

LORRAYNE MOREIRA ZAMPIER

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASEADOS NA
ANÁLISE POR IMAGENS DIGITAIS PARA DETERMINAÇÃO DE OZÔNIO
E HIPOCLORITO EM ÁGUAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Z26d
2017

Zampier, Lorryne Moreira, 1988-

Desenvolvimento de métodos analíticos baseados na análise por imagens digitais para determinação de ozônio e hipoclorito em águas / Lorryne Moreira Zampier. – Viçosa, MG, 2017. xvi, 95f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: André Fernando de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Imagens digitais. 2. Ozônio. 3. Água sanitária. 4. Água - Purificação - Cloração. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22 ed. 621.367

LORRAYNE MOREIRA ZAMPIER

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASEADOS NA
ANÁLISE POR IMAGENS DIGITAIS PARA DETERMINAÇÃO DE OZÔNIO E
HIPOCLORITO EM ÁGUAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.




Antônio Augusto Neves




Alisson Carraro Borges



Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Coorientadora)



Fernanda Fernandes Heleno
(Coorientadora)



André Fernando de Oliveira
(Orientador)

A meus pais, Marlei e José Ricardo, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por tornarem possível meus estudos e formação profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor André Fernando pelos ensinamentos, orientação, paciência e pela confiança em mim depositada. Sua generosidade e competência profissional tornaram essa caminhada muito mais fácil.

Às minhas coorientadoras, professora Maria Eliana e Fernanda pela grande contribuição neste trabalho.

À professora Lêda por permitir o trabalho em seu laboratório.

Ao Sérgio Olivo (IBM) pela criação do *software RGBcam* para tratamento analítico das imagens usadas no método de imagens digitais.

Aos membros da banca examinadora, professores Alisson (DEA-UFV), Antônio Augusto (DEQ-UFV), Lêda (DEA-UFV) e Efraim (DEQ-UFV) pelo enriquecimento e pela avaliação na dissertação.

Aos companheiros de laboratório pela ótima convivência e pela ajuda na execução deste trabalho, especialmente à Stefania e Thais, por estarem comigo em todos os momentos difíceis, não me deixando desanimar.

A todos que de uma maneira ou de outra, possam ter contribuído para a execução desse trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química pela recepção e pela oportunidade de realizar o trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, por ter me guiado em mais uma etapa de minha vida, dando-me forças para atingir os meus objetivos, sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Marlei e José Ricardo e a meu irmão, Josserrand pelo amor, carinho e incentivo.

Ao Marcos pela compreensão, apoio e companheirismo.

A meus familiares que sempre me apoiaram e incentivaram.

À todas as minhas amigas, sempre dispostas a ajudar.

Aos colegas de curso pelos bons e maus momentos compartilhados.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Ozônio.....	2
1.1.1. Produção de ozônio	4
1.1.2. Métodos para quantificação de ozônio	5
1.2. Cloro residual.....	6
1.2.1. Métodos para quantificação de cloro residual.....	9
1.3. Verde malaquita	9
1.4. Método de análise por imagens digitais.....	11
1.4.1. Lei de Beer-Lambert-Bouguer.....	11
1.4.2. Espectro de absorção na região do visível	12
1.4.3. Sinais digitais	12
1.4.4. Comparação de espectrofotômetro e dispositivo de captura de imagens.....	14
1.4.5. Sensação de cor	15
1.4.6. A cor em dispositivos de imagem.....	17
1.4.7. Modelos e espaço de cor	18
1.4.8. Procedimentos analíticos empregando análises por imagens digitais	21
1.4.9. <i>Softwares</i> para tratamento de imagens	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Reagentes.....	24
3.2. Soluções	25
3.3. Padronização da solução de tiosulfato de sódio	26
3.4. Produção do ozônio	27

3.4.1. Ozonização da água	27
3.5. Quantificação de ozônio	28
3.5.1. Quantificação de ozônio gasoso	28
3.5.2. Quantificação de ozônio aquoso	29
3.6. Padronização das soluções de hipoclorito	30
3.6.1. Padronização da solução de hipoclorito comercial	30
3.6.2. Padronização da solução estoque de hipoclorito	30
3.7. Estudo para seleção do reagente a ser utilizado nos métodos desenvolvidos	31
3.7.1. Curvas analíticas para o método com DPD	31
3.7.2. Curvas analíticas para o método com índigo-trissulfonato.....	32
3.7.3. Curvas analíticas para o método com verde malaquita	32
3.8. Caracterização do verde malaquita	32
3.8.1. Comportamento do verde malaquita na presença de soluções aquosas de ozônio e hipoclorito	32
3.9. Método de análise por imagens digitais com o verde malaquita.....	33
3.9.1. Confecção do sistema para análises por imagens digitais.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Seleção de reagentes	37
4.1.1. Curvas analíticas utilizando o DPD	37
4.1.2. Curvas analíticas utilizando o índigo-trissulfonato	44
4.1.3. Curvas analíticas utilizando o verde malaquita	47
4.2. Estudo cinético do verde malaquita	51
4.3. Método de análise por imagens digitais com o verde malaquita.....	57
4.3.1. Influência do tratamento do sinal analítico	57
4.3.2. Influência do material da cubeta	65
4.3.3. Influência do tipo de <i>webcam</i> e cubeta	67
4.4. Validação dos métodos analíticos.....	70
4.4.1. Método de análise por imagens digitais para quantificação de ozônio em águas com o verde malaquita	70
4.4.2. Método de análise por imagens digitais para quantificação de hipoclorito com o verde malaquita.....	77
5. CONCLUSÕES.....	86

6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADC – Conversor analógico digital
- CIE – *Commision internationale de l'Éclairage*
- CMYK – *Cyano magenta, yellow, key* (Ciano, magenta, amarelo e chave-preto)
- CV – Coeficiente de variação
- DPD – N-dietil-p-fenilenediamina
- EPA – *Environmental Protection Agency*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- GRAS – *General recognized as safe*
- HSL – Matiz, saturação, luminosidade
- HSV – Matiz, saturação, valor (escalas de cinza)
- IBM – *International Business Machines*
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- LOD – *Limit of detection* (Limite de detecção)
- LOQ – *Limit of quantification* (Limite de quantificação)
- MG, VM – *Malachite green*, Verde Malaquita
- RGB – *Red, green and blue*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de distribuição de espécies do sistema ácido-base de Bronsted do ácido hipocloroso (A) escala linear; (B) escala logarítmica.	8
Figura 2. Estrutura química do verde malaquita.....	10
Figura 3. Estrutura química do carbinol do verde malaquita.	11
Figura 4. Exemplos de figuras baseadas no pontilhismo. O conceito para a formação da imagem é similar ao dos dispositivos de captura de imagem.....	15
Figura 5. Espectro na região do visível	16
Figura 6. Ampliação da uma pequena área de televisão de LED onde pode-se ver os filtros coloridos que forma cada pixel (similar ao detector dos dispositivos de captura de imagem) e os pixels formando partes de duas letras.	18
Figura 7. Representação do modelo de cor CIE-XYZ.....	19
Figura 8. Representação do modelo RGB.	20
Figura 9. Representação de um espaço de cor e diferenças entre os espaços de cor dos modelos RGB e CMYK.....	20
Figura 10. Gerador de ozônio utilizado no trabalho.	27
Figura 11. Frasco lavador de gases usado como compartimento para ozonização da água.....	28
Figura 12. Câmara “homemade” para fixação da <i>webcam</i> e cubetas para obtenção das imagens digitais. Esquerda – Vista Frontal (onde há incidência da luz); Direita – Vista Posterior. (A) dispersor de luz; (B) cubetas no porta cubetas (o encaixa das cubetas fica dentro da câmara); (C) abertura onde a <i>webcam</i> é colocada.	34
Figura 13. Montagem do sistema para estudo da influência da luz externa sobre as imagens digitais, sem a câmara escura. (A) <i>webcam</i> ; (B) câmara de análise; (C) cubetas; (D) fonte de luz.....	34
Figura 14. Desenho esquemático da montagem do sistema utilizado para a análise por imagens digitais.....	35
Figura 15. Interface do <i>software</i> para análise das imagens digitais.....	36
Figura 16. Detalhes da interface do <i>software</i> para análise das imagens digitais. Áreas para coleta de dados: (A) cubeta com amostra; (B) luz	

incidente; (C) da região sem incidência de luz (preto); (D) cubeta com branco.	36
Figura 17. Curva analítica do método com DPD para o hipoclorito. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.	37
Figura 18. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com DPD para hipoclorito. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático. O quadrado cinza marca um <i>outlier</i> não incluído no modelo quadrático.....	38
Figura 19. Curva analítica do método com DPD para o ozônio. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.	40
Figura 20. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com DPD para o ozônio. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático.	41
Figura 21. Gráfico de resíduos para a curva do método com DPD para o ozônio na presença e ausência de iodeto. (■) com iodeto; (△) sem iodeto. O quadrado cinza marca um <i>outlier</i> não incluído na curva na presença de iodeto.	42
Figura 22. Efeito da presença de iodeto sobre o método com DPD para o ozônio. (■) com iodeto; (△) sem iodeto.	43
Figura 23. Curva analítica do método com índigo-trissulfonato para o ozônio. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.	44
Figura 24. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com índigo-trissulfonato para o ozônio. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático.	45
Figura 25. Curva analítica do método com índigo-trissulfonato para o hipoclorito. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.	46
Figura 26. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com índigo-trissulfonato para o hipoclorito. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático. ..	46
Figura 27. Curva analítica do método com verde malaquita para o hipoclorito. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.	48
Figura 28. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com verde malaquita para o hipoclorito. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático.	48
Figura 29. Curva analítica do método com verde malaquita para o ozônio. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.....	49
Figura 30. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com verde malaquita para o ozônio. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático.....	50

Figura 31. Exemplos dos resultados obtidos para as condições experimentais definidas pela Matriz de Doehlert: (esquerda) ozônio, pH 4,5 e concentração de verde malaquita igual a 22,5 $\mu\text{mol/L}$; (direita) hipoclorito, pH 6,0 e concentração de verde malaquita igual a 15,0 $\mu\text{mol/L}$	51
Figura 32. Comportamento cinético do verde malaquita 15 $\mu\text{mol/L}$ na presença de hipoclorito 2,0 mgCl/L (56,0 $\mu\text{mol/L}$) e pH 7,5. Inseto: Gráfico de resíduos.	52
Figura 33. Constantes de reação observadas para os diferentes ensaios do planejamento experimental baseado na Matriz de Doehlert para o hipoclorito. Os traços são apenas para melhorar observação dos pontos referentes ao mesmo ensaio.....	53
Figura 34. Coeficientes significativos (em unidades codificadas) para explicar o comportamento do pH e concentração de verde malaquita no planejamento experimental. (■) quadrado do valor do pH, (○) valor do pH e (▲) quadrado da concentração de verde malaquita.	55
Figura 35. Termo A_{eq} estimados para os diferentes ensaios do planejamento experimental baseado na Matriz de Doehlert. Os traços são apenas para melhorar observação dos pontos referentes ao mesmo ensaio.	56
Figura 36. Resolução para cada tratamento aplicado aos dados experimentais para o filtro R para <i>webcam</i> com correção e sem correção de branco.....	59
Figura 37. Perfis típicos de filtros de <i>webcam</i> . Filtros GREEN(□), RED(▲) e BLUE(○).....	61
Figura 38. Sobreposição do espectro de absorção do verde malaquita (A) e os espectros de transmissão (normalizados) dos filtros <i>Kodak</i> para <i>webcam</i> : filtro GREEN (B); filtro BLUE (C).....	62
Figura 39. Exemplo do comportamento da absorbância medida de verde malaquita a partir das imagens digitais para os três canais (RED - ■; GREEN - ○; BLUE - ▲).	63
Figura 40. Comparação da curva analítica em termos de absorbância de verde malaquita obtida em um espectrofotômetro (■) no comprimento de absorção máxima e em um sistema de imagem digital (○), com o filtro RED.	64

Figura 41. Comparação da curva analítica em termos de transmitância de verde malaquita obtida em um espectrofotômetro (■) no comprimento de absorção máxima e em um sistema de imagem digital (○), com o filtro RED.	65
Figura 42. Frequência de desvios entre as intensidades do branco (I_B) e do dispersor de luz (I_D) para cada cubeta.	66
Figura 43. Curvas analíticas obtidas com <i>webcam</i> no filtro RED com (A e B) e sem (C e D) correção de branco, com cubeta de acrílico (A e C) e cubeta de vidro(B e D) ; pra diferentes distâncias da fonte de luz. (■) 10 cm; (○) 20 cm; (▲) 30 cm;(▽) 40 cm.	67
Figura 44. Curvas analíticas para os filtros R (■), G (○) e B (▲) utilizando cubeta de acrílico, 10 cm de distância da fonte de radiação. (Esquerda) <i>webcam</i> com correção de branco; (Direita) sem correção do branco.	68
Figura 45. Influência da distância da fonte de luz sobre a sensibilidade da curva analítica para (esquerda) <i>webcam</i> com correção de branco e (direita) sem correção do branco – (●) vidro; (■) acrílico.	69
Figura 46. Curva analítica do método com verde malaquita em pH 4,5 para determinação de ozônio. Foi utilizado o filtro RED da <i>webcam</i> com correção de branco. Inseto: Gráfico de Resíduos.	70
Figura 47. Curva analítica com amostras de água da torneira fortificadas com volumes conhecidos de água ozonizada.	73
Figura 48. Curva analítica para o ozônio pelo método espectrofotométrico do índigo.	75
Figura 49. Curva analítica pelo método de análise por imagens digitais com o reagente índigo-trissulfonato.	76
Figura 50. Curva analítica do método com verde malaquita em pH 6,0 para determinação de hipoclorito. Foi utilizado o filtro RED da <i>webcam</i> com correção de branco. Inseto: Gráfico de Resíduos.	78
Figura 51. Curva analítica com amostras de água de torneira fortificadas com volumes conhecidos da solução estoque de hipoclorito.	81
Figura 52. Curva analítica com amostras de água de torneira fortificadas com volumes conhecidos da solução estoque de hipoclorito e EDTA 0,002 mol/L.	82

