

***Análise de imagens
digitais para fins
analíticos: Aplicações
ambientais e tecnológicas***



International
Year of Light
2015

Juliano Passaretti Filho

Araraquara

2015

Juliano Passaretti Filho

Análise de imagens digitais para fins analíticos: Aplicações ambientais e tecnológicas

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

P286a Passaretti Filho, Juliano
Análise de imagens digitais para fins analíticos:
aplicações ambientais e tecnológicas / Juliano Passaretti
Filho – Araraquara : [s.n], 2015
161 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Arnaldo Alves Cardoso

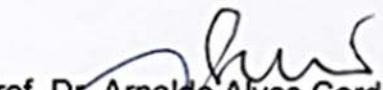
1. Química atmosférica. 2. Dióxido de nitrogênio
atmosférico. 3. Dióxido de enxofre atmosférico. 4. Imagens
digitais. 5. Alimentos - análise. I. Título.

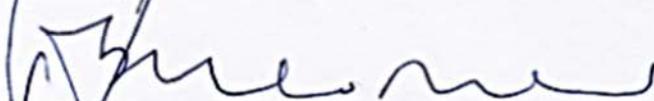
JULIANO PASSARETTI FILHO

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

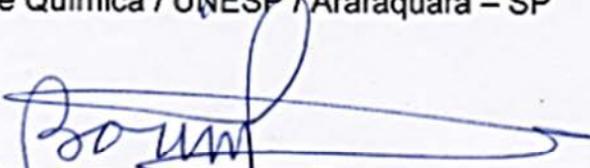
Araraquara, 28 de agosto de 2015.

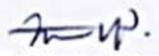
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP


Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia / USFCar / São Carlos - SP


Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP


Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / USP / Piracicaba - SP


Profª. Drª. Fabíola Manhas Verbi Pereira
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP

Súmula Curricular

Dados pessoais

Nome Juliano Passaretti Filho

Endereço profissional

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara
R. Francisco Degni, s/n Departamento de Química Analítica
Bairro Quitandinha - Araraquara
14800-900, SP - Brasil
Telefone: 016 33016600

Endereço eletrônico

E-mail para contato: juliano.passaretti@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2011 - 2015** Doutorado em Química Analítica (Arar.).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Análise de imagens digitais para fins analíticos: Aplicações ambientais e tecnológicas.
Orientador: Arnaldo Alves Cardoso
- 2009 - 2010** Mestrado em Química Analítica (Arar.).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Desenvolvimento de método analítico para determinação de ozônio residual em água utilizando a técnica de fluorescência e estudo da viabilidade da construção de um sensor fluorimétrico em uma gota de solução para determinação de ozônio em ar.
Orientador: Arnaldo Alves Cardoso
- 2004 - 2008** Graduação em Química - Licenciatura.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Avaliação de Hidrolises Enzimáticas no Carço de Abacate para a Produção de Etanol
Orientador: Manoel Lima de Menezes

Formação complementar

2014 - 2014 Extensão universitária em Processamento de imagens Numpy.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil

Atuação profissional

Instituto de Química Unesp Araraquara - IQ - UNESP

2011 – 2015 Bolsista Doutorado CNPq.

2009 - 2010 Bolsista Mestrado CNPq,

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

2014 - 2014 Bolsista, Professor Temporário, Carga horária: 12 horas semanais,

Cursinho Popular 1° de Maio FEB-UNESP-Bauru

2008 - 2008 Voluntário, Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 10 horas semanais

Áreas de atuação

1. Química Analítica
 2. Análise de gases
 3. Instrumentação Analítica
 4. Processamento de imagens
-

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. PASSARETTI FILHO, J., et al. Development of a simple method for determination of NO₂ in air using digital scanner images. *Talanta (Oxford)*. , v.140, p.73 - 80, 2015.

2. Felix, Erika P., PASSARETTI FILHO, J., Garcia, Gabriel et al.
A new fluorescence method for determination of ozone in ambient air. *Microchemical Journal (Print)*. , v.99, p.530 - 534, 2011.

3. Cesarino, Ivana, Moraes, Fernando C., PASSARETTI FILHO, J., Machado, Sergio A. S. et al. A New Indirect Electrochemical Method for Determination of Ozone in Water Using Multiwalled Carbon Nanotubes. *Electroanalysis (New York, N.Y.)*. , v.23, p.1512 - 1517, 2011

4. Guinesi, A. S., Andolfatto, C., Bonetti Filho, I., PASSARETTI FILHO, J. et al.
Ozonized oils: a qualitative and quantitative analysis. *Brazilian Dental Journal (Impresso)*. , v.22, p.37 - 40,

5. Sequinel, Rodrigo, Hatanaka, Rafael Rodrigues, Gualtieri, Carlos Eduardo, PASSARETTI FILHO, J. et al.

Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. *Química Nova (Impresso)*. , v.33, p.2226 - 2232, 2010.

6. MENEZES, Manoel Lima de, LOPES, L., F., PASSARETTI FILHO, J.
Síntese de biodiesel empregando óleo de abacate. *Analytica (São Paulo)*. , v.8, p.68 - 78, 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. PASSARETTI FILHO, J., MENEZES, Manoel Lima de, TOLEDO-PINTO, E. A.
Avaliação de hidrólises enzimáticas no caroço de abacate para a produção de etanol In: 5º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2008, Lavras - MG.

2. Avaliação de hidrólises enzimáticas no caroço de abacate para a produção de etanol. Lavras - MG: UFLA: Universidade Federal de Lavras, 2008. v.5. p.1 - 421
Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

3. PASSARETTI FILHO, J., L.A.O. NUNES, CARDOSO, A. A.
Construção e avaliação de um sensor fluorimétrico para a determinação de ozônio em ar In: 35ª Reunião anual da sociedade brasileira de química (SBQ), 2012, Águas de Lindóia.

4. PASSARETTI FILHO, J., CARDOSO, A. A.
Desenvolvimento de método analítico para a determinação de NO₂ atmosférico utilizando processamento de imagens digitais In: 5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2012, Montevideo

5. PASSARETTI FILHO, J., PASSOS, G. A., Cardoso, Arnaldo A.
Desenvolvimento de método analítico para a determinação de NO₂ atmosférico utilizando tratamento de imagens In: VI EnqAmb - Encontro Nacional de Química Ambiental, 2012, Londrina.

6. PASSARETTI FILHO, J., L.A.O. NUNES, CARDOSO, A. A.
Determination of ozone in water and air using a fluorescence technique In: Euroanalysis 2011, 2011, Belgrad. Euroanalysis 2011. , 2011.

7. Garcia, G., PASSARETTI FILHO, J., CARDOSO, A. A.
Development of a sensitive passive sampler using indigo trisulfonate sorbent for the determination of tropospheric ozone In: Euroanalysis, 2009, Austria.

Apresentação de trabalho e palestra

1. PASSARETTI FILHO, JULIANO, Cardoso, Arnaldo A.
Determinação de SO₂ por imagens digitais, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

2. DIAS, P. R., PASSARETTI FILHO, J., SOUZA, M. L. et al. Influência da atmosfera na dispersão e decomposição de fósforo inorgânico e orgânico hidrolisáveis em região agroindustrial: identificando fontes, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. FRANCISCO, K. C. A., PASSARETTI FILHO, J., CARDOSO, A. A.
Desenvolvimento de método simples utilizando um scanner de mesa para a determinação de sulfito em vinhos brancos SOUZA, M. L. et al. Nova proposta para o preparo de amostra e aplicação de métodos de calibração multivariado (PLS regress e PCR) para determinação de fósforo inorgânico e orgânico hidrolisáveis em material particulado, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

5. PASSARETTI FILHO, J., Garcia, Gabriel, CARDOSO, A. A.
Aplicação de sensores CMOS e CCD em medidas colorimétricas, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
6. PASSARETTI FILHO, J., CARDOSO, A. A.
Digital image-based method for determination of nitrogen dioxide in the atmosphere, 2013.
(Congresso, Apresentação de Trabalho)
7. PASSARETTI FILHO, J.
Construção e avaliação de um sensor fluorimétrico para a determinação de ozônio em ar, 2012.
(Congresso, Apresentação de Trabalho)
8. PASSARETTI FILHO, J., CARDOSO, A. A.
Desenvolvimento de método analítico para a determinação de NO₂ atmosférico utilizando processamento de imagens digitais, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
9. PASSARETTI FILHO, J., PASSOS, G. A., CARDOSO, A. A.
Desenvolvimento de método analítico para a determinação de NO₂ atmosférico utilizando tratamento de imagens, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
10. PASSARETTI FILHO, J., L.A.O. NUNES, CARDOSO, A. A.
Determination of ozone in water and air using a fluorescence technique, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
11. Guinesi, A. S., Andolfatto, C., PASSARETTI FILHO, J., Madeira-Neto, P. et al.
Avaliação química qualitativa da composição de óleos ozonizados para uso na terapia endodôntica, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
12. PASSARETTI FILHO, J., CARDOSO, A. A.
Construção de amostrador ativo para a determinação de ozônio troposférico utilizando uma membrana microporosa de teflon, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
13. PASSARETTI FILHO, J., Garcia, G., Selisa Rollins et al.
Construção e calibração amostrador passivo utilizando a técnica de fluorescência, 2010.
(Congresso, Apresentação de Trabalho)
14. Sequinel, R., PASSARETTI FILHO, J., Flumignan, D. L. et al.
Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
15. PASSARETTI FILHO, J., CARDOSO, A. A.
Determinação de ozônio residual em amostras de água utilizando a técnica de fluorescência, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
16. PASSARETTI FILHO, J., CARDOSO, A. A.
Determinação de ozônio residual em amostras de água utilizando a técnica de fluorescência, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
17. PASSARETTI FILHO, J., MENEZES, Manoel Lima de

Avaliação da extração de óleos na polpa de abacate utilizando ácido sulfúrico, 2008. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

18. PASSARETTI FILHO, J., MENEZES, Manoel Lima de, TOLEDO-PINTO, E. A. Avaliação de hidrólises enzimáticas no caroço de abacate para a produção de etanol, 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

19. PASSARETTI FILHO, J., MENEZES, Manoel Lima de Emprego do Caroço de Abacate para a Produção de Etanol, 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Programa de computador sem registro

1. PASSARETTI FILHO, J. Sistema de alinhamento de cores baseado no CIE 1931, 2013

Programa de computador sem registro

1. PASSARETTI FILHO, J.

Sistema de alinhamento de cores baseado no CIE 1931, 2013

Educação e Popularização de C&T

Apresentação de trabalho e palestra

1. PASSARETTI FILHO, J., ZULIANI, S. R. Q. A. Oficinas Pedagógicas aplicada em escolas públicas, 2008. (Apresentação de Trabalho)

Organização de evento

1. PASSARETTI FILHO, J., UCHIDA, Marcelo Adorno, KATAOKA, Francini Pizzinato et al. V Semana de Química da Unesp Bauru, 2008. (Outro, Organização de evento)

2. UCHIDA, Marcelo Adorno, PASSARETTI FILHO, J., GAVINO, A. et al. IV Semana da Química da Unesp de Bauru, 2007. (Outro, Organização de evento)

3. UCHIDA, Marcelo Adorno, SILVA, Letícia Caetano da, KATAOKA, Francini Pizzinato, PASSARETTI FILHO, J. et al. IV Semana da Química do Centro-Oeste Paulista, 2006. (Congresso, Organização de evento)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Arnaldo Alves Cardoso, pelos ensinamentos e amizade.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Aos professores do Instituto de Química por participarem direta e indiretamente em minha formação.

Aos funcionários do Instituto de Química, pelo trabalho prestado.

Ao Professor Sadao e seu aluno Marco Antônio por disponibilizarem tempo e equipamentos para as análises de imagens de superfícies metálicas.

A Professora Fabiola Pereira pelo suporte e auxílio em quimiometria.

Ao Marco Donizete Peliçon, amigo e especialista em química orgânica, responsável por ajudar na interpretação de espectros de RMN.

Ao Andrew G. Allen pelas conversas, auxílios técnicos e amizade.

A Michele Souza, Maria Angélica, Paula, Gláucia e Luciana pela grande amizade e auxílios em alguns problemas do laboratório.

A Karen Almeida pela amizade e participação em conjunto nos experimentos para determinação de sulfito em bebidas.

Ao Luís Moreira Gonçalves por ceder o amostrador líquido-gás-líquido.

Aos amigos de laboratório João, Letícia e Vinícius, pelas conversas e os anos de convivência.

Aos amigos Rodrigo Sequinel, Amauri Alves, Murilo, Fernandinho, Luizinho, João Bronzel, Marcão, Oalas, Gabriel, Cibele, Verônica, Carla, Gislaine e Piá.

Aos meus pais, Juliano e Odete.

As minhas irmãs, Renata e Raquel, e minha sobrinha Natasha.

A Kelli Mesquita pelo companheirismo, amizade e amor que preenchem a minha vida de alegria (Obrigado por existir e tornar-me uma pessoa melhor).

“The task is...not so much to see what no one has yet seen; but to think what nobody has yet thought, about that which everybody sees.”

Erwin Rudolf Josef Alexander

“If you want to have good ideas you must have many ideas. Most of them will be wrong, and what you have to learn is which ones to throw away.”

Linus Carl Pauling

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos sensíveis, seletivos, de custo reduzido com potencial para serem utilizados em aplicações ambientais e tecnológicas. Os princípios utilizados para determinação destes de diferentes analitos são baseados em reações de soluções aquosas, que produzem espécies coloridas, utilizadas como base de métodos óticos, envolvendo a aquisição e o processamento de imagens digitais. Os experimentos mostraram a viabilidade da utilização de sensores óticos de aquisição de imagens digitais em sensores CMOS e CCD. Como resultados preliminares foram comparados sinais analíticos obtidos por espectrofotômetro e imagens digitais para determinação de nitrito, fosfato inorgânico e ozônio residual em água. As diferentes determinações mostraram que os resultados não diferem entre si com índice de confiança de 95%. Os resultados obtidos nos procedimentos experimentais que resultaram em dados confiáveis foram base para que fossem estabelecidos novos métodos para aplicações ambientais, como a determinação de SO₂ e NO₂ atmosférico

Para a determinação de NO₂ em ar foi utilizada a reação Griess-Saltzman (GS) com formação de corante róseo com absorção em 540 nm. As amostragens de ar foram feitas utilizando um cartucho C18 impregnado com TEA (trietanolamina) com vazão de 0,5 L min⁻¹ e tempo de 60 min. O analito foi solubilizado com solução alcoólica de metanol/ água e recolhido em balão de 10,0 mL contendo 4,0 mL do reagente GS. Uma alíquota de 4,0 mL foi colocada em uma superfície de acrílico e a imagem da solução foi digitalizada com um *scanner*. O processamento das imagens obtidas resultou em sinais analíticos proporcionais ao NO₂. O limite de detecção foi de 12 ppb, com um erro relativo de 7,0 % e coeficiente de variação de 3,2 %. Para melhorar o limite de detecção o volume de solução foi otimizado (300 µL) e novo procedimento de aquisição e tratamento das imagens digitais foi proposto e isto resultou na redução do limite de detecção para 4,5 ppb. Como resultado foi possível tornar o método mais sensível o que possibilita uma maior faixa de aplicação no ambiente e ainda com a vantagem de minimização de resíduos gerados.

Para determinação de SO₂ atmosférico foi feita uma etapa inicial de amostragem com a coleta do gás e fixação do enxofre na forma de sulfato. Com isto foi possível eliminar a interferência de NO₂ e outros oxidantes. Para o desenvolvimento do método foram gerados padrões de SO₂ obtidos por tubo de permeação certificado. A reação utilizada foi a que ocorre entre sulfato e cloraniliato de bário gerando um produto colorido (róseo) com absorção em 540 nm. Com a utilização de modelos de calibração multivariado, utilizando PCR (*principal component regression*) e PLS regress (*partial least squares regression*) foi possível quantificar o sulfato

na amostra. O modelo utilizando PLS regress apresentou melhor performance na previsão dos resultados com erro relativo de 8,0 %.

Outra possibilidade de aplicar o método do SO₂ é fazer sua adaptação para aplicação na indústria de serviços. Um problema analítico muito comum é a determinação de sulfito livre em vinhos. Para utilizar o método nesta matriz adaptou-se um sistema de extração líquido-gás-líquido contendo uma membrana de teflon para a difusão do gás SO₂ e coleta do gás em solução de água oxigenada. O S (IV) presente na bebida é emitido como gás SO₂ pela acidificação do meio com ácido fosfórico. O sulfato formado foi determinado através da reação com o sal de cloraniliato de bário (BaCLA) que forma um produto que absorve na região do UV, com absorções máximas em 212 e 331 nm. O método para o sulfito livre em bebidas apresentou um limite de detecção de 6,3 mg L⁻¹, erro relativo de 7,5 % e coeficiente de variação de 6,0 %.

Palavras Chaves: Imagens Digitais; Dióxido de enxofre; Dióxido de Nitrogênio; Análise colorimétrica; Visão Computacional; Sulfito em bebidas.

ABSTRACT

This work describes the development of sensitive, selective, and inexpensive methods with potential for use in environmental and technological applications. The techniques are based on reactions in aqueous solution that produce colored species that can be measured optically by means of the acquisition and processing of digital images. The experiments demonstrated the viability of using CMOS and CCD sensors to acquire digital images. In preliminary tests, comparison was made of analytical signals obtained using the digital image method and spectrophotometry, for measurements of nitrite, inorganic phosphate, and residual ozone in water. No statistically significant differences were observed between the two techniques, at a confidence level of 95%. The reliability of the results obtained using the new method then enabled new methods to be developed for environmental applications such as the determination of atmospheric SO₂ and NO₂.

The determination of NO₂ in air employed the Griess-Saltzman (GS) reaction, in which a rose-colored product is formed that absorbs at a wavelength of 540 nm. Air sampling was performed using C18 cartridges impregnated with triethanolamine (TEA), at a flow rate of 0.5 L min⁻¹ for 60 min. The analyte was solubilized using an alcoholic solution of methanol/water, and then transferred to a 10.0 mL volumetric flask containing 4.0 mL of the GS reagent. A 4.0 mL aliquot was placed on an acrylic surface and digital images of the solution were acquired using a scanner. Processing of the images then resulted in analytical signals that were proportional to the NO₂ concentration. The detection limit was 12 ppb, the relative error was 7.0 %, and the coefficient of variation was 3.2 %. In order to improve the detection limit, the solution volume was optimized (300 µL) and a new procedure for acquisition and treatment of the digital images was implemented, resulting in a reduction of the detection limit to 4.5 ppb. The greater sensitivity of the technique enabled a wider range of environmental concentrations to be determined, while at the same time minimizing the amount of chemical waste generated.

Atmospheric SO₂ was determined using an initial sampling step in which the sulfur was fixed in the form of sulfate, hence eliminating the interference of NO₂ and other oxidants. Development of the method employed gaseous SO₂ standards generated using a certified permeation tube. The reaction between sulfate and barium chloranilate resulted in a rose-colored product that absorbed at 540 nm. Multivariate calibration models, with principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLS), were used to quantify sulfate in the samples. The PLS model provided the best results, with a relative error of 8.0%. A further possible application of the SO₂ method is its adaptation for use in the food and drink industry. A common analytical problem is related to the determination of free sulfite in wines.

In order to use the new method applied to this matrix, an adapted liquid-gas-liquid extraction system was employed, containing a Teflon membrane for the diffusion of gaseous SO₂, which was then collected in a solution of oxygenated water. The S(IV) present in the wine was emitted as SO₂ after acidification of the medium with phosphoric acid. The sulfate formed was determined by reaction with the barium chloranilate salt, generating a product that absorbed in the UV region, with absorption peaks at 212 and 331 nm. The method for determination of free sulfite in drinks presented a detection limit of 6.3 mg L⁻¹, a relative error of 7.5 %, and a coefficient of variation of 6.0 %.

Keywords: Digital Image; Sulfur dioxide; Nitrogen dioxide; Colorimetric analysis; Computer Vision; Sulphite in beverages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variação da cor observada para um objeto iluminado de formas distintas.....	30
Figura 2. a) Cada percepção de “cor pura” corresponde a um determinado comprimento de onda. b) Interação luz matéria não permite reconstruir o espectro de reflexão apenas pela cor observada.	31
Figura 3. Diagrama geral de aquisição e reprodução de imagens digitais	33
Figura 3. Sinais observados para diferentes concentrações do corante índigo.....	41
Figura 4. Variação da intensidade do sinal da escala de cinza em função da concentração de corante índigo.	42
Figura 5. Variação de Sinais em escala de cinza obtidos para diferentes caminhos óticos.....	43
Figura 6. Variação do sinal analítico em função da área escolhida para obtenção do sinal....	44
Figura 7. Variação do desvio padrão para cada área analisada.	45
Figura 8. Variação do sinal analítico para diferentes concentrações do corante.....	46
Figura 9. Scanner HP Scanjet G 4050 contendo os spots com soluções de corante utilizado para as medidas quantitativas de concentração.	47
Figura 10. (a) Imagem digital obtida para as soluções de corante índigo. (b) escolha da região de aquisição de sinal. (c) especificação Branco de referência do scanner e variação de sinais entre duas concentrações.	48
Figura 11. Curvas analíticas obtidas utilizando as soluções com diferentes concentrações do corante índigo.	49
Figura 12. (a) Representação dos espectros de reflectância das cores primárias Azul, Verde e Vermelho e a faixa espectral relativo a cor branca. (b)Valores tristimulos e representação gráfica das funções X, Y, e Z ao longo do espectro eletromagnético visível (adaptado de GAGE, 1999).-	51
Figura 13. Diagrama de cromaticidade CIE 1931(adaptado de GAGE, 1999).	53
Figura 14. Representação do modelo de normalização da escala O.D. para medidas quantitativas.....	55
Figura 15. Diagrama do sistema ótico de um espectrofotômetro Hitachi U2000 a.....	56
Figura 16. Sensor CMOS webcam logitech®.	56
Figura 17. Esquema de distribuição do filtro de bayer montado sobre um sensor CMOS.	57
Figura 18. Imagens de feixes monocromáticos de luz em diferentes comprimentos de onda adquiridos com o sensor CMOS.....	58

Figura 19. Coordenadas de cromaticidade máxima e média do sensor CMOS para radiações monocromáticas.....	59
Figura 20. Imagens de feixes monocromáticos de luz em diferentes comprimentos de onda adquiridos com o sensor CCD.....	60
Figura 21. Coordenadas de cromaticidade máxima e média do sensor CCD para radiações monocromáticas.....	60
Figura 22. Representação do esquema do sistema de aquisição de imagens de soluções usando uma webcam e a foto do dispositivo montado.	62
Figura 23. Esquema do sistema de aquisição de imagens de soluções usando um scanner.....	63
Figura 24. a) Reação entre molibdato de amônio e ortofosfato e formação do corante azul de molibdênio. b) Espectro de absorção do azul de molibdênio ($PO^4 = 0,012\text{mmolL}^{-1}$).....	64
Figura 25. Diagramas de cromaticidade e curvas analíticas obtidas para os sensores CCD e CMOS para medidas colorimétricas para fosfato em água.	66
Figura 26. a) Reação De Griess. b) Espectro de absorção do produto de reação formado ($NO_2 = 6,0\text{ mmolL}^{-1}$).....	67
Figura 27. Diagramas de cromaticidade e curvas analíticas obtidas para os sensores CCD e CMOS para medidas colorimétricas de nitrito em água.....	69
Figura 28. Diagramas de cromaticidade e curvas analíticas obtidas para os sensores CCD e CMOS para medidas colorimétricas de ozônio residual em água.	71
Figura 29. Diagrama representando as principais reações de oxidação dos compostos de nitrogênio na troposfera (a) Oxidação de compostos orgânicos voláteis (COV) na presença da luz do dia. A oxidação é iniciada pelo ataque dos radicais OH em moléculas de COV, seguidos da adição de O_2 para a formação do radical RO_2 . (b) Oxidação de compostos orgânicos voláteis durante a noite. A oxidação é iniciada pelo ataque do radical NO_3 em moléculas de COV, seguidos da adição de O_2 para a formação do radical RO_2 (Adaptado de(SEINFELD; PANDIS, 1998)).	78
Figura 30. Sistema de geração de atmosfera padrão com diferentes concentrações de NO_2 . 1 – Entrada de ar comprimido, 2 e 3 – Colunas de purificação de ar, 4 – Fluxo de diluição, 5 – Fluxo de permeação, S – Serpentina, TP – Tubo de permeação, 6 – Banho termostaticado, 7 – Fluxo de descarte, 8 – Fluxo de amostragem, CF – Controladores de fluxo.....	83
Figura 31. Esquema da sequência de cálculos adotados para conversão da imagem digitalizada para obtenção da equação que resulta na intensidade média em escala de cinza.....	86
Figura 32. Esquema geral de recorte e aquisição dos histogramas.	87

Figura 33. Histograma característico de imagens com dimensões de 27 x 27 pixel e representação da seleção dos valores máximos de R, G e B e conversão em escala de cinza (<i>grayscale</i>).....	88
Figura 34. Esquema de amostragem do dióxido de nitrogênio em ambiente externo. a) Cartucho de amostragem, b) controlador de vazão, c) totalizador de volume e d) bomba de Sucção.....	89
Figura 35. (a) Tempo e (b) Vazão de amostragem em função do sinal analítico medido.	90
Figura 36. Boxplot representado variâncias encontrada entre sinais da escala cinza para diferentes concentrações de NO ₂ (a) e para uma mesma concentração de NO ₂ (b).....	93
Figura 37. Esquema de processamento das imagens e utilização dos dados para obtenção da curva analítica para determinação de NO ₂ em ppb.....	95
Figura 38. Mecanismo proposto para reação de GS.....	96
Figura 39. Diagrama de cromaticidade (a) solução de cores que podem ser aceitas para quantificação e (b) soluções que não podem ser consideradas para quantificação.	97
Figura 40. Fluxograma descrevendo o algoritmo qualitativo para tomada de decisão	99
Figura 41. Diagrama representado os diferentes estados de oxidação dos compostos de enxofre na troposfera e sua progressão resultando na formação do dióxido de enxofre (S+IV)(Adaptado de (WAYNE, 2000)).....	104
Figura 42. Diagrama dos métodos utilizados para processar e interpretar os sinais de imagem pelo método univariado aplicando filtros digitais	110
Figura 43. Diagrama do método multivariado utilizado para processar e interpretar os sinais de imagem aplicando a decomposição de falsas cores.....	111
Figura 44. Espectro de infravermelho médio CLA e BaCLA.	112
Figura 45. Espectros de RMN de ¹³ C no estado sólido do CLA(1 ---) e do BaCLA(2 ---) (9,4 Tesla).	113
Figura 46. Imagens de MEV e EDS do sal de BaCLA.....	114
Figura 47. Amostrador líquido-gás-líquido montado sobre um agitador magnético e esquema geral de funcionamento do amostrador nas etapas de adição dos reagentes e disposição da solução extratora. Foto e diagrama do sistema de amostragem líquido-gás-líquido e diagrama ilustrativo (a) Reator contendo amostra, (b) Seringa de injeção, (c) região reservada para estabelecer o equilíbrio da fase gasosa. (d) Líquido de extração (adaptado PACHECO et al., 2010).....	126
Figura 48. Perfil de absorção do ácido cloranílico de 700 – 190 nm	132

Figura 49. a) Espectro de absorção cloraniliato de bário após a adição de volumes conhecidos de uma solução padrão de sulfato de sódio $0,001583 \text{ molL}^{-1}$. b) Aumento gradual da variação de sinal absorção em 212 e 331 nm.....	133
Figura 50. Correlação entre mol de sulfato adicionado e mol equivalente ao ácido cloranílico em solução medido em 331 nm.	133
Figura 51. Curva analítica do método proposto.	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Figuras de mérito dos métodos utilizando os sensores CCD e CMOS.....	72
Tabela 2. Parâmetros analíticos (I) e (II) para determinação de NO ₂	91
Tabela 3 Comparação das variâncias ANOVA para as intensidades grayscale resultantes de diferentes imagens digitalizadas obtidas de diferentes concentrações de NO ₂	93
Tabela 4. Comparação de médias e desvio padrões para os sinais de intensidades grayscale obtidas de um conjunto de imagens 1,2 e 3 digitalizadas resultantes de uma mesma concentração de 34 ppb.	94
Tabela 5. Comparação geral entre uso do espectrofotômetro e o NO _x analyser para a concentração de NO ₂ em um ambiente externo.....	100
Tabela 6. Figuras de mérito analítico (método univariado).....	116
Tabela 7. Figuras de mérito analítico (método multivariado)	117
Tabela 8. Teores de SO ₂ livre recuperados de alíquotas de sal de sulfito de sódio.....	131
Tabela 9. Figuras de mérito analítico do método proposto.	134
Tabela 10. Teores de sulfito livre encontrados nas bebidas analisadas.....	135

ÍNDICE DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AOAC Association of Official Analytical Chemists

BaCLA Cloraniliato de Bário

CCD Charge-coupled device

CMOS Complementary metal-oxide-semiconductor

CLA Ácido Cloranílico

CIE Commission Internationale d'Eclairage

COS Sulfeto de carbonila

COV Compostos Orgânicos Voláteis

C.V. Coeficiente de variação

FAO Food and Agriculture Organization

FDA Food and Drug Administration

GS Griees Saltzman

IDA Ingestão Diária Aceitável

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants

Kps Produto de solubilidade

LD Limite de detecção

LQ Limite de quantificação

PCR Principal component regress

PLSRegress Partial last squares regress

SD Desvio padrão

UV Ultravioleta

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	TRANSFORMANDO E INTERPRETANDO OS SINAIS DE IMAGENS.....	28
2.1	IMAGENS DIGITAIS	28
2.1.1	A RELAÇÃO ENTRE COR E ESPECTRO VISÍVEL.....	29
2.1.2	AQUISIÇÃO E INTERPRETAÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS.....	32
2.1.3	MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS	33
2.2	OBJETIVOS.....	35
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.3.1	MEDIDAS DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO VISÍVEL E AQUISIÇÃO DE IMAGENS.....	36
2.3.2	MONTAGENS DOS SENSORES CCD E CMOS NO ESPECTROFOTÔMETRO	36
2.3.3	AQUISIÇÃO DE INFORMAÇÕES DOS SINAIS DE IMAGEM	36
2.3.4	PREPARO DE SOLUÇÕES PARA INVESTIGAÇÃO E CONSTRUÇÃO DO MODELO DE AQUISIÇÃO.....	37
2.3.4.1	Soluções do método de determinação de nitrito em água.....	37
2.3.4.2	Soluções do método para determinação de fosfato em água	37
2.3.4.3	Padronização e geração de ozônio residual em água.....	38
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
2.4.1	INTERPRETANDO E TRANSFORMANDO OS SINAIS DE IMAGENS NO MODELO RGB.....	40
2.4.2	CONVERSÃO PARA ESCALA DE CINZA	42
2.4.3	AVALIAÇÃO DO CAMINHO ÓTICO DA SOLUÇÃO DE CORANTE	42
2.4.4	AVALIAÇÃO DA ÁREA DE SELEÇÃO DE IMAGEM OBTIDA	43
2.4.5	UTILIZANDO UM SCANNER COMO FERRAMENTA ANALÍTICA	46
2.4.6	APLICANDO VISÃO COMPUTACIONAL EM ENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO.....	50
2.4.6.1	A utilização do modelo CIE em química analítica (Abordagem teórica).....	50
2.4.7	AVALIAÇÃO DETECTORES EMPREGADOS	55
2.4.8	EXPERIMENTOS DE QUANTIFICAÇÃO UTILIZANDO SCANNER E WEBCAM.....	61
2.4.9	APLICAÇÃO EM REAÇÕES QUÍMICAS	63
2.4.9.1	Fosfato solúvel em água	63
2.4.9.2	Nitrito em água	67
2.4.9.3	Ozônio residual em água.....	70
2.4.10	COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS E FIGURAS DE MÉRITOS ANALÍTICOS	72
2.5	CONCLUSÕES	73
3	DETERMINAÇÃO DE NO ₂ ATMOSFÉRICO POR IMAGENS DIGITAIS.....	75
3.1	OS PROCESSOS DE COMBUSTÃO E A POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA: UMA QUESTÃO DE ENERGIA	75
3.1.1	AS EMISSÕES DE POLUENTES ATMOSFÉRICOS	76
3.1.2	A QUÍMICA DO NO ₂ NA TROPOSFERA.....	77
3.1.3	UMA VISÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE DE NO ₂	80
3.2	OBJETIVOS.....	82
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	83
3.3.1	PREPARO DE AMOSTRAS GASOSAS PADRONIZADAS DE NO ₂	83
3.3.2	PREPARO DE REAGENTES	84
3.3.2.1	Reagente de Griess-Saltzman(GS).....	84
3.3.2.2	Solução trietanolamina absorvedora (TEA)	84
3.3.2.3	Preparo do Cartucho C18 de amostragem	84
3.3.2.4	Extração e reação para formação do corante.	84
3.3.3	MEDIDAS ESPECTROMÉTRICAS E UTILIZANDO A AQUISIÇÃO DE IMAGENS.....	84

3.3.4	CONVERTENDO IMAGENS EM SINAIS ANALÍTICOS MÉTODO DESENVOLVIDO PARA NO ₂ .	85
3.3.5	APLICAÇÃO NO AMBIENTE EXTERNO	88
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	90
3.4.1	OTIMIZAÇÃO DO TEMPO E VAZÃO DE AMOSTRAGEM	90
3.4.2	ETAPA DE CALIBRAÇÃO E DEFINIÇÃO DA FAIXA DE TRABALHO.	90
3.4.3	PROCESSAMENTO DE IMAGEM PARA BAIXAS CONCENTRAÇÕES E MENORES VOLUMES.	91
3.4.4	AValiação DE INTERFERENTES	95
3.4.5	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS	100
3.5	CONCLUSÕES	101
4	DETERMINAÇÃO DE SO ₂ ATMOSFÉRICO POR IMAGENS DIGITAIS	103
4.1	A QUÍMICA DO SO ₂ NA TROPOSFERA	103
4.1.1	MÉTODOS PARA DETERMINAR O SO ₂ ATMOSFÉRICO	105
4.2	OBJETIVOS	107
4.3	MATERIAS E MÉTODOS	108
4.3.1	MEDIDAS DE CARACTERIZAÇÃO	108
4.3.2	SOLUÇÕES E REGENTES	108
4.3.2.1	Síntese do cloraniliato de bário	108
4.3.3	GERAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO SO ₂ EM AR.	108
4.3.4	ETAPA DE COLETA DO SO ₂ (FIXAÇÃO QUÍMICA)	109
4.3.5	A REAÇÃO COLORIMÉTRICA	109
4.3.6	ANÁLISE MULTIVARIADA DE DADOS	110
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	112
4.4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO CLORANILIATO DE BÁRIO (BaCLA)	112
4.4.2	FIXAÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DO DIÓXIDO DE ENXOFRE	115
4.4.3	APLICAÇÕES ANALÍTICAS UTILIZANDO O PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS.	116
4.5	CONCLUSÕES	118
5	TÉCNICA DE EXTRAÇÃO L-G-L	120
5.1	ADIÇÃO DE SULFITO COMO CONSERVANTE	120
5.1.1	EFEITOS NA SAÚDE HUMANA	121
5.1.2	LEGISLAÇÃO E IMPACTO NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS	121
5.1.3	MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE SO ₂ EM BEBIDAS	121
5.1.4	MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-GÁS-LÍQUIDO	122
5.1.5	REAÇÃO ENTRE CLORANILIATO DE BÁRIO (BaCLA) E SULFATO	124
5.2	OBJETIVOS	125
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS	126
5.3.1	EQUIPAMENTOS E DISPOSITIVOS EMPREGADOS	126
5.3.2	REAGENTES E SOLUÇÕES	127
5.3.2.1	Solução de cloraniliato de bário (BaCLA)	127
5.3.2.2	Solução extratora peróxido de hidrogênio	127
5.3.2.3	Ácido fosfórico	127
5.3.2.4	Solução de cloreto de sódio	127
5.3.2.5	Solução padrão de sulfato de sódio	127
5.3.2.6	Solução padrão de ácido cloranílico	127
5.3.2.7	Sal de Sulfito de sódio	127
5.3.2.8	Solução padrão de sulfito de sódio	128
5.3.3	PROCEDIMENTO UTILIZANDO A TÉCNICA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-GÁS-LÍQUIDO	128
5.3.3.1	Eficiência do processo de extração	128

5.3.3.2	Propriedade óticas do ácido cloranílico	128
5.3.3.3	Reação entre cloraniliato de bário e sulfato de sódio	128
5.3.3.4	Reação do BaCLA para as alíquotas coletadas.....	129
5.3.3.5	Etapa de avaliação analítica.....	129
5.3.4	PROTOCOLO DE ANÁLISE PARA AS BEBIDAS.....	129
5.3.4.1	Procedimento para as amostras de vinho.....	129
5.3.4.2	Procedimento para as amostras de cerveja	130
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	131
5.4.1	EFICIÊNCIA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO.....	131
5.4.2	ESTUDO DAS PROPRIEDADES ÓTICAS DO ÁCIDO CLORANÍLICO.....	131
5.4.3	A REAÇÃO ENTRE CLORANILIATO DE BÁRIO E SULFATO DE SÓDIO	132
5.4.4	ETAPA DE AVALIAÇÃO ANALÍTICA.....	134
5.4.5	APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE CERVEJA E VINHOS.	135
5.5	CONCLUSÕES.....	136
6	CONCLUSÕES FINAIS.....	137
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	139
	REFERÊNCIAS	140
	ANEXOS.....	148
	APÊNDICE	154

Introdução

Considerações Gerais

1 INTRODUÇÃO

A atmosfera é composta majoritariamente por 78% de nitrogênio (N₂) e 21% de oxigênio (O₂) e componentes diversos em composição minoritária que podem se apresentarem na forma de líquidos, gases e sólidos (WAYNE, 2000).

As atividades humanas, resultam em emissões de diversos tipos de substâncias orgânicas e inorgânicas, em diferentes estados físicos de agregação. Essas substâncias emitidas pelas atividades antrópicas podem atingir níveis de concentrações que modificam o ambiente e podem causar prejuízos materiais e a saúde humana (FINLAYSON-PITTS; PITTS JR, 1989).

Diante deste problema o monitoramento das emissões destes compostos na atmosfera deve ser constante e controle dessas emissões passa a ser tarefa do poder público. Cabe a química analítica o papel de desenvolver métodos simples, confiáveis e sensíveis o suficiente para determinar espécies em concentrações críticas que afetam o ambiente (IONEL; POPESCU, 2010).

O monitoramento constante de poluentes na atmosfera é uma etapa essencial para reconhecer a composição da atmosfera e com isso observar variações que possam afetar o ambiente (IONEL; POPESCU, 2010).

O conjunto de dados adquiridos no monitoramento ambiental deve gerar uma visão espacial e temporal dos poluentes mensurados. Esses dados após sua interpretação tem a função de ajudar na identificação de fontes de emissão e reconhecer quando um composto legislado ultrapassa níveis estabelecidos (IONEL; POPESCU, 2010).

Os métodos utilizados em normas de monitoramento de diferentes espécies químicas em ar, devem apresentar qualidades analíticas como alta confiabilidade, precisão e exatidão. Porém, são desejáveis muitas vezes outras qualidades como custo reduzido de análise e simplicidade na aplicação para estabelecer um uso mais amplo deste processo de monitoramento (FINLAYSON-PITTS; PITTS JR, 1989).

A frequência e o tempo de coleta do analito dependem das características químicas da espécie na atmosfera. Substâncias mais reativas tem tempo de residência curto devido a sua reatividade. O tempo necessário para realizar uma amostragem deve ser suficiente para proporcionar perfis das diferentes concentrações analito estudado ao longo do dia (FINLAYSON-PITTS; PITTS JR, 1989).

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos analíticos para a determinação de dióxido de nitrogênio e dióxido de enxofre em ar. Estes poluentes foram escolhidos, pois geralmente

estas moléculas podem ser emitidas por processos de combustão e como consequência pode fornecer uma visão da ação do impacto das atividades humanas.

Um dos principais problemas analíticos para análises de rotinas do NO₂ e SO₂ é que em média essas moléculas possuem um tempo de residência de 24 e 48 horas respectivamente na troposfera (FINLAYSON-PITTS; PITTS JR, 1989). Os métodos desenvolvidos até o momento e abordados ao longo de texto apresentam uma frequência analítica, seletividade e limite de detecção adequados para este tipo de medida, entretanto são métodos que precisam de equipamentos específicos para realizar esse tipo de medidas.

A aquisição e manutenção destes equipamentos agrega um custo final embutido na análise. Para muitos países em desenvolvimento nem sempre é possível a aquisição imediata deste tipo de equipamentos para uma avaliação do impacto da atividade humana ou um monitoramento inicial de um ambiente em estudo.

Neste quesito a química analítica tem tomado um papel fundamental na resolução deste problema. Sensores eletroquímicos têm agregado destaque para diferentes tipos análise pela facilidade de aquisição de resultados e elevada frequência analítica, entretanto eletrodos geralmente tem um tempo de vida menor e não são indicados para análises diretas por longos períodos de tempo.

Em contraposição os métodos óticos de análise podem apresentar sensibilidade adequada, são mais robustos, e também possuem uma instrumentação relativamente simples, portátil e de baixo custo. Atrélado aos métodos óticos de análise, o uso de imagens digitais tem tomado um espaço relevante para a resolução de problemas analíticos.

Aliando o uso de visão computacional e métodos óticos de análise neste trabalho foi abordado o uso de sensores de aquisição presentes em *webcams* e *scanners* para aquisição de imagens de produtos coloridos provenientes de reações químicas.

No capítulo I são abordados aspectos básicos para a composição de cores do espectro visível e uma investigação inicial de sensores CCD (*charge-coupled device*) e CMOS (*complementary metal-oxide-semiconductor*) para medidas colorimétricas resultando no desenvolvimento de métodos para determinação de nitrito, fosfato solúvel e ozônio residual em água. Nos capítulos II e III foram desenvolvimentos de métodos analíticos para determinação de NO₂ e SO₂ atmosférico culminado em uma investigação e aplicação de sensores de imagens para resolução de problemas de cunho analítico-ambiental.

Devido a uma influência direta no desenvolvimento de técnicas de amostragem em fase gasosa, no capítulo 4, foi descrito um método com aplicações na indústria de serviços para a determinação de sulfito livre em bebidas alcoólicas.

Capítulo I

Transformando e interpretando os sinais de imagens

- *Conversão da imagem digital em sinal analítico*
- *Aplicações tecnológicas para a determinação de nitrito, fosfato inorgânico e ozônio residual em água*

2 TRANSFORMANDO E INTERPRETANDO OS SINAIS DE IMAGENS

A interpretação e processamento de sinais consiste em um ramo multidisciplinar para extrair ou tornar um sinal viável para estimativas ou medidas qualitativas e quantitativas. Essa importante área da ciência utilizada por engenheiros, químicos, físicos, matemáticos e profissionais de áreas a afins podem incluir diferentes tipos de sinais obtidos por diferentes sistemas de detecção podendo incluir sons, imagens, ondas de rádio, sinais de infravermelho, analisadores de massa, detectores que empregam detecção multicanal, etc (ORFANIDIS, 1995).

