



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JORGE LUÍS OLIVEIRA SANTOS

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE
NITRITO E NITRATO EM MATRIZES AMBIENTAIS E
ALIMENTÍCIAS, EMPREGANDO ANÁLISE DE IMAGENS
DIGITAIS**

Salvador
2013

JORGE LUÍS OLIVEIRA SANTOS

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE
NITRITO E NITRATO EM MATRIZES AMBIENTAIS E
ALIMENTÍCIAS, EMPREGANDO ANÁLISE DE IMAGENS
DIGITAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Profa. Dra. Djane Santiago de Jesus

Co-orientador: Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite

Salvador
2013

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Santos, Jorge Luis Oliveira.

Estratégias analíticas para determinação de nitrito e nitrato em ambientais e alimentícias, empregando análise de imagens digitais / Jorge Luis Oliveira Santos. - 2013.
130 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Djane Santiago de Jesus

Co-orientador: Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2013.

1. Nitratos. 2. Nitritos. 3. Alimentos - Contaminação. 4. Saúde ambiental. 5. Análise por injeção de fluxo. I. Jesus, Djane Santiago da. II. Leite, Odair Donizeti. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD - 363.7

CDU - 543.42:543.62

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter me inundado com o seu amor e me sustentado com sua mão poderosa.

A sociedade brasileira por ter financiado a minha vida acadêmica. A FAPESB e ao CNPQ por ter financiado a minha pesquisa e ao programa de pós-graduação em química da UFBA pelo apoio dado.

A Profa. Dra. Djane Santiago de Jesus por ter confiado na minha capacidade em desenvolver este trabalho e, mesmo passando por momentos difíceis, não deixou de me orientar.

Ao Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite, um amigo e parceiro que tanto devo. Os meus agradecimentos são eternos.

A minha esposa Jeisivane Oliveira e a minha filha Maria Vitória Oliveira pela paciência e amor dispensado em mim.

Aos meus Pais (João e Célia) e aos meus irmãos por serem as minhas principais referências.

Ao ICADS, nas pessoas do Diretor Prof. Dr. Jacques Antonio de Miranda e da ex-diretora Profa. Dra. Joana Angélica Luz por terem me dado todas às condições para realização desse trabalho.

A Profa. Dra. Maria de Lourdes Botelho, ex- diretora do IQ/UFBA, por ter me recebido e acolhido tão bem nesse Instituto.

Aos meus amigos Técnicos administrativos do ICADS/UFBA e do IQ/UFBA: Clóves Genário, Jorge Luis Nicoletti, Maria Conceição G. S. Souza, Silvana S. Tosta e José E. Uchoa.

Gosto das cores, das flores, das estrelas, do verde das árvores, gosto de observar. A beleza da vida se esconde por ali, e por mais uma infinidade de lugares, basta saber, e principalmente, basta querer enxergar.

Clarice Lispector

RESUMO

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto PRONEX/Água-FAPESB. É proposta uma nova estratégia para determinação de nitrito e nitrato em sistema em fluxo por multicomutação e detecção por imagens digitais. Também foi proposta uma estratégia simples para determinação de nitrito por imagem digital combinado com *spot test* à base de papel de filtro. Os métodos foram baseados na reação do nitrito com a sulfanilamida, formando um cátion de diazônio que posteriormente é acoplado ao dicloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina formando um diazo composto de coloração rósea com absorção máxima em 543 nm. No sistema em fluxo os sinais analíticos foram obtidos a partir das intensidades de coloração do diazo composto nas imagens digitais obtidas por um *webcam* e os valores foram medidos através do *software* image J. Na determinação do nitrato, este foi reduzido em fluxo a nitrito por uma coluna de cádmio cobreado. As condições do sistema em fluxo foram otimizadas e a concentração de nitrato e nitrito foram determinados respectivamente na faixa de 1,0 - 10,0 mg L⁻¹ com precisão de 1,3% e 0,2 - 2,0 mg L⁻¹ com precisão de 0,6%. Os limites de detecção e quantificação para nitrito foram 0,014 mg L⁻¹ e 0,045 mg L⁻¹ e para o nitrato 0,042 mg L⁻¹ e 0,252 mg L⁻¹, respectivamente. O procedimento em fluxo foi aplicado com sucesso em amostras de águas subterrâneas na frequência analítica de 103 amostras/h para nitrito e 80 amostras/h para nitrato. No caso do *spot test* o diazo composto foi formado na superfície do papel de filtro pela adição de 5µL da solução amostra e em seguida 5µL de reagente cromogênico e a intensidade da cor foi medida a partir das imagens digitais do *spot test*. As imagens digitais do *spot test* foram obtidas através do uso de *scanner* e o sinal analítico foi obtido pelo tratamento das imagens com o *software* image J. O *spot test* foi otimizado e a concentração de nitrito foi determinada nas faixas de 0,2 - 1,0 mg L⁻¹ (r=0,9924) e 1,0 - 10,0 mg L⁻¹ (r=0,9989) com limites de detecção de 0,04 mg L⁻¹ e 0,07 mg L⁻¹, respectivamente. O *spot test* proposto foi aplicado na determinação de nitrito em amostras de salsichas e água subterrânea e os resultados encontrados foram nas faixas de 21,71- 23,88 mg kg⁻¹ e 0,04 - 0,12 mg-N L⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: Nitrato, Nitrito, Imagens Digitais, Análise em fluxo, *Spot test*

ABSTRACT

This work was carried out under the project PRONEX/Água-FAPESB. This proposes a new strategy for the determination of nitrite and nitrate by multicommutation flow injection system and detection for digital images. Also proposed was a simple strategy for determination of nitrite combined with a digital image based on spot test filter paper. The methods are based on the reaction of nitrite with sulfanilamide, forming a diazonium cation which is then coupled to dichloride N- (1-naftil)ethylenediamine form a diazo compound of pink color with maximum absorption at 543 nm. In the flow system analytical signals were obtained from the intensities of staining diazo compound in digital images obtained by a webcam and the values were measured by image J software. In the determination of nitrate, this flow was reduced to nitrite by a copper-plated cadmium column. The terms of the flow system were optimized and the concentration of nitrite and nitrate were determined respectively in the range 1,0-10,0 mg L⁻¹ with precision of 1.3% and 0,2-2,0 mg L⁻¹ with precision of 0.6%. The limits of detection and quantification were 0,014 mg L⁻¹ and 0,045 mg L⁻¹ to nitrite and nitrate 0,042 mg L⁻¹ and 0,252 mg L⁻¹ respectively. The flow procedure has been successfully applied in groundwater samples in throughput of 103 samples/h for nitrite and 80 samples/h nitrate. For the spot test the diazo compound was formed on the surface of the filter paper by the addition of 5µL of the sample solution and then 5µL of chromogenic conductor and the color intensity was measured from the digital image of the spot test . Digital images of the spot test were obtained by use of a scanner and the analytical signal is obtained by processing of images with the image J software. The spot test was optimized and nitrite concentration was determined in the range of 0,2 - 1,0 mg L⁻¹ (r=0,9924) and 1,0 - 10,0 mg L⁻¹ (r=0,9989) with limits of detection of 0,04 mg L⁻¹ and 0,07 mg L⁻¹ respectively. The spot test was applied to the determination of nitrite in sausage and groundwater samples and the results were in the range from 21,71 - 23,88 mg kg⁻¹ and 0,04 - 0,12 mg-N L⁻¹, respectively.

Keywords: Nitrate, Nitrite, Digital image, Flow analysis, Spot test

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de reação envolvida no método de Griess. Fonte: RAMOS (2006).....	27
Figura 2 - Amostragem de dados contínuos. Fonte: Google imagens.....	32
Figura 3 - Imagens digitais com diferentes quantidades de pixel, a) 4840px, b) 1210px e c) 484px.....	33
Figura 4 - Esquema de aquisição de imagem por uma câmera digital.....	34
Figura 5 - Exemplo de níveis discretos de intensidade (tons de cinza) admitida por um pixel.....	35
Figura 6 - Sensibilidade dos cones da retina em função do comprimento de onda ..	37
Figura 7 - Cubo do modelo de cores RGB	38
Figura 8 - Diagrama do módulo de análise em fluxo utilizado na determinação de nitrito e nitrato. C: Tampão (pH=7,2); A: Amostra; R: Reagente de Griess (2,3 % de sulfanilamida; 0,12 % de NED em H_3PO_4 0,5 mol L^{-1}); CR: coluna redutora de cádmio cobreado (3mm d.i. x 6 cm); B1: Bobina de amostragem (0,8 mm d.i x 60 cm); B2: Bobina de reação helicoidal (0,8 mm d.i. x 90cm); x e y : pontos de confluência; D: detector.....	47
Figura 9 - Formulário utilizado na Interface com o usuário	50
Figura 10 - Fotografia do sistema em fluxo utilizado na determinação de nitrito e nitrato.	51
Figura 11 - Interface do programa image J com as imagens em stack	58
Figura 12 - Interface do programa image j com o stack das imagens acompanhado da tabela de resultados dos valores de RGB de cada imagem do stack.	59
Figura 13 - Espaço vetorial RGB e o vetor v representando uma cor. Fonte: (LYRA, 2008)	60
Figura 14 - Avaliação da precisão na determinação de nitrito, empregando no módulo	

de análise da Figura X para propulsão da solução reagente; válvula V ₄ , bomba peristáltica (A) e gravidade (B).	65
Figura 15 - Efeito da vazão de fluxo sobre o sinal analítico de uma solução padrão 1mg L ⁻¹ de nitrito. Medidas feitas com reagente de Griess (0,1% de NED, 2% sulfanilamida, 0,5 mol L ⁻¹ H ₃ PO ₄) na vazão de 2,1 mL min ⁻¹ e em bobina de reação (B2) com 100cm.	66
Figura 16 - Efeito do Tamanho da bobina de reação no sinal analítico de uma solução padrão de nitrito 1mg L ⁻¹ . Medidas realizadas com reagente de Griess e transportador nas vazões de 4,3 e 2,1 mL min ⁻¹ , respectivamente.	67
Figura 17 - Efeito do numero de ciclos em diversas condições de volume de reagente e amostra (R+A, 2R+A, R+2A e 2R + 2A) sobre o sinal analítico.	68
Figura 18 - Resposta previstas pelo modelo quadrático	72
Figura 19 - Superfície de resposta descrita pela equação Absorbância = 49,67 + 2,19NED – 2,46(NED) ² + 2,86(Sulf.) – 2,71(Sulf.) ² + 0,25(NED)(Sulf.), que relaciona a concentração do NED(%, m/v) e da Sulfanilamida (%, m/v) com o sinal analítico (Norma).	73
Figura 20 - Efeito da acidez da solução transportadora sobre a redução de nitrato a nitrito	74
Figura 21 - Diminuição da resposta analítica após análises de amostras de água fortificadas com 1,0 mg L ⁻¹ (A) de nitrato e 10,0 mg L ⁻¹ (B).	76
Figura 22 - Curva analítica (B) obtida para determinação de nitrito empregando webcam e imagens digitais com o sinal transiente correspondente (A).	78
Figura 23 - Curva analítica (B) obtida para determinação de nitrato empregando webcam e imagens digitais com o sinal transiente correspondente (A).	79
Figura 24 - Correlação entre os dados obtidos na determinação de nitrito (A) e nitrato (B) pelo método proposto de pelos métodos referência	83
Figura 25 - Imagem do <i>spot test</i> para determinação de nitrito	92
Figura 26 - Interface do programa image j com a imagem do <i>spot test</i> , acompanhado da tabela com os resultados dos valores de RGB das regiões selecionadas na imagem.	94

Figura 27 - Avaliação da estabilidade do azo composto, através de medidas sucessivas (intervalos de 15min) da cor do produto colorido após realização da reação no spot test.....	97
Figura 28 - Correlação entre os resultados da norma para diferentes concentrações de nitrito (0,2-10 mg L ⁻¹) obtidos em imagens com diferentes resoluções.	98
Figura 29 - Curva analítica obtida para determinação de nitrito na faixa de 0,2 a 1 mg L ⁻¹ empregando o spot test proposto.....	99
Figura 30 - Curva analítica obtida para determinação de nitrito na faixa de 1 a 10 mg L ⁻¹ empregando o spot test proposto.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de acionamento das válvulas solenoide para a determinação de nitrito e nitrato.....	49
Tabela 2 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento experimental com valores reais e codificados.....	54
Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental na forma real e codificada	55
Tabela 4 - Planejamento fatorial composto central nos estudos das variáveis; concentração de NED e Concentração de Sulfanilamida no sinal de absorvância. ...	70
Tabela 5 - Análise da Variância para ajuste do modelo quadrático $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_{11}X_1^2+b_{22}X_2^2+b_{12}X_1X_2$	71
Tabela 6 - Parâmetros estudados na otimização do sistema em fluxo para determinação de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-).	77
Tabela 7 - Características analíticas do método proposto	80
Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos na determinação de nitrito e nitrato em amostra de água subterrânea pelo método proposto e pelo método de referência.	81
Tabela 9 - Resultados obtidos na determinação de nitrito e nitrato em amostras de águas subterrâneas empregando o método em fluxo proposto e métodos de referência.	82
Tabela 10 - Comparação das características analíticas do método proposto com às de alguns métodos da literatura.	85
Tabela 11 - Características analíticas obtidas no <i>spot test</i>	101
Tabela 12 - Resultados de recuperação de nitrito adicionado em amostras de água e salsicha.	101
Tabela 13 - Comparação das características analíticas do <i>spot test</i> proposto com às de outros reportados na literatura.	102
Tabela 14 - Resultados da determinação de nitrito em amostras de águas	

subterrâneas e em amostras de salsichas pelo *spot test* e pelo método de referência.

..... 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVI	Audio Video Interleave
CCD	Charge Coupled Devices
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
dpi	Dots per inch
FBA	Flow-batch Analyser
FIA	Flow Injection Analysis
Hb	Hemoglobina
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LED-	Light emitting diode
MeHb	Metahemoglobina
MFA	Multicommutation Flow Analysis
MSFA	Monosegmented Flow Analysis
NED	Dicloreto de N-(1-naftil)etilenodiamina
ppp	Pontos por polegada
SFA	Segmented Flow Analysis
SIA	Sequential Injection Analysis
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL e OBJETIVOS	15
1.1 INTRODUÇÃO.....	15
1.2 OBJETIVOS.....	18
1.2.1 Objetivos gerais	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
CAPÍTULO 2 -REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 SISTEMAS DE ANÁLISE EM FLUXO.....	20
2.2 SPOT TEST	23
2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE NITRITO E NITRATO ...	26
2.4 FUNDAMENTOS BÁSICOS DE IMAGEM DIGITAL	31
2.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS EMPREGANDO ANÁLISES DE IMAGENS DIGITAIS	39
CAPÍTULO 3 - DETERMINAÇÃO DE NITRITO E NITRATO EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUBTERRÂNEA EMPREGANDO SISTEMA EM FLUXO COM MULTICOMUTAÇÃO E IMAGENS DIGITAIS	43
3.1 INTRODUÇÃO.....	43
3.2 EXPERIMENTAL.....	44
3.2.1 Preparo de reagentes e Soluções	44
3.2.2 Procedimento em fluxo para determinação de nitrito e nitrato.....	46
3.2.3 Tratamentos das imagens digitais e obtenção do sinal analítico	56
3.2.4 Amostragem da água subterrânea	61
3.2.5 Aplicação do teste t pareado.	62
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
3.3.1 Modulo de Análise	63

3.3.2	Características analíticas do sistema	77	
3.4	CONCLUSÕES.....	85	
CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO DE NITRITO EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUBTERRÂNEA E EM AMOSTRA DE SALSICHAS EMPREGANDO SPOT TEST E IMAGENS DIGITAIS.....			87
4.1	INTRODUÇÃO.....	87	
4.2	EXPERIMENTAL.....	89	
4.2.1	Preparo de reagentes e soluções	89	
4.2.2	Procedimento para extração de nitrito em amostras de salsichas	90	
4.2.3	Procedimento para amostragem de águas subterrâneas.	91	
4.2.4	Spot Test para determinação de nitrito	91	
4.2.5	Tratamentos das imagens digitais e obtenção do sinal analítico	93	
4.2.6	Estudo da estabilidade da coloração do azocomposto.	95	
4.2.7	Estudo do efeito da resolução das imagens digitais no sinal analítico.	95	
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	95	
4.3.1	Otimização do <i>Spot test</i>	95	
4.3.2	Características analíticas do <i>spot test</i>	98	
4.3.3	Aplicação analítica do <i>spot test</i>	103	
4.4	CONCLUSÕES.....	105	
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES GERAIS.....			106
5.1	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	107	
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....			108

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1.1 - INTRODUÇÃO

A versatilidade físico-química dos nitratos e nitritos tem assegurado as suas utilizações dentro de uma multiplicidade de processos industriais e produtos manufaturados (KUILA, 2006; VALIZADEH e SHOMALI, 2012). Sua ação antimicrobiana tem sido reconhecida há séculos e ainda é usado para a preservação de derivados de carne (SEBRANEK e BACUS, 2007). Apesar do grande número de produtos que são dependentes destes íons, são as suas relações com as questões ambientais e de saúde que tem atraído o interesse do público e uma proporção significativa da comunidade científica (MOORCROFT, 2001).

Uma das vias de entrada destas espécies no meio ambiente é através de reações fotoquímicas na atmosfera que convertem as espécies gasosas NO_x , geradas em processos naturais ou antrópicos de combustão, a nitrato (NO_3^-) (VANDERVLE, 1971; WELLBURN, 1996). Uma contribuição mais significativa, no entanto, ocorre a partir de fontes agrícolas, efluentes industriais e esgoto sanitário (HATANO, 2005; PURVAJA, 2008; HELTON, 2011).

O aumento da contaminação das águas por compostos nitrogenados vem merecendo atenção especial, uma vez que está se tornando um problema mundial. O uso indiscriminado de fertilizantes inorgânicos, associado à má gestão dos recursos naturais, nas suas mais diversas formas de uso, tem proporcionado como resultado a perturbação dos ciclos locais e globais de nitrogênio (BRIMBLECOMBE e STEDMAN, 1982). Portanto, o monitoramento e controle do destino das espécies de nitrato e nitrito, indicadores importantes de contaminação, ganha importância crescente.

Normalmente, os íons nitrito e nitrato em águas superficiais apresentam baixos teores, mas podendo atingir altas concentrações em águas subterrâneas. O consumo desses íons através das águas de abastecimento está associado a efeitos

adversos à saúde. Já o nitrito, quando presente na água de consumo humano, tem efeitos mais rápidos e pronunciados, a saúde, que o nitrato (FAN, 2011).

A Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente do Brasil (CONAMA) que dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e estabelece limites para os níveis de diversos componentes químicos, incluindo os nutrientes nitrogenados, estabelece limites máximos de 1,0 mg-N L⁻¹ para nitrito e 10,0 mg-N L⁻¹ para o nitrato em água doce classe 1 e 3 (BRASIL, 2005). A resolução nº 396 de 03 de abril de 2008 do CONAMA, estabelece para água subterrânea destinada ao consumo humano limites máximos de nitrito e nitrato de 1,0 mg-N L⁻¹ e 10,0 mg-N L⁻¹, respectivamente (Brasil, 2008).

Outra potencial forma de consumo de íons nitrato e nitrito pela população pode se dar pela ingestão de produtos cárneos como, por exemplo, salsichas, linguiças e hambúrgueres, que utilizam sais contendo estas espécies como conservantes. Nesses produtos os sais desses íons tem a finalidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, como o *Clostridium Botulinum*, além de retardar a oxidação lipídica, conferir sabor e coloração rósea pela formação da nitrosomioglobina (GREVER e RUITER, 2001).

Apesar da importância econômica, do emprego destes íons como aditivo alimentar, estudos vem apontando possibilidades de reações tóxicas ao organismo em função da quantidade ingerida. Um dos riscos a saúde decorrente da ingestão em excesso de nitrito e/ou nitrato é a metahemoglobinemia. Esse quadro clínico é caracterizado pelo aumento dos níveis de metahemoglobina no sangue, que ocorre nas situações onde os mecanismos contra stress oxidativo, dentro das hemácias, são desativados. Esses mecanismos podem ser desativados devido a exposição a agentes metemoglobinizantes como, por exemplo, os nitritos e nitratos (NASCIMENTO, 2008).

Em presença de nitrito a Hemoglobina (Hb) é oxidada a metahemoglobina (MeHb). Nessa reação, o íon ferro (II) da molécula da protoporfirina presente na Hb é oxidado a ferro (III). Diferentemente de como ocorre com Hb, na MeHb o oxigênio não se liga de forma reversível, resultando numa redução no transporte de oxigênio

para os tecidos. A toxicidade do nitrato é atribuível à sua redução enzimática e/ou microbiana a nitrito (BOYLSTON e BEER, 2002). As manifestações clínicas devido o aumento nos níveis de MeHb, normalmente são pigmentação acinzentada da pele, fraqueza, cefaleia, dispneia, sintomas de baixo débito cardíaco, sonolência e crise convulsiva.

Os Lactentes até os quatro meses de idade são particularmente mais susceptíveis a metahemoglobinemia do que adultos, por apresentarem deficiência fisiológica transitória da MeHb redutase ou de seu cofator NADH. Além disso, por possuírem pH intestinal mais elevado, há facilitação do crescimento de bactérias gram-negativas conversoras de nitrato a nitrito (ZEMAN, 2002; NASCIMENTO, 2008).

O consumo excessivo do nitrito e nitrato também está associado à incidência de câncer de estômago em seres humanos. A causa está relacionada com o fato de que os nitritos são precursores das *N*-nitrosaminas, compostos conhecidos pelo seu potencial carcinogênico e por sua ação teratogênica em animais (MAEKAWA, 1982).

Tendo em vista esse problema e visando a proteção da saúde da população brasileira, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da portaria nº 1004 de 11 de dezembro de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária estabelece um limite máximo de 150 mg/kg de nitrito (de sódio ou potássio) e 300 mg kg⁻¹ de nitrato (de sódio ou potássio) em carnes ou produtos cárneos (BRASIL, 1999). No caso do uso simultâneo de nitrito e nitrato a soma das suas concentrações não pode ser superior a 150 mg kg⁻¹ (BRASIL, 1999).

Estimando a importância industrial e os possíveis aspectos toxicológicos causados pela ingestão de nitrito e nitrato, é necessário o controle rigoroso dos teores desses íons nos alimentos e nas águas. A ferramenta básica para assegurar que os teores desses compostos estão enquadrados nas resoluções legais é através da determinação quantitativa.

Em função dessa necessidade, vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos, bem como várias técnicas analíticas têm sido empregadas para o monitoramento dessas espécies (MOORCROFT, 2001). Devido à simplicidade, baixos limites de detecção e custos relativamente baixos, os métodos

espectrofotométricos na região do visível, utilizando a reação de Griess para formação do produto colorido, sem dúvidas são os mais largamente empregados na quantificação de nitrito e nitrato (MOORCROFT, 2001). Nesse caso, o nitrato é reduzido a nitrito por meio de agentes redutores, como por exemplo, ligas de cádmio cobreado.

Atualmente métodos colorimétricos, baseados em análise de imagens digitais, vêm sendo reportados na literatura como uma alternativa para monitoramento de muitas espécies químicas (IQBAL e BJORKLUND, 2011; LAPRESTA-FERNANDEZ e CAPITAN-VALLVEY, 2011; ZAMORA, 2011; ANDRADE, 2012; JOKERST, 2012). Na maioria destes métodos, as imagens digitais são capturadas por dispositivos como câmeras digitais, *scanner* e *webcam*, equipados com sensores do tipo *Charge Coupled Devices* (CCD) ou *Complementary Metal Oxide semiconductor* (CMOS) (WONGWILAI, 2010; ANDRADE, 2012).

Neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação de nitrito e nitrato em águas superficiais e subterrâneas, e em amostras alimentícias. As estratégias foram desenvolvidas empregando sistemas de análise em fluxo com multicomutação (MFA) e por spot testes, sendo que os sinais analíticos foram obtidos empregando análise de imagens digitais.

1.2 - OBJETIVOS

1.2.1 - Objetivos gerais

Desenvolver estratégias analíticas, para determinação de nitrito e nitrato em matrizes ambientais e alimentícias, empregando análise de imagens digitais.

1.2.2 - Objetivos específicos

- Desenvolver estratégias analíticas em fluxo e análise de imagens digitais para a determinação de nitrato e nitrito em amostras de água;
- Desenvolver estratégias analíticas empregando “*spot test*” e análise de imagens digitais para a determinação de nitrito em amostras de alimentos e água;
- Utilizar planejamento experimental na otimização dos parâmetros físico-químicos;
- Desenvolver “*plugin*” em Java, para análise de imagens digitais no software image j;
- Aplicar as estratégias analíticas desenvolvidas em amostras de água e alimentícias;

CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - SISTEMAS DE ANÁLISE EM FLUXO

Normalmente os sistemas de análise em fluxo são desenvolvidos com o objetivo de automatizar os procedimentos analíticos e deste modo obter uma maior frequência analítica. Além desse argumento, muitos outros surgiram motivando ainda mais o desenvolvimento de procedimentos em fluxo, como por exemplo, a diminuição dos erros analíticos pela diminuição das intervenções do analista nas etapas do processo analítico, a diminuição do consumo de reagentes, monitoramento de reações sem a necessidade do estabelecimento do equilíbrio, diluição ou pré-concentração de analitos e a diminuição na geração de resíduos.

O primeiro sistema em fluxo foi proposto por Skeggs (1957) e era utilizado um fluxo de amostra segmentada com ar que, apesar de suas vantagens, possuía a desvantagem da instrumentação não ser tão simples, além da necessidade da utilização de um dispositivo para retirada das bolhas que interferiam na detecção espectrofotométrica.

Em 1975 Ruzicka e Hansen publicaram um trabalho no qual propuseram um sistema de análise em fluxo não segmentado, utilizando uma instrumentação simples, que foi denominado de análise por injeção em fluxo do inglês *Flow Injection Analysis* (FIA). Os autores demonstraram que, com um cuidadoso controle hidrodinâmico do sistema em fluxo, era possível controlar a dispersão da amostra no sistema sem a necessidade da segmentação do fluxo com ar. As consequências analíticas importantes, obtidos com o sistema FIA, foi o aumento na precisão das medidas pela ausência de bolhas de ar e a possibilidade, devido o controle minucioso das variáveis hidrodinâmica, da obtenção do sinal analítico sem a necessidade do equilíbrio da reação ser atingido.

Segundo Reis, Giné e Kronka (1989), a análise química por injeção em fluxo, pode ser definida como um processo de automatização de procedimentos analíticos,

no qual a amostra em solução aquosa é introduzida em um fluido carregador que a transporta em direção ao detector. Durante o transporte a amostra pode receber reagentes, sofrer reações químicas e passar por etapas de separação, concentração, etc. Os autores ainda ressaltam que uma característica importante do sistema FIA é que, a fluxo constante, o tempo de transito entre o injetor e o detector é exatamente o mesmo para padrões e amostras, podendo, em vista disso, fazer as medidas analíticas antes da reação se completar.

De um modo geral o sistema de análise por injeção em fluxo é essencialmente composto de quatro partes básicas; propulsão dos fluidos, injeção da amostra, reação e detecção (Reis, Giné e Kronka, 1988).

Desde a publicação por Stewart e Ruzicka (1976) do trabalho sobre a determinação de amônio e fosfato empregando análise por injeção em fluxo e da publicação por Giné e colaboradores (1980) do trabalho sobre a determinação de nitrito e nitrato pela redução em linha do nitrato a nitrito, a utilização de sistemas em fluxo tem se popularizado muito na comunidade acadêmica devido à possibilidade da determinação de mais de uma espécie química no mesmo módulo de análise (REIS 1996).

Os principais avanços nos processos de análise por injeção em fluxo ocorreram basicamente no desenvolvimento de dispositivos utilizados na introdução das soluções no sistema. No começo, as soluções eram injetadas por seringas hipodérmicas que, comprometia a repetibilidade dos resultados devido a pouca precisão na tomada de alíquotas e devido à variação na velocidade de injeção (REIS e BERGAMIN F, 1993). Esse problema foi superado pelo desenvolvimento de injetores automáticos que evoluíram dos injetores comutadores com estrutura solidária para os sistemas de introdução com válvulas solenoide (REIS e BERGAMIN F, 1993).

A partir do emprego desses dispositivos de introdução de amostras no sistema em fluxo, tornou possível implementar diversos procedimentos, como por exemplo; fluxo monossegmentado (BARRETO, 2012), pré-concentração (EL-SHAHAT, 2010) e titulações espectrofotométricas (NĚMCOVÁ, 2005). Vale ressaltar que, o gerenciamento de diferentes reagentes no sistema em fluxo ficou mais fácil com

emprego de dispositivos de comutação discreta (ex: válvulas solenoide), porque esses dispositivos são controlados e programados independentemente (multicomutação) através de *softwares* (ROCHA, 2002).

A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (ZAGATTO, 2002) classifica os métodos em fluxo em quatro categorias: segmentação por ar, fluxo contínuo não segmentado, análise por injeção em fluxo e análise por injeção sequencial. Na literatura são reportados trabalhos que empregam sistemas em fluxo, conforme o interesse analítico, nas mais diversas configurações. E, dependendo das características do fluxo ou do processo de amostragem, os analisadores em fluxo são denominados de analisador em fluxo segmentado (*Segmented Flow Analyser-SFA*), analisador por injeção em fluxo (*Flow Injection Analyser-FIA*), analisador em fluxo monossegmentado (*Monosegmented Flow Analyse-MSFA*), analisador por injeção sequencial (*Sequential Injection Analyser-SIA*), analisador em fluxo com multicomutação (*multicommutation flow analyser-MFA*) e analisador em fluxo-batelada (*flow-batch Analyser- FBA*).

Dependendo da espécie a ser detectado, praticamente todas as técnicas analíticas usuais podem ser empregadas em sistemas de análise em fluxo, como; espectroscopia no UV-Vis (ASAN, 2003; LLAMAS, 2011), absorção e emissão atômica (FARAJI, 2009), potenciometria (MROCZKIEWICZ, 2011; SAKR e EL NASHAR, 2012), condutometria (FARIA e PASQUINI, 1991; FATIBELLO-FILHO e BORGES, 1998), amperometria (SCANLON, 2010) e quimiluminescência (MERVARTOVÁ, 2007; LARA, 2010; ALAM, 2012).

A maioria dos trabalhos, que empregam sistemas em fluxo, utiliza como sistema de detecção a espectrofotometria. Entretanto, quando se utiliza essa técnica, o número de analitos a serem analisados no mesmo módulo de análise normalmente é limitado em dois. Essa limitação está associada à necessidade da utilização de diferentes reagentes, que podem ser incompatíveis quimicamente, e da detecção ocorrer em diferentes comprimentos de ondas.

A determinação de mais de duas espécies é mais comum quando se utiliza detectores de absorção e emissão atômica (MARTÍN-ESTEBAN, 1999; ANTHEMIDIS, 2012) e detectores eletroquímicos (MEDEIROS, 2012; VARGAS,

2012). No caso dos métodos colorimétricos, a alternativa para realização de multidetecção em fluxo tem sido o emprego de fotômetros construídos pela associação de diodos emissores de luz (LED), devido o baixo custo e por ser compacto (TROJANOWICZ, 1988; TROJANOWICZ, 1991; TAN, 1994).

