



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

Dissertação de Mestrado

Um Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem
Digital para Determinação de Al(III) e Cr(VI) em Águas

Stéfani Iury Evangelista de Andrade

João Pessoa – PB - Brasil

Março/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 Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem Digital para Determinação de Al(III) e Cr(VI) em Águas

Stéfani Iury Evangelista de Andrade*

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

Março/2012

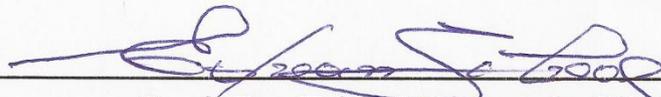
A553c Andrade, Stéfani lury Evangelista de.
Um analisador fluxo-batelada baseado em imagem digital
para determinação de Al(III) e Cr(VI) em águas / Stéfani lury
Evangelista de Andrade.-- João Pessoa, 2012.
87f. : il.
Orientador: Edvan Cirino da Silva
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN
1. Química Analítica. 2. Analisador fluxo-batelada.
3. Imagem digital. 4. Sistema de cor RGB. 5. Al(III).
6. Cr(VI). 7. Água.

UFPB/BC

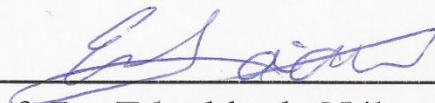
CDU: 543(043)

Um Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem Digital para Determinação de Al(III) e Cr(VI) em Águas.

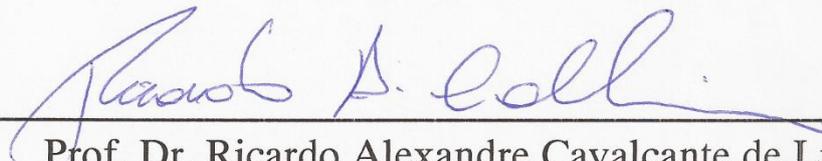
Dissertação de Mestrado de Stefani Iury Evangelista de Andrade aprovada pela banca examinadora em 09 de março de 2012:



Prof. Dr. Edvan Cirino da Silva
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Edvaldo da Nóbrega Gaião
Examinador



Prof. Dr. Ricardo Alexandre Cavalcante de Lima
Examinador

*Aos meus pais, Tito e Rosa,
meus irmãos, Séfora, Steniel e Sabrina
e meu avô Joaquim (in memoriam),
com muito carinho eu dedico.*

Agradecimentos

- À Deus;
- À Séfora e Joab, pela amizade, apoio e incentivo em todos os momentos;
- Ao professor Edvan Cirino da Silva, pela orientação e confiança durante toda iniciação científica e mestrado;
- Ao professor Mário César Ugulino de Araújo, pelos ensinamentos, confiança e sugestões;
- Ao amigo Marcelo Batista de Lima, pela relevante contribuição e ajuda na parte experimental;
- Aos professores Edvaldo da Nóbrega Gaião, Ricardo Alexandre e Luciano Farias, por todas sugestões na pré-defesa e na defesa;
- Aos amigos Cleilson, Flaviano, Sófacles, Inakã, Renato, Anabel, Chico e a todos os demais membros do LAQA, pela amizade e convivência agradável.
- E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPQ, pela bolsa concedida;

Sumário

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	x
Lista de Siglas e Abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xv
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Caracterização da Problemática	2
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Geral	4
1.2.2 Específicos.....	4
1.3 Sistemas Automáticos de Análise	5
1.3.1 Analisador em Fluxo Segmentado (SFA)	7
1.3.2 Analisador por Injeção em Fluxo (FIA)	7
1.3.3 Analisador em Fluxo Monosegmentado (MSFA)	8
1.3.4 Analisador por Injeção Sequencial (SIA)	9
1.3.5 Analisador em Fluxo com Multicomutação (MFA)	9
1.3.6 Analisador em Fluxo-Batelada (FBA)	10
1.4 Métodos Analíticos Baseados em Imagem Digital.....	12
1.5 Determinação de Metais em Água	15
1.5.1 Métodos para Determinação de Alumínio	18
1.5.2 Métodos para Determinação de Cromo	22
Capítulo 2 Experimental	27
2.1 Reagentes, Amostras e Soluções	28
2.1.1 Determinação de Alumínio	28
2.1.2 Determinação de Cromo	29
2.2 Equipamentos	30
2.3 Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem Digital	30
2.3.1 Câmara de Mistura.....	31
2.3.2 Bomba Peristáltica	32
2.3.3 Válvulas Solenoides	33
2.3.4 Acionador de Válvulas	33
2.3.5 Sistema de Detecção.....	34

2.4 Programa de Gerenciamento do DIB-FBA	35
2.5 Programa de Tratamento e Análise das Imagens Digitais	36
2.6 Procedimentos do DIB-FBA	38
2.6.1 Procedimento para Determinação de Al(III)	40
2.6.2 Procedimento para Determinação de Cr(VI)	41
2.7 Procedimentos para os Métodos de Referência	42
2.8 Procedimentos para Avaliação da Performace Analítica	42
Capítulo 3 Resultados e Discussão	47
3.1 Tratamento das Imagens Digitais.....	48
3.2 Obtenção das Respostas e Curvas Analíticas.....	50
3.3 Validação da Curva Analítica para Determinação de Al(III).....	51
3.4 Validação da Curva Analítica para Determinação de Cr(VI).....	55
3.5 Aplicações Analíticas do Sistema Proposto.....	59
Capítulo 4 -Conclusão	62
4.1 Conclusão	63
4.2 Perspectivas.....	64
Referências	65

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Esquema ilustrativo dos principais componentes do FBA. (a) Câmara de mistura, (b) válvulas solenoides, (c) agitador magnético, (d) bomba peristáltica, (e) acionador de válvulas, (f) exemplo de detector, UV-Vis-NIR (g) computador.....	10
Figura 1.2 – Equação da reação de complexação de Al(III) empregando a quercetina ^[70]	21
Figura 1.3 – Equação da reação de complexação de Cr(VI) empregando a difenilcarbazida ^[73]	25
Figura 2.1 – Fotografia do DIB-FBA. (a) Câmara de mistura, (b) <i>webcam</i> , (c) bomba peristáltica, (d) válvulas solenoides, (e) acionador de válvulas, (f) agitador magnético e (g) notebook.	31
Figura 2.2 – Ilustração tridimensional da câmara de mistura empregada. (a) Vista frontal e (b) corte lateral.	32
Figura 2.3 – Fotografia de uma válvula solenoide de três vias.....	33
Figura 2.4 – Diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009.	34
Figura 2.5 – Fotografia do posicionamento da <i>webcam</i>	35
Figura 2.6 – Interface do programa de controle do DIB-FBA.....	35
Figura 2.7 – Interface do programa <i>ImageJ</i> utilizado para o tratamento e seleção da área das imagens.....	37
Figura 2.8 – Janela do programa <i>ImageJ</i> apresentando os resultados das análises das componentes RGB da área selecionada.	38
Figura 2.9 – Diagrama esquemático DIB-FBA. Câmara de mistura (CM), bomba peristáltica (BP), barra magnética (BM), agitador magnético (AM), <i>webcam</i> (WC) e válvulas solenoides (V1, V2, V3, V4 e V5). Para a determinação de Al(III): R1, quercetina; R2, CTAB. Para a determinação de Cr(VI): R1, DPC; R2 não foi utilizado.	39

- Figura 2.10** – Diagrama dos tempos (em segundos) usados para as análises das amostras de água durante a determinação de Al(III). t_{V1} , t_{V2} , t_{V3} , t_{V4} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V1, V2, V3, V4 e V5, respectivamente; t_{WC} é o tempo de captura das imagens..... 40
- Figura 2.11** – Diagrama dos tempos (em segundos) usado para as amostras de água durante a determinação de Cr(VI). t_{V1} , t_{V2} , t_{V4} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V1, V2, V4 e V5, respectivamente; t_{WC} é o tempo de captura das imagens. A válvula V3 não foi utilizada. 41
- Figura 2.12** – Curvas analíticas e equações utilizadas nos cálculos de LOD (a) e LOQ (b) ^[82]. 44
- Figura 3.1** – Imagens digitais obtidas utilizando o DIB-FBA com a área selecionada (100 x 80 pixels). Os complexos (a) Al(III)-quercetina-CTAB e (b) Cr(VI)-DPC de algumas soluções de calibração ($\mu\text{g L}^{-1}$) e a solução do branco para cada análise. 48
- Figura 3.2** – Dados RGB das soluções de calibração do complexo Al(III)-quercetina-CTAB (10 a 600 $\mu\text{g L}^{-1}$). 49
- Figura 3.3** – Dados RGB das soluções de calibração do complexo Cr(VI)-DPC (10 a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$). 50
- Figura 3.4** – Curvas de calibração DIB-FBA (linha vermelha) e HP (linha azul) para a determinação de Al(III). 51
- Figura 3.5** – Gráficos dos resíduos dos modelos de calibração DIB-FBA e HP para a determinação de Al(III). 53
- Figura 3.6** – Curvas de calibração DIB-FBA (linha vermelha) e HP (linha azul) para a determinação de Cr(VI). 56
- Figura 3.7** – Gráficos dos resíduos dos modelos de calibração DIB-FBA e HP para a determinação de Cr(VI). 57

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 – Utilização e classificação das águas do território brasileiro, estabelecido pelo CONAMA ^[59]	16
Tabela 1.2 – Valores máximos da concentração (mg L ⁻¹) de alguns metais estabelecido pelo CONAMA ^[59]	17
Tabela 2.1 – ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ.....	45
Tabela 3.1 – Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos para a determinação de Al(III) em águas.....	52
Tabela 3.2 – Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas (ANOVA), para a determinação de Al(III).	54
Tabela 3.3 – Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração para a determinação de Al(III).....	54
Tabela 3.4 – Valores de LOD e LOQ, em µg L ⁻¹ , estimados ao nível de 95% de confiança, para a determinação de Al(III) em água.....	55
Tabela 3.5 – Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos para a determinação de Cr(VI) em águas.....	56
Tabela 3.6 – Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas (ANOVA), para a determinação de Cr(VI).	58
Tabela 3.7 – Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração para a determinação de Cr(VI).....	58
Tabela 3.8 – Valores de LOD e LOQ, em µg L ⁻¹ , estimados ao nível de 95% de confiança, para a determinação de Cr(VI) em água.....	59
Tabela 3.9 – Valores médios das concentrações preditas (n=3) das amostras de água natural para a determinação de Al(III) em µg L ⁻¹ utilizando o DIB-FBA e o HP.	60

Tabela 3.10 – Valores médios das concentrações preditas (n=3) das amostras de água residual para a determinação de Cr(VI) em $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando o DIB-FBA e o HP.	60
--	----

Lista de Siglas e Abreviaturas

ANOVA – Analysis of variance (análise de variância)

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

CMOS – Complementary metal-oxide semiconductor (semicondutor metal-óxido complementar)

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CTAB – Cetyltrimethylammonium bromide (brometo de cetiltrimetilamônio)

DIB-FBA - Digital image-based flow-batch analyzer (analisador fluxo-batelada baseado em imagem digital)

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

ECR – Eriocromo cianina R

FAAS – Flame atomic absorption spectrometry (espectrometria de absorção atômica com chama)

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

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

GC – Gas Chromatography

GF-AAS – Graphite furnace atomic absorption spectrometry (espectrometria de absorção atômica em forno de grafite)

HPLC – High-performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

ICP-MS – Inductively coupled plasma mass spectrometry (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado)

ICP-OES – Inductively coupled plasma optical emission emission spectroscopy (espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado)

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

LED – Light emitting diode (diodo emissor de luz)

LOD – Limit of detection (limite de detecção)

LOQ – Limit of quantitation (limite de quantificação)

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

MS – Mass spectrometry (espectrometria de massa)

MSFA – Monosegmented flow analyser (analisador em fluxo monosegmentado)

PIXEL – 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

Título: **Um Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem Digital para Determinação de Al(III) e Cr(VI) em Águas**

Esse estudo propõe um analisador fluxo-batelada baseado em imagem digital (DIB-FBA) para determinação de Al(III) e Cr(VI) em águas. O DIB-FBA utiliza uma webcam com sensor CCD para a aquisição das imagens geradas de acordo com o sistema de cor RGB (*Red-Green-Blue*). O método para a determinação de Al(III) baseia-se na reação com quercetina e o brometo de cetiltrimetilamônio, produzindo um complexo amarelo com máximo de absorção em 428 nm. A determinação de cromo é baseada na reação do íon Cr(VI) com 1,5-difenilcarbazida, cujo o produto é um complexo de coloração violeta com máximo de absorção em 548 nm. Todas as soluções de calibração foram preparadas in-line e todos os processos analíticos foram realizados simplesmente mudando os parâmetros operacionais do aplicativo de controle do DIB-FBA. A resposta linear para o Al(III) se estende de 10 a 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para o Cr(VI) de 10 a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os modelos lineares das curvas analíticas foram validados por intermédio de ANOVA, teste F para falta de ajuste e da análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos. Os limites de detecção e as frequências analíticas foram estimadas como sendo, respectivamente, 3,97 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 137 h^{-1} , para o Al(III) e 3,40 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 134 h^{-1} , para o Cr(VI). Os resultados da aplicação do DIB-FBA foram comparados com os obtidos empregando os respectivos métodos de referência. Constatou-se que não existe nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os resultados, aplicando o teste t -pareado ao nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: Analisador fluxo-batelada, Imagem digital; Sistema de cor RGB; Al(III); Cr(VI); Água.

Abstract

Title: **A Digital Image-Based Flow-Batch Analyzer for Al(III) and Cr(VI) Determination in Waters**

This study proposes a digital image-based flow-batch analyzer (DIB-FBA) for the determination of Al(III) and Cr(VI) in waters. The proposed DIB-FBA uses a webcam with CCD sensor for acquisition of the images generated according to the RGB (Red-Green-Blue) colour system. The method for determination of Al(III) is based on reaction of this ion with quercetin and cetyltrimethylammonium bromide, yielding a yellow complex with maximum absorption at 428 nm. Chromium(VI) determination is accomplished by reaction of this ion with 1,5-diphenylcarbazide, whose product is a violet complex with maximum absorption at 548 nm. All calibration solutions were prepared in-line, and all analytical processes completed by simply changing the operational parameters in the DIB-FBA control software. The linear response ranges from 10 to 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Al (III) and from 10 to 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cr (VI). Linear models for analytical curves were validated using ANOVA, *F*-test for lack of fit and residual plots. The limits of detection and sampling rates were estimated as 3,97 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 137 h^{-1} , for Al(III) and 3,40 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 134 h^{-1} , for Cr(VI), respectively. DIB-FBA performance was compared with the reference methods for determination of both analytes, and no statistically significant difference was observed between results by applying the paired t-test at a 95% confidence level.

Keywords: Flow-batch analyzer; Digital images; RGB colour system; Al(III); Cr(VI); Water.

Capítulo 1
Introdução

1.1 Caracterização da Problemática

A poluição de ambientes aquáticos por metais tem despertado um considerável interesse público e científico, devido à sua toxicidade para a saúde humana e sistemas biológicos. As propriedades toxicológicas e biológicas de muitos elementos dependem de suas formas químicas, ou seja, do estado de oxidação [1]. Por causa da diferença da toxicidade dos diferentes estados redox de alguns metais, há uma necessidade de desenvolver métodos analíticos para determinar cada uma destas espécies com suficiente precisão e sensibilidade [2,3]. Determinações de metais, tais como alumínio e cromo tem especial importância em matrizes ambientais.

Várias técnicas instrumentais têm sido utilizadas para a determinação de Al e Cr em matrizes ambientais, tais como cromatografia [4,5], espectrometria de absorção atômica [6], voltametria [7], espectrofluorimetria [8,9], quimiluminescência [10] e espectrofotometria [11-13]. Além disso, a literatura reporta a automatização dos procedimentos para derminação de alumínio e cromo usando diferentes analisadores por injeção em fluxo [8,12,14], conhecidos como FIA (do inglês: *Flow Injection Analyser*). Com os analisadores FIA, essas determinações podem ser realizadas com elevada taxa de amostragem, alta reprodutibilidade, menor interferência do analista e consumo de reagentes e amostras, etc. No entanto, esses analisadores podem apresentar algumas desvantagens, como a perda de sensibilidade, devido à dispersão da amostra, e a necessidade de uma nova configuração física do sistema para cada tipo de análise requerida [15].

Uma alternativa que pode minimizar estes inconvenientes é a utilização dos analisadores fluxo-batelada [16] ou em inglês *Flow-Batch Analyser* (FBA), que alia as características favoráveis dos sistemas em fluxo e dos sistemas em batelada. Uma das principais características do FBA é a existência de uma câmara de mistura (CM) a qual permite a realização de grande parte dos processos analíticos como o pré-

tratamento, homogeneização e reações químicas. Além disso, o FBA também permite integrar o sistema de detecção à sua CM, tornando o processo de análise ainda mais rápido [17].

A detecção integrada à própria CM pode ser realizada utilizando dispositivos como LED's (do inglês: *Light Emitting Diode*), fototransdutores, fibras óticas e fotodiodos, dependendo do tipo de análise. Em determinações envolvendo imagens digitais, pode ser utilizada uma *webcam* direcionada para uma câmara de mistura transparente colocada em um ambiente com iluminação uniforme.

Recentemente, métodos baseados em imagens digitais vêm sendo utilizados como uma alternativa satisfatória para determinações quantitativas em ciências analíticas [18-30]. Estes métodos geralmente empregam o sistema de cor RGB (do inglês: *Red Green Blue*) onde os valores individuais das cores primárias variam de 0 a 255 (8 bits) [18-24]. Essas imagens podem ser capturadas a partir de *scanner*, *webcam* e câmeras digitais com sensores baseados em CCDs (do inglês: *Charge-Coupled Devices*) ou em CMOS (do inglês: *Complementary Metal-Oxide Semiconductor*) [31].

Neste trabalho de pesquisa foi proposto um analisador automático fluxo-batelada para determinação dos íons alumínio (III) e cromo (VI) em águas, utilizando como sistema de detecção uma *webcam* e dados RGB.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Desenvolver um analisador fluxo-batelada baseado em imagem digital (DIB-FBA) obtida com uma *webcam*, para determinação de Al(III) e Cr(VI) em águas.

1.2.2 Específicos

- Propor um analisador fluxo-batelada, para a determinação de Al(III) e Cr(VI) em águas, utilizando uma única configuração física do sistema;
- Usar, como sistema de detecção do analisador, uma *webcam* para obtenção das imagens digitais produzidas durante as análises;
- Relacionar as imagens digitais com as concentrações dos complexos obtidos com o Al(III) e com o Cr(VI);
- Desenvolver um programa para controle das operações do sistema, aquisição e tratamento das imagens digitais;
- Configurar os parâmetros operacionais do analisador e da conexão com a *webcam*;
- Aplicar o DIB-FBA à determinação de Al(III) e Cr(VI) em amostras de água;
- Avaliar o desempenho analítico em termos das figuras de mérito.