Figura 53. Curva analítica para o hipoclorito pelo método espectrofotométrico da orto-tolidina.	83
Figura 54. Curva analítica para o hipoclorito pelo método de análise por imagens digitais com a orto-tolidina.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais. .	24
Tabela 2. Condições experimentais do planejamento de experimentos baseado na Matriz de Doehlert para duas variáveis.	33
Tabela 3. Inclinações, coeficientes de determinação e desvios padrão dos resíduos para as curvas analíticas do O ₃ e ClO ⁻	57
Tabela 4. Respostas analíticas obtidas a partir do sinal analítico fornecido pela imagem digital.....	58
Tabela 5. Parâmetros estatísticos para cada cubeta (acrílico e vidro).	66
Tabela 6. Valores obtidos para absorvância absoluta do branco e com os íons concomitantes na ausência de ozônio.	72
Tabela 7. Valores obtidos para absorvância absoluta do branco, com os interferentes (Fe ³⁺ e Cu ²⁺) e com os interferentes + EDTA, na presença de ozônio.	73
Tabela 8. Comparação entre os métodos analíticos aplicados para determinação de ozônio em águas.	77
Tabela 9. Valores obtidos para absorvância absoluta do branco e com os íons concomitantes na ausência de hipoclorito.	79
Tabela 10. Valores obtidos para absorvância absoluta do branco, com os interferentes (Fe ³⁺ e Cu ²⁺) e com os interferentes + EDTA, na presença de hipoclorito.	80
Tabela 11. Comparação entre os métodos analíticos aplicados para determinação de hipoclorito.	85

RESUMO

ZAMPIER, Lorryne Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Desenvolvimento de métodos analíticos baseados na análise por imagens digitais para determinação de ozônio e hipoclorito em águas.** Orientador: André Fernando de Oliveira. Coorientadoras: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Fernanda Fernandes Heleno.

Métodos como a cloração e a ozonização têm sido usados para desinfecção da água utilizada para abastecimento doméstico. Entretanto, níveis elevados de ozônio e cloro residual são maléficos, tornando-se fundamental o monitoramento da sua concentração. Recentemente, o método de análise por imagens digitais tem sido usado para as análises quantitativas, podendo este ser utilizado como uma alternativa a espectrofotometria na região do visível. Deste modo, este trabalho propõe o desenvolvimento de métodos analíticos baseados nas análises por imagens digitais para determinação de ozônio e hipoclorito em águas. Para tal, selecionou-se o corante verde malaquita (VM) para o desenvolvimento dos métodos. Para o verde malaquita, foi realizado um estudo cinético na presença hipoclorito e a otimização das condições de reação do ozônio e hipoclorito com auxílio de um planejamento de multivariáveis baseado na Matriz de Doehlert. O método otimizado para a determinação de ozônio apresentou faixa linear de 0,58 mgO₃/L a 5,0 mgO₃/L, com sensibilidade analítica 0,0542 L/mgO₃, coeficiente de determinação de 0,9940, limite de detecção de 0,18 mgO₃/L, resolução de 0,103 mgO₃/L e coeficiente de variação $\leq 0,88\%$. O método foi validado utilizando amostras de água de torneira fortificadas em diferentes níveis de concentração, e as recuperações alcançadas foram entre 85,0 e 96,0%. O método otimizado para a determinação de hipoclorito apresentou faixa linear de 0,62 mgCl/L a 6,0 mgCl/L, com sensibilidade analítica 0,1123 L/mgCl, coeficiente de determinação de 0,9938, limite de detecção de 0,19 mgCl/L, resolução de 0,135 mgCl/L e coeficiente de variação $\leq 1,12\%$. O método foi validado utilizando amostras de água de torneira fortificadas em diferentes níveis de concentração, e as recuperações alcançadas foram entre 101,0 e 119,0%.

ABSTRACT

ZAMPIER, Lorryne Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Development of analytical methods based on digital image analysis for determination of ozone and hypochlorite in waters.** Advisor: André Fernando de Oliveira. Co-Advisors: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and Fernanda Fernandes Heleno.

Methods such as chlorination and ozonation have been used to disinfect the water used for domestic supply. However, high levels of ozone and residual chlorine are harmful, making it essential to monitor their concentration. Recently, the digital image analysis method has been used for the quantitative analyzes, which can be used as an alternative to spectrophotometry in the visible region. Thus, this work proposes the development of analytical methods based on digital image analysis for determination of ozone and hypochlorite in water. For this, the malachite green (MG) dye was selected for the development of the methods. For the malachite green, a kinetic study was carried out in the presence of hypochlorite and the optimization of the reaction conditions of ozone and hypochlorite with the aid of multivariate planning based on the Doehlert Matrix. The optimized method for the determination of ozone presented a linear range of 0.58 mgO₃/L to 5.0 mgO₃/L, with analytical sensitivity 0.0542 L/mgO₃, determination coefficient of 0.9940, detection limit of 0.18 mgO₃/L, resolution of 0.103 mgO₃/L and coefficient of variation ≤ 0.88%. The method was validated using tap water samples fortified at different concentration levels, and the recoveries achieved were between 85.0 and 96.0%. The optimized method for the determination of hypochlorite presented a linear range of 0.62 mgCl/L at 6.0 mgCl/L, with analytical sensitivity of 0.1123 L/mgCl, determination coefficient of 0.9938, detection limit of 0, 19 mgCl/L, resolution of 0.135 mgCl/L and coefficient of variation ≤ 1.12%. The method was validated using samples of tap water fortified at different concentration levels, and the recoveries reached were between 101.0 and 119.0%.

1. INTRODUÇÃO

A água é uma fonte vital para todos os seres vivos, porém pode ser considerada um veículo de doenças causadas por microrganismos, logo a qualidade da mesma torna-se essencial para a manutenção da vida humana. Quando utilizada para abastecimento doméstico deve apresentar-se isenta de microrganismos patogênicos e substâncias nocivas à saúde, apresentando características sanitárias e toxicológicas adequadas (CASALI, 2008; ARAÚJO et al., 2011).

Existem alguns métodos que são utilizados para desinfecção da água para o abastecimento doméstico, sendo a cloração um dos métodos mais utilizados. A ozonização também tem sido bastante aplicada para este fim desde o início do século XX (GURLEY, 1985).

Logo, existe um grande interesse no uso da ozonização como uma alternativa a cloração, devido ao ozônio possibilitar uma esterilização mais eficiente. Entretanto, níveis elevados de ozônio são maléficos à saúde humana. Já no método da cloração podem ser gerados alguns subprodutos, como compostos organoclorados, que são cancerígenos. Portanto torna-se fundamental o monitoramento da concentração de ozônio e cloro residual em águas (SILVA; JARDIM, 2006).

Recentemente, o método de análise por imagens digitais tem sido usado para as análises qualitativas e quantitativas, podendo este ser utilizado como uma alternativa a espectrofotometria na região do visível. Neste método, qualquer equipamento que detecte variação de intensidade da cor (*webcam*, câmera digital, câmera de celular, *scanner*, dentre outros) possibilita a realização das análises. Nestes casos, as imagens digitais obtidas são analisadas por meio de programas computacionais (OLIVEIRA, 2012).

Para garantir a desinfecção adequada e qualidade da água, a concentração de cloro residual ou ozônio deve ser monitorada. Logo já existem vários métodos que podem ser utilizados para este fim. Contudo torna-se interessante o desenvolvimento de métodos que utilizem uma instrumentação com um custo menor e que possibilite a diminuição do tamanho dos sistemas de análise a ponto da portabilidade. Com o intuito de

atingir este objetivo, este trabalho busca o desenvolvimento de métodos baseados na análise por imagens digitais para determinação de ozônio e hipoclorito em águas.

1.1. Ozônio

A descoberta do ozônio (O₃) ocorreu no ano de 1785 por Van Marum, quando este observou sua formação por meio de uma faísca de descarga elétrica em oxigênio (O₂) (CHIATTONE et al., 2008). Já no final do século XIX, na França, o ozônio começou a ser utilizado como desinfetante no tratamento de água (RICE et al., 1981; LAPOLLI et al., 2003). E no ano de 1982, foi considerado pela FDA (*Food and Drug Administration*) um produto seguro (“*General Recognized As Safe*” - GRAS) para o tratamento de garrafas de água, além de uma série de outras aplicações comerciais terem sido desenvolvidas, como a desinfecção de água de piscina e o tratamento de águas residuais (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIN, 2004). No Brasil, a ozonização como alternativa aos métodos convencionais de cloração e pré-aeração no tratamento de águas superficiais passou a ser utilizada no ano de 1983 (LAPOLLI et al., 2003).

O ozônio é um alótropo muito instável do oxigênio, além de ser um gás com um odor característico intenso. Sua massa molar é de 47,9982 g/mol e condensa-se a -111,9 °C. Esse gás é um agente oxidante forte, apresentando um potencial de redução igual a 2,07 V, sendo menos positivo apenas que o gás flúor (3,05 V). Em altas concentrações pode ser vista sua cor verde azulada. Sua solubilidade em água é baixa, com uma constante de Henry igual a 0,1 mol/(L.atm) a 25 °C (RICE et al., 1981; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; LAPOLLI et al., 2003; DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

Ao aumentar a temperatura, o gás se torna menos solúvel em água, tornando-se menos estável, o que não causa uma alteração significativa na taxa de desinfecção, mostrando que esta não é tão dependente da temperatura (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; USEPA, 1999; LAPOLLI et al., 2003; SILVEIRA, 2004). Sua decomposição é favorecida em soluções com pH elevado, que também favorece a formação de diferentes tipos de

compostos oxidantes com reatividades diferentes, como radicais livres hidroxila, que possuem um elevado poder de oxidação (LAPOLLI et al., 2003; DI BERNARDO; DANTAS, 2005). A decomposição do ozônio também pode ser acelerada pela radiação ultravioleta ou pela presença de catalisadores como metais, óxidos de metais, hidróxidos e peróxidos (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; LAPOLLI et al., 2003).

O ozônio é mais estável na fase gasosa que na fase aquosa apresentando uma meia-vida da ordem de 12 h em ar atmosférico, enquanto que em água destilada a 20 °C esse valor varia de 20 a 30 min (RICE et al., 1981; WICKRAMANAYAKE, 1991; GRAHAM, 1997; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; VIDAL, 2003; DI BERNARDO; DANTAS, 2005).

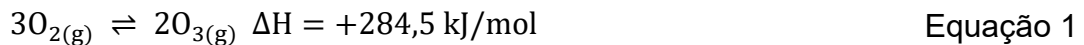
A principal atuação da molécula de ozônio é como um eletrófilo, embora também possa agir como um dipolo ou nucleófilo. Ao atuar como um eletrófilo, a reação ocorre em locais na molécula que apresentam uma alta densidade eletrônica e a algumas combinações aromáticas. Assim, o ozônio tende a reagir preferencialmente com compostos insaturados (alquenos, alquinos, anéis aromáticos, etc.) nas reações de degradação de compostos orgânicos. Por exemplo, os substituintes do anel aromático com grupos doadores de elétrons (OH, NH₂ e compostos similares) na posição orto apresentam alta densidade eletrônica e assim, são muito susceptíveis ao ataque. As moléculas aromáticas sem grupo doador de elétrons, reagem fracamente com o ozônio, sendo que o ataque inicial do ozônio acontece principalmente na posição para (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; VIDAL, 2003; GOTTSCHALK et al., 2009).

O ozônio pode reagir com compostos orgânicos por reações diretas ou indiretas, quando em solução aquosa, onde estes dois mecanismos de ação competem pelo composto a ser oxidado. Em meio ácido (pH < 4) predomina o mecanismo de reação direta, que envolve o ozônio molecular. Em valores de pH mais elevados (acima de 10), predomina o mecanismo de reação indireta, pois há um aumento na formação de radicais hidroxilas (OH•) formados pela decomposição do ozônio. Para pH em torno de 7, ambos os

mecanismos podem ocorrer (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; USEPA, 1999; VIDAL, 2003; DI BERNARDO; DANTAS, 2005; HELENO, 2013).

1.1.1. Produção de ozônio

A geração do ozônio ocorre a partir do oxigênio e pode ser descrita pela equação global (Equação 1):



É uma reação altamente endotérmica e não espontânea ($\Delta G = +161,3$ kJ/mol). Logo, como o ozônio se decompõe rapidamente quando aquecido, ele não pode ser gerado pela ativação térmica do oxigênio (VIDAL, 2003).

Para gerar o ozônio, uma molécula de oxigênio diatômico é quebrada formando oxigênio livre que reage com outras moléculas de oxigênio formando as moléculas de ozônio. Essa energia para quebra das ligações do oxigênio é elevada (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; USEPA, 1999). A produção de ozônio pode ocorrer através de métodos fotoquímico, de descarga elétrica (processo corona) e eletroquímico (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; KIM; YOUSEF; DAVE, 1999).