Os sinais adquiridos por diferentes instrumentos, apresentam inúmeras variáveis que quando analisadas em conjunto podem ser usadas para extrair informações relevantes para o experimento em estudo. O uso do processamento de sinais permite modificar o sinal tornando-o mais simples e útil para resolver o problema abordado.

O uso do processamento de sinais é comumente utilizado na análise de imagens digitais. Este tipo específico de sinal apresenta uma quantidade massiva de pontos de análise que muitas vezes pode dificultar ou inviabilizar seu uso por exemplo em um sistema de detecção e comparação entre sinais de amostras distintas (GONZALEZ; WOODS; EDDINS, 2004).

Desta forma, estudar e entender as configurações e geometrias dos experimentos utilizados na aquisição de imagens podem trazer informações úteis sobre sinal estudado e trazer novas perspectivas para o uso destes sinais na química analítica.

2.1 Imagens digitais

O conceito de imagem remete ao comportamento primitivo do ser humano, associando sempre a aspectos relativos à percepção e sensação visual (LAND, 1977). Uma imagem é uma representação da interação e reflexão entre luz e matéria e pode ser reproduzida levando como parâmetro principal a simulação da visão humana (LAND, 1983).

Para realizar essa tentativa de simular a visão humana, detectores do tipo CCD e CMOS são amplamente utilizados para a aquisição de imagens (WALTHAM, 2013). Estes sensores são materiais semicondutores e convertem a energia fóton em energia elétrica (CARLSON, 2002). Neste tipo de detecção a luz refletida pelo objeto é convertida em energia elétrica e a resposta obtida são alinhadas em coordenadas cartesianas composto por pontos denominados pixels. Cada pixel do sensor é capaz de indicar variações na intensidade de iluminação, pela luz refletida pelo objeto real. Quando alinhados no sistema de coordenadas x e y, em condições

específicas de transmissão da luz, esses sensores passam a fornecer como resposta uma matriz com informações relevantes da luz refletida ou absorvida pela matéria trazendo contribuições para diferentes áreas da ciência (OHTA, 2007).

Devido à grande quantidade de informações geradas por esses sensores, um recente campo da computação vem sendo desenvolvido nos últimos anos: a visão computacional.

A visão computacional é um ramo da ciência que desenvolve teorias e constrói sistemas de artificiais para obter e interpretar sinais de imagens obtidas na região do espectro visível ou imagens hiper espectrais (multidimensionais)(CROWLEY; CHRISTENSEN, 1995).

Imagens adquiridas no espectro visível são amplamente utilizadas para diferentes aplicações como o desenvolvimento de robôs autônomos, aplicações na indústria (certificação de qualidade) e a percepção e acompanhamento de eventos de natureza física.

Dento do universo de imagens no espectro eletromagnético na região do visível, acompanhar e perceber as variações de cores pode gerar variáveis relevantes para entender ou distinguir particularidades sobre a detecção de luz nos sensores empregados, cujo a resposta pode ser obtida na forma de uma imagem.

2.1.1 A relação entre cor e espectro visível

Em uma definição simples, o sentido da palavra cor expressa um fenômeno de percepção mental, intrínseco ao ser humano que depende da natureza física da luz que atinge o órgão visual. Este fenômeno do ponto de vista antropológico depende de aspectos psicológicos que são únicos para cada indivíduo. A chegada da luz aos olhos e sua eventual interpretação na forma de uma imagem é formada pela percepção do cérebro humano e dependem da vivência do indivíduo, transformando-a em uma sensação única para cada um que enxerga uma cena. Este aspecto pode ser considerado filosófico por que depende do indivíduo e sua tendência em perceber e identificar uma determinada cor e suas tonalidades (FEITOSA-SANTANA et al., 2006).

No domínio da física a definição de cor foge dos aspectos perceptivos humanos e passam a ser definidos como a diferença de frequência de dois feixes de luz. Essa diferença de frequência entre os feixes luminosos definem uma medida de “aparência de cor” para um observador. Para vias de normalizar o ensaio, o observador possui uma visão considerada média definida como normal(HARKNESS, 2006).

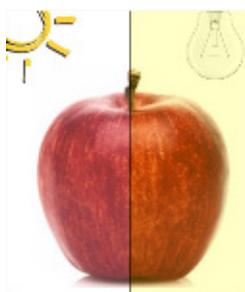
Assim, a cor propriamente dita só existe no cérebro do observador dependendo basicamente em um pensamento minimalista formado por três condições fundamentais: 1) a fonte luminosa 2) objeto iluminado e 3) detector empregado na aquisição.

A fonte luminosa escolhida deve ter a propriedade de emitir um conjunto de frequências que chegam até o objeto. O objeto reflete parte das radiações eletromagnéticas oriundas da fonte de emissão. Essa faixa de frequências modificadas pela interação luz x matéria chegam até o detector. O detector é responsável por gerar um sinal elétrico proporcional a luz incidente sobre sua superfície promovendo a conversão de energia de fótons para energia elétrica para ser medida. Essa aquisição é devido a uma perturbação promovida pelo estímulo luminoso oriundo da faixa espectral na qual o detector gera uma resposta mesurável(CROWLEY; CHRISTENSEN, 1995).

Um exemplo clássico deste comportamento está representado na Figura 1. Ao iluminarmos uma maçã utilizando a luz do sol parte desta radiação é absorvida pelo objeto devido a interações luz - matéria em nível atômico molecular e parte desta radiação é refletida. Ao chegar aos olhos do observador humano, essa luz refletida, promove uma associação a cor do objeto.

Porém se o mesmo corpo for iluminado por uma lâmpada de tungstênio que possui frequências distintas as observadas para a luz do sol, resultará em uma nova sensação aos olhos do observador com percepção de uma cor diferente a original(CROWLEY; CHRISTENSEN, 1995).

Figura 1. Variação da cor observada para um objeto iluminado de formas distintas.



Desta forma, deve-se considerar que a cor representada por um feixe de radiações luminosas que chegam até o objeto é diferente da cor apresentada pelo corpo que recebe está radiação. Assim, diferente da percepção humana, o conceito de cor pode ser atribuído a luz em propagação no espaço e independe da fonte que a gerou e a noção de cor de um corpo,

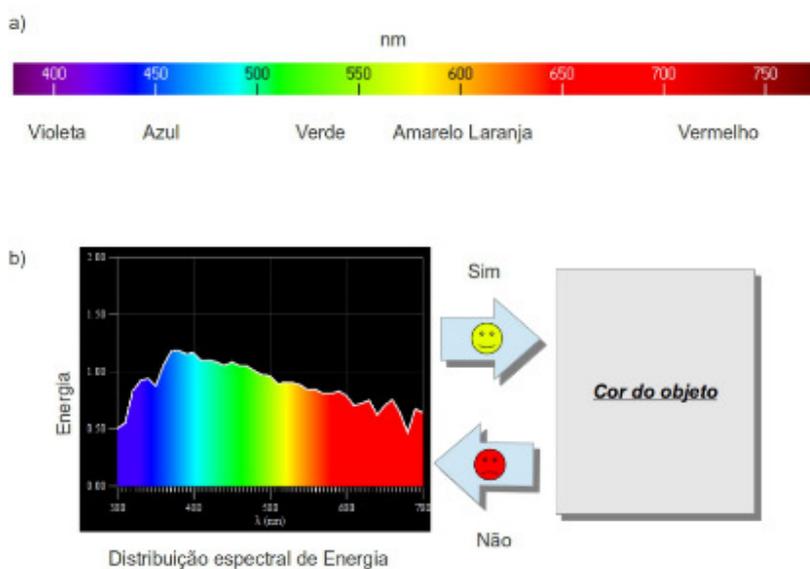
corresponde a luz refletida e absorvida interagindo com a matéria como representado na Figura 2(a), onde cada comprimento de onda na região do visível pode ser associado a uma cor correspondente a visão média humana.

As sensações de cor produzida por feixes monocromáticos sempre apresentam uma cor própria perfeitamente definida sempre correspondendo a um determinado comprimento de onda. As cores oriundas dos feixes monocromáticos são conhecidas como “puras” ou “simples”. Existem diversas tonalidades de cores ao longo do espectro visível que corresponde a faixa do espectro eletromagnético visível entre 380 e 760 nm.

Uma vez que a visão humana e consequentemente os métodos de visão computacional muitas vezes estão baseados na mistura de cores primárias, vale ressaltar que a cor atribuída a luz refletida por um objeto iluminado por luz branca, nem sempre pode ser diretamente associada a cor observada. Parte da luz emitida pode interagir com a matéria tornando a reflexão de luz um fenômeno extremamente complexo. No modelo de mistura de cores primárias, que imita a visão humana, as cores capturadas transmitem a uma resposta em função apenas pela mistura das cores vermelho, verde e azul, eliminando efeitos como trocas de energia entre a luz e o material iluminado(CROWLEY; CHRISTENSEN, 1995).

Portanto, a cor do objeto não pode ser usada para gerar de forma fidedigna a curva espectral de reflectância emitida pelo objeto como representado na Figura 2(b).

Figura 2. a) Cada percepção de “cor pura” corresponde a um determinado comprimento de onda. b) Interação luz matéria não permite reconstruir o espectro de reflexão apenas pela cor observada.



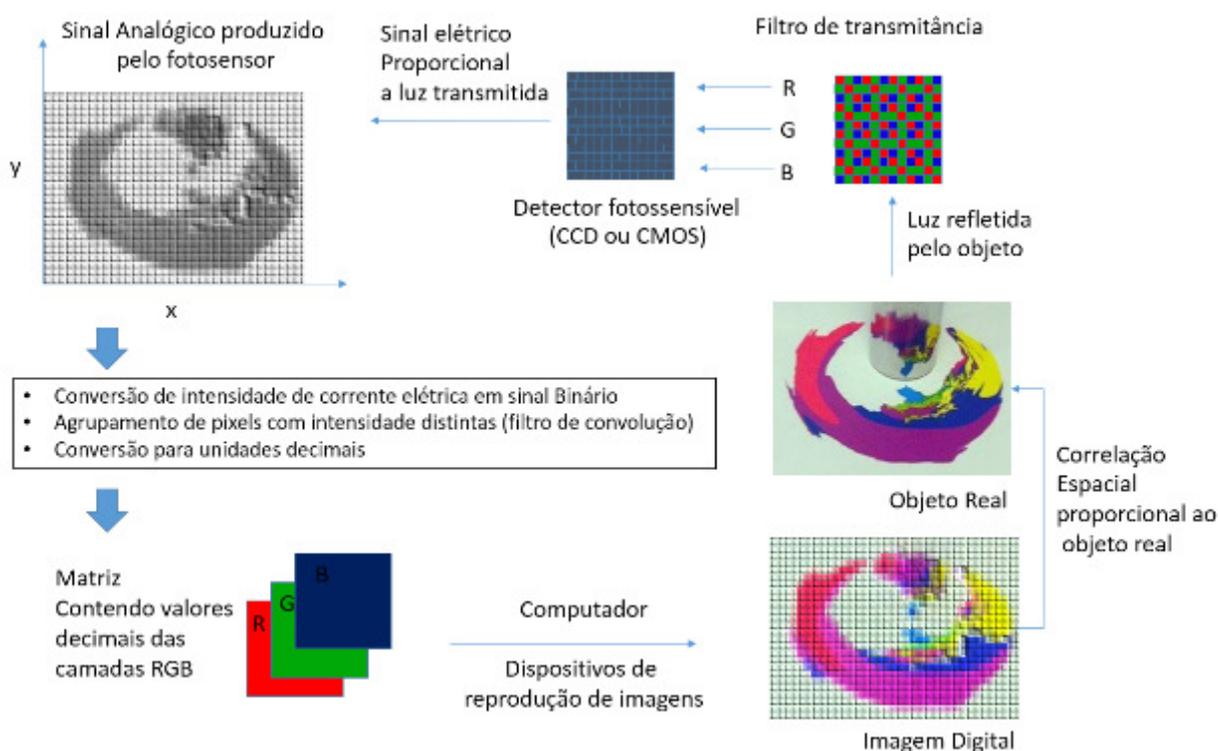
No domínio do estudo e entendimento físico do significado das cores dentre os vários estudos aceitos, as teorias de Maxwell e o diagrama de cromaticidade são amplamente utilizados para o entendimento e design de equipamentos e dispositivos cujo o principal intuito é medir e reproduzir cores com alta qualidade para os padrões de visão humana.

2.1.2 Aquisição e interpretação de imagens digitais

A imagem digital é um registro do fenômeno físico de espalhamento e reflexão da luz sobre um objeto. Essa luz refletida passa por um conjunto de filtros com as cores vermelho, verde e azul agrupados na forma de um mosaico e conhecido como filtro de *Bayer*. A luz ao ser transmitida através do filtro é absorvida em regiões individuais que compõem o filtro de *Bayer* (CROWLEY; CHRISTENSEN, 1995). A luz após a passagem pelo filtro é atenuada antes de chegar ao detector fotossensível (HARKNESS, 2006). Os detectores fotossensíveis empregados são constituídos por diversos pontos conhecidos como pixels. Cada ponto individual do detector é composto geralmente por um material semicondutor com propriedade de converter em energia elétrica a luz que incide sobre sua superfície (CARLSON, 2002).

O sinal elétrico adquirido (sinal analógico), é agrupado espacialmente e a intensidade de corrente elétrica é convertida em um número binário (sinal digital). A partir das diferentes transmitâncias adquiridas para cada pixel e utilizando como base o modelo das misturas de cores vermelho, verde e azul, o sinal convertido em unidades decimais entre 0 e 255 e alinhado em *layers* (camadas) (HARKNESS, 2006). As camadas adquiridas são equivalentes a matrizes numéricas que podem ser interpretadas por dispositivos de reprodução de imagem geral assim a imagem digital assim como representado na Figura 3.

Figura 3. Diagrama geral de aquisição e reprodução de imagens digitais



A imagem digital, apresenta proporções espaciais semelhantes a imagem original de partida. Por ser composta por inúmeros pontos a imagem pode ser representada por histogramas. Avaliar uma imagem por seu histograma é conveniente do ponto de vista estatístico e matemático, pois é possível determinar quali e quantitativamente vários parâmetros como ponto central, variação da distribuição, amplitude e simetria na distribuição dos dados. E como consequência determinar esses parâmetros pode auxiliar na interpretação de fenômenos físicos que podem ser observados em dispositivos que adquirem imagens.

2.1.3 Métodos analíticos utilizando imagens digitais

Diversos métodos analíticos vêm sendo utilizados e constantemente desenvolvidos baseados em reações químicas que produzem produtos coloridos. Estas reações visíveis ao olho humano podem ser facilmente registradas por sensores de webcams, scanners e câmeras digitais. A vantagem deste tipo de abordagem é a possibilidade de trabalhar com pequenos volumes de soluções ou materiais submetidos a medidas. Em trabalhos onde a quantidade de amostra é crítica muitas vezes é necessário reduzir o volume de solução para aumentar o sinal medido. Os métodos baseados em imagens digitais apresentam vantagens na detecção de cores

em superfícies de papel (CARDOSO; GARCIA; COLTRO, 2015; LI; TIAN; SHEN, 2010), identificação de reações colorimétricas utilizando aparelhos comerciais de scanner (KOMPANY-ZAREH; MANSOURIAN; RAVAAEE, 2002) ou a até a determinação em reações colorimétricas que geram precipitados coloridos (ZAMORA et al., 2011).

Estes métodos podem ser usados e aplicados em diferentes ensaios químicos baseados na variação de cor. Dentre as vantagens apresentadas é possível destacar: redução de volume, possibilidade de acompanhar a formação de precipitados e os métodos baseados em imagens digitais que empregam sensores de baixo custo.

O uso destes sensores torna possível a aplicação e desenvolvimento de diferentes plataformas e geometrias experimentais para acompanhar e determinar analitos em reações químicas colorimétricas.

2.2 OBJETIVOS

Os objetivos buscados no estudo de transformação e interpretação dos sinais de imagens digitais foram:

- Desenvolver uma estratégia de aquisição e análise de imagens digitais associadas a reações químicas colorimétricas.
- Processamento da imagem digital para conversão em sinal analítico.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Medidas de absorção molecular na região visível e aquisição de imagens

Para as medidas espectrométricas foi utilizado um espectrofotômetro UV-VIS U-2000 (Hitachi, Tokyo, Japão) e cubetas de quartzo com caminho ótico de 10.0 mm. O equipamento foi desmontado para adaptação e aquisição de imagens de feixes de luz monocromáticos na posição do fotodetector. Para a aquisição dos espectros de absorção foi utilizado na região do espectro eletromagnético visível foi utilizado espectrofotômetro UV-PROV 1800 (SHIMADZU, Kyoto, Japão), e cubetas de quartzo com caminho ótico de 10.0 mm. As imagens das soluções coloridas foram digitalizadas com o uso de um scanner Deskjet G4050 (Hewlett-Packard, USA) e os suportes para as soluções foram colocados na região central em um região retangular delimitado por bordas laterais de 4 cm para esquerda e 7 cm na parte superior com a mesma proporção para as bordas adjacentes.

Foi utilizado o software SANE (HAMMEL, 2003) com as funções de autocorreção desligada, luminosidade e contraste iguais para todas as imagens adquiridas na posição fixa de recorte retangular em $x_0 = 4$ cm, $y_0 = 7$ cm. Os procedimentos foram realizados em ambiente GNU/Linux e distribuição Ubuntu 12.04 LTS. A resolução de digitalização foi mantida em 300 dpi e 16 bits e na sequência as imagens foram processadas para conversão da imagem em sinal analítico. Os arquivos foram salvos em formato TIFF (Tagged Image File Format).

2.3.2 Montagens dos sensores CCD e CMOS no espectrofotômetro

Foram avaliados neste estudo dois tipos diferentes de sensores para aquisição de imagens: CMOS (webcam) e CCD (scanner). Estes sensores foram irradiados com feixes de luz monocromáticos entre 300 a 800 nm utilizando o sistema de emissão de luz e monocromadores de um espectrofotômetro Hitachi U2000.

2.3.3 Aquisição de informações dos sinais de imagem

O processamento das imagens foi utilizado o software ImageJ escrito em linguagem JAVA, o software *opensorce* foi usado para inspeções iniciais das imagens pois apresenta interface gráfica mais amigável ao usuário para obtenção de coordenadas para recorte e obtenção do perfil RGB da região de estudo (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004).

Após a etapa inicial exploratória as imagens foram processadas utilizando software Matlab R2014a (Mathworks) em conjunto com *toolkit* de processamento de imagens (Mathworks) pela facilidade em transformação das imagens em matrizes, cálculos matemáticos e automação das etapas de processamento (GONZALEZ; WOODS; EDDINS, 2004).

2.3.4 Preparo de soluções para investigação e construção do modelo de aquisição

Nos ensaios de quantificação foram escolhidas reações descritas no manual padrão de análises de águas. A determinação de nitrito em água pelo método 4500-NO₂⁻ (reação de Griess), ozônio residual em água pelo método 4500-O₃ (degradação do corante índigo trissulfonado) e a determinação de fosfato em água utilizando o procedimento 4500-P (reação com o complexo P-Mo) (CLECERI; GREENBERG; EATON, 1989). Após os ensaios, as imagens das soluções resultantes foram digitalizadas utilizando os sensores CMOS (webcam) e CCD (Scanner). Com a aquisição, as imagens foram processadas e convertidas em sinais de resposta em função da concentração do analito.

2.3.4.1 Soluções do método de determinação de nitrito em água

O reagente de Griess (MOORCROFT; DAVIS; COMPTON, 2001) foi preparado dissolvendo-se 5,000 g de ácido sulfanílico (Carlo Erba, Itália) em solução contendo 600 mL de água, 140 mL de ácido acético glacial (MAIA F.A., Brasil), 0,020 g de N-(1-naftil)-etilenodiamina (Merck, USA) O volume final de 1000 mL foi ajustado com água deionizada em um balão volumétrico.

A solução padrão de nitrito de sódio (Mallinckrodt Baker, México) foi preparada dissolvendo 5,816 g de nitrito de sódio em 1000,0 mL de água deionizada (Mili-Q, USA). A solução de nitrito de sódio foi padronizada por titulação iodométrica antes do uso.

2.3.4.2 Soluções do método para determinação de fosfato em água

A análise de fosfato em água foi realizada utilizando o método do azul de molibdênio (MURPHY; RILEY, 1962). O ácido sulfúrico 2,5 molL⁻¹ (Tedia, Estados Unidos) foi preparado diluindo 70 mL do ácido em 500,0 mL de água deionizada (Mili-Q, USA). O antimônio tartarato de potássio 4,4 x10⁻³ mol L⁻¹ (Gardena, New Brunswick) foi preparado dissolvendo 1,3715 g do sal em 400,0 mL de água deionizada (Mili-Q, USA). Após a completa dissolução o volume foi ajustado para 500,0 mL em um balão volumétrico. Para o preparo da solução de molibdato

de amônio $3,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (Merck, Brasil), foram dissolvidas 20,120 g do sal em 500,0 mL de água deionizada (Mili-Q, USA). A solução de ácido ascórbico $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ (Mallinckrodt Baker, França) foi preparada dissolvendo 1,760 g do sal em 100,0 mL de água deionizada (Mili-Q, USA).

A solução estoque fosfato $50,0 \text{ mgL}^{-1}$ foi preparada dissolvendo 0,210 g de dihidrogenofosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Mallinckrodt Baker, México) em 1000,0 mL de água deionizada (Mili-Q, USA).

2.3.4.3 Padronização e geração de ozônio residual em água

O gás ozônio foi gerado por efeito corona através da passagem de ar por colunas de carvão ativado e iodeto de potássio em um ozonizador de ar Gasozon (Gasozon, Brasil). O ozônio residual em água foi obtido borbulhando gás ozônio durante 20 minutos em um tubo impingir contendo 10,00 mL de água deionizada (Mili-Q, USA) em um banho termostatizado à $5,0 \text{ }^\circ\text{C}$. A padronização das soluções ozônio residual foram feitas por medidas espectrofotométricas na região do ultravioleta em 280 nm (HART; SEHESTED; HOLOMAN, 1983)

A solução estoque de índigo foi preparada pesando 0,0400 g de índigo trissulfonado de potássio (Sigma Aldrich, USA). Essa massa de corante foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100,0 mL, ao balão foram adicionados 50 mL de água deionizada (Mili-Q, USA), seguido por 1,00 mL de ácido fosfórico 85 % (SINC, Brasil). O volume do balão foi completado com a mesma água. Foram pesados 2,650 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 99,60% (Mallinckrodt Baker, México). A essa massa de sal foram adicionados 100 mL de água deionizada (Mili-Q, USA) e em seguida 1,80 mL de ácido fosfórico 85 % (SINC, Brasil). A solução resultante foi colocada em agitação e seu pH medido e ajustado para $2,2 \pm 0,1$ ($25,0^\circ\text{C}$) com a adição de ácido fosfórico. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 250,0 mL completado com água.

Para preparar a solução de trabalho de índigo trissulfonado foram transferidos 10,00 mL da solução estoque de índigo para um balão volumétrico de 100,0 mL. O volume do balão foi completado com PBS pH 2,2 ($\pm 0,1$). Uma alíquota de 1,00 mL da solução de trabalho foi transferida para um balão volumétrico de 10,00 mL e o volume do balão completado com água deionizada contendo ozônio residual.

Em um balão volumétrico de 10,00 mL foram adicionados 5,00 mL de uma solução contendo ozônio residual recém padronizado juntamente com 1,00 mL da solução de trabalho de índigo trissulfonado. O balão foi completado até o menisco com água deionizada.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Interpretando e transformando os sinais de imagens no modelo RGB

Para o estudo proposto inicialmente foi necessário entender como uma imagem obtida por instrumentos de aquisição poderia tornar-se um analítico mensurável. Este processo é complexo, pois uma imagem pode ser processada de diferentes maneiras (SOLOMON; BRECKON, 2011). O modelo matemático mais simples estudado foi considerar o objeto analisado como uma superfície de composição homogênea em toda sua extensão. Para isso os estudos foram baseados na aquisição de imagens de soluções coloridas, garantindo uma concentração constante do cromóforo por toda a área analisada.

O objeto que tem sua imagem digitalizada significa que ela é transformada em um modelo computacional de interpretação de cores, por exemplo o modelo RGB (SÜSTRUNK; BUCKLEY; SWEN, 1999) que expressa sua cor de forma reproduzi-la real ou parcialmente para dispositivos de interface humana como monitores e impressoras. No modelo de falsas cores RGB a cor analisada restringe o objeto a um conjunto de valores variáveis R, G e B (red, green e blue) para reproduzir uma determinada cor em um modelo aditivo. Por exemplo, um objeto de cor azul terá valores máximos para o componente blue quanto mais intensa for a tonalidade da cor azul, já os componentes G e R deverão sofrer um decréscimo proporcional para intensificar a cor azul do componente blue. Assim quanto maior a quantidade de moléculas que refletem a cor azul maior será o decréscimo de intensidade dos componentes G e R.

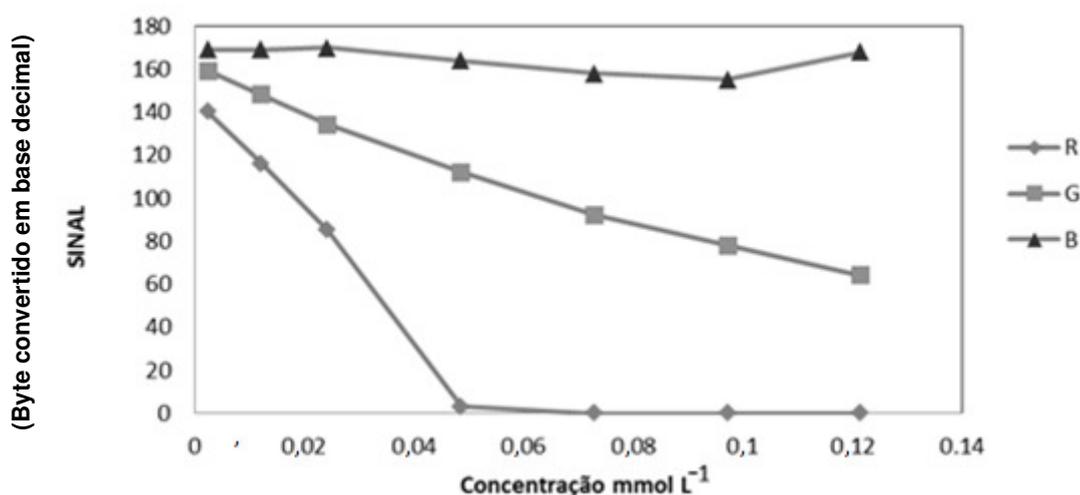
Em termos de qualidade da imagem, o melhor parâmetro encontrado para a obtenção foi em resoluções de 300 dpi para aquelas obtidas em câmeras digitais e entre 300 e 600 dpi para as obtidas em scanner de mesa convencional. O parâmetro dpi indica o número definido de pontos por polegada (dot per inch) que terá a imagem, quanto mais pontos por polegada maior será resolução e qualidade gráfica, porém os arquivos gerados apresentam tamanhos superiores a 50 megabytes tornando o processamento das imagens mais demorado para computadores ou dispositivos embarcados com capacidade de processamento limitadas.

Para desenvolver uma forma de observar o sinal de imagem como uma resposta analítica quantitativa foi realizado experimentos exploratórios utilizando uma solução aquosa do corante índigo trisulfonado. A solução de trabalho de índigo foi diluída em diferentes concentrações no intervalo de zero a 12,00 mmol L⁻¹ e colocadas em spots de acrílico transparentes de formato cilíndrico adaptado de um suporte de filtro (*filter holder*) Millipore catalogue no.M000037A0), em um volume fixo de 5,00 mL.

Os spots contendo soluções de corantes tiveram suas fotos digitalizadas, utilizando um scanner e sua imagem foi processada para obter os valores médios da composição em RGB das amostras em diferentes concentrações com o auxílio do software ImageJ (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004) em uma área de seleção fixa de 0,2 cm².

Os sinais adquiridos através das imagens no modelo RGB foram correlacionados para cada concentração de corante como apresentado na Figura 4. O objeto azul teve um comportamento similar ao descrito anteriormente, onde o componente blue praticamente não sofreu alteração. Já os sinais dos componentes G e R decresceram em função do acréscimo da concentração de corante.

Figura 4. Sinais observados para diferentes concentrações do corante índigo.



Os dados obtidos para os valores RGB podem trazer informações importantes se interpretados corretamente. Uma forma de interpretá-los quantitativamente é assumir que a concentração de corante é proporcional a intensidade dos valores RGB. Para padronizar o resultado, um artifício é a conversão da imagem colorida para a escala em tons de cinza utilizando o algoritmo matricial $f(\text{RGB})$ representado na equação 1:

$$f(\text{RGB}) = 0,2989 R + 0,5866 G + 0,1145 B \text{ (Equação 1)}$$

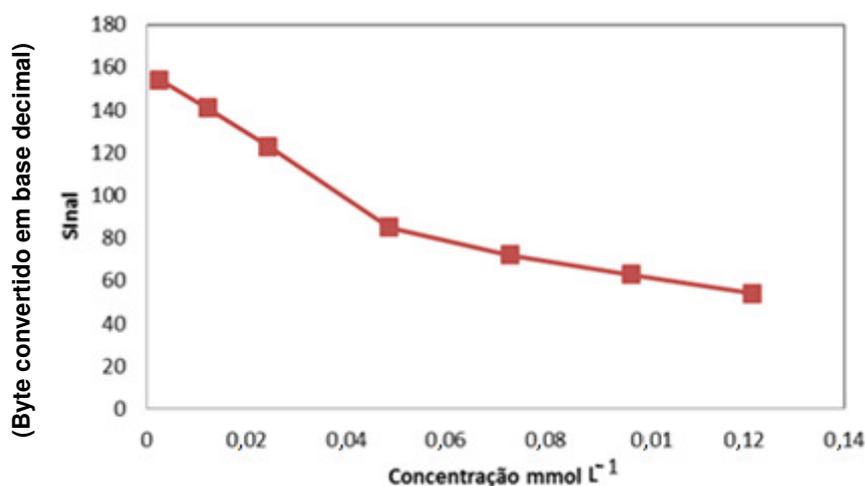
Onde $f(\text{RGB})$ é uma escala que varia de zero a 255, R é o componente vermelho, B é o componente azul e G o componente verde.

2.4.2 Conversão para escala de cinza

A equação 1 foi utilizada para transformar os registros de cores no modelo RGB em um modelo de escala de tonalidade de cinza. Esses valores estão dentro de uma escala que varia de zero a 255, onde zero corresponde a preto e 255 ao branco. Esse sinal byte convertido em sua base decimal correspondente O procedimento foi utilizado porque é de simples aplicação dentro de um processo de quantificação. Uma maior quantidade de moléculas contra o fundo branco resulta em uma intensificação da cor visível de solução e conseqüentemente incremento na intensidade na tonalidade de cor cinza.

Desta forma é possível associar a um sinal um único valor a quantidade de moléculas presentes na solução, como pode ser observado na Figura 5. Fato que possibilita medidas de concentração.

Figura 5. Variação da intensidade do sinal da escala de cinza em função da concentração de corante índigo.

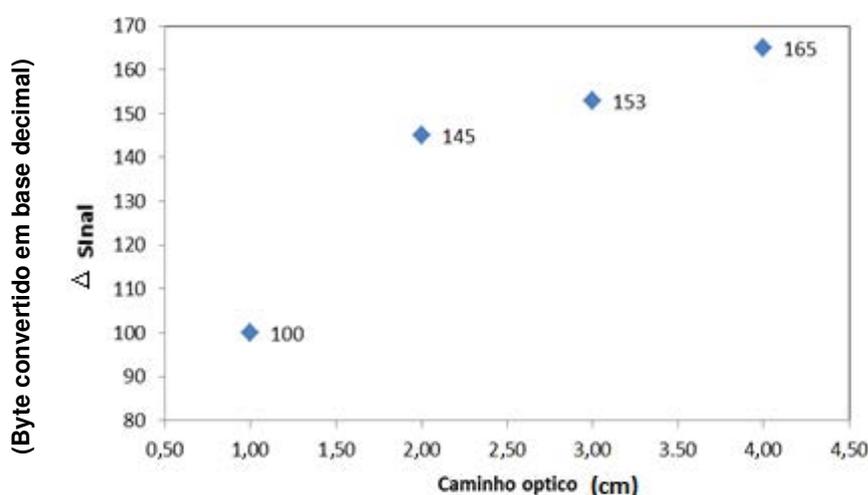


2.4.3 Avaliação do caminho ótico da solução de corante

Outro fator estudado foi a variação da intensidade do sinal em função caminho ótico entre a superfície do corante em relação ao fundo branco de referência. Este fator deve ser considerado, porque a leitura do sinal (aquisição da imagem) foi realizada sobre a superfície do corante sobre um anteparo de cor branca. O acréscimo de volume intensifica a cor observada em função do incremento do caminho ótico. Uma solução de concentração 0,035 mmolL⁻¹ de

índigo foi preparada e escaneada da mesma forma do experimento anterior, variando apenas a altura da coluna de corante presente em cada spot de medida (Figura 6). Com alturas maiores, foram obtidas variações de sinal com maior intensidade, já que o maior caminho ótico intensifica absorção de luz. Caminhos óticos maiores não foram avaliados por que seriam necessários volumes maiores de corantes e estes fogem do objetivo analítico que foi trabalhar com amostras de pequenos volumes. O uso de caminhos óticos maiores podem representam um ganho de variação de sinal obtido, entretanto o sinal apresenta saturação diminuindo a sensibilidade do método.

Figura 6. Variação de Sinais em escala de cinza obtidos para diferentes caminhos óticos.



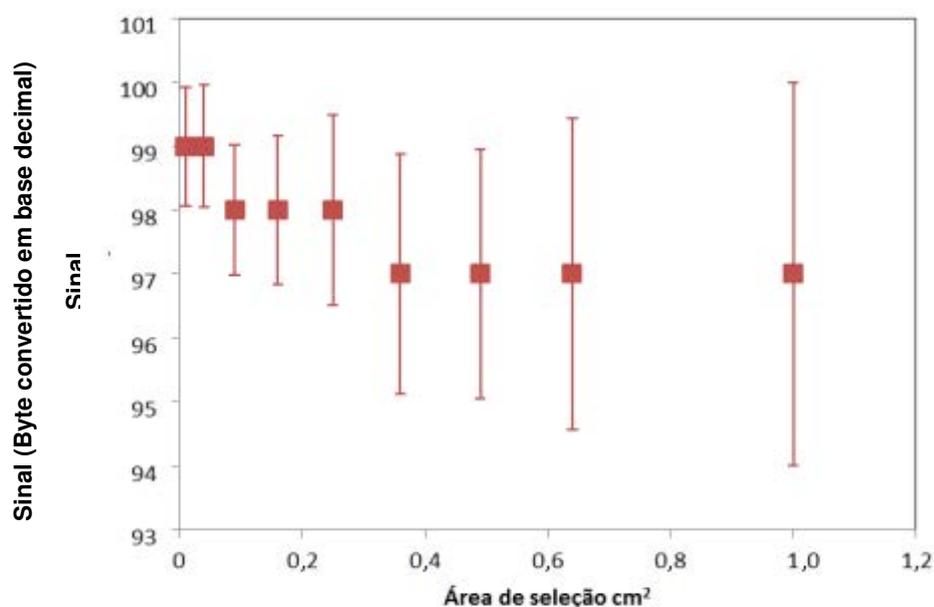
2.4.4 Avaliação da área de seleção de imagem obtida

A área selecionada da imagem para ser convertida em sinal de cinza também tem uma influência significativa para as medidas realizadas. Isto ocorre porque a fonte de luz não é homogênea no processo de digitalização e com isto a imagem apresenta diferentes nuances em sua totalidade. Isto pode ser verificado na mesma solução que foram submetidas ao ensaio anterior, utilizando um caminho ótico de 1 cm (5 ml de solução). Com o auxílio do software de processamento de imagem, ImageJ, diferentes áreas da imagem foram selecionadas. Cada uma destas áreas foi correlacionada com o sinal obtido na escala de cinza (Figura 7).

Foi possível observar que o valor absoluto medido produz tons de cinza mais intenso a partir de uma área de 0,25 cm². Para áreas maiores é observado que o valor médio do sinal

permanece constante, porém o erro associado a cada medida é maior, aumentando as incertezas das medidas de sinais em áreas muito grandes.

Figura 7. Variação do sinal analítico em função da área escolhida para obtenção do sinal.



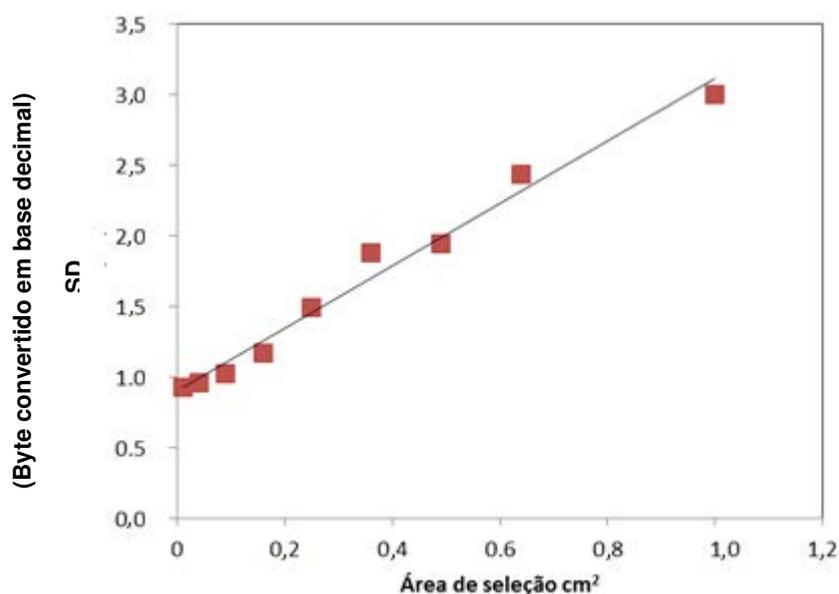
Foi observado que o desvio padrão (SD) cresce de forma linear em função da área de seleção da imagem, como é apresentado na Figura 8 e Equação 2:

$$SD = 2,20(A) + 0,90 \quad R^2 = 0,982 \text{ (Equação 2)}$$

Onde SD é o desvio padrão expresso em intensidade de escala de cinza e A é área de seleção escolhida em cm².

Esse fato era esperado porque mesmo a amostra apresentando um sinal médio constante, uma área de seleção maior corresponde a um maior número de pixels analisados. Estes pixels por sua vez trazem a informação de cor em uma determinada coordenada da imagem, aumentando a sua variabilidade dos sinais. O sinal médio adquirido será o mesmo, porém o desvio entre eles será proporcionalmente maior.

Figura 8. Variação do desvio padrão para cada área analisada.



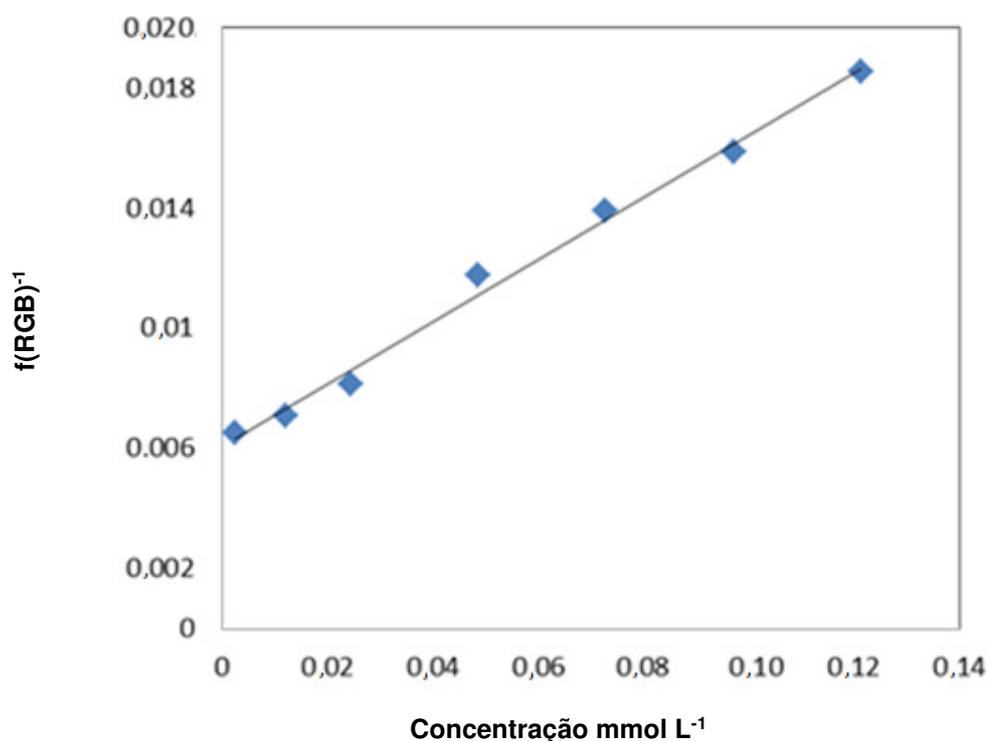
O sinal em escala de cinza observado no experimento onde a concentração do corante é variada, apresentou um decaimento de sinal inversamente proporcional a concentração do corante (Figura 5). Para tratar o sinal observado como um valor puro de referência foi utilizado a transformada de Laplace, onde admitimos que a função inversa tem domínio e imagem real como representado na equação 3.

$$f(\text{RGB})^{-1} = k.[C] + \text{constante (Equação 3)}$$

Onde $f(\text{RGB})^{-1}$ é a função inversa dos sinais obtidos para a escala de cinza, $f(\text{RGB})$ deverá ser entre zero e 255, k o coeficiente angular e $[C]$ a concentração do analito em mmolL^{-1} .

Na Equação 3 onde os valores plotados são obtidos pelo inverso da escala de cinza em função da concentração do corante, é possível observar que neste caso o fenômeno observado assume valores lineares crescentes em função do aumento da concentração do analito, como pode ser observado na Figura 9. Foi constatado que existe uma boa correlação linear como representado na Equação 4.

Figura 9. Variação do sinal analítico para diferentes concentrações do corante.



$$f(\text{RGB})^{-1} = 0,103[C] + 0,006 \quad R^2 = 0,993 \text{ (Equação 4)}$$

Assim como resultados dos testes iniciais em experimentos subsequentes, os parâmetros de medidas foram fixados utilizando imagens com resolução de 300 dpi, área de seleção das imagens de 0,25cm² e caminho ótico em 1,0 cm em relação ao fundo branco de referência.