1.3 Sistemas Automáticos de Análise

Os procedimentos convencionais de análises químicas (procedimentos em batelada) 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 [32].

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. Esses sistemas podem ser divididos em três grandes grupos [33]: os analisadores automáticos discretos, robotizados e em fluxo.

Os analisadores automáticos discretos têm como principal característica, a utilização de dispositivos mecânicos para o transporte da amostra até o sistema de detecção. A amostra é armazenada em recipientes individuais e os equilíbrios físicos e químicos são controlados permitindo explorar a máxima sensibilidade dos métodos. Isso é importante principalmente quando as determinações envolvem reações de cinética lenta, sendo necessário um tempo maior de residência para que os equilíbrios físico e químico sejam alcançados. Todavia, esses analisadores possuem uma baixa frequência analítica, além de um alto

custo de aquisição e manutenção, tornando-os pouco atraentes nos laboratórios de rotina ou de pequeno porte.

Analísadores automáticos robotizados apresentam uma complexidade mecânica, custo de aquisição e manutenção maiores que os analisadores discretos. Sua principal característica é realizar manipulações analíticas utilizando braços mecânicos robotizados, isso os torna importantes durante a realização de procedimentos analíticos que exigem o emprego de substâncias tóxicas, radiotivas e/ou explosivas, evitando a exposição do analista nessas situações.

Os analisadores automáticos em fluxo, por apresentarem uma instrumentação simples, menor intervenção do analista, reduzido consumo de reagentes e amostra, obtenção de uma maior 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 [34].

A IUPAC (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*) [35] e algumas referências encontradas na literatura [34,36,37], 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.

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

- Analísador em Fluxo Segmentado (do inglês: *Segmented Flow Analyser* – SFA);
- Analísador por Injeção em Fluxo (do inglês: *Flow Injection Analyser* – FIA);
- Analísador em Fluxo Monosegmentado (do inglês: *Monosegmented Flow Analyser* – MSFA);
- Analísador 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).

Nas seções a seguir, apresenta-se uma descrição das características, vantagens e limitações dos diferentes tipos de analisadores em fluxo.

1.3.1 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) ^[38]. 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 os equilíbrios 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.

1.3.2 Analisador por Injeção em Fluxo (FIA)

Ruzicka e Hansen caracterizaram, em 1975, o Analisador por Injeção em Fluxo (FIA) ^[39]. 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. Conseqüentemente, a

sensibilidade do método pode ser inferior à obtida pelos analisadores automáticos discretos e robotizados. 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.

1.3.3 Analisador em Fluxo Monosegmentado (MSFA)

Pasquini e Oliveira propuseram, em 1985, o primeiro Analisador em Fluxo Monosegmentado (MSFA) [40]. 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 (fluido transportador-amostra e reagente(s)-fluido transportador) 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. Para aliar uma maior frequência analítica bastam introduzir sequencialmente as amostras, enfileirando-se os diversos monosegmentos no percurso analítico.

Portanto, os sistemas MSFA combinam as características favoráveis dos analisadores SFA (p. ex. mínima dispersão e intercontaminação das amostras, possibilitando alcançar longos tempos de residência sem comprometer os equilíbrios físico e químico) com as dos sistemas FIA que incluem uma maior velocidade analítica e um menor consumo de amostra e reagentes.

1.3.4 Analisador por Injeção Sequencial (SIA)

O Analisador por Injeção Sequencial (SIA) foi proposto por Ruzicka e Marshall em 1990 [41]. 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 carecteristicas obtidas por outros analisadores automáticos em fluxo, como reprodutibilidade, robustez, versatilidade, 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.

1.3.5 Analisador em Fluxo com Multicomutação (MFA)

Reis e colaboradores desenvolveram, em 1994, o Analisador em Fluxo com Multicomutação (MFA) [42]. 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 solenoides de três vias ou minibombas solenoides. 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 [43].

1.3.6 Analisador em Fluxo-Batelada (FBA)

Em 1999, Honorato e colaboradores propuseram os Analisadores em Fluxo-Batelada, ou em inglês *Flow-Batch Analyser* (FBA) [16], que incorporam 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. Na Figura 1.1 é apresentado um esquema ilustrativo destacando os principais componentes necessários para a montagem do FBA.

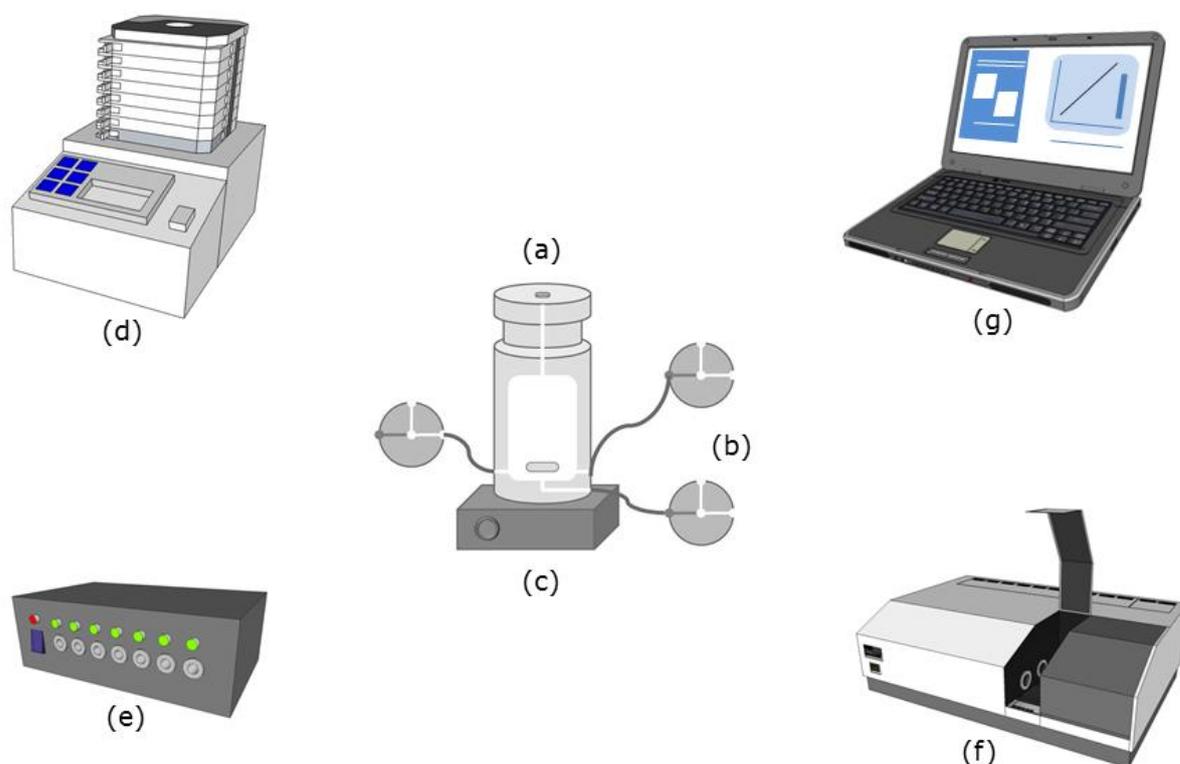


Figura 1.1 – Esquema ilustrativo dos principais componentes do FBA. (a) Câmara de mistura, (b) válvulas solenoides, (c) agitador magnético, (d) bomba peristáltica, (e) acionador de válvulas, (f) exemplo de detector, UV-Vis-NIR (g) computador.

Uma das principais características do FBA é a presença da câmara de mistura (Figura 1.1(a)), pequena peça cilíndrica, geralmente de Teflon ou Acrílico, com volume interno variável de 0,5 a 2,0 mL. Nessa câmara de mistura ou câmara reacional ocorre a maior parte dos procedimentos analíticos, como por exemplo, a adição, homogeneização, reações e

condicionamento dos fluidos, preparo de soluções de calibração, detecção do analito, etc.

Nesse sistema automático de análise, a câmara de mistura recebe os volumes adequados de reagentes e amostra que são controlados pelas válvulas solenoides (Figura 1.1(b)). Uma eficiente mistura dos fluidos pode ser obtida com o uso de um agitador magnético e de uma barra magnética no interior da câmara (Figura 1.1(c)). A propulsão dos fluidos é normalmente realizada por intermédio de uma bomba peristáltica (Figura 1.1(d)). O controle das válvulas é realizado utilizando um acionador de válvulas (Figura 1.1(e)). O sistema de detecção (Figura 1.1(f)) pode ou não ser acoplado à câmara de mistura, conforme a necessidade ou configuração do sistema requerido. Nos sistemas em fluxo-batelada todo o procedimento analítico é controlado com auxílio de um computador (Figura 1.1(g)) que garante a reprodutibilidade e velocidade nas aplicações.

Os sistemas em fluxo-batelada possuem a vantagem de explorar a máxima sensibilidade do sinal analítico, ou seja, os equilíbrios físico e químico são estabelecidos, sem ocorrer dispersão da amostra. Além disso, oferecem flexibilidade durante a aplicação, permitido com simples ajustes no programa de controle, alterar parâmetros como a faixa de concentração para a curva analítica ou o fator de diluição da amostra. Devido à versatilidade (caráter multipropósito) dos sistemas em fluxo-batelada é possível implementar diferentes processos analíticos sem alterar a configuração física do sistema, modificando apenas os parâmetros do software de controle [44].

Em síntese, os sistemas em fluxo-batelada oferecem uma instrumentação simples, de fácil manutenção e operação, são robustos, versáteis, flexíveis, apresentam um baixo consumo de reagentes e amostras, bem como de geração de resíduo, o que os torna aptos a realizarem diferentes procedimentos analíticos como: titulação [45], análise *screening* [44], adição de padrão [46], extração líquido-líquido [17],

análise nefelométrica [47], turbidimétrica [48], quimiluminescente [49], fluorescente [17] e fotométrica [50].

A detecção do analito pode ser realizada em fluxo ou diretamente na CM, aumentando a velocidade analítica. Para a detecção integrada, pode-se acoplar à CM dispositivos como LED's, fototransdutores, e fotodiodos [17,49,50].

Sistemas automáticos em fluxo e em batelada, empregando métodos baseados em imagem digital, apresentam-se como uma recente estratégia com grande potencial, especialmente em química analítica quantitativa.

As vantagens da realização de procedimentos analíticos empregando sistemas automáticos em fluxo e procedimentos convencionais em batelada, com detecção baseada em imagem digital, são descritas a seguir.

1.4 Métodos Analíticos Baseados em Imagem Digital

Métodos baseados em imagem digital vêm sendo empregados como uma alternativa de baixo custo para determinações em química analítica. A possibilidade de monitoramento em linha e a capacidade de avaliar parâmetros como a textura, intensidade das cores e sua distribuição na superfície, também contribuíram para essa tendência [18-30].

Esses métodos geralmente empregam o sistema de cor RGB [51-53], que utiliza as diferentes combinações dos valores individuais das cores primárias (vermelho, verde e azul), variando de 0 a 255 (8 bits), para simular todas as cores existente no espectro da região do visível. As imagens digitais podem ser capturadas utilizando *scanner*, *webcam* e câmeras digitais com sensores baseados em CCDs ou em CMOS [31], etc.

Na literatura são descritos vários modelos matemáticos que utilizam dados do sistema de cor RGB das imagens digitais para a obtenção de respostas analíticas em diversas determinações. Alguns desses modelos são descritos a seguir.

Gaião e colaboradores [18] propuseram, pela primeira vez, o uso de imagem digital RGB para implementar uma titulação. A metodologia foi avaliada inicialmente na análise de amostras sintéticas para determinação de ácido clorídrico (HCl) e ácido fosfórico (H₃PO₄). Posteriormente, a estratégia foi aplicada à determinação de alcalinidade total em água mineral e água de torneira. Nesse método, utilizou-se uma *webcam*, como detector, para localização do ponto final em titulações de neutralização. O valor de cor, adotado como resposta analítica, foi baseado no produto $2^R \times 2^G \times 2^B$ empregando o sistema de cor RGB. Utilizou-se o valor de cor baseado nos valores médios de R, G e B para a construção das curvas de titulação. Os resultados das determinações foram similares aos obtidos por titulação espectrofotométrica. Utilizando essa mesma metodologia, Tôrres e colaboradores [19] determinaram a acidez total de vinhos tintos por meio de titulação ácido-base sem o uso de indicador externo, explorando apenas as imagens capturadas com uma *webcam*.

Lopez-Moliner e colaboradores [20] desenvolveram um método simples, baseado em imagem digital utilizando quimiometria para a determinação de titânio em amostras de plásticos. Utilizou-se uma câmera digital para a captura das imagens, e os valores das componentes RGB das imagens foram correlacionados linearmente com a concentração do analito. Essa metodologia permitiu a obtenção de uma satisfatória precisão e exatidão analítica, tornando o método proposto adequado para o controle de qualidade de plásticos em análises de rotina.

Maleki, Savafi e Sedaghatpour [21] fizeram o uso de imagem digital para a determinação simultânea de Al(III) e Fe(III) em aços usando cromo azurol S como reagente cromogênico. Eles utilizaram uma câmera digital como sistema de detecção e para captura das imagens digitais. Os valores individuais de R, G e B, obtidos das imagens RGB, foram correlacionados às concentrações de Al(III) e Fe(III) nos complexos formados, utilizando um modelo baseado em redes neurais artificiais.

Kohl, Landmark e Stickle [22] descreveram um experimento simples, onde o princípio da absorção foi demonstrado por meio da análise de

imagem digital. A resposta analítica foi estimada a partir da equação: $A = \log (I_0 / I)$, onde I_0 e I são as intensidades da componente azul (B) das imagens digitais obtidas a partir da solução do branco e soluções padrão de um corante alimentício amarelo, respectivamente. Para a captura das imagens foram utilizados um scanner e uma câmera digital.

Gomes e colaboradores [23] determinaram ácido ascórbico em formulações farmacêuticas pela digitalização das amostras com um scanner. O princípio da técnica foi baseado na reação entre o ácido ascórbico, hexacianoferrato de potássio e cloreto de ferro (III), para formar o complexo azul da Prússia. Posteriormente, selecionou-se uma região da imagem obtida, e os valores médios das cores primárias vermelho (R), verde (G) e azul (B) foram obtidos para cada amostra usando um programa computacional. A componente azul (B) foi correlacionada em absorvância utilizando uma relação matemática semelhante à descrita por Kohl [22].

Recentemente, Wongwilai e colaboradores [24] desenvolveram um sistema semi-automático em um simples reator *lab-on-chip* que utiliza uma *webcam* como detector. Esse sistema foi projetado para monitoramento, em tempo real, de uma titulação ácido-base por meio da mudança de cor do indicador fenolftaleína utilizado. Registrou-se as imagens associadas ao desaparecimento da cor rosa, característica do indicador, quando a solução ácida se difundia na solução básica. Essa mudança de cor promove uma variação nos valores das componentes R, G e B, a qual está relacionada com a concentração do ácido no processo de titulação.

1.5 Determinação de Metais em Água

O acúmulo de metais em sistemas aquáticos ameaça a qualidade das águas e do meio ambiente prejudicando, conseqüentemente, a saúde humana. Muitos dos metais não são biodegradáveis e requerem tratamento adequado ou meios apropriados para acondicioná-los. Isso tem despertado o interesse da comunidade científica no desenvolvimento de metodologias capazes de detectar níveis cada vez menores de concentração de metais utilizando métodos convencionais de análises (batelada) e métodos automáticos [1-14].

A contaminação por metais pode ocorrer não apenas naturalmente por fontes difusas, como as originadas pela atmosfera, intemperismo e lixiviação do solo, mas também pela intervenção humana. Esta é considerada como a maior responsável pelo frequente acúmulo de metais em rios, bacias e mananciais, poluindo água e sedimentos destes locais [54].

Como conseqüências, essas atividades antropogênicas, tais como descarga de efluentes industriais, esgotos domésticos, depósitos de lixo e despejos de mineração, provocam o enriquecimento desses constituintes em corpos de água tornando-os biodisponíveis. Isso significa que podem se tornar aptos para serem incorporados por organismos que estão em contato ou que utilizam, direto ou indiretamente, esses recursos naturais.

Esses contaminantes podem ser encontrados nas formas particulada, coloidal e dissolvida. Suas possíveis interações em ambientes aquáticos são complexas e afetam diretamente as condições de equilíbrio desses ecossistemas, promovendo sérias modificações ambientais [55,56].

A toxicidade dos metais depende de vários fatores, como a forma química, taxa de emissão, concentração, transporte, tempo de exposição e os processos bioquímicos de cada organismo. Cerca de vinte metais são reconhecidos como tóxicos. A susceptibilidade à substâncias tóxicas é mais acentuada em crianças e pessoas idosas [57].

Grossi ^[58] classifica os metais de acordo com sua toxicidade dividindo-os em três grupos: no Grupo 1 encontram-se os elementos considerados como micronutrientes, pouco tóxico ao meio ambiente, porém em concentrações elevadas se tornam tóxicos. Entre eles estão o alumínio, cobalto, cobre, manganês, molibdênio, selênio, vanádio, zinco e estanho; o Grupo 2 é formado pelos metais arsênio, berílio, cromo e níquel, apresentam uma grande probabilidade de risco de câncer; já o Grupo 3 é composto por metais que apresentam um caráter tóxico significativo, é o caso do chumbo, cádmio, mercúrio e tálio.

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) é o órgão responsável pela avaliação da qualidade e a classificação dos corpos de água para os seus principais usos. Na Resolução CONAMA nº 357 de 25 de março de 2005 ^[59], as águas são classificadas em doces, salobras e salinas, e elencadas em várias classes, de acordo com o seu uso, como mostrado na [Tabela 1.1](#).

Tabela 1.1 – Utilização e classificação das águas do território brasileiro, estabelecido pelo CONAMA ^[59].

Classificação	Utilização
Águas Doces	
Classe especial	Ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção.
Classe 1	Ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado e à irrigação de hortaliças que se desenvolvem rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película.
Classe 2	Ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional, à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e à atividade de pesca.
Classe 3	Ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras.
Classe 4	À navegação e harmonia paisagística.
Águas Salinas	
Classe 1	À recreação de contato primário e à aquicultura e à atividade de pesca.
Classe 2	À pesca amadora e à recreação de contato secundário.
Classe 3	À navegação e harmonia paisagística.
Águas Salobras	
Classe 1	Ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado, e à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas.
Classe 2	À pesca amadora e à recreação de contato secundário.
Classe 3	À navegação e harmonia paisagística.

O CONAMA [59] também estabelece condições e padrões de lançamentos de efluentes em corpos de água, oriundos de qualquer fonte poluidora. Esses valores máximos admissíveis podem variar de acordo com a classificação da água. Na Tabela 1.2 podemos observar as concentrações máximas aceitáveis de alguns metais para as diferentes classes de águas e também para efluentes tratados por indústrias poluidoras.

