

NÍVIA SILVA OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO NÃO TITULOMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM AMOSTRAS DE VINAGRE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2014**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Oliveira, Nívia Silva, 1984-
O48d Desenvolvimento de método não titulométrico para
2014 determinação de acidez em amostras de vinagre / Nívia Silva
Oliveira. – Viçosa, MG, 2014.
xvi, 71f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: André Fernando de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.68-71.

1. Vinagre. 2. Vinagre - Acidez. 3. Potenciometria.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.


CDD 22. ed. 664.55

NÍVIA SILVA OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ EM
AMOSTRAS DE VINAGRE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

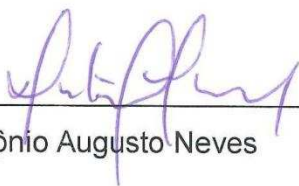
APROVADA: 16 de maio de 2014.



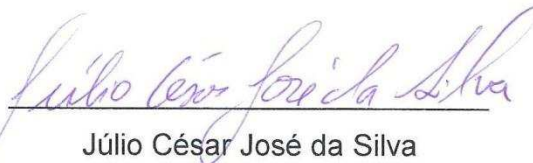
Maria Eliana L. Ribeiro de Queiroz
(Coorientadora)



Leonardo Luiz Okumura
(Coorientador)



Antônio Augusto Neves



Júlio César José da Silva



André Fernando de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus. Ele esteve sempre ao meu lado durante esta caminhada, muitas vezes o caminho tornou-se tortuoso e pensei em desistir, porém, Ele esteve sempre ao meu lado me dando força e fé.

Agradeço aos meus pais, Gessé e Rosária, que mesmo distantes, estiveram sempre comigo, ensinando-me, apoiando-me, amando-me incondicionalmente e acreditando em meu potencial. Eu amo vocês!

Agradeço ao meu noivo Helder por todo apoio, amor e companheirismo. Amo muito você!

Obrigado a todos os meus familiares e aos meus amigos, em particular aos meus irmãos Ivan, Aline, Iran e Jean pela confiança e admiração.

Meu muitíssimo obrigado ao meu orientador e Professor Doutor André Fernando de Oliveira. Obrigada por aceitar-me como orientanda, incentivar-me, apoiar-me sempre que precisei. Obrigada pelo ensinamento e pela paciência que teve durante todo este tempo. Ainda no âmbito acadêmico, agradeço a professora Doutora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pelos conselhos e sugestões, você é um exemplo que sempre levarei comigo, como pessoa e como profissional. Agradeço ao Professor Doutor Antônio Augusto Neves pelas sugestões pertinentes durante a construção final desse trabalho.

Agradeço a todos que fazem parte da família LAQUA: Bethânia, Agatha, Cris, Luiz Felipe, Carlos, Luís Manoel, Renata, Fernanda, Cintia, Alessandra, Carlos (Dudu) pelo companheirismo no trabalho e pelos momentos de descontração. Em especial à Anna Isabel, pela paciência, por me ouvir, auxiliar e por me ceder à mão amiga quando mais precisava.

Às minhas companheiras de republica Angélica Costa e Matilde Pessoa por esclarecerem as dúvidas relacionadas à estatística e formatação que surgiam.

À Juliana Diniz e Kelle Gomes, companheiras de mestrado, de casa, de carona e de risadas. Adoro vocês!

À Andiará por toda ajuda durante o primeiro ano de mestrado, momento em que mais me sentia perdida.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade. À Coordenação

de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudos.

Divido com todos vocês mais uma etapa de minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Vinagre.....	1
1.2 Processos de produção.....	7
1.2.1 Processo lento ou Orléans.....	8
1.2.2 Processo rápido ou Alemão.....	9
1.2.3 Processo submerso	10
1.3 Alterações do vinagre.....	11
1.4 Métodos titulométricos	12
1.5 Determinação da acidez em vinagres usando métodos titulométricos.....	12
1.6 Método Dois Pontos.....	14
1.6.1 Avaliação da eficiência de sistemas tampão.....	14
1.6.2 Poder tamponante	14
1.6.3 Carga efetiva	16
1.6.4 Simulação de titulação-TitGer 2.5.....	19
1.6.5 Planejamento experimental Doehlert	20
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.1.1 Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E METÓDOS.....	25
3.1 Preparo das soluções.....	25

3.1.1	Solução tampão de ácido cítrico.....	25
3.1.2	Solução padrão de ácido acético.....	25
3.1.3	Solução de hidróxido de sódio.....	25
3.1.4	Preparo da curva analítica para amostras diluídas.....	26
3.1.5	Preparo da curva analítica para amostras sem diluição.....	26
3.2	Preparo das amostras.....	27
3.2.1	Procedimento do M2P para amostras diluídas.....	27
3.2.2	Procedimento do M2P para amostras sem diluição.....	27
3.3	Simulação computacional.....	27
3.4	Matriz de Doehlert.....	28
3.5	Medidas com pHmetro.....	28
3.6	Titulação volumétrica com detecção potenciométrica.....	28
3.7	Figuras de mérito.....	29
3.7.1	Tratamento dos dados.....	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	Titulação potenciométrica.....	30
4.2	Definição dos parâmetros de avaliação da faixa da curva analítica quadrática.....	32
4.3	Otimização univariada para o método dois pontos.....	35
4.3.1	Efeito da concentração do tampão citrato e do pH inicial.....	35
4.3.2	Comportamento do erro do método.....	42
4.3.3	Figuras de mérito do protocolo do M2P.....	43
4.3.4	Otimização por planejamento experimental baseado na matriz de Doehlert para amostra diluída.....	45
4.3.5	Comparação entre os valores simulados e otimização univariada.....	53
4.3.6	Comparação entre a otimização univariada e multivariada.....	55
4.4	Aplicação do planejamento experimental baseado na matriz de Doehlert para amostra concentrada.....	56

4.4.1	Figuras de mérito.....	60
4.5	Considerações sobre o Método dos Dois Pontos (M2P).....	61
4.6	Interpretação dos resultados.....	61
5.	CONCLUSÃO.....	65
6.	ETAPAS FUTURAS	67
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processo de produção do vinagre (XAVIER <i>et al.</i> , 2009). ...	2
Figura 2: Esquema de recipiente usado no processo orléans (AQUARONE <i>et al.</i> , 2001).	8
Figura 3. Gerador utilizado no processo rápido para produção de vinagre (AQUARONE <i>et al.</i> , 2001).	10
Figura 4. Acetificador usado em processo submerso (TAKEMOTO, 2000).	11
Figura 5. Diagrama de distribuição de espécie para ácido cítrico em diferentes pH: A_0 (H_3Cit)(- · - · -), A_1 (H_2Cit^-) (—), A_2 ($HCit^{2-}$) (····) e A_3 (cit^{3-}) (---).	18
Figura 6. Comportamento do sistema citrato em função do pH: (a) carga efetiva; (b) poder tamponante. (----) efeito total; (- - - -) efeito pseudo tampão; (····)efeito devido ao sistema citrato.....	18
Figura 7. Telas do Titger 2.5. (a) tela principal (b) detalhe da tela destruição de espécies	20
Figura 8. Planejamento Doehlert para duas variáveis: hexágono (—) obtido pelo primeiro planejamento e hexágono (...) obtido utilizando pontos experimentais já explorados anteriormente (TEÓFILO & FERREIRA, 2006).	21
Figura 9. Curvas de titulação (■) simulada e (□) experimental: 10 mL ácido acético $4,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com solução hidróxido de sódio $0,1699 \text{ mol L}^{-1}$	30
Figura 10. Derivada primeira com ajuste da função não-linear de Lorentz para a titulação descrita na figura 9. O inserto apresenta a tabela de valores fornecido pelo origin 8.0 pro.	31
Figura 11. Função de gran para a titulação descrita na figura 9. O inserto apresenta a tabela de valores fornecido pelo origin 8.0 pro.	31
Figura 12. Curvas analíticas hipotéticas utilizando a função: $R = B + I.C + QC^2$, onde B igual a 1 e I, igual a 10. Valores de Q: (—)0,0; (---) -0,7; (····) -1,0.	33
Figura 13. Sensibilidade analítica de curvas analíticas hipotéticas usando a função : $R = B + I.C + QC^2$, onde B igual a 1 e I, igual a 10. Valores de Q: (—)0,0; (---) -0,7; (····) -1,0. figura A: sensibilidade analítica em valores absolutos; figura B: em porcentagem da maior sensibilidade.....	34

- Figura 14. Exemplo hipotético de curva analítica usando a função: $R = B + I.C + QC^2$, onde B igual a 1 e I, igual a 10. Valores de Q: (—) 0,0; (---) -0,7; (····) -1,0. figura A: % sensibilidade ;figura B: resposta analítica; setas verticais: definição da faixa analítica considerando A %Sensibilidade analítica limite de 75%35
- Figura 15. Efeito do pH inicial do tampão citrato 5 mmol L^{-1} sobre a curva analítica de ácido acético. Adição de 2,5 mL de ácido acético sobre 10 mL do tampão citrato36
- Figura 16. Efeito da do pH inicial do tampão citrato 10 mmol L^{-1} sobre a curva analítica de ácido acético. Adição de 2,5 mL de ácido acético sobre 10 mL do tampão citrato.36
- Figura 17. Efeito do pH inicial do tampão citrato 20 mmol L^{-1} sobre a curva analítica de ácido acético com adição de 2,5 mL de ácido acético sobre 10 mL do tampão citrato.37
- Figura 18. Influência do pH sobre a inclinação das curvas analíticas em diferentes concentrações de tampão citrato (\square) 5 mmol L^{-1} ; (\blacksquare) 10 mmol L^{-1} ; (\bullet) 20 mmol L^{-1} . Adição de 2,5 mL de solução padrão de ácido acético.38
- Figura 19. Influência do pH sobre a inclinação das curvas analíticas em diferentes concentrações de tampão citrato (\square) 5 mmol L^{-1} ; (\blacksquare) 10 mmol L^{-1} ; (\bullet) 20 mmol L^{-1} . Adição de 2,5 mL de ácido acético.39
- Figura 20. Influência do pH sobre a sensibilidade mínima, calculada para a concentração de ácido acético $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. O inserto expressa a %sensibilidade mínima em função do pH. Concentrações de tampão citrato (\square) 5 mmol L^{-1} ; (\blacksquare) 10 mmol L^{-1} ; (\bullet) 20 mmol L^{-1} . Adição de 2,5 mL de solução padrão de ácido acético.....40
- Figura 21. Efeito do pH inicial do tampão citrato sobre a curva analítica de ácido acético com adição de 5,0 mL de ácido acético sobre 10 mL do tampão citrato. Concentração do tampão citrato: (a) 5 mmol L^{-1} ; (b) 10 mmol L^{-1} ; (c) 20 mmol L^{-1} 41
- Figura 22. Influência do pH sobre a sensibilidade mínima, calculada para a concentração de ácido acético $0,0103 \text{ mol L}^{-1}$. O inserto expressa a %sensibilidade mínima em função do pH. Concentrações de tampão citrato (\square) 5 mmol L^{-1} ; (\blacksquare) 10 mmol L^{-1} ; (\bullet) 20 mmol L^{-1} . Adição de 5,0 mL de solução padrão de ácido acético.42

Figura 23. Comportamento do erro do método do M2P em relação à titulação potenciométrica para vinho tinto. Concentração do tampão: (x) 5 mmol L ⁻¹ (□); 10mmol L ⁻¹ (●); 20 mmol L ⁻¹ ; volume de amostra: (a) 2,5mL (b) 5 mL.....	43
Figura 24. Coeficientes do modelo de regressão linear obtido para o planejamento pela Matriz de Doehlert	46
Figura 25. Superfície de resposta da sensibilidade mínima do pH e concentração do tampão (unidades codificadas)	47
Figura 26. Valores máximos do modelo obtidos. (■) pH máximo para cada valor de concentração de tampão; (□) concentração máxima de tampão para cada valor de pH.....	47
Figura 27. Coeficientes do modelo de regressão múltipla utilizando todos os termos da equação 17 para avaliação da influência do pH e concentração do tampão sobre a estimativa do desvio-padrão dos resíduos das curvas analíticas.....	48
Figura 28. Coeficientes do modelo stepwise regression para a avaliação da influência do pH e concentração do tampão sobre a estimativa do desvio-padrão dos resíduos das curvas analíticas	49
Figura 29. Superfície de resposta da influência do ph e concentração do tampão sobre a estimativa do desvio-padrão dos resíduos das curvas analíticas.....	50
Figura 30. Coeficientes do modelo de regressão obtidos para o planejamento de experimento utilizando a Matriz de Doehlert e usando o erro do método média de amostras de vinagre.....	51
Figura 31. Superfície de resposta da porcentagem do erro do método em função do pH e concentração do tampão (unidades codificadas.....	52
Figura 32. Valores máximos do modelo para explicar o erro do método. (■) pH máximo para cada valor de concentração de tampão; (□) concentração máxima para cada valor de pH.....	52
Figura 33. Comparação entre as curvas analíticas obtidas para os dados experimentais e para dados simulados no Titger 2.5. (■) tampão pH 4,00 e 12,5 mmol L ⁻¹ ; (○) tampão pH 5,5 e 5 mmol L ⁻¹	53
Figura 34. Comparação entre as sensilidades mínimas obtidas por simulação e pelos dados experimentais.	55
Figura 35. Coeficiente do modelo <i>stepwise regression</i> da sensibilidade analítica da concentração do tampão citrato utilizando a adição da amostra não-diluída	58

Figura 36. Superfície de resposta da influência do pH e concentração do tampão citrato sobre a sensibilidade mínima.	59
Figura 37. Curva analítica do protocolo otimizado com modelo quadrático (—) e linear (····) Sobrepostos.	60
Figura 38. Carga efetiva do sistema citrato e modelo de regressão linear na região entre $2,7 < \text{pH} < 6,7$. O inserto apresenta o gráfico de resíduos do modelo. Dados gerados pela planilha alfadist 5.0.....	63
Figura 39. Comparação entre as regiões de pH das curvas analíticas do método otimizado para amostras diluída(a) e não diluída(b) e as curvas de carga efetiva do sistema citrato (...) e acetato (—).....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites analíticos para o vinagre de vinho, fermentado acético de fruta.	4
Tabela 2. Classificação e denominação do fermentado acético.....	5
Tabela 3. Número de experimentos e os valores codificados para a Matriz de Doehlert usando duas variáveis.	22
Tabela 4. Comparação da determinação da acidez acética pela titulação potenciométrica e pelo M2P com 2,5 mL de tampão citrato 10 mmol L ⁻¹ e em pH 5,5.(N = 3).....	44
Tabela 5. Valores de inclinação e termo constante obtidos na comparação entre as curvas analíticas obtidas experimentalmente e através de simulação	54
Tabela 6. Comparação dos valores de LOD e LOQ para as condições otimizadas pelo método multivariado utilizando a Matriz de Doehlert e pelo método univariado.....	56
Tabela 7. Condições experimentais para planejamento experimental baseado na Matriz de Doehlert para uso das amostras sem diluição	57
Tabela 8. Comparação dos resultados da determinação da acidez acética pela titulação potenciométrica e pelo M2P com adição de 1 mL de amostra não-diluída sobre 10 mL de tampão citrato 100 mmol L ⁻¹ e em pH 7,0.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANAV - Associação Nacional das Indústrias de Vinagre.
CV – Coeficiente de Variação.
DQO - Demanda Química de Oxigênio.
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
FIA - Análise por Injeção em Fluxo.
HPLC - High-Performance Liquid Chromatography.
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada.
LOD – Limite de Detecção.
LOQ - Limite de Quantificação.
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
M2P – Método Dois Pontos.

RESUMO

OLIVEIRA, Nívia Silva. M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, Maio, 2014. **Desenvolvimento de método não titulométrico para determinação de acidez em amostras de vinagre.** Orientador: André Fernando de Oliveira. Coorientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Leonardo Luiz Okumura.

O vinagre é um produto obtido a partir da fermentação acética geralmente de vinhos e possui a finalidade de atribuir gosto e aroma aos alimentos, sendo assim considerado um condimento. De acordo com a Portaria nº 204, de 05 de dezembro de 2008, o vinagre comercial deve conter, no mínimo, 4% de ácido acético. No presente trabalho foi desenvolvido um método potenciométrico não-titulométrico (M2P) baseado na variação do pH de uma solução de tampão citrato com adição da amostra (diluída ou não-diluída) sobre o tampão. A otimização do método analítico foi realizada por três estratégias em que os parâmetros pH e concentração do tampão citrato foram modificados. Na otimização univariada, o método otimizado consistiu em adicionar 5 mL de amostra diluída sobre 10 mL de tampão citrato 10 mmol L⁻¹ em pH 5,5. A faixa analítica foi de 2 a 20 mmol L⁻¹ e o modelo da equação da curva analítica apresentou um valor de R² ajustado igual a 0,998 e estimativa do desvio-padrão dos resíduos igual a 0,016. No estudo de repetibilidade, foi obtido um coeficiente de variação de 0,8% para a concentração de 0,01 mol L⁻¹ e a comparação do protocolo com o método titulométrico na determinação de acidez de amostras comerciais de vinagre apresentou erros entre 0,7 % e 4,64% (N = 3). Na otimização multivariada foi utilizada a matriz de Doehlert, o protocolo foi otimizado utilizando a amostra diluída e concentrada. No primeiro caso, as condições ótimas foram similares àquelas obtidas para o método univariado. Além da matriz de Doehlert foi utilizada uma planilha eletrônica (TitGer 2.5) com o intuito de prever as melhores condições experimentais. Os resultados obtidos pela planilha apresentaram a mesma região ótima obtida pela otimização univariada e multivariada. Na otimização multivariada utilizando a amostra concentrada, primeiramente as condições preestabelecidas foram simuladas pela planilha eletrônica e posteriormente inseridas na matriz de Doehlert. A condição ótima encontrada foi com adição de 1 mL de amostra sem diluição sobre 10 mL de tampão citrato 100 mmol L⁻¹ em pH 7,0. A faixa analítica foi de 0,5 a 1,05 mol L⁻¹, com R²

igual a 0,992 e estimativa do desvio-padrão dos resíduos igual a 0,013 mol L⁻¹. O limite de quantificação foi de 0,34 mol L⁻¹ e uma repetibilidade de 0,64% foi obtida para a concentração de 800 mmol L⁻¹. A comparação do protocolo com o método titulométrico na determinação de acidez de amostras comerciais de vinagre apresentou erros entre 0,13 % e 3,97% (N = 3). Dessa forma, o método proposto além de ser simples, rápido e barato apresentou resultados similares ao método titulométrico tendo como vantagem a utilização da resposta de um instrumento analítico ao invés da decisão do analista (em relação a pontos de viragem) tornando-o mais confiável sob o ponto de vista de garantia da qualidade e controle de qualidade (QA/QC).

ABSTRACT

OLIVEIRA, Nívia Silva, M. Sc., Federal University of Viçosa, May, 2014. **Development not titrimetric method for determination of acidity in vinegar samples.** Advisor: André Fernando de Oliveira. Co-advisors: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and Leonardo Luiz Okumura.

Vinegar is a product obtained from the acetic fermentation of wine and generally has the purpose of assigning taste and flavor to food, thus being considered a condiment. According to Decree No. 204 of 05 December 2008, the commercial vinegar must contain at least 4% acetic acid. In this study we developed a non-potentiometric titration method (M2P) based on the variation of the pH of a solution of citrate buffer with addition of the sample (diluted or undiluted) on the buffer. Optimization of the analytical method was carried out three strategies in which the parameters pH and concentration of the citrate buffer were modified. Univariate optimization, the optimized method consisted of adding 5 mL of diluted sample of about 10 mL citrate buffer 10 mmol L⁻¹ at pH 5.5. The analytical range was 2-20 mmol L⁻¹ and the model of the analytical curve equation had a value of adjusted R² equal to 0.998 and estimated standard deviation of waste equal to 0.016. In the study of repeatability was obtained a coefficient of variation of 0.8% for the concentration of 0.01 mol L⁻¹ and the comparison with the protocol titrimetric method for the determination of acidity of commercial vinegar samples had errors between 0, 7% and 4.64% (N = 3). Multivariate optimization of Doehlert matrix was used, the protocol was optimized using the diluted sample, and concentrated. In the first case, the optimal conditions were similar to those obtained for the univariate method. Beyond the matrix Doehlert a spreadsheet (TitGer 2.5) in order to provide the best experimental conditions was used. The results presented by the spreadsheet the same optimal region obtained by univariate and multivariate optimization. In multivariate optimization using the concentrated sample, first the set conditions were simulated by the spreadsheet and then entered into the Doehlert matrix. The optimal condition was found by adding 1 mL of undiluted sample of about 10 mL citrate buffer 100 mmol L⁻¹ at pH 7.0. The analytical range was 0.5 to 1.05 mol L⁻¹, with R² equal to 0.992 and estimated standard deviation of waste equal to 0.013 mol L⁻¹. The limit of quantification was 0.34 mol L⁻¹ and a repeatability of 0.64% was obtained for the concentration of 800

mmol L⁻¹. Comparison of the titration method with the protocol for the determination of acidity of commercial vinegar samples had errors between 0.13% and 3.97% (N = 3). Thus, the proposed method besides being simple, fast and inexpensive titration method presented similar to how taking advantage of the use of the response of a more reliable analytical tool rather than the decision of the analyst (in relation to turning points) making the results from the point of view of quality assurance and quality control (QA / QC).

1. INTRODUÇÃO

O vinagre é um produto obtido a partir da fermentação acética de substratos alcoólicos de origem agrícola onde o aspecto mais importante nesse processo é a oxidação biológica do etanol a ácido acético. Porém, outras substâncias em menores concentrações, também sofrem transformações ou são formadas, fornecendo ao produto final características típicas e definitivas para sua qualidade. Sua acidez é dada principalmente pela presença do ácido acético, sendo este um parâmetro físico-químico avaliado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como padrão de identidade e qualidade, com acidez mínima aceitável de 4% (m/m) expressa em ácido acético (EMBRAPA, 2006).

Para determinação dessa acidez, utiliza-se principalmente a titulação ácido-base de Bronsted com uso de indicador, sendo também utilizada a titulação potenciométrica. A titulação com uso do indicador apresenta desvantagens tais como o fato dos resultados serem muito dependente do analista, que é um problema na acreditação das análises, enquanto que as titulações potenciométricas são muito demoradas ou exige instrumento de custo relativamente elevado.

