

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Determinação Simultânea de Ácidos Fracos, em Análise por
Injeção em Fluxo, empregando Calibração Multivariada não
Linear, por Treinamento de Redes Neurais Artificiais.**

CLEIDIANE GORETE ZAMPRONIO

ORIENTADOR: RONEI JESUS POPPI

COORIENTADOR: JARBAS JOSE RODRIGUES ROHWEDDER



Campinas

1998

UNIDADE	IQ
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	Z14d
V.	Ex.
T. Nº DO B.O.	35728
PROC.	395/98
C	0 X
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	04/11/98
N.º C. DE	40029323-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Z14d Zampronio, Cleidiane Gorete
Determinação simultânea de ácidos fracos, em análise por injeção em fluxo, empregando calibração multivariada não linear, por treinamento de redes neurais artificiais / Cleidiane Gorete Zampronio - - Campinas, [SP : s.n.], 1998.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.

Co-orientador: Jarbas José Rodrigues Rohwedder.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

I. Redes neurais. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Rohwedder, Jarbas José Rodrigues. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Zampronio, Cleidiane Gorete

Determinação simultânea de ácidos fracos, em análise por injeção em fluxo, empregando calibração multivariada não linear, por treinamento de redes neurais artificiais / Cleidiane Gorete Zampronio - - Campinas, [SP : s.n.], 1998.
T/UNICAMP/Z14d

(35728/98)

**“A Ciência será sempre uma busca jamais um descobrimento real.
É uma viagem, nunca uma chegada”.**

Karl Popper

**À toda minha família, principalmente
aos meus pais e ao meu irmão Robinson,
por todo o apoio durante este período.**

Agradecimentos

- Ao Prof. Ronei J. Poppi e ao Prof. Jarbas J. R. Rohwedder, pela excelente orientação, apoio, paciência, amizade e por todo o conhecimento transmitido.
- Ao Prof. Ivo e ao Prof Célio, também pela orientação e amizade.
- Aos amigos do grupo de quimiometria Eduardo, Marcelo, Rosangela, Paulo Augusto, Paulo Henrique, Silvio, Jacqueline e Cesar.
- Aos amigos do Instituto, Fernanda, Adriano, Roberta, Pedro, Henrique, Renatão, Saliba, Soraya, Renato, Jefe, Margareti, Raquel Sofia, Ileana, Martinha e outros companheiros de festas.
- Aos amigos do laboratório novo Simone (Velha amiga e companheira da UNESP - Araraquara), Bete, Rosângela, Myuke, Adélia, Maria, Fernando e Rose pela cooperação enquanto eu escrevia a tese.
- Ao Instituto de Química e aos seus funcionários
- À FAPESP pelo apoio financeiro (proc. 96/03715-3).
- As amigas de república Roselena (Também velha amiga e companheira da UNESP – Araraquara) e Ana Claudia. E ao grande amigo Frede.

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Capítulo 1. Construção e Avaliação de Celas Potenciométricas em Fluxo	
1.1. Introdução	01
1.1.1. Eletrodos metal-óxido metálico	01
1.1.2. Uso de Sensores Potenciométricos em Sistemas FIA	05
1.2. Parte Experimental	07
1.2.1. Preparação e Calibração dos Eletrodos	07
1.2.2. Soluções Tampão	07
1.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura	08
1.2.4. Sistemas empregados no Processo de Análise por Injeção em Fluxo	08
1.2.5. Modelos de Celas Potenciométricas Desenvolvidas	09
1.3. Resultados e Discussão	12
1.3.1 Estudos Referentes ao Filme de Óxido	12
1.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	18
1.3.3. Preparação e Otimização do Processo de Titulação Potenciométrica em Sistema FIA	21
Capítulo 2. Aplicação de Redes Neurais na Determinação de Ácidos Fracos, através de Titulação Potenciométrica em Sistema FIA.	
2.1. Introdução	26
2.1.1. Titulação Potenciométrica em Sistema FIA	26
2.1.2. Titulação Potenciométrica de Misturas de Ácidos Fracos em Sistema FIA	28
2.1.3. Calibração Multivariada	30
2.1.3.1. Análise de Componentes Principais (PCA)	30
2.1.3.2. Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	31
2.1.3.3. Redes Neurais Artificiais (ANN)	32
2.1.3.3.1. Retropropagação do Erro	37
2.1.3.3.2. Marquardt Levenberg	39
2.2. Parte Experimental	41

2.2.1. Titulação Potenciométrica de Misturas de Ácidos Fracos em Sistema FIA	41
2.2.1.1. Mistura de Ácidos Oxálico e Succínico	41
2.2.1.2. Mistura de Ácidos Fosfórico, Oxálico e Tartárico	42
2.2.1.3. Mistura de Ácidos Cítrico e Málico	43
2.2.1.4. Determinação de Ácidos Cítrico e Málico em Amostras de Laranja	44
2.2.2. Preparação das Amostras de Suco de Laranja, para a Titulação Potenciométrica em Fluxo	45
2.2.3. Análise de Amostras de Suco por CLAE	46
2.3. Resultados e Discussão	47
2.3.1. Titulações Potenciométricas de Misturas Ácidas	47
2.3.1.1. Mistura de Ácidos Oxálico e Succínico	47
2.3.1.2. Mistura de Ácidos Fosfórico, Oxálico e Tartárico	55
2.3.1.3. Mistura de Ácidos Cítrico e Málico	61
2.3.1.4. Determinação da Concentração de Ácidos Cítrico e Málico em Amostras de Suco de Laranja	65
Conclusão	77
Referências Bibliográficas	79
ApêndiceI	85

Capítulo 1
Construção e Avaliação de Celas
Potenciométricas em Fluxo

1.1.Introdução

1.1.1. Eletrodos metal-óxido metálico

O pH é um dos mais importantes parâmetros para a caracterização de propriedades químicas de soluções aquosas e, normalmente, o eletrodo de vidro é o sensor mais empregado para este tipo de medida. No entanto, existem casos em que este eletrodo não pode ser utilizado, como por exemplo, em sistemas que apresentam alta acidez, temperatura e pressão, ou ainda em sistemas de Análise por Injeção em Fluxo (do inglês Flow Injection Analysis-FIA) [1], que envolvem pequeno volume de solução. Existem no entanto, microeletrodos de vidro que são produzidos, para serem adaptados em sistema como este, mas que além de serem excessivamente caros, também não oferecem uma resposta rápida, necessária para sistemas FIA. Nesta situação os eletrodos metálicos recobertos com seus respectivos óxidos (metal-óxido metálico), podem ser uma alternativa eficiente e de baixo custo.

Os eletrodos metal-óxido metálicos também são indicados quando se faz necessário um eletrodo robusto, para controlar ou estimar o pH em análises de rotina. Alguns destes eletrodos são capazes de responder a variações da atividade do íon H^+ com grande rapidez, sendo adequados para indicar o ponto final em titulações ácido-base.

Idealmente, os eletrodos metal-óxido metálicos apresentam variação de potencial em relação a variações da concentração dos íons H^+ , obedecendo a equação de Nernst [2, 3].

Uma forma de explicar o princípio deste tipo de eletrodo, baseia-se nos eletrodos de segunda classe. Neste caso a parte aniônica de um sal pouco solúvel do metal, participa do equilíbrio com o solvente. Para um eletrodo reversível metal-óxido metálico $M | M_xO_y, H^+ (aq)$, o equilíbrio pode ser representado por:



O potencial do eletrodo mudará linearmente com o pH:

$$E = E^0_{M|MxOyH+} - pH \frac{RT}{nF} \ln 10 - \frac{RT}{nF} \ln a_{H_2O} \quad (2)$$

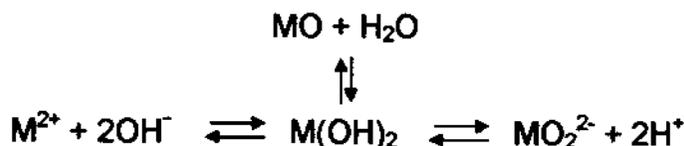
onde $E^0_{M|MxOyH+}$ é o potencial padrão do eletrodo, R é a constante dos gases, igual a $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, T é a temperatura em K (Kelvins), F é a constante de Faraday, igual a 96.485 C (Coulombs) e a_{H_2O} é a atividade da água em solução. O último termo, em muitos casos, pode ser ignorado para sistemas aquosos diluídos e conseqüentemente, tem-se:

$$E = E^0_{M|MxOyH+} - pH \frac{RT}{F} \ln 10 \quad (3)$$

onde $\frac{RT}{F} \ln 10$ é $0,059 \text{ V}$ à 25° C

As variações no potencial do eletrodo entre diferentes concentrações do analito, é causada por um mecanismo de transferência de cargas, ambos na interface eletrodo-solução. A presença de interferentes que participam da reação de equilíbrio entre o filme e a solução, também causam variações de potenciais. Assim, para que um eletrodo possa ser utilizado como sensor, este deve obrigatoriamente ser seletivo com respeito ao analito

O metal e seu óxido devem possuir algumas propriedades para que o eletrodo metal-óxido metálico obtido, possa responder satisfatoriamente às concentrações de íons H^+ . Uma delas é que o metal deve resistir ao ataque de soluções, nas quais ele será utilizado. Seu óxido deve ser condutor e capaz de permanecer em equilíbrio com a solução, controlando o potencial do eletrodo. Se isto ocorre, para uma larga faixa de pH, o óxido pode ser considerado anfótero, como mostram os equilíbrios apresentados abaixo.



Um filme de óxido pode ser preparado de várias maneiras nas superfícies dos metais como: depósito eletrolítico, depósito cristalino em solução, ou ainda por tratamento térmico à altas temperaturas.

Uma das maiores dificuldades encontradas, quando trabalha-se com este tipo de eletrodo, é a reprodutibilidade na obtenção do filme óxido. O metal ao ser oxidado, normalmente tem mais de um estado de valência, podendo então ser uma mistura de estados de oxidação mais baixos e mais altos. Assim provavelmente, mais de uma reação de equilíbrio entre a superfície do eletrodo e a solução estarão presentes. Além disso, os diferentes óxidos implicam também na presença de diferentes formas cristalinas. O polimorfismo pode causar grandes dificuldades na obtenção de um estado padrão de equilíbrio para o óxido.

O comportamento eletroquímico de um eletrodo é atribuído a um ou mais dos seguintes aspectos: adsorção e dissolução de íons na superfície do filme, reações redox na interface eletrodo-solução, rapidez e reversibilidade de processos de troca iônica e processos de difusão

Eletrodos de antimônio [3, 4, 5, 6], irídio [3, 7], tungstênio [8] e aço inox [9, 10] têm sido utilizados como eletrodos indicadores de íons H^+ .

O eletrodo de antimônio-óxido de antimônio foi um dos primeiros a ser empregado. Sua reação de equilíbrio é mostrada abaixo:



Propriedades tais como, tempo de resposta rápido, simplicidade de construção, e possibilidade de ser empregado a elevadas temperaturas, fazem deste eletrodo uma importante alternativa no controle contínuo de pH na indústria [3].

Entretanto, assim como para outros tipos de eletrodos metal-óxido metálico, este eletrodo apresenta desvio do potencial de equilíbrio, baixa sensibilidade e desvio da resposta em função de agentes complexantes.

Óxido de irídio sobre irídio, é outro tipo de eletrodo que tem sido utilizado, e pode ser preparado termicamente, ou eletroquimicamente por voltametria cíclica. O filme preparado por esta última técnica[7], mostra picos anódicos e catódicos, atribuídos a transição redox de $Ir^{III} - Ir^{IV}$, associados com a reação de equilíbrio abaixo



Chen e Alexander [8] estudaram o eletrodo de tungstênio-óxido de tungstênio como eletrodo íon seletivo para medida potenciométrica de H^+ , em solução de ácido carboxílico, utilizando sistema FIA. Foi utilizado como carregador um tampão fosfato $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a pH 6,5 e obteve-se uma ótima sensibilidade, com detecções limites de 1,0 e $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para os ácidos fórmico e propanóicos, respectivamente.

Figueiredo et al.[11] estudaram diferentes formas cristalinas de óxido de cromo, depositado na superfície do aço inox para medidas de pH. Os depósitos foram realizados por tratamento químico, com solução sulfocrômica e tratamento térmico, com temperaturas variando entre 573 e 1223 K. Estes tratamentos produziram filmes de óxidos com diferentes estruturas cristalinas, variando entre a estrutura cristalina trigonal e cúbica.

Eletrodos metal-óxido metálicos preparados a partir de ligas metálicas, são superiores aos eletrodos preparados a partir de monometais, pois, apresentam uma maior estabilidade. Assim, espera-se que os eletrodos obtidos a partir de ligas metálicas, respondam de forma mais estável, tomando-se apropriados para as medidas de pH.

Nomura e Ujihira [9] prepararam filmes de óxidos sobre duas diferentes ligas, empregando tratamento térmico e tratamento químico. A composição das duas ligas empregadas são: liga No. 1. 18,0% Cr, 8,0% Ni, 0,1% C, 1,8% Mn, 0,4% Si, e o restante composto por Fe, e liga No. 2. 18% Cr, 8% Ni, 3% Mo, 0,1% C, 1,8% Mn, 0,4% Si e o restante composto por Fe. No tratamento térmico, as ligas foram aquecidas por uma hora em diferentes temperaturas, entre 400 e 700°C . O tratamento químico foi feito em solução $2,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 a 70°C entre 10-30 minutos.

Segundo os autores deste trabalho, os eletrodos preparados com as ligas de aço inox, com diferentes composições, por tratamento térmico e tratamento químico, apresentaram praticamente o mesmo comportamento. A única exceção é a interferência do íon cloreto, que ocorre com os eletrodos preparados com a liga sem molibdênio em sua composição. Observou-se através de experimentos realizados, que a presença de óxido de molibdênio na liga, previne o ataque do

ion cloreto. O tempo de resposta dos eletrodos é de 3 segundos, quando o mesmo é transferido de uma solução à pH igual à 4 para outra à pH igual à 9. Este tempo é muito menor, se comparado com o tempo de resposta de um eletrodo de vidro. Foi encontrado também que em soluções contendo $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , e NaNO_3 o eletrodo apresenta resposta satisfatória, podendo ser utilizada qualquer uma destas espécies para o ajuste de força iônica quando necessário. O tempo de vida do eletrodo é por volta de um mês, se ele não for mergulhado em solução de NaCl e em soluções com valores de pH inferiores a 3,5.

Estes eletrodos metal-óxido metálico obtidos, foram empregados na medida de pH de diversos tampões, e os resultados obtidos foram comparados com os encontrados para o eletrodo de vidro. Os resultados mostraram uma resposta nernstiana entre pH 1-13. A presença de íons de metais alcalinos, íons amônio e outros cátions não causaram interferência.

1.1.2. Uso de Sensores Potenciométricos em Sistemas FIA.

Sistemas FIA são baseados em uma combinação de três princípios básicos [1]: injeção de uma amostra de forma discreta, controle da zona de dispersão da amostra e reprodutividade do sinal analítico. Assim, em contraste a outros métodos de análise instrumental, as reações químicas ocorrem enquanto o material da amostra é dispersado junto com o reagente, produzindo um gradiente de concentração da zona de amostra, formado no processo de dispersão. Este conceito de dispersão, controlado dentro de um espaço de tempo, é a base do sistema FIA.

Nos sistemas potenciométricos em fluxo, utilizados para medidas de pH, são necessários eletrodos indicadores, que forneçam uma resposta rápida às variações de H^+ , de forma reprodutível.

O tempo de resposta, estabilidade e reprodutividade dos sinais são na maioria dos casos, fatores limitantes para a utilização de qualquer eletrodo indicador em sistemas FIA. Os eletrodos metal-óxido metálicos podem fornecer respostas apropriadas para este tipo de sistema. Além disso, são mais versáteis

para serem adaptados a celas potenciométricas de fluxo, e podem ser usados no lugar de microeletrodos de vidro, como uma alternativa de menor custo.

A resposta de um eletrodo metal-óxido metálico, em sistema em fluxo, é controlada pelas propriedades químicas do mesmo e pela dispersão ocorrida no sistema. A eficiência de um eletrodo é influenciada pela natureza do filme, condicionamento do eletrodo, faixa de resposta linear em relação à variação do pH, tempo de resposta e seletividade do eletrodo[12, 13].

O tempo de resposta do eletrodo é definido pela IUPAC como: o tempo decorrente entre, o instante em que o eletrodo indicador e um eletrodo de referência, estão em contato com a solução de amostra, e o instante no qual, o potencial da cela torna-se estável dentro de 1 mV [14]. O eletrodo deve responder à variação da concentração do analito de maneira dinâmica, e não somente em condições de equilíbrio.

O tempo de vida e a estabilidade em análise por injeção em fluxo são obviamente importantes requisitos, e podem ser fatores limitantes em um experimento que exige muita precisão. Mas de qualquer forma, a recalibração do sistema de detecção, não oferece muitos problemas, pois, em sistema FIA esse procedimento é normalmente bastante simples e rápido[15].

1.2. Parte Experimental

1.2.1. Preparação e Calibração dos Eletrodos

A liga de aço inóx SAE316, produzida pela Villares, com composição: 16-18% Cr, 10-14% Ni, 2-3% Mo, 0,08% C, 2% Mn, 1% Si, 0,045% P, 0,03% S e o restante Fe, equivalente aquela descrita anteriormente por Nomura e Ujihira[9], foi utilizada como substrato para a preparação do eletrodo.

Foram preparados eletrodos com duas geometrias diferentes. No primeiro caso foi preparado um eletrodo planar, com dimensões de 3,0 cm de comprimento, 1,0 cm de largura e 0,3 cm de espessura. Um segundo eletrodo de geometria tubular de 0,1 cm de diâmetro e 0,3 cm de comprimento, foi confeccionado fazendo-se um orifício na placa do aço inox. A superfície do aço inox foi inicialmente submetida ao desgaste mecânico com lixas de diferentes granulometrias. Posteriormente, foram polidas com produto comercial (Brasso), a base de dolomita, até obter-se uma superfície espelhada.

Diferentes placas de aço foram mergulhadas em uma solução à 70°C contendo $K_2Cr_2O_7$ 2,5mol L⁻¹ e H_2SO_4 5,0mol L⁻¹ por diferentes períodos de tempo (10 minutos a 3 horas), com e sem agitação. Posteriormente as placas foram retiradas do meio oxidante e lavadas com água deionizada.

Para avaliar a resposta dos eletrodos, foram preparadas diversas soluções tampões, com valores de pH variando de 2,0 a 12,0, a partir de misturas de ácido cítrico, ácido bórico e fosfato de sódio. Todos os tampões foram calibrados com o auxílio de um potenciômetro (Coming- pH/ion Analyser 350) utilizando-se um eletrodo de vidro combinado.

1.2.2. Soluções tampão

Foram preparadas 11 soluções tampão, que foram utilizadas na avaliação inicial da resposta do eletrodo em função da variação do pH. Estas soluções foram preparadas a partir de misturas dos ácidos cítrico, bórico e de uma solução de fosfato de sódio, em diferentes concentrações. A Tabela 1 mostra as soluções tampão preparadas, e seus respectivos valores de pH.

Tabela 1. Soluções tampão preparadas e seus respectivos valores de pHs obtidos com o auxílio de um eletrodo de vidro combinado, devidamente calibrado.

mistura	Ácido Cítrico mol L ⁻¹	Ácido Bórico mol L ⁻¹	Fosfato de sódio 12H ₂ O mol L ⁻¹	pH
1	4,88x10 ⁻²	1,95x10 ⁻¹	2,50x10 ⁻³	2,07
2	4,40x10 ⁻²	1,76x10 ⁻¹	1,20x10 ⁻²	3,10
3	3,88x10 ⁻²	1,55x10 ⁻¹	2,25x10 ⁻²	4,07
4	3,35x10 ⁻²	1,34x10 ⁻¹	3,30x10 ⁻²	5,12
5	2,95x10 ⁻²	1,18x10 ⁻¹	4,10x10 ⁻²	6,12
6	2,48x10 ⁻²	9,90x10 ⁻²	5,05x10 ⁻²	7,16
7	2,13x10 ⁻²	8,50x10 ⁻²	5,75x10 ⁻²	8,19
8	1,73x10 ⁻²	6,90x10 ⁻²	6,55x10 ⁻²	9,07
9	1,35x10 ⁻²	5,40x10 ⁻²	7,30x10 ⁻²	10,03
10	1,10x10 ⁻²	4,40x10 ⁻²	7,80x10 ⁻²	10,97
11	0,43x10 ⁻²	1,70x10 ⁻²	9,15x10 ⁻²	11,92

1.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a obtenção das curvas de potencial em função do pH, a superfície dos eletrodos preparados foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura. Para a caracterização, os eletrodos foram metalizados, com a deposição de uma fina camada de ouro, no metalizador BALTEC - MED 020, através do processo "sputtering". Após a metalização, foram obtidas as microscopias das amostras através do Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL JSM-T300.

As microscopias foram obtidas depois de focalizadas e percorridas as superfícies de cada filme de óxido. As fotos reveladas foram obtidas a partir de regiões heterogêneas, que melhor representavam a superfície do filme.

1.2.4. Sistemas Empregados no Processo de Análise por Injeção em Fluxo.

Para avaliar a resposta do eletrodo, juntamente com os três modelos de celas de fluxo desenvolvidos, foram montados dois diferentes sistemas em fluxo de linha única mostrados na Figura 1. No primeiro sistema mostrado,

Figura 1A, o eletrodo de referência é colocado em um becker contendo solução de KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ e o contato elétrico entre o eletrodo indicador e de referência é feito através da solução contida no tubo de polietileno. Já o segundo sistema, Figura 1B, apresenta o eletrodo de referência acoplado diretamente na cela de fluxo.

Para as medidas do potencial, foi empregado um potenciômetro Corning pH/ion analyser 350, posicionado na saída da cela potenciométrica de fluxo. A aquisição dos dados foi feita através de um microcomputador Pentium 150 Mhz com 32 Mb RAM de memória, e uma interface Advantech PCL-711S, com um conversor A/D de 12 bits. No Apêndice I encontra-se descrita toda a parte eletrônica do sistema automático construído. O programa para a aquisição e controle do sistema, foi escrito em linguagem Visual Basic 3.0.

1.2.5. Modelos de Celas Potenciométricas Desenvolvidas

Na Figura 2 são apresentados, os três modelos de células potenciométricas de fluxo estudados. A Figura 2A mostra um dos modelos de cela com eletrodo indicador planar. Este utiliza um espaçador de borracha com um corte central de dimensões iguais a 0,1 cm de espessura, 2 cm de comprimento e 0,4 cm de largura, resultando em um volume de cela de $80 \mu\text{L}$.

A Figura 2B mostra praticamente o mesmo modelo da Figura 2A, mas agora contendo o eletrodo indicador planar, e o eletrodo de referência Ag/AgCl na mesma cela. Neste modelo, a amostra passa pela cela e entra em contato simultaneamente com os dois eletrodos.

A Figura 2C mostra o modelo de cela com o eletrodo indicador de geometria tubular. A placa de aço foi perfurada, proporcionando um volume interno da cela de $15 \mu\text{L}$, sendo a solução bombeada através deste orifício.

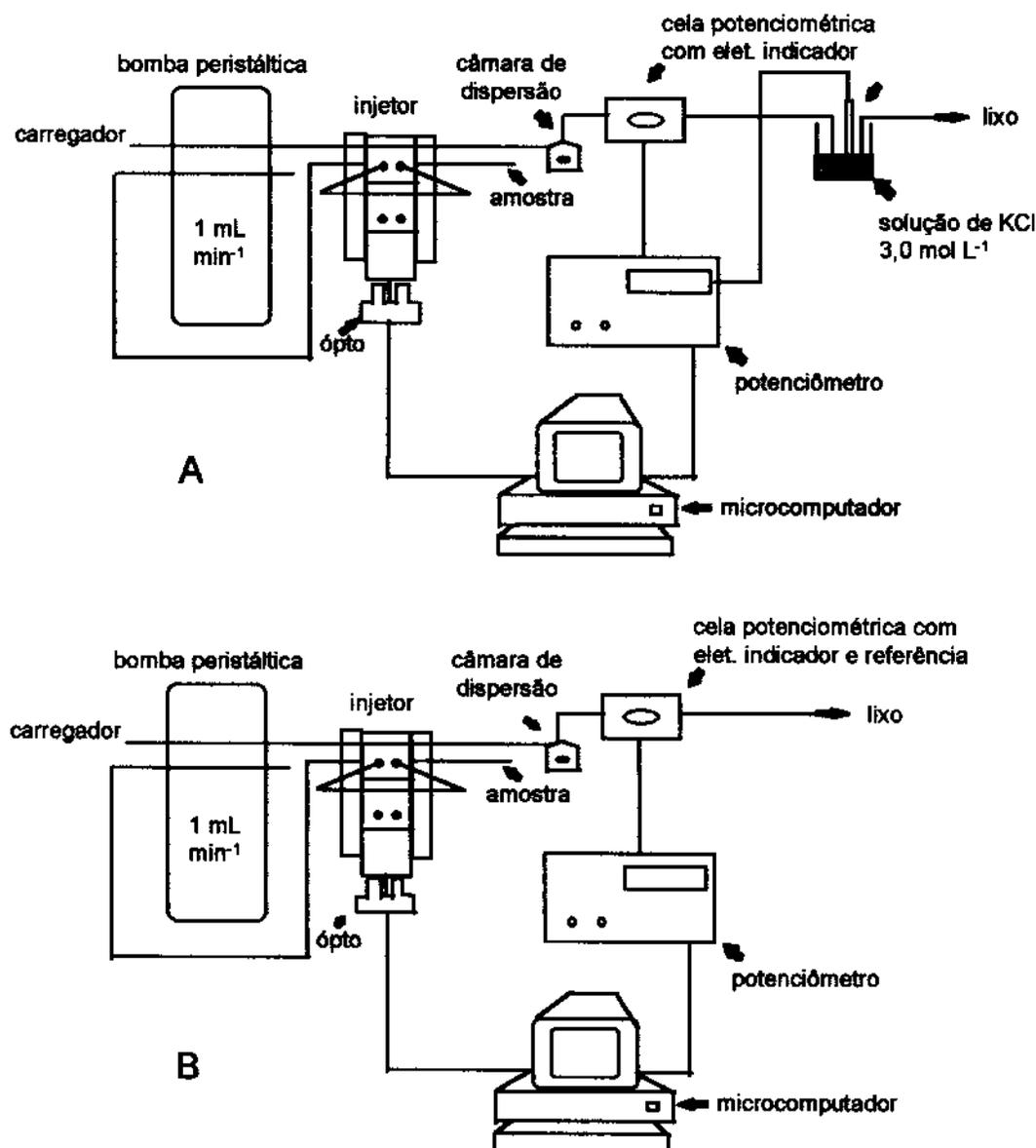


Figura 1. Sistemas FIA utilizados para avaliar os modelos de células construídos. Sistema (A) Cella potenciométrica de fluxo contendo apenas o eletrodo indicador; Sistema (B) Cella potenciométrica contendo o eletrodo de referência e eletrodo indicador.

