionar as válvulas solenoides. Para que

realize sua função, o acionador de válvulas foi conectado ao computador via USB através de uma interface arduino UNO.

Arduino Uno é uma placa microcontroladora baseada no ATmega 328P. Este possui 14 pinos de entrada / saída digital (dos quais 6 podem ser usados como saídas PWM), 6 entradas analógicas, um cristal oscilador de 16 MHz, uma conexão USB, uma entrada de alimentação 12v, um ICSP e um botão de reset.

➤ Válvulas solenoide

Acoplada à bomba, a válvula solenoide direciona os fluidos até a câmara de reação cujas posições on/off (ligada ou desligada) são controladas pelo acionador de válvulas. Nesse sistema uma das três vias é bloqueada por vez, e sua posição difere quando a válvula está ligada (ON) ou desligada (OFF), de forma que o fluxo das soluções dá-se mediante as outras duas, conforme mostra a [Figura 2.2](#).

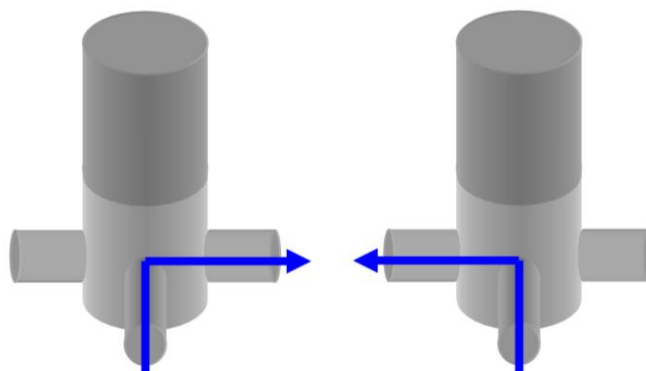


Figura 2.2 – Esquema do funcionamento de válvulas solenoides de três vias permitindo a passagem do fluxo de solução em dois sentidos: **(a)** fluxo para a direita quando desligada (OFF) e **(b)** fluxo para a esquerda quando ligada (ON)

Cada tubo de bombeamento pode ser ligado a uma válvula, de maneira que enquanto a válvula está desligada a solução retorna para o seu respectivo recipiente, sendo injetada no percurso analítico quando esta é ligada.

➤ Bomba peristáltica

Para a aspiração das soluções do sistema utilizou-se uma bomba peristáltica Ismatec (modelo IPC), e tubos de Tygon® com diâmetro interno de 1,14 mm para o bombeamento e, para o transporte, foram utilizados tubos de Teflon® com 0,8 mm de diâmetro interno. A aspiração foi realizada a partir de um dos canais da bomba peristáltica, a princípio numa vazão de $0,80 \text{ mL min}^{-1}$.

Cada válvula pode ser ligada a um tubo de bomba, de maneira que enquanto a válvula está desligada a solução retorna para o seu respectivo recipiente, sendo injetada no percurso analítico quando esta é ligada.

➤ Agitador magnético

Para fornecer uma homogeneização eficiente da mistura dos fluidos introduzidas na câmara de mistura foi utilizado um agitador magnético e inserido uma barra magnética no interior da câmara.

➤ Câmara de mistura

Visando obter uma melhor homogeneização na reação de neutralização do sistema proposto FBT-DM empregou uma câmara de mistura com um volume interno total de 3,6 mL, na qual em seu interior foi colocado uma pequena barra magnética (BM). Esse dispositivo foi confeccionado em PTFE (Teflon®), contendo 7 canais de entrada e 1 para saída, bem como duas janelas de quartzo posicionadas paralelamente. A câmara de mistura apresenta diâmetro interno de 1 cm.

➤ Webcam

O sistema de detecção utilizado foi uma webcam da Microsoft LifeCam, modelo H5D-00013, a qual realiza monitoramento das filmagens digitais do sistema titulométrico. A webcam (**Figura 2.3**) foi fixada a janela de filmagem da câmara FBT, para a captura dos filmes foi utilizado uma resolução de 960x544.



Figura 2.3 – Ilustração da webcam

Antes de dar início Procedimento de titulação FBT-DM proposto, é necessário realizar as seguintes etapas:

- ✓ Estudo da vazão dos canais das válvulas solenoides;
- ✓ Escolha da região para obtenção dos valores de RGB;

2.3.1 Estudo da vazão dos tubos das válvulas solenoides

Inicialmente foi realizado o estudo da vazão, que tem por objetivo avaliar o volume da solução que pode ser transportado para a câmara de mistura através da bomba peristáltica em um determinado tempo. Cada válvula foi avaliada empregando uma balança analítica para medida das massas correspondentes a volumes de água destilada empregando tempos de acionamento de 1, 3, 5, 7 e 10s. Os tempos de acionamento das válvulas solenoides são proporcionais aos volumes adicionados na câmara de mistura. Dessa forma, esse estudo preliminar de calibração para cada válvula foi necessário para obter com precisão a medida dos volumes adicionados à câmara de mistura.

2.3.2 Escolha da região para obtenção dos valores de RGB

Com o intuito de selecionar a área para aquisição dos valores das componentes RGB, o usuário seleciona uma região de interesse (RI), usando o mouse através do programa de controle. Depois de selecionada a região, o programa utiliza automaticamente as mesmas coordenadas da região delimitada para todos os frames do filme digital. Foram estudadas cinco regiões diferentes para extração dos dados, conforme a **Figura 2.4**.

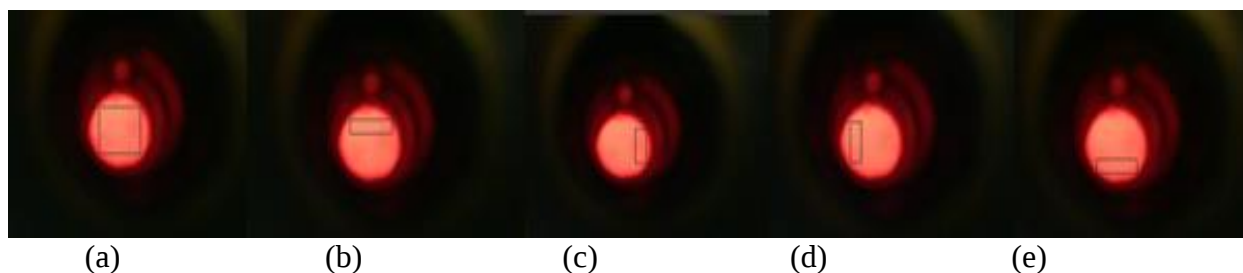


Figura 2.4 – Regiões estudadas para escolha da melhor área para realização das análises. (a) Janela Central com orientação espacial (X,Y) de 180x111. (b) Janela superior com orientação espacial (X,Y) de 187x107. (c) Janela direita com orientação espacial (X,Y) de 222x108. (d) Janela esquerda com orientação espacial (X,Y) de 188x113. (e) Janela inferior com orientação espacial (X,Y) de 190x144.

2.3.3 Procedimento de titulação FBT-DM

O diagrama esquemático simplificado do titulador em fluxo-batelada usado na determinação da acidez total de vinhos tintos é mostrado na **Figura 2.5**. As etapas do procedimento analítico são descritas a seguir:

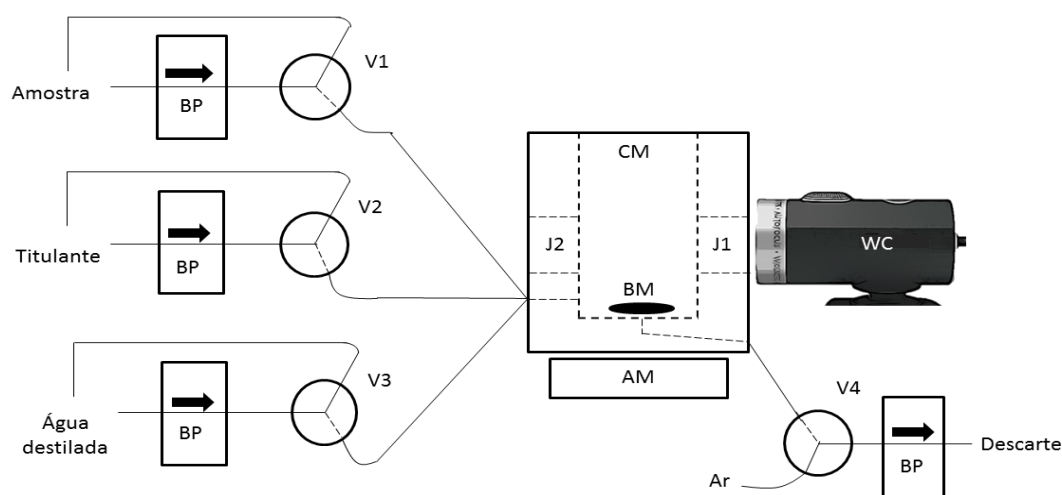


Figura 2.5 – Diagrama esquemático FBT-DM. Câmara de mistura (CM), bomba peristáltica (BP), barra magnética (BM), agitador magnético (AM), webcam (WC) e válvulas solenoides (V1 a V4).

1) Etapa de preenchimento dos canais e modo de espera

Inicialmente é necessário preencher os canais entre as válvulas (V1, V2 e V3) e a câmara de mistura, com as soluções utilizadas na análise. Para essa finalidade são acionadas simultaneamente as válvulas V1, V2, e V3 e suas soluções são bombeadas em direção à câmara de mistura. Ao desligar as válvulas, ocorre o retorno contínuo das soluções para seus respectivos recipientes, conforme apresentado na **Figura 2.6**.