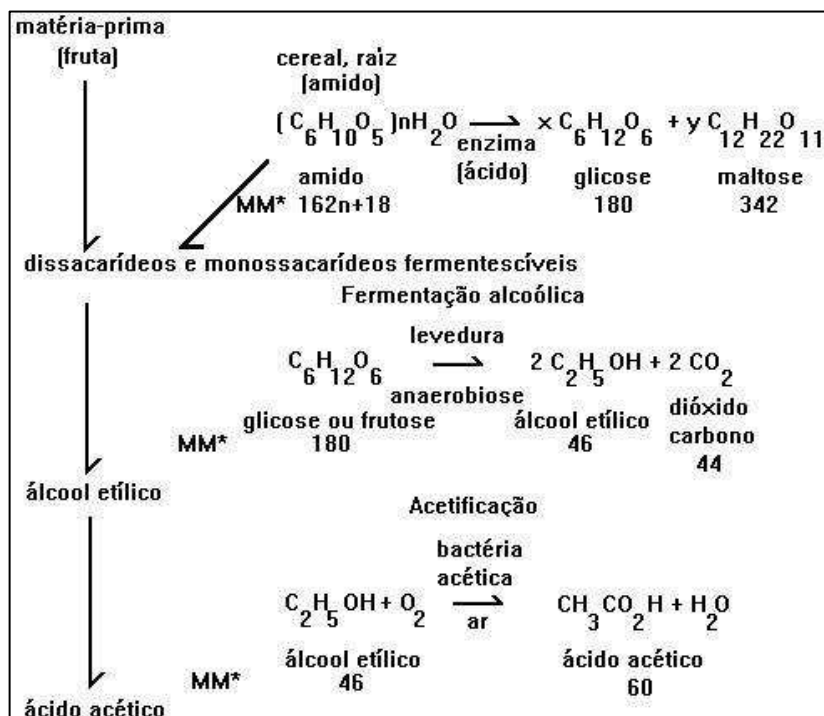
Este trabalho propôs um método potenciométrico não-titولométrico para determinação de acidez, com precisão, elevada frequência analítica, com baixo custo e outras vantagens na acreditação do protocolo.

1.1 Vinagre

A principal finalidade do vinagre é atribuir gosto e aroma aos alimentos, sendo por isso considerado um condimento. Ele apresenta propriedades estimulantes que favorecem a secreção do suco gástrico e assim, estimulando a digestão. Deve ser ingerido em quantidade moderada, pois, em excesso, sua ação digestiva é prejudicada e ele se torna corrosivo para a mucosa gastrointestinal (EMBRAPA, 2006).

O vinagre é resultado da fermentação de uma variedade de matérias-primas, onde são envolvidos dois processos. No primeiro processo os açúcares presentes no mosto são convertidos em etanol pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. No segundo processo, o etanol produzido sofre oxidação por bactérias aeróbicas do

gênero *Acetobacter* (TESFAYE *et al.*, 2002). A Figura 1 mostra a conversão do álcool a ácido acético pela ação das bactérias.



*Massa molecular

Figura 1. Fluxograma do processo de produção do vinagre (XAVIER *et al.*, 2009).

A matéria-prima utilizada para sua elaboração é variável em função da disponibilidade de cada país. Assim, países de tradição vitícola como a Itália, Espanha, França e Grécia, o vinagre é feito, sobretudo de vinho. O vinagre produzido a partir do arroz é mais frequente na China e no Japão, enquanto nos Estados Unidos e Inglaterra, o vinagre é produzido a partir da sidra e do malte (RIZZO *et al.*, 1998).

No Brasil, as principais matérias-primas utilizadas para produção de vinagre é a cana-de-açúcar (produção do vinagre de álcool) e a uva (produção do vinagre de vinho tinto). Segundo a EMBRAPA (2006), 170 milhões de litros de vinagre são consumidos anualmente no Brasil, cerca de 80% corresponde ao vinagre de álcool. A região Sudeste responde por 53% do consumo do produto em território nacional, seguido pelas regiões Sul (23%), Norte-Nordeste (19%) e Centro-Oeste (5%). A região da Grande São Paulo é o maior polo produtor de vinagre, concentrando 37%

da produção total nacional, enquanto o interior de São Paulo é o principal mercado (cerca de 24% da produção nacional) (EMBRAPA, 2006).

Há muitos anos atrás, o vinagre era considerado apenas como um produto enológico secundário espontaneamente derivado do vinho e sem qualquer padrão de qualidade reconhecido. No entanto nos dias atuais alguns vinagres são considerados especialidades culinárias de todo o mundo, como o vinagre Sherry (produto típico da Espanha), vinagre balsâmico tradicional de Modena (doze anos é o limite mínimo do envelhecimento) e vinagre balsâmico de Modena (CURTIDO *et al.*, 2012). Na China os vinagres são considerados condimentos favoritos, produtos para a saúde e até mesmo medicamentos. São produzidos mais de 26 milhões de hectolitros de vinagre por ano e em média 3,2 milhões de litros consumidos por dia (ZOU *et al.*, 2012).

As primeiras referências do vinagre datam de 8000 anos A.C.. Há 5.000 anos, os povos antigos como os egípcios, babilônicos gregos entre outros, já conheciam o processo de produção do vinagre e em viagens longas utilizavam este, muitas vezes, como uma forma de conservar seus alimentos (HEINIG, 2004). Em civilizações antigas, no Oriente Médio e na Europa, durante a Idade Média, o vinagre também era utilizado, em soluções diluídas, para aliviar a sede, pois o vinagre inibe as papilas gustativas temporariamente, aliviando assim a sensação de sede. Foi empregado também para prevenir possíveis contaminações microbiológicas, como durante as epidemias de cólera, em que foi utilizado para desinfecção, sendo recomendado para lavar as mãos antes e depois de visitar um doente, e para lavar as frutas e verduras antes do consumo (HEINIG, 2004; EMBRAPA, 2006). Estudos posteriores mostraram que um vinagre com 5% de ácido acético é letal para os vibriões da cólera, quando em contato por cinco minutos (EMBRAPA, 2006).

Na antiga China os nobres que merecessem grandes honrarias recebiam um jarro de vinagre, o qual simbolizava a vida. Estudos realizados por Nishidai *et al.* (2000) demonstraram atividade antitumoral do vinagre de arroz integral em tecido de rato, sendo assim o uso deste produto sugerido no retardo do desenvolvimento de tumores, uma vez que ele inibe o estresse oxidativo, um importante mecanismo para a estimulação tumoral (NISHIDAI *et al.*, 2000).

Ogawa e colaboradores (2000) em estudo com culturas de células expostas a soluções de ácido acético observaram uma inibição na atividade das enzimas dissacaridasas – sacarase, maltase, trealase e lactase – que convertem

dissacarídeos em monossacarídeos. Outros ácidos orgânicos, como cítrico, succínico, láctico e tartárico não apresentaram esse efeito, sendo sugerido o uso oral do vinagre para diminuir o nível de glicose sanguínea (OGAWA *et al.*, 2000).

Segundo a Instrução normativa nº 6, de 3 de abril de 2012 (MAPA), é definido como vinagre de vinho, o produto obtido da fermentação acética do vinho, no entanto permitem que sejam usadas genericamente outras substâncias ou líquidos alcoólicos para a fermentação acética, desde que ao produto resultante seja acrescido o nome da matéria-prima após o termo vinagre (ANAV, 2013). Os limites de concentração previstos na legislação brasileira para o vinagre de vinho (“limites analíticos”) e o fermentado acético de frutas são apresentados na Tabela 1 (MAPA, 2012).

Tabela 1. Limites analíticos para o vinagre de vinho, fermentado acético de fruta.

Variável	Limite	
	Mínimo	Máximo
Ácido volátil, em ácido acético g/100 mL	4,0	-
Álcool (% v/v) a 20°C	-	1,0
Extrato seco reduzido (g/L)	-	-
Sulfato de potássio (g/L)	-	1,0
Dióxido de enxofre total (mg/L)	-	200
Aspecto	Ausência de elementos estranhos a sua natureza e composição	
Cheiro	Característico	
Sabor	Ácido	
Cor	De acordo com a matéria prima de origem e composição	

Fonte: EMBRAPA 2006.

Vinagre é o produto resultante da fermentação acética do vinho. A expressão vinagre usada isoladamente é privativa do fermentado acético do vinho. Os produtos resultantes de outras matérias-primas são denominados de fermentados acéticos seguidos pelo nome do produto de origem. A denominação e

classificação dos vários tipos de fermentado acético são apresentadas na Tabela 2 (MAPA, 2012).

Tabela 2. Classificação e denominação do fermentado acético.

Composição ou forma de obtenção	Classificação	Denominação	
		Fermentado acético	Vinagre
Fermentação acética do fermentado alcoólico de mistura hidro alcóolica originária do álcool etílico potável de origem agrícola;	de álcool	Fermentado Acético de Álcool	Vinagre de Álcool
Fermentação acética do fermentado alcoólico de uma ou mais frutas	de fruta	Fermentado Acético de fruta	Vinagre de fruta
Fermentação acética do fermentado alcoólico de um ou mais cereais;	de cereal	Fermentado Acético de cereal	Vinagre de cereal
Fermentação acética do fermentado alcoólico de um ou mais vegetais;	de vegetal	Fermentado Acético de vegetal	Vinagre de vegetal
Fermentação acética do fermentado alcoólico de duas ou mais das seguintes matéria-primas: fruta, cereal e vegetal	misto	Fermentado Acético misto de vegetais	Vinagre misto de vegetais
Fermentação acética do fermentado alcoólico de mel de abelha;	de mel	Fermentado Acético de Mel	Vinagre de Mel
Fermentado acético adicionado de suco de fruta ou suco de vegetal ou de mel de abelha, em conjunto ou separadamente;	Composto	Fermentado Acético de (nome genérico do fermentado acético) Composto	Vinagre de (nome genérico do vinagre) Composto
Fermentado acético adicionado de condimento;	Condimentado	Fermentado acético de (nome genérico do fermentado acético) condimentado	Vinagre de (nome genérico do vinagre) condimentado
Fermentado acético de fermentado alcoólico	Duplo	Fermentado Acético Duplo	Vinagre Duplo

com acidez volátil superior a oito gramas de ácido acético por cem mililitros do produto;			
Fermentado acético de fermentado alcoólico com acidez volátil superior a doze gramas de ácido acético por cem mililitros do produto;	Triplo	Fermentado Acético Triplo	Vinagre Triplo

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

A utilização do ácido acético de síntese, ou seja, do ácido acético glacial é proibida pela legislação brasileira para elaboração de vinagre, assim como a designação de vinagre de vinho para fermentados acéticos de outras frutas. Os limites analíticos exigidos pela Legislação Brasileira para o vinagre de vinho são bastante amplos, ou seja, os valores estabelecidos não são baixos, o que facilita o seu enquadramento analítico aos padrões estabelecidos. Outros componentes do vinagre, tais como metanol, acetoína, potássio, sódio, magnésio e fósforo também contribuem na caracterização do vinagre (EMBRAPA, 2006).

Tem sido um grande problema em relação ao vinagre brasileiro a designação do vinagre de vinho a produtos elaborados com álcool de cana-de-açúcar e produtos que contenham uma pequena quantidade de vinho. A principal razão é devido ao baixo preço do álcool proveniente da cana-de-açúcar em relação ao vinho, além de que 1 litro de vinho (teor alcoólico 12° GL) produz cerca de 2 a 2,5 litros de vinagre, enquanto 1 litro de álcool produz entre 18 a 20 litros de vinagre. Esse procedimento acarretou prejuízos às regiões produtoras de vinho, além de prejudicar a tipicidade e qualidade do vinagre de vinho. Com o intuito de diminuir possíveis fraudes, é determinada a proporção de isótopos estáveis do $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ presentes no ácido acético de vinagre, por meio da técnica de diluição isotópica, permitindo assim determinar se o ácido acético provém do álcool de cana-de-açúcar ou do vinho (EMBRAPA, 2006).

Outro método adotado recentemente para evitar fraudes e equívocos entre os diferentes tipos de vinagres foi o novo padrão estabelecido pelo MAPA. Para os fermentados acéticos, a principal mudança adotada foi relacionada com a determinação do limite para uso de corante caramelo, com o intuito de não confundir

os demais vinagres com o vinagre de vinho tinto, além disso, o vinagre de álcool escuro com coloração semelhante ao vinagre de vinho tinto não poderá mais ser comercializado (CASTELO, 2002; MAPA 2013).

1.2 Processos de produção

Os processos de fabricação de vinagre realizam-se tanto de maneira descontínua, como de maneira semicontínua. No primeiro caso, os microorganismos são inoculados ao mosto (matéria prima) e ao alcançar as características de acidez desejadas, retira-se todo o vinagre produzido, podendo-se iniciar novo processo. No segundo caso, ao chegar a uma determinada acidez, retira-se parte do produto e adiciona-se uma quantidade equivalente de matéria-prima. O rendimento, a qualidade e a produtividade no processo de fabricação do vinagre dependem de uma série de variáveis, por exemplo, o teor alcoólico deve estar entre 4% e 10%. Abaixo de 4% (m/v) podem ocorrer contaminações originando vinagres fracos com concentração de ácido acético inferior a 4%, além disso, esse baixo teor pode tornar o processo muito lento caso haja perdas de álcool por evaporação. No entanto, as bactérias acéticas não são resistentes a concentrações de álcool acima de 10% (EMBRAPA, 2006).

Em relação à acidez volátil inicial do vinho, uma concentração acética inferior a 2%(v/v) e 1%(v/v) para os processos lentos e submersos respectivamente, resultam em fermentações com tempo de indução muito longo, causando maiores perdas de álcool por evaporação além de favorecer contaminações. A concentração acética superior a 3% é tóxica para as bactérias na fase inicial de acetificação. A temperatura no acetificador deve estar entre 28 e 35° C, que é a faixa de crescimento ótimo das bactérias acéticas. O fornecimento adequado de oxigênio é crucial para o sucesso da fermentação acética, pois, um aumento inadequado na aeração também causa maior evaporação do álcool, resultando em diminuição de produtividade. O tempo de fermentação depende do processo e deve ser controlado, pois se as bactérias acéticas permanecerem no meio após o esgotamento do álcool podem consumir o ácido acético produzido e levar a uma perda de acidez do produto (EMBRAPA, 2006).

Existem três principais processos de conversão microbiológica de uma solução diluída de etanol em vinagre: o processo lento, denominado Orleans ou

Francês, o processo rápido ou Alemão e o submerso, que é atualmente a via de conversão mais utilizada pela indústria de vinagre.

1.2.1 Processo lento ou Orléans

Este processo é o mais antigo para a produção de vinagres e fornece um vinagre de excelente qualidade quando empregado somente vinho como matéria prima (BELMONT, 2002).

Seu aprimoramento iniciou há cerca de 200 anos, quando foi observado que, o avinagramento era mais rápido quando as barricas contendo vinho não estavam cheias, isso devido à maior superfície em contato com o ar e, portanto, sujeita a maior aeração. Foi então que novos artifícios para facilitar ainda mais essa aeração foram empregados, como manter o barril em posição horizontal, utilizar volumes de matérias-primas ainda menores, promover aberturas laterais para passagem de ar, entre outras. Usa-se como dorna um barril de carvalho, ou outra madeira que não confira propriedades estranhas ao produto, provido de aberturas laterais para a entrada de ar, um tubo em forma de “J” para a adição de vinho e uma torneira para a retirada de vinagre (CASTELO, 2002).

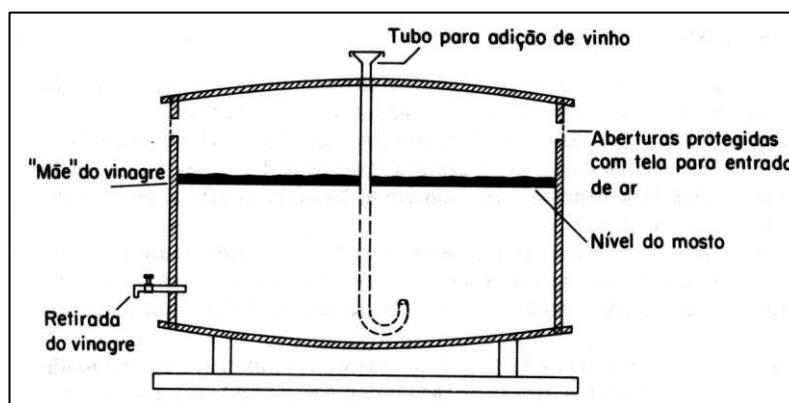


Figura 2: Esquema de recipiente usado no processo Orléans (AQUARONE *et al.*, 2001).

Geralmente, o processo é iniciado adicionando-se a um barril de 200 litros de capacidade cerca de 60 litros de vinagre não pasteurizado (vinagre forte) e de boa qualidade, contendo, portanto, as bactérias acéticas ativas. Semanalmente, adicionam-se 15 litros de vinho, sendo que os primeiros 15 podem ser adicionados junto com o vinagre forte. Após a quinta semana, quando dois terços da capacidade

do barril estiver preenchido, retiram-se 15 litros de vinagre e adicionam-se 15 litros de vinho, repetindo-se semanalmente esta operação, tornando assim o processo semi-contínuo. A temperatura ambiente para este processo não deve exceder 25°C, evitando-se assim perdas de álcool por evaporação.

Na superfície, em contato simultâneo com o ar e o vinho, forma-se uma película gelatinosa de *Acetobacter*, que é a chamada de mãe do vinagre (CASTELO, 2002). Uma grade quadriculada de madeira é colocada na superfície para suportar o peso da película formada, pois sua submersão poderá causar turvação do produto prejudicando o processo de acetificação. O processo é lento e semi-contínuo, exige espaço e tem uma produtividade muito baixa. No entanto, proporciona os melhores vinagres (CASTELO, 2002).

1.2.2 Processo rápido ou Alemão

Idealizado por Boerhave e, introduzido por Schuetzenbach em 1832, o processo alemão produz uma acetificação mais rápida. O gerador ou fermentador é um recipiente de 100 a 100.000 litros de capacidade preenchidos com serragem ou outro material que tenha uma superfície de contato grande e sobre a qual se fixam as bactérias acéticas. (PEDROSO, 2003; AQUARONE *et al.*, 1983).

O vinho circula repetidas vezes no gerador enquanto se injeta ar no sentido contrário. O calor não se espalha tão facilmente como no método tradicional, e é necessário, então, um método de esfriamento, estabelecendo um gradiente de temperatura que impulsiona a circulação do ar. Em relação ao processo lento, a produtividade é maior, mas a qualidade do vinagre é inferior (AQUARONE *et al.*, 2001). Esse processo em geral leva 10 dias para que se possa retirar 10% do volume colocado inicialmente para avinagramento (SPINOSA *et al.*, 2012).

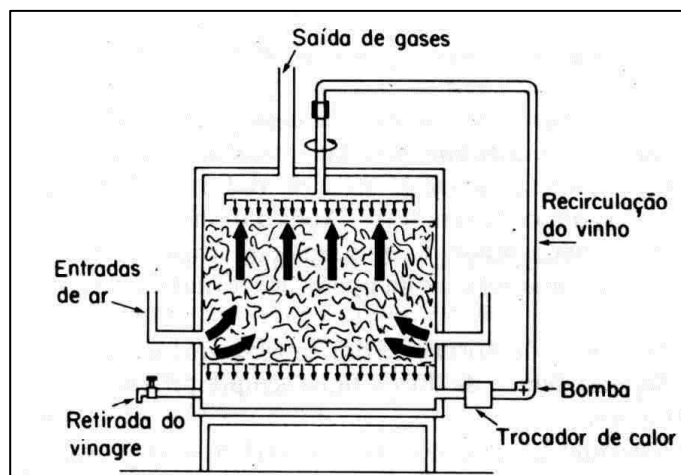


Figura 3. Gerador utilizado no processo rápido para produção de vinagre (AQUARONE *et al.*, 2001).

1.2.3 Processo submerso

Neste processo as bactérias estão submersas em uma mistura hidroalcoólica, dentro de enormes cubas de aço inoxidável. Estes acetificadores, conhecido pelo nome de Frings, contam com agitação, oxigenação e controles de temperatura, pois pequenas interrupções no fornecimento de oxigênio, ainda que por alguns minutos, principalmente nas fases finais de fermentação, podem afetar sobremaneira o rendimento. Este processo apresenta uma série de vantagens: Alta eficiência, produzindo diariamente cerca de 6% ou mais de vinagre; os rendimentos calculados em relação ao teórico alcançam de 90 a 95%; praticidade, dispensando tratamentos de clarificação e de filtração, via de regra, onerosos e demorados (AQUARONE *et al.*, 2001).

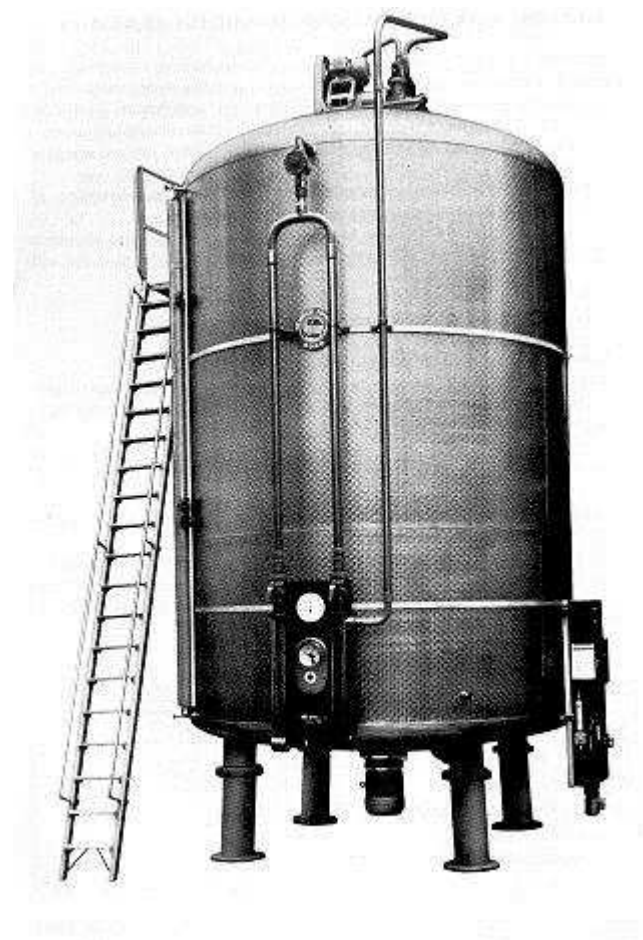


Figura 4: Acetificador usado em processo submerso (TAKEMOTO, 2000).

1.3 Alterações do vinagre

Existem três grupos de problemas no processo que podem causar alterações na fabricação do vinagre: microbiológico, macrobiológica e químico. Dentre os problemas microbiológicos, pode-se citar principalmente a contaminação de certas espécies de bactérias acéticas, por exemplo, a *Acetobacter xylinum* que é um organismo fortemente capsulado que causa mucosidade obstruindo o equipamento com um sedimento lodoso. Essa viscosidade excessiva é mais fácil de aparecer quando a matéria prima é rica em nutrientes, como os vinhos e sidras (AQUARONE *et al.*, 2001). Entre as alterações de ordem macrobiológica destaca-se a infestação pela 'enguia do vinagre' (*Anguillula aceti*), proveniente de frutos não bem selecionados ou da poeira do ar. Sua *avidez* por oxigênio limita a atividade das bactérias acéticas, aumentam a viscosidade, e diminuem as características organolépticas (SCHEIDT *et al.*, 2010).