Uma alternativa também, para multidetecção em fluxo, seria a utilização de câmeras digitais como detector. Recentemente Andrade e colaboradores (2012) utilizou, no lugar do espectrofotômetro, uma *webcam* como detector, em um analisador de fluxo-batelada para determinação colorimétrica de Cr (VI) e Al (III) em água.

O uso de câmeras digitais como detector em sistemas em fluxo ainda não é uma estratégia muito explorada. Fazendo uma pesquisa em dezembro de 2012 na base de dados da *Analytical abstracts* usando a palavra chave *digital image* foi encontrado 78 trabalhos utilizando métodos analíticos associados a imagens digitais, sendo que, desses apenas dois utilizam sistema em fluxo-batelada (ANDRADE, 2012; LIMA, 2013) e um utiliza sistema em fluxo para titulação ácido base (TÔRRES, 2011).

A utilização de sistemas em fluxo com detecção baseada em imagens digitais pode ser muito promissora, no que diz respeito, ao desenvolvimento de sistemas de baixo custo, com multidetecção e miniaturizados.

2.2 - SPOT TEST

Os rápidos avanços na tecnologia e nas pesquisas nas áreas da espectroscopia, eletroanalítica e cromatografia possibilitaram o desenvolvimento de instrumentos analíticos sofisticados que, em muitos laboratórios, se tornaram indispensáveis para execução das atividades de rotina.

Por outro lado, ao mesmo tempo, foram desenvolvidos dispositivos compactos e de baixo custo analítico para a avaliação qualitativa ou semiquantitativa de analitos

em que a estimativa aproximada, tem valor de diagnóstico, pelo menos na primeira fase da análise. Grande parte do desenvolvimento desses dispositivos se concentra na aplicação em análises clínicas, controle de qualidade de água, ar, solos e alimentos. Dentre esses dispositivos os mais difundidos são os *Spot Tests*.

Os *spots tests* se caracterizam por serem simples, sensíveis, seletivos e por utilizarem pequenos volumes de amostras e reagentes. O produto formado pode ser detectado a olho nu, seja pela presença de cor ou pela formação de precipitado.

Caio Plínio, o Velho, relata em seus escritos que os romanos identificavam a presença de ferro em vinagre por meio de um papiro saturado com extrato de nozes amargas (noz de galha) (JUNGREIS, 2005; ALVIM e ANDRADE, 2006). A identificação era feita pela formação de uma mancha preta no papiro devido à reação entre o ferro e o tanino presente no extrato (ALVIM e ANDRADE, 2006).

De acordo com a literatura, provavelmente, o primeiro registro da utilização de *spot test* para fins analíticos foi datado em 1834, quando Runge desenvolveu um teste para detecção de cloreto em solução de alvejante (FEIGL e ANGER, 1972). O teste era baseado na formação de uma mancha azul em um papel de filtro previamente impregnado com amido e iodeto de potássio. Mais tarde, em 1854, Schiff, desenvolveu um teste para detectar ácido úrico na urina pela formação de uma mancha marrom em um papel de filtro impregnado com carbonato de prata (FEIGL e ANGER, 1972).

No entanto, o interesse da comunidade científica pelo uso de *spot test* em análise química qualitativa, se tornou expressivo, a partir das pesquisas feitas por Fritz Feigl que, inicialmente foram dedicadas às reações inorgânicas e posteriormente às reações orgânicas. Essas pesquisas foram compendiadas em três publicações acerca de *spot test* que se tornaram textos fundamentais para os estudos em química analítica qualitativa. A citar, às publicações foram os livros; *Spot Test in Inorganic Analysis*, *Spot Test in Organic Analysis* e *Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions*. Esta última, considerada sua obra prima, foi escrita totalmente no Brasil, haja vista que, Feigl apesar da sua origem austríaca em 1944 se naturalizou brasileiro, e foi nesse país onde realizou grande parte de suas pesquisas (HAINBERGER, 1982).

Apesar dos *spot tests* poderem ser realizados em placas de toque, micro tubos de ensaio e outros materiais de microquímica, a realização desses testes em papel de filtro não deixou de ser a preferência. A razão disso é que o papel possui características que possibilitam a construção de dispositivos analíticos com maior portabilidade, menor consumo de reagente e menor geração de resíduos. Feigl no primeiro capítulo do livro *Spot Test in Inorganic Analysis*, chama a atenção da grande importância do trabalho realizado em 1861 por Shonbein, sobre a propriedade do papel em difundir mais rapidamente a água do que os solutos e os solutos se difundem no papel com velocidades diferentes (FEIGL e ANGER, 1972).

A maior evolução nos *spot tests* ocorreu no desenvolvimento de testes semiquantitativos, baseados na comparação visual com escalas de cores feitas com padrões analíticos de diferentes concentrações e no desenvolvimento de testes quantitativos pela utilização de instrumentos para medida da cor.

Atualmente existem no mercado uma variedade de kits de análises, qualitativas e semiquantitativas, baseados em *spot tests* para uma diversidade de ensaios químicos utilizados em análises clínicas, forenses, de prospecção geoquímica e de controle de poluição (JUNGREIS, 1997 ; ESPINOLA, 2004).

Na literatura são reportados muitos *spots tests* aplicados em análises quantitativas e, na maioria, a leitura é feita por espectrofotometria de reflectância difusa (TUBINO, 1997; GHAUCH, 2000; MATIAS, 2004; TUBINO, 2010; LIMA, 2012; LUIZ, 2012). Entretanto, recentemente têm sido reportados na literatura trabalhos envolvendo conceitos de *spot test* em dispositivos baseados em papel que utilizam imagens digitais obtidas por *scanner* na leitura da cor (PACIORNIK, 2006; ABE, 2008; CARRILHO, 2009; ANWAR, 2010; SHIHANA, 2010).

Nos trabalhos que utilizam *spot test* quantitativos associados a imagens digitais, os autores destacam que as vantagens de utilizar *scanner* ou câmera digital, em relação aos espectrofotômetros, é o baixo custo e a maior portabilidade.

Embora as primeiras pesquisas a cerca de *spot tests* já terem atravessado séculos, o tema ainda é bastante atual e desperta na comunidade científica bastante interesse, principalmente, devido a sua simplicidade e o baixo consumo de reagentes.

2.3 - MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE NITRITO E NITRATO

Na literatura têm sido publicados muitos métodos para determinação de nitrito e nitrato em diversas matrizes, envolvendo técnicas cromatográficas (HELALEH e KORENAGA, 2000; NAKASHIMA, 2010; KODAMATANI, 2011), eletroquímicas (MANEA, 2010; SHARIAR e HINOUE, 2010), eletroforese capilar (BUDANOVA, 2009; ERDOGAN e ONAR, 2011) e espectrofotométricas (ZHANG, 2011; AYALA, 2012). Algumas metodologias também utilizam as técnicas de quimiluminescência (RODRIGUES e LAPA, 2010; ATTIQ-UR-REHMAN, 2011) e fluorimetria (ZHAN, 2001; HUANG, 2006).

As determinações desses íons através das diversas técnicas reportadas na literatura podem ser feitas de forma simultânea ou sequencial. Normalmente as metodologias para determinação simultânea são realizadas por técnicas cromatográficas, comumente empregando detecção por condutividade associado à cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por massas associado à cromatografia gasosa. Além destas, vem se destacando as técnicas voltamétricas e eletroforese capilar.

Os métodos sequenciais geralmente são baseados na determinação espectrofotométrica, do íon nitrito via reação de Griess. Para a determinação de nitrato, este passa por uma etapa de redução a nitrito, antes da reação colorimétrica e detecção.

Há uma variedade de agentes redutores de nitrato a nitrito, se diferenciado essencialmente quanto à eficiência na redução. Dentre estes reagentes redutores destacam-se a liga de cádmio cobreado (ANDERSON, 1979; AHMED, 1996; BURAKHAM, 2004; AYALA, 2012), solução de cobre-hidrazina (SAWICKI e SCARINGE, 1971; DOWNES, 1978; OMS, 1995), fotorredução através da absorção de radiação UV (TAKEDA e FUJIWARA, 1993; MOTOMIZU e SANADA, 1995;

TORRO, 1998; MIKUSKA e VECERA, 2002) e a enzima *nitrato redutase* (CAMPBELL, 1997; MORETTO, 1998; QUAN, 2005).

Na grande maioria dos métodos colorimétricos, o nitrato é reduzido e determinado indiretamente como nitrito. Entretanto, existem métodos que propõem a determinação direta do nitrato através da reação com reagentes cromogênicos, como o ácido cromotrópico e do ácido fenoldissulfônicos, etc (WEST e RAMACHAN.TP, 1966; GOU, 2006; 2007).

Os métodos espectrofotométricos são os mais amplamente utilizados na determinação dos íons nitritos e nitratos, devido aos baixos limites de detecção e simplicidade. Sendo mais utilizada a reação de Griess, na qual o íon nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido formando um sal de diazônio que reage por acoplamento com cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) formando um diazo composto, conforme apresentado na Figura 1, de coloração vermelha que apresenta um máximo de absorção em torno de 540 nm (RAMOS, 2006).

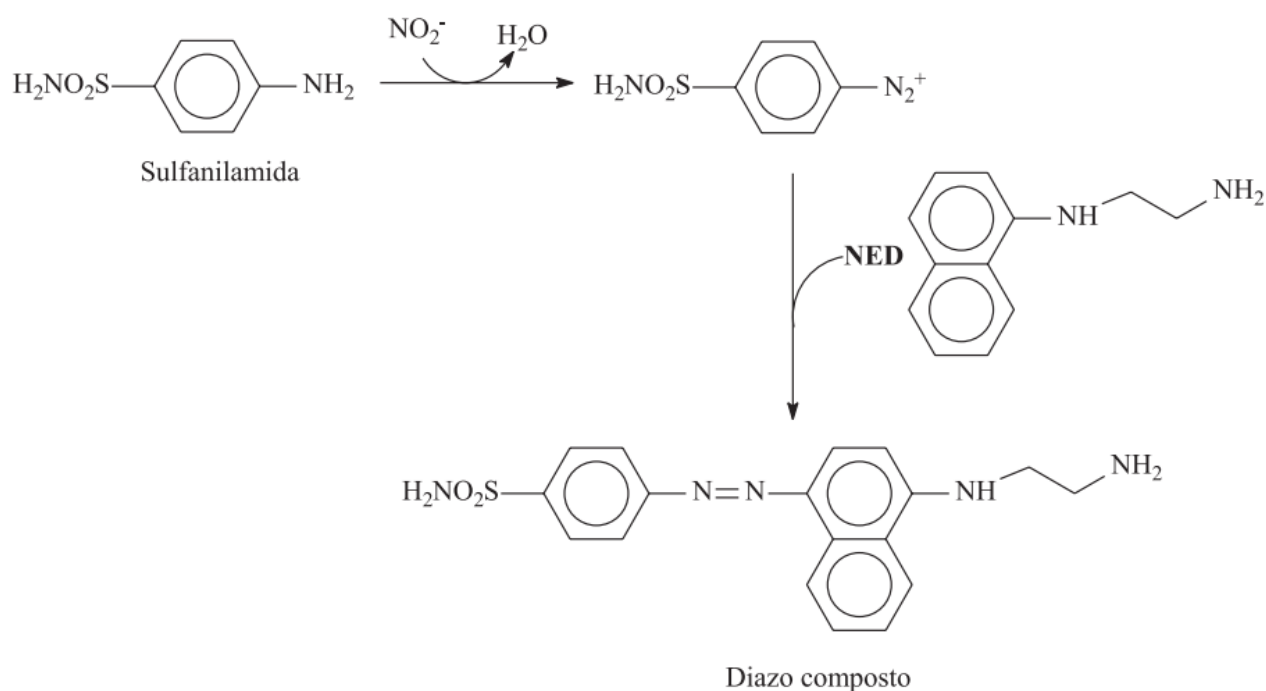


Figura 1 - Mecanismo de reação envolvida no método de Griess. Fonte: RAMOS (2006).

Na reação de Griess, além da sulfanilamida, outros reagentes como: o ácido sulfanílico, nitroanilina e p- aminoacetofenona podem ser usados na reação com o nitrito (MOORCROFT, 2001). Como agentes de acoplamento, substituindo o NED, também podem ser usados o fenol, 1-naftol-4-sulfonato, 1- aminonaftaleno e 1,3-diaminobenzeno. Dependendo dos reagentes escolhidos, os limites de detecção variam entre 0,02 a 2 μM e a linearidade normalmente abrange duas ordens de magnitude (1- 100 μM) (MOORCROFT, 2001).

Outras reações com o nitrito resultando em produtos coloridos podem ser uma opção à reação de Griess que, inconvenientemente, utiliza reagentes cancerígenos e de baixa estabilidade. Guerrero (1996) e colaboradores, por exemplo, propuseram como alternativa viável à reação de Griess, a reação em condições ácida do nitrito com proflavin (3,6-diaminoacridide) gerando um composto violeta com absorção em 328nm. O proflavin além de não ser cancerígeno é estável a longo tempo.

Com o intuito de minimizar o consumo de amostras e reagentes, aumentar a frequência analítica e melhorar a precisão dos resultados analíticos, foram desenvolvidos muitos métodos para determinação de nitrato e nitrito que utilizam sistemas em fluxo acoplado à espectrofotometria. Estes métodos se distinguem principalmente pela configuração do sistema em fluxo e pelo tipo de reação a ser monitorada espectrofotometricamente.

Giné e colaboradores (1980) desenvolveram um método espectrofotométrico com sistema de injeção em fluxo com válvula comutadora para determinação de nitrito e nitrato, sendo este último reduzido *on line* a nitrito em uma coluna de cádmio cobreado (5,2 cm x 3 mm d.i), o nitrito então reage com a sulfanilamida e o NED formando o diazo composto. Com a metodologia desenvolvida, conseguiram frequência analítica de 90 amostras por hora, precisão para o nitrito de 0,5% na faixa linear de trabalho de 0,1 a 0,5 mg L^{-1} e para o nitrato precisão de 1,5% na faixa de 1 a 5 mg L^{-1} .

Ahmed e Colaboradores (1996) desenvolveram um método por injeção em fluxo para determinação de nitrito e nitrato semelhante ao proposto por Giné e colaboradores (1980). No sistema em fluxo incorporaram uma pré-coluna de cobre (2 cm x 3 mm d.i) antes da coluna redutora de cádmio cobreado (10 cm x 3 mm d.i),

a fim de melhorar a precisão em longo prazo e aumentar o tempo de uso da coluna redutora. Neste método, invés da sulfanilamida, os pesquisadores utilizaram a 3-nitroanilina em meio ácido para reagir com o nitrito formando o íon de diazônio, o qual subsequentemente reage por acoplamento com o NED formando o diazo composto. Conseguiram uma frequência analítica de 30 amostras por hora com precisão relativa de 0,2 a 2%, para o nitrito faixa linear de 0,1 a 3,5 mg L⁻¹ e para o nitrito 10⁻³ mg L⁻¹ a 2,2 mg L⁻¹.

Zhi-Qi e colaboradores (1998) propuseram um método em fluxo espectrofotométrico para determinação de nitrito e nitrato, baseado no efeito catalítico do nitrito na oxidação do verde de naftol B pelo bromato de potássio em meio ácido. A reação redox foi monitorada pelo decréscimo da absorbância do verde de naftol em 722 nm. O nitrato foi reduzido a nitrito em coluna de cádmio-zinco (26 cm x 1.6 mm d.i). Obtiveram limites de detecção de 0,5 µg L⁻¹ e 2,5 µg L⁻¹ com precisão relativa de 2% para o nitrito e nitrato respectivamente.

Yue e colaboradores (2004) propuseram um método analítico em fluxo com detecção espectrofotométrica para determinação de nitrito e nitrato baseado no efeito catalítico do nitrito na reação redox entre cristal violeta e bromato de potássio em meio ácido. A reação foi monitorada pela diminuição da absorbância em 610 nm. O nitrato foi reduzido a nitrito através de uma coluna de cádmio-zinco (5 cm x 2 mm d.i). Os pesquisadores obtiveram frequência analítica de 32 amostras por hora e limites de detecção de 0,3 µg L⁻¹ para o nitrito e 1,0 µg L⁻¹ para o nitrato, ambos com precisão relativa de 2%.

Mesmo com todas as vantagens relacionadas ao uso de sistemas em fluxo, na prática esses métodos ainda são relativamente complexos e exigem rigoroso controle operacional e muita habilidade do operador. Em determinados casos podem ser utilizados os métodos quantitativos por *spot test* como opção mais simples e também de baixo consumo de amostra e reagentes (TUBINO, 1997; KOMPANY-ZAREH, 2002; LUIZ, 2012).

Muitos kits e equipamentos foram especialmente projetados para determinação por *spot test* de muitas espécies de interesse, sendo habitualmente utilizados na determinação qualitativa e em alguns casos semi quantitativas. Estes incluem

espectrofotômetros portáteis, folhas para determinação visual através da intensidade da cor e tiras de teste (JUNGREIS, 1997).

Apesar da maioria dos métodos de determinação por comparação visual serem demasiadamente imprecisos, devido a grande probabilidade de erro humano nas medidas e interferências de sólidos suspensos, Kiso e colaboradores (2006) desenvolveram um *spot test* em mini colunas para determinação visual de nitrito e nitrato com boa precisão (RSD<5%) na faixa linear de 4-20 mg-N L⁻¹.

A aplicação de *spot test* em determinações quantitativas não é muito comum, devido às dificuldades na obtenção de medidas com precisão e exatidão aceitáveis, entretanto alguns trabalhos com propostas de métodos quantitativos têm sido reportados na literatura (TUBINO, 1997; GHAUCH, 1999; KOMPANY-ZAREH, 2002; PACIORNIK, 2006).

Como exemplo, pode ser citado o *spot test* em papel de filtro desenvolvido por Luiz e colaboradores (2012) para determinação quantitativa de nitrito. O método de determinação, com baixo consumo de reagentes (20 µL) e amostra (20 µL), foi feito através da medida de reflectância difusa em 545 nm do papel manchado pelo corante formado na reação de diazotização do nitrito com 4,4-diamino-difenilsulfona (dapsona) e NED. Eles obtiveram limites de detecção e quantificação de 0,09 mg L⁻¹ e 0,29 mg L⁻¹ respectivamente na faixa linear de 0,29 -5 mg L⁻¹.

Nas análises quantitativas por *spot test* em papel de filtro, a fim de garantir uma boa precisão nas medidas, o dispositivo de análise deve ser construído, de maneira que, a cor formada na reação entre o analito e o composto cromogênico seja uniforme ao longo da região analítica do papel (LUIZ, 2012). Outros fatores que interferem, e que devem ser observados entre uma medida e outra, são as diferenças na iluminação e na intensidade de cor do papel seco e umedecido (DUNGCHAI, 2010).

No aspecto da química verde, os métodos quantitativos baseados em dispositivos em papel são interessantes por gerarem poucos resíduos. Além dessa vantagem, segundo Martinez e colaboradores (2008) normalmente são de baixo custo e dependendo do detector (e.g. Câmera de celulares e *scanner*) e do dispositivo utilizados podem ser portáteis, tornando possíveis análises *in situ*.

No caso dos dispositivos analíticos em papel combinados com análise de imagens digital, Martinez e colaboradores (2008) ressaltam que os testes e a obtenção das imagens podem ser feitas por uma pessoa com pouca experiência e enviadas a um analista experiente para realizar a interpretação dos dados.

2.4 - FUNDAMENTOS BÁSICOS DE IMAGEM DIGITAL

A palavra imagem do português é oriunda da palavra *imago* do latim, que significa representação visual de um objeto. Na computação a imagem de um objeto é a representação matemática em duas dimensões (2D) de um conjunto finito de valores digitais inteiros não negativos, onde cada valor é chamado de *pixel* (*Picture element*).

Matematicamente a imagem de um objeto, gerada por um processo físico, é uma função bi-dimensional $f(x, y)$ de intensidade de luz, onde cada valor de f dá a intensidade da luz em um ponto nas coordenadas espaciais (GONZÁLEZ e WOODS, 2002). As imagens geradas possuem valores de $f(x, y)$ dentro de uma faixa finita e proporcional a intensidade luminosa incidente no sensor, isto é:

$$0 < f(x, y) < \infty$$

Como as imagens são criadas a partir da detecção física da luz que é refletida dos objetos. Então, a natureza de $f(x, y)$ deve ser caracterizada pelos elementos quantidade de luz incidente na cena e a quantidade de luz refletida pelo objeto na cena. Esses elementos são chamados de *iluminância* e *reflectância*, sendo $i(x, y)$ e $r(x, y)$, respectivamente.

Assim sendo, matematicamente a função de $f(x, y)$ representa o produto da interação entre a *iluminância* e as propriedades de *reflectância*:

$$f(x, y) = i(x, y) \cdot r(x, y) \text{ Eq (1)}$$

Como a *reflectância* é a fração da luz refletida pelo objeto no ponto (x, y) , seu valor fica limitado entre zero (0, absorção total) e um (1, reflectância total). Já o valor da iluminância é determinado pela fonte de luz incidente no objeto.

Assim:

$$0 < r(x, y) < 1$$

$$0 < i(x, y) < \infty$$

As imagens geradas por processos físicos são contínuas tanto na variação espacial como nos níveis de intensidade das cores. Para reproduzir a imagem de um objeto no computador é necessário tornar discreto o sinal luminoso registrado no sensor óptico, haja vista que o computador processa sinais em dois dígitos (sistema binário), isto é, em bits (0 ou 1) que são números inteiros. O processo de discretização espacial da luz chama-se amostragem e o de discretização da intensidade luminosa denomina-se quantização (GONZÁLEZ e WOODS, 2002).

A amostragem consiste em coletar amostras de pontos (x, y) equidistantes ao longo do eixo vertical e horizontal da imagem bidimensional definida por $f(x, y)$ (FIGURA 2), enquanto que a quantização extrai os valores das intensidades de luz monocromática identificados nos pontos amostrados escalonando-os em níveis, conhecidos como níveis de cinza.

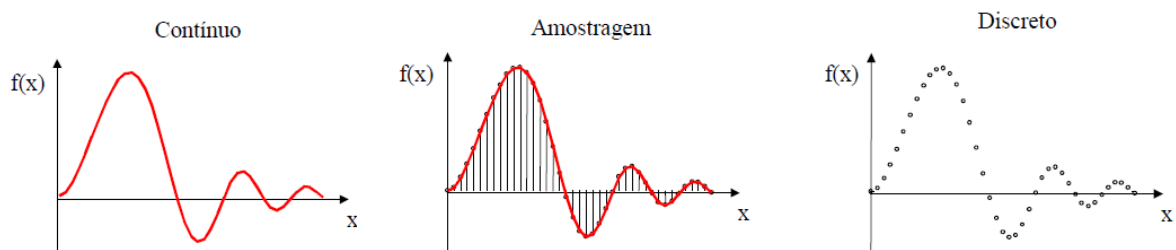


Figura 2 - Amostragem de dados contínuos. Fonte: Google imagens

Fundamentalmente a amostragem converte o sinal luminoso contínuo em uma matriz de M por N pontos, sendo cada ponto denominado de *pixel*. Onde, o ponto de origem é o valor de intensidade luminosa correspondente a $f(0,0)$ e o ponto final $f(M-1, N-1)$, os pontos intermediários estão dispostos conforme a estrutura matricial da equação 2;

$$f(x, y) = \begin{bmatrix} f(0,0) & f(0,1) & \dots & f(0,N-1) \\ f(1,0) & f(1,1) & \dots & f(1,N-1) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ f(M-1,0) & f(M-1,1) & \dots & f(M-1,N-1) \end{bmatrix} \text{Eq(2)}$$

Quanto maior o número de elementos amostrado por área da imagem maior será quantidade de *pixel* na matriz e consequentemente maior a resolução da imagem (FIGURA 3).

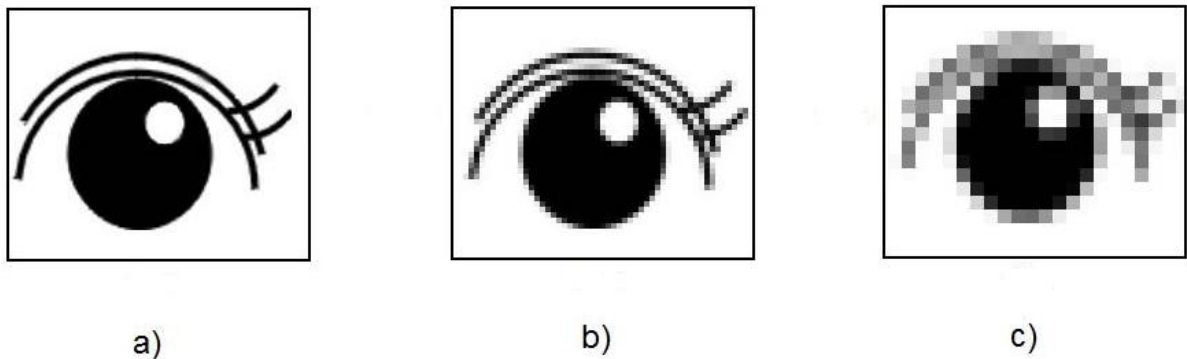


Figura 3 - Imagens digitais com diferentes quantidades de pixel, a) 4840px, b) 1210px e c) 484px.

A quantidade de pixels no processo de amostragem depende da quantidade de células fotoelétricas arranjada bidimensionalmente no sensor, que pode ser do tipo CCD (*Charge Coupled Devices*) ou CMOS (*Complementary Metal Oxide semiconductor*). Cada célula do sensor corresponde a um pixel da imagem, então, quanto maior o número de células fotoelétricas no sensor, maior será a resolução

da imagem (FIGURA 4).

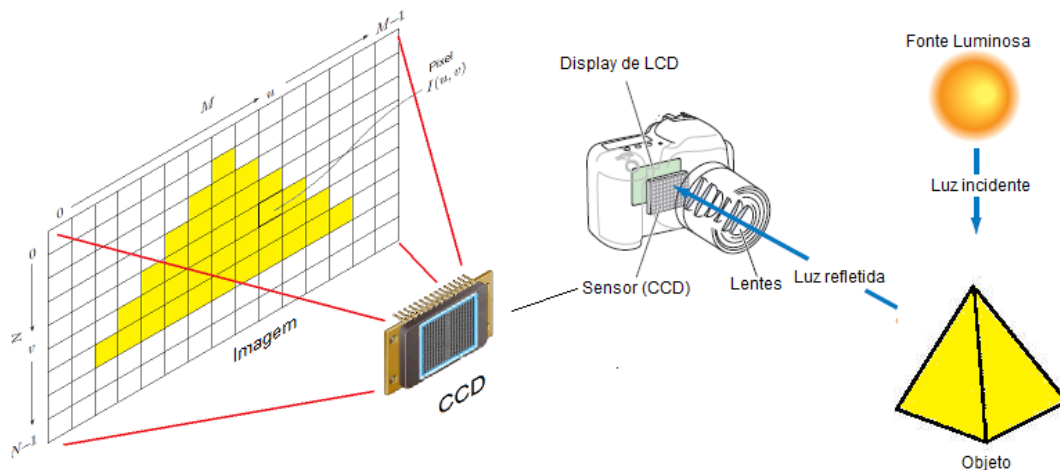


Figura 4 - Esquema de aquisição de imagem por uma câmera digital

Uma câmera de 6 megapixels, por exemplo, corresponde a um sensor com 6 milhões de elementos fotoelétricos e pode gerar uma imagem digital com 6 milhões de pixel, entretanto a imagem a ser exibida pode ter diferentes definições. A definição (resolução de saída) da imagem a ser exibida depende do tamanho do pixel, que é expressa pela quantidade de pontos por polegada (ppp) ou *dots per inch* (dpi). Quanto mais pixel por polegada tiver uma imagem mais resolvida ela será.

Existem tamanhos padrões de sensores (CCD), que são medidos em polegadas, variando de 1/3 de polegadas a 1/6 de polegadas. Os primeiros CCDs tinha tamanho de células fotoelétricas maiores do que os atuais, e quanto maior era o tamanho do CCD melhor era a imagem. Entretanto, com avanços na tecnologia foram sendo desenvolvidos CCDs com pixels cada vez menor, o que possibilitou a compactação de um numero cada vez maior de pixel em CCDs de dimensões reduzidas.

A maior quantidade de pixel no CCD, não significa que a imagem terá boa qualidade, haja vista que, esses dispositivos dependem das lentes nos equipamentos de aquisição para que a radiação luminosa chegue de modo adequado. Além disso,

equipamentos de aquisição compactos, como câmeras de celulares, apesar de possuírem sensores com alta resolução, alguns são de baixa qualidade e geram ruídos na imagem devido a produção de calor quando expostos a radiação luminosa (TAVARES JÚNIOR, 2011).

A quantização, processo de discretização das intensidades luminosas, está associado com a sensibilidade dos sensores utilizados na aquisição da imagem, que usualmente varia de 1 bit/pixel a 24 bits/pixel. As imagens de 1bit/pixel admitem 2^1 níveis discretos de intensidade por pixel, imagens com 8 bits/pixel admitem 256 (2^8) níveis e imagens com 24 bits/pixel admitem 16,8 milhões de níveis (FIGURA 5). Assim, a quantização faz com que cada um dos pixels assumam um valor inteiro de tonalidade, na faixa de 0 a $2^n - 1$. Onde n é o número de bits usados.

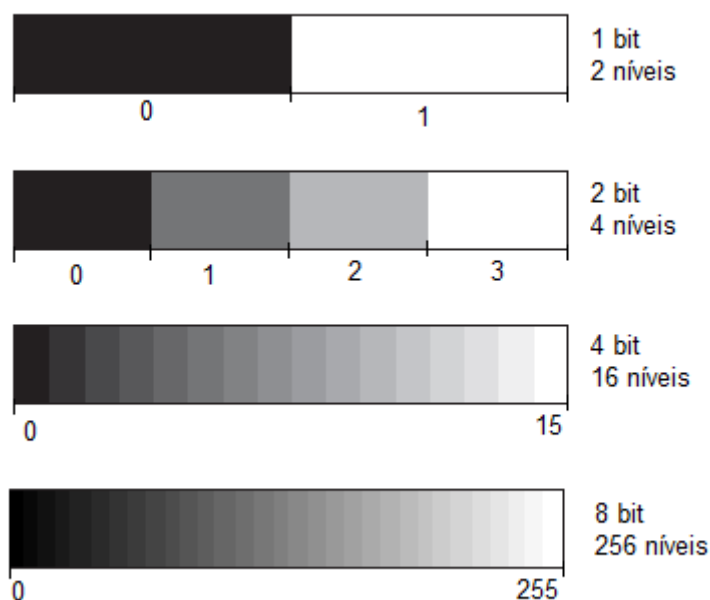


Figura 5 - Exemplo de níveis discretos de intensidade (tons de cinza) admitida por um pixel.

As células fotoelétricas presente no CCD não consegue distinguir cores, é sensível apenas a intensidade luminosa e não discrimina os comprimentos de ondas. Deste modo, o sensor só seria capaz de gerar imagens monocromáticas em

tons de cinza.