Tabela 1.2 – Valores máximos da concentração (mg L^{-1}) de alguns metais estabelecido pelo CONAMA [59].

Metais	Águas Doces (classes)		Águas Salinas (classes)		Águas Salobras (classes)		Efluentes tratados
	1 e 2	3	1	2 e 3	1	2 e 3	
Al	0,1	0,2	1,5	1,5	0,1	0,1	–
Pb	0,01	0,033	0,01	0,21	0,01	0,21	0,5
Cu	0,009	0,013	0,005	0,0078	0,005	0,0078	1,0
Fe	0,3	5,0	0,03	0,3	0,3	0,3	15,0
Cd	0,001	0,01	0,005	0,04	0,005	0,04	0,2
Zn	0,18	5,0	0,09	0,12	0,09	0,12	5,0
Cr	0,05	0,05	0,05	1,1	0,05	1,1	0,1 (Cr^{6+}) 1,0 (Cr^{3+})
Ni	0,025	0,025	0,025	0,074	0,025	0,074	2,0
Hg	0,0002	0,002	0,0002	0,00018	0,0002	0,00018	0,01
Se	0,01	0,05	0,01	0,29	0,01	0,29	0,3

O conhecimento da concentração total de metais oferece pouca ou nenhuma informação sobre a biodisponibilidade, a toxicidade, a mobilidade ambiental e o comportamento biogeoquímico, que em geral, são fortemente dependentes da espécie química de metais. Especificação pode ser definida como a determinação das concentrações individuais das várias formas químicas de um elemento que, juntos, compõem a concentração total do elemento em uma dada matriz [60].

As baixas concentrações da maioria dos metais em águas requerem o uso de técnicas analíticas com alta sensibilidade e seletividade, sendo às vezes necessário realizar algum procedimento que envolve separação ou

pré-concentração, tais como: evaporação, volatilização, co-precipitação e extração por solvente ou extração de fase sólida. Apesar de eficiente, qualquer processo de pré-concentração envolve manipulação de amostras, com isso aumenta o risco potencial de contaminação. Logo, é importante a escolha de uma técnica que utiliza o mínimo de manipulação da amostra e o mínimo uso de reagentes [61].

Uma variedade de técnicas analíticas permite a discriminação entre as diferentes formas de um metal, cromatografia em fase líquida (HPLC) e gasosa (GC), espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) e em forno de grafite (GF-AAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), espectrometria de massa (MS), técnicas eletroanalíticas, espectrofluorimetria, quimiluminescência e espectrofotometria [1-13,61].

1.5.1 Métodos para Determinação de Alumínio

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante na litosfera, o que inclui cerca de 8% da crosta terrestre. Em virtude de sua reatividade, esse elemento dificilmente é encontrado como metal na natureza, apenas na forma combinada, sendo seu principal mineral a bauxita (Al_2O_3). A solubilidade do Al é fortemente afetada pelo pH e, em condições ácidas ($\text{pH} < 6,0$) e básicas ($\text{pH} > 8,0$), a solubilidade do Al é significativamente aumentada [62].

O Al(III) é liberado para o ambiente por processos naturais e também por fontes antropogênicas. Apesar de estar presente em baixas concentrações em águas naturais, quantidades significativas são adicionadas à água, onde essa espécie atua como um agente floculante durante o processo de tratamento de água potável, aumentando em muitos casos a sua concentração final [2]. O CONAMA estabelece o nível máximo de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de alumínio dissolvido em águas doces para as classe 1 e 2, e de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ para a classe 3 [59].

O comportamento do Al(III) em ecossistemas aquáticos está relacionado com as suas várias espécies e seu potencial de complexação com os diferentes ligantes orgânicos e inorgânicos que ocorrem naturalmente. O alumínio é predominantemente mononuclear $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ (Al^{3+} abreviado) em soluções aquosas com pH abaixo de 5,0. Em soluções menos ácidas ($\text{pH} > 5,0$) sofre hidrólise produzindo as espécies $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})^{2+}$ ($\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ abreviado) e $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2^+$ ($\text{Al}(\text{OH})_2^+$ abreviado). Em pH neutro, Al é precipitado principalmente como $\text{Al}(\text{OH})_3$ e em soluções básicas ($\text{pH} > 8,0$) o precipitado redissolve resultando na espécie $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ [63].

A presença de alumínio em sistemas aquáticos é de grande preocupação devido à sua potencial ameaça à saúde de inúmeras espécies incluindo os seres humanos. Os compostos de alumínio não são tóxicos como metais pesados, mas eles podem se acumular nos tecidos e organismos provocando algumas doenças tais como encefalopatia, osteomalácia (doença óssea), anemia hipocrômica, microcítica, e é considerado como um dos fatores de risco para a doença de Alzheimer [2,64].

Na literatura, existe uma variedade de técnicas analíticas que são empregadas para determinação de alumínio em amostras ambientais, tais como: espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) e em forno de grafite (GF-AAS), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), voltametria, potenciometria, amperometria, fluorimetria e espectrofotometria [2,62].

Métodos automáticos de análise, como análise por injeção em fluxo (FIA) [14], análise por injeção sequencial (SIA) [65] e análise em fluxo com multicomutação (MFA) [42], vêm sendo desenvolvidos para determinação de Al(III) em águas empregando diferentes metodologias analíticas.

Vários sistemas têm sido propostos para determinações espectrofotométricas de íons alumínio utilizando diferentes reagentes cromogênicos [14,65].

Wauer, Heckemann e Koschel [66] desenvolveram um método automático FIA para determinação de Al(III) em águas naturais ricas em carbonatos usando o violeta de pirocatecol como reagente cromogênico. Este sistema em fluxo foi tamponado com hidroxilamina (pH 6,1) e monitorado em 590 nm, com isso foi possível o monitoramento da concentração de Al(III) em água de lagos.

Royset [67] descreveu um sistema de análise em fluxo (FIA) para determinação de Al(III) usando o reagente cromogênico eriocromo cianina R e o surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). As medidas espectrofotométricas foram realizadas em pH 7,5. Neste método existe a interferência relativamente acentuada dos íons ferro, berílio, lantânio e cério.

Mesquita e Rangel [68] propuseram um sistema SIA para determinação espectrofotométrica de íons alumínio reativo em amostras de água baseado na sua reação do reagente cromogênico com o cromo azurol S. Vanloot e colaboradores [69] também determinaram Al(III) em água potável utilizando o mesmo reagente cromogênico. Eles utilizaram um sistema FIA, sendo a sensibilidade do método proposto reforçada pelo uso do CTAB. Este sistema foi aplicado, com sucesso, na determinação on-line do agente floculante residual Al(III) na saída de duas unidades de tratamento de água.

Recentemente, Norfun, Pojanakaroon e Liawraungrath [12] propuseram um método espectrofotométrico de análise por injeção de fluxo reverso (rFIA) para a determinação de Al(III) em água de torneira. O método foi baseado na reação do Al(III) com a quercetina e o CTAB, produzindo um complexo de coloração amarela em meio tampão acetato (pH 5,5) com máximo de absorção em 428 nm.

A quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona) é um flavonoide amplamente distribuído no reino vegetal. Trata-se de um composto

polifenólico presente naturalmente em vegetais como maçã, cebola, chá e em plantas medicinais como *Ginkgo Biloba*, *Hypericum Perforatum*. É um conhecido reagente colorimétrico e fluorimétrico para determinação de traços de Al(III) em água e amostras biológicas. A quercetina forma seletivamente um complexo estável com alumínio e a sua detecção é praticamente livre de espécies interferentes, que são comumente presentes em água [4].

A quercetina apresenta em sua estrutura molecular três zonas para a possível complexação de íons metálicos, como o Al(III), por exemplo. A Figura 1.2 representa um recente mecanismo proposto para explicar a complexação da quercetina com o íon metálico Al(III) [70]. Embora bem difundido para análise de traços de metais em águas, vários esforços vêm sendo realizados com o objetivo de esclarecer informações sobre a forma de complexação, estrutura das zonas de ligação, alterações conformacionais e propriedades físico-químicas (como capacidade antioxidante) desse complexo.

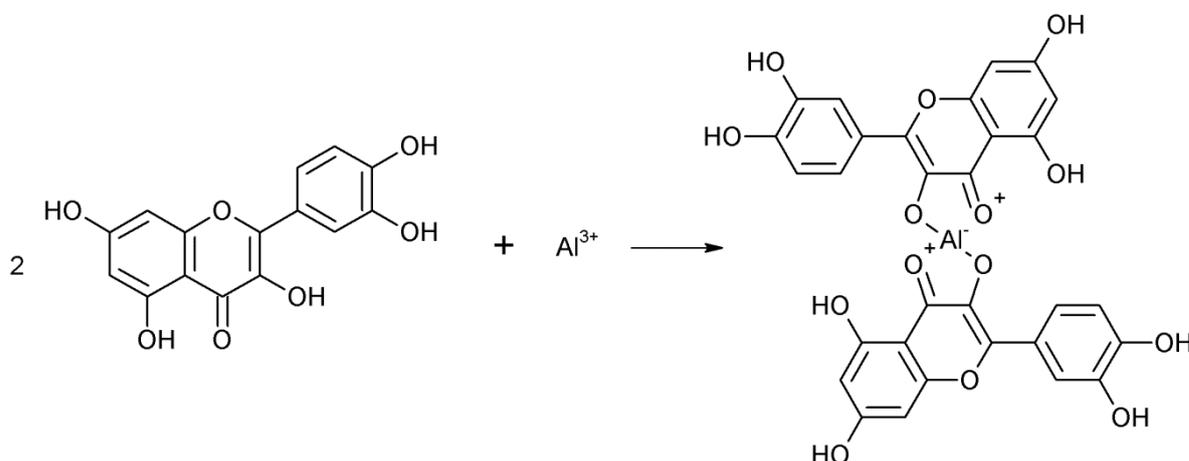


Figura 1.2 – Equação da reação de complexação de Al(III) empregando a quercetina [70].

1.5.2 Métodos para Determinação de Cromo

O cromo é obtido industrialmente do mineral cromita (FeCr_2O_4), que está presente no solo, água, e rocha. Algumas atividades humanas são as principais responsáveis pela maior parte da liberação do cromo no meio ambiente. Indústrias metalúrgicas e de corantes, galvanoplastia, curtumes, são produtores ativos de águas residuais que muitas vezes são lançadas em ambientes aquáticos sem nenhum tratamento prévio. Esse metal também pode ser encontrado em sistemas de abastecimento de água por intermédio de inibidores de corrosão, geralmente utilizados em tubulações de água e recipientes ou mediante lixiviação dos aterros sanitários, que possibilita a contaminação da água subterrânea [1].

Em águas naturais esse elemento existe em seus dois estados estáveis de oxidação, Cr(III) e Cr(VI). A presença e a relação entre estas duas formas dependem de processos como precipitação/dissolução e adsorção/ dessorção [71]. O Cr(III) é encontrado em águas naturais na forma hidrolizada ($\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{OH}_2^+$) e complexada com outros compostos, geralmente orgânicos. Essa espécie é utilizada em vários produtos comerciais, incluindo corantes, pigmentos e tintas para curtimento de couro. O Cr(VI) é encontrado em águas naturais nas formas CrO_4^{2-} , HCrO_4^- e $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, dependendo do pH. O cromo (VI) é empregado em processos industriais como a cromagem de circuitos elétricos, pigmentos para fotografia, pirotecnia e plásticos, apesar de ser cancerígeno, mutagênico e induzir à dermatite [1,71].

Apesar de ser um nutriente fundamental no controle da insulina e influenciar no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, o cromo é tóxico e cancerígeno e sua toxicidade depende de seu estado de oxidação. Compostos de cromo hexavalente podem ser de 1 a 10 vezes mais tóxicos que os trivalentes. Não só a toxicidade, mas também a mobilidade e biodisponibilidade do cromo dependem fundamentalmente de sua forma química. Os compostos de Cr(VI) são mais solúveis, móveis e biodisponíveis em comparação com os compostos de Cr(III), tornando-os

provavelmente os mais absorvidos. O Cr(III) é pouco absorvido pelo organismo, independentemente da via de exposição [3]. Assim, existe uma necessidade de conhecimento detalhado de cada espécie ao invés de apenas a concentração total desse metal para a avaliação adequada da fisiologia e os seus possíveis efeitos, e as suas transformações químicas na água, solo e atmosfera, bem como seu transporte e distribuição no meio ambiente [71].

A determinação de cromo é realizada principalmente em soluções aquosas, tanto em águas naturais (água de rio, água mineral, água de torneira, água do mar, etc.) quanto em águas residuais (efluentes industriais e águas de interesse ambiental). O cromo também é determinado em amostras de alimentos, solos, sedimentos, materiais metalúrgicos, material biológico, óleos e na atmosfera [3].

Na maioria das amostras a concentração de cromo é da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Em amostras de água a concentração varia de ng L^{-1} em água de consumo para mais de mg L^{-1} ou até g L^{-1} em águas naturais ou águas de rio e reservatório com descarga de efluentes industriais contaminados [1]. O CONAMA estabelece o limite máximo de cromo total de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ em águas doces para as classes 1, 2 e 3, em águas salinas e em águas salobras o limite é de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ para classe 1 e de $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ para as classes 2 e 3. Para efluentes tratados o limite estabelecido pelo CONAMA para a concentração de cromo varia de acordo com sua espécie, para o Cr(III) o limite é de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e para o Cr(VI) o valor é $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ [59].

Os pré-tratamentos mais frequentes utilizados para a especiação de cromo são: os métodos colorimétricos com a formação de complexos, métodos cromatográficos, pré-concentração em coluna/troca iônica e em alguns casos em processos de oxidação-redução [71].

Dentre os métodos instrumentais propostos para a determinação de cromo, os mais comuns são os métodos espectroscópicos (FAAS, GF-AAS, ET-AAS e ICP-AES). Porém, esses métodos necessitam de um pré-tratamento para fornecer a seletividade de uma espécie em relação a outra. Os métodos quimiluminescentes também são empregados para

determinação de cromo, a fluorimetria é utilizada principalmente para a determinação de Cr(VI). Sistemas cromatográficos (HPLC e GC) são utilizados, em alguns casos, para a determinação simultânea das duas espécies mais importantes de cromo (Cr(III) e Cr(VI)) em apenas uma única etapa, reduzindo o consumo de reagentes e amostras. Os métodos eletroquímicos (amperometria e voltametria) também são utilizados para a determinação de cromo, podendo alcançar limites de detecção (LOD) da ordem de ng L^{-1} quando são utilizados adsorventes seletivos e agentes mascarantes.

Os métodos espectrofotométricos podem ser utilizados para a especiação seletiva das diferentes espécies de cromo, utilizando reagentes cromogênicos para formar complexos absorventes seletivos. O método mais comum para a determinação de Cr(VI) em soluções aquosas é baseado na reação da difenilcarbazida (DPC) com o Cr(VI) produzindo um complexo violeta com máximo de absorção em 548 nm [1,71].

Vários estudos foram realizados para esclarecer a reação entre a difenilcarbazida e o Cr(VI), entretanto divergentes explicações sobre o seu mecanismo foram apresentadas, sobretudo divergências envolvendo a sua conformação, zona de ligação e formação da cor característica [72]. Willems e colaboradores [73] propuseram que a interação entre o Cr(VI) e a difenilcarbazida forma o complexo difenilcarbadiazona, provavelmente responsável pela coloração violeta (Figura 1.3).

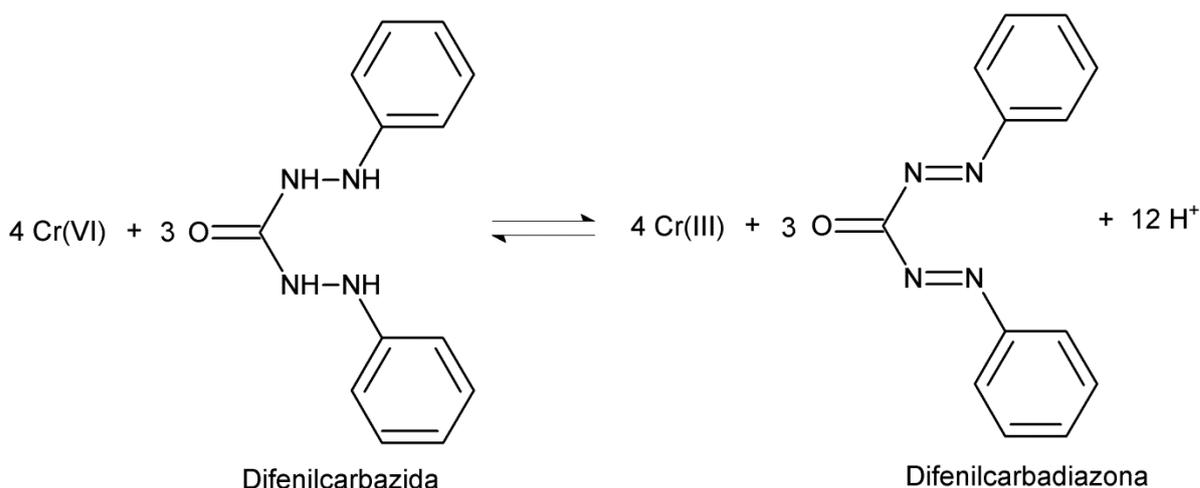


Figura 1.3 – Equação da reação de complexação de Cr(VI) empregando a difenilcarbazona ^[73].

Tal como apresentado para a determinação de íons Al(III), métodos automáticos de análise em fluxo, como FIA, SIA e MFA, vêm sendo desenvolvidos para determinação espectrofotométrica de Cr(III) e Cr(VI) em águas, utilizando vários reagentes cromogênicos. Esses sistemas automáticos empregam uma instrumentação simples, com reduzida interferência do analista, além de minimizar o consumo de reagentes e amostras ^[14,65].

Yuan e colaboradores ^[74] desenvolveram um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) para a determinação espectrofotométrica rápida e sensível de Cr(VI). O método é baseado na reação do Cr(VI) com o reagente cromogênico difenilamina sulfonato de sódio, em meio ácido, formando um complexo púrpura com máximo de absorção em 550 nm. O sistema foi aplicado para a determinação de Cr(VI) em águas residuais.

Themelis, Kika e Economou ^[75] propuseram um método espectrofotométrico FIA para a determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) em água mineral e água de torneira. O método utiliza como reagente cromogênico o ácido cromotrópico que reage com o íon Cr(VI) em meio ácido formando um complexo solúvel em água com máximo de absorção em 370 nm. O periodato de potássio, KIO₄, foi utilizado como reagente oxidante para o Cr(III) a Cr(VI).