As alterações de ordem química são provocadas principalmente por metais. O ferro quando em concentrações elevadas, causam escurecimento e turvação e transmitem um gosto metálico ao vinagre; essa turvação ocorre devido à formação de complexos entre os grupos fenólicos como o tanino e o ferro(III). Os grupos fosfatos também causam turvação com o ferro(III) que inicialmente se encontra na forma coloidal límpida, mas que irá flocular na presença das proteínas, de Ca^{2+} e K^+ . O excesso de cobre gera precipitado causando também a turvação no vinagre. Para evitar tais acontecimentos é imprescindível a limpeza do equipamento e deve-se trabalhar com alta concentração alcoólica, acidez acética inicial adequada (de 2% a 3%), empregar culturas ativas que acetifiquem rapidamente os mostos (SCHEIDT *et al.*, 2010).

1.4 Métodos titulométricos

Em química analítica a titulação é amplamente utilizada para determinação de várias espécies químicas em concentrações moderadas a elevadas. É muito empregada em diversas matrizes (alimentos, medicamentos, produtos agrícolas, etc) para determinação de parâmetros químicos tais como acidez, alcalinidade, dureza de águas, índice de iodo, índice Kappa, demanda química de oxigênio (DQO), etc., (SKOOG, 2006).

Estes métodos se baseiam na quantidade de matéria necessária para consumir estequiometricamente o analito (OLIVEIRA, 2009). As titulações podem ser classificadas de acordo com a reação principal envolvida (ácido-base Bronsted; de precipitação; de complexação, de oxi-redução, etc.); tipo de detecção do ponto de equivalência (visual, potenciométrico, fotométrico, termométrico, etc.) pelo controle de quantidade titulante utilizado (gravimétrico, volumétrico, contagem de gota) (SKOOG, 2006).

1.5 Determinação da acidez em vinagres usando métodos titulométricos

A acidez é um parâmetro importante em diversas agroindústrias e está relacionada com a concentração de espécies químicas capazes de liberar próton em solução, sob condições definidas, podendo ser vista como uma medida de

capacidade da solução (em contraponto ao pH que seria uma medida de intensidade (STUMM *et al.*, 1995).

Em vinagres, a acidez é devida, principalmente, ao ácido acético. Sua determinação é importante não só na indústria alimentar como também em aplicações industriais, pois ele é utilizado como solvente e reagente para a produção de plástico, borracha, produtos farmacêuticos e etc (STADEM *et al.*, 2002).

Existem vários métodos para determinação do ácido acético em vinagre, como por exemplo, espectrometria de absorção molecular na fase gasosa, sensores de cristal piezoelétrico. Esses métodos são baseados na volatilidade dos compostos sendo necessário o controle da pressão, umidade e temperatura. Sistemas envolvendo titulação de injeção em fluxo e injeção sequencial também têm sido propostos (STADEM *et al.*, 2002).

Em 1729 Claude Joseph Geoffroy apresentou um artigo a Academia Francesa sobre a determinação do ácido acético em vinagres a partir da reação com carbonato de potássio pulverizado utilizando como método a titulação gravimétrica, o final da titulação era determinado quando não houvesse mais efervescência após adição do carbonato (TERRA *et al.*, 2005). Os primeiros procedimentos envolvendo os princípios da titulação volumétrica também foram para investigações da composição do vinagre (TERRA *et al.*, 2005).

Stadem e colaboradores usando um sistema em fluxo sequencial e como detector um eletrodo de vidro determinaram a acidez em amostras de vinagres (STADEM *et al.*, 2002).

Apesar da existência de inúmeros métodos para determinação de acidez em vinagres, ainda predomina a titulação volumétrica de neutralização com uso de indicador, embora, às vezes seja necessária a utilização da titulação potenciométrica para determinação de acidez em amostras de cor escura, como por exemplo, amostras de vinagre de vinho tinto e de vinagre de álcool escuro.

Seria necessário então um método que pudesse além de minimizar a influência do analista nos resultados ao usar a titulação volumétrica, fosse capaz de aumentar a frequência analítica, já que a titulação potenciométrica requer um pouco mais de tempo. O método dois pontos é um novo método desenvolvido capaz de unir essas duas características diminuição da influência do analista e aumento da frequência analítica.

1.6 Método Dois Pontos

O método dos dois pontos é baseado, fundamentalmente na força do tampão ou capacidade tamponante efetiva (OLIVEIRA, 2009). Isso significa que a variação de pH que será observada devido à adição de ácido acético sobre a solução tampão de citrato depende da resistência à variação do pH tanto do sistema ácido base de Bronsted do citrato quanto do acetato. A força do tampão é, por sua vez, explicada considerando-se o balanço de carga da solução antes e após a variação do pH do meio.

O Método Dois pontos dependerá exclusivamente de duas variáveis: a concentração e o pH inicial das soluções tampão. Para determinar essas variáveis é fundamental um estudo para avaliar a eficiência de sistemas tampão e como se comporta a carga efetiva nesses sistemas. O estudo dessas variáveis envolve a teoria e utilização de estratégias como, por exemplo, métodos de otimização.

1.6.1 Avaliação da eficiência de sistemas tampão

As soluções-tampão são soluções que diminuem a variação de pH quando a elas são adicionados ácidos ou bases de Bronsted. Uma solução tampão é usualmente constituída por um ou mais sistemas ácido-base de Bronsted. Além disso, soluções com grande concentração de prótons e ou de hidroxila também apresentam comportamento tampão e são chamadas de soluções pseudo-tampão (BATES, 1954).

A eficiência de uma solução tampão ou de um sistema tampão pode ser avaliada por parâmetros tais como o poder tamponante de Van Slyke (ou a capacidade tamponante de Kolthoff) e a força do tampão (ou capacidade tamponante efetiva) (OLIVEIRA, 2009).

1.6.2 Poder tamponante

O poder tamponante (β) expressa a concentração de ácido ou base fortes que pode ser adicionada à solução para uma variação infinitesimal de pH. Esse parâmetro foi introduzido por Van Slyke em 1922 (Eq. 1):

$$\beta = \frac{dC_b}{dpH} = -\frac{dC_a}{dpH} \quad \text{Eq.1}$$

em que C é a concentração de uma base (b) ou ácido (a) fortes adicionado ao meio (VAN SLYKE, 1992). Esta expressão, no entanto é útil apenas para identificar a região onde o efeito do poder tamponante é máximo, sendo muito complicado para avaliar a quantidade de ácido ou base forte necessário para uma variação não-infinitesimal de pH, pois é necessário a integração da função. Por essa razão, a força do tampão é um parâmetro que tem sido pouco utilizado, embora talvez seja o mais importante no estudo de sistemas tampão. Kolthoff tentou unir os dois conceitos na capacidade tamponante, sendo, historicamente tratado como uma variação do poder tamponante apenas.

Oliveira (2009), entretanto, apresenta uma maneira mais prática de abordar a força do tampão, utilizando o balanço de carga da solução nas duas situações de uma solução tampão, ou seja, antes e após a mudança do pH da solução. Assim, considerando o balanço de carga da solução tampão no pH “inicial” (ou “antes, designado pela letra A”) e aquele após a adição do ácido ou base ao meio (pH “final” ou “depois, designado pela letra D”), relaciona-se diretamente a concentração do sistema adicionado (não necessariamente um ácido ou base forte) com a variação nas frações de equilíbrio e das concentrações de prótons e hidroxilas (OLIVEIRA, 2009). No cálculo da capacidade tamponante para um sistema monoprótico (ácido que libera apenas um íon H^+), por exemplo, o tampão acetato com pH “inicial” igual a 4,0 e concentração C_T , preparado a partir do ácido acético e de hidróxido de sódio (concentração C_b^A) é apresentado a seguir. Considerando o balanço de carga da solução tampão em um valor de pH (OLIVEIRA, 2009):

$$\begin{aligned} [Na^+] + [H^+] - [OH^-] - [Ac^-] &= 0 \\ wat &= [H^+] - [OH^-] = 10^{-pH} - 10^{pK_w - pH} \\ Cb + Wat - \alpha_1 \cdot C_T &= 0 \Rightarrow -Cb = Wat - \alpha_1 \cdot C_T \end{aligned} \quad \text{Eq.2}$$

onde C_b é a concentração da base forte adicionada para o ajuste do pH e α_1 , a fração de equilíbrio do acetato nesse valor de pH, definida como a razão entre a concentração no equilíbrio de uma espécie química e sua concentração analítica do sistema em equilíbrio. No caso do equilíbrio ácido-base de Bronsted, sua expressão

depende apenas do pH e do(s) pK_a (s) dos sistema. Como observado com o acetato no seu sistema ácido-base de Bronsted (Equação 3).

$$\alpha_1 = \frac{[Ac^-]}{c(Ac^-)} = \frac{1}{1+10^{pK_a-pH}} \quad \text{Eq.3}$$

A nova quantidade de base a ser adicionada ao meio para alterar o pH do tampão (ΔC_b) é obtida por novo balanço de carga (desconsiderando-se efeitos de diluição) (OLIVEIRA, 2009).

$$\begin{cases} -Cb^A = Wat^A - \alpha_1^A \cdot C_T \\ -Cb^D = Wat^D - \alpha_1^D \cdot C_T = Cb^A + \Delta C_b \end{cases} \quad \text{Eq.4}$$

$$\Delta C_b = \Delta Wat - \Delta \alpha_1 C_T$$

A força do tampão pode também ser generalizada para a mistura de vários sistemas ácido-base mono ou polipróticos utilizando o conceito de carga efetiva ao invés de apenas a fração de equilíbrio, mantendo a mesma simplicidade (OLIVEIRA, 2009).

1.6.3 Carga efetiva

A carga efetiva considera as cargas de todos os íons de um sistema ácido-base de Bronsted, sendo útil para simplificar a expressão da contribuição de sistemas polipróticos em um balanço de carga, resumindo-a na carga elétrica média ponderada desse sistema (e também pode ser vista como a carga de uma espécie hipotética). Então, a carga efetiva de um composto é dada pela soma do produto das cargas e suas respectivas frações de equilíbrio das espécies e suas cargas, ela pode ser representada pela Equação 5 (OLIVEIRA, 2009).

$$q_{ef} = \sum q_i \alpha_i \quad \text{Eq.5}$$

em que q_i é a carga do íon i e α_i o fração de equilíbrio do íon 'i'

Com auxílio da carga efetiva, uma equação mais geral e mais simples para a força do tampão pode ser obtida (Eq. 6).

$$-\Delta q_x C_x = \Delta W_{at} + \sum \Delta q_{ef,i} C_i \quad \text{Eq.6}$$

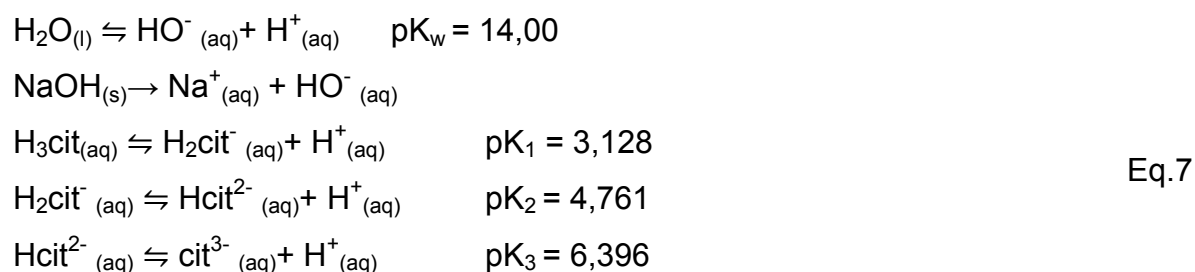
Em que 'i' se refere a cada sistema ácido-base existente na solução e 'x', à espécie adicionada ao meio, que pode ser um ácido ou base fortes, ou mesmo outro sistema ácido-base de Bronsted (OLIVEIRA, 2009).

A Equação 6 permite observar os fatores que aumentam a força do tampão: (i) o aumento da concentração analítica dos sistemas ácido-base de Bronsted que o compõe; (ii) a região de pH onde há uma maior variação da carga efetiva e (iii) a região onde a concentração de H^+ ou OH^- são elevadas (regiões pseudo-tampão) (OLIVEIRA, 2009).

Ainda que os cálculos de fração de equilíbrio e carga efetiva sejam simples, são também tediosos, de maneira que planilhas eletrônicas (AlfaDist e TitGer) fazem esses cálculos, assim como é possível calculá-las diretamente em células do Excel com auxílio da biblioteca de funções Alfa[®] (OLIVEIRA, 2012).

Um exemplo é o tampão envolvendo o sistema citrato. O tampão citrato é muito interessante, pois suas constantes de dissociação possuem valores próximos (Figura 5), fazendo com que ele seja um eficiente sistema tampão abrangendo uma ampla faixa de pH (Figura 6)

Um tampão simples de citrato, formado pela mistura de ácido cítrico e hidróxido de sódio apresenta as equações químicas:



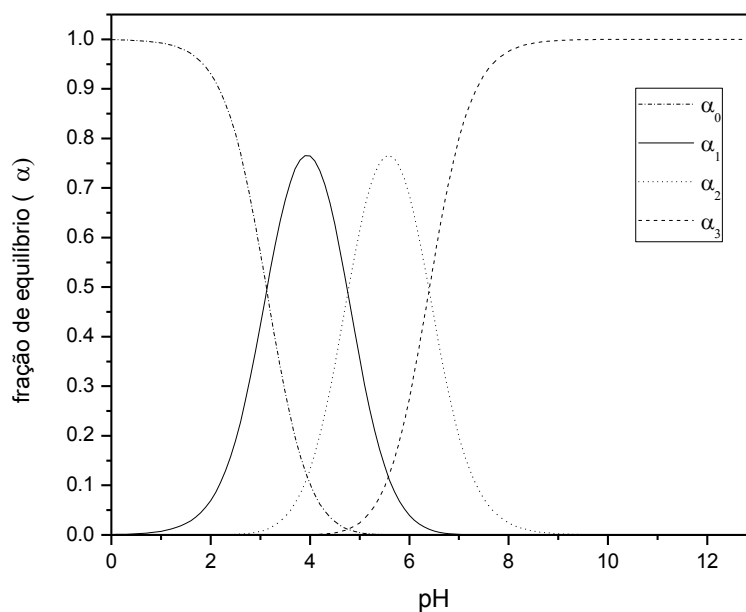


Figura 5. Diagrama de distribuição de espécie para ácido cítrico em diferentes pH: α_0 (H_3cit) (---), α_1 (H_2cit^-) (—), α_2 ($Hcit^{2-}$) (.....) e α_3 (cit^{3-}) (-·-·-).

A faixa tamponante do tampão citrato, pode ser visto no gráfico de carga efetiva em função do pH, assim como pelo gráfico do poder tamponante (β) (Figura 6).

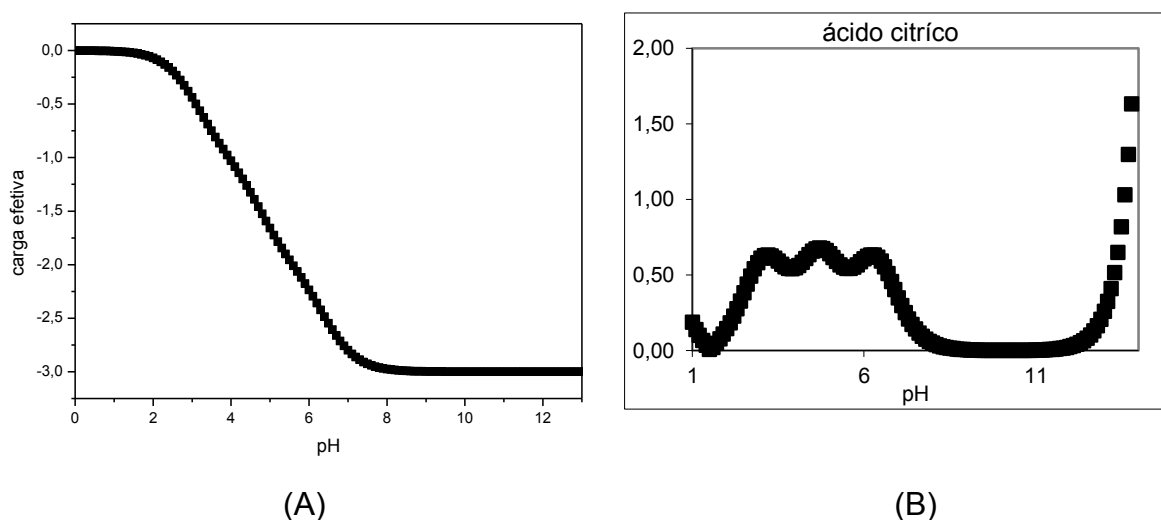


Figura 6. Comportamento do sistema citrato em função do pH: (A) carga efetiva; (B) poder tamponante. (---) efeito total; (-·-·-) efeito pseudo tampão; (.....) efeito devido ao sistema citrato.

Apenas para exemplificar a relação entre as frações de equilíbrios das espécies do sistema citrato e sua carga efetiva, o balanço de carga da solução é apresentado na Equação 8.

$$\begin{aligned}
 [Na^+] + [H^+] - [OH^-] - [H_2cit] - 2[Hcit^{2-}] - 3[cit^{3-}] &= 0 \\
 Cb + Wat + (-\alpha_1 - 2\alpha_2 - 3\alpha_3)c(cit^{3-}) &= 0 \\
 -Cb &= Wat + q_{ef}c(cit^{3-})
 \end{aligned}
 \tag{Eq.8}$$

1.6.4 Simulação de titulação-TitGer 2.5

A busca por métodos de otimização que utilizem menos experimentos, menores custo e tempos tem aumentado enormemente nos últimos 20 anos. Entretanto, o uso de ferramentas de simulação computacional tem sido muito pouco utilizado com esse objetivo na química analítica. Silva e Oliveira, (2001) utilizaram a planilha TitGer para estudar a eficiência de alguns métodos de determinação de ponto de equivalência na determinação de alcalinidade em águas, utilizando um algoritmo Monte Carlos para a geração de números aleatórios com distribuição normal (SILVA et al., 2001). Santiago e Oliveira (2010) utilizaram o software Vminteq (baseado no MINTEQA2) para simular as condições ótimas do uso do EDTA tetraneutralizado em titulação complexométrica (SANTIAGO et al., 2010).

Além disso, a titulação é uma importante ferramenta no aprendizado de equilíbrio químico, uma vez que ela dispõe de um apelo visual muito interessante.

Entretanto, os cálculos exaustivos que são necessários para determinação das concentrações das espécies de interesse e do pH, por exemplo, a torna um obstáculo para aprendizagem. Sem o uso do computador, é necessário o uso de aproximações não triviais, exigindo do aluno um conhecimento avançado de cálculo numérico, além do fato do excesso de aproximações diminuir a exatidão dos cálculos, criando um paradoxo em relação à importância da exatidão na química analítica. Uma maneira para solucionar este problema tem sido o desenvolvimento de planilhas eletrônicas capazes de simular as titulações ácido-base. Com elas são feitas quantidades enormes de cálculos em questão de segundos (OLIVEIRA et al., 2007), sem a necessidade de aproximações.

Oliveira, em 1999, desenvolveu o TitGer, uma planilha elaborada no Microsoft Excel 97 que permite a simulação de curvas de titulação envolvendo uma solução

(titulante) formada por até duas substâncias polipróticas e uma solução (titulada), que pode ser formada por até 5 sistemas polipróticos. Todos os sistemas podem ter até 8 valores de pK_a cada (Oliveira, 2013). Em diferentes pastas de trabalho da planilha são apresentadas as curva de distribuição de espécies, inclusive sobrepostas à curva de titulação, sendo possível a observação do comportamento das frações de equilíbrio durante a titulação. Em outra pasta de trabalho são apresentadas curvas das suas derivadas primeira e segunda, e os gráficos de Sorensen, Gran I e Gran II, assim como do poder tamponante (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O algoritmo do programa é baseado na resolução do balanço de carga da solução a cada adição do titulado sobre o titulante, usando um método dicotômico simples (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Além do TitGer, outros simuladores de titulação tem sido propostos, como por exemplo o CurTiPot, desenvolvido pelo professor do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Ivano Gutz. A Figura 7 mostra a tela principal do programa TitGer 2.5 e um detalhe da pasta “Distribuição de espécies, onde esse gráfico para um dos titulados (fração de equilíbrio versus pH) é apresentado, assim como a sua sobreposição com a curva de titulação.

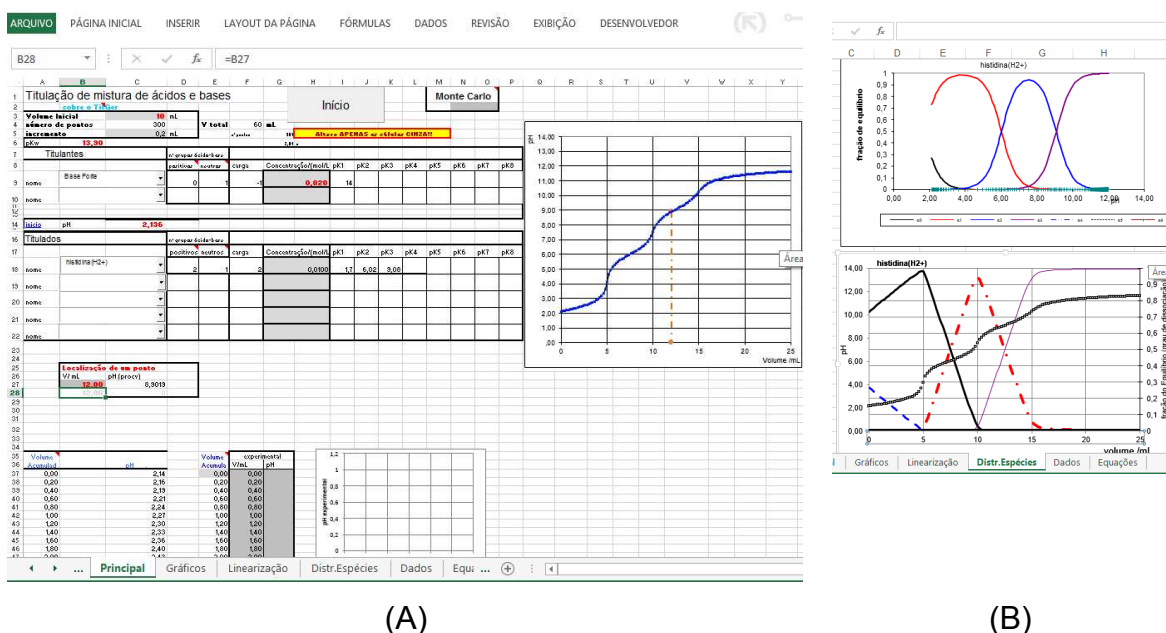


Figura 7. Telas do TitGer 2.5. (A) tela Principal (B) Detalhe da tela Distribuição de Espécies

1.6.5 Planejamento experimental Doehlert

O uso de planejamentos multivariados tem se tornado cada vez mais difundido em química analítica, pois, eles permitem o estudo simultâneo de diversas variáveis, além de serem mais rápidos, ou seja, envolverem, *a priori*, um número menor de experimentos, se comparados com planejamentos univariados. Os planejamentos fatoriais têm sido muito utilizados, porém permitem apenas a modelagem utilizando modelos lineares (ou de primeira ordem) (Bruns *et al.*, 2010). Para obter modelos de segunda ordem, geralmente são usados planejamentos composto centrais (CCD). A desvantagem desse planejamento é o uso do mesmo número de níveis para cada variável. Entretanto, o uso do planejamento de Doehlert tem aumentado nos últimos anos, e tem a vantagem de permitir um número elevado de níveis para uma variável e baixo para os outros.

