

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Luiza Baumann

**DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM PETRÓLEO UTILIZANDO
COLORIMETRIA COM IMAGENS DIGITAIS**

Santa Maria, RS
2022

Luiza Baumann

**DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM PETRÓLEO UTILIZANDO COLORIMETRIA
COM IMAGENS DIGITAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Edson Irineu Müller

Santa Maria, RS
2022

Baumann, Luiza
DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM PETRÓLEO UTILIZANDO
COLORIMETRIA COM IMAGENS DIGITAIS / Luiza Baumann.-
2022.
95 p.; 30 cm

Orientador: Edson Irineu Müller
Coorientador: Cezar Augusto Bizzi
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Petróleo 2. Cálcio 3. Imagens digitais 4. Calibração
multivariada 5. PhotoMetrix I. Müller, Edson Irineu II.
Bizzi, Cezar Augusto III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LUIZA BAUMANN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Luiza Baumann

**DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM PETRÓLEO UTILIZANDO COLORIMETRIA
COM IMAGENS DIGITAIS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Aprovada em 18 de março de 2022.



Edson Irineu Müller, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Adilson Ben da Costa, Dr. (UNISC)

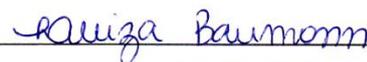


Fábio Andrei Duarte, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2022

DECLARAÇÃO

A pesquisa descrita nesta dissertação foi totalmente elaborada por mim e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta dissertação não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.

A handwritten signature in blue ink that reads "Luiza Baumann". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Luiza Baumann

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)**, pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro por meio da bolsa de mestrado.

Ao **Prof. Dr. Edson Irineu Müller** pela orientação neste trabalho, pelo exemplo profissional e pessoal, pela total disponibilidade de acompanhar e discutir as atividades realizadas no decorrer desse período, pela paciência, confiança, amizade e pelas oportunidades de crescimento.

Aos membros do exame de qualificação, **Profa. Dra. Paola de Azevedo Mello** e **Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte**, pelas contribuições e sugestões para o melhor desenvolvimento do trabalho. Aos **Profs. Drs. Adilson Ben da Costa** e **Fábio Andrei Duarte**, pela participação na banca examinadora desta dissertação e pelas sugestões, que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos Profs. Drs. **Érico Marlon de Moraes Flores**, **Cezar Augusto Bizzi**, **Valderi Luiz Dressler**, **Jussiane Souza da Silva**, **Rochele Sogari Picoloto**, **Rodrigo Cordeiro Bolzan**, **Aline Lima Hermes Müller** e **Darlina Mello Souza** pelo exemplo de profissionalismo, por todos os ensinamentos repassados e pelas oportunidades ofertadas para meu crescimento profissional.

À **Kéllen F. Anshau** e **Caroline Matte Senger** pela amizade, disponibilidade e auxílio durante a realização deste trabalho.

A todos os colegas do **LAQIA/CEPETRO** pelo convívio, amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Ademir**, funcionário da secretaria do PPGQ, pelo auxílio no decorrer do mestrado.

Em especial, agradeço aos meus pais **Rogério** e **Adelaine**, que sempre me incentivaram nos meus estudos, sem medir esforços para dar todo o suporte necessário, pelo exemplo pessoal, honestidade e amor incondicional. À minha irmã **Eduarda**, pelo carinho e por sempre me apoiar e incentivar nas minhas decisões. Agradeço pela compreensão dos amigos que estiveram comigo desde o início e aos que conquistei durante esta trajetória.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM PETRÓLEO UTILIZANDO COLORIMETRIA COM IMAGENS DIGITAIS

AUTORA: Luiza Baumann
ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Irineu Müller

Nesse trabalho foi desenvolvido um método para a determinação de Ca em petróleo utilizando a colorimetria com imagens digitais com o aplicativo PhotoMetrix. Para isso, foi utilizado um sistema portátil baseado na captura de imagens digitais por uma câmera endoscópica e o processamento e tratamento das imagens foi feito utilizando o aplicativo PhotoMetrix PRO. A análise colorimétrica foi baseada nas reações de complexação com o Ca usando calceína, murexida e calcon. Foram avaliados os parâmetros de pH e concentração de cada complexante necessária para a formação de complexos estáveis com o Ca. Também foi utilizado um planejamento de experimentos do tipo Doehlert, modelo quadrático, de três variáveis, para avaliar as influências do volume total de solução (1 a 2 mL), distância focal da câmera (2 a 20 mm) e intensidade de luz (30 a 180 lx) para a aquisição das imagens digitais. Por último, foram otimizadas as regiões de interesse para a captura das imagens digitais (32x32, 64x64 e 128x128 pixels) e avaliadas as possíveis interferências causadas pela presença de magnésio. Após a captura das imagens, os dados foram processados no aplicativo PhotoMetrix PRO utilizando o modelo de calibração multivariada pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS). A norma ASTM D4807 foi avaliada como método de preparo de amostras para posterior determinação de Ca nas amostras de petróleo. Diante disso, foi feito o isolamento das espécies salinas contidas no petróleo em membrana de 0,45 μm após filtração, como preconizado pela norma ASTM D4807. O método proposto, com as condições otimizadas, foi aplicado para 5 amostras de petróleo com concentrações de Ca variando de 5 até aproximadamente 900 mg kg^{-1} , para avaliar a capacidade preditiva do modelo. Os resultados do método proposto foram comparados com os valores obtidos pelas solubilizações das amostras de petróleo e também, com os valores obtidos pela digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema com câmara única de reação (MAWD-SRC) com determinação por ICP OES, como métodos de referência. Coeficientes de determinação superiores a 0,997 foram obtidos para os modelos de calibração construídos para os três complexantes, com a utilização de 5 fatores. Valores de RMSECV de 0,26, 0,35 e 0,32 mg L^{-1} foram obtidos para os modelos de regressão para a calceína, murexida e calcon, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre o método proposto e os métodos de referência (ANOVA, intervalo de 95% de confiança). Os limites de detecção e quantificação foram 0,62 e 2,05 mg kg^{-1} , 0,12 e 0,40 mg kg^{-1} e 0,15 e 0,51 mg kg^{-1} , para os complexantes calceína, murexida e calcon, respectivamente. Não foi observada interferência significativa do magnésio nas amostras de petróleo utilizadas neste trabalho. Por fim, o método colorimétrico por imagens digitais com PhotoMetrix é considerado uma alternativa viável para a determinação de Ca em amostras de petróleo, devido a sua possibilidade de miniaturização, baixo custo, facilidade operacional e rapidez na obtenção e processamento das imagens digitais.

Palavras-chave: Petróleo. Cálcio. Imagens digitais. Calibração multivariada. PhotoMetrix.

ABSTRACT

DETERMINATION OF CALCIUM IN CRUDE OIL USING COLORIMETRY WITH DIGITAL IMAGES

AUTHOR: Luiza Baumann
ADVISOR: Prof. Dr. Edson Irineu Müller

In this work, a method was developed for the determination of Ca in petroleum using colorimetry with digital images with the PhotoMetrix application. For this purpose, a portable system was used based on the capture of digital images by an endoscopic camera and the processing and treatment of the images was done using the PhotoMetrix PRO application. The colorimetric analysis was based on complexation reactions with Ca using calcein, murexide and calcon. The pH parameters and concentration of each complexing agent necessary for the formation of stable complexes with Ca were evaluated. A three variable Doehlert matrix (DOE), quadratic model, was also used to evaluate the influences of the total volume of solution (1 to 2 mL), camera focal length (2 to 20 mm) and light intensity (30 at 180 lx) for digital image acquisition. Finally, the regions of interest for capturing digital images (32x32, 64x64 and 128x128 pixels) were optimized and the possible interference caused by the presence of magnesium was evaluated. After the capture of the images, the data were processed in the PhotoMetrix PRO application using the multivariate calibration model by the partial least squares (PLS) method. ASTM D4807 was evaluated as a sample preparation method for further determination of Ca in petroleum samples. Therefore, the saline species contained in the crude oil were isolated in a 0.45 μm membrane after filtration, as recommended by the ASTM D4807 standard. The proposed method with optimized conditions was applied to 5 crude oil samples with Ca concentrations ranging from 5 to approximately 900 mg kg^{-1} , to evaluate the predictive capacity of the model. The results of the proposed method were compared with the values obtained by the solubilization of the petroleum samples with determination by ICP OES and also with the values obtained by microwave-assisted wet digestion using single reaction chamber (MAWD-SRC) with determination by ICP OES, as reference methods. Determination coefficients greater than 0.997 were obtained for the calibration models built for the three complexing agents, using 5 factors. RMSECV values of 0.26, 0.35 and 0.32 mg L^{-1} were obtained for the regression models for calcein, murexide and calcon, respectively. No significant differences were observed between the proposed method and the reference methods (ANOVA, 95% confidence interval). The detection and quantification limits were 0.62 and 2.05 mg kg^{-1} , 0.12 and 0.40 mg kg^{-1} and 0.15 and 0.51 mg kg^{-1} , for the complexing agents calcein, murexide and calcon, respectively. No significant interference of magnesium was observed in petroleum samples used in this work. Finally, the colorimetric method by digital images with PhotoMetrix is considered a viable alternative for the determination of Ca crude oil samples, due to its possibility of miniaturization, low cost, operational ease and speed in obtaining and processing digital images.

Keywords: Crude oil. Calcium. Digital images. Multivariate calibration. PhotoMetrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Modelo de cores RGB.....	33
Figura 2 –	Sistema utilizado para análise colorimétrica com imagens digitais utilizando o aplicativo PhotoMetrix UVC desenvolvido por Costa et al. (2020).....	38
Figura 3 –	Dispositivo utilizado para a determinação de cálcio por análise colorimétrica nas amostras de petróleo. Em destaque, a câmera USB, o local para a introdução da amostra em frasco de polipropileno e o regulador da intensidade de luz emitida pelo LED.....	44
Figura 4 –	Sistema de filtração utilizado para determinação do teor de sedimentos nas amostras de petróleo.....	46
Figura 5 –	Fluxograma dos procedimentos e parâmetros avaliados para a determinação de cálcio nas amostras de petróleo.....	53
Figura 6 –	Resultados dos modelos de calibração por PLS obtidos pelo aplicativo PhotoMetrix em função do pH e da concentração de complexante necessária para a formação dos complexos com o Ca. (A) Calceína; (B) Murexida e (C) Calcon.....	60
Figura 7 –	Curva de calibração para a calceína utilizando a resposta dos canais RGB em função da concentração de cálcio (n = 3).....	63
Figura 8 –	Gráfico de probabilidade normal para os coeficientes obtidos para a calceína.....	65
Figura 9 –	Superfícies de respostas das variáveis significativas por análise colorimétrica no PhotoMetrix utilizando solução de referência de cálcio (5 mg L ⁻¹) com a calceína.....	66
Figura 10 –	Curva de calibração para a murexida utilizando a resposta dos canais RGB em função da concentração de cálcio (n = 3).....	69
Figura 11 –	Gráfico de probabilidade normal para os coeficientes obtidos para a murexida.....	70

Figura 12 – Superfícies de respostas das variáveis significativas por análise colorimétrica no PhotoMetrix utilizando solução de referência de cálcio (5 mg L^{-1}) com a murexida.....	71
Figura 13 – Curva de calibração para o calcon utilizando a resposta dos canais RGB em função da concentração de cálcio ($n = 3$).....	74
Figura 14 – Gráfico de probabilidade normal para os coeficientes obtidos para o calcon.....	75
Figura 15 – Superfícies de respostas das variáveis significativas por análise colorimétrica no PhotoMetrix utilizando solução de referência de cálcio (5 mg L^{-1}) com o calcon.....	76
Figura 16 – Valores de RMSECV em função do número de fatores do modelo PLS obtidos para a curva de calibração, utilizando soluções de referência de cálcio 1 a 10 mg L^{-1} . Em destaque as três regiões de interesse avaliadas.....	78
Figura 17 – Valores de RMSEC, RMSECV e RMSEP em função das regiões de interesse avaliadas no modelo PLS obtidos para a curva de calibração, utilizando soluções de referência de cálcio 1 a 10 mg L^{-1} e 5 fatores.....	80
Figura 18 – Parâmetros da curva de calibração pelo modelo PLS utilizando a calceína. Condições: $100 \mu\text{L}$ de solução de referência de cálcio, $130 \mu\text{L}$ de $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH } 12$), $150 \mu\text{L}$ de calceína ($0,120 \text{ mmol L}^{-1}$) e o restante avolumado a 2 mL (volume total de solução), 30 lx de intensidade de luz, 20 mm de distância focal da câmera, 128×128 pixels ($n = 4$).....	82
Figura 19 – Parâmetros da curva de calibração pelo modelo PLS utilizando a murexida. Condições: $100 \mu\text{L}$ de solução de referência de cálcio, $130 \mu\text{L}$ de $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH } 12$), $99 \mu\text{L}$ de murexida ($0,174 \text{ mmol L}^{-1}$) e o restante avolumado a 2 mL (volume total de solução), 180 lx de intensidade de luz, 11 mm de distância focal da câmera, 64×64 pixels ($n = 4$).....	83
Figura 20 – Parâmetros da curva de calibração pelo modelo PLS utilizando o calcon. Condições: $100 \mu\text{L}$ de solução de referência de cálcio, 130	

μL de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12), $66,6 \mu\text{L}$ de calcon ($0,080 \text{ mmol L}^{-1}$) e o restante avolumado a 2 mL (volume total de solução), 150 lx de intensidade de luz, 2 mm de distância focal da câmera, 128×128 pixels ($n = 4$)..... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Condições de operação utilizadas na determinação de Ca, Mg, Na, Ba, Li e Sr por ICP OES.....	45
Tabela 2 –	Valores reais e codificados de cada variável para avaliação da melhor condição de trabalho na aquisição das imagens digitais usando o PhotoMetrix.....	51
Tabela 3 –	Ensaio gerados pelo planejamento DOE para avaliar a melhor condição de trabalho na aquisição das imagens digitais usando o PhotoMetrix.....	51
Tabela 4 –	Resultados para a determinação do teor de água, teor de sedimentos e °API presentes nas amostras de petróleo utilizadas neste trabalho (n = 3).....	55
Tabela 5 –	Concentração de Ca, Mg, Na, Ba, Li e Sr em sedimentos de petróleo após solubilização e MAWD-SRC, com determinação por ICP OES. Resultados expressos em mg kg-1 (n = 3).....	57
Tabela 6 –	Resultados dos 19 ensaios do planejamento DOE quadrático correspondentes aos canais R, G e B obtidos pelo modelo PLS no aplicativo PhotoMetrix para a calceína (n = 3).....	62
Tabela 7 –	Análise de variância para regressão múltipla do planejamento DOE para a calceína.....	64
Tabela 8 –	Valores reais e codificados utilizados para a obtenção da condição ótima de trabalho empregando o Solver para a calceína.....	67
Tabela 9 –	Resultados dos 19 ensaios do planejamento DOE quadrático correspondentes aos canais R, G e B obtidos pelo modelo PLS no aplicativo PhotoMetrix para a murexida (n = 3).....	68
Tabela 10 –	Análise de variância para regressão múltipla do planejamento DOE para a murexida.....	69
Tabela 11 –	Valores reais e codificados utilizados para a obtenção da condição ótima de trabalho empregando o Solver para a murexida.....	72

Tabela 12 – Resultados dos 19 ensaios do planejamento DOE quadrático correspondentes aos canais R, G e B obtidos pelo modelo PLS no aplicativo PhotoMetrix para o calcon (n = 3).....	73
Tabela 13 – Análise de variância para regressão múltipla do planejamento DOE para o calcon.....	74
Tabela 14 – Valores reais e codificados utilizados para a obtenção da condição ótima de trabalho empregando o Solver para o calcon.....	77
Tabela 15 – Concentração de cálcio nas amostras de petróleo pelo método de solubilização (ASTM D4807) e determinação por PhotoMetrix. Por comparação, os resultados obtidos pela MAWD-SRC e solubilização com determinação no ICP OES. Resultados expressos em mg kg ⁻¹ , média ± desvio padrão, n = 3.....	85
Tabela 16 – Resultados obtidos para a concentração de cálcio na presença de diferentes concentrações de magnésio pelo PhotoMetrix (n = 3).....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica, do inglês <i>atomic absorption spectrometry</i>
°API	do inglês <i>American Petroleum Institute</i>
ASTM	Sociedade Americana para Testes e Materiais, do inglês <i>American Society for Testing and Materials</i>
BSW	do inglês <i>basic solids and water</i>
CCD	Dispositivo de carga acoplada, do inglês <i>charge coupled device</i>
CENPES	Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello
CMOS	Semicondutor metal-óxido complementar, do inglês <i>complementary metal-oxide semiconductor</i>
CRM	Material de referência certificado, do inglês <i>certified reference material</i>
DOE	Matriz Doehlert, do inglês <i>doehlert matrix</i>
EDS-raios-X	do inglês <i>Energy - Dispersive X-ray Spectrometry</i>
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, <i>flame atomic absorption spectrometry</i>
HSI	Matiz, saturação e intensidade, do inglês <i>hue, saturation and intensity</i>
HSL	Matiz, saturação e brilho, do inglês <i>hue, saturation and lightness</i>
HSV	Matiz, saturação e valor, do inglês <i>hue, saturation and value</i>
ET AAS ou GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, do inglês <i>electrothermal atomic absorption spectrometry</i> ou <i>graphite furnace atomic absorption</i>

ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
LED	Diodo emissor de luz, do inglês <i>light-emitting diode</i>
MAWD	Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, do inglês <i>microwave-assisted wet digestion</i>
PCA	Análise de componentes principais, do inglês <i>principal component analysis</i>
PIXEL	Elementos da imagem, do inglês <i>picture elements</i>
PLS	Mínimos quadrados parciais, do inglês <i>partial least square</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
RGB	Vermelho, verde e azul, do inglês <i>red, green and blue</i>
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio quadrático da calibração, do inglês <i>root mean square error of calibration</i>
RMSECV	Raiz quadrada do erro médio de calibração cruzada, do inglês <i>root mean square error of cross validation</i>
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão, do inglês <i>root mean square error of prediction</i>
SRC	Câmara única de reação, do inglês <i>single reaction chamber</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	PETRÓLEO.....	21
2.1.1	Composição química do petróleo.....	21
2.1.2	Formação de emulsões e os problemas causados pela presença dos sais no petróleo.....	22
2.2	TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM PÉTROLEO.....	24
2.2.1	Normas oficiais para a determinação de cálcio em petróleo.....	24
2.2.2	Métodos de preparo de amostra para posterior determinação de cálcio em petróleo.....	25
2.2.3	Técnicas instrumentais para determinação de cálcio.....	27
2.3	FORMAÇÃO DE COMPLEXOS COM O CÁLCIO.....	29
2.3.1	Estabilidade de um complexo.....	30
2.3.2	Principais complexantes utilizados na determinação de Ca.....	30
2.4	COLORIMETRIA COM IMAGENS DIGITAIS.....	31
2.4.1	Fundamentos.....	31
2.4.2	Quimiometria e calibração multivariada.....	35
2.4.3	PhotoMetrix.....	36
2.4.4	Aplicações da colorimetria por imagens digitais.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1	REAGENTES.....	42
3.2	AMOSTRAS.....	43
3.3	INSTRUMENTAÇÃO.....	43
3.3.1	Determinação do teor de água.....	45
3.3.2	Determinação do teor de sedimentos e isolamento das espécies salinas para determinação de cálcio.....	46
3.4	PROCEDIMENTOS.....	47
3.4.1	Determinação do teor de água nas amostras de petróleo.....	47
3.4.2	Determinação do teor de sedimentos e isolamento das espécies salinas nas amostras de petróleo.....	47
3.4.3	Decomposição assistida por radiação micro-ondas em SRC.....	48

3.4.4	Determinação de cálcio por colorimetria com imagens digitais utilizando o PhotoMetrix.....	49
3.4.4.1	Influência do pH e otimização da concentração do complexante necessário para a formação dos complexos com o cálcio.....	49
3.4.4.2	Avaliação do volume total da solução, distância focal da câmera e intensidade de luz para a obtenção das imagens digitais.....	50
3.4.4.3	Investigação de interferências causadas pelo magnésio.....	52
3.4.4.4	Avaliação dos critérios para verificar a qualidade dos modelos de calibração para determinação de Ca.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	54
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PETRÓLEO.....	55
4.2	DETERMINAÇÃO DE Ca, Mg, Na, Ba, Li e Sr EM PETRÓLEO PELOS MÉTODOS DE REFERÊNCIA.....	55
4.3	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO COM IMAGENS DIGITAIS UTILIZANDO O APLICATIVO PHOTOMETRIX.....	58
4.3.1	Avaliação da influência do pH e otimização da concentração do complexante necessária para a formação dos complexos com o cálcio.....	58
4.3.2	Avaliação do volume total da solução, distância focal da câmera e intensidade de luz para a obtenção das imagens digitais.....	60
4.3.2.1	Calceína.....	62
4.3.2.2	Murexida.....	67
4.3.2.3	Calcon.....	72
4.3.3	Otimização da região de interesse.....	77
4.3.4	Determinação de cálcio nas amostras de petróleo pela colorimetria com imagens digitais no PhotoMetrix.....	81
4.3.5	Avaliação da interferência do magnésio.....	85
4.3.6	Estabilidade dos complexantes.....	87
5	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é composto majoritariamente por hidrocarbonetos e em uma menor proporção por compostos orgânicos que contêm enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais. Essa mistura é de ocorrência natural, encontrando-se normalmente no estado líquido (SPEIGHT, 2001). A sua extração geralmente é realizada juntamente com água livre ou água na forma de emulsão. Nas emulsões de petróleo estão contidas algumas espécies indesejadas, decorrentes da etapa de extração, como os sedimentos, o elevado teor de água e os sais (ALVES et al., 2022; UMAR et al., 2018).

Dentre os sais associados a fase aquosa das emulsões água/óleo, estão os sais de cloreto, formados com os metais cálcio, sódio e magnésio, como o CaCl_2 , NaCl e MgCl_2 , respectivamente. Esses sais contidos no petróleo, quando são submetidos a altas temperaturas, tendem a reagir com o vapor de água produzido, por meio de uma reação de hidrólise, formando o ácido clorídrico. Consequentemente, ocorre a corrosão dos equipamentos de destilação, além de causar o entupimento das tubulações, válvulas e bombas (SPEIGHT, 2001; SPEIGHT, 2006).

Diante disso, há a necessidade de se fazer o controle desses contaminantes presentes no petróleo, em especial a quantificação de cálcio. O monitoramento da concentração de cálcio pode ser feito por diversas formas, porém as mais usuais são empregando diluição em solventes orgânicos, calcinação da amostra com posterior digestão ácida e a decomposição por via úmida com radiação micro-ondas, como métodos de preparo de amostra, e a quantificação é realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de absorção atômica com chama e forno de grafite (FLORES, 2014; MELLO et al., 2012).

Apesar dos métodos e técnicas acima citados serem bem estabelecidos, progressivamente tem sido desenvolvidos métodos utilizando técnicas que forneçam resultados mais rápidos, que possibilitem a análise no local e que tenham um baixo custo. Dessa forma, como alternativa, é possível fazer a determinação de cálcio utilizando a análise colorimétrica por imagens digitais. Em análises onde há modificação de cor mediante uma reação, pode-se efetuar a captura e o processamento de imagens digitais, sem a necessidade de equipamentos robustos, como espectrofotômetros ou colorímetros. Ainda, o desenvolvimento de novos métodos miniaturizados e portáteis promove maior mobilidade, sem prejuízo à qualidade analítica dos resultados (FAN et al., 2021; FERNANDES et al., 2020).

As análises colorimétricas baseiam-se na formação de compostos com cor em solução, a partir de diversas reações químicas, como complexação, precipitação, oxirredução, entre outras. Particularmente, nas reações de complexação, são utilizados agentes complexantes sensíveis ao íon metálico, os quais mudam de coloração, conforme a concentração do metal presente em solução, em faixas de pH específicas para a formação do complexo (BACCAN, 2001; HARRIS et al., 2010; SKOOG et al., 2013; VOGEL et al., 1989).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método colorimétrico para a determinação de cálcio em petróleo, utilizando um sistema portátil para a captura das imagens digitais e o processamento das mesmas através do aplicativo PhotoMetrix PRO. Para tanto, foram otimizados alguns parâmetros importantes para a formação dos complexos na reação colorimétrica, como pH e a concentração de complexante necessária, além dos parâmetros do dispositivo de detecção colorimétrica. Como método de preparo de amostra, buscou-se adaptar a norma ASTM D4807, utilizada para a determinação do teor de sedimentos empregando uma filtração, para posterior determinação de cálcio no PhotoMetrix. A exatidão do método foi realizada através da comparação dos resultados do método proposto com os resultados obtidos com a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e das solubilizações com posterior determinação por ICP OES.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será abordada a revisão bibliográfica, a qual foi dividida em 4 partes principais. Na primeira parte, serão abordados os aspectos gerais sobre o petróleo, o processo de formação de emulsões e os problemas causados pela presença de sais no petróleo. Na segunda seção, serão apresentadas as normas oficiais, os métodos de preparo de amostras e as técnicas para a determinação de cálcio em petróleo e seus derivados. Na terceira etapa, serão tratados os conceitos da formação de complexos com o cálcio e seus fundamentos, estabilidade de um complexo e os principais complexantes utilizados. Por fim, serão abordados os fundamentos da análise colorimétrica por imagens digitais, seus fundamentos, além dos métodos quimiométricos utilizados para o tratamento dos dados da colorimetria com imagens digitais obtidas com o aplicativo PhotoMetrix.