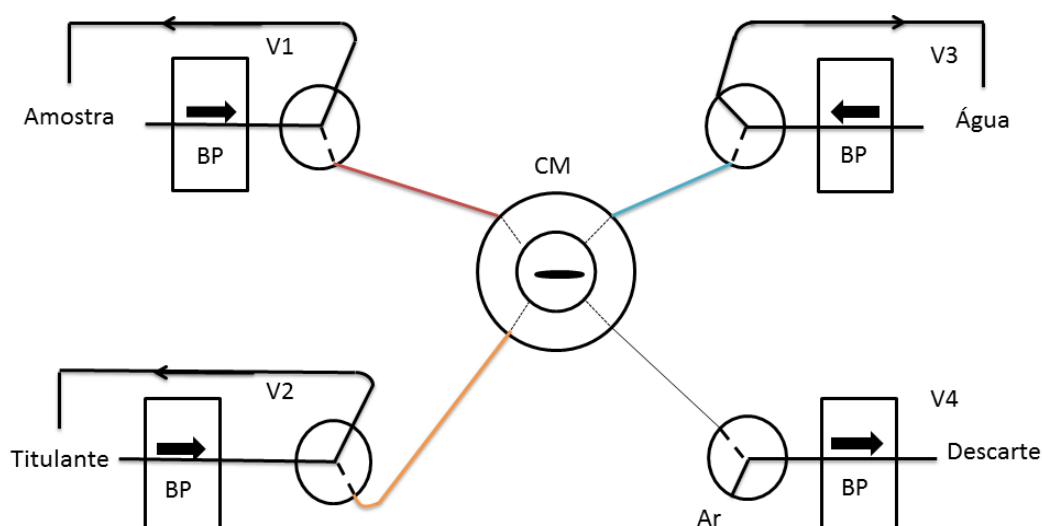


Figura 2.6 – Diagrama do sistema fluxo-batelada para titulação FBT-DM em modo de espera. (—) Linhas de fluxo vazia ou estacionada e (—) preenchida com solução; (- - -) Linha de fluxo alternativa; (BP) Bomba peristáltica; (V1 a V4) válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura.

1) Etapa de análise

2.i. Aciona-se a válvula V1 durante 24 s de modo a introduzir na câmara de mistura o volume de 1,6 mL da amostra de vinho tinto, de modo que a janela da filmagem seja completamente preenchida, conforme ilustrado na **Figura 2.7**.

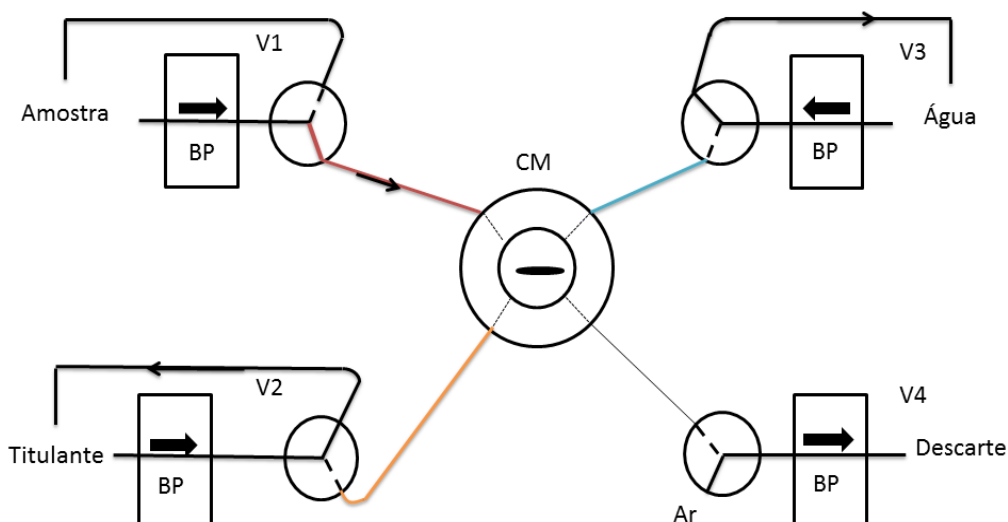


Figura 2.7 – Etapa de análise 2-i do procedimento de titulação DM: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida com solução; (BP) Bomba peristáltica; (V1 a V4) válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura.

2.ii. Conforme ilustrado na **Figura 2.8** aciona-se a válvula V2 durante 25s a fim de introduzir na câmara de mistura o volume em excesso de 2,0 mL de titulante. O excesso de

titulante produz uma descontinuidade na curva de titulação onde existe um ponto final, que está associado à condição de equivalência química.

Durante a adição do titulante é realizado a gravação do filme da reação, ou seja, é registrado as variações de cor decorrentes das reações químicas entre titulante e amostra no interior de câmara, que promove uma variação nos valores das componentes R, G e B.

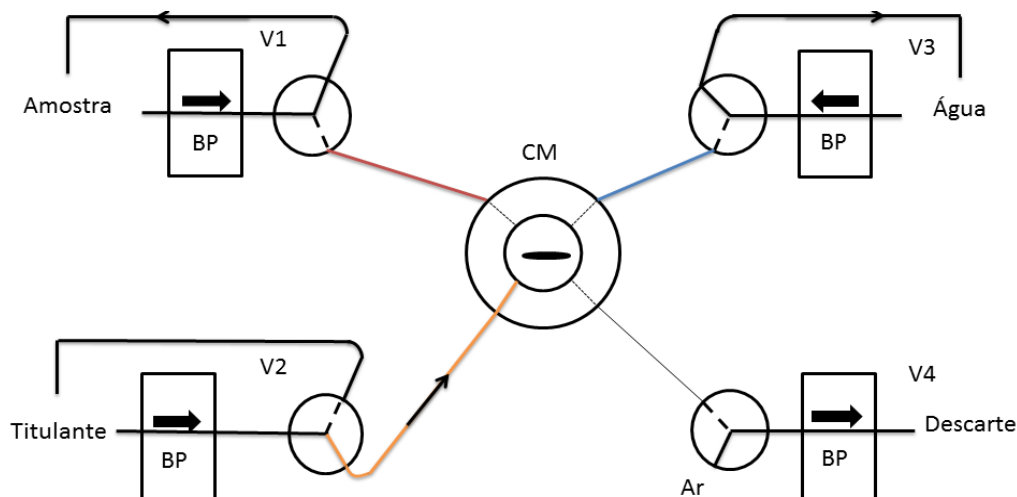


Figura 2.8 – Etapa de análise 2-ii do procedimento de titulação DM: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida com solução; (BP) Bomba peristáltica; (V1 a V4) válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura.

2) Etapa de limpeza do sistema FBT

Antes de iniciar a etapa de limpeza a válvula V4 é aberta para esvaziar a câmara de mistura. Entre cada medida a válvula V3 é novamente acionada durante 45s visando adicionar na câmara de mistura o volume de água deionizada necessário para efetuar a limpeza; seguindo a etapa de acionamento da V4 durante 47s para esvaziamento da câmara de mistura. Conforme a [Figura 2.9](#).

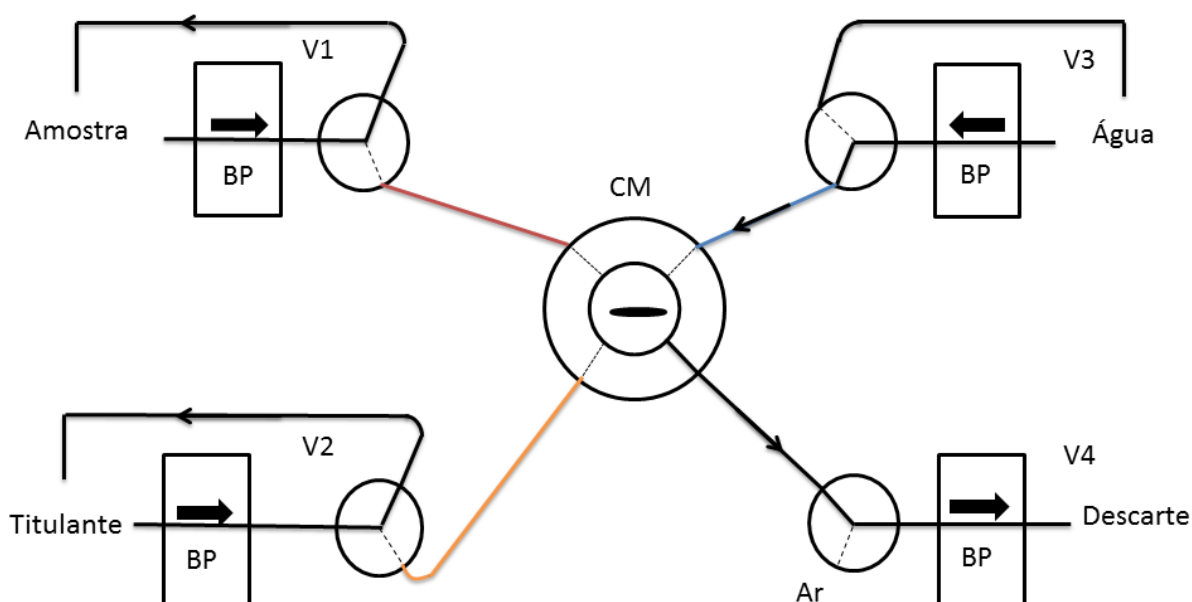


Figura 2.9 – Etapa de limpeza do procedimento de titulação DM: (—) Linha de fluxo vazia ou estacionada; (- - -) Linhas de fluxo alternativa e (—) preenchida com solução; (BP) Bomba peristáltica; (V1 a V4) válvula solenoide; (CM) Câmara de mistura.

2.3.4 Os tempos de acionamento

Na **Figura 2.10** é apresentado um diagrama destacando os tempos (em segundos) do procedimento de titulação BFT-DM.