Outra vantagem do planejamento Doehlert esta na possibilidade da obtenção de modelos experimentais de segunda ordem, além da necessidade de um número menor de experimentos e estes poderem se mover através de um domínio experimental utilizando um menor número de pontos, já que o próximo hexágono utiliza pontos experimentais já explorados no hexágono anterior, conforme ilustrado na Figura 8. (FERREIRA *et al.*, 2004; TEOFILO & FERREIRA, 2006).

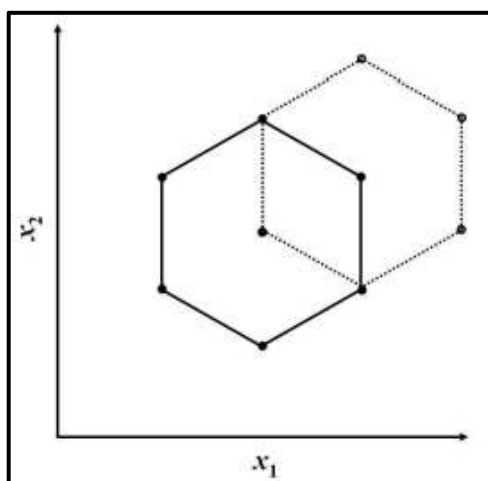


Figura 8. Planejamento Doehlert para duas variáveis: Hexágono (—) obtido pelo primeiro planejamento e hexágono (...) obtido utilizando pontos experimentais já explorados anteriormente (TEÓFILO & FERREIRA, 2006)

Os pontos da matriz Doehlert correspondem aos vértices de um hexágono gerado de um simplex regular e em geral, o número total de experimentos é dado por $N = k^2 + k + C_0$, em que k é o numero de variáveis e C_0 o numero de experimentos

no ponto central. Para duas variáveis, a matriz de Doehlert possui um ponto central e mais seis pontos adicionais. O número de variáveis é que define o planejamento da matriz experimental, estas variáveis são codificadas, a equação abaixo define a relação entre os valores experimentais e codificados (TEOFILO & FERREIRA, 2006, 2013; FERREIRA *et al.*, 2004).

$$V_i = \frac{V(+)-V(-)}{Code(+)-Code(-)} * Code_i + \frac{V(+)+V(-)}{2} \quad \text{Eq.9}$$

em que : V_i = variável i ; $V(+)$ = valor máximo; $V(-)$ = valor mínimo; $Code(+)$ = máximo codificado; $Code(-)$ = valor mínimo codificado; $Code_i$ = valor codificado da variável i .

Na Tabela 3 estão os valores codificados para um planejamento experimental com duas variáveis (FERREIRA *et al.*, 2004).

Tabela 3. Número de experimentos e os valores codificados para a matriz de Doehlert usando duas variáveis.

Nº de experimentos	Variáveis experimentais	
	A	B
1	0,0	0,000
2	1,0	0,000
3	0,5	0,866
4	-1,0	0,000
5	-0,5	-0,866
6	0,5	-0,866
7	-0,5	0,866

A primeira utilização do planejamento experimental de Doehlert em química analítica foi na otimização de um processo envolvendo HPLC. (FERREIRA *et al.*, 2004). Assis e colaboradores utilizaram o planejamento Doehlert para estudar a influência dos componentes da gasolina no número de octano e propor um método para auxiliar na formulação da gasolina, facilitando assim a produção de um

combustível de melhor qualidade e com um menor impacto ambiental (ASSIS *et al.*, 2013). O emprego de quatro variáveis foi utilizado por Caldas e colaboradores na determinação de cobre em óleos isolantes derivados de petróleo (CALDAS *et al.*, 2013). A influência das variáveis iniciais também foi determinada na anodização de alumínio (BENSALAH *et al.*, 2012). Otimização multivariada também foi empregada para desenvolver um método para determinação de cobre em cachaça (CALDAS *et al.*, 2011). O planejamento Doehlert foi aplicado para estabelecer as melhores condições em um método de extração desenvolvido para determinar a concentração de eicosanoides (ARAÚJO *et al.*, 2012). Selênio IV também foi determinado utilizando a otimização multivariada (HELLAL *et al.*, 2004). As melhores condições para produção de ácido cítrico a partir de glicerol é um exemplo da matriz de Doehlert em aplicações industriais (IMANDI *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de método analítico potenciométrico não titulométrico (M2P) para determinação de acidez em amostras de vinagre.

2.1.1 Objetivos específicos

- Otimização do método de dois pontos através
 - de planejamento univariado,
 - de simulação em computador
 - de planejamento multivariado utilizando a matriz de Doehlert;
- Avaliar as figuras de mérito do método dois pontos na condição otimizada e aplicar em amostras comerciais de vinagre para determinação de acidez.

3. MATERIAIS E METÓDOS

3.1 Preparo das soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico (P.A.) e não foram submetidos a nenhuma etapa prévia de purificação. Todas as soluções foram preparadas em água destilada.

3.1.1 Solução tampão de ácido cítrico

As soluções estoque de tampão citrato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas a partir da dissolução de 10,507 g de ácido cítrico (Merck), dissolvido em água. O pH foi ajustado com NaOH (Vetec) utilizando um pHmetro (Digimed/ DN20) antes de completar o volume para 500 mL. As soluções foram armazenadas em frasco de plástico e acondicionadas em geladeira a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As demais soluções foram obtidas pela diluição da mesma.

3.1.2 Solução padrão de ácido acético

As soluções estoque de ácido acético foram preparadas em água destilada nas concentrações de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ a partir do ácido acético glacial (Isofar, 18 mol L^{-1}) e padronizadas com NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ previamente padronizada. As soluções foram armazenadas em frasco de vidro âmbar.

Todas as outras soluções de ácido acético, usadas na construção da curva analítica foram preparadas no mesmo dia em que foram utilizadas, mediante diluição adequada da solução estoque.

3.1.3 Solução de hidróxido de sódio

A solução estoque de NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo 2,0 g da base em água e completando o volume para 250 mL. A solução foi padronizada com ftalato ácido de potássio (Vetec). O ftalato ácido de potássio foi previamente seco a $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h e mantido em dessecador até o momento de uso. A solução de hidróxido de sódio foi armazenada em frasco de plástico e mantida a temperatura ambiente.

3.1.4 Preparo da curva analítica para amostras diluídas

Para construção da curva analítica foi utilizada uma solução de tampão citrato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e pH ajustado para 5,5. Foi adicionado sobre o tampão diferentes níveis de concentração de solução ácido acético (entre $1,0 \cdot 10^{-3}$ e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$). Para cada concentração de ácido acético os volumes utilizados foram 2,5 mL e 5,0 mL, sendo o pH medido a cada adição.

A partir da variação dos resultados analíticos obtidos para as diferentes concentrações analisadas foram construídas curvas analíticas pela relação da concentração de ácido acético e variação do pH (após adição de 2,5 mL e após a adição de 5,0 mL). Através dessa relação plotou-se um gráfico e o ajuste dos pontos foi realizado através de uma regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados. A equação obtida por esse ajuste permitiu a avaliação de parâmetros como a linearidade da faixa concentração utilizada e a sensibilidade do método.

3.1.5 Preparo da curva analítica para amostras sem diluição

Para construção da curva analítica foi utilizada uma solução de tampão citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH ajustado para 7,0. Foi adicionado sobre o tampão diferentes níveis de concentração de solução ácido acético (entre 0,5 e $1,05 \text{ mol L}^{-1}$). Para cada concentração de ácido acético o volume utilizado foi 1,0 mL, sendo o pH medido antes e após a adição.

A partir da variação dos resultados analíticos obtidos para as diferentes concentrações analisadas foram construídas curvas analíticas pela relação da concentração de ácido acético e variação do pH (pH inicial e pH após adição de 1 mL). Através dessa relação plotou-se um gráfico e o ajuste dos pontos foram realizados através de uma regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados. A equação obtida por esse ajuste permitiu a avaliação de parâmetros como a linearidade da faixa concentração utilizada e a sensibilidade do método.

3.2 Preparo das amostras

Foram adquiridas várias amostras comerciais de vinagre (de vinho tinto, fruta maçã, de alho, de arroz, de álcool colorido e de álcool escuro) das marcas Toscano, Santa Amália, Velho e Kenko nos mercados da cidade de Viçosa-MG e mantidas em geladeira à temperatura de 4 °C.

3.2.1 Procedimento do M2P para amostras diluídas.

No método otimizado, uma alíquota de 200 µL da amostra de vinagre foi adicionada sobre 10,0 mL de água destilada e homogeneizada. Com auxílio de uma micropipeta de volume variável (1- 5 mL, Labmate) um volume de 2,5 mL da amostra diluída foi adicionado sobre 10 mL de tampão citrato (0,01 mol L⁻¹ e pH 5,5) e o valor de pH medido. A resposta analítica foi a diferença nos valores de pH antes e após a adição da amostra sobre a solução tampão (Δ pH).

3.2.2 Procedimento do M2P para amostras sem diluição

No método otimizado, um volume de 1,0 mL da amostra concentrada foi adicionado sobre 10,0 mL de tampão citrato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) e o pH medido. A resposta analítica foi a diferença nos valores de pH antes e após a adição da amostra sobre a solução tampão (Δ pH).

3.3 Simulação computacional

As condições experimentais foram simuladas na planilha TitGer[®] 2.5, escrita no Microsoft Excel (OLIVEIRA *et al.*, 2009), tanto para as titulações do ácido cítrico quanto para observar o comportamento do M2P, onde alíquotas de 1,0 mL ou 2,5 mL de solução de ácido acético foram adicionadas sobre 10 mL de solução tampão citrato, formado pela mistura de ácido cítrico e de hidróxido de sódio. Os valores das concentrações do ácido acético utilizadas foram os mesmos utilizados nos experimentos reais. Não foram realizadas correções das constantes pelos coeficientes de atividade, ou seja, foram consideradas as constantes termodinâmicas da literatura.

3.4 Matriz de Doehlert

Após simulação computacional as condições obtidas foram inseridas na matriz de Doehlert. Foi utilizado como variável A o pH e como variável B a concentração do tampão citrato. Para amostras diluídas foi utilizado para a variável A o valor máximo e mínimo 6 e 4. Para a variável B o valor máximo e mínimo utilizado foi 20 e 5 mmol L⁻¹. Para amostras sem diluição foi utilizado para a variável A o valor máximo e mínimo 7 e 4. Para a variável B o valor máximo e mínimo utilizado foi 100 e 22 mmol L⁻¹.

Como o método dois pontos está relacionado com a carga efetiva e ela é baseada nos valores de pH do sistema tampão, ficou determinado o uso de um maior número de níveis para a variável A, uma vez que ela poderia ter maior influência sobre os sistemas utilizados no método dois pontos.

3.5 Medidas com pHmetro

O pHmetro com eletrodo combinado de vidro (utilizando KCl 3,0 mol L⁻¹ como ponte salina) foi calibrado semanalmente com soluções padrão de pH (Digimed) em valores de 4,0 e de 7,0.

3.6 Titulação volumétrica com detecção potenciométrica

Todas as amostras de vinagre foram tituladas potenciometricamente com NaOH 0,2 mol L⁻¹.

Foi utilizado um volume de 500 µL de amostra de vinagre adicionado a 10 mL de água destilada em um béquer com barra magnética sobre um agitador magnético e adicionado alíquotas de 50 ou 100 µL de NaOH 0,1699 mol L⁻¹ padronizado.

A acidez de cada amostra foi calculada a partir do volume de base gasto para atingir o ponto de equivalência. O volume de equivalência foi determinado por duas técnicas.

A primeira utilizou como ponto de equivalência o termo constante do modelo de regressão linear do volume versus a função de linearização de Gran II (G) (Eq. 10), lançada em gráfico como abcissa.

$$G_i = V_{T,i} ([H^+]_i + k_1 [OH^-]_i) = V_{T,i} (10^{-pH_i} + k_1 10^{pH_i - 14}) \quad \text{Eq.10}$$

Onde V_T , é o volume total da solução após adição da alíquota do titulante e k_1 uma constante de ajuste.

O segundo método utilizou o ponto central (x_c) definido pelo ajuste da função não-linear de Lorentz (Eq.11) aos dados derivados numericamente (Derivada Primeira) (Eq.12) (Silva & Oliveira, 2001; Capelato, 1995). O modelo foi ajustado com auxílio do software OriginPro 8 (OriginLab Co.)

$$y = y_o + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x - x_c)^2 + w^2} \quad \text{Eq.11}$$

Onde y_o , A , w e x_c são os parâmetros estimados pelo modelo de regressão. O parâmetro x_c é igual ao volume de equivalência.

$$D = \frac{\Delta pH}{\Delta V} = \frac{pH_i - pH_{i-1}}{V_i - V_{i-1}} \quad \text{Eq.12}$$

Onde i representa cada ponto calculado (a partir do segundo).

3.7 Figuras de mérito

Para a caracterização (e validação) do Método dos Dois Pontos proposto neste trabalho foram considerados os seguintes parâmetros: sensibilidade mínima do método (parâmetro definido no item 4.2); qualidade do ajuste do modelo; faixa analítica; limite de detecção (LOD); limite de quantificação (LOQ) e exatidão pela comparação do método com o método de titulação potenciométrica e precisão, através de medidas de repetibilidade.

3.7.1 Tratamento dos dados

Todos os dados foram tratados em planilhas eletrônicas Microsoft Excel (2003-2010) ou no software OriginPro 8.0 (LabOrigin). As simulações foram realizadas pela planilha TitGer 2.5 (registro de software requerido).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Titulação potenciométrica.

As titulações potenciométricas foram realizadas para comparação da acidez das amostras de vinagre com o método dos dois pontos.

Na Figura 9 é apresentado um exemplo de titulação de uma amostra de vinagre diluída, utilizando uma solução de hidróxido de sódio padronizada e sua simulação realizada no TitGer 2.5.

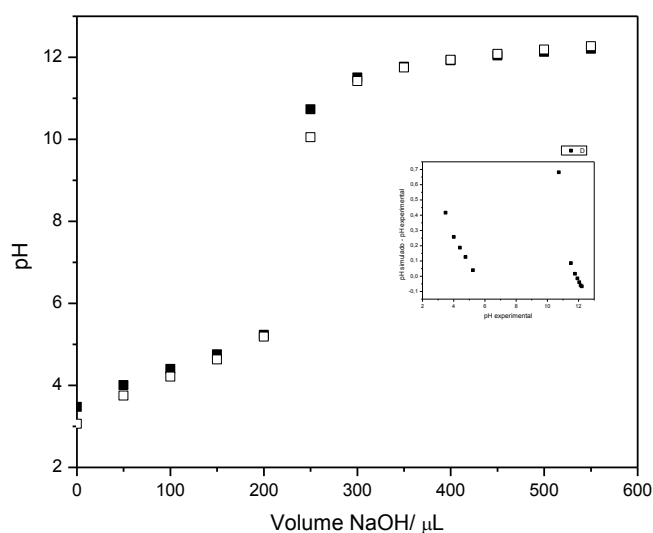


Figura 9. Curvas de titulação (■) simulada e (□) experimental: 10 mL ácido acético $4,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com solução hidróxido de sódio $0,1699 \text{ mol L}^{-1}$.

O ponto de equivalência obtido utilizando-se o ajuste de um modelo não-linear de Lorenz (Eq. 11), para a primeira derivada numérica da curva de titulação é apresentada na Figura 10.

O uso da função ajustada auxilia na identificação mais precisa do ponto de equivalência.

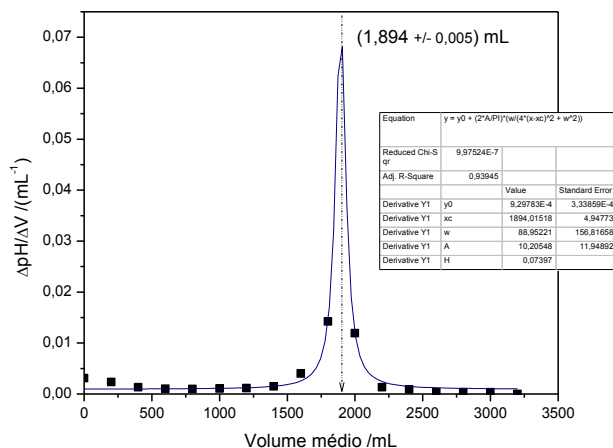


Figura 10. Derivada primeira com ajuste da função não-linear de Lorentz para a titulação descrita na Figura 9. O inserto apresenta a tabela de valores fornecido pelo Origin 8.0 Pro.

A linearização da curva de titulação com a função de Gran II na forma mais simples (Eq.10) foi também avaliada (Figura 11). Devido à similaridade dos resultados, optou pelo uso do modelo de Lorentz para todas as titulações potenciométricas, além de que no modelo de Lorentz o ponto de equivalência é calculado automaticamente, ou seja, não há interferência do analista como pode e haver usando a função de Gran II onde o ajuste é feito manualmente.

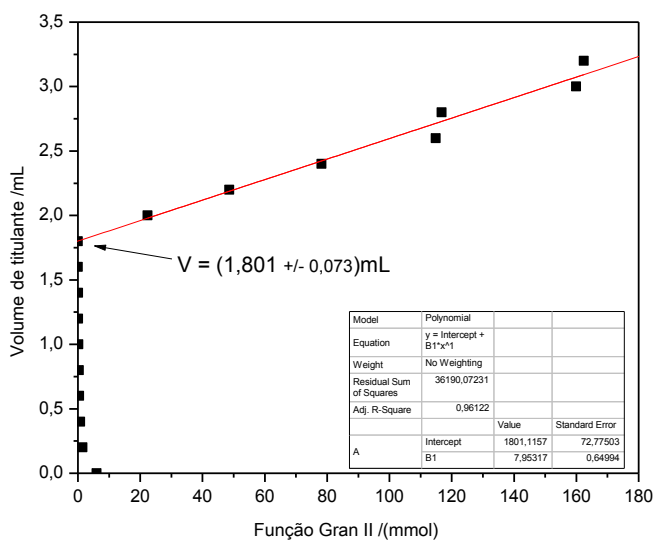


Figura 11. Função de Gran para a titulação descrita na Figura 9. O inserto apresenta a tabela de valores fornecido pelo

Origin 8.0 Pro.

4.2 Definição dos parâmetros de avaliação da faixa da curva analítica quadrática.

Ensaio prévios (não apresentados) mostraram que a curva analítica obtida pela adição de 2,5 mL ou 5,0 mL soluções de ácido acético (entre $1,0 \cdot 10^{-3}$ e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) sobre 10 mL de tampão citrato (entre 5 e 20 mmol L^{-1}) poderiam apresentar um comportamento quadrático, ou seja, a equação da curva analítica foi expressa pela Equação 13:

$$R = B + I.c + Qc^2 \quad \text{Eq.13}$$

Onde R, é a resposta analítica, que neste trabalho foi a variação do pH da solução tampão (diferença entre pH após adição da solução de ácido acético e o pH inicial); B, o branco (ou termo constante) I, inclinação (ou termo linear) e Q, a curvatura (ou termo quadrático).

Como as otimizações foram realizadas visando a maximização da sensibilidade analítica, faixa analítica e a precisão, foi estudado, previamente às otimizações, a influência da curvatura Q sobre esses parâmetros.

Foram construídos modelos hipotéticos, considerando o valor de Branco igual a 1, sensibilidade igual a 10 e o valor da curvatura variando entre 0,0 e $-1,0$ (Figura 12). Pode-se observar que a faixa de linearidade da curva analítica (a faixa de concentração em que pode ser observado um comportamento linear) diminui à medida que a curvatura torna-se mais negativa.

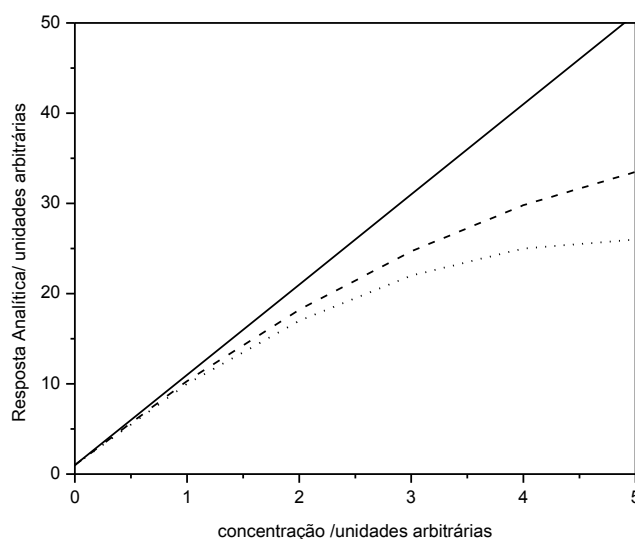


Figura 12. Curvas Analíticas Hipotéticas utilizando a função: $R = B + I.c + Qc^2$, onde B igual a 1 e I, igual a 10. Valores de Q: (—) 0,0; (---) -0,7; (.....) -1,0.

Entretanto, a faixa de linearidade não é necessária quando um modelo não linear é usado. Por outro lado, é necessário definir critério para estabelecer um limite superior na curva analítica não-linear.

Esse critério foi obtido a partir da definição da IUPAC de sensibilidade analítica (Eq. 14).

$$S = \frac{dR}{dc} \quad \text{Eq.14}$$

onde S é a sensibilidade analítica, R, a resposta analítica e c, a concentração.

Para modelos lineares, onde Q é igual a zero na Eq. 13, a sensibilidade analítica é igual à inclinação I. Para modelos quadráticos, a sensibilidade analítica em um ponto, obtida pela derivação da Eq. 14, é função da concentração nesse ponto (Eq. 15)

$$S = \frac{dR}{dc} = I + Qc \quad \text{Eq.15}$$

Pela Eq. 15 pode-se observar que, quando a concentração do analito tende a zero, a sensibilidade tende ao valor da inclinação, ou seja, nessa região, a curva quadrática tem comportamento linear. Além disso, para os casos onde a curvatura é negativa, a menor sensibilidade analítica ocorre no ponto superior da curva analítica.

A Figura 13A mostra o comportamento da sensibilidade analítica para diferentes valores de curvatura. Na Figura 13B, os valores de sensibilidade analítica relativa à sensibilidade máxima, ou seja, a inclinação I .