2.4.5 Utilizando um Scanner como Ferramenta Analítica

Um scanner tem a função de digitalizar uma foto, um documento ou até mesmo um pequeno objeto. Os objetos cujas imagens passam por um processo de digitalização, em princípio, são submetidos a uma luz que incide diretamente sobre sua superfície.

Quando uma imagem de scanner é obtida, na realidade o sinal obtido é um conjunto de informações relativas à refletância da luz que incidiu no objeto. Essa luz refletida pode ser acompanhada de duas formas distintas:

1° - Observando a composição de cores da imagem obtida e um modelo de cores utilizado por computadores, como por exemplo o RGB.

2° - Converter esse modelo de cores, para um sistema de escala e tons de cinza para correlacionar densidade e quantidade de um determinado componente selecionado na imagem estudada.

Nos experimentos exploratórios, foi utilizada uma solução aquosa de corante índigo trissulfonado, que possui intensa cor azul. O corante foi inicialmente utilizado para avaliar o uso de um scanner HP Scanjet G4050 para medidas quantitativas. A Figura 10 apresenta a montagem do experimento no laboratório.

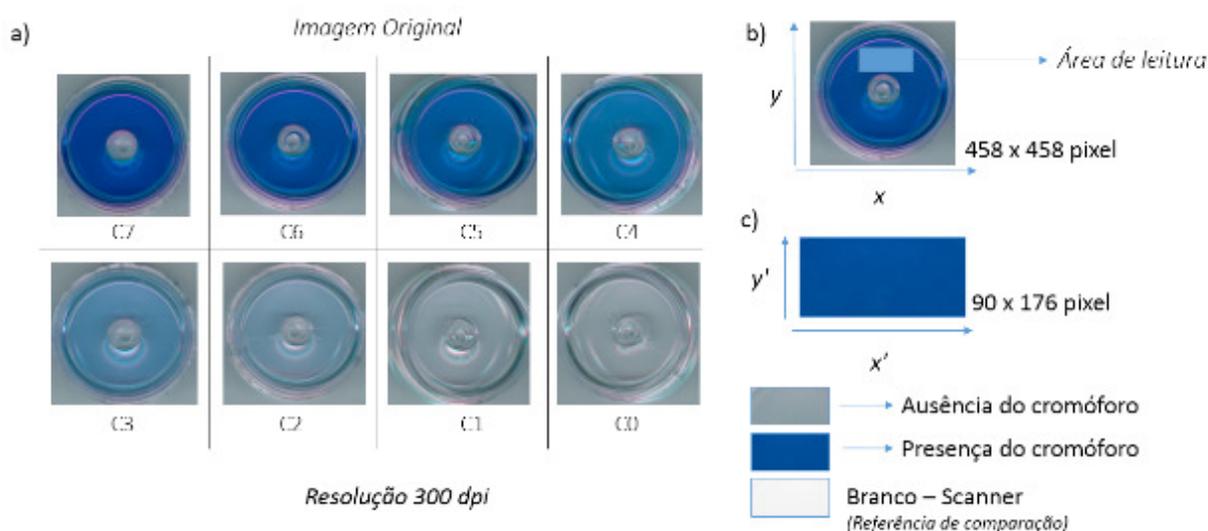
Figura 10. Scanner HP Scanjet G 4050 contendo os *spots* com soluções de corante utilizado para as medidas quantitativas de concentração.



Para a realização deste ensaio foi utilizada uma solução índigo trissulfonado de trabalho. Esta solução foi diluída proporcionalmente para diferentes concentrações. Um volume de 5,00 mL de cada solução diluída foi transferido para recipientes de acrílico cilíndricos transparentes com 2 cm de altura e 5 cm de diâmetro.

Os recipientes de acrílico foram colocados no centro do scanner para fornecer uma imagem digital da mesma forma que um documento convencional com uma resolução de 300 dpi, como representado na figura 11(a).

Figura 11. (a) Imagem digital obtida para as soluções de corante índigo. (b) escolha da região de aquisição de sinal. (c) especificação Branco de referência do scanner e variação de sinais entre duas concentrações.

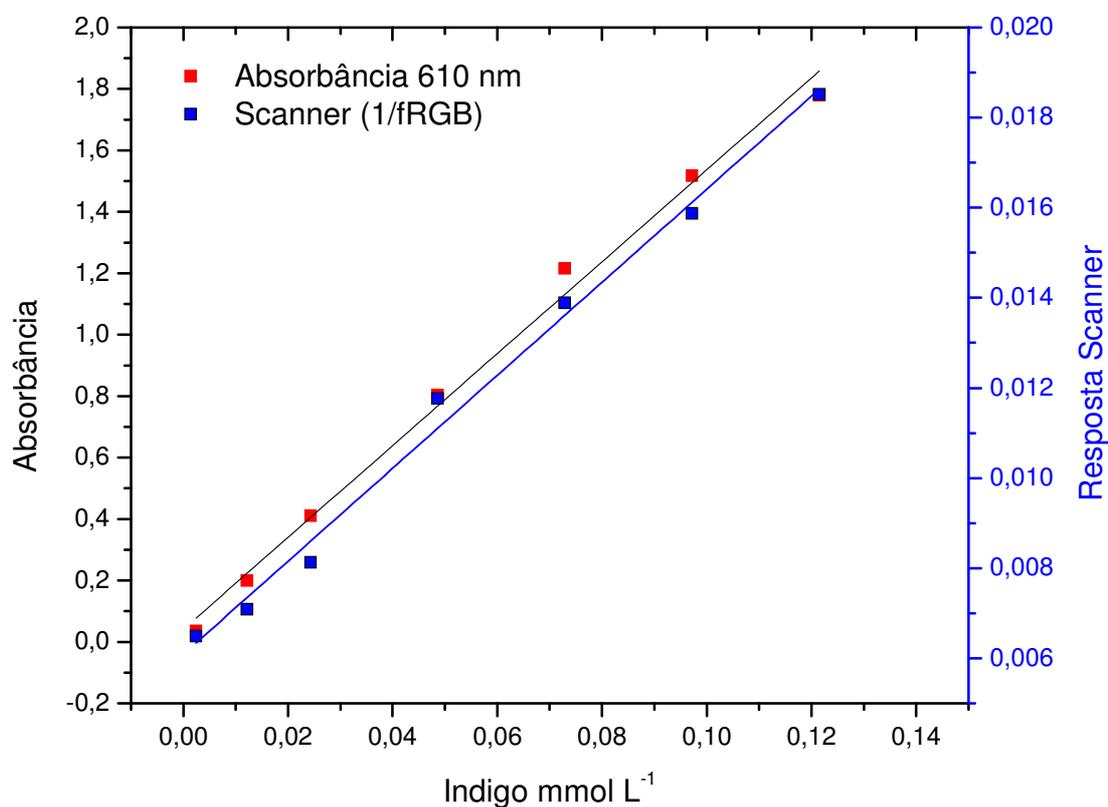


A imagem digital obtida utilizando o recipiente de acrílico apresenta uma região selecionada para a aquisição do sinal analítico. A área de seleção escolhida, foi elegida por apresentar maior homogeneidade e menores efeitos de espalhamento de luz verificado na imagem original devido ao suporte de acrílico. A região delimitada para a imagem adquirida no scanner foi de 90 x 176 pixel com uma resolução de 300 dpi conforme representado na figura 11 (b,c).

A composição RGB da imagem foi convertida para o sinal em *grayscale*. Converter o sinal para escala de cinza confere a imagem um aspecto de escurecimento em função do aumento da quantidade da espécie cromófora mensurada (KOMPANY-ZAREH; MANSOURIAN; RAVAAEE, 2002; SHISHKIN et al., 2004).

As mesmas soluções de índigo que tiveram suas imagens digitalizadas, foram utilizadas em um espectrofotômetro Hitachi U-2000 para medida de suas absorvâncias em comprimento de onda de 600 nm e cela de caminho ótico de 10,0 mm. Os sinais obtidos pelos dois equipamentos foram transformados em um gráfico de sinal VS concentração, como apresentados na Figura 12.

Figura 12. Curvas analíticas obtidas das soluções com diferentes concentrações do corante índigo.



Para os dois conjuntos de medidas foi observado uma correlação linear para concentração em função do sinal, representados pelas equações 5 e 6.

$$\text{Abs} = 14,9 (\pm 0,5) [\text{Índigo mmol L}^{-1}] + 0,041 (\pm 0,037) \quad R^2 = 0,992 \text{ (Equação 5)}$$

$$f(\text{RGB})^{-1} = 0,103 (\pm 0,001) [\text{Índigo mmol L}^{-1}] + 0,0060 (\pm 0,0003) \quad R^2 = 0,992 \text{ (Equação 6)}$$

Os resultados mostraram que foi possível utilizar imagens digitais para realizar medidas quantitativas corroborarão para: a aplicar o processamento de imagens em problemas práticos de quantificação de conjuntos de moléculas que absorvam e reflitam luz na região do espectro visível.

2.4.6 Aplicando visão computacional em ensaios de quantificação

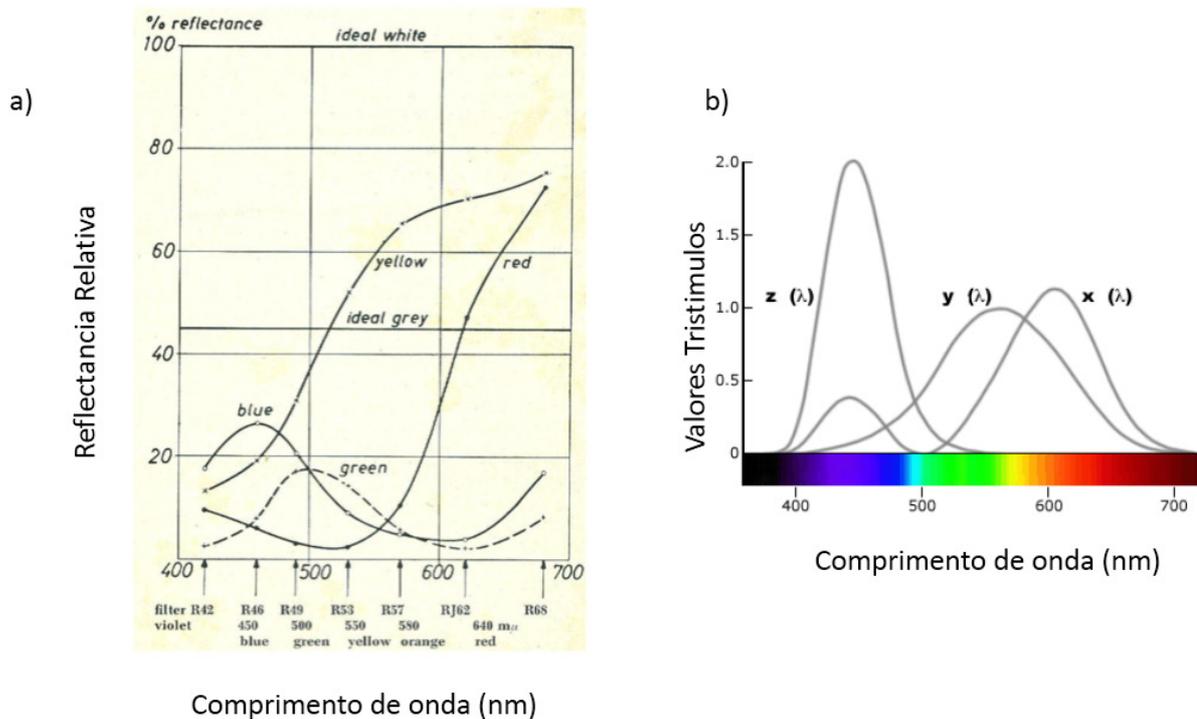
Métodos de detecção baseados na absorção ou reflexão de luz são muito comuns em análises de rotina em laboratório. Existem diversos equipamentos comerciais para ensaios de reflectância e absorção de luz para compostos com cor visível. Em muitos casos, esses equipamentos podem ser adaptados para realizar medidas simples de laboratório. A universalização da computação facilitou a forma de adquirir e processar fotografias digitais e convergiu para utilização de sensores baseados em imagens para extrair informações químicas qualitativas e quantitativas. Nesta etapa do trabalho foi desenvolvido um modelo simples baseado no diagrama de cromaticidade e no modelo *grayscale* para quantificar e agrupar diferentes produtos com formação de corantes.

2.4.6.1 A utilização do modelo CIE em química analítica (Abordagem teórica).

O modelo CIE (*Commission Internationale d'Eclairage*) (BROADBENT, 2004; HUNT; POINTER, 1985) define o conceito psicofísico puro de avaliação de um observador padrão capaz de reagir a matizes, saturação e claridade sempre da mesma maneira. Uma grande gama de matizes, perceptíveis para o olho humano, podem ser produzidas pela mistura na proporção correta das cores ditas como primárias. O CIE é um sistema proposto internacionalmente e aceito por vários países. Este modelo propõe três tipos de radiações imaginárias, e a combinação dessas luzes primárias seriam responsáveis por reproduzir combinações de diferentes cores dentro do campo de visão humano.

Os espectros de reflectância representadas pela Figura 13 (a) representam respectivamente as cores vermelho, verde e azul e podem ter seus espectros redistribuídos segundo as ordenadas X, Y e Z chamados de valores tristímulos, conforme representado na figura 13 (b).

Figura 13. (a) Representação dos espectros de reflectância das cores primárias Azul, Verde e Vermelho e a faixa espectral relativo a cor branca. (b)Valores tristimulos e representação gráfica das funções X, Y, e Z ao longo do espectro eletromagnético visível (adaptado de GAGE, 1999).-



Para uma determinada distribuição de energia espectral, $P(\lambda)$, de uma fonte de emissão como por exemplo um monitor de computador, os valores de tristimulos XYZ são calculadas em função da integral dos comprimentos de onda das funções de emissões das cores puras azul, verde e vermelho, representados pelas Equações 7, 8 e 9 respectivamente.

$$X = \int \bar{x}(\lambda)P(\lambda)d\lambda \quad (\text{Equação 7})$$

$$Y = \int \bar{y}(\lambda)P(\lambda)d\lambda \quad (\text{Equação 8})$$

$$Z = \int \bar{z}(\lambda)P(\lambda)d\lambda \quad (\text{Equação 9})$$

Onde X, Y e Z são as funções de observador padrão do modelo CIE e as integrais das funções correspondem ao espectro visível em um intervalo que varia entre 380 e 770 nm.

Os valores tristímulos são proporcionais entre si ($x: y: z$), onde $x + y + z = 1$. Estes termos podem ser definidos como “coordenadas cromáticas” e são definidos como representados nas Equações 10,11 e 12. Estas equações representam a correlação direta das funções de emissão agora convertidas em valores proporcionais x , y e z que podem ser apresentadas de forma gráfica em função de suas “coordenadas de cromaticidade” também chamado de “diagrama de cromaticidade”.

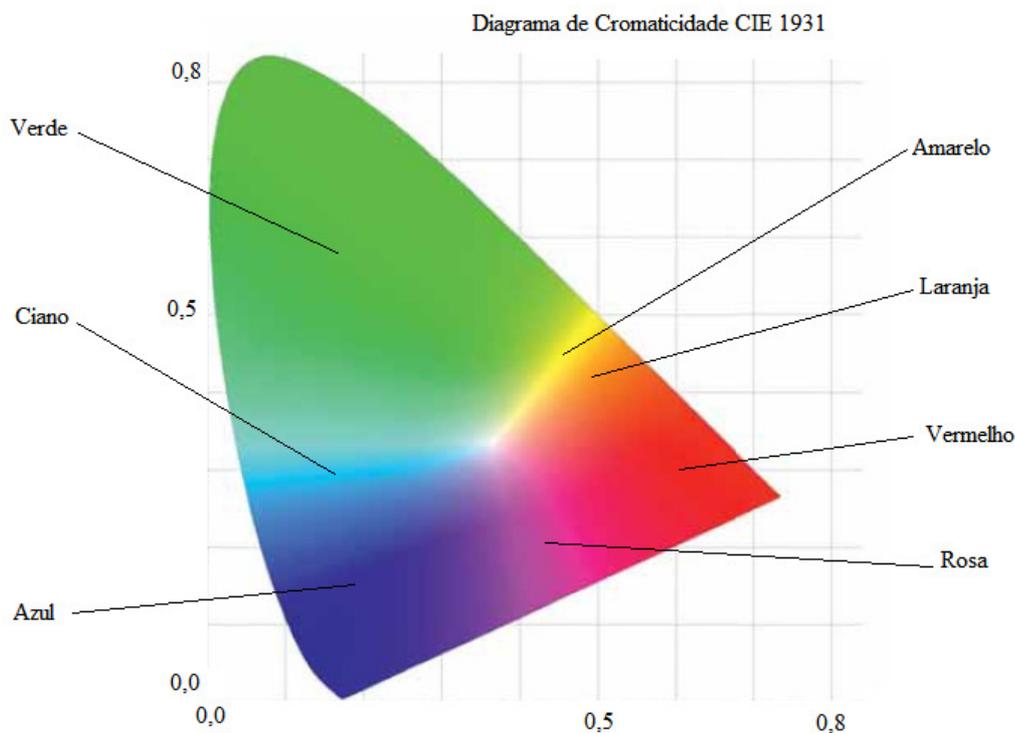
$$\text{Coordenada de cromaticidade azul: } x = \frac{X}{X + Y + Z} \text{ (Equação 10)}$$

$$\text{Coordenada de cromaticidade verde: } y = \frac{Y}{X + Y + Z} \text{ (Equação 11)}$$

$$\text{Coordenada de cromaticidade vermelho: } z = \frac{Z}{X + Y + Z} = 1 - x - y \text{ (Equação 12)}$$

Cada curva de reflectância cobre uma respectiva área do espectro eletromagnético, promovendo efeitos de combinação de frequências e resultando em diferentes cores. Dentro do diagrama de cromaticidade essas cores podem ser representadas em gráfico bidimensional, onde no eixo das ordenadas ficam os valores tristímulos x e no eixo das abcissas os valores tristímulos y (Figura 14). O valor tristímulo z é uma variável complementar no diagrama de cromaticidade e pode ser expressa em relação dos valores tristímulos x e y , como representado na Equação 12.

Figura 14. Diagrama de cromaticidade CIE 1931(adaptado de GAGE, 1999).



Uma combinação adequada destes valores tristimulos produzem uma cor conhecida como “Branco Teórico” ocupando o centro do diagrama de cromaticidade. Ao longo do diagrama as combinações representam diferentes cores dentro do espectro visível e como consequência essas cores correspondem a comprimentos de onda puros.

O uso do diagrama de cromaticidade é uma aproximação da interação entre as propriedades físicas de coloração de uma superfície e a resposta psicofísica gerada pela visão de um observador humano de acuidade visual perfeita (HUNT; POINTER, 1985). Neste trabalho o uso do diagrama teve um papel importante para distinguir diferentes cores produzidas por diferentes reações químicas. As imagens digitais adquiridas de reações químicas através de sensores CMOS ou CCD, tem suas informações registradas digitalmente em um modelo conhecido como RGB. Neste modelo a informação da imagem fica registrada em um sistema de coordenadas cartesianas x e y, e cada ponto de coordenada ocupa um ponto com informações dos componentes Red, Green e Blue.

Existem diversos modelos qualitativos para representar cores, porém, todos esses modelos utilizados tem uma relação direta com o diagrama de cromaticidade (INTERNACIONAL BUSINESS MACHINES CORPORATION, 1996). O

modelo RGB foi usado neste trabalho como base de composição de cores dos objetos digitalizados, por ser um modelo estabelecido e considerado padrão em sistemas computacionais. A relação entre os modelos pode ser descrita de forma matricial como representado na equação 13.

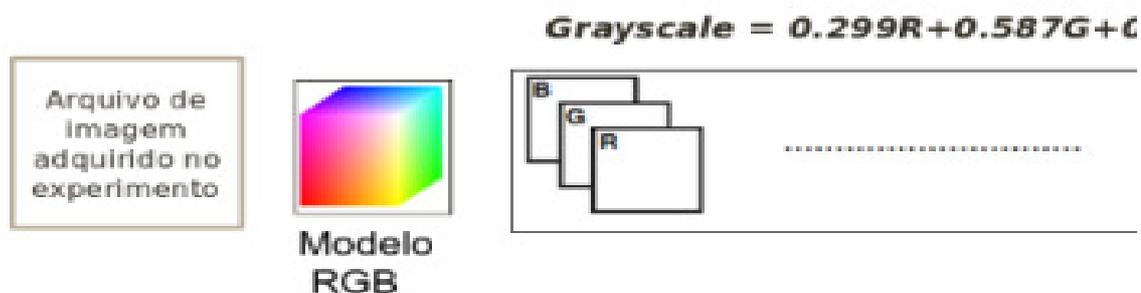
$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = M \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \text{ (Equação 13)}$$

Onde X, Y e Z são respectivamente os valores tristimulos que conseqüentemente são convertidos nas coordenadas cromaticidade x, y e Y (neste trabalho denominado com x, y e z respectivamente), [M] é matriz de proporcionalidade, que depende da variação do branco teórico e a taxa de iluminação em relação ao observador, neste caso foi a matriz correspondente a taxa de iluminação D65-E (*Daylight*).

Com este conjunto de equações foi possível realizar conversões entre os modelos e representar as cores contidas no digrama de cromaticidade com uma excelente congruência na comparação entre as cores das reações adquiridas digitalmente.

Para expressar de forma quantitativa a concentração da substância cromófora presente na solução foi desenvolvido uma maneira mais simples de comparação. O modelo de quantificação está baseado na quantidade de luz refletida pelo objeto. A luz refletida por um objeto iluminado por uma fonte de emissão constante é capturada pelo sensor CMOS ou CCD na forma de uma imagem digital. A imagem digital de um corpo homogêneo é um registro da cor visível refletida pelo objeto. A intensidade de luz adquirida varia inversamente proporcional, como foi discutido anteriormente nos exemplos de utilização do scanner em exemplos de digitalização de soluções contendo corante. Objetos com ausência de espécies cromóforas apresentam coloração de aspecto claro, que aumenta sua intensidade proporcionalmente em função do acréscimo da concentração da substância cromófora. Então para termos de comparação de concentrações, a imagem inicialmente colorida e homogênea passa por uma transformação para o modelo de escala de cinza e normalizado O.D.R. (densidade ótica relativa) em uma função inversa logarítmica de base 10 da razão do valor I médio do modelo *grayscale* da concentração a ser mensurada, pelo valor I_0 da imagem menor concentração do cromóforo ou um objeto considerado branco relativo a cada detector representado pela Figura 15.

Figura 15. Representação do modelo de normalização da escala O.D. para medidas quantitativas.



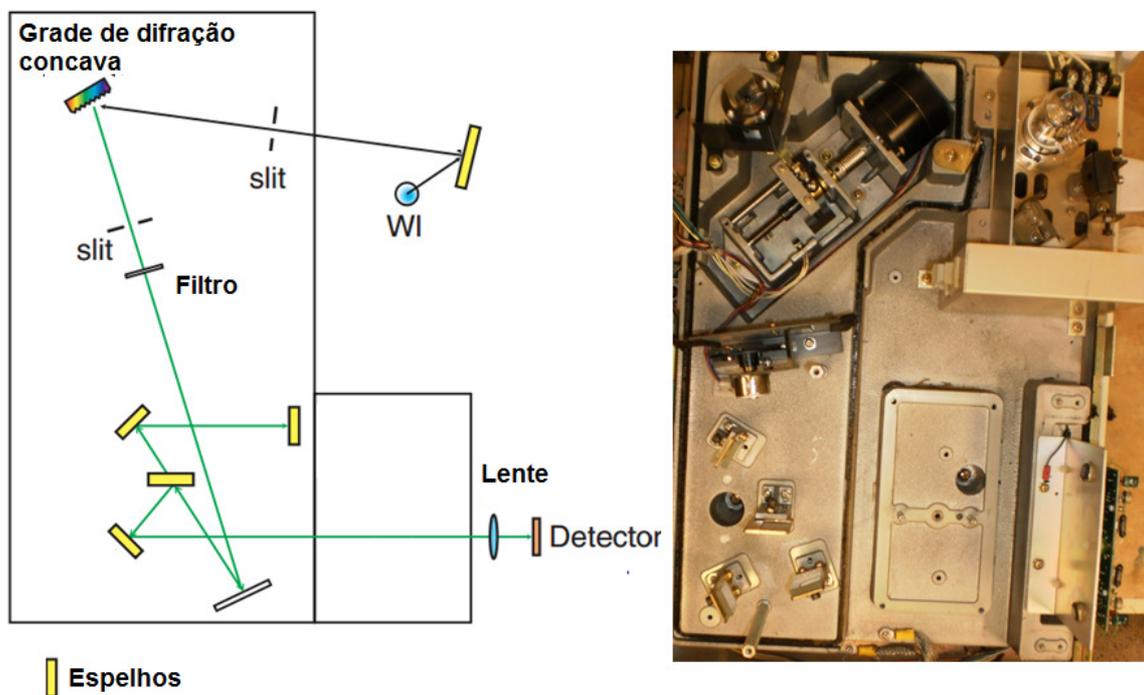
Para avaliar de forma mais precisa o funcionamento do modelo, os comprimentos de onda passíveis a serem adquiridos por sensores de imagem foram avaliados para medir o nível de resposta de cada detector.

2.4.7 Avaliação detectores empregados

Foram avaliados neste estudo dois tipos diferentes de sensores para aquisição de imagens: CMOS (presente em webcams) e CCD (presente em scanners e câmeras digitais).

Estes sensores foram irradiados com feixes de luz monocromáticos entre 300 a 800 nm utilizando o sistema de feixes monocromáticos de um espectrofotômetro Hitachi U2000 conforme disposto na Figura 16. A luz emitida pela lâmpada de tungstênio (WI), chega ao detector por reflexões internas. O sistema é composto por uma lâmpada de tungstênio (WI) como fonte de emissão. Um *slit* (fenda) de entrada que leva à luz a grade de difração e o *slit* de saída. A grade de difração foi controlada por um motor simples de passo para guiar a luz em comprimentos de onda até o *slit* de saída. A luz guiada chega até um filtro seletor de comprimentos de onda. No final a luz foi guiada para um conjunto de espelhos que guiam a luz até o detector.

Figura 16. Diagrama do sistema ótico de um espectrofotômetro Hitachi U2000 ao lado da foto do equipamento.



O experimento proposto consistiu na substituição do detector do equipamento por um sensor de imagem para aquisição das cores oriundas de comprimentos de onda específicos. Para esta avaliação foi utilizado um sensor CMOS encontrado em webcams logitech® como representado na figura 17.

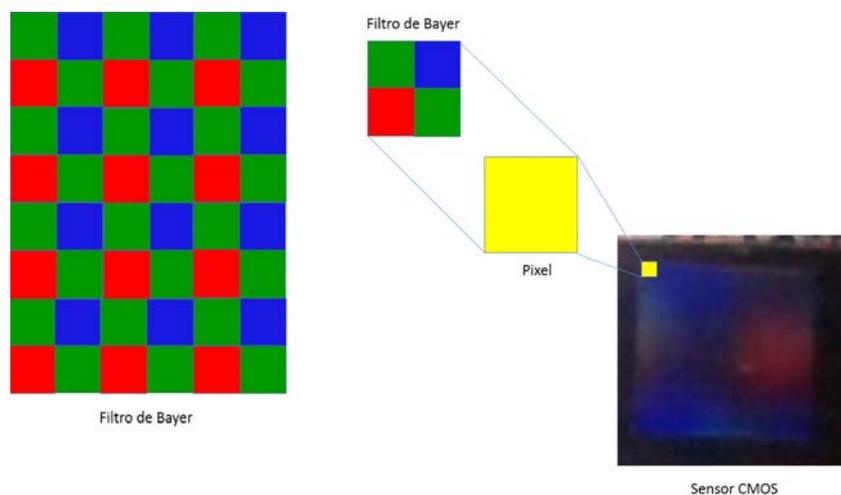
Figura 17. Sensor CMOS webcam logitech®.



O sistema de detecção é composto por uma lente convexa, um filtro de Bayer e o sensor CMOS montado sobre uma eletrônica simples de aquisição, amplificação e transformação da luz registrada pelo sensor para um sinal digital.

O filtro ou mosaico de Bayer consiste em um conjunto de filtros que controlam a transmissão de luz nos comprimentos de onda correspondentes as cores verde, vermelho e azul que chegam em cada pixel (menor fração do detector sensível ao estímulo luminoso em um sistema de coordenadas bidimensional). O filtro é distribuído sobre os pixels do fotosensor formando um mosaico sobre sua superfície como apresentado no esquema da Figura 18.

Figura 18. Esquema de distribuição do filtro de *Bayer* montado sobre um sensor CMOS.



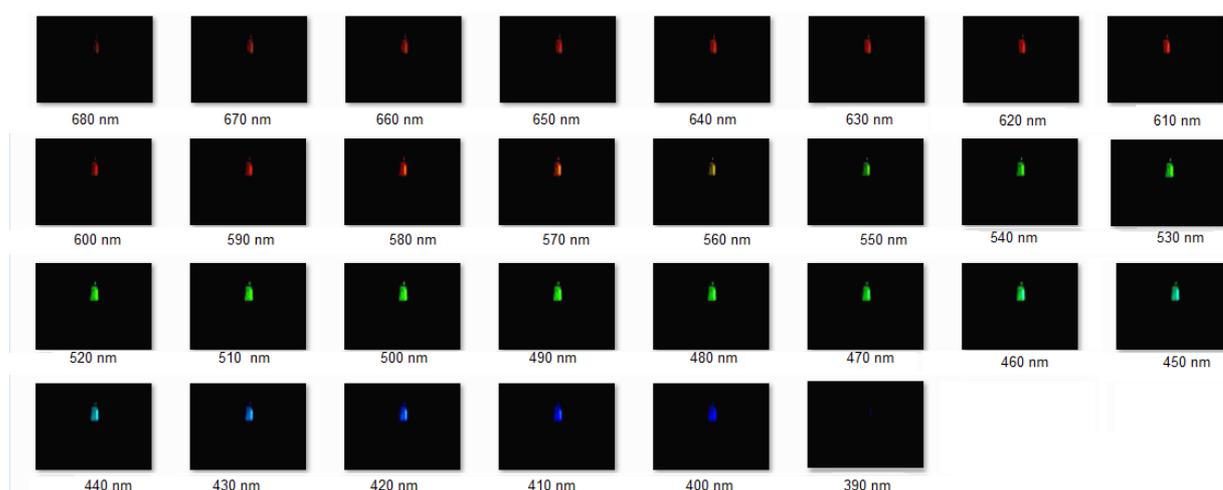
Os filtros de *Bayer* podem sofrer alterações entre os padrões de distribuição das camadas vermelho, verde e azul do mosaico, entretanto a função dele continua sendo controlar a transmissão das cores primárias ao longo das coordenadas x e y do detector.

Como é possível observar na Figura 18 o filtro de Bayer não apresenta uma proporção equivalente das 3 cores. A presença de pixels verdes ao longo do sensor é muito maior em relação aos demais, seguindo uma proporção de 0.5 Verde: 0.25 Azul: 0.25 Vermelho. Esse aspecto observado para a distribuição das cores ao longo do mosaico deve-se a tentativa de simular a forma em que visão humana reage ao ser sensibilizada pela luz (HUNT; POINTER, 1985).

O sensor CMOS montado como detector no sistema ótico do espectrofotômetro Hitachi U-2000 foi ligada a um computador portátil com processador Intel Core2 DUO, 4 Gg de memória RAM operando sob o Kernel Linux na distribuição Ubuntu 12.04 LTS. O Software

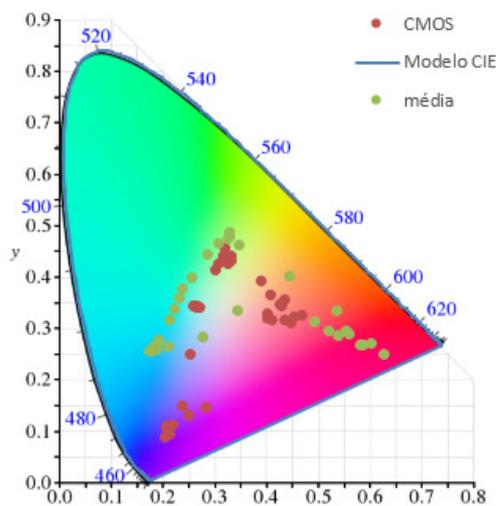
opensource utilizado para aquisição foi o Camorama v 0.19, que possui opções de aquisição de imagens controladas em função do tempo. O Software foi pré-ajustado para adquirir imagens em um intervalo de tempo de 5 segundos, durante um período de 4 minutos resolução de 640x480 pixels. O período de tempo escolhido deve-se a velocidade de varredura ajustada para o espectrofotômetro que foi de 200 nm min^{-1} , irradiando luz em um intervalo de 300 á 800 nm. O detector CMOS apresentou sinal relevante no intervalo de aquisição de 390 á 680 nm como apresentado nas imagens da Figura 19.

Figura 19. Imagens de feixes monocromáticos de luz em diferentes comprimentos de onda adquiridos com o sensor CMOS.



As imagens obtidas correspondendo aos comprimentos de onda puros foram analisadas e seus componentes R, G e B, máximos e médios dentro da matriz de resultados obtida como resposta foram convertidos em coordenadas x e y do diagrama de cromaticidade como apresentado na Figura 20.

Figura 20. Coordenadas de cromaticidade máxima e média do sensor CMOS para radiações monocromáticas.

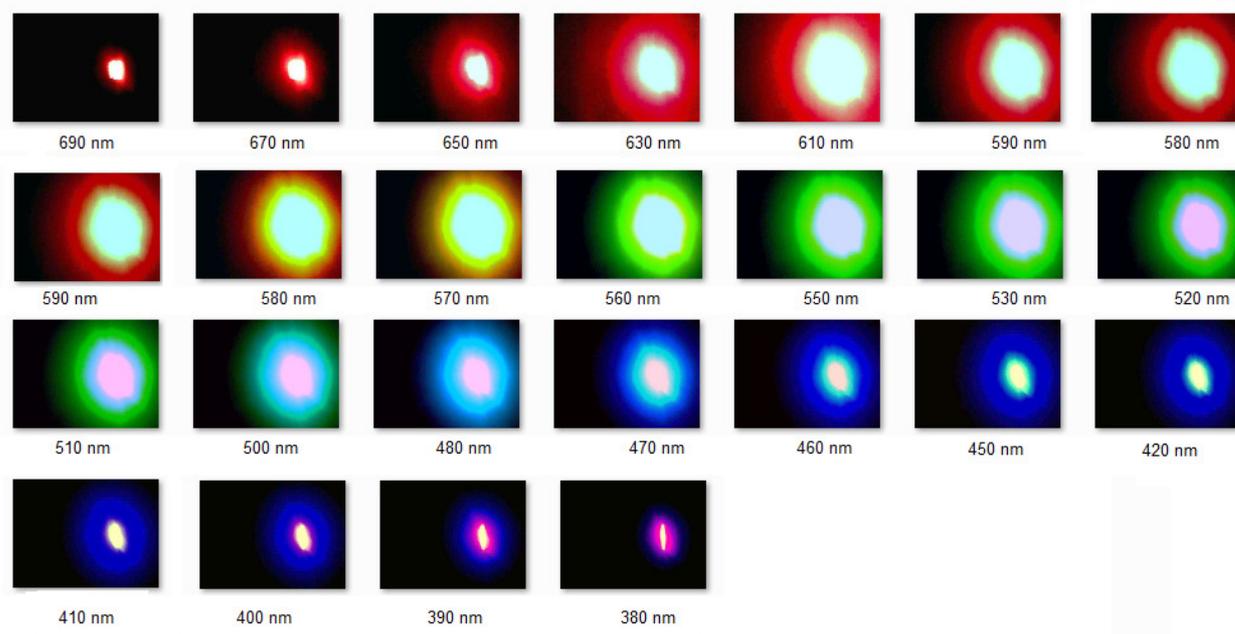


Como pode ser observado na Figura 20, no modelo, os valores de x e y obtidos nas imagens com diferentes comprimentos de onda estão distribuídos no diagrama contemplando boa parte dos comprimentos de onda na distribuição espacial das coordenadas de cromaticidade, apresentando pouca sensibilidade para as cores azul, roxo e rosa. É possível observar também que as coordenadas obtidas estão muito próximas do centro do diagrama, o que indica uma menor variação entre possíveis variações na luminosidade de cada cor.

Um experimento similar foi realizado utilizando um sensor CCD embutido em uma câmera digital Olympus T-100 de 12 megapixels, contendo um sensor semelhante ao CCD contido no scanner. A câmera digital foi montada no sistema óptico de forma similar a webcam. Entretanto foi adquirido um arquivo de vídeo com um tempo de duração de 4 minutos e 30 fps e resolução de 640x480 pixels. O sistema de detecção da câmera digital, incluindo detector, lentes e qualidade do filtro de Bayer é superior a webcam e foi submetido ao mesmo experimento.

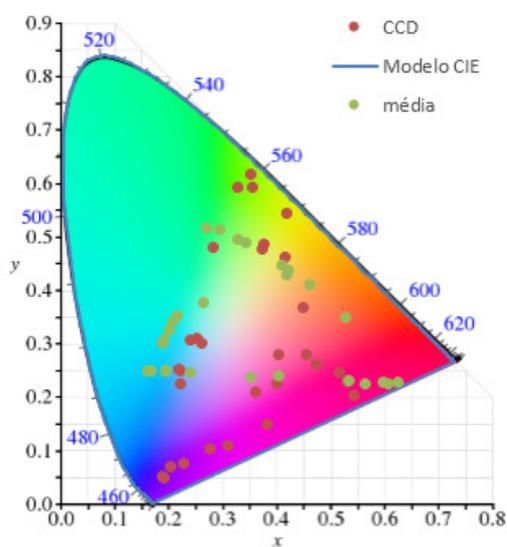
Neste experimento o sistema de aquisição com o sensor CCD apresentou visualmente imagens mais nítidas, porém apresentando uma saturação no ponto de incidência direta do feixe de luz indicada pelo ponto branco no centro do feixe como pode ser observado na Figura 21.

Figura 21. Imagens de feixes monocromáticos de luz em diferentes comprimentos de onda adquiridos com o sensor CCD.



O detector CCD apresentou sinal relevante no intervalo de aquisição de 380 á 690 nm como apresentado na Figura 21. As imagens obtidas foram tratadas da mesma maneira que as imagens obtidas com o sensor CCD resultado em coordenadas x e y do diagrama de cromaticidade como apresentado na Figura 22.

Figura 22. Coordenadas de cromaticidade máxima e média do sensor CCD para radiações monocromáticas.



Neste diagrama é possível observar que a distribuição de faixa espectral sensível ao detector é maior, garantindo ao detector CCD capturar uma gama maior de cores dentro do espectro visível. Os pontos distribuídos espacialmente mostram-se um pouco mais distantes do centro do diagrama quando comparado com o sensor CMOS. A maior distância observada no diagrama significa uma maior diferenciação entre cores mostrando que o sensor é significativamente mais sensível para ensaios colorimétricos.

Os intervalos de aquisição para os diferentes comprimentos de onda mostraram a possibilidade de realizar experimentos de aquisição de imagens de soluções cujo os produtos de reação apresentem reflexão de luz na região do espectro eletromagnético visível. Para ambos os sensores é possível realizar este tipo de medida, porém o sensor CCD apresentou uma melhor resolução e intensidade de sinal.

Os experimentos realizados tiveram o objetivo apenas de verificar a resposta do sensor em função de um comprimento de onda específico aplicado. A calibração de monitores, scanners, câmeras e demais dispositivos baseados em imagens com a função de reproduzir fielmente as cores são realizados por meio de cartas de cores padronizadas pela CIE em condições normais de operação do instrumento utilizado. As medidas realizadas apresentam um caráter comparativo sem um compromisso real na comparação entre tipos específicos de cores.

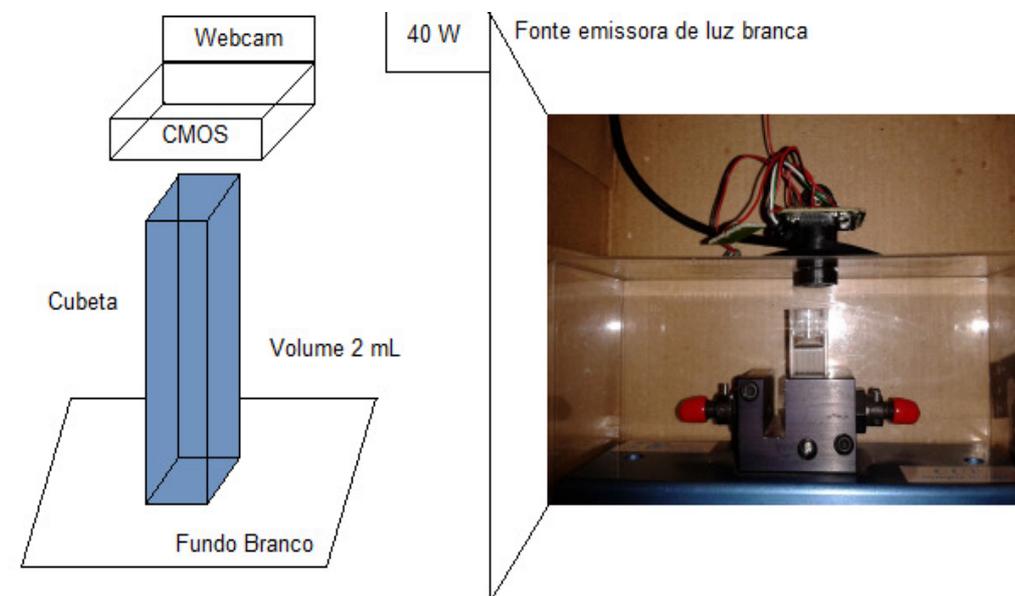
As imagens neste trabalho são abordadas como um sinal de intensidade que variam em função de uma espécie cromófora em solução. O sinal obtido pode ser comparado com comprimentos de onda puros, conhecidos no diagrama de cromaticidade CIE 1931 e verificado experimentalmente pelo procedimento apresentando.

Buscando um melhor entendimento da aquisição de sinais foram realizados experimentos quali e quantitativos utilizando os sensores CMOS e CCD para aquisição de imagens.

2.4.8 Experimentos de quantificação utilizando scanner e webcam

Nos experimentos de quantificação foram utilizadas duas formas distintas de aquisição, o primeiro sistema composto por uma lâmpada de 40 watts como fonte emissora de luz branca, uma cubeta fixada em um suporte em cima de um fundo branco e uma webcam logitech® de 2 megapixels montada sobre a cubeta para a aquisição da imagem da solução como representado na figura 23.