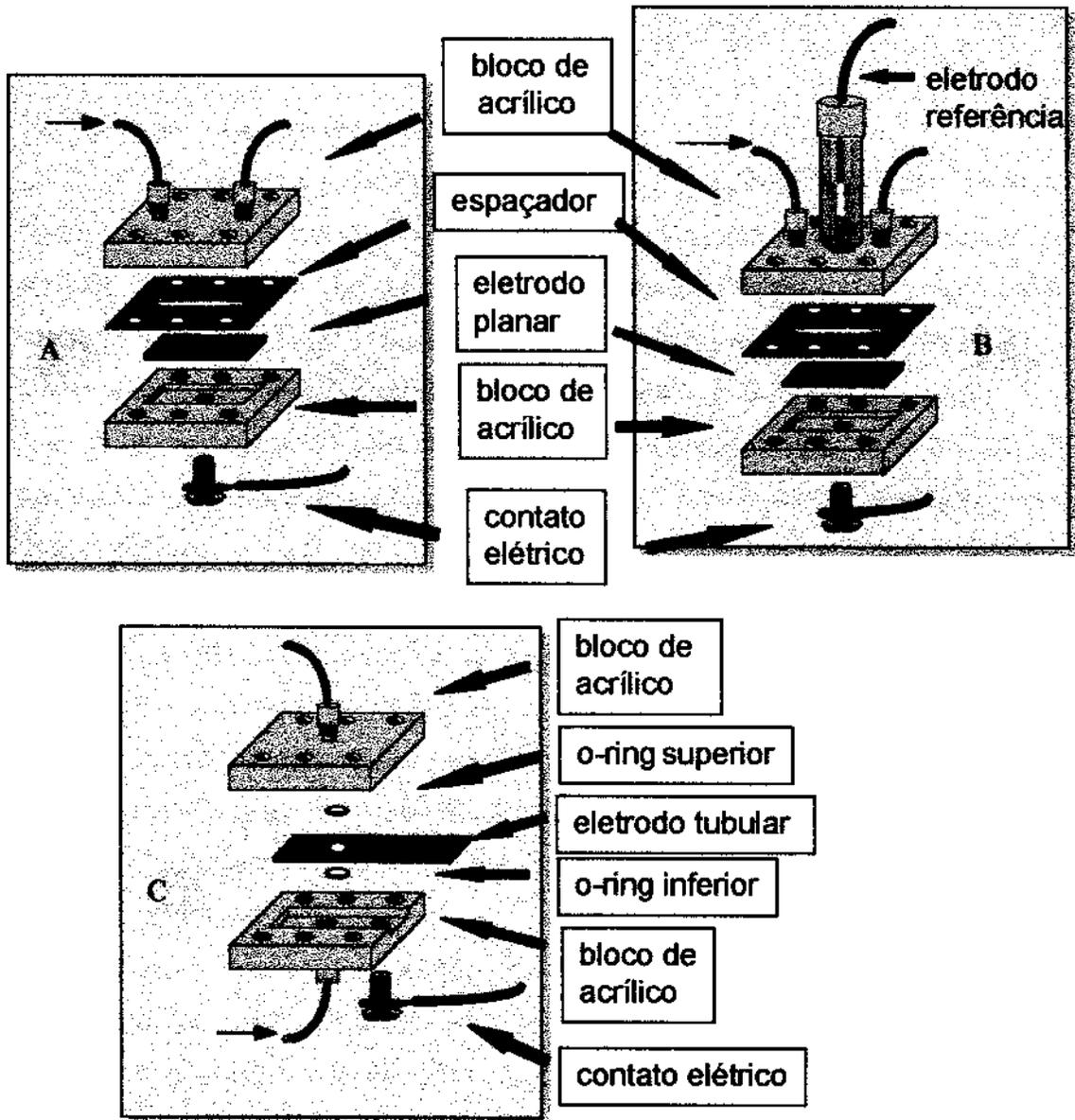


Figura 2. Representação dos três modelos de celas potenciométricas estudadas. (A) Cella contendo apenas o eletrodo indicador planar; (B) Cella contendo o eletrodo indicador planar e eletrodo de referência; (C) Cella contendo apenas o eletrodo indicador com geometria tubular.

1.3. Resultados e Discussão

1.3.1. Estudos Referentes ao Filme de Óxido

Inicialmente foi preparado um eletrodo através de tratamento químico. Neste caso a placa de aço inox permaneceu mergulhada por 30 minutos na solução de $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$ à $70^\circ C$, sem agitação. Neste tratamento o filme formado apresentou uma superfície rugosa, opaca e não homogênea, com diferentes tonalidades variando entre o amarelo e o verde. A Figura 3A, mostra as respostas do eletrodo de aço inox versus tempo, para diferentes injeções de soluções tampão com valores de pH conhecidos. Estas respostas foram obtidas a partir do gradiente de dispersão das soluções tampão, empregando como solução carregadora a solução tampão de pH igual a 7. Neste experimento foram utilizados o sistema FIA mostrado na Figura 1B, e a cela de fluxo mostrada na Figura 2B.

A curva de calibração, mostrada na Figura 3B, foi construída a partir dos valores máximos de potencial em relação a linha base (soluções tampão ácidas) e os valores mínimos de potencial em relação a linha base (soluções tampão alcalinas).

Como pode ser observado, os resultados da calibração apresentam duas retas bem distintas, uma para as soluções ácidas, com inclinação de -60 mV/pH, e a outra para soluções alcalinas, com inclinação de -19 mV/pH. Além disso, como pode ser observado na Figura 3A, este eletrodo necessita de um grande intervalo de tempo, para que haja o retorno a linha base. Para soluções mais ácidas, como as de pH 2 e 3, verifica-se que em um período de 100 segundos, o potencial não retornou à linha base e as curvas para as soluções de pHs 11 e 12, apresentaram um perfil de resposta completamente diferente do esperado. Neste caso há uma variação da linha base no momento em que a cela está sendo novamente preenchida com a solução carregadora (pH 7). O valor inicial da linha base é novamente restabelecido depois de algum tempo, aproximadamente 10 minutos.

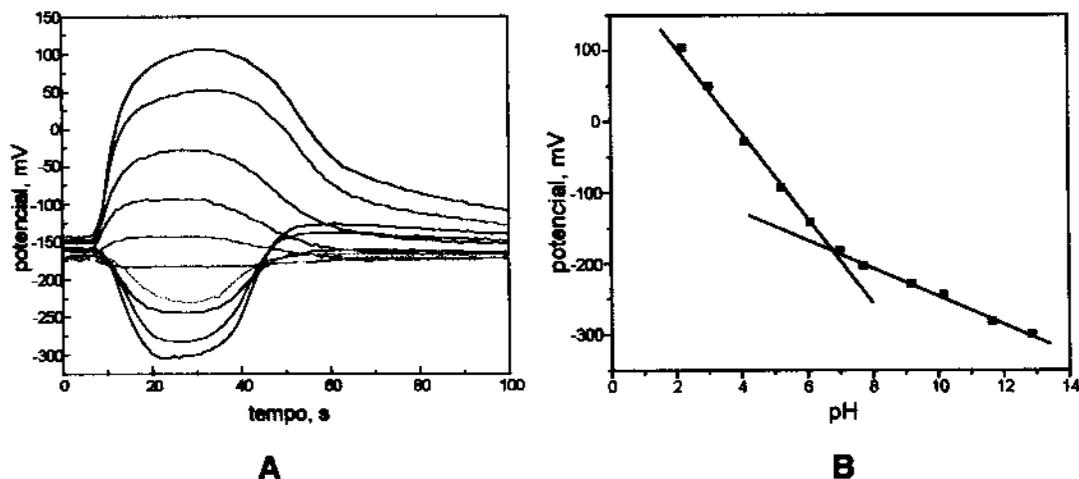


Figura 3. (A). Respostas do eletrodo de aço inox, com tempo de tratamento de 30 min para a formação do filme. Solução carregadora tampão fosfato pH=6,9, vazão 1ml/min e volume injetado de 500 μ L. O sistema utilizado neste experimento foi o da Figura 1B e a cela potenciométrica Figura 2B. (B). Curva de calibração do eletrodo, obtida a partir das respostas mostradas em A.

Quando comparada à variação de potencial por unidade de pH (inclinação da reta) para diferentes dias, observou-se uma diminuição ou perda de sensibilidade de resposta do eletrodo a partir do primeiro dia de uso, tanto para o lado ácido como alcalino.

Verificou-se assim que nas condições em que o eletrodo foi preparado o filme de óxido não apresentou resposta satisfatória para a medida de pH (ou variação da concentração de H^+). Assim, nos experimentos seguintes todos os eletrodos preparados foram mantidos sob agitação da solução oxidante, durante o período de preparação do filme, obtendo-se eletrodos com superfícies mais homogêneas e espelhadas de tonalidades uniformes. As cores dos eletrodos variaram do amarelo, vermelho, verde, azul, violeta e grafite, dependendo do tempo de reação. Sendo que com as repetições das mesmas condições experimentais, dificilmente foi possível obter tonalidades idênticas.

Com este tipo de preparação do filme de óxido, todos os eletrodos mostraram valores de inclinações próximos daquele previsto pela equação de Nernst. Este eletrodo apresentou também tempo de resposta e tempo de retorno à linha base, menores que os valores encontrados para o eletrodo discutido anteriormente. A Figura 4A mostra os resultados de um eletrodo preparado através do tratamento químico com agitação da solução de

$K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$, por 1 hora. A superfície do aço inox apresentou coloração esverdeada e com uma superfície completamente lisa e brilhante, sendo que a inclinação obtida foi de $-52,0$ mV/pH. Foi utilizado, neste estudo o sistema FIA mostrado na Figura 1B, e a cela potenciométrica mostrado na Figura 2B.

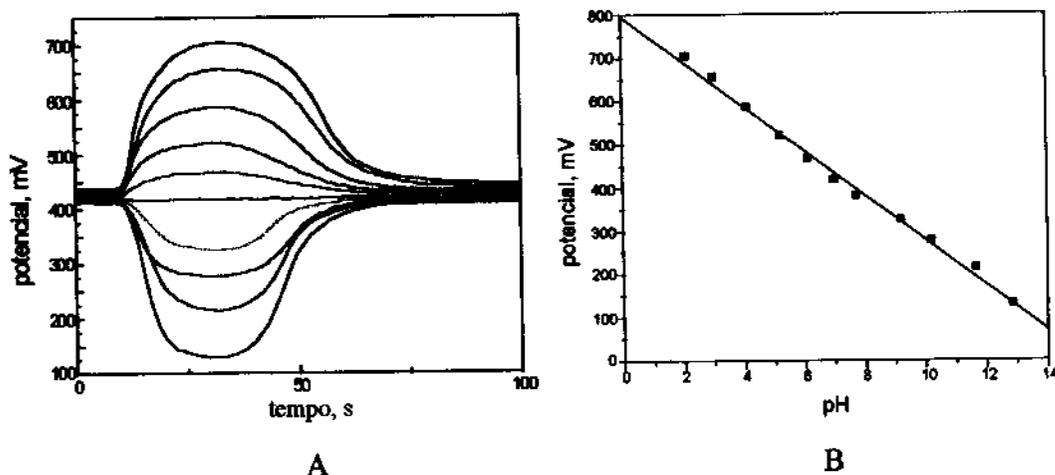


Figura 4. (A) Respostas do eletrodo de aço, em regime de fluxo, para a injeção de diferentes tampões. Solução carregadora, tampão pH=6,9, vazão 1ml/min e volume injetado de 500 μ L. O sistema utilizado neste experimento foi o da Figura 1B e a cela potenciométrica foi da Figura 2B. (B) Curva de calibração do eletrodo, obtida a partir das respostas da Figura 4A. Equação da reta: $y = -51,84x + 798,48$; coeficiente de correlação 0,9973.

A equação da reta pode ser escrita como se segue:

$$E(\text{mV}) = -51,84\text{pH} + 798,48\text{mV}$$

Verificou-se, no entanto, que em uma segunda calibração, realizada no mesmo dia, a inclinação foi de $-43,7$ mV/pH, e estabilizou-se próxima a este valor, para as demais calibrações realizadas em 5 dias consecutivos.

Para eletrodos tratados quimicamente por 3 horas em solução, observou-se que a inclinação por unidade de pH, foi semelhante àquelas obtidas para eletrodos tratados por menores períodos de tempo. Conclui-se que o tempo de reação não é o fator determinante no processo para a formação do filme, mas sim a concentração da solução oxidante, a agitação da mesma e a temperatura de reação.

As inclinações das curvas de calibração obtidas a partir de triplicatas de injeções das soluções tampão, para 10 eletrodos preparados, apresentaram um valor médio de inclinação de $-45,0$ mV/pH. Desta forma, a seleção dos melhores eletrodos foi realizada com base no tempo de resposta

do eletrodo e principalmente na reprodutibilidade dos dados.

Na Figura 5 encontram-se os diagramas obtidos a partir das respostas de um eletrodo de aço inox, tratado por 20 minutos em solução oxidante. Foram realizadas injeções das soluções tampão em triplicatas, no qual foram utilizados o sistema FIA mostrado na Figura 1B, e a cela potenciométrica mostrada na Figura 2B.

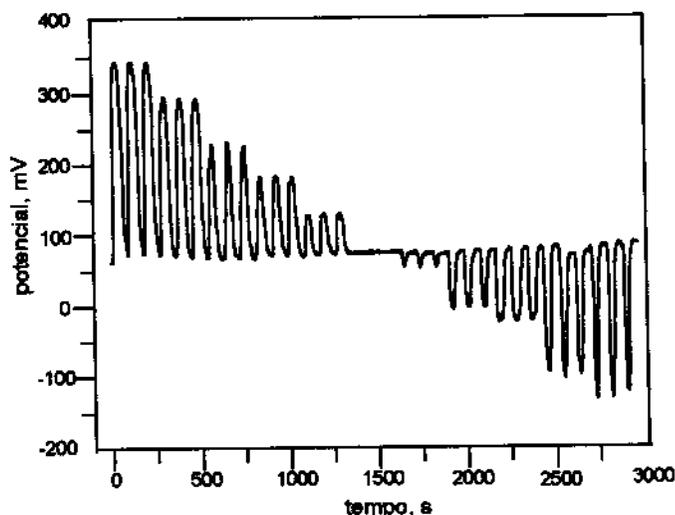


Figura 5. Diagrama de 3 injeções sucessivas das soluções tampão de pHs entre 2,0 e 12,0; vazão de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; e volume injetado de $500\ \mu\text{L}$. Foi utilizando um eletrodo tratado quimicamente por 20 min em solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{SO}_4$. O sistema FIA utilizado neste experimento é o mesmo mostrado na Figura 1B e a cela potenciométrica mostrada na Figura 2B.

A Tabela 2 mostra os valores médios e a estimativa do desvio padrão, encontrados para 3 injeções das soluções tampão mostrada na Figura 5. A equação da reta para esta curva de calibração foi $E(\text{mV}) = -45,46\text{pH} + 416,92\text{mV}$ com coeficiente de correlação de 0,995. A Figura 6 mostra a curva de calibração, onde as barras verticais se referem a estimativa do desvio padrão para cada ponto.

Tabela 2. Valores médios e estimativa do desvio padrão (S), para a curva de calibração mostrada na Figura 6.

pH	Potencial médio(mV)	S(\pm mV)
2,10	344	0
3,04	292	3
3,99	229	3
5,00	182	1
6,03	129	2
6,99	75	2
7,86	55	0
9,22	-2	1
9,44	-22	1
11,6	-99	4
12,36	-126	4

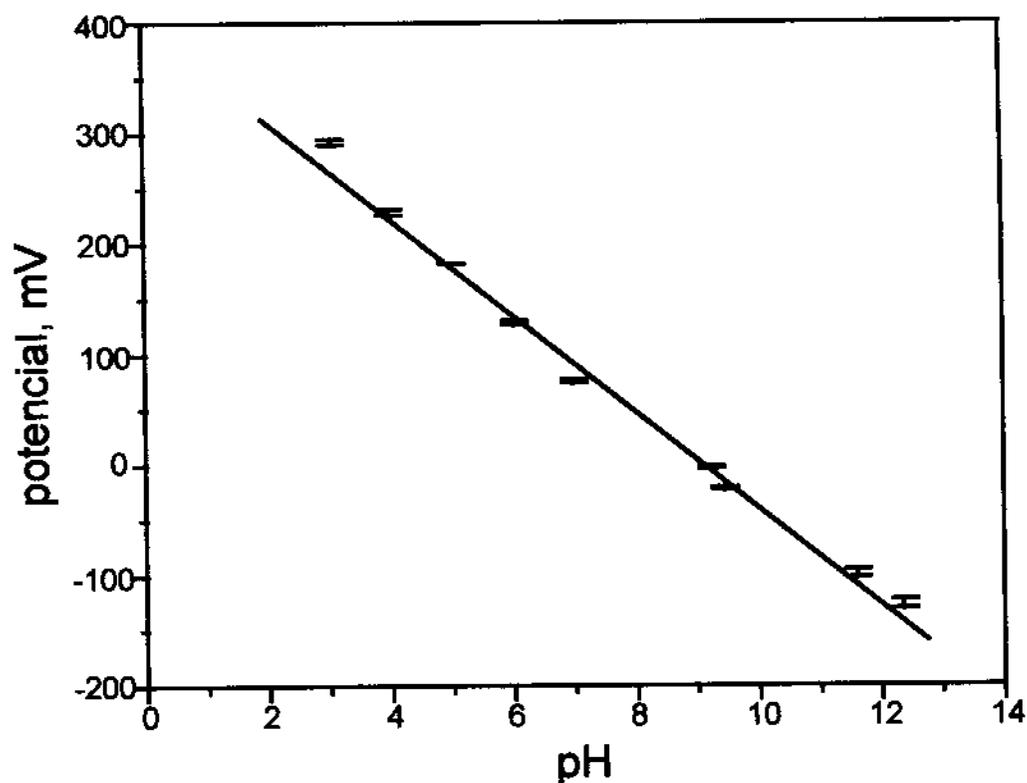


Figura 6. Curva de calibração do eletrodo, obtida a partir das alturas máximas das curvas de respostas versos tempo, com os desvios padrões relativos de 3 injeções sucessíveis. O eletrodo deste experimento foi tratado quimicamente por 20 minutos.

Outro fato que também foi observado diz respeito ao valor de potencial da linha base (pH igual à 7), cujo valor para diferentes eletrodos foi bastante

distinto. No entanto, estas oscilações podem ser facilmente corrigidas pela calibração prévia dos eletrodos, a partir de soluções tampão com pHs conhecidos.

Para o estudo do tempo de resposta do eletrodo indicador aço inox, o caminho do sistema em fluxo da Figura 1B, entre a posição de amostragem e a cela potenciométrica da Figura 2B, foi reduzido ao máximo possível, de modo que a dispersão tornasse desprezível. Na Figura 7 pode ser observado alguns dos resultados.

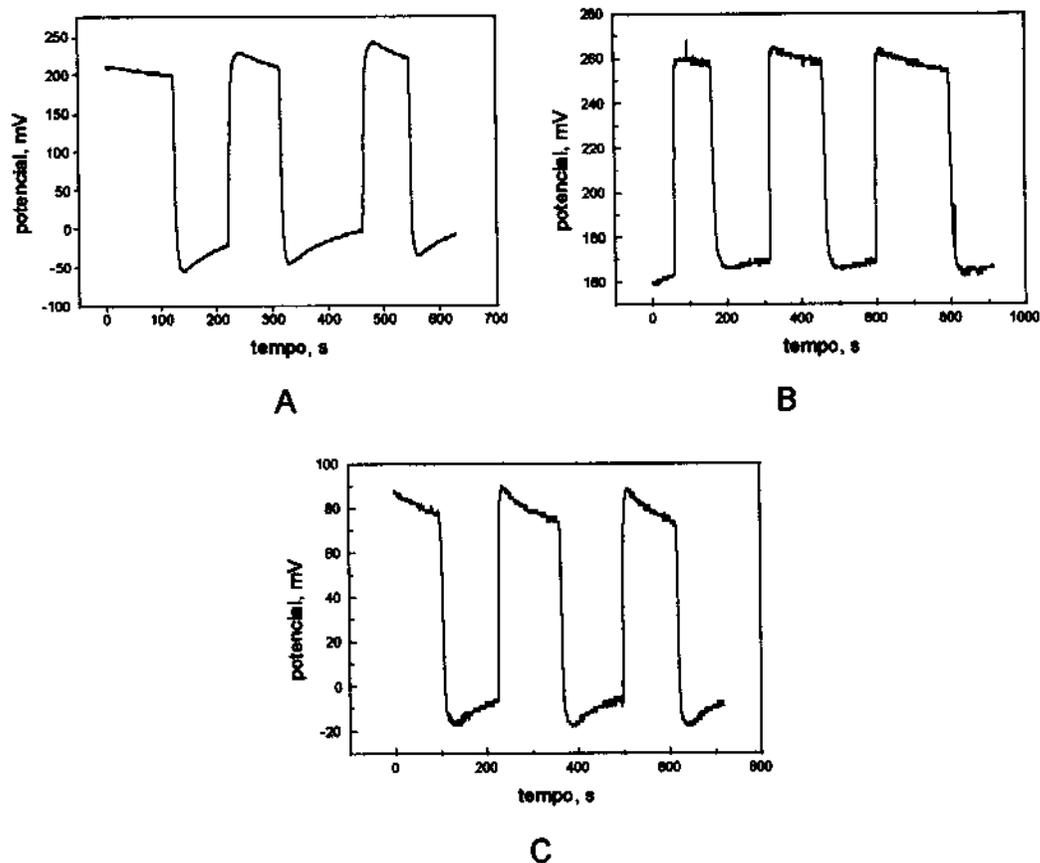


Figura 7. Tempos de respostas do eletrodo tratado por 20 min em solução oxidante. Injeções de diferentes soluções tampão a volume infinito e vazão de $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. O sistema utilizado neste experimento foi o mostrado na Figura 1B e a cela potenciométrica foi a mostrada na Figura 2B. (A) Substituição do tampão pH=4 por pH=9; (B) Substituição do tampão pH=2 por pH=4; (C) Substituição do tampão pH=9 por pH=12.

Na Figura 7A, tem-se a resposta do eletrodo, em um sistema onde foi bombeada solução tampão de pH = 4, e substituída pela solução tampão pH = 9. Neste sistema o tempo de resposta do eletrodo foi de 5 segundos. Na

Figura 7B tem-se a resposta do eletrodo para a substituição da solução tampão de pH = 4, pela solução tampão de pH = 2, que apresentou um tempo de resposta também igual a 5 segundos. E por último na Figura 7C a solução tampão pH = 9 substituída pela solução tampão pH = 12, cujo tempo de resposta foi de 7 segundos. Como pode ser verificado em cada sinal obtido, há uma resposta rápida para cada troca de tampão. Assim, foi possível verificar experimentalmente, que a resposta do eletrodo de aço inox é suficientemente rápida para poder ser utilizado em sistema FIA.

Também foi estudado o tempo de vida deste mesmo eletrodo que permaneceu em uso durante um mês. Sua resposta mostrou-se estável, durante todo este período, com relação ao tempo de resposta, assim como a sensibilidade. No entanto, verificou-se que com o aumento da frequência de medidas, a utilização de soluções com pHs abaixo de três, e a presença de íons Cl^- , o tempo de vida diminui para no máximo uma semana.

1.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.

Com o objetivo de verificar melhor a causa do decaimento da sensibilidade para alguns dos eletrodos obtidos, foram realizadas microscopias das superfícies do filme de óxido que apresentaram diferentes comportamentos. Nas Figuras 8, 9 e 10 encontram-se as fotos de filmes analisados, com um aumento de 3500 vezes. No primeiro caso, Figura 8, o eletrodo apresentou uma sensibilidade de resposta bastante baixa, da ordem de -25mV por unidade de pH e no segundo caso, Figura 9, a sensibilidade encontrada foi de -30 mV por unidade de pH. Nestas duas figuras nota-se superfícies muito defeituosas e com ranhuras.

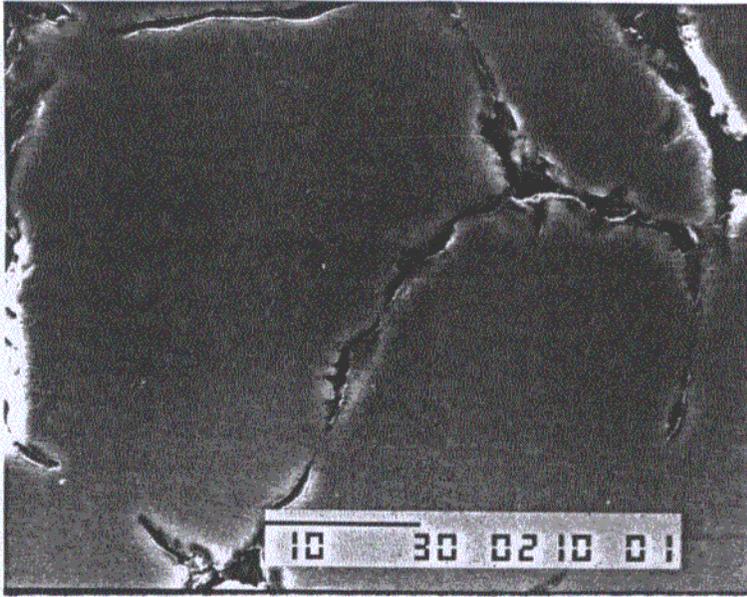


Figura 8. Foto do filme com um aumento de 3500 vezes., cuja sensibilidade foi de -25mV por unidade de pH.

O eletrodo mostrado na figura 10 tem uma sensibilidade de -44 mV por unidade de pH, e praticamente não apresenta defeitos

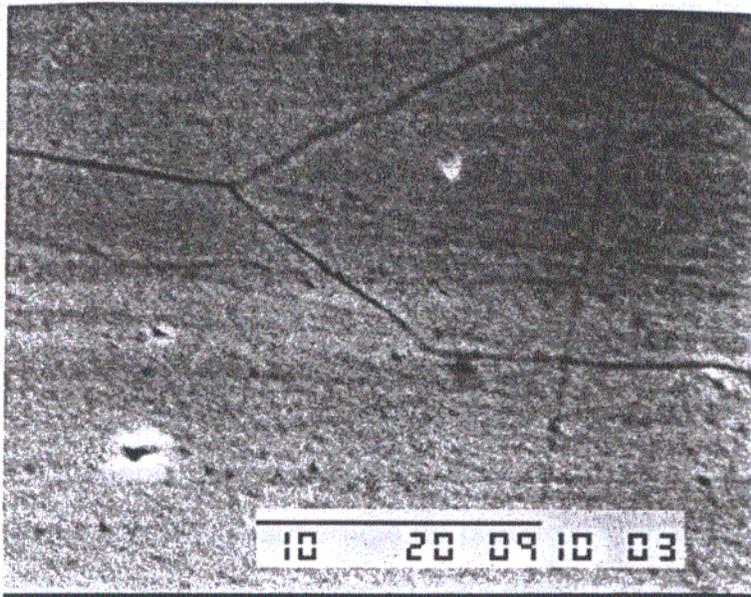


Figura 9. Foto do filme com um aumento de 3500 vezes., cuja sensibilidade foi de -30mV por unidade de pH.