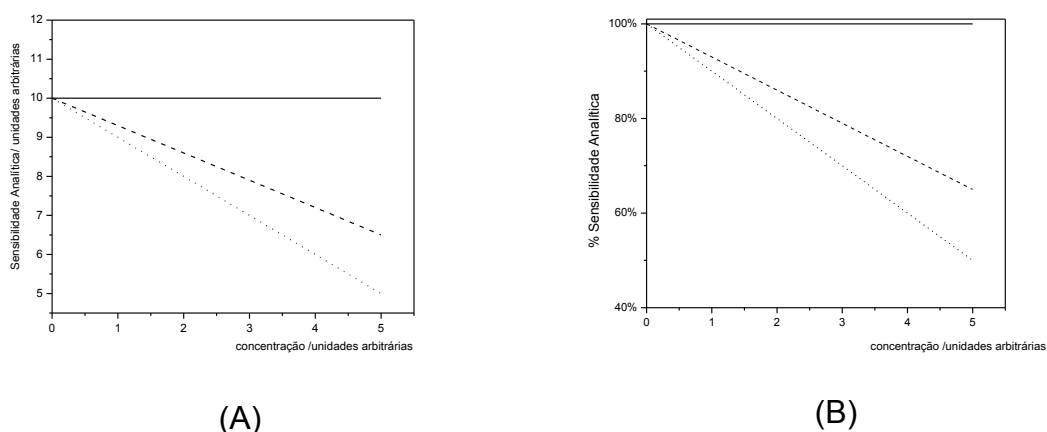


Figura 13. Sensibilidade Analítica de curvas analíticas hipotéticas usando a função : $R = B + I.c + Qc^2$, onde B igual a 1 e I , igual a 10. Valores de Q : (—) 0,0; (---) -0,7; (.....) -1,0. Figura A: Sensibilidade analítica em valores absolutos; Figura B: em porcentagem da maior sensibilidade.

Portanto, ao ser definida a sensibilidade analítica mínima ou uma porcentagem mínima da sensibilidade analítica, pode-se definir também a faixa analítica, ou vice-versa. Na Figura 14 é apresentado o uso do limite de 75% da sensibilidade máxima para o exemplo hipotético, nesta região que se obteve melhores valores para os parâmetros da curva analítica sem perda da faixa analítica.

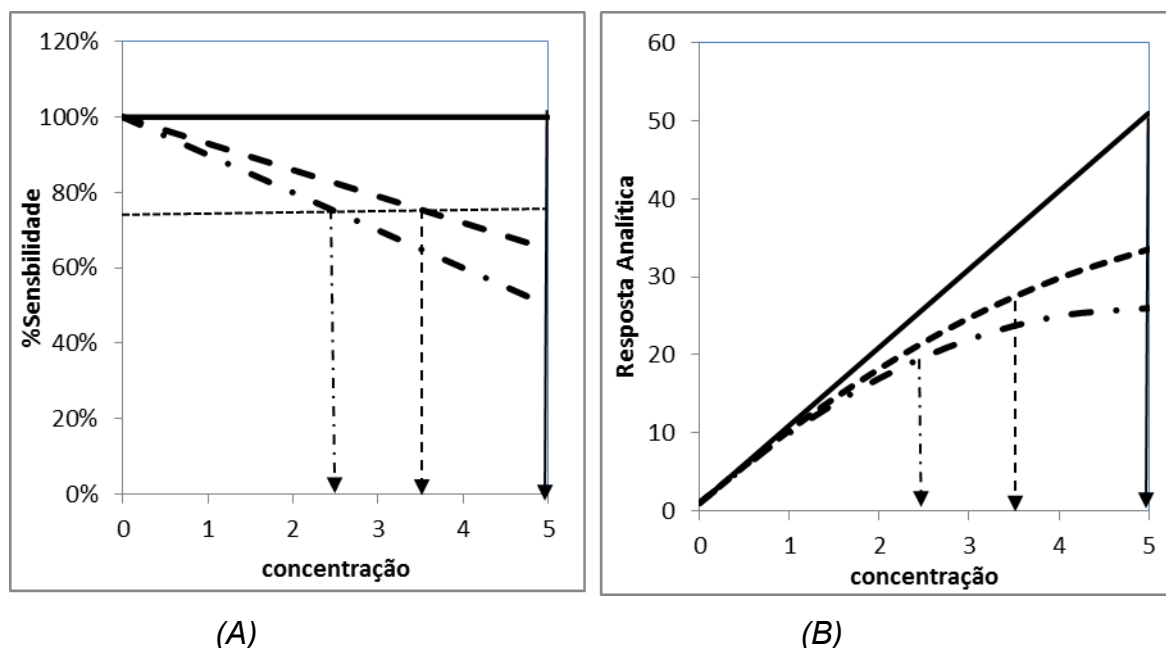


Figura 14. Exemplo hipotético de curva analítica usando a função: $R = B + I.c + Qc^2$, onde B igual a 1 e I , igual a 10. Valores de Q : (—) 0,0; (---) -0,7; (.....) -1,0. Figura A: % sensibilidade ;Figura B: Resposta Analítica; Setas verticais: Definição da faixa analítica considerando a %sensibilidade analítica limite de 75%

Desta maneira, a otimização foi realizada em função da sensibilidade analítica mínima, e não da inclinação ou da curvatura.

4.3 Otimização univariada para o método dois pontos

A otimização univariada foi realizada considerando-se a amostra diluída, como ocorre com o método titulométrico.

4.3.1 Efeito da concentração do tampão citrato e do pH inicial

Os efeitos da concentração do tampão citrato e do pH inicial foram avaliados pela adição de 2,5 mL ou de 5,0 mL de solução de ácido acético sobre 10 mL de tampão citrato.

Nas Figuras 15 a 17 são apresentadas as curvas analíticas para cada concentração de tampão citrato (5 mmol L^{-1} , 10 mmol L^{-1} e 20 mmol L^{-1}) preparadas em diferentes valores de pH. A curva analíticas foram obtidas plotando-se em gráfico a resposta ΔpH em relação à concentração analítica do ácido acético. Pode-se observar o comportamento não-linear para todas as curvas analíticas. Esse

comportamento dificulta a comparação entre as curvas analíticas obtidas em diferentes condições, de maneira que é mais adequado analisar os parâmetros do modelo de regressão quadrático obtido para cada curva analítica.

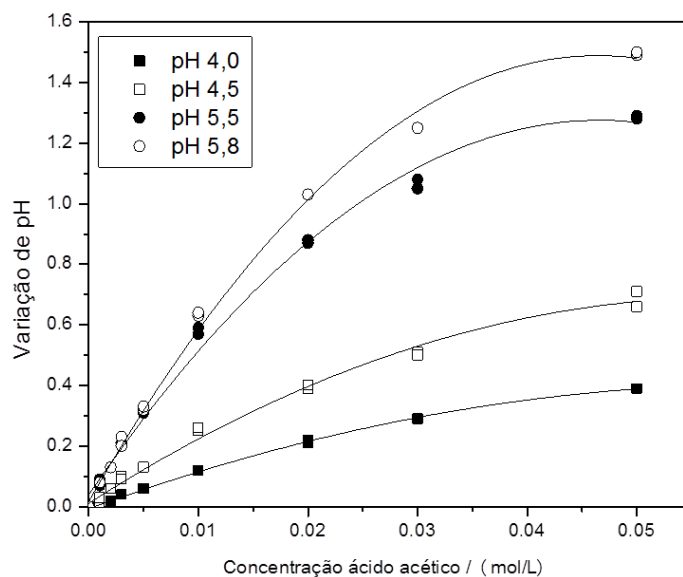


Figura 15. Efeito do pH inicial do tampão citrato 5 mmol L^{-1} sobre a curva analítica de ácido acético. Adição de $2,5 \text{ mL}$ de ácido acético sobre 10 mL do tampão citrato

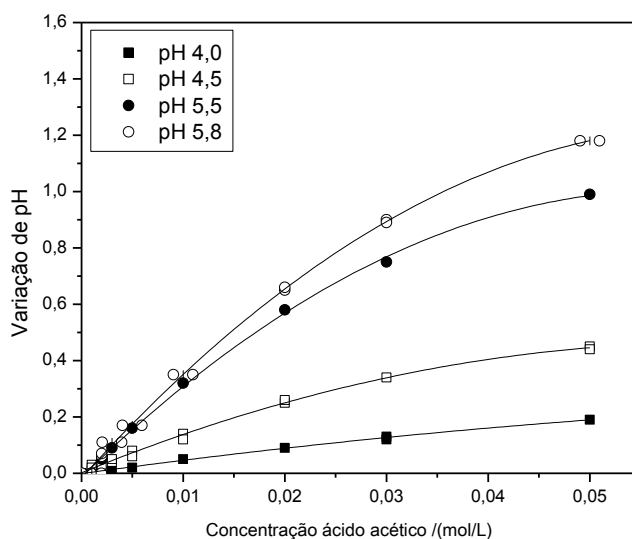


Figura 16. Efeito da do pH inicial do tampão citrato 10 mmol L^{-1} sobre a curva analítica de ácido acético. Adição de $2,5 \text{ mL}$ de ácido acético sobre 10 mL do tampão citrato.

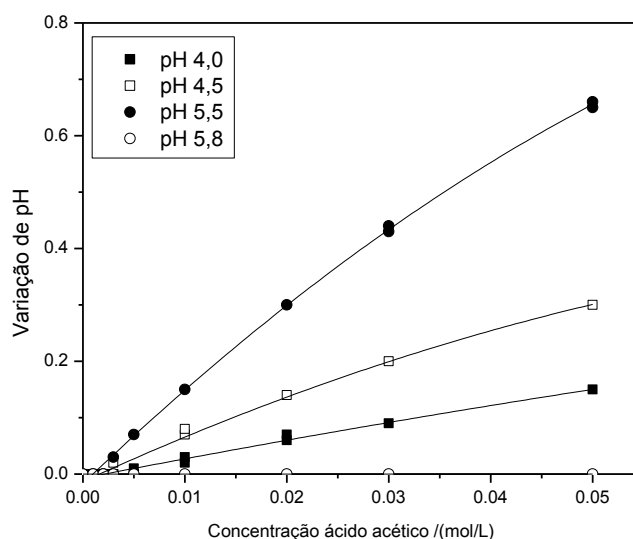


Figura 17. Efeito do pH inicial do tampão citrato 20 mmol L⁻¹ sobre a curva analítica de ácido acético com adição de 2,5 mL de ácido acético sobre 10 mL do tampão citrato.

A influência do pH inicial do tampão sobre a inclinação das curvas analíticas são apresentadas na Figura 18. Observa-se o aumento da inclinação com o aumento do pH, com exceção para a condição com pH 5,8 e concentração de tampão igual a 20 mmol L⁻¹, onde não há variação do pH com a adição do ácido acético. Nos testes realizados em triplicata, o mesmo comportamento foi observado para a condição com pH 5,8 e concentração igual a 20 mmol L⁻¹.

Como esperado, o aumento da concentração do tampão diminui a inclinação da curva analítica devido ao maior tamponamento do meio. Da mesma maneira, o menor tamponamento afeta a dispersão nos valores de pH obtidos, como pode-se observar nas barras de erro para a concentração de tampão de 5 mmol L⁻¹ comparado com as outras condições.

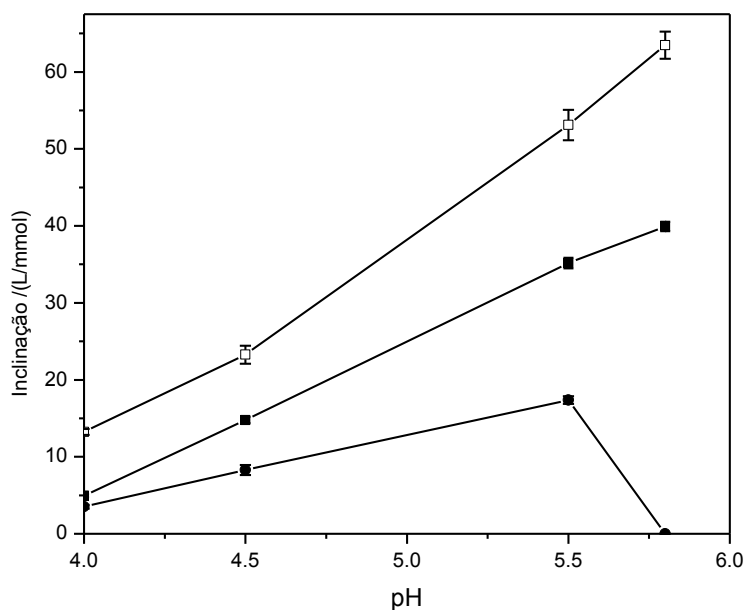


Figura 18. Influência do pH sobre a inclinação das curvas analíticas em diferentes concentrações de tampão citrato (□) 5mmol L⁻¹; (■) 10 mmol L⁻¹; (●) 20 mmol L⁻¹. Adição de 2,5 mL de solução padrão de ácido acético.

Entretanto, considerando que o poder tamponante de Van Slyke para o sistema citrato é razoavelmente constante em toda a faixa de pH estudada (Figura 6, página 21), o comportamento observado com a alteração do pH inicial do tampão não é explicado.

Da mesma maneira, a curvatura das curvas analíticas, que, de maneira simplista, representa o quanto a curva analítica se torna menos linear, ficam mais negativos com o aumento do pH inicial em todas as condições experimentais (Figura 19) e, portanto, diminuem a sensibilidade analítica, com exceção à condição com pH 5,8 e concentração de tampão igual a 20 mmol L⁻¹, que, por não haver variação significativa no pH em nenhuma concentração de ácido acético, não há valor para curvatura, assim como não houve para a inclinação.

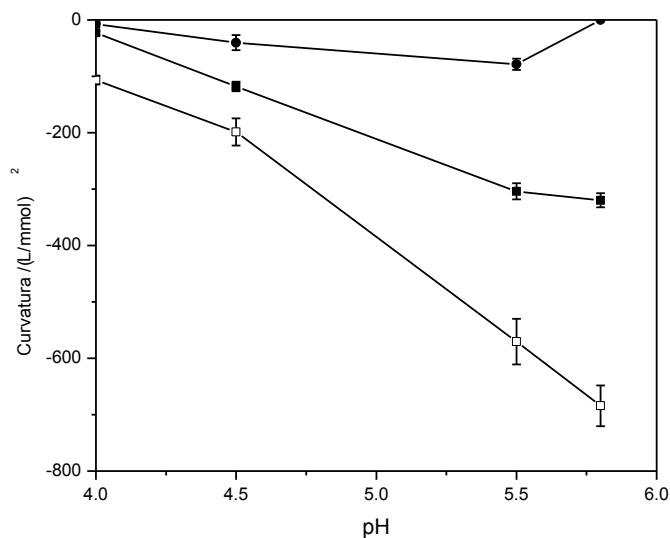


Figura 19. Influência do pH sobre a inclinação das curvas analíticas em diferentes concentrações de tampão citrato (\square) 5 mmol L^{-1} ; (\blacksquare) 10 mmol L^{-1} ; (\bullet) 20 mmol L^{-1} . Adição de $2,5\text{ mL}$ de ácido acético.

Assim, com o aumento da inclinação, que favorece a sensibilidade analítica, os valores mais negativos da curvatura diminuem esse parâmetro de interesse na otimização. Assim, considerando a concentração máxima de ácido acético igual a $0,050\text{ mol L}^{-1}$, foi calculada a sensibilidade analítica mínima em cada condição experimental (Figura 20).

O perfil do gráfico da sensibilidade mínima em função do pH foi razoavelmente similar àquele da Figura 18. Entretanto, a sensibilidade diminuiu cerca de 50% na condição mais favorável, tampão com concentração 5 mmol L^{-1} e pH 5,8.

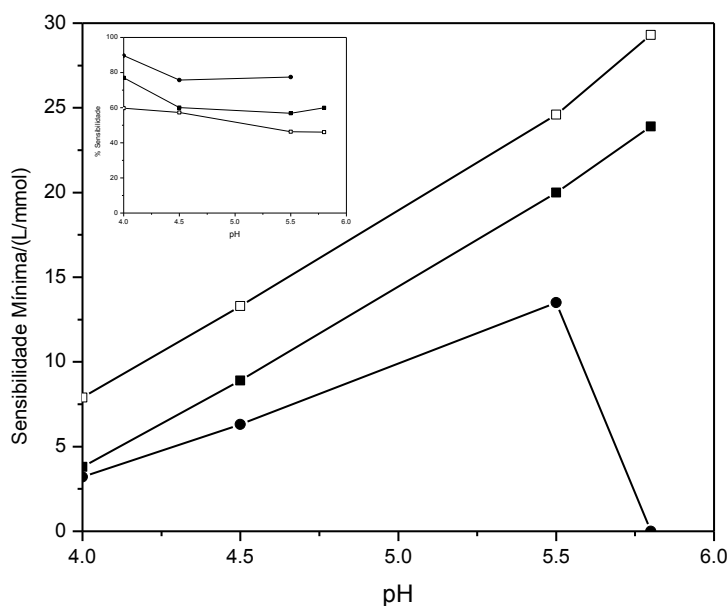


Figura 20. Influência do pH sobre a sensibilidade mínima, calculada para a concentração de ácido acético $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. O inserto expressa a %sensibilidade mínima em função do pH. Concentrações de tampão citrato (\square) 5 mmol L^{-1} ; (\blacksquare) 10 mmol L^{-1} ; (\bullet) 20 mmol L^{-1} . Adição de $2,5 \text{ mL}$ de solução padrão de ácido acético.

Após o estudo do sistema com adição de $2,5 \text{ mL}$ de solução de ácido acético, uma nova condição foi estudada. Foi aumentado o volume de solução de ácido acético para 5 mL . Como esperado, com o aumento do volume de amostra ($5,0 \text{ mL}$) (Figura 21), houve um aumento na variação do pH, como pode ser visto para as condições com concentração do tampão igual a 20 mmol L^{-1} (Figura 21C). Entretanto, o modelo quadrático não pode ser ajustado em toda a faixa de concentração de ácido acético estudada para a concentração de tampão 5 mmol L^{-1} , pois a curva analítica perderia a sensibilidade mínima estabelecida para os estudos que é de 75% .

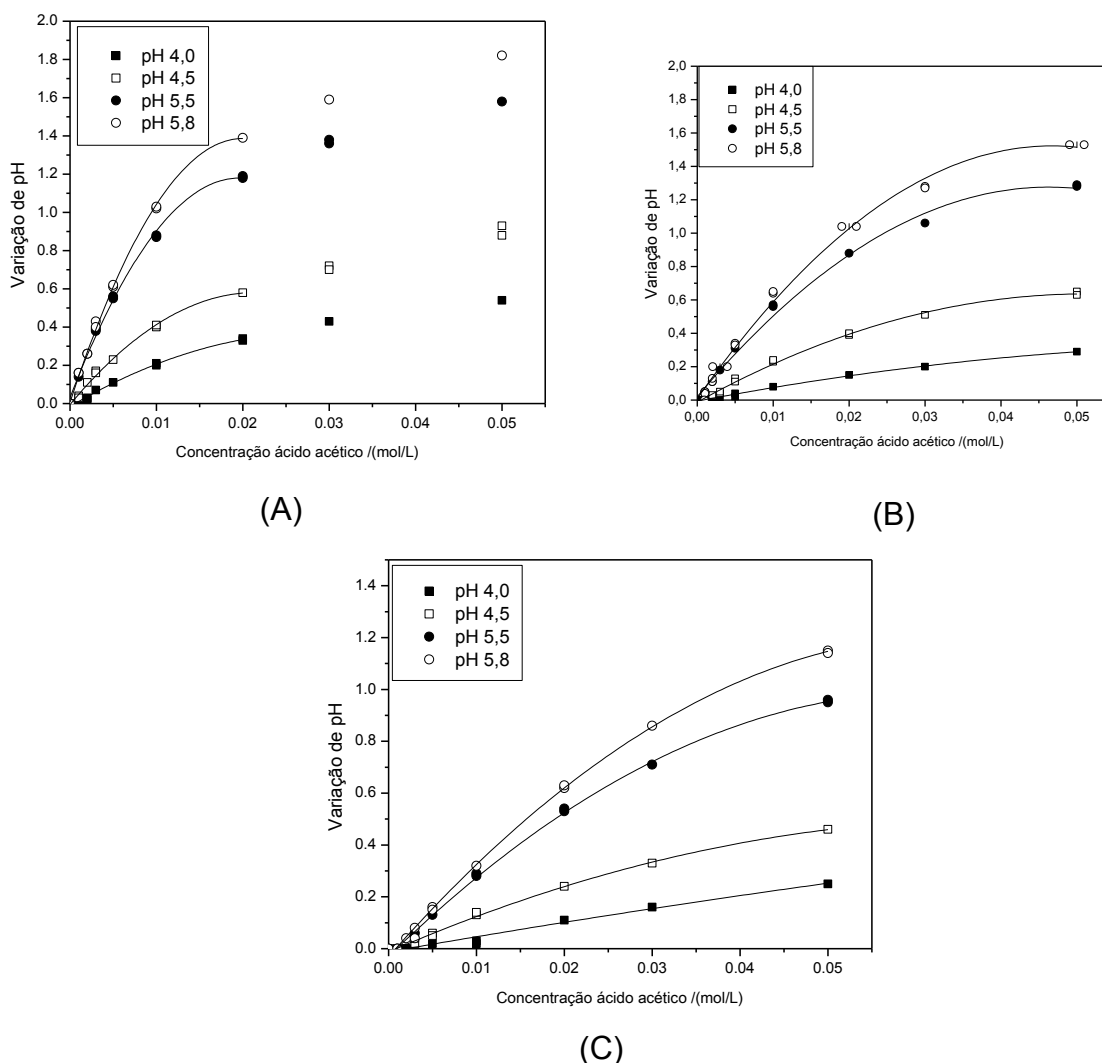


Figura 21. Efeito do pH inicial do tampão citrato sobre a curva analítica de ácido acético com adição de 5,0 mL de ácido acético sobre 10 mL do tampão citrato. Concentração do tampão citrato: (A) 5 mmol L⁻¹; (B) 10 mmol L⁻¹; (C) 20 mmol L⁻¹.

Para facilitar a comparação entre as condições experimentais, a sensibilidade mínima para todas as curvas analíticas da Figura 21 foi calculada para a concentração de 0,02 mol L⁻¹, limite da faixa analítica obtida para a concentração de 5 mmol L⁻¹ onde foi possível obter uma sensibilidade mínima de 75%. Os perfis obtidos foram similares àqueles obtidos para a adição de 2,5 mL, mas os valores aumentaram significativamente. A sensibilidade, para a melhor concentração de tampão (5 mmol L⁻¹) foi cerca de 75% da sensibilidade analítica máxima. Este resultado está associado ao fato que, com maior quantidade de ácido acético no meio, maior a variação de pH do meio, considerando que o poder tamponante nessa faixa de pH seja razoavelmente constante.