No método fotoquímico a geração do ozônio ocorre por meio da reação do oxigênio do ar sob a luz ultravioleta (140 a 190 nm). Ocorre de forma natural na estratosfera, podendo ser reproduzido em laboratório, mas é pouco utilizado industrialmente devido ao baixo rendimento e elevado consumo energético (LANGLAIS, 1991; VIDAL, 2003). No processo corona o ozônio é gerado através da passagem de ar ou oxigênio puro entre dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial, suficiente para formar uma corrente de elétrons através do dielétrico (ar ou oxigênio). Quando esses elétrons possuem energia suficiente para quebrar a molécula de oxigênio, colidem com a mesma, causando a dissociação do oxigênio e, por conseguinte, a formação do ozônio. Este método gera maior quantidade de ozônio com menor custo (USEPA, 1999; ALMEIDA et al., 2004). Na produção eletroquímica são gerados radicais oxigênio em uma interface sólido/líquido de um anodo, durante a eletrólise da água e difunde-se para a solução. Sua

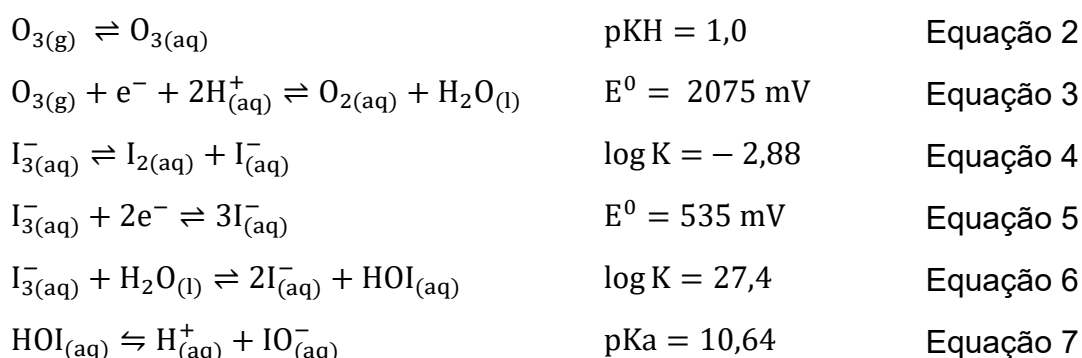
desvantagem é o custo do anodo, e o baixo rendimento energético (KIM et al., 2000; CURTI, 2011).

Como o ozônio é muito instável, é necessário que sua geração ocorra no local onde será usado (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; USEPA, 1999; LAPOLLI et al., 2003).

1.1.2. Métodos para quantificação de ozônio

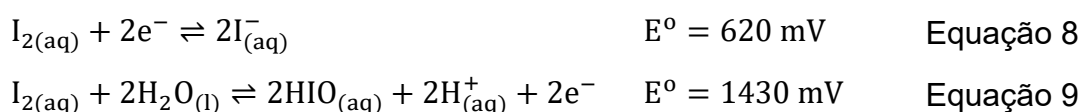
Dentre os métodos disponíveis para quantificação de ozônio gasoso e dissolvido, os mais utilizados são o método iodométrico e os métodos espectrofotométricos direto na região do ultravioleta e baseado na descoloração do índigo (HELENO, 2013).

No método iodométrico, o ozônio dissolvido em uma solução ácida com excesso de iodeto oxida os íons iodeto a triiodeto (Equações 2 a 5).



O desproporcionamento do triiodeto em ácido hipiodoso e iodeto torna a estequiometria da titulação desconhecida (Equações 6 e 7). Para minimizar esse efeito, o meio é mantido ácido (GORDON, 1995; OLIVEIRA et al., 2017).

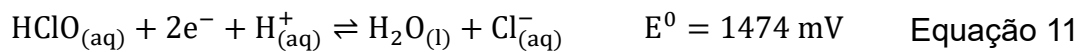
Vale a pena ressaltar que o desproporcionamento do iodo molecular é lento e pode ser descrito como a dissociação heterolítica do iodo ou pela combinação das semi-reações (Equação 8 e Equação 9).



A quantidade de triiodeto, por sua vez, é titulada com tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) formando o tetrionato ($S_4O_6^{2-}$) (Equação 10):



Devido ao baixo potencial de redução do sistema triiodeto/iodeto, outras espécies oxidantes presentes agem como interferentes neste método (USEPA, 1999). Assim, esse método não se mostra adequado para uso em águas de abastecimento público cloradas, por exemplo, devido à oxidação estequiométrica do iodeto pelo ácido hipocloroso (Equação 11).



O método espectrofotométrico direto pode ser utilizado para determinação de ozônio na forma gasosa, devido à sua absorção na região do ultravioleta, com $\lambda_{\text{máx}}$ em 258-260 nm. Em solução aquosa o método apresenta muitos interferentes nessa faixa de absorção (LANGLAIS, 1991).

O método espectrofotométrico baseado no reagente índigo-trissulfonato é recomendado pelo EPA (*Environmental Protection Agency*) e *Standard Methods* (APHA et al., 2005). Ele é baseado na oxidação do corante índigo-trissulfonato em meio ácido pelo ozônio, o que reduz a intensidade da cor azul. A absorbância é medida em 600 nm (LANGLAIS, 1991). Este método é sensível, preciso e rápido, além de ser mais seletivo para o ozônio que outros métodos para quantificação de ozônio em meio aquoso. Ainda assim, o método pode ter interferência de manganês (II), cloro e peróxido de hidrogênio. Por exemplo, a presença de cloro acima de 0,1 mgCl/L pode mascarar a concentração de ozônio (APHA et al., 2005).

1.2. Cloro residual

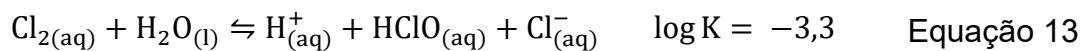
No tratamento convencional da água para consumo humano, ácido hipocloroso pode ser utilizado para a desinfecção (destruição dos microrganismos patogênicos), a oxidação (alteração das características da

água devido a oxidação dos compostos presente) ou estas duas ações ao mesmo tempo (BAZZOLI, 1993). Por motivos históricos, o sistema ácido-base de Bronsted do ácido hipocloroso é chamado de “cloro”. Logo, a formação desse sistema em solução é chamado de “cloração” (Equação 12).



Há vários produtos usados para a produção de ácido hipocloroso em solução aquosa, principalmente o gás cloro (Cl_2), hipoclorito de sódio (em solução alcalina), hipoclorito de cálcio (na forma do sólido $(\text{CaClO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e como dicloroisocianurato de sódio (na forma sólida)). Os dois últimos são principalmente utilizados em tratamento de água de piscina e os dois primeiros têm um uso mais geral (MEYER, 1994).

O gás cloro produz o ácido hipocloroso rapidamente por desproporcionamento em água (Equação 13).



Também por questões históricas, à medida que a interferência de cloraminas nos métodos para determinar “cloro” foi sendo compreendida, o sistema hipocloroso (ácido hipocloroso e hipoclorito) foi chamado de “cloro residual livre”, enquanto que, as cloraminas (NH_2Cl , NHCl_2 e NCl_3), de “cloro residual combinado”. A soma desses teores é chamada então de “cloro residual total”. As cloraminas são formadas lentamente pela ação do “cloro” sobre amônia. Em grande excesso (a partir do chamado de “*breakpoint*” da curva de cloração), o “cloro” oxida as cloraminas (MEYER, 1994).

O ácido hipocloroso é o principal agente oxidante do sistema ácido-base de Bronsted e também o principal agente desinfetante (FAIR et al., 1973). A ação desinfetante é explicada pela teoria pH-partição. O ácido hipocloroso pode atravessar a parede celular, devido a este ser neutro, por um processo de partição e então causar a oxidação de várias espécies químicas no interior da bactéria (OLIVEIRA, 2009).

A taxa da desinfecção pode ser descrita de acordo com a Equação 14 (MORRIS,1973):

$$-\log(c(\text{HClO})) = (3,6 + \log \alpha_o) + 1,05 \log t \quad \text{Equação 14}$$

onde $c(\text{HClO})$ é a concentração analítica (ou total, ou teor de cloro residual livre), t é o tempo necessário para inativar 99,9% de *Escherichia coli* e α_o é a fração de equilíbrio de ácido hipocloroso (Equação 15), onde:

$$\alpha_o = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pKa}}} \quad \text{Equação 15}$$

Com o aumento do pH há uma diminuição na reatividade do ácido hipocloroso, como pode ser visto pelo seu diagrama de distribuição de espécies (na forma linear ou logarítmica) (Figura 1) e com a elevação da temperatura a velocidade de reação aumenta (MEYER, 1994).

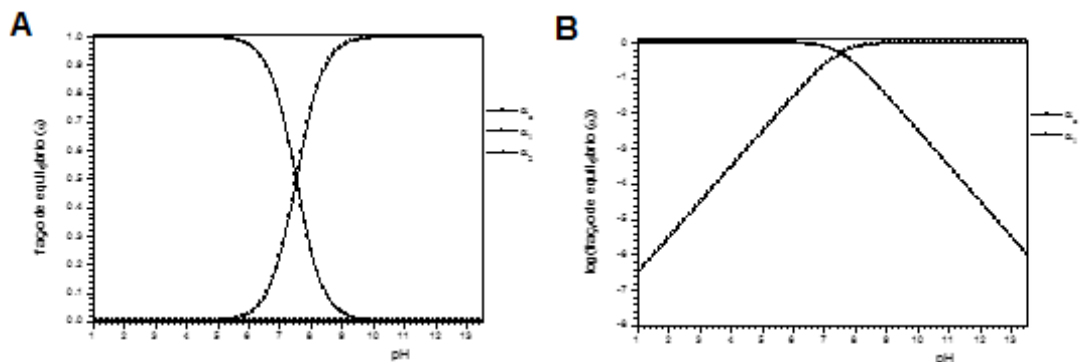


Figura 1. Diagrama de distribuição de espécies do sistema ácido-base de Bronsted do ácido hipocloroso (A) escala linear; (B) escala logarítmica.

O cloro residual livre presente na água pode contaminá-la ao reagir com as substâncias orgânicas presentes, formando os trihalometanos, ou outros compostos halogenados tais como ácidos haloacéticos, haloaldeídos, halocetonas, halofenóis e halopicrinas, que são nocivos (DI BERNARDO; DI BERNARDO; CENTURIONE FILLHO, 2002; PASCHOALATO et al., 2008). A diferença entre os contaminantes químicos e os de caráter infeccioso se deve ao fato dos primeiros serem prejudiciais à saúde do homem devido a

exposição prolongada, sendo alvo de preocupação os metais pesados e agentes cancerígenos, pois apresentam propriedades tóxicas cumulativas. Logo, a toxicidade dessas espécies químicas varia de acordo com a sua concentração na água, tempo de exposição e suscetibilidade individual (FUNASA, 1999).

1.2.1. Métodos para quantificação de cloro residual

Existem vários métodos para a determinação de cloro residual, sendo os mais comuns aqueles com o-tolidina, com DPD (N,N-dietil-p-fenilendiamina), o método iodométrico, dentre outros. O uso do primeiro tem sido diminuído devido à característica carcinogênica (SOARES et al., 2016).

O método iodométrico com detecção visual com amido é adequado para concentração de cloro residual total acima de 1,0 mgCl/L. Já a titulação amperométrica, embora seja mais precisa, exige maiores cuidados, entre eles, grande habilidade do operador e um controle rígido do pH. Por exemplo, para a determinação do cloro residual livre, o pH deve estar entre 6,5 e 7,5. (APHA et al., 2005).

No método espectrofotométrico do DPD, a espécie reduzida incolor é oxidada pelo cloro residual livre, formando uma espécie química com elevada absorvidade molar. Devido à estabilidade da cor e largura da banda de absorção, a determinação pode ser realizada com disco colorimétrico (comparação da cor da solução com disco de cores) ou com clorímetro digital (usualmente um sistema formado por um LED e um fotodiodo) (HELBLING; VANBRIESEN, 2007). Este método apresenta desvantagens principalmente devido aos interferentes, como espécies cloradas, manganês (II) e altas concentrações de clorito. Nos processos colorimétricos, a cor e turbidez podem causar interferência, sendo necessário compensar através de uma amostra de branco (APHA et al., 2005).

1.3. Verde malaquita

O verde malaquita (VM) é corante orgânico catiônico da família dos trifenilmetanos, sendo sua nomenclatura pela IUPAC 4-[(4-dimetilaminofenil)-

fenil-metil]-N,N-dimetilanilina. É utilizado como corante na indústria têxtil, e também é bastante usado como microbiocida em sistemas de piscicultura, sendo usado em baixas concentrações (0,27 $\mu\text{mol/L}$) desde o início da década de 1930 (HASHIMOTO et al., 2011; BILANDZIC et al., 2012; CHEN et al., 2013; XIE et al., 2013; MIRZAJANI; AHMADI, 2015). A estrutura química do verde malaquita é apresentada na Figura 2.

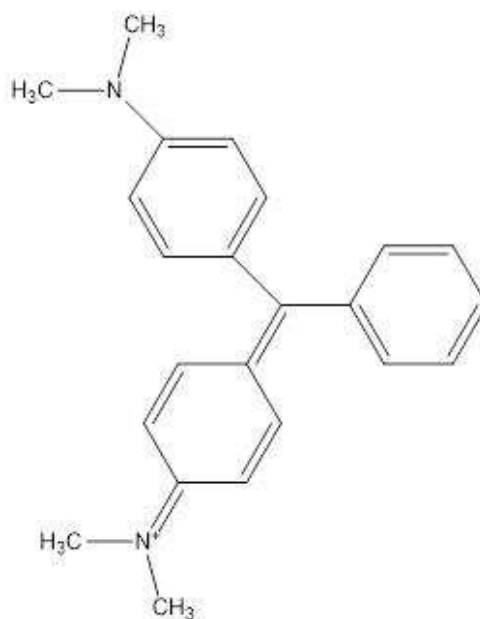


Figura 2. Estrutura química do verde malaquita.

O corante tem comportamento ácido base monoprótico de Bronsted, sendo seu pK_a estimado entre 3,7 e 4,8 (ACD, 2016). As soluções de verde malaquita são amarelas em valores de pH inferiores a 1, verdes para valores de pH entre 2 e 12, e incolor para valores pH superior a 12. Em soluções com pH elevados, é hidrolisado rapidamente com a formação de um carbinol incolor (Figura 3) (GUENFOUD; MOKHTARI; AKROUT, 2014).