Inicialmente, a amostra de vinho tinto é bombeada através do acionamento da válvula V1 durante 24 s para o preenchimento completo da janela de análise no interior da CM (**Figura 2.7**). Posteriormente a válvula V2 é acionada por 25s e é nesse momento que ocorre o monitoramento da filmagem da titulação de vinho tinto (**Figura 2.8**), ou seja, a captura o vídeo é iniciada. Para finalizar a análise é realizada a etapa de limpeza e descarte, por meio do acionamento da V3 e V4 (**Figura 2.9**). Os intervalos de tempo empregado para o acionamento das válvulas (V1 a V4) é mostrado na **Figura 2.10**:

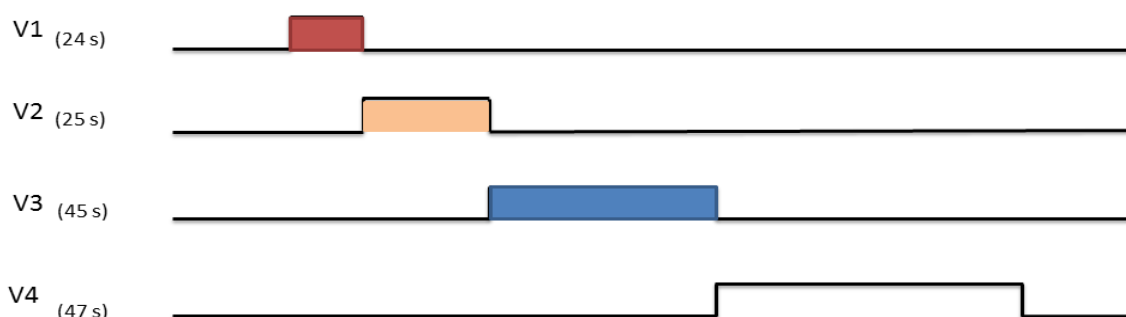


Figura 2.10. Diagrama dos tempos (em segundos) usado para os tempos de abertura das válvulas V1, V2, V3 e V4, respectivamente.

2.3.5 Programa para controle das Válvulas

O programa utilizado para o gerenciamento do sistema automático de análise em fluxo-batelada FBT-DM foi escrito na plataforma Adobe AIR for Desktop, programado em ActionScript 3.0, ilustrado na [Figura 2.11](#).

O programa apresenta várias funções de gerenciamento de controle, o que o torna fácil sua utilização pelo usuário, tais como:

Na coluna **(I)** controle do tempo de acionamento das válvulas solenoides – O programa permite que o usuário selecione os tempos que vão ser utilizados em cada etapa do processo, através da variável t (tempo de abertura de válvula) que se deseja utilizar para os canais das válvulas solenoides contendo soluções de amostra (titulado), titulante, água e descarte.

Na coluna **(II)** procedimentos analíticos – O programa permite executar as operações necessárias para o procedimento analítico, onde é possível adicionar o número de repetições das análises, limpeza do sistema e escolha da área selecionada na imagem para obtenção dos dados em termos do valor de RGB.

Na coluna **(III)** leitura do sinal analítico – O programa permite o monitoramento do sinal proveniente do sistema de detecção, com uma webcam, o qual relaciona os valores de cor RGB com a concentração do analito.

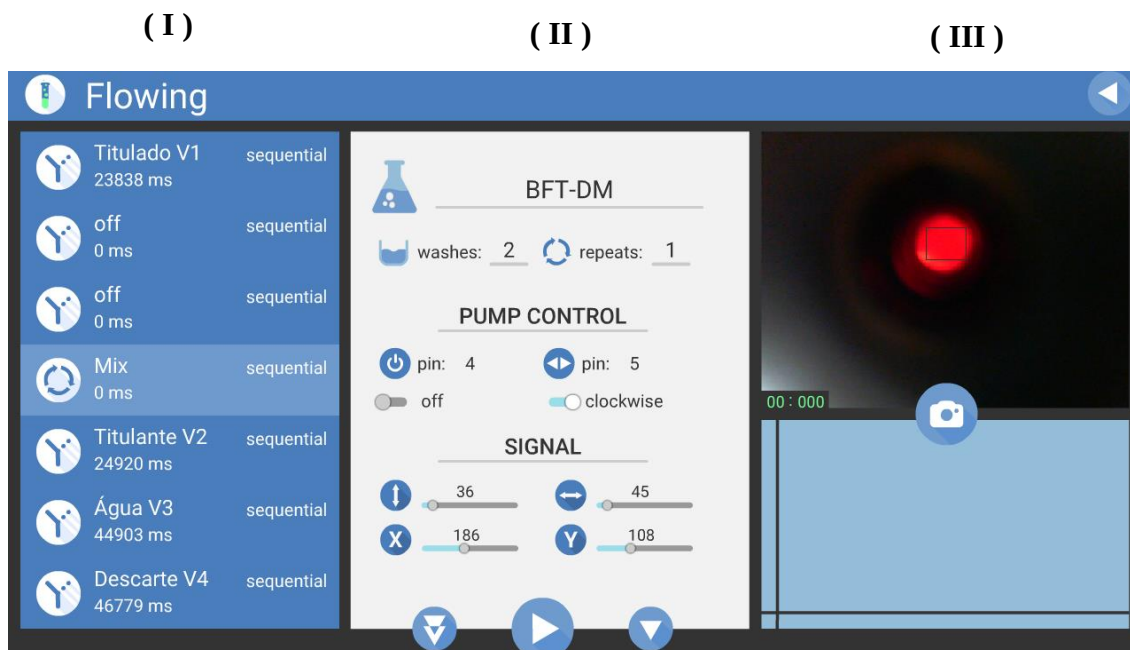


Figura 2.11 – Interface do programa de controle do acionamento das válvulas, as colunas: (I) controle do tempo de acionamento das válvulas solenoides ; (II) procedimentos analíticos , (III) leitura do sinal analítico.

Durante a realização das análises pelo FBT proposto, o usuário pode acompanhar em tempo real a execução da análise, observando pelo computador a filmagem exibida pelo programa de gerenciamento.

Com o programa é possível obter, a partir da webcam os dados analíticos através de uma série de imagens digitais, 30 frames/segundo, a matriz obtida pode ser observada na [Figura 2.12](#), o que constitui um vídeo digital.

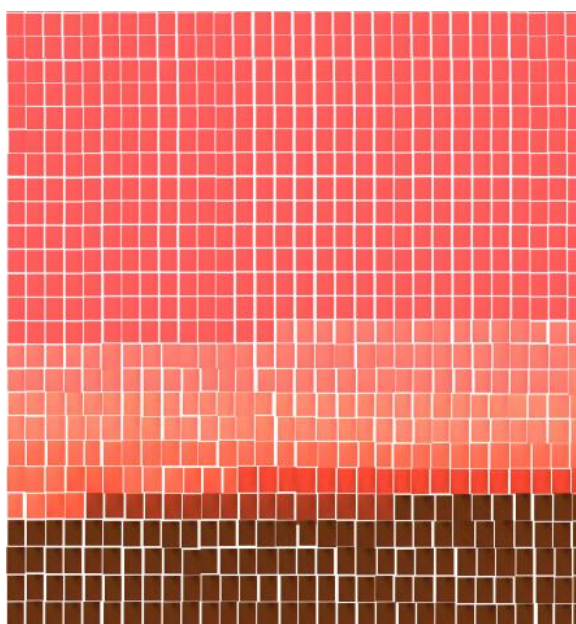


Figura 2.12 – Matriz de frames por segundos para a acidez total de vinhos tintos.

2.3.6 Tratamento e análise dos filmes digitais

Os filmes digitais são gravados a uma taxa constante de 30 quadros por segundo (FPS). (SIQUEIRA, 2016). É por meio da extração FPS que é possível descompilar os arquivos de vídeos digitais em imagem digitais, e assim obter os quadros resultantes que são convertidos em arquivos de imagem.

A partir da região de interesse selecionada pelo usuário, o programa faz a leitura de cada pixel da imagem e armazena as coordenadas dos pixels delimitadores da região seleciona. Após o armazenamento das coordenadas o usuário trata esses valores matemáticos da componente R do RGB para construção da curva de titulação.

2.3.7 Determinação da razão entre as vazões dos tubos de bombeamento das soluções de titulante e amostra (RV)

A determinação das vazões para cada válvula foram estimadas através das massas de alíquotas de água destilada correspondentes aos volumes liberadas em uma balança analítica durante os tempos de acionamento de 1, 3, 5, 7 e 10s a uma temperatura constante (25 ° C). Dessa forma, Os tempos de acionamento das válvulas solenoides são proporcionais ao volume adicionado na câmara de mistura.

Mediante à razão entre as vazões (RV) das soluções de titulante e amostra foi possível ajustar a equação dos cálculos das concentrações das amostras em termos de acidez total, com a finalidade de corrigir as diferenças de volumes adicionados pelo acionamento das válvulas V1 e V2.

Este procedimento deve ser sempre refeito quando ocorrer a troca dos tubos de bombeamento ou troca de alguma válvula solenoide.

2.3.8 Cálculo da concentração da acidez total de vinho tinto

Objetivando determinar a acidez total de vinhos tintos usando o FBT-DM, foi utilizada a **equação 1.0**, onde se utiliza o tempo de abertura da válvula solenoide da amostra, tempo de abertura da válvula solenoide do titulante, encontrado através do valor baseado na componente de cor R versus o tempo de titulante e a razão das vazões dos canais (RV) descrito na **seção 2.3.6** segundo procedimento relatado por Lima e colaboradores (LIMA et al. 2016).

$$\text{Concentração de ácido tartárico } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{MM_{(\text{ácido Tartárico})} T_{PF} RV \cdot M_{(NaOH)}}{T_{(amostra)}} \quad (1.0)$$

Os fatores dessa equação são:

$M_{(NaOH)}$ = concentração do titulante (NaOH) em mol L⁻¹;

$MM_{(\text{ácido tartárico})}$ (g mol⁻¹) = massa molar do ácido tartárico;

T_{PF} = tempo de abertura da válvula solenoide do titulante, referente ao momento do ponto final da titulação.