Para conseguir imagens coloridas com o CCD, são utilizados alguns artifícios como recobrir o CCD com filtros (*Colour Filter Array*) vermelho, verde e azul. Assim, cada célula no CCD registrará separadamente as intensidades nos comprimentos de onda correspondente a cor do filtro.

Esse artifício fundamenta-se no fato de que a cor é uma percepção sensorial oriunda dos estímulos que a luz em determinados comprimentos de ondas provocam na retina do observador (GILCHRIST e NOBBS, 1999; BRAINARD, 2008; CONWAY, 2009). Na interação entre a energia luminosa e o meio material, a luz que chega ao observador dando a percepção de cor, é originada de processos aditivos, subtrativos e pigmentação. No processo aditivo o raio luminoso é formado pela combinação de dois ou mais raios luminosos com diferentes comprimentos de ondas, no subtrativo o raio luminoso é aquele que não foi absorvido quando diferentes raios luminosos são transmitidos através de um filtro. No processo por pigmentação os pigmentos podem absorver refletir ou transmitir a radiação luminosa (BENDER, 2003).

Segundo a teoria de Young-Helmoltz, o olho humano percebe a cor através do estímulo de diferentes pigmentos visuais presentes em cada um dos três cones da retina, S (*short*), M (*medium*) e L (*long*), que possuem respectivamente sensibilidade máxima para os comprimentos de ondas em torno de 430 nm (azul), 530 nm (verde) e 630 nm (vermelho) (FIGURA 6) (BRAINARD, 2001). Os bastonetes, outro foto sensor também presente na retina, não são sensíveis à cor, porém são sensíveis a intensidade luminosa (CONWAY, 2009).

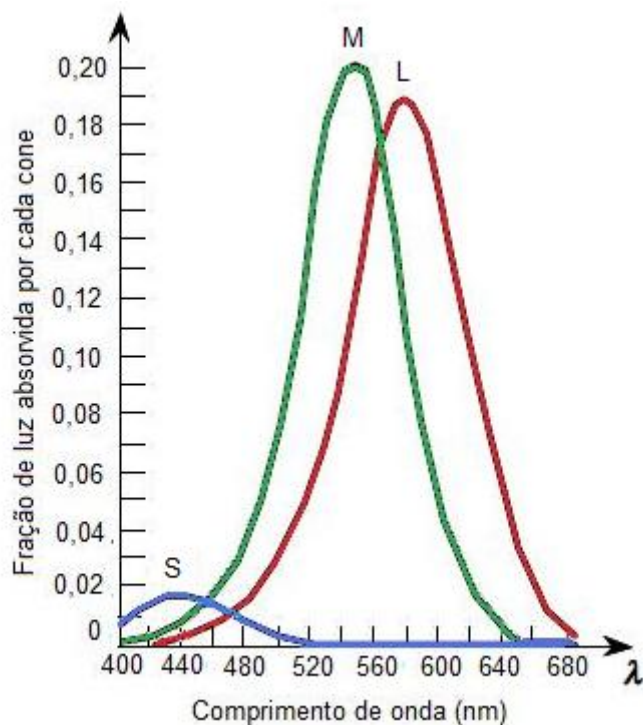


Figura 6 - Sensibilidade dos cones da retina em função do comprimento de onda

Os comprimentos de ondas compreendidos entre 400 e 680 nm são detectados pelos três tipos de cones, mas cada cone detecta um determinado comprimento de onda com uma sensibilidade diferente, dando origem a impulsos nervosos com intensidades diferentes (FAIRCHILD, 2010). A luz com comprimento de onda de 500 nm corresponde à sensibilidade máxima dos cones do tipo S, M e L em cerca de 20%, 30% e 10% respectivamente, provocando a sensação da cor ciano. Para um comprimento de onda de 550 nm, as sensibilidades são de 0%, 99% e 80% respectivamente, dando a sensação da cor amarela.

As diferenças entre as respostas dos três tipos de cones permite o cérebro interpretar um determinado comprimento de onda como uma determinada cor. Qualquer comprimento do espectro visível pode ser reproduzido como cor, através da adição dos resultados obtidos pelos diferentes estímulos dos três tipos de cones. A cor percebida pelo observador depende somente da relação entre os três estímulos (SHAPLEY e HAWKEN, 2002).

Em 1931 a comissão internacional de iluminação (CIE-Commission

internationale de l'Éclairage) criou um modelo matemático chamado CIE-*RGB* que utiliza as cores primárias vermelha (*R-red*), verde (*G-green*) e azul (*B-blue*), no qual a partir das diferentes possibilidades de combinações aditivas dessas cores são representadas todas as outras cores do espectro visível (POYNTON, 2003). Com esse modelo foi possível medir quantitativamente as cores e representá-las numericamente, dando os alicerces para os estudos de colorimetria (GILCHRIST e NOBBS, 1999).

O modelo RGB é representado por um cubo em coordenadas cartesianas, onde cada cor primária representa um dos eixos e assumem valores finitos que variam de zero (0) a um (1). Onde, o valor um (1) corresponde à intensidade máxima com que a cor primária pode ser representada no gráfico e o valor zero (0) à intensidade mínima (FIGURA 7).

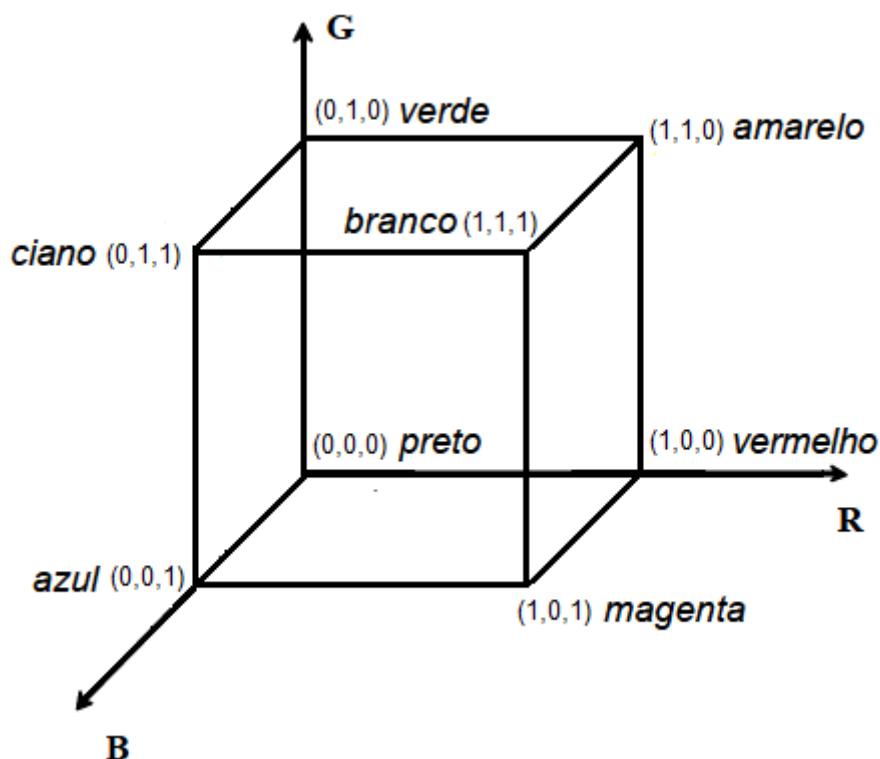


Figura 7 Cubo do modelo de cores RGB

Numa imagem digital a cor de cada pixel pode ser representada utilizando o

sistema de cor RGB. Nesse sistema, para carregar as informações digitais dos componentes vermelho, verde e azul são usados 8 bits (1 byte) para cada, isso significa que, os componentes do sistema RGB só podem assumir 256 níveis discretos de intensidade. Ou seja, o valor de cada componente primária só pode ser medida de 0 a 255, onde 0 é ausência de cor e 255 é a intensidade máxima. Os valores intermediários constituem um “degradê” de tons.

Como imagem digital é formada pelo conjunto de pequenos quadrados (*pixel*), quanto mais pixel por área da imagem maior a resolução. Porém, quanto mais *pixel* maior será o tamanho do arquivo (em bytes) de imagem e maior será o espaço ocupado na memória do computador.

No sistema RGB, em cada pixel é registrado uma cor que corresponde à combinação dos valores das componentes vermelha, verde e azul. Assim, para cada pixel são utilizados 3 bytes e pode ter 16,7 milhões (256x256x256) de possibilidade de cores do visível diferentes. O pixel com valores de R=0, G=0, B=0 possui cor preta e com R=255, G=255, B=255 cor branca. Vale ressaltar que a quantidade de possibilidades de cores que o pixel no sistema RGB pode assumir é muito maior que a quantidade de cores que o olho humano tem sensibilidade para distinguir.

2.5 - PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS EMPREGANDO ANÁLISES DE IMAGENS DIGITAIS

Métodos de análises químicas baseadas na formação de produtos coloridos a partir da reação de um analito de interesse com um reagente específico tem sido vastamente utilizados, sendo estes denominados de métodos colorimétricos. Sem dúvidas, a espectrofotometria na região do visível é a técnica mais aplicada nas análises colorimétricas quantitativas.

A espectrofotometria tem se mostrado bastante robusta no que diz respeito às

variedades de espécies químicas que podem ser analisadas (ROCHA e TEIXEIRA, 2004). No contexto da analítica quantitativa, os trabalhos com a espectrofotometria têm visado o emprego de estratégias para aumentar a sensibilidade e conseqüentemente a obtenção de limites de detecção cada vez menor (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

Atualmente tem se buscado a diminuição do tamanho dos sistemas de análises espectrofotométricas a ponto da portabilidade, o que possibilita análises *in situ* e aquisição de dados em tempo real (STEIMLE, 2002). Entretanto, sistemas espectrofotométricos com dimensão reduzida e com boa precisão ainda possuem um custo relativamente elevado. Uma saída satisfatória nas análises colorimétricas seria a utilização de sistemas com detecção por dispositivos de capturas de imagens digitais (KOMPANY-ZAREH, 2002; WONGWILAI, 2010).

Kompany-zareh e colaboradores (2002) desenvolveram um *spot test* quantitativo com papel de filtro para determinação colorimétrica de Fe (III) em amostras de aço. Na determinação utilizaram um *scanner* portátil para obtenção da imagem digital. O método proposto apresentou boa precisão, com erro menor que 4% na faixa linear de 6 a 45 mmol L⁻¹. Além da simplicidade, do baixo consumo de reagentes (20 µL) e rapidez do método, os autores ressaltaram o baixo custo.

Recentemente têm sido reportados na literatura alguns trabalhos que utilizaram imagens digitais, obtidas por *webcam*, *scanner*, câmera digital e câmeras de celulares na determinação de concentrações de espécies químicas de interesse em diversas matrizes (KOMPANY-ZAREH, 2002; PACIORNIK, 2006; YANG, 2007; MARTINEZ, 2008; WONGWILAI, 2010; IQBAL e BJORKLUND, 2011; LAPRESTA-FERNANDEZ e CAPITAN-VALLVEY, 2011), porém esse campo analítico ainda é pouco explorado.

Na maioria dos métodos analíticos baseados em imagens digitais, as respostas analíticas são obtidas extraindo através de *softwares* às informações que as imagens carregam, como por exemplo, os valores das cores primárias no sistema de cor RGB, e aplicando-as em modelos matemáticos (MALEKI, 2004; GAIAO, 2006; LYRA, 2009; LOPEZ-MOLINERO, 2010). Em alguns trabalhos também são utilizados os valores da escala de cinza ou até mesmo outros sistemas de cor, como

o sistema *Hue-Lightness-Saturation* (HSL) e o CMYK, da imagem para obterem o sinal analítico (PACIORNIK, 2006; MARTINEZ, 2008; ZAMORA, 2011; JOKERST, 2012).

Lyra e colaboradores (2009) desenvolveram um método no qual empregaram uma *webcam* como sistema de detecção em espectrometria de emissão em chama. Eles chamaram esse método de “Espectrometria de Emissão em Chama Baseada em Imagens Digitais” (DIB-FES). Na determinação de Li^+ , Na^+ e Ca^{2+} por DIB-FES, propuseram um modelo matemático baseado no espaço tridimensional do sistema RGB e no conceito de norma de vetores para conseguir a resposta analítica.

A possibilidade do desenvolvimento de procedimentos quantitativos em microescala para determinação simultânea de várias espécies de interesse, tem tornado os métodos por imagens digitais muito atraentes do ponto de vista analítico (SOLDAT, 2009).

Martinez e colaboradores (2008) desenvolveram um método colorimétrico para determinação simultânea de glicose e proteína em urina. No método proposto utilizaram um sistema baseado em dispositivo microfluídico em papel (*μPAD-Microfluidic Paper-based Analysis Devices*) e os resultados foram obtidos das imagens digitais do *μPAD*. Neste trabalho, os pesquisadores utilizaram pequenos volumes de amostra ($5\mu\text{L}$) e avaliaram as imagens obtidas por *scanner* de mesa, *scanner* portátil, câmera digital e por dois tipos de celulares.

Outra aplicação interessante e recente de imagens digital é na utilização de *webcam* como detector em sistemas de análises em fluxo. Andrade e colaboradores (2012) propuseram um sistema de análise em fluxo-batelada baseado em imagem digital para determinação de Al (III) e Cr (VI) em água. Com a metodologia conseguiram precisão para o Al (III) de 1,5 % na faixa linear de trabalho de 10 a $600\mu\text{g L}^{-1}$ e para o Cr (VI) precisão de 1,7% na faixa de 10 a $300\mu\text{g L}^{-1}$.

A combinação de imagem digital e colorimetria tem oferecido uma rota de alto potencial analítico em processamentos qualitativos e em medidas quantitativas. Isso só foi possível porque, nos últimos anos ocorreram avanços nas tecnologias de fotografia digital, tanto em termos de hardware quanto no desempenho dos softwares, proporcionando o desenvolvimento de equipamentos de baixo custo e

melhorias na precisão e no desempenho dos dispositivos de obtenções das imagens (BYRNE, 2000; GAIAO, 2006).

CAPÍTULO 3 - DETERMINAÇÃO DE NITRITO E NITRATO EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUBTERRÂNEA EMPREGANDO SISTEMA EM FLUXO COM MULTICOMUTAÇÃO E IMAGENS DIGITAIS

3.1 - INTRODUÇÃO

Nitrato e nitrito são espécies químicas importantes nas transformações associadas ao ciclo de nitrogênio. Pequenas quantidades desses íons no ambiente aquático são importantes para manutenção da reserva de nutrientes essenciais para o crescimento de micro-organismos aquáticos e preservação da vida nos corpos hídricos (MANAHAN, 2000).

Contudo, a presença de elevadas concentrações de nitrato em águas naturais estimula o crescimento de plantas e outros organismos aquáticos, como algas que florescem em abundância na presença desse íon, causando eutrofização e conseqüentemente morte de peixes pela insuficiência de oxigênio na água (MANAHAN, 2000; HARRISON, 2007). Em condições anaeróbicas o nitrato pode ser reduzido por bactérias a nitrito que é uma espécie muito tóxica para os peixes, agravando mais ainda a situação do ambiente aquático afetado (MANAHAN, 2000).

Em condições naturais normalmente as concentrações de nitrato e nitrito em águas superficiais são muito baixas. Entretanto, fontes de poluição proveniente de esgotos domésticos, decomposição de compostos orgânicos nitrogenados e usos de fertilizantes podem aumentar a concentração desses íons nos corpos hídricos de forma significativa (JOHNSON e KROSS, 1990).

A ocorrência de nitrato e nitrito em água subterrânea é causada principalmente, em regiões com agricultura intensiva, pela lixiviação de fertilizantes utilizados na adubação do solo, como também pela infiltração de esgotos provenientes de fossas sépticas e canalizações com defeitos (JOHNSON e KROSS, 1990; SPALDING e EXNER, 1993).

O interesse ambiental em monitorar os níveis de nitrato e nitrito em águas naturais se deve ao fato de serem parâmetros importantes na avaliação dos impactos sofridos por um ambiente aquático e, sobretudo, aos aspectos toxicológicos associados à ingestão desses íons. No Brasil os níveis máximos desses íons permitidos em água subterrânea são de 1,0 mg L⁻¹ para nitrito (expresso em Nitrogênio) e 10,0 mg L⁻¹ para nitrato (expresso em Nitrogênio) (BRASIL, 2008).

Muitos métodos analíticos empregando uma variedade de técnicas analíticas aplicados na determinação de nitrato e nitrito em diversas matrizes (água, alimentos, solos e etc.) têm sido reportados na literatura (MOORCROFT, 2001; HUANG, 2006; SHARIAR e HINOUE, 2010; ATTIQ-UR-REHMAN, 2011; ERDOGAN e ONAR, 2011; KODAMATANI, 2011; AYALA, 2012). Desses, os métodos espectrofotométricos baseados na reação de Griess são os mais largamente utilizados (MOORCROFT, 2001).

Com o intuito de minimizar o consumo de amostras e reagentes, aumentar a frequência analítica e melhorar a precisão dos resultados analíticos, em muitos métodos para determinação de nitrato e nitrito espectrofotometricamente são empregados sistemas de análise em fluxo (GINÉ, 1980; AHMED, 1996; ZHI-QI, 1998; YUE, 2004).

Neste trabalho é proposto o desenvolvimento de uma estratégia analítica para determinação de nitrato e nitrito em amostras de águas naturais pela reação de Griess. A estratégia foi desenvolvida empregando sistemas de análise em fluxo, com multicomutação (MFA) e detecção por *webcam*, sendo que os sinais analíticos foram obtidos empregando análise de imagens digitais.

3.2 - EXPERIMENTAL

3.2.1 - Preparo de reagentes e Soluções

Na determinação dos íons nitrito foi utilizado o reagente de Griess como reagente cromogênico, e este foi composto por 2,3% (m/v) de sulfanilamida mais 0,12 % (m/v) de dicloreto N-(1-naftil)etilenodiamina (NED) em ácido fosfórico. O

reagente de Griess foi preparado pesando-se em becker de 50 mL uma massa de 1,15 g de sulfanilamida P.A da marca Vetec e 0,06 g de NED P.A da marca J.T. Baker, em seguida foi adicionado ao becker 30 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A dissolução foi realizada com agitação e aquecimento em chapa à aproximadamente 50°C . Depois de resfriada em temperatura ambiente, a solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com a solução de H_3PO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução estoque de nitrito foi preparada pesando-se em Becker uma massa de 0,075 g de sal de nitrito de sódio P.A da marca Vetec, previamente seco em estufa a 110°C por 2 horas e armazenados em dessecador, depois foi adicionado aproximadamente 20 mL de água deionizada e sob agitação manual a massa foi diluída. Em seguida a solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e avolumada com água deionizada.

Na construção da curva analítica para determinação do íon nitrito foram preparadas soluções padrões 0,2; 0,4; 0,6; 1,2 e 2,0 mg L^{-1} de nitrito a partir da diluição da solução estoque de nitrito 1000 mg L^{-1} .

Na determinação do nitrato foi preparada uma coluna redutora de nitrato a nitrito, preenchendo um tubo de vidro de (3 mm d.i. e 6 cm de comprimento) com limalhas de cádmio cobreado (GINÉ, 1980). O depósito de cobre sobre a limalha de cádmio foi realizada conforme descrito na literatura (HENRIKSEN e SELMER-OLSEN, 1970), lavando-se as limalhas de cádmio sucessivamente com solução de ácido clorídrico $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, depois com água deionizada e em seguida com solução de sulfato de cobre $0,08 \text{ mol L}^{-1}$. Na sequencia as limalhas foram lavadas novamente com água deionizada a fim de remover o excesso de cobre.

Toda vez que houve perda de 5% do sinal analítico na determinação do nitrato, foi passado pela coluna de cádmio cobreado uma solução de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 2 minutos e depois água deionizada durante 5 minutos para regenerá-la (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

Na construção da curva analítica para determinação do íon nitrato foram preparadas soluções padrões 1,0; 3,0; 6,0; 8,0 e 10 mg L^{-1} de nitrato a partir da diluição da solução estoque de nitrato 1000 mg L^{-1} .

A solução estoque de nitrato foi preparada pesando-se em Becker uma massa de 0,0685 g de sal de nitrato de sódio P.A da marca Vetec, previamente seco em estufa a 110 °C por 2 horas e armazenados em dessecador, depois foi adicionado aproximadamente 20 mL de água deionizada e sob agitação manual a massa foi diluída. Em seguida a solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e avolumada com água destilada.

No sistema em fluxo como solução transportadora foi utilizada uma solução tampão pH 7,2 ($1,32 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de Na₂B₄O₇ e $2,9 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de Na₂EDTA), preparada dissolvendo 2,5 g de Na₂B₄O₇ · 10 H₂O e 0,5 g de Na₂EDTA em 400 mL de água deionizada, ajustando o pH a 7,2 com solução concentrada de HCl e completando o volume a 500 mL com água deionizada.

3.2.2 - Procedimento em fluxo para determinação de nitrito e nitrato

A determinação de nitrito foi realizada através da reação de Griess (MOORCROFT, 2001). Esta é baseada na reação de nitrito com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o dicloreto de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração rósea. O diazo composto formado na reação e Griess, nos método proposto, foi monitorado por uma *webcam* da Leadership modelo Mini webcam 5 Mega. Na determinação de nitrato, este foi preliminarmente reduzido no módulo de análise a nitrito por uma coluna de cádmio cobreado.

Para fins de comparação, o nitrito e o nitrato também foram determinados pelos métodos de referência NBR 12619 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1992) e APHA *Method* 4500-NO₃-I (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005) que são baseados na reação de Griess e, neste caso, foi monitorada por espectrofotômetro FEMTO modelo 800XI em 543 nm.

Na construção do módulo de análise, para determinação de nitrito e nitrato,

foram empregados tubos de polietileno (0,8 mm d.i.), confluências feitas em acrílico e uma micro cubeta de fluxo “made in lab” com caminho ótico de 10 mm, janela de vidro com abertura de 3 mm de diâmetro e volume interno estimado em ca. 71,0 μL . A propulsão dos fluidos foi feita com uma bomba peristáltica Ismatec (IPC-4), equipada com tubos de propulsão de Tygon [®] de diferentes diâmetros. Para inserção das soluções, foi empregada válvulas solenoide de 3 vias (Nresearch – T 161T031).

A Figura 8 apresenta o módulo de análise em fluxo, composto por quatro válvulas solenoide, para determinação de nitrito e nitrato.

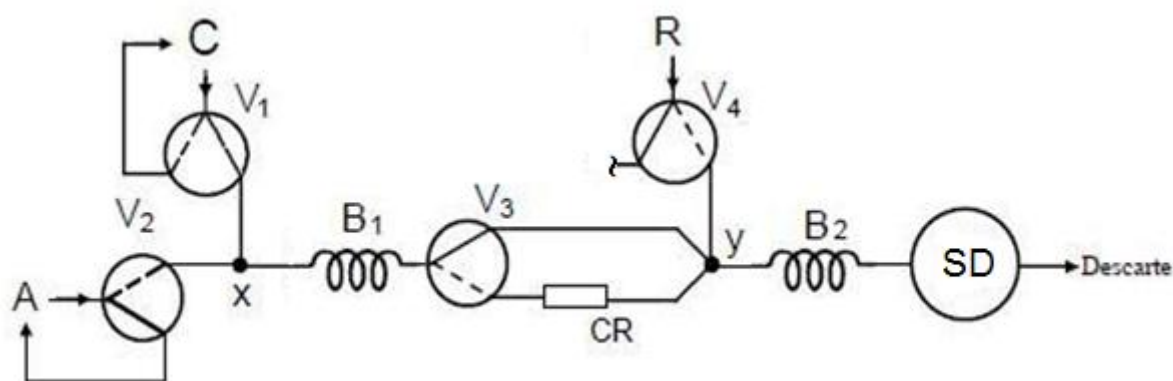


Figura 8 - Diagrama do módulo de análise em fluxo utilizado na determinação de nitrito e nitrato. C: Tampão (pH=7,2); A: Amostra; R: Reagente de Griess (2,3 % de sulfanilamida; 0,12 % de NED em H_3PO_4 0,5 mol L^{-1}); CR: coluna redutora de cádmio cobreado (3 mm d.i. x 6 cm); B1: Bobina de amostragem (0,8 mm d.i x 60 cm); B2: Bobina de reação helicoidal (0,8 mm d.i. x 90 cm); x e y: pontos de confluência; SD: Sistema de detecção.

Na determinação de nitrito e nitrato a amostra (A) teve o fluxo direcionado pela válvula V_2 . A válvula V_4 foi utilizada para direcionar o fluxo do Reagente (R). A válvula V_1 foi utilizada para direcionar o fluxo da solução tampão (C) que foi utilizada como carregador. Na determinação de nitrato a válvula V_3 foi empregada para direcionar o fluxo da amostra para a coluna redutora (CR). A amostra e a solução tampão foram bombeadas a vazão de 4,3 mL min^{-1} enquanto o reagente foi amostrado através da força da gravidade a uma vazão de 2,1 mL min^{-1} .

O gerenciamento de abertura e fechamento das válvulas solenoide bem como

a obtenção do sinal analítico foi realizado conforme as etapas programadas e descritas na Tabela 1.

Na determinação de nitrito as válvulas V_1 e V_2 foram acionadas durante 5s, tempo necessário para a amostra preencher a bobina B_1 (300 μ L) com a solução de amostra e/ou padrões, enquanto a solução carregadora recirculava (Tabela 1, etapa 1). Na sequencia, a válvula V_4 foi acionada durante 1s, permitindo a introdução da solução de Griess no ponto y, intercalando com abertura e fechamento da válvula V_1 durante 2s para o transporte da mistura reacional para a Bobina B_2 , (etapas 2-3), estas etapas foram repetidas 5 vezes (5 ciclos de acionamento entre as válvulas V_4 e V_1), permitindo que alíquotas de amostra fossem intercaladas entre alíquotas de reagente por amostragem binária. Na etapa 4 (medida do sinal) todas as válvulas estão desligadas e o fluxo carregador flui pela válvula V_1 , conforme apresentado no diagrama do módulo da Figura 8.

Para determinação de nitrato (Tabela1), etapa 5, somente a V_3 é acionada para direcionar o fluxo (solução tampão) para coluna redutora (CR), por um período de 10s. Na sequência as válvulas V_1 e V_2 são acionadas durante 10 s, para que a B_1 e a coluna redutora fosse preenchida com solução da amostra e/ou padrões (etapa 6). Na etapa 6 a zona de amostra é tamponada por dispersão da amostra na solução transportadora. Na sequencia, o procedimento foi similar aquele empregado na determinação de nitrito (a partir da etapa 2), a válvula V_4 foi acionada durante 1s, permitindo a introdução da solução de Griess no ponto y, intercalando com abertura e fechamento da válvula V_1 durante 2s para o transporte da mistura reacional para a Bobina B_2 , (etapas 7-8), estas etapas foram repetidas 5 vezes (5 ciclos de acionamento entre as válvulas V_4 e V_1), permitindo que alíquotas de amostra fossem intercaladas entre alíquotas de reagente por amostragem binária. Na etapa 9 (medida do sinal) todas as válvulas estão desligadas e o fluxo carregador flui pela válvula V_1 , conforme apresentado no diagrama do módulo da Figura 8.

O volume da alíquota de cada solução inserida no percurso analítico pode ser obtido pelo intervalo de tempo (Δt) de abertura da válvula solenoide e função da vazão do fluxo (φ) pela equação conforme equação 3:

$$V(\mu L) = \varphi (mL s^{-1}) \times \Delta t (s) \times 1000 \quad Eq (3)$$

Para obtenção da curva de calibração no lugar da amostra foram utilizadas as soluções padrões de nitrito e nitrato. O sinal do nitrato foi obtido subtraindo do sinal da amostra reduzida, o sinal da amostra sem passar pela coluna redutora.

Tabela 1 - Sequência de acionamento das válvulas solenoide para a determinação de nitrito e nitrato.

ETAPA	V1	V2	V3	V4	t (s)	Descrição
Nitrito						
1	1	1	0	0	5	Preenchimento de B1 com amostra
2^a	1	0	0	1	1	Amostragem - R1
3^a	0	0	0	0	2	Amostragem - A
4	0	0	0	0	15	Medida do sinal
Nitrato+Nitrito						
5	0	0	1	0	10	Preenchimento da B1 e da CR com tampão
6	1	1	1	0	10	Preenchimento da B1 e da CR com amostra
7^b	0	0	1	1	1	Amostragem – R1
8^b	0	0	1	0	2	Amostragem - A
9	0	0	0	0	10	Medida do sinal

1= válvula solenoide acionada; 0=válvula solenoide desligada; a e b = etapas repetidas (5 ciclos de amostragem).

O acionamento das válvulas solenoide foi realizado através de um *software* de gerenciamento do módulo de análise que utiliza linguagem de programação escrito em Lab-View 6.0. e a interface com o usuário, formulário, é apresentada na Figura 9. Empregando um arquivo de comandos, montado em forma de matriz, é possível programar vários eventos como acionamento das válvulas, direção e velocidade da bomba, número de replicatas, entre outros. Entretanto, neste trabalho só utilizamos

esta interface para programação das válvulas solenoide e controle da bomba peristáltica.

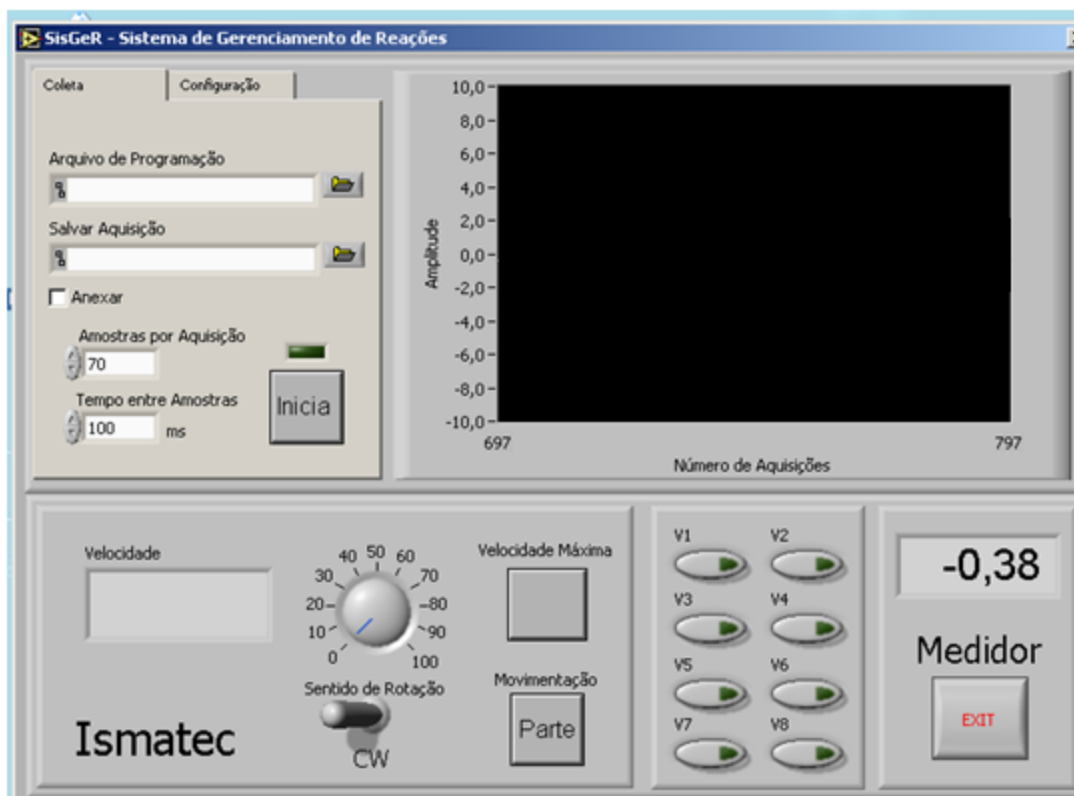


Figura 9 - Formulário utilizado na Interface com o usuário

No método proposto, o sistema de detecção consiste em uma caixa de isopor de dimensões 21 cm (L) x 30 cm (C) x 18 cm (A), dentro da qual foi instalado um suporte para cela em fluxo alinhada e distante 1 cm de uma *webcam* Leadership modelo Mini webcam 5 Mega com detector CMOS. Conforme sugerido por Andrade e colaboradores (2012), para assegurar uniformidade na iluminação foi utilizada caixa com interior branco e para evitar interferências da iluminação do ambiente a caixa foi lacrada e o interior foi iluminado com lâmpada fluorescente de 7 w (FIGURA 10).