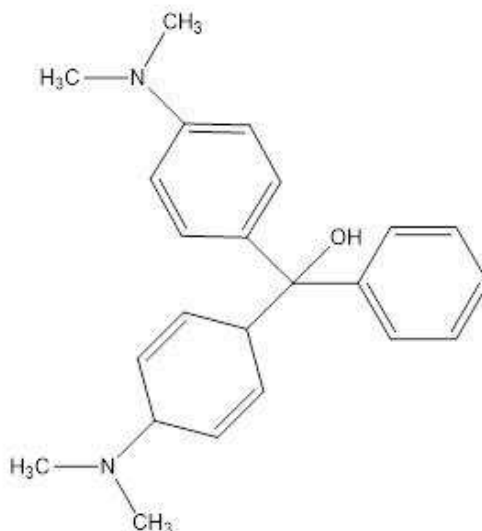


Figura 3. Estrutura química do carbinol do verde malaquita.

1.4. Método de análise por imagens digitais

1.4.1. Lei de Beer-Lambert-Bouguer

A lei de Beer-Lambert-Bouguer relaciona a razão entre a intensidade (potência radiante) da luz transmitida e a incidida sobre um espaço (caminho óptico, b) de uma solução contendo uma espécie absorvente i de acordo com a Equação 16 (SKOOG et al., 2006).

$$A_{\lambda,i} = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon_{\lambda,i} \cdot b \cdot [i] \quad \text{Equação 16}$$

onde A é a absorvância no comprimento de onda da luz incidida, ϵ a absorvância molar da espécie i , que é uma grandeza característica da espécie absorvente naquele comprimento de onda, I é a intensidade da radiação transmitida e I_0 é a intensidade da luz incidida.

Para o uso analítico da Lei de Beer-Lambert-Bouguer, deve-se considerar tanto a aditividade da absorvância quanto a relação entre a concentração no equilíbrio da espécie absorvente e a concentração analítica do analito (Equação 17) (SKOOG et al., 2006).

$$A_{\lambda} = B + S c$$

Equação 17

onde B é o branco, que considera a absorção de todas as espécies químicas cuja concentração seja constante no meio ou espalhamento de luz constante; S , a sensibilidade analítica, que é função da absorvidade molar das espécies absorventes, e de fatores que relacionam-nas com o analito.

1.4.2. Espectro de absorção na região do visível

A região ultravioleta e visível é útil do ponto de vista analítico, por exemplo, para determinações espectrofotométricas, onde a região do ultravioleta (próximo), definida operacionalmente, está entre 190 nm a cerca de 400 nm, enquanto que a região do visível, entre cerca de 400 nm até 700-800 nm. Logo, essa definição operacional está associada às regiões exploradas por espectrofotômetros. Tais regiões também podem ser definidas sob o ponto de vista da visão. Nesse caso a região do visível pode ser considerada de 380-400 nm até 700-780 nm (TORNQUIST, 2008).

1.4.3. Sinais digitais

Devido ao grande avanço tecnológico dos últimos 50 anos, pode-se considerar que qualquer instrumento moderno envolve a conversão de sinal elétrico analógico em sinal digital.

Um sinal analógico é aquele que pode assumir qualquer valor, ou seja, é contínuo, como comprimentos, massa, concentrações, etc. Em tese, pode-se obter diferenças cada vez menores entre dois valores de medição (SKOOG et al., 2006).

O sinal digital, por outro lado, é quantizado, ou seja, pode assumir apenas dois valores (0 e 1) e pode ser “manipulado” através da matemática booleana. Um nível de tensão alto (por exemplo, 5 V) e outro igual zero permite identificar os dois sinais (os spins de um elétron, por exemplo, também atuam de maneira binária, mas ainda não é possível usá-los para fins eletrônicos/computacionais). A grande vantagem do uso do sinal digital, além daquelas devido à matemática booleana que permite o desenvolvimento do computador, está associada ao ponto de vista instrumental, pois o nível alto

não precisa ser exatamente 5V, mas um valor razoável que permita distingui-lo do 'zero' Volt (SKOOG et al., 2006).

A unidade de sinal digital é o *bit*. Logo, um *bit* pode adquirir o valor de 0 ou 1. Uma "palavra" em sinal digital é um conjunto de 8 *bits* (um *byte*) e a expressão de valores em *bits* ou *bytes*, em ordem é chamado de notação binária, como por exemplo 01001001 ou 10100010, que representam os números 73 e 162, respectivamente. Para converter um número inteiro (N) em notação binária, utiliza-se uma série de potência de 2, como mostra a Equação 18 (SKOOG et al., 2006).

$$N = b_0 \cdot 2^0 + b_1 \cdot 2^1 + b_2 \cdot 2^2 + \dots + b_{n-1} \cdot 2^{n-1} \quad \text{Equação 18}$$

onde b_i é o valor do *bit* (0 ou 1).

O valor de n representa o número máximo de *bits* que uma expressão binária pode conter e ele representa no máximo 2^n números inteiros (SKOOG et al., 2006). Por razões eletrônicas, estes números acabam sendo pré-definidos. Valores como 8 *bits* (1 *byte*) foi um valor muito usual no início da computação. Nos dias atuais, esse número pode ser mais elevado.

Do ponto de vista de instrumentação analítica, o tamanho da expressão binária (valor de n) define o número máximo de divisões que uma medida pode ter. Por exemplo, uma palavra de 8 *bits* pode expressar valores inteiros entre 0 e 255 ($2^8 - 256$ medidas). Assim, se um equipamento mede o sinal de um sensor variando de -1 V a 1 V, e esse sinal for convertido para uma palavra de 8 *bits*, então, essa faixa de voltagem será dividida em 256 partes e a resolução desse sinal digital (1 *bit*) será equivalente a 7,8 mV. Se a diferença de sinal for inferior à metade desse valor, o instrumento não registrará essa diferença (SKOOG et al., 2006).

O nome do componente eletrônico que faz a conversão de um sinal elétrico (analógico) em digital é chamado de Conversor Analógico Digital (ADC) (SKOOG et al., 2006). Por muitos anos, os instrumentos simples continham um ADC de 8 *bit*. Atualmente é muito comum o uso de ADC de 10 *bit* (1064 divisões), 12 *bit* (4096 divisões), 14 *bit* (16384), etc. E, portanto, uma melhor resolução dos sinais.

1.4.4. Comparação de espectrofotômetro e dispositivo de captura de imagens

A espectrofotometria se baseia na medida da luz (na região do ultravioleta e/ou visível) que é absorvida por uma espécie química (EWING, 1972).

Os componentes básicos de um espectrofotômetro são:

- Uma fonte que emite radiação, que pode ser monocromática (Laser ou LED, por exemplo) ou policromática (lâmpada de filamento de tungstênio, de arco de deutério, etc.);
- Um monocromador (se a fonte não for monocromática o suficiente), que seleciona uma banda estreita de comprimentos de onda, podendo ser filtros (simples ou de interferência), prismas ou rede de difração;
- Compartimento para posicionamento da amostra, que pode vir antes ou depois do monocromador;
- Detector, responsável pela conversão da luz transmitida através da solução em sinal elétrico (analógico);
- Sistema para tratamento do sinal elétrico, incluindo, atualmente, um ADC (Conversor Analógico Digital), usualmente com 10 *bit* ou mais;
- E a apresentação dos resultados, seja em um display ou em um computador.

Os dispositivos de captura de imagens são semelhantes aos espectrofotômetros no que diz respeito às suas partes principais. Mas como o uso é distinto, há algumas diferenças importantes. Como o principal objetivo de um dispositivo de captura de imagem visa construir uma imagem com a melhor definição possível, o interesse é o maior número possível de detectores, de maneira que, cada detector represente um ponto no desenho. A ideia é muito similar ao movimento artístico pontilhismo (ou à tatuagem). No pontilhismo, a figura é formada por inúmeros pontos não ligados e com intensidades diferentes (ou cores distintas) (Figura 4). Se o número de pontos for muito elevado, têm-se a impressão de um traço contínuo (os pontos devem ser menores que o “círculo de confusão”, ou seja, o limite de diâmetro do ponto que o ser humano consegue distinguir uma dada distância) (SKOOG et al., 2006).

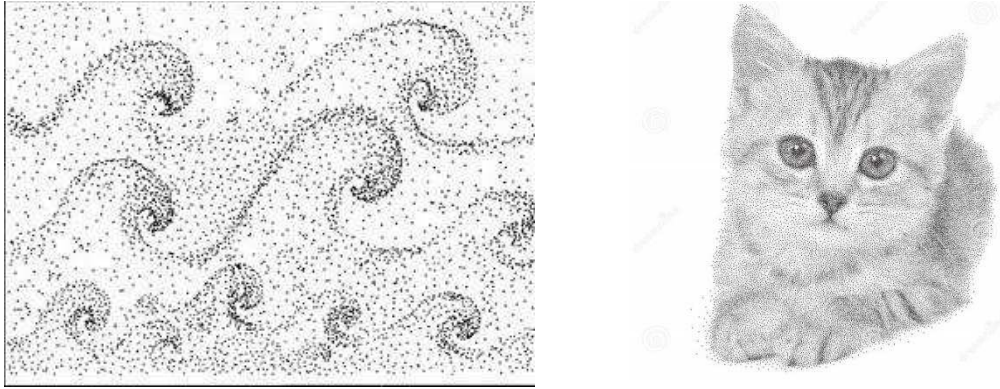


Figura 4. Exemplos de figuras baseadas no pontilhismo. O conceito para a formação da imagem é similar ao dos dispositivos de captura de imagem. (COSTA, 2017).

Embora um dispositivo de captura de imagens possa ter alguns milhões de detectores (chamados então de pixel (*picture element*), ou seja, cada ponto da imagem construída no dispositivo, de tamanho muito pequeno), que compõem um sensor, cada dispositivo se comporta como um detector de espectrofotômetro. A capacidade de representar uma imagem com exatidão é chamada de resolução da imagem e esta aumenta com a densidade de pixels na imagem, expressos em *dpi* (pontos por polegada). Além disso, quanto maior um visor ou um sensor, maior o número de pixels (independente da sua densidade) (GOMES et al., 2008; SANTOS, 2013).

Esses detectores têm uma resolução de 8 *bit*, ou seja, a intensidade máxima da luz captada e convertida em sinal elétrico será dividida em 256 níveis.

1.4.5. Sensação de cor

O olho humano é composto por uma grande quantidade de células nervosas capazes de captar a luz (milhões), sendo chamados de cones e bastonetes. Analogamente ao espectrofotômetro, estas células seriam detectores. Os cones são capazes de distinguir três grandes regiões do espectro visível da luz incidente. Essa capacidade de distinguir partes do espectro visível da luz seria a mesma função realizada pelo monocromador do espectrofotômetro (um monocromador pouco eficiente em resolver

comprimentos de onda). Os bastonetes, não têm essa capacidade de distinguir essas regiões, mas são muito sensíveis, permitindo ao olho captar intensidades de luz muito baixas. Mantendo a analogia, são detectores com baixo limite de detecção. As três regiões que os cones distinguem criam a sensação do azul, verde e vermelho e partir das combinações de intensidade dessas cores, cria-se no cérebro toda gama de cores (LEÃO, 2005; BERTOLINI, 2010).

Em relação ao espectro visível deve-se observar que o olho humano “enxerga” um feixe de luz monocromática em 410 nm como azul (ou violeta), mas isso não significa que toda cor violeta criada no cérebro é devido a essa radiação ou mesmo alguma próxima dessa. A combinação das “cores fundamentais” distinguidas pelos cones também pode gerar a sensação de azul, violeta, etc. (SHAPLEY; HAWKEN, 2002). Lembrando que uma luz policromática balanceada tem a sensação de branco, enquanto que a ausência de luz nos cones e bastonetes cria a sensação do preto. Assim, é usual apresentar o espectro na região do visível como na Figura 5.

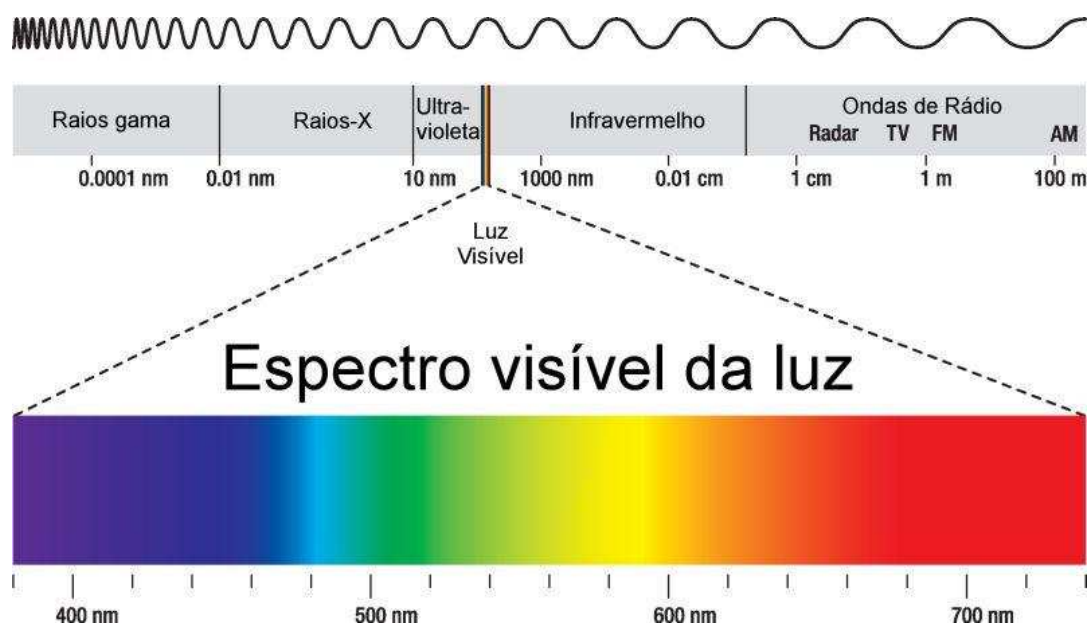


Figura 5. Espectro na região do visível (THOMAS, 2017).