2.1 PETRÓLEO

O petróleo é composto por uma mistura de hidrocarbonetos, associado a pequenas quantidades de compostos orgânicos formados com enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais. Dentre as diversas teorias que buscam explicar a origem do petróleo, uma das mais aceitas é a de que o petróleo é gerado por meio da deterioração da matéria orgânica acumulada nas rochas sedimentares, durante milhares de anos, em condições térmicas adequadas (temperatura e pressão). Ele é utilizado principalmente como combustível, gás, fonte de energia nas indústrias, além de prover as matérias primas utilizadas para a produção de polímeros, plásticos e diversos outros produtos (RIAZI, 2005; SPEIGHT, 2006).

2.1.1 Composição química do petróleo

O petróleo apresenta uma gama de diferentes compostos orgânicos, cuja composição varia em função da região e da profundidade, do tempo/idade da reserva petrolífera e das condições em que o petróleo foi submetido, tais como temperatura e pressão. Além disso, o petróleo também pode apresentar, dependendo da sua origem, alterações na cor, odor, entre outras propriedades (GLUYAS e SWARBRICK, 2003; SPEIGHT, 2001).

A grande maioria dos constituintes dos hidrocarbonetos no petróleo, é composto por grupos parafínicos, naftênicos e aromáticos. As parafinas são hidrocarbonetos saturados, com cadeias lineares ou ramificadas, enquanto que os naftenos podem apresentar um ou mais anéis, além de cadeias laterais. Já os hidrocarbonetos aromáticos, podem conter em sua estrutura um ou mais anéis benzênicos, podendo estar ligados a anéis naftênicos e cadeias parafínicas. Esses compostos resultam em alterações das propriedades físico-químicas do petróleo, dependendo do grupo predominante (JONES e PUJADÓ, 2006).

Com relação à composição elementar, a variação não é tão significativa. O petróleo é composto majoritariamente por hidrocarbonetos, apresentando em massa de 83 a 87% de carbono e 10 a 14% de hidrogênio. Ainda, em menores proporções, o petróleo contém de 0,1 a 2% de nitrogênio, 0,05 a 1,5% de oxigênio, 0,05 a 6% de enxofre e teores inferiores a 0,3% de metais, como Fe, Ni, V, entre outros (SPEIGHT, 2001).

A classificação do petróleo é feita por diversos parâmetros físico-químicos, tais como a densidade, pressão de vapor, ponto de fluidez, viscosidade, acidez, entre outros. Entretanto, a forma mais empregada de classificação do petróleo consiste na determinação da densidade, de acordo com o *American Petroleum Institute* (API). A densidade pode ser definida como a relação entre a massa específica do óleo e do padrão, a uma determinada temperatura. Com base na densidade, o petróleo é caracterizado como extra leve, leve, médio, pesado, extrapesado e asfáltico (FARAH, 2012; GAUTO et al., 2016; SPEIGHT, 2006).

Diante disso, utiliza-se o °API como medida da densidade para estimar o valor comercial do petróleo, através da Equação 1:

$$^{\circ}API = \frac{141,5}{d_{15,6/15,6}} - 131,5 \quad (1)$$

Em que, $d_{15,6/15,6}$ é a razão entre a densidade do petróleo a 15,6 °C e a densidade da água na mesma temperatura. Os petróleos extrapesados apresentam °API entre 15 e 19, os pesados entre 19 e 27, os intermediários entre 27 e 33 e aqueles com °API superiores a 33 são considerados leves (FARAH, 2012; GAUTO et al., 2016; SPEIGHT, 2006).

2.1.2 Formação de emulsões e os problemas causados pela presença dos sais no petróleo

Um dos maiores problemas encontrados na indústria petrolífera é a elevada quantidade de água que está associada a extração do petróleo. Geralmente, o petróleo é extraído dos poços juntamente com água livre ou água emulsionada, produzindo emulsões. Basicamente, as emulsões podem ser do tipo água-em-óleo (A/O), óleo-em-água (O/A) e emulsões múltiplas (água-em-óleo-em-água, A/O/A), sendo a emulsão água em óleo o tipo mais comum na indústria petrolífera (ABDULREDHA et al., 2020).

As emulsões são formadas dentro do reservatório quando o petróleo e a água, presente naturalmente no poço ou injetada durante a extração, entram em contato e começam a ser coproduzidos. A formação dessas emulsões ocorre principalmente devido ao fluxo turbulento nos dutos ao longo do processo de perfuração. A agitação

e a turbulência formada nos poços, resultantes desse processo, geram forças de cisalhamento suficientemente altas para provocar a dispersão da água em gotículas na fase oleosa e vice-versa, formando assim as emulsões (UMAR et al., 2018; WONG et al., 2015; YONGUEP et al., 2022).

Além disso, a presença de agentes emulsificantes no petróleo, como asfaltenos, ceras, bases e ácidos orgânicos, sólidos inorgânicos e sais dissolvidos podem aumentar a estabilidade das emulsões. Quanto maior a quantidade de agentes emulsificantes, maior será a estabilidade de uma emulsão, pois o filme interfacial se torna mais rígido, dificultando o rompimento e a coalescência das gotas (ALVES et al., 2022; KANG et al., 2011; UMAR et al., 2018).

A corrosão causada nos tubos de refino permanece sendo um dos maiores obstáculos enfrentados nas refinarias de petróleo, devido a presença de sedimentos, água e sais. A presença dessas espécies pode causar diversos efeitos adversos na qualidade do produto obtido, bem como, pode causar a corrosão dos equipamentos de destilação e incrustação nas unidades trocadoras de calor (SPEIGHT, 2001).

A corrosão desenvolve-se principalmente pela presença de sais de cloreto, formados com os metais cálcio, magnésio e sódio. Geralmente, a quantidade de sais de cloreto presente não é muito elevada, porém, mesmo em baixas concentrações, resulta em diversos prejuízos às refinarias (HUANG e ZHU, 2019).

A maioria dos sais de cloreto presentes no petróleo são originários da água salgada associada à sua produção. Eles podem ser removidos do petróleo com uma boa eficiência por meio de dessalinizadores. Porém, os sais que permanecem na água emulsionada, quando submetidos ao aquecimento, sofrem hidrólise, formando ácido clorídrico como subproduto (GRAY, et al., 2008; SPEIGHT, 2006). Os principais sais presentes no petróleo e as suas respectivas reações de hidrólise, estão apresentados nas Equações 2, 3 e 4.



Como visto, mesmo em baixas concentrações, a presença dos sais causa uma série de danos a refinaria. Diante disso, a porcentagem de sal existente no petróleo deve ser mantida abaixo dos limites permitidos. O teor salino é expresso como a quantidade de cloreto de sódio (NaCl) presente no petróleo e derivados, em que, na produção o teor máximo permitido é 570 mg L⁻¹ e no máximo 5 mg L⁻¹ nas refinarias.

Para que esse valor seja atingido nas refinarias, o petróleo é submetido a um procedimento de desidratação e/ou dessalgação previamente ao seu transporte dos campos produtores. Já em relação ao BSW (do inglês, *basic solids and water*), o teor máximo de água e sedimentos aceito é 1% (MORIGAKII et al., 2010; SPEIGHT, 2006).

2.2 TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM PÉTROLEO

2.2.1 Normas oficiais para a determinação de cálcio em petróleo

Diversas normas oficiais são propostas para a determinação de cálcio em petróleo e seus derivados, dentre as quais destacam-se as normas ASTM D5056, D7876, D4951, D3605, D4628 e D7111. A seguir, de forma resumida, estão apresentados os métodos de preparo de amostras e as técnicas utilizadas para a determinação elementar para cada norma.

A norma ASTM D5056 é utilizada para a determinação de Ca, Al, Fe, Ni, Si, Na, V em coque de petróleo por espectrometria de absorção atômica (AAS). No método de preparo de amostra utilizado, é feita inicialmente a calcinação da amostra em forno tipo mufla, e em seguida as cinzas obtidas são fundidas com os reagentes tetraborato de lítio ($\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$) ou metaborato de lítio (LiBO_2) (ASTM D5056, 2017).

Já a norma ASTM D7876 consiste na decomposição de amostras de petróleo e seus derivados utilizando digestão por via úmida com aquecimento por radiação micro-ondas (com ou sem incineração prévia das amostras) e posterior determinação elementar por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) ou espectrometria de absorção atômica (AAS) (ASTM D7876, 2018). A ASTM D4951, por sua vez, permite a determinação de Ca, Ba, B, Cu, Mg, P, S e Zn em amostras de óleos lubrificantes por ICP OES com a diluição prévia das amostras com solvente orgânico (ASTM D4951, 2019).

Por fim as normas ASTM D4951, D3605, D4628 e D7111 propõem a diluição prévia das amostras em solventes orgânico (xileno, tolueno) e posterior determinação elementar por técnicas de espectrometria atômica (F AAS ou ICP OES) (ASTM D4951, 2019; ASTM D3605, 2017; ASTM D7111, 2021).

Recentemente foram propostas algumas adaptações da norma ASTM D4807 que permitem o isolamento das espécies salinas presentes nas emulsões de petróleo. O método consiste na solubilização do petróleo em tolueno aquecido e posterior

filtração da mistura em membrana de 0,45 μm para a determinação do teor de sedimentos. A partir da diferença de massa da membrana antes e após a filtração em relação a massa de amostra utilizada, é calculado o teor de sedimentos, sendo o resultado final expresso em porcentagem (ENDERS et al., 2020; HENN et al. 2022).

Enders et al. (2020) fizeram a caracterização e a identificação de sólidos inorgânicos presentes em petróleos, utilizando a norma ASTM D4807. Além do que é preconizado pela norma, os autores também fizeram modificações, utilizando misturas de solventes, como tolueno + isopropanol, tolueno + isopropanol + água e uma terceira modificação, utilizando uma etapa de lavagem adicional com água quente dos sólidos inorgânicos retidos membrana de 0,45 μm . Os principais elementos identificados nas estruturas sólidas retidas nas membranas de nylon foram Na, Cl, Ca, Ba, Fe, K, Mg, S, Si e Sr utilizando a microscopia eletrônica de varredura com detector EDS-raios-X.

A modificação da norma ASTM D4807 para a determinação elementar foi proposta por Henn et al. (2022), que consistiu na solubilização em água das espécies retidas na superfície da membrana de nylon de 0,45 μm . Os autores avaliaram o isolamento das espécies salinas formadas com o Mg, Sr e Pb através do método de filtração em membrana para posterior determinação do teor de sedimentos presentes no petróleo, segundo a norma ASTM D4807. Esse método não requer equipamentos sofisticados e após a filtração na membrana de nylon, o Mg e o Sr, presentes como sólidos inorgânicos, ficaram retidos na membrana, podendo ser facilmente recuperados em água, mas as recuperações do Pb não foram quantitativas.

2.2.2 Métodos de preparo de amostra para posterior determinação de cálcio em petróleo

Os métodos de preparo de amostra têm a finalidade de converter a amostra em uma forma adequada a ser introduzida nos equipamentos de medida, utilizados para a quantificação dos elementos de interesse. Embora existam técnicas que permitem a introdução da amostra sólida sem pré-tratamento prévio, a grande maioria delas requer que as amostras estejam na forma de solução ou de suspensão, como as técnicas espectrométricas de absorção atômica, de emissão óptica em chamas e em plasmas indutivamente acoplados. Com essa etapa, as interferências geradas pelos componentes da matriz da amostra podem ser minimizadas e a calibração é facilitada,

devido a possibilidade do uso de padrões aquosos para este fim (KRUG e ROCHA, 2016).

A grande maioria dos métodos de preparo de amostras utilizados para posterior determinação de cálcio em petróleo aplicam uma diluição em solventes orgânicos, calcinação da amostra com posterior digestão ácida e a decomposição por via úmida com radiação micro-ondas. A seguir serão descritos, de forma resumida os métodos que empregam a calcinação e a decomposição por via úmida com radiação micro-ondas.

Na calcinação das amostras de petróleo, ocorre a decomposição da matéria orgânica, por meio da combustão e/ou pirólise em uma mufla, com temperaturas entre 450 e 550 °C. A queima da amostra é realizada na presença do oxigênio do ar e o produto da queima é um resíduo inorgânico (cinzas), normalmente contendo óxidos de metais, silicatos, fosfatos e sulfatos não voláteis, os quais podem ser solubilizados em ácidos inorgânicos. O método permite a decomposição de grandes quantidades de amostra (> 10 g), porém, a perda de elementos por volatilização pode ser significativa, acarretando em diversos erros sistemáticos na etapa de determinação (KRUG e ROCHA, 2016; MELLO et al., 2012).

Em vista disso, um dos métodos mais empregados para a determinação de cálcio e outros metais presentes no petróleo é a decomposição por via úmida com ácidos concentrados e aquecimento com radiação micro-ondas em sistema fechado. Em seguida, a determinação elementar é feita por técnicas de espectrometria atômica utilizando plasma indutivamente acoplado (ICP OES e ICP-MS).

O método de preparo de amostra de digestão por via úmida é utilizado para promover a oxidação da matéria orgânica, por meio do uso de ácidos minerais concentrados, podendo ser realizada em sistemas abertos ou fechados. Em geral, a maioria dos compostos orgânicos presentes nas amostras podem ser oxidados e os elementos de interesse a serem determinados, permanecem dissolvidos na solução ácida (ARRUDA, 2007; KRUG e ROCHA, 2016; MELLO et al., 2012).

A decomposição por via úmida é particularmente útil para ser utilizada como método de preparo de amostra para o petróleo, principalmente devido a presença de elementos em baixas concentrações, considerando os riscos de contaminação existentes nas análises. Em sistemas abertos algumas desvantagens são encontradas, como perda de elementos voláteis, contaminação por fontes externas, o tempo de decomposição é elevado, visto que a temperatura máxima atingida é a

temperatura de ebulição do ácido concentrado utilizado, e a eficiência de decomposição é inferior a obtida em sistemas fechados. Isso porque, em sistemas fechados, maiores temperaturas e pressões podem ser empregadas, pois com a aplicação da pressão, ocorre o aumento da temperatura de ebulição do ácido utilizado. Ainda, os riscos de contaminação são minimizados, visto que os frascos são fechados, isolados da atmosfera do laboratório. Contudo, a acidez e o carbono residual dos digeridos podem acarretar em interferências na etapa de determinação utilizando as técnicas de ICP OES e ICP-MS (ARRUDA, 2007; FLORES et al., 2014; KRUG e ROCHA, 2016).

2.2.3 Técnicas instrumentais para determinação de cálcio

Uma das formas de se fazer o monitoramento da concentração de cálcio e outros metais presente no petróleo é utilizando métodos de decomposição por via úmida com radiação micro-ondas, empregando ácidos concentrados e posterior determinação por técnicas espectrométricas como, a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) ou com forno de grafite (GF AAS). A seguir, serão abordados brevemente os princípios de cada uma das técnicas citadas.

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é uma das técnicas mais empregadas, devido a sua capacidade multielementar para a determinação dos elementos, pela ampla faixa linear e pelos baixos limites de detecção possíveis de serem obtidos. A técnica baseia-se na medida da intensidade da radiação emitida por átomos ou íons excitados por um plasma, quando estes retornam ao seu estado fundamental. O número de fótons emitidos é diretamente proporcional a concentração do elemento de interesse. A região do espectro eletromagnético em que ocorre as transições eletrônicas é a do ultravioleta-visível (190 a 700 nm). O plasma é um gás parcialmente ionizado, normalmente o argônio, devido ao seu elevado potencial de ionização (15 eV), o qual consegue excitar a maioria dos elementos da tabela periódica, atingindo temperaturas de até 10.000 K (DEAN, 2005; HILL, 2008).

A espectrometria de absorção atômica (AAS, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*) é uma técnica monoelementar e baseia-se na medida da intensidade da radiação absorvida por átomos gasosos no estado fundamental. Assim como para

a técnica de ICP OES, a região do espectro eletromagnético em que ocorre as transições eletrônicas é a do UV-Vis. Além disso, na AAS as fontes de radiação utilizadas para promover a excitação dos elementos, fornecem radiação no comprimento de onda específico e característico do analito. Os tipos de atomizadores mais utilizados na AAS são a chama e o forno de grafite. A espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) é utilizada para determinar os elementos na ordem de mg L^{-1} , enquanto que na espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (ET AAS, do inglês *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry* ou GF AAS, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption*) os elementos podem ser determinados em concentrações 1.000 vezes mais baixas em relação a F AAS, em $\mu\text{g L}^{-1}$ (WELZ e SPERLING, 1999; SKOOG et al., 2017).

Poirier et al. (2016) aplicaram as técnicas ICP OES e ICP-MS para a determinação de Ni, V, Fe e Ca em petróleo por diluição direta com solventes orgânicos. Para o cálcio, especialmente, os limites de detecção e quantificação por ICP OES e ICP-MS foram 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $2,2$ e $6,9 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Foi obtida uma recuperação de 101-103% e 103-111% por ICP OES e ICP-MS, respectivamente, indicando uma boa concordância. Pessoa et al. (2012) propuseram a determinação de Ca, Mg, Sr e Ba em amostras de petróleo por espectrometria de absorção atômica, usando a formação de emulsões O/A para o preparo da amostra. Ca, Mg e Sr foram determinados por F AAS e o Ba por GF AAS. Os limites de detecção encontrados foram $0,54$, $0,09$, $0,10$ e $0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ para Ca, Mg, Sr e Ba, respectivamente. Foram obtidas recuperações de 96 a 104%, indicando ser uma boa alternativa de análise.

Seeger et al. (2019) utilizaram a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite por amostragem direta (DS-GF AAS) para a determinação de Mg e Ca em amostras de petróleo dessalinizado. Os resultados encontrados para o cálcio de massa característica e limite de quantificação foram $4,8 \text{ pg}$ e $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Uma boa linearidade foi obtida (R^2 acima de 0,997) e desvio padrão relativo abaixo de 14%. Nos testes de recuperação avaliados, os resultados variaram de 92 a 107%. Por fim, os autores relataram que a DS-GF AAS é uma boa alternativa para a determinação de cálcio e magnésio, pois requer um mínimo preparo de amostra, minimizando os riscos de contaminação, além de reduzir o uso de reagentes químicos e o tempo de análise. É importante destacar que apesar da elevada

sensibilidade, possibilidade de análise direta de amostras de petróleo e possibilidade de eliminação da matriz pela etapa de pirólise na GF AAS, cuidados especiais devem ser tomados na determinação de metais alcalinos e alcalino-terrosos por esta técnica, devido a possibilidade de formação de carbeto estáveis, diminuindo, portanto, a sensibilidade da técnica (WELZ, 1999).

2.3 FORMAÇÃO DE COMPLEXOS COM O CÁLCIO

Um complexo é formado pela reação de um íon metálico com um ligante. Os íons metálicos são ácidos de Lewis, isto é, substâncias que podem aceitar pares de elétrons e os ligantes são bases de Lewis, ou seja, substâncias que podem doar pares de elétrons. Para que essa ligação seja formada, os ligantes devem ter pelo menos um par de elétrons desemparelhados disponível (SKOOG et al., 2013; HARRIS, 2010).

Um dos complexantes mais utilizados é o ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA). A sua estrutura apresenta seis grupos doadores de elétrons, quatro grupos carboxílicos e dois grupos amino, designado como um ligante hexadentado. Uma propriedade atrativa do EDTA é que ele reage com os íons metálicos na proporção de 1:1, independente da carga do cátion, exceto os metais alcalinos. Sendo assim, os indicadores liberam o íon metálico, que será complexado pelo EDTA no ponto de equivalência. A maioria dos complexos formados com o EDTA são muito estáveis, resultado dos vários sítios complexantes da molécula (BACCAN, 2001; SKOOG et al., 2013).

O equilíbrio das reações de complexação ocorre quando o íon metálico M se liga ao ligante L, formando o complexo ML, conforme a Equação 5:



As reações de complexação ocorrem em etapas, de tal forma que em cada uma delas, somente um ligante reage com o metal ou o complexo já formado, de acordo com as equações a seguir, exemplificadas de forma geral, omitindo as cargas dos íons:



...



Cada reação apresenta a sua constante de formação β correspondente, em que β_1 é o valor da constante para a reação (1) e assim sucessivamente até β_n (SKOOG et al., 2013; VOGEL et al., 1989).

As reações de complexação são muito utilizadas na química analítica através do emprego da volumetria de complexação, que permite a determinação de íons. Nessas titulações, o íon metálico é titulado com um solução do agente complexante na presença de um indicador adequado e com pH apropriado. Os indicadores utilizados nas titulações complexométricas devem ser sensíveis ao íon metálico e formar complexos menos estáveis com o íon metálico, quando comparada com a estabilidade do complexo do íon metálico e titulante. Esses indicadores são compostos orgânicos caracterizados por formar complexos coloridos com os íons metálicos (SKOOG et al., 2013; VOGEL et al., 1989).

2.3.1 Estabilidade de um complexo

A estabilidade de um complexo em solução aquosa está relacionada com grau na qual as duas espécies se associam, depois de atingir o equilíbrio químico. Quanto maior for a constante de formação de um complexo $M + L$, maior é a estabilidade e maior a proporção do complexo em solução. A seletividade de um ligante é maior quando o valor da constante de formação do complexo é elevado (SKOOG et al., 2013).

Além da constante de formação, o pH é outro fator importante da estabilidade dos complexos com íons metálicos, o qual está diretamente relacionado com a forma em que o agente complexante está presente no meio (SKOOG et al., 2013; VOGEL et al., 1989).

2.3.2 Principais complexantes utilizados na determinação de Ca

O EDTA sem dúvidas é o agente complexante mais utilizado nas titulações complexométricas para a determinação de Ca. Contudo, o complexo EDTA-Ca não possui coloração, o que inviabiliza a sua utilização na colorimetria por imagens digitais. Assim, serão descritos os principais complexantes para a determinação de cálcio que produzem complexos coloridos tais como o calcon, murexida e a calceína.

O calcon, também chamado de azul preto de eriocromo R, é um sal de sódio ácido 1-(2-hidróxi-1-naftilazo)-2-naftol-4-sulfônico. Na formação do quelato metálico, o calcon se liga ao cálcio pelos dois átomos de oxigênio dos grupos fenólicos, os quais perdem os hidrogênios em função da desprotonação promovida pela mudança de pH. Os prótons se ionizam com valores de pKa de 7,4 e 13,5 respectivamente. O grupo sulfônico tem como função aumentar a solubilidade do composto em água, visto que, este grupo é fortemente ácido, estando completamente dissociado em água, independente do pH da solução. O calcon deve ser utilizado em um pH igual ou superior a 12, para evitar a interferência provocada pelo magnésio. Teoricamente, nessa condição o magnésio se precipita como hidróxido, não competindo com o cálcio para a formação do complexo com o calcon. A mudança de coloração é observada de rosa para azul (BACCAN, 2001; VOGEL et al., 1989).

A murexida (purpurato de amônio) é utilizada como complexante em titulações diretas de cálcio com EDTA em pH 12, onde a mudança de cor no ponto final é de vermelho para azul-violeta. A mudança de cor é decorrente do descolamento progressivo de prótons dos grupos imido. Há quatro desses grupos na estrutura da murexida, no entanto, apenas dois podem ser removidos em solução alcalina, com valores de $pK_{a4} = 9,2$ e $pK_{a3} = 10,5$. Destaque importante, é que com esse complexante, o magnésio forma um complexo muito fraco, é incolor e se decompõe no pH utilizado para as titulações com o cálcio (BACCAN, 2001; VOGEL et al., 1989).

A calceína ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$), também conhecida por fluorexona, é um agente complexante sintetizado a partir da fluoresceína. Quando ela se complexa com os íons Ca^{2+} , libera uma molécula de fluoresceína, responsável pela emissão fluorescente, com coloração verde. A calceína deve ser utilizada em solução alcalina, em pH acima de 12, para evitar e minimizar possíveis interferências provocadas pelo magnésio (NTAILIANAS et al., 1964).

2.4 COLORIMETRIA COM IMAGENS DIGITAIS

2.4.1 Fundamentos

A colorimetria compreende as técnicas utilizadas para descrever e quantificar as cores, perceptíveis pelo ser humano. Em compostos químicos, uma cor pode ser observada, quando uma substância absorve determinado comprimento de onda na

região do visível (380-780 nm). A substância absorve certos comprimentos de onda e o olho humano consegue detectar a cor proporcional aos comprimentos de onda que não foram absorvidos. Ainda, a cor que é observada corresponde à cor complementar referente a cor absorvida (HARRIS, 2010; SKOOG et al., 2013; VOGEL et al., 1989).