$T_{amostra}$ = tempo de abertura da válvula solenoide da amostra;

RV = razão entre as vazões dos canais titulante e amostra.

2.3. 9 Procedimento para obtenção do volume do ponto final da titulação

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

Foram utilizadas as seguintes equações para o cálculo das derivadas das curvas de titulação.

- Equações para o cálculo da primeira derivada

$$\frac{\Delta R}{\Delta V} = \frac{R_{(i+1)} - R_{(i)}}{V_{(i+1)} - V_{(i)}} \quad (2.0)$$

$$V_{médio} = \frac{V_{(i+1)} + V_{(i)}}{2} \quad (2.2)$$

- Equações para o cálculo da segunda derivada:

$$\frac{\Delta^2 R}{\Delta V_{\text{médio}}} = \frac{\Delta((\Delta R/\Delta V))}{\Delta V_{\text{médio}}} = \frac{((\Delta R/\Delta V))_{i+1} - ((\Delta R/\Delta V))_i}{(V_{\text{médio}})_{i+1} - (V_{\text{médio}})_i} \quad (2.3)$$

$$\bar{V}_{\text{médio}} = \frac{(V_{\text{médio}})_{i+1} + (V_{\text{médio}})_i}{2} \quad (2.4)$$

Os fatores das equações são:

- ✓ R é a resposta analítica;
- ✓ V é o volume do titulante;
- ✓ i= 0,1,2,3,.....,n, e n é o número de pontos de titulação que foram usados no cálculo derivativo.

As curvas de segunda derivada foram construídas usando o valor de $\bar{V}_{\text{médio}}$.

2.4 Método de referência para determinação de acidez total

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

2.5 Testes estatísticos para validação dos resultados analíticos

Para verificar se existe ou não diferença sistemática, estatisticamente significativa, entre os resultados do método FBT-DM proposto e os de referência, aplicou-se os testes reportados na literatura (BARROS NETO et al., 2007) e descritos nas [Seções 2.5.1](#) e [2.5.2](#). Para esse propósito, foram comparados os resultados par a par das análises de amostras de vinho tinto realizadas por ambos os métodos. Os resultados da acidez total do vinho para as onze (N = 11) amostras analisadas, foram expressos em termos de concentração (g L⁻¹) de ácido tartárico.

2.5.1 Teste *t* emparelhado baseado no conceito de intervalo de confiança

Intervalos de confiança sempre podem ser aplicados para validação estatística dos resultados analíticos baseada no teste *t* emparelhado. Para isso, estimam-se as diferenças (d_i) entre os valores de concentração para cada par de resultados obtidos pelo método proposto e de referencia, bem como a média dessas diferenças ($\bar{d}$). Dessa forma, o intervalo de confiança (Δ) é determinado pela equação 3.0.

$$\Delta = \bar{d} \pm t_v \frac{s_d}{\sqrt{n}} \quad (3.0)$$

No intervalo de confiança, o “ Δ ” se refere ao valor populacional (média verdadeira) entre os resultados dos métodos. O desvio padrão das diferenças (d_i), denotado por s_d , é estimado com base no número de amostras “ n ” analisadas por ambos os métodos. O valor de t_v é ponto da distribuição de Student, correspondente ao número de graus de liberdade ($v = N - 1$) e nível de confiança adotado (em geral, de 95%) (BARROS NETO et al. 2007).

O resultado do intervalo de confiança para Δ é interpretado como segue. Se o referido intervalo contiver o valor “zero”, então não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados de ambos os métodos. Do contrário, existe diferença estatística entre os resultados dos métodos ao nível de confiança adotado.

2.5.2 Teste *t* emparelhado baseado no teste de hipóteses

Baseando-se na mesma estatística estimada para d_i , ($\bar{d}$) e s_d (Seção 2.5.1) e considerando-se que não há diferença sistemática na média ($\bar{d}$) dos resultados par a par, então o valor populacional correspondente $\Delta = 0$ (hipótese nula). Assim o teste *t* pareado pode ser aplicado, com base na referida hipótese nula, de acordo com a Equação 4.0:

$$t = \frac{\bar{d} - 0}{s_d / \sqrt{n}} \quad (4.0)$$

Por meio da comparação entre o valor de $\hat{t}$ estimado e o t_v obtido da distribuição de Student para o nível de confiança adotado, conclui-se que:

- (i) Se $\hat{t} < t_v$ não existe diferença sistemática, estatisticamente significativa, entre os resultados de ambos os métodos, ou seja, a hipótese nula $\Delta = 0$ deve ser aceita.
- (ii) Caso contrário, existe diferença significativa entre os resultados indicando que a hipótese nula deve ser rejeitada no nível de confiança adotado.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo da vazão dos canais das válvulas solenoides

Cada válvula solenoide possibilita que uma quantidade de fluido diferente, passe entre seu caminho de entrada e saída, assim sendo, cada válvula encaminha um volume de líquido diferente para a câmara de mistura durante um dado intervalo de tempo. Por essas razões, é essencial o estudo da vazão para cada válvula. Para a calibração das válvulas solenoides, foram estudadas as velocidades de 20,40,60,80 e 100 rotações por minuto (rpm) para a bomba peristáltica, com os tempos da abertura das válvulas solenoides de 1, 3, 5, 7 e 10 segundos. Como resultado desse estudo observou-se que a velocidade de rotação da bomba peristáltica de 20 e 60 rpm obteve imprecisão nas medidas. Enquanto que a rotação de 40, 80 e 100 rpm apresentaram os menores desvios padrão relativo, que foram de 3,0; 2,6 e 2,8%, respectivamente.

Para definir a melhor velocidade de rotação de inserção dos volumes de amostra e titulante na câmara FBT, foi analisado também a relação sinal/ruído durante um procedimento de titulação de neutralização para as rotações de 40, 80 e 100 rpm, descrita na [seção 3.2.1](#).

Na [Figura 3.1](#) tem-se o estudo de calibração para a válvulas solenoides 1 e 2 usada no FBT proposto.

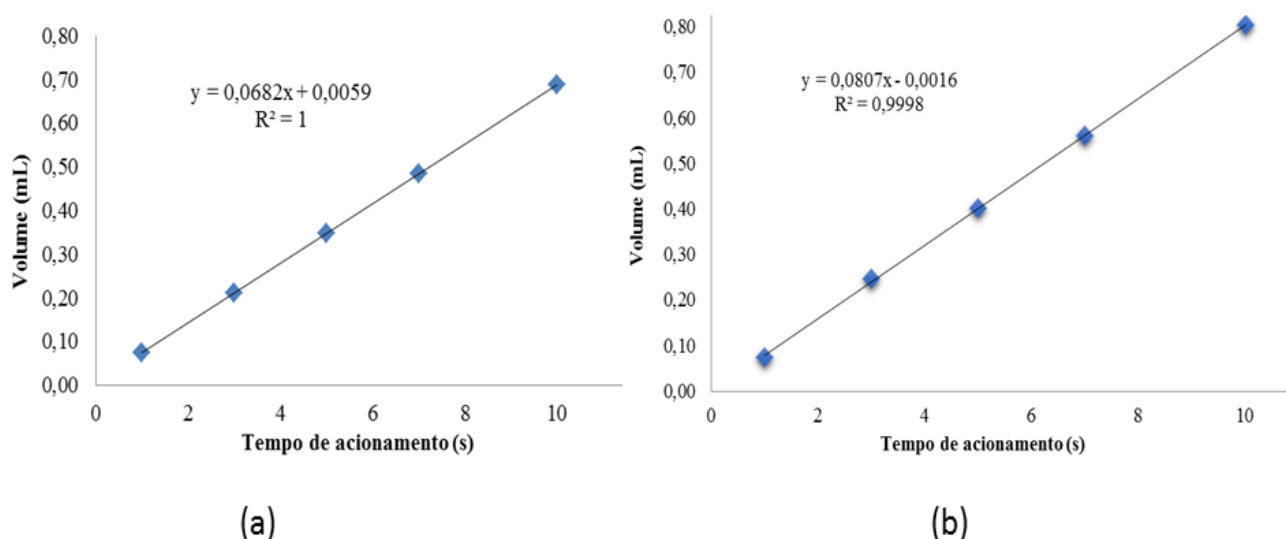


Figura 3.1 – Curvas de calibração referentes à válvula 1 (a) e válvula 2 (b) utilizada no FBT proposto. Líquido bombeado: água destilada, 10 replicatas para cada tempo de acionamento, por válvula. Rotação da bomba peristáltica: 40 rpm.

3.2.1 Rotação da Bomba Peristáltica

Foram estudadas as velocidades de 40, 80 e 100 rotações por minuto (rpm) para a bomba peristáltica, com os tempos da abertura das válvulas solenoides de 1, 3, 5, 7 e 10s.

Para definir a melhor velocidade de rotação de inserção dos volumes de amostra e titulante na câmara FBT, foi analisado a relação sinal/ruído durante um procedimento de titulação de neutralização. Na **Figura 3.2** tem-se os gráficos da análise de titulação do vinho tinto empregando as rotações 40, 80 e 100 rpm.