Além disso, uma vez que parte de uma radiação monocromática pode ser absorvida por um corpo (solução, tinta, etc.), se for incidida uma luz policromática, a radiação absorvida não chegará aos cones, mas as outras

radiações sim. Tem-se, portanto o conceito de cor complementar, onde por exemplo, se o olho humano “enxerga” através de um filtro azul, significa que radiações que dão a sensação de azul estão chegando a esse olho, enquanto que um conjunto de radiações estão sendo absorvidas pelo filtro (total ou parcialmente) (SHAPLEY; HAWKEN, 2002; LEÃO, 2005; TORNQUIST, 2008; BERTOLINI, 2010).

Do ponto de vista analítico, a sensação de cor não tem nenhuma importância prática.

1.4.6. A cor em dispositivos de imagem

Os detectores dos dispositivos de imagem não distinguem comprimentos de onda, detectando inclusive radiações no infravermelho (assim como aqueles de espectrofotômetros), e cada tipo de detector tem um espectro de sensibilidade. Para criar a sensação de cor, são colocados filtros simples coloridos, que mimetizam o comportamento dos cones dos olhos e dessa maneira, criam a “sensação de cor” do pixel através da medida da intensidade de luz em cada filtro. A intensidade de luz máxima de cada filtro, é dividida em 256 níveis (para um ADC de 8 *bit*) (BRAINARD, WILLIAMS, HOFER, 2008; CONWAY, 2009). Essa estratégia é similar àquela para obter vídeos coloridos, como televisão tipo LED, etc. (Figura 6).

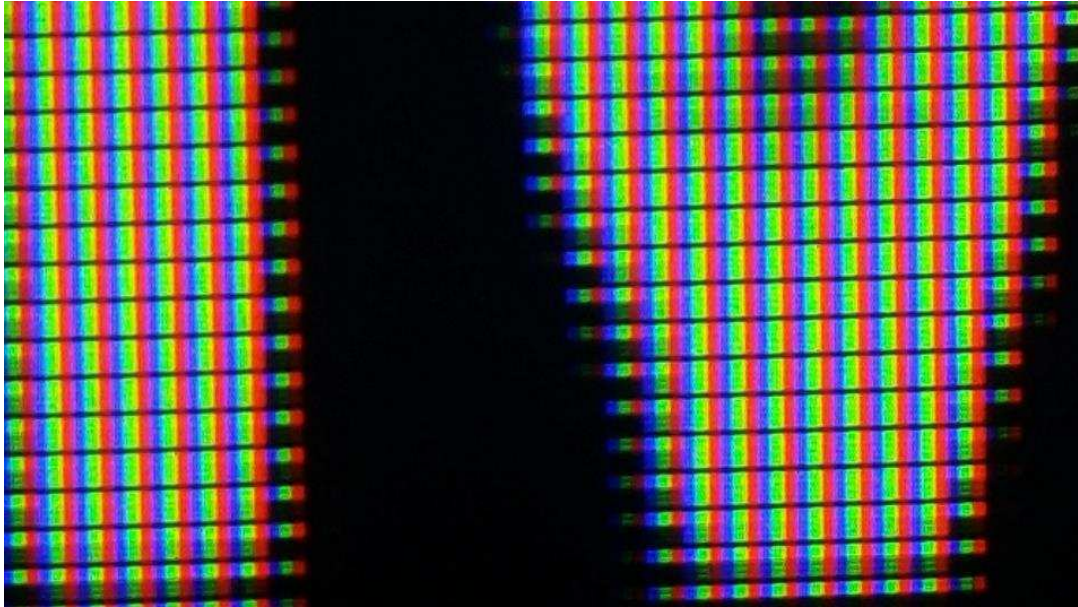


Figura 6. Ampliação da uma pequena área de televisão de LED onde pode-se ver os filtros coloridos que forma cada pixel (similar ao detector dos dispositivos de captura de imagem) e os pixels formando partes de duas letras.

1.4.7. Modelos e espaço de cor

Para que a comunicação entre as cores ficasse mais fácil e precisa, foram criados os modelos de cor, que são métodos e fórmulas muito complexas para quantificar a cor e representá-la de forma numérica. Eles têm por objetivo explicar as propriedades ou o comportamento das cores, descrevendo suas diferentes características e a sua percepção pelo ser humano. Alguns exemplos desses modelos, são o RGB (*red, green and blue*), CMYK (ciano, magenta, amarelo e preto), HSV (matiz, saturação, valor – escalas de cinza), HSL (matiz, saturação, luminosidade) (MINOLTA, 2007; BERTOLINI, 2010).

A comissão internacional de iluminação (CIE-*Commision internationale de l'Éclairage*) criou um modelo matemático chamado CIE-XYZ que utilizava as cores primárias vermelha, verde e azul, no ano de 1931. A combinação dessas três cores permite representar todas as outras cores do espectro visível, como mostra a Figura 7. Ele foi criado devido a não existir um conjunto de valores finitos para expressar as possíveis cores visíveis, possibilitando

medidas quantitativas das cores e sua representação numérica. Sendo assim, por meio desse modelo foi possível obter os outros modelos de cor conhecidos (SANTOS, 2013; CAPITÁN-VALLVEY et al., 2015).

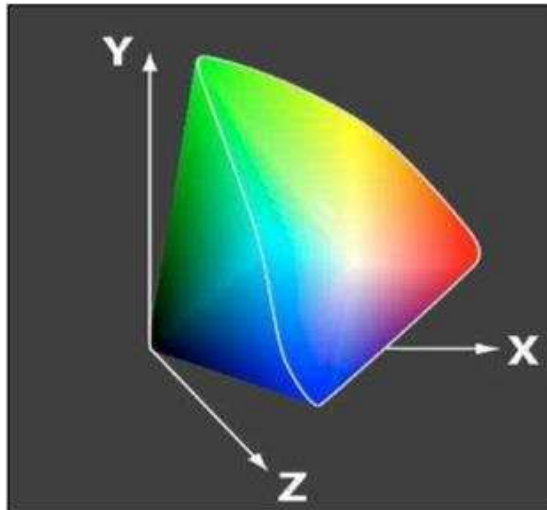


Figura 7. Representação do modelo de cor CIE-XYZ (BERTOLINI, 2010).

Para representar o modelo de cor RGB utiliza-se um cubo em coordenadas cartesianas. Neste cubo, cada eixo corresponde a uma das três cores primárias (vermelha, verde e azul), assumindo valores finitos que variam de zero (0) a um (1), como mostra a Figura 8. A intensidade máxima de cada cor corresponde ao valor um (1) e a intensidade mínima corresponde ao valor zero (0). Cada pixel é registrado como uma cor que corresponde à combinação dos valores das três cores primárias (componentes), em que cada componente do sistema RGB pode assumir 256 níveis de intensidade. Assim, o valor de cada componente primária pode ser medida de 0 a 255, onde 0 é a intensidade mínima da cor (preto) e 255 é a intensidade máxima (branco). Os valores intermediários correspondem as várias tonalidades de cada cor (SANTOS, 2013).

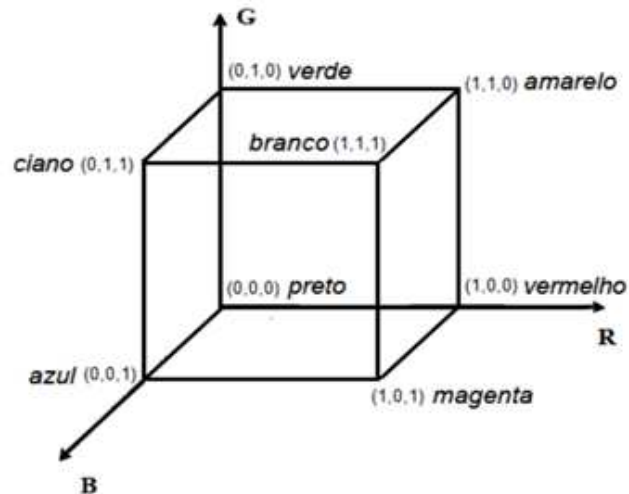


Figura 8. Representação do modelo RGB (SANTOS, 2013).

A representação geométrica e tridimensional em que as cores podem ser visualizadas a partir de um modelo de cor é chamada de espaço de cor. Logo, os modelos de cor produzem cores dentro do seu próprio espaço e alguns modelos podem representar mais cores que outros (LEITE, 2006). Na Figura 9 estão apresentados os espaços de cor dos modelos RGB e CMYK.

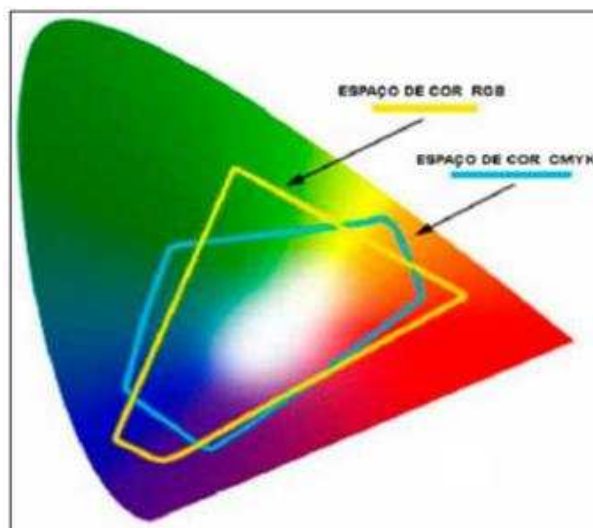


Figura 9. Representação de um espaço de cor e diferenças entre os espaços de cor dos modelos RGB e CMYK (LEITE, 2006).

1.4.8. Procedimentos analíticos empregando análises por imagens digitais

Recentemente há uma busca pela portabilidade dos sistemas de análises espectrofotométricas, o que permite análises *in situ* e a obtenção de dados em tempo real (STEIMLE et al., 2002). Porém, os sistemas espectrofotométricos com tamanho reduzido e com boa precisão apresentam um custo elevado. Como uma alternativa para estes sistemas, surge o método de análise por imagens digitais, que utiliza dispositivos de capturas de imagens nas análises (KOMPANY-ZAREH et al., 2002; WONGWILAI et al., 2010).

Nos métodos baseados em imagens digitais, as respostas analíticas são adquiridas a partir da intensidade de cada filtro colorido em uma região da imagem, utilizando *softwares* para coletar essas informações (MALEKI et al., 2004; GAIAO et al., 2006; LYRA et al., 2009; LOPEZ-MOLINERO et al., 2010). Estes métodos têm se tornado bastante interessantes do ponto de vista analítico, devido a possibilidade de desenvolver procedimentos quantitativos em microescala para determinação simultânea de várias espécies de interesse (SOLDAT et al., 2009).

1.4.9. Softwares para tratamento de imagens

No mercado existe vários *softwares* para análise de imagens digitais, sendo muitos deles comerciais e com custo elevado, como o *Adobe Photoshop*. Esses *softwares* podem ser utilizados para tratamento de imagem, entretanto, são desenvolvidos com outra finalidade que não a coleta de informações puras de RGB. Dentre os *softwares* livres (gratuitos) que fornecem essa informação, ainda que não dedicado ou otimizado para química analítica, está o *image J*, que é escrito em Java e possui código fonte aberto, o que possibilita a criação de *plugins* de acordo com as necessidades do usuário. Nele estão disponíveis várias ferramentas de processamento e análise de imagens, como ajuste de brilho e contraste, segmentação e

análise, medição de distâncias e ângulos, entre outras (DIAS, 2008; RASBAND, 2016).

Para este trabalho, foi desenvolvido um *software* dedicado exclusivamente para a química analítica. Ele foi chamado de *RGBcam* e foi desenvolvido por Sérgio Olívio da IBM - Brasil (*International Business Machines*). Neste *software* é possível realizar a leitura dos filtros RGB em quatro regiões diferentes da imagem, em tempo real, sendo possível a captura manual ou automática das informações a serem analisadas. Para o tratamento dos dados obtidos, estes são exportados para *softwares* como *Microsoft Excel* ou *OriginLab Origin*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver métodos analíticos baseados na análise por imagens digitais para determinação de ozônio e hipoclorito em águas.

2.2. Objetivos específicos

- Selecionar um reagente adequado para as reações envolvendo alteração de cor com o ozônio e o hipoclorito;
- Otimizar as melhores condições da reação do ozônio e do hipoclorito com o reagente escolhido;
- Aplicar o método para determinação de ozônio por imagens digitais com o reagente escolhido e validá-lo;
- Aplicar o método para determinação de hipoclorito por imagens digitais com o reagente escolhido e validá-lo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados nesse trabalho estão listados na Tabela 1. Todos os reagentes utilizados são P.A.

Tabela 1. Reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais.

Reagente	Fórmula	CAS	Marca
Acetato de Sódio	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	6131-90-40	Merck
Ácido bórico	H_3BO_3	10043-35-3	Vetec
Ácido clorídrico	HCl	7647-01-0	Vetec
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6381-92-6	Vetec
Ácido fosfórico	H_3PO_4	7664-38-2	Vetec
Ácido Sulfúrico	H_2SO_4	7664-93-9	Vetec
Água sanitária comercial	NaClO	7681-52-9	Super globo
Amido solúvel	$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$	9005-84-9	Vetec
Carbonato de sódio	Na_2CO_3	497-19-8	Impex
Cloreto férrico	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10025-77-1	Vetec
Cloreto de sódio	NaCl	7647-14-5	Cinética
Dicromato de potássio	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	7778-50-9	Vetec
DPD em mistura tampão	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2$	93-05-0	Del lab
Dihidrogenofosfato de sódio	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	7558-80-7	Synth
Hidróxido de sódio	NaOH	1310-73-2	Vetec
Índigo trissulfonato de potássio	$\text{C}_{16}\text{H}_7\text{K}_3\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}_3$	67627-18-3	Sigma Aldrich

Iodeto de potássio	KI	7681-11-0	Vetec
Sulfato cúprico	CuSO ₄ .5H ₂ O	7758-99-8	Neon
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	10034-96-5	Reagen
Tiosulfato de sódio	Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	10102-17-7	Vetec
Orto-tolidina	CH ₃ C ₆ H ₄ NH ₂	95-53-4	Hidroazul
Verde malaquita	C ₂₃ H ₂₅ ClN ₂	569-64-2	Sigma Aldrich

3.2. Soluções

Todas soluções foram preparadas em água tipo 1 (MiliQ® Reference A+).