Figura 10 - Fotografia do sistema em fluxo utilizado na determinação de nitrito e nitrato.

Tanto para o gerenciamento do módulo de análise quanto para aquisição das imagens de vídeo pela *webcam*, foi empregado um *notebook* com processador Intel Pentium T3400 com memória RAM de 2GB. As imagens obtidas pela *webcam* foram salvas em arquivos do tipo AVI (*Audio Video Interleave*).

O sistema de detecção utilizado para obtenção do sinal analítico no método de referência foi um espectrofotômetro da marca FEMTO modelo 800XI em 543 nm.

De modo que fosse obtido o maior sinal com melhor resolução e menor consumo de reagente, os parâmetros físico-químicos do sistema em fluxo foram avaliados. Nesses estudos o tamanho da bobina de amostragem (B1) foi fixada em 60 cm (300 μ L).

3.2.2.1 - Efeito da influência na precisão dos resultados analíticos pela inserção da solução do reagente de Griess por amostragem binária.

Nesse estudo avaliou-se o efeito do emprego da bomba peristáltica e da gravidade como propulsor do reagente de Griess na precisão da determinação (n=10) de uma solução padrão de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito. Na realização desse estudo as vazões da bomba peristáltica e da gravidade, ambas foram fixadas em $2,1 \text{ mL min}^{-1}$.

3.2.2.2 - Estudo do efeito da vazão de fluxo do transportador.

Nesse estudo foi avaliado o efeito da vazão de fluxo do transportador sobre o sinal analítico na determinação de uma solução padrão de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito. Nesse estudo foi fixada a vazão do reagente de Griess em $2,1 \text{ mL min}^{-1}$ (propulsão por gravidade), tamanho da bobina de reação (B2) em 100 cm ($500 \mu\text{L}$) e variou-se a vazão do transportador entre $3,1$ a $6,6 \text{ mL min}^{-1}$.

3.2.2.3 - Estudo do efeito do comprimento da bobina reacional.

Fixando a vazão de fluxo do transportador em $4,3 \text{ mL min}^{-1}$ e do reagente de Griess em $2,1 \text{ mL min}^{-1}$, foi avaliado o efeito do tamanho do percurso analítico no sinal analítico variando-se o comprimento da bobina de reação (B₂) entre 50 a 100 cm (250 - $500 \mu\text{L}$). Neste experimento foi utilizada uma solução padrão de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito.

3.2.2.4 - Estudo do número de ciclos na amostragem binária.

Nesse estudo avaliou-se a influência sobre o sinal analítico da mistura reacional na amostragem em diferentes proporções entre reagente e amostra. Para isso variou-se o número de ciclos de amostragem entre 3 e 7 nas seguintes combinações de volume reagente (R) e amostra (A); R+A, R+2A, 2R+A e 2R+2A.

A combinação R+A corresponde a inserção do reagente (R) na bobina de reação (B_2) durante 1s (no fluxo de $2,1 \text{ mL min}^{-1}$) e na sequência é introduzido durante 1s (no fluxo de $4,3 \text{ mL min}^{-1}$) a amostra (A). Os rótulos 2R ou 2A correspondem ao tempo de 2s. Foram utilizadas uma bobina de reação de 90 cm, fluxo de amostra e reagente de $4,3 \text{ mL min}^{-1}$ e $2,1 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente e solução de nitrito de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

3.2.2.5 - Efeito das concentrações de NED e Sulfanilamida na reação de Griess.

Nesse estudo foi avaliado na reação de Griess o efeito da concentração do NED, sulfanilamida e ácido fosfórico sobre o sinal analítico.

Primeiramente foi avaliado o efeito da concentração de ácido fosfórico. Para isso foi preparado reagentes de Griess com ácido fosfórico nas concentrações que variaram de $0,3$ a $1,5 \text{ mol L}^{-1}$, Sulfanilamida e NED nas concentrações de 2% e 0,1 %, respectivamente. Com os reagentes de Griess nas diferentes concentrações de ácido fosfórico foram feitas, no módulo de análise (FIGURA 8), reações com solução padrão de nitrito de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e monitorado sinal analítico.

Depois de encontrada e fixada a melhor condição para concentração do ácido fosfórico foi determinada as concentrações ótimas de sulfanilamida e NED no reagente de Griess. Nesse estudo foi empregado o planejamento do tipo composto

central (11 experimentos, sendo 3 replicatas no ponto central) e a metodologia de superfície de resposta (MSR ou RSM do inglês *Response Surface Methodology*) (BARROS NETO, 2010).

As faixas de variação (TABELA 2) entre o limite inferior (-1,41) e superior (1,41) de cada variável independente (NED e Sulfanilamida) foram estabelecidas de acordo com os valores normalmente recomendados na literatura (ANDERSON, 1979; GINÉ, 1980; ROCHA e REIS, 2000) e nos protocolos de análises de nitrito por reação de Griess (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1992; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Tabela 2 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento composto central com valores reais e codificados

Fatores	Níveis				
NED % (m/v)	0,03	0,05	0,10	0,15	0,17
Sulfanilamida % (m/v)	1,3	1,5	2,0	2,5	2,7
Codificação	-1,41	-1	0	1	1,41

A matriz do planejamento composto central utilizada nesse estudo é apresentada na Tabela 3

Tabela 3 - Matriz do planejamento composto central na forma real e codificada.

Exp.	Variáveis codificadas		Variáveis originais	
	X ₁	X ₂	NED % (m/v)	Sulf.% (m/v)
1	+1	+1	0,15	2,5
2	+1	-1	0,15	1,5
3	-1	+1	0,05	2,5
4	-1	-1	0,05	1,5
5	0	0	0,10	2,0
6	0	0	0,10	2,0
7	0	0	0,10	2,0
8	+1,414	0	0,17	2,0
9	-1,414	0	0,03	2,0
10	0	+1,414	0,10	2,7
11	0	-1,414	0,10	1,3

Como resposta ao planejamento a variável dependente foi o sinal analítico (Norma), obtido empregando o módulo de análise (FIGURA 8) através das imagens das reações em triplicata na determinação de solução padrão de nitrito 0,5 mg L⁻¹.

Os resultados do planejamento experimental definido neste trabalho foram analisados estatisticamente pela técnica de análise de variância (ANOVA) através do *software STATISTICA 7.0*.

3.2.2.6 - Influência do pH da solução tampão na redução do nitrato a nitrito.

Foi feito o estudo do efeito da acidez na redução de nitrato a nitrito variando-se o pH da solução tampão entre 6,9 a 8,5. Esse estudo foi realizado empregando uma solução padrão contendo 4,0 mg L⁻¹ de nitrato.

3.2.2.7 - Estudo da eficiência de redução e estabilidade da coluna de cádmio cobreado.

Foi avaliada a eficiência de redução da coluna de cádmio cobreado pela introdução de soluções padrões de nitrato e nitrito, ambas nas concentrações de 2,0 mg L⁻¹.

A estabilidade da coluna redutora foi avaliada verificando-se a diminuição na resposta analítica, após a realização de 100 determinações sucessivas em amostras (22 amostras) de águas naturais fortificadas com nitrato na concentração de 1,0 mg L⁻¹ e de 50 determinações sucessivas na concentração de 10,0 mg L⁻¹.

3.2.3 -Tratamentos das imagens digitais e obtenção do sinal analítico

No mercado existe vários software para análise de imagens digitais, entretanto, estes são pagos e alguns necessitam de pessoal treinado para sua utilização. Tendo em vista esses aspectos é interessante o uso de *software* livre que, possibilite o usuário o estabelecimento de rotinas de análise que atendam a necessidade de diversos grupos e que suas análises sejam certificadas pelas normas técnicas internacionais (DIAS, 2008).

Devido ao desempenho e as facilidades, neste trabalho foi utilizado o *software* image J de tratamento e análise de imagens, desenvolvido por Wayne Rasband do *Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, United States of America*. O image J, além de gratuito, é escrito em Java e possui código fonte aberto, permitindo a criação de *plugins* que se adéquam as necessidades do usuário.

Na determinação de nitrito pelo sistema em fluxo, a *webcam* com sensor do tipo CMOS foi configurada para capturar vídeos com imagens digitais de 24 bits em uma razão de 30 *frames* por segundo com resolução espacial de 640x480 pixels. As imagens de vídeos foram capturadas pelo *software* da *mini webcam 5MP* da Leandershship e armazenado em arquivo do tipo AVI. A aquisição do vídeo foi iniciada manualmente e em sincronia com o início da execução da programação do módulo de análise apresentada na Tabela 1.

Para cada injeção em triplicata foi gerado arquivos de vídeos com 90 segundos de gravação e através do *software free vídeo to JPG converter* foi extraído um *frame* de cada segundo do arquivo de vídeo. Os *frames* extraídos foram salvos em arquivos distintos de imagens do tipo JPEG (*Joint Photographic Experts Group*). Os arquivos de imagens JPEG foram abertos sequencialmente no *software Image j* e com a ferramenta *image to stack*, foram agrupadas numa pilha (*stack*) ordenada das imagens (FIGURA 11).

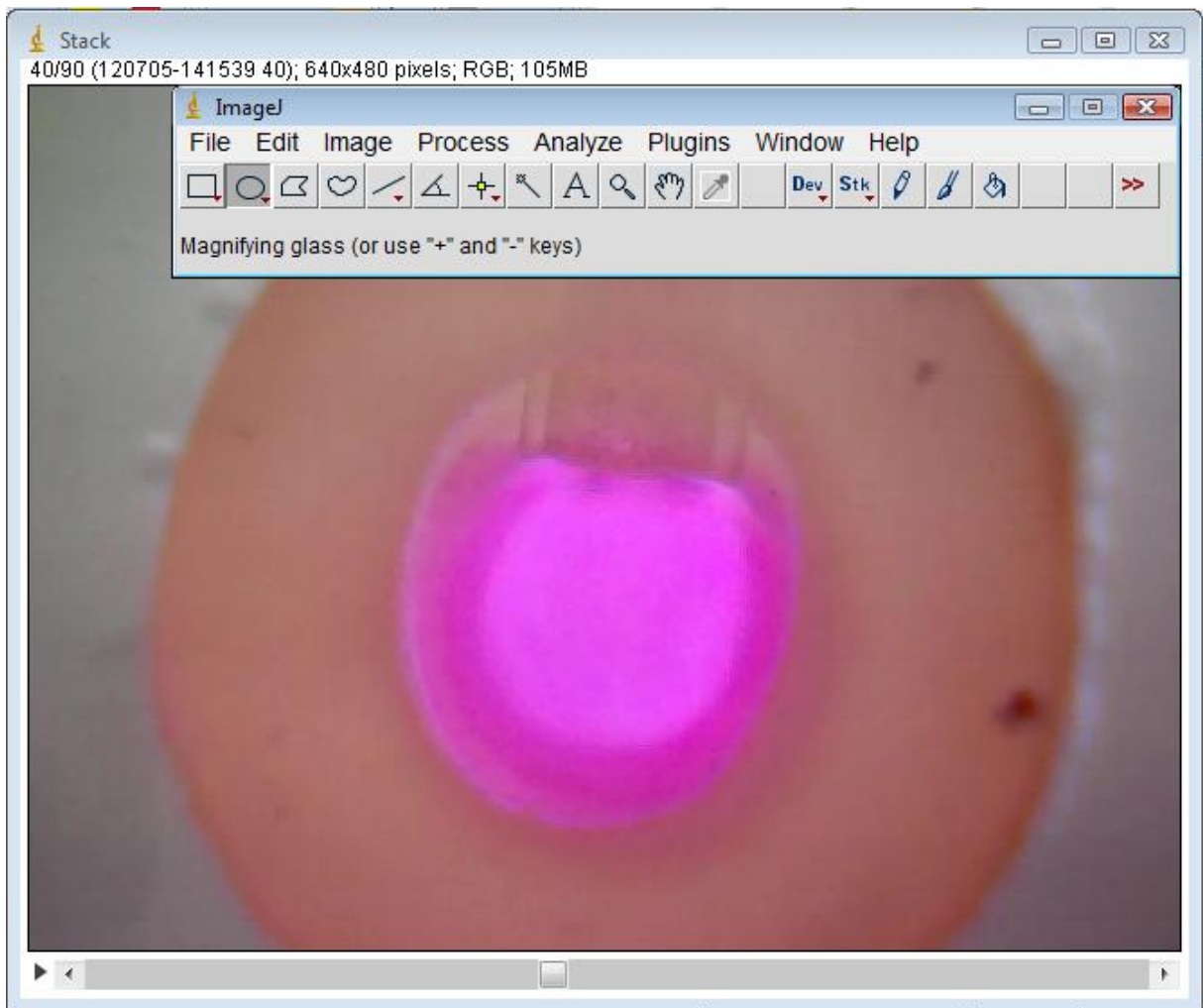


Figura 11 - Interface do programa image J com as imagens em stack

A região selecionada da imagem para a obtenção e análise dos dados, como ilustrada na Figura 12, é uma matriz com área de 9500 pixel^2 obtida pelo uso da ferramenta *oval selections*. Como as imagens possuem as mesmas dimensões, fazendo a seleção da área em uma imagem do *stack*, a seleção é válida para todas as outras imagens do *stack*. Para extrair os valores médios dos canais (R, G e B) dos pixels na área selecionada e apresenta-los em forma de tabela, foi utilizado um *plugin* que foi chamado de *measure bands stacks* (ANEXO). Esse *plugin* foi criado modificando-se o código fonte do *plugin measure staks* (ANEXO) desenvolvido por

Bob Dougherty da OptiNav Inc¹ e para funcionar foi necessário o *plugin measure bands* desenvolvido no projeto *open source* de Jarek Sacha².

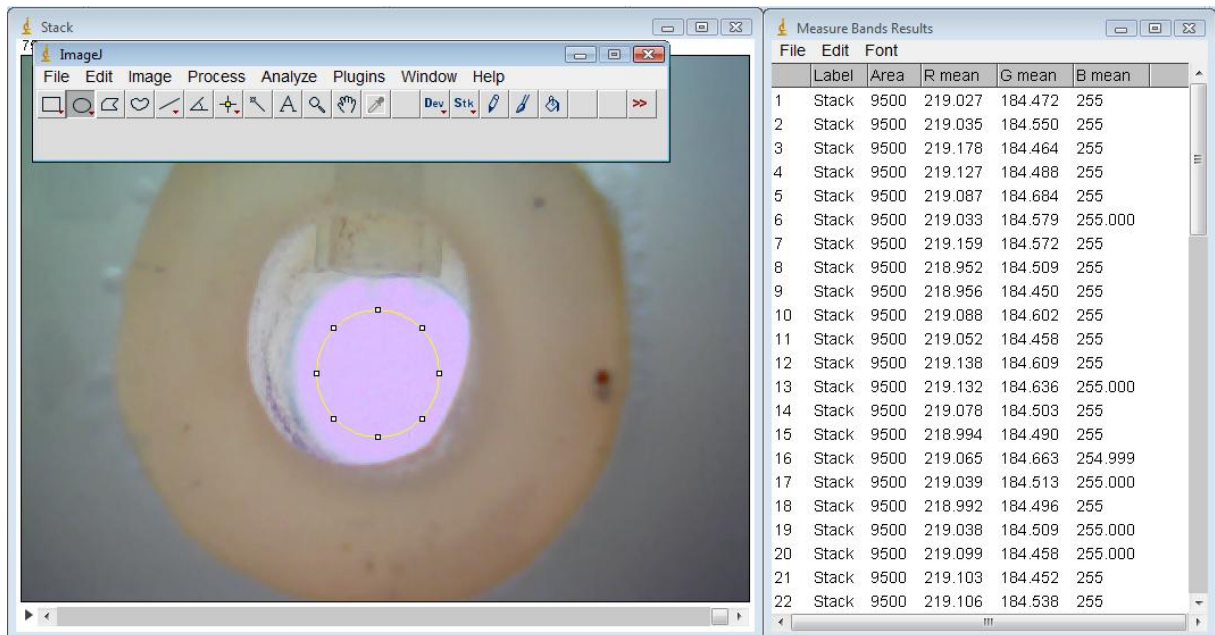


Figura 12 - Interface do programa image j com o stack das imagens acompanhado da tabela de resultados dos valores de RGB de cada imagem do stack.

Os valores de RGB foram importados para uma planilha em *Excel* e o sinal analítico foi obtido utilizando o modelo matemático proposto por Lyra e colaboradores (2009). Neste modelo é utilizado o conceito de norma de vetor e é associado um vetor \mathbf{v} ao valor da cor conforme a Figura 13.

¹ <http://www.optinav.com/imagej.html>. Acessado em 22 de janeiro de 2013

² <http://ij-plugins.sourceforge.net/>. Acessado em 22 de janeiro de 2013

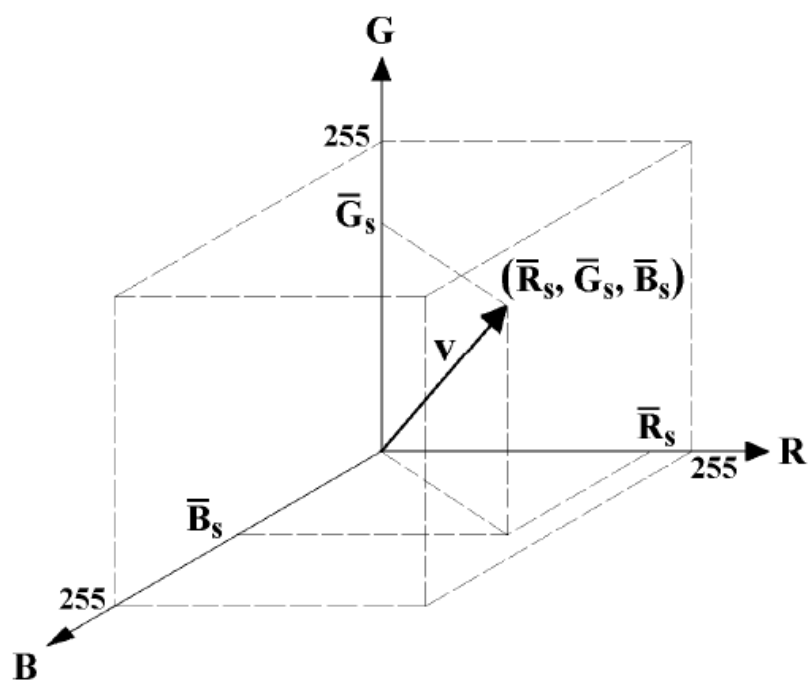


Figura 13 - Espaço vetorial RGB e o vetor v representando uma cor. Fonte: (LYRA, 2008)

A norma “ $\|v\|$ ” do vetor v foi calculada pela equação 4:

$$\|V\| = \sqrt{\bar{R}_{s-b}^2 + \bar{G}_{s-b}^2 + \bar{B}_{s-b}^2} \quad \text{Eq (4)}$$

Onde \bar{R}_{s-b} , \bar{G}_{s-b} e \bar{B}_{s-b} são os valores médios das componentes RGB da amostra ou da solução padrão subtraídos dos valores médios das componentes RGB do branco. Conforme mostrado por Lyra e colaboradores (2009) o valor da norma do vetor possui uma relação linear com a concentração do analito.

Como a resposta analítica está associada à norma do vetor que depende de três variáveis o desvio padrão associado foi estimado usando a equação de propagação de erro. Conforme demonstrado por Lyra e colaboradores o desvio padrão nas medidas do branco é obtido pela equação 5:

$$s_b = \sqrt{\frac{\bar{R}_b^2 s_{\bar{R}} + \bar{G}_b^2 s_{\bar{G}} + \bar{B}_b^2 s_{\bar{B}}}{\bar{R}_b^2 + \bar{G}_b^2 + \bar{B}_b^2}} \text{ Eq (5)}$$

Onde $s_{\bar{R}}$, $s_{\bar{G}}$ e $s_{\bar{B}}$ são os desvios padrão associado aos valores médios de RGB das imagens do branco. Neste trabalho pra estimar o valor de S_b foram utilizadas 25 imagens do branco.

Os valores do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados utilizando as equações 6 e 7:

$$LD = \frac{3s_b}{\beta} \text{ Eq (6)}$$

$$LQ = \frac{10s_b}{\beta} \text{ Eq (7)}$$

Onde β é o coeficiente linear da equação da curva de calibração.

3.2.4 - Amostragem da água subterrânea

As amostras foram coletadas em poços ativos localizados na área urbana da Cidade de Barreiras-Ba preferencialmente no período do final da tarde.

A amostragem foi realizada deixando primeiramente a torneira do poço aberta durante 10 minutos para que a água estagnada na tubulação fosse drenada. Após esse procedimento, a amostra foi coletada em frasco de polietileno de um litro, previamente descontaminado e rinsado várias vezes com a água a ser amostrada (CETESB, 1988).

As amostras foram identificadas e numeradas, sendo as informações anotadas

em caderno de campo e transportadas para o laboratório em caixa de isopor com gelo. As determinações de nitrito nas amostras não ultrapassaram o prazo de 24 horas após a coleta e a de nitrato não ultrapassou o prazo de uma semana da coleta.

3.2.5 - Aplicação do teste t pareado.

O teste t pareado foi aplicado na comparação dos resultados obtidos na determinação de nitrito e nitrato em amostras de água subterrânea pelos métodos propostos e pelos métodos de referência.

Na aplicação do teste t foi calculada, para cada par de resultados, a diferença (d) entre os resultados obtidos pelo método proposto e pelo método de referência. Depois foi calculado a média dessas diferenças (\bar{d}) e o desvio padrão (s_d) dessas diferenças na média. Assumindo que Δ_0 é a diferença média entre os resultados dos métodos, a hipótese nula (H_0) a ser testada é de que $\Delta_0=0$. O valor do teste estatístico é:

$$t = \frac{\bar{d} - 0}{s_d/\sqrt{N}}$$

Onde N é o número de amostras analisadas por ambos os métodos e S_d é:

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{N}}{N - 1}}$$

Depois de calculado o valor de t, este deve ser comparado ao valor tabelado de $t_{\text{crítico}}$ para o grau de liberdade (N-1) no nível de confiança esperado. Se, $t \geq t_{\text{crítico}}$

ou $t \leq -t_{\text{crítico}}$ a hipótese nula é rejeitada e é concluído que os dois métodos fornecem resultados diferentes (WEST, 2006).

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram estudados os parâmetros físico-químicos do sistema de análise em fluxo com detecção empregando *webcam*, a fim de obter uma melhor correlação entre a sensibilidade do procedimento e o consumo de reagente. Posteriormente, o procedimento otimizado foi aplicado na determinação de nitrito e nitrato em amostras de água subterrânea.

3.3.1 - Modulo de Análise

3.3.1.1 - Aspectos físicos

A determinação de nitrito e nitrato envolve reações em meio ácido, reação de diazoacoplamento para a determinação de nitrito e, moderadamente alcalino, redução de nitrato a nitrito. Em sistema de análise em fluxo esse requisito pode ser contemplado empregando-se, por exemplo, dispositivos de comutação discretos como mini e micro bombas além de válvulas solenoide utilizadas na construção do módulo de análise deste trabalho, conforme apresentado no diagrama de fluxo na Figura 8(p.47, seção 3.2.2). As válvulas solenoide (V_1 - V_4) foram empregadas para controlar independentemente a adição das soluções empregadas, bem como a redução de nitrato a nitrito na coluna redutora, permitindo a implementação das condições reacionais para a determinação de nitrito e nitrato respectivamente.

O procedimento de amostragem binária foi utilizado para a seleção de alíquotas de amostra e reagentes no sistema. Nesse processo, a repetibilidade de amostragem pode ser afetada pela precisão no controle do tempo de amostragem e pulsação da bomba peristáltica (REIS, 1994; ROCHA, 2001), quando utilizada como propulsor de fluidos. Neste estudo foi avaliada a precisão obtida em 10 determinações sucessivas para nitrito, empregando amostragem binária, com propulsão da solução reagente com bomba peristáltica e/ou amostragem por gravidade. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 14. Com o emprego da bomba peristáltica, verificou-se um coeficiente de variação (CV) de 2,9%, (FIGURA 14 - A). Já com a amostragem da solução reagente por gravidade (FIGURA 14 - B) o coeficiente de variação (CV) obtido foi de 1,5%. No caso da amostragem por gravidade a vazão da solução é dependente de vários fatores hidrodinâmicos, altura do frasco da solução do reagente, diâmetro interno e comprimento do tubo, viscosidade da solução reagente, etc. Como estes parâmetros foram mantidos constantes durante o procedimento analítico, a vazão se manteve constante e seu valor determinado foi de $2,1 \text{ mL min}^{-1}$. A bomba peristáltica foi empregada para a propulsão da solução transportadora, devido à impedância hidrodinâmica no sistema pela coluna redutora de cádmio cobreado.

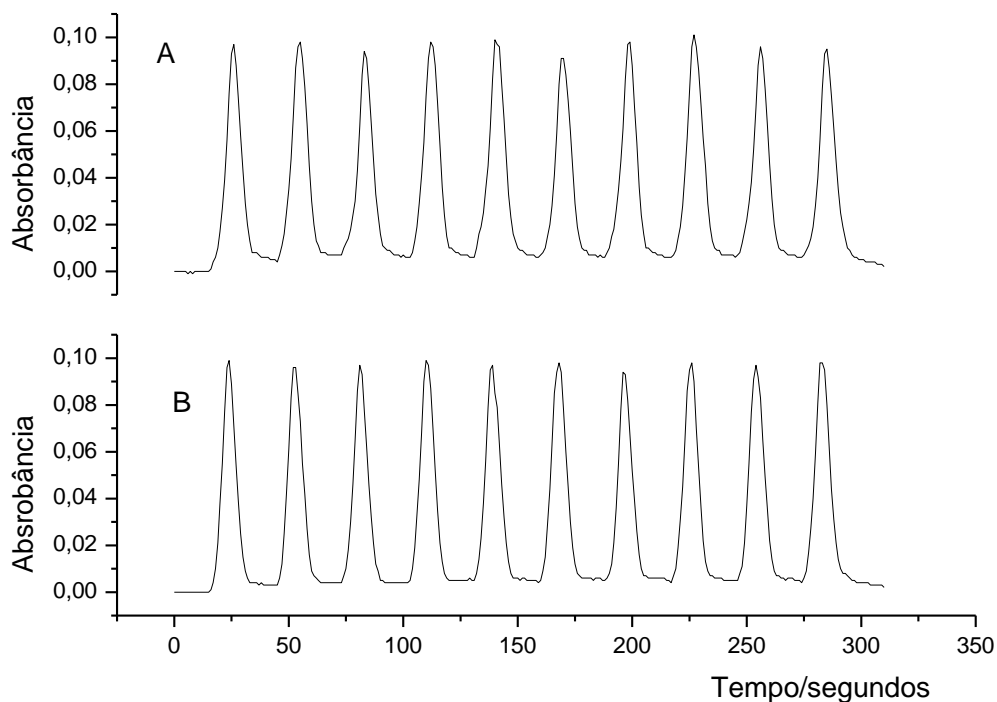


Figura 14 - Avaliação da precisão na determinação de nitrito, empregando no módulo de análise da Figura 8 para propulsão da solução reagente; válvula V_4 , bomba peristáltica (A) e gravidade (B).

Nos estudos subsequentes a propulsão da solução do reagente (R_1) foi realizada pela força da gravidade e, mantida em $2,1 \text{ mL min}^{-1}$. A alíquota de amostra, bobina B_1 , foi fixada em 60 centímetros ($300 \mu\text{L}$). Já o efeito da vazão do fluxo transportador foi avaliado variando-se a vazão de $3,1$ a $6,6 \text{ mL min}^{-1}$, empregando-se bomba peristáltica e uma bobina reacional (B_2) de 100 cm ($500 \mu\text{L}$).

Conforme apresentado na Figura 15, o sinal de maior intensidade foi observado na vazão de $4,3 \text{ mL min}^{-1}$. Em vazões maiores observa-se uma diminuição na intensidade do sinal provavelmente relacionada à cinética da reação. Já em vazões menores que $4,3 \text{ mL min}^{-1}$ o sinal foi menor devido uma maior dispersão do produto colorido no sistema.

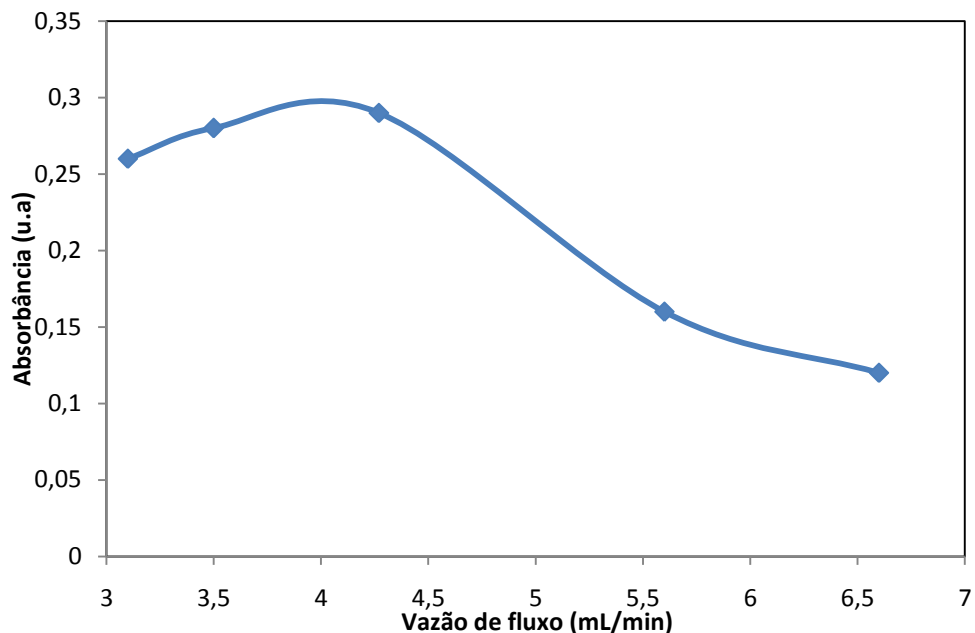


Figura 15 - Efeito da vazão de fluxo sobre o sinal analítico de uma solução padrão $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito. Medidas feitas com reagente de Griess (0,1% de NED, 2% sulfanilamida, $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$) na vazão de $2,1 \text{ mL min}^{-1}$ e em bobina de reação (B2) com 100 cm.