Figura 10. Foto do filme com um aumento de 3500 vezes., cuja sensibilidade foi de -44mV por unidade de pH.

Pode-se assim concluir que eletrodos que apresentam maior regularidade no filme de óxido sobre o aço inox, apresentam uma melhor resposta. Desta forma, a preparação do filme é uma etapa fundamental na construção do eletrodo. O filme deve ser bastante fino e regular quanto a sua propriedade física, pois, desta forma pode-se garantir uma troca dinâmica de cargas, durante a passagem do fluxo da amostra [3]. As imperfeições na superfície do filme de óxido, expõe a superfície da liga metálica. Essas duas superfícies (filme do óxido e liga metálica) passam a competir pelo íon H^+ de forma diferente, dificultando assim o equilíbrio das reações que determinam o potencial de interface.

Na Figura 11 verifica-se a mesma superfície do eletrodo da figura 10, mas com um aumento de 10000 vezes. Esta ainda apresenta algumas imperfeições decorrentes da superfície do próprio metal, que não atingiu um polimento perfeito. Talvez um polimento mais efetivo, poderia resultar em um eletrodo com uma resposta mais próxima daquela esperada pela equação de Nernst.

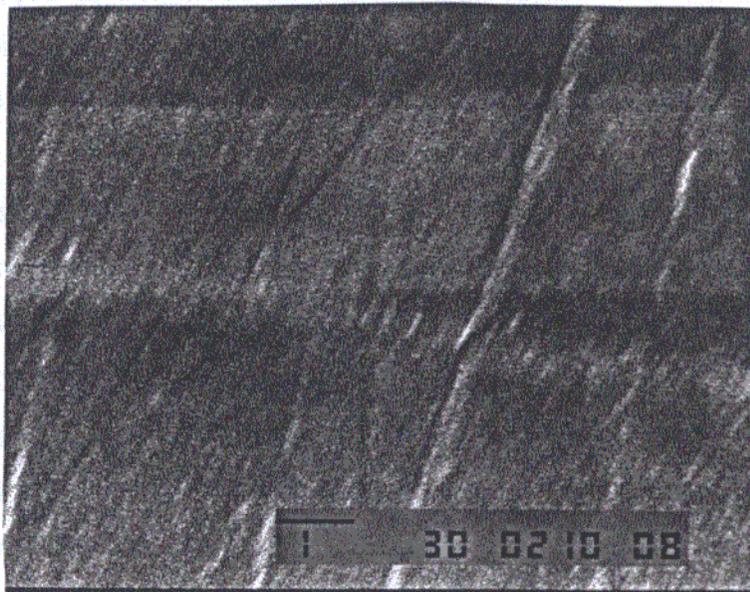


Figura 11. Foto do filme com um aumento de 10000 vezes., cuja sensibilidade foi de -44mV por unidade de pH.

Conclui-se que a formação do filme é uma etapa determinante para a obtenção de eletrodos metal-óxido metálico. É necessário um meio mais controlado para a sua formação de forma a obter-se um filme mais regular.

É preciso enfatizar, no entanto, que um estudo mais aprofundado do processo de preparação do filme, não foi a finalidade principal deste trabalho. Assim, apenas testou-se todo eletrodo produzido, através de várias calibrações, para verificar sua estabilidade antes de ser utilizado. O importante foi obter um eletrodo com sensibilidade adequada e estável, para ser utilizado durante todas as medidas realizadas.

1.3.3. Preparação e Otimização do Processo de Titulação Potenciométrica em Sistema FIA.

Como mostrado, o eletrodo de aço inox apresentou um tempo de resposta suficientemente rápido para ser utilizado em sistema FIA. Também verificou-se uma boa reprodutividade das respostas para injeções de diferentes soluções tampões.

Considerando que o eletrodo de aço inox é bastante versátil, para confeccionar celas potenciométricas de fluxo, foi possível com isto empregá-

lo na construção de três modelos diferentes de celas.

Os sistemas de titulação potenciométrica em fluxo, normalmente encontrados em diversos trabalhos, são semelhantes àqueles mostrados na Figura 1A.

Baseado neste fato, foi avaliado inicialmente uma cela potenciométrica contendo um eletrodo indicador aço inox planar, Figura 2A, com o eletrodo de referência Ag/AgCl, posicionado próximo à saída do fluxo. Um fio de prata recoberto com AgCl foi mergulhado em uma solução de KCl 3,0 mol L⁻¹, a qual recebia o fluxo da amostra proveniente da cela potenciométrica. Foi utilizado um volume de aproximadamente 1000 mL da solução de KCl, de forma a minimizar os efeitos de diluição desta solução, durante o tempo necessário para a obtenção dos dados. Neste estudo, foi empregado como carregador uma solução tampão de pH 6,9, com vazão de 1 ml min⁻¹, e injetadas as demais soluções tampão de pHs entre 2,0 e 12,0. As respostas obtidas podem ser observadas na Figura 12.

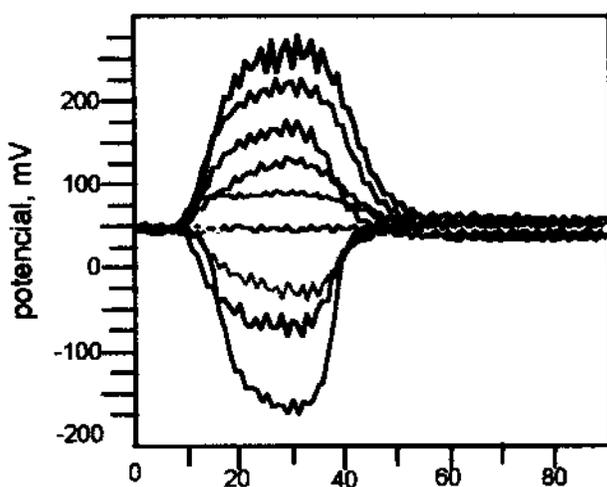


Figura 12. (A) Resposta do eletrodo indicador planar de aço inox com o eletrodo de referência Ag/AgCl posicionado na saída da cela potenciométrica. O sistema utilizado neste experimento foi o mostrado na Figura 1A e a cela potenciométrica mostrada na Figura 2A.

Em todas as curvas são observados ruídos que apresentam amplitudes máximas de aproximadamente 50 mV. Estes ruídos podem ter como principais causas a pulsação da bomba peristáltica ou a interferência de 60Hz da rede de alimentação do laboratório. Neste caso, a distância entre o eletrodo indicador e o eletrodo de referência foi de 16 cm.

Quando a distância entre o eletrodo indicador e o eletrodo de referência foi aumentada para 32 cm, foi também observado um aumento significativo do ruído, com amplitude de até 100 mV, como pode ser observado na Figura 13.

Para diminuir o nível de ruído nas medidas potenciométricas em fluxo, como sugerido por Alegret, et. al. [16], foi adaptado um tubo de aço inox no sistema, entre o injetor e a cela, sendo que este tubo foi devidamente aterrado. Pelo tubo foi bombeada a solução carregadora transportando a amostra em direção a cela potenciométrica. O nível de ruídos para este sistema mostrou uma sensível melhora com amplitude de 6 mV, aproximadamente.

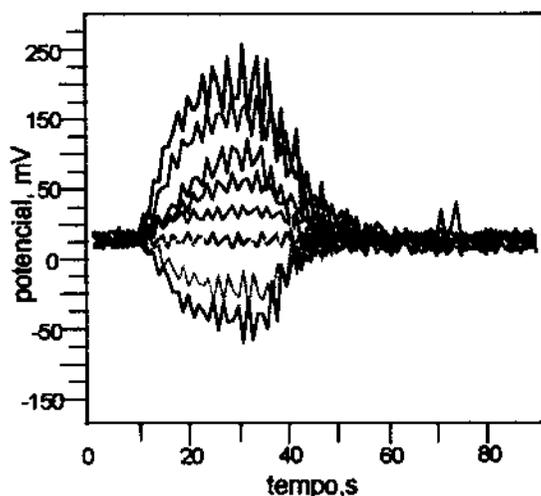


Figura 13. Resposta do eletrodo indicador planar separado do eletrodo de referência, com uma distância de 32 cm. O sistema utilizado neste experimento foi o da Figura 1A e a cela potenciométrica foi a da Figura 2A.

Este resultado demonstra que a principal causa dos ruídos observados anteriormente, são as interferências causadas pela rede elétrica do laboratório.

Com o intuito de verificar e comprovar as observações anteriores, foram comparados os resultados obtidos com o modelo de cela da Figura 2B, acoplada no sistema de fluxo da Figura 1B. Ao comparar os resultados verifica-se que as respostas para o modelo de cela da Figura 2B apresentam ruídos cujas amplitudes são de 2 mV, e este mesmo valor é encontrado estando ou não o sistema aterrado, através do tubo de aço inox. As curvas de

respostas para os diferentes tampões em função do tempo, são mostradas na Figura 14.

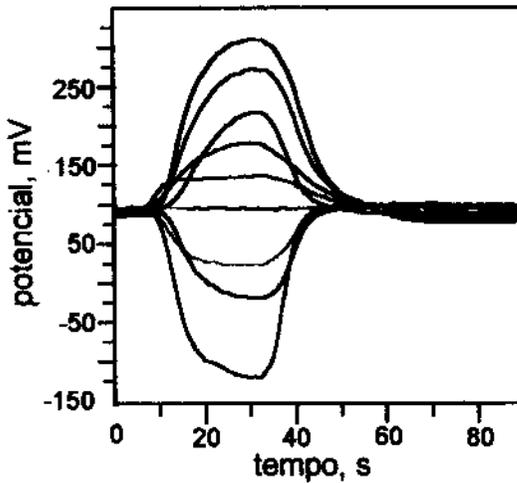


Figura 14. Resposta do eletrodo indicador planar, com o eletrodo de referência acoplado. O sistema utilizado neste experimento foi o da Figura 1B e a cela potenciométrica foi a da Figura 2B.

Depois de realizados todos os experimentos, é possível concluir que para garantir um menor nível de ruído nas medidas, o melhor modelo de cela é aquele em que o eletrodo de referência encontra-se acoplado junto ao eletrodo indicador.

No entanto, uma das principais desvantagens das celas em fluxo, semelhante a esta com o eletrodo planar, é a possibilidade da presença de pequenas bolhas de ar, que possam ser formadas na superfície do eletrodo. Estas bolhas, principalmente em sistemas eletroquímicos onde o detector está em contato direto com a solução, causam sérios problemas na obtenção de dados (ruídos, distorções, perda de reprodutibilidade, etc).

Na tentativa de minimizar estes efeitos foi ainda avaliado uma geometria de eletrodo onde o fluxo passa através de um eletrodo tubular. Neste caso um orifício de 1 mm foi feito em uma placa de aço inox, de dimensões semelhantes àquela empregada para a construção do eletrodo planar, resultando em um tubo de 0,1 cm de diâmetro e 0,3 cm de comprimento. A área de contato da solução e o eletrodo, no entanto, é determinado neste caso pela espessura da placa de aço e pelo diâmetro do orifício. Este modelo de cela desenvolvido é mostrado na Figura 2C.

Se por um lado este sistema apresenta menos problemas quanto a

presença de bolhas de ar em solução, por outro as respostas dos eletrodos não foram satisfatórias. Como pode ser verificado na Figura 15, ocorreu uma perda da sensibilidade do eletrodo indicador para as soluções com pH's mais ácidos, e um aumento no tempo de retorno a linha base para as soluções mais alcalinas. Também observou-se a presença de ruído, devido a necessidade de se manter o eletrodo de referência na saída da cela potenciométrica, como discutido anteriormente.

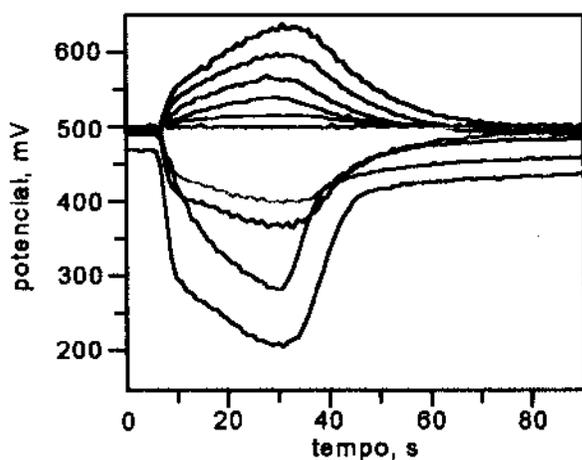


Figura 15. (A) Resposta do eletrodo indicador tubular. O sistema utilizado neste experimento foi mostrado na Figura 1A e a cela potenciométrica mostrada na Figura 2C.

A perda de sensibilidade para esta geometria, está associada a dificuldade de se obter um filme de óxido com boa qualidade na superfície interna do eletrodo tubular, devido as suas pequenas dimensões.

Desta forma, para garantir um menor nível de ruído nas medidas, uma maior sensibilidade, assim como um menor tempo de resposta, foi selecionado para os futuros trabalhos, o modelo de cela mostrado na Figura 2B, juntamente com o sistema em fluxo mostrado na Figura 1B.

Capítulo 2

Aplicação de Redes Neurais na Determinação de Ácidos Fracos, através de Titulação Potenciométrica em Sistema FIA.

2.1. Introdução

2.1.1. Titulação Potenciométrica em sistema FIA

Nas titulações convencionais de neutralização, que empregam indicadores colorimétricos, é comum obter-se apenas um ponto final, no qual, o número de moles da base é igual ao número de moles do ácido, conhecendo-se a estequiometria da reação. Em titulações potenciométricas pode-se traçar um perfil da titulação, obtendo-se mais informações à respeito do sistema em estudo do que apenas o ponto final. Por outro lado, além de fornecer as mesmas informações daquelas obtidas com as titulações com indicadores, as titulações potenciométricas apresentam também a vantagem de um menor tempo de análise e a não necessidade de conhecer a concentração do titulante.

As titulações potenciométricas em sistemas FIA são baseadas na criação de um gradiente de concentração adequado, de um volume injetado (ácido ou base), em fluxo carregador (base ou ácido). Normalmente este gradiente de titulação em fluxo é produzido por uma câmara de dispersão. Forma-se uma zona de amostra dispersa no carregador, que gradualmente será neutralizada através da interface da espécie injetada com o fluxo carregador à frente e no final da zona dispersa. No perfil da dispersão encontrar-se-ão várias relações de concentrações ácido/base, em que um dos pontos o ácido é exatamente neutralizado pela base.

Normalmente é considerada a largura de pico como método de cálculo da concentração, descrito por Pardue e Fields [17, 18]. A largura de pico é medida pela diferença de tempo (Δt) entre dois pontos, um situado à frente da zona de dispersão e outro situado no final da zona de dispersão, pontos A e B da Figura 16, com coeficientes de dispersão idênticos. Para calibrar este sistema, são feitas injeções de padrões de diferentes concentrações, no qual, diferentes larguras de picos podem ser registradas.

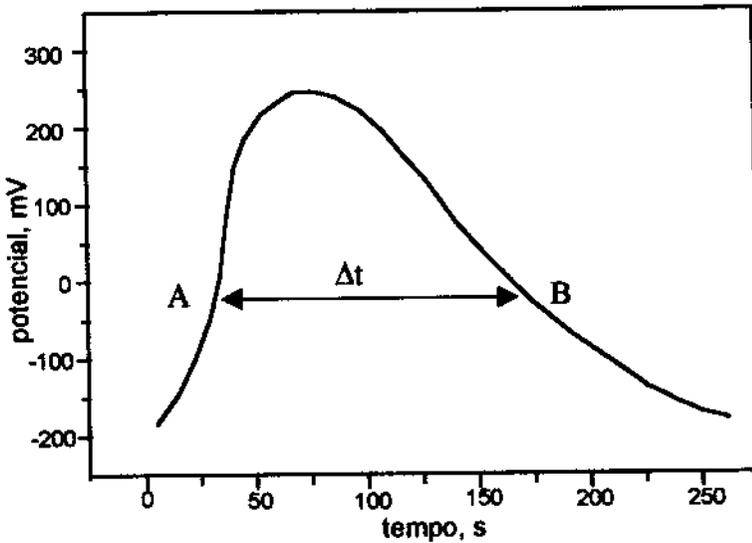


Figura 16. Perfil de resposta comumente encontrado em uma titulação ácido - base, em sistema FIA.

Como pode ser observado na Figura 16, inicialmente ocorre uma grande variação do potencial, devido a chegada da zona de dispersão no eletrodo, seguido por um perfil decrescente de potenciais, no qual, indica a reação de neutralização do ácido injetado, pela base utilizada como carregador.

Escolhendo um valor de potencial, a diferença de tempo Δt entre o início e o final da titulação, podem ser relacionados com o volume da amostra injetada, a vazão e a concentração da amostra e do reagente através da equação 1 [1].

$$\Delta t = (V_m/Q) \ln 10 \log [C_A^0 / (C_R^0 n)] + (V_m/Q) \ln 10 \log (S_v / V_m) \quad (1)$$

onde, V_m é volume da câmara de dispersão, Q é a vazão, C_A^0 e C_R^0 são a concentração da amostra e do reagente, respectivamente, S_v é o volume de amostra injetado e n é a razão molar dos reagentes

O termo $(V_m/Q) \ln 10$ fornece a inclinação da curva de calibração quando uma série de titulações de soluções padrões são efetuadas, podendo assim ser utilizada para a determinação da concentração das amostras desconhecidas. A vantagem do processo de titulação em sistemas FIA é que a concentração do reagente não precisa ser necessariamente conhecida, desde que o reagente utilizado para a titulação das soluções padrões na calibração, seja o mesmo em

todas as titulações das amostras.

2.1.2. Titulação Potenciométrica de Misturas de Ácidos Fracos em sistema FIA

A determinação da concentração dos componentes em misturas de vários ácidos fracos é comumente necessária em indústrias alimentícias, pesquisas científicas e laboratórios clínicos. Sabe-se que não é uma tarefa fácil determinar a concentração de ácidos fracos por titulação potenciométrica, principalmente quando os pK_a 's dos ácidos envolvidos são muito próximos.

As titulações potenciométricas em sistemas FIA, como já descrito, considera apenas a largura de pico, como fator característico do sinal medido, para a determinação da concentração do analito. Quando tratamos dados de titulação potenciométrica de misturas de ácidos fracos, esta informação de largura de pico não é suficiente para determinar a concentração dos diferentes ácidos fracos presentes na amostra.

No entanto, a titulação potenciométrica para determinação simultânea de uma mistura de ácidos fracos às vezes é preferida, pois, é um método alternativo de menor custo. Mas sabe-se que os dados resultantes das medidas potenciométricas de misturas de ácidos fracos, apresentam um comportamento não linear, devido a complexidade dos equilíbrios envolvidos. Em decorrência disto, vários métodos matemáticos e gráficos são encontrados na literatura [19-28], para solucionar este problema.

Titulações potenciométricas de ácidos fracos em sistema em fluxo foram realizadas por Lindberg e Kowalski [29]. Neste caso os autores empregaram o Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS), para tratamento dos dados. Misturas binárias de ácido acético e propanóico, foram tituladas obtendo-se erros relativos de concentração de 1%. Neste caso os resultados foram bastante satisfatórios, principalmente devido ao fato de os valores dos pK_a 's dos ácidos titulados, diferirem de quase duas unidades. Para misturas com ácido fosfórico, succínico, málico, oxálico e tartárico, com faixa de concentração entre $5,0 \times 10^{-3}$ e $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, o erro de previsão segundo estes mesmos autores foi de 4,6%.

O aumento do erro neste caso, deve-se ao aumento do número de espécies bem como a uma menor diferença entre os pka's dos ácidos titulados na mistura.

Recentemente, redes neurais artificiais (ANN) [30] tem despertado interesse em muitas pesquisas, e tem sido vista como um método de calibração multivariada bastante eficiente, para modelar sistemas analíticos complexos, não lineares.

Redes neurais tem sido empregada, em dados obtidos a partir de titulações potenciométricas [31] de misturas de ácidos fracos, onde a aquisição dos mesmos foram realizadas em intervalos de 0,10 unidades de pH, em sistema não automatizado. Os ácidos estudados foram o ácido málico, propanóico e succínico, com faixa de concentração entre $1,5 \times 10^{-2}$ e $5,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ e foi obtido um erro médio relativo de 4,5%. A principal desvantagem deste trabalho é o tempo gasto para a obtenção dos dados.

2.1.3. Calibração Multivariada

A Calibração Multivariada [32] tem como princípio básico a utilização de muitas variáveis instrumentais x_1, x_2, \dots, x_n (como valores de absorbância à vários comprimentos de onda, valores de intensidade à vários tempos, etc...) simultaneamente, para quantificar alguma variável de interesse y (como concentração).

Foram utilizadas as seguintes anotações para uma melhor compreensão algébrica dos modelos de tratamento de dados, que serão discutidos a seguir:

- Vetores - letras minúsculas em negrito (\mathbf{x})
- Matrizes - letras maiúsculas em negrito (\mathbf{X})
- Escalares - letras minúsculas sem negrito (x)
- Matrizes diagonais - letras maiúsculas sem negrito (X).

Serão apresentados os métodos de calibração multivariados utilizados neste trabalho, que são a Rede Neural e o PLS. Uma ênfase maior será dada à Rede Neural, devido ao fato deste método ser mais recente e ainda pouco difundido no país. Também será apresentado uma breve introdução sobre a Análise de Componentes Principais (PCA) que é necessária para a compreensão do PLS.

2.1.3.1. Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise dos componentes principais PCA (do inglês Principal Component Analysis) [33, 34, 35], é um método para decompor uma matriz de dados \mathbf{X} de posto r (ou "rank" r), como uma soma de matrizes de posto igual a 1, como na equação 2:

$$\mathbf{X} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \mathbf{M}_3 + \dots + \mathbf{M}_h \quad (2)$$

onde posto expressa o número de vetores linearmente independentes de uma matriz.

Essas novas matrizes com posto igual a 1, são produtos de vetores chamados "scores" t_h e "loadings" p_h . Estes "scores" e "loadings" podem ser calculados par a par por um processo iterativo, como na equação 3.

$$\mathbf{X} = t_1 \mathbf{p}'_1 + t_2 \mathbf{p}'_2 + \dots + t_h \mathbf{p}'_h \quad (3)$$

ou de forma geral equivalente:

$X = TP'$ ou graficamente como na Figura 17.

$$\begin{matrix} & m \\ \boxed{X} & \\ n & \end{matrix} = \begin{matrix} & l \\ \boxed{t_1} & \\ n & \end{matrix} \begin{matrix} & m \\ \boxed{p'_1} & \\ l & \end{matrix} + \begin{matrix} & l \\ \boxed{t_2} & \\ n & \end{matrix} \begin{matrix} & m \\ \boxed{p'_2} & \\ l & \end{matrix} + \dots + \begin{matrix} & l \\ \boxed{t_h} & \\ n & \end{matrix} \begin{matrix} & m \\ \boxed{p'_h} & \\ l & \end{matrix}$$

Figura 17. Representação da somatória dos produtos de matrizes dos vetores “scores” e “loadings”

Para exemplificar t_h e p'_h , temos a Figura 18 que ilustra no plano bidimensional duas variáveis x_1 e x_2 . A Figura 18A mostra uma componente principal que é a reta que aponta para a direção de maior variabilidade das amostras (pontos 1 a 6) da Figura 18B. Os “scores” t_h são as projeções das amostras na direção da componente principal e os “loadings” p'_h são os cossenos dos ângulos formados entre a componente principal e cada variável.

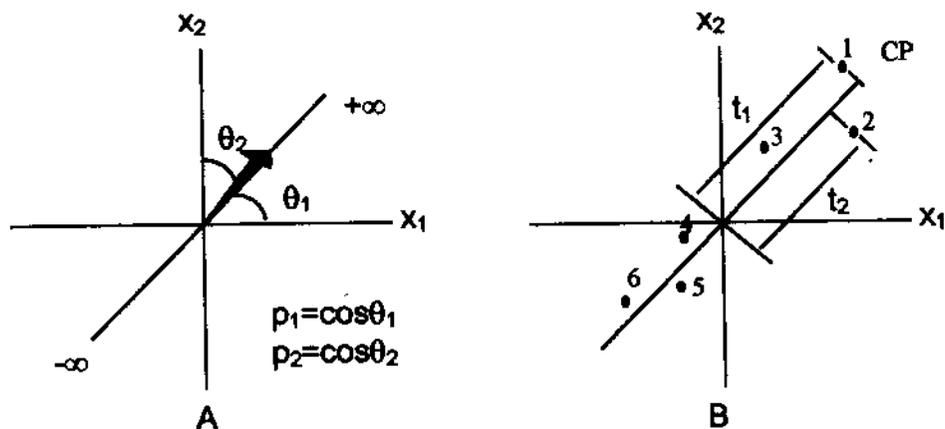


Figura 18. Uma componente principal no caso de duas variáveis: (A) loadings são os ângulos do vetor direção; (B) scores são as projeções das amostras (1 -6) na direção da componente principal. Note que os dados são centrados na média.

Em síntese, a PCA é um método que tem por finalidade básica, a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais.

2.1.3.2. Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O PLS [36-38] é um modelo matemático baseado em uma combinação linear das medidas instrumentais x e os resultados de concentração y . Para

realizar esta combinação são obtidos inicialmente os "scores" e os "loadings" das duas matrizes X (matriz de dados instrumentais) e Y (matriz de concentração):

$$X = TP' + E = \sum t_h p'_h + E$$

$$Y = UQ' + F = \sum u_h q'_h + F$$

onde T e U são as matrizes de "scores" da matriz X e Y respectivamente; P e Q são as matrizes de "loadings" da matriz X e Y respectivamente; e E e F são os resíduos. A correlação entre os dois blocos X e Y é simplesmente uma relação linear obtida pelo coeficiente de regressão como descrito abaixo:

$$U = b_h T_h$$

onde b_h é um vetor de coeficientes de regressão entre a matriz "scores" U de Y e a matriz "scores" T de X .

Este algoritmo usualmente converge muito rapidamente, realizando pequenas rotações das componentes principais dos blocos de X e Y , para que se obtenha a melhor relação linear possível entre os "scores" desses dois blocos.

2.1.3.3. Redes Neurais Artificiais (ANN)

Recentemente, Redes Neurais Artificiais tem despertado interesse em muitas áreas da Química. Ela tem sido vista como um método de calibração multivariada muito eficiente dentro da Quimiometria, para modelar sistemas analíticos complexos.