Foram preparadas soluções de K₂Cr₂O₇ 0,01 e 0,001 mol/L, soluções de KI 1, 2 e 5% (m/v) (10, 20 e 50 g/L), solução de H₂SO₄ 0,5 mol/L, solução de HCl 1:1 (6,0 mol/L), solução de Na₂S₂O₃ 0,1 e 0,01 mol/L e uma suspensão de amido 1% (10 g/L).

Preparou-se uma solução estoque de índigo (0,01 mol/L), e a partir da diluição da solução estoque preparou-se uma solução de índigo II (0,0001 mol/L). Estas foram preparadas de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA et al., 2005).

A solução estoque de verde malaquita (VM) 1000 µmol/L foi preparada pela dissolução de 0,3649 mg de verde malaquita (364,9 g/mol), e o volume completado para 1 litro com água tipo 1.

A solução de hipoclorito de 354,0 mgCl/L foi preparada a partir da diluição de água sanitária comercial 2% (m/v). Esta solução foi padronizada por iodometria.

Soluções tampão fosfato (pH 3,0; 6,0; 7,5), acetato (pH 4,5) e ácido bórico (pH 9,0) foram preparadas a partir de NaH₂PO₄ (137,99 g/mol), CH₃COONa (136,08 g/mol) e H₃BO₃ (61,83 g/mol) ajustando-se o pH com solução de HCl e NaOH (1,0 mol/L) com o auxílio de um pHmetro (pH 21, HANNA, Brasil), de acordo com a necessidade.

Foram preparadas soluções de Fe^{3+} , Cu^{2+} , CO_3^{2-} , Mn^{2+} , Cl^- na concentração de 1,0 mmol/L a partir de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (270,30 g/mol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (249,69 g/mol), Na_2CO_3 (105,99 g/mol), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (169,01 g/mol) e NaCl (58,44 g/mol), respectivamente. Também foi preparada uma solução de EDTA 0,002 mol/L.

3.3. Padronização da solução de tiosulfato de sódio

Para padronizar as soluções de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 e 0,01 mol/L, utilizou-se solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,01 e 0,001 mol/L, respectivamente. O $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ utilizado foi previamente seco, por 3 h, em estufa.

Adicionou-se 10,0 mL da solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 10,0 mL da solução de HCl 6,0 mol/L e 5,0 mL da solução de KI 5% (m/v) em um erlenmeyer de 125,0 mL, esta solução apresentou coloração marrom. Titulou-se com a solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a ser padronizada na presença de suspensão de amido 1% (m/v). A concentração real da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ foi calculada pela Equação 19 (APHA et al., 2005):

$$C_{\text{tio}} = 6 \frac{V_{\text{dic}} C_{\text{dic}}}{V_{\text{tio}}} \quad \text{Equação 19}$$

em que C_{tio} (em mol/L) é a concentração real da solução de tiosulfato, V_{dic} é o volume de dicromato (em mL), C_{dic} é a concentração de dicromato (em mol/L) e V_{tio} é o volume de tiosulfato (em mL) gasto na titulação.

O fator de correção da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ foi calculado de acordo com a Equação 20.

$$f_c = \frac{C_{\text{real}}}{C_{\text{Nominal}}} \quad \text{Equação 20}$$

em que f_c é o fator de correção da solução de tiosulfato, C_{real} é a concentração real encontrada para a solução de tiosulfato (em mol/L) e C_{Nominal} é a concentração de tiosulfato que deveria ser encontrada (em mol/L).

3.4. Produção do ozônio

Para a produção do ozônio foi utilizado um gerador de ozônio (O&L3.ORM, Ozone & Life, Brasil) (Figura 10), utilizando gás oxigênio isento de umidade obtido a partir de ar atmosférico em concentrador de oxigênio (OxxiSul, Mark 5 Plus, Ozonebras, Brasil).



Figura 10. Gerador de ozônio utilizado no trabalho.

3.4.1. Ozonização da água

A água foi ozonizada até uma concentração de aproximadamente 6,0 mgO₃/L. Para atingir esta concentração primeiramente mediu-se a concentração de gás ozônio produzido, através da titulação iodométrica. Visto que o gás é parcialmente solúvel na água, foi possível obter uma estimativa de qual seria a concentração necessária de gás ozônio para atingir determinada concentração de ozônio na água.

Após a quantificação do gás ozônio, o fluxo de gás foi conduzido a um compartimento (frasco lavador, 500,0 mL) contendo água tipo 1, a 20 °C, como é mostrado na Figura 11. A água foi ozonizada por no mínimo 30 min até estabilização da concentração de ozônio na água. As amostras de água ozonizada em concentrações abaixo de 6,0 mgO₃/L foram obtidas a partir da diluição da amostra de maior concentração. Para realizar estas diluições,

utilizou-se um tipo de água “pré-ozonizada”, que foi preparada através da condução do fluxo de gás ao compartimento (frasco lavador, 500,0 mL) contendo água tipo 1. A água foi ozonizada por no mínimo 30 min até estabilização da concentração de ozônio na água. Logo após, esta foi armazenada em um recipiente adequado, em um local refrigerado para que pudesse ser utilizada posteriormente para as diluições. A “pré-ozonização” da água foi realizada, para que aquela utilizada nas diluições estivesse isenta de oxigênio, que poderia causar alguma interferência.



Figura 11. Frasco lavador de gases usado como compartimento para ozonização da água.

3.5. Quantificação de ozônio

3.5.1. Quantificação de ozônio gasoso

A concentração do gás ozônio produzido foi medida por meio do método iodométrico, onde foi necessário conduzir um fluxo do gás e borbulhar o mesmo em um erlenmeyer de 125,0 mL contendo 50,0 mL de uma solução de KI 2% (m/v), sendo esta solução logo em seguida acidificada com 2,5 mL de H₂SO₄ 0,5 mol/L, por 30 s. Titulou-se com solução de Na₂S₂O₃ 0,01 mol/L na presença de suspensão de amido 1% (m/v) (APHA et al., 2005).

A concentração de ozônio no gás foi calculada a partir da quantidade de tiosulfato consumido na titulação (Equação 21).

$$m_O = 0,5 \cdot C_{tio} \cdot f \cdot V_{tio} \cdot FW_{O_3} \quad \text{Equação 21}$$

em que, m_O é a massa do ozônio (em *mg*) determinada pelo método, C_{tio} é a concentração nominal (em *mol/L*) de tiosulfato, f é o fator de correção do tiosulfato, V_{tio} é o volume de viragem na titulação (em *mL*) e FW_{O_3} é a massa molar do ozônio (em *g/mol*).

A concentração do ozônio (em *mgO₃/L*) foi calculada a partir da massa de ozônio obtida por meio da Equação 22.

$$C_O(\text{mg/L}) = \frac{m_O}{\phi t} \quad \text{Equação 22}$$

em que, C_O é a concentração de ozônio (em *mgO₃/L*), m_O é a massa de ozônio (em *mg*), ϕ , é o fluxo de ozônio (em *L/s*) e t é o tempo de borbulhamento (em segundos).

3.5.2. Quantificação de ozônio aquoso

De acordo com a literatura, o método iodométrico também pode ser utilizado para quantificação de ozônio na água. Logo, não se encontra a descrição das etapas deste procedimento analítico (GORDON, 1995). Para quantificar o ozônio aquoso foi feita uma adaptação ao método iodométrico para determinar a concentração do gás ozônio que é produzido pelo gerador. Neste processo, ao invés de borbulhar o gás, foram adicionados 100,0 mL da amostra de água ozonizada em um erlenmeyer de 125,0 mL contendo 50,0 mL da solução de KI 2% (m/v) e todo o procedimento subsequente foi igual ao método descrito anteriormente.

A massa de ozônio foi calculada a partir da quantidade de tiosulfato consumido na titulação (Equação 21).

A concentração do ozônio (*mgO₃/L*) foi calculada a partir da massa de ozônio obtida através da Equação 23.

$$C_O(\text{mg/L}) = \frac{m_O}{V} \cdot 10^3 \quad \text{Equação 23}$$

em que C_O é a concentração de ozônio (em mgO_3/L), m_O é a massa de ozônio (em mg) e V é o volume da amostra de água ozonizada adicionada (em mL).

3.6. Padronização das soluções de hipoclorito

3.6.1. Padronização da solução de hipoclorito comercial

A padronização da solução de hipoclorito comercial foi realizada por meio do método iodométrico, em que adicionou-se 1,0 mL da amostra em um balão volumétrico de 100,0 mL completando-se o volume com água tipo 1. Em seguida transferiu-se 10,0 mL da solução anterior para um erlenmeyer de 125,0 mL, adicionando-se 5,0 mL de HCl 6,0 mol/L e 2,0 mL KI 5% (m/v). Logo após, titulou-se com solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/L na presença de suspensão de amido 1% (m/v) (APHA et al., 2005).

A concentração analítica de hipoclorito na solução comercial, expressa em porcentagem de cloro, foi calculada a partir do volume de tiosulfato (em mL) de acordo com a Equação 24.

$$\% \text{Cl}(\text{m/v}) = 177,3 \cdot C_{\text{tio}} \cdot f \cdot V_{\text{tio}} \cdot FW_{\text{Cl}} \quad \text{Equação 24}$$

em que C_{tio} é a concentração nominal de tiosulfato (em mol/L), f é o fator de correção da solução de tiosulfato e FW_{Cl} é a massa molar (em g/mol) do cloro.

3.6.2. Padronização da solução estoque de hipoclorito

Para padronização da solução estoque de hipoclorito foram adicionados 10,0 mL da solução em um erlenmeyer de 125,0 mL, adicionando em seguida 5,0 mL de HCl 6,0 mol/L e 2,0 mL KI 5% (m/v). Logo após, titulou-se com solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/L na presença de suspensão de amido 1% (m/v) (APHA et al., 2005). A concentração analítica de hipoclorito na solução estoque foi calculada de acordo com a Equação 25.

$$C_{(HClO)} = 5 \cdot C_{tio} \cdot f \cdot V_{tio} \cdot FW_{Cl} \quad \text{Equação 25}$$

em que $C_{(HClO)}$ é a concentração analítica de hipoclorito (em $mgCl/L$), C_{tio} é a concentração nominal do tiosulfato (em mol/L), f é o fator de correção do tiosulfato, V_{tio} é o volume de tiosulfato gasto na titulação (em L) e FW_{Cl} é a massa molar (em g/mol) do cloro.

3.7. Estudo para seleção do reagente a ser utilizado nos métodos desenvolvidos

Foram realizados estudos com os reagentes DPD, índigo-trissulfonato e verde malaquita para determinar qual seria o mais apropriado para o propósito do trabalho, ou seja, a determinação de ozônio e hipoclorito em águas por meio do método de análise por imagens digitais. Para este fim foram construídas curvas analíticas, utilizando-se um espectrofotômetro (USB2000+, Ocean Optics, Brasil) para o ozônio e o hipoclorito com cada um destes reagentes.

3.7.1. Curvas analíticas para o método com DPD

Para a construção da curva analítica para o hipoclorito foram preparadas seis soluções padrão em diferentes concentrações a partir da solução estoque de hipoclorito ($354,0 \text{ mgCl/L}$), com concentrações entre $0,5$ e $5,0 \text{ mgCl/L}$. Sobre $5,0 \text{ mL}$ das amostras foram adicionadas uma medida (cerca de $35,0 \text{ mg}$) da mistura sólida tamponada de DPD, a solução foi homogeneizada e a absorbância medida em 515 nm (APHA et al., 2005).

A curva analítica para o ozônio foi construída de maneira similar àquela do hipoclorito. Os padrões ($0,5$ a $4,0 \text{ mgO}_3/L$) foram obtidos por diluição da solução aquosa de ozônio na concentração de aproximadamente $6,0 \text{ mgO}_3/L$. Para o ozônio, também foram construídas curvas analíticas utilizando-se KI 1% (m/v) como catalisador. O procedimento foi o mesmo citado anteriormente, porém foram adicionados $5,0 \text{ mL}$ da solução de KI 1% (m/v) após a adição do DPD.

3.7.2. Curvas analíticas para o método com índigo-trissulfonato

A curva analítica para o ozônio foi obtida a partir do procedimento apresentado a seguir, em que foram utilizadas as mesmas soluções padrão descritas no método com DPD. Em um balão volumétrico de 100,0 mL foram adicionados 10,0 mL da solução de índigo II, 5,0 mL da amostra e o volume do balão foi completado com água tipo 1. A seguir, a absorbância foi medida em 600 nm (APHA et al., 2005).

Um procedimento similar foi utilizado para a curva analítica para o hipoclorito. Entretanto, foram usadas soluções padrão com concentrações entre 10,0 a 150,0 mgCl/L.

3.7.3. Curvas analíticas para o método com verde malaquita

O método utilizado para o verde malaquita foi adaptado a partir do método com índigo-trissulfonato (APHA et al., 2005).

Em um balão volumétrico de 25,0 mL foram adicionados 10,0 mL da solução de verde malaquita 7,5 $\mu\text{mol/L}$, 5,0 mL da solução padrão de ozônio (entre 0,5 e 4,0 mgO_3/L) ou 5,0 mL de solução padrão de hipoclorito (entre 2,0 e 7,0 mgCl/L) e o volume do balão foi completado com água tipo 1. A absorbância foi medida em 618 nm.