Fixando-se a vazão de fluxo em $4,3 \text{ mL min}^{-1}$, foi avaliado o efeito do tamanho da bobina reacional (B_2) entre 50 a 100 cm ($250\text{-}500\mu\text{L}$) sobre o sinal analítico. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos nestes estudos. Observa-se que a melhor relação entre a cinética reacional com os parâmetros físicos do sistema em fluxo (vazão e bobina reacional) sobre sensibilidade do sinal, foi obtida quando foi empregada uma bobina reacional de 90 cm ($450\mu\text{L}$).

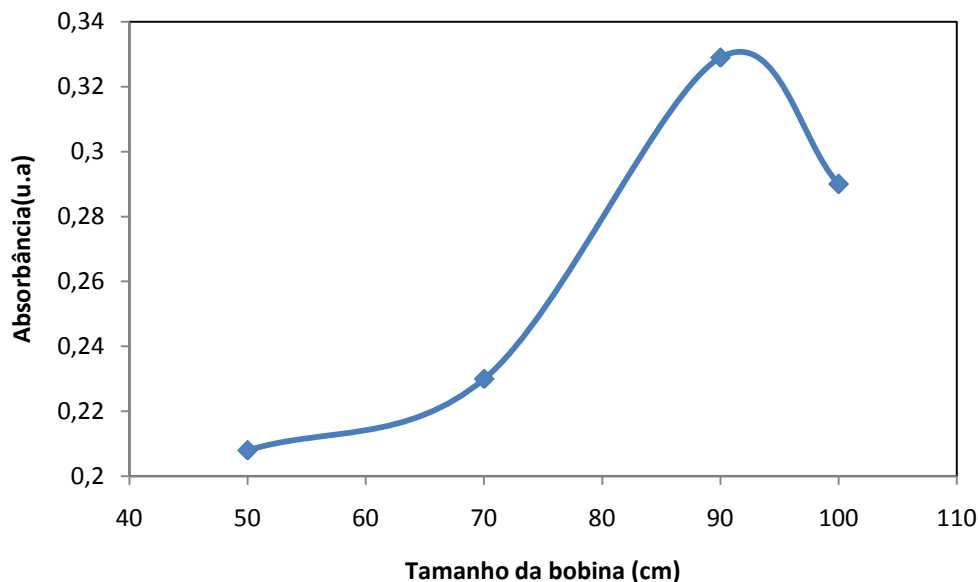


Figura 16 - Efeito do Tamanho da bobina de reação no sinal analítico de uma solução padrão de nitrito $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Medidas realizadas com reagente de Griess e transportador nas vazões de $4,3$ e $2,1 \text{ mL min}^{-1}$, respectivamente.

Estabelecidos os parâmetros do sistema em fluxo, bem como as concentrações dos reagentes empregados na determinação de nitrito e nitrato, avaliou-se qual a melhor relação da mistura reacional empregando-se o sistema de amostragem binária. Neste estudo avaliou-se o número de ciclos (3 a 7), em diferentes condições de volumes de reagentes (R) e amostra (A) para compor a mistura reacional. Nestes estudos, por exemplo, a combinação R + A corresponde a inserção de reagente R, pela abertura da Válvula V_4 durante 1s (no fluxo de $2,1 \text{ mL min}^{-1}$), onde um “plug” de reagente é introduzido na Bobina B_2 , na sequência a válvula V_4 se fecha e um “plug” de amostra é introduzido na Bobina B_2 durante 1s (a uma vazão de $4,3 \text{ mL min}^{-1}$). Estes ciclos foram repetidos de 3 a 7 vezes para compor a mistura reacional. Os rótulos 2R ou 2A correspondem ao tempo de abertura das válvulas (reagente (V_4) e/ou transportador (V_1)) em 2s. O volume de reagente (R) inserido na bobina (B_2), correspondente a 1 s de abertura da válvula V_4 , é de aproximadamente $35,0 \mu\text{L}$.

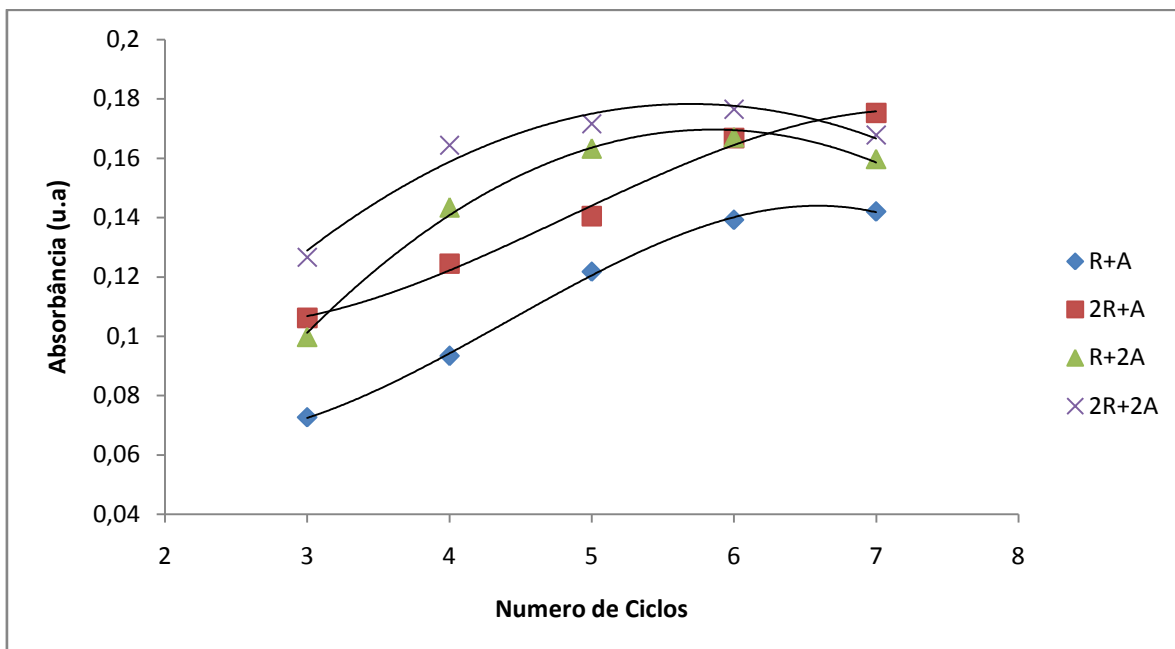


Figura 17 - Efeito do numero de ciclos em diversas condições de volume de reagente e amostra (R+A, 2R+A, R+2A e 2R + 2A) sobre o sinal analítico.

Nos estudos realizados observa-se (FIGURA 17) que para as combinações R+A e 2R+A há um aumento significativo do sinal analítico entre 3 a 6 ciclos, sendo que para a combinação R+2A, esse aumento é observado entre 3 a 5 ciclos. Já a combinação 2R+2A, não se observa diferença significativa no sinal analítico acima de 4 ciclos.

Uma boa relação entre a sensibilidade e consumo de reagentes por determinação foi estabelecido na combinação R+2A, com 5 ciclos. Nesta configuração a sensibilidade obtida é muito próxima a máxima encontrada nos experimentos (Ca. 93%), quando comparado com a configuração 2R+A em 7 ciclos. Entretanto, o consumo de reagente (Ca. 175,0 μ L) é 64% menor (Ca. 490,0 μ L de reagente em 2R+A em 7 ciclos). Assim, estabeleceu-se esta configuração nos estudos posteriores.

3.3.1.2 - Aspectos químicos

Para a determinação de nitrito e nitrato no procedimento foi empregado à reação de Griess (MOORCROFT, 2001), no caso do nitrato este é convertido a nitrito, empregando uma coluna de cádmio cobreado, antes da sua determinação.

Na reação de Griess o íon nitrito reage em meio ácido com a sulfanilamida formando um sal de diazônio que reage por acoplamento com o dicloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) formando um composto colorido.

Foi avaliado no reagente de Griess o efeito da concentração de ácido fosfórico sobre o sinal analítico. Neste estudo as concentrações de NED e sulfanilamida foram fixadas respectivamente em 0,1% e 2 %, enquanto a concentração do ácido fosfórico foi variada de 0,3 a 1,5 mol L⁻¹. O melhor valor para o sinal analítico foi encontrado utilizando reagente de Griess com ácido fosfórico na concentração de 0,5 mol L⁻¹.

Empregando planejamento do tipo composto central e a metodologia de superfície de resposta (BARROS NETO, 2010) foram avaliados o efeito da concentração do NED e da sulfanilamida sobre o sinal analítico.

A metodologia de superfície de resposta é constituída por duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície ou área de experimentação. A modelagem é feita ajustando modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia na forma mais pronunciada (BARROS NETO, 2010).

Os experimentos do planejamento composto central foram conduzidos de forma aleatória, afim de não serem introduzidos erros sistemáticos. As condições de realização e os valores de sinal (norma) obtidos nos ensaios do planejamento fatorial composto central estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Planejamento fatorial composto central nos estudos das variáveis; concentração de NED e Concentração de Sulfanilamida no sinal da norma.

Fatores	Níveis				
	NED % (m/v)	0,03	0,05	0,10	0,15
Sulfanilamida % (m/v)	1,3	1,5	2,0	2,5	2,7
Codificação	-1,41	-1	0	1	1,41

Exp.	Variáveis codificadas		Variáveis originais		Norma
	X ₁	X ₂	NED %(m/v)	Sulf.%(m/v)	
1	+1	+1	0,15	2,5	50
2	+1	-1	0,15	1,5	43
3	-1	+1	0,05	2,5	45
4	-1	-1	0,05	1,5	39
5	0	0	0,10	2,0	51
6	0	0	0,10	2,0	48
7	0	0	0,10	2,0	50
8	+1,414	0	0,17	2,0	48
9	-1,414	0	0,03	2,0	42
10	0	+1,414	0,10	2,7	48
11	0	-1,414	0,10	1,3	41

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância para avaliar a significância estatística e se houve ajuste do modelo aos dados experimentais. Esses resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise da Variância para ajuste do modelo quadrático $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_{11}X_1^2+b_{22}X_2^2+b_{12}X_1X_2$.

Fonte de variação	SQ	g.l	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	162,51	5	32,50		
Resíduo	6,40	5	1,28	25,41	5,0
Falta de ajustes	1,73	3	0,58		
Erro puro	4,67	2	2,33	0,25	19,1
Total	168,91	10			
% Variância explicada 96,21%					
% Máxima variância explicável 97,24%					
Equação de regressão: Norma = 49,67 + 2,19NED – 2,46(NED) ² + 2,86(Sulf.) – 2,71(Sulf.) ² + 0,25(NED)(Sulf.)					

SQ=Soma quadrática, g.l= Graus de liberdade e MQ=Média quadrática.

Segundo Box e Wetz (1973), para que uma regressão não seja apenas significativa, mas também útil para previsões de respostas, devem ser observados dois critérios na Tabela de variância obtida:

1º. critério: o valor da razão, MQ da regressão / MQ do resíduo (F calculado), deve ser no mínimo cinco (5) vezes o valor do F tabelado, para os graus de liberdade envolvidos;

2º. critério: o valor da razão, MQ da falta de ajuste / MQ do erro puro (F calculado), deve ser menor que o valor do F tabelado, para os graus de liberdade envolvidos.

Com os resultados da análise de variância (TABELA 5), verifica-se que o valor de razão MQ da regressão/ MQ Resíduo (F calculado = 25,41) foi mais de cinco vezes maior que o valor de $F_{5,5}$ tabelado (5,0) evidenciando com 95 % de confiança que, segundo o critério de Box e Wetz que, a regressão foi significativa. O valor da razão MQ da falta de ajuste/ MQ do erro puro (F calculado= 0,25) foi menor do que o valor de $F_{3,2}$ tabelado (19,1) evidenciando também, com 95 % de confiança, ajuste do modelo aos dados experimentais. Deste modo, a equação do modelo quadrático é capaz de prever com segurança o valor do sinal analítico (Norma) nas condições

experimentais para concentrações de NED e Sulfanilamida.

O gráfico das repostas previstas pelo modelo quadrático contra as repostas observadas na Figura 18 confirma visualmente a qualidade do ajuste.

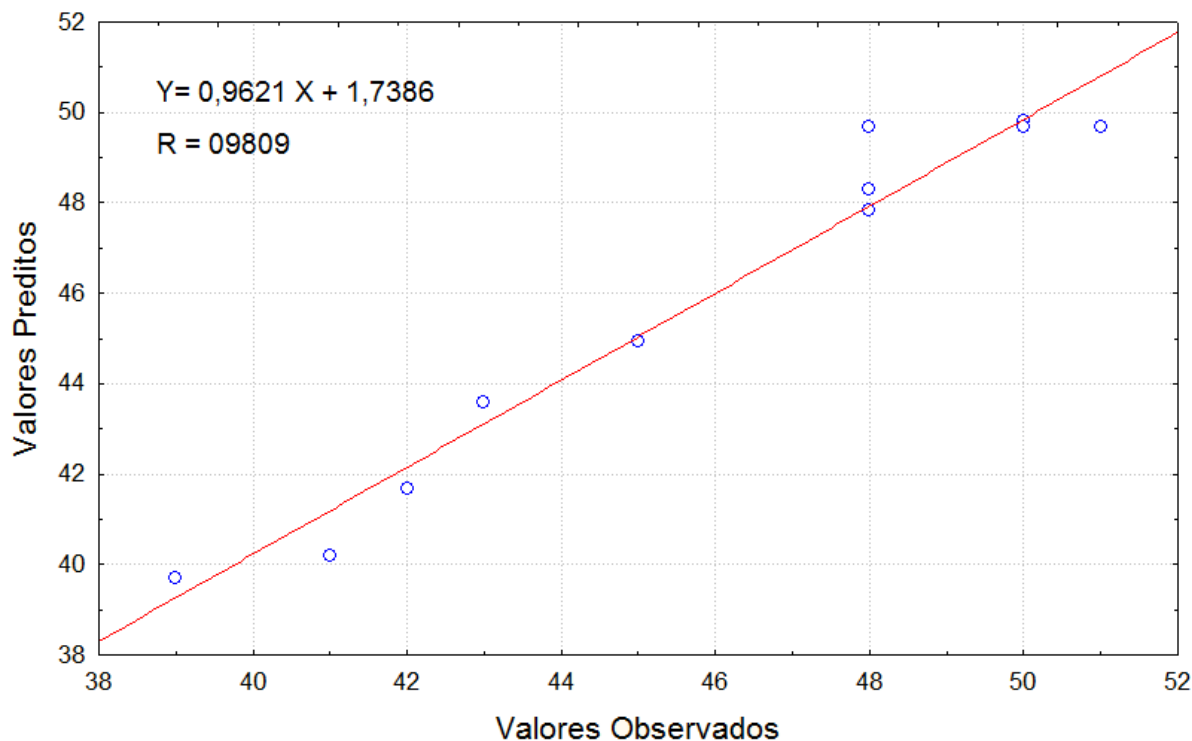


Figura 18 - Respostas previstas pelo modelo quadrático.

A superfície de resposta correspondente ao modelo ajustado é apresentada na Figura 19. A região contém um ponto de máximo (x_1 , x_2) correspondente às concentrações de 0,12% (m/v) de NED e 2,3% de sulfanilamida. Nessas concentrações de NED e Sulfanilamida é possível obter um maior sinal analítico na reação do nitrito com o reagente de Griess.

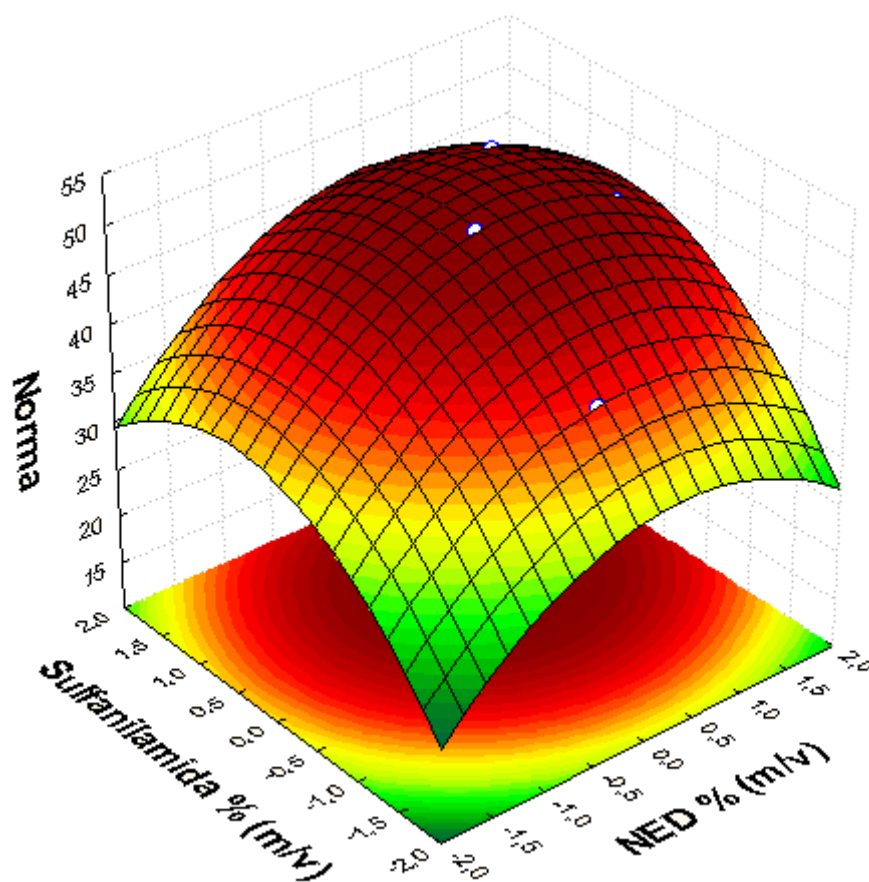


Figura 19 - Superfície de resposta descrita pela equação $\text{Norma} = 49,67 + 2,19\text{NED} - 2,46(\text{NED})^2 + 2,86(\text{Sulf.}) - 2,71(\text{Sulf.})^2 + 0,25(\text{NED})(\text{Sulf.})$, que relaciona a concentração do NED(% , m/v) e da Sulfanilamida (% , m/v) com o sinal analítico (Norma).

Apesar da reação de Griess ocorrer em meio ácido, a redução de nitrato a nitrito na coluna de cádmio cobreado ocorre em meio moderadamente alcalino, sendo necessário o ajuste de pH da zona de amostra antes da passagem pela coluna redutora. Com essa finalidade foi utilizada uma solução tampão de tetraborato ($1,32 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) com EDTA ($2,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). A presença do EDTA na solução tampão também tem a função de mascarar alguns íons como Fe (III) e Cu (II) que podem interferir na redução de nitrato a nitrito, além de evitar a formação de precipitados que poderiam diminuir a atividade da coluna redutora (ROCHA, 2000).

Utilizando o sistema em fluxo estudou-se o efeito do pH no intervalo de 6,9 a 8,5 sobre o sinal analítico na redução a nitrito de uma solução padrão de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato (FIGURA 20).

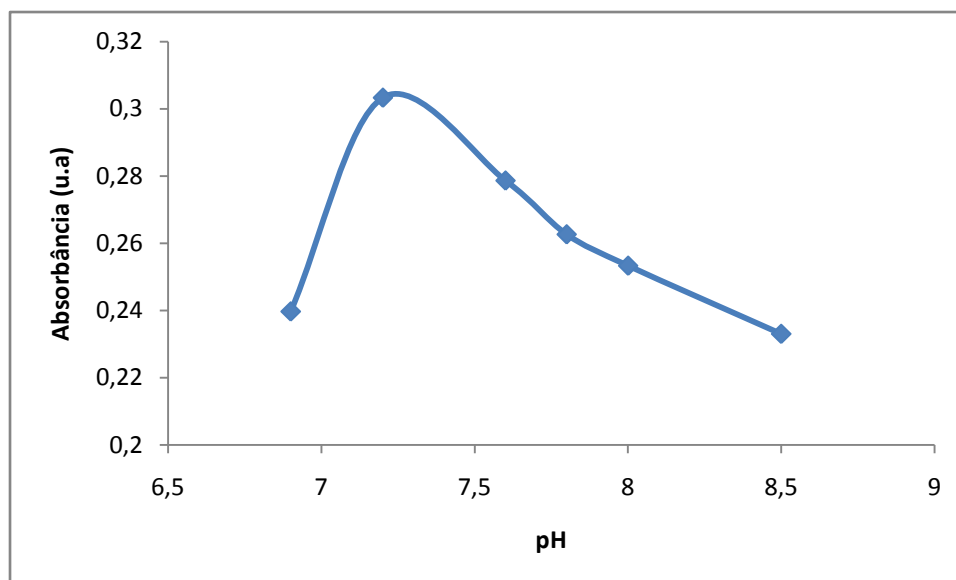


Figura 20 - Efeito da acidez da solução transportadora sobre a redução de nitrato a nitrito

O maior sinal analítico foi obtido quando o pH empregado foi de 7,2, (FIGURA 20). Em pH 7,6 houve uma diminuição de ca. 8% do sinal analítico, estes resultados foram similares àqueles obtidos em trabalho da literatura (ROCHA e REIS, 2000). O ajuste da acidez foi satisfatório sem a necessidade de adicionar um reator tubular (intercalar amostra e solução tampão) previamente a coluna de cádmio, provavelmente deve-se ao fato da coluna empacotada estar atuando para melhorar a mistura entre a amostra e transportador. Desta forma, selecionou-se o pH 7,2 da solução transportador (Solução tampão: $1,32 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ e $2,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2EDTA) nos experimentos posteriores.

A eficiência de redução do nitrato pela coluna redutora esta relacionada a vários fatores dentre estes podemos citar a área superficial dos grânulos de cádmio (NYDAHL, 1976; JONES, 1984; HYDES e HILL, 1985), o empacotamento da coluna, a cinética de redução que por sua vez esta correlacionada com o tempo de residência da amostra na coluna (NYDAHL, 1976)

Foi avaliada a eficiência de redução de nitrato na coluna utilizada no sistema em fluxo. Neste estudo soluções padrões de nitrato e nitrito, ambas nas concentrações de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, foram utilizadas, onde foi possível verificar uma

eficiência de redução de 35,8% para o nitrato, nas condições experimentais avaliadas.

Outro estudo realizado foi a avaliação da estabilidade da coluna (eficiência após sucessivas reduções). Neste estudo foi monitorada a diminuição na resposta analítica, após a realização de 100 determinações empregando-se 20 amostras de águas naturais fortificadas com 1,0 mg L⁻¹ e 10,0 mg L⁻¹ de nitrato, respectivamente.

Conforme apresentado na Figura 21, em amostras contendo nitrato na concentração de 1,0 mg L⁻¹ (FIGURA 21 - A) após 100 determinações a magnitude do sinal analítico decresceu em 6%. Já quando a coluna foi utilizada na análise de nitrato com concentrações em torno de 10,0 mg L⁻¹ (FIGURA 21 - B) de nitrato, após 20 determinações ocorreu uma diminuição de 4% da magnitude do sinal analítico inicial e, após 50 determinações observou-se uma diminuição de 57% do sinal inicial.

Neste sentido, recomenda-se que para cada série de 20 determinações (perda de mais de 5% do sinal) seja realizada uma etapa de recondicionamento da coluna com HCl 0,1 mol L⁻¹ e posteriormente recalibração com soluções padrões de nitrato (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

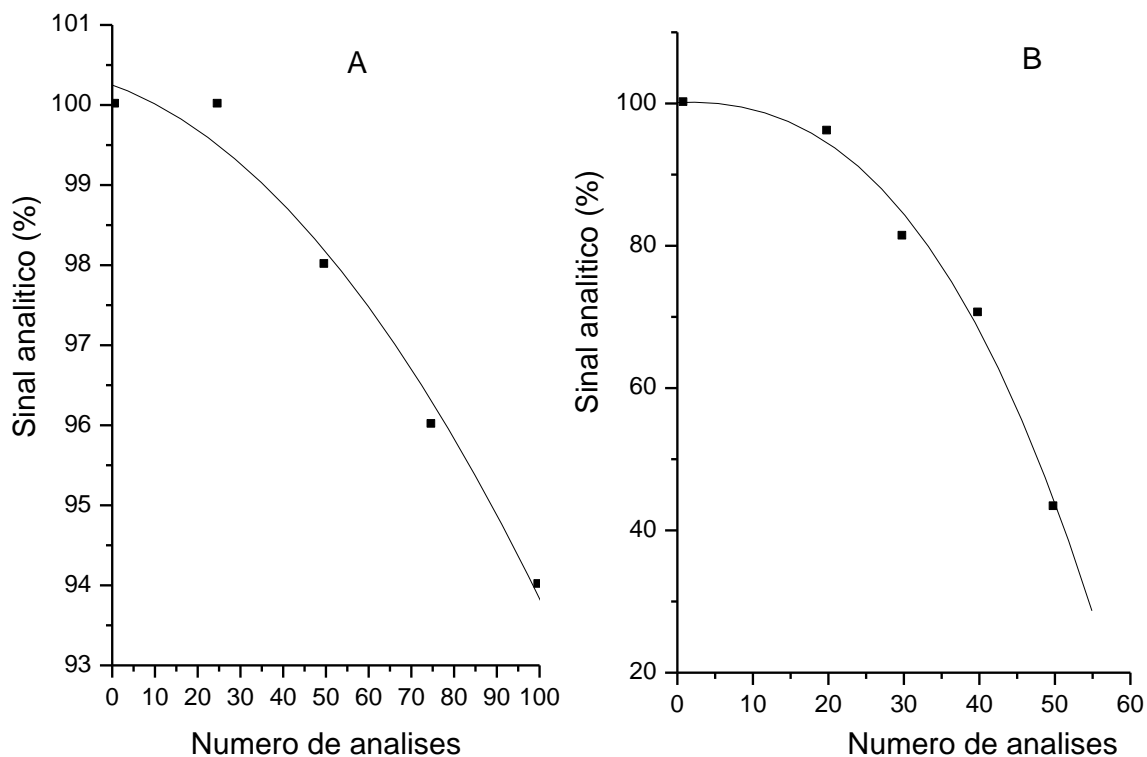


Figura 21 - Diminuição da resposta analítica após análises de amostras de água fortificadas com 1,0 mg L⁻¹ (A) e 10,0 mg L⁻¹ (B) de nitrato.

Após estabelecer as condições ótimas dos parâmetros físico-químicos do sistema em fluxo (TABELA 6), foi avaliado o desempenho do método proposto em termos de linearidade, limites de detecção e quantificação bem como estudos de adição e recuperação em amostras de águas subterrâneas e a determinação destas espécies nas amostras.

Tabela 6 - Parâmetros estudados na otimização do sistema em fluxo para determinação de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-).

Parâmetro	Avaliada	Selecionada
pH Solução Tampão	6,0-8,5	7,2
Sulfanilamida (%%, m/v)	1,3-2,7	2,3
NED (%%, m/v)	0,03-0,17	0,12
Ácido fosfórico (mol L^{-1})	0,3-1,5	0,5
Bobina de reação (cm)	50-100	90
Fluxo Carregador (mL min^{-1})	3,1-6,6	4,3
Numero de ciclos (R+2A)	3-7	5

3.3.2 - Características analíticas do sistema

Nas Figuras 22-B e 23-B são apresentadas curvas analíticas obtidas para as soluções de referência de nitrato e nitrito. As condições utilizadas para obtenção das curvas analíticas estão apresentadas na Tabela 6. A curva analítica obtida, nas concentrações de 0,2 a 2,0 mg L^{-1} para nitrito, seguiu um comportamento linear descrito pela equação: Norma do vetor (IIvII) = $-0,647 + 111,912$ [nitrito], $R^2 = 0,9956$. Para nitrato, a linearidade obtida foi entre 1,0 a 10,0 mg L^{-1} de nitrato descrito pela equação Norma do vetor (IIvII) = $-16,202 + 19,995$ [nitrato], $R^2 = 0,9944$.

Nas condições otimizadas, os coeficientes de variação (RSD) foram estimados em 0,62% e 1,34% para 10 medidas, correspondente a soluções de 0,6 mg L^{-1} de nitrito e 6,0 mg L^{-1} de nitrato, respectivamente. Os sinais transientes obtidos para as concentrações crescentes de nitrito e nitrato são apresentados nas Figuras 22-A e 23-A, respectivamente.

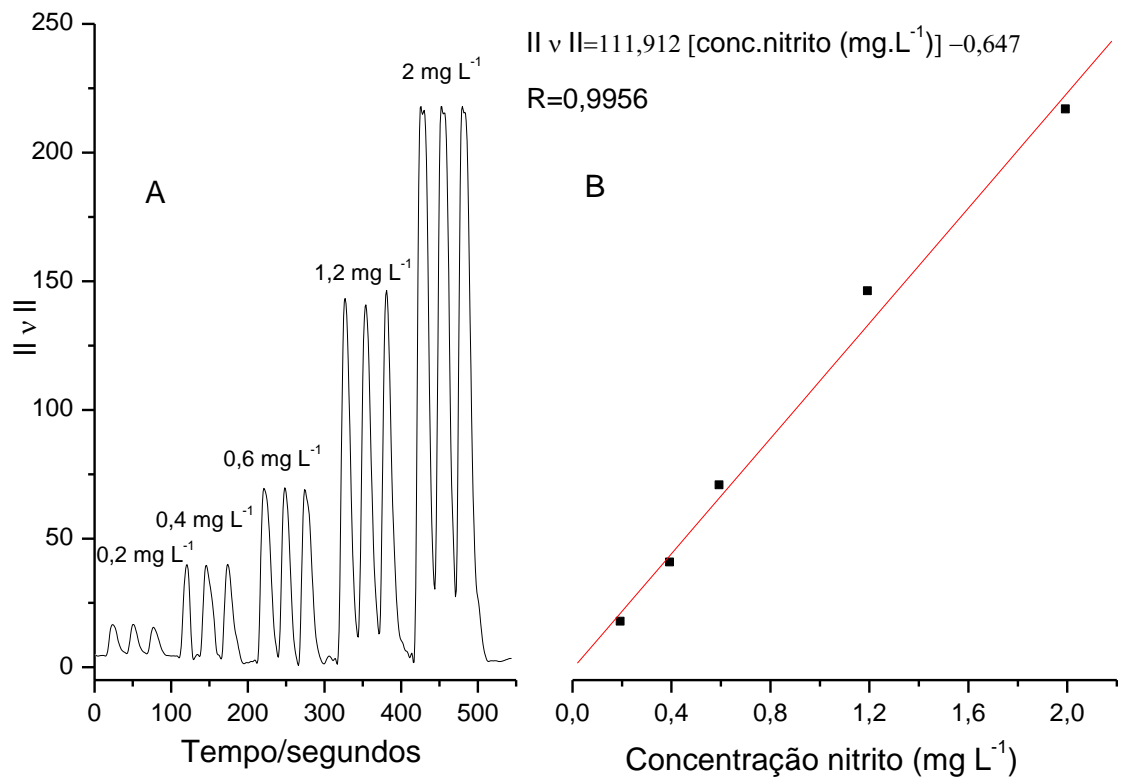


Figura 22 - Curva analítica (B) obtida para determinação de nitrito empregando webcam e imagens digitais com o sinal transiente correspondente (A).