O termo rede neural resulta de pesquisas realizadas a partir da inteligência artificial, no qual procura entender e imitar o comportamento do cérebro [39]. De acordo com Barr e Feigenbaum (1981) [40]:

"Inteligência artificial é a parte da ciência da computação envolvida com o desenvolvimento de sistemas computacionais inteligentes, isto é, sistemas que exibem características associadas com a inteligência no comportamento humano."

Buchanan e Shortliffe (1983) [41] forneceram uma outra definição:

"Inteligência artificial é o ramo da ciência computacional relacionada com métodos simbólicos e algoritmos na solução de problemas."

Ou ainda mais genericamente:

"Redes Neurais é o nome dado a um conjunto de métodos matemáticos e algoritmos computacionais especialmente projetados para simular o processamento de informações e aquisição de conhecimento do cérebro humano."

Resumidamente, a rede neural tem como objetivo estabelecer uma relação, seja ela linear ou não linear, entre um conjunto de dados de entrada e uma correspondente saída ou resposta. Para isto utiliza-se de transformações matemáticas na entrada, de modo a produzir a saída desejada.

A rede realiza este trabalho "aprendendo" como o sistema em estudo se comporta, e então, aplica este conhecimento à novos dados de entrada para prever a saída apropriada.

A rede neural é baseada no funcionamento do cérebro humano, no qual o sistema nervoso detecta estímulos, e envia estas informações de entrada, via neurônios para o cérebro. Na Figura 19, tem-se a representação de um neurônio biológico. Dentro do cérebro, outros neurônios são excitados e se interagem através das forças sinápticas. Baseado no sinal de entrada, o cérebro conclui e envia um sinal de saída na forma de resposta ou reação.

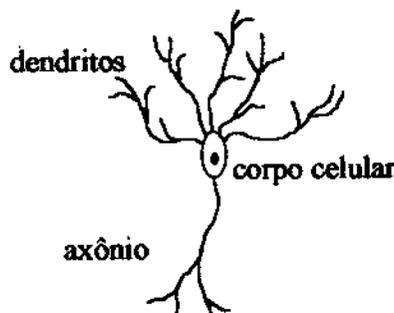


Figura 19. Representação de um neurônio humano com suas entradas (dendritos), núcleo, onde ocorre as transformações (corpo celular) e as saídas (axônio).

Analogamente na Figura 20 [42], tem-se a representação de um único neurônio artificial. Comparando este, com o neurônio biológico da Figura 19, temos que as interconexões de entrada do neurônio artificial, denominadas de interconexões peso, que correspondem aos dendritos, por onde são recebidos os sinais das forças sinápticas no neurônio biológico. Os cálculos efetuados, correspondem ao que ocorre no corpo celular do neurônio biológico, e a saída transmitida pela interconexão de saída, corresponde ao axônio.

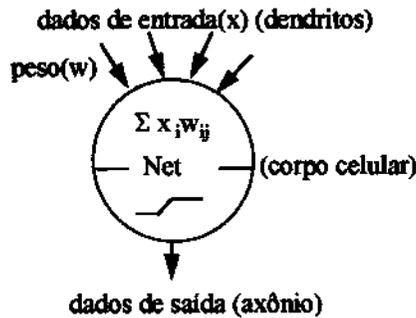


Figura 20. Representação dos componentes de um neurônio artificial, entradas e interconexões peso (dendritos), núcleo com função de transferência (corpo celular) e a saída (axônio).

No neurônio artificial, os dados de entrada x são multiplicados pelos respectivos pesos w . A função $Net_j = \sum x_i w_{ij}$, é a somatória de todos os dados de entrada x , vezes os seus respectivos pesos w . A saída do neurônio, é obtida a partir de uma função de transferência aplicada sobre Net_j . Esta função de transferência pode ser: linear, sigmoide, tangente hiperbólica, ou qualquer outra função que possa ser criada, dependendo do comportamento dos dados. Neste trabalho foi utilizada a função de transferência sigmoide, que tem um comportamento não linear, como mostrado na Figura 21

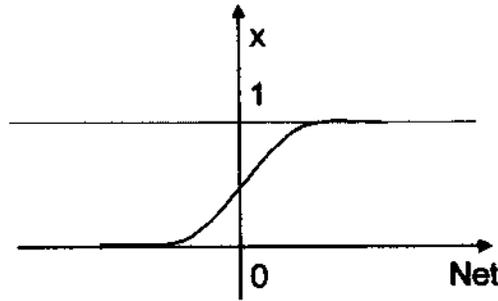


Figura 21. Função de transferência sigmoideal

A função de transferência sigmoideal é representada pela equação 4:

$$f_t(\text{Net}, \theta) = 1 / \{1 + \exp [-(\text{Net} + \theta)]\} \quad (4)$$

onde, Net é a somatória dos dados de entrada (x) vezes seus pesos (w) e θ representa o "bias", que é uma constante adicionada à função de transferência de cada camada, deslocando esta função para um melhor ajuste dos pesos.

A seqüência de entradas e saídas se repetem tantas vezes quantas forem as camadas de neurônios de uma rede. O conjunto de neurônios forma a rede neural com uma camada de entrada, uma ou mais camadas internas ou escondidas, e uma camada de saída.

Em uma titulação potenciométrica em fluxo, por exemplo, os dados de entrada são os potenciais em função do tempo, obtidos a partir da titulação das soluções padrões. Na Figura 22 [43], está representada uma rede neural típica, com três camadas: uma camada de entrada, uma camada escondida e uma camada de saída. Os dados de entrada são os pontos do perfil de resposta instrumental e os dados de saída, são as concentrações dos ácidos na mistura.

O número de neurônios assim como as camadas, são determinados por tentativa e erro, de forma a minimizar os erros na saída da rede, para padrões conhecidos.

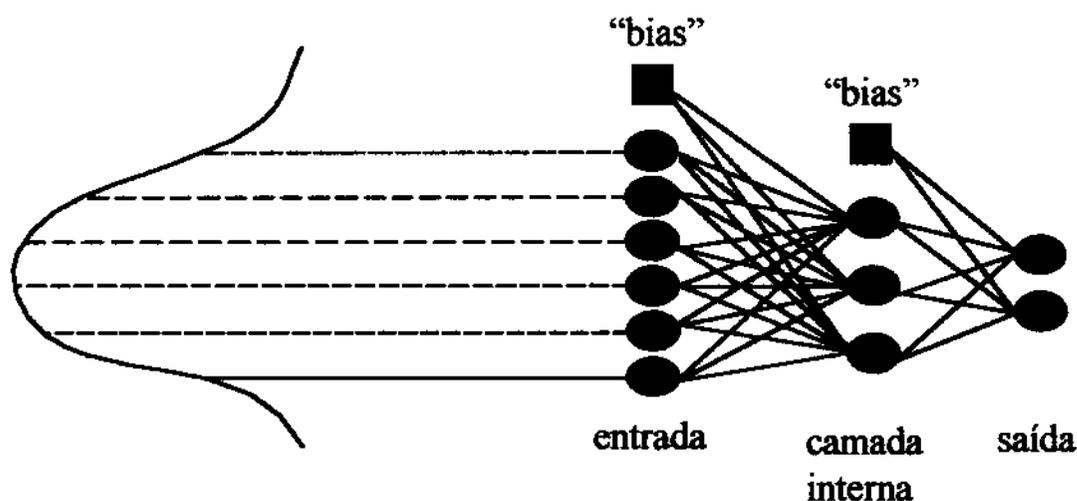


Figura 22. Representação de uma rede neural de três camadas, no tratamento dos dados de titulação potenciométrica em um sistema FIA.

Inicialmente estes pesos são estabelecidos aleatoriamente, posteriormente são corrigidos, através de métodos de otimização, baseados em gradiente ou não, para que as saídas encontradas apresentem um erro mínimo global, quando comparadas com a resposta esperada.

O treinamento da Rede Neural pode ser dividido em duas fases: uma fase de treinamento ou aprendizagem, uma de validação ou generalização.

Na primeira fase, onde ocorre o treinamento ou aprendizagem, um conjunto conhecido de dados de entrada X e saída Y , são apresentados à rede. Em seguida são ajustados os fatores pesos entre os neurônios até a entrada produzir a saída desejada. Este ajuste é realizado através de métodos de otimização dos pesos em função dos erros, dos quais os mais utilizados são: o método de Retropropagação dos Erros [42, 44] e o método de Marquardt Levenberg [45, 46]. O processo de treinamento normalmente é supervisionado, significa que, os pesos são corrigidos baseados nos valores reais pré-especificados, correspondentes as entradas. Existem também outros tipos de redes neurais que utilizam métodos de treinamento não supervisionado, ou seja, treinamentos em que as respostas não são conhecidas.

Na fase de validação ou generalização uma nova matriz de dados X , que não foi utilizada no treinamento, irá estimar através do modelo matemático

desenvolvido na fase de treinamento, a saída da rede Y esperada.

2.1.3.3.1. Retropropagação dos Erros

O método de otimização dos pesos por Retropropagação dos Erros, realiza um processo em que os pesos são corrigidos a partir da última camada até a primeira camada. E este processo está representado na Figura 23, para uma rede neural de três camadas.

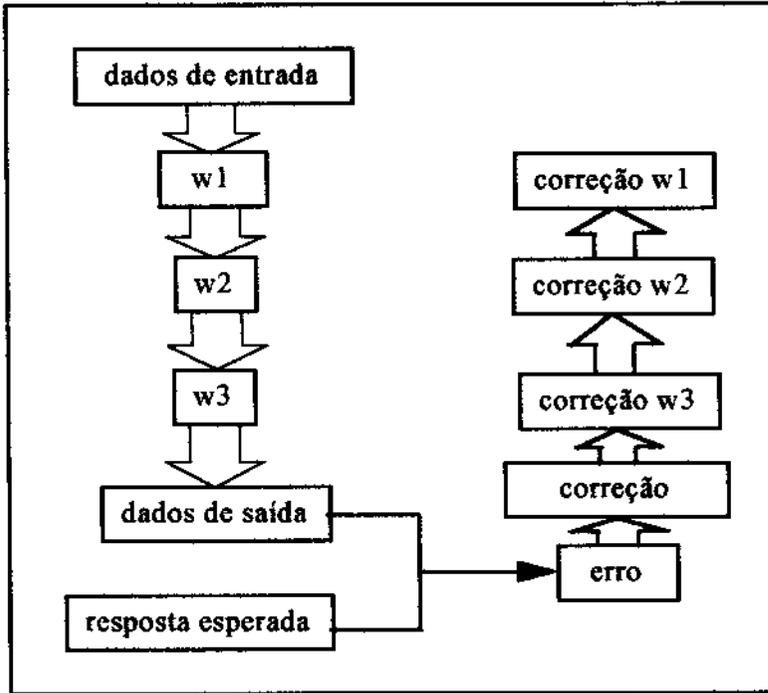


Figura 23. Representação da correção dos pesos por retropropagação dos erros, no qual inicia a correção a partir da última camada em direção a primeira camada.

Este processo é baseado na equação 5, que é aplicada em todas as camadas.

$$\Delta w_i = w_i - w_{i-1} \quad (5)$$

Sendo que o valor Δw é dado pela equação 6:

$$\Delta w = \eta \delta_{out_{i-1}} + \mu \Delta w \quad (6)$$

Como pode ser observado, a equação 6 tem dois termos. O primeiro termo engloba o chamado parâmetro de velocidade de treinamento, que tem por finalidade ajustar o tamanho do passo que a rede dará na interação (η). O δ é o

gradiente descendente, o qual, é um fator de correção, encontrado a partir da derivada parcial do erro em função do peso. E out_{l-1} é o valor de saída da camada anterior ($l-1$). O primeiro termo da equação 6 é derivado de:

$$\Delta w = -k \frac{\partial E}{\partial w} = -k \left(\frac{\partial E}{\partial out_{l-1}} \right) \left(\frac{\partial out_{l-1}}{\partial Net} \right) \left(\frac{\partial Net}{\partial w} \right) \quad (7)$$

onde $E = \frac{1}{2} \sum (y - y')^2$ é o erro, no qual $y - y'$ é a diferença entre o valor previsto e o valor esperado.

Depois de derivar o último termo da equação 7 tem-se:

$$\Delta w = -k \left(\frac{\partial E}{\partial out_{l-1}} \right) \left(\frac{\partial out_{l-1}}{\partial Net} \right) out_{l-1} \quad (8)$$

assim, $\Delta w = \eta \delta out_{l-1} \quad (9)$

onde η é igual a $-k$, $\delta = \left(\frac{\partial E}{\partial out_{l-1}} \right) \left(\frac{\partial out_{l-1}}{\partial Net} \right)$ e out_{l-1} é igual a saída da camada anterior. A equação 9 equivale ao primeiro termo da equação 6.

A Figura 24, ilustra o método do gradiente descendente, onde temos o erro como uma função de apenas um peso, no qual apresenta um mínimo. Pela inclinação da reta (derivada), pode-se encontrar o sentido de correção dos pesos para que se atinja o mínimo.

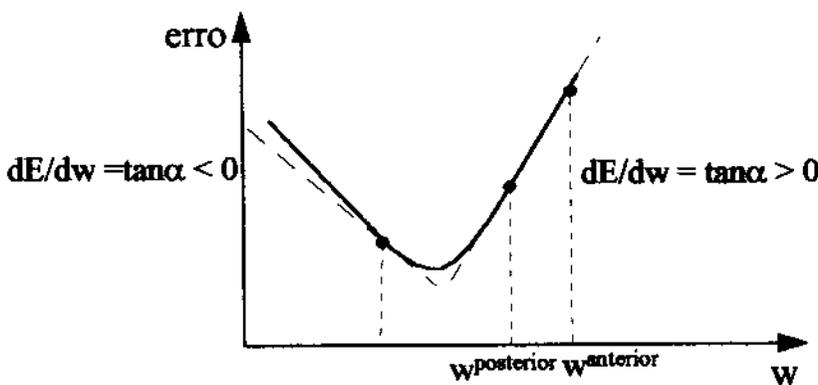


Figura 24. Função erro com relação aos pesos, onde dE/dw fornece o fator de correção entre os pesos

No segundo termo da equação 6, ($\mu \Delta w$), tem-se o " μ " que é denominado

momento, que tem a função de garantir que o vetor peso obtido pelo método do gradiente descendente, esteja em um mínimo global e não em um mínimo local. O momento desloca o peso encontrado, forçando com que o erro seja reavaliado. Se for encontrado um erro maior, o peso estava em um mínimo global, se for encontrado um erro menor, o mínimo era local, e neste último caso a busca prossegue.

2.1.3.3.2. Marquardt Levenberg

Este é um segundo método de correção dos pesos, no qual é uma modificação do algoritmo de Gauss Newton denominado Marquardt Levenberg [45, 46]. A vantagem deste método é ser mais rápido na convergência e também ser mais robusto.

Esta aproximação usa a expansão da série de Taylor da função erro, fazendo a truncagem nos termos de segunda ordem. Considerando w_{i-1} o peso estimado anteriormente, na iteração $i-1$ a função erro pode ser aproximada por:

$$E(w) = E(w_{i-1}) + \delta E(w_{i-1})\Delta w + \frac{H}{2}(\Delta w)^2$$

onde $\Delta w_i = w_i - w_{i-1}$

$\delta E(w_{i-1})$ é o gradiente da função erro:

$$\delta E(w_{i-1}) = \frac{\partial E(w_{i-1})}{\partial w}$$

H é a derivada segunda da função de erro:

$$H = \frac{\partial^2 E(w_{i-1})}{\partial w^2}$$

O mínimo da função erro, ignorando os termos de ordem superior é dado através da derivada primeira da série de Taylor até o termo de segunda ordem, igualada a zero, pela seguinte condição:

$$\frac{\partial E(w)}{\partial w} = 0 \quad \text{e} \quad \delta E(w_{i-1}) + H(\Delta w) = 0$$

e o valor de Δw é dado pela equação 10:

$$\Delta w = -H^{-1} \delta E(w_{i-1}) \quad (10)$$

A equação 10 é usada iterativamente até que seja encontrado um valor de erro satisfatório. Este método é chamado de método de Gauss Newton, e requer o cálculo da inversa da matriz Hessiana, o qual pode introduzir problemas numéricos.

A Hessiana pode ser alterada por adição de uma matriz positiva definida por P para que H possa ser encontrado. Quando esta modificação é realizada de forma que $P = \lambda I$, e é adicionado no cálculo do peso tem-se a equação 11:

$$\Delta w = -(H + \lambda I)^{-1}(w_{i-1}) \delta E(w_{i-1}) \quad (11)$$

onde I é a matriz identidade e λ é um escalar não negativo. Este termo é um escalar que ajusta o tamanho do passo na superfície de erro.

Se o escalar λ é muito grande, a expressão acima aproxima-se do gradiente descendente, enquanto se o escalar é pequeno a expressão acima aproxima-se do método de Gauss-Newton, que é baseado na segunda derivada da função erro. O λ decresce depois de cada passo e aumenta apenas quando um passo aumenta o erro.

Os parâmetros de treinamento que devem ser estabelecidos são, o número máximo de ciclos, (onde cada ciclo significa um processo de correção dos pesos) o erro mínimo que deve ser atingido, o gradiente de erro mínimo, o valor inicial para λ , o múltiplo valor para aumentar ou diminuir λ , e o máximo valor de λ .

O treinamento continua até que o erro desejado seja encontrado, ou o λ máximo seja atingido, ou ainda, o número máximo de períodos ter terminado.

2.2. Parte Experimental

2.2.1. Titulação Potenciométrica de Misturas de Ácidos Fracos em Sistema FIA.

O sistema em fluxo mostrado na Figura 1B e a cela potenciométrica mostrada na Figura 2B, foram empregados nas titulações potenciométricas de misturas de ácidos fracos, no qual encontram-se acoplados na mesma cela os eletrodos indicador (aço inox) e de referência (Ag/AgCl).

2.2.1.1. Misturas de Ácidos Oxálico e Succínico.

Um primeiro conjunto de misturas contendo ácido cítrico e málico foi proposto inicialmente, com planejamento 6^2 (onde 6 define os níveis de concentrações de cada um dos dois componentes na mistura), resultando em um total de 36 misturas. Posteriormente eliminou-se 2 níveis para o ácido succínico restando 24 misturas. Destas misturas uma apresentou perfil com curva de titulação experimental incompleta. Esta mistura foi retirada, resultando um total de 23 misturas. A distribuição das concentrações dos ácidos oxálico e succínico é mostrada na Figura 25. As misturas indicadas pelos símbolos na cor vermelha foram utilizadas para o treinamento, e as indicadas pelos símbolos na cor verde foram utilizadas na previsão. Todas as soluções foram preparadas por diluição, a partir de soluções estoques $0,0998 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido succínico e $0,0999 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido oxálico.

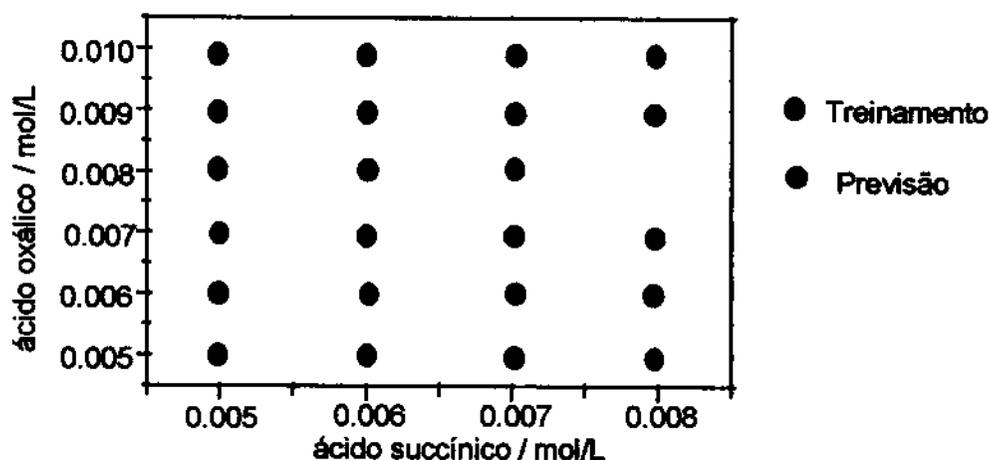


Figura 25. Concentrações das misturas dos Ácidos succínico e Oxálico, tituladas no sistema FIA, com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Foi empregado um sistema em fluxo reverso, no qual a mistura ácida

foi bombeada como carregador, e injetada a solução de NaOH. Um volume de 250 μL de NaOH, aproximadamente $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi injetado, e os potenciais da zona dispersa, foram amostrados em intervalos de um segundo, durante um período total de 420 segundos. Foi utilizada uma câmara de dispersão de 500 μL , e a vazão do sistema foi mantida em $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

2.2.1.2. Misturas de Ácidos Fosfórico, Oxálico e Tartárico.

A Figura 26 mostra o planejamento realizado na preparação do segundo conjunto de soluções, para a realização das titulações potenciométricas em fluxo, contendo ácido fosfórico, oxálico e tartárico. Um planejamento 4^3 , foi realizado resultando em um total de 64 misturas, das quais, foram eliminadas algumas com concentrações mais altas e concentrações mais baixas. As misturas indicadas pelos símbolos na cor vermelha foram utilizadas no treinamento, e as indicadas pelos símbolos na cor verde foram utilizadas na previsão. As misturas foram preparadas por diluição a partir de soluções estoques $0,0967 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fosfórico, $0,0999 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido oxálico e $0,0998 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido tartárico.

Foi utilizada uma câmara de dispersão de 500 μL , e a vazão do sistema foi mantida em $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$. Foi injetado um volume de 500 μL de uma solução de NaOH, aproximadamente $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os dados foram amostrados em intervalos de um segundo, durante um período total de 420 segundos.

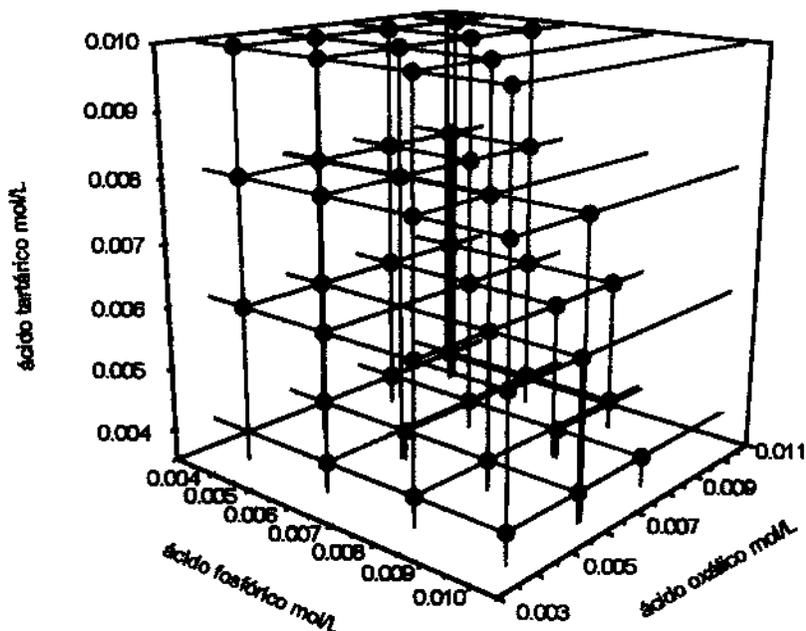


Figura 26. Concentrações das misturas dos Ácidos fosfórico, Oxálico e tartárico, tituladas no sistema FIA, com solução de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

2.2.1.3. Misturas de Ácidos Cítrico e Málico.

Um terceiro conjunto de misturas de ácidos cítrico e málico foi proposto, sendo que as misturas preparadas foram baseadas em um planejamento 5^2 . Destas misturas duas apresentaram perfís com curva de titulação experimental incompleta decorrentes do experimento. Além destas misturas outras 6, com concentrações intermediárias foram adicionadas, resultando em um total de 29 misturas. A distribuição das concentrações dos ácidos cítrico e málico é mostrada na Figura 27. As misturas indicadas pelos símbolos na cor vermelha foram utilizadas para o treinamento e as indicadas pelos símbolos na cor verde foram utilizadas na previsão. Todas as soluções foram preparadas por diluição a partir de soluções estoques $0,1006 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cítrico e $0,09849 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido málico

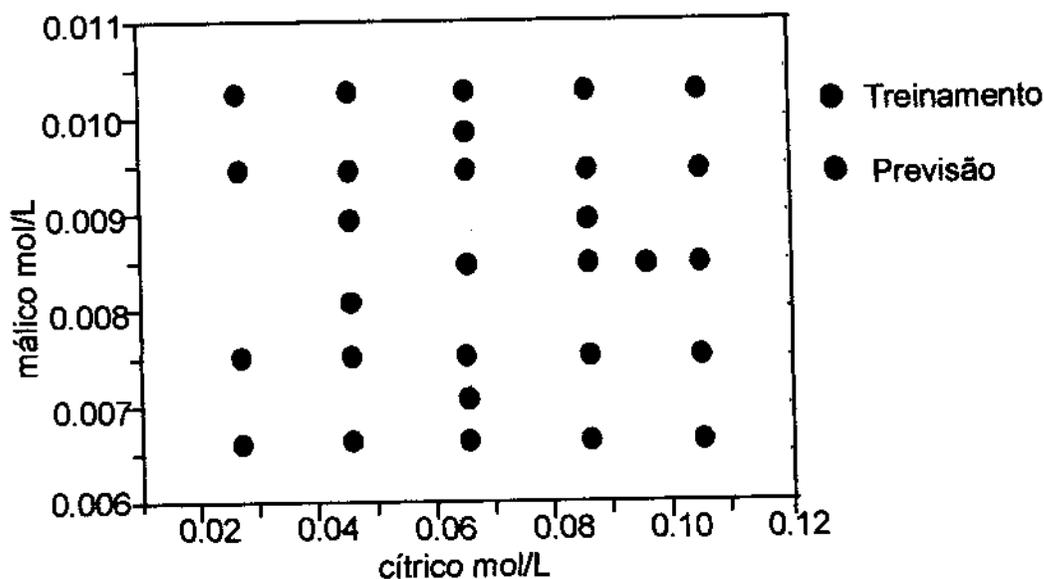


Figura 27. Concentrações das misturas dos Ácidos cítrico e málico, tituladas no sistema FIA com solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Foi utilizada uma câmara de dispersão de $500 \mu\text{L}$ e a vazão foi mantida em $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Um volume de $375 \mu\text{L}$ de NaOH aproximadamente $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi injetado, e os potenciais da zona dispersa foram amostrados em intervalos de um segundo, durante um período total de 420 segundos.