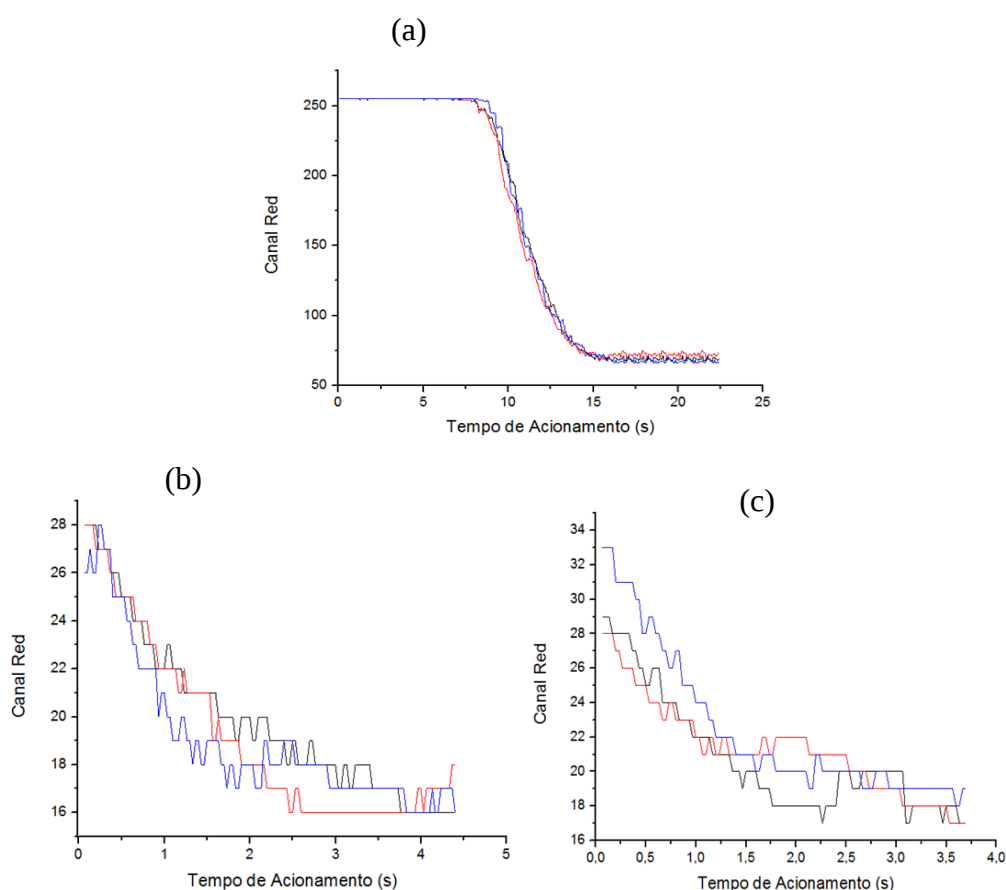


Figura 3.2 – Curvas de titulação obtidas com diferentes rotações (a) 40; (b) 80 e (c) 100 rpm. As linhas (–, –, –) representam a análise em triplicata.

Para este procedimento, foram feitas 3 medidas para cada rotação. A partir dos resultados obtidos pelo estudo de rotação da bomba peristáltica foi observado que a velocidade de 40 rpm apresentou menor ruído associado à curva sigmoide. Com isso, foi adotada esta rotação para inserção dos volumes de amostra e titulante na câmara de mistura.

3.2.2 Escolha da componente de cor

Conforme mostrado na [Figura 3.3](#), observa-se que as contribuições dos canais R, G e B para análise são diferentes. Por isso, a importância de se realizar esse estudo, para definir o melhor canal para a curva de titulação.

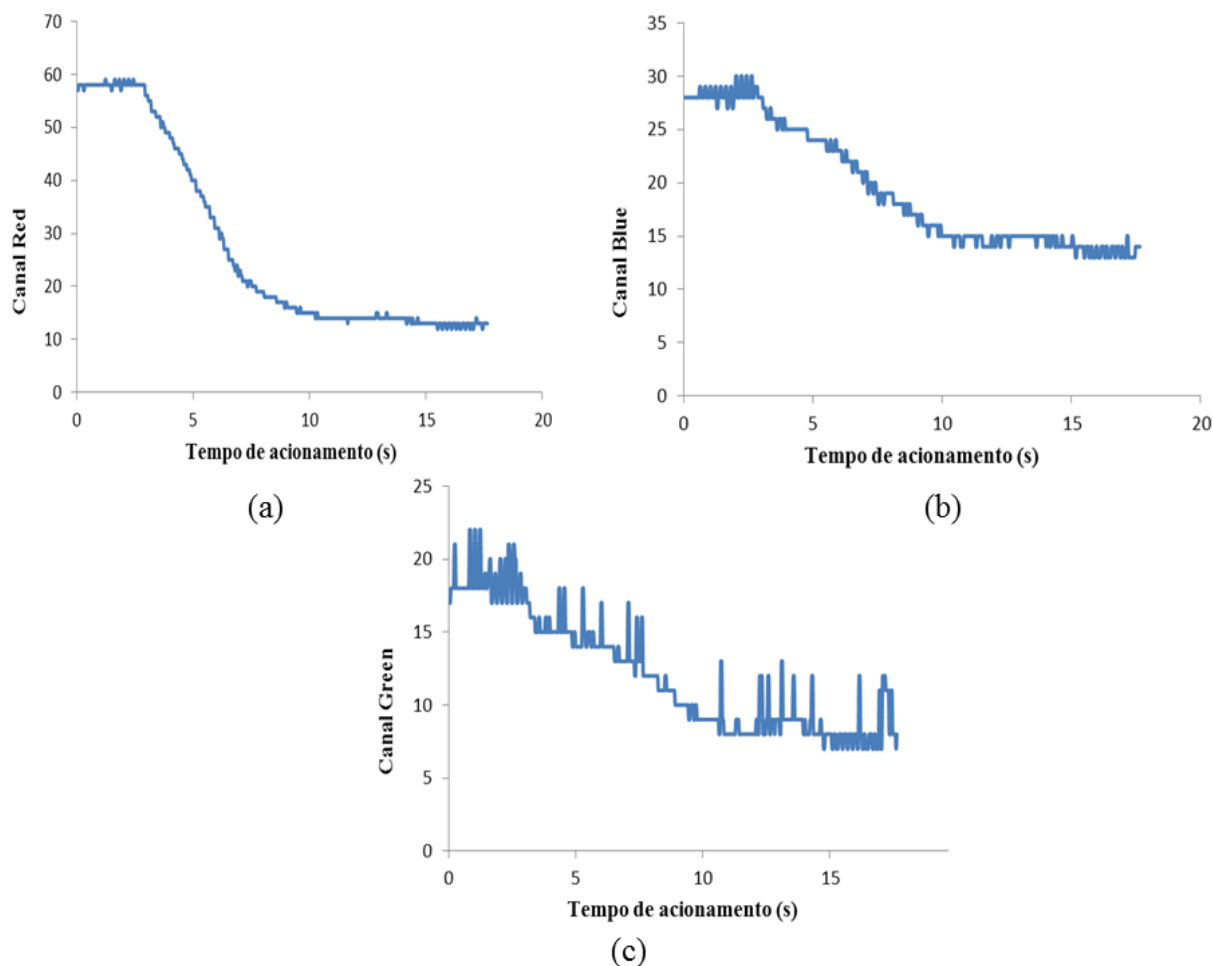


Figura 3.3 – Curva de titulação observada para (a) canal red, (b) canal blue e (c) canal green para análise de titulação em vinhos tintos.

Ao comparar os gráficos obtidos de cada componente de cor foram analisadas as seguintes questões:

- Queda acentuada do sinal: a relação aos pontos inicial e final da titulação, deve ter valores bem diferentes para determine com maior clareza o ponto final da titulação.
- Menor Ruído: a relação sinal ruído, deve ser maior possível, visto que a presença dos mesmos pode implicar na determinação errônea do ponto de equivalência, pois, indica para um pseudo ponto final da titulação.

A partir dos resultados expostos, foi definido a componente R, pois apresentou menor ruído, queda acentuada do sinal e melhor magnitude do sinal, obtendo assim características mais semelhantes a uma curva de titulação.

3.2.3 Posicionamento da janela para o tratamento dos dados RGB

Esta avaliação foi realizada em triplicata para cada janela, através de um estudo variando a posição da janela para captura da imagem digital, de modo univariado, mantendo constante os outros fatores físicos do sistema como: o tempo de acionamento, canal R e rotação da bomba de 40 rpm. Os dados presentes na **Figura 3.4** são referentes a titulação do vinho tinto selecionando diferentes regiões para a extração dos dados da imagem.

