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

Dissertação de Mestrado

Um método quimiluminescente baseado em imagens digitais para determinação de Cr (VI) em águas usando um sistema fluxo batelada

José Berivaldo Sales Almeida

João Pessoa/PB - Brasil
Novembro/2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

Um método quimiluminescente baseado em imagens digitais para determinação de Cr (VI) em águas usando um sistema fluxo batelada

José Berivaldo Sales Almeida*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva

*** Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

João Pessoa/PB - Brasil

Novembro/2012

A447u Almeida, José Berivaldo Sales.
Um método quimiluminescente baseado em imagens digitais para determinação de Cr (VI) em águas usando um sistema fluxo batelada / José Berivaldo Sales Almeida.-- João Pessoa, 2012.
81f. : il.
Orientador: Edvan Cirino da Silva
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
1. Química Analítica. 2. Quimiluminescência. 3. Imagem digital. 4. Analisador em fluxo-batelada. 5. Cr (VI) - águas.

UFPB/BC CDU: 543(043)

"Um Método Quimiluminescente Baseado em Imagens Digitais para Determinação de Cr(VI) em Águas Usando um Sistema Fluxo Batelada".

Dissertação de Mestrado de José Berivaldo Sales Almeida aprovada pela banca examinadora em 12 de novembro de 2012:

Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Sérgio Ricardo Bezerra dos Santos
Examinador

Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Examinador

Ao Deus Supremo, Senhor da Matemática Universal,
"Razão de tudo o que somos e fazemos"

Ao meu pai (*in memoriam*) e minha mãe,
Este trabalho eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus pela existência da Matemática Universal e por tudo que me consentiu realizar;

Aos meus pais, irmãs e familiares por ter sempre acreditado em mim e pela ajuda nos momentos que necessitei;

Ao professor Dr. Edvan Cirino da Silva, pelo acolhimento, paciência e orientação no desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores Márcio Coelho, Sérgio e Luciano Farias de Almeida por aceitar a participação na banca de pré-defesa, pelos ensinamentos, confiança, contribuições acadêmicas, científicas e sugestões;

Aos demais professores pela valiosa contribuição no meu processo de formação acadêmica;

Aos colegas Renato Allan, Stéfani Iury, Flaviano Leite, Patrizzia e Aline pela colaboração na parte experimental. Ao grande amigo Railton Andrade pela constante motivação. E aos demais colegas do LAQA pelo companheirismo, dicas e sugestões.

Aos amigos que sempre me motivaram.

Obrigado por fazerem parte de minha história!

SUMÁRIO

Lista de Figuras vii
Lista de Tabelas ix
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas x
Resumo xi
Abstract xii
Capítulo I 01
1. Caracterização do problema 02
1.1. Objetivos 03
1.1.1. Objetivo geral 03
1.1.2. Objetivos específicos 04
1.2. Princípios da Quimiluminescência 04
1.2.1. Aspectos históricos da Quimiluminescência 06
1.2.2. Classificação da quimiluminescência conforme o modo de ocorrência 08
1.2.3. O uso do luminol como reagente Quimiluminescente 09
1.3. Imagem Digital 11
1.3.1. Dispositivo de captura de imagem – Webcam 12
1.3.2. Cor e sistemas de cores 13
1.3.3. Sistemas de cor e o modelo RGB 14
1.3.4. Imagem digital em Química Analítica 17
1.4. Sistemas automáticos de análise 18
1.4.1. Analisador em fluxo segmentado (SFA) 19
1.4.2. Analisador por Injeção em Fluxo (FIA) 19
1.4.3. Analisador em Fluxo Monosegmentado (MSFA) 20
1.4.4. Analisador por Injeção Sequencial (SIA) 20
1.4.5. Analisador em Fluxo com Multicomutação (MFA) 21
1.4.6. Analisador em Fluxo-Batelada (FBA) 21
1.5. O Elemento Cromo: **Propriedades e Toxicidade** 23
1.5.1. Fontes de contaminação por cromo 25
1.5.2. Determinação de cromo por métodos quimiluminescentes 27
Capítulo II 28
2. EXPERIMENTAL 29

2.1. Reagentes, soluções e amostras 29
2.2. Equipamentos e Software 30
2.3. Sistema Quimiluminescente Fluxo-Batelada proposto 32
2.4. Estudo da vazão dos canais das válvulas solenóides utilizadas no Sistema Quimiluminescente Fluxo-Batelada 35
2.5. Determinação de cromo (VI) em amostras de águas naturais 36
2.5.1. Método quimiluminescente proposto 36
2.5.2. Método de referência 40
2.6. Avaliação do desempenho dos métodos 41
2.6.1. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) 43
2.6.2. Sensibilidade 43
2.6.3 Desvio padrão conjunto 44
2.6.4. Teste *t*-emparelhado baseado no teste de hipóteses 44
2.6.5. Teste *t*-emparelhado baseado no conceito de intervalo de confiança 45
Capítulo III 47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 48
3.1. Estudo da vazão dos canais das válvulas solenóides 48
3.2. Imagens adquiridas durante a geração de um sinal quimiluminescente 49
3.3. Obtenção da curva analítica baseada nos valores médios de R, G e B 51
3.4. Aplicação analítica do método proposto 56
Capítulo IV 59
4. CONCLUSÃO 60
4.1. Perspectivas e propostas futuras 60
Capítulo V 62
REFERÊNCIAS 63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Fórmula estrutural da molécula 1,2-dioxetanodiona.....07

Figura 1.2 – Esquema ilustrativo da quimiluminescência direta e indireta. 09

Figura 1.3 – Proposta mecanística apresentada por Albertin para quimiluminescência do luminol a partir de sua oxidação por peróxido de hidrogênio, catalisada por um metal de transição. 10

Figura 1.4 – Representação esquemática de uma Câmera Digital (WebCam). 12

Figura 1.5 – Esquema de cores do sistema RGB [Red-Green-Blue] mostrando a formação de cores secundárias (amarelo, ciano e magenta) e da cor branca ao centro. 15

Figura 1.6 – Espaço de cores do sistema RGB representado em um sistema de coordenadas cartesianas. O valor máximo para cada canal é 255. (fonte: Google imagens).....16

Figura 2.1 – Interface do programa de controle do Sistema Fluxo-Batelada Quimiluminescente Baseada em Imagens Digitais. 30

Figura 2.2 – Interface do software de obtenção dos valores de RGB. No centro (a) área selecionada de uma imagem, na região de interesse; (b) respectivos valores médios das componentes RGB da área selecionada.....31

Figura 2.3 – Ilustração tridimensional de uma câmara de mistura reacional.....32

Figura 2.4 – Bomba peristáltica utilizada para propulsão dos fluídos para a câmara de mistura.....33

Figura 2.5 – Fotografia de uma válvula solenóide de três vias.....33

Figura 2.6 – Diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009 (fonte: Andrade, 2012).....34

Figura 2.7 – Webcam usada para aquisição das imagens digitais.....34

Figura 2.8 – Fotografia do sistema DIB-CL-FBA. (a) câmara escura de alojamento da mistura reacional e agitador magnético; (b) bomba peristáltica; (c) conjunto de válvulas solenóides; (d) acionador de válvulas; (e) webcam.....35

Figura 2.9 – Espaço RGB ilustrando a posição do vetor v associado a uma imagem digital.....38

Figura 2.10 – Esquema ilustrativo do Sistema Fluxo-Batelada Quimiluminescente Baseada em Imagens Digitais proposto.....39

Figura 2.11 – Diagrama da sequência e tempo da injeção do sistema em fluxo.....40

Figura 3.1 – Estudo de vazão para os canais das válvulas solenóides utilizadas no sistema quimiluminescente em fluxo-batelada.. 48

Figura 3.2 – Progresso da quimiluminescência (QL) para a solução de Cr (IV) com 100 µg L^{-1}. Imagens digitais capturadas ao longo do tempo 49

Figura 3.3 – Progresso da quimiluminescência (QL) para a solução de Cr (IV) com 100 µg L^{-1}. Variação temporal do sinal QL em termos dos valores individuais de R, G e B correspondentes às imagens capturadas. 50

Figura 3.4 – Gráficos dos valores médios individuais das componentes R, G e B das imagens digitais capturadas para as soluções de calibração de Cr (VI). 51

Figura 3.5 – Curva analítica para a determinação de Cr (VI) pelo método quimiluminescente proposto.....52

Figura 3.6 – Curva analítica para a determinação de Cr (VI) pelo método de referência. 52

Figura 3.7 – Gráficos dos resíduos deixados pelos modelos dos métodos proposto de referência. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Limites especificados para cromo total, Cr (III) e Cr (VI) segundo legislação nacional e internacional. 26

Tabela 2.1 – Equações para ANOVA aplicada ao modelo obtido pelo método dos mínimos quadrados. 41

Tabela 3.1 – Equações utilizadas para calcular as vazões dos canais das válvulas solenóides e seus respectivos coeficientes de correlação 49

Tabela 3.2 – ANOVA para o modelo linear obtido pelo método proposto. 54

Tabela 3.3 – ANOVA para o modelo linear obtido pelo método de referência. 54

Tabela 3.4 – Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais, β_0 e β_1, dos modelos lineares obtidos para ambos os métodos. 55

Tabela 3.5 – Figuras de mérito para os métodos DIB-CL-FBA e referência (HP). 56

Tabela 3.6 – Resultados das determinações de cromo (VI) em seis amostras água natural empregando os métodos proposto e de referência. 57

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ANOVA – Analysis of variance (análise de variância)

CCD – Charge-coupled devices (dispositivo de carga acoplada)

CL – Chemiluminescence (quimiluminescência)

CMYK – Ciano, Magenta, Yellow and Black (ciano, magenta, amarelo e preto)

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DIB-FBA – Digital image-based flow-batch analyzer (analisador fluxo-batelada baseada em imagens digitais)

DIB-CL-FBA – Digital image-based flow-batch analyzer chemiluminescent (analisador fluxo-batelada quimiluminescente baseada em imagens digitais)

DIB-FES – Digital image-based flame emission spectrometry (espectrometria de emissão em chama baseada em imagens digitais)

DPC – 1,5-diphenylcarbazide (1,5-difenilcarbazida)

FBA – Flow-batch analyzer (analisador em fluxo-batelada)

FIA – Flow injection analyzer (analisador por injeção em fluxo)

HSL – Hue, Saturation and Luminosity (matiz, saturação e luminosidade)

HSV – Hue, Saturation and Value (matiz, saturação e valor)

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

LOD – Limit of detection (limite de detecção)

LOQ – Limit of quantitation (limite de quantificação)

MFA – Multicommutation in flow analyser (analisador em fluxo multicomutado)

MSFA – Monosegmented flow analyser (analisador em fluxo monosegmentado)

PIXEL – Picture Element (Elemento de imagem)

RGB – Red, Green and blue (vermelho, verde e azul)

SFA – Segmented flow analyser (analisador em fluxo segmentado)

SIA – Sequential injection analyser (analisador por injeção sequencial)

RESUMO

“Um método quimiluminescente baseado em imagem digital para determinação de Cr (VI) em águas usando um analisador fluxo-batelada”

Autor: José Berivaldo Sales Almeida

Orientador: Edvan Cirino da Silva

Neste trabalho, propõe-se um método quimiluminescente baseado em imagem digital que utiliza um analisador em fluxo-batelada para determinação de Cr (VI) em águas. O sistema QL-FB-BID (sistema quimiluminescente em fluxo batelada baseado em imagens digitais) proposto usa uma webcam com sensor CCD (dispositivo de carga acoplada) para aquisição das imagens digitais geradas de acordo com o sistema de cor RGB (Red-Green-Blue). A determinação de Cr (VI) é baseada em sua redução quantitativa para Cr (III) por peróxido de hidrogênio em meio ácido. Em seguida, o Cr (III) atua como catalisador na reação de oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio em meio alcalino, produzindo radiação quimiluminescente. A luz emitida é capturada pela webcam gerando uma imagem digital, na qual uma região é delimitada para a decomposição dos pixels nos valores dos componentes R, G e B. Estes valores são usados para definir um vetor posição no espaço tridimensional RGB. A norma do vetor é adotada como sendo a resposta analítica, a qual se relaciona linearmente com a concentração do analito. A faixa linear da resposta obtida para a determinação de Cr (VI) estendeu-se de 7,36 até 150,00 μg L^{-1}. O modelo linear de curva analítica foi validado por intermédio de ANOVA, teste-*F* para falta de ajuste e da análise gráfica dos resíduos deixados pelo modelo. Os valores estimados dos limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 2,20 e 7,36 μg L^{-1}. A frequência analítica alcançada foi de 40 h^{-1}. Aplicando-se o teste *t*-emparelhado aos resultados obtidos pelo método proposto em comparação com o método espectrofotométrico de referência, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ao nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: quimiluminescência, imagem digital, analisador em fluxo-batelada, Cr (VI), águas.

ABSTRACT

"**A digital image-based chemiluminescent method for determination of Cr (VI) in water using a flow-batch analyzer**"

Author: José Berivaldo Sales Almeida

Supervisor: Edvan Cirino da Silva

In this work, it is proposed a digital image-based chemiluminescent (DIB-CL) method that employs a flow-batch analyzer (FBA) for the determination of Cr (VI) in water. The proposed DIB-CL-FBA (Digital Image-Based Chemiluminescent Flow-Batch Analyser) system uses a webcam with CCD sensor for acquisition of digital images generated according to the RGB (Red-Green-Blue) colour system. In Cr (VI) determination, this specie is quantitatively reduced to Cr (III) by using hydrogen peroxide in acid medium. After, the produced chromium (III) actuates as catalyst effect on oxidation of the luminol by hydrogen peroxide in alkaline medium, yielding chemiluminescence radiation. The emitted light is captured by webcam generating a digital image, in which a region is delimited in order to retrieve the values of the R, G and B individual components of each pixel. These values are used to define a position vector in RGB three-dimensional space. The vector norm is adopted as the RGB-based value (analytical response), which is linearly related o the analyte concentration. A linear response range for implementing the Cr (VI) determination was from 7.36 to 150.00 μg L^{-1}.The linear analytical curve was validated through ANOVA, *F*-test for lack of fit and graphical analysis of the residue left by the model. The limits of detection and quantification estimated were 2.20 and 7.36 μg L^{-1}, respectively, and sampling rate was found as 40 h^{-1}. The results of applying the DIB-FBA-CL method were compared with those obtained using a spectrophotometric method used as reference. It was verified that there is no statistically significant systematic difference between the results by applying the paired *t*-test at a confidence level of 95%.

Keywords: chemiluminescence, digital image, flow-batch analyzer, Cr (VI), water.

Capítulo I

INTRODUÇÃO

1. Caracterização do Problema

O interesse pela quimiluminescência para o desenvolvimento de métodos analíticos é motivado, principalmente, por sua alta seletividade e sensibilidade, baixos limites de detecção e quantificação e requerer instrumentação relativamente simples e de baixo custo (FERREIRA e ROSSI, 2002).

A aplicação da quimiluminescência em química analítica é um desenvolvimento relativamente recente (SKOOG, 2009). O número de reações químicas conhecidas que produzem quimiluminescência é pequeno embora se saiba que são reações que envolvem compostos de grande importância e com possibilidade de aplicação em diversas áreas do conhecimento humano, tais como a Medicina, Biologia e a Química.

Procedimentos analíticos com detecção por quimiluminescência podem ser realizados empregando-se instrumentação similar aquela utilizada em outros métodos ópticos, como espectrofotometria e fluorescência. Entretanto, os equipamentos são usualmente mais simples devido à ausência de fontes de radiação externas e de dispositivos para a discriminação de comprimentos de onda (REIS, 2002), o que tem motivado o interesse de pesquisadores para o desenvolvimento de métodos analíticos usando a quimiluminescência.

Não é necessário nenhum dispositivo para a seleção do comprimento de onda, uma vez que a única fonte de radiação é a reação quimiluminescente entre o analito e o reagente (SKOOG, 2009). Na reação, uma espécie eletronicamente excitada é formada e emite radiação eletromagnética (REM) (geralmente no visível) quando retorna ao seu estado fundamental. A intensidade da radiação quimiluminescente relaciona-se linearmente com a concentração do analito presente na matriz da amostra. A relação linear é geralmente observada para uma ampla faixa de concentrações do analito. Além disso, a detecção do sinal pode ocorrer mesmo para baixos níveis de concentração, permitindo a determinação de uma grande variedade de espécies em níveis de traço ($\mu g\ L^{-1}$).

A elevada sensibilidade dos métodos quimiluminescentes está associada a vários fatores, principalmente pela ausência da necessidade de uma fonte de radiação, eliminando problemas devido à dispersão de luz, instabilidade e/ou ruído proveniente deste tipo de componente (ANDRADE, 2011). Isso possibilita o aumento da razão sinal/ruído, e consequentemente a sensibilidade analítica.

A oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio em meio alcalino foi a primeira reação quimiluminescente descrita e suas propriedades termodinâmicas e cinéticas continuam sendo intensamente estudadas até os dias de hoje. O trabalho pioneiro sobre a reação do luminol foi publicado por Albrecht no ano de 1928 (ISACSSON e WETTERMARK, 1974).

Por tal característica apresentada nas reações quimiluminescentes, a luz emitida pode ser captada por uma câmera digital CCD – Webcam, produzindo imagens que podem ser tratadas por meio de algoritmo matemático apropriado onde a resposta analítica monitorada é definida por uma expressão matemática que determina os valores médios dos componentes resultantes das imagens obtidas durante o processo de análise.

O sistema fluxo-batelada foi escolhido por conciliar as vantagens dos sistemas em fluxo com as características importantes dos processos realizados em batelada. Características que possibilitam que os equilíbrios físicos e químicos sejam estabelecidos, além de permitir maior flexibilidade e ajuste do sistema.

Com isso, o objetivo central deste estudo é propor um método de determinação quimiluminescente baseada em imagens digitais para determinação de Cr (VI), espécie química de grande importância ambiental e toxicológica, potencialmente contaminante de águas de consumo, fazendo o uso de imagem digital obtida por meio de Webcam em substituição ao fototransdutor convencionalmente utilizado como detector de radiação visível na captura das imagens geradas no decurso da determinação, o que caracterizará o desenvolvimento de uma nova metodologia analítica baseada no sistema [quimiluminescência]-[imagem digital].

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Desenvolver um método quimiluminescente de análise em fluxo-batelada baseada em imagem digital, obtida com uma webcam, para determinação de Cr (VI) em águas superficiais.

1.1.2. Objetivos específicos

- Utilizar um sistema em fluxo batelada para automatizar o processo de análise e aquisição das imagens;
- Aplicar o sistema Quimiluminescente em Fluxo-Batelada com detecção por imagem digital à determinação de Cr (VI) em amostras de água;
- Avaliar o desempenho analítico do sistema proposto em termos das figuras de mérito e validação do método.

1.2. Princípios da Quimiluminescência

A quimiluminescência consiste de um tipo de luminescência observada a partir de moléculas no estado eletronicamente excitado, produzidas a partir de uma reação química (FERREIRA e ROSSI, 2002).

Skoog (2009) descreve que “as reações quimiluminescentes são encontradas em sistemas biológicos nos quais o processo é frequentemente denominado bioluminescência” e que os mecanismos das reações quimiluminescentes não são totalmente compreendidos.

Stevani e Baader (1999) discorrem que uma reação quimiluminescente pode ser entendida como o inverso de uma reação fotoquímica, onde uma determinada molécula ao absorver um fóton atinge um estado eletrônico excitado e, através de uma reação química, forma-se um produto no estado eletrônico fundamental. Ao contrário, uma reação quimiluminescente leva à produção de uma molécula eletronicamente excitada, que, ao decair para o estado eletrônico fundamental, emite luz.

No século passado descobriu-se que diversos compostos orgânicos relativamente simples também são capazes de exibir quimiluminescência. O tipo mais simples de reação de tais compostos para produzir a quimiluminescência pode ser descrita como representada na expressão seguinte:

$$A + B \rightarrow C^* + D \rightarrow C^* \rightarrow C + hv$$

Onde C* representa o estado excitado da espécie C. Nesse caso, a radiação

quimiluminescente é produto do decaimento da espécie excitada *C** para o estado eletrônico fundamental *C*.