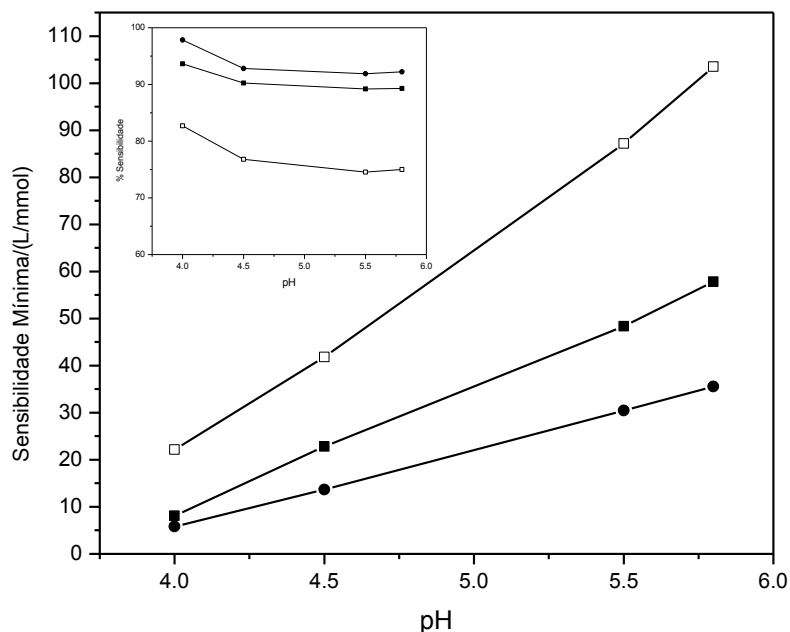


Figura 22. Influência do pH sobre a sensibilidade mínima, calculada para a concentração de ácido acético $0,0103 \text{ mol L}^{-1}$. O inserto expressa a %sensibilidade mínima em função do pH. Concentrações de tampão citrato (□) 5 mmol L^{-1} ; (■) 10 mmol L^{-1} ; (●) 20 mmol L^{-1} . Adição de $5,0 \text{ mL}$ de solução padrão de ácido acético.

4.3.2 Comportamento do erro do método

Além da sensibilidade mínima, avaliou-se o erro médio do método na comparação dos resultados obtidos na determinação da acidez em vinagre de vinho, comparado com a titulação potenciométrica nas diferentes condições experimentais (Figura 23).

Para a adição de $2,5 \text{ mL}$ de amostra, houve um grande aumento do erro do método com o aumento do pH. Apenas para os valores de pH de $4,0$ e $4,5$ foram observados valores menores que 2% . Por outro lado, para a adição de $5,0 \text{ mL}$ de amostra, observa-se que os procedimentos com menores concentrações de tampão apresentaram maiores coeficientes de variação, mas não é possível observar um padrão de comportamento em relação ao pH do tampão.

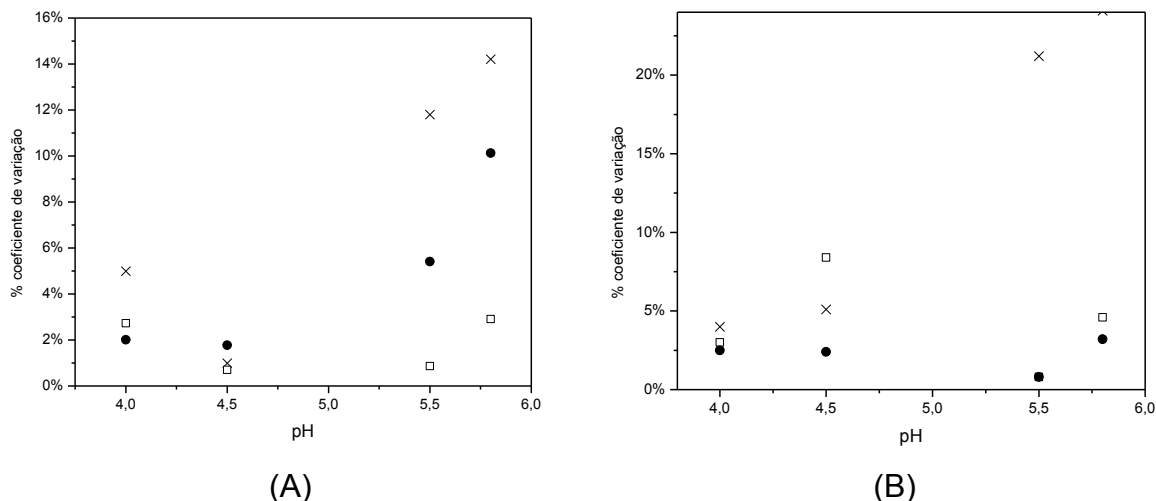


Figura 23. Comportamento do erro do método do M2P em relação à titulação potenciométrica para vinho tinto. Concentração do tampão: (x) 5 mmol L⁻¹ (□); 10 mmol L⁻¹ (●); 20 mmol L⁻¹; Volume de amostra: (A) 2,5 mL (B) 5 mL.

Portanto, buscando uma condição onde o erro do método (%erro) estivesse abaixo de cerca de 2,0%, uma região onde se pudesse obter uma maior sensibilidade mínima sem significativa da faixa analítica, foi então selecionada a condição com concentração de tampão é igual a 10 mmol L⁻¹ e o pH igual a 5,5, além da adição de 2,5 mL de amostra.

4.3.3 Figuras de mérito do protocolo do M2P

Com os resultados da otimização pelo método univariado, foi selecionado a adição de 2,5 mL de amostra sobre 10 mL de um tampão citrato 10,0 mmol L⁻¹ e pH 5,5.

A equação da curva analítica obtida nessa condição é apresentada na Eq. 16.

$$\Delta\text{pH} = (0,011 \pm 0,014) + (63,4 \pm 2,5)c + (-957 \pm 79)c^2 \quad \text{Eq.16}$$

Onde 'ΔpH' é a resposta do método dos 2 pontos e 'c' é a concentração, em mol L⁻¹.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), foram calculados considerando a estimativa do desvio-padrão do branco (s_b) e a inclinação (I), que representa a sensibilidade analítica quando a concentração do analito tende a zero (item 4.2, pág. 52).

$$LOD = 3,3 \frac{S_b}{I}$$

$$LOQ = 10 \frac{S_b}{I}$$

Assim, os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram de 0,7 mmol L⁻¹ e 2,3 mmol L⁻¹ respectivamente. Dessa maneira, a faixa analítica foi de 2,0 a 20,0 mmol L⁻¹, sendo que limite superior representa 77% da sensibilidade máxima (ou seja, aquela observada no limite de quantificação, igual a 49,1 L/mol). O modelo apresentou um coeficiente de determinação ajustado (R²_{aj}) igual 0,998 (N = 8) e um desvio padrão do resíduo de 0,016 unidades de pH (ou 0,25 mmol L⁻¹). Esse desvio padrão dos resíduos representa 11 % do LOQ, demonstrando o ótimo ajuste desse modelo.

A precisão do método foi estimada pela repetitividade, que apresentou um desvio padrão relativo com um valor de 0,8% (N= 10), obtido para a concentração de 0,01mol L⁻¹ de ácido acético.

Para avaliar a exatidão do método, foram comparados os resultados da acidez das amostras, através do método proposto em relação ao método potenciométrico. O erro do método proposto variou entre 0,7% a 4,6% (Tabela 4), demonstrando seu bom desempenho em comparação com o método potenciométrico em relação à acidez.

Tabela 4. Comparação da determinação da acidez acética pela titulação potenciométrica e pelo M2P com 2,5 mL de tampão citrato 10 mmol L⁻¹ e em pH 5,5. (N = 3).

Tipo de Vinagre	Acidez Acética		
	M2P	Titulação	%erro
Vinho Tinto 1	4,33 ± 0,01	4,38 ± 0,01	1,1%
Maçã 1	4,17 ± 0,01	4,20 ± 0,01	0,7%
Álcool 1	4,37 ± 0,04	4,34 ± 0,04	0,8%
Vinho Tinto 2	4,23 ± 0,10	4,38 ± 0,01	3,3%
Maçã 2	4,23 ± 0,03	4,20 ± 0,03	0,8%
Álcool 2	4,54 ± 0,01	4,34 ± 0,01	4,6%

Vinho tinto 3	4,33 ± 0,01	4,38 ± 0,01	1,11%
Maçã 3	4,17 ± 0,01	4,20 ± 0,01	0,69%
Álcool escuro 3	4,37 ± 0,04	4,33 ± 0,04	0,77%

4.3.4 Otimização por planejamento experimental baseado na matriz de Doehlert para amostra diluída.

A otimização do método com auxílio da matriz de Doehlert foi realizada visando comparar o seu desempenho com aqueles resultados obtidos na otimização univariada. Optou-se pelo volume de 2,5 mL de amostra devido a uma facilidade operacional.

Após realização dos experimentos da matriz de Doehlert, foi obtido um modelo de regressão múltipla (Equação 17) para cada uma das respostas utilizadas na otimização, como a sensibilidade mínima, por exemplo.

$$\hat{y} = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_1 \cdot x_2 + a_4 \cdot x_1^2 + a_5 \cdot x_2^2 \quad \text{Eq.17}$$

onde \hat{y} é o valor da resposta estimada pelo modelo; a_i , o coeficiente estimado e x_i , o valor codificado das variáveis.

Os valores dos coeficientes obtidos no modelo de regressão múltipla (obtido com a função proj.lin no Microsoft Excel 2007) são apresentadas na Figura 23. Um teste t-Student foi aplicado aos coeficientes para verificar se seus valores eram estatisticamente diferentes de zero

$$t_{calc} = \frac{|a|}{s_b}, \text{ onde } a \text{ é o coeficiente e } s_b, \text{ a estimativa do seu desvio-padrão. O}$$

coeficiente apresentará um valor significativamente diferente de zero se o valor de t calculado (t_{calc}) for maior que o valor da distribuição de t ($t_{crítico}$), calculado para uma probabilidade de erro de 0,05, com grau de liberdade igual ao número de pontos menos 2.

Utilizando a sensibilidade mínima como resposta do planejamento, todos os termos do modelo obtido foram significativamente diferentes de zero, obtendo-se Equação 18. (Figura 24).

$$\hat{y} = (6,3 \pm 1,3) \text{pH}^2 + (3,7 \pm 1,3) \text{conc}^2 + (-7,6 \pm 1,7) \text{pH} \cdot \text{conc} + (-10,8 \pm 0,9) \text{pH} + (16,0 \pm 1,3) \cdot \text{conc} + 15,9 \pm 0,7 \quad \text{Eq.18}$$

O modelo apresentou coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9929 e uma estimativa do desvio-padrão do resíduo (s_r) igual 1,48 L/mol.

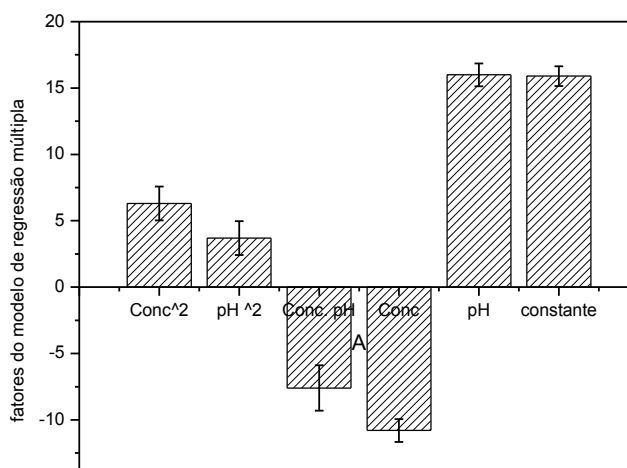


Figura 24. Coeficientes do modelo de regressão linear obtido para o planejamento pela Matriz de Doehlert

A partir do modelo, foram simulados os valores obtidos para a o modelo e lançados em gráficos 3D (Figura 25). Para auxiliar na interpretação da figura, foram selecionados os valores máximos de pH para cada valor de concentração do tampão simulado e os valores máximos de concentração do tampão para cada valor de pH (Figura 26).

Dessa maneira, pode-se observar que a sensibilidade aumenta com a diminuição da concentração do tampão e com o aumento do pH do tampão.

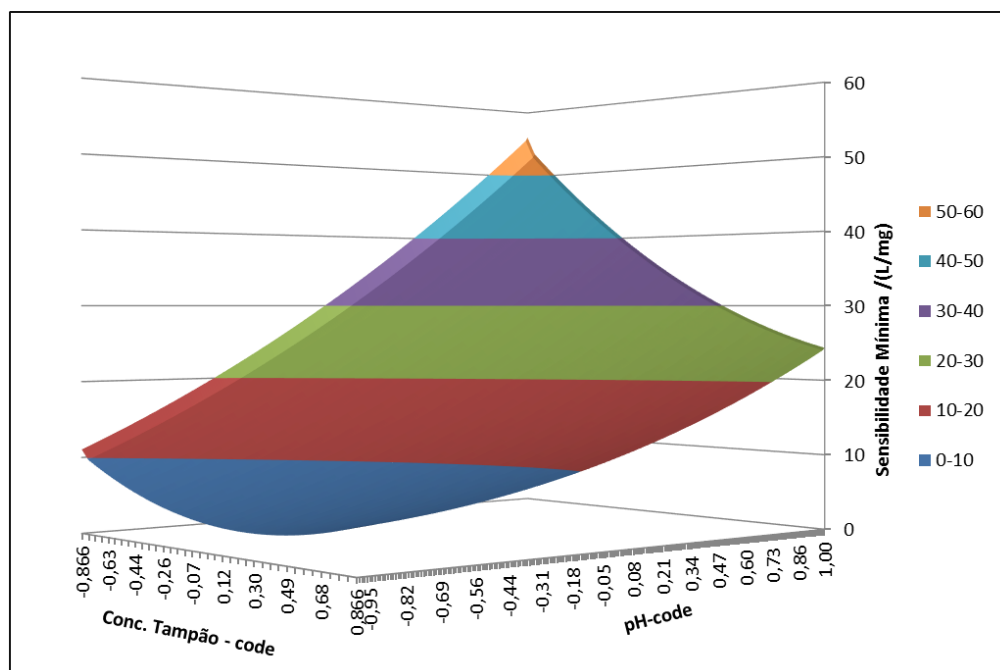


Figura 25. Superfície de resposta da sensibilidade mínima do pH e concentração do tampão (unidades codificadas)

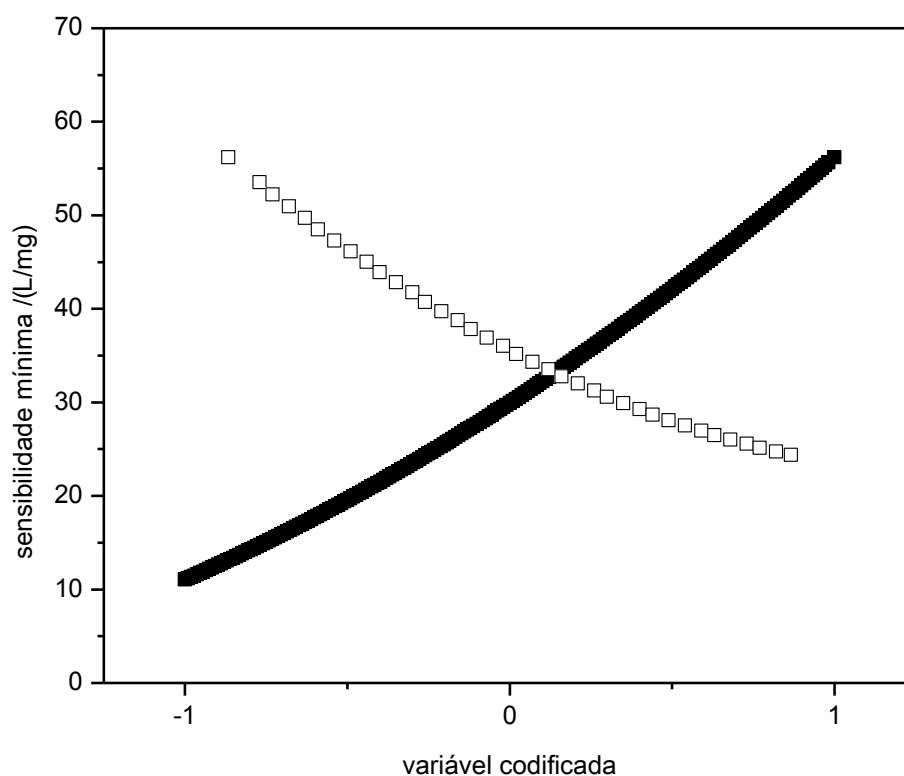


Figura 26. Valores máximos do modelo obtidos. (■) pH máximo para cada valor de concentração de tampão; (□) concentração máxima de tampão para cada valor de pH.

A condição experimental em relação à qualidade do ajuste da curva analítica foi avaliada pela matriz de Doehlert considerando as estimativas dos desvios-padrão dos resíduos (s_r).

Para a obtenção desse modelo foi utilizado o conceito da *stepwise regression* (Draper & Smith, 1964). Assim, inicialmente foi obtido o modelo com todos os termos (Equação 17) (Figura 27), cujo R^2 foi igual a 0,5761 e a estimativa do desvio-padrão dos resíduos igual a $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Em seguida, foram avaliados os termos que foram significativamente diferentes de zero. Nesse caso, apenas o termo 'branco' (a_0 , na Equação 17) foi significativo, ou seja, o modelo não conseguiu explicar a influência do pH e concentração do tampão sobre os coeficientes de variação observados.

Novos modelos foram obtidos desconsiderando alguns termos e nova avaliação estatística realizada.

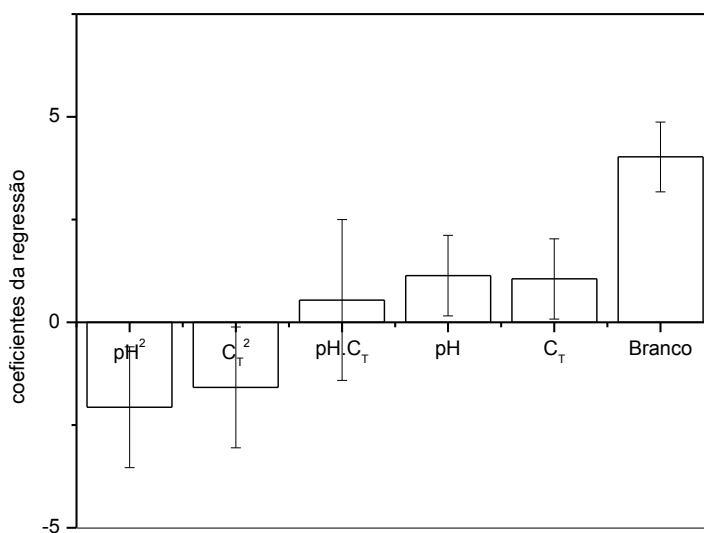


Figura 27. Coeficientes do modelo de regressão múltipla utilizando todos os termos da Equação 17 para avaliação da influência do pH e concentração do tampão sobre a estimativa do desvio-padrão dos resíduos das curvas analíticas

Esse procedimento é necessário pois ao realizar o modelo usando termos sem diferença significativa do zero, parte da variância dos dados é perdida. Essa variância é redistribuída ao serem utilizados menos termos, mas que influenciem significativamente o modelo. Isso pode ser comprovado pelo melhor ajuste obtido (tanto

por valores mais elevados de R^2 quanto menores valores do desvio padrão dos resíduos.).

Assim, os coeficientes do modelo *stepwise regression* obtido para as estimativas do desvio-padrão dos resíduos das curvas analíticas são apresentados na Figura 28.

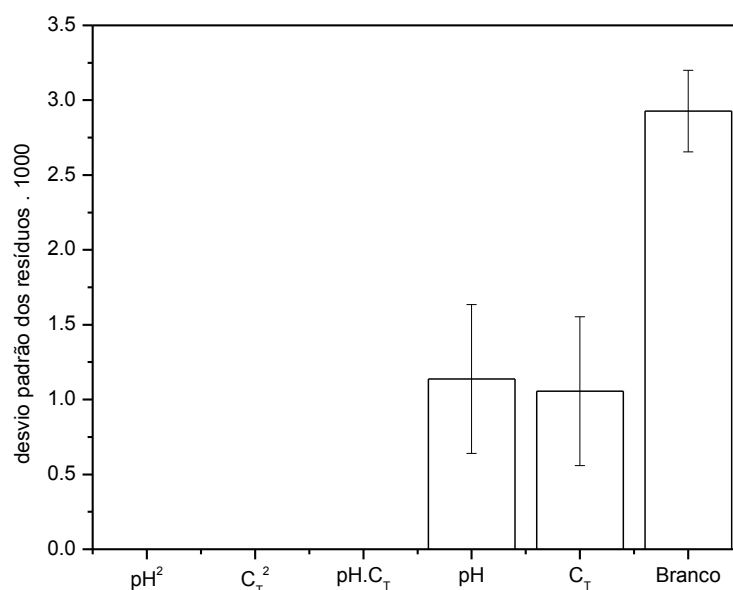


Figura 28. Coeficientes do modelo *stepwise regression* para a avaliação da influência do pH e concentração do tampão sobre a estimativa do desvio-padrão dos resíduos das curvas analíticas

Na Figura 29 é apresentada a superfície de resposta para esse estudo. Uma vez que o plano se encontra em um intervalo de desvio-padrão muito baixo, considerou-se todas as condições de estudo adequadas para o método, ou seja, essa variável não foi considerada para a escolha da melhor condição experimental.