Fan e colaboradores [76] descreveram um método automático espectrofotométrico de análise por injeção sequencial (SIA) para a determinação de Cr(VI) em águas residuais utilizando um reagente orgânico livre. O método foi baseado na detecção de um composto intermediário instável azul resultante da reação de Cr(VI) com peróxido de hidrogênio em meio ácido.

Matsuoka e colaboradores [77] desenvolveram um sistema FIA com detecção espectrofotométrica para determinação de Cr(III) e Cr(VI) em águas naturais sem separação mútua. O peroxodissulfato foi utilizado como agente oxidante para a oxidação do Cr(III) a Cr(VI). As amostras foram pré-concentradas usando uma resina de troca catiônica. Utilizou-se como reagente cromogênico a 1,5-difenilcarbazida (DPC) que reage com o íon Cr(VI) formando um complexo amarelo monitorado em 550 nm. O mesmo reagente cromogênico DPC foi utilizado por Pressman e Aldstadt [78], que propuseram um sistema automático SIA para determinação de Cr(VI) em águas superficiais.

Pires e colaboradores [13] propuseram um sistema de análise em fluxo com multicomutação (MFA), no qual a propulsão dos fluidos era realizada utilizando microbombas. O sistema foi aplicado à determinação de Cr(III) e Cr(VI) em águas naturais, a partir de medidas realizadas com um fotômetro baseado em diodo emissor de luz (LED). O método foi baseado na reação do Cr(VI) com a DPC, sendo o Cr(III) previamente oxidado a Cr(VI) e determinado pela diferença entre o Cr total e o Cr(VI). A oxidação do Cr(III) foi realizada empregando o peróxido de hidrogênio.

Capítulo 2
Experimental

2.1 Reagentes, Amostras e Soluções

Todas as soluções e amostras foram preparadas empregando reagentes de grau analítico e água recém deionizada com um sistema Milli-Q Plus[®] (Millipore). Após a deionização, a água apresentava resistividade específica $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

2.1.1 Determinação de Alumínio

A determinação de Al(III) com o analisador proposto foi implementada utilizando o método da quercetina [12]. Preparou-se uma solução estoque de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Al(III), dissolvendo-se $7,7899 \text{ g}$ de cloreto de alumínio hexahidratado (Synth) em água deionizada contendo $1,0 \text{ mL}$ de uma solução de ácido clorídrico $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (Synth). A solução resultante foi aferida com água deionizada a $1,0 \text{ L}$. Essa solução foi padronizada com uma solução de EDTA $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ conforme descrito na literatura [79].

Para o método de referência [80] as soluções padrão de Al(III) foram obtidas a partir de diluições apropriadas da solução estoque. No sistema automático proposto as soluções de calibração foram preparadas dentro da câmara de mistura utilizando uma solução padrão de $650 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada a partir da solução estoque.

A solução estoque de quercetina ($1000,0 \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada a partir da dissolução $0,0300 \text{ g}$ de seu produto puro (Vetec) em $60,0 \text{ mL}$ de uma mistura de solução etanol/água (60% v/v). Preparou-se a solução surfactante, dissolvendo $0,0127 \text{ g}$ de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Vetec) em aproximadamente 100 mL de solução tampão acetato com uma concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e um pH 5,5.

A solução tampão acetato, com $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5,5, foi preparada dissolvendo $13,608 \text{ g}$ de acetato de sódio (Vetec) em 500 mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 5,5 usando ácido acético glacial

(Synth) e a solução foi diluída com água deionizada em um balão volumétrico de 1,0 L.

As amostras de água natural foram coletadas em diferentes pontos na cidade de João Pessoa, Paraíba. As amostras foram filtradas utilizando um papel filtro com membrana de celulose 0,45 μm (Whatman), acidificadas com 1,0 mL de ácido nítrico 0,1 mol L⁻¹ (Synth) e armazenadas em recipientes de polietileno antes das análises.

Para a determinação de alumínio (III) nas amostras de água natural, foi necessária a adição de um agente mascarante. Este agente consistiu de 0,625 g de tiouréia, 15,0 mL de ácido ascórbico 0,1 mol L⁻¹, e 25,0 mL de 1,10-fenantrolina 0,1 mol L⁻¹. O pH da solução da amostra foi ajustado para 5,5 com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ e o volume foi aferido a 250,0 mL.

2.1.2 Determinação de Cromo

A determinação de Cr(VI) foi realizada empregando o método da difenilcarbazida [13]. Para isso, preparou-se uma solução estoque de 100,0 mg L⁻¹ de Cr(VI) dissolvendo-se 0,0375 g de dicromato de potássio (Synth) em água deionizada, adicionando-se 1,0 mL de uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (Synth), aferindo a 100,0 mL.

Para o método de referência [80] as soluções padrão de Cr(VI) foram obtidas a partir de diluições apropriadas da solução estoque. No sistema automático proposto as soluções de calibração foram preparadas dentro da câmara de mistura utilizando uma solução padrão de 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparada a partir da solução estoque.

A solução de 1,5-difenilcarbazida 0,012% (m/v) foi preparada dissolvendo 0,012 g em 2,0 mL de etanol P.A (Synth) e completando o balão para 100,0 mL com solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ (Vetec). Essa solução foi preparada e armazenada semanalmente.

Assim como para determinação de Al (III), a coleta das amostras de água residual, para verificar o teor de Cr (VI), foi realizada em diversos pontos da cidade de João Pessoa, Paraíba. As amostras obtidas foram filtradas empregando um papel de filtro com membrana de celulose 0,45 μm (Whatman), acidificadas com 1,0 mL de ácido nítrico 0,1 mol L⁻¹ (Synth) e armazenadas em recipientes de polietileno antes das análises.

2.2 Equipamentos

Um espectrofotômetro UV-Vis Hewlett-Packard (HP) com arranjo de diodos, modelo 8453, foi utilizado para as medidas de absorvância usando os métodos de referência [80]. Nesse equipamento, usava-se uma cubeta de quartzo com um volume interno de aproximadamente 4,0 mL e um caminho ótico de 1,0 cm.

Uma *webcam* Philips VGA com sensor CCD, modelo SPC900NC, foi utilizada para captura das imagens digitais durante o procedimento analítico empregando o sistema automático proposto (DIB-FBA).

Um notebook com processador Intel Core2 Duo, HD de 320 GB e memória de 4 GB foi empregado para controle e gerenciamento do sistema automático baseado em imagens digitais.

2.3 Analisador Fluxo-Batelada Baseado em Imagem Digital

Na Figura 2.1 são mostrados os componentes principais utilizados na montagem do DIB-FBA para a determinação de alumínio (III) e cromo (VI) em águas.

O DIB-FBA é constituído por uma câmara de mistura, bomba peristáltica, válvulas solenoides, acionador de válvulas, agitador magnético, *webcam* e notebook. Para evitar interferência da luz ambiente, a câmara de mistura, o agitador magnético e a *webcam* foram colocados dentro de uma caixa de madeira de dimensões aproximadamente

25 cm × 30 cm × 20 cm, paredes internas cobertas com papel branco e iluminada com uma lâmpada fluorescente de 5 W, como sugerido por Tôrres [19].

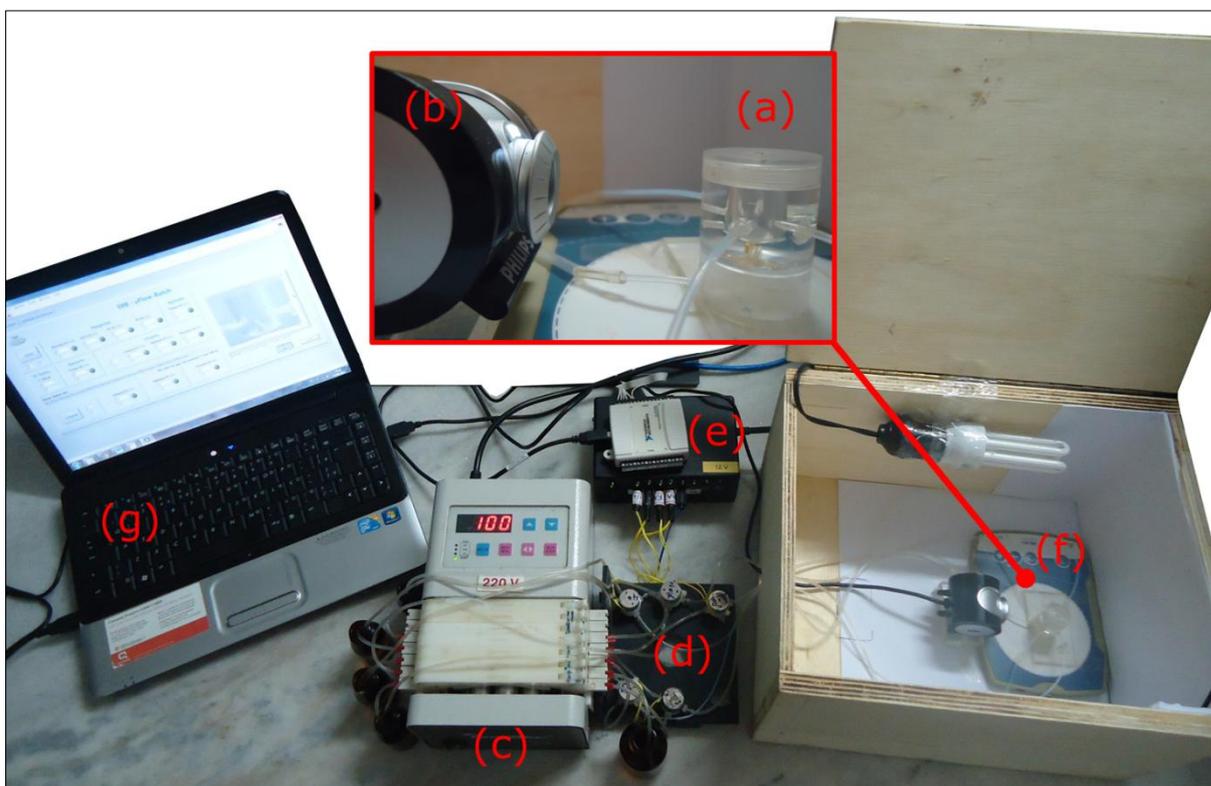


Figura 2.1 – Fotografia do DIB-FBA. (a) Câmara de mistura, (b) *webcam*, (c) bomba peristáltica, (d) válvulas solenoides, (e) acionador de válvulas, (f) agitador magnético e (g) notebook.

2.3.1 Câmara de Mistura

Utilizou-se uma câmara de mistura (CM) (Figura 2.2) para homogeneização, preparo das soluções de calibração, amostras e detecção do analito. Esta foi confeccionada em acrílico (material transparente) possuindo um volume interno de aproximadamente 0,9 mL, contendo quatro canais de entrada e um canal de saída. No seu interior foi colocado uma pequena barra magnética (BM), empregada para promover a homogeneização das soluções, e a sua rotação é realizada utilizando um agitador magnético (AM) da Lab Disc, modelo White.

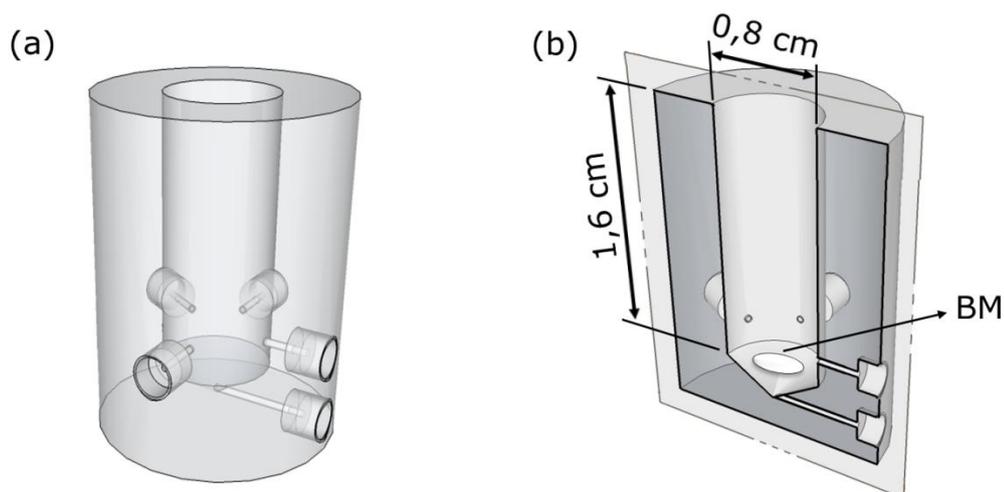


Figura 2.2 – Ilustração tridimensional da câmara de mistura empregada. (a) Vista frontal e (b) corte lateral.

2.3.2 Bomba Peristáltica

Uma bomba peristáltica (BP) Ismatec IPC, modelo 78002-00, foi utilizada para a propulsão dos fluidos por intermédio de tubos de bombeamento 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 8 canais para propulsão. Durante a análise das amostras todas as adições das soluções utilizaram a BP com vazão de $190,0 \pm 1,6 \mu\text{L s}^{-1}$ ($n = 20$) em todos os canais. É importante ressaltar que a vazão dos fluidos é ajustada quando menores concentrações das soluções de calibração são preparadas, para garantir a adição de pequenos volumes da solução padrão com precisão.

2.3.3 Válvulas Solenoides

Os fluidos (reagentes e amostra) foram selecionados e direcionados para a câmara de mistura utilizando quatro válvulas solenoides de três vias da Cole Parmer (modelo EW-01540-13). Uma quinta válvula foi empregada para o descarte. Essas válvulas (Figura 2.3) foram controladas por um acionador de válvulas conectado a um notebook via porta USB, utilizando uma interface de controle da NI USB-6009. O acionamento pode ser simultâneo ou sequencial, dependendo do tipo de análise.



Figura 2.3 – Fotografia de uma válvula solenoide de três vias.

2.3.4 Acionador de Válvulas

O controle das válvulas solenoides foi realizado empregando um acionador de válvulas *labmade*. Na Figura 2.4 é mostrado o diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009. O acionador utiliza um circuito integrado ULN2803, fabricado pela Toshiba, que possui um conjunto de 8 transistores do tipo Darlington, apropriados para suportar alta tensão e corrente. O uso desse dispositivo possibilita o controle simultâneo ou independente de até 8 portas de saída.

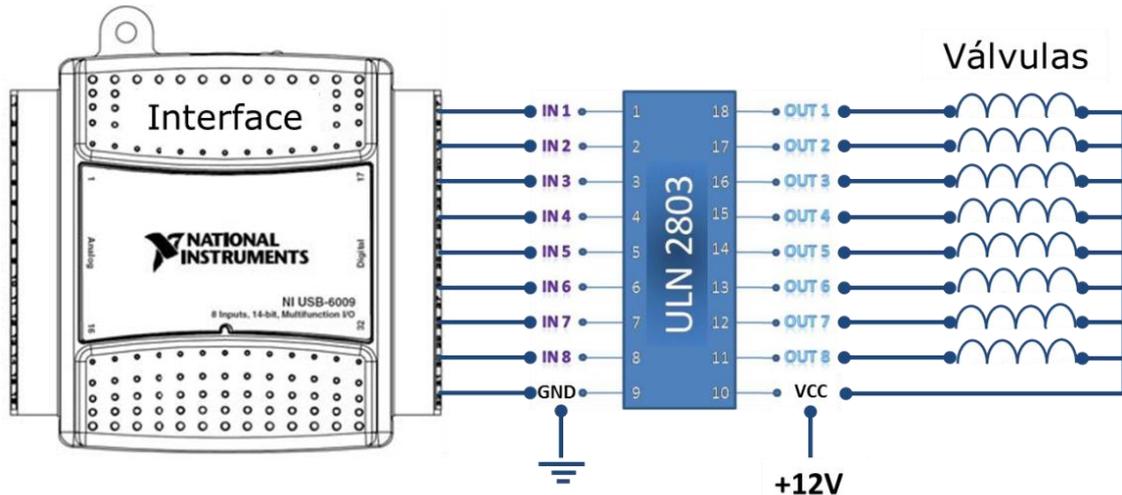


Figura 2.4 – Diagrama esquemático da ligação entre o acionador de válvulas e a interface NI USB-6009.

As válvulas solenoides 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. O acionamento é administrado via notebook, que utiliza uma interface de controle NI USB-6009 da National Instruments, a qual é conectada às portas de entrada do ULN2803 presente no acionador de válvulas.

2.3.5 Sistema de Detecção

Uma *webcam* (WC) Philips 1,3 megapixel com sensor CCD e taxa de transfêrencia de 90 quadros por segundo, modelo SPC900NC VGA, foi usada como detector colorimétrico para a captura das imagens digitais durante o procedimento analítico usando o sistema automático proposto. Na [Figura 2.5](#), ilustra-se a *webcam* posicionada a uma distância de cerca de 4 cm da câmara de mistura, possibilitando a obtenção das imagens do complexo com melhor iluminação, nitidez, contraste e reprodutibilidade. O uso de uma câmara de mistura transparente (confeccionada em acrílico) permitiu sua utilização tal como ilustrado na [Figura 2.5](#).



Figura 2.5 – Fotografia do posicionamento da *webcam*.

2.4 Programa de Gerenciamento do DIB-FBA

Para controle do analisador automático proposto (DIB-FBA) foi desenvolvido um programa escrito em linguagem gráfica *LabVIEW 7.1* da National Instruments. Esse programa de gerenciamento apresenta uma interface amigável (Figura 2.6).



Figura 2.6 – Interface do programa de controle do DIB-FBA.

O programa desenvolvido permite o usuário realizar o controle de todas as etapas da análise, incluindo o tempo de abertura das válvulas dos reagentes, amostra e descarte, número de imagens a serem capturadas, etc. As imagens são capturadas e armazenadas em um diretório do computador para posterior tratamento conforme desejado.

Os tempos de abertura das válvulas são proporcionais aos volumes adicionados na câmara de mistura. Para isso, é realizado um estudo prévio de calibração em cada válvula solenoide. Tal procedimento de calibração é realizado correlacionando-se a quantidade de massa do fluido adicionado, de acordo com a rotação da bomba peristáltica, em função do tempo de acionamento da válvula.

Durante o procedimento analítico, o usuário pode acompanhar, em tempo real, todos os processos realizados durante a execução da análise, observando no *display* de imagem exibido pelo programa desenvolvido, inclusive a adição dos volumes na câmara de mistura e a formação dos complexos metálicos para cada determinação.

O mesmo programa foi utilizado satisfatoriamente tanto na determinação de alumínio (III), em águas naturais, quanto na determinação de cromo (VI), em águas residuais, sem a necessidade de alterações.

2.5 Programa de Tratamento e Análise das Imagens Digitais

As imagens capturadas durante as determinações de alumínio (III) e cromo (IV) em águas, usando o DIB-FBA, foram tratadas com o programa *ImageJ*, disponibilizado gratuitamente para *download* na internet ^[81]. Esse software de domínio público, escrito em *Java*, possui o código-fonte aberto, possibilitando alteração em sua arquitetura e também na sua interface, mostrada na [Figura 2.7](#).