Quando a luz entra em contato com a matéria, esta pode ser absorvida, refletida ou transmitida. No fenômeno de absorção, quando comprimentos de onda específicos são absorvidos, o restante é refletido e observa-se a cor complementar. Quando todos os comprimentos de onda são absorvidos, a cor preta é observada e quando nenhum comprimento de onda é absorvido, a luz branca é refletida. A luz branca compreende todas as cores presentes no espectro visível. Ainda, a luz pode ser transmitida e passar sem nenhuma modificação pelo material (HARRIS, 2010; SKOOG et al., 2013; VOGEL et al., 1989).

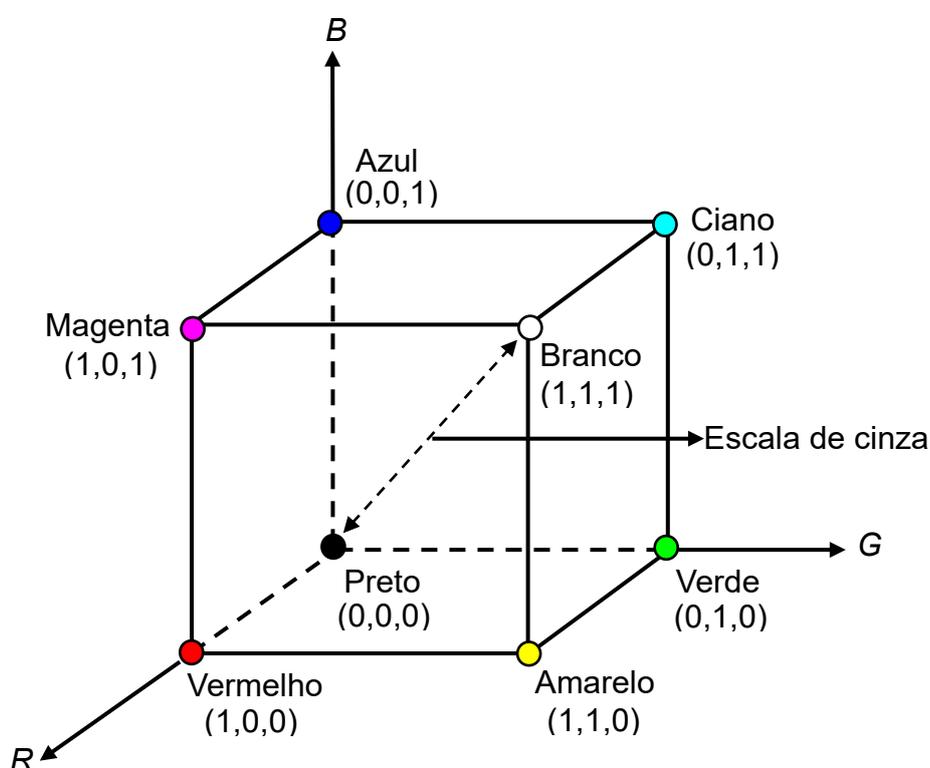
O propósito da colorimetria é a descrição numérica das cores e a percepção da cor de um determinado objeto é atribuída a três razões, sendo elas: a fonte de luz, as propriedades ópticas, como a reflexão ou transmissão da luz pelo objeto e a forma como que o detector enxerga essa cor. Essas características podem ser quantificadas pela colorimetria, levando a representações de cores como RGB (LINDON et al., 2016).

Um dos mais conhecidos e utilizados dos modelos de cores é o RGB. Para a geração de uma cor, o modelo usa três canais: vermelho (R), verde (G) e azul (B). As cores RGB são denominadas cores primárias, pois todas as outras cores são obtidas pela combinação dessas três cores, em diferentes proporções. Esse modelo baseia-se em um sistema de coordenadas cartesianas, podendo ser visualizado, geometricamente, na forma de um cubo (Figura 1). Os eixos representam as cores primárias RGB, em três pontos. Nas outras extremidades, estão as cores secundárias ciano, magenta e amarelo. A cor preta encontra-se junto à origem, a cor branca na extremidade mais distante da origem e a escala de cinza se estende do preto ao branco no decorrer da linha que os une (GONZALEZ & WOODS, 2008).

As cores secundárias são geradas através das combinações R+B, G+B e R+G, obtendo as cores magenta, ciano e amarelo, respectivamente. A luz branca é formada pela mistura das três cores primárias ou de uma secundária com sua cor primária contrária, enquanto que o preto é formado, na subtrativa, pela mistura das três cores primárias ou de uma secundária com sua primária oposta (MARQUES FILHO & VIEIRA NETO, 1999). Assim, quando os valores dos canais R, G e B forem

equivalentes a 255, a cor será branca e quando os valores desses canais for 0, a cor será preta. Cada canal possui um valor que varia de 0 a 255, sendo possível a formação de mais de dezesseis mil cores. Assim, cada cor possuirá um valor de R, um valor de G e um valor de B. Os valores máximos de R, G e B se encontram padronizados no intervalo de 0 a 1, apenas por conveniência (ABDOLMALEKY et al., 2017). (DE JESUS et al., 2021; GONZALEZ & WOODS, 2008).

Figura 1 – Modelo de cores RGB



Fonte: Adaptado de De Jesus et al., 2021.

A partir do modelo RGB, outros novos modelos de cores podem ser gerados. Dentre eles estão o matiz, saturação e valor (HSV, do inglês *hue, saturation and value*); matiz, saturação e brilho (HSL, do inglês *hue, saturation and lightness*) e matiz, saturação e intensidade (HSI, do inglês *hue, saturation and intensity*). A matiz distingue uma cor da outra, ou seja, quando se diz que um objeto é laranja ou amarelo, a matiz é a referência. Além disso, a matiz está relacionada ao comprimento de onda dominante. A saturação se refere ao grau de pureza ou a intensidade de uma cor. É o que distingue a cor vermelha da rosa, por exemplo. Uma cor será mais intensa quando maior for a saturação. Valor, brilho e intensidade referem-se à quantidade de

luz, responsável por diferenciar cores claras e escuras (GONZALEZ & WOODS, 2008).

Nos últimos tempos, os avanços em novas tecnologias de aquisição e processamento de imagens digitais estão ganhando espaço entre os cientistas, devido à comprovação da eficácia dos seus resultados frente a equipamentos colorimétricos tradicionais. Em análises onde há modificação de cor mediante uma reação, pode-se efetuar a captura e processamento das imagens digitais, resultando em uma análise mais rápida, com menor custo e sem a necessidade de equipamentos robustos como espectrofotômetros e colorímetros (DE JESUS et al., 2021).

Uma imagem digital é composta por elementos de imagens, denominados pixels (do inglês, *picture elements*), onde cada pixel é obtido pela combinação das cores vermelha, verde e azul. Com isso diz-se que cada ponto representado no cubo da Figura 1 corresponde a um pixel. A aquisição das imagens digitais pode ocorrer por meio de câmeras fotográficas, *smartphones*, *webcam*, endoscópios, entre outros, os quais vão captar uma cena real tridimensional e convertê-la em uma imagem eletrônica. Para a conversão da imagem digital, normalmente se utilizam dispositivos de carga acoplada (CCD, do inglês *charge coupled device*) ou semicondutores metal-óxido complementar (CMOS, do inglês *complementary metal-oxide semiconductor*). Eles têm a função de transformar a luz incidente em um sinal elétrico, o qual é processado, convertendo a imagem a uma forma numérica, nos valores correspondentes de cada canal R, G e B (MARQUES e NETO, 1999).

A utilização do modelo de cores RGB como resposta analítica fundamenta-se em que os valores de cada canal (R, G e B) mudam proporcionalmente com a cor. De acordo com as cores geradas então, é possível aplicar a análise colorimétrica para quantificar os elementos de interesse. No caso específico do cálcio, as reações de complexação podem ser usadas para esse fim. Após capturadas as imagens são necessárias ferramentas matemáticas para a conversão e o tratamento dos dados. Para isso a quimiometria é muito aplicada, através de modelos univariados ou multivariados de calibração (DE JESUS et al., 2021; FAN et al., 2021; FERNANDES et al., 2020).

Diferentes trabalhos podem ser encontrados na literatura, em que foi utilizado a análise colorimétrica com imagens digitais. Dentre as diversas matrizes que foram aplicadas, encontram-se as de alimentos (CALEB et al., 2021; JING et al., 2021), bebidas (FERNANDES et al., 2020; PORTO et al., 2019), revestimentos industriais

(ALBIZU et al., 2020), suplementos e fármacos (BALLESTEROS et al., 2021; JAIN et al., 2021), entre outras.

2.4.2 Quimiometria e calibração multivariada

A Quimiometria é uma área interdisciplinar, que abrange estatística multivariada, química analítica, ciência da computação e modelagem matemática (GEMPERLINE, 2006). Em outras palavras, é a ciência que utiliza modelos matemáticos e estatísticos para o tratamento, interpretação e previsão dos dados (FERREIRA, 2015).

Um dos métodos mais utilizados na quimiometria é a calibração multivariada. A aplicação dessa técnica é realizada para encontrar um algoritmo matemático que produza informações quantitativas, a partir dos resultados registrados em um determinado equipamento. Após encontrar esse algoritmo, é possível prever a concentração do analito de interesse, por meio da resposta instrumental obtida anteriormente (FERREIRA et al., 1999; WANG et al., 2022).

A partir de uma matriz de dados obtida pela análise multivariada é possível determinar todas as variações existentes. Assim, ferramentas quimiométricas tentam encontrar as relações entre as amostras e as variáveis desse conjunto de dados e convertê-las em novas variáveis latentes (KUMAR et al., 2014). As técnicas mais conhecidas de análise multivariada são a análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) e a regressão pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS, do inglês, *Partial Least Squares*).

Como uma ferramenta de análise exploratória, a PCA representa a transformação de um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis com a mesma dimensão. Ao empregar essa metodologia, é possível descobrir, visualizar e interpretar as relações que podem existir entre as amostras e as diferenças existentes entre as variáveis, além de verificar a existência de amostras anômalas (FERREIRA, 2015; VARELLA, 2008).

Considerado o método mais popular em quimiometria, o PLS é uma técnica de regressão supervisionada que relaciona variáveis independentes (matriz X) com as variáveis das propriedades de interesse (vetor Y), baseado no uso de fatores. Esse método utiliza a análise de componentes principais com o objetivo de reduzir a dimensionalidade da matriz (FERREIRA, 2015; VINZI et al., 2010).

Os modelos de calibração por PLS podem ser desenvolvidos a partir de dados coletados através da espectroscopia do ultravioleta e do visível. Após a obtenção dos dados instrumentais, onde as respostas são as intensidades medidas, é possível fazer uma relação com uma propriedade de interesse, como por exemplo, a concentração de um determinado analito (FERREIRA, 2015). Assim, entende-se que a calibração multivariada consiste basicamente de duas fases: a calibração e a previsão.

Para verificar a qualidade do modelo e realizar a escolha do número de fatores, alguns critérios são avaliados. Entre os mais importantes, destacam-se o valor do erro médio quadrático de calibração (RMSEC, do inglês, *Root Mean Square Error of Calibration*), o erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV, do inglês, *Root Mean Square Error of Cross Validation*) e o erro médio quadrático de previsão (RMSEP, do inglês, *Root Mean Squares Error of Prediction*) (BRERETON, 2000).

O RMSEC descreve o grau de concordância entre o modelo de calibração, enquanto que o RMSECV define o número de variáveis latentes em que o modelo apresenta menor erro de previsão. Já o RMSEP, indica o quanto o modelo errou a partir do valor verdadeiro. Dessa forma, o número de fatores considerado ótimo, é aquele que apresentar o menor RMSEP (FERREIRA, 2015; GEMPERLINE, 2006).

2.4.3 PhotoMetrix

Apesar dos avanços nas tecnologias de aquisição e processamento das imagens digitais, em muitos casos o processamento das imagens não ocorre diretamente no dispositivo utilizado, requerendo outro software para o tratamento das mesmas.

Pensando na praticidade e agilidade das análises colorimétricas por imagem digital, Helfer et al. (2017) desenvolveram um aplicativo para *smartphone* denominado de PhotoMetrix, capaz de capturar e analisar as imagens digitais através de modelos matemáticos. Entre as opções, podem ser realizadas a análise univariada convencional, bem como a análise multivariada com os algoritmos PCA, HCA e PLS. O aplicativo está disponível em duas versões: a versão PRO, onde a captura das imagens é realizada através da câmera do próprio dispositivo, e a versão UVC, que permite a conexão de uma câmera USB ao dispositivo.

Dentre algumas vantagens de utilizar um *smartphone* para aquisição de imagens digitais, destaca-se a sua facilidade de operação, rapidez na obtenção de

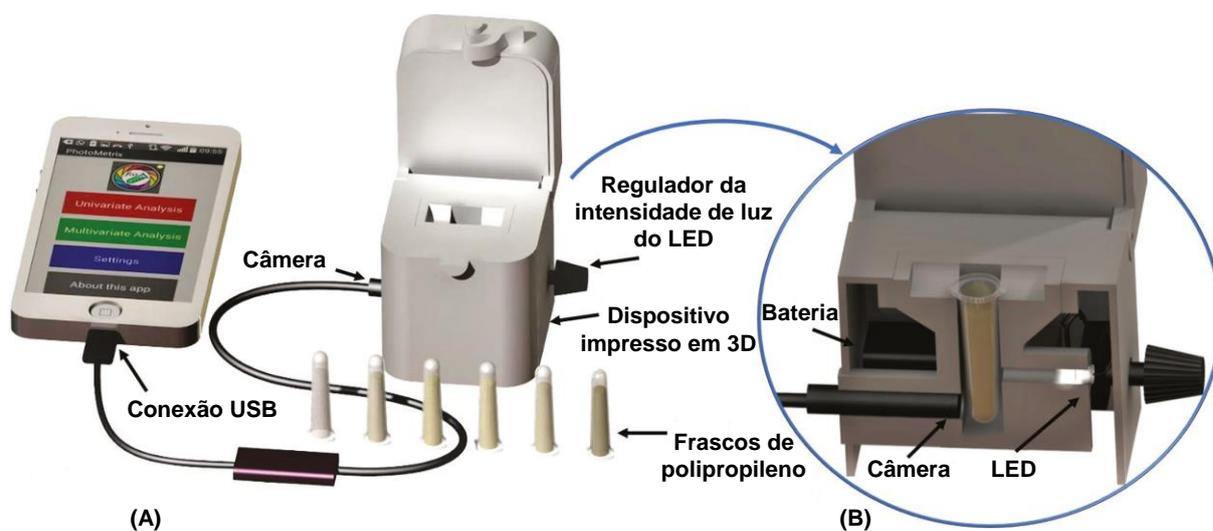
resultados e mobilidade, além da familiaridade do operador (BÖCK et al., 2020). O aplicativo pode ser baixado gratuitamente na Google Play (Android).

Uma variedade de trabalhos envolvendo o uso do PhotoMetrix podem ser encontrados na literatura em diversas aplicações, como a determinação de açúcares em refrigerante (SCHLESNER, 2022), determinação de cobre em aguardente de cana (BÖCK et al., 2022), determinação de flúor e fósforo em água (PAPPIS et al., 2019), determinação de ácido úrico em saliva (SOARES et al., 2021), avaliação da estabilidade térmica do leite por meio do teste com alizarol (HELFER et al., 2018), entre outras.

Apesar das vantagens em se utilizar um *smartphone*, alguns desafios ainda precisam ser superados, principalmente ao que se refere a reprodutibilidade das análises. Devido as diferenças entre os modelos e fabricantes dos *smartphones* e da forma como cada operador faz a captura das imagens, é necessário a construção de dispositivos que padronizem as condições ambientais, como por exemplo, a iluminação e a distância da câmera em relação a superfície da amostra para a aquisição das imagens.

Nesse sentido, Costa et al. (2020) desenvolveram um dispositivo portátil impresso em 3D (Figura 2A) que atende a essas expectativas, controlando as condições ambientais, uma vez que o ambiente de iluminação é controlado e a câmera fica em uma posição fixa durante toda a análise. No sistema, uma câmera USB (endoscópica) foi posicionada na lateral do dispositivo e conectada a um *smartphone* para realizar a captura das imagens digitais. Para o controle da intensidade de luz emitida, foi utilizado um diodo emissor de luz (LED), o qual foi conectado a um modulador da energia fornecida por uma bateria. As reações colorimétricas foram feitas em frasco transparente de polipropileno e o frasco foi introduzido numa cavidade central projetada no dispositivo (Figura 2B). Os dados foram processados, após a captura das imagens, no aplicativo PhotoMetrix UVC, onde são gerados os histogramas RGB.

Figura 2 – Sistema utilizado para análise colorimétrica com imagens digitais utilizando o aplicativo PhotoMetrix UVC desenvolvido por Costa et al. (2020)



Fonte: adaptado de Costa et al. (2020).

Para a avaliação do sistema proposto, quatro adulterantes proibidos em amostras de leite foram analisados, sendo eles o cloreto, peróxido de hidrogênio, hipoclorito e amido. Nos resultados obtidos para os adulterantes, os coeficientes de determinação foram superiores a 0,99 e não foram identificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores medidos e os previstos. Além do mais, o uso do sistema impresso em 3D, minimizou as interferências que podem ser causadas pela iluminação do ambiente e distância da câmera e superfície da amostra. A câmera USB externa utilizada permite o acoplamento com qualquer *smartphone*, o que pode reduzir os erros relacionados a marca e modelos dos celulares. E por fim, como a reação colorimétrica da amostra ocorre dentro dos frascos de polipropileno, vapores que podem ser gerados nas reações não entram em contato nem com a câmera e nem com o *smartphone*, o que aumenta a vida útil destes (COSTA et al. 2020).

2.4.4 Aplicações da colorimetria por imagens digitais

Neste capítulo serão descritas, principalmente as aplicações da literatura que propõem a utilização da colorimetria por imagens digitais na determinação de cálcio e determinação de sal em petróleos.

O uso da colorimetria associada a dispositivos portáteis para a aquisição e tratamento das imagens digitais, vêm crescendo progressivamente. Ainda assim, as

aplicações encontradas na literatura para a determinação de cálcio em determinadas matrizes são significativamente menores. O mesmo ocorre para matrizes oleosas como o petróleo.

Em relação ao cálcio, Lopez-Moliner (2013) avaliaram a viabilidade da colorimetria com imagem digital para a determinação da dureza da água. A reação colorimétrica aconteceu entre os íons Ca^{2+} e o indicador metalocrômico glioxal bis(2-hidroxianil), o qual, em solução, gera uma cor laranja avermelhada em meio alcalino. Para a aquisição das imagens digitais, foi utilizada uma câmera comercial de 2 M pixels. O processamento e tratamento dos dados RGB das imagens foi realizado pelo software Matlab®. As melhores respostas foram obtidas usando a cor verde do modelo de cores RGB. O coeficiente de correlação alcançado foi 0,995, com uma faixa linear de 0,2 a 2,0 mg L^{-1} e o limite de detecção foi de 0,07 mg L^{-1} . A exatidão do método foi avaliada através da comparação dos resultados do método proposto, com os métodos de referência utilizando a técnica F AAS para a determinação do cálcio e por titulação de complexométrica usando EDTA e negro de eriocromo T como indicador. Pelo teste *t student* foi comprovado que os resultados não apresentaram diferenças significativas. Com isso, os autores indicaram que o método pode ser utilizado para a quantificação de cálcio, na dureza da água, sendo um método rápido e de baixo custo.

Mais recentemente, Peng et al. (2019) desenvolveram um método de microextração líquido-líquido dispersiva combinado com a análise colorimétrica, utilizando um *smartphone* para a determinação de cálcio em amostras de água e alimentos. Foi utilizado o glioxal bis(2-hidroxianil) para a formação do complexo colorido com o cálcio, o qual pode ser extraído em uma mistura de solventes (clorofórmio e 1,2-diclorometano) na presença de cloreto de tetra-decil-metilbenzilamonio. Os valores de RGB foram registrados pelo aplicativo Color Grab. Nos resultados obtidos pelos autores, a faixa linear foi de 0,06 a 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com limite de detecção e quantificação de 0,017 e 0,056 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O método foi validado em comparação com F AAS e CRM e diferenças significativas não foram observadas.

Soares et al. (2022) utilizaram a colorimetria por imagens digitais em um *smartphone* com o aplicativo PhotoMetrix, para a determinação de cálcio e magnésio em biodiesel. A determinação de cálcio e magnésio foi baseada na descoloração de uma solução alcalina de negro de eriocromo T devido à formação de complexos com os analitos. Para isso, foi utilizado etanol para dissolver o biodiesel e o indicador. O

coeficiente de determinação obtido foi de 0,999, limite de detecção de $3 \mu\text{mol L}^{-1}$, em uma faixa linear de 10 a $75 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para a avaliação da exatidão, os resultados do método proposto foram comparados com os resultados obtidos por ICP OES, com quebra de emulsão como preparo de amostra, os quais não apresentaram diferenças significativas por meio do teste *t* de *Student*. Os autores concluíram que o método proposto é uma alternativa confiável para a determinação das concentrações de cálcio e magnésio no biodiesel. Além das características desejáveis de um método colorimétrico por análises digitais, como rapidez e baixo custo, os autores relataram que o método por eles proposto apresentou algumas vantagens. Sendo elas, preparo da amostra rápido, pois a amostra foi dissolvida com etanol, evitando extrações demoradas. Também foi possível a minimização da geração de resíduos e o risco de efeitos de matriz, pois foi possível preparar as curvas de calibração em etanol (SOARES et al., 2022).

Holkem et al. (2021) desenvolveram um método colorimétrico utilizando imagens digitais com o dispositivo portátil desenvolvido por Costa et al. (2020), para a determinação de cloreto em amostras de petróleo. As imagens digitais foram processadas no aplicativo PhotoMetrix, utilizando o modelo PLS, gerado no próprio app. O cloreto foi extraído para a fase aquosa com água e ainda foi avaliado a necessidade do uso de solventes orgânicos (tolueno, óleo mineral, querosene, xileno, acetato de etila, acetona e álcool isopropílico) para a extração. O limite de detecção encontrado nesse método foi de 69 mg L^{-1} ($0,034 \text{ mg g}^{-1}$ usando 10 g de amostra) e não foram observadas diferenças significativas, comparando os resultados do método colorimétrico com os valores de referência (determinação de cloro por cromatografia de íons após combustão induzida por micro-ondas).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo são descritos a instrumentação, os reagentes, as amostras e os procedimentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Ademais, serão apresentados os parâmetros avaliados para a determinação de cálcio em amostras de petróleo utilizando o método colorimétrico por imagens digitais através do aplicativo PhotoMetrix. Também será descrito o procedimento para isolamento das espécies salinas presentes nas emulsões de petróleo utilizando a norma ASTM D4807 para subsequente determinação de Ca utilizando o método proposto. Por fim, os métodos de referência, MAWD-SRC e solubilização para posterior determinação pela técnica de ICP OES, foram utilizados para a avaliação da exatidão do método proposto.

3.1 REAGENTES

A água ultrapura utilizada para os experimentos passou por um processo de destilação, seguida pela deionização utilizando uma coluna de troca iônica e por fim, a água foi purificada por um sistema de Milli-Q® (Millipore, EUA), com resistividade mínima de 18,2 MΩ cm. As amostras de petróleo foram solubilizadas com tolueno grau analítico (Tedia, EUA) nas filtrações, para a posterior determinação do teor de sedimentos e cálcio.

Na decomposição das amostras de petróleo, o ácido nítrico (65% m/m, Merck, Alemanha) utilizado é destilado abaixo do seu ponto de ebulição, em um sistema de destilação de quartzo (modelo duoPUR, Milestone). O gás argônio (pureza 99,998%, White Martins, São Paulo) foi utilizado para pressurizar (40 bar) a cavidade do sistema SRC durante a etapa de decomposição das amostras de petróleo.

Para a quantificação do cálcio e dos demais metais por ICP OES, a curva de calibração (10 a 600 µg L⁻¹) foi preparada pela diluição de uma solução estoque multielementar de 1000 mg L⁻¹ (SCP33MS, SCP Science, Canadá e Merck, Alemanha) em água. A exatidão da curva de calibração foi verificada utilizando o material de referência certificado NIST 1640a (*Trace Elements in Natural Water*). Para a geração do plasma e nebulização das amostras, o gás utilizado foi o argônio (pureza 99,998%, White Martins, São Paulo).

A curva de calibração (1 a 10 mg L⁻¹) para a determinação de cálcio utilizando a colorimetria por imagens digitais no PhotoMetrix, foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de Ca(NO₃)₂ (Dinâmica, Brasil) 1000 mg L⁻¹ em água. Para o ajuste do pH das soluções, foi preparada uma solução de NaOH (Vetec, Brasil) 0,5 mol L⁻¹, a partir de uma solução estoque de NaOH 1 mol L⁻¹, em água. Os complexantes utilizados foram calceína (Sigma-Aldrich, Japão), murexida (Nuclear, Brasil) e calcon (Merck, Alemanha). Para cada complexante, foram preparadas soluções 0,1%. A calceína foi solubilizada em uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, a murexida foi solubilizada em água, enquanto que o calcon foi dissolvido em metanol. As soluções dos complexantes foram preparadas diariamente, dada a instabilidade das mesmas.