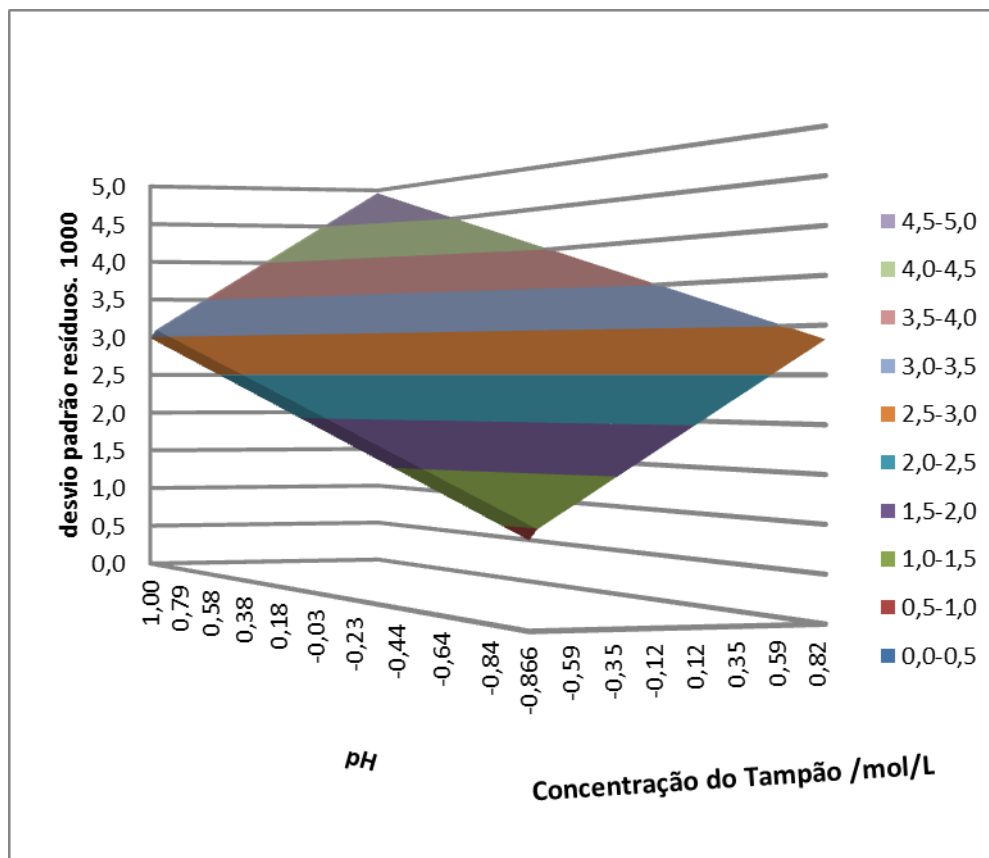


Figura 29. Superfície de resposta da influência do pH e concentração do tampão sobre a estimativa do desvio-padrão dos resíduos das curvas analíticas

Na avaliação do planejamento experimental utilizando os coeficientes de variação médios da determinação da acidez nas amostras de vinagre de vinho tinto, de álcool e de maçã, os coeficientes do modelo *stepwise regression* obtido são apresentados na Figura 30. Ou seja, os coeficientes apresentados são aqueles que apresentaram uma diferença significativa de zero (95% de confiança).

A equação do modelo da *stepwise regression* é apresentada na Eq. 19, com um coeficiente de determinação igual a 0,9987 e um desvio padrão do resíduo igual a 0,362%.

$$\hat{y} = (-7,4 \pm 0,4) \text{ pH}^2 + (-3,8 \pm 0,4) \text{ conc}^2 + (3,3 \pm 0,3) \cdot \text{conc} + 11,4 \pm 0,3 \quad \text{Eq.19}$$

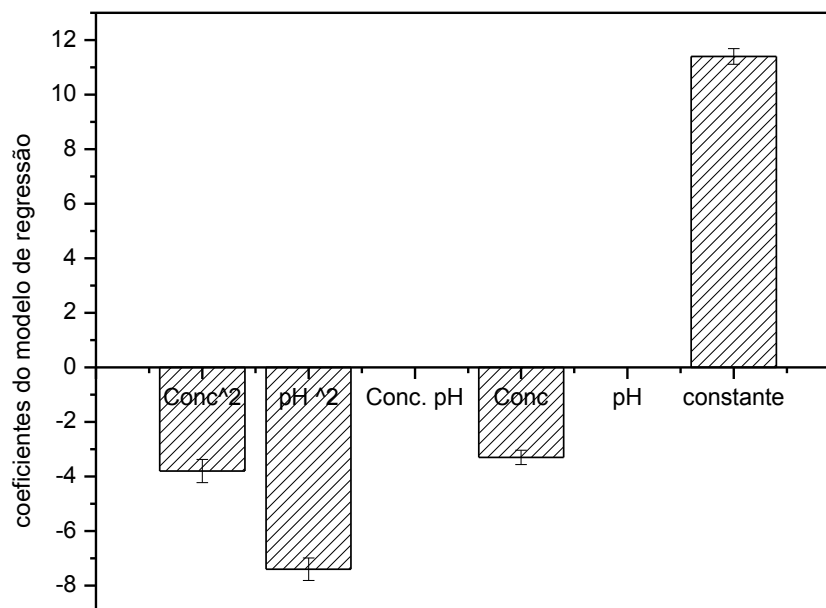


Figura 30. Coeficientes do modelo de regressão obtidos para o planejamento de experimento utilizando a matriz de Doehlert e usando o erro do método média de amostras de vinagre.

Observa-se uma influência quadrática tanto da concentração quanto do pH do tampão, de maneira que o aumento desses parâmetros determinam uma diminuição nos valores de %erro. A superfície de resposta obtida é apresentada na Figura 31, enquanto que os valores máximos de pH para cada valor de concentração do tampão simulado e os valores máximos de concentração do tampão para cada valor de pH é apresentada na Figura 32.

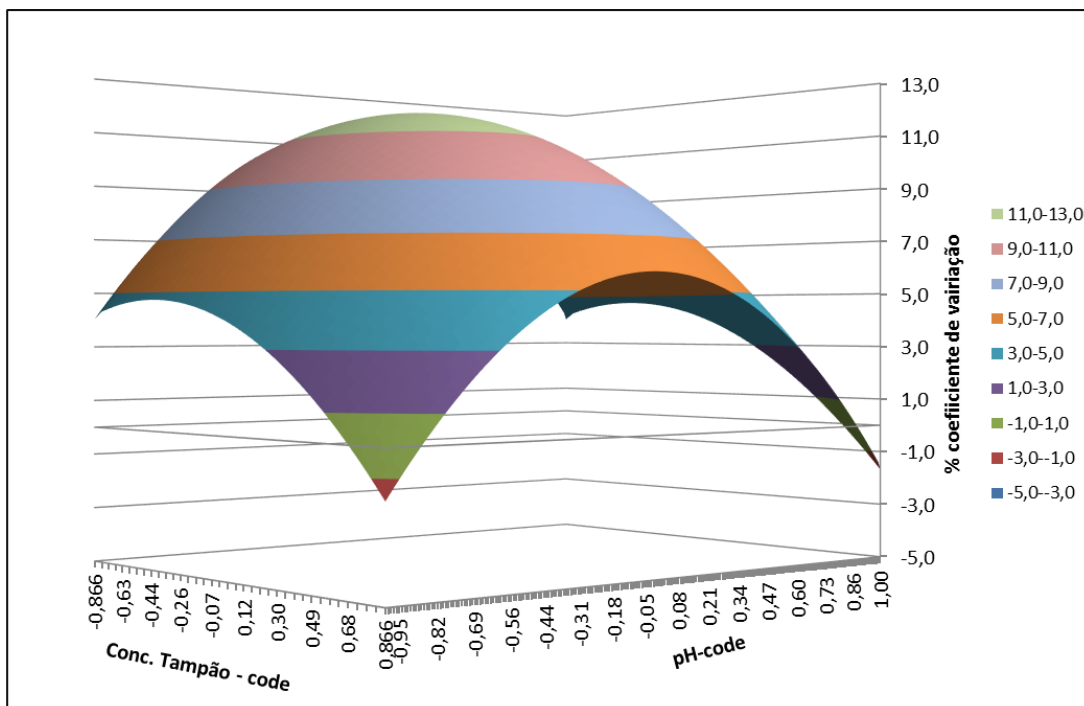


Figura 31. Superfície de resposta da porcentagem do erro do método em função do pH e concentração do tampão (unidades codificadas)

Observa-se, portanto, que os menores erros do método são obtidos nos valores extremos de pH e concentração do tampão.

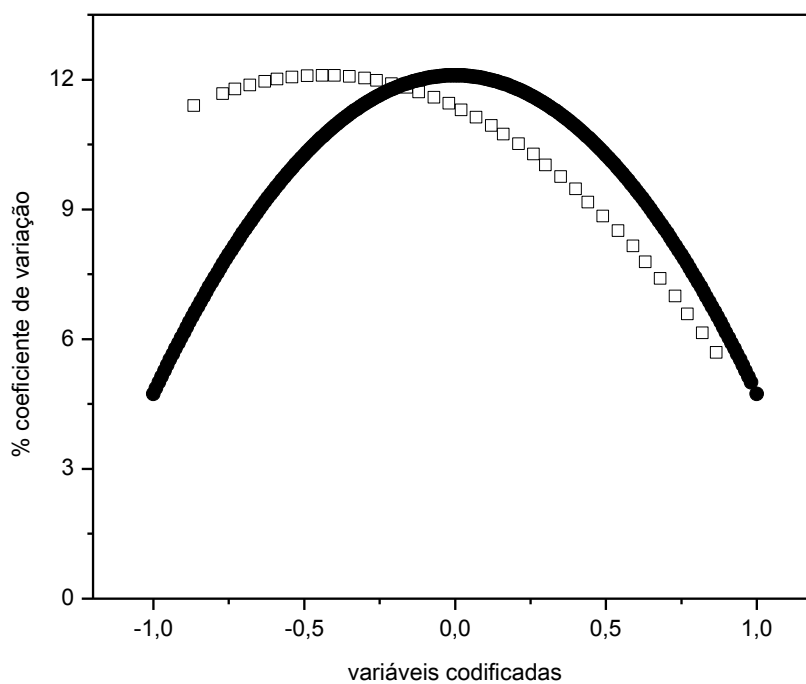


Figura 32. Valores máximos do modelo para explicar o erro do método. (■) pH máximo para cada valor de concentração de tampão; (□) concentração máxima para cada valor de pH

4.3.5 Comparação entre os valores simulados e otimização univariada

A simulação computacional pode ser uma ferramenta muito importante para a diminuição do trabalho experimental, principalmente por permitir avaliar o comportamento aproximado do sistema sem as complicações experimentais e gasto de reagentes. Assim, para confirmar essa hipótese, foi avaliada a similaridade entre os resultados da otimização experimental e aquela observada na simulação do comportamento do M2P usando a planilha eletrônica TitGer 2.5 (Oliveira, 2009), utilizando as constantes termodinâmicas e sem correção de força iônica.

Considerando o comportamento quadrático da resposta analítica do M2P, ou seja, ΔpH , optou por comparar os modelos obtidos lançando em gráfico a resposta experimental *versus* a resposta simulada estimadas. Na Figura 33 são apresentadas a melhor e a pior similaridade, ainda que, em todos os casos, o ajuste do modelo linear tenha sido muito bom, com desvio padrão dos resíduos inferiores a 0,011 unidades de pH e coeficiente de determinação superiores a 0,997.

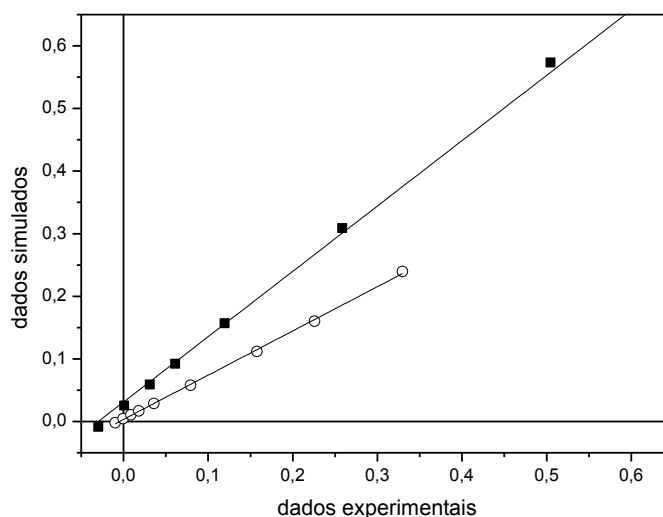


Figura 33. Comparação entre as curvas analíticas obtidas para os dados experimentais e para dados simulados no TitGer 2.5. (■) tampão pH 4,00 e 12,5 mmol L⁻¹; (○) tampão pH 5,5 e 5 mmol L⁻¹.

Nessa comparação, a inclinação igual a um e o intercepto igual a zero significa a perfeita correlação entre os dois conjuntos de dados. Na Tabela 5 são apresentados os termos constantes (interceptos) e inclinação para todas as

condições estudadas. Todos os valores de inclinação são significativamente diferentes de um (95% de confiança) usando-se um teste t-Student, enquanto que os valores dos termos constantes foram significativamente diferentes de zero.

Tabela 5 Valores de inclinação e termo constante obtidos na comparação entre as curvas analíticas obtidas experimentalmente e através de simulação

	Code A	Code B	inclinação	termo constante
1	0,0	0,000	0,792	0,014
2	1,0	0,000	1,044	0,031
3	0,5	0,866	0,862	0,038
4	-1,0	0,000	1,044	0,031
5	-0,5	-0,866	0,886	-0,004
6	0,5	-0,866	0,805	0,049
7	-0,5	0,866	0,707	0,003
8	0,0	0,000	0,792	0,014

Os valores de inclinação foram avaliados na matriz de Doehlert, porém não foi observado nenhuma relação significativa (95% de confiança) com termos lineares ou quadráticos ou de interação com o pH e concentração do tampão.

As diferenças nas inclinações podem estar associadas a diferenças nos valores de pKa reais e aqueles termodinâmicos e à variação da força iônica do meio, assim como pequenas diferenças entre os valores experimentais e parâmetros utilizados na simulação. A importância de cada parâmetro não foi estudada neste trabalho.

Entretanto, para a comparação com a sensibilidade mínima, que é o principal parâmetro de otimização (Figura 34), observa-se uma boa correlação entre os dados, explicados pela equação $\hat{y} = (-1,11 \pm 1,13) + (0,94 \pm 0,09).x$, onde y são as sensibilidades mínimas obtidas através da simulação, e x, aquelas para os dados experimentais.

O termo constante não é significativamente diferente de zero nem a inclinação é significativamente diferente de um (95% de confiança), ou seja, a simulação explica muito bem os dados experimentais obtidos.

Desta maneira, foi comprovada a hipótese que a simulação computacional do sistema em estudo representa adequadamente os dados experimentais e, portanto pode ser utilizado para auxiliar na buscar de condições ótimas.

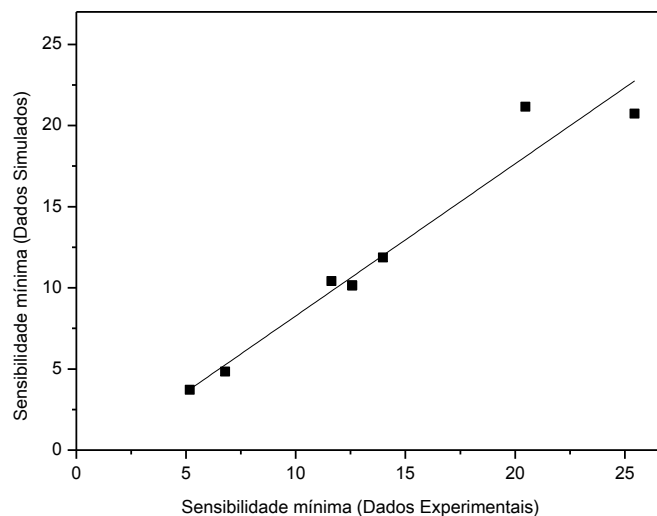


Figura 34. Comparação entre as sensibilidades mínimas obtidas por simulação e pelos dados experimentais.

4.3.6 Comparação entre a otimização univariada e multivariada

Apesar do bom resultado obtido pela simulação computacional com a planilha TitGer 2.5, e sua boa correlação com o resultado experimental, o uso do método multivariado utilizando a matriz de Doehlert também foi empregado neste estudo, com o objetivo de avaliar e testar sua funcionalidade. A fim de observar as diferenças entre os resultados da otimização multivariada usando a matriz de Doehlert e o método univariado, na Tabela 6 são apresentados os valores de LD e LQ obtidos para a condição citada, assim como para a condição considerada selecionada para o método univariado.

Observa-se que ambas as otimizações conduziram a uma mesma região ótima, sendo que o método multivariado permite inclusive a seleção mais simples de condições não estudadas, mas dentro dos intervalos estudados.

O método multivariado utilizando a matriz de Doehlert é um procedimento muito interessante para obtenção do comportamento das variáveis estudadas considerando efeitos de interação com um número muito menor de experimentos. Além disso, o fato de utilizar níveis diferentes para cada variável permitiu o estudo multivariado do pH como parâmetro, uma vez que, por esse parâmetro afetar os sistemas químicos de maneira não linear ao longo da escala útil de pH em solução

aquosa, e intervalos maiores que duas unidades de pH podem omitir alguns efeitos importantes e portanto regiões ótimas. Nesse sentido, outras técnicas de otimização multivariadas, tais com planejamentos fatoriais ou otimização por composto central apresentam severas restrições.

Por outro lado, a otimização univariada continua sendo uma estratégia de avaliação de sistemas químicos muito interessante, pois permite observar de maneira mais detalhada o comportamento dos sistemas químicos. Sua principal desvantagem é o aparente número elevado de experimentos e a complicação à medida que os sistemas contenham muitas interações entre as variáveis. Vale a pena ressaltar que as interações podem ser estudadas no planejamento univariado, como realizado nesse trabalho. Além disso, o comportamento não-linear é melhor observado nessa estratégia de otimização.

Conclui-se, portanto, que os métodos de otimização multivariados e univariados são ferramentas complementares no desenvolvimento de métodos analíticos. A escolha por cada um depende do nível de conhecimento da influência das variáveis sobre a resposta de interesse, do tempo disponível e do custo de cada experimento.

Tabela 6. Comparação dos valores de LOD e LOQ para as condições otimizadas pelo método multivariado utilizando a Matriz de Doehlert e pelo método univariado

Método de Otimização	Tampão citrato	LOD/ (mmol L ⁻¹)	LOQ /(mmol L ⁻¹)
Matriz Doehlert	12,5 mmol L ⁻¹ pH 6,0	7,0	23
Univariado	10,0 mmol L ⁻¹ pH 5,5	9,9	33

4.4 Aplicação do planejamento experimental baseado na matriz de Doehlert para amostra concentrada.

Ainda que o método de 2 pontos (M2P) tenha sido otimizado considerando-se a diluição da amostra, da mesma maneira que ocorre para o método titulométrico, buscou-se nesta etapa do trabalho alterar as condições experimentais de maneira a eliminar a etapa de diluição prévia dos vinagres antes da determinação, elevando a frequência analítica, diminuindo fontes de erros e aumentando a praticidade do método. Nesse sentido, as condições experimentais foram também alteradas para a adição de 1 mL de amostra não-diluída sobre 10 mL de solução tampão.

Assim, um novo experimento utilizando a matriz de Doehlert foi desenhado e previamente avaliado por simulação computacional utilizando a planilha TitGer 2.5 e então verificados experimentalmente.

Tabela 7. Condições Experimentais para Planejamento Experimental baseado na Matriz de Doehlert para uso das amostras sem diluição

Experimentos	Variáveis codificadas		Variáveis experimentais	
	x ₁	x ₂	pH	Concentração /(mmol L ⁻¹)
1	0,0	0,0	5,50	61,0
2	0,0	0,0	5,50	61,0
3	0,0	0,0	5,50	61,0
4	1,0	0,0	7,00	61,0
5	0,5	0,866	6,25	100,0
6	-1,0	0,0	4,00	61,0
7	-0,5	-0,866	4,75	22,0
8	0,5	-0,866	6,25	22,0
9	-0,5	0,866	4,75	100,0

Nessas condições experimentais, as curvas analíticas apresentaram um comportamento muito próximo ao linear.

O modelo *stepwise regression* apresentou a influência acentuada do pH do tampão citrato, como pode ser visto na Figura 35. Assim, houve pequena influência do aumento da concentração do tampão, sendo que a sensibilidade foi maior para a concentração de tampão igual 100,0 mmol L⁻¹. O modelo ajustado apresentou um coeficiente de determinação igual a 0,9995 e um desvio padrão do resíduo de 0,02 L mol⁻¹.

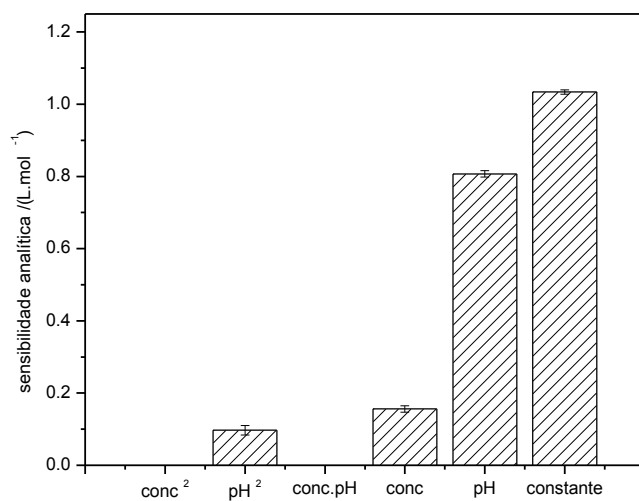


Figura 35. Coeficiente do modelo *stepwise regression* da sensibilidade analítica da concentração do tampão citrato utilizando a adição da amostra não-diluída

$$\hat{y} = (0,097 \pm 0,013) \text{ pH}^2 + (0,807 \pm 0,009) \text{ pH} + (0,156 \pm 0,009) \text{ pH} + (1,034 \pm 0,006) \quad (20)$$

Na Figura 36 é apresentada a superfície de resposta da influência do pH e concentração do tampão citrato sobre a sensibilidade analítica do método, onde pode ser observada que a máxima sensibilidade, nos intervalos estudados está no valor máximo de pH, ou seja, no valor de pH igual a 7,0.

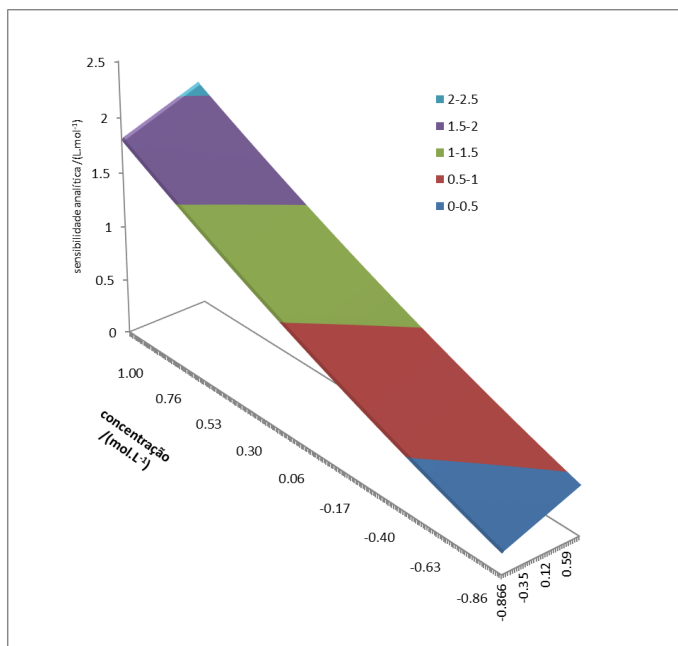


Figura 36. Superfície de resposta da influência do pH e concentração do tampão citrato sobre a sensibilidade mínima.

A condição experimental escolhida para o método dos dois pontos para determinação de acidez em amostras não-diluídas foi aquela utilizando tampão citrato 100 mmol L^{-1} e pH 7,0.