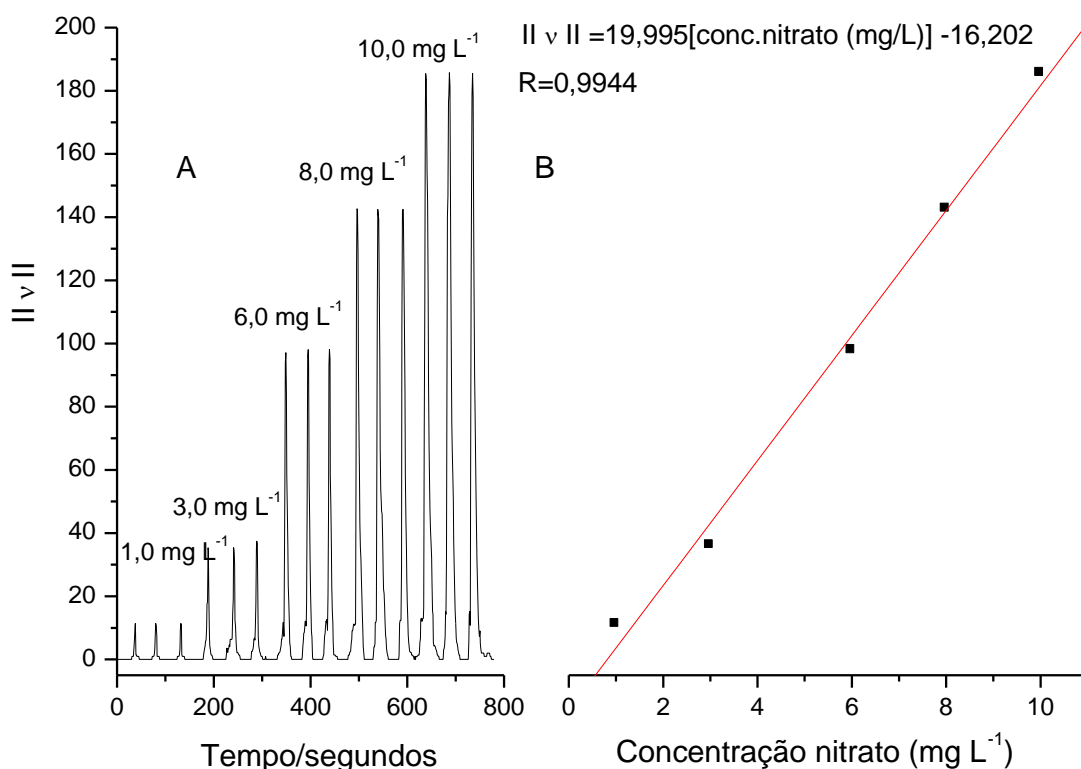


Figura 23 - Curva analítica (B) obtida para determinação de nitrato empregando webcam e imagens digitais com o sinal transiente correspondente (A).

Segundo as recomendações da IUPAC (THOMPSON, 2002), o cálculo do limite de detecção se baseia no desvio padrão do branco (valores de RGB de 25 imagens do branco). Com base nestas informações, os limites de detecção estimados foram de 0,014 mg L⁻¹ e 0,042 mg L⁻¹ para nitrito e nitrato respectivamente.

As frequências analíticas estimadas para o nitrito e nitrato foram de 103 e 80 determinações por hora respectivamente. As características analíticas do procedimento proposto são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Características analíticas do método proposto

Parâmetros	Nitrito	Nitrato
Faixa linear de trabalho (mg L ⁻¹)	0,2-2,0	1,0-10,0
Coefficiente de regressão	0,9956	0,9944
Limite de detecção (mg L ⁻¹)	0,014	0,042
Limite de quantificação (mg L ⁻¹)	0,045	0,252
Repetibilidade (% RSD)	0,62	1,34
Frequência Analítica (amostra/h)	103	80

Depois de descritas as figuras de mérito do procedimento, este foi empregado na análise de nitrito e nitrato em amostras de água subterrânea de poços do município de Barreiras–BA. Inicialmente, foi realizado um estudo de recuperação de nitrito e nitrato nestas amostras. Nestes estudos, três concentrações diferentes de nitrito e nitrato (0,6, 1,2 e 1,6 mg L⁻¹ de nitrito e 3,0, 6,0 e 8,0 mg L⁻¹ de nitrato) foram adicionadas nas amostras de águas e os resultados obtidos (descontados originalmente daqueles presentes na amostra sem a adição do analito) foram comparados com as concentrações adicionadas. Os resultados das recuperações obtidas são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos na determinação de nitrito e nitrato em amostra de água subterrânea pelo método proposto e pelo método de referência.

Amostra	Nitrito Add (mg/L)	Método Referência*		Método proposto		Erro (%)
		Enc. (mg/L)	Rec.(%)	Enc. (mg/L)	Rec. (%)	
Água subterrânea	1,60	1,56±0,01	97,50	1,55±0,03	96,90	-0,64
	1,20	1,24±0,01	103,33	1,31±0,03	109,17	5,64
	0,60	0,60±0,01	99,50	0,60±0,01	100,00	0
	Nitrato Add (mg/L)	Método Referência**		Método proposto		Erro (%)
		Enc. (mg/L)	Rec.(%)	Enc. (mg/L)	Rec. (%)	
		8,0	8,32±0,12	104,00	8,25±0,14	103,12
	6,0	6,00±0,18	100,00	6,11±0,11	101,83	1,83
	3,0	2,98±0,07	99,47	3,00±0,16	100,00	0,67

Add = adicionado; Enc = Encontrado (Média+IC 95%); Rec = Recuperado, * Método NBR 12619, ** APHA 4500-NO3-I.

Analisando-se os resultados obtidos, estes apresentaram recuperações entre 96,9% a 109,2% para nitrito e 100,0% a 103,2% para nitrato, estes valores de recuperações, foram muito semelhantes àqueles obtidos pelos métodos de referência NBR 12619 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1992) e APHA 4500-NO3-I (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005). Assim o procedimento proposto foi utilizado na determinação de nitrito e nitrato em amostras de água subterrânea empregando curvas de calibração com padrões.

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos da determinação de nitrito e nitrato nas amostras de água subterrânea, empregando-se o procedimento proposto e os métodos de referência NBR 12619 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1992) e APHA *Method* 4500-NO3-I (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Tabela 9 - Resultados obtidos na determinação de nitrito e nitrato em amostras de águas subterrâneas empregando o método em fluxo proposto e métodos de referência.

Amostra	Nitrito (mg-N/L)		Erro (%)	Nitrato (mg-N/L)		Erro (%)
	Método Proposto	Método Referência*		Método Proposto	Método Referência**	
1	0,16±0,02	0,15±0,01	6,67	1,93±0,03	1,95±0,01	-1,02
2	0,10±0,01	0,10±0,01	0,00	0,51±0,01	0,53±0,01	-3,77
3	0,12±0,02	0,13±0,01	-7,69	0,63±0,01	0,65±0,01	-3,08
4	0,18±0,01	0,19±0,01	-5,26	1,05±0,02	1,09±0,03	-3,67
5	0,09±0,01	0,10±0,01	-10,00	1,24±0,02	1,22±0,02	1,64
6	0,06±0,01	0,07±0,01	-14,29	1,47±0,02	1,48±0,04	-0,67

Media ± IC 95%%; * NBR 12619, ** APHA 4500-NO3-I.

Correlacionando os dados obtidos nas determinações pelo método proposto com os obtidos pelo método de referência (FIGURA 24), apresentam coeficiente de correlação linear para o nitrito e para o nitrato de 0,983 e 0,999, respectivamente.

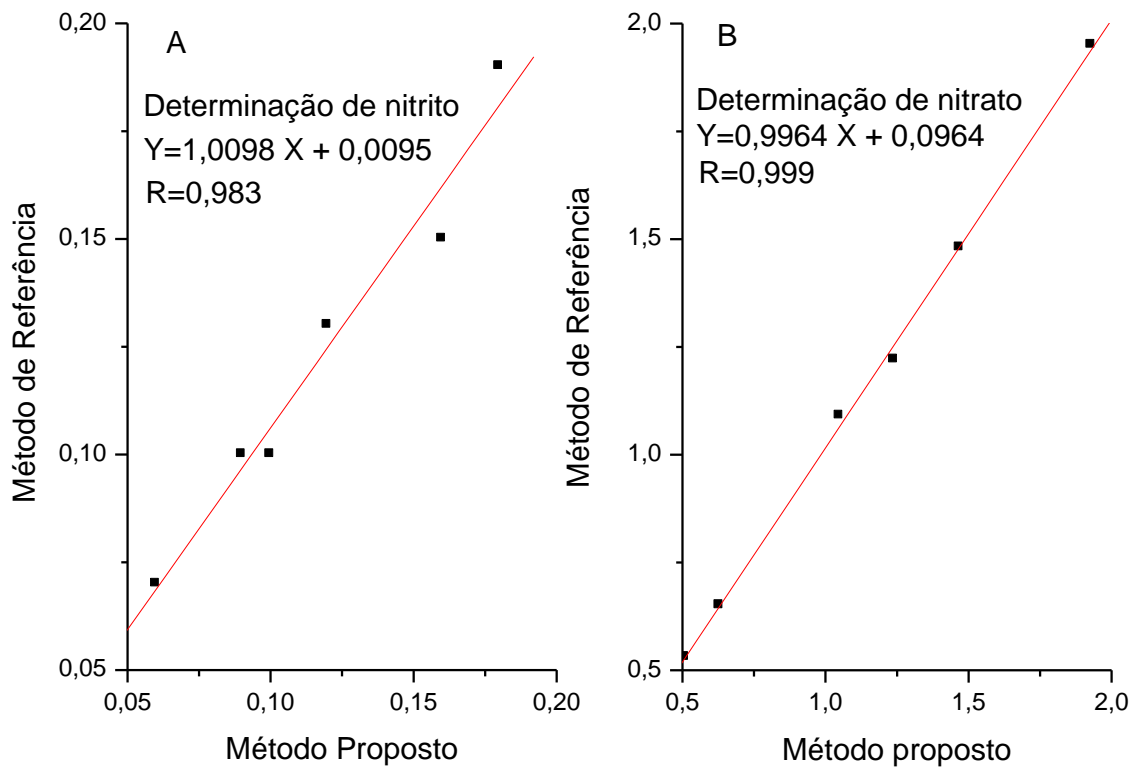


Figura 24- Correlação entre os dados na determinação de nitrito (A) e nitrato (B) pelo método proposto e pelos métodos de referência.

Os resultados encontrados com o método proposto foram comparados com os do método de referência. Utilizando o teste t pareado verificou-se que, para os resultados de nitrato $t=-1,86$ é maior que $t_{\text{crít}}=-2,57$ e para o nitrito $t=-1,46$ é maior que $t_{\text{crít}}=-2,57$, com o nível de confiança de 95% e 5 (n-1) graus de liberdade, a hipótese nula é aceita e os resultados encontrados pelo método proposto não se diferem significativamente dos encontrados pelos métodos de referência.

Na análise dos resultados obtidos dos teores de nitrito e nitrato, encontrado nas amostras de água subterrânea da cidade de Barreiras-Ba demonstraram que estão abaixo do limite máximo estabelecido na resolução nº 396/ 2008 do CONAMA (BRASIL, 2008). No entanto, esses valores não são os esperados (traços) para águas subterrâneas onde não tenha fonte de contaminação (JOHNSON e KROSS, 1990). Os valores de nitrito e nitrato encontrados na cidade de Barreiras-Ba se

devem, provavelmente, ao fato da insuficiência do sistema de esgotamento sanitário desta cidade e a utilização de fossa séptica pela maioria da população.

As figuras de mérito obtidas no procedimento proposto foram comparadas a outros procedimentos em fluxo com redução de nitrato a nitrito por coluna cádmio cobreado reportados na literatura (AHMED, 1996; ROCHA e REIS, 2000; PASQUALI, 2010; AYALA, 2012) e, são apresentados na Tabela 10.

De um modo geral os limites de detecção apresentado pelo método proposto foram maiores quando comparados com dos métodos da literatura, isso se deve provavelmente a menor sensibilidade associada ao detector da *webcam* em relação aos detectores utilizados nos espectrofotômetros.

Com relação à frequência de amostragem, estas foram superiores (103 para nitrito e 80 para nitrato) aquelas apresentadas em outros procedimentos. A magnitude da faixa linear de trabalho é em geral maior quando comparada com aqueles obtidos em outros procedimentos, entretanto a sensibilidade nos outros procedimentos que empregaram detecção fotométrica foram superiores. Mesmo apresentando menor sensibilidade, a ampla faixa linear permite a determinação destas espécies a um nível de concentração inferior aqueles estabelecidos para a determinação destas espécies em amostras de água subterrânea (BRASIL, 2008).

O procedimento proposto mostrou-se compatível e adequado quando aplicado no monitoramento dos níveis legais de nitrito e nitrato em água. O consumo de reagente Griess por determinação foi baixo (Ca. 175 μ L), demonstrando que, do ponto de vista ambiental, o método proposto é apropriado. Além disso, quando comparado aos tradicionais métodos espectrofotométricos, o método proposto possui atributos interessantes como simplicidade de detecção, utilização de equipamentos compactos e de baixo custo.

Tabela 10 - Comparação das características analíticas do método proposto com às de alguns métodos da literatura.

Referência	Matriz	Detec.	Frequência Analítica*	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Faixa (mg L^{-1})
Método proposto	Água	Cam	103-NO ₂ ⁻ 80-NO ₃ ⁻	14-NO ₂ ⁻ 42-NO ₃ ⁻	0,62 1,34	0,2-2,0-NO ₂ ⁻ 1,0-10,0-NO ₃ ⁻
(AYALA, 2012)	Água	Vis	15-NO ₂ ⁻ 12-NO ₃ ⁻	2 -NO ₂ ⁻ 20-NO ₃ ⁻	3,39 4,76	0,01-0,42-NO ₂ ⁻ 0,14-1,82-NO ₃ ⁻
(PASQUALI, 2010)	Solos	Vis	35-40	22-NO ₂ ⁻ 44-NO ₃ ⁻	0,96 1,02	0,05 -1,6-NO ₂ ⁻ 0,05 -7,0 -NO ₃ ⁻
(ROCHA e REIS, 2000)	Água	LED	60	5-NO ₂ ⁻ 15-NO ₃ ⁻	0,32 0,42	0,025 -1,0-NO ₂ ⁻ 0,1 -5,0 -NO ₃ ⁻
(AHMED, 1996)	Água, Alimentos e solos	Vis	30	1-NO ₂ ⁻ 10-NO ₃ ⁻	<2,0 <2,0	0,01 -2,2 -NO ₂ ⁻ 0,1 -3,5 -NO ₃ ⁻

Detec = detector, cam = webcam; vis = Espectrofotômetro - Vis; LD = limite de detecção; RSD (%) = reprodutibilidade; * determinação por hora

3.4 - CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível observar que o emprego da *webcam* como detector nas análises de espécies químicas por métodos colorimétricos pode ser uma alternativa ao uso do espectrofotômetros. Além disso, por ser a *webcam* um equipamento de custo relativamente baixo, do ponto de vista econômico metodologias com esse tipo de sistema de detecção pode ser muito atraente quando aplicados em análises de rotina.

O uso de sistemas em fluxo associados à detecção por imagens digitais mostrou ser uma estratégia viável na quantificação de nitrito e nitrato devido a sua simplicidade, rapidez e precisão. Sendo ainda mais interessante, quando é empregado o processo de amostragem binária que minimiza o consumo de reagente e a geração de resíduos.

Os resultados encontrados para os teores de nitrito e nitrato em amostras de água subterrânea pelo método proposto foram abaixo dos limites máximos permitidos e compatíveis com os resultados encontrados pelas metodologias de referência. Desse modo, o método proposto nesse trabalho se mostrou adequado para determinações de nitrito e nitrato em amostras de águas naturais.

Apesar dos resultados encontrados para nitrito e nitrato nos poços da cidade de Barreiras-Ba terem sido abaixo dos limites legais, ainda são considerados altos em relação ao que se espera para águas subterrâneas, apontando com isso a necessidade de um sistema de esgotamento sanitário eficiente que atenda as demandas da população.

CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO DE NITRITO EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUBTERRÂNEA E EM AMOSTRA DE SALSICHAS EMPREGANDO SPOT TEST E IMAGENS DIGITAIS

4.1 - INTRODUÇÃO

Há muito tempo a indústria alimentícia vem utilizando os íons nitrito e nitrato em produtos cárneos. A ação antimicrobiana e a eficiência desses íons na preservação de derivados de carne são conhecidas há séculos (SEBRANEK e BACUS, 2007). Nesses produtos, os sais desses íons tem a finalidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, como o *Clostridium Botulinum*, além de retardar a oxidação lipídica, conferir sabor e coloração rósea pela formação da nitrosomioglobina (GREVER e RUITER, 2001).

Embora seja muito importante o emprego de nitrito e nitrato como aditivo alimentar, especialmente para o caso do nitrito, estudos científicos assinalam os problemas de saúde provocados pela ingestão excessiva desse íon. Dentre os problemas, o que mais se destaca, principalmente em lactantes, é a metahemoglobinemia. Entretanto, outras doenças como câncer de estômago também pode ser associado à ingestão de nitrito (NASCIMENTO, 2008).

Através do consumo de água de abastecimento contaminada, a população também pode estar ingerindo íons nitrito de forma indiscriminada. Normalmente a contaminação da água é decorrente do uso descontrolado de fertilizantes inorgânicos associados à má gestão do recurso hídrico e a poluição por esgotos domésticos.

Tendo em vista os possíveis aspectos toxicológicos causados pela ingestão de nitrito, no Brasil os níveis de nitrito permitidos para água subterrânea e para produtos cárneos são de 1,0 mg-N L⁻¹ e 150 mg Kg⁻¹ respectivamente (BRASIL, 2008; BRASIL, 1999).

Determinações quantitativas de nitrito é uma forma de assegurar se os teores desse composto em amostras de água e alimentos estão enquadrados dentro ou não dos níveis estabelecidos pelas resoluções legais. Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos, bem como várias técnicas analíticas têm sido empregadas com essa finalidade (MOORCROFT, 2001).

Os métodos espectrofotométricos na região do visível, utilizando a reação de Griess para formação do produto colorido, são os mais vastamente empregados na quantificação de nitrito (MOORCROFT, 2001).

Como muito dos métodos para determinação de nitrito o consumo de reagentes e amostra é relativamente alto e envolvem equipamentos com dimensões que impossibilitam sua aplicação “*in situ*”, em determinados casos, uma alternativa simples pode ser o uso de *spot test* quantitativos (KISO, 2006; LUIZ, 2012).

A aplicação de *spot test* em determinações quantitativas não é muito comum, devido às dificuldades na obtenção de medidas com precisão e exatidão aceitáveis, sendo aplicados mais frequentemente em análises qualitativas e semi quantitativas. Entretanto, alguns trabalhos com propostas de métodos baseados em *spot test* quantitativos têm sido reportados na literatura (TUBINO, 1997; GHAUCH, 1999; KOMPANY-ZAREH, 2002; PACIORNIK, 2006).

Nesse trabalho foi desenvolvido um *spot test* baseado na reação de Griess para determinação de nitrito em amostras de água e salsicha. A quantificação dos teores de nitrito foi realizada pela análise das imagens digitais do *spot test* obtidos por um *scanner* de mesa.

4.2 - EXPERIMENTAL

4.2.1 - Preparo de reagentes e soluções

Na determinação dos íons nitrito foi utilizado o reagente de Griess (2,3 % de sulfanilamida e 0,12 % de NED em ácido fosfórico 0,5 mol L⁻¹) como reagente cromogênico, e este foi preparado pesando-se em becker de 50 mL uma massa de 1,15 g de sulfanilamida P.A da marca Vetec e 0,06 g de NED (N-(1-nafitil)etilenodiamina) P.A da marca J.T. Baker., em seguida foi adicionado ao becker 30 mL de água destilada e 5 mL de ácido clorídrico P.A . A dissolução foi realizada com agitação e aquecimento em chapa à aproximadamente 50°C. Depois de resfriada em temperatura ambiente, a solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com água deionizada.

A solução estoque de nitrito foi preparada pesando-se em Becker uma massa de 0,075 g de sal de nitrito de sódio P.A da marca Vetec, previamente seco em estufa a 110°C por 2 horas e armazenados em dissecador, depois foi adicionado aproximadamente 20 mL de água destilada e sob agitação manual a massa foi diluída. Em seguida a solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e avolumada com água deionizada.

Na construção da curva analítica para determinação do íon nitrito foram preparadas soluções padrões 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 3,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹ de nitrito a partir da diluição da solução estoque de nitrito 1000 mg L⁻¹.

Na extração de nitrito em amostras de salsichas foi utilizada solução de tetraborato de sódio deca hidratado 5% (m/v.) A qual foi preparada dissolvendo 2,5 g de Na₂B₄O₇.10H₂O P.A da marca Vetec em água deionizada e completando o volume em balão volumétrico de 50 mL.

A solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado 0,25 mol L⁻¹ foi preparado dissolvendo uma massa de 5,28 g de K₄Fe(CN)₆.3H₂O P.A da marca Vetec em água

deionizada e completando o volume em balão volumétrico de 50 mL.

Na clarificação do extrato foi utilizada a solução de acetato de zinco di-hidratado $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, a qual foi preparada dissolvendo 10,98 g de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.A da marca Vetec em 30 mL de água deionizada, depois foi completado o volume em balão volumétrico de 50 mL.

4.2.2 - Procedimento para extração de nitrito em amostras de salsichas

A extração de nitrito em amostras de salsichas foi realizada segundo método proposto pelo Instituto Adolfo Lutz (2005). Seguindo este método, foi pesado em um Becker, massas de aproximadamente 5,0 g de amostra de salsicha previamente triturada e homogeneizada em liquidificador doméstico. Depois, foi adicionado 2,5 mL de solução de tetraborato de sódio 5% (m/v) e homogeneizado com auxílio de um bastão de vidro. A esta mistura foi acrescentado 50,0 mL de água deionizada aquecida a 80°C . Com frequente agitação a mistura foi mantida aquecida em banho maria por um período de 15 minutos.

Após o resfriamento, a mistura foi transferida quantitativamente para um balão de 100 mL. Então, foi adicionado ao balão 2,5 mL de ferrocianeto de potássio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e 2,5 mL de acetato de zinco $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, depois o balão foi avolumado com água deionizada. A mistura foi deixada em repouso durante 30 min e depois foi filtrado à vácuo em funil de buchner com papel de filtro quantitativo nº 42 Whatman.

Foi realizado um branco, sem a massa de salsicha, seguindo o mesmo procedimento.

4.2.3 - Procedimento para amostragem de águas subterrâneas.

O procedimento de amostragem da água subterrânea foi realizado segundo a norma 6410 da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 1998), conforme descrito no capítulo 3 (seção 3.2.4, p. 61- 62).

4.2.4 - Spot Test para determinação de nitrito

O *Spot test* foi construído empregando-se placas retangulares hidrofílicas (plástico maleável ppp) nas dimensões de 4 cm x 3 cm. Nestas placas foram realizados furos circulares de 5,0 mm de diâmetro, onde foi preenchido posteriormente com papel de filtro quantitativo Whatman nº 42 de mesma dimensão do furo (FIGURA 25).

A determinação de nitrito no *spot test*, foi baseada na reação de Griess, onde o nitrito reage com a sulfanilamida e dicloreto de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha intensa.

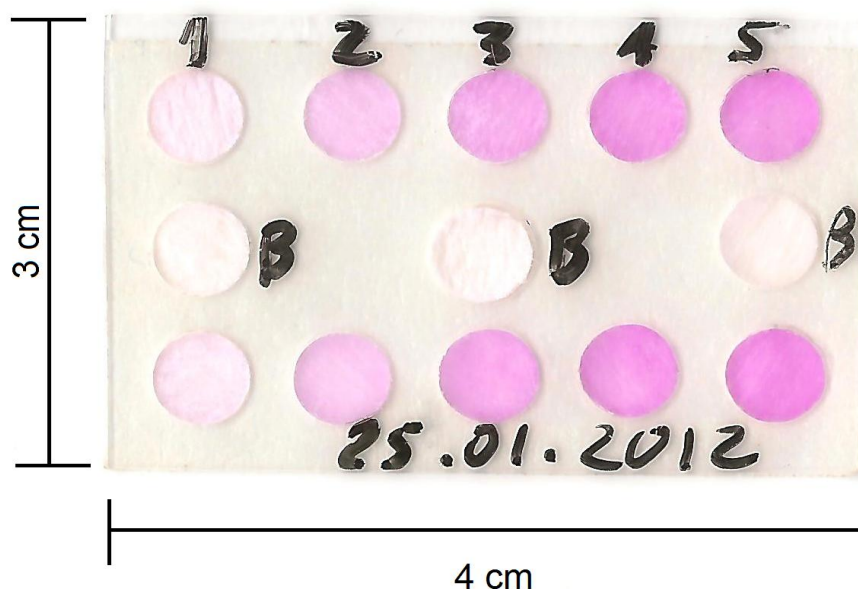


Figura 25-Imagem do *spot test* para determinação de nitrito

Para a adição de reagente e/ou padrões e amostras no *spot test* foi utilizado uma micro seringa de vidro da marca Hamilton, onde 5,0 μL de reagente de Griess e 5,0 μL de padrões e/ou amostras foram adicionados no centro da zona circular (reacional) do dispositivo. Depois, a reação no *spot test* se processou a temperatura ambiente por 30 min, antes da obtenção das imagens, que foram realizadas com o auxílio de um *scanner* de mesa da marca HP Photosmart C5280. As imagens digitalizadas foram salvas em arquivos na extensão JPG, para posterior análise em software adequado.

Os métodos comparativos empregados para às análises de nitrito em amostras de água e alimentos foram respectivamente a norma NBR 12619 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1992) e a norma do Instituto Adolfo Lutz (2005), que também empregam a reação de Griess, mas com detecção espectrofotométrica. Neste caso a absorbância da reação foi monitorada com o auxílio de um espectrofotômetro FEMTO modelo 800XI em 543 nm.

4.2.5 - Tratamentos das imagens digitais e obtenção do sinal analítico

Para a obtenção do sinal analítico a partir das imagens do *spot test*, na determinação de nitrito, o *scanner* foi configurado para aquisição de imagens digitais de 24 bits com resolução de 600 dpi e o arquivo obtido foi salvo na extensão JPG. Posteriormente o arquivo JPG foi aberto no *software image j*.

Empregando a ferramenta *oval selection* da caixa de ferramentas do *image j* foi selecionado uma área de 11316 pixel² da imagem que corresponde a zona de reação do *spot test*. Os valores de RGB da área selecionada foram extraídos utilizando o *plugin measure RGB and set label* (ANEXO1). Esse plugin foi criado pela modificação nos códigos fonte dos *plugins measure and set label* e *measure RGB*, ambos criados por Wayne Rasband. Os resultados foram salvos na extensão *txt*.

A figura 26 apresenta a interface do programa *image j* com o usuário, bem como a obtenção dos valores de RGB da imagem do *spot test*.

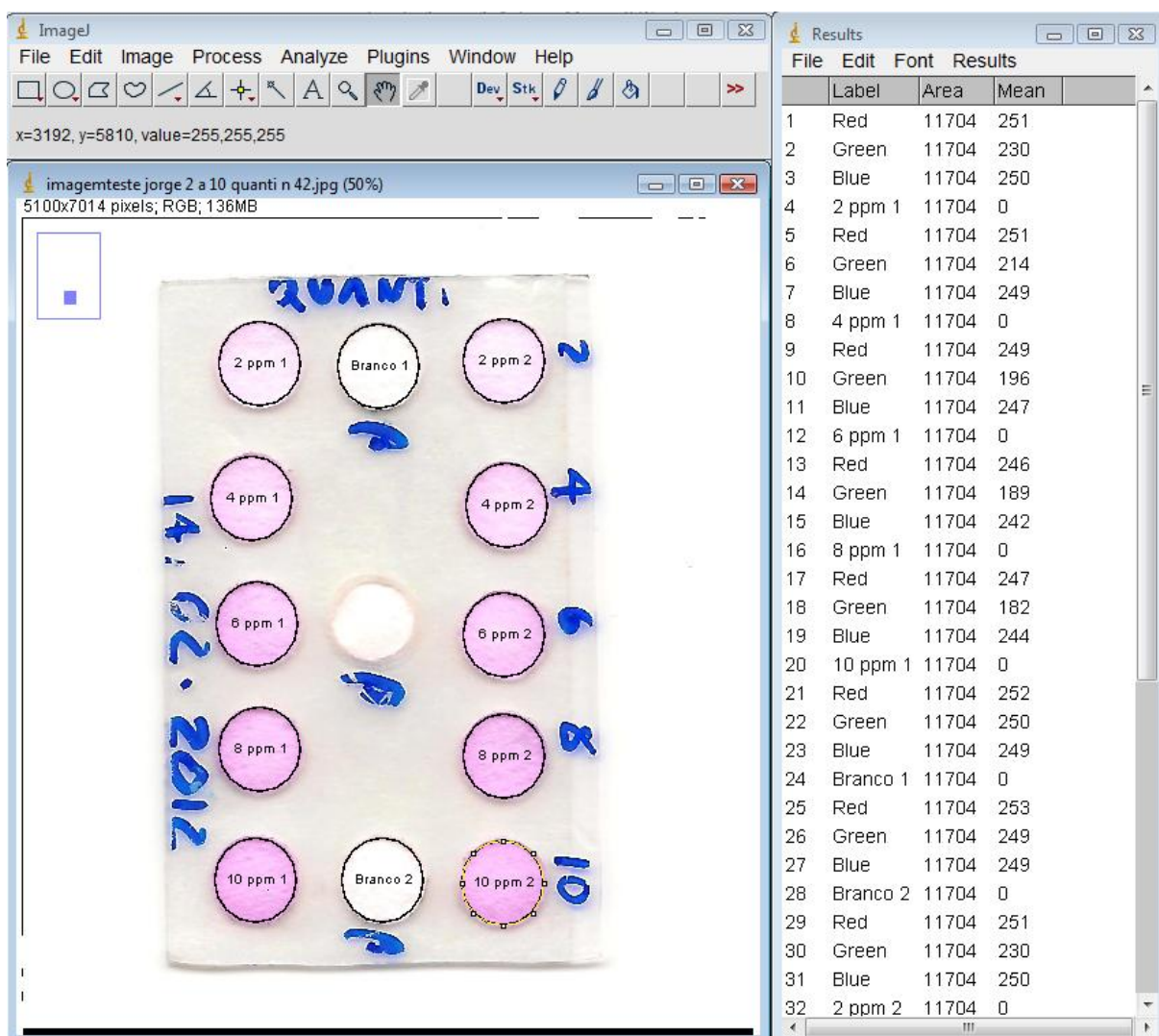


Figura 26 - Interface do programa image j com a imagem do *spot test*, acompanhado da tabela com os resultados dos valores de RGB das regiões selecionadas na imagem.