3.2 AMOSTRAS

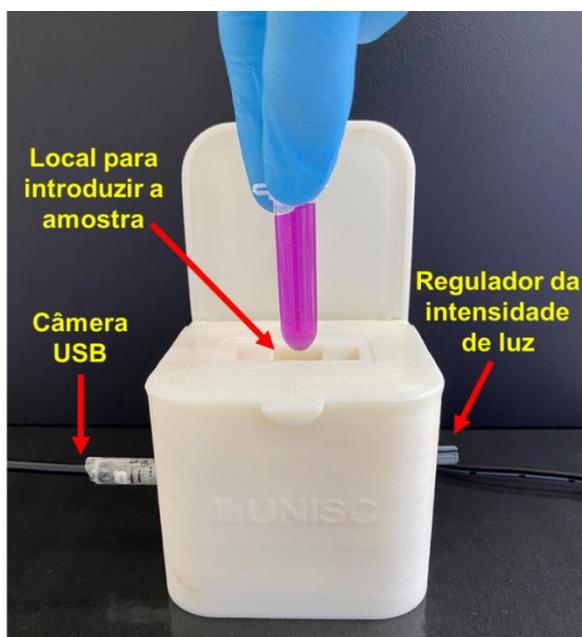
As amostras de petróleo foram enviadas pelo Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES) da PETROBRAS. Foram utilizadas 5 amostras, identificadas como 1, 2, 3, 4 e 5. As amostras selecionadas são emulsões naturais da camada do pré-sal, que apresentam $^{\circ}$ API de 26 a 29, conforme dados fornecidos pelo CENPES. Cabe ressaltar que, antes de qualquer procedimento, as amostras de petróleo foram homogeneizadas de forma manual durante 10 minutos.

3.3 INSTRUMENTAÇÃO

A análise colorimétrica utilizando imagens digitais foi desenvolvida utilizando um dispositivo proposto por Costa et al. (2020), para maior controle das condições ambientais como iluminação e distância da amostra em relação ao diodo emissor de luz. O dispositivo foi projetado utilizando um software de desenho 3D (SolidWorks®, versão office premium 2008, Estados Unidos) e os componentes foram impressos por deposição fundida em ácido polilático (PLA) utilizando uma impressora 3D (modelo Core A3 V2, GTMaX 3D, Brasil).

Na Figura 3 está demonstrado o dispositivo utilizado, na qual observa-se uma cavidade central para a introdução da amostra contida em um frasco de polipropileno transparente do tipo Eppendorf com fundo redondo e volume de 2 mL (Cralplast, Brasil). Para controlar a intensidade de luz emitida, um diodo emissor de luz (LED) de 6 W foi conectado em um modulador de energia. Uma câmera USB (modelo endoscópio inteligente, B-Max, China, 7 mm, resolução de 640 x 480 pixels) foi posicionada na lateral do dispositivo e conectada a um notebook (modelo X541UA-GO1987T, ASUS, Brasil, Intel Core i3-6006U), para a aquisição das imagens digitais. O aplicativo PhotoMetrix, disponível gratuitamente na *Google Play Store* (Android), foi instalado na versão PRO no notebook por meio de um emulador (BlueStacks App Player, Bluestacks System Incorporated, EUA) disponível nas plataformas digitais, para a sua execução. Após a reação colorimétrica, que ocorreu nos frascos de polipropileno, as amostras foram fotografadas e processadas pelo aplicativo PhotoMetrix. Todas as imagens foram submetidas a análise multivariada utilizando o algoritmo dos mínimos quadrados parciais (PLS) contido no aplicativo PhotoMetrix.

Figura 3 – Dispositivo utilizado para a determinação de cálcio por análise colorimétrica nas amostras de petróleo. Em destaque, a câmera USB, o local para a introdução da amostra em frasco de polipropileno e o regulador da intensidade de luz emitida pelo LED



Fonte: Autor (2022).

Após o processo de filtração das amostras de petróleo seguindo a norma ASTM D4807, os sedimentos retidos na superfície das membranas de nylon de 0,45 μm , foram solubilizados em 25 mL de água ultrapura. As determinações de Ca, Mg, Na, Ba, Li e Sr, solubilizados das membranas de nylon, foram realizadas por um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Spectro Ciros CCD®, Spectro Analytical Instruments, Alemanha). O equipamento contém um nebulizador do tipo *cross-flow* (Spectro Analytical Instruments), uma câmara de nebulização de duplo passo (Scott, Spectro Analytical Instruments) e uma tocha com injetor de quartzo (Spectro EOP Quartz Torch, Glass Expansion, Austrália). As condições operacionais do equipamento encontram-se na Tabela 1, as quais foram estabelecidas de acordo com as condições usuais do laboratório. Os mesmos extratos foram utilizados para a determinação de cálcio por colorimetria com imagens digitais no aplicativo PhotoMetrix.

Tabela 1 – Condições de operação utilizadas na determinação de Ca, Mg, Na, Ba, Li e Sr por ICP OES

Parâmetro	Condição
Potência do gerador de radiofrequência, W	1400
Vazão do gás principal, L min ⁻¹	15,0
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	0,20
Vazão do gás nebulizador, L min ⁻¹	0,70
Elemento	Comprimento de onda, nm
Ca	393,366 (II)
Mg	280,271 (II)
Na	589,592 (I)
Ba	455,403 (II)
Li	670,784 (I)
Sr	407,771 (II)

(I) Linha de emissão atômica; (II) Linha de emissão iônica.

A exatidão do método foi avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos pelas solubilizações das amostras de petróleo (com determinação por ICP OES e PhotoMetrix), com os resultados obtidos pelo método de digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD) em sistema com câmara única de reação (SRC UltraWave®, Milestone, Itália) de aço inoxidável e determinação por ICP OES. O UltraWave dispõe de uma câmara de PTFE com capacidade de 0,9 L, a qual é utilizada para acomodar o rotor que contém 5 frascos de quartzo. De acordo com o fabricante, o máximo de temperatura e pressão que o sistema suporta é de 300 °C e 199 bar, respectivamente. Após a digestão, as amostras foram quantificadas por ICP OES.

3.3.1 Determinação do teor de água

A determinação do teor de água foi feita seguindo a norma ASTM D4377, por meio da titulação potenciométrica, conforme método de Karl Fischer. Para isso, foi utilizado um titulador automático (modelo 836 Titrando, Metrohm, Suíça), com módulo de agitação magnética (modelo 803 Ti Stand, Metrohm, Suíça) e eletrodo de platina (modelo 8.109.1306, Metrohm). Uma mistura de tolueno e metanol na proporção de

3:1 foi utilizada para a solubilização das amostras de petróleo e a mistura foi titulada utilizando o reagente comercial Hydranal Composite 5®.

3.3.2 Determinação do teor de sedimentos e isolamento das espécies salinas para determinação de cálcio

A determinação do teor de sedimentos e o isolamento das espécies salinas foi feita de acordo com o especificado pela norma ASTM D4807. Assim, um sistema de filtração a vácuo foi utilizado, conforme demonstrado na Figura 4. O sistema consiste em uma bomba de vácuo (modelo WP6 111560, Millipore, EUA), um funil de vidro sinterizado, um kitassato de vidro e membranas de nylon com porosidade de 0,45 µm. Ainda, foi utilizado uma chapa de aquecimento (VELP Scientifica, Itália), para o aquecimento das amostras e do tolueno empregado para a solubilização. A pesagem das membranas e das amostras foi realizada em uma balança analítica (modelo AY 220, com resolução de 0,1 mg, Shimadzu, Japão). As membranas foram secas a 105 °C em estufa com circulação de ar (Nova Ética, Brasil).

Figura 4 – Sistema de filtração utilizado para determinação do teor de sedimentos nas amostras de petróleo



Fonte: Autor (2022).

3.4 PROCEDIMENTOS

3.4.1 Determinação do teor de água nas amostras de petróleo

A determinação do teor de água foi realizada de acordo com o especificado pela norma ASTM D4377, por meio da titulação potenciométrica pelo método de Karl Fischer. Aproximadamente 0,5 g de amostra foram pesadas e transferidas com o auxílio de uma seringa para um copo de titulação. Cerca de 25 mL de uma mistura de tolueno e metanol na proporção de 3:1, foi utilizada para a solubilização das amostras de petróleo. Para a titulação da mistura, foi utilizado o reagente comercial Hydranal Composite 5®. Um eletrodo de platina foi empregado para a detecção do ponto final da titulação, sendo identificado diretamente pelo software do equipamento.

3.4.2 Determinação do teor de sedimentos e isolamento das espécies salinas nas amostras de petróleo

Para a determinação do teor de sedimentos e o isolamento das espécies salinas nas amostras de petróleo foi utilizada a norma ASTM D4807. É importante destacar que originalmente a norma ASTM D4807 permite a determinação do teor de sedimentos. A partir de trabalhos relatados na literatura, constata-se a possibilidade do isolamento das espécies salinas presentes nas emulsões de petróleo e a subsequente determinação elementar (ENDERS et al., 2020; HENN et al., 2021).

Para a determinação do teor de sedimentos (de acordo com a norma ASTM D4807), inicialmente as membranas de nylon de 0,45 µm foram secas em estufa com circulação de ar forçada a 105 °C por 15 minutos. Após, as membranas foram resfriadas e reservadas em um dessecador até o momento de uso. Massas de amostra de petróleo (de 1 a 10 g) foram pesadas e solubilizadas em 100 mL de tolueno. A mistura amostra + tolueno foi aquecida à 90 °C. Cabe destacar que para as amostras com maior teor de sedimentos, foram utilizadas massas de petróleo menores para evitar o entupimento da membrana, o que acaba impedindo a completa filtração da amostra.

Após a filtração, as membranas novamente foram secas em estufa a 105 °C por 15 minutos e após, pesadas para proceder o cálculo do teor de sedimentos. A diferença entre a massa da membrana pesada antes e depois da filtração, indicou o

resultado (%) do teor de sedimentos presente nas amostras. O procedimento foi realizado em triplicata. As espécies salinas isoladas na superfície da membrana foram solubilizadas no interior de frascos de polipropileno de 50 mL utilizando massas de água variando de 10 a 25 g. Os extratos aquosos foram utilizados para a determinação de cálcio utilizando a ICP OES e a colorimetria com imagens digitais utilizando o PhotoMetrix.

3.4.3 Decomposição assistida por radiação micro-ondas em SRC

A decomposição das amostras de petróleo foi realizada utilizando o método de digestão por via úmida assistida por radiação micro-ondas em sistema com câmara única de reação. Antes de iniciar o procedimento de pesagem das amostras, estas foram homogeneizadas manualmente durante 5 minutos. Posteriormente, cerca de 500 mg de petróleo foram pesados em frasco de quartzo com capacidade de 40 mL e em seguida, foram adicionados 6 mL de HNO₃ destilado ao frasco. Previamente a digestão no sistema SRC, foi realizada uma etapa de oxidação dos compostos orgânicos, pelo aquecimento das amostras contendo o HNO₃ em banho durante 1 hora (ENDERS et al., 2020).

Nesse período, foi preparada uma mistura para a cuba de reação de 130 mL de água com 5 mL de HNO₃ concentrado, preenchendo o copo de PTFE, de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante do equipamento. Após o período de 1 hora de oxidação dos compostos orgânicos das amostras, os frascos foram colocados no rotor e dispostos no interior do copo de PTFE para dar início ao procedimento de digestão no sistema SRC. O sistema foi fechado e pressurizado com argônio, em uma pressão inicial de 40 bar.

O programa de irradiação consistiu em 6 etapas, sendo elas: (I) rampa de 5 min até 90 °C; (II) rampa de 10 min até 110 °C, com permanência de 5 min; (III) rampa de 10 min até 120 °C; (IV) rampa de 10 min até 130 °C; (V) rampa de 20 min até 250 °C, com permanência de 15 min e (VI) resfriamento do sistema. Após a digestão, as amostras foram transferidas para frascos de polipropileno e avolumadas a 25 mL com água ultrapura (ENDERS et al., 2020).

3.4.4 Determinação de cálcio por colorimetria com imagens digitais utilizando o PhotoMetrix

Inicialmente, foram realizados experimentos para verificar a influência do pH (10 a 13), da concentração do complexante (0,016 a 0,250 mmol L⁻¹), do volume total da solução (1 a 2 mL), da distância focal da câmera (2 a 20 mm) para a obtenção das imagens digitais e da intensidade de luz (30 a 180 lx) aplicada pelo LED.

3.4.2.1 Influência do pH e otimização da concentração do complexante necessário para a formação dos complexos com o cálcio

A influência do pH e a concentração do complexante na formação dos complexos com o cálcio foram avaliadas para a calceína, murexida e o calcon. A influência destas variáveis foi avaliada mediante a construção de curvas de calibração com concentração de Ca de 1 a 10 mg L⁻¹ no interior de frascos de polipropileno de 2 mL. Neste sentido, alíquotas da solução estoque de Ca(NO₃)₂ 1000 mg L⁻¹ foram transferidas para o interior de diferentes frascos de plástico de 2 mL e o pH foi ajustado com solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹. Todas as curvas de calibração para os três complexantes foram construídas em pH superior a 10, condição necessária para a formação de complexos estáveis com o Ca (NTAILIANAS e WHITNEY, 1964 e VOGEL, 1989). A escolha do melhor pH e a concentração do complexante foi feita a partir do menor valor de RMSECV.

Nessas mesmas curvas de calibração, antes de proceder a captura das imagens, também foram avaliados os volumes de cada complexante adicionados, que fossem suficientes para a formação estável dos complexos. Após a reação colorimétrica gerada nas curvas de calibração para cada complexante, foi realizada a aquisição das imagens digitais (área de interesse: 64x64 e n=4) utilizando o sistema exemplificado na Figura 2. Todas as imagens foram submetidas a análise multivariada utilizando PLS, selecionada diretamente no aplicativo PhotoMetrix PRO.

3.4.2.2 Avaliação do volume total da solução, distância focal da câmera e intensidade de luz para a obtenção das imagens digitais

Um planejamento de experimentos fatorial do tipo Doehlert (DOE) foi feito para avaliar algumas condições experimentais de interesse e possibilitar a obtenção de superfícies de resposta, para definir a melhor condição de trabalho a ser aplicada para os experimentos. Dentre as variáveis avaliadas, estão: o volume total da solução (1 a 2 mL), a distância focal da câmera (2 a 20 mm) para a obtenção das imagens digitais e a intensidade de luz (30 a 180 lx) aplicada pelo LED.

Dessa forma, o volume total da solução foi escolhido como sendo a variável 1, a distância focal da câmera como variável 2 e a intensidade de luz como variável 3. Como são três variáveis, o número de níveis gerado pelo planejamento DOE é igual a 5, 7 e 3, para as variáveis 1, 2 e 3, respectivamente. Para a construção do planejamento foram utilizadas planilhas eletrônicas, seguindo o tutorial apresentado por Teófilo e Ferreira (2006). Os diferentes níveis gerados para cada uma das variáveis podem ser observados na Tabela 2 e os 19 experimentos gerados pelo planejamento DOE na Tabela 3. Vale ressaltar que os 19 experimentos foram executados para os três complexantes estudados neste trabalho (calceína, murexida e calcon).

Os experimentos foram realizados utilizando a opção de calibração multivariada por PLS, no aplicativo PhotoMetrix PRO. Neste caso, apenas os valores dos canais R, G e B foram coletados para serem utilizados nos cálculos do planejamento de experimentos. Sendo assim, os resultados experimentais foram avaliados utilizando as mesmas planilhas propostas por Teófilo e Ferreira (2006), nas quais são avaliadas a significância da regressão, ajuste do modelo e são construídos os gráficos de superfície, para avaliar a condição ótima de trabalho a ser empregue em todos os experimentos do trabalho. Ainda, foi utilizada a ferramenta Solver disponível no Microsoft Excel® para identificar a melhor condição de trabalho.

Tabela 2 – Valores reais e codificados de cada variável para avaliação da melhor condição de trabalho na aquisição das imagens digitais usando o PhotoMetrix

Variáveis	Níveis da variável 1						
	-1	-0,5	0	0,5	1		
Var01	1	1,25	1,5	1,75	2		
Níveis da variável 2							
	-0,9	-0,6	-0,3	0	0,29	0,58	0,87
Var02	2	5	8	11	14	17	20
Níveis da variável 3							
	-0,8	0	0,82				
Var03	30	105	180				

Fonte: Autor (2022).

Tabela 3 – Ensaios gerados pelo planejamento DOE para avaliar a melhor condição de trabalho na aquisição das imagens digitais usando o PhotoMetrix

Planejamento							
Ensaio	Var 1, mL	Var 2, mm	Var 3, lux	Ensaio	Var 1, mL	Var 2, mm	Var 3, lux
1	2,00	11	105	11	1,25	14	180
2	1,75	20	105	12	1,50	5	180
3	1,75	14	180	13	1,50	11	105
4	1,00	11	105	14	1,50	11	105
5	1,25	2	105	15	1,50	11	105
6	1,25	8	30	16	1,50	11	105
7	1,75	2	105	17	1,50	11	105
8	1,75	8	30	18	1,50	11	105
9	1,25	20	105	19	1,50	11	105
10	1,50	17	30				

Fonte: Autor (2022).

3.4.2.3 Investigação de interferências causadas pelo magnésio

A influência do magnésio na formação dos complexos foi investigada utilizando concentrações variando de 0,5 a 10 mg L⁻¹ de Mg e a concentração de Ca constante em 5 mg L⁻¹. As soluções contendo Ca e Mg foram analisadas utilizando curvas de calibração para cada um dos complexantes com as condições experimentais previamente otimizadas. Os resultados para a interferência de Mg foram avaliados a partir do cálculo da incerteza da medição baseado no desvio padrão das medidas de uma solução contendo somente Ca e o valor de t de *Student*.

3.4.2.4 Avaliação dos critérios para verificar a qualidade dos modelos de calibração para determinação de Ca

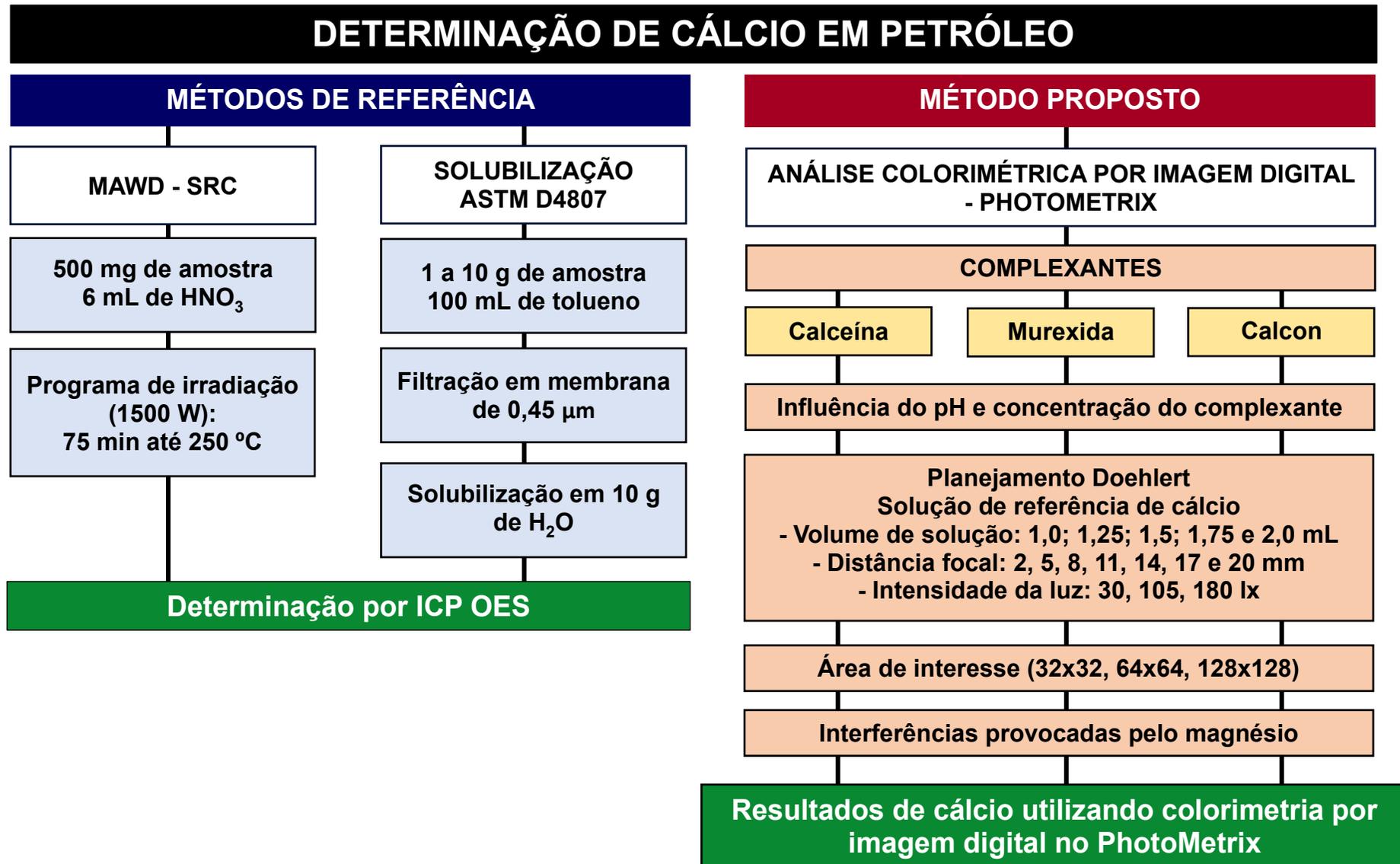
Os modelos de calibração obtidos pela regressão PLS foram avaliados de acordo com o número de fatores, os coeficientes de determinação, RMSEC, RMSECV e RMSEP. A escolha do número de fatores que melhor descreve o modelo é feita de acordo com os valores encontrados de RMSEC, RMSECV e RMSEP. No entanto, o número de fatores considerado ótimo, é aquele que apresentar o menor RMSEP.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada complexante utilizado, foram calculados considerando a concentração média e o desvio padrão de dez medidas do branco. Para o branco, foi realizada a filtração da membrana de 0,45 µm com tolueno e determinada a sua concentração pelo aplicativo PhotoMetrix PRO.

Os valores encontrados para as amostras de petróleo (em mg L⁻¹) foram convertidos em mg kg⁻¹, levando em consideração a massa de amostra e a massa de água utilizada para a aferição das solubilizações (10 g), utilizados no preparo das amostras.

Para a avaliação da exatidão do método proposto, os resultados foram comparados com os resultados obtidos pela MAWD e determinação por ICP OES e com os resultados encontrados nas solubilizações e determinação por ICP OES. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) com pós teste t de *Student*, num intervalo de 95% de confiança, utilizando o software GraphPad InStat®, versão 3.0. O fluxograma da Figura 5 resume todos os procedimentos experimentais avaliados nesse estudo.

Figura 5 – Fluxograma dos procedimentos e parâmetros avaliados para a determinação de cálcio nas amostras de petróleo



4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, inicialmente, serão mostrados os resultados da caracterização das amostras de petróleo utilizadas nesse trabalho. Logo após, serão mostrados os resultados dos métodos de referência utilizados para avaliação da exatidão do modelo proposto. E por fim, serão mostrados e discutidos os resultados para o desenvolvimento do método colorimétrico utilizando o aplicativo PhotoMetrix para a determinação de cálcio em petróleo.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PETRÓLEO

Inicialmente, as amostras de petróleo selecionadas para este estudo foram caracterizadas quanto ao teor de água, teor de sedimentos e °API, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados para a determinação do teor de água, teor de sedimentos e °API presentes nas amostras de petróleo utilizadas neste trabalho (n=3)

Amostra	Teor de água, %	Teor de sedimentos, %	°API
1	5,55 ± 0,03	0,864 ± 0,147	26,75 ± 0,15
2	0,41 ± 0,01	0,161 ± 0,017	28,78 ± 0,09
3	0,93 ± 0,01	0,299 ± 0,010	26,38 ± 0,01
4	0,82 ± 0,04	0,131 ± 0,045	28,16 ± 0,09
5	0,36 ± 0,03	0,054 ± 0,009	26,26 ± 0,13

Fonte: Autor (2022)

Em relação ao teor de água, a amostra 1 foi quem apresentou o maior valor (5,55%), enquanto as demais amostras apresentaram teores de água inferiores a 1%. Já para a determinação do teor de sedimentos, de acordo com a norma ASTM D4807, para a maioria das amostras, foi necessário diminuir a massa utilizada para a filtração, pois ao pesar a massa preconizada pela norma (10 g), ocorria o entupimento da membrana, impedindo a completa filtração da amostra. Além do mais, com exceção das amostras 4 e 5, as amostras apresentaram teores de sedimentos superiores a 0,15% (m/m), valor máximo estipulado pela norma. Em relação ao °API, o menor valor encontrado foi 26,26 e o maior valor foi 28,78, sendo considerados petróleos intermediários (SPEIGHT, 2006) e provenientes da camada do pré-sal (informação fornecida pelo CENPES/PETROBRAS).