3.8. Caracterização do verde malaquita

3.8.1. Comportamento do verde malaquita na presença de soluções aquosas de ozônio e hipoclorito

Para avaliar o comportamento do verde malaquita na presença de ozônio e hipoclorito foram realizados estudos em condições experimentais definidas com auxílio de um planejamento de multivariáveis baseado na Matriz de Doehlert, para duas variáveis, que foram o pH e a concentração do verde malaquita (Tabela 2).

Tabela 2. Condições experimentais do planejamento de experimentos baseado na Matriz de Doehlert para duas variáveis.

Ensaio	pH	Conc. VM ($\mu\text{mol/L}$)	Code A	Code B
1	3,0	15,0	-1,0	0,000
2	4,5	22,5	-0,5	-0,866
3	4,5	7,5	-0,5	0,866
4	6,0	15,0	0,0	0,000
5	7,5	22,5	0,5	-0,866
6	7,5	7,5	0,5	0,866
7	9,0	15,0	1,0	0,000

Para realização dos estudos foram adicionados em béqueres 5,0 mL de solução tampão para ajuste do pH, 10,0 mL da solução de verde malaquita e 5,0 mL da amostra de ozônio ou hipoclorito. A avaliação do comportamento do verde malaquita foi feita através de leituras no espectrofotômetro na região do visível, durante intervalo de tempo de 0 a 30 min, sendo estas obtidas a cada 15 s.

3.9. Método de análise por imagens digitais com o verde malaquita

3.9.1. Confeção do sistema para análises por imagens digitais

A câmara para obtenção de imagens digitais foi construída a partir de caixas plásticas pretas (Patola, PB 25) com dimensões: 11 cm x 7,5 cm x 3,5 cm (comprimento x largura x altura). O orifício de observação da *webcam* foi mantido no centro da parede oposta à abertura de captação de luz, que foi fechada com um dispersor de luz feito com uma etiqueta de papel. Orifícios na parte superior da câmara foram construídos para colocação de duas cubetas de 1 cm de caminho óptico (Figura 12). Internamente foi colocado um guia montado em papelão para garantir a posição fixa das cubetas.

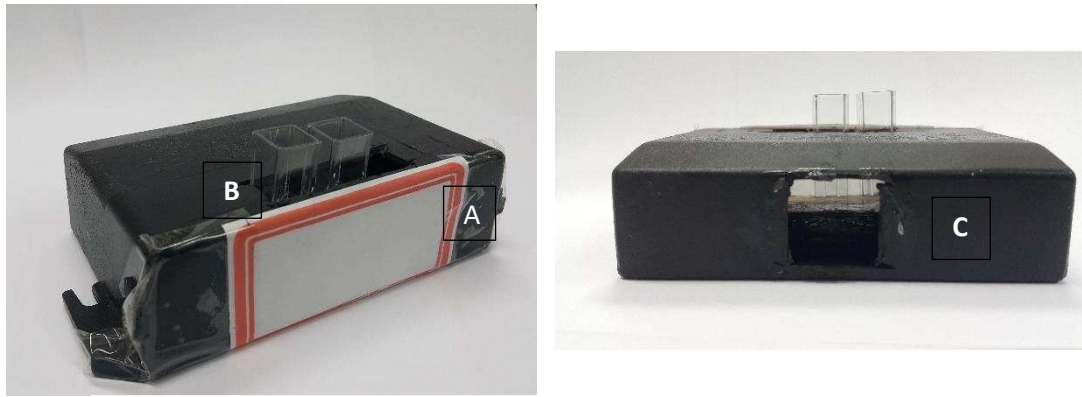


Figura 12. Câmara “homemade” para fixação da *webcam* e cubetas para obtenção das imagens digitais. Esquerda – Vista Frontal (onde há incidência da luz); Direita – Vista Posterior. (A) dispersor de luz; (B) cubetas no porta cubetas (o encaixa das cubetas fica dentro da câmara); (C) abertura onde a *webcam* é colocada.

Para o estudo da influência da luz sobre as imagens digitais construiu-se uma câmara escura de papelão com dimensões: 32 cm x 28 cm x 27 cm (comprimento x largura x altura). Dentro da câmara escura foi colocado a câmara de imagens digitais e defronte ao dispersor uma fonte de radiação formada por um LED branco 1,8 W (Luminária DP LED light, DP6001, China) uniformemente separados em área de 20 cm x 10 cm. A montagem do sistema está apresentada na Figura 13.

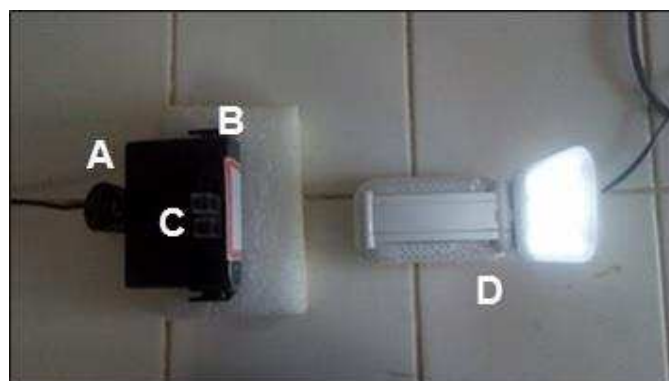


Figura 13. Montagem do sistema para estudo da influência da luz externa sobre as imagens digitais, sem a câmara escura. (A) *webcam*; (B) câmara de análise; (C) cubetas; (D) fonte de luz.

Para facilitar a visualização da montagem do sistema utilizado para a análise por imagens digitais, a seguir está apresentado um desenho esquemático do mesmo (Figura 14).

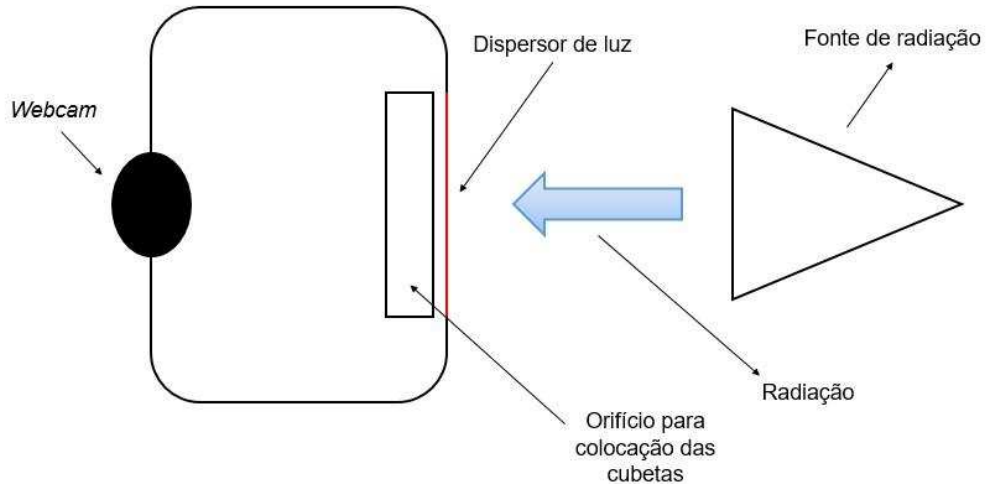


Figura 14. Desenho esquemático da montagem do sistema utilizado para a análise por imagens digitais.

Para as análises foram testados dois tipos de *webcams*. Uma *webcam* com correção de branco (Hardline, China) e outra sem esse tipo de correção (Infokit, Brasil). A *webcam* era conectada a um computador via cabo USB. Também foram testadas cubetas de dois materiais diferentes (acrílico e vidro), além de diferentes distâncias entre fonte da radiação e o dispersor (10 a 40 cm).

As imagens foram coletadas por meio de um *software* que foi desenvolvido para este trabalho, o *RGBcam*.

A interface deste *software* está mostrada na Figura 15. O *software* foi baseado na plataforma Processing em ambiente Linux. A imagem coletada da *webcam* é transmitida ao *software* e apresentada na janela principal. É possível selecionar 4 regiões da imagem (A, B, C, D) para obter os valores médios RGB de cada região. As dimensões da região e sua posição na imagem podem ser ajustadas com os controles. Os valores médios de cada região são apresentados em pequenos gráficos em tempo real e aquisição pode ser feita automaticamente em intervalos de tempo pré-definidos ou

manualmente e posteriormente salvos em arquivos tipo ASCII (formato de texto, com coluna de dados separados por vírgula) (Figura 16). Os dados foram importados diretamente para *softwares* de tratamento de dados, tais com o *Microsoft Excel* ou *OriginLab Origin*. Marcadores de evento podem ser adicionados nos arquivos, em uma coluna adicional.

Para o trabalho, a região A foi utilizada para obtenção de dados de RGB da cubeta com amostra, a região B para a luz incidente (“papal”), a região C para a região sem incidência de luz e na região D foi feita a leitura em RGB da cubeta com o “branco” (água tipo 1).

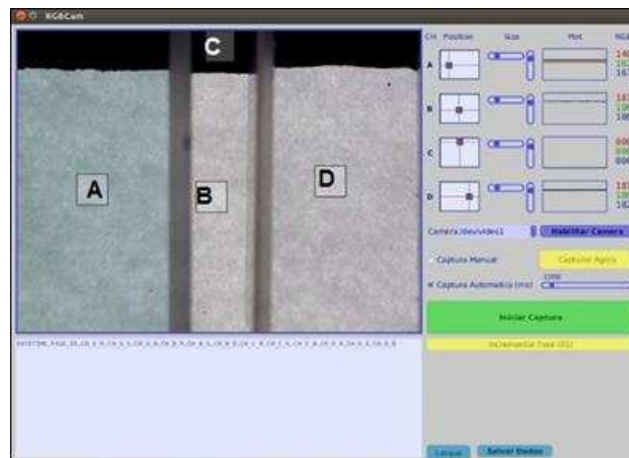


Figura 15. Interface do *software* para análise das imagens digitais.

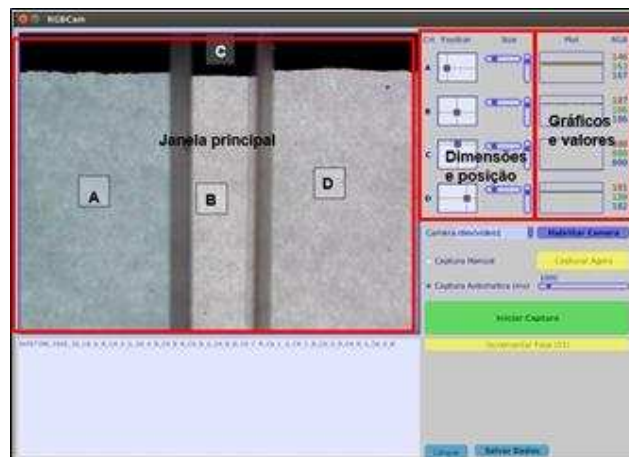


Figura 16. Detalhes da interface do *software* para análise das imagens digitais. Áreas para coleta de dados: (A) cubeta com amostra; (B) luz incidente; (C) da região sem incidência de luz (preto); (D) cubeta com branco.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de reagentes

A partir das curvas analíticas obtidas para cada um dos reagentes (DPD, índigo-trissulfonato e verde malaquita) selecionou-se aquele que seria usado para a determinação de ozônio e hipoclorito em águas por meio do método de análise por imagens digitais.

4.1.1. Curvas analíticas utilizando o DPD

Método com DPD para hipoclorito

A curva analítica do método espectrofotométrico para o sistema ácido-base do hipoclorito é apresentada na Figura 17. Um modelo quadrático foi aplicado a todos os pontos e um modelo linear, de 0,5 a 3,0 mgCl/L. O gráfico de resíduos para estes modelos está apresentado na Figura 18.

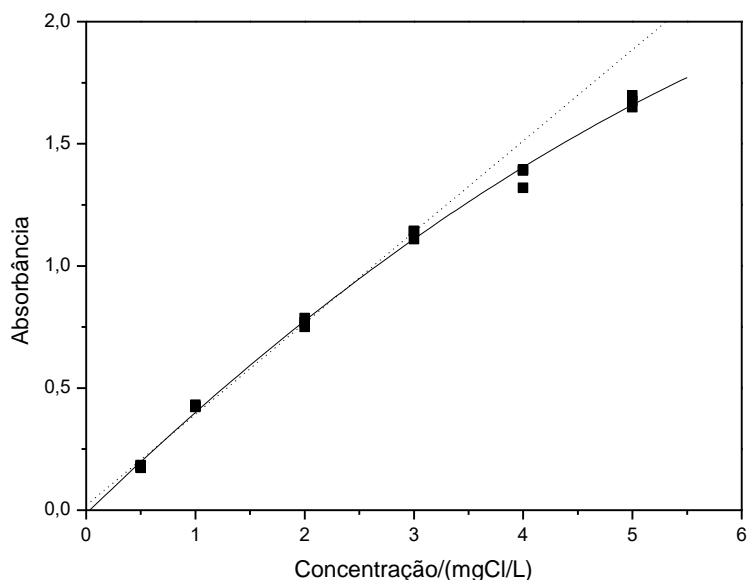


Figura 17. Curva analítica do método com DPD para o hipoclorito. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.

O ajuste dos modelos aos dados experimentais foi avaliado com auxílio de um gráfico de resíduos.