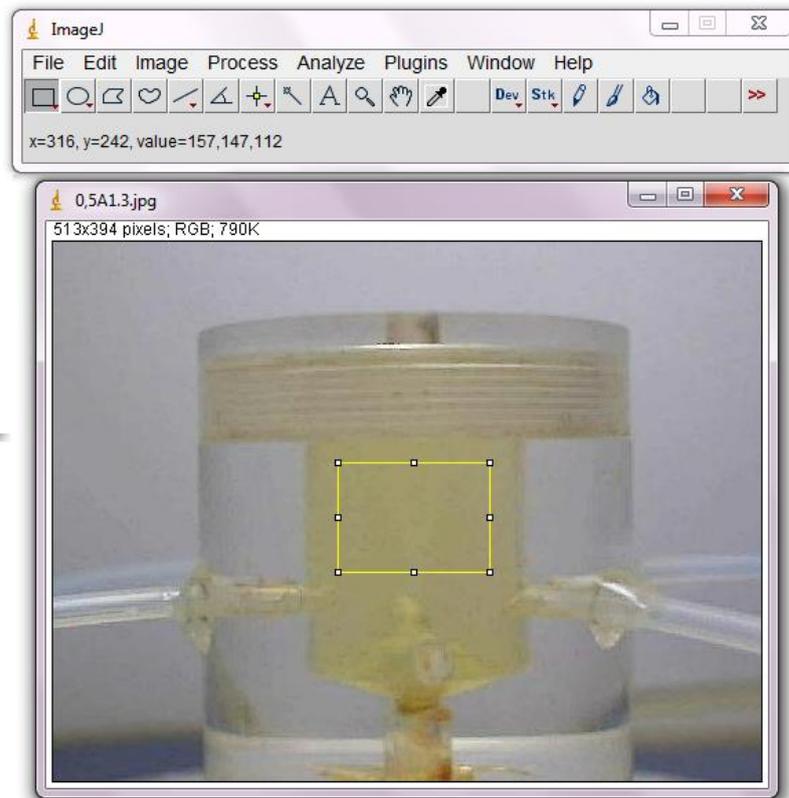
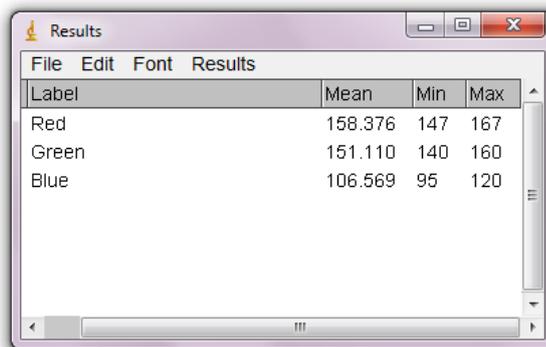


Figura 2.7 – Interface do programa *ImageJ* utilizado para o tratamento e seleção da área das imagens.

Com o software *ImageJ*, é possível editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 bits. Além disso, o programa *ImageJ* permite calcular estatísticas de valor de pixel em áreas pré definidas da imagem e criar histogramas de densidade e parcelas de perfil de linha. O *ImageJ* suporta ainda funções de processamento de imagem padrão, tais como: manipulação de contraste, nitidez, detecção de borda de suavização e filtragem mediana.

Inicialmente, o usuário seleciona a região mais homogênea da imagem desejada ([Figura 2.7](#)), as coordenadas da região selecionada são então armazenadas para serem usadas em todas as outras imagens. O software verifica todos os pixels (coluna por coluna) para extrair as componentes RGB de cada pixel e calcular o valor médio, mínimo e máximo para cada componente RGB, conforme solicitado pelo usuário. Os resultados são exibidos em uma janela ([Figura 2.8](#)) e, em seguida, armazenados no computador.



The screenshot shows a window titled 'Results' from the ImageJ software. It contains a table with the following data:

Label	Mean	Min	Max
Red	158.376	147	167
Green	151.110	140	160
Blue	106.569	95	120

Figura 2.8 – Janela do programa *ImageJ* apresentando os resultados das análises das componentes RGB da área selecionada.

2.6 Procedimentos do DIB-FBA

A [Figura 2.9](#) representa o diagrama esquemático do DIB-FBA empregado para as determinações de Al(III) e Cr(VI) em águas. A mesma configuração física do sistema foi utilizada para as duas análises, sem a necessidade de qualquer modificação na sua estrutura física.

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. Em seguida, as válvulas V1, V2, V3 e V4 são acionadas simultaneamente durante 2,0 s e as soluções utilizadas para as determinações (amostra ou solução estoque, R1, R2 e água deionizada) são bombeadas em direção à câmara de mistura preenchendo todos os canais localizados entre as válvulas e a CM.

Em seguida, a válvula V5 é acionada durante 4,0 s e a solução presente no interior da CM é descartada por aspiração da bomba peristáltica (BP). Este procedimento deve ser realizado sempre que houver uma troca de solução contida nos reservatórios (amostras ou reagentes).

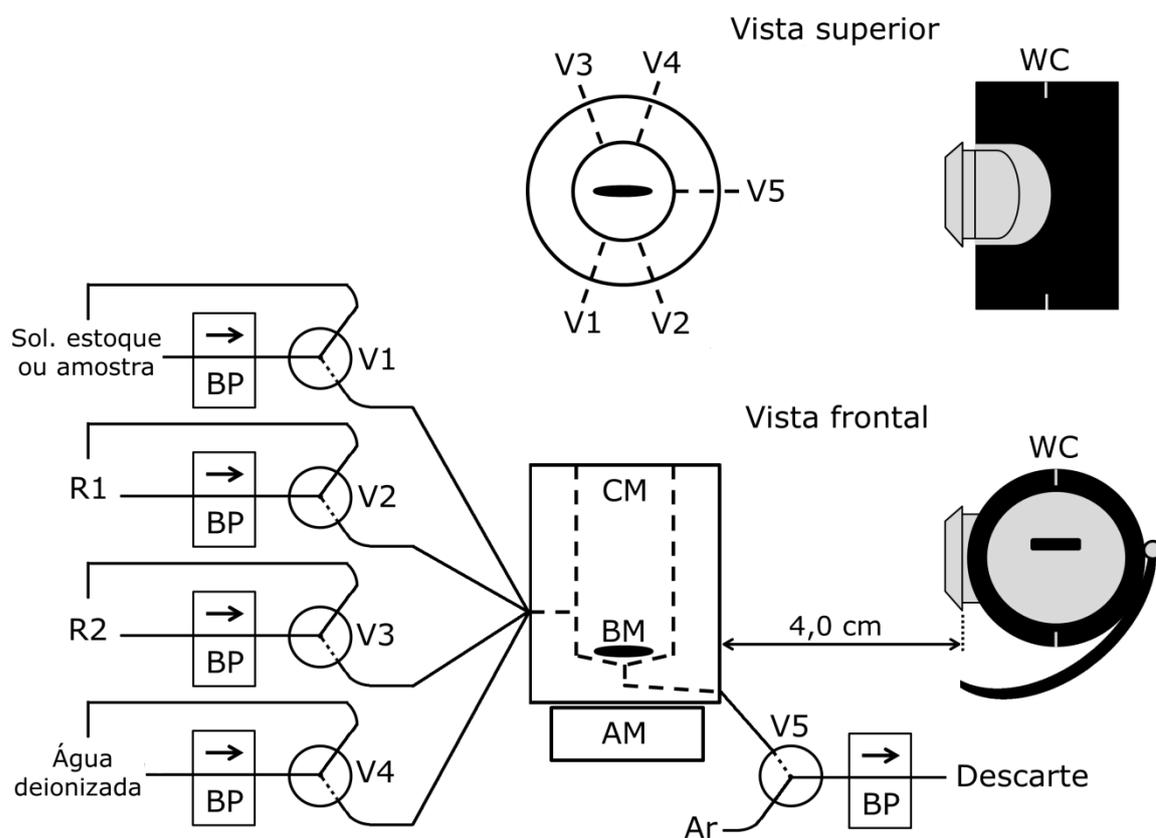


Figura 2.9 – Diagrama esquemático DIB-FBA. Câmara de mistura (CM), bomba peristáltica (BP), barra magnética (BM), agitador magnético (AM), *webcam* (WC) e válvulas solenoides (V1, V2, V3, V4 e V5). Para a determinação de Al(III): R1, quercetina; R2, CTAB. Para a determinação de Cr(VI): R1, DPC; R2 não foi utilizado.

Os procedimentos de mistura das soluções na CM, captura das imagens digitais, descarte e limpeza, são comuns às determinações dos íons alumínio (III) e cromo (VI).

A homogeneização é realizada continuamente durante todas as etapas pela ação da barra magnética (BM) presente no interior da CM. Após a adição das soluções na CM, as imagens são capturadas durante 2,0 s, tempo necessário para capturar 20 imagens, e posteriormente a CM é esvaziada por acionamento da válvula V5 (descarte). Após isso, é realizada uma etapa de limpeza na CM, onde a válvula V4 é acionada durante 4,0 s adicionando água deionizada. Então, a válvula V5 é acionada durante 5,0 s descartando o conteúdo presente no interior da CM. Este procedimento de limpeza e descarte deve ser realizado no mínimo duas vezes, de forma a garantir uma limpeza eficiente da CM.

2.6.1 Procedimento para Determinação de Al(III)

Para a preparação do branco, as válvulas V2 (quercetina), V3 (CTAB) e V4 (água deionizada) são simultaneamente acionadas durante 1,3 s, a CM é preenchida com aproximadamente 750 μL e as imagens do branco são capturadas durante um intervalo de tempo de 2,0 s.

As soluções de calibração (10,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0; 500,0; 600,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Al (III)) foram preparadas na CM, utilizando a solução padrão de 650 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Al(III). Durante a preparação, as válvulas V1 (padrão), V2 (quercetina), V3 (CTAB) e V4 (água deionizada) são simultaneamente acionadas. Os tempos de acionamento variam proporcionalmente de acordo com a concentração da solução de calibração que está sendo preparada. Após a adição das soluções, as imagens digitais são capturadas e salvas em um intervalo de 2,0 s.

O procedimento para a determinação da amostra na CM é similar à preparação das soluções de calibração. A solução padrão é trocada pela amostra já pronta para a análise. Os intervalos de tempo empregado para o acionamento das válvulas, captura das imagens e procedimento de limpeza durante a preparação da amostra são mostrados na [Figura 2.10](#).

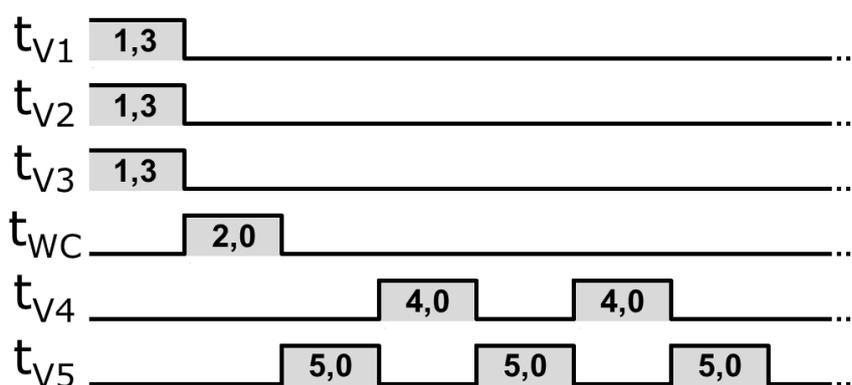


Figura 2.10 – Diagrama dos tempos (em segundos) usados para as análises das amostras de água durante a determinação de Al(III). t_{V1} , t_{V2} , t_{V3} , t_{V4} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V1, V2, V3, V4 e V5, respectivamente; t_{WC} é o tempo de captura das imagens.

2.6.2 Procedimento para Determinação de Cr(VI)

Os procedimentos para a preparação do branco, soluções de calibração e amostra, necessários para a determinação de Cr (VI), são semelhantes aos descritos na [Seção 2.6.1](#).

Para a preparação do branco na CM, as válvulas V2 (1,5-difenilcarbazida) e V4 (água deionizada) são simultaneamente acionadas por 2,0 s, e após a adição das soluções as imagens são capturadas e salvas durante um intervalo de 2,0 s.

As soluções de calibração (10,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI)) foram preparadas na CM, utilizando a solução padrão de 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI). Durante a preparação, as válvulas V1 (padrão), V2 (1,5-difenilcarbazida), e V4 (água deionizada) são simultaneamente acionadas. Os tempos de acionamento variam proporcionalmente de acordo com a concentração da solução de calibração que está sendo preparada. Após a adição das soluções, as imagens digitais são capturadas e salvas em um intervalo de 2,0 s.

A amostra é determinada com o procedimento similar ao das soluções de calibração. A solução padrão é substituída pela amostra e os intervalos de tempo empregados para o acionamento das válvulas, captura das imagens e procedimento de limpeza, durante a preparação da amostra, são mostrados na [Figura 2.11](#).

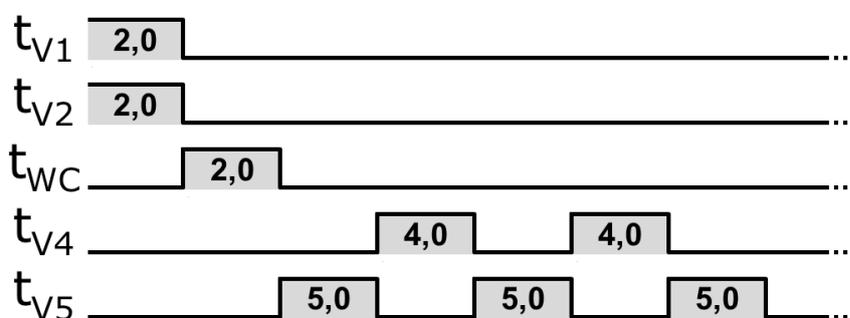


Figura 2.11 – Diagrama dos tempos (em segundos) usado para as amostras de água durante a determinação de Cr(VI). t_{V1} , t_{V2} , t_{V4} e t_{V5} são os tempos de abertura das válvulas V1, V2, V4 e V5, respectivamente; t_{WC} é o tempo de captura das imagens. A válvula V3 não foi utilizada.

2.7 Procedimentos para os Métodos de Referência

O procedimento espectrofotométrico de referência para determinação de alumínio (III) em água foi realizado de acordo com *Standard Methods (Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20^a ed., Método 3500-Al B, método colorimétrico empregando o eriocromo cianina R, pág. 3-56, 1998)* [80]. As medidas foram realizadas em 535 nm, onde encontra-se a máxima absorção do complexo formado.

Para a determinação de cromo (VI) em água residual, o procedimento espectrofotométrico de referência também foi realizado de acordo com *Standard Methods (Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20^a ed., Método 3500-Cr B, o método colorimétrico utilizando o reagente difenilcarbazida, pág. 3-66, 1998)* [80]. As medidas de absorbância foram realizadas em 540 nm, explorando o máximo de absorção do complexo formado.

A análise de cada amostra foi realizada em triplicata autêntica e as concentrações foram estimadas a partir das equações obtidas pelas curvas analíticas.

2.8 Procedimentos para Avaliação da Performace Analítica

Neste trabalho, os procedimentos estatísticos usados para a validação dos modelos de calibração e estimativa das figuras de mérito são descritos sucintamente a seguir.

A avaliação estatística do desempenho do sistema proposto (DIB-FBA), em termos da sensibilidade, faixa dinâmica e dos valores de LOD e LOQ, foi realizada envolvendo a determinação de cada um dos metais. Os resultados foram comparados com os obtidos por intermédio de um espectrofotômetro comercial.

Para ambas as determinações foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) para validar os modelos lineares baseados no método dos mínimos quadrados (MMQ). Em seguida, foram construídas as curvas

analíticas e os testes F para falta de ajuste e de significância estatística da regressão foram aplicados aos modelos lineares com base nos resultados da ANOVA. Além disso, foram obtidos os intervalos de confiança em relação aos parâmetros do modelo que foram estimados.

De acordo com a IUPAC, a sensibilidade de calibração de um método instrumental é dada pela inclinação da curva analítica a uma dada concentração de interesse, expressando a capacidade de um instrumento ou de um método, discriminar entre pequenas diferenças na concentração do analito [32].

Os limites de detecção (*limit of detection* - LOD) e limites de quantificação (*limit of quantification* - LOQ) são definidos como segue. O LOD corresponde a menor concentração, da espécie de interesse (analito), que pode ser detectada pela técnica instrumental utilizada, enquanto o LOQ corresponde a mínima concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de reprodutibilidade das medidas pelo método empregado [32,82].

Existem basicamente três formas de se estimar o LOD e o LOQ e as suas escolhas, geralmente, devem levar em consideração a técnica analítica utilizada, bem como o grau de confiabilidade estatística necessária. São eles: o método visual, da relação sinal/ruído e pelos parâmetros da curva analítica [83].

O método da relação sinal/ruído, que utiliza de 20 a 30 medidas do sinal do branco, é amplamente utilizado devido a sua rapidez e simplicidade dos cálculos estatísticos. O método da estimativa do limite de detecção e quantificação baseado em parâmetros da curva analítica apresenta maior confiabilidade estatística e robustez, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão. Neste caso, o LOD e o LOQ são estimados a partir do intervalo de confiança e pode ser medido a 95% de confiança estatística. Tais estimativas foram realizadas por intermédio de uma planilha eletrônica para validação de métodos analíticos univariados, disponível na internet [84].

A Figura 2.12 ilustra os parâmetros e equações utilizadas para a realização dos cálculos estatísticos para previsão de LOD e LOQ. A estimativa do sinal analítico a partir da equação da regressão apresenta um erro padrão, o produto desse erro pelo valor da distribuição *t* de Student adequado, permite calcular o intervalo de confiança da curva de calibração (Figura 2.12(a)), que apresenta a forma de duas linhas hiperbólicas ao redor da curva. O intercepto do limite superior, do intervalo de confiança, é denominado *y_c* e a sua projeção no limite inferior é uma estimativa da concentração mínima, que pode ser medida com um grau de confiança estatística evidenciado, sendo o limite de detecção do método (LOD). As equações apresentadas (Figura 2.12(a)) descrevem os cálculos de *y_c* crítico e do limite de detecção.