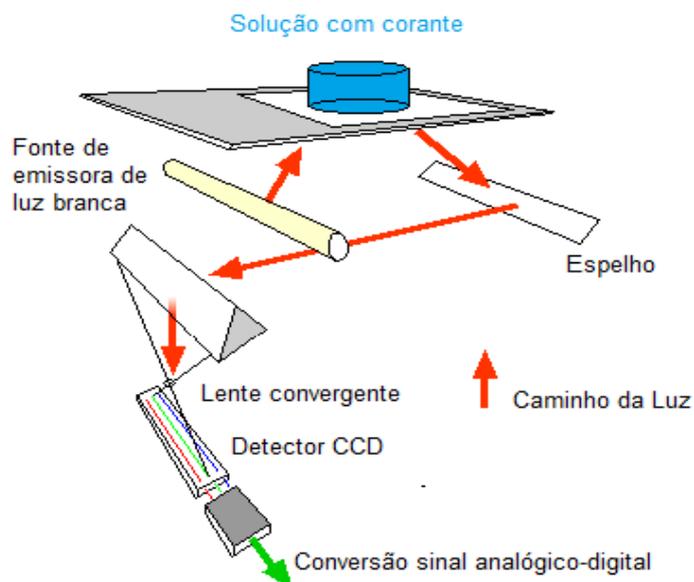
Figura 23. Representação do esquema do sistema de aquisição de imagens de soluções usando uma webcam e a foto do dispositivo montado.



A segunda forma de aquisição, foi utilizando um scanner de mesa HP deskjet G4050, similar aos experimentos exploratórios iniciais. As soluções resultantes das reações químicas estudadas foram escaneadas usando recipientes de acrílico cilíndricos transparentes com 2 cm de altura e 5 cm de diâmetro.

Esses recipientes tiveram suas imagens digitalizadas utilizando o scanner que distribui uniformemente a luz sobre o objeto irradiado e a luz refletida é guiada até o detector CCD onde o sinal é posteriormente convertido em uma imagem digital assim como apresentado no esquema presente na Figura 24.

Figura 24. Esquema do sistema de aquisição de imagens de soluções usando um scanner.



Com montagens propostas foi possível propor experimentos de quantificação utilizando soluções cujo os produtos de reação geram moléculas com absorção na região do visível, faixa na qual os sensores estudados apresentam uma resposta satisfatória.

2.4.9 Aplicação em reações químicas

Com a proposta desenvolvida para o processamento e aquisição de sinais de imagens digitais, foram realizados experimentos com soluções resultantes de procedimentos de quantificação de espécies químicas de interesse ambiental. As imagens das soluções foram interpretadas de forma qualitativa e quantitativa aplicando os conceitos desenvolvidos para o processamento e interpretação dos sinais de imagens.

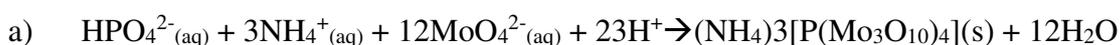
2.4.9.1 Fosfato solúvel em água

O fosfato tem um papel importante em sistemas biológicos e está inserido nos ciclos biogeoquímicos do nosso planeta. O método proposto para determinação do fosfato solúvel em água foi 4500-P e consiste na determinação colorimétrica do analito em estudo.

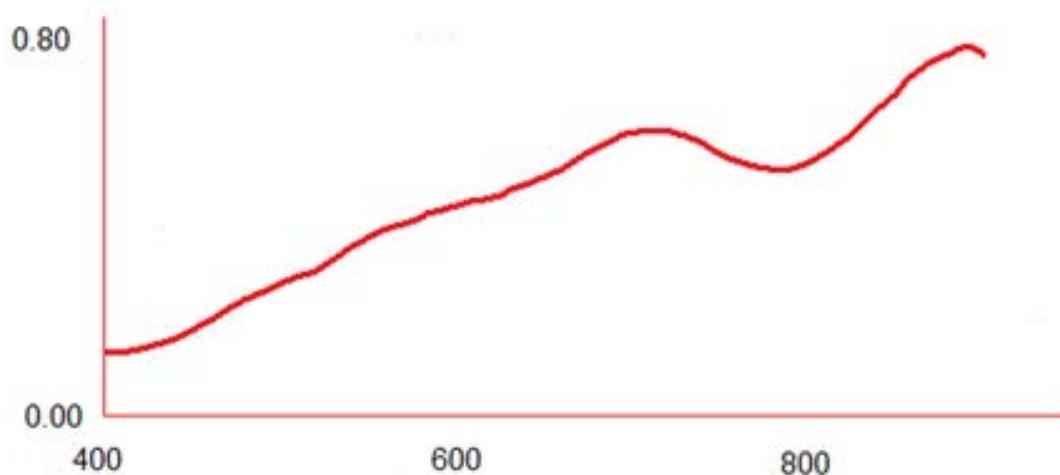
Na reação como representado na Figura 25 (a) o molibdato de amônio e antimônio tartarato de potássio, em meio ácido, reagem com o ortofosfato para formar o azul de

molibdênio ((NH₄)₃PO₄ 12MoO₃) que apresenta um máximo de absorção em 880 nm, porem também apresentando absorções na região da faixa do espectro visível próximo a 600 nm (figura 25 (b)).

Figura 25. a) Reação entre molibdato de amônio e ortofosfato e formação do corante azul de molibdênio. b) Espectro de absorção do azul de molibdênio (PO⁴⁻ = 0,012mmolL⁻¹).



b)



Para a aplicação deste método foi preparado uma solução de reagentes combinados, pela mistura de 50,0 mL de ácido sulfúrico 2,5 mol L⁻¹, 5,00 mL de solução de antimônio tartarato de potássio 4,4x10⁻³mol L⁻¹, 15,0 mL de solução de molibdato de amônio 3,2x10⁻² mol L⁻¹ e 30,0 mL de solução de ácido ascórbico 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹, misturando sempre a cada adição de reagente. A curva analítica foi preparada pela adição de 5,00 mL de reagente combinado às soluções padrão de fosfato em diferentes concentrações.

Após 12 minutos foram medidas as absorbâncias das soluções padrão utilizando um espectrofotômetro Hitachi U-2000 em $\lambda = 880$ nm. Os mesmos ensaios foram realizados capturando as imagens das soluções resultantes onde estas foram digitalizadas utilizando os sensores CMOS (webcam) e CCD (scanner). Com a aquisição, as imagens foram processadas e convertidas em sinais de resposta em função da concentração do analito como mostrado na Figura 26 com curvas analíticas apresentadas na Equação 14 para o sensor CCD e na Equação 15 para o sensor CMOS.

$$\text{O.D.R.} = 15,3 (\pm 0,4) [\text{PO}_4^{3-}] \quad R^2 = 0,984 \text{ (Equação 14)}$$

$$\text{O.D.R.} = 8,04 (\pm 0,75) [\text{PO}_4^{3-}] \quad R^2 = 0,994 \text{ (Equação 15)}$$

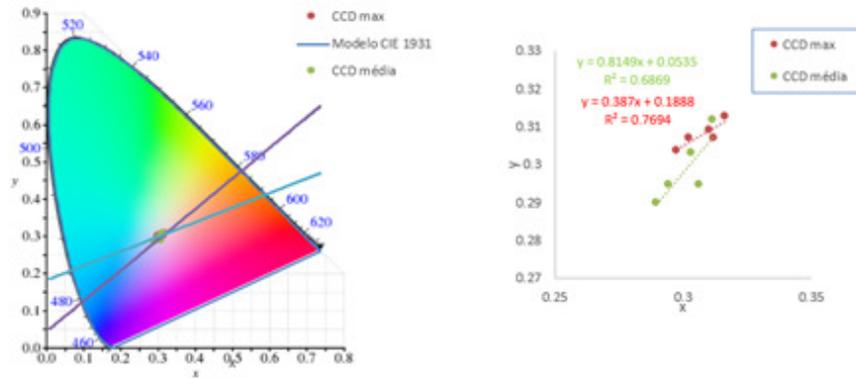
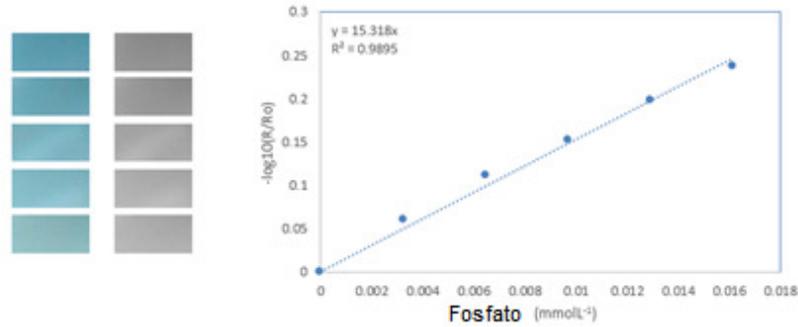
Onde O.D.R. é o sinal obtido pelas imagens e $[\text{PO}_4^{3-}]$ é a concentração de ortofosfato solúvel em mmol L^{-1} . As faixas de concentrações analisadas para o sensor CMOS foi de 0,0120 - 0,0230 mmol L^{-1} e para o sensor CCD foram de 0,00250 – 0,0170 mmol L^{-1}

As imagens adquiridas das soluções foram processadas seguindo o modelo proposto, onde as cores das imagens são associadas ao diagrama de cromaticidade para certificar as cores das soluções comparando os valores máximos e médios de RGB dos pixels analisados na imagem. Neste modelo é possível observar uma faixa de cor relativa a reflectância do material e uma faixa de absorção teórica, representado na figura 26 (a) e (b) respectivamente para os sensores CCD e CMOS. A intersecção das tendências lineares exibidas entre os pontos ao longo do diagrama de cromaticidade exhibe as cores do objeto digitalizado e as cores complementares indicando uma região de previsão qualitativa de absorção máxima.

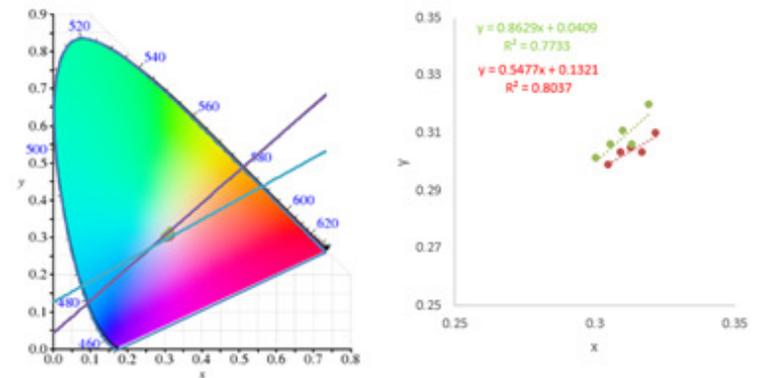
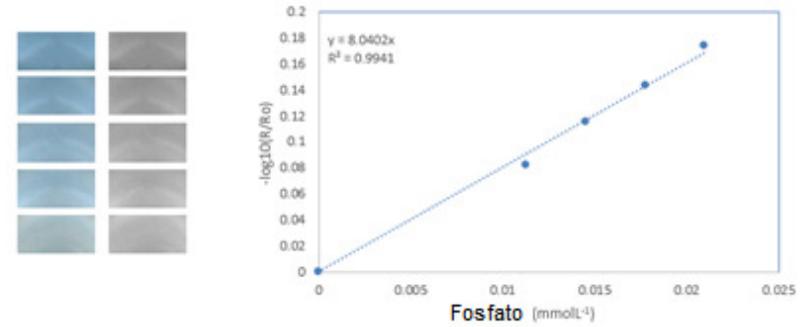
Os resultados de comparação de cores foram consistentes com as cores das amostras analisadas. Outro ponto que deve ser ressaltado é linearidade observada dentro dos valores de cores analisados. Dentre os pontos analisados no diagrama cromaticidade verificou-se que variação ocorre dentro da saturação da cor apresentando algo que já era previsto, pois as cores das soluções digitalizadas apresentam diferentes concentrações das substâncias cromóforas, mantendo o volume da solução constante.

Figura 26. Diagramas de cromaticidade e curvas analíticas obtidas para os sensores CCD e CMOS para medidas colorimétricas para fosfato em água.

a) CCD



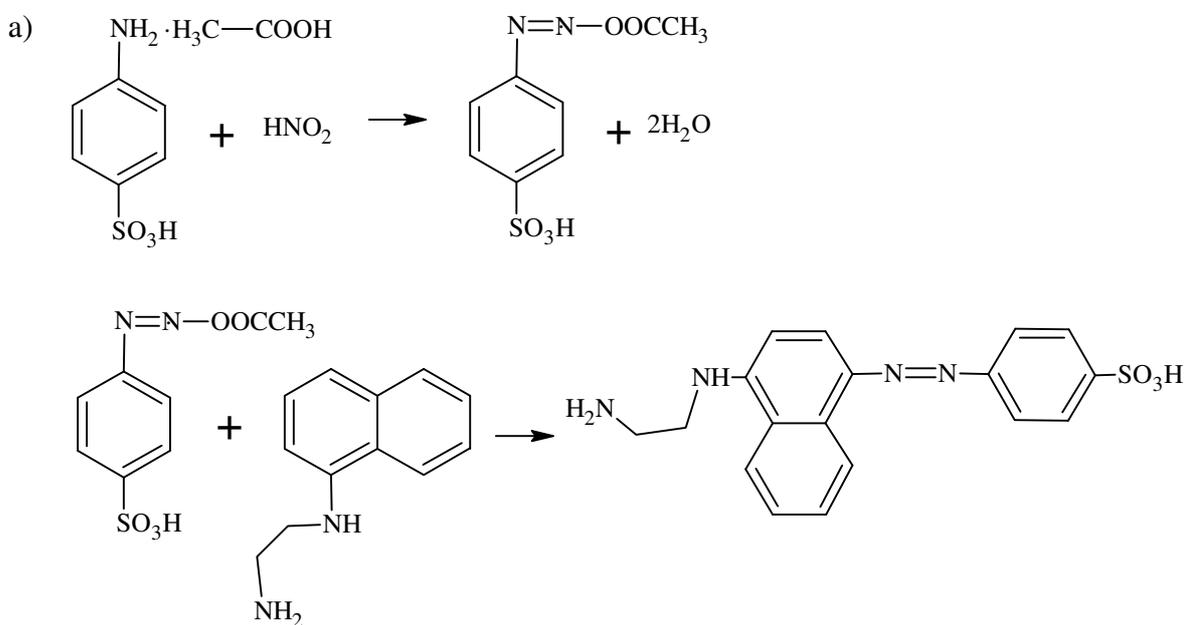
b) CMOS



2.4.9.2 Nitrito em água

A reação de Griess é comumente utilizada para a identificação e a quantificação do ânion nitrito ($N_{\text{nox}} +3$) e gás NO_2 ($N_{\text{nox}} +4$). Esta reação envolve uma etapa inicial de diazotização do ácido sulfanílico pelo nitrito, seguida de uma substituição eletrolítica com o hidrogênio na posição *para* do α -Naftalenamina formando como produto um corante azo rosa como apresentado na reação descrita na Figura 27 (a).

Figura 27. a) Reação De Griess. b) Espectro de absorção do produto de reação formado ($\text{NO}_2^- = 6,0 \text{ mmolL}^{-1}$).



b)



O corante formado absorve na região de 540 nm (Figura 27 (b)) e pode ser quantificado com o uso de um espectrofotômetro. Para construir a curva analítica foram preparadas soluções com concentrações conhecidas de nitrito. Estas soluções foram preparadas pela diluição de uma solução aquosa de nitrito de sódio 80,0 mmol L⁻¹, recém-preparada padronizada pelo método iodométrico e contendo 0,010 % de clorofórmio, para aumentar a estabilidade do nitrito em solução.

Uma alíquota de 1,00 mL de cada solução de nitrito foi transferida para balões volumétricos de 10,00 mL. A estes balões foram adicionados 5,00 mL do reagente de Griess e completou-se o volume com água e um tempo de reação de 15 minutos.

Após a formação do corante, medidas de absorbância foram feitas com comprimento de onda de 540 nm juntamente a obtenção das imagens pelo scanner e a webcam. De forma semelhante ao que foi feito nas soluções do método para fosfato solúvel em água, foram obtidas as curvas analíticas para as medidas e os resultados estão apresentados na Figura 28.

Os estudos mostraram que os métodos são lineares nos intervalos de 1,60 a 8,00 mmol L⁻¹ para o sensor CCD e de 4,00 a 8,00 mmol L⁻¹ para o sensor CMOS, como apresentado respectivamente pelas Equações 16 e 17.

$$\text{O.D.R.} = 0,0230(\pm 0,0010)[\text{NO}_2^-] \quad R^2 = 0,993 \text{ (Equação 16)}$$

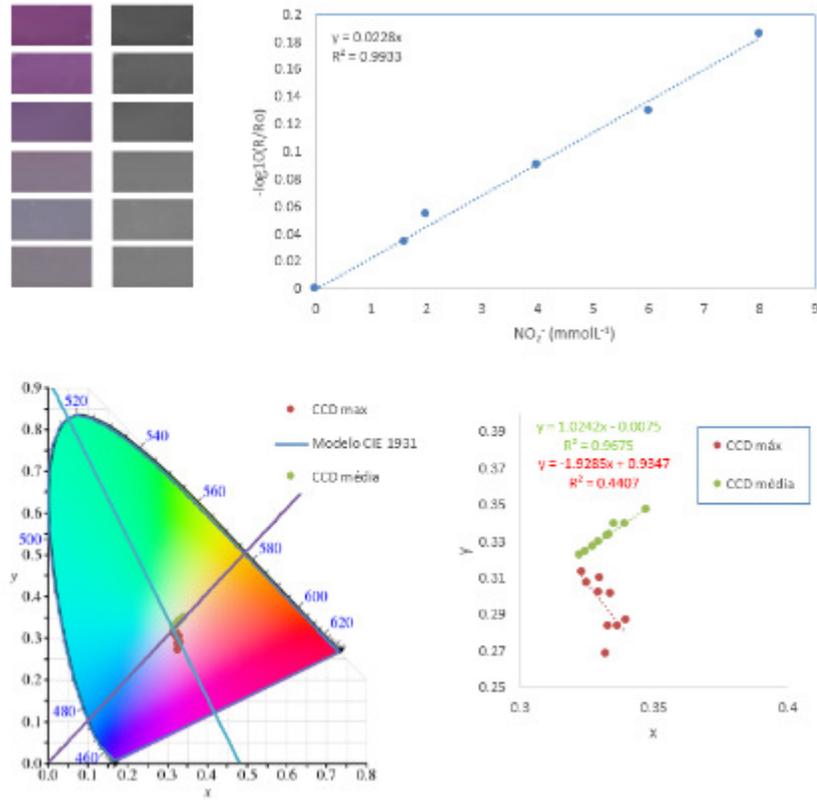
$$\text{O.D.R.} = 0,0170(\pm 0,0020)[\text{NO}_2^-] \quad R^2 = 0,978 \text{ (Equação 17)}$$

Onde O.D.R. é o sinal obtido pelas imagens e [NO₂⁻] é a concentração de nitrito em mmol L⁻¹.

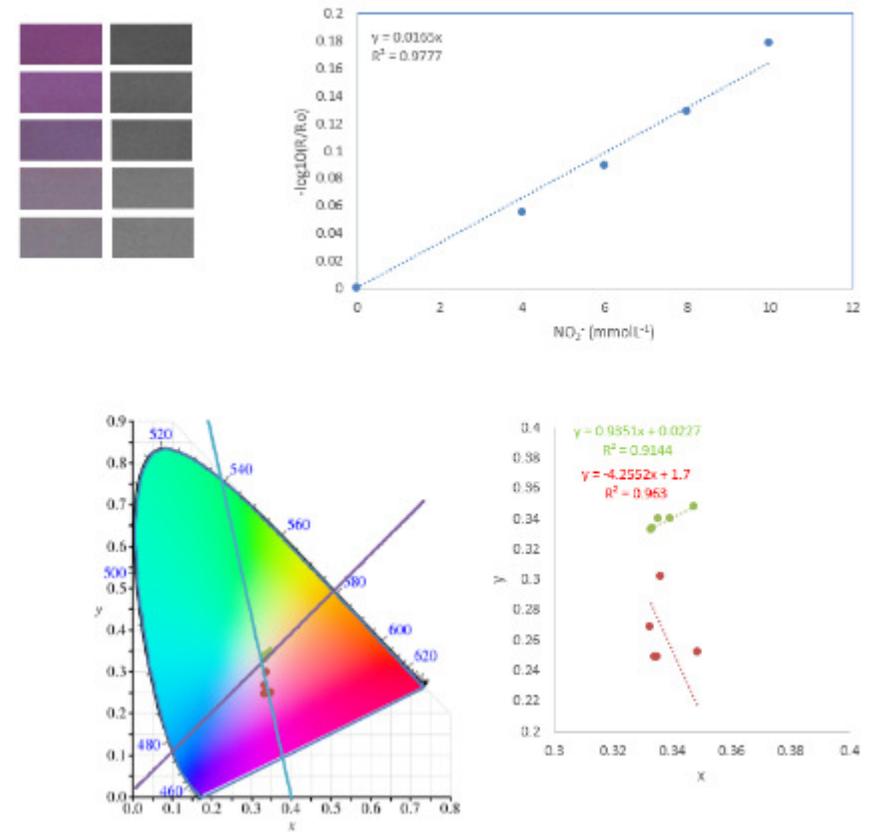
O conjunto dos resultados iniciais sugere que é possível utilizar o método de imagens para determinação de nitrito ou NO₂ em solução aquosa através da reação de Griess através das imagens obtidas por scanner e webcam. Porém é possível observar que o limite de detecção do método é diretamente ligado a qualidade das imagens adquiridas.

Figura 28. Diagramas de cromaticidade e curvas analíticas obtidas para os sensores CCD e CMOS para medidas colorimétricas de nitrito em água.

a) CCD



b) CMOS



2.4.9.3 Ozônio residual em água

A água é um bem valioso para a manutenção da vida, ela está envolvida na maioria dos ciclos bioquímicos que regulam a vida em nosso planeta. O crescimento do processo de industrialização e a expansão das cidades contribuíram para contaminação de grande parte das águas superficiais. Um processo utilizado para desinfecção de águas em larga escala é o baseado na cloração, porém um dos problemas da adição de cloreto ou dióxido de cloro em água é a possibilidade da formação de substâncias organocloradas de elevada toxicidade. O uso do ozônio, substância de alto potencial oxidante ($E^0 = + 2,07$ volts, meio ácido) é uma alternativa ao cloro. Além do seu potencial germicida, ele pode destruir compostos orgânicos responsáveis por dar cor ou odor a água potável (PASSARETTI FILHO, 2010).

A degradação do corante índigo frente ao ozônio é uma reação utilizada como método padrão para a determinação a quantidade de ozônio águas (BADER; HOIGNÉ, 1981). Na reação de ozonólise entre índigo e ozônio promove a degradação do corante índigo trissulfonado, acompanhando da formação de isatinas e derivados sulfonados do ácido antranílico (PASSARETTI FILHO, 2010).

A concentração de ozônio em água foi acompanhada em função da degradação do corante índigo trissulfonado. As concentrações nominais de ozônio, utilizadas na construção da curva analítica, foram acompanhadas pelo método na região do UV. O ozônio é pouco estável em solução aquosa e não existem padrões estáveis que possam ser utilizados. Desta forma torna-se necessário gerar e determinar o ozônio *in situ* (BADER; HOIGNÉ, 1981). As curvas analíticas para os sensores CCD e CMOS estão representadas respectivamente pelas Equações 18 e 19 e na Figura 29.

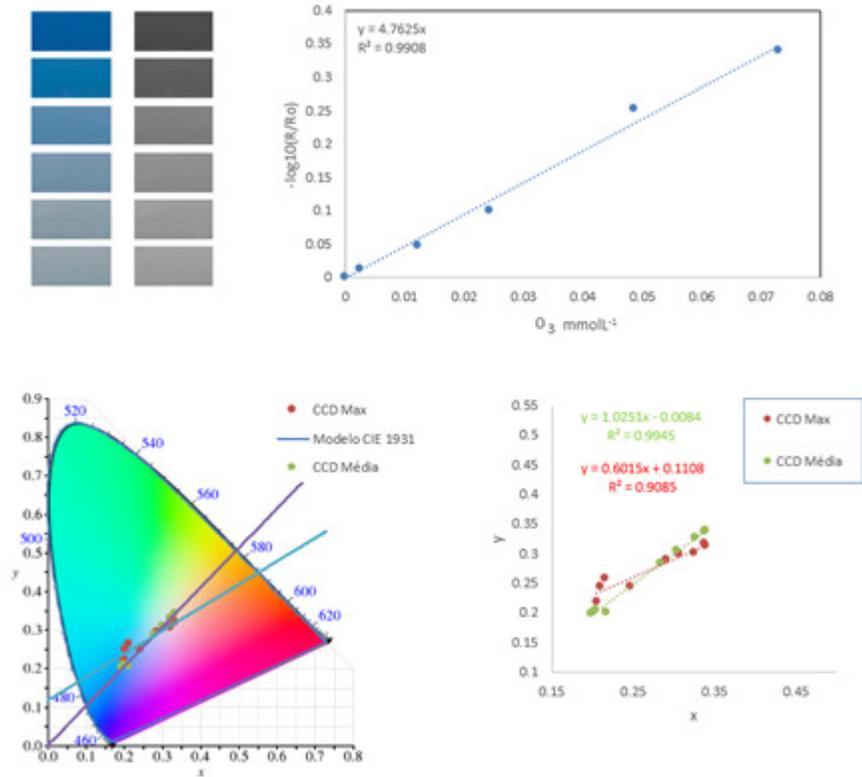
$$\text{O.D.R.} = 4,76(\pm 0,11)[\text{O}_3] \quad R^2 = 0,991 \text{ (Equação 18)}$$

$$\text{O.D.R.} = 3,48(\pm 0,15)[\text{O}_3] \quad R^2 = 0,983 \text{ (Equação 19)}$$

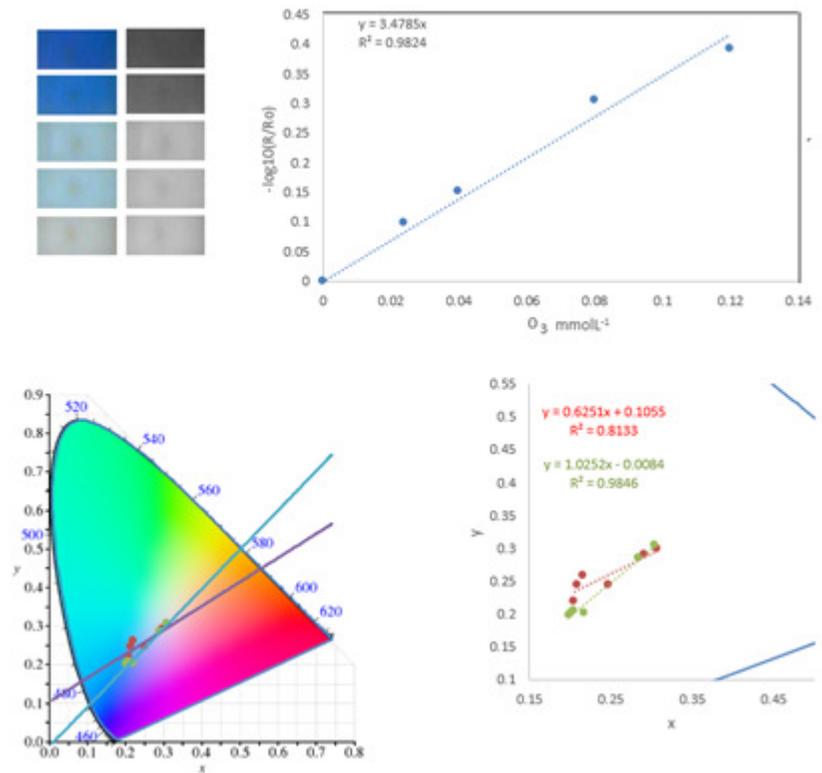
Onde O.D. é o sinal obtido pelas imagens e $[\text{O}_3]$ é a concentração de ozônio residual dissolvido em água em mmolL^{-1} .

Figura 29. Diagramas de cromaticidade e curvas analíticas obtidas para os sensores CCD e CMOS para medidas colorimétricas de ozônio residual em água.

a) CCD



b) CMOS



2.4.10 Comparação entre os resultados e figuras de méritos analíticos

Os resultados para os métodos de determinação de nitrito, ortofosfato e ozônio residual em água pelos sensores de imagens apresentaram concordância quando comparados aos métodos de referência com medidas espectrometria visível. As figuras de mérito estão dispostas na Tabela 1.

Tabela 1. Figuras de mérito dos métodos desenvolvidos para os sensores CCD e CMOS

Sensores	Parâmetros Analíticos	Ozônio	Nitrito	Fosfato
CCD (Scanner)	Faixa de linearidade (mmol L ⁻¹)	0,0300 – 0,0700	1,00 – 8,00	0,00300 – 0,0170
	SD	0,0133	0,00551	0,0100
	R ²	0,984	0,995	0,990
	LD (mmol L ⁻¹)	0,0100	0,800	0,00200
	LQ (mmol L ⁻¹)	0,0400	2,40	0,00600
	Erro Relativo (%)	3,20	5,30	11,2
	Coeficiente de Variação (%)	1,80	2,20	2,70
	Teste F (95%)	5.33 (5,4)*	1.69 (5,5)*	5.34 (6,4)*
	Teste t (95%)	0.481(4)*	0.192 (4)*	2.24 (4)*
CMOS (Webcam)	Faixa de linearidade (mmol L ⁻¹)	0,0400 – 0,120	4,00 – 10,0	0,0120 – 0,0230
	SD	0,0210	0,0102	0,00520
	R ²	0,994	0,978	0,983
	LD (mmol L ⁻¹)	0,0200	1,90	0,00200
	LQ (mmol L ⁻¹)	0,0600	6,20	0,00700
	Erro Relativo (%)	4,20	7,30	9,30
	Coeficiente de Variação (%)	3,60	6,10	5,70
	Teste F (95%)	1.74 (4,5)*	1.71 (4,5)*	1.74 (5,4)*
	Teste t (95%)	0,400 (4)*	1,43(4)*	0.357(4)*

*Graus de liberdade

Os sinais obtidos para os sensores CCD e CMOS são compatíveis com as faixas de concentração para os métodos colorimétricos dos respectivos analitos dos métodos recomendados para a análise águas em um intervalo de confiança de 95%.(CLECERI; GREENBERG; EATON, 1989)

2.5 CONCLUSÕES

Os sensores testados foram irradiados por feixes monocromáticos e as imagens adquiridas exibiram cores nítidas em um intervalo comum de 370 á 650 nm. Os intervalos de aquisição para os diferentes comprimentos de onda mostraram a possibilidade de realizar ensaios colorimétricos para as reações escolhidas para ambos os sensores, porém o sensor CCD apresentou uma melhor resolução nas imagens e intensidade de sinal.

Ambos os sensores apresentaram boa aplicabilidade para a quantificação dos corantes utilizados nos experimentos. Porém, quando o LD é crítico nas amostras a serem determinadas é recomendado o uso do sensor CCD. Esse conjunto de resultados confere aos detectores empregados confiabilidade para serem utilizados em diferentes experimentos de caráter quanti e qualitativo.

Capítulo II

Determinação de NO₂ atmosférico por imagens digitais

- *Método analítico utilizando imagens digitais para a determinação de NO₂ atmosférico com pré-concentração em cartucho C-18*

3 DETERMINAÇÃO DE NO₂ ATMOSFÉRICO POR IMAGENS DIGITAIS

O NO₂ é um poluente envolvido em diferentes processos que atuam na química atmosférica. As emissões antrópicas são as principais fontes destas moléculas para atmosfera. Determinar NO₂ é relevante para controle de emissões e para o entendimento do seu efeito no ambiente. Devido a inúmeras fontes e pequeno tempo de residência do gás na atmosfera é necessário que sejam feitas várias determinações distribuídas temporalmente e espacialmente. Neste trabalho é descrito um método simples e de baixo custo para coletar e determinar o NO₂.

3.1 Os processos de combustão e a poluição atmosférica: Uma questão de energia

Os processos de combustão perfazem grande parte da energia que consumimos no mundo atual. Carros, motos, caminhões, geração de energia elétrica e até o cozimento de alimentos são em sua grande maioria fornecidos por processos que envolvem a queima de algum tipo de material (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2004; SEINFELD; PANDIS, 1998)

Vários esforços vêm sendo realizados para diminuir a dependência da combustão na geração de energia, isso porque foi verificado que nosso modelo de consumo não está de acordo com as capacidades do nosso planeta em absorver as mudanças realizadas pelo homem (CONTI, 2005; SEINFELD; PANDIS, 2012)

Estudos conduzidos a respeito do modelo econômico vigente, indicam que o consumo desenfreado, sem uma mudança na forma em que delapidamos nossos recursos naturais tende a causar um impacto irreversível em nosso planeta e como consequência uma redução drástica na qualidade de vida para os seres humanos (ROCKSTRÖM et al., 2009). O uso racional de recursos naturais será em médio e longo prazo fatores determinantes para encontrarmos um equilíbrio entre consumo e energia (TONON et al., 2006).

Entretanto, caso mudemos drasticamente nossa matriz energética, ou seja, abandonarmos definitivamente os processos de combustão, ainda assim o planeta conviverá por anos ou séculos com os produtos mais estáveis formados após a queima dos combustíveis (SEINFELD; PANDIS, 2012).

Assim, conhecer a composição do material que é queimado ajuda a prever os possíveis gases ou partículas que podem ser geradas no processo culminando na formação de óxidos como por exemplo o dióxido de enxofre (FINLAYSON-PITTS; PITTS, 1989). Porém, existem compostos que fogem a essa regra e são formados em qualquer processo de combustão, independente do material que será queimado.

Estes compostos formados indiretamente pelos processos de combustão na presença de ar são os óxidos de nitrogênio. Durante a queima do material ocorre a liberação de energia que reflete no aumento da temperatura. O aumento dos choques efetivos entre moléculas de oxigênio e nitrogênio presentes no ar favorecendo a formação do óxido nítrico (NO) como representado na Equação 20. Na atmosfera, o NO oxida-se facilmente resultando na formação do gás dióxido de nitrogênio (Equação 21) (FINLAYSON-PITTS; PITTS, 1989; SEINFELD; PANDIS, 1998)



Entretanto o processo de emissão de compostos nitrogenados na atmosfera é muito mais complexo gerando outros compostos que contribuem com o efeito estufa como o N_2O . Há ainda uma incerteza nos mecanismos que levam a formação destes produtos. Existem estudos que demonstram experimentalmente que as taxas de formação envolvidos nos processos de combustão para os compostos de nitrogênio resultam na formação do NO_2 e N_2O (MILLER; BOWMAN, 1989).

Diante do problema, torna-se conveniente o monitoramento constante destes compostos na atmosfera. Esses poluentes podem ser provenientes de uma fonte primária, ou seja, são emitidos diretamente no ar, ou secundários quando formados através de reações entre poluentes primários ou com constituintes pré-existentes na atmosfera da Terra (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2004).

3.1.1 As emissões de poluentes atmosféricos

As emissões primárias podem ocorrer por fontes naturais ou antrópicas. As emissões naturais são aquelas produzidas por processos biogeoquímicos como vulcões, queimadas naturais, processos geológicos e respiração ou metabolismo animal e vegetal (FINLAYSON-PITTS; PITTS, 1989). Entretanto essas emissões podem acontecer devido a ação do homem por processos não naturais de combustão que inclui consumo de combustíveis fósseis, biomassa em atividades industriais e domésticas (CARDOSO; MACHADO; PEREIRA, 2008).

O tipo de emissão primária determina em parte os tipos de poluentes secundários que podem ser formados na atmosfera. Esse comportamento observado está ligado a reatividade das

moléculas emitidas no ar e depende de fatores como a presença de luz, catalisadores, temperatura, pressão e concentração das espécies químicas envolvidas na formação dessas substâncias mais estáveis no ar (WARNATZ et al., 2001).

A atmosfera pode formar e absorver diversas moléculas emitidas pelas fontes primárias, entretanto quando essas espécies químicas atingem níveis de concentração superiores as concentrações que podem ser suportadas pelos processos naturais, essas moléculas em desequilíbrio podem causar prejuízos ao meio ambiente (FINLAYSON-PITTS; PITTS, 1989; SEINFELD; PANDIS, 1998).

O monitoramento constante dos poluentes emitidos na atmosfera podem trazer informações importantes das variações naturais destas substâncias e como a ação do homem pode alterar esses processos (SEINFELD; PANDIS, 1998). Esse monitoramento no seu termino deve gerar uma visão espacial e temporal dos poluentes emitidos (IONEL; POPESCU, 2010).

A frequência e o tempo de análise podem variar em função do tipo de analito a ser determinado no ar. Muitas substâncias tem tempo de residência diferentes e isso deve-se ao seu tempo de meia vida na atmosfera e as reações que estas substâncias podem sofrer na atmosfera (FINLAYSON-PITTS; PITTS, 1989).

Neste trabalho foi desenvolvido um método para a determinação de NO₂ atmosférico. Para definir estratégias para quantificar foi necessário conhecer mais a fundo as suas propriedades químicas e conseqüentemente o seu comportamento na troposfera, camada recebe a maior carga das emissões primárias das atividades antrópicas.

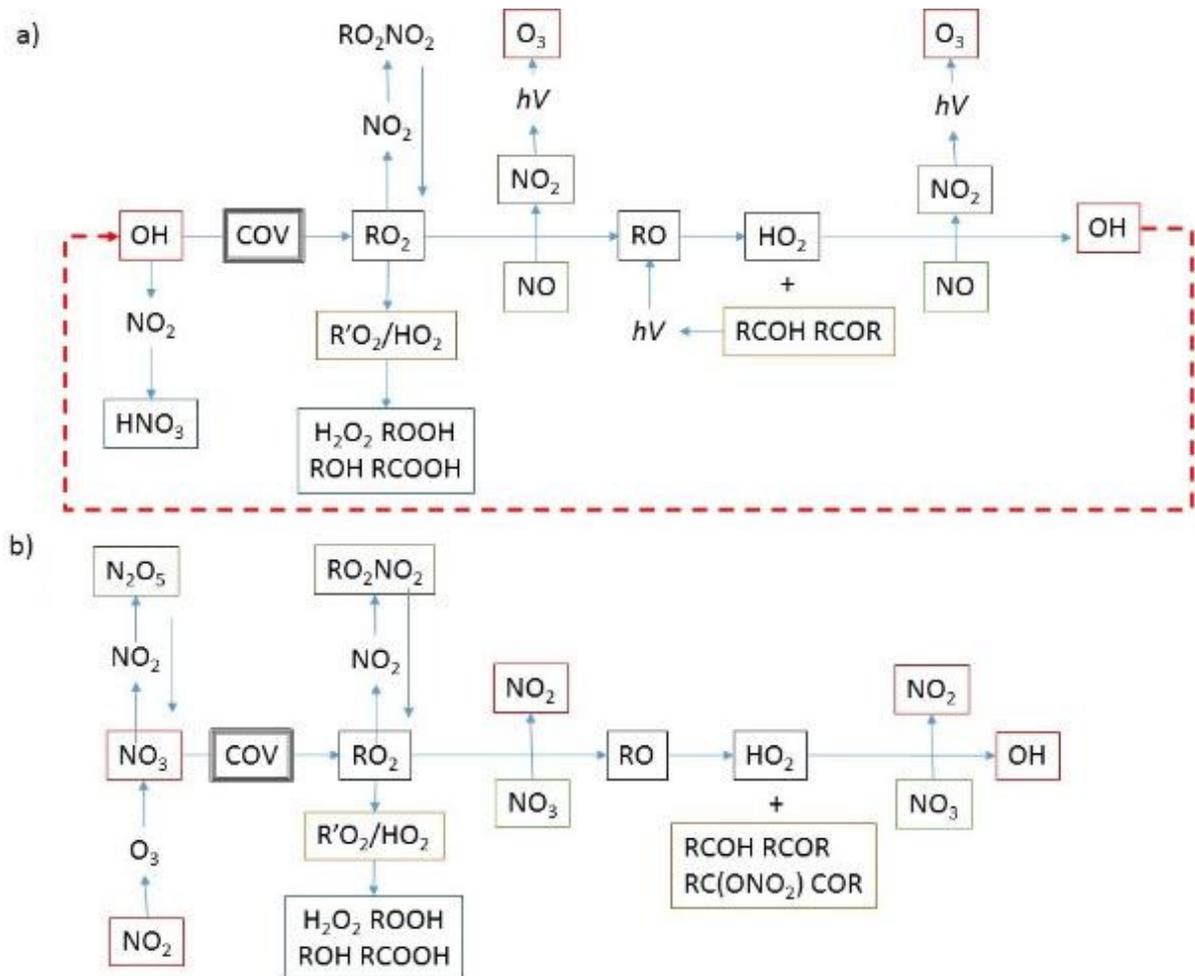
3.1.2 A química do NO₂ na troposfera

A reação de fotólise do NO₂ é um dos únicos caminhos conhecidos para a produção de ozônio na troposfera (FINLAYSON-PITTS; PITTS, 1989; SEINFELD; PANDIS, 1998). Reações atmosféricas de formação de peróxidos, ou a oxidação dos compostos orgânicos não seriam possíveis sem a etapa prévia de conversão de NO a NO₂. Essas reações que ocorrem na troposfera acontecem na presença da luz formando radicais hidroxila e ozônio em reações de oxidações fotocatalíticas. Estas reações são responsáveis pela oxidação dos compostos orgânicos emitidos na troposfera como representado no diagrama da Figura 29 (a) (WAYNE, 2000).

Na ausência de luz solar, outras reações radicalares passam a ser ativadas envolvendo os óxidos de nitrogênio. Algumas reações entretanto podem ser iniciadas em processos noturnos

por radicais NO_3^\cdot e estas na presença de compostos orgânicos promovem um novo ciclo de reações de oxidação resultando, na formação de NO_2 e radicais hidroxila como representado na Figura 29 (b) (WAYNE, 2000; WAYNE et al., 1991).

Figura 30. Diagrama representando as principais reações de oxidação dos compostos de nitrogênio na troposfera (a) Oxidação de compostos orgânicos voláteis (COV) na presença da luz do dia. A oxidação é iniciada pelo ataque dos radicais OH^\cdot em moléculas de COV, seguidos da adição de O_2 para a formação do radical RO_2^\cdot . (b) Oxidação de compostos orgânicos voláteis durante a noite. A oxidação é iniciada pelo ataque do radical NO_3^\cdot em moléculas de COV, seguidos da adição de O_2 para a formação do radical RO_2^\cdot (Adaptado de (SEINFELD; PANDIS, 1998)).



Um dos problemas gerado devido as elevadas concentrações de NO e NO_2 na atmosfera é a formação do “smog fotoquímico”. A queima de combustíveis fósseis corresponde a

aproximadamente 70% de todo o NO_x emitido para atmosfera e estima-se que a emissão global de óxidos de nitrogênio corresponda a $50\text{-}120 \times 10^{12}$ g de N ano⁻¹ (MARTINS; DE ANDRADE, 2002).