2.2.1.4. Determinação de Ácidos Cítrico e Málico em Amostras de Suco de Laranja.

A Figura 28, mostra o planejamento realizado na preparação das misturas para o quarto conjunto de soluções tituladas, contendo ácido cítrico, málico e clorídrico. Estas soluções, foram preparadas por diluição a partir de soluções estoques $0,1007 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido cítrico, $0,01042 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido málico e $0,0948 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorídrico. As concentrações dos ácidos cítrico e málico foram mantidas dentro da faixa esperada para os teores destes ácidos, encontrados em sucos de laranja. Foi realizado um planejamento de 5^3 , resultando em 125 combinações. Destas combinações, foram analisadas somente 63 misturas, que apresentaram as seguintes relações de concentração: altas concentrações de ácidos cítrico e málico e baixas concentrações de ácido clorídrico; baixas concentrações de ácidos cítrico e málico e altas concentrações de ácido clorídrico

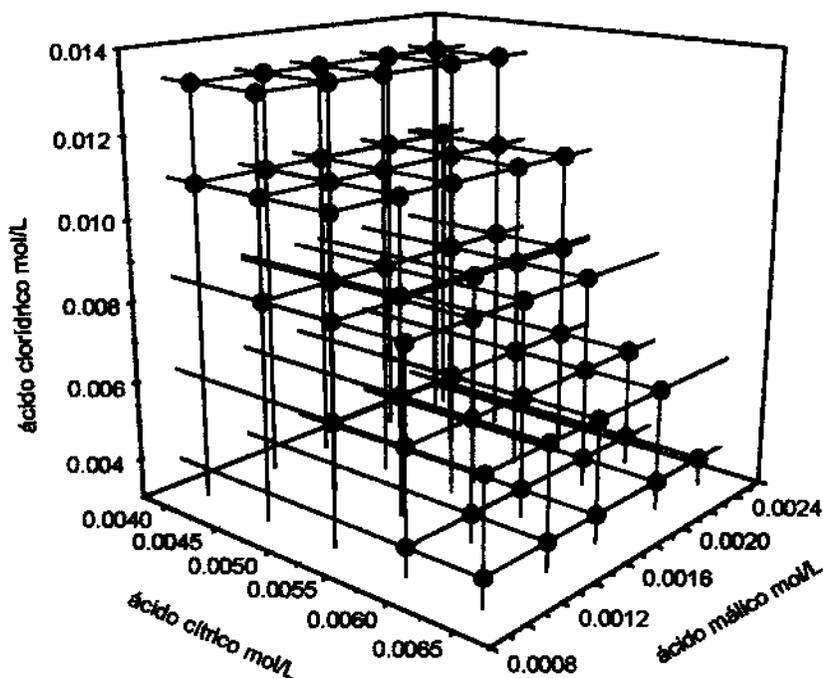


Figura 28. Concentrações das misturas dos Ácidos cítrico, málico e clorídrico, tituladas no sistema FIA com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Foi utilizada uma câmara de dispersão de $500 \mu\text{L}$, e a vazão foi mantida em $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. O volume injetado de NaOH aproximadamente $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, foi de $500 \mu\text{L}$. Os dados foram amostrados em intervalos de um segundo durante 320 segundos.

2.2.2. Preparação das Amostras de Suco de Laranja, para a Titulação Potenciométrica em Fluxo

Dezessete amostras de suco de laranja foram tituladas, para a determinação de ácidos cítrico e málico [47], em amostras reais. Inicialmente os sucos concentrados, provenientes da empresa Citrossuco, foram diluídos 5,8 vezes, para obter-se um brix (quantidade de sólidos dispersos em solução) de aproximadamente 11,2. Foram pipetados 10 mL da amostra diluída e neutralizada com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, usando fenolftaleína como indicador.

Em seguida foram adicionados 2,5 mL de BaCl_2 e 70 mL de álcool etílico 95%. O volume foi completado para 100 mL garantindo uma solução 66% em álcool, sendo em seguida agitado por 5 minutos. Deixou-se em

repouso por 30 minutos, filtrou-se em membrana de celulose 0,45 μm de porosidade e lavou-se o precipitado com álcool. Este foi dissolvido em água à 10^oC, e adicionado um volume de 3,2 mL de HCl 0,8695 mol L⁻¹. Esta solução foi diluída em balão de 100 mL e depois titulada no sistema FIA.

2.2.3. Análise de Amostras de Suco por CLAE

Das amostras de suco tituladas por potenciometria, dez delas foram anteriormente analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), pela Citrossuco [48], e determinadas as concentrações de ácido cítrico e málico. As outras sete amostras foram analisadas em nossos laboratórios utilizando a mesma metodologia da Citrossuco [48], cujo equipamento utilizado foi Waters 600E (sistema de bomba) e Waters 484 (detector).

As amostras foram diluídas 5,8 vezes da mesma forma que a diluição realizada na titulação potenciométrica e centrifugadas à 10000 rpm, por 10 minutos. Em seguida foram filtradas em membrana de celulose 0,45 μm de porosidade.

A coluna cromatográfica foi condicionada com metanol, seguido por água e por último tampão fosfato (0,2 mol L⁻¹ de KH₂PO₄) à pH 2,4. Todos estes reagentes foram bombeados por aproximadamente 1 hora, com vazão de 1,0 mL min⁻¹, e este foi mantido durante a análise. A coluna utilizada foi a C18 de 5 μm de porosidade, e dimensões 25cm x 4,6mm. O comprimento de onda do detector UV-Visível, foi ajustado para 214nm, e após a obtenção de uma linha base estável, foi injetado 10 μL dos padrões e das amostras, obtendo-se os picos cromatográficos.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Titulações potenciométricas de misturas ácidas.

2.3.1.1. Misturas de ácidos oxálico e succínico

Um primeiro experimento foi realizado utilizando-se misturas sintéticas com apenas dois ácidos fracos: oxálico e succínico. Neste experimento buscou-se a confirmação de que o sistema em fluxo construído, seria suficiente para a titulação de misturas com apenas dois ácidos fracos. Na Tabela 2, encontram-se os valores de pka's dos ácidos empregados no experimento, e os números em negrito são os pka's que provavelmente diferenciam os perfis das curvas de titulação umas das outras.

Tabela 3. Valores de pka's dos ácidos utilizados nos experimentos[49]

ácidos utilizados	pka1	pka2
Oxálico	1,02	3,60
succínico	3,95	5,12

As 23 misturas de ácido succínico e oxálico preparadas foram tituladas em triplicata com 250 μ L de solução 0,5 mol L⁻¹ de NaOH. Os dados de potenciais foram imediatamente registrados após a injeção da base, sendo necessário um tempo de 420 segundos para cada titulação. O volume de NaOH foi selecionado de forma a garantir um excesso deste reagente na zona de dispersão, produzindo um gradiente de concentração de base no sistema. Esta mistura dispersa na câmara foi continuamente bombeada em direção ao detector, produzindo um perfil de variação de potencial registrado com o tempo. Posteriormente o valor do potencial retorna lentamente para o valor inicial, devido a limpeza da câmara de dispersão e da cela potenciométrica, pela solução que contém a mistura dos ácidos.

Na Figura 28 encontram-se as curvas de titulação obtidas para o conjunto de 23 misturas de ácidos fracos, cujas concentrações foram indicadas na Figura 24. As estimativas do desvio padrão médio para as triplicatas das curvas de titulação foi de 4 mV.

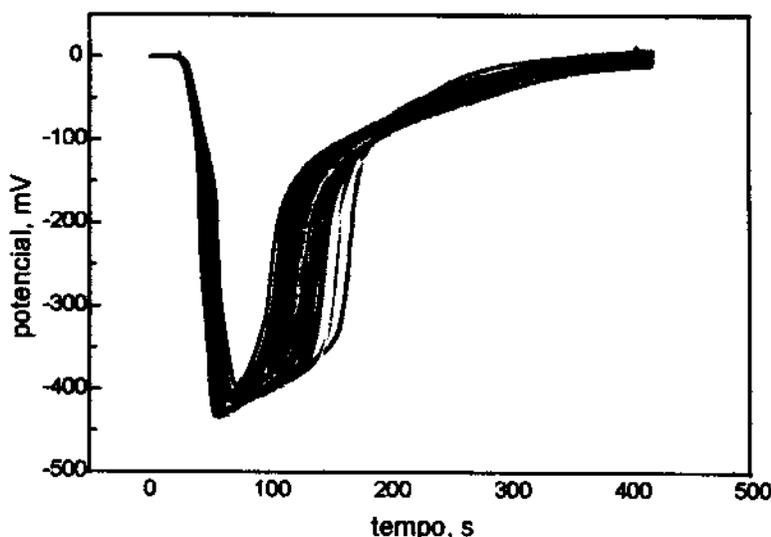


Figura 28. Curvas de titulação das 23 misturas contendo diferentes concentrações de ácido succínico e oxálico

Das 23 misturas, 17 foram usadas para o treinamento da rede neural, e 6 foram utilizadas para verificar a habilidade de previsão do modelo desenvolvido.

Como já descrito na introdução, foram testadas várias estruturas de redes até atingir o menor erro de previsão. Também foram alterados outros parâmetros como, a velocidade de treinamento, o momento, e o número de ciclos durante o período de treinamento, ou de otimização dos pesos em relação aos erros.

Inicialmente foram realizados testes onde os dados de entrada da rede foram normalizados entre 0 e 1. A normalização é necessária devido à função de transferência sigmoideal, utilizada na camada interna da rede neural, cujo intervalo de variação está nesta faixa.

Foram utilizados apenas os 300 últimos pontos das curvas de titulação, pois, até os 100 primeiros pontos apresenta-se apenas um excesso de base na câmara. As variações de potenciais correspondentes as titulações dos ácidos, estão no final de cada uma das curvas. Estes dados foram utilizados para o treinamento de uma Rede Neural de 300 neurônios de entrada, 10 neurônios na camada interna, com equação de transferência sigmoideal, e 1 neurônio na camada de saída, com equação de transferência linear. Foi criado um modelo diferente, para a determinação de cada um dos ácidos presentes na mistura, ou

seja, foi treinada uma rede com uma saída para encontrar a concentração do ácido succínico e uma rede para determinar o ácido oxálico.

Para a correção dos pesos foi utilizado a Retropropagação de Erro. Na fase de previsão verificou-se que o modelo criado com 10000 ciclos durante o treinamento, assim como momento $\mu = 0,95$ e velocidade de treinamento $\eta = 0,01$, forneceu o melhor resultado para as 6 misturas separadas para a previsão. Foram encontrados valores de concentrações com erros relativos médios de 5,0% para os dois ácidos determinados. No entanto, a desvantagem de usar este método de calibração seria a necessidade de um tempo maior, para o processo de treinamento. Este tempo pode variar de 10 a 20 minutos dependendo do número de neurônios de entrada e da camada interna. Quanto maior o número de neurônios na camada interna, maior o tempo gasto no processamento dos dados. Foi utilizado para os cálculos durante o treinamento da rede neural, o pacote computacional: "Neural Network Toolbox for use with Matlab"[50].

Com a finalidade de diminuir o número de dados de entrada, tomando mais rápido o período de treinamento, foi aplicada a análise de componentes principais nos dados de entrada da rede. Através deste método foi possível selecionar as 10 primeiras componentes principais que representam 99,99% da variância dos dados. Na Figura 29 encontra-se o gráfico dos "scores" da primeira componente principal versus a segunda componente principal.

Quando aplica-se a PCA nas misturas, é possível através do gráfico dos "scores" das duas primeiras componentes principais, realizar uma separação destas misturas, em diferentes grupos. Neste caso pode ser verificado que, são formados grupos de acordo com a acidez total de cada uma das misturas. Pode ser notado que as misturas 1 e 23 encontram-se mais afastadas, sendo que a mistura 1 é a mais diluída de todas e a mistura 23 é a mais concentrada.

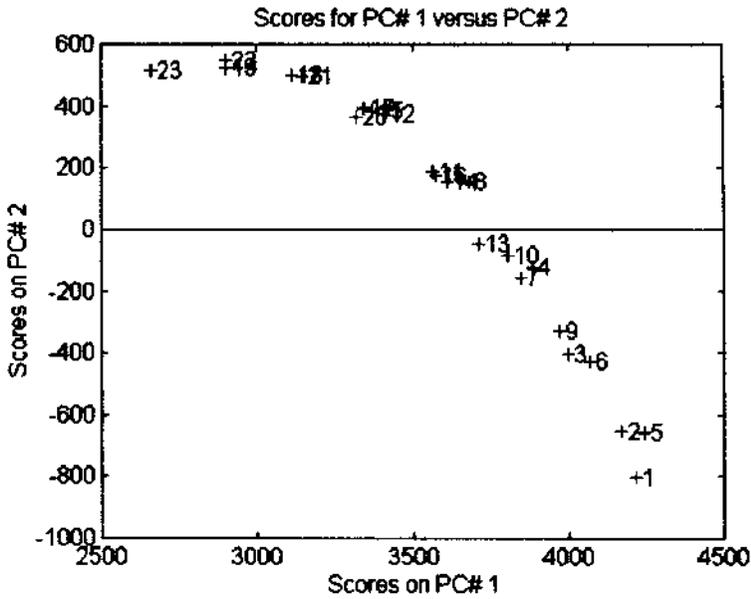


Figura 29 Gráfico dos “scores” da primeira componente principal com relação a segunda componente principal

Também baseado na Figura 29, foram separadas as 6 misturas para o conjunto de previsão. As misturas 2, 6, 10, 13, 18, e 21, mostradas na Figura 24, foram selecionadas para que todas as faixas de concentração fossem representadas.

Foram selecionadas as 10 primeiras componentes principais, das quais, foram normalizadas entre 0 e 1, e utilizadas como dados de entrada da rede. Assim, na camada de entrada foram utilizados 10 neurônios. Esta primeira camada foi seguida de uma camada interna ou escondida, no qual foi aplicada uma função de transferência sigmoideal. Na Figura 30 encontra-se um estudo para a determinação da quantidade de neurônios na camada interna, onde o número de neurônios varia de 1 a 9 e os erros relativos médios para a previsão são calculados.

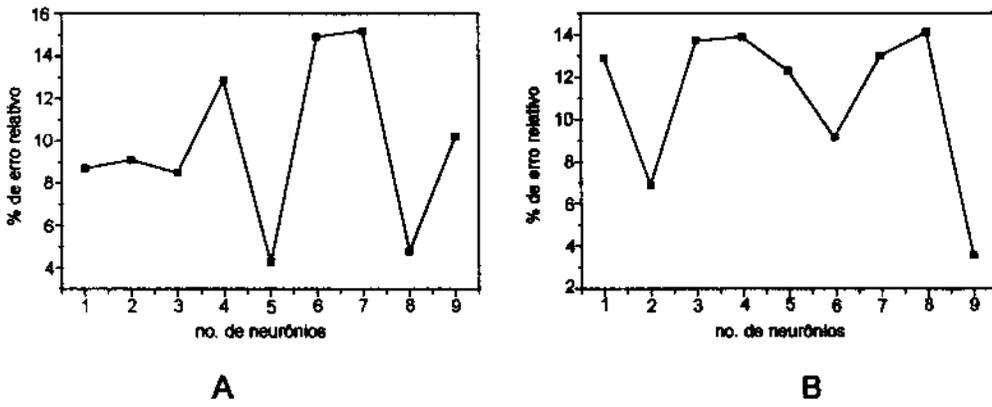


Figura 30 Valores de % erro relativo médio para as 6 amostras, com relação ao número de neurônios na camada interna (A) Valores para o ácido succínico (B)Valores para o ácido oxálico

Como saída da rede foi empregada uma camada com um neurônio, sendo aplicada uma função de transferência linear. O treinamento da rede foi específico para a determinação da concentração de cada um dos ácidos separadamente, no qual os resultados em termos de concentração foram fornecidos pela última camada. A correção dos pesos no período de treinamento foi realizada pela Retropropagação dos Erros. Os erros médios relativos ficaram por volta de 4,3% para o ácido succínico quando utilizado 5 neurônios na camada interna e 3,6% para o ácido oxálico, quando utilizado 9 neurônios na camada interna.

No entanto, ainda em um terceiro método de pré-tratamento de dados, foram testados como dados de entrada da rede, os valores de tempo correspondentes aos potenciais das curvas de titulação. Isso foi realizado invertendo a curva de titulação para a forma tempo x potencial, no qual, foram obtidos valores de tempo medidos em intervalos constantes de potenciais [51]. Desta inversão dos dados resultou uma matriz 23x38, no qual, para as 23 misturas foram selecionados 38 valores de tempo. Foi aplicada a PCA nestas novas variáveis e selecionadas apenas 3 componentes principais que foram suficientes para explicar 99,99% da variância dos dados. Da mesma forma estas componentes foram normalizadas entre 0 e 1 e utilizadas para a criação de um novo modelo de calibração através da rede neural. A estrutura desta nova rede foi distribuída também em três camadas: uma camada de entrada com três

neurônios, uma camada interna com 2 neurônios e uma camada de saída com um neurônio. Verificou-se que a utilização de dois neurônios na camada interna foi que forneceu o melhor resultado.

Os erros relativos médios encontrados foram de 3,3% para o ácido succínico e 1,6% para o ácido oxálico. Os cálculos durante o treinamento foram realizados com mais eficiência e rapidez, através do método de otimização dos pesos por Marquardt de Levenberg. Este método de otimização é indicado quando um número menor de variáveis de entrada são utilizados no processo de cálculo, que neste caso foram empregadas apenas 3 componentes principais. Uma das vantagens apresentadas por este método é que os resultados são obtidos em questão de segundos. Já o método de otimização por Retropropagação dos Erros, levaria aproximadamente 10 minutos para cada um dos vários processos de treinamento, até que fosse alcançado um resultado aproximado.

Os valores de Erro Relativo (ER) e o Erro Relativo Médio (ERM) apresentados na Tabela 4, foram calculados por:

$$ER = ((x_p - x_r) / x_r) \cdot 100$$

$$ERM = \frac{\sqrt{\sum(ER)^2}}{n}$$

onde: $x_p - x_r$ é a diferença entre o valor previsto e o real, e n é o número total de misturas, separadas para a previsão. Pode-se dizer que os erros relativos não são sistemáticos para nenhum dos ácidos estudados.

Nos gráficos da Figura 31 encontram-se as correlações entre os valores reais e os previstos, a partir dos modelos criados para o ácido succínico e para o ácido oxálico. Pode-se verificar que apresentam uma boa correlação para ambos os ácidos determinados.

Tabela 4. Valores de concentrações real e previsto para as misturas de ácidos succínico e oxálico e os respectivos erros relativos, obtidos a partir do modelo desenvolvido através da rede neural.

mistura	Ácido succínico mol L ⁻¹			Ácido Oxálico mol L ⁻¹		
	real	previsto	ER	real	previsto	ER
1	0,00600	0,00593	-1,1	0,00600	0,00582	-2,9
2	0,00700	0,00651	-6,9	0,00600	0,00598	-0,2
3	0,00500	0,00515	3,0	0,00700	0,00682	-2,5
4	0,00800	0,00778	-2,6	0,00700	0,00706	0,9
5	0,00600	0,00576	-3,8	0,00800	0,00782	-2,1
6	0,00600	0,00616	2,3	0,00800	0,00893	-0,7
ERM			3,3			1,6

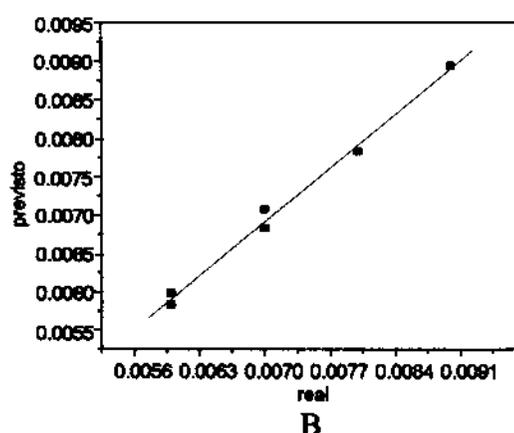
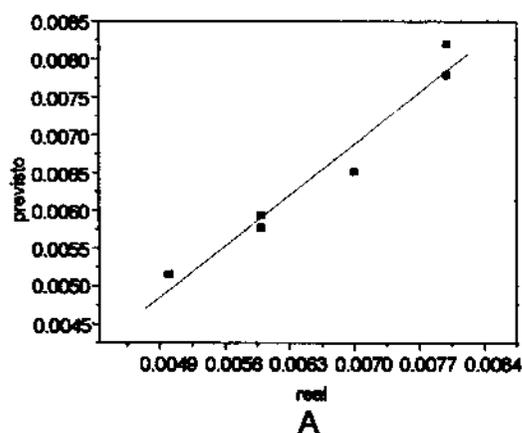


Figura 31. (A) Correlação entre valores reais e previsto para o ácido succínico, 0,97735 (B) ácido oxálico, 0,99622.

O método de calibração multivariada por rede neural forneceu um modelo capaz de prever a concentração das 6 misturas separadas para teste. O processo de treinamento foi satisfatório, a quantidade de ciclos de treinamento foi suficiente para criar um modelo generalizado e não específico para as misturas utilizadas no treinamento. Isto pode ser verificado no processo de previsão quando utilizou-se o modelo obtido, para resolver misturas que não entraram no conjunto de treinamento da rede.

Quando são comparados os valores de erros médios relativos obtidos por tratamento por Redes Neurais, com os valores obtidos pelo PLS, verifica-se que os valores permanecem na mesma faixa. O ácido succínico apresentou um erro

relativo médio por volta de 1,6% e o ácido oxálico erro relativo médio de 2,8%. Na Tabela 5 encontram-se os valores reais e previstos assim como os erros para cada mistura, referente a cada um dos ácidos, quando utilizado o método PLS para os cálculos de concentração. Os dados foram centrados na média e utilizados 14 componentes principais durante os cálculos.

Da mesma forma que nos dados obtidos por modelamento através de redes neurais, os resultados decorrentes do tratamento por PLS, apresentam boas correlações entre os valores reais e os previstos, como mostrado na Figura 32.

Tabela 5. Valores de concentração real e previsto, para as misturas de ácidos succínico e oxálico, e os respectivos erros relativos, obtidos a partir do modelo desenvolvido por PLS.

mistura	Ácido Succínico mol L ⁻¹			Ácido Oxálico mol L ⁻¹		
	real	previsto	ER	real	previsto	ER
1	0,00600	0,00595	-0,6	0,00600	0,00587	-2,1
2	0,00700	0,00711	1,5	0,00600	0,00545	-9,0
3	0,00500	0,00511	2,3	0,00700	0,00702	0,3
4	0,00600	0,00608	1,0	0,00700	0,00706	0,8
5	0,00600	0,00617	2,8	0,00600	0,00782	-2,1
6	0,00600	0,00789	-1,3	0,00600	0,00922	2,4
ERM			1,6			2,8

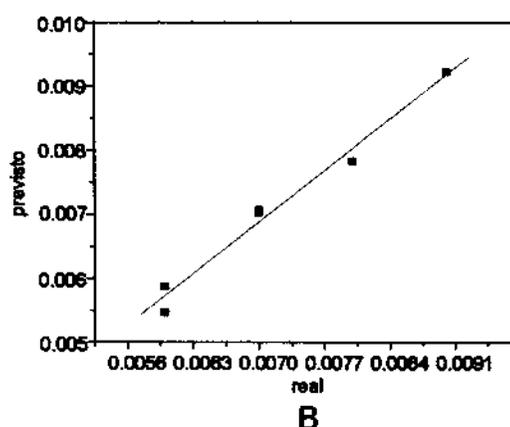
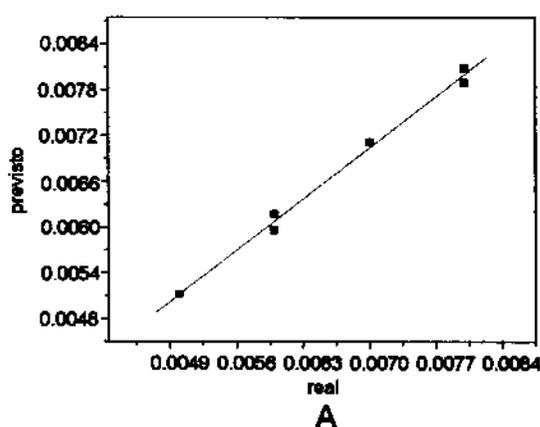


Figura 32. (A) Correlação entre valores reais e previsto para o ácido succínico, 0,99661 (B) ácido oxálico, 0,98962

Pode-se dizer que tanto a calibração por Redes Neurais como a calibração por PLS, forneceram valores de erros razoáveis, se comparados com os valores da literatura, apresentados anteriormente [29, 31] e as baixas concentrações dos ácidos nas misturas. Isto porque o sistema é simples, onde tem-se a titulação de misturas com apenas 2 ácidos fracos, que apresentam valores de pK_a 's distantes.

2.3.1.2. Mistura de ácidos fosfórico, oxálico e tartárico.

Buscando um sistema mais complexo que contenha ácidos fracos com valores de pK_a 's mais próximos, foram preparadas e tituladas 50 misturas de ácidos fosfórico, oxálico e tartárico. Na Figura 33 encontram-se as médias das triplicatas das curvas de titulação, cuja estimativa do desvio padrão médio foi de 3 mV.

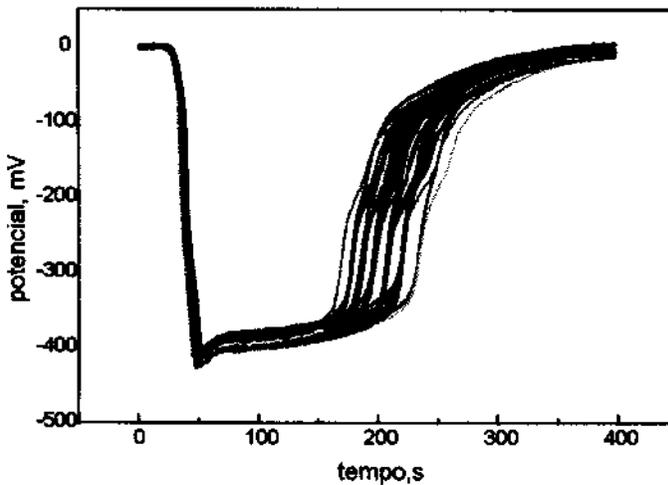


Figura 33. Curvas de titulação de 50 misturas contendo diferentes concentrações de ácido fosfórico, oxálico e tartárico

Na Tabela 6, encontram-se os valores de pK_a 's para os três ácidos, no qual pode-se verificar que a diferença entre alguns deles, são menores que uma unidade. Com isto a tarefa da rede neural, assim como, qualquer outro método quimiométrico aplicado para a criação de um modelo de calibração, torna-se mais difícil.