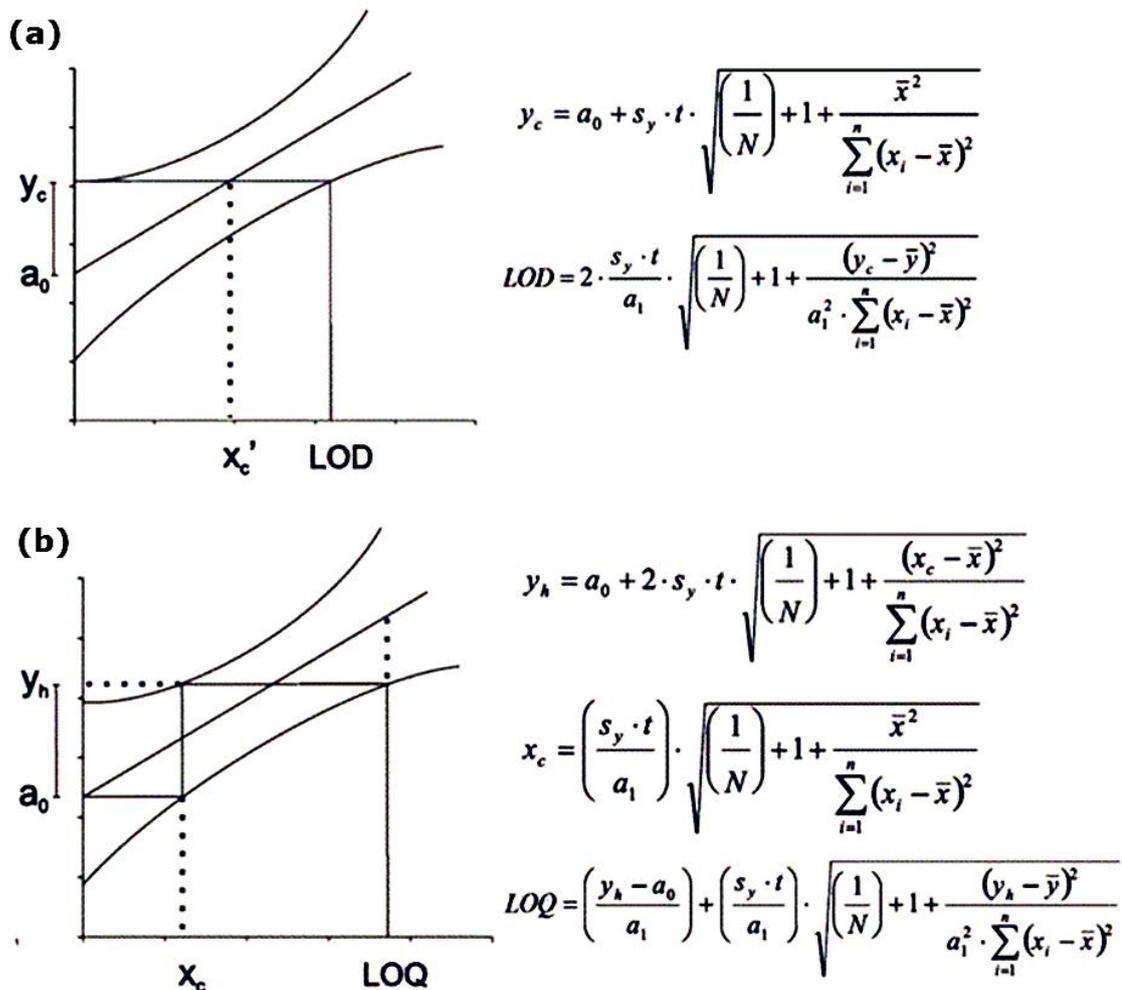


Figura 2.12 – Curvas analíticas e equações utilizadas nos cálculos de LOD (a) e LOQ (b) [82].

Pelo método dos parâmetros da curva de calibração, o limite de quantificação (LOQ) também é determinado da mesma forma de LOD. Como observado na [Figura 2.12\(b\)](#) x_c é o valor da concentração, x , no ponto onde o valor de a_0 intercepta a reta de regressão e y_h é o valor da projeção de x_c no limite superior. Os cálculos estatísticos de y_h , x_c e LOQ podem ser efetuados pela utilização das equações apresentadas na [Figura 2.12\(b\)](#).

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. Dessa forma, a validação do modelo de calibração geralmente é realizada por meio de uma ANOVA ^[85]. A [Tabela 2.1](#) apresenta as equações para ANOVA de dados experimentais adaptados para modelos obtidos pelo método dos mínimos quadrados (MMQ).

Tabela 2.1 – ANOVA para o ajuste de um modelo pelo MMQ.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (gl)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	$\sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	$p - 1$	$SQ_{reg}/(p-1)$
Resíduo	$\sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n - p$	$SQ_r/(n-p)$
Falta de Ajuste	$\sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	$m - p$	$SQ_{faj}/(m-p)$
Erro Puro	$\sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	$n - m$	$SQ_{ep}/(n-m)$

Onde: índice **i** indica o nível da variável x ; índice **j** refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x ; **p** = número de parâmetros do polinômio do modelo de calibração; **n** = número total de medidas; **m** = número de níveis da variável independente x .

A validação de modelos, obtidos pela aplicação do método dos mínimos quadrados, consiste na análise dos resíduos, falta de ajuste e significância estatística da regressão. Na análise de resíduos deixados pelo modelo, verifica-se o comportamento dos erros de previsão em relação aos dados experimentais. Nos gráficos dos resíduos é possível identificar o

tipo de erro associado aos dados ou estrutura sistemática não descrita pelo modelo. Dessa forma, se os resíduos apresentam algum perfil ou estrutura teremos a presença de uma falta de ajuste apresentada pelo modelo. Entretanto, se os resíduos se distribuírem aleatoriamente em torno de zero teremos apenas erros aleatórios.

O teste 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 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 [84].

No teste de significância 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 estatística. Em geral, emprega-se um nível de 95% de confiança. Se a referida razão for maior que o valor de F (de pelo menos cinco vezes como recomendado na literatura [84]), conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa. Do contrário, não se pode admitir a existência de uma relação funcional (linear, quadrática, etc) entre as variáveis que possa ser descrita pelo modelo [84].

Capítulo 3
Resultados e
Discussão

3.1 Tratamento das Imagens Digitais

O tratamento das imagens digitais, capturadas nas determinações de Al(III) e Cr(VI) com o DIB-FBA, foi realizado usando software *ImageJ* [81]. Como mencionado na Seção 2.5, o usuário deve selecionar uma região de maior homogeneidade na imagem a ser tratada (comumente no centro), definindo as coordenadas a serem usadas também nas outras imagens. Uma das ferramentas do software *ImageJ* permite examinar todos os pixels (coluna por coluna) extraíndo as componentes do modelo RGB de cada pixel e calculando o valor médio, máximo e mínimo da região selecionada da imagem.

Na Figura 3.1 são mostradas as imagens dos complexos Al(III)-quercetina-CTAB (Figura 3.1(a)) e Cr(VI)-DPC (Figura 3.1(b)), obtidas com o DIB-FBA, provenientes de cinco soluções de calibração com diferentes concentrações (preparadas por diluição de uma única solução estoque na própria câmara de mistura). A primeira imagem de cada sequência é referente à solução do branco correspondente àquela análise. Em todas as imagens, selecionou-se uma região homogênea para o tratamento, com 100 x 80 pixels de resolução espacial.

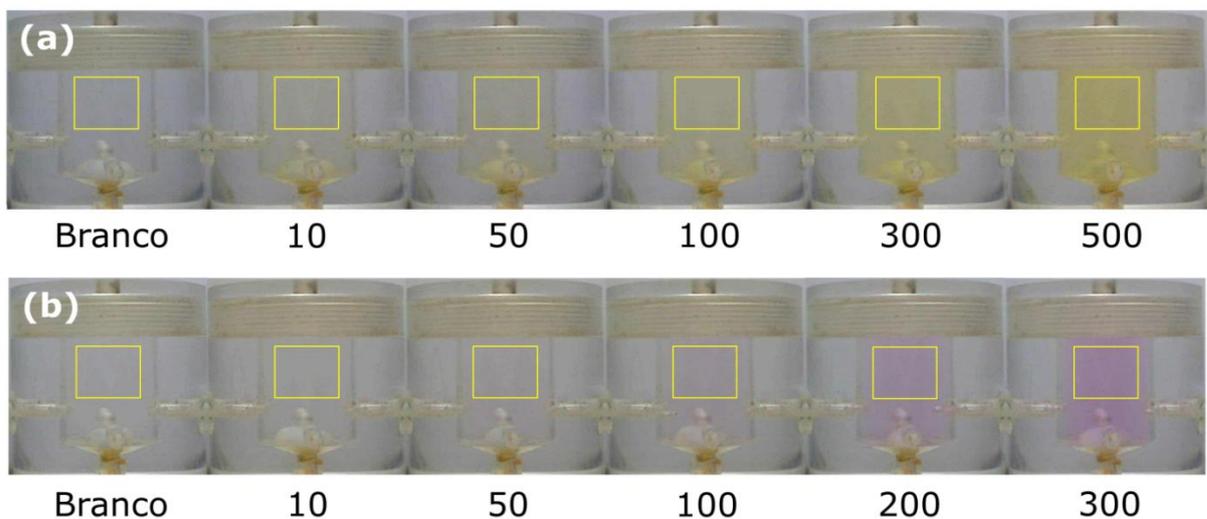


Figura 3.1 – Imagens digitais obtidas utilizando o DIB-FBA com a área selecionada (100 x 80 pixels). Os complexos (a) Al(III)-quercetina-CTAB e (b) Cr(VI)-DPC de algumas soluções de calibração ($\mu\text{g L}^{-1}$) e a solução do branco para cada análise.

A [Figura 3.2](#) mostra uma diminuição no valor da componente B (*Blue*) com o aumento da concentração das soluções de calibração do complexo Al(III)-quercetina-CTAB de cor amarela, enquanto os valores das componentes R (*Red*) e G (*Green*) permanecem praticamente constantes.

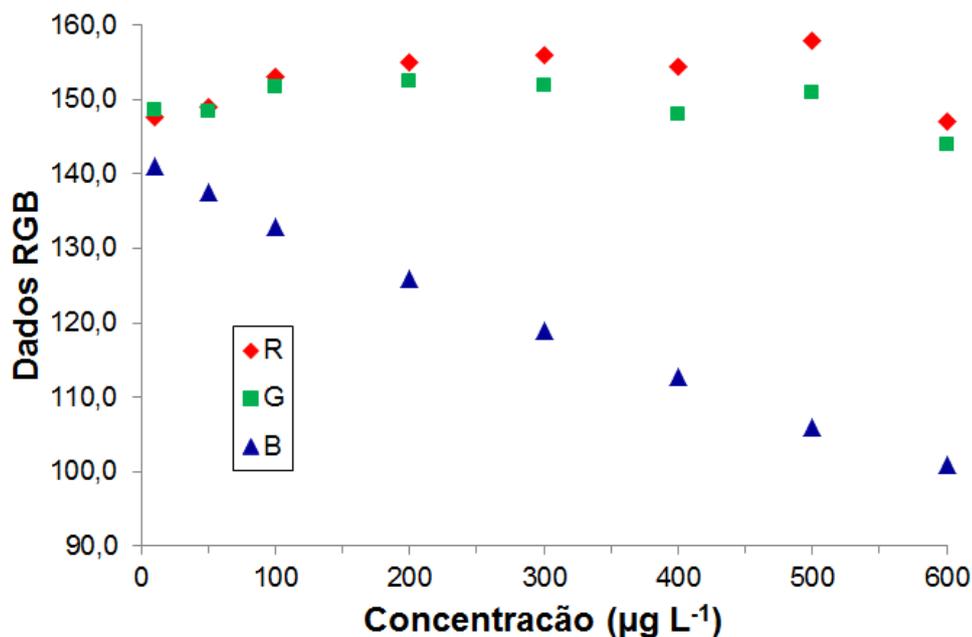


Figura 3.2 – Dados RGB das soluções de calibração do complexo Al(III)-quercetina-CTAB (10 a 600 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Um comportamento semelhante pode ser notado na [Figura 3.3](#), onde a concentração das soluções de calibração do complexo Cr(VI)-DPC, de coloração violeta, estão correlacionadas com a diminuição dos valores da componente G, que correspondem à cor complementar do complexo, enquanto as intensidades das componentes R e B permanecem praticamente constantes.

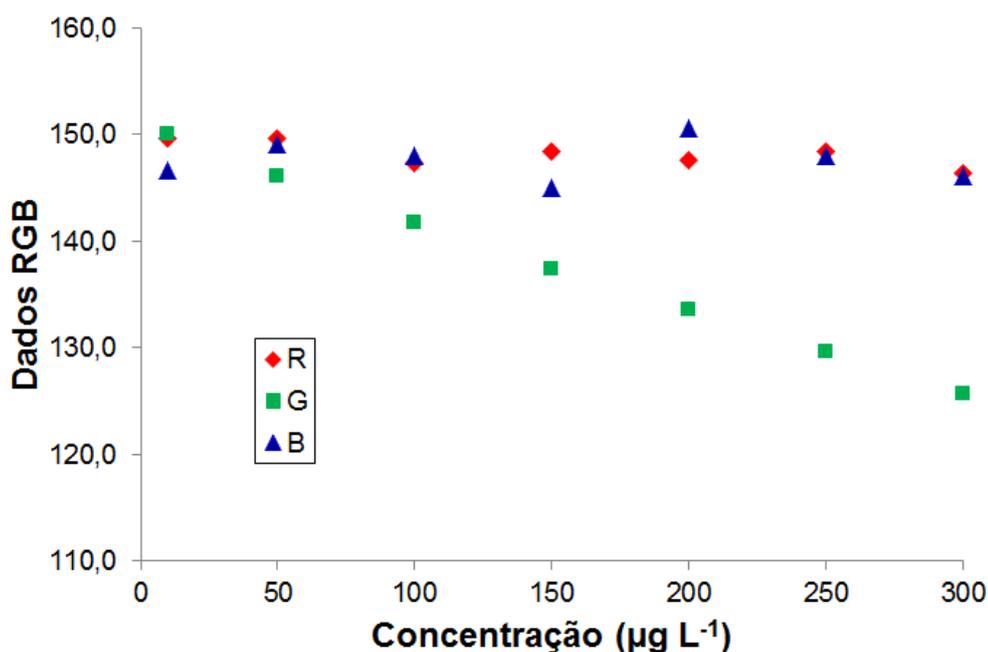


Figura 3.3 – Dados RGB das soluções de calibração do complexo Cr(VI)-DPC (10 a 300 µg L⁻¹).

3.2 Obtenção das Respostas e Curvas Analíticas

A resposta analítica (R) é definida pela [Equação 1](#), reportada na literatura [\[22,23\]](#), e calculada a partir da componente R, G ou B cujo valor diminui com o aumento da concentração do analito:

$$R = \log \frac{I_0}{I} \quad (1)$$

Onde I_0 e I são as médias das intensidades de uma das componentes referente à solução do branco e às de calibração ou amostras, respectivamente, obtidas a partir da área selecionada da imagem digital.

As curvas analíticas foram construídas assumindo-se uma relação linear entre a resposta analítica (R) e a concentração do analito nas soluções de calibração. Pode-se verificar nas [Seções 3.3](#) e [3.4](#) que na determinação de Al(III), a resposta analítica, baseada nos valores da componente B, mostrou-se proporcional à concentração do complexo nas

soluções de calibração. Enquanto para a determinação de Cr(VI), a relação proporcional à concentração do analito foi estabelecida por meio da resposta baseada nos valores da componente G.

3.3 Validação da Curva Analítica para Determinação de Al(III)

Tendo investigado a faixa linear para a determinação de Al(III) em amostras de água natural, construiu-se a curva analítica para a faixa de concentrações de 10 a 600 $\mu\text{g L}^{-1}$, em triplicatas autênticas. As curvas analíticas construídas a partir das imagens obtidas com o sistema DIB-FBA e das medidas com o espectrofotômetro HP são mostradas na [Figura 3.4](#).

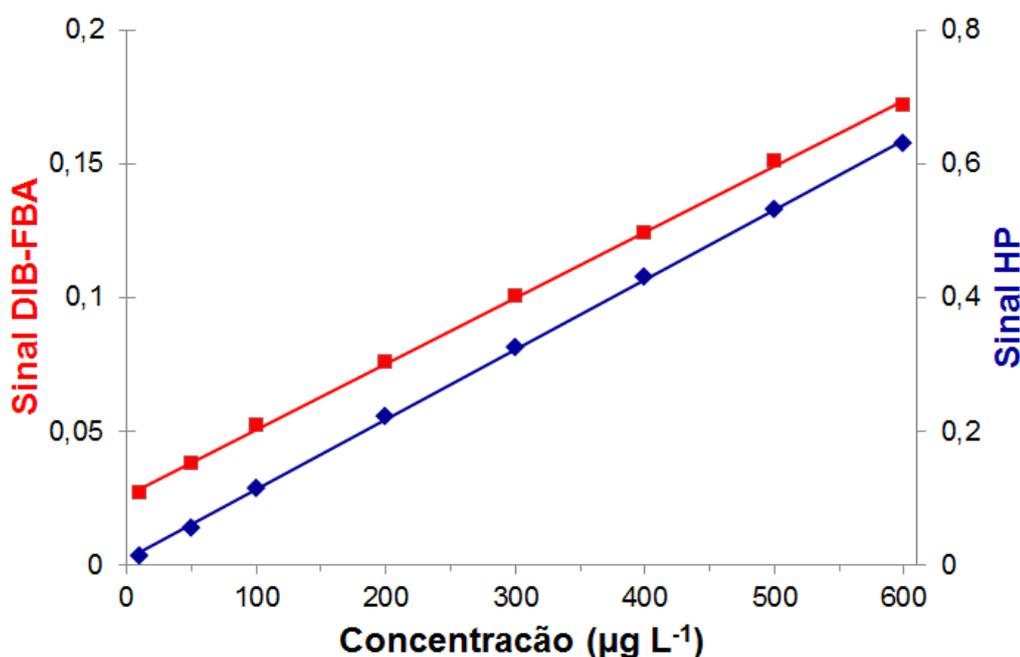


Figura 3.4 – Curvas de calibração DIB-FBA (linha vermelha) e HP (linha azul) para a determinação de Al(III).

As curvas analíticas obtidas aplicando ambos os métodos foram construídas a partir dos níveis de concentração 10,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0; 500,0 e 600,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Al(III). A [Figura 3.4](#) mostra que as curvas analíticas apresentam um comportamento linear entre as respostas analíticas e a concentração de Al(III) nas soluções de calibração.

Essa inferência baseada, inicialmente, em uma inspeção visual, é confirmada adiante pela análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos e corroborada pelos resultados da ANOVA apresentados em seguida.

Os parâmetros dos modelos de calibração, obtidos por regressão linear pelo modelo dos mínimos quadrados, considerando o nível de confiança de 95%, e os limites dos intervalos de confiança para os valores populacionais são apresentados na [Tabela 3.1](#). Os intervalos de confiança não contêm o valor zero, os parâmetros estimados para todos os modelos de calibração são estatisticamente significativos. Além disso, pode-se observar que o instrumento HP produziu uma curva analítica ([Figura 3.4](#)) para quantificação de Al(III) com maior coeficiente angular (β), evidenciando uma maior sensibilidade de calibração.