A curva analítica obtida é apresentada na Figura 37. Os modelos linear e quadrático parecem explicar igualmente os dados experimentais, considerando a pequena diferença entre os coeficientes de determinação ajustados (respectivamente iguais a 0,992 e 0,997) e estimativas do desvio-padrão do resíduo (respectivamente iguais a $0,013$ e $0,017 \text{ mol L}^{-1}$), assim como em relação a gráfico dos resíduos (inserto da Figura 37). Dessa maneira, foi usado o modelo linear.

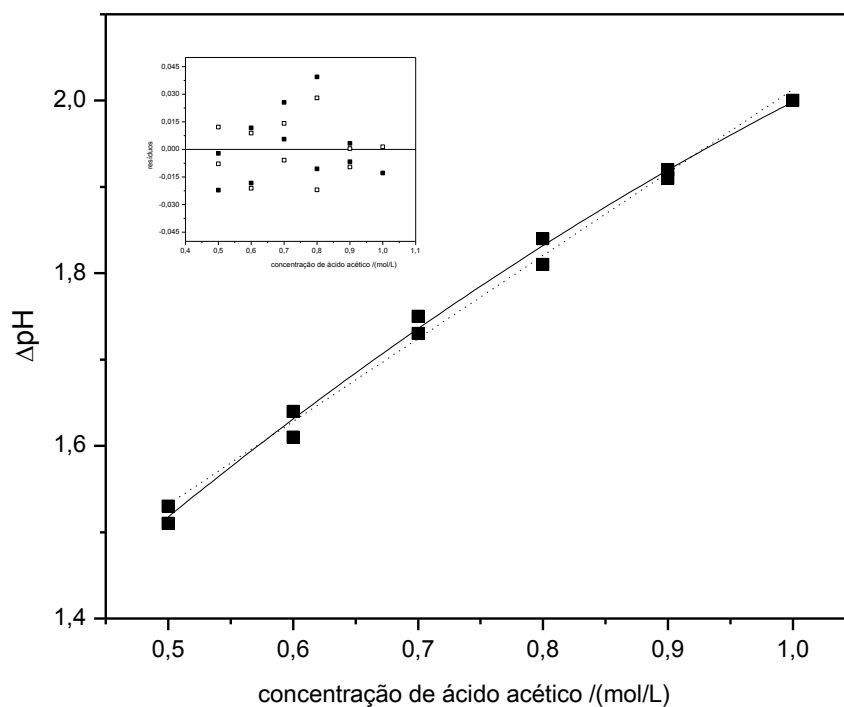


Figura 37. Curva analítica do protocolo otimizado com modelo quadrático (—) e linear (---) sobrepostos.

4.4.1 Figuras de mérito

Nessa condição experimental o modelo de regressão linear da curva analítica obtido é apresentado na Equação 21. O coeficiente de determinação foi 0,992 e a estimativa do desvio-padrão dos resíduos igual a $0,013 \text{ mol L}^{-1}$.

$$\Delta\text{pH} = (1,05 \pm 0,02) + (0,96 \pm 0,03) c/(\text{mol.L}^{-1}) \quad \text{Eq.21}$$

O limite de detecção e o limite de quantificação foram respectivamente iguais a $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,34 \text{ mol L}^{-1}$. A faixa analítica foi de $0,5$ a $1,05 \text{ mol L}^{-1}$.

A repetibilidade do método proposto foi determinada para a concentração de 800 mmol L^{-1} , obtendo-se um coeficiente de variação de 0,64% (N= 10).

O método proposto foi aplicado na determinação de novas amostras comerciais de vinagre (Tabela 8) e seus resultados comparados com aqueles obtidos na titulação potenciométrica.

Tabela 8. Comparação dos resultados da determinação da acidez acética pela titulação potenciométrica e pelo M2P com adição de 1 mL de amostra não-diluída sobre 10 mL de tampão

citrato 100 mmol L⁻¹ e em pH 7,0.

Amostra de vinagre	Acidez Acética/(% ácido acético/(m/v))		
	Titulação	M2P	CV%
De fruta maçã (Santa Amália)	4,24	4,34	2,28
De alho (Toscano)	4,43	4,31	2,82
Álcool colorido (Santa Amália)	4,47	4,46	0,13
De cereal arroz (Kenko)	4,47	4,62	3,38
De fruta maçã (Toscano)	4,47	4,47	0,14
De vinho tinto (Toscano)	4,46	4,50	1,00
De maçã (Toscano)	4,47	4,44	0,57
Álcool colorido (Toscano)	4,46	4,29	3,97

4.5 Considerações sobre o Método dos Dois Pontos (M2P)

O método proposto apresentou uma precisão e exatidão similares às aquelas obtidas para a titulação potenciométrica. É um método rápido, simples e barato, sendo bastante adequado para pequenos laboratórios e trabalhos de rotina em que a demanda é elevada. Dito de outra maneira, com o uso desse método a frequência de medidas de acidez para controle de processos industriais pode ser aumentada, se substituir o método titulométrico.

Além disso, uma vez que o resultado depende da medida de um instrumento analítico, o resultado final é menos dependente do analista do que na titulação com indicador visual. Essa vantagem é importante em laboratório certificados por sistemas de qualidade (garantia de qualidade e controle de qualidade – QA/QC), tais com a ISO 17025 (IMMETRO, 2005), uma vez que os resultados obtidos pelos pHmetros podem ser registrados sem possibilidade de alteração posterior, garantindo a rastreabilidade do resultado.

4.6 Interpretação dos resultados

A partir da equação geral da força do tampão (conforme apresentado no item 1.6.2 Eq.6), aplicada ao sistema citrato, desconsiderando a diluição, temos:

$$-q(Ac)C(Ac) = \Delta W_{at} - \Delta q(cit)c(cit) \quad \text{Eq.22}$$

Onde 'Ac' se refere ao sistema acetato e 'cit' se refere ao sistema citrato.

O sistema ácido-base de Bronsted do citrato apresenta um comportamento muito especial em relação à sua carga efetiva, sendo linear em uma ampla faixa de pH entre 2,7 e 6,8 (Figura 38), sendo possível obter um modelo de regressão linear nessa região (Equação 23), com $R^2 = 0,9997$ e desvio-padrão dos resíduos igual a 0,011. Pode-se observar no inserto da Figura 38 que, embora o ajuste do modelo seja muito bom e suficiente, o comportamento da carga efetiva não é, realmente, linear.

$$\hat{q}(cit) = 1,362 - 0,6011pH \quad \text{Eq.23}$$

Assim, considerando a aproximação do comportamento linear expresso pela Equação 23, a Equação 22 pode ser reescrita (equações 24 e 25):

$$-q(Ac)^{depois}c(Ac) = \Delta Wat - 0,6011(pH^{após} - pH^{início})c(cit) \quad \text{Eq.24}$$

$$\Delta pH = (pH^{após} - pH^{início}) = \frac{\Delta Wat + q(ac)^{depois}c(ac)}{0,6011.c(cit)} \quad \text{Eq.25}$$

Pela Equação 25, pode-se observar que a resposta do Método dos Dois Pontos depende do pH inicial do tampão, pois define a faixa de valores de carga efetiva do ácido acético e do citrato e a concentração do tampão (ou seja, da concentração analítica do sistema citrato). É interessante notar que a dependência da resposta com o pH inicial não é linear, assim como é inversamente proporcional à concentração do tampão, como foi observado durante a otimização.

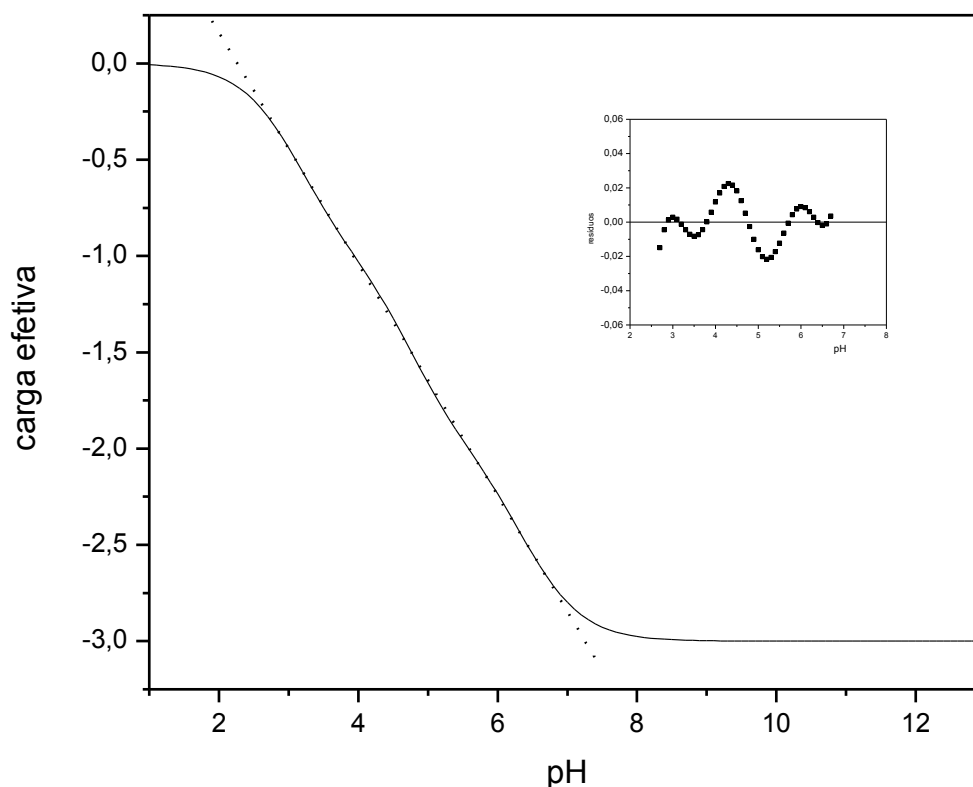


Figura 38. Carga efetiva do sistema citrato e modelo de regressão linear na região entre $2,7 < \text{pH} < 6,7$. O inserto apresenta o gráfico de resíduos do modelo. Dados gerados pela planilha AlfaDist 5.0.

Além disso, a resposta analítica é linearmente relacionada com a concentração de ácido acético, e portanto, com a acidez do ácido acético, desde que a carga efetiva do acetato seja constante (ou varie linearmente) na faixa analítica da curva analítica, assim como a carga efetiva do citrato.

As faixas de pH usadas nos dois métodos desenvolvidos nesse trabalho (para amostra de vinagre diluída e não-diluída) são sobrepostas à curva da carga efetiva do ácido acético e do ácido cítrico em função do pH (Figura 39). A variação de pH na faixa analítica das curvas analíticas foi cerca de uma unidade.

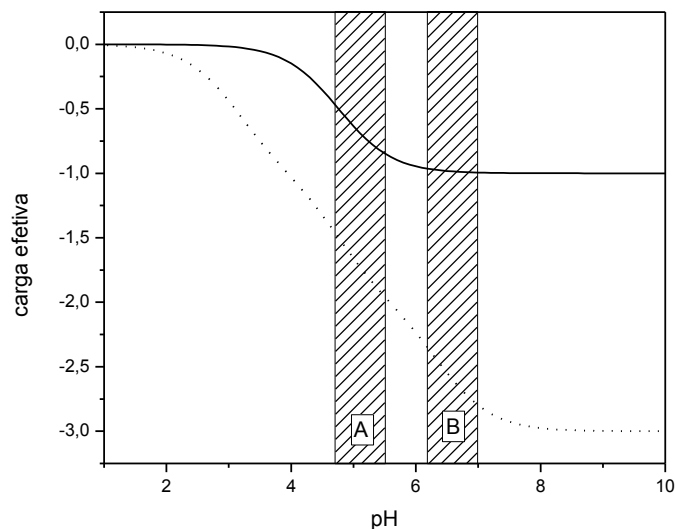


Figura 39. Comparação entre as regiões de pH das curvas analíticas do método otimizado para amostras diluída(A) e não diluída(B) e as curvas de carga efetiva do sistema citrato (...) e acetato (—).

Dessa maneira, pode-se observar que o método para amostras diluídas foi otimizado em uma região onde a carga efetiva do acetato não se manteve constante nem apresentou um comportamento linear, embora esse comportamento tenha ocorrido para o sistema citrato.

Entretanto, na faixa de pH da curva analítica do método otimizado para amostras não-diluídas, tanto a carga efetiva do ácido acético se manteve constante quanto a carga efetiva do citrato variou linearmente com o pH, explicando o comportamento linear observado para a curva analítica.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposto um método não-titulométrico para a determinação de acidez em vinagres, baseado na variação do pH com a adição da amostra (diluída ou não-diluída) sobre tampão citrato. Dois protocolos foram otimizados e validados.

No primeiro, o pH e concentração do tampão foram otimizados tanto por planejamento experimental univariado quando multivariado baseado na Matriz de Doehlert para a adição de 5 mL de amostra diluída sobre 10 mL de tampão citrato. Para o método univariado a condição ótima foi obtida utilizando-se um tampão citrato 10 mmol L⁻¹ em pH 5,5. A faixa analítica foi de 0,002 a 0,02 mol L⁻¹, com R² igual a 0,998 e estimativa do desvio-padrão dos resíduos igual a 0,016. O Limite de Detecção e o Limite de Quantificação foram respectivamente iguais a 0,007 mol L⁻¹ e 0,23 mol L⁻¹. A repetibilidade foi igual a 0,8% para a concentração de 0,01 mol L⁻¹ e a comparação do protocolo com o método titulométrico na determinação de acidez de amostras comerciais de vinagre apresentou erros entre 0,7 % e 4,64% (N = 3). Para o método multivariado utilizando a matriz de Doehlert a condição ótima foi obtida utilizando-se um tampão citrato 12,5 mmol L⁻¹ em pH 6,0. A faixa analítica foi de 0,001 a 0,05 mol L⁻¹, com R² igual a 0,997 e estimativa do desvio-padrão dos resíduos igual a 0,024. O Limite de Detecção e o Limite de Quantificação foram respectivamente iguais a 7,0 mmol L⁻¹ e 23 mmol L⁻¹.

Os resultados experimentais foram comparados com valores obtidos por simulação na planilha eletrônica TitGer 2.5, obtendo-se boa correlação entre os valores de sensibilidade mínima das curvas analíticas em cada situação experimental.

No segundo protocolo, novamente o pH e concentração do tampão foram otimizados com auxílio da matriz de Doehlert, porém para a adição de 1 mL de amostra sem diluição sobre 10 mL de tampão citrato, e em condições previamente simuladas com auxílio na planilha eletrônica TitGer 2.5. A condição ótima foi obtida para adição de 1 mL de amostra sem diluição sobre 10 mL de tampão citrato 100 mmol L⁻¹. A faixa analítica foi de 0,5 a 1,05 mol.L⁻¹, com R²_{aj} igual a 0,992 e estimativa do desvio-padrão dos resíduos igual a 0,013 mol L⁻¹. O Limite de Detecção e o Limite de Quantificação foram respectivamente iguais a 0,11 mol L⁻¹ e 0,34 mol L⁻¹. Uma repetibilidade de 0,64% foi obtida para a concentração de 800

mmol L⁻¹ e a comparação do protocolo com o método titulométrico na determinação de acidez de amostras comerciais de vinagre apresentou erros entre 0,13 % e 3,97% (N = 3).

O método proposto mostrou-se simples, rápido, barato e apresentou resultados similares ao método titulométrico. Além disso, o fato do método utilizar a resposta de um instrumento analítico ao invés da decisão do analista (em relação a pontos de viragem) torna-o mais confiável sob o ponto de vista de garantia da qualidade e controle de qualidade (QA/QC).

6. ETAPAS FUTURAS

Considerando o sucesso no desenvolvimento do método dos dois pontos (M2P) para a determinação de acidez em vinagre utilizando a amostra diluída ou não, é importante um estudo mais aprofundado do método e aplicação em outras matrizes. Assim, sugere-se como futuros trabalhos:

- Aplicação do M2P na determinação de acidez de frutas, sendo os ácido predominantes distintos do ácido acético, como ácido cítrico, em frutas cítricas, ácido málico em maçãs, ácido tartárico em uvas, etc.
- Aplicação do M2P para estudo de respiração de plantas e frutos, onde o gás carbônico será dissolvido em solução tampão adequada.
- Uso do eletrodo de PbO_2 de alta sensibilidade (LIMA et. al., 2005) para aumentar a sensibilidade do M2P
- Avaliação do potencial redutor ou oxidante em solos e sucos, utilizando para isso uma solução tampão redox ao invés de uma solução tampão de pH.
- Avaliar a importância de diferentes parâmetros experimentais na simulação de dados de otimização em química analítica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAV- Associação Nacional das indústrias de Vinagre. Disponível em: <http://www.anav.com.br/legislacao>. Acesso em: 28 abril. 2014.

AQUARONE, E, LIMA, U. A., BORZANI, W. Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação. São Paulo, Editora Edgard Blücher, 1983, 243 p.

AQUARONE, E. et al. Biotecnologia industrial: Engenharia química. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, c. 6, p. 95-96, v. 2, 2001.

BATES, R. G. Determination of pH Theory and Practice – J.Wiley & sons, N.York, 1954, 435p.

BELMONT. Indústria de vinagres Belmont. Disponível em: <http://www.vinagrebmont.com.br>. Acesso em 20 abril. 2014.

CAPELATTO, M.D., 1995, comunicação pessoal.

CASTELO. Castelo alimentos S/A. Disponível em: <http://www.casteloalimentos.com.br>. Acesso em: 06 novembro .2013.

DRAPER, N.R.; SMITH, H.; Applied Regression Analysis, Wiley, 1998, 736p.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema de produção de vinagre. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/index.htm>. 2006. Acesso em: 06 novembro.2013.

FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. Talanta, 63, p. 1061-1067, 2004.

HEINIG. Indústria de vinagres e plásticos Heinig Ltda. A origem do vinagre. Disponível em: <http://www.vinagreheinig.com.br/site/o-vinagre.php>. Acesso em: 12 março. 2014.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade. Acreditação de Laboratórios (ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005). Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/acre_lab.asp. Acesso em: 07 janeiro. 2014.

LUFT, L. Automated gravimetric titrations. Talanta, 27, p. 221-22, 1979.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2012/04/mapa-publica-padrao-de-identidade-e-qualidade-para-vinagres>. Acesso em: 29 abril. 2014.

NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R. E.; Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, Editora da Unicamp, 2010.

NISHIDAI, S. et al. A traditional vinegar produced from unpolished rice, suppresses lipid peroxidation in vitro and in mouse skin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry (Japan)*, 64, p. 1909-1914, 2000.

OGAWA, N. et al. Acetic acid suppresses the increase in disaccharidase activity that occurs during culture of caco-2 cells. *Journal Nutr*, 130, P. 507-513, 2000.

OLIVEIRA, A.F. Equilíbrios em solução aquosa orientados à Aplicação, Campinas: Átomo, 2009.

OLIVEIRA, A. F.; LIMA, A. C.; SILVA, A. F. S. Desenvolvimento de um titulador baseado na contagem de gotas. *Quimica Nova*, vol.33, nº 3, p. 721-724, 2010.

OLIVEIRA, A. F. et al. TitGer - uma planilha eletrônica para simulação de titulação de mistura de compostos polipróticos. *Quimica Nova*, vol.30, nº 1, p. 224-228, 2007.

OLIVEIRA, A. F.. ALFA - biblioteca de funções para Microsoft Excel. 2012. Patente: Programa de Computador. Número do registro: 13279-5, título: "ALFA - biblioteca de funções para Microsoft Excel", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

OLIVEIRA, A. F.. TitGer – planilha eletrônica para simulação de titulação de mistura de sistemas polipróticos, 2014. pedido de registro do Programa de nº BR 51 2013 001115 9 - Instituto de Propriedade Industrial (INPI,) em 16 de outubro 2013.

OLSEN, J. R.; HANSEN, E.H. *Anal. Chim. Acta*, 136, p. 101-112, 1982.

PEDROSO, P. R. F. Produção de Vinagre de Maça em Biorreator Airlift, 2003. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2003.

RIZZO, L.A; M, A. Características analíticas de vinagres comerciais de vinhos brasileiros. **Braz. J. Food Technol**, p. 25-31, 1998.

SAAD, B.; LING, C. W. L.; JAB, M. S. ; LIM, B. P.; ALI, A. S. M.; WAI, W. T.; SALEH, M. I. Determination of free fatty acids in palm oil samples using non-aqueous flow injection titrimetric method. *Food Chemistry*, 102, p. 1407-1414, 2007.

SANTIAGO, O. R.; SILVA, S. F. A.; **OLIVEIRA, A. F.** . Avaliação do uso de EDTA tetraneutralizado em titulação complexométrica por simulação de equilíbrios simultâneos. In: Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2010, Viçosa. Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG. Viçosa, 2010. v. QAP. p. 37.

SCHEIDT, F.W. et al. Processo Fermentativo rápido de produção de vinagre. EXPOUT 2010.

SILVA, S.F.A.; OLIVEIRA, A. F. . Exemplos de aplicações do TitGer 1.4- Estudo da Influência de alguns parâmetros na determinação da alcalinidade por titulação potenciométrica . In: 11 Encontro Nacional de Química Analítica, 2001, Campinas.

Livro de Resumos do 11 Encontro Nacional de Química Analítica, 2001. v. 1. p. OT-21-OT-21.

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

SLYKE, V.D.D. Solution and reaction of the buffer buffer and the concentration dissociation constant of the of buffer value to the relationship values and on the on the measurement of buffera J. Biol.Chem.1922,52,525-570.

SPINOSA, W. A. Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústria de vinagre. Tese de Doutorado. Engenharia de alimentos, Universidade estadual de Campinas, departamento de ciência de alimentos, 2002.

STADEN, J. F. V.; MASHAMBA, M. G.; STEFAN, R. I. An on-line potentiometric sequential injection titration process analyser for the determination of acetic acid. Anal Bioanal Chem, 374, p. 141-144, 2002.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. Aquatic Chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters. 3.ed. New York: Wiley- Interscience, 1995.

TAKEMOTO, S.Y. Avaliação do Teor de Acetoína em Vinagres como forma de verificação de sua genuinidade. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2000.

TEÓFILO, F. R.; FERREIRA, M. M.; Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos Experimentais, um tutorial. QNova, Vol. 29, No. 2, 338-350, 2006.

TERRA, J.; ROSSI, A. V. Sobre o desenvolvimento da análise volumétrica e algumas aplicações atuais. Química Nova, vol. 28, nº 1, p. 166-171, 2005.

TESFAYE, W. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. Trends in Food Science and Technology, v. 13, p. 12-21, 2002.

VAHL, K. et al. Determination of the titratable acidity and the pH of wine based on potentiometric flow injection analysis, Talanta 111, p. 134–139, 2013.

XAVIER, L. et al. Produção do vinagre de maçã. 2009. 11 f. Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, 2009. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAT1AAA/producao-vinagre-maca>>. Acesso em: 09 mar. 2013.

ZOU, X.;LI, Y.;SHI,J.HUANG,X.;ZHAO,J. Traditional Vinegars Identification by Colorimetric Sensor. *Procedia Chemistry*, 6, p. 20 – 26, 2012.