A fração de moléculas que emitem um fóton ao retornar ao estado fundamental é denominada de rendimento quântico $\boldsymbol{\phi_{CL}}$. Esse rendimento é o produto de três outros rendimentos, podendo ser determinado através da **Equação 01**.

$$\boldsymbol{\phi_{CL} = \phi_C . \phi_E . \phi_F} \qquad (01)$$

Onde $\boldsymbol{\phi_C}$ é a fração de moléculas que reagem no sistema químico originando uma molécula excitável; $\boldsymbol{\phi_E}$ é a fração de moléculas em um estado eletronicamente excitado; $\boldsymbol{\phi_F}$ é a fração de moléculas excitadas que ao retornar para estado fundamental, emite um fóton. Muitas moléculas orgânicas são quimiluminescentes, mas os rendimentos quânticos são geralmente de ordem muito baixa, tipicamente sendo menores que 1%. (DODEIGNE et al, 2000).

Na quimiluminescência, a energia de excitação é proporcionada por uma reação química, sendo a emissão de radiação observada geralmente nas regiões do visível ou infravermelho próximo (LEITE et al, 2004). De acordo com Assunção (2009) “a quimiluminescência ocorre devido à quebra de ligações ricas em energia, tais como peróxidos, hidroperóxidos ou 1,2-dioxetanos, já existente nas moléculas ou formada a partir de rearranjos moleculares (intermediários)”.

Essa emissão ocorre em maioria na temperatura ambiente. Nestes processos de produção não térmica de luz visível, o estado energético excitado é gerado através de uma reação química que envolve a absorção de energia pelos reagentes, suficiente para a geração de um complexo ativado, transformando-o posteriormente em um produto eletronicamente excitado.

A energia excedente de uma molécula num estado eletronicamente excitado singleto ou tripleto onde os elétrons estão desemparelhados é dissipada na forma de radiação eletromagnética, diferentemente do que ocorre na maioria das reações exotérmicas, onde esta dissipação é na forma de calor ou excitação rotacional ou vibracional (ASSUNÇÃO, 2009).

O sinal típico de uma reação quimiluminescente é dependente do tempo e aumenta rapidamente para um máximo à medida que a mistura do reagente com o analito se completa. Assim, ocorre um decaimento aproximadamente exponencial do sinal.

1.2.1. Aspectos históricos da Quimiluminescência

Da Sibéria ao Novo México, da Europa à China, os primeiros escritos da civilização humana contêm referências e mitologia sobre animais luminosos, tais como vaga-lumes e pirilampos, além de referências a fenômenos como corpos brilhantes e florestas incandescentes (ALBERTIN et al, 1998). Os fenômenos de emissão de luz relacionados às substâncias químicas são conhecidos pelas mais antigas culturas e civilizações que ajudaram a criar vários mitos e contos. Os primeiros a classificar e relatar as características peculiares de seres luminosos como peixes, bactérias e fungos foram os gregos e romanos (MOREIRA, 2009).

Garcia-Campaña e Baeyens (2001) mencionam que de acordo com certa lenda, cerca de 1000 a.C. um imperador chinês possuía uma pintura mágica em que a imagem de um boi apareceu ao pôr do sol. A composição química da tinta utilizada não era conhecida. Este é o primeiro caso conhecido de uma substância produzida pelo homem capaz de armazenar a luz do dia para recuperação posterior.

Em 1669, o médico H. Brandt, a partir da destilação exaustiva de uréia, produziu fósforo que, devido a sua oxidação pelo O_2 do ar, produzia quimiluminescência. Esta primeira “reação química artificial” é hoje conhecida propriedade do fósforo quando exposto ao oxigênio do ar (ALBERTIN, 1998). O primeiro composto orgânico sintético luminescente descrito foi a lofina, 2,4,5-trifenilimidazol, obtida em 1887 por Radiziszewski. A partir destes resultados, em 1888, Wiedemann conseguiu distinguir a quimiluminescência da incandescência, definindo-a como “a emissão de luz que ocorre junto a processos químicos”. Vários sistemas emissores de luz importantes foram descritos alguns anos mais tarde após os estudos de Wiedemann, como a reação quimiluminescente do luminol (BARTOLONI et al, 2011). Desde esta época, as reações quimiluminescentes têm sido objeto de estudos para elucidação dos mecanismos envolvidos e da atuação de outras espécies que afetam a quimiluminescência (FERREIRA e ROSSI, 2002).

Em 1947, a luciferase de vaga-lume foi, pela primeira vez, isolada. Em 1952, Strehler e Totter publicaram uma aplicação analítica desta enzima na dosagem de trifosfato de adenosina (SANTOS et al, 1993).

Um grande avanço nos estudos mecanísticos da quimiluminescência orgânica foi alcançado por Kopecky em 1967 quando este sintetizou, pela primeira vez, as substâncias: 1,2-dioxetano (1,2-dioxaciclobutano), 3,3,4-trimetil e 2-dioxetano. Logo

depois foi relatada a síntese da primeira α-peróxi-lactona, ou 1,2-dioxetanona, por Adam e Liu, em 1972. Este último tipo de peróxido cíclico com anel de quatro átomos foi postulado mesmo antes da sua primeira síntese, sendo posteriormente comprovado como o intermediário-chave na bioluminescência do vaga-lume, a qual envolve a oxidação do substrato luciferina, catalisada pela enzima luciferase. Ambos os peróxidos cíclicos foram muito estudados nos anos setenta e oitenta como compostos-modelo para a geração de estados eletronicamente excitados em reações quimiluminescentes orgânicas e, também, para diversas transformações bioluminescentes. Por outro lado, a 1,2-dioxetanodiona, o dímero do gás carbônico, é postulado como o intermediário-chave na quimiluminescência do sistema peróxi-oxalato, uma das reações quimiluminescentes mais eficientes conhecidas até agora, sendo empregada nos chamados “light-sticks” (ALBERTIN, 1998).

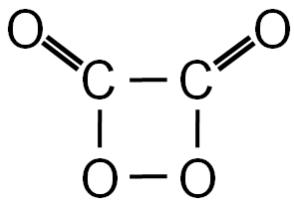

Figura 01 – Fórmula estrutural da molécula 1,2-dioxetanodiona.

O interesse e a aplicação de metodologias fazendo uso da quimiluminescência têm crescido desde então e tem sido relatado na literatura das últimas décadas em diferentes aplicações.

Kenny e Kurtz (1951) implementaram uma câmara escura para titulações quimiluminescentes em soluções coradas e obtiveram resultados satisfatórios. Em 1952, propuseram outro trabalho usando o luminol como indicador quimiluminescente um novo método para titulações fotométricas de soluções coradas de alta opacidade.

Seitz e colaboradores (1972) determinaram cromo III em amostras de água natural pela medida da emissão de luz promovida pelo efeito catalítico dos íons Cr^{3+} na reação de oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio.

Mikuška et al (1995) propuseram um método quimiluminescente baseado na reação dos íons nitrito com peróxido de hidrogênio para quantificar a concentração de íons nitrito em água.

Lu et al (1995) desenvolveram um sistema em fluxo com sistema de detecção quimiluminescente para monitorar os níveis de cianeto em água de torneira e águas de descarte industrial tomando como base a reação de íons cianeto com luminol imobilizados em resina de troca iônica.

Li e Lee (2004) propuseram um método quimiluminescente para especiação de arsênio utilizando um sistema FIA, baseando-se na medida de emissão de luz emitida pela reação da lucigenina com peróxido de hidrogênio em meio básico e catalisada por íons arsênio.

Moreira (2009) elaborou um planejamento e a otimização de um método quimiluminescente para determinação de vitamina B12 usando um sistema fluxo-batelada.

Andrade (2011) desenvolveu com sucesso um luminômetro fluxo-batelada para determinação quimiluminescente de vitamina B12 em medicamentos aproveitando o efeito catalítico dos íons cobalto presente na estrutura da cobalamina.

Também podemos encontrar com alguma frequência trabalhos envolvendo quimiluminescência em estudos no campo da farmacologia (SOTOMAYOR, 2008), bromatologia (LIU et al, 2010), biologia e medicina (YAO et al, 2002).

1.2.2. Classificação da Quimiluminescência conforme o modo de ocorrência

As reações quimiluminescentes são classificadas, conforme a maneira de como se processam, em três tipos, segundo a nomenclatura adotada por Schuster citada por Nery e Baader (2001):

(I) *Quimiluminescência direta* - quando o emissor é um produto da reação. Uma molécula de alto conteúdo energético que sofre uma reação exotérmica, rearranjo ou fragmentação gera uma molécula de produto num estado eletronicamente excitado, cujo decaimento para o estado eletrônico fundamental é o responsável pela emissão da luz.

(II) *Quimiluminescência Indireta* - quando o emissor é excitado via transferência de energia por um produto excitado. Neste caso, a espécie química responsável pela emissão é proveniente de outra molécula aceptora de energia de excitação, onde o estado excitado se forma por transferência de energia intermolecular, e é o responsável pela quimiluminescência.

Um esquema ilustrativo mostrando a quimiluminescência direta e indireta é mostrado na **Figura 1.2**.

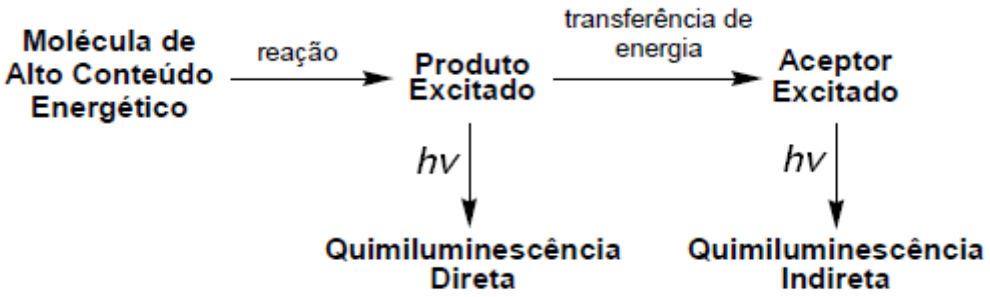

Figura 1.2 – Esquema ilustrativo da quimiluminescência direta e indireta.

(III) *Quimiluminescência ativada* - quando uma reação direta bimolecular entre um peróxido rico em energia e um aceptor (que tem como função ativar a decomposição do peróxido) leva a formação deste último num estado eletronicamente excitado via um novo caminho da reação. O processo pode ser intermolecular ou intramolecular.

1.2.3. O uso do luminol como reagente Quimiluminescente

Procedimentos analíticos baseados em medidas de quimiluminescência caracterizam-se por apresentar alta sensibilidade e ampla faixa de resposta linear. Uma das reações mais exploradas é a oxidação do luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona) por peróxido de hidrogênio em meio alcalino, na presença do catalisador hexacianoferrato (III) de potássio. Diversas outras espécies podem ser empregadas como oxidantes (*eg.* $ClO^-, MnO_4^-, Cr_2O_7^{2-}$) ou catalisadores (*eg.* $Cu^{2+}, Co^{2+}, Fe^{3+}$) podendo ser também quantificadas explorando essa reação. A aplicação é expandida, pois redutores como frutose, ácido ascórbico e ácido úrico podem ser determinados indiretamente. Além disso, diversas reações enzimáticas produzem peróxido de hidrogênio e a reação de oxidação do luminol permite a quantificação indireta dos substratos destas reações. Assim como ocorre com muitas outras reações envolvendo quimiluminescência, a oxidação do luminol na presença de catalisadores ocorre rapidamente e o tempo de emissão de radiação é bastante curto. Essas características, que dificultam a implementação destes procedimentos em batelada, os tornam atraentes para implementação em sistemas de análises em

fluxo, nos quais as quantidades adicionadas de reagentes e o tempo disponível para a reação são perfeitamente reprodutíveis (LEITE et. al., 2004).

Vários pesquisadores já citaram alguns caminhos possíveis para a reação do luminol com alguns agentes oxidantes, como O_2 e H_2O_2. Também foram determinados alguns possíveis intermediários. Além disso, estudos realizados com outras reações quimiluminescentes (por exemplo, com dioxetanos) têm mostrado novos caminhos e idéias sobre o mecanismo de quimiluminescência (FERREIRA e ROSSI, 2002). Uma dessas propostas foi elaborada por Albertin e pode ser contemplada na **Figura 1.3**.

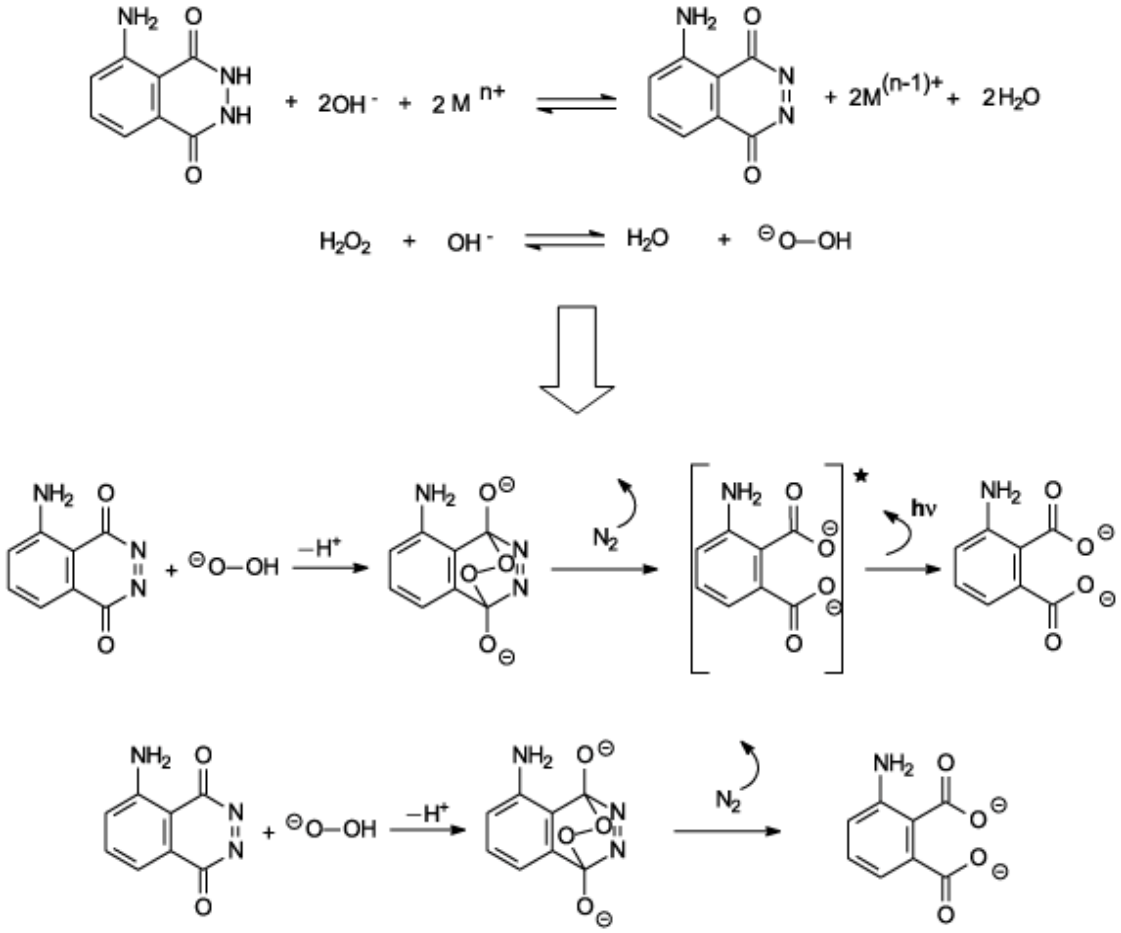

Figura 1.3 – Proposta mecanística apresentada por Albertin para quimiluminescência do luminol a partir de sua oxidação por peróxido de hidrogênio, catalisada por um metal de transição.

Conforme Moreira (2009) "a quimiluminescência do luminol é, hoje, uma das reações luminescentes mais empregadas na química analítica quantitativa e forense". A emissão de luz após a oxidação do luminol é iniciada por um forte agente oxidante, em meio alcalino, que pode se intensificar grandemente sob ação

catalisadora de cátions de metais de transição. Isso explica a sua elevada sensibilidade à micro-quantidades (μg L^{-1} e ng L^{-1}) dos constituintes da reação.

1.3. Imagem Digital

A área de processamento digital de imagens tem crescido consideravelmente nas últimas duas décadas, com a utilização de imagens e gráficos em uma grande variedade de aplicações, aliado ao fato de que a tecnologia de construção de computadores também tem se aprimorado, possibilitando a utilização de sistemas mais eficientes e mais baratos. Muitas áreas vêm utilizando sistemas de processamento digital de imagens, tais como: reconhecimento de padrões (indústria), medicina, agricultura, pesquisas espaciais, meteorologia, etc. (TRAINA e OLIVEIRA, 2004).

As imagens digitais podem ser produzidas por diversos aparelhos, incluindo câmeras digitais, scanners, aparelhos de raios-X, microscópios eletrônicos, aparelhos de ultra-som e radares (MACHADO e SOUKI, 2004), celulares, webcam entre outros dispositivos.

Uma imagem digital pode ser entendida como uma matriz bidimensional cujos índices de linhas e colunas identificam um ponto na imagem. Os elementos dessa matriz digital são denominados de “elementos de imagem” ou pixels (GONZALES e WOODS, 2000).

Pixel é definido como o menor elemento de uma imagem digital, constituindo-se numa representação abstrata da imagem no domínio digital (MARTINS, 2006). Ao se utilizar um dispositivo baseado no sistema RGB (Red-Green-Blue) para aquisição das imagens, cada pixel resulta da combinação das cores vermelho, verde e azul em diferentes proporções e intensidades. Pode formar qualquer cor, variando do preto na ausência de qualquer radiação ao branco quando se tem a contribuição máxima das intensidades de R, G e B (MIOT et al, 2006).

A profundidade de cor de uma imagem digital é quantificada em bits ou byte (unidade de medida para mensurar o tamanho de arquivos digitais). Uma imagem que possui intensidade de cor de apenas um bit terá somente uma cor, que pode ser o branco ou o preto (0 ou 1 do código binário). Quanto maior a profundidade de cores (expressa em bits), maior será a quantidade de cores de uma imagem. Por exemplo, uma imagem com 8 bits de profundidade possuirá uma combinação de 256 (2^8) níveis de intensidade (MACHADO e SOUKI, 2004) para cada canal R, G ou B.

Dessa forma é possível combinar os três canais (R, G e B) em diferentes níveis de intensidade e atingir 16,7 milhões de cores.

1.3.1. Dispositivo de captura de imagem - Webcam

Webcam é uma câmera de vídeo de baixo custo que captura imagens digitais que são transferidas para um computador de modo quase instantâneo. A conexão utilizada com o microcomputador, usualmente, é do tipo USB e a captura de imagem é realizada mediante um transdutor de imagem (LYRA, 2008).

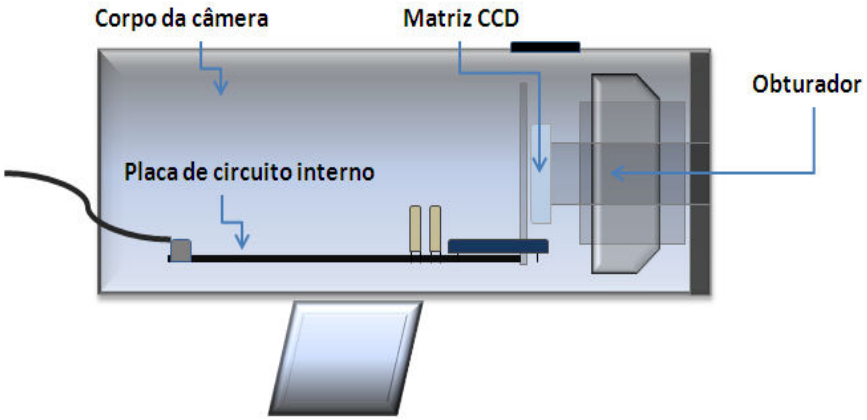

Figura 1.4 – Representação esquemática de uma câmera digital (WebCam).