Tabela 3.1 – Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos para a determinação de Al(III) em águas.

Instrumento	Modelo: $\hat{y} = \alpha + \beta x$	
	$\alpha \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\alpha)$	$\beta \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\beta)$
HP	0,0077 \pm 0,002	0,0010 \pm 0,003
DIB-FBA	0,0261 \pm 0,011	0,0002 \pm 0,001

A [Figura 3.5](#) mostra os gráficos dos resíduos deixados pelos modelos de calibração. Pode-se observar a distribuição de maneira aleatória dos resíduos ao longo da faixa dinâmica estudada, não apresentando nenhum perfil sistemático indicando a falta de ajuste do modelo.

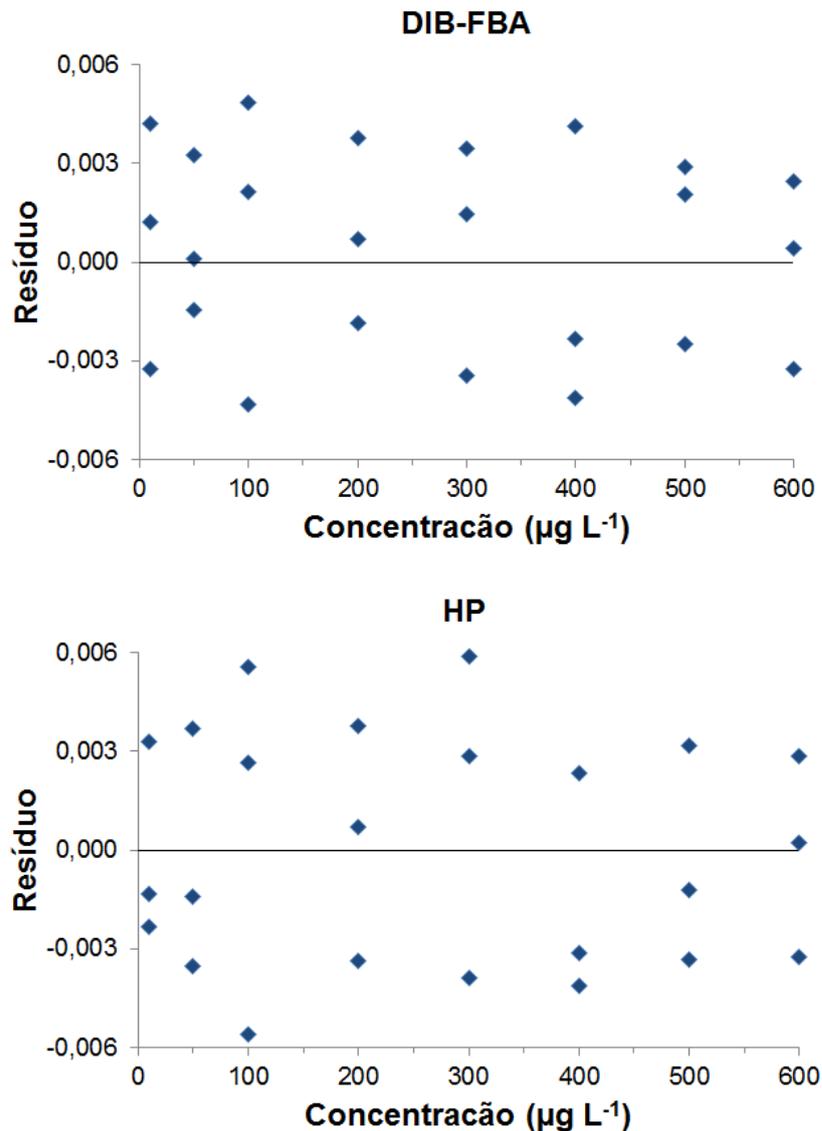


Figura 3.5 – Gráficos dos resíduos dos modelos de calibração DIB-FBA e HP para a determinação de Al(III).

Os resultados da ANOVA, empregados para corroborar na validação dos modelos de calibração utilizando o DIB-FBA e o HP, são apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3. Definidos os graus de liberdade, as médias quadráticas foram calculadas a partir das somas quadráticas por meio das equações apresentadas na Tabela 2.1 e os valores obtidos são mostrados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas (ANOVA), para a determinação de Al(III).

Fonte	SQ		MQ	
	DIB-FBA	HP	DIB-FBA	HP
Reg. (1)	$2,13 \times 10^{-2}$	$1,54 \times 10^{-1}$	$2,13 \times 10^{-2}$	$1,54 \times 10^{-1}$
Res. (22)	$2,61 \times 10^{-5}$	$1,47 \times 10^{-4}$	$2,15 \times 10^{-6}$	$1,35 \times 10^{-5}$
F. Aj. (6)	$2,57 \times 10^{-5}$	$1,46 \times 10^{-4}$	$5,82 \times 10^{-6}$	$3,15 \times 10^{-5}$
E. P. (16)	$4,52 \times 10^{-5}$	$4,18 \times 10^{-4}$	$4,52 \times 10^{-6}$	$4,18 \times 10^{-5}$

Os resultados dos testes de falta de ajuste e significância de regressão são mostrados na [Tabela 3.3](#). Em ambos os casos, os valores MQ_{faj}/MQ_{ep} são menores que o ponto de distribuição F , considerando um nível de 95% de confiança e os mesmos graus de liberdade. Assim, não há evidências de falta de ajuste para os modelos lineares apresentados na [Tabela 3.1](#). Além disso, dado que os valores MQ_{reg}/MQ_r são muito maiores que os pontos de distribuição F (para os mesmos graus de liberdade e confiança estatística), as equações dos modelos são altamente significativas.

Tabela 3.3 – Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração para a determinação de Al(III).

		HP	DIB-FBA
	MQ_{faj}/MQ_{ep}	0,754	1,288
	MQ_{reg}/MQ_r	$1,061 \times 10^4$	$1,141 \times 10^4$
gl	Falta de Ajuste	6 e 16 respectivamente	
	Signif. da Regressão	1 e 22 respectivamente	
Fv1/v2	Falta de Ajuste	2,74	
a 95%	Signif. da Regressão	4,30	

Após a validação das curvas analíticas, foram estimados os valores de LOD e LOQ para sistema proposto e para o método de referência baseado no uso do espectrofotômetro comercial. Os resultados, apresentados na [Tabela 3.4](#), revelam que os valores obtidos para o método de referência são um pouco menores em relação ao DIB-FBA. Tais diferenças podem ser atribuídas, principalmente, ao tipo de detector e ao caminho óptico empregado. O DIB-FBA possui uma *webcam* com sensor CCD como detector e um caminho óptico de 0,8 cm, enquanto o espectrofotômetro HP apresenta um arranjo de fotodiodos como detector, e o caminho óptico de 1,0 cm. Desta forma, os resultados mostram-se coerentes com as limitações encontradas no instrumento proposto.

Tabela 3.4 – Valores de LOD e LOQ, em $\mu\text{g L}^{-1}$, estimados ao nível de 95% de confiança, para a determinação de Al(III) em água.

	HP	DIB-FBA
LOD	1,60	3,97
LOQ	5,34	13,25

3.4 Validação da Curva Analítica para Determinação de Cr(VI)

O estudo da faixa linear para a determinação Cr(VI) em águas revelou que a faixa linear de concentrações se estende de 10 a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$. As curvas de calibração foram construídas a partir das medidas, realizadas em triplicatas autênticas, nos níveis de concentração 10,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 e 300,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI).

Na [Figura 3.6](#) são mostradas as curvas analíticas obtidas empregando o sistema DIB-FBA e o instrumento comercial. Visualmente, observa-se um comportamento linear entre a resposta analítica e a concentração de Cr(VI) presente nas soluções de calibração para ambos os casos. Essa inferência é confirmada pela análise gráfica dos resíduos deixados pelos modelos e corroborada pela ANOVA apresentados na sequência.

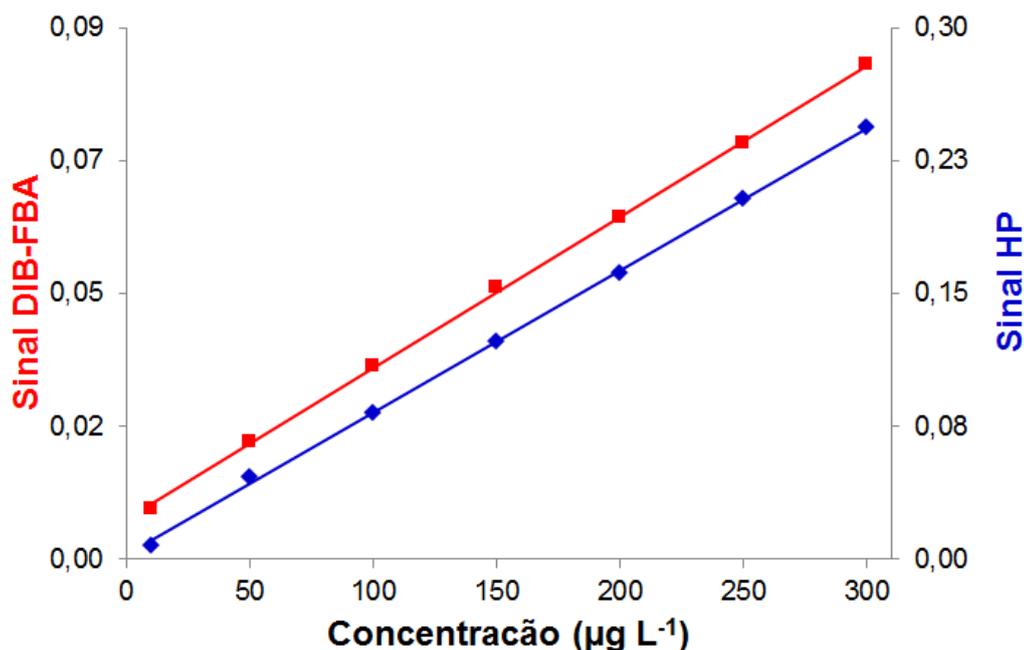


Figura 3.6 – Curvas de calibração DIB-FBA (linha vermelha) e HP (linha azul) para a determinação de Cr(VI).

Os parâmetros dos modelos, obtidos por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, considerando o nível de confiança de 95%, e os limites dos intervalos de confiança para os valores populacionais são apresentados na [Tabela 3.5](#). Como os intervalos de confiança não contêm o valor zero, os parâmetros estimados para todos os modelos de calibração são estatisticamente significativos. Novamente, o instrumento HP apresentou uma maior sensibilidade de calibração quando utilizado na determinação de Cr(VI), como evidenciado pelo maior valor do parâmetro β e inclinação da curva analítica ([Figura 3.6](#)).

Tabela 3.5 – Parâmetros de regressão linear e limites dos intervalos de confiança para os coeficientes dos modelos obtidos para a determinação de Cr(VI) em águas.

Instrumento	Modelo: $\hat{y} = \alpha + \beta x$	
	$\alpha \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\alpha)$	$\beta \pm t_{13} \times \text{erro puro}(\beta)$
HP	0,002 ± 0,004	0,0008 ± 0,001
DIB-FBA	0,007 ± 0,003	0,0003 ± 0,002

A Figura 3.7 mostra os gráficos dos resíduos deixados pelos modelos de calibração. Pode-se observar a distribuição de maneira aleatória dos resíduos ao longo da faixa dinâmica estudada, não apresentando nenhum perfil sistemático indicando a falta de ajuste do modelo.

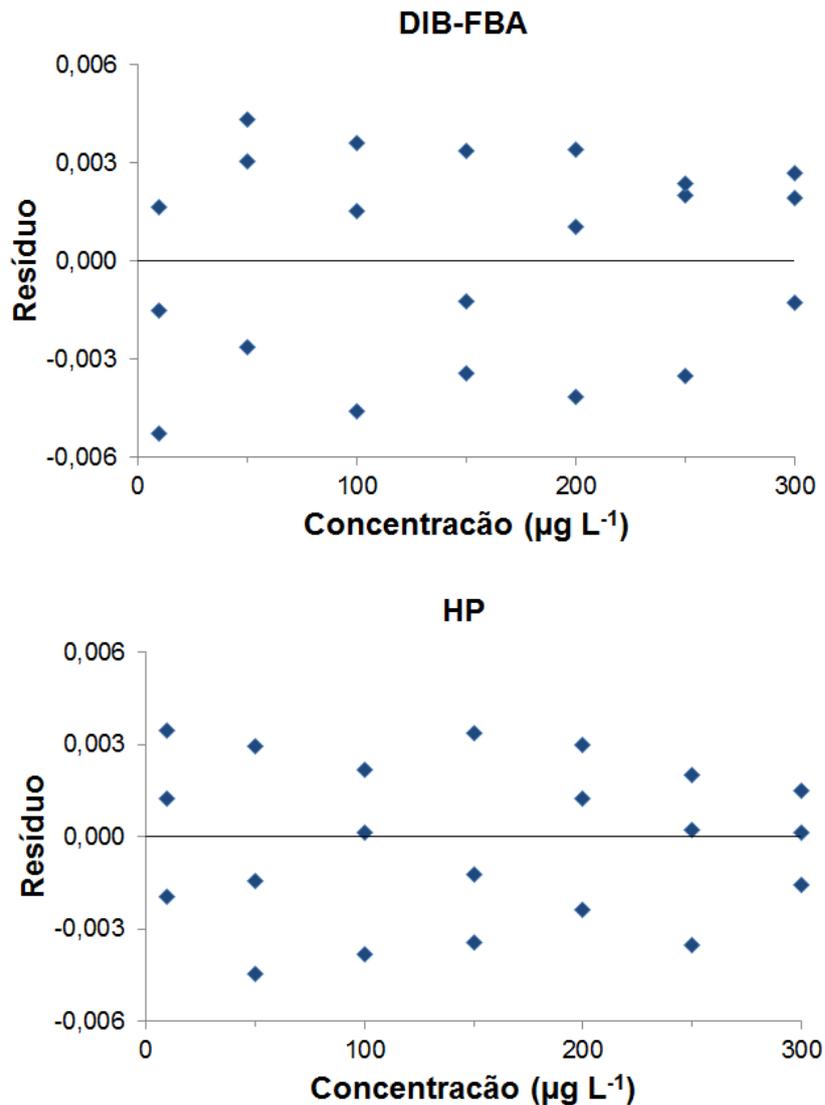


Figura 3.7 – Gráficos dos resíduos dos modelos de calibração DIB-FBA e HP para a determinação de Cr(VI).

Os resultados da ANOVA, empregados para a validação dos modelos de calibração utilizando o DIB-FBA e o HP, são apresentados nas Tabelas 3.6 e 3.7. Definidos os graus de liberdade, as médias quadráticas foram calculadas a partir das somas quadráticas por meio das equações

apresentadas na Tabela 2.1 e os valores obtidos são mostrados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Somas quadráticas e médias quadráticas calculadas (ANOVA), para a determinação de Cr(VI).

Fonte	SQ		MQ	
	DIB-FBA	HP	DIB-FBA	HP
Reg. (1)	$1,54 \times 10^{-4}$	$1,31 \times 10^{-3}$	$1,54 \times 10^{-4}$	$1,31 \times 10^{-3}$
Res. (19)	$1,77 \times 10^{-6}$	$1,60 \times 10^{-6}$	$1,57 \times 10^{-7}$	$1,46 \times 10^{-7}$
F. Aj. (5)	$1,86 \times 10^{-7}$	$1,17 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-8}$	$2,55 \times 10^{-6}$
E. P. (14)	$6,13 \times 10^{-7}$	$4,52 \times 10^{-5}$	$6,13 \times 10^{-8}$	$4,52 \times 10^{-5}$

Os resultados dos testes de falta de ajuste e significância de regressão são mostrados na Tabela 3.7. Em ambos os casos, os valores MQ_{faj}/MQ_{ep} são menores que o ponto de distribuição F , considerando um nível de 95% de confiança e os mesmo graus de liberdade. Assim, não há evidências de falta de ajuste para um modelo linear, e os valores MQ_{reg}/MQ_r são muito maiores que o ponto de distribuição F , considerando os mesmos graus de liberdade e o nível de 95% de confiança estatística.

Tabela 3.7 – Tabela ANOVA para o modelo linear das curvas de calibração para a determinação de Cr(VI).

		HP	DIB-FBA
	MQ_{faj}/MQ_{ep}	0,564	0,471
	MQ_{reg}/MQ_r	$8,972 \times 10^4$	$9,81 \times 10^3$
gl	Falta de Ajuste	5 e 14 respectivamente	
	Signif. da Regressão	1 e 20 respectivamente	
Fv1/v2	Falta de Ajuste	2,96	
a 95%	Signif. da Regressão	4,35	

Os valores de LOD e LOQ estimados para ambos os métodos são apresentados na [Tabela 3.8](#). Novamente, os valores obtidos para o método de referência, baseado no uso do espectrofotômetro, foram inferiores ao do DIB-FBA. Da mesma forma que para o caso do Al(III), essas diferenças podem ser atribuídas ao caminho óptico e o tipo de detector empregados nos sistemas. O DIB-FBA utiliza uma *webcam* com sensor CCD como detector e um caminho óptico de 0,8 cm, enquanto o espectrofotômetro HP apresenta um arranjo de fotodiodos como detector, e o caminho óptico de 1,0 cm. A coerência dos resultados pode ser justificado devido as limitações encontradas no instrumento proposto.

Tabela 3.8 – Valores de LOD e LOQ, em $\mu\text{g L}^{-1}$, estimados ao nível de 95% de confiança, para a determinação de Cr(VI) em água.

	HP	DIB-FBA
LOD	2,65	3,40
LOQ	8,83	11,26

Uma vez validados os modelos de calibração, as curvas analíticas foram utilizadas para as determinações de Al(III) e Cr(VI) em águas, como descrito na [Seção 3.5](#).

3.5 Aplicações Analíticas do Sistema Proposto

As curvas analíticas obtidas pelo DIB-FBA e pelo HP foram utilizadas para a determinação de Al(III) em amostras de água natural ([Tabela 3.9](#)) e de Cr(VI) em amostras de água residual ([Tabela 3.10](#)).

Tabela 3.9 – Valores médios das concentrações preditas ($n=3$) das amostras de água natural para a determinação de Al(III) em $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando o DIB-FBA e o HP.

Amostras	DIB-FBA	DPR %	HP	DPR %
1	34,9 ± 0,5	1,43	34,2 ± 0,3	0,88
2	46,3 ± 0,9	1,94	46,2 ± 0,5	1,08
3	47,7 ± 0,7	1,47	46,6 ± 0,3	0,64
4	130,4 ± 0,6	0,46	131,5 ± 0,4	0,30
5	32,6 ± 0,8	2,45	33,0 ± 0,6	1,82
6	82,7 ± 1,1	1,33	83,4 ± 0,8	0,96

Tabela 3.10 – Valores médios das concentrações preditas ($n=3$) das amostras de água residual para a determinação de Cr(VI) em $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando o DIB-FBA e o HP.