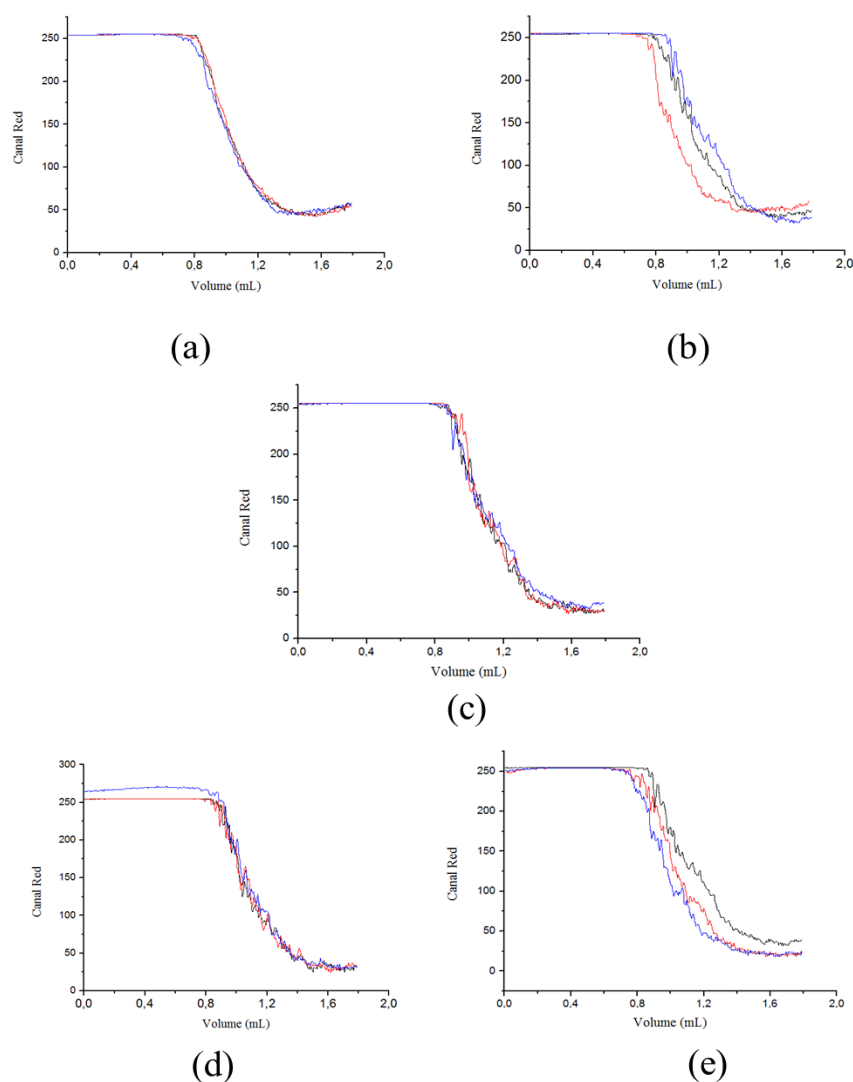


Figura 3.4 – Avaliação da posição das janelas correspondente a localização. (a) curva de titulação para a janela na posição central com área de 36x45 pixels. (b) curva de titulação para janela na posição superior com área de 12x45 pixels. (c) curva de titulação para janela na posição esquerda com área 32x7 pixels. (d) curva da titulação para janela na posição direita com área de 37x9 pixel. (e) curva da titulação para janela na posição inferior com área de 6x45 pixels. As linhas (–, –, –) representam a análise em triplicata.

Com base nos gráficos obtidos podemos observar-se que a janela central obteve o melhor desempenho, levando em consideração o menor ruído associado à curva sigmoide. Dessa forma, a localização da área da janela (área de 36 x 45 pixels e orientação 186x108) foi usada para os demais procedimentos.

3.4 Curvas das titulações de vinho tinto

Para o método proposto, curvas de titulação foram construídas a fim de localizar o ponto final da titulação.

As amostras de vinhos tintos, doadas pelas vinícolas do Vale do Submédio do São Francisco, foram analisadas, em quintuplicata, empregando o método desenvolvido. Na **Figura 3.5** está a curva de titulação dos vinhos tintos obtida a partir dos valores da componente R do sistema de cor RGB, extraídos das imagens digitais em função do tempo de acionamento do titulante.

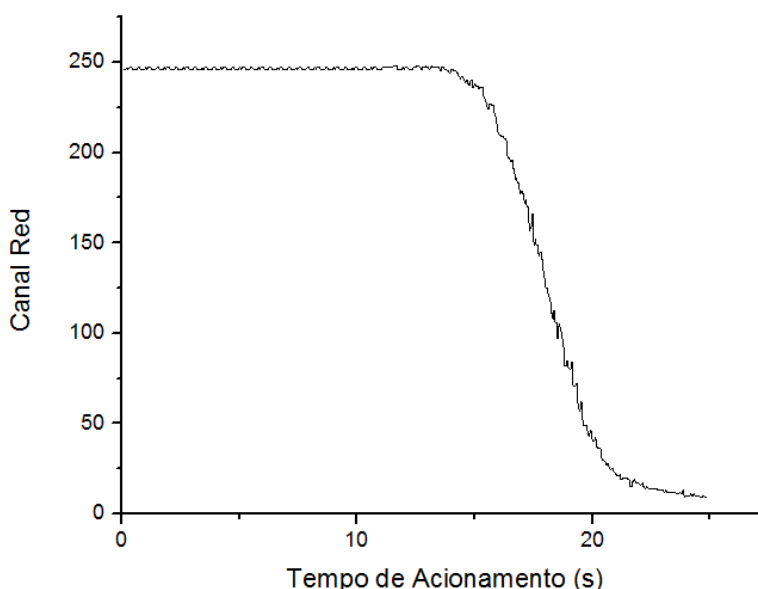
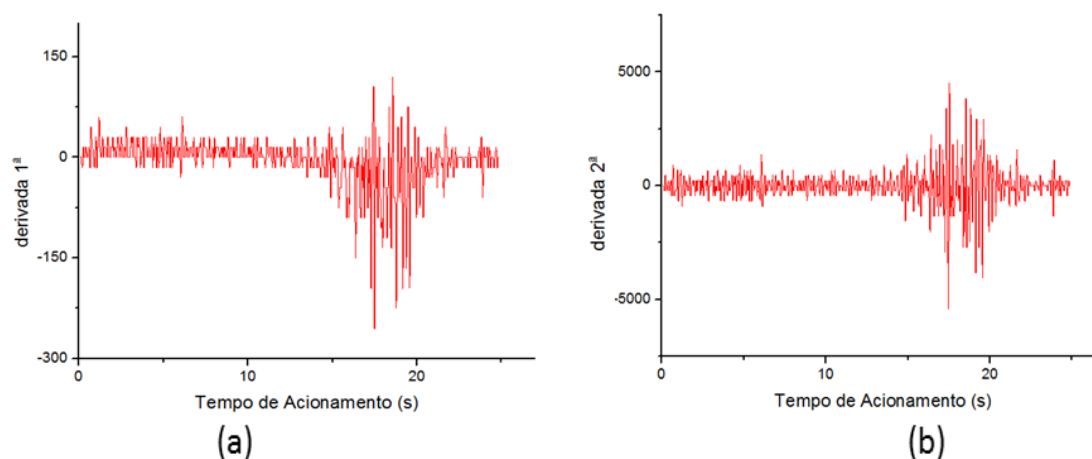


Figura 3.5 – Curva sigmoide da titulação em vinhos tintos obtida pelo método proposto.

Para determinação do ponto final empregou-se um modelo matemático de primeira derivada e segunda derivada. Na **Figura 3.6** estão os dados referente a primeira e segunda derivadas.



Figuras 3.6 – Curva da análise de titulação em vinhos tintos. (a) primeira derivada e (b) segunda derivada

Observa-se o alto grau de ruído presente nos modelos matemáticos, impossibilitando a determinação do ponto final da titulação. Por consequência, foi proposta a utilização de uma suavização para a curva sigmoide. Essa tem como função principal o ajuste dos pontos da curva sigmoide sem comprometer o resultado da análise.

Foram produzidos novos gráficos, que está representada nas **Figuras 3.7**.

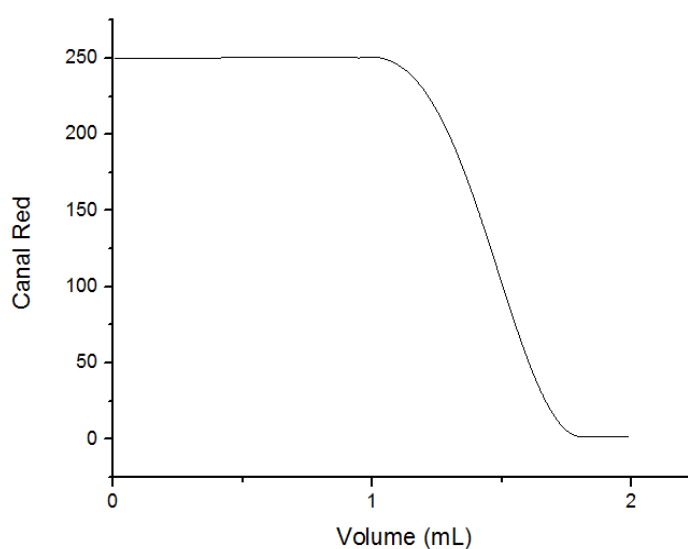


Figura 3.7 – Curva sigmoide para os dados suavizados da titulação em vinhos tintos obtida pelo método proposto.

Posteriormente, para determinação do ponto final da titulação os procedimentos de primeira e segunda derivada, descritos na **Seção 2.3.8**, foram empregados nos dados suavizados, conforme mostra a **Figura 3.8**.

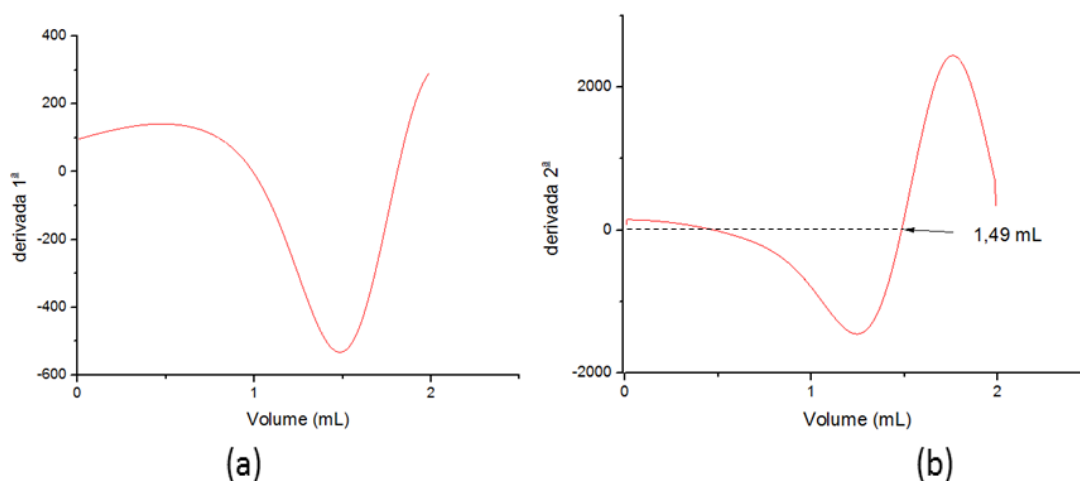


Figura 3.8 – Curvas de (a) primeira e (b) segunda derivada para os dados suavizados da titulação de uma amostra de vinho tinto.