Uma câmera digital ou webcam é composta basicamente dos componentes seguintes:

Matriz CCD: conjunto de fotocélulas formado por linhas e colunas. A luz que incide sobre a matriz CCD, sensibiliza as fotocélulas e provoca a emissão de elétrons, proporcional à quantidade de luz.
Placa do circuito interno: sistema integrado que controla as diversas funções da câmera.
Obturador: controla a entrada de luz incidente que será captada para aquisição do sinal digital.
Caixa ou corpo da câmera: gabinete ou "carcaça" plástica onde são dispostos os dispositivos constituintes da câmera.

CCD (dispositivo de carga acoplada) e sensores baseados em tecnologia CMOS (semicondutor de óxido metálico complementar) são os sensores mais utilizados na fabricação das câmeras digitais e webcam. Ambos têm capacidade de converter luz em sinais elétricos, sendo que os sensores CCD, entre outras vantagens, são menos suscetíveis aos ruídos (formação de pixels com informação espúria) possibilitando a obtenção de imagens com maior qualidade, podendo ser explorada com diversos propósitos (GAIÃO, 2006; LYRA, 2008).

1.3.2. Cor e sistemas de cores

A cor é o atributo da percepção visual que pode ser descrito por intermédio de nomes para identificá-las, como branco, cinza, preto, amarelo, etc., ou da combinação delas. As diferentes cores, ou espectros luminosos, que podem ser percebidos pelo sistema visual humano correspondem a uma pequena faixa de frequências do espectro eletromagnético (TRAINA e OLIVEIRA, 2004).

A cor exerce uma ação tríplice: a de impressionar, a de expressar e a de construir. A cor é vista quando impressiona a retina. É sentida e transmitida como uma emoção. É construtiva, pois tendo um significado próprio, possui valor de símbolo, podendo assim, construir uma linguagem que comunique uma idéia. O conjunto de técnicas que permite definir, estudar e quantificar como o sistema visual humano percebe e compara as cores é chamado de colorimetria. Também são chamados de colorimétricos os métodos de análise espectrofotométricos de absorção da luz (AZEVEDO e CONCI, 2003).

Os aparelhos que permitem a determinação das componentes ou coordenadas tricromáticas de um estímulo de cor, sob condições de iluminação e observação definidas, são chamados colorímetros.

Scuri (2002) explica que a cor monocromática ideal é também chamada de cor espectral, já que possui apenas um único comprimento de onda. No sistema RGB, por exemplo, a cor púrpura não é uma cor espectral, ela contém comprimentos de onda bem próximos a 380 nm e outros bem próximos a 780 nm. A luz branca possui todos os comprimentos de onda com energia máxima. A luz branca ideal seria um espectro com uma linha horizontal.

No nosso olho existem dois tipos de células sensoriais, cones e bastonetes. Bastonetes são sensíveis a todos os comprimentos de onda ponderadamente e por isso não são capazes de distinguir cor, possuem melhor resposta à luz de baixa

intensidade (visão noturna). Já os cones são menos sensíveis à luz (visão direta), mas permitem a distinção de cores porque existem três tipos de cones, os sensíveis a comprimentos de onda próximos a 450 nm, a 550 nm, e a 600 nm (1 nm = 10^{-9} m). Isso caracteriza o processo de discriminação de cor do olho, chamado de tricromaticidade.

A distribuição de cones e bastonetes ao longo da retina é responsável por diversos aspectos da nossa visão. A informação de cor é enviada para o cérebro em dois canais, um que codifica a intensidade da luz e outro que codifica as diferenças de cor. A informação provinda dos bastonetes é chamada de luminância e a informação provinda dos cones é combinada em um único canal e chamada de crominância. Isso mostra que o sinal de luminância é muito importante para distinguirmos objetos na imagem nos dando acuidade espacial. Assim como, mostra que a informação de crominância pode ser bastante compactada.

Os dispositivos usados na captura de imagens, representação e codificação de cores são baseados nas principais características da visão humana, onde a existência de três sensores para cada cor primária (vermelha, verde e azul) podem ser combinados em um único canal e apenas para informação de intensidade.

1.3.3. Sistemas de cor e o modelo RGB

Gonzalez e Woods (2000) afirmam que o propósito de um modelo de cores é facilitar a especificação das cores em alguma forma padrão e de aceite geral. Essencialmente, um modelo de cor é uma especificação de um sistema de coordenadas tridimensionais e um subespaço dentro deste sistema onde cada cor é representada por um único ponto.

Azevedo e Conci (2003) explicam que “um sistema de cores é um modelo que explica as propriedades ou o comportamento das cores num contexto particular. Não existe um sistema que explique todos os aspectos relacionados à cor. Por isso, são utilizados sistemas diferentes para ajudar a descrever as diferentes características das cores e sua percepção pelo ser humano”. Existem vários sistemas de cores, tais como RGB, CMYK, HSV e o HLS.

Traina e Oliveira (2004) esclarecem que os sistemas de cores podem ser aditivos ou subtrativos. Nos modelos aditivos (por exemplo, RGB), as intensidades das cores primárias são adicionadas para produzir outras cores. Pode-se pensar que

o branco é a mistura das intensidades máximas das três cores primárias aditivas (vermelho, verde e azul). Os matizes intermediários (amarelo, turquesa e magenta) são obtidos através da combinação das intensidades máximas de duas cores.

Nos modelos subtrativos (por exemplo, o CMYK), as cores são geradas subtraindo-se o comprimento da onda dominante da luz branca, por isso, a cor resultante corresponde à luz que é refletida. Pode-se pensar que o preto é a combinação das três cores subtrativas (turquesa, magenta e amarela).

Azevedo e Conci (2003) destacam que as cores primárias aditivas são: *vermelho, verde* e *azul*, conforme ilustrado na **Figura 1.5**. No processo aditivo, o preto é gerado pela ausência de qualquer cor, indicando que nenhuma luz está sendo emitida; o branco é formado pela mistura equitativa de todas elas, o que indica que uma quantidade máxima de vermelho, verde e azul está sendo transmitida. Outras tonalidades de cores são formadas pela adição das cores primárias em diferentes níveis de contribuição.

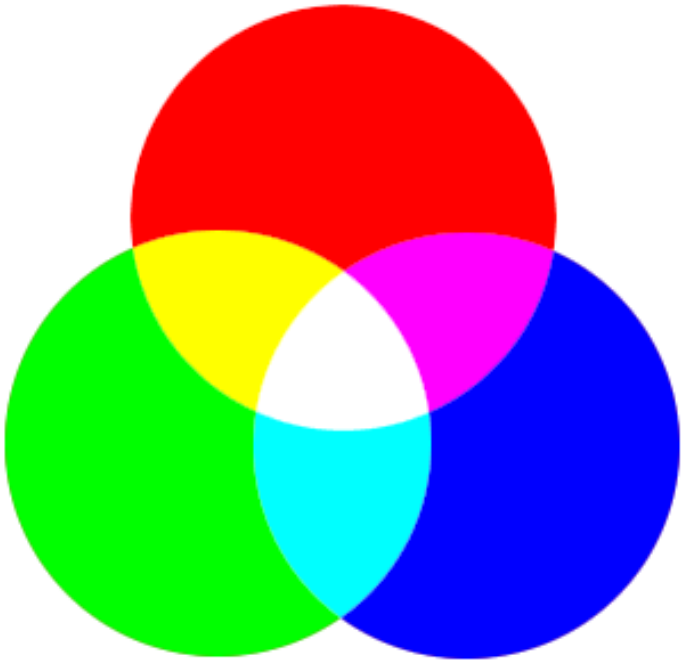

Figura 1.5 – Esquema de cores do sistema RGB [Red-Green-Blue] mostrando a formação de cores secundárias (amarelo, ciano e magenta) e da cor branca ao centro.

Em uma imagem colorida, a representação da cor “C” de cada pixel da imagem pode ser obtida matematicamente por:

$$\mathbf{C = r.R + g.G + b.B} \qquad (02)$$

Onde R, G e B são as três cores primárias e r, g e b são os coeficientes de mistura correspondentes a cada uma das intensidades associadas a cada um dos canais RGB. Esses coeficientes de mistura podem ser números reais ou inteiros. A primeira forma é mais utilizada para transformação entre espaços de cor, ou consultas em tabelas. A segunda, (valores inteiros), é utilizada nas aquisições de imagens digitais e em sua armazenagem na forma de arquivos de imagens. Dessa forma, a cor C de cada pixel da imagem pode ser representada no espaço de cores RGB usando-se os coeficientes de mistura (r, g, b) como coordenadas.

No modelo RGB, cada cor aparece nos seus componentes espectrais primários: vermelho, verde e azul. Esse modelo baseia-se num sistema de coordenadas cartesianas. O subespaço de cores de interesse é o cubo mostrado na **Figura 1.6**, no qual os valores RGB estão nos três vértices; ciano, magenta e amarelo estão nos outros três vértices; preto está na origem; e branco está no vértice mais distante da origem. Nesse modelo, a escala de cinza estende-se do preto até o branco ao longo da linha juntando estes dois pontos, e as cores são pontos sobre ou dentro do cubo, definidas por vetores estendendo-se a partir da origem (GONZALEZ e WOODS, 2000).

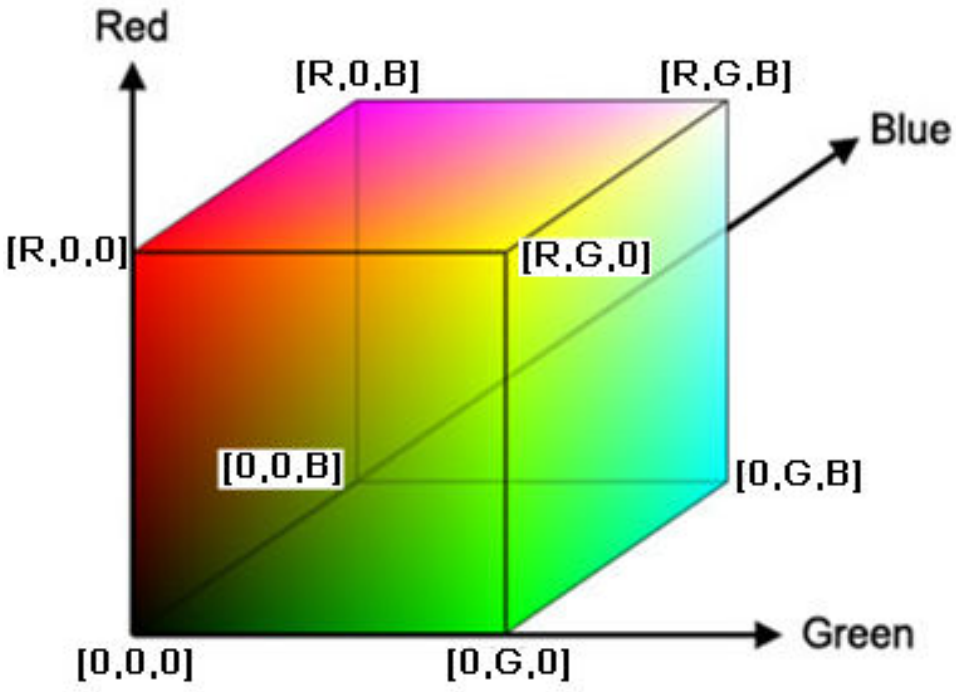

Figura 1.6 – Espaço de cores do sistema RGB representado em um sistema de coordenadas cartesianas. O valor máximo para cada canal é 255. (fonte: Google imagens)

Uma cor, portanto, pode ser considerada como um ponto em um espaço tridimensional (modelada como um subconjunto do espaço R^3), onde cada cor é representada por um trio de coordenada RGB.

1.3.4. Imagem digital em Química Analítica

O uso de imagens digitais em química analítica é recente e tem se demonstrado promissor. Desde o trabalho pioneiro desenvolvido por Monemi et al. (1999) que fizeram uso de uma câmera CCD (Dispositivo de carga acoplada), para determinar proteínas de ligação do retinol (RBP – Retinol Binding Protein) por quimiluminescência, várias propostas para o uso de imagens digitais foram postas em prática com sucesso.

Gaião et al. (2006) desenvolveram um novo método para implementação de titulações baseado na exploração de imagens digitais obtidas com uma Webcam. Essa metodologia foi aplicada com sucesso à determinação de alcalinidade total em águas mineral e de torneira.

Lyra et al. (2008) propõe pela primeira vez o emprego de uma webcam como uma nova técnica de detecção em espectrometria de emissão em chama baseada em imagens digitais, denominado de DIB-FES constatando que não há diferença estatística significativa quando comparado com o método tradicional de fotometria de emissão de chama.

Torres (2010) fez uso de imagens digitais, capturadas com uma webcam, para determinação da acidez total de vinhos tintos por meio de titulação ácido-base sem a utilização de indicador externo, uma vez que as antocianinas presentes no vinho apresentam a propriedade de modificar sua coloração de acordo com o meio do sistema.

Andrade (2012) utilizou um sistema em fluxo com detecção por webcam e determinou Al (III) e Cr (VI) em amostras águas por colorimetria obtendo excelente concordância com os métodos propostos na literatura.

Além do uso de webcam outros dispositivos como scanners (GOMES, 2008), câmeras digitais (MALEKI, 2004) de celulares (MARTINEZ, 2008) têm sido utilizadas como recurso de captação de imagens na química e bioquímica e tem mostrado resultados promissores.

1.4. Sistemas Automáticos de Análise

Os procedimentos convencionais de análises químicas apesar de comumente aplicados em diversas determinações analíticas, podem apresentar alguns inconvenientes, como: elevado consumo de reagentes e amostras, transferência manual de soluções, o que implica em um aumento na susceptibilidade a erros, baixa velocidade analítica, exposição do analista a reagentes tóxicos e/ou radioativos elevando o risco de contaminação.

Vários inconvenientes proporcionados pelos procedimentos em batelada podem ser contornados ou amenizados com a utilização de sistemas automáticos de análises. Geralmente esses sistemas possibilitam a realização de procedimentos experimentais de forma mais rápida, com mínima quantidade de reagentes e amostra, menor geração de resíduos, boa precisão e aumento na frequência analítica, além de possibilitar manipulação de soluções instáveis, tóxicas, explosivas e/ou radioativas com a mínima intervenção do analista.

Sistemas automáticos de análise têm potencial para serem empregados em laboratórios de análise de rotina, principalmente nos laboratórios de análises clínicas, por apresentarem uma demanda diária de diagnósticos que exigem resultados rápidos e precisos (ANDRADE, 2012) e que processam pequenas quantidades de amostras.

Os analisadores automáticos em fluxo, por apresentarem uma instrumentação relativamente simples, menor intervenção do analista, reduzido consumo de reagentes e amostras, elevada frequência analítica, não comprometer a precisão, e às vezes até a sensibilidade dos métodos, vêm sendo utilizados em laboratórios de análises de rotina, substituindo os analisadores automáticos discretos e robotizados. Nesses analisadores, a introdução e processamento da amostra, bem como o processo de detecção, ocorrem em fluxo (KOLEV e MCKELVIE, 2008).

A IUPAC (do inglês: International Union of Pure and Applied Chemistry) (ZAGATTO, 2002) e algumas referências encontradas na literatura, classificam os analisadores em fluxo de acordo com algumas características, tais como: o modo de inserção da amostra ou reagente e a forma de acondicionamento da amostra até o sistema de detecção (ANDRADE, 2012).

Dessa forma, os analisadores em fluxo podem ser classificados como:

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

Andrade (2012) descreve algumas das características, vantagens e limitações dos diferentes tipos de analisadores em fluxo conforme apresentando a seguir.

1.4.1. Analisador em fluxo segmentado (SFA)

Os sistemas automáticos em fluxo segmentado (do inglês: Segmented Flow Analyser - SFA), foram propostos por Skeggs, em 1957, e denominados inicialmente de Analisadores em Fluxo Contínuo (do inglês: Continuous Flow Analyser− CFA). Esse sistema tem como característica o bombeamento contínuo da amostra segmentada por várias bolhas de ar em direção ao detector. A presença de bolhas além de minimizar a dispersão e intercontaminação das amostras permite atingir o equilíbrio físico e químico durante a análise tornando o SFA adequado para reações de cinética lenta. Entretanto, as bolhas de ar são removidas com auxílio de um desborbulhador antes de atingirem o detector.

1.4.2. Analisador por Injeção em Fluxo (FIA)

Ruzicka e Hansen (1975) caracterizaram o Analisador por Injeção em Fluxo (FIA). Nesse sistema, um volume reprodutível da amostra e do reagente é injetado em um fluido carregador inerte, sendo transportado para o detector sem o uso de segmentos de bolhas de ar. Os sistemas FIA, geralmente, utilizam uma instrumentação simples, podendo alcançar uma elevada frequência analítica, bem como uma maior precisão durante as análises. Entretanto, nesses sistemas a amostra normalmente sofre dispersão durante o transporte para o detector e os

equilíbrios físico e químico não são atingidos. Outra desvantagem dos sistemas FIA, reside na dificuldade de realizar uma mistura eficiente entre reagentes e amostra, além da sua incapacidade de se aplicar a diversas análises com uma única configuração física do sistema, devido a sua baixa flexibilidade.

1.4.3. Analisador em fluxo monosegmentado (MSFA)

Pasquini e Oliveira (1985) propuseram o primeiro Analisador em Fluxo Monosegmentado (MSFA). Nesse analisador um volume reprodutível de amostra e reagente(s), interposto entre duas bolhas de ar, é introduzido em um fluido transportador inerte. Forma-se um monosegmento que limita a dispersão e evita a intercontaminação das amostras durante sua residência no caminho analítico. Como resultado, é possível obter sinais analíticos com maior sensibilidade, mesmo para reações lentas que requeiram longos tempos de residência (ANDRADE, 2012). Para aliar uma maior frequência analítica bastam introduzir sequencialmente as amostras, enfileirando-se os diversos monosegmentos no percurso analítico.

1.4.4. Analisador por injeção sequencial (SIA)

O Analisador por Injeção Sequencial (SIA) foi proposto por Ruzicka e Marshall (1990). Nos sistemas SIA, volumes de amostra e reagentes são aspirados sequencialmente empregando geralmente uma seringa e uma válvula seletora com vários canais de entrada e apenas um canal de saída, denominada válvula SIA. Com o auxílio dessa válvula, os volumes são adequadamente aspirados para uma bobina de armazenamento, onde pode ocorrer à homogeneização, separação e mistura das soluções. Em seguida, o fluxo é invertido e a solução é então direcionada para o sistema de detecção.

Os sistemas SIA mantêm algumas características obtidas por outros analisadores automáticos em fluxo, como reprodutibilidade, robustez, versatilidade e baixos consumo de reagentes e amostra. No entanto, a velocidade analítica pode ser bastante comprometida devido à forma de aspiração sequencial das soluções quando comparados com os outros analisadores automáticos em fluxo utilizados para o mesmo propósito.

1.4.5. Analisador em Fluxo com Multicomutação (MFA)

Reis e colaboradores (1994) desenvolveram o Analisador em Fluxo com Multicomutação (MFA). A principal característica do sistema MFA é a inserção de pequenas alíquotas da amostra e do reagente como forma de amostragem binária, possibilitando a formação de zonas reacionais que são transportadas por fluxo carregador. Isso ocorre devido à utilização de válvulas solenóides de três vias ou minibombas solenóides. Esses dispositivos atuam como comutadores dos fluidos, sendo que os volumes inseridos são definidos de acordo com o tempo de abertura dos canais de cada componente. A formação dessas zonas reacionais favorece o processo de homogeneização entre a amostra e o reagente, não influenciando na velocidade analítica.

1.4.6. Analisador em Fluxo-Batelada (FBA)

Em 1999, Honorato e colaboradores propuseram um novo sistema como uma estratégia inovadora na automação de processos de análise química (ANDRADE, 2011). Na ocasião, estudou-se a acidez nos vinhos brancos por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) utilizando indicador de púrpura de metacresol (BARRETO, 2012), empregando o método de Fibonacci para detectar o ponto final.