Em 1972 nos EUA, medidas realizadas para a determinação das concentrações de NO_2 e NO em ar indicaram respectivamente 37 e 24 ppb em média para áreas urbanas apresentando picos de concentração de até 800 ppb de NO_2 em áreas urbanas nas regiões de Los Angeles (FINLAYSON-PITTS; PITTS JR, 1989).

A partir de 1980 estudos brasileiros relataram elevados índices de NO_2 na atmosfera em regiões industriais e centros urbanos. Em Cubatão, São Paulo, durante a década de 80, indicou concentrações médias diárias de 64 mg m^{-3} , sendo que os valores mais altos foram encontrados em estações próximas às rodovias, bem como nas áreas de influência direta da refinaria de petróleo (MARTINS; DE ANDRADE, 2002).

Entretanto, o problema da emissão de NO_2 na atmosfera não ocorre exclusivamente em regiões urbanas. Em estudos conduzidos em cidades no interior do estado São Paulo em 2005 revelaram que as concentrações de NO_2 e de outros poluentes eram elevadas e de mesma grandeza a àquelas observadas em regiões industriais. Um dos principais motivos deste desequilíbrio residia no plantio de cana de açúcar onde a colheita era realizada através da queima controlada da plantação. Novas legislações foram criadas com o intuito de inibir a queima da cana de açúcar, entretanto, ainda é possível até o momento do término deste trabalho observar focos de queimada em diversos pontos do estado de São Paulo. Os focos de queimada e o trânsito intenso de veículos para escoar a produção agrícola acabam corroborando no aumento das emissões de NO_2 e NO, ou seja o nitrogênio reativo (ALLEN; MACHADO; CARDOSO, 2011).

A troposfera possui mecanismos que podem remover os compostos emitidos para atmosfera provendo a formação de oxidados tornando-os mais solúveis facilitando a sua remoção da atmosfera. Em alguns casos é possível realizar uma previsão espacial e temporal da quantidade de nitrogênio reativo depositado pelo ar (ALLEN; MACHADO; CARDOSO, 2011). Um dos efeitos diretos desta deposição é a eutrofização de rios e lagos em áreas impactadas pela emissão de nitrogênio reativo para a atmosfera.

3.1.3 Uma visão dos métodos de análise de NO₂

Quando os limites de detecção e quantificação do método analítico empregado estão acima da concentração da espécie gasosa presente no ambiente, a amostragem associada a uma etapa de preconcentração é determinante para o bom resultado do processo analítico. O uso de trietanolamina, reagente que coleta NO₂ do ar com eficiência, tem sido estudado e utilizado em diferentes métodos analíticos (GOLD, 1977; KIRBY; FOX; WATERHOUSE, 2000; KROCHMAL; GORSKI, 1991; YANAGISAWA; NISHIMURA, 1982). Um procedimento eficiente para coletar, pré-concentrar e determinar NO₂ gasoso envolve a utilização de cartucho C-18 impregnado com solução de trietanolamina (TEA)(NISHIKAWA et al., 1986). Estudos posteriores demonstraram que é possível realizar a coleta do gás de forma ativa com posterior eluição do analito com solução metanólica(UGUCIONE; GOMES NETO; CARDOSO, 2002). A solução contendo o analito é misturada com os reagentes de Griess-Saltzan (SALTZMAN, 1954; UGUCIONE; GOMES NETO; CARDOSO, 2002). O produto formado é um corante de coloração rosa com absorção máxima em 540 nm. O método de baixo custo e fácil de operar tem sido utilizado em diferentes ambientes para a determinação da concentração de NO₂ (UGUCIONE; MACHADO; CARDOSO, 2009).

O desenvolvimento de hardwares e softwares mais amigáveis e velozes tem favorecido a utilização de métodos analíticos baseados em processamentos de imagens digitais culminando em aplicações para resolução de diferentes tipos de problemas (DUCHESNE; LIU; MACGREGOR, 2012; PRATS-MONTALBÁN; DE JUAN; FERRER, 2011).

A determinação analítica com cores foi explorada em um sensor para oxigênio (EVANS; DOUGLAS, 2006). O uso de câmeras digitais e webcams, possibilitou o desenvolvimento de métodos analíticos para análises em micro-flow-batch (LIMA et al., 2013), titulações ácido-base (GAIAO et al., 2006; TÔRRES et al., 2011) e até como sensor substituto para a detecção de cores de chamas em técnicas de fotometria de chama(LYRA et al., 2009).

Outros dispositivos de aquisição de imagens presentes em dispositivos portáteis como por exemplo smartphones e webcams aumentaram ainda mais possibilidade de aplicação dessa nova abordagem de determinação analítica(GAIAO et al., 2006; LIM et al., 2008; LIMA et al., 2013; LIN; SUSLICK, 2010; MUSTO et al., 2009; LYRA et al., 2009; TÔRRES et al., 2011; ZHANG; SUSLICK, 2005).

Atualmente equipamentos de captura de imagens são manipulados por qualquer pessoa e foram universalizados devido ao baixo custo de produção, contribuindo para sua

popularização. Métodos analíticos baseados no uso destes equipamentos podem ajudar no controle de poluição de regiões remotas onde o acesso a laboratório é inviável e também em países em desenvolvimento, onde aquisição e manutenção de equipamentos comerciais é um fator limitante no procedimento de monitoramentos ambientais.

Dessa forma, neste trabalho buscou-se desenvolver e aplicar o processamento de imagens digitais na região do visível para a determinação de NO₂ na baixa atmosfera. Essa abordagem mostra ser uma alternativa altamente eficaz na determinação *in situ* destes compostos, o que poderá contribuir com o monitoramento de poluentes atmosféricos em diversos tipos de ambientes e diferentes lugares do planeta.

3.2 OBJETIVOS

Os objetivos no estudo de determinação de NO₂ atmosférico por imagens digitais foram:

- Aplicar e desenvolver novas estratégias de visão computacional para o processamento e interpretar imagens para mensurar o sinal analítico de uma imagem
- Desenvolver um método confiável para determinação de dióxido de nitrogênio em ar.

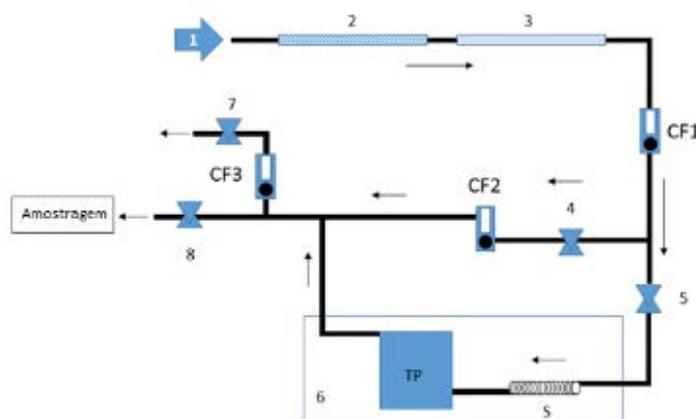
3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Preparo de amostras gasosas padronizadas de NO₂

O sistema para geração de padrões de NO₂ gasoso foi montado com tubulações de teflon com 4 mm diâmetro, medidores de vazão 2,0 L.min⁻¹ (Coler Palmer, USA) e controlador de pressão em 60 psi (Norgreen, USA) para a diluição e calibração dinâmica. Foi utilizado para geração de concentração padrão um tubo de permeação de NO₂, com taxa de permeação de 81.25 ng min⁻¹ (VICI Metronics, USA). Para conversão de unidades pode ser considerado que a 25,0 °C, 10,0 ppb = 18,8 µg.m⁻³.

O sistema montado para a geração do padrão gasoso está apresentado na Figura 31. O ar comprimido foi purificado através de colunas de 30 mm x 400 mm, contendo carvão ativado e sílica gel impregnada com iodeto de potássio (2 e 3), para retenção de possíveis contaminantes e oxidantes presentes no ar. Após essa etapa de remoção de oxidantes e umidade, o ar foi redirecionado à câmara contendo o tubo de permeação (TP) de NO₂, com taxa de permeação certificada de 81.25 ng min⁻¹ (VICI Metronics, USA) (5) dentro de um banho com temperatura controlada de 30 ± 0,1°C (6). Uma serpentina de cobre (S) foi colocada dentro do banho para ajudar no equilíbrio da temperatura do gás. O amostrador foi montado no fim da linha de geração do padrão gasoso (8) e parte do ar descartado (7). Controladores de vazão (CF) foram adicionados para manter a vazão de ar constante em um valor preestabelecido. A montagem é conveniente pois possibilita a diluição da mistura de ar padrão.

Figura 31. Sistema de geração de atmosfera padrão com diferentes concentrações de NO₂. 1 – Entrada de ar comprimido, 2 e 3 – Colunas de purificação de ar, 4 – Fluxo de diluição, 5 – Fluxo de permeação, S – Serpentina, TP – Tubo de permeação, 6 – Banho termostatzado, 7 – Fluxo de descarte, 8 – Fluxo de amostragem, CF – Controladores de fluxo.



3.3.2 Preparo de reagentes

3.3.2.1 Reagente de Griess-Saltzman(GS)

O reagente de Griess-Saltzman foi preparado nas condições estabelecidas para o método padrão 4500 -NO₂ (CLECERI; GREENBERG; EATON, 1989; LODGE 1989).

3.3.2.2 Solução trietanolamina absorvedora (TEA)

A solução de TEA foi preparada com 11,0 % (v/v) de TEA, 3,6 % (v/v) etilenoglicol e 25,0 % (v/v) de acetona. Para a eluição foi empregada uma solução metanólica 5,0 % (v/v) (UGUCIONE; GOMES NETO; CARDOSO, 2002)

3.3.2.3 Preparo do Cartucho C18 de amostragem

Foi usado como amostrador para o NO₂ um cartucho de sílica-C18 300 mg (Waters, USA) impregnado com solução de trietanolamina. Para a impregnação do cartucho C18 foi utilizado uma seringa contendo cerca de 10 mL de solução de TEA para forçar a solução a passar através da coluna C-18 (UGUCIONE; GOMES NETO; CARDOSO, 2002). O excesso da solução de TEA foi retirado passando-se ar puro isento de NO₂ por cerca 10 minutos. O cartucho C18 pronto para uso é guardado dentro de saco plástico selado e mantido na geladeira até o momento de uso.

3.3.2.4 Extração e reação para formação do corante

Após a amostragem, o analito retido no cartucho C18 foi eluído com o auxílio de uma seringa contendo cerca de 5 ml de solução de eluição. Dois procedimentos diferentes foram avaliados para o preparo da amostra. No procedimento (I), a solução foi recolhida em um balão volumétrico de 10,00 ml contendo 4,00 ml do reagente de GS. O volume final foi acertado com água e mantido em repouso por 20 minutos para formação do corante de cor rosa. No procedimento (II), a solução metanólica contendo o analito foi recolhida em um balão volumétrico de 5,00 ml e o volume completado com solução de eluição.

3.3.3 Medidas espectrofotométricas e aquisição de imagens

Para realizar as medidas espectrométricas foi usado um espectrofotômetro UV-VIS (U-2000, Hitachi, Tokyo, Japão) e cubetas de quartzo com caminho ótico de 10.0 mm. O produto

da reação possui absorção máxima na região do visível em 540 nm. Uma alíquota da solução obtida no procedimento (I) (balão de 10.00 ml) foi utilizada nas medidas usando o espectrofotômetro. Posteriormente da mesma solução foi retirado um volume de 4.00 ml da solução contendo o corante e adicionado a um frasco transparente de policarbonato de 37 mm de diâmetro. Este frasco foi adaptado com parte de um filter holder (Millipore catalogue No.M000037A0) que foi colocado sobre a superfície do scanner. Com estes frascos adaptados é possível obter várias imagens digitalizadas de diferentes amostras. No procedimento (II), (balão de 5.00ml) foi retirado uma alíquota de 200 µL da solução do analito e esta foi colocada no interior de um spot de uma microplaca de acrílico com 96 furos (BD FALCON, USA). Na sequência foi adicionado 100 µL da solução do reagente de GS. Após 20 minutos procedeu-se a digitalização da imagem do corante formado. Neste caso é possível trabalhar com 96 amostras diferentes.

3.3.4 Convertendo imagens em sinais analíticos método desenvolvido para NO₂.

Na Figura 32 é apresentado um esquema do modelo de processamento da imagem para uma amostra aleatória. Este processamento resultou em uma imagem digitalizada que posteriormente tratada gerou um valor médio dentro da escala cinza

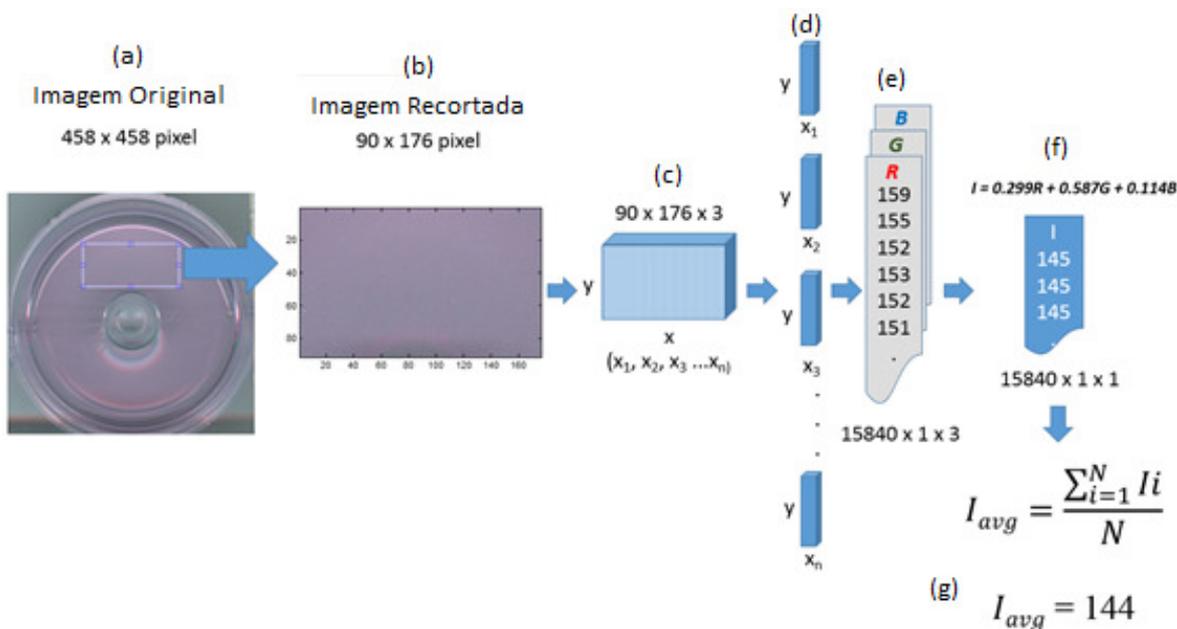
Obtida a digitalização da imagem da solução colorida, foi selecionado uma fração da imagem para ser utilizada no processamento. No procedimento (I) a imagem obtida (a) foi recortada selecionado foi de uma fração de 90 x 176 pixel (b). A escolha da área onde será selecionada a imagem é por simples avaliação visual, buscando uma região onde a cor é mais homogênea. A cor característica desta área de trabalho pode ser representada pelo modelo RGB onde os valores R, G e B caracterizam a cor digitalizada do retângulo destacado (c,d,e). Esses valores foram separados em três colunas. Os dados de cada coluna (R, G e B) (f) podem ser transformados em escala de intensidade de cinza (*I*), valor que é proporcional a um padrão de referência a luminosidade D65 (Equação 22):

$$I = 0,299R + 0,587G + 0,114B \text{ (Equação 22)}$$

Onde *I* é intensidade de luminosidade em escala cinza e R, G e B variáveis que caracterizam a cor da área de análise, pelo modelo RGB. Uma média da somatória dos vetores

contidos na matriz I resulta em um valor I_{avg} (g) que corresponde à média de intensidade presente na área de trabalho transformado em escala de cinza.

Figura 32. Esquema da seqüência de cálculos adotados para conversão da imagem digitalizada para obtenção da equação que resulta na intensidade média em escala de cinza.



No procedimento (II) a imagem digital correspondente a solução com volume de corante de 300 μL foi similar ao anterior com algumas modificações. Foi recortada uma fração de 27 x 27 pixel selecionada da parte central imagem digitalizada. Importante destacar que mesmo está fração da imagem digitalizada possui uma cor menos homogênea que a fração de cor destacada na imagem obtida no procedimento (I). Para contornar este problema, a cor da área de trabalho destacada passa por um processo de homogeneização utilizando-se os pontos de cor dentro da imagem que se repetem com maior frequência.

Para proceder a homogeneização de cor, a área de trabalho pode ser representada por n pontos de observação gerando variáveis R_n , G_n e B_n para cada ponto de cor que forma a imagem. Nesse caso, é possível representar em histograma os n números de cores observadas pelos respectivos R_n , G_n e B_n . Os histogramas são representados como a somatória de mB_i , mG_i e mR_i e obedecem as condições previstas pelas três equações resultantes derivadas da substituição dos valores de R, G e B na variável E apresentada nas Equação 23:

$$E_n = \sum_{i=1}^k mEi$$

$$E = R, G \text{ e } B$$

(Equação 23)

Satisfeitas essas condições, os valores máximos populacionais de intensidade R_{\max} , G_{\max} e B_{\max} que foram obtidos dos respectivos histogramas R (histo(R)), G (histo(G)) e B (histo(B)) correspondentes a intensidade relativa do máximo populacional da imagem analisada representado matematicamente pela equação 24:

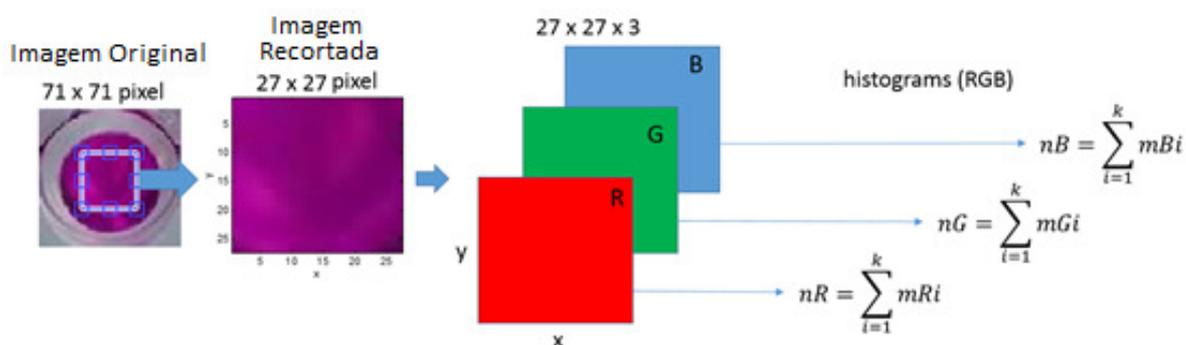
$$E_{\max} = \arg \max_i (\text{histo}(E))$$

$$E = R, G \text{ e } B$$

(Equação 24)

Os valores máximos de intensidade representam a intensidade média de cor da área de trabalho. Este podem ser convertidos para escala de cinza resultado em um valor I, de forma semelhante ao cálculo anterior, representado pela Equação 22. O modelo de processamento de imagem obtido para uma solução contendo o corante com volume de 300 μL é apresentado na Figura 33.

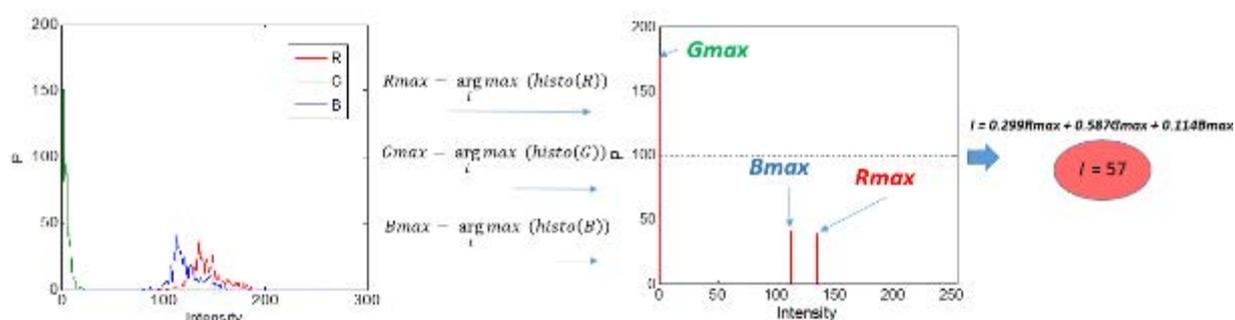
Figura 33. Esquema geral de recorte e aquisição dos histogramas de solução de corante com 300 μL de volume.



Os histogramas adquiridos apresentam aspecto gaussiano, apesar de apresentar ruídos característico no sinal devido a fatores de heterogeneidade e tamanho da imagem final. Para minimizar esses efeitos em vez de ser usado para o cálculo de *grayscale* o valor médio final das

variáveis R, G e B com ruído, apenas foi escolhido os valores máximos de intensidade para a conversão (Figura 34).

Figura 34. Histograma característico de imagens com dimensões de 27 x 27 pixel e representação da seleção dos valores máximos de R, G e B e conversão em escala de cinza (*grayscale*).



Para concentrações elevadas da espécie cromófora a absorção de parte da energia transmitida por uma fonte luminosa é semelhante ao descrito pela lei de Lambert Beer, produzindo uma menor quantidade de radiação eletromagnética capturada pelo detector de imagem.

Para corrigir o efeito de luminosidade de fundo, é utilizado equação de densidade óptica relativa (O.D.R.) representado pela Equação 25:

$$O. D. R. = -\log_{10} \left(\frac{R}{R_0} \right) \text{ (Equação 25)}$$

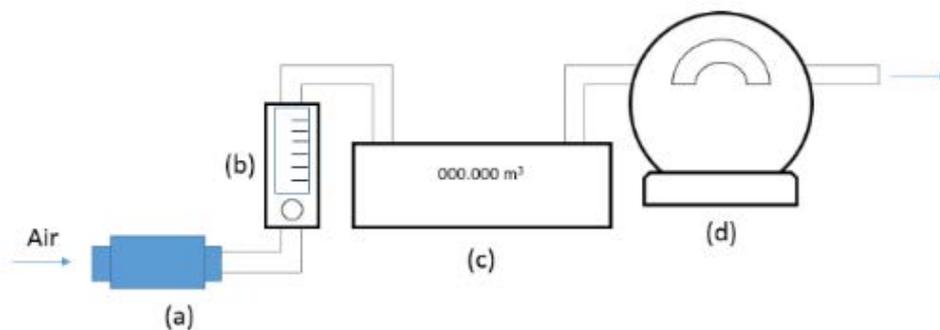
Onde (R) é o valor final de intensidade em escala de cinza e (R_0) referente ao fundo branco de referência do scanner. O sinal (O.D.R.) possibilita a minimização de erros resultantes da obtenção de imagens com variações mínimas de luminosidade provocadas pela absorção de luz por moléculas cromóforas presentes na solução de corante.

3.3.5 Aplicação no ambiente externo

Para amostragem em ambientes externos utilizou-se uma bomba de sucção DOA-V722-AA (Gast, USA), um controlador com medidor de vazão (rotâmetros de vidro e esfera de

alumínio (Cole-Parmer, USA) um totalizador de volume (Cole-Parmer, USA) e cartucho C-18 300 mg (Waters, USA) como apresentado na Figura 35.

Figura 35. Esquema de amostragem do dióxido de nitrogênio em ambiente externo. a) Cartucho de amostragem, b) controlador de vazão, c) totalizador de volume e d) bomba de Sucção.

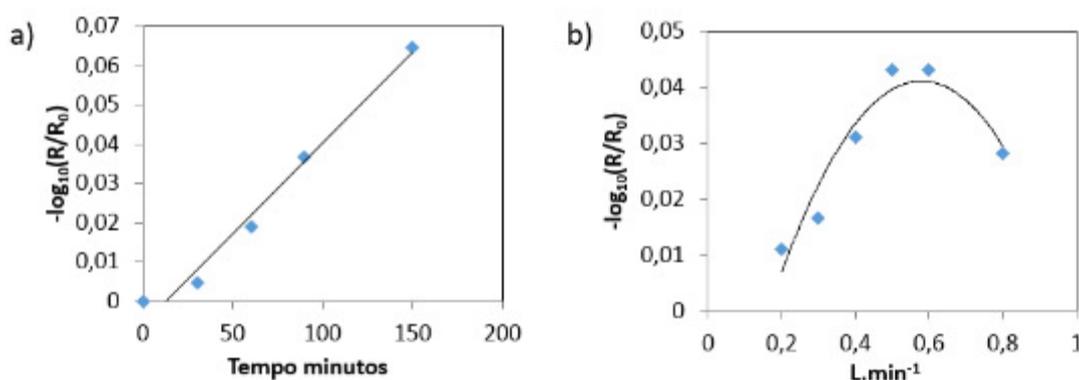


3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Otimização do tempo e vazão de amostragem

No método analítico proposto é importante conhecer limites de trabalho para vazões e tempos de amostragem. O cartucho C-18 impregnado com TEA foi utilizado em amostragem da mistura gasosa padrão contendo 20.0 ppb de NO_2 e vazão de 0.4 L min^{-1} . Inicialmente foi avaliada a capacidade de coleta do amostrador para tempos de amostragem variando entre zero e 150 min. Na Figura 36 (a) são apresentados os resultados, que mostram que para uma concentração de 20.0 ppb, a amostragem pode ser feita por até 150 minutos, sem que ocorra saturação da coluna C-18. Não foram avaliados tempos superiores porque o método deve possuir como qualidade tempo curto de amostragem. Para um tempo de amostragem de 60 min e concentração de NO_2 de 20 ppb, diferentes vazões de amostragem foram avaliadas. Os resultados apresentados na Figura 36 (b) mostram que é possível trabalhar com amostragens com vazão de $0,50 \text{ L min}^{-1}$ mantendo a eficiência de coleta pela coluna C-18.

Figura 36. (a) Tempo e (b) Vazão de amostragem em função do sinal analítico medido.



3.4.2 Etapa de calibração e definição da faixa de trabalho

Estabelecidos os parâmetros de amostragem, na sequência foi estabelecida a curva analítica de calibração. Inicialmente foi utilizado o procedimento (I) no preparo da amostra e sua determinação. Para esta curva analítica, utilizou-se amostragem de 60 min e vazão de amostragem de $0,50 \text{ L min}^{-1}$ e as concentrações de NO_2 foram variadas entre 15.1 e 100.0 ppb. A cada concentração avaliada resultou em soluções de coloridas que foram utilizadas para obter imagens digitalizadas. Estas imagens coloridas foram transformadas em sinais de tons de cinza. Estes sinais foram finalmente transformados em O.D.R. Posteriormente com os valores de

intensidade O.D.R. e valores de concentração, foi possível plotar a curva analítica para o método (Equação 26)

$$\text{O.D.R.} = 7,04(\pm 0,23) \times 10^{-4} [\text{NO}_2] \quad (R^2 = 0,997 \quad n = 18 \quad F = 972,51) \quad (\text{Equação 26})$$

Onde O.D.R. é a densidade óptica relativa da imagem digitalizada e transformada em escala cinza e $[\text{NO}_2]$ a concentração de dióxido de nitrogênio em unidades de ppb. O limite de detecção baseado no critério na menor concentração que gera sinal 3,3 x maior que o sinal branco de fundo obtido para estas condições de amostragem é de 12,0 ppb. Os demais parâmetros analíticos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros analíticos obtidos para o procedimento (I) e (II) para determinação de NO_2

Parâmetro	Método 1	Método 2
Faixa linear (ppb)	15,1 – 100,0	5,10 – 54,0
Erro relativo (%) (n=5)	7,00	1,60
Coefficiente de variação (%)	3,20	1,80
Limite de detecção*	15,0 ± 1,0	5,10 ± 0,40
R^2	0,997	0,998
SD	0,00239	0,0109
Teste F	1344	3310

3.4.3 Processamento de imagem para baixas concentrações e menores volumes

A faixa linear de trabalho obtida para o método desenvolvido segundo o procedimento (I) é adequada para análises de NO_2 presentes em ar ambiente de regiões impactadas por atividades antrópicas (SPICER et al., 1994). Porém, é possível aumentar a faixa de trabalho do método. No caso de altas concentrações de NO_2 , a redução do tempo de amostragem como mostra os resultados apresentados na Figura 35 (a) é a solução mais conveniente. Para baixas concentrações de NO_2 pode-se evitar trabalhar o tempo maior de amostragem, reduzindo o volume de solução utilizado na solubilização do analito coletado no cartucho de C-18. Em paralelo é interessante também diminuir o volume dos reagentes formadores do corante, o que

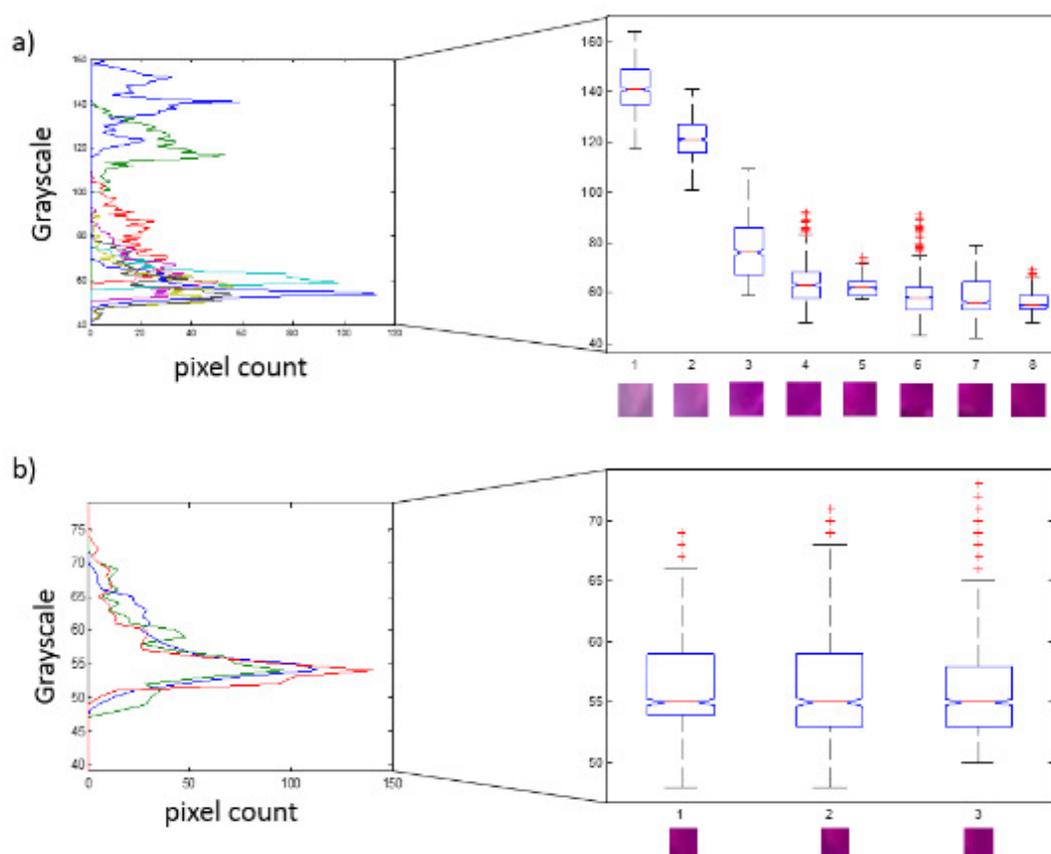
vem de encontro com o princípio de uma química verde, reduzindo a geração de resíduos. Na sequência apresentamos o procedimento (II) mostrando como é possível viabilizar o processo.

Para reduzir o volume de reagentes utilizados na etapa de formação do corante, a reação foi efetuada sobre uma placa transparente com 96 furos (*spots*), com volumes de 300 μL de solução para cada *spot* da placa. Um volume de 200 μL da alíquota da amostra de solução foi transferida para um ponto da placa e foi adicionado 100 μL do reagente de GS. Após 20 minutos de repouso, a placa foi colocada sobre o scanner e sua imagem digital foi obtida.

Para minimizar o efeito de heterogeneidade, foram adquiridos os histogramas das imagens para encontrar os valores de máximos populacionais. Esses valores de máximo populacional passaram a ser utilizados como novo valor representando as intensidades das imagens processadas.

Para avaliar o sinal médio de cor representa o valor de sinal analítico associado a uma respectiva concentração de NO_2 foi necessário submeter o conjunto de imagens resultantes a uma análise de variância (ANOVA). Inicialmente, foram avaliadas as imagens digitalizadas convertidas em sinais de escala de cinza. As imagens digitalizadas resultaram em soluções com diferentes concentrações de NO_2 (5,10; 7,70; 15,4; 23,2; 30,9; 34,0; 38,6 e 54,0 ppb). Os sinais convertidos na escala cinza foram ordenados em colunas de 1 a 8 (Figura 37 (a)). A mesma avaliação de variância foi repetida para a mesma concentração de 34,0 ppb e foram convertidas em sinais de escala cinza e ordenados em colunas de 1 a 3 (Figura 37 (b)).

Figura 37. Boxplot representado variâncias encontrada entre sinais da escala cinza para diferentes concentrações de NO₂(a) e para uma mesma concentração de NO₂(b).



Na Tabela 3 são apresentadas as variâncias comparadas para o conjunto de sinais de escala cinza resultantes das imagens digitalizadas para diferentes concentrações de NO₂. Resultados mostram que os sinais observados para escala de cinza são diferentes ($p = 0$), e que os sinais analíticos obtidos são diferentes para cada concentração de NO₂.

Tabela 3 Comparação das variâncias ANOVA para as intensidades grayscale resultantes de diferentes imagens digitalizadas obtidas de diferentes concentrações de NO₂.

Fonte	SS	gl	MS	F	Prob>F
Blocos	5368565.2	7	766937.9	11740.91	0
Erro	380434.5	5824	65.3		
Total	5748999.7	5831			

Realizado o teste t pareado para comparar os sinais de escala cinza obtidas para a mesma concentração de um ponto intermediário, 34,0 ppb foi possível observar que não são significativamente diferentes em um intervalo de confiança de 95% e portanto, representam o mesmo sinal (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação de médias e desvio padrões para os sinais de intensidades grayscale obtidas de um conjunto de imagens 1, 2 e 3 digitalizadas resultantes de uma mesma concentração de 34 ppb (teste t pareado).

	Média	Desvio padrão	Comparação	t _{calculado}	t _{tabelado}
1	56,7	4,20	1-2	1,1414	
2	56,4	5,06	2-3	0,7319	< 1,9632
3	56,5	4,70	1-3	0,4959	
n	729	GI	728		

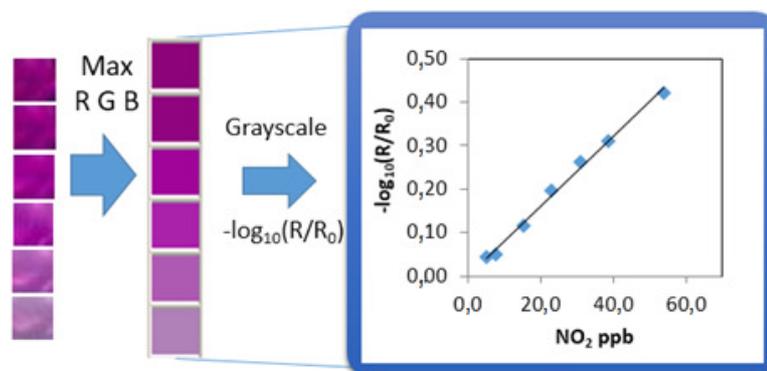
O boxplot apresentado na Figura 37 apresenta o esquema resumindo os resultados obtidos para a avaliação das variâncias entre diferentes concentrações de NO₂ e também dos sinais obtidos para uma mesma concentração.

Para utilização dos sinais de escala cinza em sinais de uso analítico, estes foram recalculados em densidade óptica relativa (O.D.R.). A curva de calibração resultante está representada pela equação 27:

$$\text{O.D.R.} = 7.99(\pm 0.14) \times 10^{-3} [\text{NO}_2] \quad (R^2 = 0.9981 \quad n = 21 \quad F = 3310,8) \quad (\text{Equação 27})$$

Onde O.D.R. é densidade óptica relativa e [NO₂] a concentração do gás em ppb. O limite de detecção obtido para estas condições de amostragem é de 5.10 ppb. Outros parâmetros analíticos estão apresentados na Tabela 1. A representação esquemática do modelo proposto para o tratamento das imagens digitalizadas está apresentada na Figura 38.

Figura 38. Esquema de processamento das imagens e utilização dos dados para obtenção da curva analítica para determinação de NO₂ em ppb.

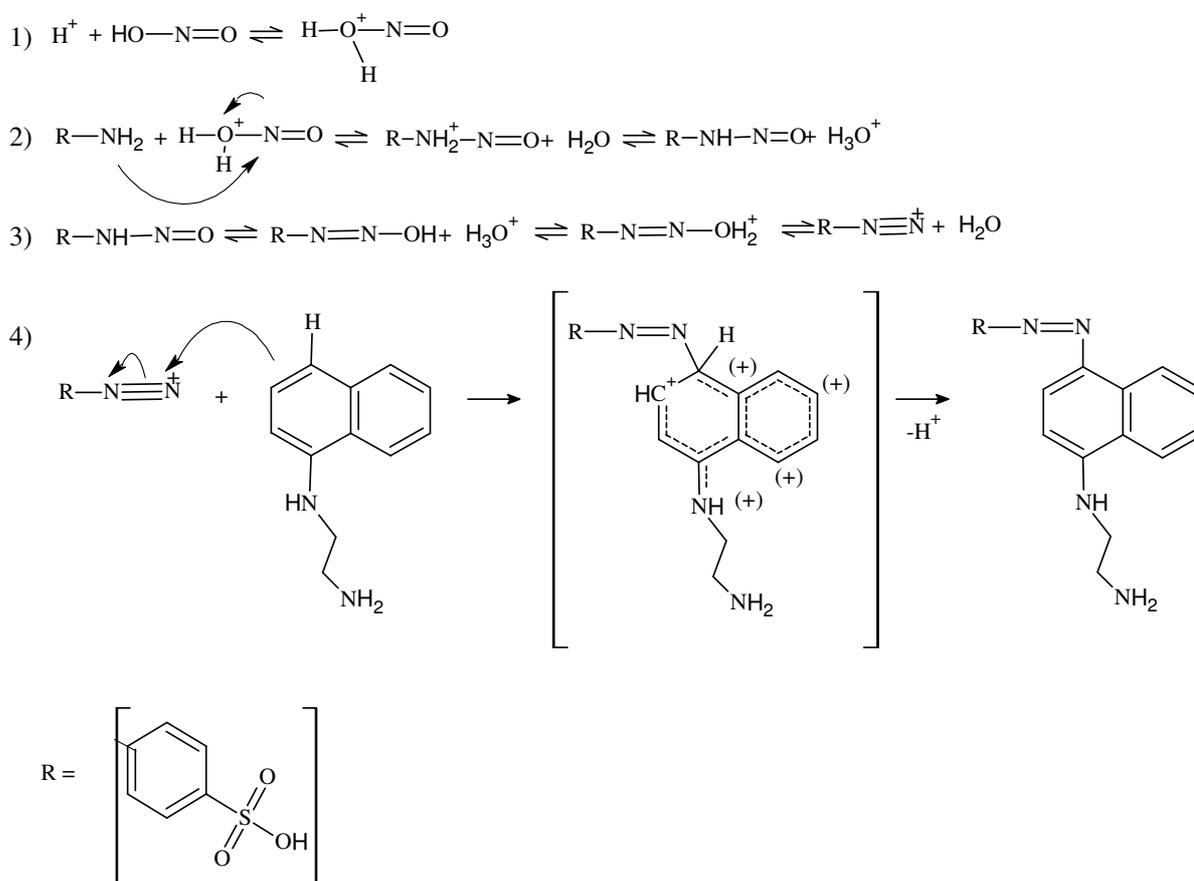


3.4.4 Avaliação de interferentes

A reação colorimétrica utilizada para determinação do NO₂ coletado foi a reação de Griess-Saltzman. Esta reação ocorre em etapas e o meio ácido (pH 2,0- 2,5 (\pm 0,1)) favorece a transformação da espécie NO₂ coletada na espécie iônica NO⁺. Este íon NO⁺ reage com o grupo amina da molécula de ácido sulfanílico (etapa lenta) formando o sal de diazônio. O sal formado reage com o N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED) em uma reação de substituição eletrolítica formando o corante de cor rosa estável em 15 min que apresenta absorção máxima em 540 nm.

A reação colorimétrica de Griess-Saltzman e seu mecanismo proposto estão representados na Figura 39. Inicialmente é formado o íon H₂O⁺NO em meio ácido (etapa 1). O íon H₂O⁺NO reage com o grupo amina da molécula de ácido sulfanílico em uma etapa lenta formando o sal de diazônio (etapa 2 e 3). O sal formado reage com o N-(1-naftil)-etilenodiamina em uma reação de substituição eletrolítica formando um produto majoritário (etapa 4) que apresenta absorção máxima em 540 nm.

Figura 39. Mecanismo proposto para reação de GS.

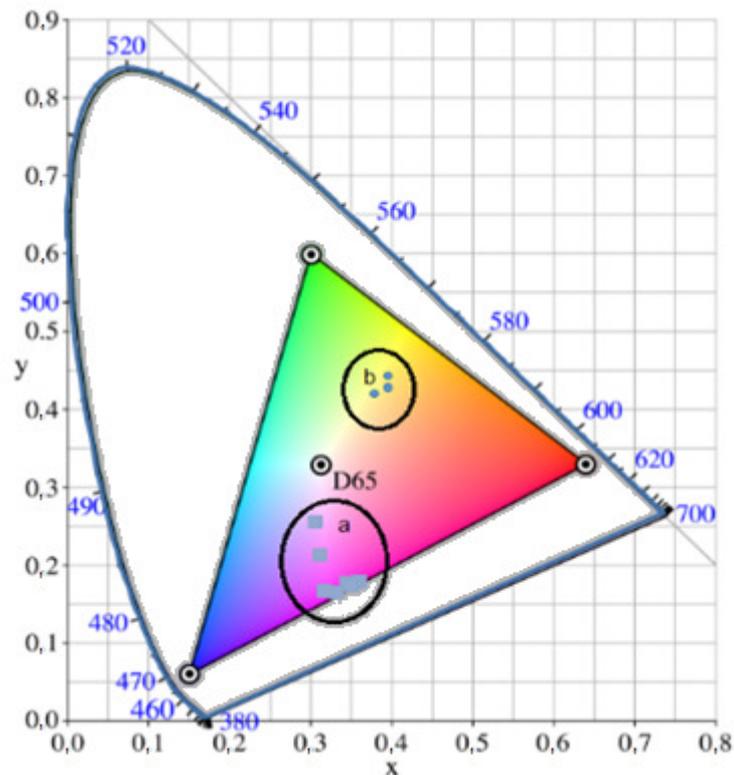


Como o procedimento de amostragem foi modificado, reavaliando a interferência de SO_2 e O_3 que são descritos como interferentes da reação e invariavelmente estão presentes em atmosferas contaminadas com o NO_2 . Para concentração de 20 ppb de NO_2 foi observado que O_3 e SO_2 causam interferência de cerca de 17% e 13% em concentrações superiores a 200 e 800 ppb respectivamente. Estes valores não são usualmente encontrados em atmosferas de ambientes fechados ou abertos.