Tabela 6. Valores de pka 's dos ácidos tartárico, oxálico e fosfórico, utilizados nos experimentos[49]

ácidos utilizados	pka_1	pka_2	pka_3
Tartárico	2,69	3,73	-
Oxálico	1,02	3,60	-
fosfórico	2,16	7,21	12,32

Inicialmente foi realizado o mesmo procedimento anterior, aplicando-se a PCA nos dados de potenciais para simplificar o processo de treinamento, utilizando as componentes principais como dados de entrada. Foram alterados a velocidade de treinamento, momento, e os métodos de otimização de pesos, como a retropropagação dos erros e Marquardt Levenberg. No entanto, não foi possível obter-se bons resultados, mesmo variando número de neurônios e quantidade de ciclos de treinamento.

Objetivando uma melhor separação dos diferentes grupos, com diferentes concentrações das misturas, foi aplicada a segunda derivada em todas as curvas de titulação. Neste caso foi possível com este pré-processamento, verificar a região onde existe uma maior informação a respeito das titulações. Encontrou-se que o intervalo de tempo entre 150 segundos a 340 segundos, totalizando 290 pontos (ou variáveis), era a região onde efetivamente ocorreria a titulação dos ácidos, como mostrado na Figura 34.

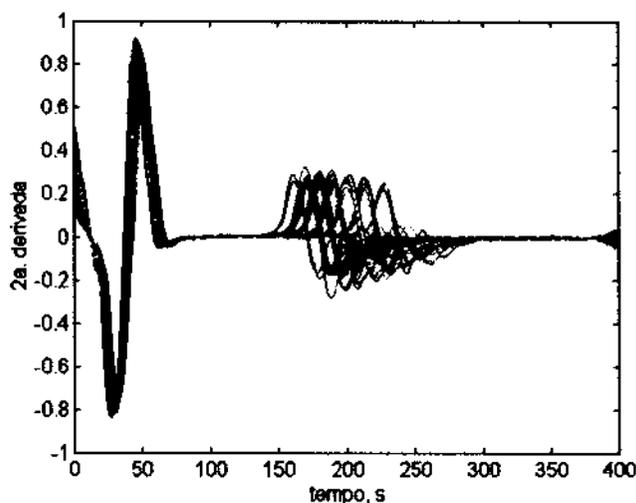


Figura 34. Segunda derivada da matriz de dados contendo ácido fosfórico, oxálico e tartárico

Em seguida aplicou-se novamente a PCA somente na faixa de interesse, e foram selecionadas as 16 primeiras componentes principais. Um gráfico dos "scores" da primeira componente principal contra a segunda componente principal, Figura 35, mostra os diferentes agrupamentos das amostras, o que não acontecia antes de ter sido aplicada a derivada nos dados. As misturas 20 e 23 encontram-se mais afastadas dos outros grupos, isto porque os agrupamentos refletem a acidez total das misturas, e estas duas possuem uma acidez total maior e diferente dos outros grupos. As misturas que apresentam uma acidez total mais baixa estão nos dois quadrantes abaixo, e as de acidez mais alta estão nos dois quadrantes acima. No entanto, verificou-se que os cálculos realizados com ou sem estas misturas, apresentaram os mesmos resultados. Isto porque, a rede neural tem como vantagem minimizar efeitos causados por amostras muito diferentes das demais.

Assim depois de aplicada a segunda derivada e a PCA nos dados de potenciais, foram então separadas 43 misturas, das 50 tituladas, para serem utilizadas na obtenção do modelo de calibração, e 7 foram separadas para a previsão.

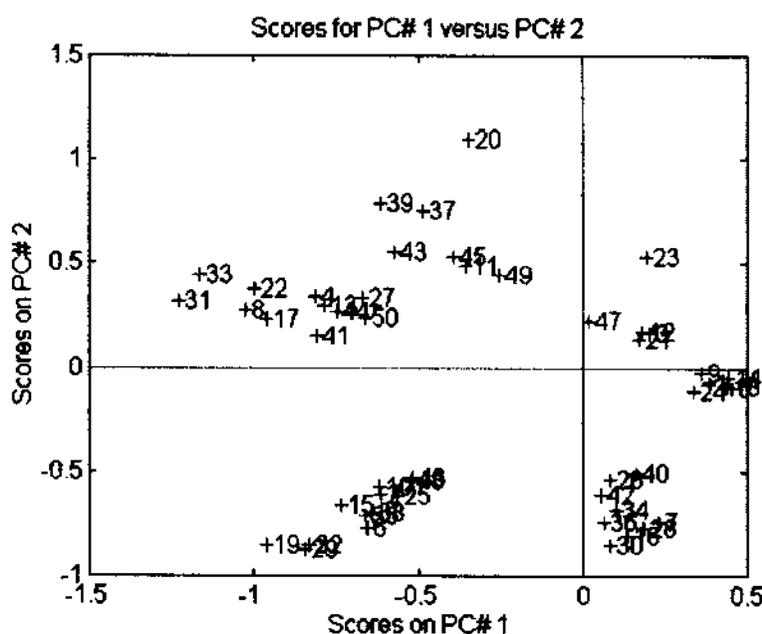


Figura 35. Gráfico dos "scores" da primeira componente principal, com relação a segunda componente principal.

Verificou-se que não foi possível obter bons resultados mesmo variando número de neurônios e diferentes métodos de otimização dos pesos, no qual foram obtidos erros da ordem de 10% a 20% até mesmo para o ácido fosfórico. Isto é devido a complexidade desta mistura, assim foi preciso aplicar um pré-tratamento nos dados, antes de serem utilizados para a criação de um modelo de calibração.

Assim como no conjunto de misturas sintéticas anteriores, as variáveis independentes que antes eram tomados os dados de potenciais a partir das curvas de titulação, também foram invertidas para dados de tempo. Foi obtida uma matriz 50x35, com 50 misturas e 35 valores de tempo distribuídos nas colunas da matriz. Destas, foram separadas 7 misturas para validação e 43 foram mantidas como misturas de treinamento da rede.

Foi aplicada a PCA na matriz de dados e selecionadas as 4 primeiras componentes principais, que explicavam 99,99% da variância dos dados. Estas foram normalizadas entre 0 e 1 e utilizadas como dados de entrada de uma rede com 4 neurônios de entrada, 3 na camada interna e 1 na camada de saída. Na Tabela 7 e 8 encontram-se os valores de erro relativo, obtidos através do modelo criado por rede neural e PLS respectivamente.

Tabela 7. Valores de concentração real e prevista para as misturas de ácidos fosfórico, oxálico e tartárico e os respectivos erros quadráticos médios de previsão, obtidos a partir do modelo desenvolvido por Redes Neurais.

mistura	Ácido fosfórico mol L ⁻¹			Ácido Oxálico mol L ⁻¹			Ácido Tartárico mol L ⁻¹		
	real	previsto	ER	real	previsto	ER	real	previsto	ER
1	0,00803	0,00789	-1,6	0,00803	0,00591	-26,3	0,00600	0,00885	47,6
2	0,00396	0,00415	4,8	0,00803	0,00551	-31,3	0,00396	0,00409	3,4
3	0,00396	0,00418	5,6	0,00996	0,00640	-35,6	0,00396	0,00470	18,9
4	0,00396	0,00427	7,7	0,01010	0,01120	10,9	0,00996	0,01042	4,6
5	0,00600	0,00631	5,2	0,00996	0,00885	-11,1	0,00996	0,00820	-17,6
6	0,00396	0,00392	-1,0	0,00600	0,00659	9,9	0,00996	0,01087	9,2
7	0,00600	0,00610	1,5	0,00996	0,00982	-1,3	0,00396	0,00554	39,9
ERM	3,9			18,1			20,2		

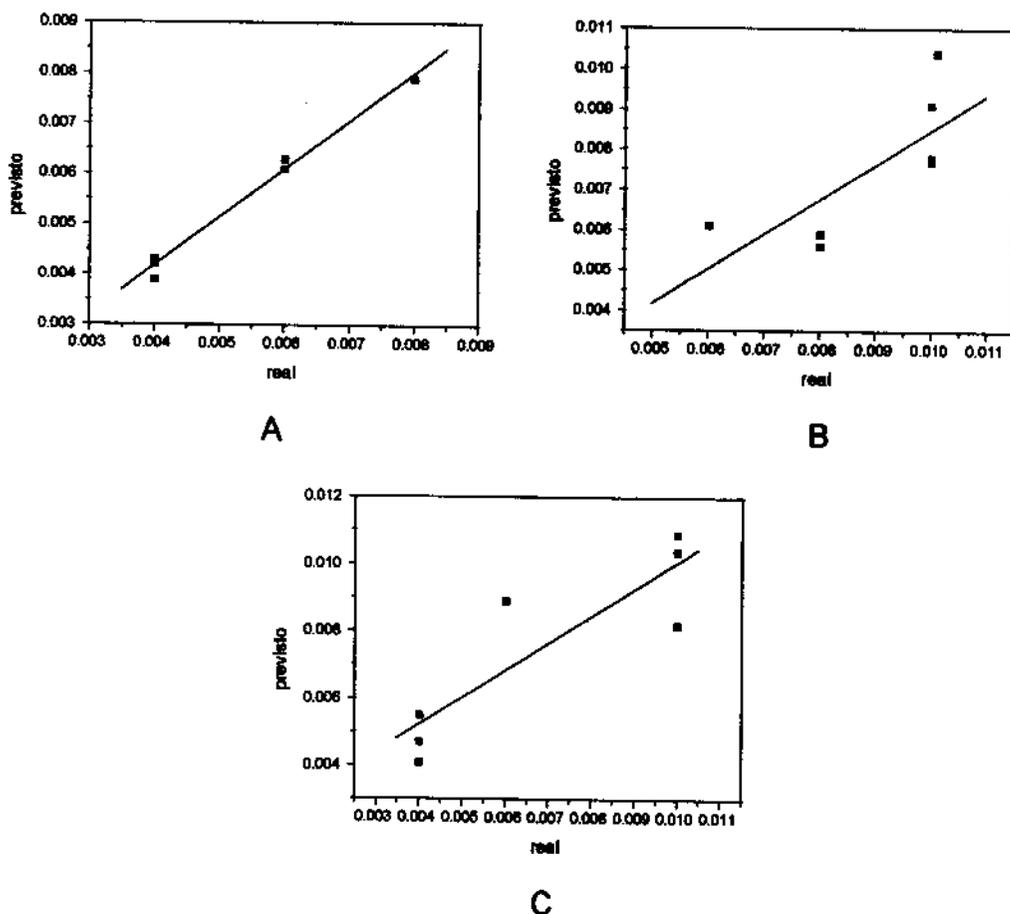


Figura 36. (A) Correlação entre valores reais e previsto para o ácido fosfórico, 0,99462 (B) ácido oxálico, 0,76324 (C) ácido tartárico, 0,88224

Tabela 8. Valores de concentração real e prevista para as misturas de ácidos fosfórico, oxálico e tartárico e os respectivos erros quadráticos médios de previsão, obtidos a partir do modelo desenvolvido por PLS.

mistura	Ácido fosfórico mol L ⁻¹			Ácido Oxálico mol L ⁻¹			Ácido Tartárico mol L ⁻¹		
	real	previsto	ER	real	previsto	ER	real	previsto	ER
1	0,00803	0,00672	-16,2	0,00803	0,00453	-43,4	0,00600	0,00695	15,8
2	0,00396	0,00463	16,9	0,00803	0,00833	3,8	0,00396	0,00665	68,0
3	0,00396	0,00465	17,4	0,00996	0,00931	-6,4	0,00396	0,00660	66,9
4	0,00396	0,00500	26,3	0,01010	0,00788	-21,9	0,00996	0,01102	10,7
5	0,00800	0,00646	7,6	0,00996	0,00897	-9,8	0,00996	0,00934	-6,1
6	0,00396	0,00372	-6,0	0,00600	0,00527	-12,0	0,00996	0,00661	-3,4
7	0,00800	0,00606	1,3	0,00996	0,00728	-26,8	0,00396	0,00724	82,8
ERM	13,1			17,7			36,2		

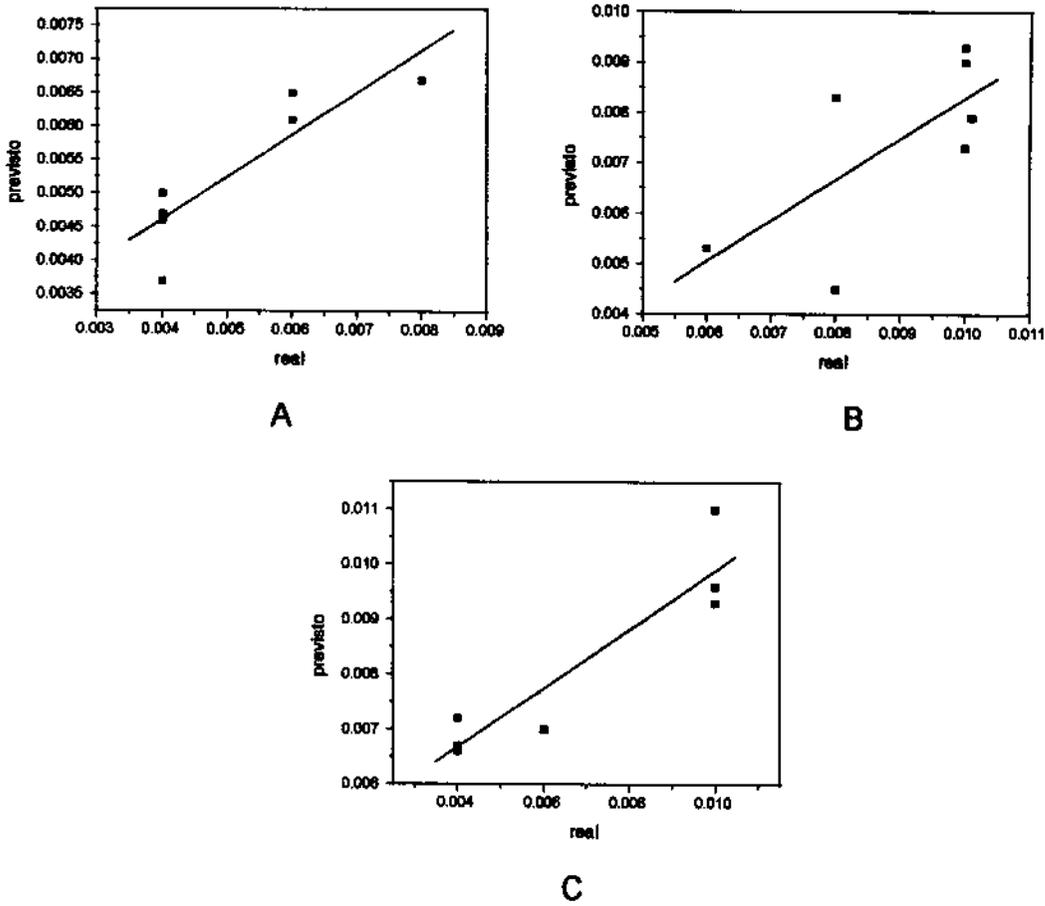


Figura 37. (A) Correlação entre valores reais e previsto para o ácido fosfórico, 0,88576 (B) ácido oxálico, 0,70261 (C) ácido tartárico, 0,92892

Se comparados os erros obtidos por Rede Neural Tabela 7 e Figura 36, com os obtidos por PLS, observados na Tabela 8 e na Figura 37, verifica-se que na média ocorre um sensível aumento do erro a partir do modelo criado por Rede Neural para o modelo criado por PLS. Mas em geral as correlações entre o valor real e o previsto para o ácido fosfórico apresentam o melhor resultado.

Note que a inversão dos dados para tempo, ajuda na diferenciação das curvas de titulação melhorando os resultados. Mas ainda assim, não foi possível boas previsões para todos os ácidos.

2.3.1.3. Misturas de ácidos cítrico e málico

Em um terceiro experimento foram preparadas e tituladas 29 amostras contendo uma mistura de ácido cítrico e málico, com faixa de concentração próxima à encontrada em sucos de laranja. Com isto, pretendeu-se avaliar a possibilidade de empregar posteriormente esta metodologia em amostras reais de suco de laranja. As curvas de titulação médias são mostradas na Figura 38, sendo que neste caso, a estimativa do desvio padrão médio para cada 3 injeções da mesma mistura foi de 3 mV.

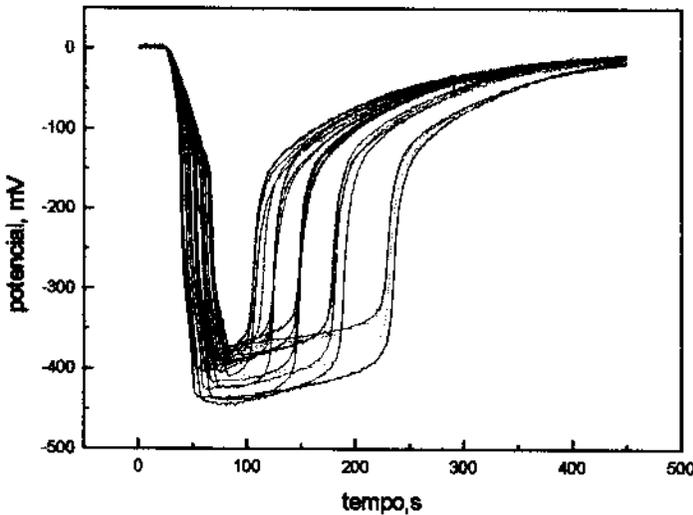


Figura 38. Curvas de titulação das 29 misturas contendo diferentes concentrações de ácido cítrico e málico

Foi inicialmente aplicado a PCA nos dados de potenciais e selecionado as componentes principais como dados de entrada na rede neural. Das 29 misturas tituladas, 22 foram separadas para serem utilizadas no processo de treinamento da rede e 7 foram separadas para a previsão. Como método de otimização dos pesos durante o treinamento foi utilizado a Retropropagação dos Erros. Deste treinamento foram obtidos erros da ordem de 16%.

Buscando melhores resultados, foi realizada a inversão dos dados de potenciais para dados de tempo, como nos experimentos anteriores, obtendo-se

uma matriz de dados de 29x36, no qual foram selecionados 36 valores de tempos para cada uma das 29 misturas. Depois da inversão dos dados aplicou-se a PCA, das quais resultaram em 3 componentes principais necessárias para explicar 99,99% do modelo. Na Figura 39 encontram-se os "scores" da primeira componente principal versus a segunda componente principal.

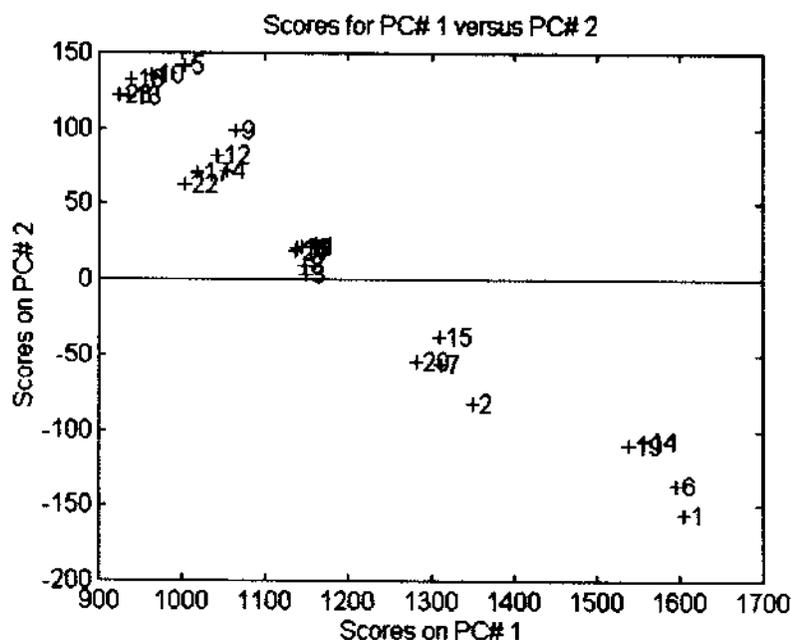
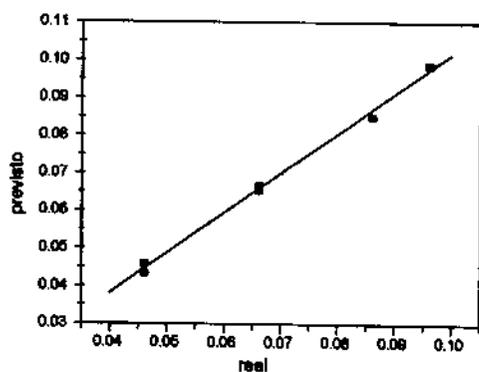


Figura 39. Gráfico dos "scores" da primeira componente principal em relação a segunda componente principal.

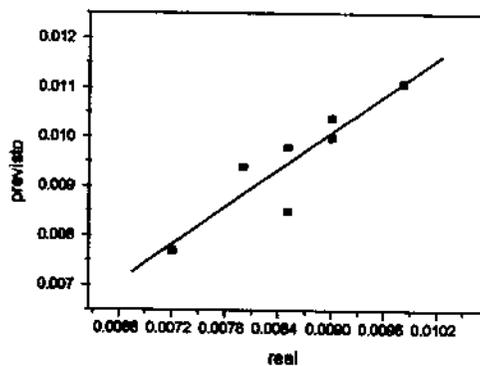
Como pode ser verificado as misturas estão agrupadas em cinco grupos, conforme as concentrações em termos da acidez total. As componentes principais foram normalizadas entre 0 e 1 e utilizadas como entrada na rede neural. A estrutura da Rede Neural otimizada foi de 3 neurônios na camada de entrada, 2 na camada interna e 1 na camada de saída. As funções de transferência foram a sigmoideal e a linear, na camada interna e na última camada, respectivamente. No processo de treinamento foi utilizado como método de otimização dos pesos Marquardt Levenberg. Verificou-se erros relativos médios por volta de 1,8% para o ácido cítrico e de 11,4% para o ácido málico, como mostrado na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de concentração real e prevista para 7 misturas de ácidos cítrico e málico e os respectivos erros obtidos por redes neurais

mistura	Ácido cítrico mol L ⁻¹			Ácido málico mol L ⁻¹		
	real	previsto	ER	real	previsto	ER
1	0,0660	0,0657	-0,5	0,0077	0,0072	7,0
2	0,0460	0,0458	-0,5	0,0094	0,0080	16,3
3	0,0660	0,0666	0,9	0,0098	0,0085	14,9
4	0,0660	0,0688	2,8	0,0085	0,0085	-0,5
5	0,0460	0,0434	-5,6	0,0104	0,0090	16,6
6	0,0660	0,0651	-1,0	0,0100	0,0090	11,3
7	0,0660	0,0653	-1,0	0,0111	0,0098	12,9
ERM	1,8			11,4		



A



B

Figura 40. Valores de correlação para os ácidos cítrico e málico, utilizando a rede neural, como método de calibração (A) Correlação para o ácido cítrico 0,99813 (B) Correlação para o ácido málico 0,90191

Ao verificar a correlação dos dados obtidos com os dados reais, na Figura 40, observa-se que estas são muito boas para o ácido cítrico e razoáveis para o ácido málico. Isto se deve ao fato do ácido málico estar a uma concentração dez vezes mais baixa em relação ao ácido cítrico e também tem seus valores de pka's muito próximos, dificultando sua resolução. Os valores de pka's destes dois ácidos podem ser verificados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de pka's dos ácidos utilizados nos experimentos[49]

ácidos utilizados	pka1	pka2	pka3
Málico	3,10	4,50	-
Cítrico	2,80	4,10	5,30

Foi aplicado em seguida o PLS, utilizando as mesmas 22 misturas utilizadas no treinamento da rede, para a criação do modelo e 7 amostras para a previsão, resultando em erros médios relativos para o ácido cítrico de 12,1% e de 7,7% para o ácido málico. Na Tabela 11 apresentam-se os valores reais, previstos e os erros de cada mistura.

Tabela 11. Valores de concentração real e prevista para as 7 misturas de ácidos cítrico e málico e os respectivos erros obtidos por PLS.

mistura	Ácido cítrico mol L ⁻¹			Ácido málico mol L ⁻¹		
	real	previsto	ER	real	previsto	ER
1	0,0660	0,0765	15,9	0,0077	0,0057	-20,3
2	0,0460	0,0576	25,1	0,0094	0,0079	-1,7
3	0,0660	0,0699	5,8	0,0098	0,0087	2,7
4	0,0660	0,0662	0,2	0,0085	0,0096	13,3
5	0,0460	0,0525	14,0	0,0104	0,0092	2,5
6	0,0660	0,0811	-5,7	0,0100	0,0094	4,9
7	0,0660	0,0779	18,0	0,0111	0,0090	-8,5
ERM	12,1			7,7		

As correlações encontradas entre os valores reais e previsto para as 7 misturas de previsão utilizando o PLS, apresentam-se mais baixas, mas bastante próximas das encontradas anteriormente. Os valores são:

- Correlação entre valores reais e previsto para o ácidos cítrico, 0,95391
- Correlação entre valores reais e previsto para o ácido málico, 0,80316

Assim pode-se dizer que, como no caso anterior, que se trata de misturas de ácidos fracos, que envolvem valores de pka's próximos, tanto a Rede Neural

como o PLS, produzem resultados não muito satisfatórios. E o ácido fosfórico no sistema anterior assim como o ácido cítrico no atual conjunto, que possuem valores de pka's mais distantes, fornecem os melhores resultados.

2.3.1.4. Determinação da concentração de ácido cítrico e málico em amostras de suco de laranja.

Neste experimento foram preparadas e tituladas 64 misturas contendo ácido cítrico, málico e clorídrico. As faixas de concentrações escolhidas para o ácido cítrico e málico foram próximas às encontradas em amostras de suco de laranja, de forma à possibilitar o emprego destas misturas, como conjunto de calibração de amostras reais de suco. A concentração do ácido cítrico pode variar entre 50 - 90% da acidez total do suco de laranja [52], dependendo da época da colheita. Já o ácido málico é encontrado a uma faixa de concentração de 5 à 10 vezes menor que o cítrico. Outros ácidos orgânicos também estão presentes, como o ácido oxálico, quinínico, tartárico, ascórbico, fumárico, succínico, propiônico. Na Tabela 12 encontram-se os valores dos pka's dos ácidos cítrico e málico.

Foram tituladas 17 amostras de suco de laranja, que inicialmente sofreram um pré-processamento, conforme o procedimento descrito anteriormente. Este procedimento foi realizado, para separar os ácidos orgânicos presentes no suco. Duas amostras sintéticas, com concentrações de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em ácido cítrico e $2,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em ácido málico, também sofreram o mesmo pré-tratamento das amostras de suco de laranja.

O pré-processamento realizado consistiu em precipitar os ácidos orgânicos com BaCl₂ em meio alcoólico e posteriormente dissolvê-los com água e adicionar um excesso de ácido clorídrico conhecido. Este último foi utilizado para protonar os ácidos cítrico e málico, precipitados na forma de citrato de bário e malato de bário, que foram separados do suco de laranja.