O referido sistema foi batizado de Analisador Fluxo-Batelada, uma vez que incorpora as características favoráveis dos analisadores automáticos em fluxo, além de preservar algumas características encontradas nos analisadores convencionais em batelada, como o processamento da amostra de forma discreta (BARRETO, 2012).

Embora originalmente os analisadores fluxo-batelada tenha sido concebido para realizar titulações (HONORATO et al, 1999), o tempo demonstrou que esse sistema tem grande versatilidade. Várias metodologias analíticas têm sido abordadas nos últimos anos.

Pesquisadores vêm utilizando analisadores FBA para aplicação em diversos procedimentos e métodos de análise química, tais como: exploração de gradiente (MEDEIROS et al, 2004) pré-tratamento da amostra como ajuste de pH (HONORATO et al, 2001), ou salinidade (CARNEIRO et al, 2000) adições de padrão (ALMEIDA et al, 2003) preparação de soluções multicomponente para calibração

multivariada (ALMEIDA et al, 2007) screening (LIMA et al, 2004; FORMIGA et al, 2003; NASCIMENTO et al, 2010), entre outros.

Uma das principais características do fluxo-batelada é a presença da câmara de mistura com volume interno variável. Na câmara de mistura ou câmara reacional ocorre a maior parte dos procedimentos analíticos, como por exemplo, a adição, homogeneização, preparo de soluções de calibração, reações químicas e detecção do analito (ANDRADE, 2012).

Amostra(s) e reagente(s) são bombeadas ou aspiradas para uma câmara de mistura onde se processa a reação respeitando a velocidade da mesma e no final a mistura é bombeada para o detector ou feita a detecção na própria câmara de mistura (MOREIRA, 2009). Dessa forma, esses sistemas garantem o controle dos equilíbrios químico e físico da reação com o mínimo de intervenção humana e elevada frequência analítica.

Além disso, oferecem flexibilidade durante a aplicação, permitindo ao analista, com simples ajustes no programa de controle, a alteração de parâmetros como a faixa de concentração (para levantar a curva analítica) ou o fator de diluição da amostra.

Moreira (2009) aponta algumas das características que melhor descrevem os analisadores em fluxo-batelada:

1. Fazem uso de válvulas solenóides de três vias para direcionar os fluidos e uma câmara para mistura e/ou reação, permitindo que possam ser realizados diversos procedimentos como: preparação de soluções de calibração, adição de analito, exploração de gradientes de concentração;

2. São controlados por microcomputador, via softwares e drivers, garantindo a precisão dos tempos de acionamento das válvulas solenóides e consequentemente dos volumes dos fluidos adicionados na câmara;

3. A amostra é processada em batelada, assim, as medidas podem ser realizadas com grande sensibilidade, pois os equilíbrios físicos e químicos inerentes ao processo analítico podem ser atingidos com ou sem a ocorrência de dispersão e/ou diluição da amostra;

4. Oferecem boa flexibilidade e versatilidade à aplicação de várias metodologias, as quais podem ser modificadas de forma conveniente, via software, sem necessidade de maiores alterações/adaptações no sistema físico.

Diante tamanha flexibilidade e versatilidade, os sistemas fluxo-batelada já apresentam algumas variantes que têm mostrado bastante potencial. Duas

importantes variações do FBA são os analisadores fluxo-batelada com propulsão à bomba pistão (PFBA) e os analisadores miniaturizados (μFBA).

O Analisador Fluxo-Batelada com propulsão à bomba pistão (PFBA) foi proposto por Almeida (2007) como uma nova modalidade de sistema em fluxo. Nesse analisador, os fluidos são propelidos por uma bomba pistão (ao invés da bomba peristáltica utilizada no sistema convencional) de baixo custo e dimensões reduzidas.

As características dos sistemas fluxo-batelada convencional (flexibilidade, versatilidade, robustez e caráter universal) se mantêm nessa nova versão. A vantagem dessa proposta é que o PFBA consta de duas características adicionais, a saber: portabilidade e capacidade de miniaturização.

Outra modalidade, proposta por Monte Filho (2010) como tentativa de contornar alguns inconvenientes do sistema fluxo-batelada convencional, foi um Analisador em Fluxo-Batelada miniaturizado à base de polímero fotocurável Uretano-Acrilato. Essa nova modalidade de analisador fluxo-batelada miniaturizado (μFBA), teve como motivação a possibilidade de se vir a analisar amostras disponíveis apenas em quantidades residuais, alcançar maior portabilidade e minimizar custos.

Pode-se apontar como vantagem sobre o analisador fluxo-batelada convencional a possibilidade de minimizar o volume morto devido ao comprimento das conexões (tubos) existentes entre um dispositivo e outro e a sua portabilidade.

1.5. O Elemento Cromo: Propriedades e Toxicidade

O cromo é um elemento de transição pertencente ao grupo 6 da classificação periódica dos elementos. De considerável importância ambiental e geológica, no ambiente, ocorre principalmente como cromo (III) ou cromo (VI). As funções bioquímicas e os efeitos do cromo são dependentes de seu estado de oxidação, pois enquanto o cromo (VI) é tóxico por ser um agente carcinogênico, o cromo (III) é considerado um nutriente essencial para os humanos.

As maiores fontes de cromo (VI) são antropogênicas, originando-se principalmente de indústrias têxteis e de galvanizações, e este é transferido ao ambiente por meio de emissões pelo ar ou pela água. Já o cromo (III) aparece

difundido em níveis diminutos na natureza (GAMMELGAARD et al, 1997). Devido ao fato de que os cromatos são amplamente empregados no tratamento de águas e que o cromo (VI) apresenta uma toxicidade muito maior que a do cromo (III), o maior interesse na especiação de cromo é focado na determinação de cromo (VI) (SUSSULINI e ARRUDA, 2006).

No homem e em animais, o cromo trivalente é um nutriente essencial que desempenha papel importante no metabolismo de glicose, gorduras e proteínas. Acredita-se que a forma biologicamente ativa do complexo de cromo (III) orgânico facilite a interação da insulina com seus receptores celulares. A molécula biologicamente ativa do cromo (III) parece ser um complexo do tipo dinicotinato de cromo (III)-glutationa. Esta molécula não foi ainda totalmente caracterizada, mas sabe-se que ela facilita a interação da insulina com seu receptor, influenciando, assim, o metabolismo de glicose, proteína e lipídeos. Compostos inorgânicos de cromo não apresentam esta atividade. Entretanto, o homem e os animais são capazes de converter os compostos de cromo inativos a formas biologicamente ativas. O mecanismo exato desta interação é desconhecido. Os estudos realizados demonstraram que a suplementação de cromo na deficiência do metal melhora o metabolismo de glicose, proteína e lipídios.

Os sintomas de deficiência do metal baseiam-se em poucos casos relatados. Neuropatia periférica, perda de peso e disfunção do metabolismo de glicose foram descritos. Em animais, a deficiência severa de cromo resultou em hiperglicemia, perda de peso, níveis elevados de colesterol, aterosclerose, opacidade da córnea, disfunção da fertilidade e letalidade. A administração de compostos de cromo trivalente resultou em diminuição dos níveis séricos de glicose e colesterol e regressão da aterosclerose (ATSDR, 2000).

Ainda que a incidência de deficiência severa de cromo seja baixa, a ocorrência de concentrações de cromo próximas aos valores marginais da homeostase pode ser comum. Tanto o homem como os animais convertem o cromo (III) inativo a formas fisiologicamente ativas. Ainda que a exposição a elevadas concentrações desta forma do metal possa levar à observação de efeitos adversos, a maioria dos estudos sobre os efeitos à saúde envolve a exposição a cromo metálico e cromo (VI).

Dentre os fatores que devem ser considerados na avaliação da toxicidade dos compostos de cromo, destaca-se a pureza desses compostos; os compostos de

cromo (III) podem estar contaminados com pequenas quantidades de cromo (VI), o que dificultaria a interpretação dos estudos com animais de experimentação e a avaliação da exposição no ambiente ocupacional. Outrossim, como o cromo (VI) é rapidamente reduzido à cromo (III) no organismo, torna-se difícil distinguir os efeitos nocivos de cada espécie em separado. (ATSDR, 2000).

O cromo metálico parece não ser nocivo à saúde. Os compostos de cromo (VI) podem provocar efeitos nocivos na pele, no trato respiratório e, em menor extensão, nos rins. O cromo (III) é cerca de 300 vezes menos tóxico que o cromo no estado hexavalente (MIRETZKYA e CIRELLI, 2010).

1.5.1. Fontes de contaminação por Cromo

A contaminação das águas por cromo pode ocorrer tanto de forma natural como também antropogênica, que é o meio mais comum em áreas industriais.

Entre as fontes naturais de contaminação ambiental estão os incêndios florestais e as erupções vulcânicas. Em áreas onde ocorrem depósitos significativos de cromo, as fontes de água podem apresentar concentrações superiores a 50,00 $\mu g\ L^{-1}$, valores estes que ultrapassam os padrões nacionais e internacionais para água potável (WHO, 1988).

As principais atividades humanas na qual o cromo e seus compostos são liberados para o meio ambiente, são (ATSDR, 2000; WHO, 1988):

• emissões decorrentes da fabricação do cimento;
• construção civil, devido aos resíduos provenientes do cimento;
• soldagem de ligas metálicas, fundições e manufatura do aço e ligas;
• indústria de galvanoplastia;
• lixos urbano e industrial;
• incineração de lixo e cinzas de carvão;
• curtumes;

Nestes processos ou fontes de contaminação, o cromo aparece nas formas trivalente, hexavalente e elementar.

A maioria do cromo em água superficial pode estar na forma de material particulado, ou depositado no sedimento. Algumas partículas podem permanecer como matéria suspensa e posteriormente ser depositadas nos sedimentos. A maioria dos compostos solúveis de cromo, em água de superfície, pode estar

presente como cromo hexavalente e, uma pequena parte, como cromo (III) em complexos orgânicos, sendo que o cromo hexavalente é mais estável na água do mar. O cromo hexavalente pode, entretanto, ser reduzido à cromo (III) por matéria orgânica presente na água e pode, eventualmente, depositar-se nos sedimentos .

As principais fontes antropogênicas que contaminam as águas superficiais e profundas são as operações de galvanoplastia, indústrias de tingimento de couro e manufatura de tecidos. A deposição de partículas de cromo presentes no ar atmosférico é também uma fonte de exposição significativa, ainda que não identificável (ATSDR, 2000).

Exceto em regiões contendo minério de cromo, as concentrações em águas superficiais e água potável são muito baixas, encontrando-se na faixa de 1 a 10 µg L^{-1}. A concentração de cromo é bem mais alta, em regiões onde há atividade industrial, tais como: Grandes Lagos (Canadá) - faixa de 0,2-19 µg L^{-1}; China (região rural de Tia-Ding) - faixa de 0-80 µg L^{-1}; Polônia (Wilsa) - faixa de 31-112 µg L^{-1}; Estados Unidos (rio Illinois) - faixa de 5-38 µg L^{-1} (WHO, 1988).

No Brasil, a portaria 518/2004 que trata sobre a potabilidade das águas para consumo humano e a resolução CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente limitam o teor de cromo em águas doce (classes especial, I, II e III) que podem ser destinadas ao abastecimento e consumo humano de acordo com os valores destacados na **Tabela 1.1**.

Tabela 1.1 – Limites especificados para cromo total, Cr (III) e Cr (VI) segundo legislação nacional e internacional.

Legislação	Meio	Limites de tolerância (mg L^{-1})
CONAMA	Águas Naturais e Consumo humano	0,500 (Cr III) e 0,050 (Cr VI)
Portaria M. S. 18	Água potável	0,050 (Cr VI)
U. S. EPA	Água para consumo	0,050 (Cr total)
	Água para ambientes aquáticos	0,100 (Cr total)

1.5.2. Determinação de cromo por métodos quimiluminescentes

Diversos estudiosos tem se preocupado em desenvolver métodos de determinação de cromo em águas, alguns deles utilizando quimiluminescência, assim como os trabalhos que se seguem:

Bowling e colaboradores (1975) propuseram um método de determinação rápida de cromo em águas naturais por quimiluminescência usando um analisador de centrifugação rápida.

Williams, Jones e Ebdon (1989) determinaram simultaneamente Cr (III) e Cr (VI) em níveis de ultra-traços usando cromatografia de troca iônica com detecção quimiluminescente em amostras sintéticas de água. A determinação das duas espécies de cromo sem nenhum pré-tratamento das amostras foi bem caracterizada e o método mostrou-se atrativo para análises em amostras reais.

Zhang, Qin e Liu (1995) desenvolveram um novo método para monitorar cromo (VI) em águas usando um sistema em fluxo com quimiluminescência. O sistema mostrou-se estável e pode ser aplicado com sucesso em determinações de cromo (VI) em amostras de água.

Capítulo II

EXPERIMENTAL

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se reagentes de grau analítico e água deionizada com um sistema Milli-Q Plus® (Millipore). Após a deionização, a água apresentava resistência específica 18,2 MΩ cm^{-1}.

Uma solução de luminol ($C_8H_7N_3O_2$, Sigma 97% P.A.) de concentração 5 x 10^{-3} mol L^{-1} foi preparada pela dissolução de 0,0913 g de 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona em solução 0,1 mol L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH, Synth 97% P.A.), adicionado 0,1mL de solução 0,01 mol L^{-1} de EDTA e aferida ao volume de 100mL. A solução foi mantida sob refrigeração a 8 °C. Com base nos estudos de (MOREIRA, 2009 e ANDRADE, 2011) a solução de luminol sempre foi preparada com antecedência mínima de 48 horas para que adquirisse estabilidade química.

Uma solução estoque de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$, Vetec 99% P.A.) foi preparada a partir da dissolução de 0,0283 g de em água deionizada. Sempre que necessário a solução foi diluída para concentração de trabalho e acidificada pela adição de 840 µL de ácido clorídrico (HCl, Synth 36,5% P.A.) concentrado.

Preparou-se diariamente uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2, Merck 30% m/v) com concentração 5,0 x 10^{-3} mol L^{-1} a partir da diluição de 50 µL de H_2O_2 (30% m/v, Merck). Essa solução foi levada ao volume de 100 mL em balão volumétrico adicionando-se água deionizada.

Uma solução de EDTA (99% Merck) 0,01 mol L^{-1} foi preparada a partir de 0,3722 g do sal dissolvidos em 100 mL de água deionizada. A função do EDTA é atuar como agente mascarante de possíveis íons interferentes possivelmente encontrados nas amostras.

Preparou-se 100 mL de uma solução de difenilcarbazida a partir de 0,012 g do sal dissolvido em 2,0 mL de etanol (CH_3CH_2OH, Merck 99,5% P.A.) e aferida com a adição de solução 0,5 mol L^{-1} de ácido sulfúrico (H_2SO_4, Vetec 99% P.A). A solução foi preparada semanalmente e devidamente armazenada em frasco âmbar.

As soluções de calibração foram preparadas a partir da solução estoque de Cr (VI), as quais foram preparadas em meio ácido com as seguintes concentrações: 5,00, 10,00, 25,00, 50,00, 100,00 e 150,00 (µg L^{-1}). A acidificação foi realizada pela adição de 840 µL de ácido clorídrico, cujo valor de pH das soluções ficou próximo de 1,5.

Amostras de água superficiais foram coletadas em diferentes pontos (próximo ao distrito industrial) na cidade de João Pessoa, Paraíba. Foram acidificadas pela adição de 1,0 mL ácido nítrico 0,1 mol L^{-1} (HNO_3, Synth) e devidamente armazenadas.

2.2. Equipamentos e Software

Um computador com processador Intel Dual Core, 2 GB de memória RAM e HD com 320 GB foi utilizado para o controle do sistema analítico e aquisição dos sinais quimiluminescentes (QL).

Uma webcam Microsoft® modelo LifeCam 720p HD foi utilizada para captura das imagens digitais durante o procedimento analítico empregando o sistema automático proposto (DIB-CL-FBA).

O software LabVIEW 7.1 da *National Instruments* (NI), foi utilizado para o desenvolvimento de um programa de controle de fluxo dos reagentes do sistema automático proposto e captura das imagens digitais obtidas durante as análises, cuja interface é mostrada na **Figura 2.1**.

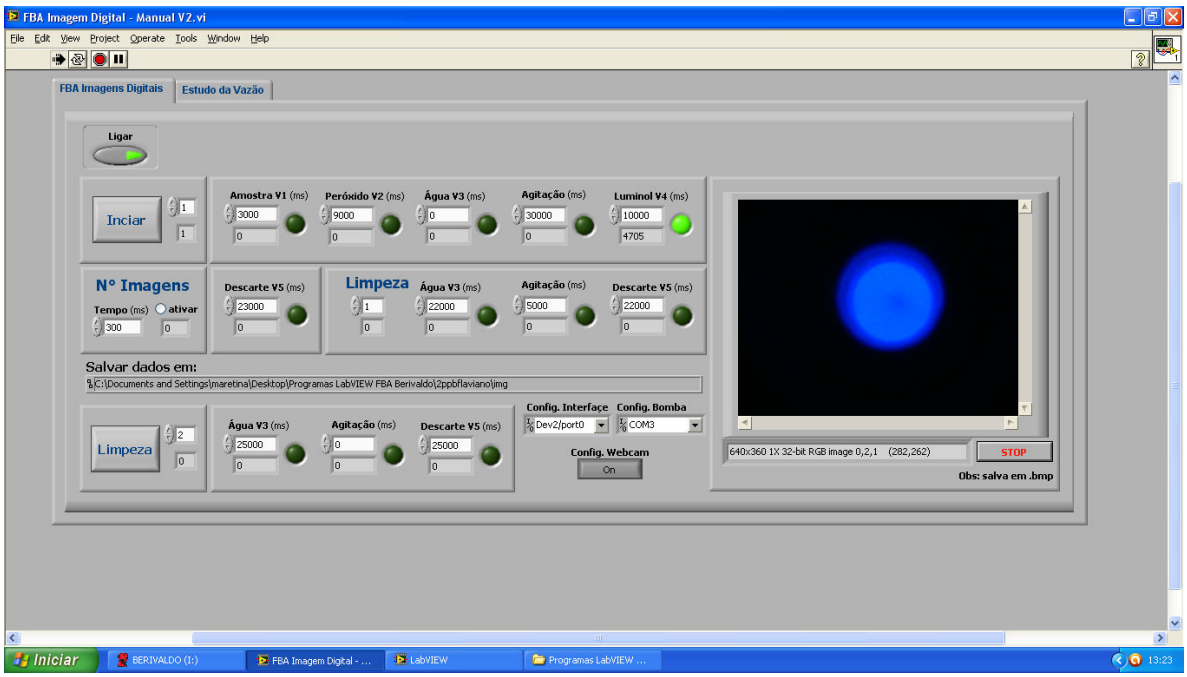

Figura 2.1 – Interface do programa de controle do sistema fluxo-batelada quimiluminescente baseada em imagens digitais.

O programa de controle permite o usuário realizar tarefas de controle do tempo de abertura para cada válvula solenóide, assim como também estabelecer o tempo

de captura das imagens, taxa de frames, número de replicatas e o processo de limpeza da câmara de mistura reacional. Pode-se escolher também o diretório de armazenamento das imagens obtidas durante o processo de determinação para tratamento posterior.

As imagens obtidas durante as análises, usando o sistema fluxo-batelada quimiluminescente proposto, foram tratadas com o programa ImageJ 1.45s. Esse software, de domínio público, escrito em linguagem Java, encontra-se disponibilizado gratuitamente para download na internet (http://imagej.nih.gov/ij/download.html).

Para a aquisição dos valores de RGB importa-se uma sequência de imagens e delimita-se uma região apropriada. Neste caso, foi delimitada uma região compreendendo 25 x 25 pixels. As coordenadas que delimitam a área de seleção da imagem são automaticamente alocadas e são usadas em todas as demais imagens. Assim, o programa é capaz de calcular a área e retornar os valores médios de RGB compreendidos na área selecionada, que posteriormente são armazenados e convertidos em seus respectivos valores de norma RGB em uma planilha eletrônica. A interface do programa de tratamento ImageJ, assim como um exemplo de área selecionada na figura, pode ser vista na **Figura 2.2**.