Como poder ser observado nos gráficos de primeira derivada e segunda derivada, os resultados obtidos com a suavização proporcionaram a detecção do ponto final da titulação.

O cruzamento do zero indicado por uma seta na curva de segunda derivada da titulação dos vinhos tintos indica o valor do volume do ponto final (VPF), o qual foi semelhante para as titulações FBT-DM e potenciométrica.

O ponto de inflexão da curva de titulação, observado na curva da segunda derivada da **Figura 3.8** (b), corresponde ao volume de titulante necessário para a neutralização de todos os ácidos fracos presentes na matriz da amostra do vinho tinto.

3.5 Determinações de acidez total dos vinhos tintos

O método proposto (FBT-DM) foi aplicado na determinação da acidez total de onze amostras de vinho tinto (secos e suaves) e os resultados foram comparados com os obtidos pelo método de referência (titulação potenciométrica). A **tabela 1.3** apresenta os resultados, em termos de concentração de ácido tartárico em g L^{-1} , obtidos nessas determinações.

Tabela 1.3 - Resultados das médias de cinco determinações ($N = 5$) da acidez total de vinhos tintos, em termos de g L^{-1} de ácido tartárico, obtidos pelos métodos proposto FBT-DM e de referência.

Amostra	FBT-DM (g L^{-1})	Método de referência (g L^{-1})
1	$11,3 \pm 0,07$	$11,4 \pm 0,01$
2	$11,4 \pm 0,04$	$11,3 \pm 0,05$
3	$14,3 \pm 0,16$	$13,0 \pm 0,01$
4	$14,6 \pm 0,21$	$14,8 \pm 0,01$
5	$12,2 \pm 0,08$	$11,9 \pm 0,09$
6	$12,3 \pm 0,26$	$12,5 \pm 0,08$
7	$10,5 \pm 0,15$	$11,0 \pm 0,11$
8	$12,6 \pm 0,26$	$12,8 \pm 0,25$
9	$12,6 \pm 0,01$	$12,6 \pm 0,15$
10	$13,8 \pm 0,13$	$13,6 \pm 0,12$
11	$14,9 \pm 0,14$	$14,7 \pm 0,04$

Na análise da acidez total de vinhos tintos, o método proposto e o de referência permitiram obter resultados com desvios padrões relativos inferiores a, respectivamente, 2,6% e 2,5%. Dessa forma, observa-se que os procedimentos apresentam desempenho similar em termos de precisão. O consumo de amostra e reagente titulante foi de, respectivamente, 1,6 e 2,0 mL por análise.

Para verifica se existe diferença sistemática estatisticamente sigficativa entre as concentrações de ácido tartárico estimadas por ambos os métodos, aplicou-se o teste t emparelhado descrito na [Seção 2.5](#). De acordo com a [Seção 2.5.1](#), obteve-se o seguinte intervalo de confiança $\Delta = [-0,1331; 0,3660]$. Pode-se observar que o intervalo contém o valor “zero”, indicando que não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados de ambos os métodos ao nível de 95% de confiança. Aplicando o teste descrito na [Seção 2.5.2](#), observou-se que o valor de t estimado é menor que t_v da distribuição de Student, correspondente a $v = 10$ e 95% de confiança. Assim, a hipótese nula ($\Delta = 0$) é aceita corroborando a conclusão baseada no intervalo de confiança.

Todas as amostras analisadas neste estudo apresentaram padrão de qualidade para comercialização quanto à acidez total, conforme preconizado pelo MAPA (BRASIL, 1999).

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um método titulométrico em fluxo-batelada com detecção por filmagem digital para a determinação de acidez total de vinhos tintos sem o uso de indicador. O método FBT-DM proposto se baseia nas propriedades absorventes das amostras de vinho tinto na região do visível e cores inerentes à matriz das amostras de vinho tinto. De fato, as antocianinas provenientes da uva, apresentam diferentes cores de acordo com o pH do meio. Assim, por meio das variações do valor de cor dos filmes digitais, o ponto final da titulação foi estimado com precisão e exatidão sem a necessidade do uso de indicador e diluição da amostra.

O estudo realizado, envolvendo as componentes do modelo de cor R, G e B, mostrou que o canal de cor R é o mais adequado para as medidas do sinal analítico. Consequentemente, as curvas de titulação são plotadas usando apenas o sinal desse canal em função do volume de titulante.

A técnica de detecção baseada na filmagem digital com uma webcam para determinação da acidez total de vinhos tintos, possibilitou a titulação de 26 amostras por hora. Essa velocidade analítica é, consideravelmente, maior que a obtida com sistema titulométrico baseado em imagem digital descrito por Tôrres (2010). Além disso, o método proposto apresentou uma expressiva flexibilidade e versatilidade nas análises das amostras de vinho tinto sem a necessidade de sequer efetuar uma diluição prévia. Esses parâmetros de desempenho se devem às características inerentes ao sistema fluxo-batelada que foi usado na automatização do processo de titulação.

As amostras de vinhos tintos apresentaram concentração entre 10,5 a 14,9 g L⁻¹ de ácido tartárico, com consumo de amostra e reagente titulante de, respectivamente, 1,6 e 2,0 ml por análise.

Por conseguinte, o método FBT-DM é uma ferramenta alternativa e eficaz para a determinação de acidez total de vinhos tintos considerando o seu desempenho satisfatório quando comparado ao método de referência.

4.1 PERSPECTIVAS

As possibilidades de trabalhos futuros na linha sistema titulométrico proposto são:

- Investigar a possibilidade de empregar a metodologia proposta a sistemas que envolvam titulações de soluções coloridas baseadas em outros tipos de reações (oxidação-redução, precipitação etc).
- Explorar outros modelos de cores como HLS (Hue, Lightness, Saturation), HSI (Hue, Saturation, Intensity), visando um melhor monitoramento das mudanças de cor do sistema e desempenho do método titulométrico.
- Aplicação do titulador FBT-DM para determinações analíticas de amostras de alimentos e fármacos, com a finalidade de simplificar os processos das análises e reduções dos custos operacionais.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALPUIM, J. P. Aprendendo a Química do Vinho, Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, v. 65, 13-27, 1997.

ANDRADE, S. Um analisador fluxo-batelada baseado em imagem digital para determinação de Al(III) e Cr(VI) em águas, 87p, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2012.

ANDRADE, R. A., ANDRADE, S. I., MARTINS, V. L., MOREIRA, P. N., COSTA, D. J., LYRA, W. S., & ARAÚJO, M. C. U. A flow-batch luminometer, Microchemical Journal, v. 108, 151-155, 2013.

ANDRADE, F. A.; Caracterização e distinção analítica e quimiométrica de vinhos elaborados no Vale do São Francisco e no Rio Grande do Sul, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, 2008.

ALBUQUERQUE, M. Processamento de Imagens: Métodos e Análises, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF/MCT-RJ, 2002.

BARBOSA, J. INDICATORS | Acid-Base, Encyclopedia of Analytical Science, v.2, 360-371, 2005.

BELLONI, J.A.; NEZIO, M.S.D.; PISTONESI, C.M.E. Automatic flow-batch system for the sample treatment and determination of hydroxyproline in sausages, v. 89, 526 -530, 2012.

BENEDETTI, L. Determinação in situ de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de spot tests. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 78p. 2013.

BENASSI, M. de T., Metodologia analítica para avaliação de parâmetros físico- químicos e sensoriais de qualidade em vinhos Riesling Itálico nacionais, Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1997. Tese de doutorado, 164p

BARROS, F. G. Determinação condutométrica e colorimétrica de acidez volátil de vinagres e vinhos por injeção em fluxo, 86p, Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 1990.

BORDIGNON Jr, C. L. et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango, Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 29, 183-188, 2009

BETZ, J.; NOLL, C. Total-Hardness Determination by Direct Colorimetric Titration, Journal American Water Works Association, v. 42, 49-56, 1950.

CARDWELL, T. J., CATTRALL, R. W., CROSS, G. J., O'CONNELL, G. R., PETTY, J. D., & SCOLLARY, G. R. Determination of titratable acidity of wines and total acidity of vinegars by discontinuous flow analysis using photometric end-point detection, Analyst, v.116, 1051-1054, 1991.

CARDOSO, L.M, LEITE,J.P.V,PELUZIO,M.C.G, Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico, Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm, v.40, 116-138, 2011.

CAVALCANTI, Rodrigo N.; SANTOS, Diego T.; MEIRELES, Maria Angela A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. Food research international, v. 44, n. 2, p. 499-509, 2011.

CORREIA, P.T.R. A maturação fenólica em uvas tintas. Comparação de metodologias, p.82, Dissertação de Mestrado, universidade de Évora, Portugal, 2014.

DARIAS-MARTÍN, J., SOCAS-HERNÁNDEZ, A., DÍAZ-ROMERO, C., & DÍAZ-DÍAZ, E. Comparative study of methods for determination of titrable acidity in wine, Journal of Food Composition and Analysis, v.16, 555-562, 2003.

DIAS, F.S.Determinação de compostos fenólicos em vinhos e caracterização de vinhos elaborados na região do vale do São Francisco Pernambuco. Tese de Mestrado - Universidade Federal da Bahia, Brasil,2010.

DINIZ, P. H. G. D., ALMEIDA, L. F., HARDING, D. P., & ARAÚJO, M. C. U. Flow-Batch Analysis: fundamentals and applications, Trends in Analytical Chemistry, v.35, 39-49, 2012.

LI, D., LI, B., MA, Y., SUN, X., LIN, Y., & MENG, X. Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidante capacity of various cultivars of highbush and half-high, Journal of food composition and analysis, V.62, 84-93, 2017.