4.2 DETERMINAÇÃO DE Ca, Mg, Na, Ba, Li e Sr EM PETRÓLEO PELOS MÉTODOS DE REFERÊNCIA

A exatidão do método proposto nesse estudo foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos pelas solubilizações das amostras de petróleo (com determinação

por ICP OES e PhotoMetrix), com os resultados obtidos pelo método de digestão por via úmida por radiação micro-ondas em sistema com câmara única de reação (MAWD-SRC).

Normalmente, os metais alcalinos e alcalinos terrosos encontram-se no petróleo na forma de sais (SPEIGHT, 2001). Conforme descrito no item 3.4.2 (Determinação do teor de sedimentos e isolamento das espécies salinas nas amostras de petróleo) dos Materiais e Métodos, após a filtração das amostras nas membranas de 0,45 μm , as espécies salinas isoladas na superfície das membranas foram solubilizadas com massas de água de 10 e 25 g. Os extratos aquosos então foram utilizados para a determinação de cálcio pela ICP OES. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5 e foram comparados com aqueles obtidos após MAWD-SRC, conforme descrito no item 3.4.3 (Decomposição assistida por radiação micro-ondas em SRC).

Tabela 5 – Concentração de Ca, Mg, Na, Ba, Li e Sr em sedimentos de petróleo após solubilização e MAWD-SRC, com determinação por ICP OES. Resultados expressos em mg kg⁻¹ (n = 3)

Metal	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
	MAWD-SRC	Solubilização	MAWD-SRC	Solubilização	MAWD-SRC	Solubilização	MAWD-SRC	Solubilização	MAWD-SRC	Solubilização
Ca	879 ± 43	834 ± 39	118 ± 10	103 ± 9	400 ± 39	379 ± 38	639 ± 58	680 ± 85	5,36 ± 0,50	5,02 ± 0,01
Mg	188 ± 14	188 ± 13	19,7 ± 1,8	21,5 ± 2,0	31,1 ± 3,0	31,3 ± 4,2	11,3 ± 0,1	11,5 ± 0,1	2,64 ± 0,25	2,60 ± 0,20
Na	2559 ± 189	2649 ± 165	153 ± 14	138 ± 20	308 ± 35	261 ± 36	58,1 ± 6,3	61,7 ± 4,5	165 ± 11	166 ± 4
Ba	0,701 ± 0,040	0,754 ± 0,055	< 0,100	< 0,050	1,10 ± 0,10	1,33 ± 0,15	1,13 ± 0,15	1,18 ± 0,07	< 0,100	< 0,050
Li	0,432 ± 0,045	1,04 ± 0,50	< 0,100	< 0,050	0,223 ± 0,030	0,303 ± 0,050	< 0,100	< 0,050	< 0,100	< 0,050
Sr	17,6 ± 2,0	19,5 ± 1,8	3,73 ± 0,29	3,77 ± 0,31	12,2 ± 1,5	13,5 ± 1,7	2,74 ± 0,02	2,91 ± 0,17	0,322 ± 0,04	0,309 ± 0,03

Fonte: Autor (2022).

Os resultados obtidos pela MAWD-SRC e solubilização das membranas, com posterior determinação por ICP OES não apresentaram diferenças significativas (teste t de *Student*, com nível de confiança de 95%). Os resultados para Ca foram comparados na etapa posterior com os resultados da análise colorimétrica com imagens digitais no PhotoMetrix.

4.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO COM IMAGENS DIGITAIS UTILIZANDO O APLICATIVO PHOTOMETRIX

Inicialmente, serão apresentados os resultados obtidos na avaliação da influência do pH e da concentração dos complexantes (calceína, murexida e calcon) necessária para a formação do complexo com o Ca. Em seguida, serão discutidos os resultados do planejamento DOE para avaliação das interações das variáveis 1, 2 e 3, que foram o volume de solução utilizado (1 a 2 mL), distância focal da câmera (2 a 20 mm) para a aquisição das imagens digitais e a intensidade de luz (30 a 180 lx) emitida pelo LED, respectivamente.

Ainda, serão mostrados os resultados da região de interesse selecionada para a captura das imagens digitais no PhotoMetrix, nas regiões de 32x32, 64x64 e 128x128, bem como, a comparação dos resultados pelo método proposto e os métodos de referência utilizados para a avaliação da exatidão e os resultados das interferências provocadas pelo magnésio na formação dos complexos.

4.3.1 Avaliação da influência do pH e otimização da concentração do complexante necessária para a formação dos complexos com o cálcio

O pH influencia diretamente na formação do complexo, devido a quantidade de sítios disponíveis para ocorrer a ligação com o cálcio. Sendo assim, avaliou-se a influência do pH e a concentração de complexante (calceína, murexida e calcon) necessária na formação dos complexos com o cálcio. A influência destas variáveis foi avaliada mediante a construção de curvas de calibração com concentração de Ca de 1 a 10 mg L⁻¹. Neste sentido, alíquotas da solução estoque de Ca 1000 mg L⁻¹ foram transferidas para o interior dos frascos de polipropileno de 2 mL e o pH foi ajustado com solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹. Todas as curvas de calibração para os três complexantes foram construídas em pH superior a 10, condição necessária para a

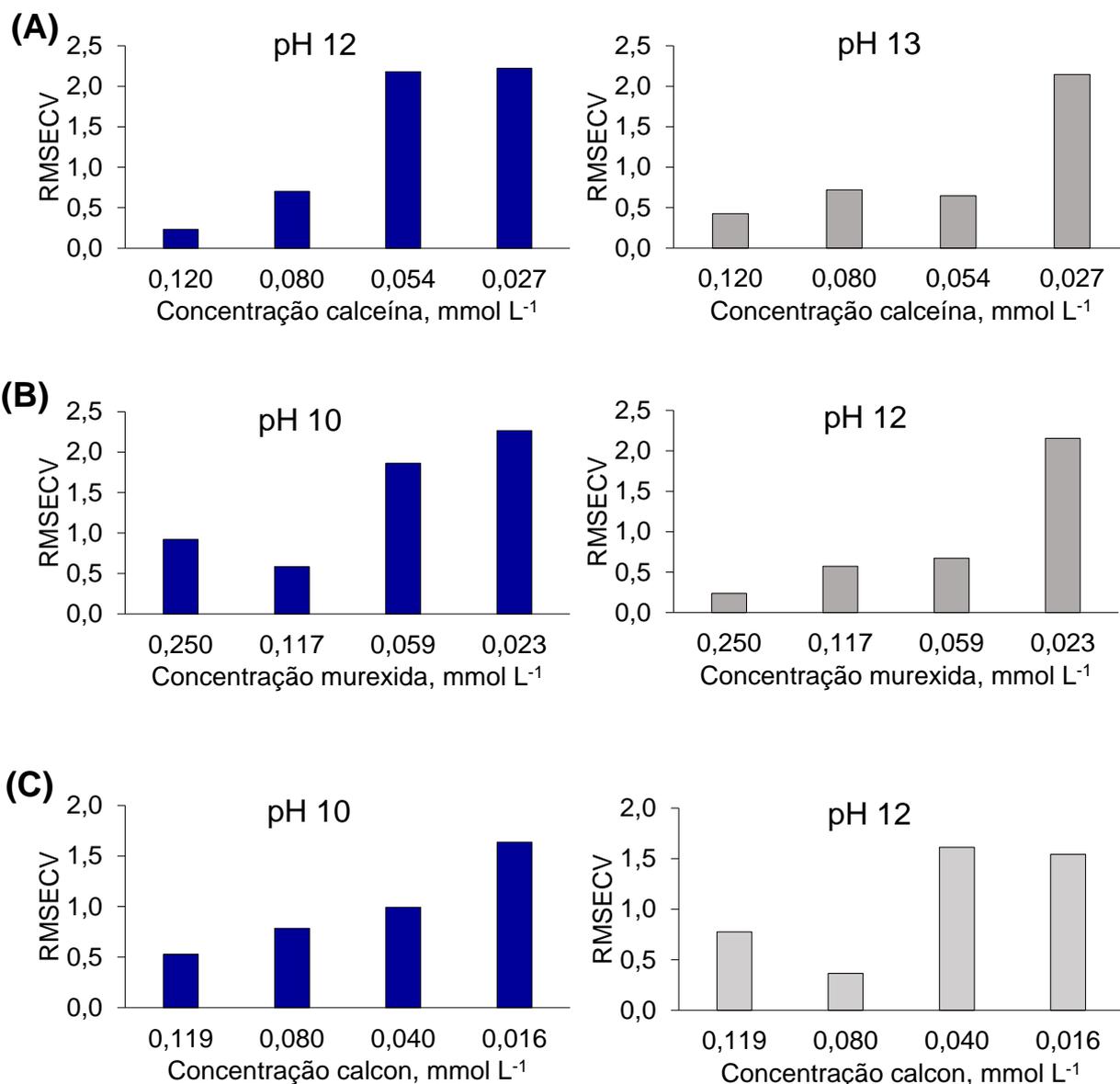
formação de complexos estáveis com o Ca (NTAILIANAS e WHITNEY, 1964 e VOGEL, 1989).

Nessas mesmas curvas de calibração, antes de proceder a captura das imagens, também foram avaliados os volumes de cada complexante adicionados, de maneira a permitir a obtenção de complexos estáveis e com máxima resposta colorimétrica. Após a reação colorimétrica gerada nas curvas de calibração para cada complexante, foi realizada a aquisição das imagens digitais utilizando o sistema exemplificado na Figura 2 e com região de interesse de 64x64 (n=4). Todas as imagens foram adquiridas 30 s após a adição de cada complexante, em seguida foram submetidas a análise multivariada utilizando PLS, selecionada diretamente no aplicativo PhotoMetrix PRO. A escolha da melhor condição foi baseada nas figuras de mérito obtidas pelas curvas de calibração, como o coeficiente de determinação (R^2), o número de fatores, RMSEC e RMSECV.

Na Figura 6 encontram-se os resultados de RMSECV para os diferentes pH e concentrações de complexante calceína, murexida e calcon avaliados. A partir da Figura 6 é possível notar que o menor valor de RMSECV encontrado para a calceína foi utilizando uma concentração de $0,120 \text{ mmol L}^{-1}$ de complexante em pH 12 (Figura 6A). Nessas condições, a estequiometria da reação é 2 mol de cálcio para 1 mol de complexante calceína, considerando o maior ponto da curva de calibração de 10 mg L^{-1} de Ca ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$). Para a murexida (Figura 6B), o menor valor de RMSECV obtido foi para a concentração de $0,250 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 12. Nessa condição, a estequiometria da reação é de 1:1 (Ca:murexida), considerando a concentração de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. Por fim, para o calcon, o menor RMSECV encontrado foi utilizando uma concentração de $0,080 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 12. Nesse caso, a estequiometria da reação foi de 3 mols de cálcio para 1 mol de calcon (considerando a concentração de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ca). Cabe destacar, que se deve trabalhar em pH 12 com o calcon para minimizar possíveis interferências formadas com o magnésio (VOGEL et al., 1989).

Essas condições otimizadas foram aplicadas em todos os experimentos posteriores.

Figura 6 – Resultados dos modelos de calibração por PLS obtidos pelo aplicativo PhotoMetrix em função do pH e da concentração de complexante necessária para a formação dos complexos com o Ca. (A) Calceína; (B) Murexida e (C) Calcon



Fonte: Autor (2022).

4.3.2 Avaliação do volume total da solução, distância focal da câmera e intensidade de luz para a obtenção das imagens digitais

Após o ajuste de pH e a concentração adequada de cada complexante, realizou-se um planejamento de experimentos do tipo Doehlert, modelo quadrático para a otimização do volume total da solução, a distância focal da câmera e a

intensidade de luz. A definição de qual planejamento usar é muito importante para estimar as influências e ou os efeitos das diferentes variáveis em estudo. Com isso, as interações entre as variáveis obtidas com o planejamento auxiliam a boa compreensão do comportamento do sistema (TEÓFILO e FERREIRA et al., 2006).

Um ponto importante é que os planejamentos fatoriais permitem a construção de modelos lineares nos fatores utilizando o método dos Mínimos Quadrados, que descrevem superfícies de respostas planas. Mas, na maioria das vezes a superfície de resposta possui curvatura, requerendo a construção de modelos quadráticos, como foi o caso do presente estudo. Dessa forma, por meio do planejamento DOE são adicionados novos níveis de planejamento fatorial, que permitem o cálculo de coeficientes quadráticos. Além disso, a escolha do planejamento DOE foi em função de este necessitar um número menor de experimentos quando comparado com o planejamento composto central, o que o torna mais eficiente (BREITKREITZ, et al., 2014; TEÓFILO e FERREIRA et al., 2006).

Esse planejamento foi utilizado por Böck et al. (2022) para encontrar a condição ótima de trabalho para posterior determinação de cobre em aguardente de cana (cachaça). As variáveis avaliadas foram a concentração de cuprizona necessária para a formação do complexo estável com o cobre e o pH, em cinco e três níveis. Holkem et al. (2021), por sua vez, utilizaram o planejamento composto central (CCD), para posterior determinação de cloreto em petróleo por análise colorimétrica com imagens digitais. Foram avaliadas as interações entre 3 variáveis, sendo elas a intensidade de luz aplica pelo LED, o volume total de solução utilizado e a distância focal da câmera para a captura das imagens digitais após reação de precipitação.

Diante disso, no presente estudo, o volume total da solução foi fixado como variável 1, a distância focal da câmera como variável 2 e a intensidade de luz como variável 3, considerando que essas são as variáveis mais importantes. Assim, foi possível avaliar as influências entre as variáveis, visto que dependendo das condições empregadas, as respostas podem diferir em termos dos canais R, G e B. O mesmo planejamento foi aplicado para calceína, murexida e calcon.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos para os canais RGB para cada complexante, a significância da regressão para o modelo, o ajuste do modelo e os gráficos de superfície para avaliar a condição ótima de trabalho, que foi empregada em todos os experimentos do trabalho.

4.3.2.1 Calceína

Para poder fazer a avaliação da regressão e do ajuste do modelo, foram avaliados os valores dos canais RGB obtidos dos 19 ensaios gerados pelo planejamento DOE (Tabela 3), os quais encontram-se na Tabela 6. No entanto, um desafio que ainda é corriqueiro, é a inserção dos três canais simultaneamente como resposta na avaliação dos experimentos do planejamento. Assim, tanto para a calceína, como para dos demais complexantes, utilizou-se como resposta apenas o canal com a melhor correlação com a concentração de cálcio.

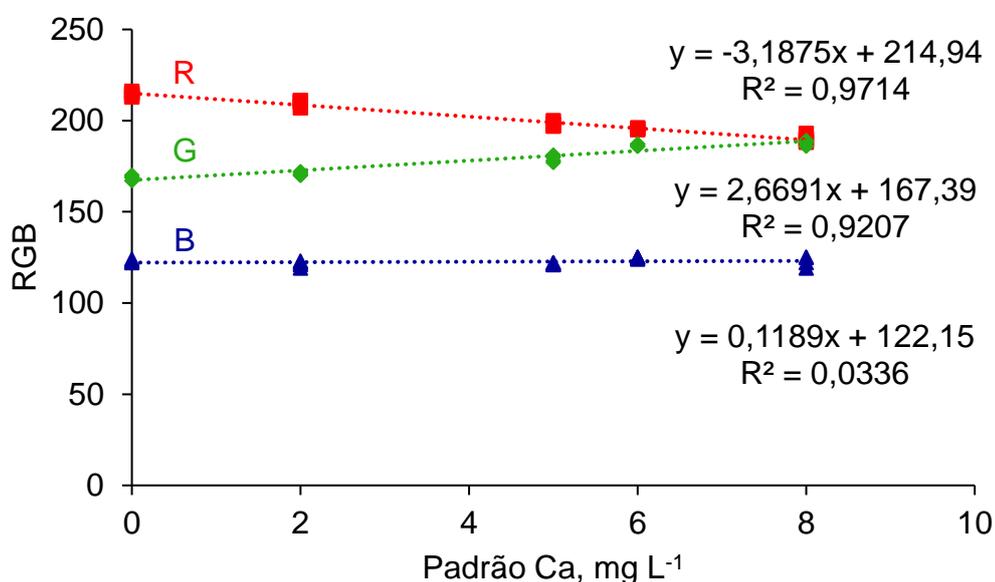
Tabela 6 – Resultados dos 19 ensaios do planejamento DOE quadrático correspondentes aos canais R, G e B obtidos pelo modelo PLS no aplicativo PhotoMetrix para a calceína (n = 3)

Ensaio	R	G	B
1	182,7	182,7	119,7
2	201,7	203,3	136,7
3	163,0	166,7	108,0
4	178,3	183,3	118,3
5	191,3	195,0	131,0
6	186,7	168,0	111,7
7	193,0	195,3	132,3
8	191,3	169,3	113,7
9	201,3	205,3	138,0
10	201,0	179,7	121,3
11	166,0	170,3	112,0
12	165,0	169,3	112,0
13	182,3	183,7	120,0
14	182,7	183,7	120,3
15	182,3	184,7	121,3
16	182,0	183,3	120,0
17	182,7	183,7	121,0
18	181,7	183,0	120,3
19	181,0	184,0	120,3

Fonte: Autor (2022).

Na Figura 7 está o gráfico de calibração entre os valores dos canais RGB obtidos para a calceína, em relação a concentração de cálcio. É possível observar que o canal R é o que apresenta o maior coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9714$) com a concentração de cálcio. A correlação também é significativa para o canal G com coeficiente de determinação de 0,9207. Por fim, para o canal B, a correlação não é significativa. Sendo assim, os valores do canal R foram utilizados como resposta para o tratamento estatístico dos experimentos.

Figura 7 – Curva de calibração para a calceína utilizando a resposta dos canais RGB em função da concentração de cálcio (n = 3)



Fonte: Autor (2022).

Nesse mesmo contexto, Lopez-Moliner et al. (2013) propuseram a determinação da dureza de cálcio em água pela colorimetria com imagens digitais. A reação colorimétrica utilizada para a captura das imagens digitais ocorreu entre os íons Ca^{2+} e o indicador metalocrômico glioxal bis(2-hidroxianil). Os autores realizaram uma análise fatorial das imagens digitais (coloridas) pela análise de componentes principais (PCA). Com isso, verificaram que a cor verde (canal G) apresentou a maior variância (50% da variância total), indicando que a maior sensibilidade analítica estava associada a essa cor.

A etapa seguinte foi verificar se o modelo matemático feito estava ajustado, pois esta é uma etapa fundamental para chegar na condição ótima do planejamento

de experimentos. Sendo assim, após inserir os valores do canal R como resposta, obteve-se os resultados da significância da regressão e o ajuste do modelo quadrático (Tabela 7), através da análise de variância (ANOVA). A forma mais confiável de executar essa etapa é utilizando a ANOVA. A variação total da resposta pela ANOVA é determinada como a soma quadrática da regressão (SQ_{regr}) e a soma quadrática dos resíduos (SQ_{res}), sendo a soma total: $SQ_{total} = SQ_{regr} + SQ_{res}$ (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Como esperado, a regressão foi significativa ($p < 0,05$) e o modelo não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$), sendo 99,8 % da variação explicada pelo modelo.

Tabela 7 – Análise de variância para regressão múltipla do planejamento DOE para a calceína

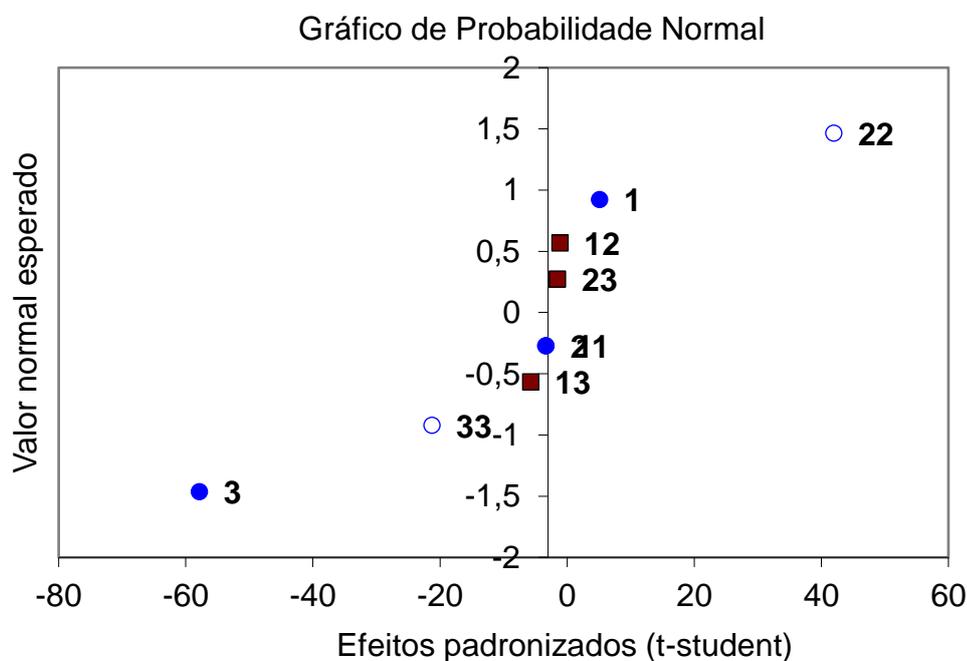
Análise de Variância - Modelo Quadrático						
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.		p
Regressão	2280	9	253,31	464,43	SG	7E-11
Resíduos	4,909	9	0,5454			
F. Ajuste	2,75	3	0,9167	2,5478		0,152
Erro Puro	2,159	6	0,3598			
Total	2285	18				
% variação explicada				99,785		
% máx. de variação explicável				99,906		

FV: fonte de variação; SQ: soma quadrática; nGL: número de graus de liberdade; MQ: média quadrática.

Após avaliada a análise de variância do modelo, a próxima etapa foi a avaliação dos coeficientes do modelo obtidos com o planejamento DOE. Para tanto, foi construído o gráfico de probabilidade normal (Figura 8), em função do valor normal esperado e dos efeitos padronizados (*t-Student*). É possível observar que o coeficiente da variável 3 (intensidade de luz) e o coeficiente quadrático da segunda variável (22), correspondente a distância focal da câmera apresentaram-se como sendo os mais significativos. O coeficiente da variável 3 apresentou uma contribuição negativa, indicando que a condição que apresenta melhor desempenho é quando se aplica menores intensidades de luz na captura das imagens. Por outro lado, o coeficiente quadrático da segunda variável (22), correspondente a distância focal da

câmera, indicou que a melhor resposta é encontrada quando se usa maiores distâncias focais para a aquisição das imagens.