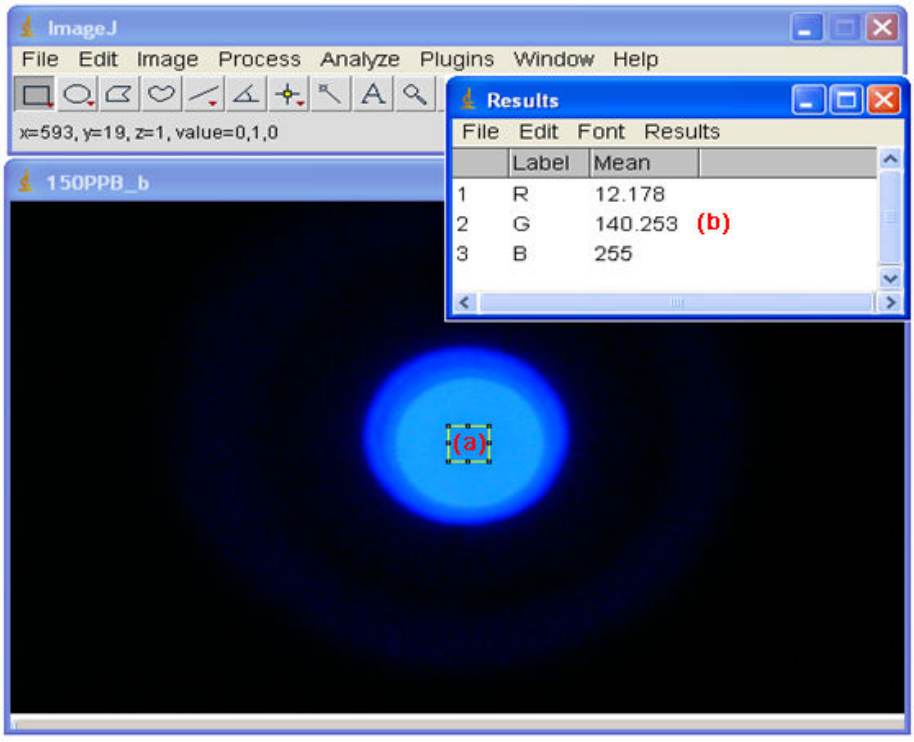

Figura 2.2 – Interface do software de obtenção dos valores de RGB. No centro (a) área selecionada de uma imagem na região de interesse; (b) respectivos valores médios das componentes RGB da área selecionada.

Para o método de referência, utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis Hewlett-Packard (HP) com arranjo de fotodiodos, modelo 8453, para as medidas de absorbância conforme método descrito na literatura (CLESCERI et al, 1995). Nesse equipamento, foi utilizada uma cubeta de quartzo com um volume interno de aproximadamente 4,0 mL e caminho ótico de 1,0 cm.

2.3. Sistema quimiluminescente fluxo-batelada proposto

O Sistema Quimiluminescente Fluxo-batelada é constituído por um conjunto de dispositivos interconectados, tais como câmara de mistura, bomba peristáltica, válvulas solenóides, acionador de válvulas, agitador magnético, webcam e um microcomputador.

A câmara de mistura, conforme apresentada na **Figura 2.3**, consiste de um componente fundamental em um sistema FB (fluxo-batelada). Neste dispositivo ocorre maior parte dos procedimentos analíticos, como mistura, homogeneização, reação e preparo de soluções de calibração. Confeccionada em Teflon® possuindo um volume interno de aproximadamente 2,0 mL, contendo cinco canais de entrada e um canal de saída. No seu interior foi posto uma pequena barra magnética, empregada para promover a homogenização das soluções, através de um agitador magnético desenvolvido no próprio laboratório LAQA.

Figura 2.3 – Ilustração tridimensional de uma câmara de mistura reacional.

Uma bomba peristáltica Ismatec IPC, modelo 78002-00, foi utilizada para a propulsão dos fluidos por intermédio de tubos de bombeamento de Tygon® com diâmetro interno de 1,14 mm. Os reagentes e amostras foram transportados

utilizando tubos de Teflon com 0,8 mm de diâmetro interno. A bomba peristáltica possibilita o bombeamento simultâneo de todas as soluções empregadas por ser equipada com oito canais para propulsão.

Figura 2.4 – Bomba peristáltica utilizada para propulsão dos fluídos para a câmara de mistura. (fonte: Ismatec)

Os fluidos (reagentes e amostra) foram direcionados para a câmara de mistura utilizando cinco válvulas solenóides de três vias da Cole Palmer (modelo EW-01540-13), como ilustrado na **Figura 2.5**. Essas válvulas foram controladas por um acionador de válvulas conectado a um microcomputador via porta USB, utilizando uma interface de controle da NI USB-6009.

Figura 2.5 – Fotografia de uma válvula solenóide de três vias. (fonte: Coleparmer)

O controle das válvulas solenóides foi realizado empregando um acionador de válvulas. A **Figura 2.6** mostra o diagrama esquemático da conexão entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009. O acionador utiliza um circuito integrado ULN2803 que possui um conjunto de 8 transistores apropriados para

suportar alta tensão e corrente. O uso desse dispositivo possibilita o controle simultâneo ou independente de até 8 portas de saída.

As válvulas solenóides são alimentadas com uma tensão de 12 V, e são acionadas quando o ULN2803 recebe uma tensão superior a 3,8 V em suas portas de entrada, gerando uma corrente de 150 mA nas portas de saída, onde estão conectadas as válvulas solenóides. Uma interface de controle NI USB–6009 da *National Instruments* é conectada às portas de entrada do ULN2803 presente no acionador de válvulas e faz a comunicação com o microcomputador via porta USB.

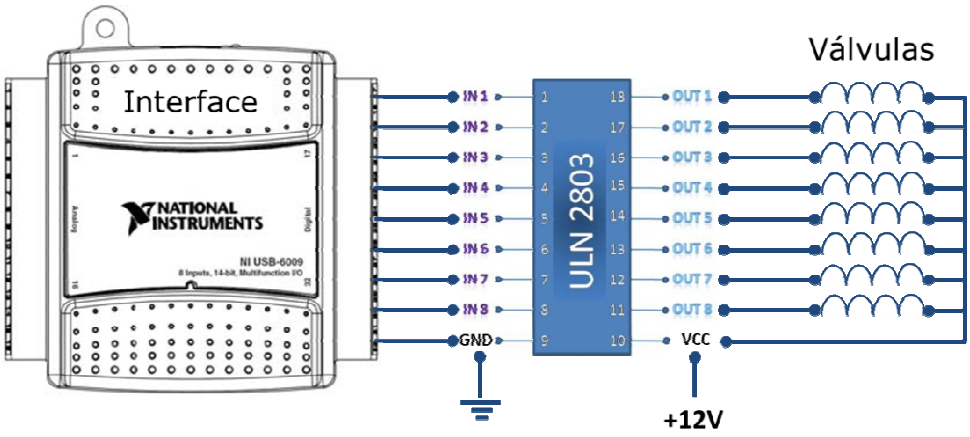

Figura 2.6 – Diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009. (fonte: Andrade, 2012)

Uma webcam Microsoft® LifeCam 720p HD com sensor CCD, foi usada como detector luminescente para a captura das imagens digitais durante o procedimento analítico usando o sistema automático proposto.

A webcam foi posicionada sobre a abertura superior da câmara de mistura, possibilitando a obtenção das imagens do sistema reacional com melhor iluminação, nitidez, contraste e reprodutibilidade. Um fotografia dessa webcam é apresentada na **Figura 2.7**.

Figura 2.7 – Webcam usada para aquisição das imagens digitais

Reagentes e amostras são bombeado através dos tubos de tygon© que fazem a conexão entre os dispositivos (válvulas solenóides e câmara de mistura). O fluido pode ser direcionado à câmara reacional ou retornar aos recipientes (quando não está sendo consumido durante a análise) evitando-se o desperdício de reagentes e amostras.

Pelo tempo de abertura de cada válvula solenóide determina-se o volume de cada reagente ou amostra que o controlador pode enviar para câmara reacional. A **Figura 2.8** ilustra a fotografia do sistema Fluxo-Batelada Quimiluminescente proposto. Para evitar interferência da luz ambiente, a câmara de mistura, o agitador magnético e a webcam foram devidamente alocados em um módulo plástico de cor escura.

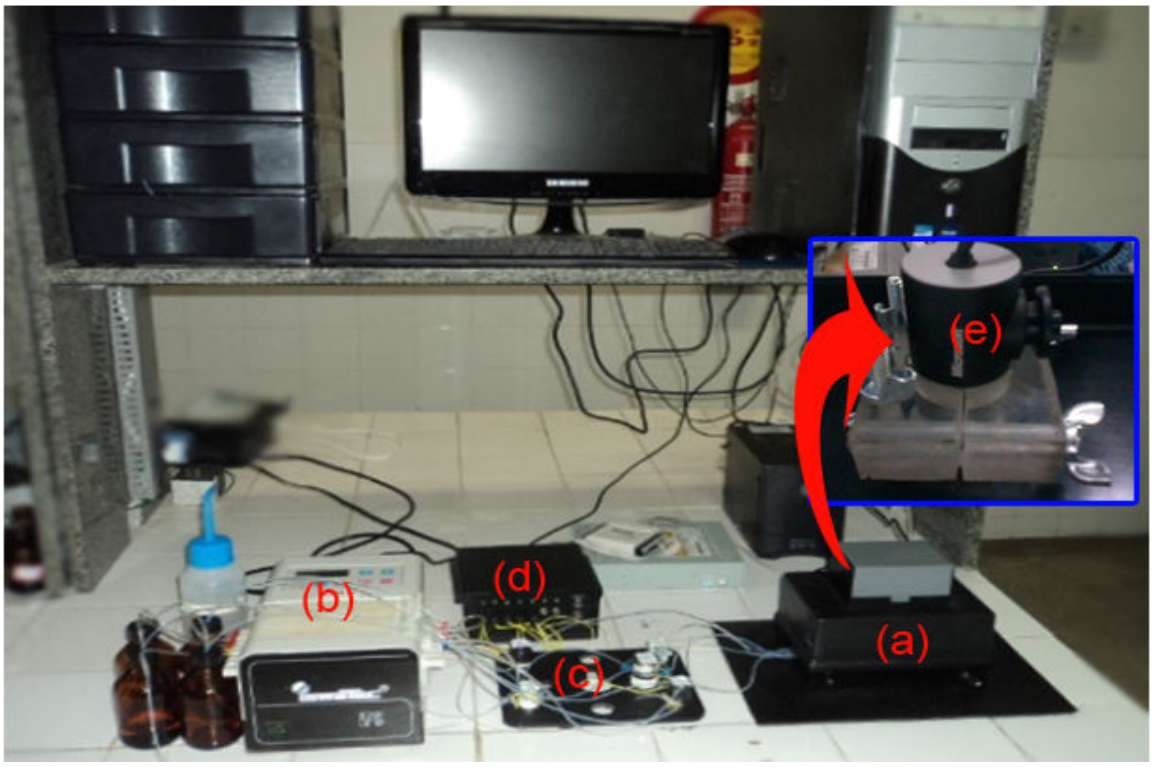

Figura 2.8 – Fotografia do sistema DIB-CL-FBA. (a) câmara escura de alojamento da câmara de mistura e agitador magnético; (b) bomba peristáltica; (c) conjunto de válvulas solenóides; (d) acionador de válvulas; (e) webcam. Em detalhe.

2.4. Estudo da vazão dos canais das válvulas solenóides utilizadas no Sistema Fluxo-Batelada Quimiluminescente

Para assegurar que os volumes de reagentes adicionados à câmara de mistura reacional esteja em consonância com os valores determinados teoricamente, foi

realizado um levantamento das curvas de vazão dos canais de bombeamento dos volumes adicionados à câmara de mistura.

Para tanto, alíquotas de água foram tomadas e por meio da ativação individual de cada válvula solenóide, em diferentes tempos de acionamento, o volume de água expelido pelo canal de saída da válvula solenóide foi cuidadosamente coletado. A massa de água foi estimada a partir da pesagem das alíquotas expelidas, utilizando uma balança analítica (Shimadzu, modelo AY220).

2.5. Determinação de cromo (VI) em amostras de águas naturais

Ambos os métodos proposto e de referência foram utilizados para a determinação de cromo (VI) nas mesmas amostras de águas naturais. Os resultados das determinações foram submetidos a um teste *t*-emparelhado como descrito nas **Seções 2.6.3** e **2.6.4**.

As medidas foram realizadas em duplicatas autênticas a partir das mesmas soluções de calibração descridas na **Seção 2.1**. Os sinais foram utilizados para obtenção da curva analítica e as concentrações das amostras foram estimadas por meio das equações obtidas para os modelos de calibração.

2.5.1. Método quimiluminescente proposto

♦ *Reações químicas envolvendo os íons Cr (VI) e Cr (III)*

Conforme destaca (WILLIAMS et al, 1989 e BOWLING et al, 1975) o cromo (III) tem uma ação catalítica para a reação de oxidação do sistema luminol-H_2O_2, semelhante aos íons de outros metais de transição tais como Co (II), Fe (II) e Cu (II), mas cromo (VI) não é capaz de catalisar a reação gerando quimiluminescência. Deste modo, o Cr (VI) presente em uma amostra deve ser reduzido completamente a Cr (III).

Para tal finalidade a literatura reporta o uso de diversos agentes redutores, tais como sulfito de potássio (WILLIAMS et al, 1989), hexacianoferrato (II) de potássio (ZHANG et al. 1995) que podem ser aplicados nos processos de redução de cromo (VI) para cromo (III) e o peróxido de hidrogênio (BOWLING et al, 1975) um dos mais relatados.

Rivera (1997) descreve que quando o peróxido de hidrogênio é adicionado a uma solução de cromato de potássio nenhuma mudança visível acontece, mas

oxigênio é lentamente liberado até finalmente o peróxido ser completamente decomposto deixando o cromato sem mudança aparente. Por outro lado, se a solução é ácida ocorre formação rápida do ácido peroxicrômico que decompõe rapidamente com liberação de oxigênio, deixando o cromo completamente reduzido a cromo (III). Medidas do oxigênio gasoso desprendido na reação confirmam a estequiometria:

$$2HCrO_4^- + 3H_2O_2 + 8H^+ \rightarrow 2Cr^{3+} + 3O_2 + 8H_2O$$

Em uma segunda etapa, os íons cromo (III) atuam com efeito catalisador na reação de oxidação do luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona) promovendo a quimiluminescência.

$$H_2O_2 + C_8H_7N_3O_2 \xrightarrow{Cr^{3+}} [C_8H_5N_1O_4]^{2-} + Luz$$

A radiação luminosa emitida como produto da reação é capturada por uma webcam acoplada sobre a câmara de mistura reacional. Imagens são capturadas durante o tempo de adição do luminol à câmara reacional em uma taxa de três quadros por segundo (suficiente para aquisição das imagens no tempo interesse). Deste modo garante-se a captação da radiação luminosa no período máximo da emissão.

♦ *Definição da resposta analítica*

Lyra (2008) propôs um modelo matemático, baseado no sistema de cores RGB e no conceito de norma de vetores. O modelo pode ser utilizado para definir a resposta analítica usada na construção das curvas analíticas. Um vetor posição v é associado à imagem digital de cada solução padrão ou amostra é ilustrado na **Figura 2.9**.

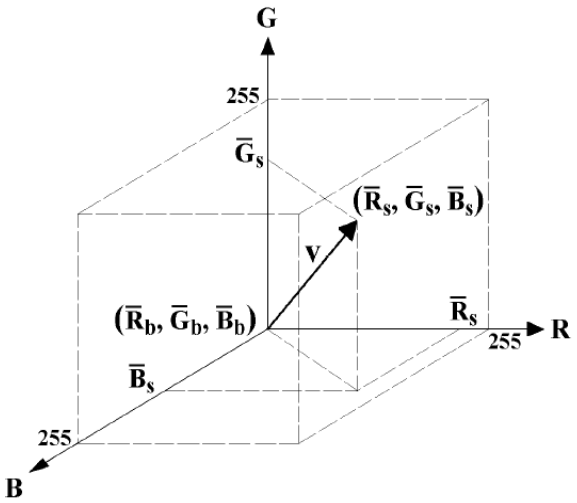

Figura 2.9 – Espaço RGB ilustrando a posição do vetor v associado a uma imagem digital. (fonte: Lyra, 2008)

Para realizar o cálculo da norma do vetor v, é necessário subtrair dos valores de $\bar{R}_S$, $\bar{G}_S$e $\bar{B}_S$ (valores médios de R, G e B das soluções padrão e amostras) dos valores $\bar{R}_B$, $\bar{G}_B$e $\bar{B}_B$ do branco.

A norma $\|v\|$ do vetor **v** é então determinada pela **Equação 09**

$$\|\boldsymbol{v}\| = \sqrt{\bar{\boldsymbol{R}}_{\boldsymbol{S-B}}^{\boldsymbol{2}} + \bar{\boldsymbol{G}}_{\boldsymbol{S-B}}^{\boldsymbol{2}} + \bar{\boldsymbol{B}}_{\boldsymbol{S-B}}^{\boldsymbol{2}}} \qquad (09)$$

Onde os valores $\bar{R}_{S-B}^2 + \bar{G}_{S-B}^2 + \bar{B}_{S-B}^2$ são os valores líquidos obtidos depois de retirar a contribuição do branco.

Deste modo a partir de uma área selecionada na imagem é possível extrair e expressar um valor matemático que pode ser usado para elaborar a curva analítica assumindo uma relação linear entre a resposta analítica e a concentração do analito e estimar a concentração do analito nas amostras.

♦ *Procedimento analítico*

No sistema proposto, antes de iniciar qualquer procedimento analítico, é necessária uma etapa de preenchimento dos canais. As soluções devem ser bombeadas e recirculadas aos seus respectivos reservatórios (ANDRADE, 2012). Em seguida, aciona-se a válvula V_1 e uma alíquota de 250 µL da solução padrão ou amostra é enviada para a câmara de mistura, com acionamento da válvula V_2 adiciona-se em sequência 850 µL de peróxido de hidrogênio. Por não ser uma

reação instantânea, foi escolhido um tempo de agitação de 30 segundos. Completada a etapa de agitação, foram adicionados 850 µL de luminol (acionando a válvula V4) e simultaneamente foi feita a captura das imagens da radiação emitida.

Por último é acionada a válvula V_5 para efetuar o descarte da mistura reacional contida na câmara de mistura e a válvula V_3 é acionada para adicionar água deionizada à câmara para a limpeza da mesma. Esta última etapa é repetida tantas vezes (de 03 à 05 vezes) forem necessárias até a remoção completa de quaisquer vestígios do analito na câmara de mistura reacional.

Para avaliar se nas amostras de água há ocorrência de íons Cr (III) livres e que possam interagir com o luminol gerando radiação luminosa, uma prova do branco foi realizado para cada amostra. Esta etapa consiste em inserir uma alíquota da amostra de água na câmara de mistura reacional sem fazer ocorrer a reação de redução do Cr (VI) com o peróxido de hidrogênio. Caso os íons Cr (III) estejam presentes nas amostras é observada a emissão da radiação quimiluminescente que deve ser medida e subtraída dos valores obtidos no processo de análise.

Um diagrama do sistema quimiluminescente em fluxo-batelada baseado em imagens digitais é mostrado na **Figura 2.10**.