Outra possibilidade de ação de interferentes podem ocorrer com espécies químicas que conferem com a solução diferente da esperada (rosa). Como o método proposto usa o sinal analítico resultante da luz refletida pela solução que é posteriormente transformada para escala de cinza. A interferência no resultado pode ocorrer por formação de uma cor diferente da esperada e que resultará em sinal na escala cinza que corresponderá a uma concentração de NO_2 não real.

Para interferentes que formam solução de cor diferente da esperada é possível, utilizar um teste prévio avaliando se a imagem digitalizada corresponde a cor esperada prevista pelo diagrama de cromaticidade (Figura 40).

Figura 40. Diagrama de cromaticidade (a) solução de cores que podem ser aceitas para quantificação e (b) soluções que não podem ser consideradas para quantificação.



O diagrama de cromaticidade é usado como base na composição de misturas de cores que imitam o espectro visível (SMITH; POKORNY, 1996). A relação entre as coordenadas do diagrama de cromaticidade e as variáveis R, G e B podem ser correlacionadas pela equação 28.

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = M \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (\text{Equação 28})$$

Onde X, Y e Z são os valores de coordenadas de cromaticidade, [M] é matriz de proporcionalidade dependente da variação do branco teórico e da taxa de iluminação utilizada, e os valores correspondentes das componentes Red (R), Green (G) e Blue (B) (MEYER; GREENBERG, 1980; PUJOL RAMO; MARTÍNEZ VERDÚ; RYU et al., 2014). Desta forma

é possível efetuar conversões entre as variáveis R, G e B para as coordenadas x, y e z no diagrama de cromaticidade. Neste trabalho foi utilizado como referência o diagrama CIE 1931 (HOLMES, 1940; SMITH; POKORNY, 1996; WRIGHT, 1943), considerando as coordenadas do diagrama equidistantes $x=y=z=1$. O arranjo desta proposta de conversão resultou em um conjunto de equações lineares, representado nas equações 29, 30, e 31.

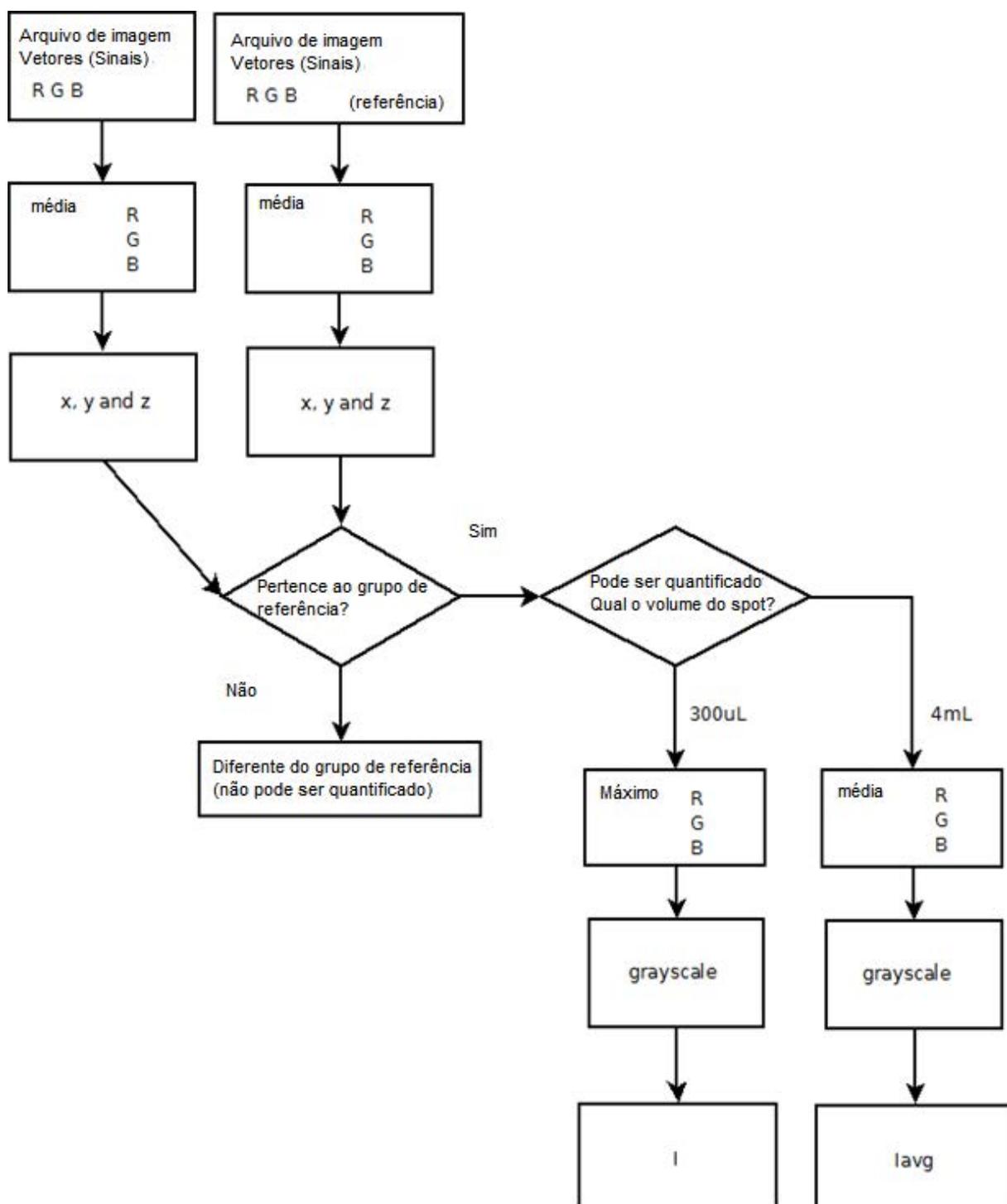
$$x = (0,490R + 0,310G + 0,200B) / (0,667R + 1,132G + 1,200B) \quad (\text{Equação 29})$$

$$y = (0,117R + 0,812G + 0,010B) / (0,667R + 1,132G + 1,200B) \quad (\text{Equação 30})$$

$$z = (0,000R + 0,010G + 0,990B) / (0,667R + 1,132G + 1,200B) \quad (\text{Equação 31})$$

Com equações 29, 30 e 31 é possível converter os valores dos vetores R, G e B médios da matriz de imagem nas coordenadas de cromaticidade x, y e z que resulta em uma posição espacial dentro dos eixos do diagrama de cromaticidade. Essa abordagem evita um episódio de falso positivo de concentração produzido por uma solução de cor diferente da esperada seja transformado em sinal analítico. O diagrama apresentado na Figura 40, auxilia nas decisões a serem tomadas para que o valor de O.D.R. calculado para imagem digitalizada seja aceito como sinal analítico correspondente apenas para determinações de NO₂. Soluções que correspondem a cor esperada (rosa) e soluções com cor amarela foram avaliadas para verificar o conceito. Os valores obtidos das imagens digitalizadas para as duas matrizes de cor resultaram em valores das coordenadas de cromaticidade que podem ser consideradas como agrupamento de cores falsas e cores verdadeiras. Portanto foi possível observar que a amostra analisada é coerente com o grupo conhecido e decidir se a amostra poderá ou não ser aceita como representando no grupo de cores verdadeiras no fluxograma da Figura 41.

Figura 41. Fluxograma descrevendo o algoritmo qualitativo para tomada de decisão



3.4.5 Aplicação em amostras ambientais

O método desenvolvido foi aplicado em ambiente externo. A amostragem com a coluna C 18 foram feitas em intervalos de uma hora, no período da manhã no Instituto de Química da Unesp Araraquara, no dia 15 de setembro de 2012 (latitude -21.8076, longitude -48.1910, elevação 650 m). O método para determinação por digitalização de imagem foi o procedimento (II). Para comparação entre os resultados determinados por espectrofotômetro e digitalização das imagens uma alíquota de 4.00 mL da solução obtida na amostragem foi utilizada para formar o corante, utilizando-se um balão de 10.00 mL completando o volume com o de reagente de GS.

Para avaliar os resultados analíticos obtidos com valores de concentração de NO₂ presentes no ambiente os valores obtidos para concentração foram comparados com os medidos com o equipamento comercial NO_x Analyser (Thermoscientific, USA).

Os resultados estão apresentados na Tabela 5, para os valores de NO₂ encontrados no período descrito. Os resultados obtidos empregando-se o processamento de imagens e espectro fotométrico não diferem significativamente entre si em um intervalo de confiança de 95 % e seguem a tendência do valor determinado pelo equipamento comercial.

Tabela 5. Resultados obtidos empregando-se o método proposto por imagens e comparação geral entre uso do espectrofotômetro e o NO_x analyser para a concentração de NO₂ em um ambiente externo.

Amostragem	Método por imagens digitais					
	NO _x analyzer	Média de NO ₂ (ppb)	n	SD	95 %	Diferença
07:10h– 08:10h	17,7	20,0	3	0,600	0,40	2,30
08:20h– 09:20h	16,1	18,0	3	1,90	1,20	1,90
09:10h– 10:10h	13,1	10,1	3	5,10	3,30	-3,00
10:10h– 11:10h	8,60	9,60	3	3,70	2,40	1,00
11:10h– 12:10h	5,60	7,00	3	0,30	1,20	1,00

*Média da diferença = 1,8; Desvio padrão da diferença = 3,6; $t_{\text{calculado}} = 1,15$; $n=5$ $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$

3.5 CONCLUSÕES

Nesse estudo foi descrito a determinação de um composto gasoso empregando a abordagem de processamento de imagens digitais na região do espectro eletromagnético visível. O dióxido de nitrogênio foi coletado e pré-concentrado em um cartucho C-18 impregnado com trietanolamina. Posteriormente na etapa de amostragem, o NO₂ coletado foi eluído e submetido a reação colorimétrica com os reagentes de Griess-Saltzman.

O produto da reação foi adicionado a uma microplaca de acrílico e sua imagem digital foi obtida e processada de acordo com os modelos de cores adequados. O método apresentou-se flexível para determinar NO₂ gasoso em faixas de concentrações de 5,1 a 54,0 e 15,0 a 100,0 ppb com tempo de amostragem de 60 minutos. Dióxido de enxofre, ozônio, sulfato e nitrato foram avaliados e não demonstraram interferência significativa. O método empregado pode ser aplicado em medidas de NO₂ em ar na temperatura ambiente.

A grande vantagem da abordagem utilizada é a não necessidade de equipamentos de alto custo para realizar medidas analíticas. A utilização de dispositivos de aquisição de imagens e laptops portáteis são uma alternativa para a amostragem in situ e determinação de componentes gasosos em uma estação de trabalho sem a necessidade de transportar a amostra até o laboratório com instrumentos simples baseados em imagens digitais.

Esse processo pode diminuir os custos relativos de análises exploratórias iniciais em ambientes impactos pela ação do homem. Também foi observado uma faixa linear para concentrações maiores de NO₂, possibilitando que o método possa ser empregado em estudos de saúde ocupacional. O método desenvolvido apresenta um custo reduzido por não ser necessário a aquisição de equipamentos dedicados para as medidas realizadas.

Capítulo III

Determinação de SO₂ atmosférico por imagens digitais

→ *Método Univariado e Multivariado utilizando imagens digitais para a determinação de SO₂ atmosférico*

4 DETERMINAÇÃO DE SO₂ ATMOSFÉRICO POR IMAGENS DIGITAIS

O dióxido de enxofre (SO₂) é um gás proveniente da queima de combustíveis fósseis. Sua emissão está associada a impactos diretos no ambiente promovendo a formação de chuva ácida e formação de sulfato no material particulado responsável pelo efeito albedo na atmosfera.

Nesta etapa do trabalho foi desenvolvido um método químico baseado na reação de precipitação entre sulfato e cloraniliato de bário para a determinação indireta de SO₂ em ar. A imagem da solução resultante foi digitalizada e processada usando dois métodos distintos para comparação: (1) a variável Green do modelo RGB e (2) uma abordagem quimiométrica decompondo a matriz RGB em um falso espectro de intensidade composto por parâmetros de diversos modelos computacionais de falsa cor para correlacionar a concentração de SO₂ com a intensidade dessa nova matriz em modelos de regressão multivariados.

4.1 A química do SO₂ na troposfera

Processos biogeoquímicos geralmente emitem enxofre em suas formas reduzidas como o H₂S, CS₂, COS, compostos orgânicos reduzidos de enxofre como CH₃SH (metil mercaptano), CH₃SCH₃ (dimetil mercaptano, DMS) e CH₃SSCH₃ (dimetil dissulfeto, DMDS). A oxidação destes compostos na troposfera é responsável pela produção de aerossóis devido a formação de núcleos de condensação (SEINFELD; PANDIS, 2012).

O sulfeto de carbonila (COS) está distribuído uniformemente devido ao seu tempo de meia vida na atmosfera e pode ser emitido por fontes naturais ou antrópicas. Na estratosfera esses compostos são oxidados gerando o sulfato que constituem os aerossóis. No mar, os processos biológicos são responsáveis pelas emissões de SO₂, ácido metano sulfônico (CH₃SO₃), e sais de sulfato (com exceção dos sais de sulfato presentes no mar) (WAYNE, 2000).

Outro fator importante relacionado a contribuição do sulfato na atmosfera é a sua contribuição para a formação do efeito albedo, que influencia diretamente na incidência de radiação solar no planeta (WAYNE, 2000). Os sais de sulfato em suspensão na atmosfera são responsáveis por muitas vezes, formarem núcleos de condensação responsáveis pelo regime de chuvas e um dos efeitos responsáveis pela manutenção da temperatura do planeta (WAYNE, 2000).

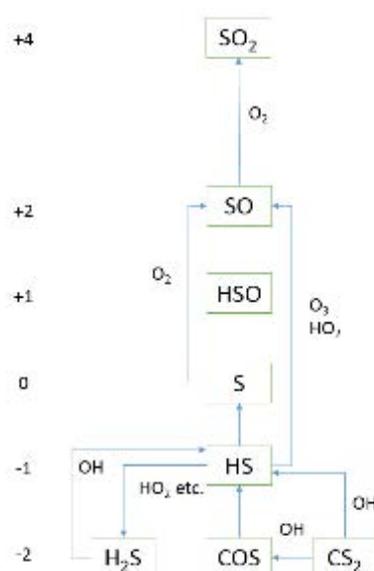
Estima-se que nos processos biológicos que ocorrem nos oceanos, a substância majoritária emitida é o DMS. O enxofre em suas formas reduzidas também pode ser emitido pelas atividades humanas em regiões industriais e urbanas devido a queima de combustíveis fósseis (WAYNE, 2000).

O enxofre reduzido é passível de sofrer diversas reações de oxidação na atmosfera culminando em 6 possíveis etapas, onde o enxofre assume os estados de oxidação que variam de $-II$ e $-I$ até a formação do SO_2 em $+IV$ (WAYNE, 2000) conforme representado na Figura 42. Estima-se que o SO_2 emitido globalmente está na faixa de $130 - 180 \times 10^{12}$ g de S ano $^{-1}$ (BRANDT; VAN ELDIK, 1995).

Comparando as fontes de emissão naturais e antrópicas observa-se que as fontes naturais são globalmente distribuídas enquanto que as atividades humanas geram emissões de compostos de enxofre mais acentuadas em regiões populosas e de maior desenvolvimento urbano (FINLAYSON-PITTS; PITTS JR, 1989).

Levando em consideração a média global das emissões de compostos de enxofre na atmosfera, foi observado que entre o período compreendido ao uso intenso de máquinas a vapor (1850) até meados de 1990 houve um crescimento na emissão de compostos de enxofre na atmosfera (LEFOHN; HUSAR; HUSAR, 1999). Após 1945, com o término da Segunda Guerra Mundial observou-se emissões mais acentuadas de compostos de enxofre na Ásia, África e América do Sul (SIEVERING et al., 1991).

Figura 42. Diagrama representado os diferentes estados de oxidação do enxofre nos compostos na troposfera e sua progressão resultando na formação do dióxido de enxofre (S+IV) (Adaptado de (WAYNE, 2000)).



Após este período muitos países começaram programas governamentais para a redução do teor de enxofre em combustíveis, contribuindo desta forma para a redução da emissão de

SO₂ para a atmosfera, entretanto muitos países em desenvolvimento como o Brasil não atingiram esses objetivos (MARTINS; DE ANDRADE, 2002).

4.1.1 Métodos para determinar o SO₂ atmosférico

Vários métodos são desenvolvidos na literatura para medidas de SO₂ atmosférico empregando diferentes técnicas como lasers presentes em satélites meteorológicos (WAYNE, 2000) e absorção no infravermelho (FINLAYSON-PITTS; PITTS JR, 1989) apresentando vantagens por serem métodos diretos e contínuos para o monitoramento em tempo real do poluente (LODGE; 1989).

Pórem por questões relacionadas a custo de instrumentação, presença de interferentes (podem oferecer falsos positivos de concentração) e sensibilidade da técnica, fazem dos métodos químicos indiretos medida adequados para o monitoramento ambiental pela robustez e não necessitar muitas vezes de instrumentação ótica dedicada para este tipo de determinação (FINLAYSON-PITTS; PITTS JR, 1989; (LODGE; 1989).

O método indireto mais utilizado para a determinação do dióxido de enxofre em ar é baseado na oxidação do S (IV) à S (VI), fixando o enxofre em uma espécie química mais estável (LODGE; 1989).

As vantagens deste tipo direto de determinação são: (1) Possibilidade de coletar o analito em um ambiente que contém a presença de oxidantes; (2) Oxidar diferentes espécies presentes na atmosfera que possam agir como interferentes no método de determinação empregado (por exemplo NO e NO₂). As desvantagens empregadas neste tipo de fixação química do SO₂ em ar são: (1) Necessidade de métodos de determinação que possam ser utilizados na presença de oxidantes (2) Determinação indireta de diferentes espécies contendo enxofre, passíveis a serem oxidadas a sulfato ou a formação de artefatos devido a coleta direta de S (VI) presente na atmosfera. Apesar de críticos ambos os problemas podem ser contornados. Atmosferas que contém SO₂ dificilmente possuem quantidades apreciáveis de compostos reduzidos de enxofre, visto a incompatibilidade entre os analitos. Quanto ao problema da geração de artefatos podem ser utilizadas membranas de teflon minimizar a coleta de material particulado que contém quantidades apreciáveis de Sulfato, previamente oxidado na atmosfera (LODGE; 1989).

Para a determinação de sulfato após a etapa de fixação química podem ser empregados como métodos como a turbidimetria com o nitrato de bário, cromatografia de íons, entre outros

(LODGE; 1989). Um método sensível, bastante empregado para esse tipo de determinação utiliza a precipitação do BaSO_4 e como reagente o sal de cloraniliato de bário (LODGE; 1989).

Nesta reação ocorre a liberação quantitativa do ácido cloranílico que possui absorções na região do ultravioleta e visível (LODGE; 1989). Esse método, portanto, permite liberação de uma molécula orgânica que absorve luz na região do espectro visível resultando em soluções coloridas. Essas soluções coloridas podem ter suas imagens capturadas e como consequência revelarem a concentração de dióxido enxofre coletado em ar.

4.2 OBJETIVOS

Os objetivos no estudo de determinação de SO₂ atmosférico por imagens digitais foram:

- Aplicar os conceitos de visão computacional para processamento e interpretar imagens para mensurar o sinal analítico de uma imagem proveniente do método padrão descrito na literatura para a determinação de SO₂ em ar
- Desenvolver formas de processamento e interpretação de sinal para redução de incertezas nas imagens digitais empregando calibração multivariada.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Medidas de caracterização

Para realizar as medidas colorimétricas na região do visível foi utilizado um espectrofotômetro SHIMATZU 1800 UV-PROV e cubeta de quartzo com 10,0 mm de caminho ótico.

As medidas de infravermelho foram realizadas em equipamento Nicolet 6700 (Thermo-Scientific, USA) acoplado a um acessório smart orbit em modo de reflectância total atenuado (ATR) em suporte de cristal de diamante e resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de RMN ^{13}C foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III 400WB a 100 MHz (9,4 T) (Bruker, Alemanha).

Os experimentos de MEV e EDS foram realizados utilizando um MEV Topcon modelo SM300 (Topcon, Holanda).

4.3.2 Soluções e reagentes

4.3.2.1 Síntese do cloraniliato de bário

Para sintetizar o cloraniliato de bário, utilizou-se uma solução de ácido clorânico em acetona (0,20g : 100 mL de água). Esta solução foi agitada vigorosamente adicionou-se lentamente um solução de nitrato de bário saturada (0,26 g : 200 mL de água), até o término da formação de precipitado. O produto de reação foi lavado com acetona, e mantido em repouso por 4 horas. O precipitado foi colocado na estufa durante o período de duas horas $40,0^\circ\text{C}$ e levado para o dessecador. O produto da síntese foi pesado e submetido a medidas RMN ^{13}C e infravermelho entre 4000 à 500 cm^{-1} .

4.3.3 Geração e padronização do SO_2 no ar

A determinação do dióxido de enxofre foi realizada através da reação entre sulfato e o cloraniliato de bário resultando em um produto que absorve em 540nm.

O sistema para geração de padrões de SO_2 gasoso foi montado com tubulações de teflon com 4 mm diâmetro, medidores de vazão $2,00\text{ L min}^{-1}$ (Coler Palmer) e controlador de pressão em 60 psi (Norgreen) para a diluição e calibração dinâmica. Foi utilizado para geração de concentração padrão um tubo de permeação de SO_2 , com taxa de permeação de $90,10\text{ ng min}^{-1}$

(VICI Metronics, USA). Para conversão de unidades pode ser considerado que a 25,0 °C, 10.0 ppb = 26,2 $\mu\text{g m}^{-3}$.

Para realizar a padronização do dióxido de enxofre foi utilizado um sistema de geração de atmosfera padrão gasoso para diferentes concentrações do analito como representado na Figura 31 e discutido no capítulo II.

4.3.4 Etapa de coleta do SO₂ (fixação química)

Para a fixação do SO₂ foi usado um tubo impingir com solução aquosa de água oxigenada 0,1 % e ácido clorídrico 0,100 mol L⁻¹. Este tubo impingir, foi montado com uma membrana de 45 μm de teflon para barrar a entrada de partículas sólidas presentes no ar.

O amostrador foi conectado a um controlador de vazão de volume e uma bomba comum para sucção do ar analisado durante um período de 24 horas e vazão de 1,0 L min⁻¹ (LODGE; 1989).

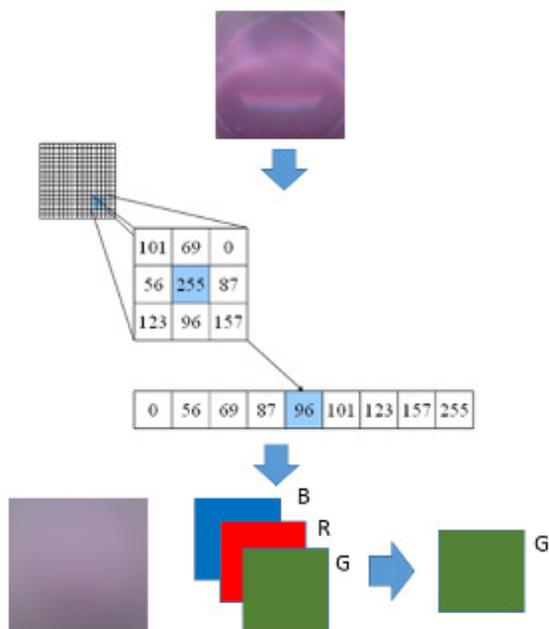
4.3.5 A reação colorimétrica

Após a etapa de fixação do dióxido de enxofre a solução resultante foi avolumada em um balão volumétrico de 5.00 mL. Uma alíquota de 1,00 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10,00 mL juntamente com 2,00 mL de solução de cloraniliato de bário (500 mg L⁻¹) e 1,00 mL de solução Tampão de acetato de sódio/ ácido acético 0,100 molL⁻¹ e pH = 4,0 \pm 0,1. O balão foi avolumado utilizando uma solução de propanol 80 %.

Após 10 minutos um volume de 300 μL foi transferido para microplaca de acrílico com 96 furos (BD FALCON, USA). A placa foi colocada em um scanner HP Scanjet G4050, para aquisição de uma imagem digital da solução em 300 dpi e 16 bits. As soluções foram também submetidas a medidas colorimétricas utilizando um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1800 em 540 nm.

Com o valor adquirido nas intensidades de RGB foram convertidos para a escala de cinza e como referência o modelo D65 de iluminação que corresponde a luz do sol em um dia claro. Os sinais adquiridos foram processados empregando um filtro de mediana $r=50$ (GONZALEZ; WOODS; EDDINS, 2004), seleção do canal Green e normalização em relação ao fundo branco de referência submetido ao mesmo filtro, conforme representado na Figura 43.

Figura 43. Diagrama dos métodos utilizados para processar e interpretar os sinais de imagem pelo método univariado aplicando filtros digitais

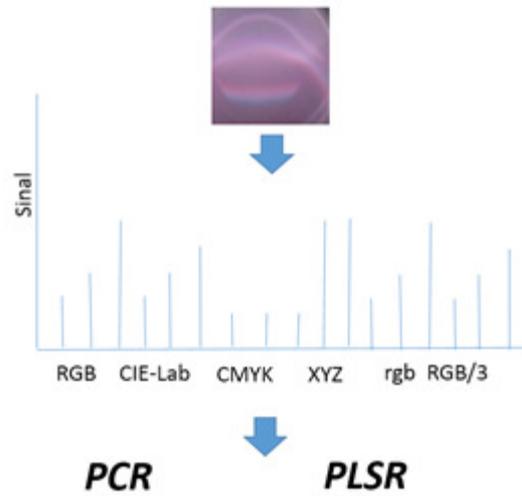


4.3.6 Análise multivariada de dados

Para análise multivariada dos dados os valores de RGB foram decompostos em uma nova matriz de dados com modelos de falsas cores montada a partir das variáveis R, G e B da matriz de imagem original, conforme pode ser representado na Figura 44 (SANTOS, P.; WENTZELL, P.; PEREIRA-FILHO 2012; SANTOS, P.; PEREIRA-FILHO, E. R 2013).

A decomposição cor em um histograma de falsas cores, resultou em uma nova matriz de intensidades para o uso de métodos calibração multivariado PCR (principal component regression) e PLS regress (partial least squares regress) (MARTENS; NAES, 1992). Nos métodos propostos foram consideradas 25 amostras referentes ao conjunto de calibração a partir de padrões de SO₂ gerados por diluição dinâmica, 6 amostras de concentração conhecida do conjunto de validação

Figura 44. Diagrama do método multivariado utilizado para processar e interpretar os sinais de imagem aplicando a decomposição de falsas cores.



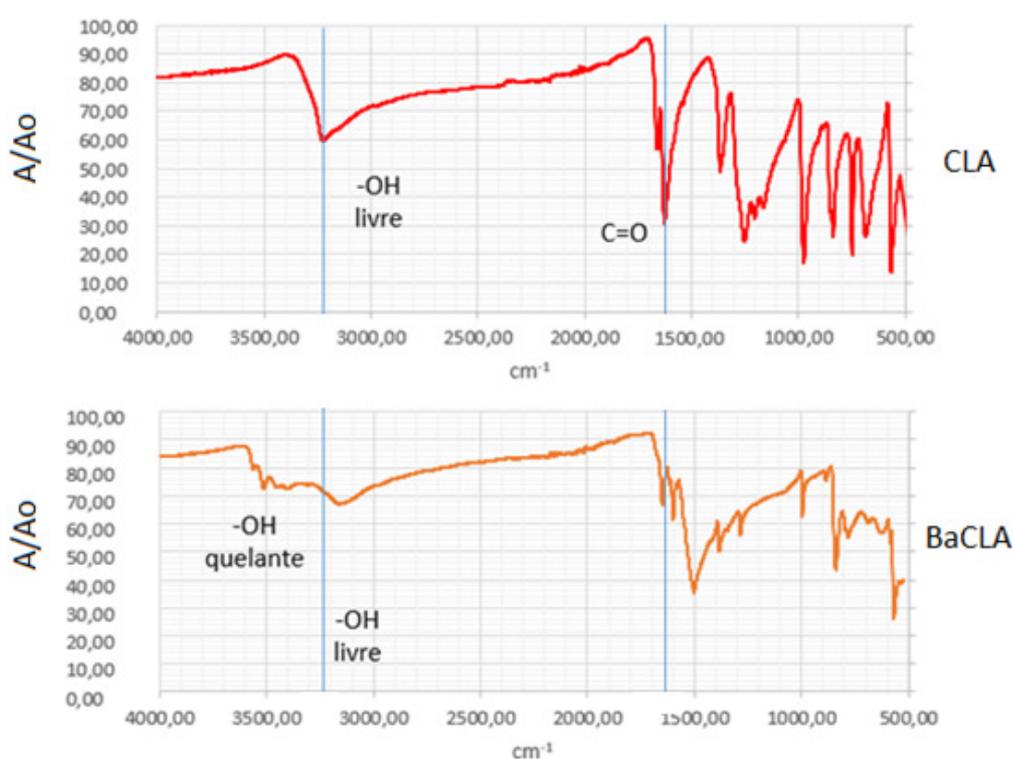
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1 Síntese e caracterização do cloraniliato de bário (BaCLA)

O rendimento alcançado na síntese do BaCLA foi de 72,1% por gravimetria. Em seguida a amostra foi submetida a uma análise utilizando espectroscopia no infravermelho. O espectro representado na Figura 45 foi resultado da média de 32 medidas em série de 3 amostras da síntese do composto cloraniliato de bário e do ligante ácido cloranílico. Esses dados evidenciaram variações nas bandas de absorção na região do infravermelho médio (MID-IR).

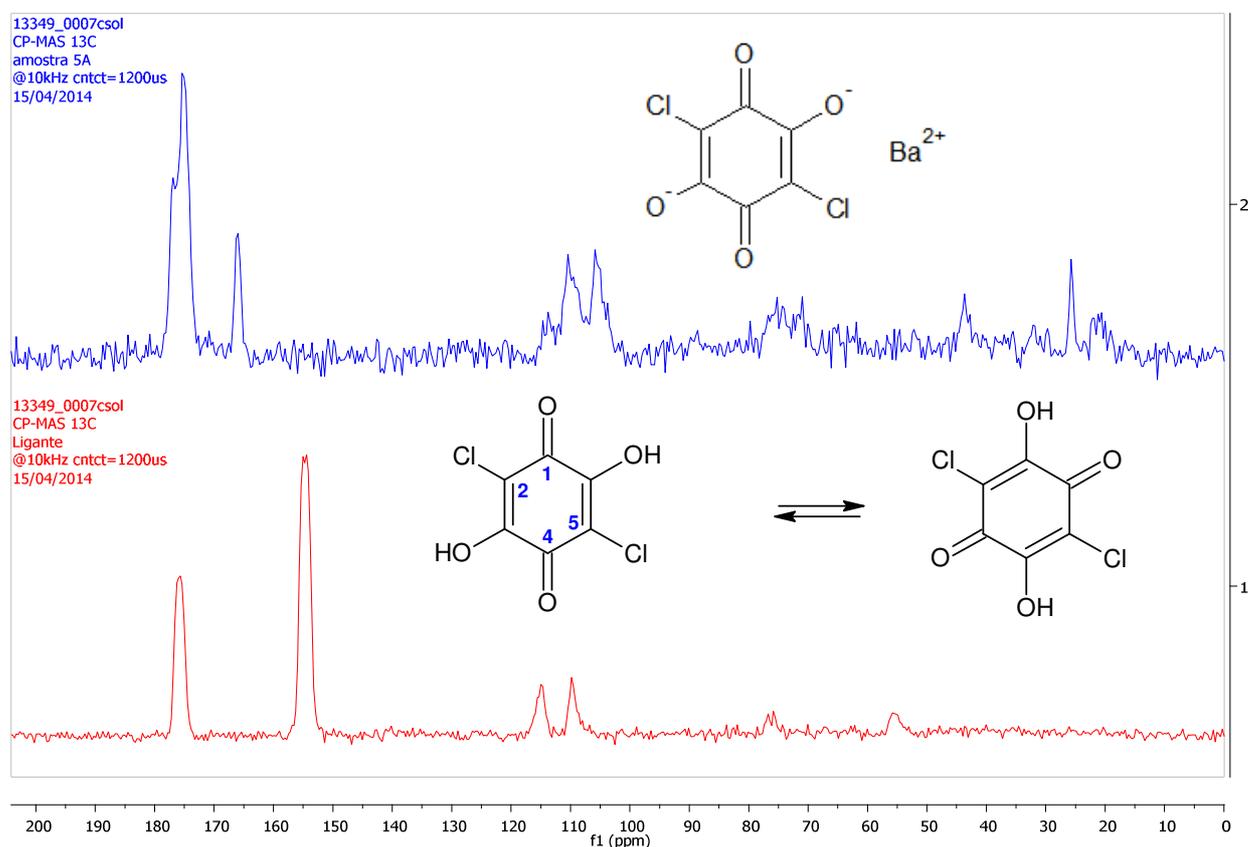
No CLA foi observado uma banda na região de 3250 cm^{-1} , a mesma banda foi observada no produto formando da reação (BaCLA), entretanto com um sinal atenuado acompanhado do aparecimento de uma banda entre 3500 e 3200 cm^{-1} , que pode indicar que hidroxila pode estar ligada ao átomo de bário de forma semelhante ao observado em ligações metal-quelante. Esses dados associado a variação significativa do espectro na região de 1621 cm^{-1} , explicado por uma possível ligação entre o íon Ba^{+2} e oxigênio do grupo carbonila, promoveu a deslocamento da banda $\text{C}=\text{O}$ para 1500 cm^{-1} , sendo este comportamento semelhante ao observado nas reações de polimerização com o composto CLA (LIU et al., 2011).

Figura 45. Espectro de infravermelho médio CLA e BaCLA.



A caracterização do produto de reação entre Ba^{2+} e CLA foi realizada utilizando espectroscopia de RMN unidimensional (^{13}C) no estado sólido. Os dados de RMN de ^{13}C de CLA apresenta sinais atribuíveis a dois átomos de carbono halogênados em $\delta_{\text{C}2}$ 109,8 e $\delta_{\text{C}5}$ 114,9, dois carbonos carbinólicos conjugados em $\delta_{\text{C}3}$ 154,9 e $\delta_{\text{C}6}$ 154,5, além de dois carbonos carbonílicos em δ 175,8 (C_1 e C_4). A análise comparativa dos dados de RMN de ^{13}C do sal (**BaCLA**) e o material de partida (**CLA**) representado na Figura 46, evidenciaram diferenças significativas principalmente nos deslocamentos dos carbonos carbinólicos e carbonílicos.

Figura 46. Espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido do **CLA** (1 ---) e do **BaCLA** (2 ---) (9,4 Tesla).

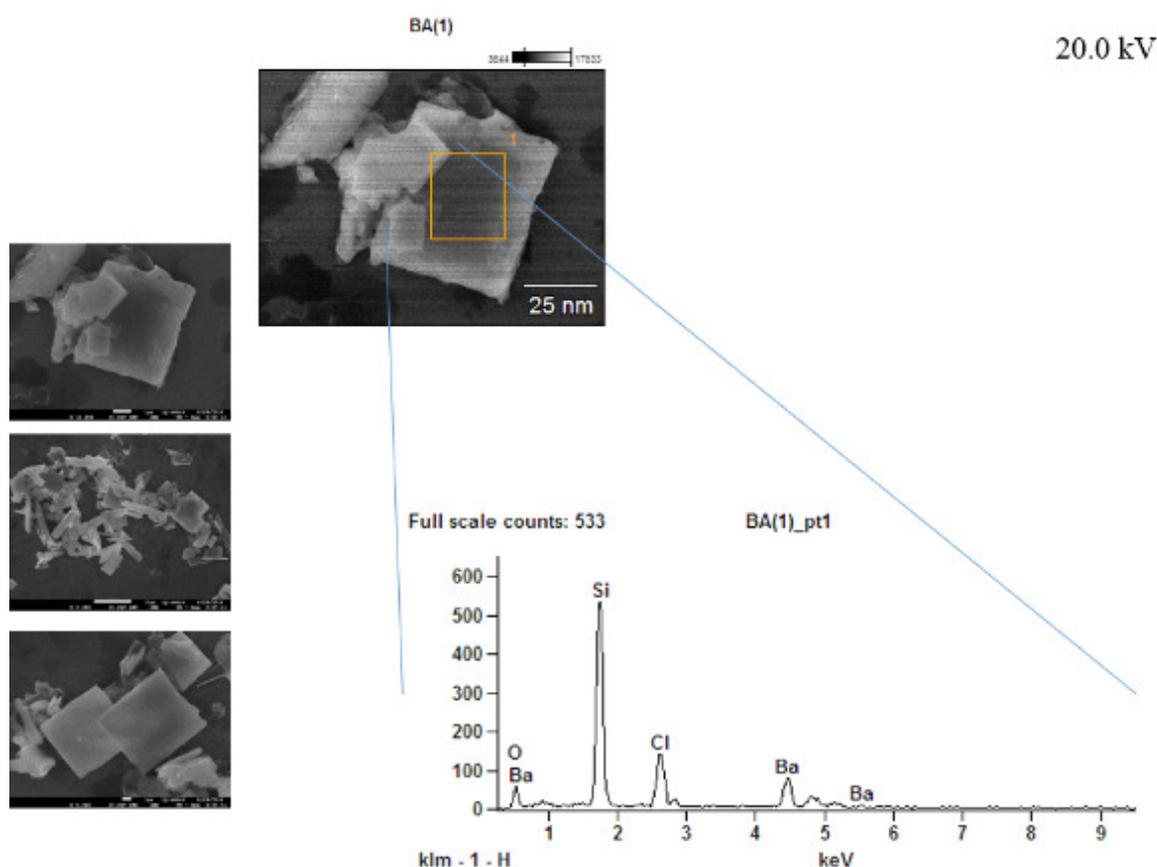


O produto de reação apresenta sinais dos grupos carbonílicos em δ_{C} 176,72 e δ_{C} 166,03, sendo este último protegido ($\Delta\delta \sim 10$ ppm) em relação ao **CLA**. Além disso, é observada a desproteção dos carbonos carbinólicos em δ_{C} 175,17 (C_3 e C_6) em relação ao **CLA** em $\delta_{\text{C}3}$ 154,9 e $\delta_{\text{C}6}$ 154,5. As variações nos deslocamentos químicos indicam uma assimetria na molécula causada pela interação do átomo de bário com o oxigênio e cloro ligados aos carbonos C_2 e C_3

e/ou C₅ e C₆. Isso causa uma deslocalização da densidade eletrônica no carbono C₂ e C₃, resultando na desproteção dos carbonos C₃ e C₆. Foi observado um efeito de proteção da carbonila C₄ quando comparado ao CLA(VON PHILIPSBORN, 1974).

O sal obtido na síntese foi misturado a álcool isopropílico e a suspensão submetida a uma análise por microscopia eletrônica de varredura e EDS. As imagens obtidas neste experimento revelam em geral a formação de cristais com formatos retangulares e análise de EDS indica que o cristal formado apresenta ligações entre Ba²⁺ e oxigênio bem como a presença de cloreto e bário na região selecionada conforme representado na Figura 47.

Figura 47. Imagens de MEV e EDS do sal de BaCLA.



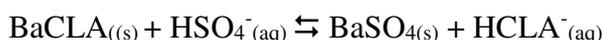
Estudos realizados de raio X para a determinação da configuração absoluta do cloraniliato de bário demonstram concordância com os resultados e as observações experimentais do BaCLA (KASHINO et al., 2001). Após a caracterização do cloraniliato de bário, o produto foi utilizado para aplicações analíticas para a determinação dióxido de enxofre em ar.

4.4.2 Fixação química e quantificação do dióxido de enxofre

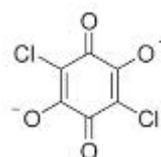
Durante a etapa de coleta foi utilizado um sistema de diluição dinâmico de gás com liberação de uma concentração e conhecida do analito em estudo. O ar coletado contendo dióxido de enxofre reage em meio aquoso com peróxido de hidrogênio favorecendo a formação de ácido sulfuroso (Equação 32). Os íons hidrogênio sulfuroso, provenientes do equilíbrio ácido-base do ácido sulfuroso em água, reagem na presença de oxigênio formando íons sulfato em solução aquosa. A adição de peróxido de hidrogênio (Equação. 33) acelera a formação de sulfato em solução (Equação. 34) (MARTINS; DE ANDRADE, 2002).



Na presença do cloraniliato de bário (BaCLA) os íons sulfato formados após a etapa amostragem reagem formando o sulfato de bário e a liberação do ácido cloranílico conforme representado na Equação 35 (LODGE; 1989).



Onde CLA =



(Equação 35)

Nesta reação de precipitação, o bário ligado ao ácido cloranílico BaCLA, na presença de íons sulfato forma cristais pouco solúveis de sulfato de bário. O sulfato de bário é um produto pouco solúvel em água apresentando um pequeno produto de solubilidade (kps) como expresso na Equação 36.



$$\text{kps} = 9,2 \times 10^{-11} (\text{mol L}^{-1})^2 = [\text{Ba}^{2+}][\text{SO}_4^{2-}] \quad (\text{Equação 36})$$

4.4.3 Aplicações analíticas utilizando o processamento de imagens digitais

As concentrações de SO₂ foram correlacionadas com suas respectivas imagens para criar um modelo quantitativo. Dois métodos distintos foram propostos para esse fim: (1) um método univariado através do processamento de imagens; (2) um método multivariado baseado em na construção de um histograma de falsas cores.

No método univariado, o sinal da imagem foi processado empregando um filtro de mediana. Nesta técnica os valores dos pixels são agrupados em ordem crescente para a seleção da mediana. O valor da mediana é aplicado a toda a zona de amostragem, resultando em uma imagem com menor variância. As figuras de mérito do método univariado estão representados na tabela 6.