Os valores de RGB foram importados para uma planilha em *Excel* e o sinal analítico (Norma) foi obtido utilizando o modelo matemático proposto por Lyra e colaboradores (2009).

4.2.6 - Estudo da estabilidade da coloração do azocomposto.

Estudos foram realizados para avaliar a estabilidade da coloração do azocomposto (composto de coloração vermelho púrpura resultante da determinação de nitrito empregando a reação de Griess) ao longo do tempo. Neste estudo, empregando *spot test* (FIGURA 25), foi feita reações com diferentes concentrações de nitrito (0,2 ppm a 10 ppm). Após a adição do reagente, monitorou-se o tempo reacional e a cada intervalo de 15 min, durante 2 horas, foram obtidas imagens digitais. Posteriormente o *spot test* foi armazenado em dessecador, a temperatura ambiente, e após 24hs foi obtida outra imagem digital.

4.2.7 - Estudo do efeito da resolução das imagens digitais no sinal analítico.

Avaliou-se diferentes resoluções do *scanner* (100, 300, 600 e 1200 *ppp*) na obtenção das imagens do *spot test*, empregando soluções padrões de nitrito entre 0,2 a 10,0 mg L⁻¹ e, seu efeito sobre o sinal analítico (valores de norma calculados).

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 - Otimização do *Spot test*

Em análises químicas quantitativas por reflectância difusa em *spot test*, para obtenção de uma melhor precisão nas medidas, a cor na superfície do *spot test* deve

ser uniforme (LUIZ, 2012). Por ser, a imagem, formada do fenômeno de reflexão da luz pelo objeto, neste caso, também é necessária a uniformidade da cor na superfície do *spot test* para uma melhor precisão nas medidas.

Nessa perspectiva, inicialmente foram realizados estudos de otimização da reação e do *spot test*, tais como: ordem de adição de reagentes e amostra, volume de reagentes e amostras, tempo reacional, resolução do *scanner*, posicionamento (do *spot test* no *scanner*) e formas de aquisição das imagens digitais.

Na avaliação da ordem de adição, de reagente e padrões e/ou amostra, verificou-se que ao adicionar primeiro o reagente de Griess sobre o papel e depois solução padrão de nitrito, é obtido uma superfície mais uniforme, quando empregada adição reagente-padrão na ordem contrária. Isso ocorre, provavelmente, porque ao adicionar primeiramente o reagente de Griess sob o papel seco a água presente no reagente é adsorvida ficando uma camada de reagente uniforme sobre a superfície do papel. Quando a amostra é adicionada sobre o papel umedecido com reagente, o íon nitrito presente na amostra se difunde mais rapidamente sobre toda a extensão do papel. Quando a ordem de adição é contrária, ao colocar o reagente sobre o papel umedecido com a amostra, as moléculas do reagente não se difundem tão rapidamente sobre toda extensão do papel, talvez por terem maior afinidade com o papel, formando uma maior concentração do produto colorido resultante da reação próximo do local onde o reagente foi adicionado.

O local de reação no *spot test*, que é a região hidrofílica, possui um diâmetro de 5,0 mm e capacidade volumétrica de aproximadamente 10,0 μL (estas dimensões e capacidade de volume foram inicialmente propostas pelo reduzido consumo de reagente e adequada área de análise das imagens digitais). Assim, avaliou-se a influência da quantidade de reagente e de amostra sobre a uniformidade da cor reacional no *spot*. Nesta avaliação variou-se o volume de reagente de Griess entre 1,0 a 5,0 μL e, o volume de solução padrão de nitrito de 3,0 mg L^{-1} entre 5,0 a 9,0 μL . Nestes estudos, quando empregado a relação de volume de 5,0 μL de solução padrão e 5,0 μL de reagente, obteve-se uma superfície, no *spot*, com coloração mais uniforme.

No estudo de estabilidade da coloração do azo composto, conforme mostrado

na Figura 27, depois de 30 minutos até duas horas de ocorrida a reação o produto colorido possui estabilidade permitindo a tomada de medidas precisas e confiáveis nesse intervalo de tempo. Depois de 24 horas de ocorrida a reação houve uma diminuição de aproximadamente 50% do sinal.

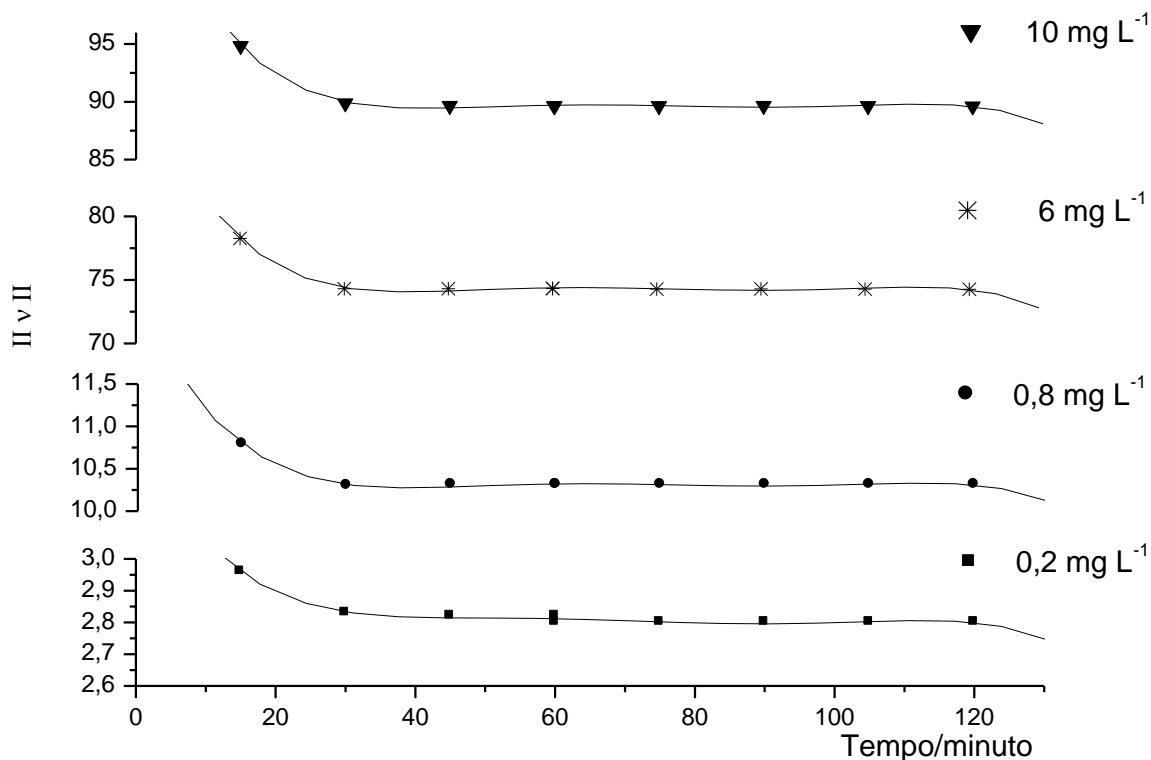


Figura 27 - Avaliação da estabilidade do azo composto, através de medidas sucessivas (intervalos de 15min) da cor do produto colorido após realização da reação no spot test.

As imagens com maior resolução apresentaram uma melhor qualidade na definição das imagens, portanto era esperado que essa característica fizesse diferença pelo menos nas imagens dos *spot test* com concentração de nitrito mais baixo, devido a baixa intensidade da coloração. Contudo, no estudo do efeito da resolução do *scanner* foi verificado que, para *spots* com diferentes concentrações de nitrito (0,2; 0,6; 3,0; 6,0 e 10,0 mg L⁻¹), não houve diferença significativa entre os

valores da norma obtidos em imagens com diferentes resoluções (100 a 1200 ppp).

Conforme mostrado na Figura 28 os valores da norma obtidos em imagens com diferentes resoluções apresentaram uma boa correlação.

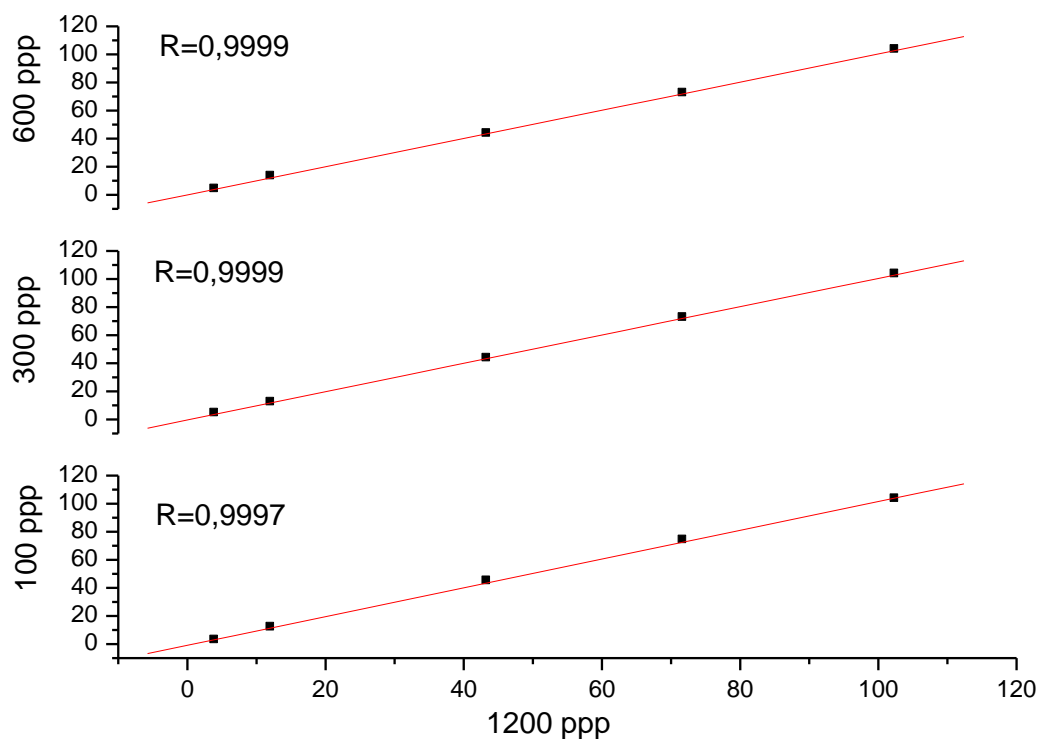


Figura 28 - Correlação entre os resultados da norma para diferentes concentrações de nitrito ($0,2-10\text{mg L}^{-1}$) obtidas em imagens com diferentes resoluções.

Neste trabalho o *scanner* foi configurado em 600 ppp (ponto por polegada) que, para imagens coloridas é a configuração padrão recomendada pelo fabricante.

4.3.2 - Características analíticas do *spot test*

Nas Figuras 29 e 30 são apresentadas as curvas analíticas obtidas para as soluções de referência de nitrito. Nestas Figuras, observa-se dois intervalos lineares

de resposta, o primeiro entre 0,2 a 1,0 mg L⁻¹ descrito pela equação: Norma do vetor (IIvII) = 0,824 + 16,530 [nitrito], R² = 0,9924, e o segundo intervalo entre 1,0 a 10,0 mg L⁻¹ descrito pela equação: Norma do vetor (IIvII) = 6,561 + 8,862[nitrito], R² = 0,9989.

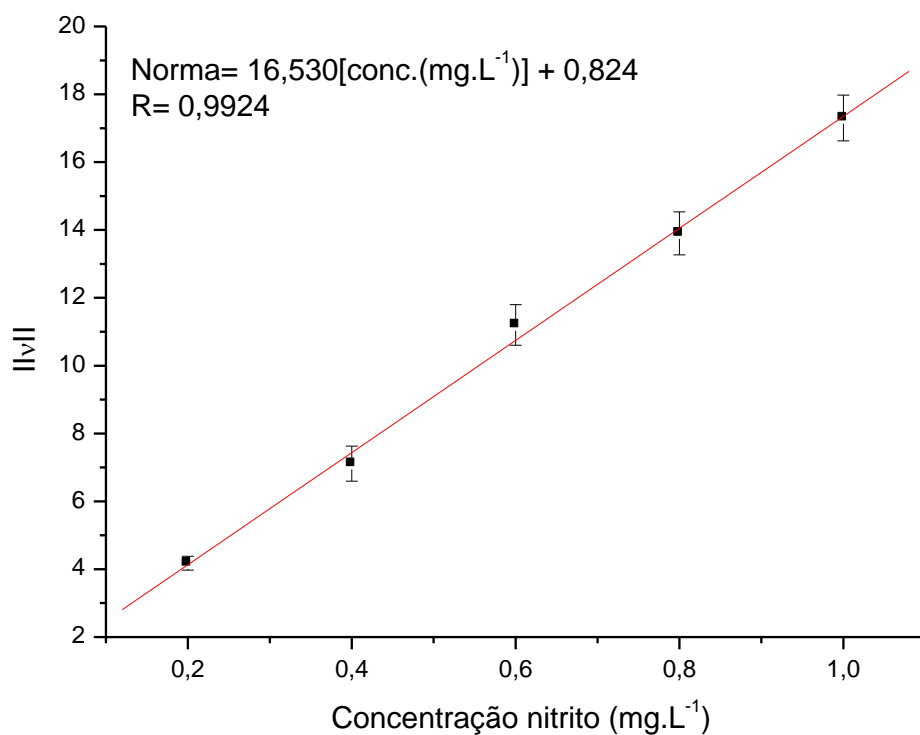


Figura 29 - Curva analítica obtida para determinação de nitrito na faixa de 0,2 a 1,0 mg L⁻¹ empregando o *spot test* proposto

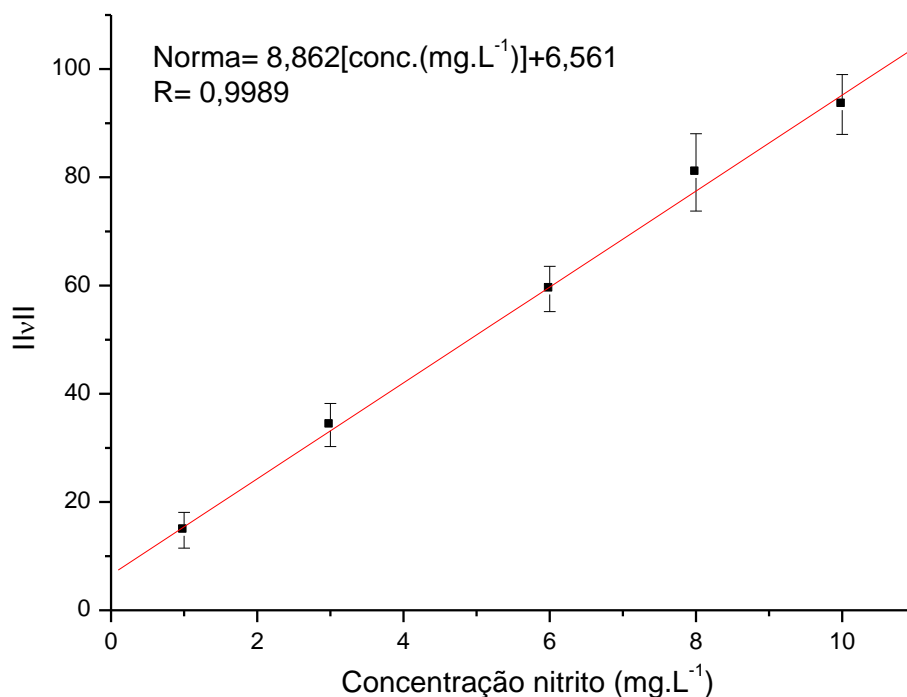


Figura 30 - Curva analítica obtida para determinação de nitrito na faixa de 1,0 a 10,0 mg L⁻¹ empregando o *spot test* proposto.

Segundo as recomendações da IUPAC (THOMPSON, 2002), o cálculo do limite de detecção e quantificação fundamentou-se no desvio padrão do branco (valores de RGB de 25 imagens do branco) e na inclinação da curva de calibração. Os limites de detecção (LD) para as faixas de 0,2 a 1,0 mg L⁻¹ e 1,0 a 10,0 mg L⁻¹ foram de 0,04 mg L⁻¹ e 0,07 mg L⁻¹, respectivamente.

Nas condições otimizadas, os coeficientes de variação (RSD) foram estimados em 4,8% e 4,0% para 6 medidas, correspondentes a soluções de nitrito nas concentrações de 0,6 mg L⁻¹ e 6,0 mg L⁻¹ respectivamente. Entretanto, para análise de nitrito nestas matrizes os valores obtidos estão abaixo do índice de precisão estabelecido pela norma da ANVISA, que é de 5%. As características analíticas do *spot test* são resumidas na Tabela 11.

Tabela 11 - Características analíticas obtidas no *spot test*.

Características analíticas	Nitrito	
Linearidade (mg L ⁻¹)	0,2-1,0	1,0-10
Limite de detecção (mg L ⁻¹)	0,04	0,07
Limite de quantificação (mg L ⁻¹)	0,12	0,22
Repetibilidade (RSD%)	4,83	4,04

Estudos de adição e recuperação de nitrito em amostras de água subterrânea e em salsicha foram realizados. Na matriz de água subterrânea foram utilizadas soluções padrões de nitrito nas concentrações de nitrito 0,6; 1,0 e 6,0 mg L⁻¹. Já para a matriz salsicha as concentrações empregadas foram de 0,4; 0,6 e 0,8 mg L⁻¹. Os resultados obtidos na análise (descontados originalmente daqueles encontrados na amostra sem a adição do analito) foram comparados com as concentrações adicionadas. Os resultados das recuperações obtidas são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados de recuperação de nitrito adicionado em amostras de água subterrânea e salsicha.

Amostra	Nitrito Add (mg/L)	Método Referência*		Método proposto		Erro (%)
		Enc. (mg/L)	Rec.(%)	Enc. (mg/L)	Rec. (%)	
Água	0,60	0,58±0,01	96,7	0,55±0,03	91,7	-5,17
	1,0	1,00±0,01	100,0	1,01±0,02	101,0	1,00
	6,0	6,01±0,01	100,2	5,71±0,04	95,2	-4,99
Salsicha	0,4	0,39±0,01	97,5	0,44±0,09	110,0	12,82
	0,6	0,56±0,01	93,3	0,62±0,03	103,3	10,71
	0,8	0,75±0,01	93,8	0,79±0,08	98,7	5,33

Add = adicionado; Enc = Encontrado (Média +IC, 95%); Rec = Recuperado; * Instituto Adolfo Lutz (2005).

Analisando os valores de recuperação obtidos, estes variaram entre 91,7% a 101% para matriz água e, de 98,7% a 110% para matriz salsicha. Já aqueles valores

de recuperação empregando o método de referência estes se apresentaram dentro de um intervalo menor de variação 96,7% a 100,2% para água e 93,8% a 97,5% para matriz salsicha.

No caso da matriz salsicha à presença de gordura não totalmente precipitada pelos reagentes clarificantes do extrato, contribuíram para os resultados encontrados, já para a diferença observada na menor concentração na matriz água, esta provavelmente associada ao maior desvio do método.

Algumas das figuras de méritos obtidos no procedimento proposto foram comparadas a outros procedimentos empregando *spot test* reportados na literatura (KISO, 2006; LUIZ, 2012) e, são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Comparação das características analíticas do *spot test* proposto com às de outros reportados na literatura.

Referência	Matriz	Deteccção	LD	LQ	RSD (%)	Volume Reagentes* (μL)	Faixa (mg L^{-1})
Método proposto	Produtos cárneos e água	<i>Scanner</i>	0,04	0,12	<5,0	10	0,2-10
(LUIZ, 2012)	Produtos cárneos e água	Reflectância difusa	0,09	0,29	<2,0	40	0,29-5,0
(KISO, 2006)	Água	Medida com régua	4	-	<5,0	5000	4,0-20

LD=Limite de deteccção, LQ=Limite de Quantificação, RSD = Repetibilidade,
* Amostra +Reagente de Griess

Observando a tabela 13 verifica-se que, de um modo geral, o método proposto possui características analíticas superiores aqueles apresentados pelos outros métodos.

Embora o *spot test* sugerido por Luiz (2012) apresente melhor precisão (RSD < 2%), no *spot test* proposto o consumo de reagentes é quatro vezes menor e o custo do *scanner* empregado na deteccção é muito menor que o do espectrofotômetro de reflectância difusa.

O *spot test* sugerido por Kiso (2006) é interessante porque a medida da cor é feita visualmente através de uma escala milimétrica que possui um custo muito menor do que um *scanner*. Mas, esse método possui um limite de detecção 100 vezes maior que o do método proposto, não sendo vantajoso quando se trata de análises em amostras com teores abaixo de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito.

4.3.3 - Aplicação analítica do *spot test*

O método desenvolvido foi aplicado na determinação de nitrito em amostras de águas subterrâneas, coletadas na zona urbana da cidade de Barreiras/Bahia. O método também foi aplicado na determinação de nitrito em quatro amostras de marcas de salsicha comercializadas em supermercados da cidade de Barreiras/Bahia.

Os resultados encontrados com o *spot test* foram comparados com encontrados pelo método de referência. Utilizando o teste t pareado verificou-se que, para os resultados de nitrito em águas subterrâneas $t = -1,73$ é maior que $t_{\text{crít}} = -4,30$ e para o nitrito em amostras de salsichas $t = -0,4$ é maior que $t_{\text{crít}} = -3,18$, com o nível de confiança de 95%, a hipótese nula é aceita e os resultados encontrados pelo método proposto não se diferem significativamente dos encontrados pelos métodos de referência.

Conforme mostrado na Tabela 14 os resultados para nitrito estão abaixo dos limites máximos para águas subterrâneas destinadas ao consumo humano como preconizado na resolução 396 de 2008 do CONAMA (BRASIL, 2008). Os resultados de nitrito em amostras de salsichas, também estão abaixo dos limites máximos permitidos na portaria 1004 de 1998 da ANVISA (BRASIL, 1999).

Tabela 14 - Resultados da determinação de nitrito em amostras de águas subterrâneas e em amostras de salsichas pelo *spot test* e pelo método de referência.

Amostra	Método Referência*	Método Proposto	Erro (%)
Água			
	Nitrito (mg-N/L)		
A	0,03±0,01	0,04±0,01	33,3
B	0,10±0,01	0,12±0,03	20,0
C	0,04±0,01	0,04±0,01	0
Salsicha			
	Nitrito (mg/Kg)		
A	19,41±0,01	21,71±1,55	11,8
B	21,41±0,90	22,98±1,30	7,3
C	23,99±0,01	22,12±1,68	-7,8
D	24,36±0,29	23,88±1,25	-2,0

n=3; Média ± IC 95%, * Instituto Adolfo Lutz (2005).

Devido a simplicidade e o baixo custo associado à metodologia, o *spot test* pode ser aplicado em análises de rotina. Além disso, em função da facilidade no transporte do *spot test*, o método possui a vantagem de poder ser utilizado em campo, bastando para isso, a utilização de um *scanner* portátil para a aquisição das imagens.

Outra vantagem que pode ser destacado no *spot test* que também favorece sua aplicação em análises de rotina seria a minimização no consumo de reagente (5µL), geração mínima de resíduos e a facilidade no tratamento desses resíduos, haja vista que o *spot test* além de ter dimensões reduzidas é confeccionado em papel podendo ser facilmente incinerado.

4.4 - CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível mostrar a viabilidade da aplicação de *spot test* quantitativo baseado em imagem digital na determinação de nitrito em amostras de águas naturais e em amostra de salsicha.

O método proposto neste trabalho se destacou quanto a sua simplicidade, baixo custo e a geração mínima de resíduo. Além disso, os resultados encontrados com o método proposto estiveram de acordo com os encontrados com o método de referência, revelando a eficiência do método em análises quantitativas de nitrito.

Os teores de nitrito encontrados nas amostras de água subterrânea e em amostra de salsicha estavam abaixo dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho evidenciou-se a viabilidade da utilização de imagens digitais obtidas por *webcam* e *scanner*, como alternativa ao uso de espectrofotômetros em análises químicas por métodos colorimétricos. Também foi possível evidenciar que os valores de norma do vetor em termos de RGB, atribuídos à cor nas imagens digitais e que estão relacionados às radiações emitidas pelos analitos, possui uma relação linear com a sua concentração.

Foram propostos dois métodos baseados em imagens digitais, no primeiro foi utilizado um sistema em fluxo com multicomutação e amostragem binária com uma *webcam* como sistema de detecção dedicado a determinação de nitrito e nitrato. No segundo foi utilizado um *spot test* a base de papel com detecção por *scanner* para determinação de nitrito. Em Ambos os métodos apresentaram instrumentação simples, caracterizados pelo baixo custo, baixo consumo de reagente e geração mínima de resíduos.

O sistema em fluxo foi aplicado com sucesso na determinação de nitrito e nitrato em amostras de água subterrânea enquanto o *spot test* foi aplicado com sucesso na determinação de nitrito em amostras de água subterrânea e salsichas.

Em todas as aplicações os métodos propostos demonstraram sensibilidade, precisão, limites de detecção e quantificação adequadas para determinação de nitrito e nitrato dentro dos limites máximos estabelecidos pelas legislações Brasileiras para as matrizes estudadas. Além disso, de acordo com teste t pareado, os resultados encontrados com os métodos propostos estavam em concordância com os encontrados pelos métodos de referência.

5.1 - PERSPECTIVAS FUTURAS

- Utilizar no sistema em fluxo outras câmeras de vídeos, com melhores desempenhos de detecção, a fim de melhorar as características analíticas do método.
- Desenvolver um *plugin* em Java para ser utilizado no image j que, permita a obtenção dos valores de RGB e o cálculo da norma do vetor simultaneamente a análise.
- Aplicar os métodos proposto na determinação de nitrito e nitrato em outras matrizes como, por exemplo, solos.
- Configurar outros sistemas em fluxo baseados em imagens digitais para determinação de outras espécies de interesses ambientais.
- Testar outros materiais na confecção do *spot test* no intuito de melhorar a uniformidade da cor e conseqüentemente a precisão do método.
- Desenvolver um *plugin* em Java para ser utilizado em imagem J, que permita a construção automática da curva de calibração a partir das imagens do spot test dos padrões. Que permita também, o cálculo automático da concentração do nitrito a partir das imagens do *spot test* das amostras e dos parâmetros da curva de calibração.
- Desenvolver outros *spot tests* baseados em imagens digitais para determinação de outras espécies químicas.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE K., SUZUKI K. e CITTERIO D. Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 18, p. 6928-34, 2008.

AHMED M. J., STALIKAS C. D., TZOUWARAKARAYANNI S. M. e KARAYANNIS M. I. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite nitrate by flow-injection analysis. **Talanta**, v. 43, n. 7, p. 1009-1018, 1996.

ALAM S. M., WABAIDUR S. M., LEE S. H., ALOTHMAN Z. A. e ELDESOKY G. E. Chemiluminescence determination of folic acid by a flow injection analysis assembly. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. n. 0, p., 2012.

ALVIM T. R. e ANDRADE J. C. A importância da Química Analítica Qualitativa nos cursos de Química das instituições de ensino superior brasileiras. **Química Nova**, v. 29, n. p. 168-172, 2006.

ANDERSON L. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Nitrite and Nitrate by Flow Injection Analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 110, n. 1, p. 123-128, 1979.

ANDRADE S. I. E., LIMA M. B., BARRETO I. S., LYRA W. S., ALMEIDA L. F., ARAÚJO M. C. U. e SILVA E. C. A digital image-based flow-batch analyzer for determining Al(III) and Cr(VI) in water. **Microchemical Journal**, v. n. 0, p., 2012.

ANTHEMIDIS A. N., XIDIA S. e GIAKISIKLI G. Study of bond Elut® Plexa™ PCX cation exchange resin in flow injection column preconcentration system for metal determination by flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 97, n. 0, p. 181-186, 2012.

ANWAR J., WAHEED-UZ-ZAMAN, SHAFIQUE M. U. e SALMAN M. Computational Quantification of Spot Tests by Image Scanning-a New Analytical Technique for Micro Samples. **Analytical Letters**, v. 43, n. 2, p. 367-371, 2010.

ASAN A., ISILDAK I., ANDAC M. e YILMAZ F. A simple and selective flow-injection spectrophotometric determination of copper(II) by using acetylsalicylhydroxamic acid. **Talanta**, v. 60, n. 4, p. 861-866, 2003.

ATTIQ-UR-REHMAN, YAQOOB M., WASEEM A. e NABI A. Determination of Nitrite and Nitrate in Freshwaters using Flow Injection Luminol Chemiluminescence Detection. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, n. 3, p. 569-575, 2011.

AYALA A., LEAL L. O., FERRER L. e CERDA V. Multiparametric automated system for sulfate, nitrite and nitrate monitoring in drinking water and wastewater based on sequential injection analysis. **Microchemical Journal**, v. 100, n. p. 55-60, 2012.

BARRETO I. S., ANDRADE S. I. E., LIMA M. B., SILVA E. C., ARAÚJO M. C. U. e ALMEIDA L. F. A monosegmented flow-batch system for slow reaction kinetics: Spectrophotometric determination of boron in plants. **Talanta**, v. 94, n. 0, p. 111-115, 2012.

BARROS NETO B **Como fazer experimentos : Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na industria.** Porto Alegre: 2010. p.

BOX G.E.P. e WETZ J. **Criteria for Judging Adequacy of Estimation by an Approximating Response Function.** University of Wisconsin, Technical Report, 1973. p.

BOYLSTON M. e BEER D. Methemoglobinemia: a case study. **Crit Care Nurse**, v. 22, n. 4, p. 50-5, 2002.

BRAINARD D. H.; Color Vision Theory. In: J. S. Editors-in-Chief: neil e B. B. Paul (Ed.). **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences.** Oxford: Pergamon, 2001. p. 2256-2263.

BRAINARD D. H., WILLIAMS D. R. e HOFER H. Trichromatic reconstruction from the interleaved cone mosaic: Bayesian model and the color appearance of small spots. **J Vis**, v. 8, n. 5, p. 15 1-23, 2008.

BRIMBLECOMBE P. e STEDMAN D. H. Historical Evidence for a Dramatic Increase in the Nitrate Component of Acid-Rain. **Nature**, v. 298, n. 5873, p. 460-462, 1982.

BUDANOVA N., FOUREST B. e MASLENNIKOV A. Capillary electrophoresis determination of nitrate and nitrite in high-salt perchlorate solutions for the UC dissolution study. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 597-602, 2009.

BURAKHAM R., OSHIMA M., GRUDPAN K. e MOTOMIZU S. Simple flow-injection system for the simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples. **Talanta**, v. 64, n. 5, p. 1259-1265, 2004.

BYRNE L., BARKER J., PENNARUN-THOMAS G., DIAMOND D. e EDWARDS S. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 517-522, 2000.

CAMPBELL E. R., CORRIGAN J. S. e CAMPBELL W. H. Field determination of nitrate using nitrate reductase. **Field Analytical Methods for Hazardous Wastes and Toxic Chemicals**, v. n. p. 851-860, 1997.