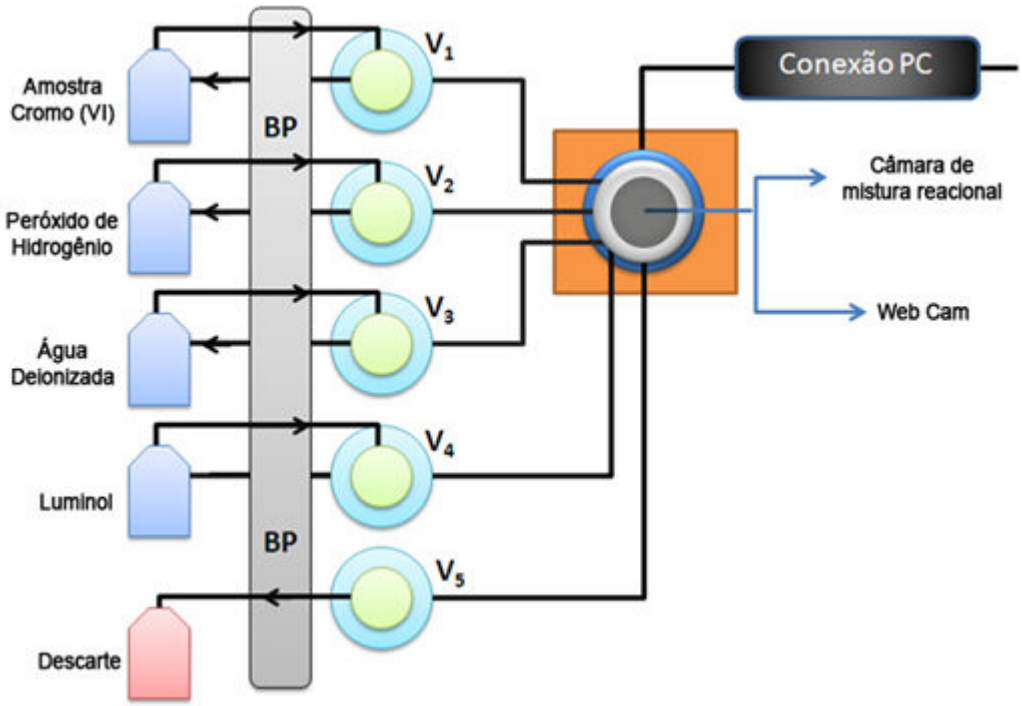

Figura 2.10 – Diagrama do sistema Fluxo-Batelada Quimiluminescente Baseado em Imagens Digitais.

Os volumes adicionados foram determinados pelo tempo de abertura das válvulas solenóides. A sequência de injeção dos fluidos na câmara está descrita conforme o diagrama de tempos apresentado na **Figura 2.11**.

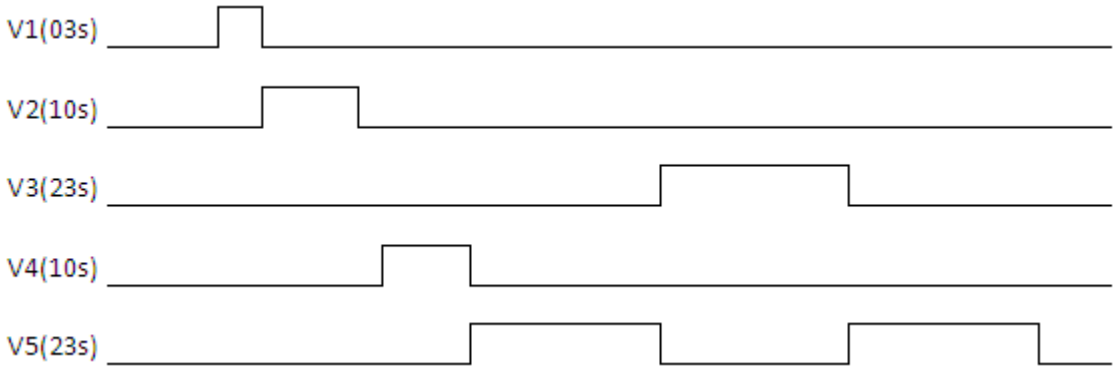

Figura 2.11 – Diagrama de tempos do sistema em fluxo-batelada proposto.

As análises foram realizadas em triplicatas para as amostras e soluções de calibração. Após cada troca da solução de calibração ou amostra, efetuou-se a lavagem do sistema até remover completamente os vestígios de cromo de modo a evitar intercontaminação.

As imagens obtidas durante o procedimento foram salvas em um diretório escolhido e posteriormente levado ao tratamento com o software específico para extrair os valores de RGB da área (selecionada) de interesse em cada imagem. Com os valores de RGB obteve-se os valores de norma RGB. Com os valores obtidos de norma RGB foi construída a curva analítica.

2.5.2. Método de referência

A fim de validar o método quimiluminescente proposto, adotou-se como referência o método colorimétrico descrito no Standard Methods (Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20ª ed., Método 3500-Cr B), pág. 3-66, 1998) que utiliza o reagente cromogênico 1,5-difenilcarbazida (DFC). As medidas de absorbância foram realizadas no comprimento de onda de 540 nm, explorando o máximo de absorção do complexo formado entre a DFC e os íons Cr(VI).

2.6. Avaliação do desempenho dos métodos

O modelo de calibração somente pode ser usado para estimar a concentração do analito, se for capaz de descrever o comportamento dos valores experimentais de maneira satisfatória. Portanto, o modelo obtido não pode apresentar evidências de falta de ajuste e deve refletir uma regressão estatística significativa (PIMENTEL e BARROS NETO, 1996). Dessa forma, a validação do modelo de calibração geralmente é realizada por meio de uma análise de variância (ANOVA).

A **Tabela 2.1** apresenta as equações para ANOVA do modelo ajustado aos dados experimentais empregando-se o método dos mínimos quadrados (MMQ).

Tabela 2.1 – Equações para ANOVA aplicadas ao modelo obtido pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p-1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^n (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n-p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^n (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m-p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n-m}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^n (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	$MQ_T = \frac{SQ_T}{n-1}$

Onde: p é o número de coeficientes de regressão do modelo postulado; n é o número total de medidas; m é o número de níveis distintos da variável independente.

A validação de modelos baseados no método dos mínimos quadrados, aplicando-se a ANOVA, consiste de análise dos resíduos, teste *F* de significância da regressão e teste *F* de falta de ajuste.

Na análise do gráfico dos resíduos verificamos o comportamento dos erros de previsão do modelo (resíduos) em relação aos dados experimentais. No gráfico de resíduos é possível identificar o tipo de erro experimental associado aos dados experimentais. Caso os resíduos apresentem algum perfil ou estrutura teremos um

erro sistemático associado aos dados experimentais. Caso os resíduos se distribuam aleatoriamente em torno de zero teremos apenas erros aleatórios associados aos dados experimentais (PIMENTEL, 1996).

O teste *F* de falta de ajuste compara, para os vários níveis da variável x, a média quadrática da falta de ajuste (MQ_{faj}) com a média quadrática devida ao erro puro (MQ_{ep}). Assim, se a razão (MQ_{faj})/(MQ_{ep}) for menor que o valor do ponto de distribuição *F*, referentes aos graus de liberdade de MQ_{faj} e MQ_{ep} e para um nível de 95% de confiança, temos um modelo sem evidência de falta de ajuste. Neste caso, as duas médias quadráticas refletirão apenas os erros aleatórios associados aos dados. Caso contrário, o modelo apresenta falta de ajuste e necessita ser reestimado e revalidado (ANDRADE, 2012).

No teste *F* de significância estatística da regressão, compara-se a razão entre a média quadrática devido à regressão (MQ_{reg}) e a média quadrática residual (MQ_r) com o valor do ponto da distribuição *F* referente aos graus de liberdade de MQ_{reg} e MQ_r a um certo nível de confiança de interesse. Geralmente, emprega-se um nível de 95% de confiança. Se a referida razão for maior que o valor de *F*, conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa. Do contrário, não se pode admitir a existência de uma relação funcional (linear, quadrática, polinomial, etc.) entre as variáveis que possa ser descrita pelo modelo.

Outros procedimentos estatísticos também foram usados para a validação do modelo de calibração e estimativa das figuras de mérito para o método proposto, tais como: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e sensibilidade de calibração.

Essas características de desempenho foram adotadas e calculadas de acordo com os conceitos e recomendações da IUPAC. Entretanto, para obtenção dos valores de LOD e LOQ, o desvio padrão do branco (s_b) para o método quimiluminescente proposto foi estimado, conforme o procedimento adotado por Lyra (2008). Isto porque, a resposta analítica está associada à norma de um vetor baseada em três variáveis (componentes R, G e B) resultantes das imagens digitais. Desse modo o desvio padrão do branco foi determinado pela **Equação 03**.

$$\mathbf{s_b} = \sqrt{\frac{(\bar{\mathbf{R}}_{\mathbf{s}_{\bar{\mathbf{R}}}})^2 + (\bar{\mathbf{G}}_{\mathbf{s}_{\bar{\mathbf{G}}}})^2 + (\bar{\mathbf{B}}_{\mathbf{s}_{\bar{\mathbf{B}}}})^2}{\bar{\mathbf{R}}^2 + \bar{\mathbf{G}}^2 + \bar{\mathbf{B}}^2}} \qquad (03)$$

Onde $s_{\bar{R}}$, $s_{\bar{G}}$,e $s_{\bar{B}}$, são os desvios padrão associados aos valores médios $\bar{R}_b$,$\bar{G}_b$e $\bar{B}_b$ resultantes da imagem digital RGB do branco, respectivamente.

2.6.1. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

A menor concentração do analito que pode ser detectada por um dado método analítico, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas, pode ser entendida como o limite de detecção. Geralmente o LOD é um parâmetro que se determina quando se desenvolvem novos métodos ou se faz uso de métodos modificados para análise de traços, frequentemente definem-se os limites de detecção em termos do desvio-padrão de medidas do branco.

O limite de detecção pode ser determinado pela **Equação 04**.

$$\mathbf{LOD} = \frac{\mathbf{3.s}}{\mathbf{S}} \qquad (04)$$

Na qual: s é o desvio-padrão da resposta; S é o coeficiente angular da curva de calibração.

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. O limite de quantificação (LQ) pode ser determinado fazendo-se uso da **Equação 05**.

$$\mathbf{LOQ} = \frac{\mathbf{10.s}}{\mathbf{S}} \qquad (05)$$

Onde: s é o desvio-padrão da resposta; S é o coeficiente angular da curva analítica.

2.6.2. Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que indica a variação da resposta analítica em função da concentração do analito pode ser determinada pela **Equação 06**. Em outras palavras, a sensibilidade é a capacidade de um método distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de

calibração e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada.

$$\mathbf{S} = \frac{\mathbf{dx}}{\mathbf{dc}} \tag{06}$$

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esta figura de mérito expressa a capacidade do procedimento analítico gerar grande variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito.

2.6.3. Desvio padrão conjunto

O desvio padrão define-se como a raiz quadrada da variância. Mede o grau de dispersão dos dados numéricos em torno de um valor médio, adequada para expressar a medida da dispersão dos valores encontrados para um conjunto de respostas, em torno da média desses valores.

O desvio padrão conjunto pode ser determinado pela razão entre variâncias individuais calculadas para cada amostra do conjunto e o total de amostras analisadas.

Em casos específicos onde o número de determinações repetidas é mantido constante, pode-se obter o desvio padrão conjunto, aplicando-se a **Equação 07**.

$$s_{conj} = \sqrt{\frac{\Sigma {s_i}^2}{N}} \tag{07}$$

Onde **N** é o número total de amostras e $\mathbf{s_i}$ é a variância encontrada para o conjunto de medidas de cada amostra.

2.6.4. Teste *t*-emparelhado baseado no teste de hipóteses

O teste de hipóteses é, usualmente, utilizado na formulação do teste t emparelhado usado para avaliar se existem diferenças sistemáticas estatisticamente

significativas entre os resultados de dois métodos analíticos. Para aplicar o teste t emparelhado, calculam-se as diferenças entre os valores de concentração para cada par de resultados assim como a média dessas diferenças (TORRES, 2010). Além disso, assumindo-se que se Δ é a diferença média verdadeira entre os resultados dos métodos, pode-se testar a hipótese nula (H_0) de que Δ = 0. Sendo assim, o teste t pareado pode ser aplicado com base na **Equação 08**.

$$t = \frac{\bar{d} - 0}{S_d/\sqrt{n}} \qquad (08)$$

Onde: **n** é o número de amostras analisadas por ambos os métodos e $\mathbf{s_d}$ é o desvio padrão das diferenças.

Após o cálculo do valor de t, deve ser comparado a um valor crítico de $t_{crítico}$ para o número de graus de liberdade (v) dado por v = n-1 e nível de confiança desejado. Geralmente, adota-se o nível de 95% de confiança como um bom compromisso entre confiança estatística e precisão. Como resultado, se o valor de t for maior que o de $t_{crítico}$, a hipótese nula é rejeitada, o que revela uma diferença sistemática significativa entre os resultados no nível de confiança adotado. Isto significa que há uma probabilidade menor que 2,5% (em cada cauda) ou de 5% no total das diferenças nos valores advirem de erros aleatórios (SKOOG, et al., 2006). Caso contrário, não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados dos métodos analíticos.

2.6.5. Teste *t*-emparelhado baseado no conceito de intervalo de confiança

O conceito de intervalo de confiança também pode ser explorado para a aplicação do teste t emparelhado. Novamente, sua implementação requer o cálculo da média das diferenças entre os valores de concentração para cada par de resultados. Admitindo-se que Δ é a diferença média verdadeira entre os resultados dos dois métodos, o intervalo de confiança para Δ é encontrado pela aplicação da **Equação 09**.

$$\Delta = \bar{d} \pm t_v \frac{s_d}{\sqrt{n}} \qquad (09)$$

Onde: n é o número de amostras, $\mathbf{s_d}$ é o desvio padrão da média das diferenças e $\mathbf{t_\upsilon}$é o ponto de distribuição *t* correspondente ao número de graus de liberdade (v = n-1) no nível de confiança desejado, em geral de 95 % (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2007).

A interpretação do intervalo de confiança é realizada da seguinte maneira:

(i) se o valor “zero” estiver contido dentro do intervalo construído, não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados dos dois métodos. Neste caso, a hipótese nula não pode ser rejeitada e a média das diferenças (d) deve ser um ponto da distribuição *t* com Δ = 0;

(ii) caso contrário, existe uma diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados dos métodos ao nível de confiança estatística adotado.

Capítulo III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo da vazão dos canais das válvulas solenóides

O procedimento do estudo de vazão consistiu na medição das massas de água obtidas pela abertura de cada válvula solenóide, individualmente, para os tempos de 1, 3, 5, 7 e 10 segundos. Para cada tempo de abertura foram efetuadas, sequencial, 10 medidas de massa de água em temperatura (aproximadamente 25°C). De posse dos valores, foram calculados a média e o desvio-padrão referente de cada válvula solenóide e com isso estimar a precisão dos volumes.

Como o tempo de abertura das válvulas solenóides é proporcional ao volume inserido à câmara de mistura foi possível construir, para cada válvula solenóide, o gráfico cuja equação da reta descreve a curva de calibração. A estimativa dos volumes foi feita pela relação entre o tempo de abertura da válvula e o volume desejado para cada válvula solenóide, tomando como base a densidade da água a 25 °C. A **figura 3.1** mostra as curvas de calibração das válvulas solenóides nos tempos de 1, 3, 5, 7 e 10 segundos.

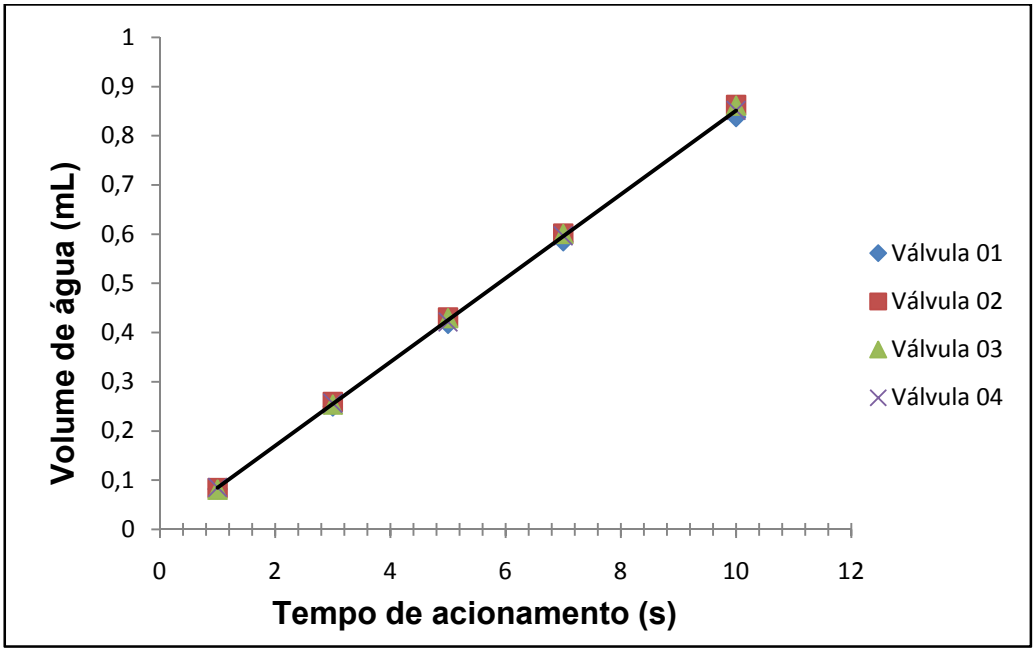

Figura 3.1 – Estudo de vazão para os canais das válvulas solenóides utilizadas no sistema quimiluminescente em fluxo-batelada.

A **tabela 3.1** apresenta as equações utilizadas para o cálculo das vazões de cada canal das válvulas solenóides.

Tabela 3.1 – Equações utilizadas para calcular as vazões dos canais das válvulas solenóides e seus respectivos coeficientes de correlação

Válvula	Equação	R^2
Válvula 01	y = 0,084x-0,002	1
Válvula 02	y = 0,086x-0,001	1
Válvula 03	y = 0,086x-0,001	1
Válvula 04	y = 0,085x-0,000	0,999

A partir do exposto todos os volumes mencionados nos procedimentos de análise foram estabelecidos mediante estudo das vazões e tempos de acionamento das válvulas solenóides.

3.2. Imagens adquiridas durante a geração de um sinal quimiluminescente

Na **Figura 3.2**, são mostradas algumas imagens digitais capturadas durante o fenômeno quimiluminescente (QL) e geração de sinal analítico usando o sistema Analisador Fluxo-Batelada Quimiluminescente Baseada em Imagens Digitais proposto.

Como descrito na **Seção 2.2**, uma região da imagem com 25 x 25 pixels foi selecionada de modo a assegurar uma maior homogeneidade e um sinal QL de melhor qualidade. Os valores de cada componente R, G e B para essa região foram calculados e utilizados na construção do gráfico da **Figura 3.3**.