Tabela 6. Figuras de mérito analítico (método univariado)

Faixa linear	26,0 – 102,0 ppb
Erro relativo (%)	13,2 %
Coefficiente de variação (%)	3,3 %
Limite de detecção	22,0 ppb
R ²	0,9859
Tempo e amostragem	24 h

O método univariado proposto apresentou concordância com os valores de intensidade medidos pelo método visível ($\lambda_{\text{max}} = 536 \text{ nm}$) em um intervalo de confiança de 95%. Dentro do intervalo proposto, o método apresentou-se viável para a determinação de dióxido de enxofre em ar.

No método multivariado as imagens das soluções foram convertidas para um histograma de falsas cores. Essa estratégia permitiu a geração de inúmeras variáveis não colineares, que podem ser utilizadas em métodos clássicos de calibração multivariada.

Os métodos selecionados foram o PCR e o PLSRegress. Ambos os métodos apresentam algoritmos semelhantes, entretanto os modelos baseados em PLSRegress apresentam melhores coeficientes de correlação linear.

Os dois métodos utilizados apresentaram figuras de mérito semelhantes, como representado na Tabela 7, entretanto o método empregando o PLSRegress apresentou menores erros relativos (PRESS).

Tabela 7. Figuras de mérito analítico (método multivariado)

	PCR	PLSregress
PRESS	11,0 %	8,0 %
g.l.	23	21
RMSEP	4,7 %	3,8 %
Variáveis latentes	2	4
R^2	0,9951	0,9989
CROSS	12,6%	11,2%

O método multivariado apresenta vantagem, pois não é necessário um pré-processamento do sinal para a aquisição do sinal analítico. O uso de um conjunto de calibração maior, pode melhorar a exatidão e precisão do método, porém o tempo de amostragem é um fator que precisa ser reavaliado.

Em função do pequeno volume empregado para realizar as determinações utilizando imagens digitais, o sistema de amostragem pode ser drasticamente reduzido. A redução do sistema de amostragem outras vantagens como redução reagentes empregados e menor tempo de amostragem.

4.5 CONCLUSÕES

A adaptação do método mostrou-se de fácil aplicação para determinação do dióxido de enxofre em ar. Os métodos multivariados propostos apresentaram vantagens em relação ao método univariado com menores erros relativos.

A síntese empregada para a obtenção do sal de BaCLA teve êxito apresentando um rendimento gravimétrico superior a 70 % e boa concordância com os valores esperados para as técnicas de infravermelho e RMN.

Os procedimentos utilizando imagens digitais podem ser utilizados para diferentes experimentos quali e quantitativos.

Capítulo IV

Aplicações tecnológicas utilizando a técnica de extração líquido gás-líquido

→ *Método de mudança de matriz para a determinação de sulfito em bebidas*

5 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS UTILIZANDO TÉCNICA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO GÁS-LÍQUIDO

O sulfito é um conservante utilizado há muito tempo em diversos alimentos e bebidas. Este conservante é usado em vinhos por prevenir a oxidação da bebida evitando variações nas suas propriedades organolépticas. Neste trabalho foi desenvolvido um método que envolve a mudança de matriz do sulfito utilizando a técnica de extração Líquido-Gás-Líquido.

5.1 Adição de sulfito como conservante

Os métodos de conservação são destinados a preservar os alimentos e alongar sua vida útil, estando eles terminados ou ainda na matéria-prima alimentar, portanto um alimento conservado é aquele que foi tratado convenientemente para evitar a sua alteração por períodos mais prolongados de tempo (MACHADO; TOLEDO; VICENTE, 2006).

As mudanças de sabor podem ocorrer no vinho ao longo do tempo devido ao oxigênio e a presença de microrganismos, comprometendo a qualidade e consistência da bebida (MACHADO; TOLEDO; VICENTE, 2006). Para protegê-lo dessas alterações tem sido utilizado, desde o século XVII, o dióxido de enxofre. Trata-se de um aditivo frequentemente usado na indústria de alimentos por ser capaz de retardar ou prevenir processos de oxidação excessiva de compostos fenólicos e outros elementos que conferem aroma à bebida, provocados pelo oxigênio do ar ou por enzimas oxidativas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Outras funções do SO₂ no vinho são: inibir a ação e desenvolvimento de bactérias, fungos (JIANG et al., 2014) e leveduras e evitar reações de escurecimento enzimático e não-enzimático durante o processamento e a estocagem da bebida (POPOLIM, 2009; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Quando adicionado aos vinhos, o SO₂ pode também ligar-se a acetaldeídos, retirando o sabor característico desses compostos que poderia prevalecer na bebida. A fração de SO₂ que não se liga a outros compostos é denominada de SO₂ livre e somente nessa forma ele consegue atravessar as paredes celulares de leveduras e bactérias e pode prevenir a ação de microrganismos e as oxidações (MACHADO, 2007; POPOLIM, 2009).

Em caso de adições em excesso do conservante pode haver alterações nas propriedades organolépticas da bebida, conferindo ao vinho um aroma e sabor de fósforo queimado (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

5.1.1 Efeitos na saúde humana

Apesar da ampla utilização em alimentos, a aplicação do SO₂ pode implicar em efeitos adversos à saúde humana, principalmente em indivíduos alérgicos e asmáticos que podem apresentar quadros de urticárias ou broncoespasmos se o consumirem mesmo em pequenas quantidades. Outro problema quanto ao seu consumo diz respeito há distúrbios neurológicos diagnosticados em uma pequena parcela da população que apresenta reduzida atividade da enzima sulfito oxidase, responsável por converter o sulfito a sulfato para que possa ser excretado pelo organismo através da urina (MACHADO, 2007; POPOLIM, 2009; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

5.1.2 Legislação e impacto na produção de alimentos

O JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants), expressa o uso seguro de um aditivo em termos de sua IDA (Ingestão Diária Aceitável), que representa a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente sem afetar a saúde humana (MACHADO et al., 2006; POPOLIM, 2009).

O IDA de grupo para sulfitos estabelecida pelo JECFA é de 0,7 mg/kg de peso corpóreo, expressa como dióxido de enxofre. Em estudos realizados na França, constatou-se que os vinhos e as frutas secas são os principais responsáveis pela exposição humana ao dióxido de enxofre pela alimentação. Em outro estudo realizado na Itália, foi observado que alguns consumidores de vinho podem alcançar até 99 % da IDA para sulfitos somente com a ingestão dessa bebida (MACHADO, 2007).

O uso de conservantes e outros aditivos alimentares são limitados por legislações específicas em diversos países, estabelecidas com base na segurança de uso e necessidade tecnológica (MACHADO; TOLEDO; VICENTE, 2006). De acordo com a legislação brasileira, dióxido de enxofre pode ser utilizado como conservante químico em vinhos e sucos em uma concentração máxima de 350 mg L⁻¹ (ANVISA, 2005).

5.1.3 Métodos para a determinação de SO₂ em bebidas

O método que tem sido utilizado como referência para determinação de sulfitos em alimentos e bebidas é o método de Monier-Williams. Esse foi o primeiro método analítico desenvolvido para essa finalidade e desde a sua criação sofreu diversas modificações a fim de

torná-lo aplicável às diferentes matrizes, sendo ainda hoje utilizado como referência para novas metodologias (MACHADO; TOLEDO; VICENTE, 2006).

O procedimento é realizado aquecendo-se e acidificando-se a amostra de vinho com HCl. A extração do SO₂ é feita através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela amostra que arrasta consigo o analito. O SO₂ é borbulhado em uma solução de peróxido de hidrogênio para que seja fixado e oxidado a ácido sulfúrico. A solução obtida é titulada com hidróxido de sódio, para que a quantidade de ácido sulfúrico gerado seja então relacionada à quantidade de dióxido de enxofre presente no vinho (DEMOLINER, 2008).

Um dos inconvenientes do método é que espécies ácidas voláteis presentes do vinho também podem ser fixadas e tituladas. Além disso as reações de adição do nucleófilo sulfito à moléculas orgânicas presentes no vinho, muitas vezes podem ser irreversíveis, tornando o analito indisponível para a titulação ácido-base (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Apesar do método de Monier-Williams ser o oficial para essa análise, no Brasil e em diversos outros países a indústria de vinhos utiliza o método Ripper para quantificar o sulfito devido a sua conveniência e rapidez. Esse método é pouco preciso e apresenta elevado erro sistemático, por conta disso apesar de ser amplamente utilizado não é adotado pela AOAC como método oficial (MACHADO; TOLEDO; VICENTE, 2006).

A baixa precisão desse método deve-se a dificuldade em visualizar o ponto de viragem em amostras de vinho tinto, pois o amido é responsável por conferir uma coloração azul escura à solução no ponto de viragem. Além disso, o custo com aparelhagem nesse método é alto caso utilize-se um titulador automático e as soluções de iodo se oxidam rapidamente, devendo a concentração do reagente ser regularmente verificada (DEMOLINER, 2008).

5.1.4 Método de extração líquido-gás-líquido

O uso de técnicas baseadas em membranas é antigo e amplamente utilizado em processos industriais e tecnológicos, porém, a sua aplicação analítica é mais recente e normalmente está associada a sistemas de escoamento de reagentes (SEGUNDO; RANGEL, 2001). Existem diversas técnicas que utilizam a extração por membranas, incluindo entre elas filtração e diálise (PACHECO et al., 2010).

Pela técnica de extração líquido-gás-líquido um analito pode ser separado da solução de uma determinada amostra por meio da passagem através de uma membrana permeável a gás e ser coletado em outra solução. As membranas criam um pequeno espaço de ar entre as duas

soluções, servindo como uma terceira fase na extração, e a transferência de massa ocorre por difusão do analito na forma de vapor através da camada de ar que separa as duas fases. O volume da fase de extração utilizado é muito pequeno em comparação com o volume da amostra de vinho disponível, de forma que a extração do analito não é exaustiva e as análises de uma substância podem ser realizadas ao longo do tempo sem alterações significativas na matriz (PACHECO et al., 2010).

Como a técnica de extração líquido-gás-líquido está relacionada à volatilidade dos componentes, a temperatura é um dos fatores mais importantes da extração e deve ser controlada e otimizada, assim como o tempo de extração e a agitação. Após um período de tempo pode ocorrer saturação da reação pois todo o analito já foi difundido para a solução extratora, porém não é necessário esperar que a reação se sature e sim que seja utilizado o mesmo tempo para realizar todas as extrações, dessa forma são criados um padrão e uma referência.

A agitação é outro fator que influencia positivamente a extração principalmente no início, pois ao longo da reação ocorre a passagem das espécies analisadas da solução no invólucro do reator para a solução coletora e dessa forma a concentração da espécie de interesse torna-se cada vez menor na solução da amostra e maior na solução extratora (PACHECO et al., 2010).

Possíveis efeitos de memória estão relacionados ao uso de membranas, o que pode implicar no entupimento dos poros e necessidade de um passo adicional de limpeza após cada extração. Na extração líquido-gás-líquido é possível descartar e trocar a membrana, o que elimina esses problemas, portanto desde que a membrana utilizada não tenha dimensões muito grandes e sua troca não interfira na repetibilidade a técnica tem sido considerada economicamente viável (PACHECO et al., 2010).

Estudos mostrando a aplicabilidade da técnica para quantificação de sulfitos em vinhos e outras matrizes que também contenham esse aditivo, como sucos de fruta e cerveja, tem obtido resultados com boa repetibilidade e precisão, para um período de tempo de extração definido, e mostrado vantagens em relação a outras metodologias analíticas (GONÇALVES et al., 2010).

5.1.5 Reação entre cloraniliato de bário (BaCLA) e sulfato

A reação entre o íon sulfato e o agente de derivação cloraniliato de bário já foi descrita diversas vezes na literatura como sendo satisfatória para a determinação desse analito em solução (CLECERI; GREENBERG; EATON, 1989).

Ao reagir com o SO_4^{2-} em meio ácido, o cloraniliato desloca uma quantidade equivalente de íons cloranílico em função da formação do precipitado de sulfato de bário. A leitura da absorvância na região do ultravioleta em 331 nm mostrou ter uma sensibilidade adequada para a realização dessa análise (CLECERI; GREENBERG; EATON, 1989; LODGE 1989).

Dentro desta perspectiva, o uso do método de extração líquido-gás-líquido apresenta uma vantagem: volatilização do analito da matriz resultando na difusão e incorporação destas espécies voláteis em uma nova matriz com uma quantidade substancialmente menor de interferentes. Esse comportamento permite o uso de reações antes não exploradas para resolução de problemas de quantificação devido a presença de uma grande quantidade de interferentes da amostra.

5.2 OBJETIVOS

- . Os objetivos no estudo de determinação de SO₂ em bebidas foram:
 - Aplicar os conceitos para determinação de SO₂ atmosférico na análise de sulfito em bebidas, visando a aplicação na indústria de serviços.

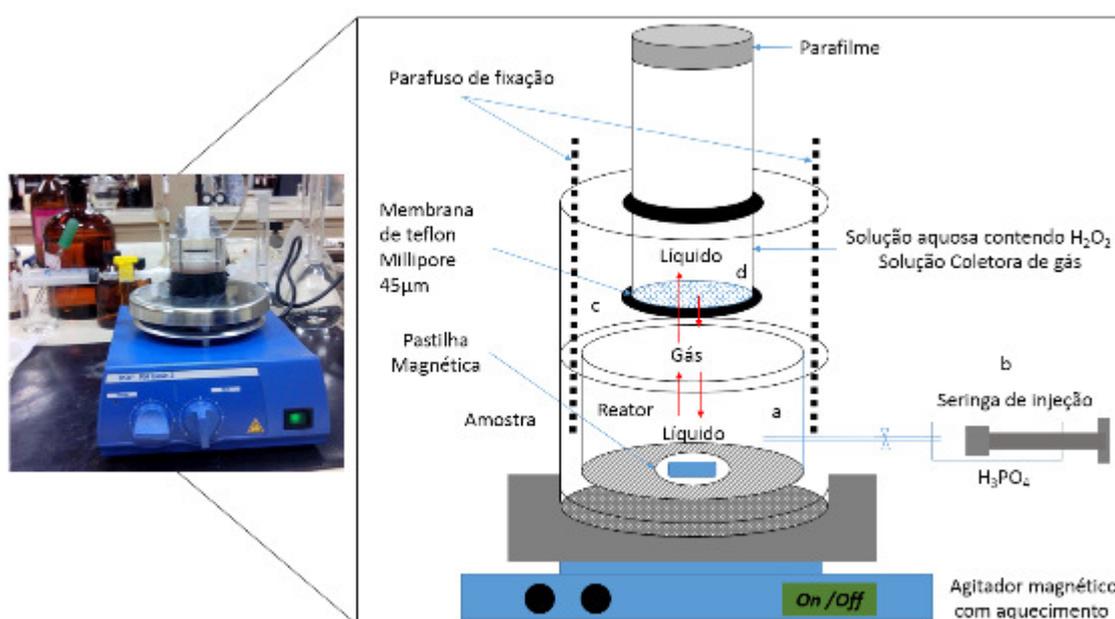
5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Equipamentos e dispositivos empregados

Para as medidas ópticas das soluções foi empregado um espectrofotômetro Shimadzu UV prov 1800, duplo feixe, com cubetas de quartzo e caminho ótico de 10,00 mm. Foi utilizada para a cromatografia de íons capilar, ICS 500, Dionex, equipado com coluna de ânions íon pac® AS19 capilar 0,4 x 250 mm. O sistema de eluição adotado foi com gradiente de hidróxido de potássio com supressão auto regenerativa, detecção por condutividade e sistema de amostragem automático (Dionex-As-Ap).

Para realizar o procedimento de extração líquido-gás-líquido foi utilizado um amostrador para extração conforme descrito por Gonçalves (PACHECO et al., 2010), montado sobre um agitador magnético IKA modelo RH Basic 2 mantendo a temperatura constante a 40 °C (Figura 48).

Figura 48. Amostrador líquido-gás-líquido montado sobre um agitador magnético e esquema geral de funcionamento do amostrador nas etapas de adição dos reagentes e disposição da solução extratora. Foto e diagrama do sistema de amostragem líquido-gás-líquido e diagrama ilustrativo (a) Reator contendo amostra, (b) Seringa de injeção, (c) região reservada para estabelecer o equilíbrio da fase gasosa. (d) Líquido de extração (adaptado PACHECO et al., 2010)



5.3.2 Reagentes e soluções

5.3.2.1 Solução de cloraniliato de bário (BaCLA)

Uma massa de 15,00 mg de cloraniliato ácido de bário (Sigma-Aldrich, USA) foram dissolvidos em metanol (SINC, Brasil) e avolumados em um balão volumétrico de 25,00 mL.

5.3.2.2 Solução extratora de peróxido de hidrogênio

Foi preparada uma 100 mL de uma solução de peróxido de hidrogênio (Dinâmica, Brasil) com 0,1 mg L⁻¹.

5.3.2.3 Ácido fosfórico

O ácido fosfórico foi utilizado com título de 98 % (Vetec, Brasil).

5.3.2.4 Solução de cloreto de sódio

Uma massa de 2,003 g de NaCl (J.T. Baker, USA) foram diluídos em balão de 1000,00 mL com água destilada.

5.3.2.5 Solução padrão de sulfato de sódio

O sulfato de sódio anidro (J.T.Baker, USA) foi preparado pesando 56,2 mg do sal e transferindo a massa para um balão volumétrico de 250,00 mL. O balão avolumado até o menisco com água MILIQ.

5.3.2.6 Solução padrão de ácido cloranílico

O ácido cloranílico (Fluka, USA), foi preparado pesando 32,0 mg do sal e transferindo a massa quantitativamente para um balão volumétrico de 100,00 mL, dissolvido e avolumado em metanol.

5.3.2.7 Sal de Sulfito de sódio

O sulfito de sódio (Mallinkrodt, USA) foi previamente titulado pelo método iodimétrico e apresentou um teor de 42,1 % em SO₂.

5.3.2.8 Solução padrão de sulfito de sódio

As soluções de sulfito de sódio foram preparadas em solução tampão Triplex de cloreto de sódio em $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$ e concentração de $0,00100 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram preparadas nas concentrações de 15,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; e $70,0 \text{ mg L}^{-1}$

5.3.3 Procedimento utilizando a técnica de extração líquido-gás-líquido

5.3.3.1 Eficiência do processo de extração

Para verificar a eficiência de coleta do SO_2 gerado após acidificação e aquecimento da amostra, o sistema de coleta foi montado adicionando-se quantidades conhecidas do sal de sulfito de sódio no invólucro do reator. Para conversão do sal a gás foi adicionado o ácido fosfórico 98 % com auxílio de uma seringa promovendo o encontro entre os dois reagentes, conforme representado na Figura 48.

A coleta do gás formado após a reação entre o sal e o ácido um volume de 2,1 mL de uma solução aquosa contendo peróxido de hidrogênio $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ foi utilizada para promover a captura do gás formado e sua conversão a sulfato. Após coletado o gás, $100,00 \mu\text{L}$ da solução extratora foram diluídos em $50,00 \text{ mL}$ de água destilada e submetido a uma análise de cromatografia de íons capilar para realizar a quantificação das alíquotas recolhidas e observar a eficiência do processo de extração do gás desprendido do reator. As amostras quantificadas foram comparadas com o teor de SO_2 total que poderia ser gerado após a reação de acordo com o teor de SO_2 encontrado na titulação do reagente. As reações foram realizadas adicionando-se massas de sulfito de sódio de: zero; 0,110; 0,036; 0,052 e 0,084 g.

5.3.3.2 Propriedade óticas do ácido cloranílico

Para verificar as propriedades óticas do ácido cloranílico foram adquiridos espectros de absorção na região do ultravioleta entre 440 e 190 nm. As soluções foram diluídas para as concentrações de zero; 0,00190; 0,0190; 0,0910; 0,300; 0,500 e $0,760 \text{ mmol.L}^{-1}$.

5.3.3.3 Reação entre cloraniliato de bário e sulfato de sódio

Foi realizado um estudo a fim de observar a variação do espectro da solução de cloraniliato ácido de bário após a adição de uma solução padrão de sulfato de sódio. Em um balão $5,00 \text{ mL}$, foram adicionados $0,50 \text{ mL}$ da solução de BaCLA e $20 \mu\text{L}$ da solução padrão

de sulfato de sódio e o volume foi completado com metanol até o menisco. O mesmo procedimento foi realizado variando o volume de solução padrão de sulfato de sódio utilizada para os volumes de zero; 20; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; e 800 μL respectivamente.

5.3.3.4 Reação do BaCLA para as alíquotas coletadas

Após completada a reação das amostras ocorrida no reator e realizado o procedimento de extração do analito, uma alíquota de 20 μL da solução extratora foi transferida para um balão volumétrico de 5,00 mL, para realizar as reações de derivação. Foi adicionado um volume de 0,50 mL de suspensão de BaCLA e o balão então avolumado com metanol. Após um tempo de 15 minutos foi feita a leitura das absorvâncias das soluções no espectrofotômetro.

5.3.3.5 Etapa de avaliação analítica

Um volume de 5,00 mL de vinho foi transferido para balão volumétrico de 25,00 mL e avolumado com solução de cloreto de sódio. Com auxílio de uma pipeta volumétrica foram transferidos 2,00 mL da solução diluída de vinho às soluções padrão de sulfito de sódio no invólucro do reator. Após feita a vedação do amostrador, um volume de 1,00 mL de ácido fosfórico foi adicionado com uma seringa para promover, sob agitação e aquecimento, a liberação do gás.

Para capturar o gás e convertê-lo a sulfato foi utilizada uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio 0,1 mg L^{-1} (solução extratora). A solução permaneceu durante 30 minutos no amostrador sob agitação constante à 40°C. 20 μL da solução extratora foram transferidos para um balão volumétrico de 5,00 mL, para realizar as reações de derivação. Ao balão foi adicionado um volume de 0,50 mL de suspensão de $\text{BaC}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ e o volume completado com metanol. Após um tempo de 15 minutos foi feita a leitura das absorvâncias das soluções no espectrofotômetro. Cada uma das análises foi feita em triplicata.

5.3.4 Protocolo de análise para as bebidas

5.3.4.1 Procedimento para as amostras de vinho

Para preparar as soluções de vinho uma alíquota de 5,00 mL de amostra foi diluída com solução de cloreto de sódio e avolumada em balão de 25,00 mL. Foram transferidos 2,00 mL da solução de vinho diluída para o reator com auxílio de uma pipeta volumétrica e após feita a

vedação do amostrador um volume de 1,00 mL de ácido fosfórico foi adicionado com uma seringa para promover, sob agitação e aquecimento, a liberação do gás. Para capturar o gás formado e convertê-lo a sulfato foi utilizada uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio (solução extratora). A solução permaneceu durante 30 minutos no reator sob agitação constante à 40°C. 20 µL da solução extratora foram transferidos para um balão volumétrico de 5,00 mL, para realizar as reações de derivação. Ao balão foi adicionado um volume de 0,50 mL de solução de BaC₆Cl₂O₄ e o volume completado metanol. Após um tempo de 15 minutos foi realizada a leitura das absorvâncias das soluções no espectrofotômetro. As amostras submetidas ao ensaio foram repetidas 5 vezes.

5.3.4.2 Procedimento para as amostras de cerveja

Uma alíquota de 2,00 mL de cerveja foi transferida para o reator com auxílio de uma pipeta volumétrica. Após feita a vedação do amostrador um volume de 1,00 mL de ácido fosfórico foi adicionado com o auxílio de uma seringa para promover a liberação do gás sob agitação e aquecimento. Para capturar o gás e convertê-lo a sulfato foi utilizada uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio. A solução permaneceu durante 30 minutos no reator sob agitação constante a 40°C. 20 µL da solução extratora foram transferidos para um balão volumétrico de 5,00 mL, para realizar as reações de derivação. Ao balão foi adicionado um volume de 0,50 mL de suspensão de BaC₆Cl₂O₄ e o volume completado metanol. Após um tempo de 15 minutos realizou-se a leitura das absorvâncias das soluções no espectrofotômetro. As amostras submetidas ao ensaio foram repetidas 5 vezes.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.4.1 Eficiência do processo de extração

Para verificar a influência da quantidade de amostra de sais de sulfito de sódio e eficiência do processo de extração, foi realizado um procedimento inicial no qual as alíquotas da solução extratora foram submetidas à análise cromatográfica para determinar a quantidade de SO₂ livre e assim verificar o fator de extração do amostrador. Diferentes massas do sal foram submetidas à extração e análise cromatográfica para verificar a congruência entre a massa de sal adicionada e a massa de sulfato recuperada após a oxidação na solução extratora. Os resultados estão dispostos na Tabela 8.

A massa de sulfato obtida na solução extratora, aumenta em função do aumento da massa de sulfito adicionada. Existe uma correlação entre a massa coletada e a massa extraída calculada com base no teor de SO₂ encontrado na titulação do reagente, apresentando uma recuperação de 98,0 % para o processo de extração realizado.

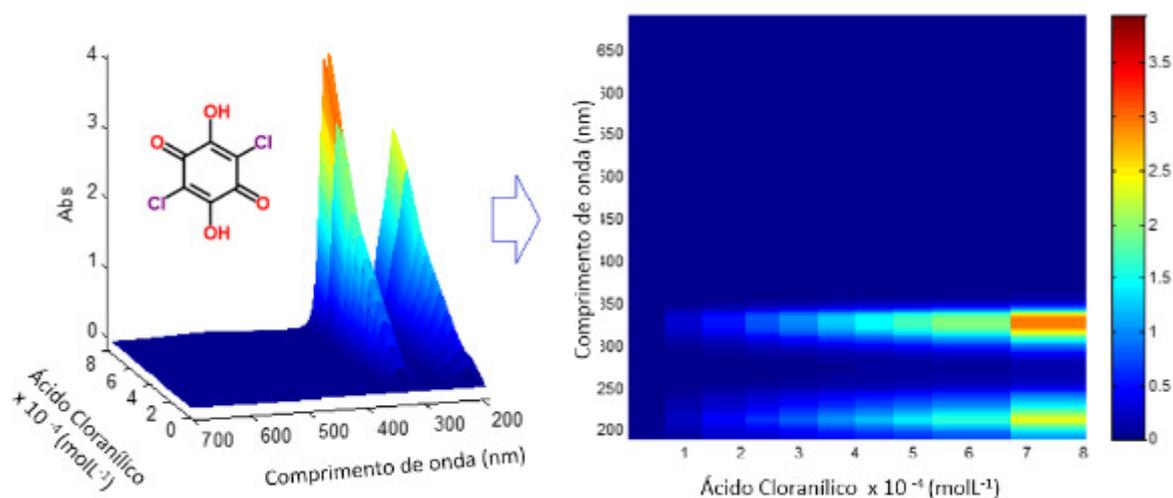
Tabela 8. Teores de SO₂ livre recuperados de alíquotas de sal de sulfito de sódio.

NaHSO ₃ (g)	Área (μS.min ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ (g)	SO ₂ livre (g)	Teor % SO ₂ Livre
0	0,2271	0,000	0	---
0,011	0,4264	0,003	0,0064	47,9
0,036	0,5267	0,005	0,0210	22,0
0,052	0,9164	0,011	0,0304	35,1
0,084	2,1239	0,029	0,0491	59,8

5.4.2 Estudo das propriedades ópticas do ácido cloranílico

Ao iniciar os estudos das propriedades ópticas do ácido cloranílico foram investigados os comprimentos de onda de absorção máxima da molécula e seu comportamento em diferentes concentrações. O espectro de absorção revela que esse composto absorve intensamente na região do ultravioleta, apresentando absorções máximas nos comprimentos de onda de 212 e 331 nm, como representado na Figura 49.

Figura 49. Perfil de absorção do ácido cloranílico de 700 – 190 nm

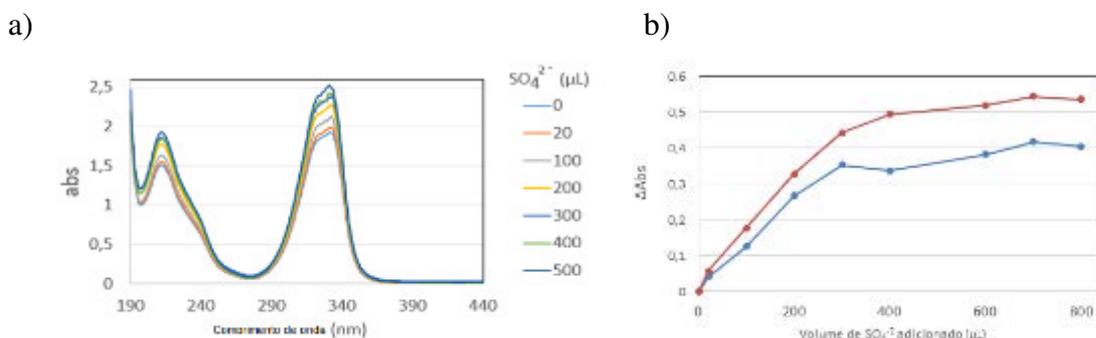


5.4.3 A reação entre cloraniliato de bário e sulfato de sódio

O cloraniliato ácido de bário apresenta um espectro de absorção na região do ultravioleta muito similar ao espectro do ácido cloranílico, com uma elevada absorção na região de 212 e 331 nm como representado na Figura 50(a, b). Após a adição de volumes conhecidos de SO_4^{2-} a solução de BaCLA ocorre um aumento na absorção nas regiões de estudo no espectro do UV. Por se tratar de uma solução diluída os comprimentos de onda na região do ultravioleta foram escolhidos por serem mais convenientes para determinar o ácido cloranílico em concentrações inferiores à $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

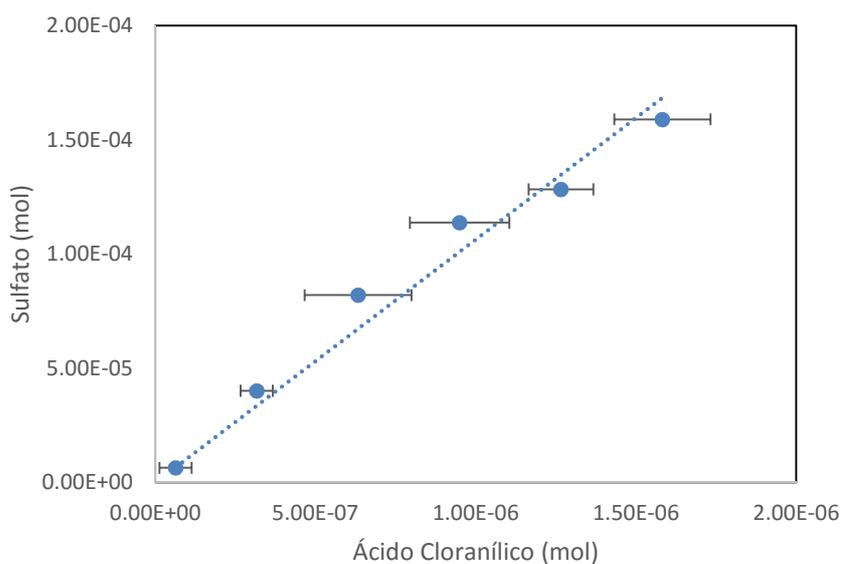
O aumento da absorbância foi gradual e proporcional à quantidade de sulfato adicionado alcançando um patamar em $400 \mu\text{L}$ da solução padrão de sulfato de sódio, acima dessa concentração ocorre saturação da reação e não é mais possível determinar variações significativas no sinal de absorção.

Figura 50. a) Espectro de absorção cloraniliato de bário após a adição de volumes conhecidos de uma solução padrão de sulfato de sódio $0,00158 \text{ mol L}^{-1}$. b) Aumento gradual da variação de sinal absorção em 212 e 331 nm.



Os valores na variação de intensidade de absorção na região do UV foram convertidos em quantidade de mols de ácido cloranílico liberado pela reação, formados após a reação com uma quantidade molar conhecida de sulfato de sódio, conforme representado na Figura 51. A relação entre o número de mols de sulfato de sódio adicionado e de ácido cloranílico liberado após a reação revelou uma provável relação entre as espécies em uma proporção de 1:1 para uma absorção em 331 nm.

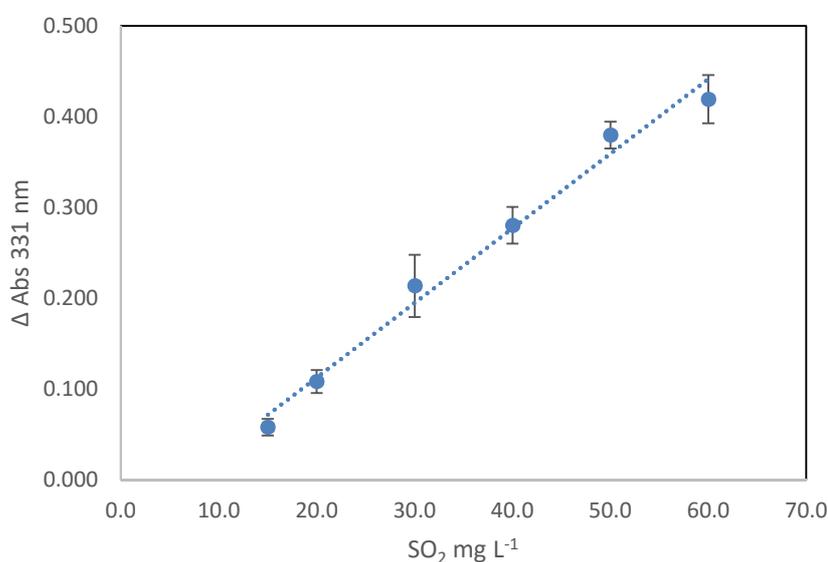
Figura 51. Correlação entre mol de sulfato adicionado e mol equivalente ao ácido cloranílico em solução medido em 331 nm.



5.4.4 Etapa de avaliação analítica

Para a etapa de avaliação analítica foi feito o procedimento de extração do analito de interesse com soluções de 2,00 mL de vinho diluído e concentrações conhecidas das soluções padrão de sulfito e traçada uma curva em triplicada da variação da absorção observada em 331 nm para o sal BaCLA, após a reação de derivação com a solução extratora. A curva analítica relativa ao sinal observado para diferentes concentrações de SO₂ aquoso está representado na Figura 52.

Figura 52. Curva analítica do método proposto.



O limite de detecção foi calculado utilizando o critério do desvio de 20 soluções do branco ($x \pm s.t_{95\%/n}^{1/2}$) e os demais parâmetros analíticos estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9. Figuras de mérito analítico do método proposto.

Parâmetros	Valores obtidos
Faixa linear	15,0 – 60,0 mg.L ⁻¹
Equação da reta	$A_{331nm} = 0,00823(\pm 0,00049)[SO_2 \text{ mg.L}^{-1}] - 0,0515(\pm 0,0193)$
Erro relativo (%)	7,5
Coefficiente de variação (%)	6,0
Limite de detecção	6,3 mg L ⁻¹
R ²	0,9859
SD	0,0192

Os parâmetros analíticos obtidos mostram que o método pode ser usado para quantificação de amostras líquidas contendo sulfito.

5.4.5 Aplicação em amostras de cerveja e vinhos.

As amostras de vinho e cerveja foram submetidas à ensaios quantitativos para a determinação de sulfito livre e os resultados foram posteriormente comparados com os valores obtidos pelo método *Ripper* por ser esse um método de fácil aplicação e utilizado por muitas vinícolas.

As amostras de vinho tinto A e B foram escolhidas por apresentarem diferentes teores de sulfito livre e a cerveja foi analisada para determinar teores menores de sulfito em bebidas e testar uma matriz diferente para verificação da aplicabilidade do método.

Na tabela 10 estão apresentados os valores de sulfito encontrados pelo método proposto e a comparação com os valores obtidos pela titulação pelo método *Ripper*.

Tabela 10. Teores de sulfito livre encontrados nas bebidas analisadas.

Amostra	Método proposto (mg L ⁻¹)	Titulação (<i>Ripper</i>) (mg L ⁻¹)	Erro relativo (%)	CV (%)
Vinho tinto (A)	54,1 ± 1,1	57 ± 3	5,9	2,1
Vinho tinto (B)	112,5 ± 10,5	125 ± 5	9,9	8,3
Cerveja	33,2 ± 1,9	29 ± 4	13,7	5,6

Valores expressos com intervalo de confiança de 95%.

Os resultados encontrados para os teores de sulfito livre nas bebidas pelos dois métodos não diferem significativamente entre si em um intervalo de confiança de 95%. O método apresentou-se adequado para a determinação de sulfito livre nas bebidas analisadas apresentando boa concordância com o método *Ripper*, tradicionalmente utilizado em vinícolas para testar a qualidade do vinho produzido e recomendado como comparativo para o desenvolvimento de novas metodologias.

5.5 CONCLUSÕES

O método desenvolvido mostrou-se uma alternativa dentro dos métodos descritos na literatura para a determinação de sulfito livre em bebidas. A utilização da técnica de extração líquido-gás-líquido é muito conveniente porque ela elimina muitos dos possíveis interferentes não voláteis.

A amostra coletada em uma nova matriz permite a obtenção de medidas sensíveis a partir da reação entre o sal de cloraniliato de bário em suspensão e sulfato. O sinal analítico pode ser determinado na região do UV sem que ocorram interferências de outras espécies comuns encontradas em bebidas. Esse estudo mostrou a viabilidade e a possibilidade de aplicação do método em diferentes alimentos e bebidas que contenham o mesmo tipo de aditivo alimentar.

6 CONCLUSÕES FINAIS

Visualizar, observar e extrair informações de fenômenos naturais sempre serão ações relevantes para qualquer área da ciência. A visualização dos fenômenos acontece mediante a nossa percepção visual, ou seja, uma interpretação mental da luz, resultado da reflexão oriunda da interação luz x matéria, sensibilizando nossos olhos e interpretada pelo cérebro como uma imagem.

Contudo essa mesma luz responsável pela formação sensorial da imagem, mediante a evolução instrumental, passou a ser capturada e analisada por instrumentos ópticos. Essas informações adquiridas pelos instrumentos agora agregam aspectos quantitativos, diferentes das informações sensoriais qualitativas antes observadas.

A análise de imagens tornou-se ferramenta de análise a partir da década de 80 em alguns laboratórios de química. Essa nova ferramenta passou a ser amplamente utilizada devido ao surgimento de novas tecnologias de *hardware* e *software* mais complexas e velozes, o que resultou crescimento exponencial de sua aplicação em diversas áreas da química.

O processamento de imagens digitais é relativamente recente e beneficia-se de uma propriedade intrínseca às imagens: a sua transformação em uma matriz de dados, onde cada unidade desta matriz, denominado *pixel*, agrega informações relevantes do material analisado. Sob este aspecto é importante ter como alternativa ferramentas matemáticas, que possam, de modo mais criterioso e científico, extrair um maior número de informações de um conjunto de imagens e interpretá-las dentro de modelos químicos qualitativos e quantitativos.

No trabalho desenvolvido foi possível fazer a determinação de ozônio residual, nitrito e fosfato e água usando reações com formação de produtos colorido e leitura do sinal com o uso de imagens digitais. Isto mostrou o potencial deste tipo de abordagem de medida. Para aplicações diretas em problemas ambientais foi desenvolvido métodos para a determinação de SO₂ e NO₂ em ar, usando os mesmos princípios.

Os métodos desenvolvidos baseados em imagens digitais apresentaram uma fácil instrumentação e parâmetros de mérito analítico aceitáveis para aplicação em diferentes problemas analíticos e compatíveis aos métodos colorimétricos de absorvimetria.

A redução do volume amostra e solução de trabalho, sempre que possível, configurou vantagens sob o aspecto ambiental considerando os resíduos gerados nas análises.

Os métodos desenvolvidos tiveram foco a aplicação e resolução de problemas ambientais e tecnológicos utilizando equipamentos de baixo custo e de grande disponibilidade no mercado mundial.

As determinações utilizaram reações amplamente conhecidas pelos químicos analíticos e instrumentos acessíveis. A meta de ampliar a determinação de analitos pela disponibilização de reações e instrumentação simples acreditamos que foi atingida.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Métodos utilizando imagens digitais podem apresentar vantagens em relação aos métodos colorimétricos tradicionais, pois a instrumentação é simples, apresenta uma fácil aquisição de sinal.

Uma gama maior de métodos baseados em reações qualitativas podem ser empregadas para realização de ensaios colorimétricos visando a quantificação de soluções, suspensões e reações em fase sólida.

Apesar do sucesso inicial na utilização dos métodos propostos para a análise dos analitos estudados, novos ensaios devem ser realizados para melhorar o sistema de coleta de gás e preconcentração para melhora de performance analítica. Comparações com outras técnicas também são desejáveis para ampliar a gama de possibilidades de aplicação de amostragens gás-líquido e líquido-gás-líquido.

Estudos prévios ainda serão necessários para dar corpo a esta proposta, entretanto as possibilidades deslumbradas neste trabalho que são redução de volume para uma medida quantitativa, conversão do sinal de imagem em sinal analítico e métodos de extração e pré-concentração em fase gasosa podem em breve abrir caminho para o desenvolvimento de outras técnicas de baixo custo para diversas aplicações analíticas.

REFERÊNCIAS

ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with imageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Informe Técnico n. 58, de 10 de junho de 2014**: Limites dos aditivos alimentares dióxido de enxofre e sulfitos (INS 220 a 225, 227 e 228) em suco de caju reconstituído. [Brasília, DF], 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/634500804451980bbc2afe115bcaffa9/IT_58_2014_Di%C3%B3xido+de+enxofre+e+sulfitos+em+suco+de+caju+reconstitu%C3%ADdo.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 28 jul. 2015.

ALLEN, A. G.; MACHADO, C. M. D.; CARDOSO, A. A. Measurements and modeling of reactive nitrogen deposition in southeast Brazil. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 5, p. 1190-1197, 2011.

AUSTRALIAN BUREAU STATISTICAL. **The winemaking industry in Western Australia**. Disponível em: <[http://www.abs.gov.au/ausstats/abs@.nsf/0/66847107b2445523ca256e3100003659/\\$FILE/WA%20wine%20industry_final.pdf](http://www.abs.gov.au/ausstats/abs@.nsf/0/66847107b2445523ca256e3100003659/$FILE/WA%20wine%20industry_final.pdf)>. Acesso em: 28 jul. 2015.

BADER, H.; HOIGNÉ, J. Determination of ozone in water by the indigo method. **Water Research**, v. 15, n. 4, p. 449-456, 1981.

BRANDT, C.; van ELDIK, R. Transition metal-catalyzed oxidation of sulfur (IV) oxides. Atmospheric-relevant processes and mechanisms. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 1, p. 119-190, 1995.

BROADBENT, A. D. A critical review of the development of the CIE1931 RGB color-matching functions. **Color Research & Application**, v. 29, n. 4, p. 267-272, Aug. 2004.

BYANJU, R. M.; GEWALI, M. B.; MANANDHAR, K. Passive sampling of ambient nitrogen dioxide using local tubes. **Journal of Environmental Protection**, v. 3, n. 2, p. 177-186, 2012.

CARDOSO, A. A.; MACHADO, C. de M. D.; PEREIRA, E. A. Biocombustível, o mito do combustível limpo. **Química Nova na Escola**, n. 28, p. 9-14, maio 2008.