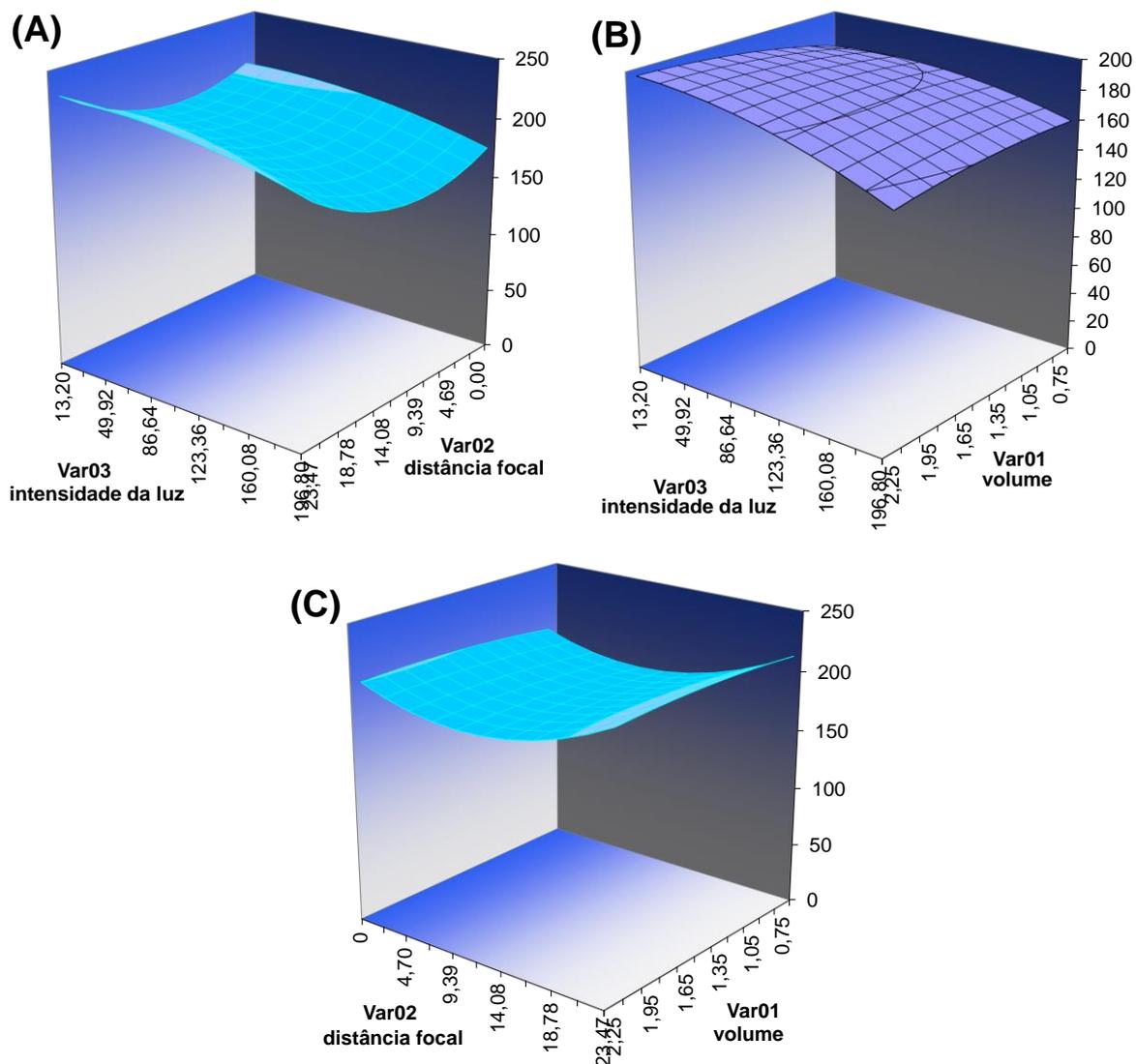
Figura 8 – Gráfico de probabilidade normal para os coeficientes obtidos para a calceína



Fonte: Autor (2022).

Após as etapas anteriormente descritas, os fatores significativos foram selecionados, permitindo executar uma análise de superfícies de resposta para a otimização dos experimentos. Assim, são encontrados os valores das variáveis que vão produzir a melhor resposta esperada, ou seja, a condição ótima de trabalho. A Figura 9 apresenta os gráficos de superfície gerados, em que para verificar as interações entre as variáveis, uma delas é fixada e avaliada em função das demais. Nesse sentido, quando o volume total de solução foi fixado, as maiores respostas foram obtidas aplicando menores intensidades de luz e maiores distâncias focais na aquisição das imagens digitais (Figura 9A). Quando a distância focal foi fixada, as maiores respostas foram alcançadas aplicando menores intensidades de luz e em relação ao volume, as respostas praticamente foram constantes (Figura 9B). E ao fixar a intensidade de luz, as maiores respostas foram aplicando maiores distâncias focais e praticamente foram constantes em relação ao volume.

Figura 9 – Superfícies de respostas das variáveis significativas por análise colorimétrica no PhotoMetrix utilizando solução de referência de cálcio (5 mg L^{-1}) com a calceína



Fonte: Autor (2022).

Diante disso, percebe-se que não é possível visualizar de uma forma tão clara e objetiva qual é a melhor condição de trabalho por meio dos gráficos de superfície. Com isso, uma das formas possíveis de encontrar essa condição é utilizando a ferramenta *Solver* disponível no Microsoft Excel®, um suplemento que pode ser utilizado para teste de hipóteses. O método de solução utilizado nesse estudo foi o Gradação Reduzida Generalizada (GRG), empregado para problemas simples não lineares (MICROSOFT, 2022). Os resultados obtidos pelo *Solver* estão apresentados

na Tabela 8. Sendo assim, a condição ótima encontrada foi utilizando 2 mL como volume total de solução, 20 mm de distância focal da câmera e 30 lx de intensidade de luz. Depois disso, todos os outros experimentos foram realizados nessas condições de volume, distância focal e intensidade da luz.

Tabela 8 – Valores reais e codificados utilizados para a obtenção da condição ótima de trabalho empregando o Solver para a calceína

	Condição ótima		Planejamento		
	Valor codificado	Valor real	-1	0	1
Var 1	1	2	1	1,5	2
Var 2	1	20	2	11	20
Var 3	-1	30	30	105	180

Var 1 - Volume total de solução (mL); Var 2 - Distância focal da câmera (mm) e Var 3 - Intensidade da luz (lux).

4.3.2.2 Murexida

O mesmo planejamento de experimentos foi aplicado para o complexante murexida. A primeira etapa consistiu na avaliação da regressão e do ajuste do modelo, onde foram inseridos os valores dos canais RGB obtidos para os 19 experimentos gerados pelo planejamento DOE (Tabela 3). Os resultados encontram-se na Tabela 9.

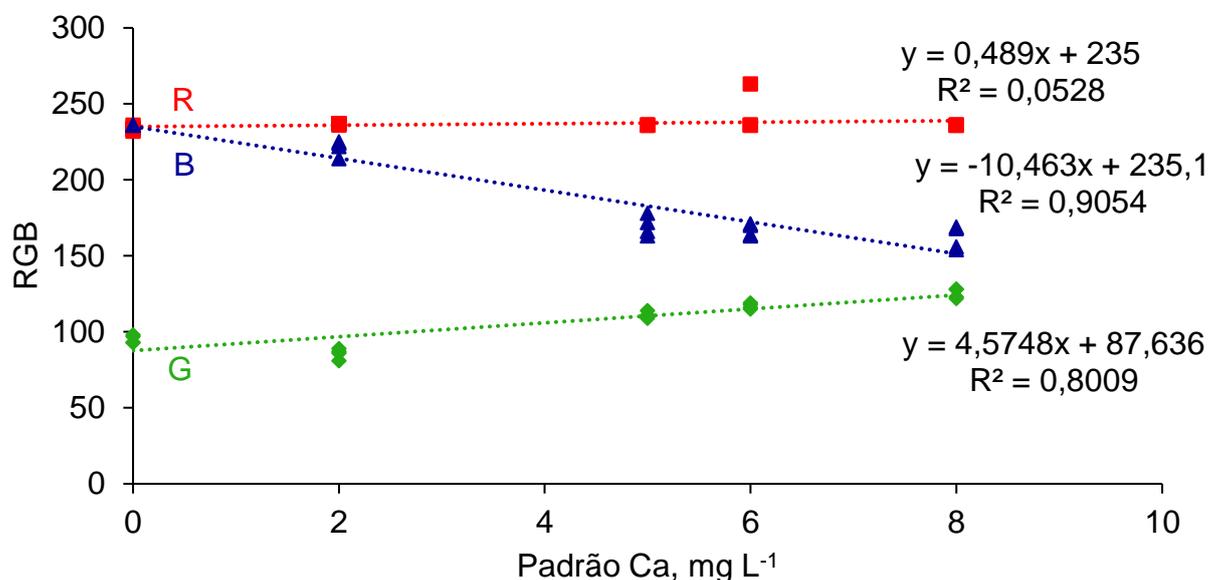
Tabela 9 – Resultados dos 19 ensaios do planejamento DOE quadrático correspondentes aos canais R, G e B obtidos pelo modelo PLS no aplicativo PhotoMetrix para a murexida (n = 3)

Ensaio	R	G	B
1	236,0	104,0	161,7
2	236,0	107,7	172,3
3	236,0	108,7	181,0
4	236,0	100,0	160,0
5	236,0	111,0	177,3
6	178,3	54,3	72,7
7	236,0	104,7	166,7
8	175,0	46,3	65,3
9	236,0	111,0	175,3
10	189,0	54,7	65,7
11	236,0	105,7	178,7
12	236,0	119,3	190,0
13	236,0	102,3	163,3
14	236,0	101,3	161,7
15	236,0	100,3	160,7
16	236,0	102,3	162,0
17	236,3	102,7	161,3
18	236,0	95,3	148,0
19	236,0	101,3	153,3

Fonte: Autor (2022).

As curvas de calibração entre as respostas obtidas pelos canais RGB e a concentração de cálcio são apresentadas na Figura 10. É possível constatar que o canal B é o que apresenta o maior coeficiente de determinação com a concentração de cálcio ($R^2 = 0,9054$), ao passo que o canal R apresenta a menor correlação. Sendo assim, os valores do canal B foram utilizados como resposta para verificar a regressão e se o modelo apresentou ou não falta de ajuste.

Figura 10 – Curva de calibração para a murexida utilizando a resposta dos canais RGB em função da concentração de cálcio (n = 3)



Fonte: Autor (2022).

Na sequência, após inserir os valores do canal B como resposta, obteve-se os resultados da significância da regressão e o ajuste do modelo quadrático (Tabela 10), através da análise de variância (ANOVA). Novamente, como esperado, a regressão foi significativa ($p < 0,05$) e o modelo não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$), sendo 98,9 % da variação explicada pelo modelo.

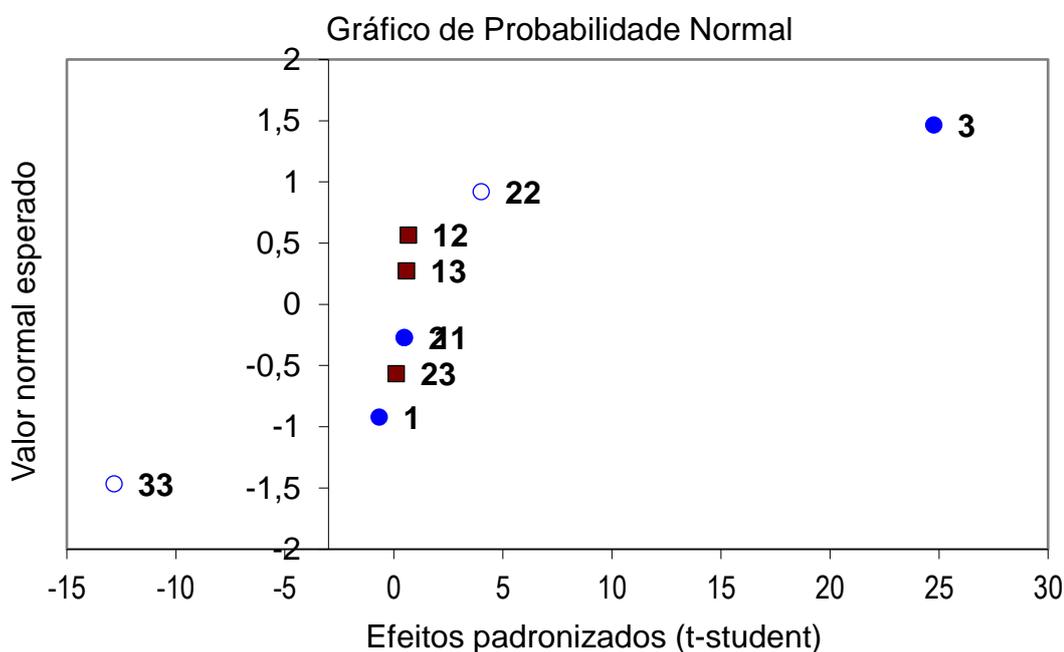
Tabela 10 – Análise de variância para regressão múltipla do planejamento DOE para a murexida

Análise de Variância - Modelo Quadrático						
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.		p
Regressão	2643	9	2936,5	90,008	SG	9,8E-08
Resíduos	293,62	9	32,625			
F. Ajuste	98,417	3	32,806	1,0083		0,45162
Erro Puro	195,21	6	32,534			
Total	26722	18				
% variação explicada				98,901		
% máx. de variação explicável				99,269		

FV: fonte de variação; SQ: soma quadrática; nGL: número de graus de liberdade; MQ: média quadrática.

Na sequência, foi obtido o gráfico de probabilidade normal (Figura 11), em função do valor normal esperado e dos efeitos padronizados (*t-Student*). É possível observar que o coeficiente da variável 3 (intensidade de luz) é o mais significativo de todos e apresenta uma contribuição positiva, indicando que a condição que apresenta melhor desempenho é quando se aplica maiores intensidades de luz na captura das imagens.

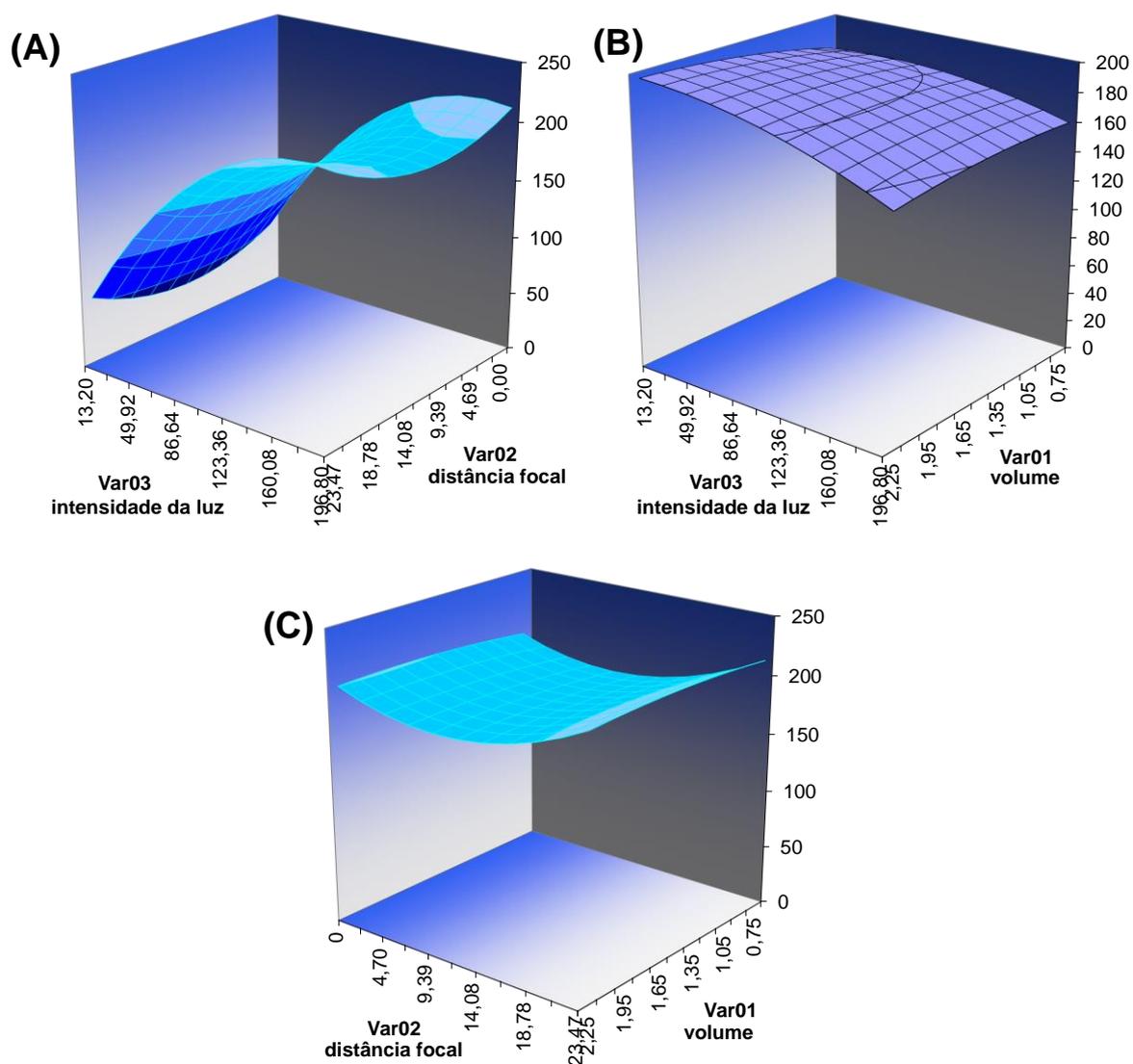
Figura 11 – Gráfico de probabilidade normal para os coeficientes obtidos para a murexida



Fonte: Autor (2022).

Em seguida, foram construídos os gráficos de superfícies de resposta para encontrar a condição ótima de trabalho (Figura 12). Quando o volume total de solução foi fixado, as maiores respostas foram obtidas ao se aplicar maiores intensidades de luz e menores distâncias focais na aquisição das imagens digitais (Figura 12A). Quando a distância focal foi fixada, as maiores respostas foram alcançadas ao aplicar maiores intensidades de luz e em relação ao volume, as respostas praticamente foram constantes (Figura 12B). E por último, ao fixar a intensidade de luz, as maiores respostas foram obtidas no sentido das menores distâncias focais e novamente, praticamente foram constantes em relação ao volume.

Figura 12 – Superfícies de respostas das variáveis significativas por análise colorimétrica no PhotoMetrix utilizando solução de referência de cálcio (5 mg L^{-1}) com a murexida



Fonte: Autor (2022).

Na última etapa, foram obtidos os resultados utilizando o *Solver* do Excel (Tabela 11). A condição ótima encontrada foi utilizando 1,5 mL como volume total de solução, 11 mm de distância focal da câmera e 180 lux de intensidade de luz. Depois disso, todos os outros experimentos foram realizados nessas condições de volume, distância focal e intensidade da luz.

Tabela 11 – Valores reais e codificados utilizados para a obtenção da condição ótima de trabalho empregando o Solver para a murexida

	Condição ótima		Planejamento		
	Valor codificado	Valor real	-1	0	1
Var 1	0	1,5	1	1,5	2
Var 2	0	11	2	11	20
Var 3	1	180	30	105	180

Var 1 - Volume total de solução (mL); Var 2 - Distância focal da câmera (mm) e Var 3 - Intensidade da luz (lux).

4.3.2.3 Calcon

A primeira etapa do planejamento DOE consistiu na avaliação da regressão e do ajuste do modelo, onde foram inseridos os valores dos canais RGB obtidos para os 19 experimentos gerados pelo planejamento e os resultados encontram-se na Tabela 12.

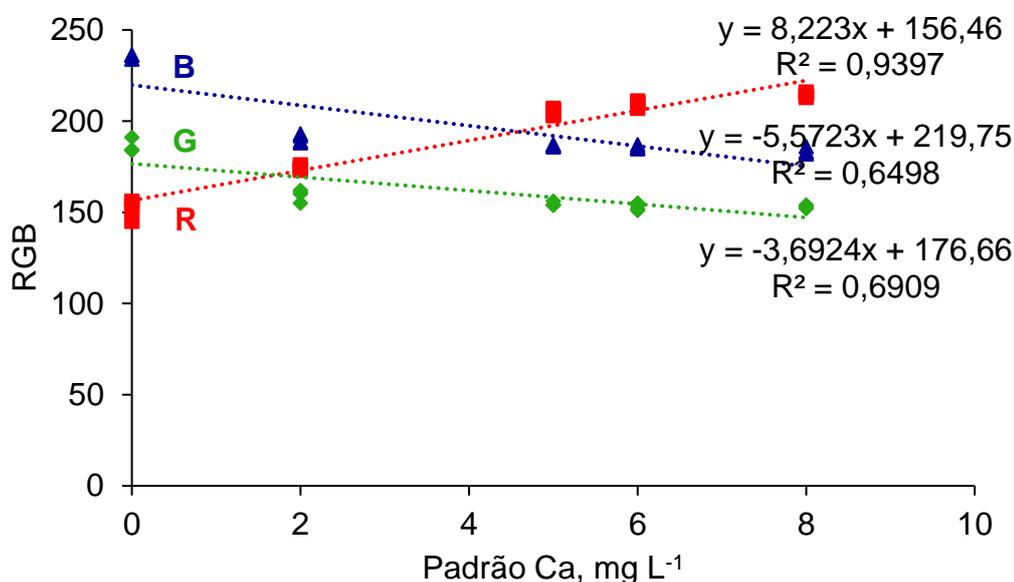
Tabela 12 – Resultados dos 19 ensaios do planejamento DOE quadrático correspondentes aos canais R, G e B obtidos pelo modelo PLS no aplicativo PhotoMetrix para o calcon (n = 3)

Ensaio	R	G	B
1	228,0	114,3	160,0
2	228,3	122,3	174,3
3	235,0	135,0	181,0
4	233,3	126,3	166,7
5	236,0	130,0	184,0
6	196,0	100,0	116,0
7	236,0	129,3	181,3
8	183,7	86,3	116,7
9	234,0	129,0	174,0
10	188,3	99,7	124,3
11	234,7	138,0	185,0
12	236,0	143,7	189,7
13	229,7	116,0	158,0
14	231,7	121,7	165,0
15	233,7	120,0	158,7
16	231,0	121,0	163,7
17	233,7	122,3	163,0
18	230,0	121,3	159,3
19	233,0	120,0	157,0

Fonte: Autor (2022).

A correlação entre as respostas obtidas pelos canais RGB e a concentração de cálcio encontram-se na Figura 13. É possível visualizar que o canal R é o que apresenta o maior coeficiente de determinação com a concentração de cálcio ($R^2 = 0,9397$). Assim, os valores do canal R foram utilizados como resposta para verificar a regressão e se o modelo apresentou ou não falta de ajuste.

Figura 13 – Curva de calibração para o calcon utilizando a resposta dos canais RGB em função da concentração de cálcio (n = 3)



Fonte: Autor (2022).

Em seguida, depois de inserir os valores do canal R como resposta, obteve-se os resultados da significância da regressão e o ajuste do modelo quadrático (Tabela 13), através da análise de variância (ANOVA). Os resultados indicaram que a regressão foi significativa ($p < 0,05$) e o modelo não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$), sendo 99,5 % da variação explicada pelo modelo.

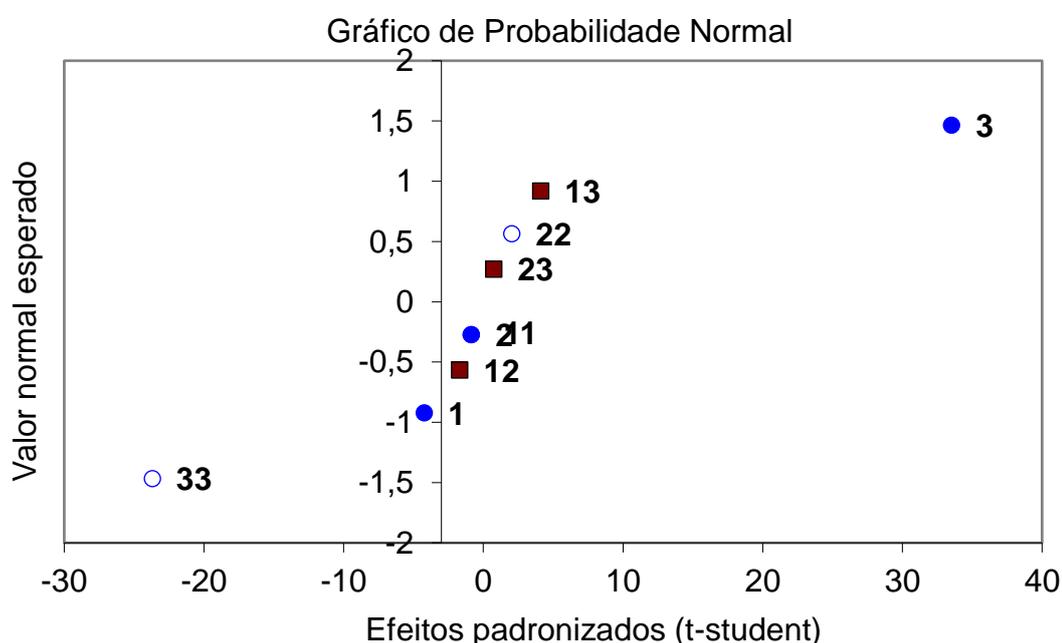
Tabela 13 – Análise de variância para regressão múltipla do planejamento DOE para o calcon

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc,	p
Regressão	4921	9	546,78	188,49 SG	4E-09
Resíduos	26,11	9	2,9008		
F. Ajuste	9,25	3	3,0833	1,0975	0,42
Erro Puro	16,86	6	2,8095		
Total	4947	18			
% variação explicada				99,472	
% máx. de variação explicável				99,659	

FV: fonte de variação; SQ: soma quadrática; nGL: número de graus de liberdade; MQ: média quadrática.

Posteriormente, obteve-se o gráfico de probabilidade normal (Figura 14), em função do valor normal esperado e dos efeitos padronizados (*t-Student*). É possível observar que o coeficiente da variável 3 (intensidade de luz) apresentou uma contribuição positiva, o que significa que a condição que apresenta melhor desempenho é aquela na qual se aplica maiores intensidades de luz na captura das imagens.