Em todas as misturas sintéticas preparadas para serem utilizadas no treinamento da Rede Neural, foi adicionado o ácido clorídrico, em faixas de

concentrações próximas dos valores adicionados em excesso nas amostras de suco. Isto foi necessário, porque o ácido clorídrico quando adicionado em excesso nas amostras, para protonar os ácidos precipitados, passou a ser uma componente a mais a ser determinada, sendo somado na acidez total do sistema titulado.

Na Figura 41, são mostradas as curvas de titulação, sendo que a estimativa do desvio padrão médio para cada 2 injeções, foi de 3 mV.

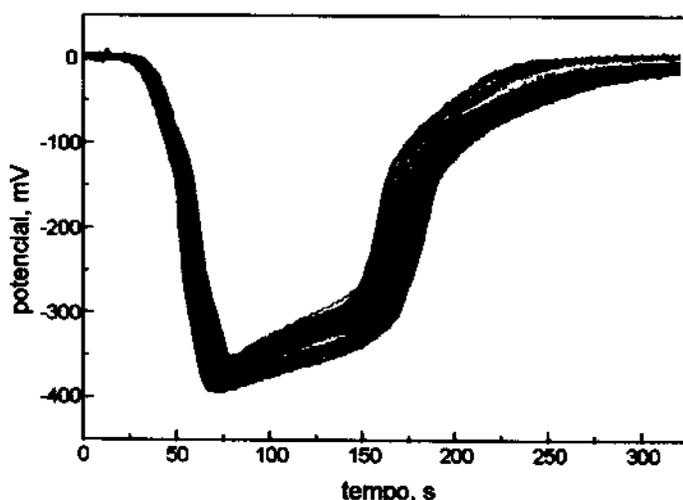


Figura 41. Curvas de titulação das 64 misturas contendo diferentes concentrações de ácido cítrico, málico e clorídrico, mais as 17 amostras de suco de laranja e 2 amostras sintéticas preparadas, através do mesmo procedimento utilizado nas amostras de suco.

Foi necessário a aplicação da segunda derivada nas misturas ácidas e nas amostras de suco para uma melhor separação das curvas de titulação, devido à complexidade do sistema. Foram selecionados os pontos entre 130 e 250 segundos, que correspondem à região onde ocorre a titulação dos ácidos, como mostrado na Figura 42.

Também foi aplicado a PCA, resultando num total de 21 componentes principais necessárias para explicar 99,99% da variância dos dados. No entanto, ao utilizar estas componentes principais como valores de entrada na Rede Neural, não foi possível uma boa correlação entre o valor real e o previsto.

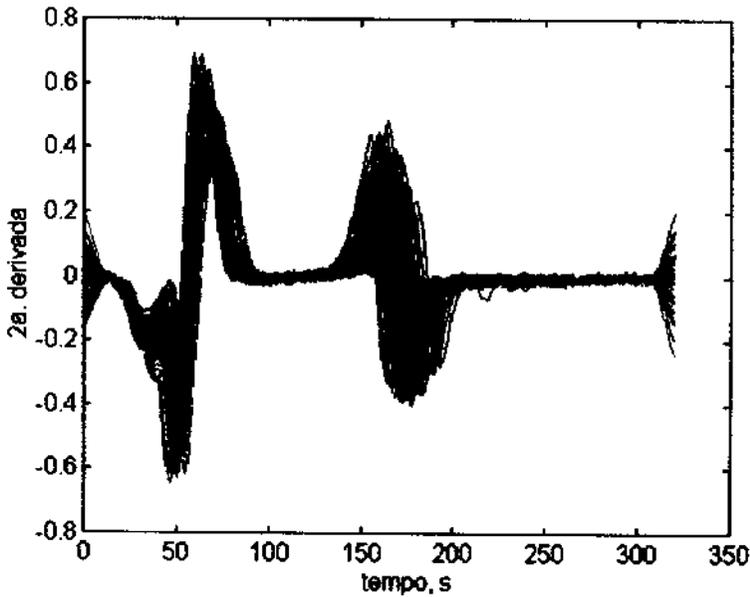


Figura 42. Segunda derivada da matriz de dados contendo as misturas sintéticas e as amostras de suco

O gráfico dos "scores" da primeira componente principal em função da segunda componente principal, Figura 43, mostra que as misturas de calibração, estão distribuídas ao redor das amostras de suco, que estão agrupadas na região central da figura. Duas amostras sintéticas preparadas da mesma forma que as amostras de suco, também encontram-se nesta mesma região central, ou seja, mais próximas da região onde se encontram as amostras de suco. Isto se deve ao fato de que, assim como nos gráficos dos "scores" anteriores, as amostras são agrupadas obedecendo a acidez total de cada uma delas. Nas amostras de suco e nas duas amostras sintéticas, precipitadas com BaCl_2 , foram adicionados um mesmo excesso de HCl . Isto acaba diferenciando-as do restante das misturas sintéticas, que em termos de acidez total apresentam-se diferentes.

Para que todas as misturas sintéticas empregadas na calibração, permanecessem na mesma região central, junto com as amostras de suco, a acidez total de todas deveriam ser a mesma, ou pelo menos muito próximas.

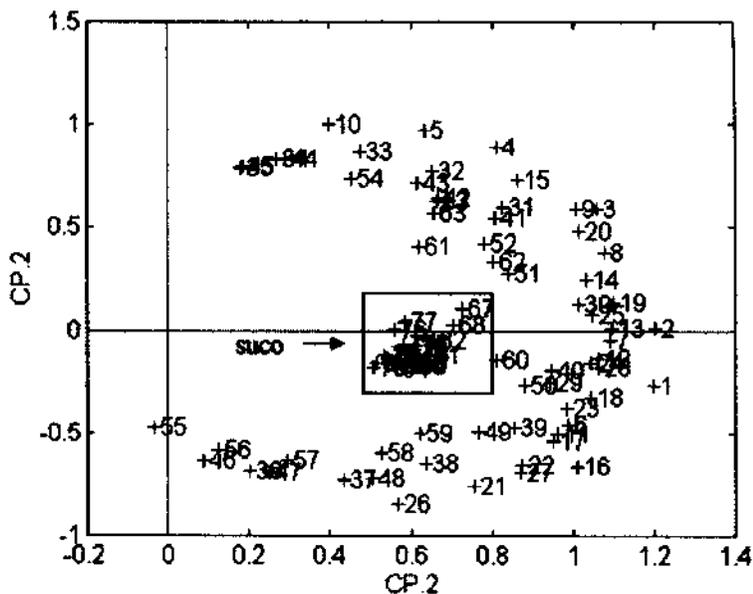


Figura 43 Gráfico dos "scores" da primeira componente principal com relação a segunda componente principal.

Foi utilizado como dados de entrada as 21 primeiras componentes principais normalizadas entre 0 e 1 e variando o número de neurônios na camada interna, número de ciclos e processo de otimização dos pesos. No entanto, nenhum dos resultados apresentaram erros de previsão satisfatórios. Assim optou-se por realizar a inversão dos dados de potenciais, obtendo-se os correspondentes dados de tempo.

Depois de realizada a inversão dos dados de potenciais, para dados de tempo e aplicada novamente a PCA, foram selecionadas 4 componentes principais. Estas foram utilizadas em uma rede com quatro neurônios de entrada, 3 neurônios na camada interna com equação de transferência sigmoideal e 1 neurônio na camada de saída com equação de transferência linear. A Rede Neural forneceu um modelo capaz de prever a concentração de 7 misturas ácidas separadas para previsão, mais uma amostra sintética preparada da mesma forma que o suco de laranja, de forma satisfatória. Como pode ser verificado nos gráficos, das Figuras 44, 45 e 46 as misturas ácidas e a amostra sintética (8 primeiros pontos), apresentam uma boa correspondência com o

valor real. Já as amostras de sucos (os últimos 17 pontos seguintes) apresentam-se mais distantes do valor real.

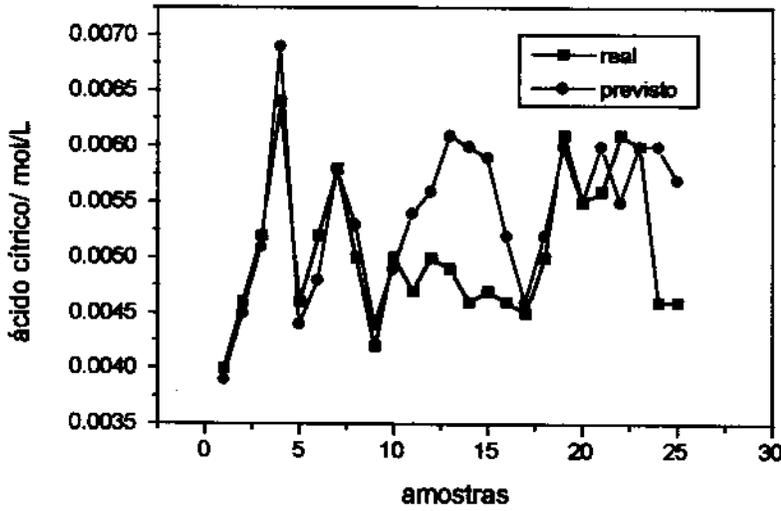


Figura 44 Representação dos valores previsto e o real para o ácido cítrico das 8 misturas sintéticas e as 17 amostras de suco

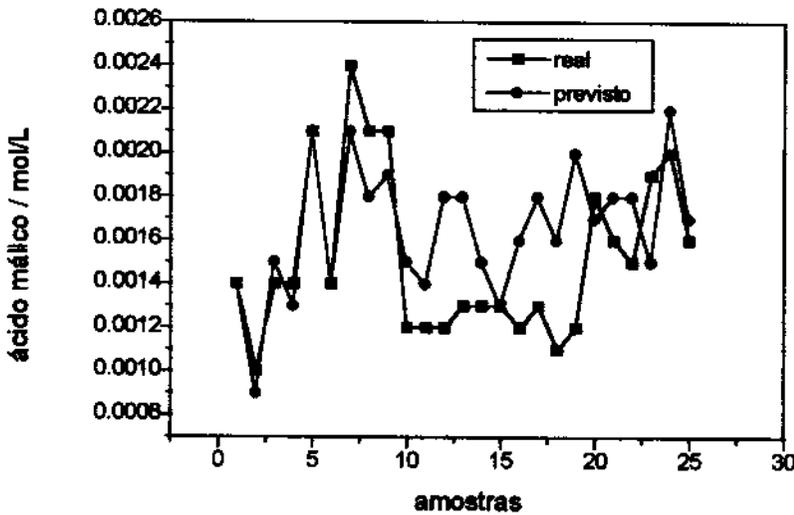


Figura 45 Representação dos valores previsto e o real para o ácido málico das 8 misturas sintéticas e as 17 amostras de suco

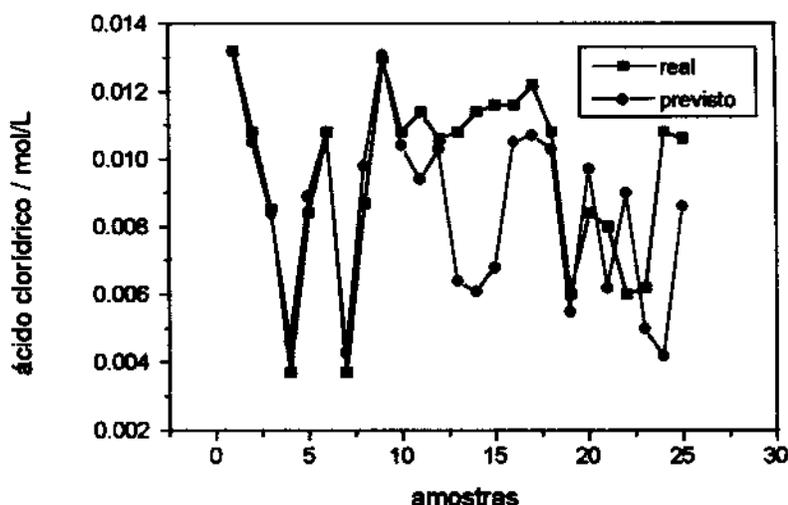
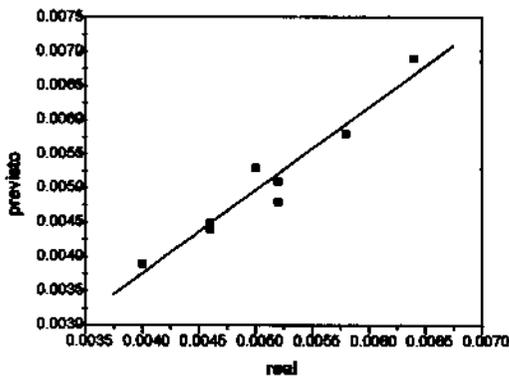


Figura 46 Representação dos valores previsto e o real para o ácido clorídrico das 8 misturas sintéticas e as 17 amostras de suco

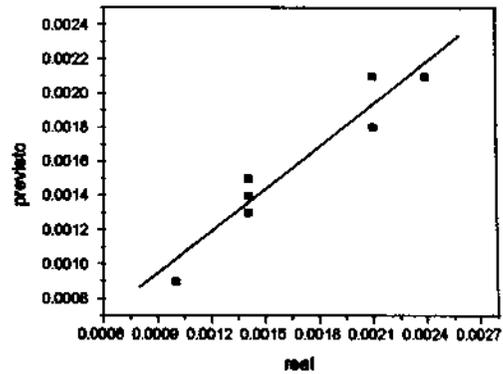
Verificando-se os valores de correlação, mostrados na Tabela 12, e na Figura 47, constata-se que estes valores são bastante satisfatórios. Os valores de erros relativos médios foram de 4,4% para o ácido cítrico, 7,1% para o málico e 8,2% para o clorídrico.

Tabela 12. Valores de concentração real e previsto, a partir do tratamento de dados por rede neural, para as 7 misturas sintéticas de ácidos cítrico, málico e clorídrico e uma amostra sintética precipitada da mesma forma que o suco de laranja.

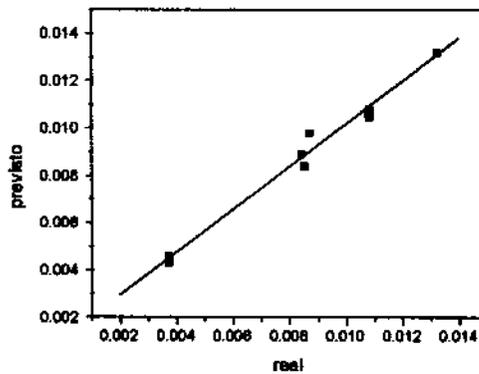
mistura	Ácido cítrico mol L ⁻¹			Ácido málico mol L ⁻¹			Ácido clorídrico mol L ⁻¹		
	real	previsto	ER	real	previsto	ER	real	previsto	ER
1	0,00403	0,00366	-4,0	0,00137	0,00142	4,2	0,01321	0,01318	-0,2
2	0,00463	0,00447	-3,2	0,00099	0,00093	-6,7	0,01085	0,01045	-3,6
3	0,00524	0,00512	-2,1	0,00137	0,00149	8,9	0,00849	0,00844	-0,5
4	0,00644	0,00669	7,1	0,00137	0,00131	-4,1	0,00368	0,00461	25,2
5	0,00463	0,00437	-5,5	0,00210	0,00207	-1,1	0,00640	0,00691	6,1
6	0,00524	0,00478	-8,7	0,00137	0,00137	0,8	0,01085	0,01083	-0,1
7	0,00664	0,00684	0,1	0,00242	0,00205	-14,9	0,00368	0,00431	17,1
sintética1	0,00604	0,00525	4,3	0,00210	0,00175	-16,4	0,00669	0,00619	12,7
ERM	4,4			7,1			8,2		



A



B



C

Figura 47. Correlação para os ácidos nas misturas sintéticas (A) ácido cítrico 0,96751 (B) ácido málico 0,95926 (C) ácido clorídrico 0,99162

Os erros para os ácidos apresentam valores razoáveis, se considerada a complexidade da resolução das curvas de titulação e a própria concentração dos ácidos em solução. Para o ácido clorídrico por exemplo, as duas soluções com concentrações mais baixas, apresentaram valores de erros mais altos.

Na Tabela 13 e 14 foram tomados como valores reais, os resultados a partir de análise por CLAE. Os 10 primeiros valores foram fornecidos pela Citrossuco (na Tabela 13 e 14 citros), dos quais foram obtidos nas análises de rotina da empresa, e os 7 seguintes foram valores obtidos em nossos laboratórios (na Tabela 13 e 14 UNIC). Os erros relativos médios, por rede neural foram de 11,9% para o ácido cítrico, 25,2% para o málico e 22,1% para o clorídrico. E por PLS foram de 6,9% para o ácido cítrico, 19,7% para o málico e 7,6% para o clorídrico.

Tabela 13. Valores de concentração real e prevista para as amostras de suco de laranja em termos de ácido cítrico, málico e clorídrico e os respectivos erros relativos, a partir de tratamento de dados por rede neural.

amostra	Ácido cítrico mol L ⁻¹			Ácido málico mol L ⁻¹			Ácido clorídrico mol L ⁻¹		
	real	previsto	ER	real	previsto	ER	real	previsto	ER
citros	0,00422	0,00437	3,7	0,00119	0,00169	59,2	0,01296	0,00801	1,2
citros	0,00495	0,00494	-0,1	0,00119	0,00152	26,0	0,01077	0,00864	-3,1
citros	0,00474	0,00544	14,9	0,00119	0,00143	20,8	0,01140	0,01053	-17,5
citros	0,00465	0,00555	12,2	0,00127	0,00179	41,1	0,01061	0,01229	-3,2
citros	0,00489	0,00609	24,5	0,00127	0,00183	44,8	0,01079	0,00846	-40,4
citros	0,00463	0,00600	29,7	0,00134	0,00151	13,2	0,01143	0,00676	-46,8
citros	0,00466	0,00592	26,5	0,00119	0,00129	9,11	0,01158	0,00652	-41,0
citros	0,00463	0,00517	11,6	0,00127	0,00158	24,6	0,01157	0,00849	-8,9
citros	0,00453	0,00463	2,3	0,00112	0,00175	56,4	0,01217	0,01145	-12,2
citros	0,00465	0,00520	5,1	0,00119	0,00157	32,5	0,01077	0,00842	-4,1
UNIC	0,00812	0,00803	-1,4	0,00183	0,00196	7,5	0,00598	0,00762	-8,4
UNIC	0,00548	0,00552	0,8	0,00157	0,00167	6,7	0,00842	0,00974	15,6
UNIC	0,00565	0,00595	5,3	0,00153	0,00182	19,2	0,00799	0,00794	-22,4
UNIC	0,00809	0,00554	-8,9	0,00188	0,00183	-2,2	0,00597	0,00666	51,2
UNIC	0,00585	0,00585	0,1	0,00196	0,00152	-22,0	0,00623	0,00666	-19,1
UNIC	0,00463	0,00603	30,2	0,00163	0,00217	33,4	0,01065	0,00689	-61,2
UNIC	0,00459	0,00573	24,9	0,00180	0,00167	-6,8	0,01063	0,01076	-19,3
ERM	11,9			25,2			22,1		

Tabela 14. Valores de concentração real e prevista para as misturas sintéticas de ácidos cítrico, málico e clorídrico e os respectivos erros quadráticos médios de previsão, obtidos a partir do modelo desenvolvido por PLS.

mistura	Ácido cítrico mol L ⁻¹			Ácido málico mol L ⁻¹			Ácido clorídrico mol L ⁻¹		
	real	previsto	ER	real	previsto	ER	real	previsto	ER
1	0,00403	0,00375	-8,9	0,00137	0,00166	21,3	0,01321	0,012918	-2,2
2	0,00463	0,00426	-7,8	0,00099	0,00126	26,4	0,01065	0,010962	1,0
3	0,00524	0,00506	-3,2	0,00137	0,00140	2,4	0,00849	0,009009	6,1
4	0,00644	0,00609	-5,3	0,00137	0,00189	36,6	0,00368	0,003788	2,9
5	0,00463	0,00505	9,1	0,00210	0,00180	-23,4	0,00840	0,008014	-4,5
6	0,00524	0,00494	-5,5	0,00137	0,00126	-7,6	0,01065	0,011891	9,6
7	0,00584	0,00567	-2,8	0,00242	0,00210	-13,0	0,00368	0,004625	25,6
sintética1	0,00504	0,00576	14,3	0,00210	0,00162	-22,7	0,00869	0,00791	-8,9
ERM	6,9			19,7			7,6		

Se forem comparados os resultados obtidos por Rede Neural, com os obtidos por PLS, verifica-se que os valores de erros relativos passam a ser um pouco maiores principalmente para o ácido málico, como observado nas Tabelas 14 e 15. Confirma-se assim a dificuldade em fornecer uma boa resolução, quando os dados apresentam valores de pka's muito próximos.

As correlações encontradas entre os valores reais e previsto para as 7 misturas e uma amostra sintética, separadas para a previsão, no PLS, apresentam-se mas baixas das encontradas por Rede Neural. Os valores são:

- Correlação entre valores reais e previsto para o ácido cítrico, 0,8507
- Correlação entre valores reais e previsto para o ácido málico, 0,61608
- Correlação entre valores reais e previsto para o ácido clorídrico, 0,98079

Tabela 15. Valores de concentração real e prevista para as amostras de suco e os respectivos erros quadráticos médios de previsão, obtidos a partir do modelo desenvolvido por PLS.

amostra	Ácido cítrico mol L ⁻¹			Ácido málico mol L ⁻¹			Ácido clorídrico mol L ⁻¹		
	real	previsto	ER	real	previsto	ER	real	previsto	ER
citros	0,00422	0,00457	8,3	0,00119	0,00093	-21,7	0,01296	0,01291	-0,3
citros	0,00495	0,00499	0,8	0,00119	0,00135	13,8	0,01077	0,01054	-2,1
citros	0,00474	0,00556	17,4	0,00119	0,00190	60,0	0,01140	0,00702	-38,3
citros	0,00495	0,00559	13,0	0,00127	0,00238	87,8	0,01061	0,00680	-35,8
citros	0,00489	0,00628	28,5	0,00127	0,00263	107,2	0,01079	0,00388	-64,0
citros	0,00463	0,00612	32,3	0,00134	0,00232	73,4	0,01143	0,00421	-63,1
citros	0,00468	0,00610	30,4	0,00119	0,00218	83,8	0,01158	0,00446	-61,4
citros	0,00463	0,00518	11,9	0,00127	0,00132	4,6	0,01157	0,01062	-8,1
citros	0,00453	0,00493	8,8	0,00112	0,00115	3,1	0,01217	0,01149	-5,5
citros	0,00495	0,00534	7,8	0,00119	0,00170	43,5	0,01077	0,00921	-14,4
UNIC	0,00612	0,00633	3,5	0,00183	0,00248	35,7	0,00598	0,00384	-35,6
UNIC	0,00548	0,00608	11,0	0,00157	0,00182	16,4	0,00842	0,00626	-25,5
UNIC	0,00585	0,00683	21,0	0,00153	0,00160	5,0	0,00799	0,00461	-42,2
UNIC	0,00609	0,00617	1,4	0,00188	0,00199	6,1	0,00597	0,00652	9,2
UNIC	0,00595	0,00637	7,1	0,00196	0,00193	-1,2	0,00623	0,00493	-20,8
UNIC	0,00463	0,00707	52,7	0,00163	0,00218	34,0	0,01085	0,00248	-77,1
UNIC	0,00459	0,00635	38,4	0,00180	0,00149	-16,7	0,01083	0,00628	-40,8
ERM	17,3			36,1			32,0		

Com o objetivo de esclarecer o fato de não ter sido possível obter bons resultados para as amostras de suco de laranja, foram preparadas algumas amostras de suco, da mesma forma que aquelas tituladas no sistema FIA. Inicialmente estas amostras foram precipitadas com BaCl_2 , diluídas, e então adicionado um excesso de ácido clorídrico. Em seguida foram filtradas e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para avaliar se na mistura havia além dos ácidos cítrico e málico, outros ácidos presentes. Na Figura 48 tem-se um cromatograma de uma das amostras analisadas.

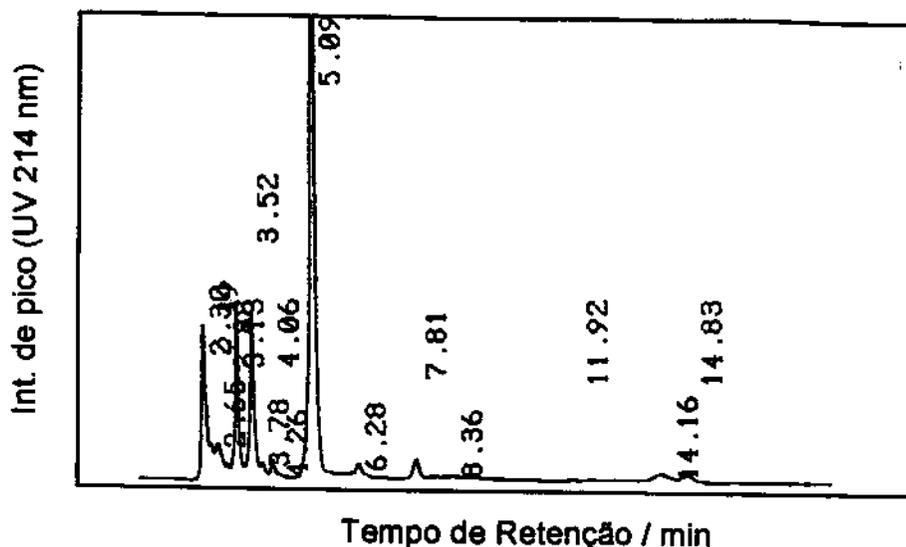


Figura 48. Picos cromatográficos de uma das amostras de suco analisadas, no qual inicialmente foi precipitada com BaCl_2 em meio alcoólico, dissolvida em água deionizada na presença de HCl e filtrada. Posteriormente foi injetada em um CLAE, com uma coluna 25cm x 4,6mm; fase móvel o tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} a pH 2,4; velocidade do fluxo 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; detector UV a 214nm.

O primeiro pico mais intenso que aparece, com tempo de retenção (TR) igual a 2,30, é de um ácido desconhecido, o segundo, TR 3,13, também se desconhece. O terceiro pico é do ácido málico, TR 3,52, e o último pico é o do ácido cítrico, TR 5,09.

Nas Figuras 49 e 50 encontram-se dois cromatogramas, obtidos de amostras de suco de laranja sem a precipitação com BaCl_2 . O primeiro cromatograma é resultante da literatura [53], e o segundo é resultante de

análises obtidas em nossos laboratórios. Pode-se verificar no cromatograma da Figura 49, muitos outros picos, dos quais o pico de nº1 corresponde ao ácido oxálico, nº.2 ao ácido quinínico, nº 3 ácido tartárico, nº 4 ácido málico, nº 5 ácido isocítrico, nº 6 ácido desconhecido, nº 7 ácido ascórbico, nº 8 ácido cítrico, nº 9 ácido fumárico e nº10 ácido succínico.