CARDOSO, T. M. G.; GARCIA, P. T.; COLTRO, W. K. T. Colorimetric determination of nitrite in clinical, food and environmental samples using microfluidic devices stamped in paper platforms. **Analytical Methods**, 2015. doi: 10.1039/C5AY0046.

CARLSON, B. S. Comparison of modern CCD and CMOS image sensor technologies and systems for low resolution imaging. IEEE COMPUTER SOCIETY, 1st, 2002, Orlando. **Proceedings...** [S.l.]: IEEE Press, 2006. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?arnumber=1037011>>. Acesso em: 28 jul. 2015.

CLECERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. (Ed.). **Standard methods**: for the examination of water and wastewater. Washington, DC: American Public Health Association, 1989.

CONTI, J. B. Considerações sobre as mudanças climáticas globais. **Revista do Departamento de Geografia**, v. 16, p. 70-75, 2005.

CROWLEY, J. L.; CHRISTENSEN, H. I. **Vision as process**: basic research on computer vision systems. Berlin; New York: Springer-Verlag, 1995.

DEMOLINER, F. **Avaliação de dois métodos analíticos de determinação de dióxido de enxofre livre**. 2008. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Viticultura e Enologia) - Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, [Instituto Federal do Rio Grande do Sul], Bento Gonçalves, 2008.

DUCHESNE, C.; LIU, J. J.; MacGREGOR, J. F. Multivariate image analysis in the process industries: a review. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 117, p. 116-128, Aug. 2012.

EVANS, R. C.; DOUGLAS, P. Controlling the color space response of colorimetric luminescent oxygen sensors. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 16, p. 5645-5652, 2006.

FAZIO, T. (Ed.). Food additives: direct. In: CUNNIFF, P. (ed.) **Official methods of analysis of AOAC International**, 16th ed. Arlington: AOAC International, 1995, v. 2, Chap 47, p. 47.01-47.52.

FEITOSA-SANTANA, C. et al. Espaço de cores. **Psicologia**, v. 17, n. 4, p. 35-62, 2006.

FINLAYSON-PITTS, B. J.; PITTS, N. Jr. **Chemistry of the upper and lower atmosphere**: theory, experiments, and applications. San Diego: Academic Press, 1989.

GAGE, J. **Color and culture**: practice and meaning from antiquity to abstraction. London: Thames and Hudson, 1999.

GAIÃO, E. da N. et al. Digital image-based titrations. **Analytica Chimica Acta**, v. 570, n. 2, p. 283-290, June 2006.

GOLD, A. Stoichiometry of nitrogen dioxide determination in triethanolamine trapping solution. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 1448-1450, 1977.

GONÇALVES, L. M. et al. Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: characterization by high-performance liquid chromatography-diode-array detection-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 24, p. 3717-3722, June 2010.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E.; EDDINS, S. L. **Digital image processing using MATLAB**. Upper Saddle River: Pearson Prantice Hall, 2004.

- HAMMEL, M. J. Scanning with SANE and other tools. **Linux Journal**, v. 2003, n. 108, 2003. Disponível em:
<http://delivery.acm.org/10.1145/650000/640536/6532.html?ip=200.145.88.129&id=640536&acc=ACTIVE%20SERVICE&key=344E943C9DC262BB.90E7F8DECCCB60F6.4D4702B0C3E38B35.4D4702B0C3E38B35&CFID=531572083&CFTOKEN=48158721&__acm__=1438110016_d30d08ce297aeb93b91e94ca1084b817>. Acesso em: 28 jul. 2015.
- HARKNESS, N. The colour wheels of art, perception, science and physiology. **Optics & Laser Technology**, v. 38, n. 4/6, p. 219-229, June 2006.
- HART, E. J.; SEHESTED, K.; HOLOMAN, J. Molar absorptivities of ultraviolet and visible bands of ozone in aqueous solutions. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 46-49, 1983.
- HOLMES, J. G. The use of uniform chromaticity scales. **Proceedings of the Physical Society**, v. 52, p. 359-370, 1940.
- HUNT, R. W. G.; POINTER, M. R. A colour-appearance transform for the CIE 1931 standard colorimetric observer. **Color Research & Application**, v. 10, n. 3, p. 165-179, 1985.
- INTERNATIONAL BUSINESS MACHINES CORPORATION. (United States). G. W. BRAUDAWAY; K. A. MAGERLEIN; F. C. MINTZER. **Color correct digital watermarking of images**. US 553759, 1 Feb. 1995, 25 June 1996.
- IONEL, I.; POPESCU, F. Methods for online monitoring of air pollution concentration. In: KUMAR, A. (Ed.). **Air quality**. Rijeka: Intech, 2010. Chap. 5, p. 81-117.
- KASHINO, S. et al. A new polymorph of barium chloroanilate trihydrate. **Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications**, v. 57, n. 1, p. 18-19, 2001.
- KIRBY, C.; FOX, M.; WATERHOUSE, J. Reliability of nitrogen dioxide passive diffusion tubes for ambient measurement: in situ properties of the triethanolamine absorbent. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 2, n. 4, p. 307-312, 2000.
- KOMPANY-ZAREH, M.; MANSOURIAN, M.; RAVAEI, 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.
- KROCHMAL, D.; GORSKI, L. Determination of nitrogen dioxide in ambient air by use of a passive sampling technique and triethanolamine as absorbent. **Environmental Science & Technology**, v. 25, n. 3, p. 531-535, 1991.
- LAND, E. H. Recent advances in retinex theory and some implications for cortical computations: color vision and the natural image. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v. 80, n. 16, p. 5163-5169, 1983.
- LAND, E. H. The retinex theory of color vision. **Scientific American**, v. 237, n. 6, p. 108-128, 1977.

- LEFOHN, A. S.; HUSAR, J. D.; HUSAR, R. B. Estimating historical anthropogenic global sulfur emission patterns for the period 1850-1990. **Atmospheric Environment**, v. 33, n. 21, p. 3435-3444, Sept. 1999.
- LI, X.; TIAN, J.; SHEN, W. Quantitative biomarker assay with microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 495-501, 2010.
- LIM, S. et al. A colorimetric sensor array for detection and identification of sugars. **Organic Letters**, v. 10, n. 20, p. 4405-4408, Oct. 2008.
- LIMA, M. B. et al. A digital image-based micro-flow-batch analyzer. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 238-243, Jan. 2013.
- LIN, H.; SUSLICK, K. S. A colorimetric sensor array for detection of triacetone triperoxide vapor. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 44, p. 15519-15521, Nov. 2010.
- LIU, K. et al. Poly (2, 5-dihydroxy-1, 4-benzoquinonyl sulfide)(PDBS) as a cathode material for lithium ion batteries. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 4125-4131, 2011.
- LODGE, J. **Methods of air sampling and analysis**. 3rd ed. Michigan: Lewis Publishers, 1989.
- LYRA, S. W. et al. Digital image-based flame emission spectrometry. **Talanta**, v. 77, p. 1584-1589, 2009.
- MACHADO, R. M. D. **Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e em sucos de frutas e estimativa de sua ingestão**. 2007. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2007.
- MACHADO, R. M. D.; TOLEDO, M. C. F.; VICENTE, E. Sulfitos em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.
- MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991.
- MARTINS, C. R.; ANDRADE, J. B. de. Química atmosférica do enxofre (IV): emissões, reações em fase aquosa e impacto ambiental. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 259-272, 2002.
- MEYER, G. W.; GREENBERG, D. P. Perceptual color spaces for computer graphics. **ACM SIGGRAPH Computer Graphics**, v. 14, n. 3, p. 254-261, 1980.
- MILLER, J. A.; BOWMAN, C. T. Mechanism and modeling of nitrogen chemistry in combustion. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 15, n. 4, p. 287-338, Jan. 1989.
- MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. **Talanta**, v. 54, n. 5, p. 785-803, 2001.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

MUSTO, C. J.; LIM, S. H.; SUSLICK, K. S. Colorimetric detection and identification of natural and artificial sweeteners. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 6526-6533, Aug. 2009.

NISHIKAWA, Y. et al. Ion chromatographic determination of nitrogen dioxide in the atmosphere by using a triethanolamine-coated cartridge. **Journal of Chromatography A**, v. 370, p. 121-129, 1986.

OHTA, J. **Smart CMOS image sensors and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2007.

ORFANIDIS, S. J. **Introduction to signal processing**. New York: McGraw Hill, 1988.

PACHECO, J. G. et al. Gas-diffusion microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 20, p. 3207-3212, Oct. 2010.

PASSARETTI FILHO, J. **Desenvolvimento de método analítico para determinação de ozônio residual em água utilizando a técnica de fluorescência e estudo da viabilidade da construção de um sensor fluorimétrico em uma gota de solução para determinação de ozônio em ar**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

POPOLIM, W. D. **Análise de sulfitos em sucos de fruta e estimativa de seu consumo por escolares**. 2009. 175 f. Tese (Doutorado em Nutrição Humana Aplicada) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Faculdade de Engenharia de Alimentos; Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PRATS-MONTALBÁN, J. M.; JUAN, A. de; FERRER, A. Multivariate image analysis: a review with applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 107, n. 1, p. 1-23, May 2011.

PUJOL RAMO, J.; MARTÍNEZ VERDÚ, F. M.; CAPILLA PEREA, P. Estimation of the device gamut of a digital camera in raw performance using optimal color-stimuli. 2003 In: IS AND TS PICS CONFERENCE 2003 Rochester, [Proceedings]...[S.l.]: Society for Imaging Science & Technology, 2003. p. 530-535. Disponível em: <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/983/1/gamut_camera.pdf>. Acesso em: 28 jul 2015.

RIBÉREAU-GAYON, P. (Ed.). et al. **Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2nd ed. Chichester; Hoboken: John Wiley, 2006. v. 1.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004.

ROCKSTRÖM, J. et al. A safe operating space for humanity. **Nature**, v. 461, n. 7263, p. 472-475, 2009.

RYU, B. et al. New RGB primary for various multimedia systems. **Journal of Information Display**, v. 15, n. 2, p. 65-70, 2014.

SALTZMAN, B. E. Colorimetric microdetermination of nitrogen dioxide in the atmosphere. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 1949-1955, 1954.

SANTOS, P.; PEREIRA FILHO, E. R. Digital image analysis - an alternative tool for monitoring milk authenticity. **Analytical Methods**, v. 5, n. 15, p. 3669-3674, 2013.

SANTOS, P.; WENTZELL, P.; PEREIRA FILHO, E. Scanner digital images combined with color parameters: a case study to detect adulterations in liquid cow's milk. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 1, p. 89-95, 2012.

SEINFELD, J. H.; PANDIS, S. N. **Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change**. New York: John Wiley & Sons, 1998.

SHISHKIN, Y. L. et al. Use of a scanner and digital image-processing software for the quantification of adsorbed substances. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 102-106, Feb. 2004.

SIEVERING, H. et al. Heterogeneous sulfur conversion in sea-salt aerosol particles: the role of aerosol water content and size distribution. **Atmospheric Environment. Part A: General Topics**, v. 25, n. 8, p. 1479-1487, 1991.

SMITH, V. C.; POKORNY, J. The design and use of a cone chromaticity space: a tutorial. **Color Research and Application**, v. 21, n. 5, p. 375-383, 1996.

SOLOMON, C.; BRECKON, T. **Fundamentals of digital image processing: a practical approach with examples in Matlab**. Chichelen: Wiley-Blackwell, 2011.

SPICER, C. et al. Evaluation of NO₂ measurement methods for indoor air quality applications. **Air & Waste**, v. 44, n. 2, p. 163-168, Feb. 1994.

SÜSSTRUNK, S.; BUCKLEY, R.; SWEN, S. Standard RGB color spaces. In: IS AND T SID COLOR IMAGING CONFERENCE; COLOR IMAGING CONFERENCE, 7th, 1999, Scottsdale. [**Proceedings**]...[S.l.:s.n.], 1999. p. 127-134.

TONON, S. et al. An integrated assessment of energy conversion processes by means of thermodynamic, economic and environmental parameters. **Energy**, v. 31, n. 1, p. 149-163, 2006.

TÔRRES, A. R. et al. A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid-base titration without indicator. **Talanta**, v. 84, n. 3, p. 601-606, 15 May 2011.

UGUCIONE, C.; GOMES NETO, J. A.; CARDOSO, A. A. Método colorimétrico para determinação de dióxido de nitrogênio atmosférico com preconcentração em coluna de c-18. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 353-357, 2002.

UGUCIONE, C.; MACHADO, C. de M. D.; CARDOSO, A. A. Avaliação de no₂ na atmosfera de ambientes externos e internos na cidade de Araraquara, São Paulo. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1829-1833, 2009.

von PHILIPSBORN, W. Applications of double resonance and Fourier transform nmr spectroscopy in organic chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 40, n. 1/2, p. 159-180, 1974.

WALTHAM, N. CCD and CMOS sensors. In: HUBER, M. C. E. et al. (Ed.). **Observing photons in space**. 2nd ed. London: Springer, 2013. Chap. 23, p. 423-442. (ISSI scientific report series, v. 9).

WARNATZ, J. MAAS, U.; DIBBLE, R. W. **Combustion**. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2001. v. 3

WAYNE, R. P. **Chemistry of atmospheres**. 3rd ed. New York: Oxford Univ. Press, 2000.

WAYNE, R. P. et al. The nitrate radical: physics, chemistry, and the atmosphere. **Atmospheric Environment. Part A: General Topics**, v. 25, n. 1, p. 1-203, 1991.

WRIGHT, W. D. The graphical representation of small color differences. **Journal of the Optical Society of America**, v. 33, n. 11, p. 632-633, 1943.

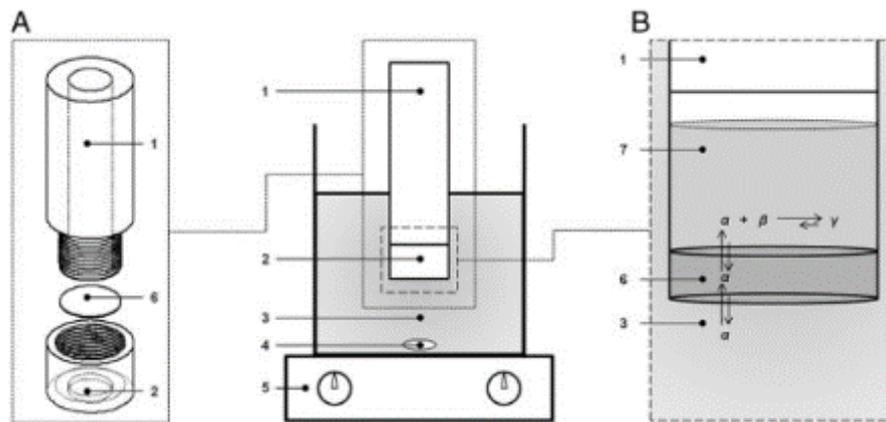
YANAGISAWA, Y.; NISHIMURA, H. A badge-type personal sampler for measurement of personal exposure to NO₂ and NO in ambient air. **Environment International**, v. 8, n. 1, p. 235-242, 1982.

ZAMORA, L. L. et al. Quantitative colorimetric-imaging analysis of nickel in iron meteorites. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1575-1579, 2011.

ZHANG, C.; SUSLICK, K. S. A colorimetric sensor array for organics in water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 33, p. 11548-11549, Aug. 2005.

Anexos

Diagrama do amostrador líquido-gás-líquido (PACHECO et al., 2010)



A scheme of GDME. A – exploded computer-aided design view of the extractor, B – schematic detail of the chemical equilibria; 1 – extractor's superior piece, 2 – extractor's lower piece, 3 – sample solution, 4 – magnetic stir bar, 5 – heating element with magnetic stirring, 6 – membrane, 7 – acceptor solution; α – analyte, β – derivatizing agent, γ – derivate. Reprinted from [31] with permission from Elsevier.

Qp-card-203 – Prancheta de cores utilizada como padrão para calibração dos instrumentos utilizados (Foto apenas ilustrativa, não possui validade para calibração)

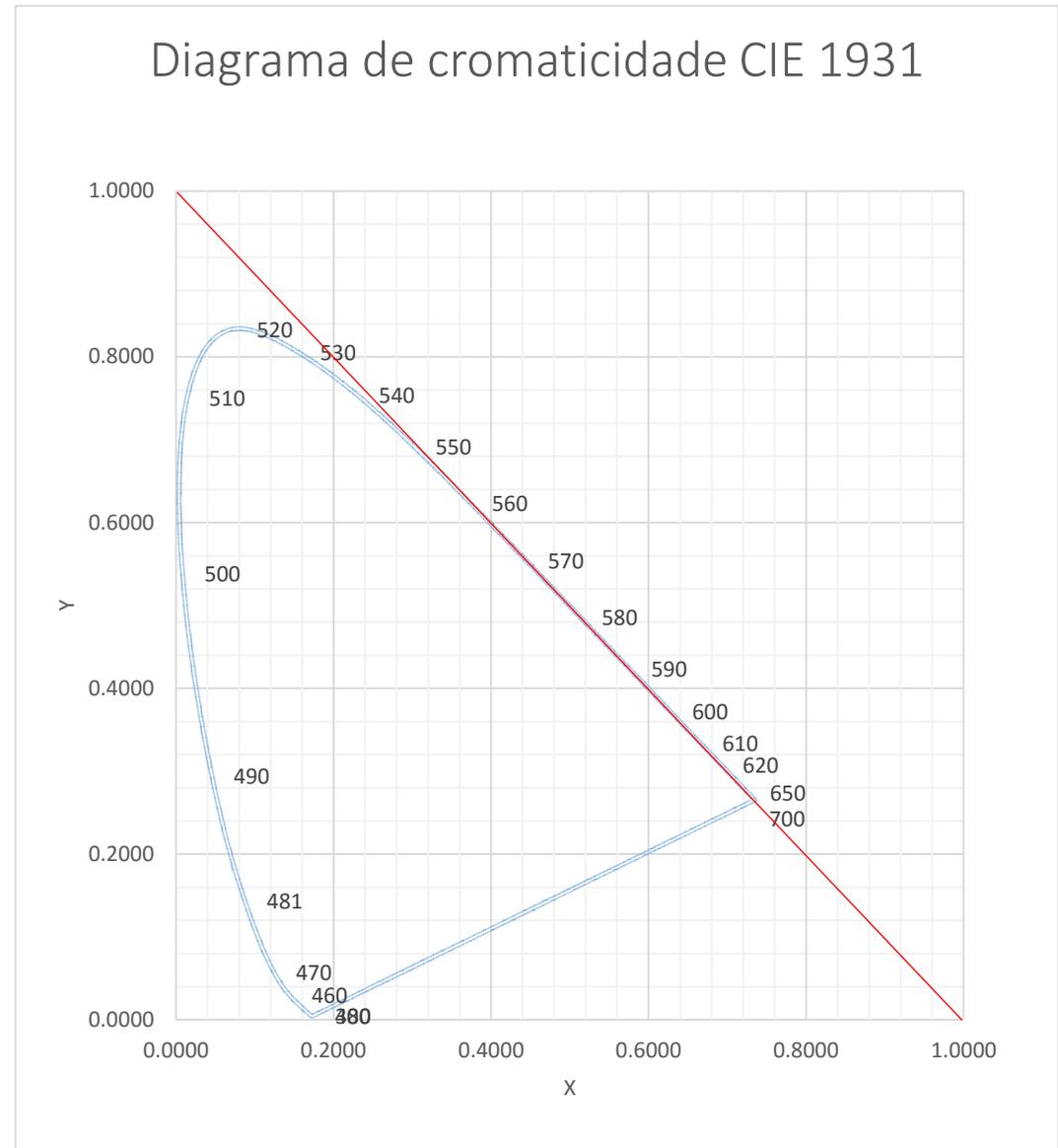


nm	x	y																					
380	0.17411	0.00496	411	0.17249	0.0048	442	0.16321	0.01194	473	0.11581	0.07358	504	0.00364	0.62201	535	0.19288	0.78163	566	0.41583	0.58262	597	0.61298	0.38648
381	0.17409	0.00496	412	0.17239	0.0048	443	0.16255	0.01252	474	0.11278	0.07989	505	0.00386	0.65482	536	0.20031	0.7764	567	0.42292	0.57563	598	0.61778	0.38171
382	0.17407	0.00497	413	0.1723	0.0048	444	0.16185	0.01314	475	0.1096	0.08684	506	0.00464	0.6759	537	0.20769	0.77105	568	0.42999	0.56865	599	0.62246	0.37705
383	0.17406	0.00498	414	0.17219	0.00482	445	0.16111	0.01379	476	0.10626	0.09449	507	0.00601	0.69612	538	0.21503	0.76559	569	0.43704	0.56167	600	0.62704	0.37249
384	0.17404	0.00498	415	0.17209	0.00483	446	0.16031	0.01449	477	0.10278	0.10286	508	0.00799	0.71534	539	0.22234	0.76002	570	0.44406	0.55472	601	0.63152	0.36803
385	0.17401	0.00498	416	0.17198	0.00486	447	0.15947	0.01523	478	0.09913	0.11201	509	0.0106	0.73341	540	0.22962	0.75433	571	0.45106	0.54777	602	0.6359	0.36367
386	0.17397	0.00497	417	0.17187	0.00489	448	0.15857	0.01602	479	0.09531	0.12194	510	0.01387	0.75019	541	0.23689	0.74852	572	0.45804	0.54084	603	0.64016	0.35943
387	0.17393	0.00494	418	0.17174	0.00494	449	0.15763	0.01684	480	0.09129	0.1327	511	0.01777	0.76561	542	0.24413	0.74262	573	0.46499	0.53393	604	0.64427	0.35533
388	0.17389	0.00493	419	0.17159	0.00501	450	0.15664	0.01771	481	0.08708	0.14432	512	0.02224	0.77963	543	0.25136	0.73661	574	0.4719	0.52705	605	0.64823	0.3514
389	0.17384	0.00492	420	0.17141	0.0051	451	0.1556	0.01861	482	0.08268	0.15687	513	0.02727	0.79211	544	0.25858	0.73051	575	0.47878	0.5202	606	0.65203	0.34763
390	0.1738	0.00492	421	0.17121	0.00521	452	0.15452	0.01956	483	0.07812	0.17042	514	0.03282	0.80293	545	0.26578	0.72432	576	0.48561	0.51339	607	0.65567	0.34402
391	0.17376	0.00492	422	0.17099	0.00533	453	0.1534	0.02055	484	0.07344	0.18503	515	0.03885	0.81202	546	0.27296	0.71806	577	0.49241	0.50661	608	0.65917	0.34055
392	0.1737	0.00494	423	0.17077	0.00547	454	0.15222	0.02161	485	0.06871	0.20072	516	0.04533	0.81939	547	0.28013	0.71172	578	0.49915	0.49989	609	0.66253	0.33722
393	0.17366	0.00494	424	0.17054	0.00562	455	0.15099	0.02274	486	0.06399	0.21747	517	0.05218	0.82516	548	0.28729	0.70532	579	0.50585	0.49321	610	0.66576	0.33401
394	0.17361	0.00494	425	0.1703	0.00579	456	0.14969	0.02395	487	0.05932	0.23525	518	0.05932	0.82943	549	0.29445	0.69884	580	0.51249	0.48659	611	0.66887	0.33092
395	0.17356	0.00492	426	0.17005	0.00597	457	0.14834	0.02525	488	0.05467	0.25409	519	0.06672	0.83227	550	0.3016	0.69231	581	0.51907	0.48003	612	0.67186	0.32795
396	0.17351	0.0049	427	0.16978	0.00618	458	0.14693	0.02663	489	0.05003	0.274	520	0.0743	0.8338	551	0.30876	0.68571	582	0.5256	0.47353	613	0.67472	0.32509
397	0.17347	0.00486	428	0.1695	0.0064	459	0.14547	0.02812	490	0.04539	0.29498	521	0.08205	0.83409	552	0.31592	0.67906	583	0.53207	0.46709	614	0.67746	0.32236
398	0.17342	0.00484	429	0.1692	0.00664	460	0.14396	0.0297	491	0.04076	0.31698	522	0.08994	0.83329	553	0.32306	0.67237	584	0.53846	0.46073	615	0.68008	0.31975
399	0.17338	0.00481	430	0.16888	0.0069	461	0.14241	0.03139	492	0.0362	0.3399	523	0.09794	0.83159	554	0.33021	0.66563	585	0.54479	0.45443	616	0.68258	0.31725
400	0.17334	0.0048	431	0.16853	0.00718	462	0.1408	0.03321	493	0.03176	0.3636	524	0.10602	0.82918	555	0.33736	0.65885	586	0.55103	0.44823	617	0.68497	0.31486
401	0.17329	0.00479	432	0.16815	0.00749	463	0.13912	0.0352	494	0.02749	0.38792	525	0.11416	0.82621	556	0.34451	0.65203	587	0.55719	0.4421	618	0.68725	0.31259
402	0.17324	0.00478	433	0.16775	0.00782	464	0.13737	0.0374	495	0.02346	0.4127	526	0.12235	0.82277	557	0.35167	0.64517	588	0.56327	0.43606	619	0.68943	0.31041
403	0.17317	0.00478	434	0.16733	0.00817	465	0.1355	0.03988	496	0.0197	0.43776	527	0.13055	0.81893	558	0.35881	0.63829	589	0.56926	0.4301	620	0.69151	0.30834
404	0.1731	0.00477	435	0.1669	0.00855	466	0.13351	0.04269	497	0.01627	0.46295	528	0.1387	0.81478	559	0.36596	0.63138	590	0.57515	0.42423	621	0.69349	0.30637
405	0.17302	0.00478	436	0.16645	0.00896	467	0.13137	0.04588	498	0.01318	0.48821	529	0.14677	0.8104	560	0.3731	0.62445	591	0.58094	0.41846	622	0.69539	0.30448
406	0.17293	0.00478	437	0.16598	0.0094	468	0.12909	0.04945	499	0.01048	0.5134	530	0.15472	0.80586	561	0.38024	0.6175	592	0.58665	0.41276	623	0.69721	0.30267
407	0.17284	0.00479	438	0.16548	0.00987	469	0.12666	0.05343	500	0.00817	0.53842	531	0.16253	0.80124	562	0.38738	0.61054	593	0.59222	0.40719	624	0.69894	0.30095
408	0.17275	0.0048	439	0.16496	0.01035	470	0.12412	0.0578	501	0.00628	0.56307	532	0.17024	0.79652	563	0.39451	0.60357	594	0.59766	0.40176	625	0.70061	0.2993
409	0.17266	0.0048	440	0.16441	0.01086	471	0.12147	0.06259	502	0.00487	0.58712	533	0.17785	0.79169	564	0.40163	0.59659	595	0.60293	0.3965	626	0.70219	0.29773
410	0.17258	0.0048	441	0.16383	0.01138	472	0.1187	0.06783	503	0.00398	0.61045	534	0.18539	0.78673	565	0.40873	0.58961	596	0.60803	0.39141	627	0.70371	0.29622

Coordenadas de cromaticidade CIE 1931

nm	x	y	nm	x	y	nm	x	y
628	0.70516	0.29477	659	0.72968	0.27032	690	0.73439	0.26561
629	0.70656	0.29338	660	0.72997	0.27003	691	0.73444	0.26556
630	0.70792	0.29203	661	0.73023	0.27077	692	0.73448	0.26552
631	0.70923	0.29072	662	0.73047	0.26953	693	0.73452	0.26548
632	0.7105	0.28945	663	0.73069	0.26931	694	0.73456	0.26544
633	0.71173	0.28823	664	0.7309	0.2691	695	0.73459	0.26541
634	0.7129	0.28706	665	0.73109	0.26991	696	0.73462	0.26538
635	0.71403	0.28593	666	0.73128	0.26872	697	0.73465	0.26535
636	0.71512	0.28484	667	0.73147	0.26853	698	0.73467	0.26533
637	0.71616	0.2838	668	0.73165	0.26835	699	0.73469	0.26531
638	0.71716	0.28281	669	0.73183	0.26817	700	0.73469	0.26531
639	0.71812	0.28185	670	0.73199	0.26801	380	0.17411	0.00496
640	0.71903	0.28094	671	0.73215	0.26785			
641	0.71991	0.28006	672	0.7323	0.2677			
642	0.72075	0.27922	673	0.73244	0.26756			
643	0.72155	0.27842	674	0.73258	0.26742			
644	0.72232	0.27766	675	0.73272	0.26728			
645	0.72303	0.27695	676	0.73286	0.26714			
646	0.7237	0.27628	677	0.733	0.267			
647	0.72433	0.27566	678	0.73314	0.26686			
648	0.72491	0.27508	679	0.73328	0.26672			
649	0.72547	0.27453	680	0.73342	0.26658			
650	0.72599	0.27401	681	0.73355	0.26645			
651	0.72649	0.27351	682	0.73368	0.26632			
652	0.72698	0.27302	683	0.73381	0.26619			
653	0.72743	0.27257	684	0.73394	0.26606			
654	0.72786	0.27214	685	0.73405	0.26595			
655	0.72827	0.27173	686	0.73414	0.26586			
656	0.72866	0.27134	687	0.73422	0.26578			
657	0.72902	0.27198	688	0.73429	0.26571			
658	0.72936	0.27064	689	0.73434	0.26566			

Continuação



Apêndice

Apêndice

Comandos Matlab+ toolbox de imagens

1. %%Resumo de comandos individuais para processamento de imagens no matlab
2. %%convertendo em escala de cinza
3. g1= rgb2gray(x1);
4. %%convertendo imagens em linhas
5. c1 = g1(:);
6. %%Alinhamento variáveis
7. vn = [c1; c2;...]
8. %%%TRANSFORMAR UNIT8 EM DOUBLE MATRIZ vn
9. %%anova
10. pvn = anova1(vn)
11. %%histogramas curva
12. h1 = imhist(g1);
13. htotal = [h1]
14. plot(htotal)
15. %%histogramas curva aquisição de Emax
16. [elem, indice] = max(h1)
17. %%Conversão dos valores r,g e b para os valores x,y e z do diagrama de cromaticidade.D65-E (ASTM E308-01)
18. %%RGB -->XYZ -->xyz(xyY)
19. %%input RGB = [R;G;B]
20. M = [0.4887180, 0.3106803, 0.2006017; 0.1762044, 0.8129847,0.0108109; 0.0000000, 0.0102048, 0.9897952]
21. XYZ = M*RGB
22. a = XYZ(1,:);
23. b = XYZ(2,:);
24. c = XYZ(3,:);
25. d = a+b+c;
26. x = a/d;
27. y = b/d;
28. Y = c/d;
29. xyY = [x; y; Y]

30. % XYZ com rec709 display e branco D65
31. M2 =[0.4124564 0.3575761 0.1804375 0.2126729 0.7151522 0.0721750 0.0193339 0.1191920 0.9503041];

Rotinas de análise multivariada de imagens-*adaptado* (DOS SANTOS; PEREIRA-FILHO, 2013; SANTOS; WENTZELL; PEREIRA-FILHO, 2012).

```
1. % Program to process digital images and calculate color parameters.
2. % The mean of color parameters are stored in the following order: R (red), G
3. % (green), B (blue), H (hue), S (saturation), V or I (value or intensity),
4. % rR (relative Red), rG, rB and L (luminosity).
5. % The file names and Y matriz must be in an Excel file (first two columns).
6. % To start digit imgprocess2('xlsFile','savename')
7. % Savename needs to be a string
8. function imgprocess2(xlsFile,savename)

9. [num,txt]=xlsread(xlsFile,1);
10. Ydata=num(:,1);
11. FileDesc=txt(2:end,1);
12. img_count=0;

13. for i = 1:length(FileDesc)
14. img=imread([FileDesc{i} '.jpg'],'jpg');
15. ImgDat(:,:,i)=img;
16. [m,n]=size(img(:,:,1));
17. X1=reshape(img,m*n,3);
18. Xout(:,1:3)=double(X1);
19. Xout(:,4:6) = rgb2hsv(X1);
20. soma = sum(Xout(:,1:3),2);
21. Xout(:,7) = Xout(:,1)./soma;
22. Xout(:,8) = Xout(:,2)./soma;
23. Xout(:,9) = Xout(:,3)./soma;
24. Xout(:,10) = soma;
25. index=isnan(Xout);
26. Xout(index)=0;
27. ImgPars(i,:)=mean(Xout);
28. img_count=img_count+1;
29. end
30. img_count=img_count-1;
31. ParsDesc=['R';'G';'B';'H';'S';'V';'r';'g';...
32. 'b';'L'];

33. save(savename,'ImgDat','FileDesc','ImgPars','ParsDesc','Ydata')
```

```

1. %%ROTINA PCR (tool box matlab)
2. %%Dados
3. [Dcm] = mean_c(abs);
4. figure(2)
5. plot(w,Dcm), xlabel 'Comprimento de onda (nm)', ylabel 'Absorbância'
6. %PCA
7. [u,s,v] = svd(Dcm'); T=u*s; P=v; var_exp = diag(s).^2/sum(diag(s).^2)*100;
8. figure(3)
9. plot(var_exp,'-o'), xlabel 'n° de componente principais', ylabel '% Variância PC'
10. %Regressao
11. b= inv(T(:,1:2))*T(:,1:2))*T(:,1:2))*c'
12. %Projecao valores conhecidos(testanto com valores da propria curva)
13. Tp = Dcm'*pinv(P(:,1:2)');
14. yp= Tp*b;
15. n=30
16. ncpr=2
17. RMSEP=(sqrt(sum((yp'-c).^2))/n-ncpr)
18. PRESS= sum((c'-yp).^2)
19. dof= n - ncpr - 1
20. MSEC = PRESS/dof
21. RMSEP= (MSEC)^0.5
22. Ep= 100*(c-yp')./c
23. figure(4)
24. plot(c,Ep, 'o'), xlabel 'Concentração P mgL^{-1}', ylabel 'Erro relativo'
25. Etotalc = mean(Ep)
26. % R2
27. ypi = mean(yp);
28. cj1= yp(:)- ypi
29. cj2= c(:)' - ypi
30. cj3= yp- c'
31. ali= cj2' + cj3
32. zeross= ali - cj1
33. SQt= sum(cj1.^2)
34. SQr= sum(cj2.^2)
35. R2= SQr/SQt
36. %Regressão (parametros)
37. %Scores x loadings
38. figure(5)
39. plot3(T(:,1), T(:,2), T(:,3), 'o'); xlabel 'PC1', ylabel 'PC2', zlabel 'PC3'
40. %(descobrir concentrações)
41. %conjunto total (com calibração)
42. Td = Dcm'*pinv(P(:,1:2)');
43. yd= Td*b;
44. %(Conjunto validação cruzada)
45. [DcmV] = mean_c(abs2(:,1:8));
46. Tva = DcmV'*pinv(P(:,1:2)');
47. yva= Tva*b;
48. VRMSEP=(sqrt(sum((yva'-cva).^2)/5))
49. CROSS= sum((cva'-yva).^2)
50. n2= 8

```

```
51. ncpr2=2
52. dof2= n2 - ncpr2 - 1
53. VMSEC = CROSS/dof2
54. VRMSEP= (VMSEC)^0.5
55. Epv= 100*(cva-yva')./cva
56. figure(6)
57. plot(cva,Epv, 'o'), xlabel 'Concentração P mgL^{-1}', ylabel 'Erro relativo validação'
58. Etotlv = mean(Epv)
59. %(Conjunto Amostras concentração desconhecida)
60. [Dcms] = mean_c(abs3);
61. Ts = Dcms*pinv(P(:,1:2)');
62. ys= Ts*b;
63. tudopcr =[yp' ,ys' , yva]
64. figure(2)
65. plot(tudopcr, 'o')
```

```

1. %%ROTINA PLS (tool box matlab)
   figure(1)
2. [Dcm] = mean_c(abs);
3. X = Dcm;
4. y = c;
5. [XL,YL,XS,YS,BETA,PCTVAR,MSE,stats] = plsregress(Dcm',c',4);
6. figure(2)
7. plot(1:4,cumsum(100*PCTVAR(2,:)),'-bo');
8. xlabel('Number of PLS components');
9. ylabel('Percent Variance Explained in y');
10. figure(3)
11. yfit = [ones(size(Dcm',1),1) Dcm']*BETA;
12. residuals = c' - yfit;
13. stem(residuals)
14. xlabel('Observation');
15. ylabel('Residual');
16. PRESS= sum((c'-yfit).^2)
17. n=30
18. ncpr=4
19. dof= n - ncpr - 1
20. MSECpls = PRESS/dof
21. RMSEP= (MSECpls)^0.5
22. Ep= 100*(c'-yfit')./c
23. figure(4)
24. plot(c,Ep, 'o'), xlabel 'Concentração P mgL^{-1}', ylabel 'Erro relativo'
25. Etotalc = mean(Ep(:))
26. ypplsi= mean(yfit);
27. cj1= yfit(:)- ypplsi
28. cj2= c(:)' - ypplsi
29. cj3= ypplsi- c'
30. ali= cj2' + cj3
31. zeross= ali - cj1
32. SQr= sum(cj1.^2)
33. SQt= sum(cj2.^2)
34. R2= SQr/SQt
35. TSS = sum((c'-mean(c')).^2);
36. RSS = sum((c'-yfit).^2);
37. Rsquared = 1 - RSS/TSS
38. figure(5)
39. plot(1:4,stats.W,'o-');
40. legend({'c1','c2','c3','c4','c5','c6','c7','c8','c9','c10','c11'},'Location','NW')
41. xlabel('Predictor');
42. ylabel('Weight');
43. figure(6)
44. [axes,h1,h2] = plotyy(0:4,MSE(1,:),0:4,MSE(2,:));
45. set(h1,'Marker','o')
46. set(h2,'Marker','o')
47. legend('MSE Predictors','MSE Response')
48. xlabel('Number of Components')
49. %Validação

```

```
50. [DcmV] = mean_c(abs2);
51. figure(7)
52. ypplsv = [ones(size(DcmV',1),1) DcmV']*BETA;
53. residuals = cva' - ypplsv;
54. stem(residuals)
55. xlabel('Observation');
56. ylabel('Residual');
57. CROSS= sum((cva' - ypplsv).^2)
58. n=7
59. ncpr=4
60. dof= n - ncpr - 1
61. vMSECpls = CROSS/dof
62. vRMSEPpls= (vMSECpls)^0.5
63. Epv= 100*(cva' - ypplsv)./cva'
64. figure(8)
65. plot(cva,Epv, 'o'), xlabel 'Concentração P mgL^{-1}', ylabel 'Erro relativo'
66. Etotalc = mean(Epv(:))
67. %(Conjunto Amostras concentração desconhecida)
68. [Dcms] = mean_c(abs3);
69. ypplss = [ones(size(Dcms',1),1) Dcms']*BETA;
70. tudopls =[yfit' ,ypplss' , ypplsv']
71. figure(9)
72. plot(tudopls, 'o')
```

Procedimento para padronização

Método Ripper:

O método *Ripper* é empregado pelas vinícolas brasileiras e também por outros países para realizar a quantificação de sulfito presente em vinhos por ser rápido e de fácil execução. Nesse trabalho, esse método foi realizado para comparação com os valores de concentração de sulfito encontrados pelas técnicas desenvolvidas. O procedimento para realização do método *Ripper* está descrito a seguir.

Materiais e métodos

Reagentes

Solução padronizada de tiosulfato: para preparar uma solução de tiosulfato com concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foram pesados 12,417 g de tiosulfato de sódio e avolumados em balão volumétrico de 1,00 L com água destilada. A solução foi transferida e armazenada em frasco âmbar.

Solução de iodeto de potássio: para preparar a solução de iodeto de potássio de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 4,154 g do sal foram dissolvidos e avolumados com água destilada em um balão volumétrico de 250,00 mL.

Solução de triiodeto de potássio: 0,06028 g de triiodeto de potássio foram dissolvidos e avolumados em balão volumétrico de 100,00 mL com água destilada.

Solução de carbonato de sódio: uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de carbonato de potássio foi preparada com 2,102 g de Na_2CO_3 em um balão de 250,00 mL de preenchido com água destilada.

Dicromato de potássio: 100,00 mL do padrão primário da titulação foram preparados com 0,2457 g do sal de dicromato de potássio e dissolvidos com água destilada.

Procedimento Experimental

Padronização de tiosulfato

Para a padronização do tiosulfato, 10,00 mL da solução de dicromato de potássio de título conhecido foram transferidos para um erlenmeyer, ao qual também foram adicionados 1,00 mL de ácido fosfórico, 10,00 mL da solução de iodeto de potássio de concentração $0,1$

mol L⁻¹, 10,00 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de carbonato de sódio e 50,00 mL de água destilada. Após um tempo de cinco minutos iniciou-se a titulação com a solução de tiosulfato adicionada à bureta. Quando a solução adquiriu coloração levemente amarela a titulação foi interrompida e foram adicionadas 3 gotas de amido, tornando a solução azul escura. A titulação com tiosulfato foi retomada até que a solução adquirisse coloração esverdeada.

Titulação iodimétrica com as amostras de vinho

Para a análise com as amostras de vinho, foram adicionados ao erlenmeyer 10,00 mL da solução de triodeto de potássio e 10,00 mL da solução de iodeto de potássio e deixou-se o recipiente reagindo no escuro por cerca de cinco minutos. Após esse tempo foram adicionados 2,00 mL de vinho, 0,50 mL de ácido fosfórico e 50,00 mL de água destilada. A solução foi titulada com a solução padronizada de tiosulfato de concentração 0,05 mol L⁻¹ contida na bureta. Quando foi observada mudança na coloração escura da solução para tons esverdeados foi interrompida a titulação e adicionado amido, tornando a solução muito escura novamente. A titulação foi retomada até que a solução ficasse incolor. Foram realizadas três repetições para cada amostra e uma titulação foi feita com uma solução de branco, sem adição de vinho. A diferença entre o volume gasto na titulação com a solução de branco e com as soluções contendo vinho foi utilizado para calcular a concentração de sulfito presente na amostra.

Titulação iodimétrica com as amostras de cerveja

Para a análise com as amostras de cerveja, foram adicionados ao erlenmeyer 10,00 mL da solução de triiodeto de potássio e 10,00 mL da solução de iodeto de potássio e deixou-se reagir no escuro por cerca de cinco minutos. Após esse tempo foram adicionados 5,00 mL de cerveja, 0,50 mL de ácido fosfórico e 50,00 mL de água destilada. A solução foi titulada com a solução padronizada de tiosulfato de concentração 0,0500 mol L⁻¹ contida na bureta. Quando foi observada mudança na coloração escura da solução para tons esverdeados foi interrompida a titulação e adicionado amido, tornando a solução muito escura novamente. A titulação foi retomada até que a solução ficasse incolor. Foram realizadas três repetições para cada amostra e uma titulação foi realizada para uma solução de branco, sem adição de cerveja. A diferença entre o volume gasto na titulação com uma solução de branco e com as soluções contendo cerveja foi utilizado para calcular a concentração de sulfito presente na amostra.