CARRILHO E., PHILLIPS S. T., VELLA S. J., MARTINEZ A. W. e WHITESIDES G. M. Paper Microzone Plates. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 5990-5998, 2009.

CONWAY B. R. Color vision, cones, and color-coding in the cortex. **Neuroscientist**, v. 15, n. 3, p. 274-90, 2009.

DIAS F.C; Usó do software image j para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais. (Dissertação-Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, INPE, São José dos Campos, 2008. 145 p.

DOWNES M. T. Improved Hydrazine Reduction Method for Automated-Determination of Low Nitrate Levels in Freshwater. **Water Research**, v. 12, n. 9, p. 673-675, 1978.

DUNGCHAI W., CHAILAPAKUL O. e HENRY C. S. Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 2, p. 227-233, 2010.

EL-SHAHAT M. F., BURHAM N. e AZEEM S. M. ABDEL. Flow injection analysis–solid phase extraction (FIA–SPE) method for preconcentration and determination of trace amounts of penicillins using methylene blue grafted polyurethane foam. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1–3, p. 1054-1060, 2010.

ERDOGAN B. Y. e ONAR A. N. Determination of Nitrates, Nitrites and Oxalates in Kale and Sultana Pea by Capillary Electrophoresis. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 15, p. 2051-2057, 2011.

ESPINOLA A. Fritz Feigl: sua obra e novos campos tecno-científicos por ela originados. **Química Nova**, v. 27, n. p. 169-176, 2004.

FAIRCHILD M. D. Color appearance models and complex visual stimuli. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. p. E25-E33, 2010.

FAN A. M.; Nitrate and Nitrite in Drinking Water: A Toxicological Review. In: O. N. Editor-in-Chief: jerome (Ed.). **Encyclopedia of Environmental Health**. Burlington: Elsevier, 2011. p. 137-145.

FARAJI M., YAMINI Y. e SHARIATI S. Application of cotton as a solid phase extraction sorbent for on-line preconcentration of copper in water samples prior to inductively coupled plasma optical emission spectrometry determination. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 2–3, p. 1383-1388, 2009.

FARIA L. C. e PASQUINI C. Flow-injection determination of inorganic forms of nitrogen by gas diffusion and conductimetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 245, n. 0, p. 183-190, 1991.

FATIBELLO-FILHO O. e BORGES M. T. M. R. Flow-injection conductometric determination of acidity in industrial hydrated ethyl alcohol. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, n. 1–3, p. 81-85, 1998.

FEIGL F.. e ANGER V . Chapter 1 - Development, Present State and Prospects of Inorganic Spot Test Analysis¹. In: (Ed.). **Spot Tests in Inorganic Analysis (Sixth Edition)**. Amsterdam: Elsevier, 1972. p. 1-30.

GAIÃO E. N., MARTINS V. L., LYRA W. S., ALMEIDA L. F., SILVA E. C. e ARAÚJO M. C. U. Digital image-based titrations. **Analytica Chimica Acta**, v. 570, n. 2, p. 283-290, 2006.

GHAUCH A., RIMA J., CHAREF A., SUPTIL J., FACHINGER C. e MARTIN-BOUYER M. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu(II) by diffuse reflectance spectrometry. **Talanta**, v. 48, n. 2, p. 385-392, 1999.

GHAUCH A., TURNAR C., FACHINGER C., RIMA J., CHAREF A., SUPTIL J. e MARTIN-BOUYER M. Use of diffuse reflectance spectrometry in spot test reactions for quantitative determination of cations in water. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1327-1333, 2000.

GILCHRIST A. e NOBBS J.; Colorimetry, Theory. In: L. Editor-in-Chief: John (Ed.). **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 1999. p. 380-385.

GINÉ M. F., BERGAMIN F. H., ZAGATTO E. A. G. e REIS B. F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 114, n. 0, p. 191-197, 1980.

GONZÁLEZ R.C. e WOODS R.E. **Digital image processing**. Prentice Hall, 2002. p.

GOU Y. Spectrophotometric determination of nitrate-nitrogen using 1-naphthol-8-sulfonic acid and its application to total nitrogen analysis. **Bunseki Kagaku**, v. 55, n. 10, p. 765-771, 2006.

_____. Spectrophotometric determination of nitrate-nitrogen in groundwaters using hydrophobic reagent anisole. **Bunseki Kagaku**, v. 56, n. 3, p. 167-171, 2007.

GREVER A. B. G. e RUITER A. Prevention of Clostridium outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite - a review. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 3, p. 165-169, 2001.

HAINBERGER S.J.L. A vida e a obra de Fritz Feigl. **Química Nova**, v. n. p., 1982.

HARRISON R.M. **Principles Of Environmental Chemistry**. RSC Publishing, 2007. 363 p.

HATANO R., NAGUMO T., HATA H. e KURAMOCHI K. Impact of nitrogen cycling on stream water quality in a basin associated with forest, grassland, and animal husbandry, Hokkaido, Japan. **Ecological Engineering**, v. 24, n. 5, p. 509-515, 2005.

HELALEH M. I. H. e KORENAGA T. Ion chromatographic method for simultaneous determination of nitrate and nitrite in human saliva. **Journal of Chromatography B**, v. 744, n. 2, p. 433-437, 2000.

HELTON A. M., POOLE G. C., MEYER J. L., WOLLHEIM W. M., PETERSON B. J., MULHOLLAND P. J., BERNHARDT E. S., STANFORD J. A., ARANGO C., ASHKENAS L. R., COOPER L. W., DODDS W. K., GREGORY S. V., HALL R. O., HAMILTON S. K., JOHNSON S. L., MCDOWELL W. H., POTTER J. D., TANK J. L., THOMAS S. M., VALETT H. M., WEBSTER J. R. e ZEGLIN L. Thinking outside the

channel: modeling nitrogen cycling in networked river ecosystems. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 9, n. 4, p. 229-238, 2011.

HENRIKSEN A. e SELMER-OLSEN A. R. Automatic methods for determining nitrate and nitrite in water and soil extracts. **Analyst**, v. 95, n. 1130, p. 514-518, 1970.

HUANG K. J., WANG H., GUO Y. H., FAN R. L. e ZHANG H. S. Spectrofluorimetric determination of trace nitrite in food products with a new fluorescent probe 1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dicarboxy-8-(3',4'-diaminophenyl)-difluoroboradiazas-indacene. **Talanta**, v. 69, n. 1, p. 73-78, 2006.

HYDES D. J. e HILL N. C. Determination of nitrate in seawater: Nitrate to nitrite reduction with copper-cadmium alloy. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 21, n. 1, p. 127-130, 1985.

IQBAL Z. e BJORKLUND R. B. Assessment of a mobile phone for use as a spectroscopic analytical tool for foods and beverages. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 11, p. 2428-2436, 2011.

JOHNSON C. J. e KROSS B. C. Continuing importance of nitrate contamination of groundwater and wells in rural areas. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 18, n. 4, p. 449-456, 1990.

JOKERST J. C., ADKINS J. A., BISHA B., MENTELE M. M., GOODRIDGE L. D. e HENRY C. S. Development of a Paper-Based Analytical Device for Colorimetric Detection of Select Foodborne Pathogens. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 6, p. 2900-2907, 2012.

JONES M. N. Nitrate reduction by shaking with cadmium: Alternative to cadmium columns. **Water Research**, v. 18, n. 5, p. 643-646, 1984.

JUNGREIS E. **Spot test analysis: Clinical, environmental, forensic, and geochemical applications**. New York: Wiley 1997 377 p.

JUNGREIS E.; SPOT TESTS. In: W. Editors-in-Chief: Paul, T. Alan, *et al* (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, 2005. p. 383-400.

KISO Y., JUNG Y. J., KUZAWA K., SEKO Y., SAITO Y., YAMADA T. e NAGAI M.

Visual determination of nitrite and nitrate in waters by color band formation method. **Chemosphere**, v. 64, n. 11, p. 1949-1954, 2006.

KODAMATANI H., YAMAZAKI S., SAITO K., KOMATSU Y. e TOMIYASU T. Rapid Method for Simultaneous Determination of Nitrite and Nitrate in Water Samples Using Short-Column Ion-Pair Chromatographic Separation, Photochemical Reaction, and Chemiluminescence Detection. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 2, p. 187-192, 2011.

KOMPANY-ZAREH M., MANSOURIAN M. e RAVAEE F. Simple method for colorimetric spot-test quantitative analysis of Fe(III) using a computer controlled hand-scanner. **Analytica Chimica Acta**, v. 471, n. 1, p. 97-104, 2002.

KUILA D. K., CHAKRABORTTY A., SHARMA S. P. e LAHIRI S. C. Composition profile of low explosives from cases in India. **Forensic Science International**, v. 159, n. 2-3, p. 127-131, 2006.

LAPRESTA-FERNANDEZ A. e CAPITAN-VALLVEY L. F. Environmental monitoring using a conventional photographic digital camera for multianalyte disposable optical sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 2, p. 328-337, 2011.

LARA F. J., GARCÍA-CAMPAÑA A. M. e AARON J.J. Analytical applications of photoinduced chemiluminescence in flow systems—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 679, n. 1–2, p. 17-30, 2010.

LIMA M. B., ANDRADE S. I. E., BARRETO I. S., ALMEIDA L. F. e ARAUJO M. C. U. A digital image-based micro-flow-batch analyzer. **Microchemical Journal**, v. 106, n. 1, p. 238-243, 2013.

LIMA M. B., ANDRADE S. I. E., BARRETO I. S., ALMEIDA L. F., SILVA E. C. e ARAUJO M. C. U. Quantitative spot test analysis of soluble tannin in green tea using a portable diffuse reflectometer. **Analytical Methods**, v. 4, n. 8, p. 2329-2333, 2012.

LLAMAS N. E., DI NEZIO M. S. e BAND B. S.F. Flow-injection spectrophotometric method with on-line photodegradation for determination of ascorbic acid and total sugars in fruit juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 1, p. 127-130, 2011.

LOPEZ-MOLINERO A., LINAN D., SIPIERA D. e FALCON R. Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in

plastics. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 2, p. 380-385, 2010.

LUIZ V. H. M., PEZZA L. e PEZZA H. R. Determination of nitrite in meat products and water using dapson e with combined spot test/diffuse reflectance on filter paper. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2546-2551, 2012.

LYRA W. S.; Espectrometria em chama baseada em imagens digitais. (Dissertação). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008. 89 p.

LYRA W. S., DOS SANTOS V. B., DIONIZIO A. G. G., MARTINS V. L., ALMEIDA L. F., GAIAO E. N., DINIZ P. H. G. D., SILVA E. C. e ARAUJO M. C. U. Digital image-based flame emission spectrometry. **Talanta**, v. 77, n. 5, p. 1584-1589, 2009.

MAEKAWA A., OGIU T., ONODERA H., FURUTA K., MATSUOKA C., OHNO Y. e ODASHIMA S. Carcinogenicity studies of sodium nitrite and sodium nitrate in F-344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 25-33, 1982.

MALEKI N., SAFAVI A. e SEDAGHATPOUR F. Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera. **Talanta**, v. 64, n. 4, p. 830-835, 2004.

MANAHAN S.E. **Environmental Chemistry**. Lewis Publishers, 2000. 898 p.

MANEA F., REMES A., RADOVAN C., PODE R., PICKEN S. e SCHOONMAN J. Simultaneous electrochemical determination of nitrate and nitrite in aqueous solution using Ag-doped zeolite-expanded graphite-epoxy electrode. **Talanta**, v. 83, n. 1, p. 66-71, 2010.

MARTÍN-ESTEBAN A., GARCINUÑO R. M., ANGELINO S., FERNÁNDEZ P. e CÁMARA C. Determination of trace metals in waters and compost by on-line precipitation coupled to flame atomic absorption spectrophotometry or ion chromatography. **Talanta**, v. 48, n. 4, p. 959-966, 1999.

MARTINEZ A. W., PHILLIPS S. T., CARRILHO E., THOMAS S. W., 3RD, SINDI H. e WHITESIDES G. M. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3699-707, 2008.

MATIAS F. A. A., VILA M. M. D. C. e TUBINO M. Quantitative reflectance spot test

for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 327-330, 2004.

MEDEIROS R. A., LOURENCAO B. C., ROCHA-FILHO R. C. e FATIBELLO-FILHO O. Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 99, n. 0, p. 883-889, 2012.

MERVARTOVÁ K., POLÁŠEK M. e CALATAYUD J. M. Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 3, p. 367-381, 2007.

MIKUSKA P. e VECERA Z. Chemiluminescent flow-injection analysis of nitrates in water using on-line ultraviolet photolysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 474, n. 1-2, p. 99-105, 2002.

MOORCROFT M. J., DAVIS J. e COMPTON R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, n. 5, p. 785-803, 2001.

MORETTO L. M., UGO P., ZANATA M., GUERRIERO P. e MARTIN C. R. Nitrate biosensor based on the ultrathin-film composite membrane concept. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 10, p. 2163-2166, 1998.

MOTOMIZU S. e SANADA M. Photoinduced Reduction of Nitrate to Nitrite and Its Application to the Sensitive Determination of Nitrate in Natural-Waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 308, n. 1-3, p. 406-412, 1995.

MROCZKIEWICZ M., GÓRSKI Ł., ZAMOJSKA-JAROSZEWICZ A., SZEWCZYK K. W. e MALINOWSKA E. Application of flow-injection potentiometric system for determination of total concentration of aliphatic carboxylic acids. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 2047-2052, 2011.

NAKASHIMA Y., SUZUKI S., YAMAZAKI M., INOUE Y., FUKATSU Y. e YAMAMOTO A. Determination of Nitrite and Nitrate in Meat Products by Inline Dialysis Ion Chromatography. **Bunseki Kagaku**, v. 59, n. 8, p. 679-683, 2010.

NASCIMENTO T. S., PEREIRA R. O. L., MELLO H. L. D. e COSTA J. Metemoglobinemia: do diagnóstico ao tratamento. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. p. 651-664, 2008.

NĚMCOVÁ I., NESMĚRÁK K., RYCHLOVSKÝ P. e KOUTNÍKOVÁ J. FIA titrations of phenothiazine derivatives in aqueous micellar and non-aqueous media. **Talanta**, v. 65, n. 3, p. 632-637, 2005.

NYDAHL FOLKE. On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite by cadmium. **Talanta**, v. 23, n. 5, p. 349-357, 1976.

OMS M. T., CERDA A. e CERDA V. Sequential Injection-Analysis of Nitrites and Nitrates. **Analytica Chimica Acta**, v. 315, n. 3, p. 321-330, 1995.

PACIORNIK S., YALLOUZ A. V., CAMPOS R. C. e GANNERMAN D. Scanner image analysis in the quantification of mercury using spot-tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 156-161, 2006.

PASQUALI C. E. L., GALLEGU-PICO A., HERNANDO P. F., VELASCO M. e ALEGRIA J. S. D. Two rapid and sensitive automated methods for the determination of nitrite and nitrate in soil samples. **Microchemical Journal**, v. 94, n. 1, p. 79-82, 2010.

POYNTON C.; 21 - The CIE system of colorimetry. In: (Ed.). **Digital Video and HDTV**. San Francisco: Morgan Kaufmann, 2003. p. 211-231.

PURVAJA R., RAMESH R., RAY A. K. e RIXEN T. Nitrogen cycling: A review of the processes, transformations and fluxes in coastal ecosystems. **Current Science**, v. 94, n. 11, p. 1419-1438, 2008.

QUAN D., SHIM J. N., KIM J. D., PARK H. S., CHA G. S. e NAM H. Electrochemical determination of nitrate with nitrate reductase-immobilized electrodes under ambient air. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 14, p. 4467-4473, 2005.

RAMOS L. A., CAVALHEIRO C. C. S. e CAVALHEIRO E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. p. 1114-1120, 2006.

REIS B. F. Análise química por injeção em fluxo: Vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51-58, 1996.

REIS B. F. e BERGAMIN F H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de

análise química por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 16, n. 6, p. 570-573, 1993.

REIS B. F., GINÉ M. F. e KRONKA E.A.M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, v. 12, n. 1, p. 82-91, 1989.

REIS B. F., GINÉ M. F., ZAGATTO E. A. G., LIMA J. L. F. C. e LAPA R. A. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293, n. 1-2, p. 129-138, 1994.

ROCHA F. R. P.; Determinação sequenciais em sistemas de injeção em fluxo empregando multicomutação emultidetecção. (Tese). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2000. 177 p.

ROCHA F. R. P., MARTELLI P. B. e REIS B. F. An improved flow system for spectrophotometric determination of anions exploiting multicommutation and multidetection. **Analytica Chimica Acta**, v. 438, n. 1-2, p. 11-19, 2001.

ROCHA F. R. P. e REIS B. F. A flow system exploiting multicommutation for speciation of inorganic nitrogen in waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 409, n. 1-2, p. 227-235, 2000.

ROCHA F. R. P., REIS B. F., ZAGATTO E. A. G., LIMA J. L. F. C., LAPA R. A. S. e SANTOS J. L. M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 468, n. 1, p. 119-131, 2002.

ROCHA F. R. P. e TEIXEIRA L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. p. 807-812, 2004.

RODRIGUES E. R. G. O. e LAPA R. A. S. CMOS arrays as chemiluminescence detectors on microfluidic devices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 1, p. 381-388, 2010.

RUZICKA J. e HANSEN E. H. Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, n. 1, p. 145-157, 1975.

SAKR M. M. e EL NASHAR R. M. Potentiometric determination of tolterodine in batch and flow injection conditions. **Talanta**, v. 96, n. 0, p. 153-160, 2012.

SAWICKI C. R. e SCARINGE F. P. Colorimetric Determination of Nitrate after Hydrazine Reduction to Nitrite. **Microchemical Journal**, v. 16, n. 4, p. 657-662, 1971.

SCANLON M. D., BERDUQUE A., STRUTWOLF J. e ARRIGAN D. W. M. Flow-injection amperometry at microfabricated silicon-based μ -liquid-liquid interface arrays. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 14, p. 4234-4239, 2010.

SEBRANEK J. G. e BACUS J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? **Meat Science**, v. 77, n. 1, p. 136-147, 2007.

SHAPLEY R. e HAWKEN M. Neural mechanisms for color perception in the primary visual cortex. **Curr Opin Neurobiol**, v. 12, n. 4, p. 426-32, 2002.

SHARIAR S. M. e HINOUE T. Simultaneous Voltammetric Determination of Nitrate and Nitrite Ions Using a Copper Electrode Pretreated by Dissolution/Redeposition. **Analytical Sciences**, v. 26, n. 11, p. 1173-1179, 2010.

SHIHANA F., DISSANAYAKE D. M., BUCKLEY N. A. e DAWSON A. H. A Simple Quantitative Bedside Test to Determine Methemoglobin. **Annals of Emergency Medicine**, v. 55, n. 2, p. 184-189, 2010.

SKEGGS JR L. T. An automatic method for colorimetric analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 28, n. 3, p. 311-322, 1957.

SOLDAT D. J., BARAK P. e LEPORE B. J. Microscale Colorimetric Analysis Using a Desktop Scanner and Automated Digital Image Analysis. **Journal of Chemical Education**, v. 86, n. 5, p. 617, 2009.

SPALDING R. F. e EXNER M. E. Occurrence of Nitrate in Groundwater—A Review. **J. Environ. Qual.**, v. 22, n. 3, p. 392-402, 1993.

STEIMLE E. T., KALTENBACHER E. A. e BYRNE R. H. In situ nitrite measurements using a compact spectrophotometric analysis system. **Marine Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 255-262, 2002.

STEWART J. W. B. e RŮŽIČKA J. Flow injection analysis : Part V. Simultaneous determination of nitrogen and phosphorus in acid digests of plant material with a single spectrophotometer. **Analytica Chimica Acta**, v. 82, n. 1, p. 137-144, 1976.

TAKEDA K. e FUJIWARA K. Determination of Nitrate in Natural-Waters with the Photoinduced Conversion of Nitrate to Nitrite. **Analytica Chimica Acta**, v. 276, n. 1, p. 25-32, 1993.

TAN A., HUANG J., GENG L., XU J. e ZHAO X. A multi-channel photometric detector for multi-component analysis in flow injection analysis. **J Automat Chem**, v. 16, n. 2, p. 71-3, 1994.

TAVARES JÚNIOR J.B, RIBEIRO E e SANTOS D.R. Estabilização da temperatura da câmara digital Magi DC 575 utilizando pastilha termoelétrica para obtenção dos parâmetros de correção do efeito da corrente escura. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. n. p. 15, 2011.

THOMPSON M., ELLISON S.L.R. e WOOD R. Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TÔRRES A. R., LYRA W.S., ANDRADE S. I. E., ANDRADE R. A. N., SILVA E. C., ARAÚJO M. C. U. e GAIÃO E. N. A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid–base titration without indicator. **Talanta**, v. 84, n. 3, p. 601-606, 2011.

TORRO I. G., MATEO J. V. G. e CALATAYUD J. M. Flow-injection biamperometric determination of nitrate (by photoreduction) and nitrite with the NO₂⁻/I⁻ reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, n. 1-3, p. 241-249, 1998.

TROJANOWICZ M., SZPUNAR-ŁOBIŃSKA J. e MICHALSKI Z. Multicomponent analysis with a computerized flow injection system using LED photometric detection. **Microchimica Acta**, v. 103, n. 3-4, p. 159-169, 1991.

TROJANOWICZ M., WORSFOLD P. J. e CLINCH J. R. Solid-state photometric detectors for flow injection analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 301-305, 1988.

TUBINO M., BIANCHESSI L. F. e VILA M. M. D. C. Quantitative Spot-Test Analysis of Metformin in Pharmaceutical Preparations Using Ultraviolet-Visible Diffuse Reflectance Spectroscopy. **Analytical Sciences**, v. 26, n. 1, p. 121-124, 2010.

TUBINO M., ROSSI A. V. e MAGALHÃES M. E. A. Quantitative Spot Tests Of Fe(III), Cr(VI) And Ni(II) By Reflectance Measurements. **Analytical Letters**, v. 30, n. 2, p.

271-282, 1997.

VALIZADEH H. e SHOMALI A. A new nitrite ionic liquid (IL-ONO) as a nitrosonium source for the efficient diazotization of aniline derivatives and in-situ synthesis of azo dyes. **Dyes and Pigments**, v. 92, n. 3, p. 1138-1143, 2012.

VANDERVL.E. Oxygen and Nitrogen Enrichment in Air by Cycling Zone Adsorption. **Separation Science**, v. 6, n. 5, p. 727-&, 1971.

VARGAS E., GAMELLA M., CAMPUZANO S., GUZMÁN-VÁZQUEZ DE PRADA A., RUIZ M. A., REVIEJO A. J. e PINGARRÓN J. M. Development of an integrated electrochemical biosensor for sucrose and its implementation in a continuous flow system for the simultaneous monitoring of sucrose, fructose and glucose. **Talanta**, v. n. 0, p., 2012.

WELLBURN F. A. M., LAU K. K., MILLING P. M. K. e WELLBURN A. R. Drought and air pollution affect nitrogen cycling and free radical scavenging in *Pinus halepensis* (Mill). **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 302, p. 1361-1367, 1996.

WEST DONALD M.; HOLLER, F. JAMES; SKOOG, DOUGLAS A. **Fundamentos de Química Analítica**

São Paulo: 2006. p.

WEST P. W. e RAMACHAN.TP. Spectrophotometric Determination of Nitrate Using Chromotropic Acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 35, n. 3, p. 317-&, 1966.

WONGWILAI W., LAPANANTNOPPAKHUN S., GRUDPAN S. e GRUDPAN K. Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 1137-1141, 2010.

YANG C. X., SUN X. Y., BIN L. e LIAN H. T. Determination of total phosphorus in water sample by digital imaging colorimetry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 850-853, 2007.

YUE X. F., ZHANG Z. Q. e YAN H. T. Flow injection catalytic spectrophotometric simultaneous determination of nitrite and nitrate. **Talanta**, v. 62, n. 1, p. 97-101, 2004.

ZAGATTO E. A. G., VAN STADEN J. F., MANIASSO N. , STEFAN R.I. e

MARSHALL G.D. Information essential for characterizing a flow-based analytical system (IUPAC Technical report). **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 4, p. 585-592, 2002.

ZAMORA L. L., LOPEZ P. A., FOS G. M. A., ALGARRA R. M., ROMERO A. M. M. e CALATAYUD J. M. Quantitative colorimetric-imaging analysis of nickel in iron meteorites. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1575-1579, 2011.

ZEMAN C. L., KROSS B. e VLAD M. A nested case-control study of methemoglobinemia risk factors in children of Transylvania, Romania. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 8, p. 817-822, 2002.

ZHAN X. Q., LI D. H., ZHENG H. e XU J. G. A sensitive fluorimetric method for the determination of nitrite and nitrate in seawater by a novel red-region fluorescence dye. **Analytical Letters**, v. 34, n. 15, p. 2761-2770, 2001.

ZHANG M., YUAN D. X., FENG S. C. e HUANG Y. M. Reversed Flow Injection Analysis of Nitrate in Drinking Water with UV-induced Reduction to Nitrite and Spectrophotometric Detection. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 943-944, 2011.

ZHI-QI Z., LOU-JUN G., HAN-YING Z. e QIAN-GUANG L. Catalytic simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate with a flow injection system. **Analytica Chimica Acta**, v. 370, n. 1, p. 59-63, 1998.

ANEXO

CÓDIGO FONTE DO *PLUGIN MEASURE BANDS STACKS*:

```
// Measure Stack
//
// This macro measure all the slices in a stack.

macro "Measure Stack" {
    for (n=1; n<=nSlices; n++) {
        setSlice(n);
        run("Measure Bands");
    }
}
```

CÓDIGO FONTE DO *PLUGIN MEASURE STACKS*:

```
// Measure Stack
//
// This macro measure all the slices in a stack.

macro "Measure Stack" {
    for (n=1; n<=nSlices; n++) {
```

```
        setSlice(n);
        run("Measure");
    }
}
```

CÓDIGO FONTE DO *PLUGIN MEASURE AND SET LABEL*:

```
// Measure And Set Label
//
// This macro measures the current selection and outlines
// and labels it in a non-destructive overlay. Edit 'color',
// 'fontSize' and 'lineWidth' variables to change the
// color, font size and outline width. Add this macro
// to ImageJ/macros/StartupMacros.txt to have it
// automatically installed when ImageJ is launched.
// Change the name to "Measure And Set Label [m]"
// to have it run when the user presses the "m" key.
// The original version of this macro is available as:
// http://imagej.nih.gov/ij/macros/MeasureAndSetLabel.txt

macro "Measure And Set Label" {
    key = "label.set";
    colors = newArray("white","black","red","blue","yellow");
    color = colors[0];
```

```

lineWidth = 1;

fontSize = 14;

addN = true;

settings = color+" "+lineWidth+" "+fontSize+" "+addN;

settings = call("ij.Prefs.get", key, settings);

lines = split(settings);

if (lines.length==4) {
    color = lines[0];

    lineWidth = parseInt(lines[1]);

    fontSize = parseInt(lines[2]);

    addN = parseInt(lines[3]);
}

if (selectionType===-1)
    exit("Selection required");

Dialog.create("Set Label");

Dialog.addString("Label:", "", 15);

Dialog.addChoice("Color:", colors, color);

Dialog.addNumber("Line width:", lineWidth);

Dialog.addNumber("Font size:", fontSize);

Dialog.addCheckbox("Add measurement number", addN);

Dialog.show();

label = Dialog.getString();

color = Dialog.getChoice();

lineWidth = Dialog.getNumber();

fontSize = Dialog.getNumber();;

```

```

addN = Dialog.getCheckbox();
run("Measure");
setResult("Label", nResults-1, label);
updateResults();
//setJustification("center");
setFont("SansSerif", fontSize);
run("Add Selection...", "stroke=&color width=&lineWidth");
getBoundingRect(x, y, width, height);
setColor(color);
if (addN) {
    dash = "";
    if (label!="") dash="-";
    label = "" + nResults + dash + label;
}
w = getStringWidth(label);
Overlay.drawString(label, x+width/2-w/2, y+height/2+fontSize/2);
Overlay.show;
settings = color+" "+lineWidth+" "+fontSize+" "+addN;
call("ij.Prefs.set", key, settings);
}

```

CÓDIGO FONTE DO *PLUGIN MEASURE RGB*:

```

// "MeasureRGB"
// This macro demonstrates how to separately measure

```

```

// the red, green and blue channels of an RGB image.

requires("1.35b");
if (bitDepth!=24)
    exit("This macro requires an RGB image");
setRGBWeights(1, 0, 0);
run("Measure");
setResult("Label", nResults-1, "Red");
setRGBWeights(0, 1, 0);
run("Measure");
setResult("Label", nResults-1, "Green");
setRGBWeights(0, 0, 1);
run("Measure");
setResult("Label", nResults-1, "Blue");
setRGBWeights(1/3, 1/3, 1/3);
run("Measure");
setResult("Label", nResults-1, "(R+G+B)/3");
// weights uses in ImageJ 1.31 and earlier
setRGBWeights(0.299, 0.587, 0.114);
run("Measure");
setResult("Label", nResults-1, "0.299R+0.587G+0.114B");
updateResults();

```

CÓDIGO FONTE DO *PLUGIN MEASURE RGB AND SET LABEL*:


```

// Measure RGB And Set Label
//
// This macro demonstrates how to separately measure
// the red, green and blue channels of an RGB image.

macro "Measure RGB And Set Label" {
    key = "label.set";
    colors = newArray("white","black","red","blue","yellow");
    color = colors[0];
    lineWidth = 1;
    fontSize = 14;
    addN = true;
    settings = color+" "+lineWidth+" "+fontSize+" "+addN;
    settings = call("ij.Prefs.get", key, settings);
    lines = split(settings);
    if (lines.length==4) {
        color = lines[0];
        lineWidth = parseInt(lines[1]);
        fontSize = parseInt(lines[2]);
        addN = parseInt(lines[3]);
    }
    if (selectionType==1)
        exit("Selection required");
    Dialog.create("Área seleccionada");
    Dialog.addString("Nome:", "", 15);
}

```

```

Dialog.addChoice("Cor:", colors, color);
Dialog.addNumber("Largura da linha:", lineWidth);
Dialog.addNumber("Fonte:", fontSize);
Dialog.addCheckbox("Adicionar numero da medida", addN);
Dialog.show();
label = Dialog.getString();
color = Dialog.getChoice();
lineWidth = Dialog.getNumber();
fontSize = Dialog.getNumber();
addN = Dialog.getCheckbox();
run("MeasureRGB ");
setResult("Label", nResults-1, label);
updateResults();
//setJustification("center");
setFont("SansSerif", fontSize);
run("Add Selection...", "stroke=&color width=&lineWidth");
getBoundingRect(x, y, width, height);
setColor(color);
if (addN) {
    dash = "";
    if (label!="") dash="-";
    label = "" + nResults + dash + label;
}
w = getStringWidth(label);
Overlay.drawString(label, x+width/2-w/2, y+height/2+fontSize/2);

```

```
Overlay.show;  
settings = color+" "+lineWidth+" "+fontSize+" "+addN;  
call("ij.Prefs.set", key, settings);  
}
```