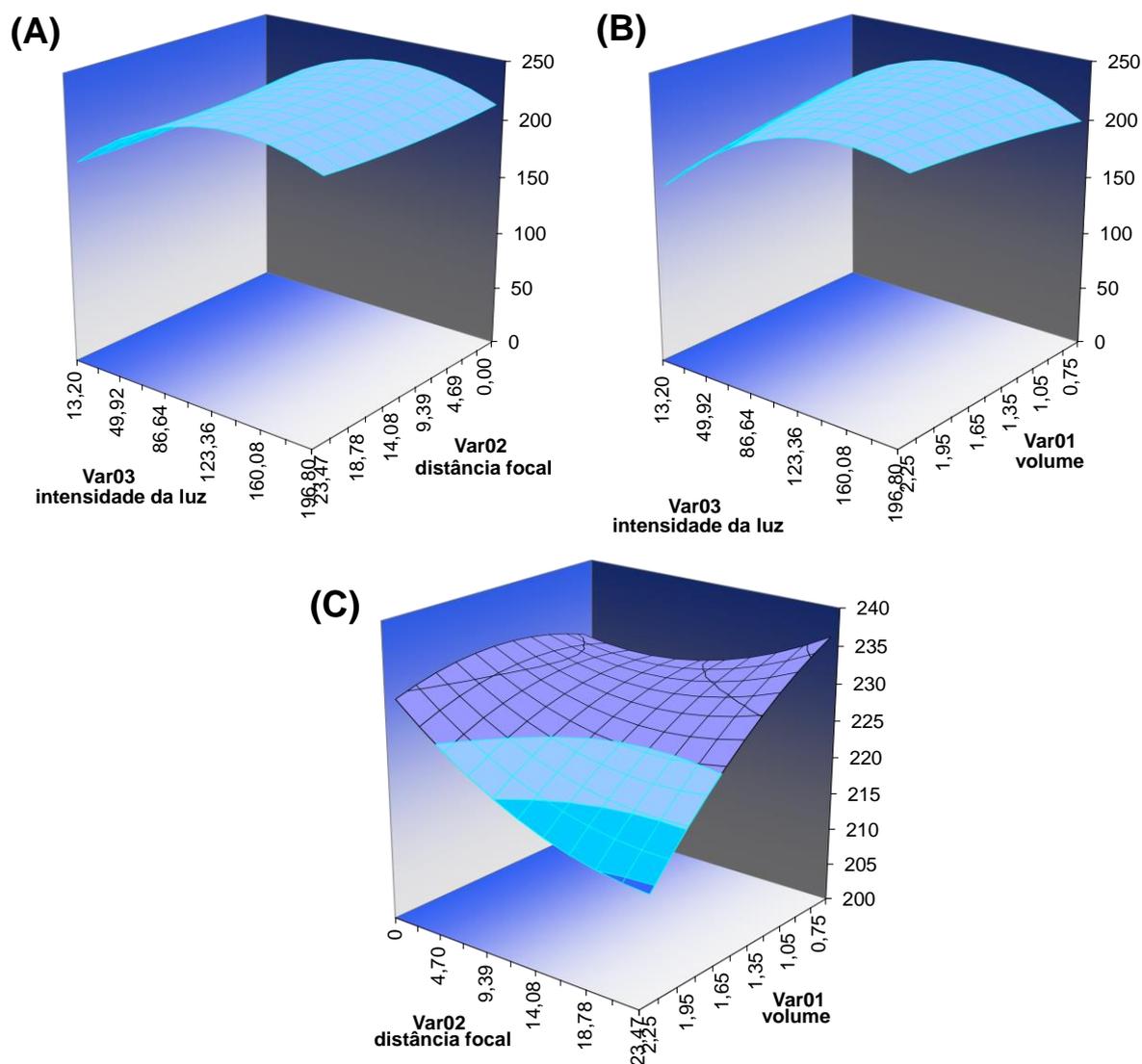
Figura 14 – Gráfico de probabilidade normal para os coeficientes obtidos para o calcon



Fonte: Autor (2022).

A próxima etapa foi avaliar as superfícies de resposta para encontrar a condição ótima de trabalho (Figura 15). Quando o volume total de solução foi fixado, as maiores respostas foram obtidas nas intensidades de luz intermediárias e menores distâncias focais na aquisição das imagens digitais (Figura 15A). Quando a distância focal foi fixada, as maiores respostas foram alcançadas nas intensidades de luz intermediárias e em relação ao volume, este não apresentou muita diferença, permanecendo constante (Figura 15B). Por fim, ao fixar a intensidade de luz, as maiores respostas foram obtidas no sentido das menores distâncias focais e novamente, praticamente foram constantes em relação ao volume.

Figura 15 – Superfícies de respostas das variáveis significativas por análise colorimétrica no PhotoMetrix utilizando solução de referência de cálcio (5 mg L^{-1}) com o calcon



Fonte: Autor (2022).

Por último, foram obtidos os resultados utilizando o *Solver* do Excel (Tabela 14). A condição ótima encontrada foi utilizando 2 mL como volume total de solução, 2 mm de distância focal da câmera e 180 lx de intensidade de luz. Depois disso, todos os outros experimentos foram realizados nessas condições de volume, distância focal e intensidade da luz.

Tabela 14 – Valores reais e codificados utilizados para a obtenção da condição ótima de trabalho empregando o Solver para o calcon

	Condição ótima		Planejamento		
	Valor codificado	Valor real	-1	0	1
Var 1	1	2	1	1,5	2
Var 2	-1	2	2	11	20
Var 3	0,596	150	30	105	180

Var 1 - Volume total de solução (mL); Var 2 - Distância focal da câmera (mm) e Var 3 - Intensidade da luz (lux).

4.3.3 Otimização da região de interesse

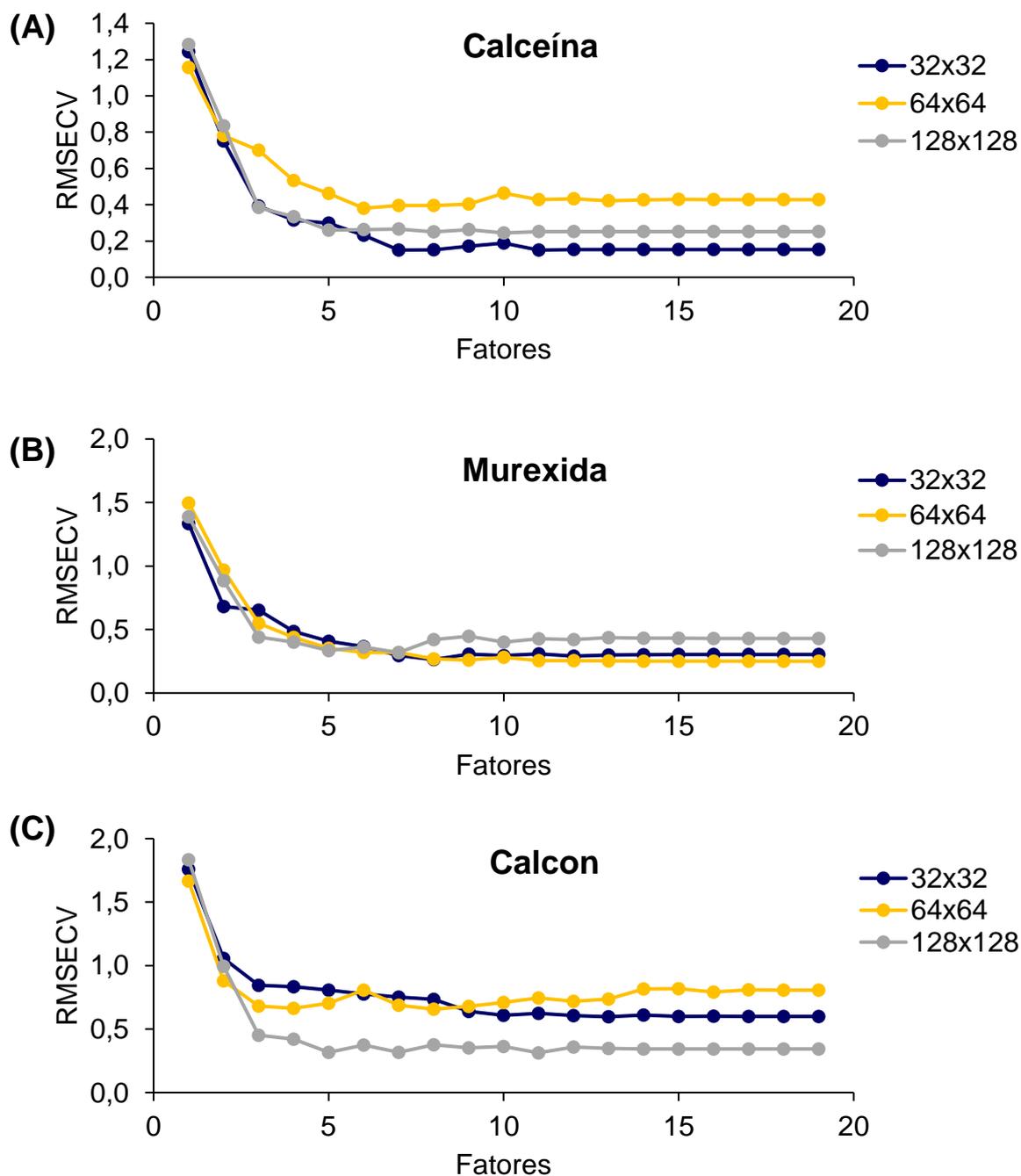
A região de interesse (ROI, do inglês *region of interest*) controla a área demarcada na imagem onde será realizado o seu processamento. Esse parâmetro pode ser selecionado diretamente no aplicativo PhotoMetrix. Dentre as regiões de interesse disponíveis no app, foram escolhidas para os experimentos, as regiões 32x32, 64x64 e 128x128. Os resultados foram avaliados em função dos valores de RMSECV obtidos a partir da curva de calibração preparada para a captura das imagens digitais e considerando o número de fatores empregado na construção dos modelos PLS.

Em um modelo de calibração multivariada é muito importante estabelecer o número de fatores a ser utilizado no modelo. Para isso, geralmente é utilizada a validação cruzada para a escolha do número de fatores, com base na avaliação da extensão dos erros de previsão para o modelo de calibração. Dessa forma, a escolha do número de fatores é em função do menor RMSECV, desde que não seja introduzido ruído, uma vez que o ruído torna o modelo menos robusto (FERREIRA et al., 1999). A Figura 16 representa os resultados do RMSECV e do número de fatores obtidos para os modelos de calibração utilizando PLS no aplicativo PhotoMetrix e ainda, o comportamento da região de interesse utilizada para a captura das imagens, para os complexantes calceína (Figura 16A), murexida (Figura 16B) e calcon (Figura 16C).

É possível observar que 5 fatores são suficientes para representar os modelos gerados para a calceína, murexida e o calcon. Verifica-se para a calceína, que as regiões 32x32 e 128x128 não apresentaram diferença significativa nos valores de

RMSECV. Para a murexida os valores de RMSECV não apresentaram diferença significativa para as ROIs avaliadas. Contudo, para o calcon, o menor valor de RMSECV foi obtido utilizando a região 128x128.

Figura 16 – Valores de RMSECV em função do número de fatores do modelo PLS obtidos para a curva de calibração, utilizando soluções de referência de cálcio 1 a 10 mg L⁻¹. Em destaque as três regiões de interesse avaliadas

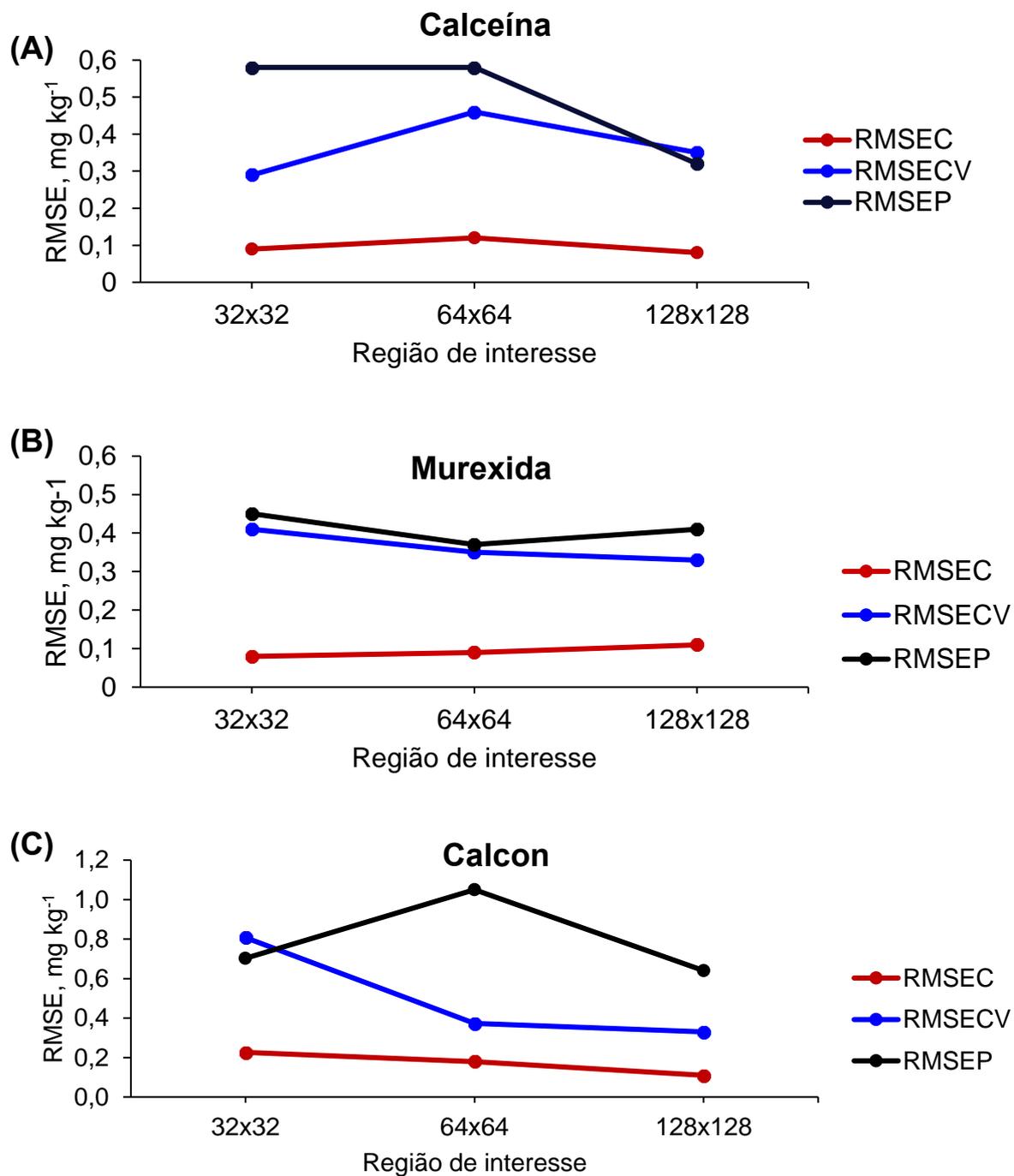


Fonte: Autor (2022).

Sendo assim, a próxima etapa foi avaliar os resultados em função dos valores de RMSEP (Figura 17). Vale destacar, que para a obtenção do erro de previsão nessa etapa, foram utilizadas soluções de referência de cálcio que não faziam parte da curva de calibração e as amostras de petróleo só foram analisadas pelo PhotoMetrix após essas otimizações.

Para a calceína (Figura 17A), foi visto que não havia grandes diferenças entre as regiões 32x32 e 128x128 em função do RMSECV, no entanto, a região 128x128 apresentou o menor valor de RMSEP e foi selecionada para os experimentos futuros. A murexida (Figura 17B) não tinha apresentado diferenças significativas nas três regiões avaliadas em função do RMSECV, porém, em relação ao RMSEP, a região 64x64 foi quem apresentou o menor erro de previsão, sendo escolhida para os experimentos posteriores. Para o calcon (Figura 17C) a região 128x128 foi quem apresentou o menor valor de RMSEP, o que já tinha sido observado para o valor de RMSECV, sendo a região empregada para todos os experimentos seguintes.

Figura 17 – Valores de RMSEC, RMSECV e RMSEP em função das regiões de interesse avaliadas no modelo PLS obtidos para a curva de calibração, utilizando soluções de referência de cálcio 1 a 10 mg L⁻¹ e 5 fatores



Fonte: Autor (2022).

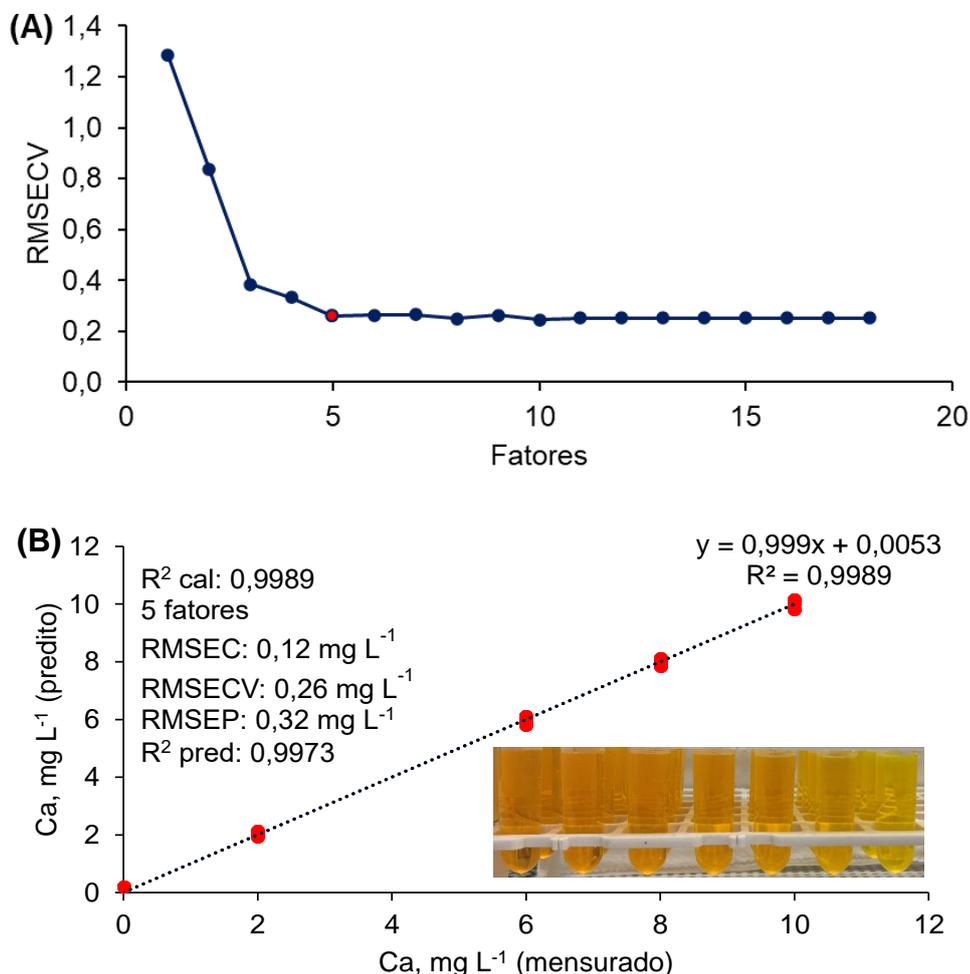
4.3.4 Determinação de cálcio nas amostras de petróleo pela colorimetria com imagens digitais no PhotoMetrix

Após as otimizações acima citadas, procedeu-se a determinação de Ca nas amostras de petróleo pela análise colorimétrica utilizando imagens digitais no aplicativo PhotoMetrix PRO. Os modelos de calibração multivariada foram construídos utilizando o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) para cada um dos complexantes.

As curvas de calibração (1 a 10 mg L⁻¹) foram obtidas pelo método de regressão PLS diretamente no aplicativo PhotoMetrix. O padrão de 10 mg L⁻¹ foi retirado das curvas de calibração construídas utilizando a murexida e o calcon permitindo a melhora nos coeficientes de determinação. Os resultados da curva de calibração em que foi utilizado a calceína como complexante estão apresentados na Figura 18, os quais foram avaliados em termos do número de fatores, linearidade da curva de calibração, RMSEC, RMSECV e RMSEP. Foram necessários cinco fatores para a adequada explicação do modelo e estabilização do RMSECV, como pode ser visto no ponto destacado em vermelho na Figura 18A. Assim, o modelo de calibração obtido apresentou R² superior a 0,99 (Figura 18B). Os valores de RMSEC, RMSECV e RMSEP foram de 0,12, 0,26 e 0,32 mg L⁻¹, respectivamente. Para avaliar a capacidade preditiva do modelo (RMSEP), foram preparados dois padrões (solução de referência de cálcio) que não estavam presentes na curva de calibração (3 e 7 mg L⁻¹).

Um ponto importante a ser destacado é que tanto as curvas de calibração como os complexantes empregados, eram preparados diariamente em função da instabilidade da solução contendo os complexantes.

Figura 18 – Parâmetros da curva de calibração pelo modelo PLS utilizando a calceína. Condições: 100 μL de solução de referência de cálcio, 130 μL de NaOH 0,5 mol L^{-1} (pH 12), 150 μL de calceína (0,120 mmol L^{-1}) e o restante avolumado a 2 mL (volume total de solução), 30 lux de intensidade de luz, 20 mm de distância focal da câmera, 128x128 pixels (n = 4)

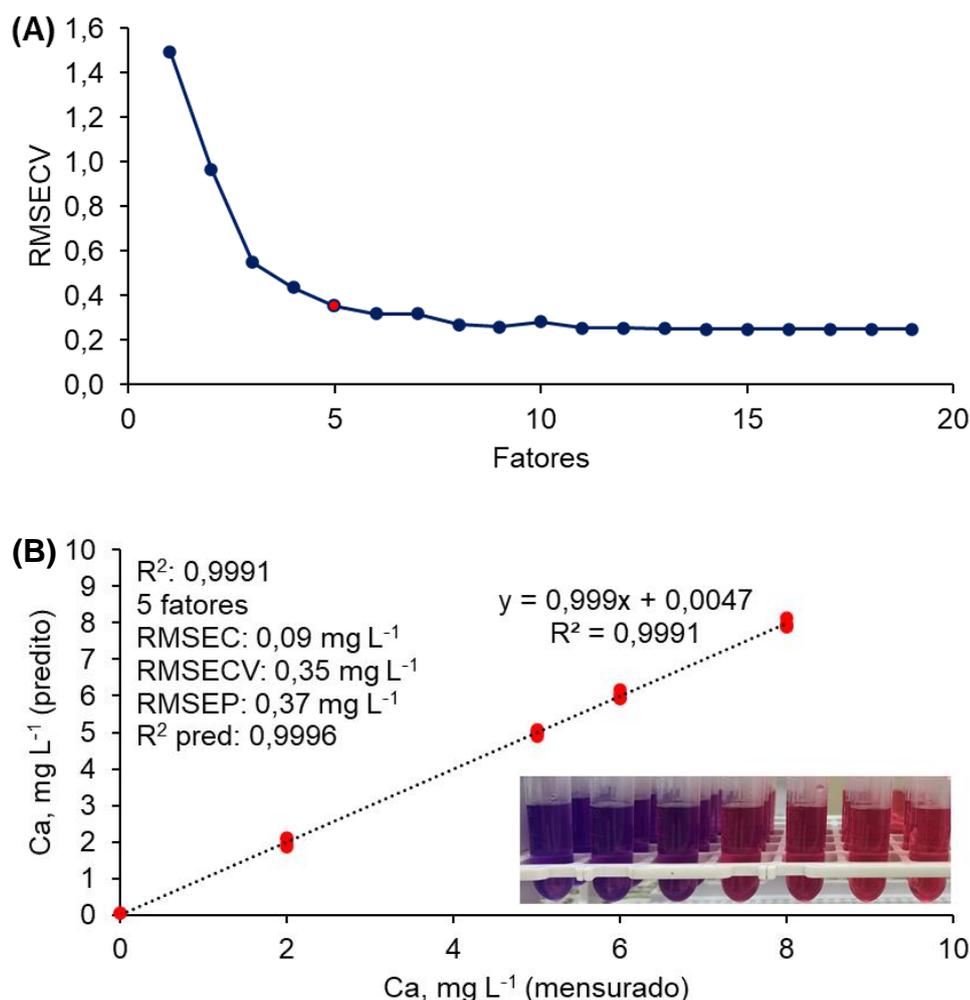


Fonte: Autor (2022).

Os resultados da curva de calibração por PLS em que foi utilizado a murexida como complexante estão apresentados na Figura 19. Verifica-se que foram necessários cinco fatores para a adequada explicação do modelo e estabilização do RMSECV, como pode ser visto no ponto destacado em vermelho na Figura 19A. Com isso, o modelo de calibração obtido apresentou R^2 de calibração e R^2 de predição superior a 0,99, RMSEC de 0,09 mg L^{-1} , RMSECV de 0,35 mg L^{-1} e RMSEP de 0,37 mg L^{-1} (utilizando padrões de referência de 3 e 7 mg L^{-1} como amostra) (Figura 19B). Vale salientar que pelo planejamento de experimentos DOE a condição ótima de volume total de solução foi de 1,5 mL, dessa forma, como as soluções da curva foram

preparadas num volume total de 2 mL, 500 μL de cada solução eram descartados antes de proceder a captura das imagens digitais.