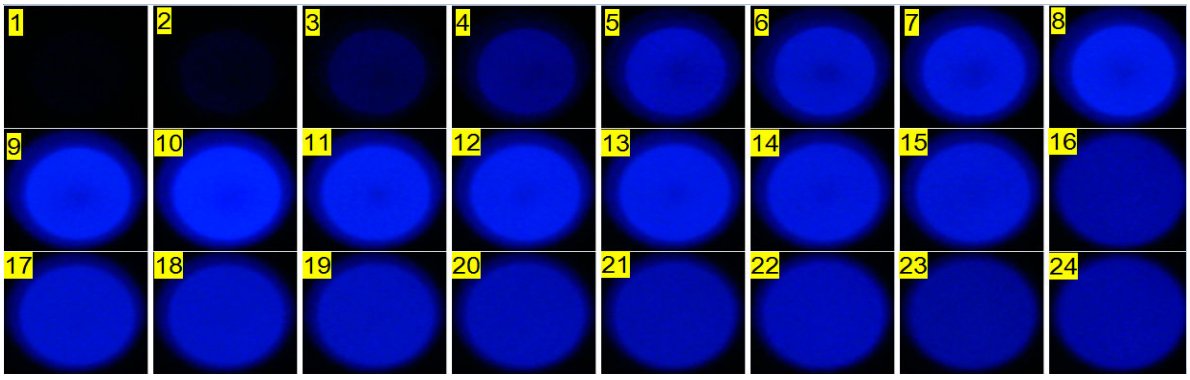

Figura 3.2 – Progresso da quimiluminescência para a solução de Cr (IV) com 100 µg L^{-1}. Imagens digitais capturadas ao longo do tempo

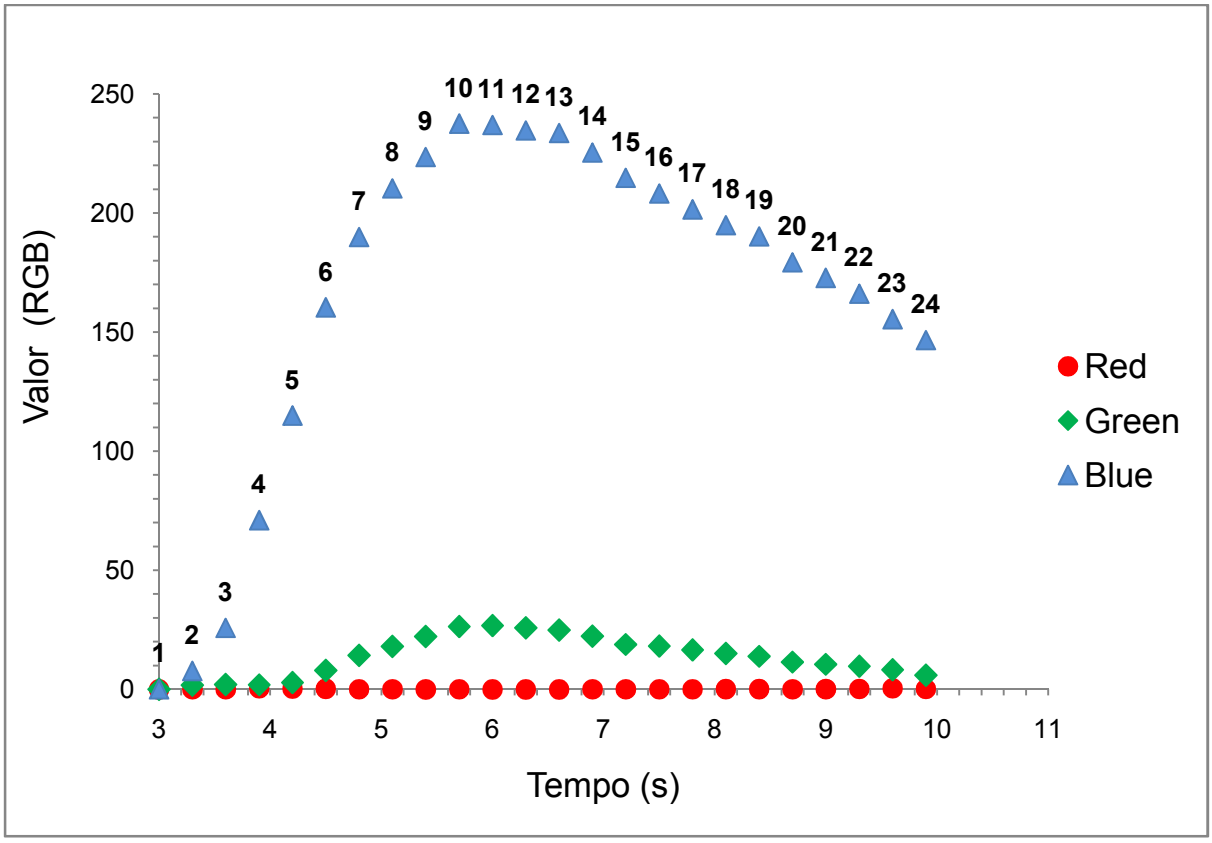

Figura 3.3 – Progresso da quimiluminescência para a solução de Cr (IV) com 100 µg L^{-1}. Variação temporal dos valores individuais de R, G e B correspondentes às imagens capturadas.

Na **Figura 3.2**, pode-se notar que as imagens digitais parecem exibir visualmente apenas a cor azul. No entanto, a componente verde (G) contribui significativamente para a cor da imagem como pode ser facilmente observado no gráfico da **Figura 3.3**. Nota-se que o perfil B (Blue) apresenta um máximo em torno de 6 s, evidenciando o ápice do fenômeno quimiluminescente para a solução de Cr (VI) utilizada no experimento. O mesmo comportamento ocorre com o perfil baseado nos valores da componente G, porém com uma intensidade muito menor.

Essas características atestam que a contribuição da componente azul (B) predomina na quimiluminescência, quando na presença do Cr (III) resultante da redução do Cr (VI) no nível da concentração de luminol utilizada (100 µg L^{-1}).

Apenas a região do máximo (**Figura 3.3**) foi utilizada para construção da curva analítica de modo a contemplar uma maior relação sinal/ruído para as medidas. Por essa razão, não há necessidade de capturar imagens durante todo o tempo de emissão da radiação quimiluminescente.

3.3. Obtenção da curva analítica baseada nos valores médios de R, G e B

A **Figura 3.4** apresenta um gráfico dos valores médios de cada componente R, G e B correspondentes às imagens digitais capturadas para as soluções de calibração de Cr (VI). Observa-se que a contribuição do componente R para a resposta analítica é desprezível quando comparado ao componente G e, principalmente, em relação à B.

A componente B (azul) predomina sobre as demais e responde linearmente em quase toda a faixa de trabalho. Além disso, essa componente tende a "saturar" (valor limite de 255) quando a concentração do analito atinge níveis mais altos, entre 100 e 150 µg L^{-1}. Desse modo, a adoção de somente a contribuição do canal B para a resposta analítica pode levar a curvas analíticas não lineares, assim como valores subestimados para a concentração do analito nas amostras.

Em face dos argumentos acima, os valores de norma adotados como resposta analítica foram determinados a partir dos valores médios das três componentes (R, G e B). Para isso, o modelo matemático proposto por Lyra (2008) baseado na norma de vetor foi adotado para obtenção da resposta analítica, uma vez que contempla o caso geral onde a variação pode envolver qualquer dos componentes individuais ou também envolver dois ou três componentes simultaneamente.

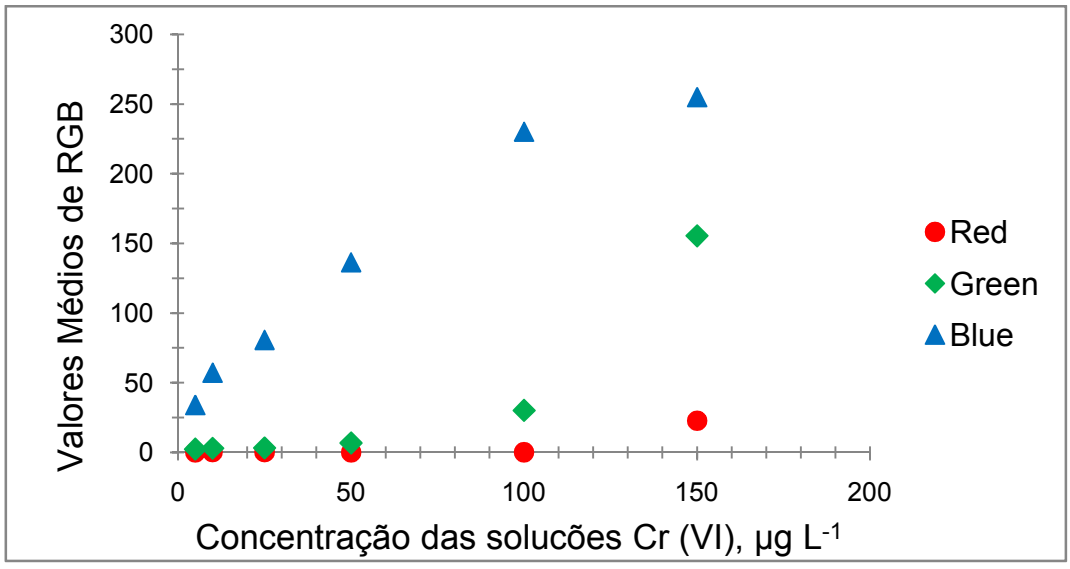

Figura 3.4 – Gráfico dos valores médios individuais das componentes R, G e B das imagens digitais capturadas para as soluções de calibração de Cr (VI).

A **Figura 3.5** mostra a curva analítica obtida a partir dos valores de norma RGB extraídos das imagens digitais capturadas empregando o método proposto. Na

Figura 3.6, apresenta-se a curva analítica obtida a partir dos valores das medidas de absorbância realizadas com o espectrofotômetro HP no método de referência.

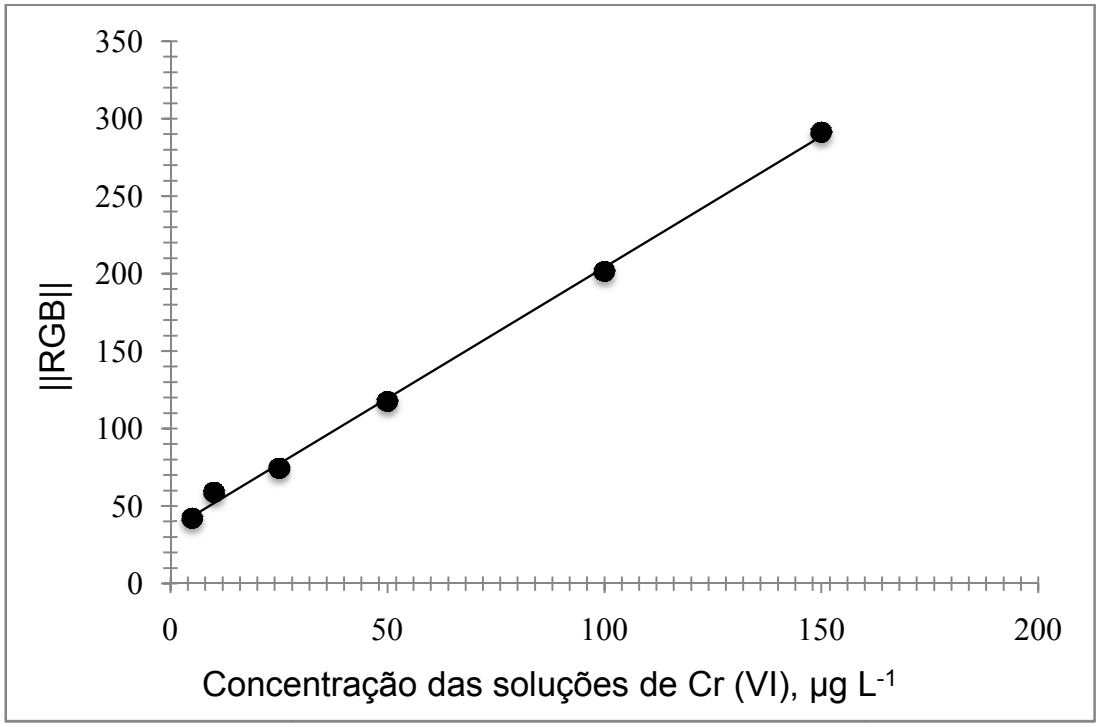

Figura 3.5 – Curva analítica para a determinação de Cr (VI) pelo método quimiluminescente proposto.

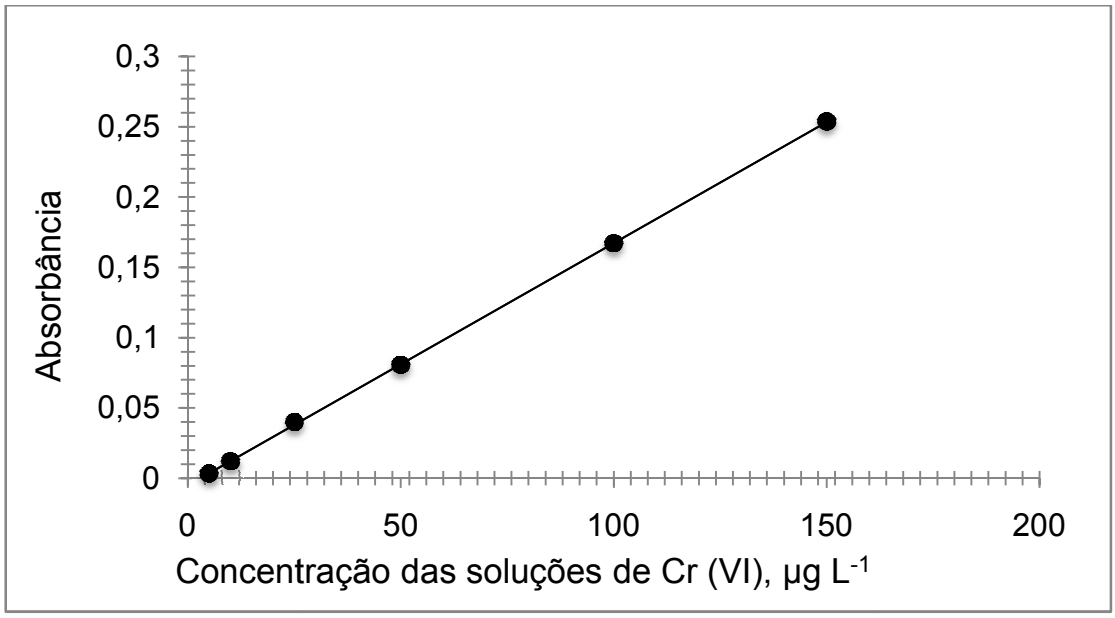

Figura 3.6 – Curva analítica para a determinação de Cr (VI) pelo método de referência.

As curvas analíticas para ambos os métodos foram obtidas a partir de medidas analíticas nos níveis de concentração 5,00; 10,00; 25,00; 50,00; 100,00 e 150,00 µg

L^{-1}. Visualmente, pode-se observar um comportamento linear entre a resposta analítica e a concentração do analito nas soluções de calibração. Tal suposição é corroborada pela análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos (**Figura 3.7**) e por meio dos resultados da ANOVA apresentados nas **Tabelas 3.2** e **3.3**.

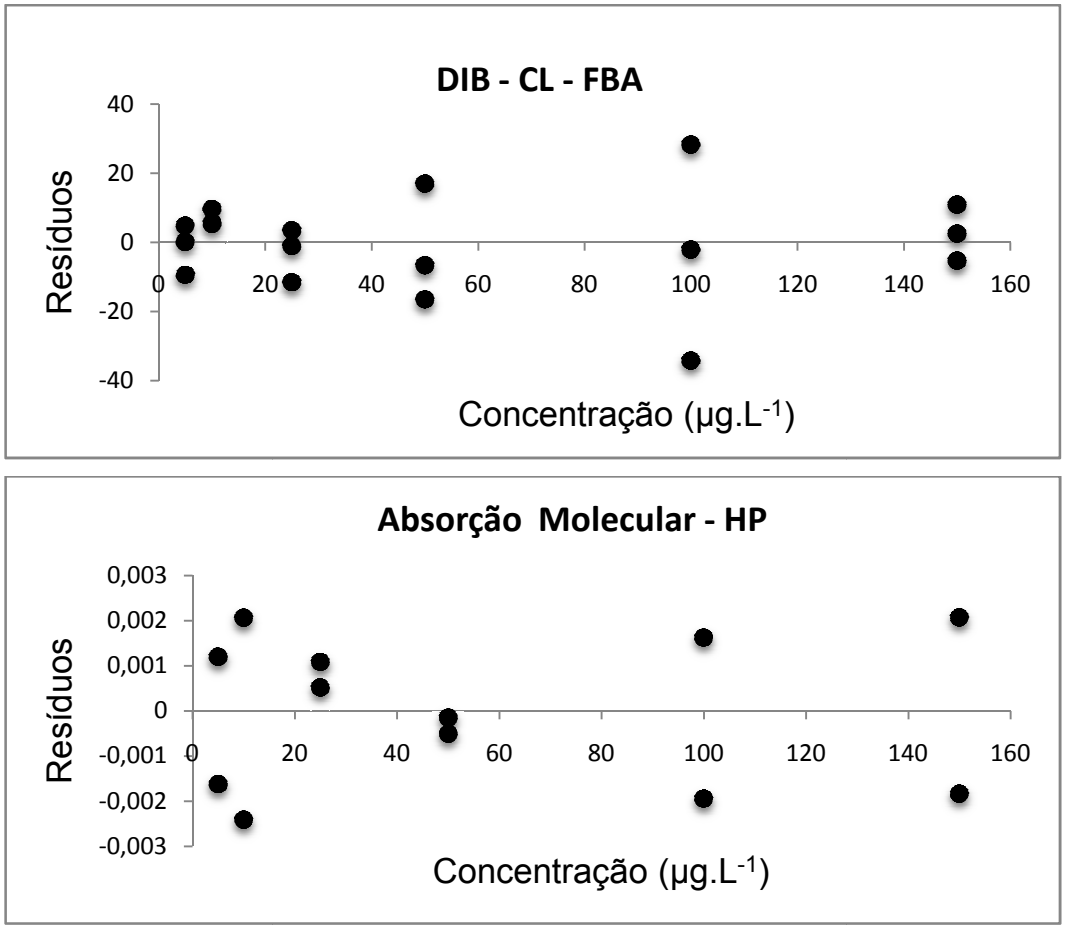

Figura 3.7 – Gráficos dos resíduos deixados pelos modelos dos métodos proposto e de referência.

Pode-se observar na **Figura 3.7** uma distribuição aleatória ao longo da faixa de concentração das soluções de calibração. De fato, não se observa nenhum perfil ou estrutura sistemática que evidencie uma falta de ajuste do modelo linear postulado tanto para o método proposto como para o de referência.

Os resultados da aplicação da ANOVA, empregados para corroborar na validação dos modelos utilizando o método quimiluminescente e o método de referência, são mostrados respectivamente nas **Tabelas 3.2** e **3.3**.

Tabela 3.2 – ANOVA para o modelo linear obtido pelo método proposto.

ANOVA – (DIB-CL-FBA)					
Fonte de variação	**SQ**	**GL**	**MQ**	**Teste F**	
Regressão (R)	141234,2	1	141234,2	Significância de R	
Resíduos (r)	3148,68	16	196,7925	MQ_R/MQ_r	717,681
Falta de Ajuste (faj)	232,92	4	58,23	Falta de Ajuste	
Erro Puro (ep)	2915,76	12	242,98	MQ_{faj}/MQ_{ep}	0,24
Total:	144382,9	17	8493,11	-	

Antes de avaliar a significância estatística da regressão, é necessário verificar se o modelo postulado não apresenta falta de ajuste. Para isso, compara-se o valor da razão MQ_{faj}/MQ_{ep} (**Tabela 3.2**) com o valor de $F_{4,12}$ (ponto de distribuição *F* para 4 e 12 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%) que é igual a 3,26. Como MQ_{faj}/MQ_{ep} é menor que $F_{4,12}$, então que não existe evidência de falta de ajuste do modelo linear ajustado aos dados experimentais. Sendo assim, comparando-se o quociente MQ_R/MQ_r (cujo valor é 717,68, **Tabela 3.2**) com o valor ponto de distribuição $F_{1,16}$ (igual a 4,49), conclui-se que a regressão é altamente significativa.

Tabela 3.3 – ANOVA para o modelo linear obtido pelo método de referência.

ANOVA – (Espectrofotométrico)					
Fonte de variação:	**SQ**	**GL**	**MQ**	**Teste F**	
Regressão (R)	0,024436	1	0,024436	Significância de R	
Resíduos (r)	0,000030	10	2,99x10-06	MQ_R/MQ_r	8167,287
Falta de Ajuste (faj)	0,000022	4	5,54x10-06	Falta de Ajuste	
Erro Puro (ep)	0,000028	6	4,70x10-06	MQ_{faj}/MQ_{ep}	1,179
Total:	0,024466	11	0,002224	-	

Analogamente, a aplicação do teste de falta de ajuste aos dados da **Tabela 3.3** evidencia que o modelo linear obtido com o método de referência também não apresenta falta de ajuste. De fato, o valor do quociente MQ_{faj}/MQ_{ep} (1,179) é menor que o ponto de distribuição $F_{4,6}$ (ao nível de 95% de confiança) atestando a ausência de falta de ajuste do modelo estimado. O teste de significância da regressão revela que a equação do modelo é altamente significativa, pois o valor de MQ_R/MQ_r (8167,287) é muito maior que o ponto de distribuição $F_{4,6}$ (4,96), ao nível de confiança adotado.