FERNANDES, E.N., REIS, B. F. Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process, Anal. Chim. Acta, V. 557, 380-386,2006.

GAIÃO, E. N., HONORATO, R. S., SANTOS, S. R., & ARAÚJO, M. C. U. An automated flow-injection titrator for spectrophotometric determinations of total acidity in wines, using a single standard solution and gradient calibration, Analyst, v.124, 1727-1730, 1999.

GAIÃO, E.N., MARTINS, V. L., LYRA, W.S., ALMEIDA, L. F., SILVA, E. C., & ARAÚJO, M. C. U. Digital image-based titrations, Anal. Chim. Acta, v. 570, 283- 290, 2006.

GARCIA, A. J. C. e REIS, B. F. Instrumentation and automated photometric titration: Procedure for total acidity determination in red wine employing a multicommutated flow system, Journal of Automated Methods and Management in Chemistry, v. 83247,1-8, 2006

GELADI, P.; GRAHN, H., Multivariate image analysis. 2ª Ed. New York: Wiley, 1996.

GONZALEZ, R.; WOODS, R. Processamento de imagens digitais. Tradução Roberto Marcondes Cesar Júnior, Luciano da Fontoura Costa. 1ª Ed. São Paulo: Editora Blucher, 2000.

HONORATO, R. S., ARAÚJO, M. C. U., LIMA, R. A., ZAGATTO, E. A., LAPA, R. A., & LIMA, J. L. C. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimization algorithm for end point search, Analytica Chimica Acta, v. 396, 91-97, 1999.

HOLLER, F.; SKOOG, D.; CROUCH, S. Princípios de análise instrumental, 6ª ed., Porto Alegre, Bookman, 2009.

JEFFERY, G. H., BASSETT, J., MENDHAN, J., DENNEY, R.C., Vogel: *Análise Química Quantitativa*, 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992.

LEÃO, A. Gerenciamento de cores para imagens digitais, 135p, Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2005.

LIMA, L. L. A. Caracterização e estabilização dos vinhos elaborados no Vale do Submédio São Francisco. Tese de Doutorado - Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2010.

LIMA, M.B, INSAUSTI,M,DOMAMINI, C.E, Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction, v.89, 21-26, 2012.

LIMA, R. A. C., ALMEIDA, L. F., LYRA, W. S., SIQUEIRA, L. A., GAIÃO, E. N., JUNIOR, S. S. P., & LIMA, R. L. Digital movie-based on automatic titrations. *Talanta*, v. 147, 226- 232, 2016.

KHANHUATHON, Y., SIRIANGKHAWUT, W., CHANTIRATIKUL, P., & GRUDPAN, K. Spectrophotometric method for determination of aluminium content in water and beverage samples employing flow-batch sequential injection system, *Journal of food composition and analysis*,v.2534 ,1-9, 2015.

MALACRIDA, C. R. e MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade, *B.Ceppa*, v.24, 59-82, 2006.

MALHEIRO, A. I. R.; *Análise de cloroanisóis e clorofenóis em solos de montado de sobreiro com vista à avaliação do risco de contaminação da cortiça com 2,4,6-Tricloroanisol*. Tese de Mestrado – Departamento de Engenharia Química, Universidade do Porto, Portugal, 2010.

MARÇO, P. H., LEVI, M. A. B., SCARMINIO, I. S., POPPI, R. J., & TREVISAN, M. G. Exploratory analysis of simultaneous degradation of anthocyanins in the calyces of flowers of the *Hibiscus sabdariffa* species by PARAFAC model, *Analytical Sciences*, 21: 1523, 2005.

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

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. e SCARMINIO, I. S., Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais, *Química Nova*, 31: 1218-1223, 2008.

MORAES, V.; Locatelli, C. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. *Evidência-Ciência e Biotecnologia*, 10.1-2 (2012): 57-68.

MOREIRA, P. N. T., Planejamento e Otimização de um Método Quimiluminescente para Determinação de Vitamina B12 Usando um Sistema Fluxo-Batelada, João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009. Tese de doutorado.

RANGEL, A. O. S. S. e TÓTH, I. V., Sequential determination of titratable acidity and tartaric acid in wines by flow injection spectrophotometry, *Analyst*, v.123, 661-664, 1998

REIS, B.F., GINÉ, M. F., ZAGATTO, E. A., LIMA, J. L. F., & LAPA, R. A. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron plant digests. *Anal. Chim. Acta*, v.293,129-138, 1994.

REIS, B.F., & LIMA, M.J.A., Fully automated photometric titration procedure employing a multicommutated flow analysis setup for acidity determination in fruit juice, vinegar, and wine, *Microchemical Journal*, v.135, 207–212, 2017.

RIBEIRO, L. de O.; MENDES, M. F.; PERERIRA, C. de S. S. Avaliação da Composição Centesimal, Mineral e Teor de Antocianinas da Polpa de Juçai (*Euterpe edulis* Martius). *Revista Eletrônica TECCEN*, Vassouras, v.4,5-16, 2011.

RUNYAN, E. G., A new indicator for use in determining total acidity of wines, *Journal of the American Chemical Society*, v.23, 402-405, 1901

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta*, 781:145, 1975.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G.D. Sequential Injection Analysis - A new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Anal. Chim. Acta*, v. 237,329-343, 1990.

RIBÉREAU-GAYON, P. The chemistry of wine stabilization and treatments, . *Handbook of Enology*, v.2, 441, 2005.

SANTOS, A. C. A., MARQUES, M. M. P., OLIVEIRA SOARES, A. K., FARIAS, L. M., FERREIRA, A. K. A., & CARVALHO, M. L. Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: revisão sistemática, *R. Interd*, v. 7, 149-156, 2014 .

SANTOS, A.C.V.; MASINI,J.C., A análise por injeção sequencial (sia): vinte anos em uma perspectiva brasileira, *Quim. Nova*, V. 33, 1949-1956, 2010.

SKEGGS, L.T. An automatic method for colorimetric analysis, *Amer. J. Clin. Pathol.* V.28, 311-322, 1957.

SILVA, A. S. C. R. B. V. S.; Estudo da Relação entre Parâmetros de Qualidade de Rolhas de Cortiça e a sua Contaminação com 2,4,6 Tricloroanisol, *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Aveiro, Portugal, 2009.

SIQUEIRA, L. A., Titulador Automático Baseado em Filmes Digitais para Determinação de Dureza e Alcalinidade Total em Águas Minerais. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SIMON, S. Comportamento viti-enológico das variedades merlot e cabernetsauvignon (*Vitisvinifera* L.) em diferentes altitudes no sul do Brasil. *Dissertação de Mestrado* - Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2014.

SKOOG, D. A., GRASSI, M.T., & PASQUINI, C., Fundamentos de Química Analítica, 8ª ed., São Paulo: Thomson, 2006.

STRINGHETA, P. C. e BOBBIO, P. A., Copigmentação das Antocianinas, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v.14,34-37, 2000.

OHTSUKI, S., KUNIMATSU, N., TAKAMURA, K., & KUSU, F., Determination of the total acid content in wine based on the voltammetric reduction of quinone, Electroanalysis, v.13, 404-407, 2001

TÔRRES, A.R., LYRA, W.S., ANDRADE, S. I. E., ANDRADE, R. A. N., SILVA, E. C., ARAÚJO, M. C. U., & GAIÃO, E.N., A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid–base titration without indicator, Talanta, v.84: 601-606, 2011.

GELADI, Paul; GRAHN, Hans F. Multivariate image analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 1996.

PASQUINI, C.; OLIVERIA, W.A. Monosegmented system for continuous flow analysis spectrophotometric determination of chromium (VI), ammonia, and phosphorus. Anal. Chem. v. 57, 2575-2579, 1985.

PEREIRA, G.E.; LIMA, L. L. A.; LIMA, T. L.; Rocha, H. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. Quim. Nova, 33(5), 1186-1189, 2010

MACIEL, S. M., Fenologia e qualidade das Vitis vinifera L. ‘Merlot’, ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Tannat’ submetidas a diferentes épocas de poda. Dissertação de mestrado, universidade federal de pelotas, Pelotas, 2017.

MENDHAM, J., AFONSO, J.C., AGUIAR, F., & ALENCASTRO, R.B., Vogel: Análise Química Quantitativa. 6ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2002.

TEIXEIRA, L.N., STRINGHETA, P.C., OLIVEIRA, F.A., Comparação de métodos para quantificação de antocianinas, revista Ceres, v.4, 297-304, 2008.

TÔRRES, A. Determinação da acidez total de vinhos tintos empregando titulações baseadas em imagens digitais, Dissertação de Mestrado, UFPB, João Pessoa-PB, 2010.

TÔRRES, A., LYRA, W.S., ANDRADE, S. I. E., ANDRADE, R. A. N., SILVA, E. C., ARAÚJO, M. C. U., & GAIÃO, E.N. A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid-base titration without indicator, talanta, V. 84, 601-606, 2011.

REIS, V.R.S., Atividade antioxidante e composição química de frutos silvestres do estado da bahia da espécies Myrcia rostrata E Gomidesia sp, XX Seminário de Iniciação Científica, n. 20, 2016.

VIZCAINO, F.V., FRAGA, C.G., Research trends in flavonoids and health ,Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 646, 107–112, 2018.

ZAGATTO, E. A. G., CARNEIRO, J. M. T., VICENTE, S., FORTES, P. R., SANTOS, J. L. M., & LIMA, J. L. F. C. Mixing chambers in flow analysis: A review, *J. Anal. Chem.* v.64, 524-532, 2009.

ZAGATTO, E. A. G., VAN STADEN, J. F., MANIASSO, N., STEFAN, R. I., & MARSHALL, G. D. Information essential for characterizing a flow-based analytical system, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, v.74, 585-592, 2002.

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