Figura 19 – Parâmetros da curva de calibração pelo modelo PLS utilizando a murexida. Condições: 100 μL de solução de referência de cálcio, 130 μL de NaOH 0,5 mol L^{-1} (pH 12), 99 μL de murexida (0,174 mmol L^{-1}) e o restante avolumado a 2 mL (volume total de solução), 180 lux de intensidade de luz, 11 mm de distância focal da câmera, 64x64 pixels (n = 4)

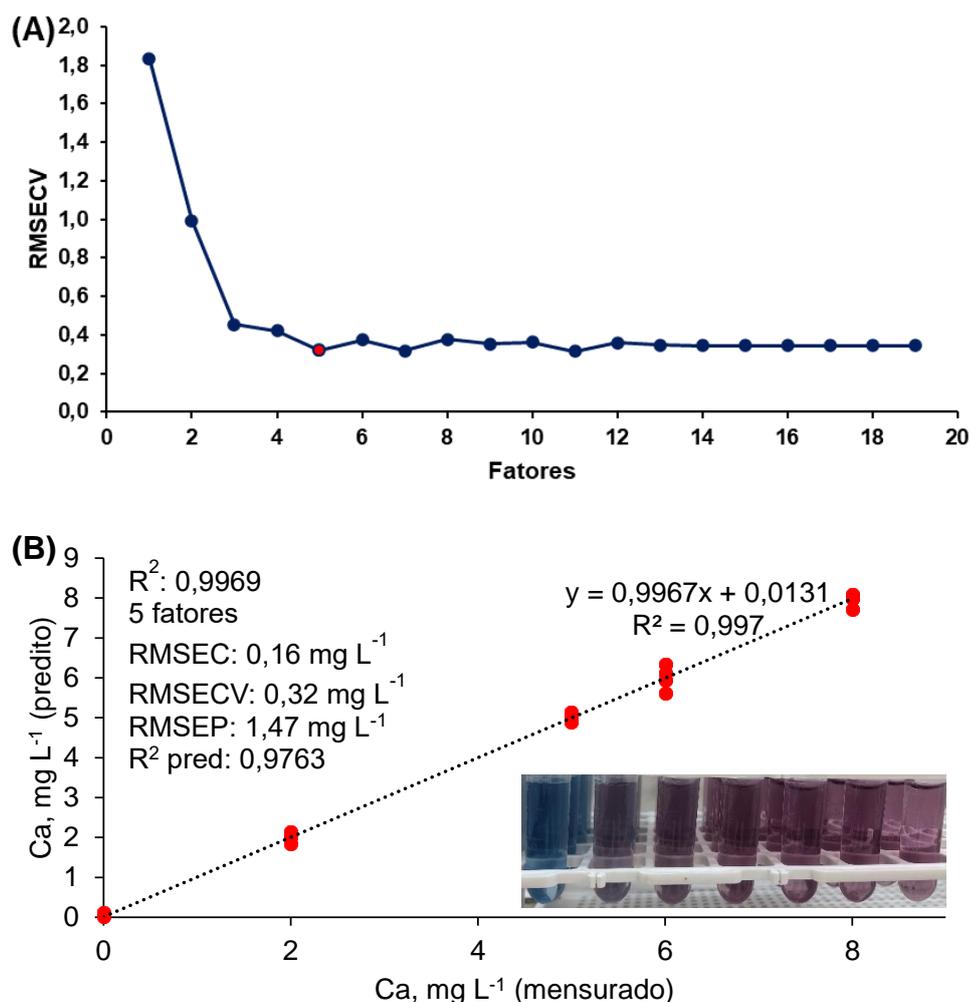


Fonte: Autor (2022).

A Figura 20 apresenta os resultados da curva de calibração por PLS utilizando o calcon como complexante. Observa-se, novamente, que foram necessários cinco fatores para a adequada explicação do modelo e estabilização do RMSECV, como pode ser visto no ponto destacado em vermelho na Figura 20A. Nessa condição, o modelo de calibração obtido apresentou R^2 de calibração superior a 0,99 e R^2 de predição de 0,976, RMSEC de 0,16 mg L^{-1} , RMSECV de 0,32 mg L^{-1} e RMSEP de

1,47 mg L⁻¹ (utilizando padrões de referência de 3 e 7 mg L⁻¹ como amostra) (Figura 20B).

Figura 20 – Parâmetros da curva de calibração pelo modelo PLS utilizando o calcon. Condições: 100 µL de solução de referência de cálcio, 130 µL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ (pH 12), 66,6 µL de calcon (0,080 mmol L⁻¹) e o restante avolumado a 2 mL (volume total de solução), 150 lux de intensidade de luz, 2 mm de distância focal da câmera, 128x128 pixels (n = 4)



Fonte: Autor (2022)

Posteriormente, 5 amostras de petróleo (n = 3) foram selecionadas para avaliar a capacidade preditiva do modelo PLS obtido, em uma faixa de 5 até aproximadamente 900 mg kg⁻¹. As amostras foram previamente filtradas e solubilizadas de acordo com a norma ASTM D4807, com o intuito de fazer o isolamento das espécies salinas nas membranas de 0,45 µm. Os extratos aquosos da solubilização das espécies salinas retidas na membrana de 0,45 µm foram utilizados para a determinação de cálcio utilizando a análise colorimétrica com imagens digitais

pelo PhotoMetrix. Os resultados da concentração de cálcio obtidos pelo método proposto estão mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 – Concentração de cálcio nas amostras de petróleo pelo método de solubilização (ASTM D4807) e determinação por PhotoMetrix. Por comparação, os resultados obtidos pela MAWD-SRC e solubilização com determinação no ICP OES. Resultados expressos em mg kg^{-1} , média \pm desvio padrão, $n = 3$

Amostra	Photometrix				
	Calceína	Murexida	Calcon	MAWD-SRC	Solubilização
1	846 \pm 38	850 \pm 36	915 \pm 83	879 \pm 43	834 \pm 39
2	113 \pm 10	98 \pm 9	101 \pm 10	118 \pm 10	103 \pm 9
3	475 \pm 28	390 \pm 25	422 \pm 12	400 \pm 39	379 \pm 38
4	649 \pm 64	616 \pm 37	695 \pm 23	639 \pm 58	680 \pm 85
5	5,8 \pm 0,4	4,8 \pm 0,3	5,5 \pm 0,6	5,4 \pm 0,5	5,0 \pm 0,1

Fonte: Autor (2022).

Para os três complexantes empregados, utilizando o teste ANOVA com um intervalo de 95% de confiança, não foram observadas diferenças significativas nos resultados obtidos pelo método proposto (análise colorimétrica com imagens digitais no PhotoMetrix), em comparação com os resultados dos métodos de referência utilizados (MAWD-SRC e solubilização).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados após realizar a filtração de uma membrana somente com tolueno e solubilização a 25 mL de água ultrapura. Para a calceína foram obtidos 0,62 e 2,05 mg kg^{-1} de LD e LQ, respectivamente. Murexida e calcon apresentaram LD e LQ de 0,12 e 0,40 mg kg^{-1} e 0,15 e 0,51 mg kg^{-1} , respectivamente.

4.3.5 Avaliação da interferência do magnésio

A interferência da concentração de magnésio na formação dos complexos com a calceína, murexida e calcon foi avaliada utilizando soluções de referência com concentrações de cálcio constante de 5 mg L^{-1} e a concentração de magnésio variando de 0,5 a 10 mg L^{-1} .

De acordo com a literatura, deve-se trabalhar em pH em torno de 12 com os complexantes calceína, murexida e calcon, de forma a minimizar possíveis

interferência provocadas pelo magnésio. Nesse pH, possivelmente o magnésio precipita na forma de hidróxido, impedindo que ele reaja com os complexantes (NTAILIANAS et al., 1964; VOGEL et al., 1989).

Os resultados das interferências estão demonstrados na Tabela 16. A avaliação da existência da interferência do Mg foi feita a partir do cálculo da incerteza expandida utilizando o desvio padrão de 10 medidas de uma solução contendo somente 5 mg L⁻¹ de Ca na presença dos complexantes calceína, murexida e calcon e os valores de t. A partir disto obtiveram-se os intervalos de aceitação para as medidas sem a interferência de magnésio que foram de 5,0 ± 0,4, 5,0 ± 0,6 e 5,00 ± 0,6 mg L⁻¹ de Ca, para a calceína, murexida e calcon, respectivamente. Desta forma, observa-se que concentrações iguais ou superiores a 3 e 5 mg L⁻¹, promovem interferência na determinação de Ca quando utilizados os complexantes calceína e calcon. Por outro lado, não foi verificada interferência até a concentração de 10 mg L⁻¹ para o complexante murexida. Para as amostras analisadas, considerando a massa de 10 g de petróleo e membrana solubilizada em 10 g de água, e as diluições necessárias dos extratos para a determinação de Ca, a máxima concentração de Mg observada é de 2,6 mg L⁻¹ (Amostra 5). Assim, não se observa interferência de Mg nas determinações de cálcio utilizando a calceína, murexida e calcon na colorimetria por imagem digital com o Photometrix.

Tabela 16 – Resultados obtidos para a concentração de cálcio na presença de diferentes concentrações de magnésio pelo PhotoMetrix (n = 3)

Ca, mg L ⁻¹	Mg, mg L ⁻¹	Calceína	Murexida	Calcon
5	0	5,1 ± 0,2	5,0 ± 0,2	4,9 ± 0,2
5	0,5	5,1 ± 0,3	5,0 ± 0,1	4,9 ± 0,1
5	1	5,2 ± 0,3	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,2
5	2	5,2 ± 0,2	5,3 ± 0,1	5,0 ± 0,3
5	3	5,4 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,3
5	4	5,6 ± 0,2	4,8 ± 0,1	4,7 ± 0,1
5	5	5,7 ± 0,4	5,0 ± 0,10	5,7 ± 1,0
5	10	5,9 ± 0,4	5,3 ± 0,4	5,70 ± 0,8
0	5	2,64 ± 1,03	< 0,40	< 0,51

Fonte: Autor (2022).

4.3.6 Estabilidade dos complexantes

A estabilidade dos complexantes calceína, murexida e calcon foi avaliada, de forma visual, a partir do tempo necessário para a mudança de coloração nas soluções, após a adição de cada complexante. Lembrando que a captura das imagens sempre foi realizada 30 s após a adição dos complexantes, para evitar esse tipo de interferência.

Nesse sentido, a calceína, aparentemente, não apresentou nenhuma instabilidade em relação a cor formada do complexo, permanecendo amarela-esverdeada durante um longo período, superior a 4 h. A murexida apresentou estabilidade em torno de 30 min, sendo que, a sua cor rosa-violeta adquiriu uma coloração mais clara com o passar do tempo. Já o calcon, foi o complexante mais instável utilizado, sendo estável em torno de 15 min, até perder quase que completamente a sua coloração.

5 CONCLUSÃO

O método proposto permitiu a determinação de cálcio em emulsões de petróleo utilizando a colorimetria com imagens digitais no aplicativo PhotoMetrix. A extração dos sais de petróleo utilizando a norma ASTM D4807 mostrou-se adequada para a determinação de cálcio, visto que foi possível fazer o isolamento das espécies salinas na membrana de 0,45 μm e posterior determinação de cálcio pelo método proposto. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os valores da concentração de cálcio obtidos pela MAWD-SRC e determinação por ICP OES e o método proposto.

A utilização da calceína, murexida e calcon, como agentes complexantes, mostrou-se viável para a formação de complexos coloridos e estáveis permitindo a determinação de cálcio em petróleo utilizando a colorimetria por imagens digitais e PhotoMetrix, após a otimização de variáveis importantes, tais como pH, concentração dos complexantes, volume total de solução, distância focal da câmera e intensidade de luz.

Não se observou interferência significativa de magnésio na determinação de Ca nas amostras de petróleo utilizando o método proposto com soluções contendo concentrações de magnésio inferiores a 3 mg L^{-1} . A murexida mostrou-se como o único agente complexante para cálcio, para a qual não se observou interferência de magnésio em todas as concentrações investigadas (até 10 mg L^{-1} de Mg). Os limites de quantificação foram inferiores a 2,0 mg kg^{-1} , sendo que a murexida apresentou o menor limite de quantificação, de 0,40 mg kg^{-1} , para extratos obtidos mediante a filtração de 10 g de petróleo e solubilização das espécies salinas retidas na membrana com 10 g de água. Estes limites de quantificação são apropriados e atendem às exigências das refinarias de petróleo que necessitam limites de quantificação da ordem de 5 mg kg^{-1} , para minimizar os efeitos deletérios de corrosão e entupimento das tubulações promovidas pelos sais de cálcio. Em termos de precisão, a colorimetria com imagens digitais no aplicativo PhotoMetrix atende às exigências da indústria do petróleo com RSDs inferiores a 10% que são semelhantes àqueles propostos pelas normas oficiais.

O método proposto apresentou algumas vantagens em relação aos métodos convencionais, tais como possibilidade de miniaturização do sistema, facilidade de operação, baixo custo e rapidez. Assim, o método proposto é considerado adequado

para ser implementando nas rotinas de laboratório da indústria petrolífera para o controle de qualidade de amostras de petróleo, no que diz respeito à determinação de Ca.

REFERÊNCIAS

ABDULREDHA, Murtada Mohammed; ASLINA, Hussain Siti; LUQMAN, Chuah Abdullah. Overview on petroleum emulsions, formation, influence and demulsification treatment techniques. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 3403-3428, Jan. 2020.

ABDOLMALEKY, Mona et al. Red-Green-Blue multi-channel quantum representation of digital images. **Optik**, v. 128, p. 121-132, Jan. 2017.

American Society for Testing Materials D5056 - Standard Test Method for Trace Metals in Petroleum Coke by Atomic Absorption, 2017.

American Society for Testing Materials D3605 - Standard Test Method for Trace Metals in Gas Turbine Fuels by Atomic Absorption and Flame Emission Spectroscopy, 2017.

American Society for Testing Materials D4628 - Standard Test Method for Analysis of Barium, Calcium, Magnesium, and Zinc in Unused Lubricating Oils by Atomic Absorption Spectrometry, 2017.

American Society for Testing Materials D7876 - Standard Practice for Practice for Sample Decomposition Using Microwave Heating (With or Without Prior Ashing) for Atomic Spectroscopic Elemental Determination in Petroleum Products and Lubricants, 2018.

ASTM. Standard Terminology Relating to Petroleum Products, Liquid Fuels, and Lubricants (D 4175-18): American National Standard. 2018.

American Society for Testing Materials D4951 - Standard Test Method for Determination of Additive Elements in Lubricating Oils by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, 2019.

American Society for Testing Materials D4807 - Standard Test Method for Sediment in Crude Oil by Membrane Filtration, 2020.

American Society for Testing Materials D4175 - Standard Terminology Relating to Petroleum Products, Liquid Fuels, and Lubricants, 2021.

American Society for Testing Materials D7111 - Standard Test Method for Determination of Trace Elements in Middle Distillate Fuels by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP OES), 2021.

ALBIZU, Gorka et al. Analytical control of nickel coating baths by digital image analysis. **Microchemical Journal**, v. 154, p. 104600, May 2020.

ALVES, Caiuã Araújo et al. Influence of asphaltenes and resins on water/model oil interfacial tension and emulsion behavior: Comparison of extracted fractions from

crude oils with different asphaltene stability. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 208, p. 109268, Jan. 2022.

ARRUDA, Marco Aurélio Zezzi. **Trends in Sample Preparation**. Nova York: Nova Science Publishers, 2007.

BACCAN, Nivaldo et al. **Química analítica quantitativa elementar**. Editora Blucher, 2001.

BALLESTEROS, Joel I.; CALEJA-BALLESTEROS, Harriet Jane R.; VILLENA, Marte C. Digital image-based method for iron detection using green tea (*Camellia sinensis*) extract as natural colorimetric reagent. **Microchemical Journal**, v. 160, p. 105652, Jan. 2021.

BÖCK, Fernanda C. et al. PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones. **Journal of chemometrics**, v. 34, n. 12, p. e3251, June 2020.

BÖCK, Fernanda C. et al. Low cost method for copper determination in sugarcane spirits using Photometrix UVC® embedded in smartphone. **Food Chemistry**, v. 367, p. 130669, Jan. 2022.

BREITKREITZ, Márcia Cristina; SOUZA, André Marcelo de; POPPI, Ronei Jesus. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014.

BRERETON, Richard G. **Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry**. Analyst, v. 125, p. 2125-2154, 2000.

CALEB, Jude; ALSHANA, Usama; ERTAŞ, Nusret. Smartphone digital image colorimetry combined with solidification of floating organic drop-dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of iodate in table salt. **Food Chemistry**, v. 336, p. 127708, Jan. 2021.

COSTA, Adilson Ben da et al. PhotoMetrix UVC: A new smartphone-based device for digital image colorimetric analysis using PLS regression, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 675-683, Mar. 2021.

DEAN, John R. **Practical inductively coupled plasma spectrometry**. John Wiley & Sons, 2005.

DE JESUS, Jemmyson Romário et al. Applications of smartphones in analysis: Challenges and solutions. In: **Smartphone-Based Detection Devices**. Elsevier, p. 199-248, 2021.

ENDERS, Michele S. P. et al. Characterization of inorganic solids present in brazilian crude oil emulsions using scanning electron microscopy (SEM) with energy-dispersive X-ray spectrometry (EDS): evaluation of the effect of solvents. **Energy & Fuels**, v. 34, n. 2, p. 1309-1316, Jan. 2020.

FAN, Yajun et al. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171, p. 108829, Feb. 2021.

FARAH, M. A. **Petróleo e seus derivados: definição, constituição, aplicação, especificações, características de qualidade**, LTC, 1st ed., 2012.

FERNANDES, Gabriel Martins et al. Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1135, p. 187-203, Oct. 2020.

FERNANDES, Gabriel M. et al. based analytical device for colorimetric detection of Cu^{2+} in Brazilian sugarcane spirits by digital image treatment. **Microchemical Journal**, v. 159, p. 105463, Dec. 2020.

FERREIRA, Márcia Miguel Castro et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, set. 1999.

FERREIRA, Márcia Miguel Castro. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Ed. da UNICAMP, 2015.

FLORES, E. M. M. **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination**. Amsterdam: Elsevier, 2014.

GAUTO, Marcelo Antunes et al. **Petróleo e Gás: princípios de exploração, produção e refino**. Bookman Editora, 2016.

GEMPERLINE, P. **Practical guide to chemometrics**. CRC press, 2006.

GLUYAS, Jon G.; SWARBRICK, Richard E. **Petroleum geoscience**. Wiley-Blackwell, 2003.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Digital Image Processing**. New Jersey: Pearson Education, 2008.

HARRIS, Daniel C. **Quantitative chemical analysis**. Macmillan, 2010.

HELPER, Gilson Augusto et al. PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 328-335, Feb. 2017.

HELPER, Gilson Augusto et al. A new tool for interpretation of thermal stability of raw milk by means of the alizarol test using a PLS model on a mobile device. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 2022-2028, Feb. 2018.

HENN, Alessandra S. et al. Development of methods for Mg, Sr and Pb isotopic analysis of crude oil by MC-ICP-MS: addressing the challenges of sample decomposition. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 36, n. 7, p. 1478-1488, May 2021.

HILL, Steve J. (Ed.). **Inductively coupled plasma spectrometry and its applications**. John Wiley & Sons, 2008.

HOLKEM, Alice P. et al. A green and high throughput method for salt determination in crude oil using digital image-based colorimetry in a portable device. **Fuel**, v. 289, p. 119941, Apr. 2021.

HUANG, Ken G.; ZHU, Yaya A. Characterization of Nonmetal Chloride Salts and Their Removal from Crude Oil. In: **Chemistry Solutions to Challenges in the Petroleum Industry**. American Chemical Society, p. 311-326, June 2019.

JAIN, Rajeev et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with digital image colorimetry for paracetamol analysis. **Microchemical Journal**, v. 162, p. 105870, Mar. 2021.

JING, Xu et al. Digital image colorimetry detection of carbaryl in food samples based on liquid phase microextraction coupled with a microfluidic thread-based analytical device. **Food chemistry**, v. 337, p. 127971, Feb. 2021.

JONES, David SJ; PUJADÓ, Peter P. **Handbook of Petroleum Processing**. Springer Science & Business Media, 2006.

KANG, Wanli et al. Stability mechanism of W/O crude oil emulsion stabilized by polymer and surfactant. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, v. 384, n. 1-3, p. 555-560, July 2011.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. São Paulo: Editsbq, 2016.

KUMAR, N. et al. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, v. 123, p. 186-199, June 2014.

LINDON, John C.; TRANTER, George E.; KOPPENAAL, David. **Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry**. Academic Press, 2016.

LOPEZ-MOLINERO, Angel et al. Feasibility of digital image colorimetry—application for water calcium hardness determination. **Talanta**, v. 103, p. 236-244, Jan. 2013.

MARQUES, O. F.; NETO, H. V. **Processamento digital de imagens**, Brasport, Rio de Janeiro, 1st ed., 1999.

MELLO, Paola A. et al. Sample preparation methods for subsequent determination of metals and non-metals in crude oil – A review. **Analytica chimica acta**, v. 746, p. 15-36, Oct. 2012.

MORIGAKII, Milton K. et al. Salinidade em petróleo bruto: otimização de metodologia e proposta de um novo método para extração de sais em petróleo. **Química Nova**, v. 33, p. 607- 612, fev. 2010.

NTAILIANAS, H. A.; WHITNEY, R. McL. Calcein as an indicator for the determination of total calcium and magnesium and calcium alone in the same aliquot of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 47, n. 1, p. 19-27, Jan. 1964.

PAPPIS, Cristiane et al. Point-of-use determination of fluoride and phosphorus in water through a smartphone using the PhotoMetrix® App, **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 6, p. 58-66, 2019.

PENG, Bo et al. A smartphone-based colorimetry after dispersive liquid–liquid microextraction for rapid quantification of calcium in water and food samples. **Microchemical Journal**, v. 149, p. 104072, Sept. 2019.

PESSOA, Helen Moura et al. Determination of Ca, Mg, Sr and Ba in crude oil samples by atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, n. 9, p. 1568-1573, June 2012.

POIRIER, Laura et al. Application of ICP-MS and ICP-OES on the determination of nickel, vanadium, iron, and calcium in petroleum crude oils via direct dilution. **Energy & Fuels**, v. 30, n. 5, p. 3783-3790, Apr. 2016.

PORTO, Icaro S. A. et al. Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 149, p. 104031, Sept. 2019.

RIAZI, M. R. **Characterization and properties of petroleum fractions**. ASTM international, 2005.

SOARES, Samara; ROCHA, Fabio R. P. Spot test for determination of uric acid in saliva by smartphone-based digital images: A new proposal for detecting kidney dysfunctions. **Microchemical Journal**, v. 162, p. 105862, Mar. 2021.

SOARES, Samara et al. Single-phase determination of calcium and magnesium in biodiesel using smartphone-based digital images. **Fuel**, v. 307, p. 121837, Jan. 2022.

SCHLESNER, Sandra K. et al. Smartphone-Based Miniaturized, Green and Rapid Methods for the Colorimetric Determination of Sugar in Soft Drinks. **Green Analytical Chemistry**, v. 1, p. 100003, Apr. 2022.

SEEGER, Tassia S. et al. Magnesium and calcium determination in desalted crude oil by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Fuel**, v. 236, p. 1483-1488, Jan. 2019.

SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentals of analytical chemistry**, Cengage Learning, Michigan, 9th ed., 2013.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. **Principles of instrumental analysis**. Cengage learning, 2017.

SPEIGHT, J. G. **Handbook of petroleum analysis**. New York: 2001.

SPEIGHT, J. G. **The chemistry and technology of petroleum**, CRC Press, Florida, 2006.

TEÓFILO, Reinaldo F.; FERREIRA, Márcia. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, pág. 338-350, dez. 2006.

UMAR, Abubakar Abubakar et al. A review of petroleum emulsions and recent progress on water-in-crude oil emulsions stabilized by natural surfactants and solids. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 165, p. 673-690, June 2018.

VINZI, V. Esposito et al. **Handbook of partial least squares**. Berlin: Springer, 2010.

VOGEL, Arthur Israel et al. **Textbook of quantitative chemical analysis**. 5^a edição. John Wiley & Sons Inc, 1989.

WANG, Hai-Peng et al. Recent advances of chemometric calibration methods in modern spectroscopy: Algorithms, strategy, and related issues. **Trends in Analytical Chemistry**, p. 116648, Apr. 2022.

WELZ, Bernhard; SPERLING, Michael. **Atomic Absorption Spectroscopy**. Wiley-VCH, 3th ed., Germany, 1999.

WONG, S. F.; LIM, J. S.; DOL, S. S. Crude oil emulsion: A review on formation, classification and stability of water-in-oil emulsions. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 135, p. 498-504, Nov. 2015.

YONGUEP, Edith et al. Formation, stabilization and chemical demulsification of crude oil-in-water emulsions: A review. **Petroleum Research**, Feb. 2022.