Amostras	DIB-FBA	DPR %	HP	DPR %
1	19,8 ± 0,4	2,02	19,2 ± 0,3	1,56
2	23,6 ± 0,3	1,27	24,1 ± 0,4	1,66
3	22,0 ± 0,5	2,27	21,9 ± 0,3	1,37
4	14,0 ± 0,3	2,14	14,7 ± 0,3	2,04
5	<LOQ	-	<LOQ	-
6	17,1 ± 0,2	1,17	17,6 ± 0,1	0,57

Nas Tabelas 3.9 e 3.10, pode-se observar que os procedimentos DIB-FBA e HP apresentam desempenho similar em termos de precisão. De fato, os valores do desvio padrão relativo (DPR %) [86] foram, em geral menores que 2% para ambos os analitos. Além disso, a aplicação do teste t -pareado revelou não existir diferença estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança. Quanto à exatidão, o sistema proposto permitiu quantificar Al(III) e Cr(VI) com erros relativos médios,

respectivamente, de 1,2% e 2,7%. Esses valores atestam uma boa concordância entre os valores obtidos por ambos os procedimentos.

A avaliação da performance do analisador proposto, nas análises envolvendo calibração univariada, apontam a viabilidade prática e a confiabilidade nas medidas realizadas no DIB-FBA para os analitos alvos das quantificações.

O DIB-FBA apresentou uma frequência analítica de 137 amostras por hora para a determinação de Al(III) e 134 amostras por hora para a determinação de Cr(VI) em águas.

Capítulo 4

Conclusão

4.1 Conclusão

Neste trabalho foi desenvolvido uma nova metodologia automática, para a determinação dos íons Al(III) e Cr(VI) em águas, baseada em imagens digitais. Para isso, foi desenvolvido um analisador automático fluxo-batelada empregando uma câmara de mistura/reacional transparente, confeccionada em acrílico, acoplada a uma *webcam* com sensor CCD, para a captura das imagens digitais obtidas.

A determinação de Al(III) em amostras de água natural foi baseada no método da quercetina [12]. As componentes do modelo de cor RGB das imagens capturadas durante a análise foram extraídas utilizando o programa *ImageJ*, e a componente B manteve uma relação linear satisfatória com a concentração do analito em estudo, possibilitando assim a construção de um modelo matemático linear para a quantificação de Al(III).

A determinação de Cr(VI) em amostras de água residual foi baseada no método da difenilcarbazida [13,80]. Nesse caso foi a componente G, do modelo RGB, que apresentou uma relação linear com a concentração de Cr(VI), o que possibilitou a construção de um modelo matemático linear também satisfatório para a quantificação de Cr(VI) neste tipo de matriz.

Todos os resultados das análises mostraram-se estatisticamente satisfatórios, e foram devidamente validados. Tanto os testes *t*-parelhado, a 95% de confiança estatística, quanto às análises de variância para falta de ajuste do modelo, não confirmaram desvios significativos, creditando os resultados obtidos utilizando o DIB-FBA em relação aos obtidos empregando o método de referência.

Desta forma, o sistema automático desenvolvido, empregando imagens digitais, apresentou uma instrumentação simples, caracterizando-se pelo baixo consumo de reagentes e amostra, baixa geração de resíduos, reprodutibilidade, versatilidade e robustez. O sistema, ainda, possibilitou a realização de análises em um curto intervalo

de tempo, apresentando uma frequência analítica de 137 amostras por hora para a determinação de Al(III), e 134 amostras por hora para a determinação de Cr(VI) em águas. Convém ressaltar que ambas determinações foram implementadas utilizando uma única configuração física do sistema.

O DIB-FBA proposto pode ser utilizado em outras aplicações analíticas que envolvem determinações colorimétricas, sem a necessidade de modificações em sua configuração física e alteração dos seus componentes, sendo necessário apenas modificações em seu programa de controle.

Portanto, a proposta deste estudo de construir o DIB-FBA contribuiu de maneira significativa para os estudos envolvendo automação e instrumentação analítica e imagens digitais. As boas características obtidas pelo DIB-FBA estão em consonância com as exigências acadêmicas e industriais da sociedade atual e podem admitir que novos trabalhos dentro dessa ótica fossem desenvolvidos e aplicados, permitindo assim que as ciências e tecnologias analíticas avancem cada vez mais.

4.2 Perspectivas

Esta pesquisa tem como perspectivas aplicações do analisador automático DIB-FBA para outras determinações colorimétricas, fluorimétricas, quimiluminescentes e turbidimétricas, aplicadas em: análises de alimentos, bebidas, pesticidas, fármacos, análises clínicas e de fluidos biológicos.

Planeja-se, ainda, para os próximos estudos, uma melhoria no DIB-FBA, utilizando uma câmara de mistura miniaturizada, microfabricada com resina uretana-acrilato e placas de vidros, permitindo uma redução ainda maior no consumo de soluções reagentes e amostras por determinações, bem como na geração de resíduos, dando maior portabilidade e capacidade de integração do dispositivo.

Referências

1. GÓMEZ, V.; CALLAO, M.P. Chromium determination and speciation since 2000, *Trend. Anal. Chem.* **25:1006, 2006.**
2. ŠČANČAR, J.; MILAČIČ, R. Aluminium speciation in environmental samples: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* **386:999, 2006.**
3. KATZ, S.A.; SALEM, H. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review, *J. Appl. Toxicol.* **13:217, 1993.**
4. LIAN, H. et al. Direct determination of trace aluminum with quercetin by reversed-phase high performance liquid chromatography, *Talanta*, **62:43, 2004.**
5. CAREY, J.M.; VELA, N.P.; CARUSO, J.A. Chromium determination by supercritical fluid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and flame ionization detection, *J. Chromatogr. A*, **662:329, 1993.**
6. NARIN, I.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Aluminium determination in environmental samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after solid phase extraction on Amberlite XAD-1180/pyrocatechol violet chelating resin, *Talanta*, **63:411, 2004.**
7. KEFALA, G.; ECONOMOU, A.; SOFONIOU, M. Determination of trace aluminium by adsorptive stripping voltammetry on a preplated bismuth-film electrode in the presence of cupferron, *Talanta*, **68:1013, 2006.**
8. KARA, D.; FISHERB, A.; HILL, S.J. Flow injection determination of aluminium by spectrofluorimetric detection after complexation with N-o-vanillidine-2-amino-p-cresol: The application to natural waters, *Anal. Chim. Acta*, **611:62, 2008.**
9. HOSSEINI, M.S.; BELADOR, F. Cr(III)/Cr(VI) speciation determination of chromium in water samples by luminescence quenching of quercetin, *J. Hazard. Mater.* **165:1062, 2009;**
10. TORTAJADA-GENARO, L.A.; CAMPÍNS-FALCÓ, P.; BOSCH-REIG, F. Calibration transfer in chemiluminescence analysis: Application to chromium determination by luminol-hydrogen peroxide reaction, *Anal. Chim. Acta*, **446:385, 2001.**

11. CHERIAN, T.; NARAYANA, B. Spectrophotometric determination of chromium using saccharin, *Ind. J. Chem. Technol.* **12:596, 2005.**
12. NORFUN, P.; POJANAKAROON, P.; LIAWRAUNGRATH, S. Reverse flow injection spectrophotometric for determination of aluminium(III), *Talanta*, **82:202, 2010.**
13. PIRES, C.K. et al. Speciation of chromium in natural waters by micropumping multicommutated light emitting diode photometry, *Talanta*, **72:1370, 2007.**
14. PYRZYNSKA, K.; GUÇER, S.; BULSKA, E. Flow-injection speciation of aluminium, *Wat. Res.* **34:359, 2000.**
15. IÑÓN, F.A.; TUDINO, M.B. Theoretical Aspects of Flow Analysis em: TROJANOWICZ, M. (Ed.), *Advances in Flow Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008.**
16. HONORATO, R.S. et al. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search, *Anal. Chim. Acta*, **396:91, 1999.**
17. LIMA, M.B. et al. Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction, *Talanta*, **89:21, 2012.**
18. GAIÃO, E.N. et al. Digital image-based titrations, *Anal. Chim. Acta*, **570:283, 2006.**
19. TÔRRES, A.R. et al. A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid–base titration without indicator, *Talanta*, **84: 601,2011.**
20. LOPEZ-MOLINERO, A. et al. Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics, *Microchem. J.* **96:380, 2010.**
21. MALEKI, N.; SAFAVI, A.; SEDAGHATPOUR, F. Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera, *Talanta*, **64:830, 2004.**

22. KOHL, S.K.; LANDMARK, J.D.; STICKLE, D.F. Demonstration of absorbance using digital color image analysis and colored solutions, *J. Chem. Educ.* **83:644, 2006.**
23. GOMES, M.S. et al. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico, *Quim. Nova*, **31:1577, 2008.**
24. WONGWILAI, W. et al. Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach, *Talanta*, **81:1137, 2010.**
25. FILIPPINI, D, LUNDSTRÖM, I. Spectroscopic information retained in screen photo-assisted techniques, *Anal. Chim. Acta.* **521: 237,2004.**
26. MIZUGUCHIA, H. et al. Highly sensitive colour change system within slight differences in metal ion concentrations based on homo-binuclear complex formation equilibrium for visual threshold detection of trace metal ions, *Anal. Chim. Acta*, **527:131, 2004.**
27. SHISHKIN, Y.L. et al. Use of a scanner and digital image-processing software for the quantification of adsorbed substances, *J. Anal. Chim.* **59:102, 2004.**
28. MARTIN, M.L.G.M. et al. Measuring colour appearance of red wines, *Food Qual. Pref.* **18:862, 2007.**
29. ELLERBEE, A.K. et al. Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper, *Anal. Chem.* **81:8447, 2009.**
30. KLASNER, S.A. et al. Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva, *Anal. Bioanal. Chem.* **397:1821, 2010.**
31. BYRNE, L. et al. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements, *Trends Anal. Chem.* **19:517, 2000.**
32. HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. Princípios de análise instrumental, 6ª ed., Porto Alegre, Bookman, **2009.**
33. VALCÁRCEL, M.; CÁRDENAS, M.S. Automatización y miniaturización en química analítica, Córdoba, Springer, **2000.**

34. KOLEV, S.D.; MCKELVIE, I.D. Comprehensive analytical chemistry advancer in flow injection analysis and relater techniques, Oxford, Elsevier, **2008**.
35. 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**.
36. KOLEV, S.D.; MCKELVIE, I.D. Advances in flow injection analysis and related techniques, 1^a ed., Hungary, Elsevier, **2008**.
37. ZAGATTO, E.A.G. et al. Mixing chambers in flow analysis: A review, *J. Anal. Chem.* **64:524, 2009**.
38. SKEGGS, L.T. An automatic method for colorimetric analysis, *Amer. J. Clin. Pathol.*, **28:311, 1957**.
39. RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta*, **781:145, 1975**.
40. PASQUINI, C.; OLIVERIA, W.A. Monosegmented system for continuous flow analysis spectrophotometric determination of chromium (VI), ammonia, and phosphorous. *Anal. Chem.* **57:2575, 1985**.
41. 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**.
42. 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**.
43. ROCHA, F.R.P. et al. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends, *Anal. Chim. Acta*, **468:119, 2002**.
44. LIMA, R.A.C. et al. Hardness screening of water using a flow-batch photometric system, *Anal. Chim. Acta*, **518:25, 2004**.
45. OLIVEIRA, S.C. et al. A coulometric flow cell for in-line generation of reagent, titrant or standard solutions, *Microchem. J.* **82:220, 2006**.

46. SILVA, J.E. et al. A flow-batch internal standard procedure for iron determination in hydrated ethanol fuel by flame atomic absorption spectrometry, *Talanta*, **70:522, 2006**.
47. ACEBAL, C.C. et al. A new automated approach to determine monosodium glutamate in dehydrated broths by using the flow-batch methodology, *Talanta*, **81:116, 2010**.
48. LIMA, M.B. et al. Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer, *Talanta*, **88:717, 2011**.
49. GRÜNHUT, M. et al. Flow-batch analyzer for the chemiluminescence determination of catecholamines in pharmaceutical preparations, *Anal. Letter*, **44:67, 2011**.
50. SILVA, M.B.; CRISPINO, C.C.; REIS, B.F. Automatic photometric titration procedure based on multicommutation and flow-batch approaches employing a photometer based on twin leds, *J. Braz. Chem. Soc.* **21:1856, 2010**.
51. BERNIS, R.S. Principles of color technology, 3rd ed., Wiley, New York, **2000**.
52. GONZALEZ, R.C.; Woods, R.E. Processamento de imagens digitais, 1^a ed., Edgard Blücher, São Paulo, **2000**.
53. LYRA, W.S. Espectrometria de emissão em chama baseada em imagens. João Pessoa, Departamento de Química, UFPB, Dissertação de Mestrado, 103p, **2008**.
54. CALMANO, W. Metals in sediments: Remobilization and environment hazards. In: MUNAWAR, M; DAVE, G. (eds). Development and progress in sediment quality assessment: rationale, challenges, techniques & strategies, SPB Academic Publishing bv, Amsterdam, **1996**.
55. MORTATTI, J.; PROBST, J.L. Characteristics of heavy metals and their evaluation in suspended sediments from Piracicaba river basin (São Paulo, Brazil), *Rev. Bras. Geoc.* **40:375, 2010**.

56. KRUSCHE, A.V. et al. Spatial and temporal water quality variability in the Piracicaba river basin, Brazil, *J. Am. Water Res. Assoc.* **33:1117, 1997.**
57. OMS – Organização Mundial de Saúde, Elementos traço na nutrição e saúde humanas, Roca, São Paulo, **1998.**
58. GROSSI, M.G.L. Avaliação da qualidade dos produtos obtidos de usinas de compostagem brasileiras de lixo doméstico através de determinação de metais pesados e substâncias orgânicas tóxicas. São Paulo, Instituto de Química, USP, Tese de Doutorado, 238p, **1993.**
59. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA 2005. Resolução Conama nº 357, disponível em: < <http://www.mma.gov.br/conama/> >. Acessado em **11/01/2012.**
60. TIPPING, E., LOFTS, S., LAWLOR, A.J. Modelling the chemical speciation of trace metals in the surface waters of the humber system. *Sci. Total Environ.* **210:63, 1998.**
61. FYTIANOS, K. Speciation analysis of heavy metals in natural water: a review. *J. AOAC Int.* **84:1763, 2001.**
62. TRIA, J. et al. Determination of aluminium in natural water samples, *Anal. Chim. Acta*, **588:153, 2007.**
63. BI, S. et al. Studies on the mechanism of hydrolysis and polymerization of aluminum salts in aqueous solution: correlations between the "Core-links" model and "Cage-like" Keggin- Al_{13} model, *Coord. Chem. Rev.* **248:441, 2004.**
64. BISHOP, N.J. et al. Aluminum neurotoxicity in preterm infants receiving intravenous-feeding solutions, *N. Engl. J. Med.* **336:1557, 1997.**
65. MESQUITA, R.B.R.; RANGEL, A.O.S.S. A review on sequential injection methods for water analysis, *Anal. Chim. Acta*, **648:7, 2009.**
66. WAUER, G.; HECKEMANN, H.J.; KOSCHEL, R. Analysis of toxic aluminium species in natural waters, *Microchim. Acta*, **146:149, 2004.**

67. ROYSET, O. Flow injection spectrophotometric determination of aluminum in natural water using eriochrome cyanine R and sationic surfactants, *Anal. Chem.* **59:899, 1987.**
68. MESQUITA, R.B.R.; RANGEL, A.O.S.S. Development of sequential injection methodologies for the spectrophotometric direct and kinetic determination of aluminium in natural and waste waters, *J. Braz. Chem. Soc.* **19:1171, 2008.**
69. VANLOOT, P. et al. On-line solid-phase extraction and multisyringe flow injection analysis of Al(III) and Fe(III) in drinking water, *Anal. Bioanal. Chem.* **389:1595, 2007.**
70. CORNARD, J.P.; MERLIN, J.C. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III), *J. Inorg. Biochem.* **92:19, 2002.**
71. KOTAS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation, *Environ. Pollut.* **107:263, 2000.**
72. MARCZENKO, Z. Separation and spectrophotometric determination of elements, Ellis Horwood, Chichester , **1986.**
73. WILLEMS, G. J. et al. The interaction of chromium(VI), chromium(III) and chromium(II) with diphenylcarbazide, diphenylcarbazone and diphenylcarbadiazone, *Anal. Chim. Acta*, **88:345, 1977.**
74. YUAN, D. et al. Rapid determination of chromium(VI) in electroplating waste water by use of a spectrophotometric flow injection system, *Spectrochim. Acta Part A*, **71:276, 2008.**
75. THEMELIS, D.G.; KIKA, F.S.; ECONOMOU, A. Flow injection direct spectrophotometric assay for the speciation of trace chromium(III) and chromium(VI) using chromotropic acid as chromogenic reagent, *Talanta*, **69:615, 2006.**
76. FAN, J. et al. An organic-reagent-free method for determination of chromium(VI) in steel alloys, sewage sludge and wastewater, *Anal. Chim. Acta*, **640:58, 2009.**
77. MATSUOKA, S. et al. Flow analysis of micro amounts of chromium(III) and (VI) in natural water by solid phase

- spectrophotometry using diphenylcarbazide, *Analyst*, **124:787, 1999**.
- 78.** PRESSMAN, M.A.S.; ALDSTADT, J.H. A comparative study of diffusion samplers for the determination of hexavalent chromium by sequential injection spectrophotometry, *Microchem. J.* **74:47, 2003**.
- 79.** VOGEL, A.I. Textbook of quantitative chemical analysis, 5^a ed., Longman Scientific & Technical, New York, pg 324, **1989**.
- 80.** CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E.; EATON, A.D. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20^a ed., American Public Health Association, Washington DC, **1998**.
- 81.** ImageJ, software para processamento e análise de imagens em java, disponível em: < <http://rsb.info.nih.gov/ij/> >. Acessado em **11/01/2012**.
- 82.** Guidance for industry. Q2B validation of analytical procedures: methodology. 1^a ed.: International Conference on Harmonisation, **1996**.
- 83.** RIBEIRO, F.A.L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados, *Quim. Nova*, **31:164, 2008**.
- 84.** FERREIRA, M.M.C. Planilha Eletrônica para Validação de Métodos Analíticos Univariados, disponível em: <<http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/downloads/validar.xls>>. Acessado em **15/02/2012**.
- 85.** PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos, *Quim. Nova*, **19:268, 1996**.
- 86.** SKOOG, D.A. et al. Fundamentos de Química Analítica, 8^a ed., Thomson, São Paulo, **2006**.