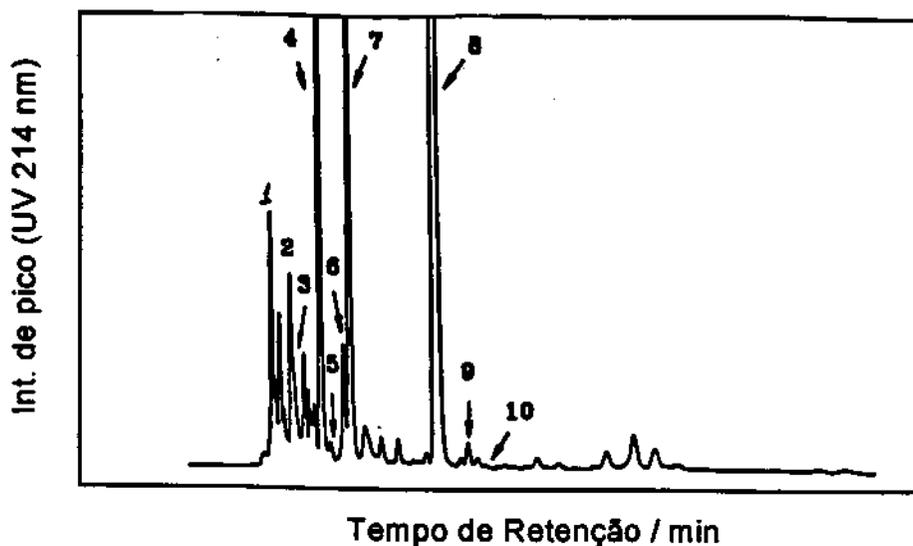


Figura 49. Picos cromatográficos de uma amostras de suco da literatura, injetada em um CLAE, com uma coluna 25cm x 4,6mm; fase móvel o tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ a pH 2,8; velocidade do fluxo 0,7 mL.min⁻¹; detector UV a 214nm.

Na Figura 50, onde encontra-se o cromatograma de uma das amostras de suco analisadas em nosso laboratório, verifica-se que não foi possível uma boa resolução de todos os ácidos presentes no suco. No entanto, pode-se verificar a presença do ácido málico no TR 4,10, e o seu isômero, ácido fumárico no TR 6,66, o ácido ascórbico que não foi nosso objetivo analisar, mas que provavelmente aparece no TR 4,44, e o ácido cítrico que aparece no TR 6,04. Verifica-se experimentalmente que o ácido málico realmente encontra-se em uma faixa de concentração bastante baixa nas amostras de suco com que trabalhamos, em relação ao ácido cítrico, dificultando assim sua resolução.

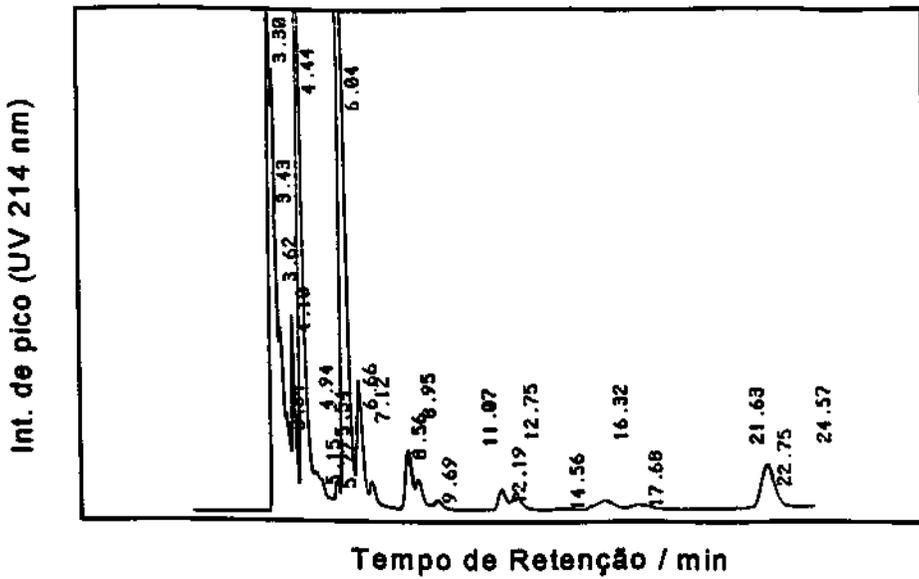


Figura 50. Picos cromatográficos de uma das amostras de suco analisadas, no qual foi centrifugada e injetada em um CLAE, com uma coluna 25cm x 4,6mm; fase móvel o tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ a pH 2,4; velocidade do fluxo 1,0 mL.min⁻¹; detector UV a 214nm.

Desta forma pode-se atribuir os erros nos resultados, à presença de algum destes ácidos nas amostras precipitadas, ocorrendo uma modificação do perfil das curvas de titulação. Estes ácidos causam uma maior interferência nos resultados do ácido málico, porque estes aparecem em uma faixa de concentração bem próxima da faixa de concentração do ácido málico. O ácido clorídrico, como pode ser observado, apresenta valores de erros sistematicamente negativos. Provavelmente isso é devido também a essa interferência, pois, o valor interpretado como excesso para o ácido clorídrico, pode ter sido utilizado para protonar os demais ácidos presentes na amostra, que não foram considerados na acidez total.

Conclusão

Pode-se dizer que a preparação do filme de óxido de cromo sobre a superfície do eletrodo, é uma das fases mais importantes para a obtenção de um eletrodo estável, reprodutível e com sensibilidade adequada para ser utilizado nas medidas de pH. Este filme deve apresentar uma superfície regular quanto a sua propriedade física, podendo-se assim garantir uma troca dinâmica das espécies envolvidas no processo de medida, durante a passagem do fluxo.

O modelo de cela de fluxo com o eletrodo de referência acoplado ao eletrodo indicador planar, forneceu uma melhor relação sinal/ruído e portanto, mais apropriado para a realização das medidas.

Com relação às titulações potenciométricas de misturas de ácidos fracos, observou-se que o primeiro conjunto de amostras (ácido succínico e oxálico) apresentou as melhores previsões e para sistemas mais complexos, como misturas de três ácidos fracos com valores de pK_a 's muito próximos, fica muito mais difícil um modelamento.

Os resultados encontrados para as amostras de suco, quanto à determinação do ácido cítrico, mostraram-se melhores que para o ácido málico e ácido clorídrico. Isto se deve provavelmente à presença de outros ácidos na amostra que devem estar interferindo na criação do modelo. Esta interferência é maior na determinação do ácido málico, cuja concentração é muito menor que a do ácido cítrico. Isto pode ser confirmado pelo fato de apenas as misturas sintéticas, que não apresentam outros ácidos na mistura, terem apresentado bons resultados.

Quanto à calibração por rede neural, para as amostras de suco, também mostrou-se superior ao PLS, como pode ser verificado pelos resultados de correlação entre o valor de referência e o valor encontrado pela rede neural.

Como conclusão final deste trabalho, foi verificado o potencial que se apresenta na junção de métodos de calibração multivariada não linear, como as redes neurais, com sistemas automáticos baseados na análise por injeção em fluxo. Talvez uma das principais dificuldades apresentadas na utilização desses

métodos quimiométricos, seria a necessidade de realização de um grande número de titulações para a construção do modelo. Esta dificuldade foi prontamente contornada pela realização de titulações automáticas, de maneira rápida e com pouco gasto de reagentes.

Referência Bibliográfica

1. Ruzicka, J. e Hansen, E., H., *Flow Injection Analysis*, ed. 2^a, 62, John Wiley & Sons (1988)
2. Ives, D. J. G., and Janz, G. J., *Oxide, Oxygen, and Sulfide Electrodes*, ed. 2^a, Academic Press - N. Y. and London (1969).
3. Glab, S., Hulanicki, A., Edwall, G., and Ingman, F., *Metal-Metal Oxide and Metal Oxide Electrodes as pH Sensors*, *Critical Reviews in Anal. Chim.*, 21(1) (1989) 29-47.
4. Edwall, G., *Influence of Crystallographic Properties on Antimony Electrode Potential I. Polycrystalline Material*, *Eletochimica Acta*, 24(1979) 595-603
5. Edwall, G., *Influence of Crystallographic Properties on Antimony Electrode Potential II. Monocrystalline Material*, *Eletochimica Acta*, 24(1979) 605-612
6. Edwall, G., *Influence of Crystallographic Properties on Antimony Electrode Potential III. Oriented Monocrystalline Material*, *Eletochimica Acta*, 24(1979) 613-621
7. Hitchman, M. L., and Ramanathan, S., *Evaluation of Iridium Oxide Electrodes Formed by Potential Cycling as pH Probes*, *Analyst*, 113 (1988) 35-39.
8. Chen, Z., and Alexander, P. W., *Potentiometric detection of carboxylic acids by flow injection analysis using a tungsten oxide electrode*, *Anal. Chim. Acta*, 332(1996) 187-192.
9. Nomura, K. and Ujihira, Y., *Response of Oxide Films on Stainless Steel as a pH Sensor*, *Anal. Chim.* 60(23), (1988) 2564-2567.

10. Santos, E. P., Naue, J. A., Adaime, M. B., Viaro, N.S., Utilização do Eletrodo Indicador Aço Inoxidável EF138 para Determinação Potenciométrica de Ácido Fosfórico em Refrigerantes, EQ-38, 19ª. Reunião Anual da SBQ (Sociedade Brasileira de Química).
11. Figueiredo, M. O., Santos, A. C., Carmezim, M. J., Abbate, M., Groot, F. M. F., Petersen, H. and Braun, H., Chemical Study of Passivating Chromium Oxide Films by Soft X-ray Absorption Spectroscopy, *Analyst*, **119** (1994) 609-611.
12. Staden, J. F. V., A Coated Tubular Solid-State Chloride-Selective Eletrode in Flow-Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **179** (1986) 407-417.
13. Staden, J. F. V., Effect of Coated Open-tubular Inorganic-based Solid-state Ion-selective Electrodes on Dispersion in Flow Injection, *Analyst*, **115** (1990) 581-585
14. Lindner, E., Tóth, K., Pungor, E., Dynamic Characteristics of Ion Selective Electrodes, CRC Press, Boca Raton Florida (1988) 107-119
15. Toth, K., Fucskó, J., Lindner, E., Fehér, Z. S., Pungor, E., Potentiometric detection in Flow Analysis, *Anal. Chim. acta*, **179** (1986) 359-370.
16. Alegret, S., Alonso, J., Bartrolí, J., and Paulís, J M., Flow- Through Tubular PVC Matrix Membrane Electrode Without Inner Reference Solution For Flow Injection Analysis, *Anal. Chim. Acta*, **164** (1984) 147-152.
17. Padua, H. L. e Fields B., Kinetic Treatment of Unsegmented Flow Systems. Part 1. Subjective and Semiquantitative Evaluations of Flow Injection Systems with Gradient Chamber. *Anal. Chim. Acta*, **124** (1981) 39.

18. Padua, H. L. e Fields B., Kinetic Treatment of Unsegmented Flow Systems. Part 2. Detailed Treatment of Flow Flow Injection Systems with Gradient Chamber. *Anal. Chim. Acta*, **124** (1981) 65.
19. Gordon, W. E., Data Analysis for Acid-Base Titration of an Unknown Solution, *Anal. Chem.*, **54** (1982) 1595 - 1601.
20. Johansson, A. and Johansson S., Automatic Titration by Stepwise Addition of Equal Volumes of Titrations, *Analyst*, **104** (1979) 601-612.
21. Souza N. E., Godinho O. E. S., and Aleixo, L. M., Procedure for the Simultaneous Determination of Tartaric and Citric Acids and Total Carbonate by Potentiometric Titrimetry and Its Application to Antacid Analysis, *Analyst*, **110** (1985) 989 -991.
22. Aleixo, L. M., Godinho, O. E. S., and Costa, W. F, Investigation of the Effects of Dilution and Number of Points in the Performance of a Linear Method of Potentiometric Titration of weak Bases, *Microchemical Journal*, **35** (1987) 153-156.
23. Aleixo, L. M., Godinho, O. E. S., and Costa, W. F., Potentiometric study of acid-base properties of humic acid using linear functions for treatment of titration data, *anal. Chim. Acta*, **257** (1992) 35-39.
24. Ivaska, A., Graphic Determination of Equivalence Volumes in Potentiometric Titrations of Mixtures of Weak Acids - I, *Talanta*, **21** (1974) 1167-1173.
25. Ivaska, A., Graphic Determination of Equivalence Volumes in Potentiometric Titrations of Mixtures of Weak Acids - II, *Talanta*, **21** (1974) 1175-1181.

26. Ivaska, A., and Nagypál I., Determination of Component Concentrations in Mf Mixtures of Weak and Strong Acids and Bases by Linear Algebraic Methods, *Talanta*, **27** (1980) 721- 726.
27. Maccà, C., Gran plots and rigorous linear plots for weak acid titrations: the "chemical" rationale, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **336** (1990) 29 - 35.
28. Ingman, F., and Still, E., Graphic Method for the Determination of Titration End-Points, *Talanta*, **13** (1966) 1431-1442.
29. Zupan, J., Gasteiger, J., *Neural Networks for Chemists: an introduction*, VCH, New York (1993) 119 - 148.
30. Song, X. H., Xu, J., and Yu R.Q., Artificial Neural Networks Applied to Potentiometric Titration of Multi-Component Polybasic Acid Mixtures, *Mikrochim. Acta*, **111** (1993) 199-206.
31. Lindberg, W., Kowalski, B., Evaluation of Potentiometric Acid-Base Titrations By Partial-Least-Squares Calibration, *Anal. Chim. Acta*, **206** (1988) 125-135.
32. Martens, H., Naes, T., *Multivariate Calibration*, wiley & Sons Ltd (1989) 1-72.
33. Zhang, P., Dudley, N., Ure, A. M., Littlejohn, D., Application of principal component analysis to the interpretation of rainwater compositional data, *Anal. Chim. Acta*, **258** (1992) 1 -10.
34. Martens, H., Naes, T., *Multivariate Calibration*, wiley & Sons Ltd (1989) 97 - 108.

35. Geladi, P., and Kowalski, B., R., Partial Least-Squares Regression: A Tutorial, *Anal. Chim. Acta*, **185** (1986) 1 -17.
36. Martens, H., Naes, T., *Multivariate Calibration*, wiley & Sons Ltd (1989) 112-163.
37. Geladi, P., and Kowalski, B., R., Partial Least-Squares Regression: A Tutorial, *Anal. Chim. Acta*, **185** (1986) 1 -17.
38. Geladi, P., and Kowalski, B., R., An Wxample of 2-Block Predictive Partial Least-Squares Regression With Simulated Data, *Anal. Chim. Acta*, **185** (1986) 19 -32.
39. Baughman, D. R., and Liu, Y. A., *Neural Networks in Bioprocessing and Chemical Engineering*, Academic Press, (1995) 1-109.
40. Barr, A. and Feigenbaum, E. A., *The Handbook of Artificial Intelligence*, Addison-Wesley, Reading, MA, **1** (1981).
41. Buchanan, B. G. and Shortliffe, E. H., *Rule-Based Expert System*, Assison-Weley, Reading, MA (1983).
42. Zupan, J., and Gasteiger J., Neural networks: A new method for solving chemical problems or just a passing phase?, *Anal. Chim. Acta*, **248** (1991) 1-30.
43. Hitzmann, B., Kullick, T., Evaluation of pH field effect transistor measurement signals by neural networks, *Anal. Chim. Acta* **294** (1994) 243-249.
44. Svozil, D., Kvasnicka, V. Pospíchal, J., Introduction to multi-layer feed-forward neural networks, *Chem and Int. Lab. Syst.*, **39** (1997) 43-62.

45. Demuth, H. and Beale, M., **Neural Networks Toolbox for use with Matlab**, January (1994) 5-1 à 5-38.
46. Jang, J. S. R., Sun, C. T., Mizutani, E., **Neuro-Fuzzy and Soft Computing, A Computational Approach to Learning and Machine Intelligence**, USA, (1997) 129-171.
47. Godinho, O. E. S., Souza, N. E., e Aleixo, L. M., **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 71 (5) (1988) 1028-1032.
48. **Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis, Fruits and Fruit Products** (1990) 920-921.
49. **Critical Stability Constants, Others Organic Ligantes**, Plenum Press, N. Y., 3 (1977).
50. Demuth, H., Beale, M. **Neural Network Toolbox for User with Matlab, User's Guide**, The Math Works Inc. (1994).
51. Poppi, R. J., and Pasquini, C., **Spectrophotometric determination of a mixture of weak acids usings multivariate calibration and flow injection analysis titration**, **Chem. and Int. Lab. Syst.**, 19 (1993) 243-254.
52. Robards K., Antolovich, M., **Methods for Assessing the Authenticity of Orange Juice, A Review**, **Analyst**, 120 (1995).
53. Lee, H. S., **J. Agric. Food Chem.** 41 (1993) 1991-1993.

Apêndice I

Sistema de Interfaceamento

O sistema de comunicação entre o microcomputador e o potenciômetro utiliza uma interface paralela de 8 bits, operando de modo assíncrono, modelo PCL-711S (American Advantech), sendo instalada diretamente no conector de expansão ("slot") do microcomputador. Esta interface possui um conversor analógico/digital (A/D) de 12 bits contendo 8 entradas independentes, um conversor digital/analógico (D/A) de 12 bits, 16 entradas e 16 saídas digitais compatível com modo TTL de operação.

A leitura do potenciômetro é feita através de sua saída analógica (saída para registrador potenciométrico), a qual foi conectada diretamente a primeira entrada do conversor A/D, através de um cabo coaxial de 50 Ω para diminuir interferências provenientes do ambiente de trabalho.

O sistema FIA desenvolvido pode operar com injetor do tipo manual e automático. Em ambos os casos, foi utilizado uma fonte de alimentação simétrica de ± 12 V, construída no próprio laboratório, a qual se destina à alimentação dos dispositivos elétricos/eletrônicos que controlam o modo de injeção manual e automático. Além disso, esta fonte assegura que não ocorra danos a fonte de alimentação do próprio microcomputador e a placa de interfaceamento, devido a uma drenagem excessiva de corrente.

O modo de operação manual utiliza um injetor de acrílico, no qual foi adaptado um sensor óptico modelo PCST-2103 que tem como função enviar para o computador, através da interface, um sinal lógico indicando se o injetor está na posição de amostragem ou de injeção. A Figura 1, mostra o esquema do injetor e o circuito eletrônico empregado para gerar o sinal lógico de controle.

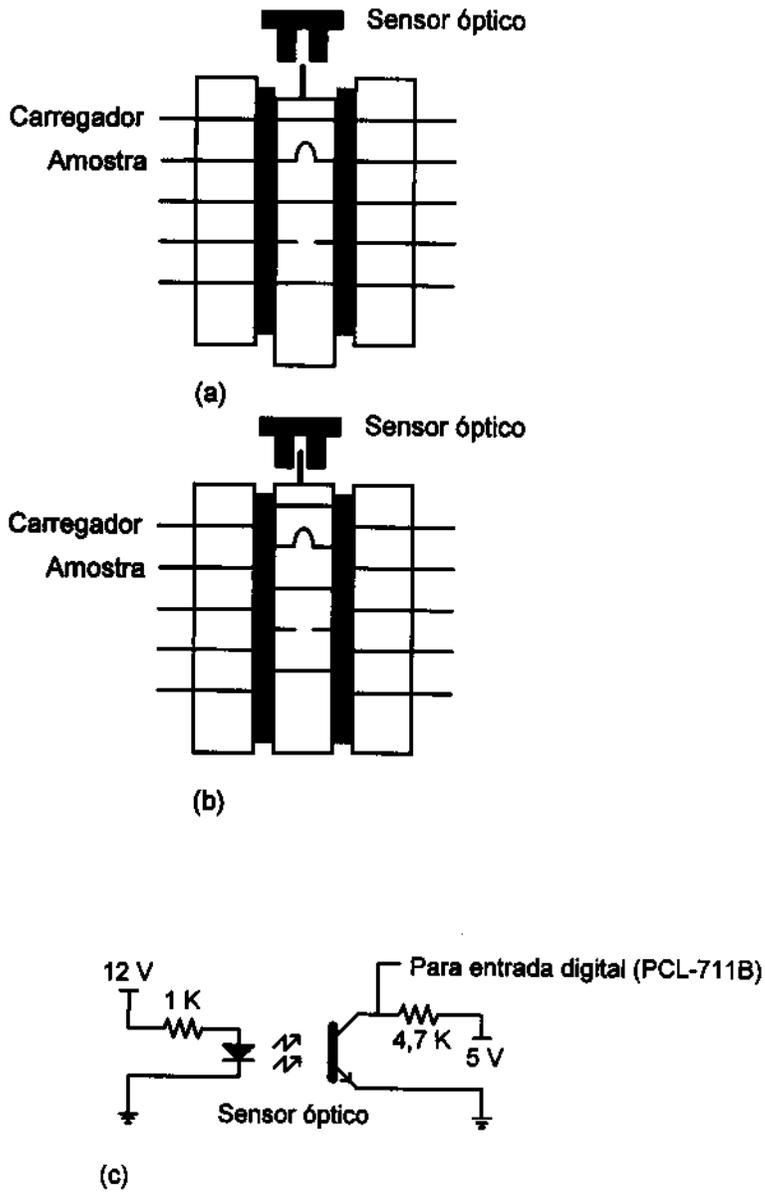


Figura 1. Sistema de injeção manual. (a) Injetor na posição de amostragem. (b) Injetor na posição de Injeção. (c) Circuito eletrônico.

Descrição do programa computacional

O programa desenvolvido para controle e aquisição dos dados do sistema FIA, foi escrito utilizando-se a linguagem Visual Basic 3.0.

A linguagem Visual Basic possui uma programação orientada por objeto, tornando o desenvolvimento do programa muito mais simples e rápido. Além disso, a janela de trabalho, mostrada na Figura 2, segue o mesmo padrão de operação empregado pelos diversos aplicativos que trabalham no ambiente Windows, facilitando a compreensão e operação do programa por qualquer usuário.

O programa foi desenvolvido com o propósito de poder ser aplicado tanto a sistemas de Análise por Injeção em Fluxo utilizando injetores manuais como também injetores automáticos.

Como pode ser observado na Figura 2, o programa permite ao usuário o controle de diferentes parâmetros, sendo alguns referentes a parte gráfica, tais como, seleção prévia da escala do gráfico e outros destinados ao controle do sistema em fluxo, como, tempo de amostragem e injeção, tempo de espera para iniciar a leitura de dados provenientes do potenciômetro, número de leitura, leituras médias de dados, número de amostras e replicatas. Todos estes parâmetros foram implementados no sentido de tornar o programa mais flexível e permitir ao usuário um controle mais efetivo sobre o sistema FIA. O programa, possui ainda, um arquivo de segurança, o qual, armazena automaticamente, os dados referentes a última análise, evitando, desta forma, que possa ocorrer perdas de dados devido a queda de energia ou outro fator que possa resultar em perda de comunicação entre o computador e o sistema em fluxo.

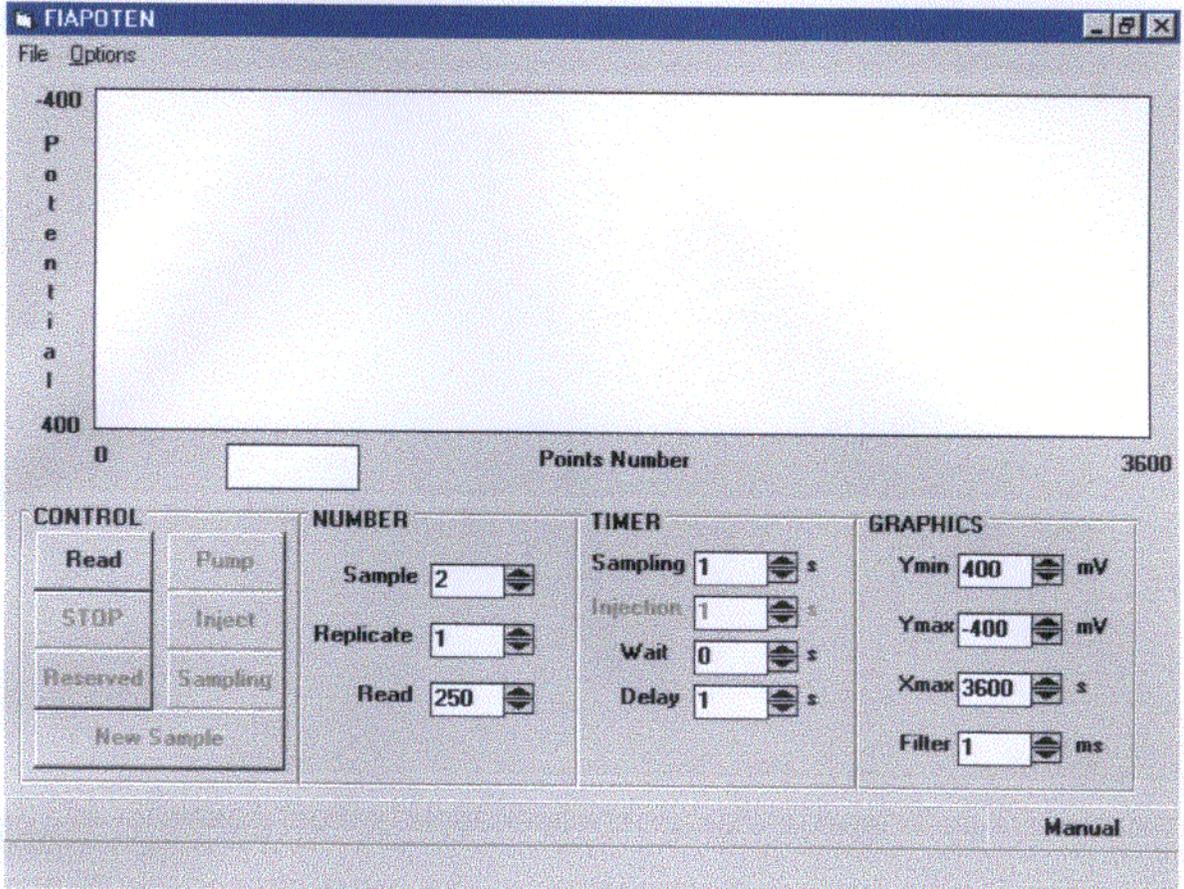


Figura 2. Janela de trabalho do programa desenvolvido para o controle e aquisição de dados do sistema potenciométrico em fluxo.

Os diagramas obtidos com o sistema desenvolvido, são apresentados ao usuário sob a forma gráfica e os dados obtidos podem também ser armazenados em disco sob a formatação do tipo ASCII. Este formato foi escolhido pois permite a manipulação dos dados em diferentes aplicativos que trabalham em ambiente Windows, como também, pelo programa MatLab.