Os coeficientes dos modelos de calibração para ambos os métodos, obtidos por regressão linear pelo modelo dos mínimos quadrados, são apresentados na **Tabela 3.4**. Visto que os modelos não apresentam falta de ajuste e descreve adequadamente a relação linear entre o sinal analítico e a concentração na faixa da calibração, foram estimados os erros padrão dos coeficientes de regressão, b_0 e b_1. Para isso, utilizou-se o valor da média quadrática residual (MQ_r) como estimativa da variância populacional dos erros aleatórios ao longo da reta de regressão.

A partir dos estimadores e erros padrão de b_0 e b_1, obteve-se o intervalo de 95% de confiança para os parâmetros populacionais (β_0 e β_1) dos modelos obtidos para ambos os métodos. Os limites obtidos mostram que os intervalos de confiança não contêm o valor zero. Assim, os coeficientes estimados para ambos os modelos são estatisticamente significativos e devem ser mantidos na respectiva equação.

Tabela 3.4 – Coeficientes de regressão e intervalos de confiança para os valores populacionais, β_0 e β_1, dos modelos lineares obtidos para ambos os métodos.

Método	**Modelo: $y = b_0 + b_1 x$**	
	$b_0 \pm t_{(n-2)}$ x erro padrão (b_0)	$b_1 \pm t_{(n-2)}$ x erro padrão (b_1)
DIB-CL-FBA	34,92 ± 10,323	1,690 ± 0,1355
Referência	-0,005 ± 1,638x10^{-3}	0,001 ± 2,123x10^{-5}

Uma vez que as curvas analíticas foram validadas, os valores de LOD, LOQ e sensibilidade foram encontrados para o método proposto e o de referência. Os valores estimados para essas figuras de mérito são mostrados na **Tabela 3.5**. Pode-se observar que o método de referência apresenta valores de LOD e LOQ menores que o método quimiluminescente proposto. Entretanto, o método proposto apresenta uma sensibilidade de calibração maior que a do método espectrofotométrico de referência. Esse fato pode ser justificado, considerando-se o caráter trivariado da resposta analítica (valor RGB das imagens digitais) obtida com uma webcam. De fato, o método proposto utiliza uma webcam com fototransdutor baseado em CCD e filtros que capturam luz nos três canais analíticos (R, G e B) constituindo uma resposta tricromática ou trivariada.

Tabela 3.5 – Figuras de mérito para os métodos DIB-CL-FBA e referência.

Método	Proposto (DIB-CL-FBA)	Referência
LOD (μg L^{-1})	2,20	1,50
LOQ (μg L^{-1})	7,36	5,00
Sensibilidade	1,690	0,001

3.4. Aplicação analítica do método proposto

As curvas analíticas obtidas pelo método quimiluminescente proposto e o método de referência foram utilizadas para estimar as concentrações de Cr (VI) em seis amostras de água superficiais.

Uma prova do branco foi realizada para verificar a ocorrência de Cr (III) nas amostras de água. Os resultados das concentrações encontradas por ambos os métodos, expressas em μg L^{-1}, são apresentados na **Tabela 3.6**.

Tabela 3.6 – Resultados das determinações de cromo (VI) em seis amostras água natural empregando os métodos proposto e de referência.

	Método	
Amostra	Referência	Proposto
01	6,37 ± 0,74	7,68 ± 2,05
02	17,9 ± 1,62	17,18 ± 3,02
03	19,8 ± 1,69	22,91± 4,47
04	18,98 ± 1,61	15,92 ± 2,13
05	6,44 ± 0,56	8,77 ± 4,62
06	13,47 ± 2,49	13,73 ± 5,10
Desvio Padrão Conjunto	1,59	3,77

Os valores da concentração de Cr (VI), obtidos pela aplicação de ambos os métodos, apresentam, em geral, boa concordância entre si apesar de em duas ou três amostras ocorrer uma aparente discrepância. A referida concordância entre os resultados pode ser corroborada pela aplicação do teste *t*-emparelhado. De fato, ao aplicar essa ferramenta baseada no teste de hipóteses, observa-se que não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados ao nível de 95% de confiança. Essa inferência pode ser ratificada pelo teste *t*-emparelhado baseado no intervalo de confiança construído para a diferença média verdadeira (Δ). Para o nível de 95% de confiança, os limites desse intervalo são:

$$\Delta = [-2{,}478;\ 6{,}952]$$

Dado que o referido intervalo contém o valor “zero”, pode-se inferir que não existe diferença sistemática estatisticamente significativa entre os resultados fornecidos por ambos os métodos ao nível de confiança adotado. Portanto, a

hipótese nula de Δ = 0 não pode ser rejeitada (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2010).

Quanto ao desempenho em termos de precisão, pode-se observar na **Tabela 3.6** que o desvio padrão conjunto do método proposto é maior o que atesta uma maior dispersão (ou imprecisão) nas concentrações estimadas. Esse fato pode estar relacionado ao baixo nível de concentração do analito nas amostras analisadas, o que prejudica a repetibilidade dos sinais quimiluminescentes baseados em mais de uma reação química.

Capítulo IV

CONCLUSÃO

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou a viabilidade do uso combinado de imagens digitais RGB com a quimiluminescência para implementar um novo método de determinação de Cr (VI) em águas superficiais, utilizando um sistema em fluxo-batelada. Para atingir esse objetivo, a metodologia proposta se baseia na redução quantitativa de Cr (VI) para Cr (III) que atua como catalisador da reação de oxidação do luminol por peróxido de hidrogênio. A radiação quimiluminescente resultante é capturada por meio de uma webcam e as imagens digitais convertidas para valores de R, G e B usados na obtenção da resposta analítica.

A possibilidade de utilizar o peróxido de hidrogênio no processo de redução do Cr (VI) para Cr (III) (1ª etapa) quanto na oxidação do luminol gerando a radiação QL (2ª etapa), simplificou consideravelmente o método proposto.

O sistema fluxo-batelada montado para a automação da determinação quimiluminescente possui alta versatilidade e flexibilidade analíticas, assim como é de fácil execução pelo programa de controle e aquisição dos sinais. O uso de uma webcam como fotodetector, aliado ao baixo consumo de reagentes e amostras, tornam as análises muito menos dispendiosas. Além disso, minimiza os esforços humanos e a manipulação analítica contribuindo para melhorar a precisão das análises. Entretanto, sua performance analítica pode ser otimizada dado que o tempo de análise pode ser reduzido ainda mais, quando comparado ao método de referência.

O desempenho da metodologia proposta foi avaliado por meio da determinação de Cr (VI) em seis amostras de água coletada em diferentes pontos da cidade de João Pessoa - PB. Os resultados das análises foram estatisticamente similares aos obtidos pelo método espectrofotométrico de referência. Todos os valores de concentração estimados encontram-se abaixo do limite máximo tolerável pala legislação vigente que é de 50 $\mu g\ L^{-1}$.

4.1. Perspectivas e propostas futuras

Este trabalho tem como expectativas futuras a aplicação do método quimiluminescente em fluxo-batelada baseado em imagens digitais para determinação indireta de íons metálicos em amostras de água, bebidas, fármacos.

Tem-se ainda em vista, para estudos futuros, a otimização do sistema proposto, experimentando novas configurações do software de controle, assim como a exploração de outros reagentes quimiluminescentes, tais como a lucigenina e a acetona.

No campo da imagem digital, pretende-se explorar outros modelos de cores, como o HSI (matiz, saturação e intensidade) como resposta analítica. Além disso, pretende-se implementar as determinações quimiluminescentes baseadas em outros métodos de análise quantitativa tal como a titulação.

Capítulo V

Referências

5. REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY [ATSDR]. **Toxicological profile for chromium**. Syracuse: U.S. Department of Health & Human Services, 2000.

ALBERTIN, R. et al. Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para sala de aula. **Química Nova**, 21: 772–779, 1998.

ALMEIDA, L. F.; MARTINS, V. L.; SILVA, E. C.; MOREIRA, P.N.T.; ARAUJO, M. C. U. Implementation of an automatic standard-addition method in a flow-batch system: application to copper determination in alcoholic beverages by AAS. **Analytica Chimica Acta**, 486: 143, 2003.

ALMEIDA, L. F.; VALE, M. G. R.; DESSUY, M. B.; SILVA, M. M.; LIMAC, R. S.; SANTOS, V. B.; DINIZ, P. H. D.; ARAUJO, M. C. U. A flow-batch analyzer with piston propulsion applied to automatic preparation of calibration solutions for Mn determination in mineral waters by ET AAS. **Talanta**, 73: 906−912, 2007.

ANDRADE, R. A. N. **Um Luminômetro Fluxo-Batelada para Determinação Quimiluminescente de Vitamina B12 em Medicamentos**. João Pessoa, UFPB, 2011. Dissertação de Mestrado. 88p.

ANDRADE, S. I. E. **Um Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem Digital para Determinação de Al(III) e Cr(VI) em Águas**. João Pessoa, Departamento de Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 2012. 89p.

ASSUNÇÃO, M. S. **Quimiluminescência Bioluminescência**. Itaúna, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – Curso de Licenciatura Plena em Química, 2009. Monografia, 44p.

AZEVEDO, E.; CONCI, A. **Teoria da computação gráfica**. Rio de Janeiro: Campus, 2003.

BARROS NETO, B. B., SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4ª Ed. Campinas: Editora Unicamp, 2010.

BARTOLONI, F. H. et al. Luz: um raro produto de reação. **Quim. Nova**, 34: 544–554, 2011.

BOWLING, J. L. et al. Rapid determination of chromium in natural waters by chemiluminescence with a centrifugal fast analyser. **Analytical Chimica Acta**, 76, 47-55, 1975.

BRASIL. Resolução CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente 357/05.

BRASIL.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria MS n.º 518/2004 Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

CARNEIRO, J. M. T.; HONORATO, R. S.; ZAGATTO, E. A. G. Individual sample conditioning in flow analysis. Determination of N-total in plant materials. **Fresenius J Anal Chem**, 368: 496−500, 2000.

CLESCERI, L. S.; GRENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**, 20ª ed. American Public Health Association. Washington, DC, 1995.

DODEIGNE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. **Talanta,** 51: 415–439, 2000.

E.C.; ARAUJO, M.C.U. Multicommutated generation of concentration gradients in a flow-batch system for metronidazole spectrophotometric determination in drugs. **Analytica Chimica Acta**, 518: 25, 2004.

FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V.; A Quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise, **Química Nova**, 25: 1003–1011, 2002.

FORMIGA, F M; MEDEIROS, E P; VERAS NETO, J G; GAIÃO, E N; SILVA, E C; ARAUJO, M C U. Um turbidímetro/nefelômetro de fluxo acoplado a um sistema Flow-Batch para “Screening Analysis” automática de cátions em medicamentos. **Controle & Instrumentação**, 83: 65–71, 2003.

GAIÃO, E. N. et al., Digital image-based titrations. **Analytica Chimica Acta**, 570: 283, 2006.

GAMMELGAARD, B.; LIAO, Y. e JØNS, O. Improvement on simultaneous determination of chromium species in aqueous solution by ion chromatography and chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta,** 354, 107-113, 1997.

GARCIA-CAMPAÑA, A. M.; BAEYENS, W. R. G. **Chemiluminescence in Analytical Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 2001.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento de Imagens Digitais**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000.508p.

HONORATO, R. S.; CARNEIRO, J. M. T.; ZAGATTO, E. A. G. Spectrophotometric flow-batch determination of aluminum in plant tissues exploiting a feedback mechanism. **Analytica Chimica Acta**, 441: 309–315, 2001.

HONORATO, R. S.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, R. A. C.; ARAUJO, M. C. U. Prior assay as an approach to flow titrations spectrophotometric determination of iron in alloys and ores. **Analytica Chimica Acta**, 416: 231−237, 2000.

HONORATO, R.S. et al. A flow-batch titrator exploiting a onedimensional optimisation algorithm for end point search. **Analytica Chimica Acta**, 396:91, 1999.

ISACSSON, U.; WETTERMARK, G. Chemiluminescence in Analytical Chemistry. **Analytica Chimica Acta**, 68: 339-362, 1974.

KENNY, F.; KURTZ, R. B. Dark-Chamber Titrimeter for Chemiluminescent Indicator Titrations in Colored Solutions. **Analytical Chemistry**, 382-383,1951

KENNY, F.; KURTZ, R. B. Luminol as a Chemiluminescent Indicator in Photometric Titration of Solutions of High Opacity. **Analytical Chemistry**, 1218-1219,1952

KOLEV, S.D.; MCKELVIE, I.D. Comprehensive analytical chemistry advancer in flow injection analysis and relater techniques, Oxford, Elsevier, 2008.

LEITE, O. D. et al. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Quim. Nova**, 27: 337–341, 2004.

LI, M.; LEE, S. H. Determination of As (III) and As (V) ions by chemiluminescence method. **Microchemical Journal**, 80: 237–240, 2005.

LIMA, R. A. C.; SANTOS, S.R.B.; COSTA, R.S.; MARCONE, G.P.; HONORATO, R.S.; NASCIMENTO, V.B.; ARAUJO, M.C.U. Hardness Screening of Water Using a Flow-batch Photometric System. **Analytica Chimica Acta**, 518: 25, 2004.

LIU, M.; LIN, Z.; LIN, Jin-Ming. A review on applications of chemiluminescence detection in food analysis. **Analytica Chimica Acta**, 670: 1–10, 2010.

LU, J.; ZHANG, Z.; QIN, W.; FENG, M.; WANG, Y. A flow-injection type chemiluminescence-based sensor for Cyanide. **Analytica Chimica Acta** 304: 369-373, 1995.

LYRA, W. S. **Espectrometria de Emissão em Chama Baseada em Imagens Digitais**. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2008. Dissertação de mestrado, 103p.

LYRA, W. S. et al. Digital image-based flame emission spectrometry.**Talanta**, 77: 1584–1589, 2009.

MALEKI, N.; SAFAVI, A.; SEDAGHATPOUR, F. Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD câmera. **Talanta**, 64: 830–835, 2004.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S. W.; SINDI, H.; WHITESIDES, M. Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real time, off-site diagnosis. **Anal. Chem**, 80: 3699, 2008.

MEDEIROS, E.P.; NASCIMENTO, E.C.L.; MEDEIROS, A.C.D.; VERAS NETO, J.G.; SILVA, E. C.; ARAUJO, M. C. U. Multicommutated generation of concentration gradients in a flow-batch system for metronidazole spectrophotometric determination in drugs. Analytica Chimica Acta, 518: 25, 2004.

MIKUŠKA, P.; VEČEŘA, Z.; ZDRÁHAL, Z. Flow-Injection chemiluminescence determination of ultra low concentration of nitrite ions water. **Analytica Chimica Acta** 316: 261-268, 1995.

MIOT, H. A.; PAIXÃO, M. P.; PASCHOAL, F. M. Fundamentos da fotografia digital em Dermatologia. **An. Bras Dermatol**. 81(2): 174-80, 2006.

MIRETZKYA, P.; CIRELLI, F. A. Cr (VI) and Cr (III) removal from aqueous solution by raw and modified lignocellulosic materials: A review. **Journal of Hazardous Materials** 180: 1–19, 2010.

MONEMI, N. et al, CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein, **Analytica Chimica Acta**, 387: 21, 1999.

MONTE FILHO, S. S. **Microfabricação de um analisador em Fluxo-Batelada (Micro Flow-Batch) à base de polímero fotocurável Uretano-Acrilato**. João Pessoa, 2010. Dissertação de Mestrado.

MOREIRA, P. N. T. **Planejamento e Otimização de um Método Quimiluminescente para Determinação de Vitamina B12 Usando um Sistema Fluxo-Batelada**. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009. Tese de doutorado, 114p.

NASCIMENTO, J. A.; DIONÍSIO, A. G. G.; NASCIMENTO, E. C. L. FREITAS, S. K. B.; ARAUJO, M. C. U. Análise Screening um analisador fluxo-batelada, espectroscopia UV-VIS e quimiometria. **Química Nova**, 33 (2): 351-357, 2010.

NERY, A. L. P.; BAADER, W. J. Quimiluminescência de peróxidos orgânicos: geração de estados eletronicamente excitados na composição de 1,2 – dioxetanos. **Química Nova**, 24: 626–636, 2001.

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

PIMENTEL, M. F. e BARROS NETO, B. B., Calibração: uma revisão para químicos analíticos, **Química Nova**, 19: 268, 1996.

R. S.; SANTOS, V. B.; DINIZ, P. H. D.; ARAUJO, M. C.U. A flow-batch analyzer with piston propulsion applied to automatic preparation of calibration solutions for Mn determination in mineral waters by ET AAS. **Talanta**, 73: 906–912, 2007.

REIS, B. F. et al. Desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo para medidas por quimiluminescência. **Química Nova**, 25: 1191–1193, 2002.

REIS, B.F. et al. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron plant digests. **Anal. Chim. Acta**, 293:129, 1994.

RIVERA, J. F. L. **Estudo da redução de Cr (VI) por ácido nítrico**. Campinas. Universidade Estadual de Campinas, 1997. Tese de Doutorado. 229p.

ROBARDS, K.; WORSFOLD, P.J. Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence. **Analytical Chimica Acta**, 266: 147-173, 1992.

ROCHA, F. R. P. e REIS, B. F., A low-cost device for automatic photometric titrations, **Journal of Chemical Education**, 77: 258, 2000.

ROCHA, F. R. P., et al. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, 468: 119–131, 2002.

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

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

SANTOS, R. M. S.; SANTOS, M. F.; COSTA, M. F. D. Quimiluminescência e bioluminescência. **Quim. Nova**, 16: 200–209, 1993.

SCURI, A. E. **Fundamentos da Imagem Digital**. Tecgraf/PUC-Rio, 2002. Apostila.

SEITZ, W. R.; SUYDAM, W. W.; HERCULES, D. M. determination of Trace Amounts of Chromium(III) Using Chemiluminescence Analysis. **Anal. Chem**. 44(6): 957, 1972.

SILVA, C. S.; PEDROZO, M. F. M. **Ecotoxicologia do cromo e seus compostos**. Salvador: CRA, 2001.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN T. A. **Princípios de análise Instrumental**. 6ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DIAS, I. L. T.; LANZA, M. R. V.; MOREIRA, A. B.; KUBOTA, L. T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, 31(7): 1755-1774, 2008.

STEVANI, C. V.; BAADER, W. J. O sistema quimiluminescente peróxi-oxalato. **Quim. Nova**, 22: 715–723, 1999.

SUSSULINI, A.; ARRUDA, M. A. Z. Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré-concentração no ponto nuvem. **Ecl. Quím**., São Paulo, 31(1): 73-80, 2006

TORRES, A. R. **Determinação da Acidez Total de Vinhos Tintos EmpregandoTitulações Baseadas em Imagens Digitais**. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2010. Dissertação de mestrado, 74p.

WILLIAMS, T.; JONES, P e EBDON, L. Simultaneous determination of Cr (III) and Cr (VI) at ultratrace levels using ion chromatography with chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography**, 482, 361-366, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. **Chromium.** Geneva, 1988. (Environmental Health Criteria, 61).

YAO, D.; VLESSIDIS, A. G.; EVMIRIDIS, N. P.; EVANGELOU, A.; KARKABOUNAS, S.; TSAMPALAS, S. Luminol chemiluminescense reaction: a new method for monitoring nitric oxide in vivo. **Analytica Chimica Acta,** 458: 281–289, 2002.

ZAGATTO, E.A.G. et al. Information essential for characterizing a flow-based analytical system, International Union of Pure and Applied Chemistry, 74:585, 2002.

ZHANG, Z.; QIN, W. LIU, S. Chemiluminescence flow system for the monitoring of chromium (VI) in water. **Analytical Chimica Acta**, 318, 71-76, 1995.