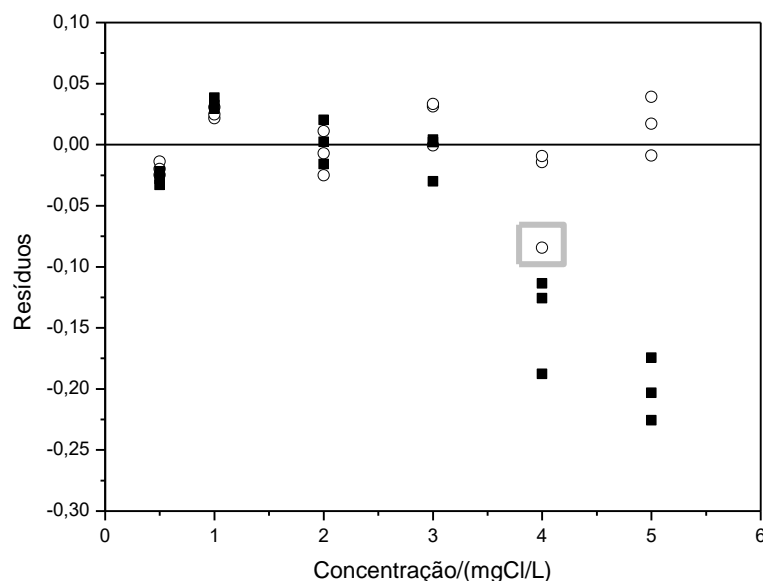


Figura 18. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com DPD para hipoclorito. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático. O quadrado cinza marca um *outlier* não incluído no modelo quadrático.

Os modelos se adequam aos dados nas faixas analíticas selecionadas, ou seja, o modelo quadrático (Equação 26) explica o comportamento dos dados em toda faixa de concentração de hipoclorito estudada. Se houver interesse no uso do modelo linear (Equação 27), sua faixa fica restrita na região até 3,0 mgCl/L, uma vez que, acima desse valor os resíduos são muito grandes (em módulo).

$$\hat{A} = (-0,014 \pm 0,023) + (0,435 \pm 0,021) \cdot c(\text{ClO}^-) + (-0,020 \pm 0,004) \cdot c(\text{ClO}^-)^2$$

Equação 26

$$R_{aj}^2 = 0,9964; s(\text{res}) = 0,032$$

$$\hat{A} = (0,019 \pm 0,015) + (0,373 \pm 0,008) \cdot c(\text{ClO}^-)$$

Equação 27

$$R_{aj}^2 = 0,9948; s(\text{res}) = 0,027$$

A sensibilidade analítica do modelo quadrático variou de 0,235 a 0,435 L/mgCl. A sensibilidade analítica para cada concentração em um modelo quadrático foi calculada conforme Oliveira et al. (2017), que considerando o modelo quadrático geral (Equação 28) obteve a sensibilidade analítica, de acordo com a definição de sensibilidade analítica pela IUPAC (Equação 29).

$$\hat{A} = B + I \cdot c + Q \cdot c^2 \quad \text{Equação 28}$$

$$S_i = \frac{dA}{dc} = 2Q \cdot c_i + I \quad \text{Equação 29}$$

em que c é a concentração analítica do analito (mg/L) e c_i é a maior concentração da faixa analítica estudada (mg/L).

A absorvidade molar aparente (ϵ_{ap}) foi estimada em $7,2 \cdot 10^4$ L/(mol.cm). Esse parâmetro foi obtido considerando a aproximação que a sensibilidade analítica (quando a concentração do oxidante tende a zero) em métodos espectrofotométricos seja dada pela Equação 30. Este valor será utilizado para comparação da sensibilidade dos diferentes métodos, usando diferentes reagentes.

$$S = \frac{b \epsilon_{ap}}{\text{massa molar(DPD)}} \quad \text{Equação 30}$$

A falta de linearidade da curva analítica pode ser atribuída a vários fatores, tais como alterações na condição de equilíbrio da reação com a concentração mais elevada de hipoclorito onde o excesso de DPD em relação ao oxidante esteja muito baixo, ou mesmo à não-linearidade do detector para intensidades de luz tão baixas, sendo então uma limitação desse instrumento em particular (na absorbância igual a 1,2, por exemplo, menos de 0,02% da luz incidente sobre a cubeta é quantificada no detector). Do ponto de vista analítico, entretanto, essa não-linearidade não traz nenhuma limitação importante ao método.

Método com DPD para ozônio

A curva analítica do método com DPD para o ozônio é apresentada na Figura 19. Foram avaliados os modelos linear e quadrático. O gráfico de resíduos para estes modelos está apresentado na Figura 20.

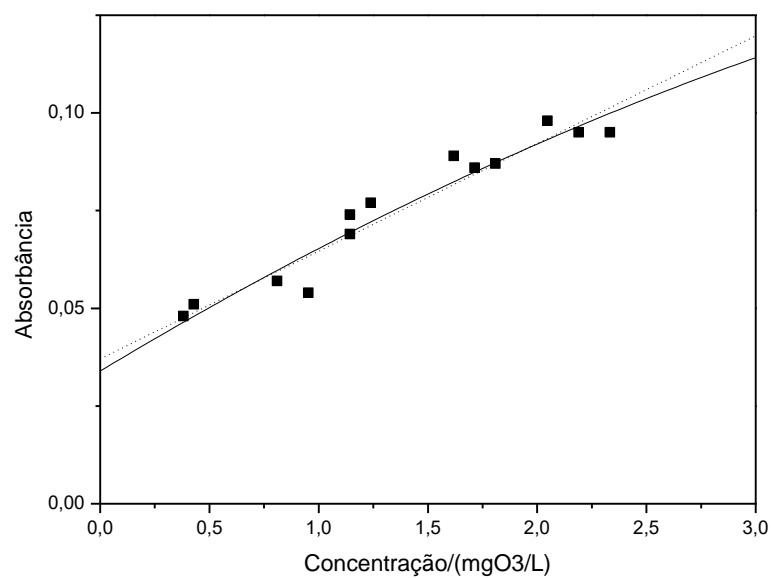


Figura 19. Curva analítica do método com DPD para o ozônio. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.

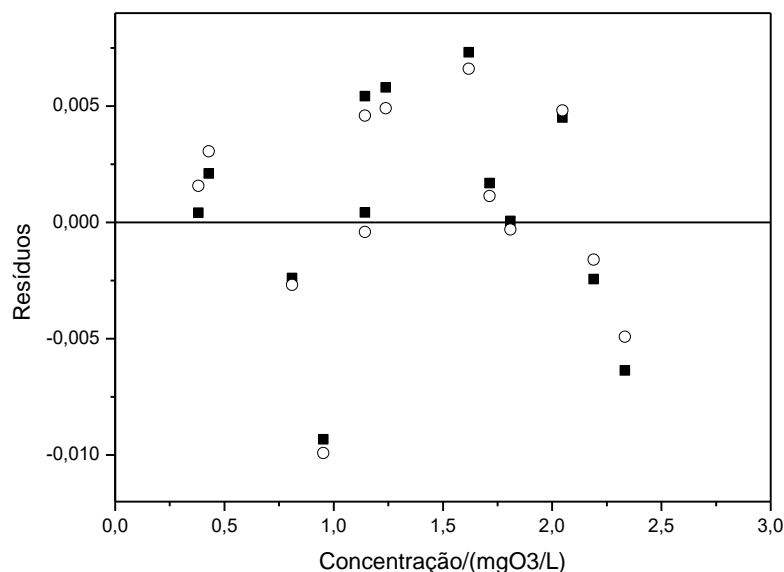


Figura 20. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com DPD para o ozônio. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático.

Devido à grande semelhança entre os dois modelos, que pode ser verificada pelo gráfico de resíduos (Figura 20), considerou-se, pelo Princípio da Parcimônia, que o modelo linear explicou adequadamente os dados experimentais (Equação 31).

$$\hat{A} = (37,1 \pm 3,2) \cdot 10^{-3} + (27,6 \pm 2,2) \cdot 10^{-3} \cdot c(O_3) \quad \text{Equação 31}$$

$$R_{aj}^2 = 0,9161; s(res) = 5,4 \cdot 10^{-3}$$

O valor elevado do branco (termo constante) é devido à oxidação do reagente DPD mesmo na dispersão sólida em tampão. A baixa qualidade do ajuste, expressa pelo baixo valor do coeficiente de determinação (menor que 0,99) e seu desvio-padrão do resíduo ($s(res)$), considerando que a resolução do espectrofotômetro usado é cerca de 0,001. Essa qualidade do ajuste foi devido à grande variabilidade dos dados. Nessa etapa do trabalho cada solução de ozônio estava sendo preparada individualmente a partir do gás ozônio e quantificada pelo método iodométrico. Desta maneira, grande parte

da dispersão está associada à dispersão do método iodométrico que deve ser maior por estar sendo aplicado à uma baixa concentração de ozônio.

Para avaliar a influência de um catalisador sobre a reação de oxidação, foi adicionado iodeto ao meio. A análise de resíduos (Figura 21) levou a uma conclusão similar em relação ao modelo linear da curva analítica sem a presença de iodeto.

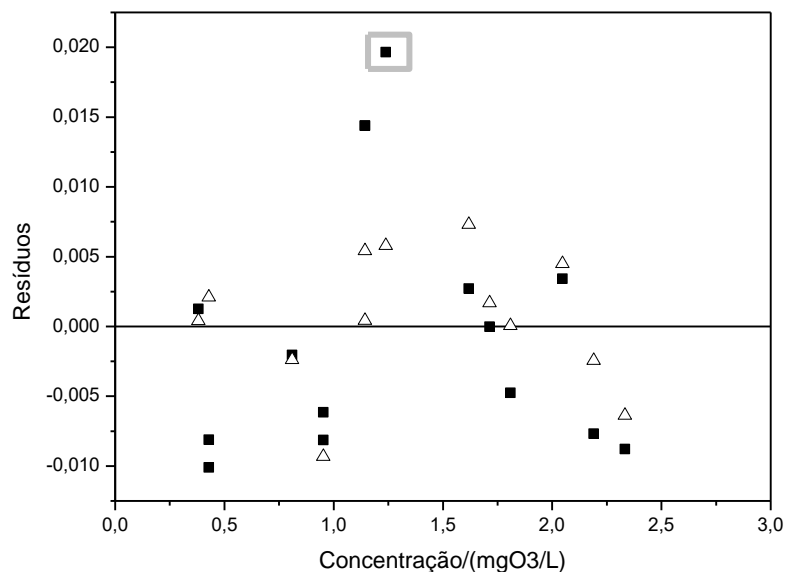


Figura 21. Gráfico de resíduos para a curva do método com DPD para o ozônio na presença e ausência de iodeto. (■) com iodeto; (△) sem iodeto. O quadrado cinza marca um *outlier* não incluído na curva na presença de iodeto.

Na Figura 22, a comparação da curva analítica obtida na presença de iodeto foi feita em relação à curva obtida na ausência daquele íon. Observa-se que a inclinação aumentou em cerca de 80% (Equação 32).

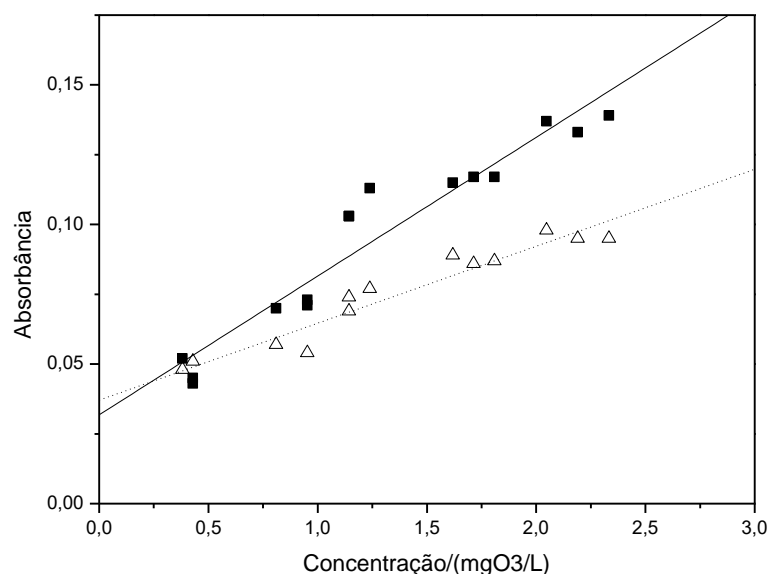


Figura 22. Efeito da presença de iodeto sobre o método com DPD para o ozônio. (■) com iodeto; (△) sem iodeto.

$$\hat{A} = (31,8 \pm 5,8) \cdot 10^{-3} + (49,7 \pm 4,1) \cdot 10^{-3} \cdot c(O_3) \quad \text{Equação 32}$$

$$R_{aj}^2 = 0,9138; s(\text{res}) = 9,8 \cdot 10^{-3}$$

A diferença entre as inclinações foi significativamente superior a 95% de confiança, usando o teste t-Student (MEIER; ZUND, 2000) (Equação 33).

$$t_{\text{calc}} = \frac{(S_1 - S_2)}{\sqrt{V_1 + V_2}} \quad \text{Equação 33}$$

onde S_i é a inclinação e V_i , a variância (ou quadrado da estimativa do desvio-padrão) dessa inclinação.

A ação do iodeto deve-se à sua oxidação pelo ozônio a iodo, e este foi cineticamente mais eficiente na oxidação do DPD. Esse efeito catalítico também é observado nesse método para determinação de cloraminas (APHA et al., 2005).

A sensibilidade analítica para o método foi igual a 0,028 L/mgO₃ ou 0,050 L/mgO₃ para a curva obtida na presença do catalisador (iodeto).

A absorvidade molar aparente para esse método foi igual a $4,5 \cdot 10^3$ L/(mol.cm) ou $8,2 \cdot 10^3$ L/(mol.cm) para a curva obtida na presença de iodeto. Esses valores mais baixos para a mesma espécie absorvente da radiação é devido a fatores associados à eficiência das reações, muito baixos comparados ao método com DPD para o hipoclorito. Esta análise também poderia ser feita utilizando a sensibilidade, mas ela seria restrita ao mesmo reagente.

4.1.2. Curvas analíticas utilizando o índigo-trissulfonato

Método com índigo-trissulfonato para o ozônio

A curva analítica do método espectrofotométrico para o ozônio está apresentada na Figura 23. Foram avaliados os modelos linear e quadrático. O gráfico de resíduos para estes modelos está apresentado na Figura 24.

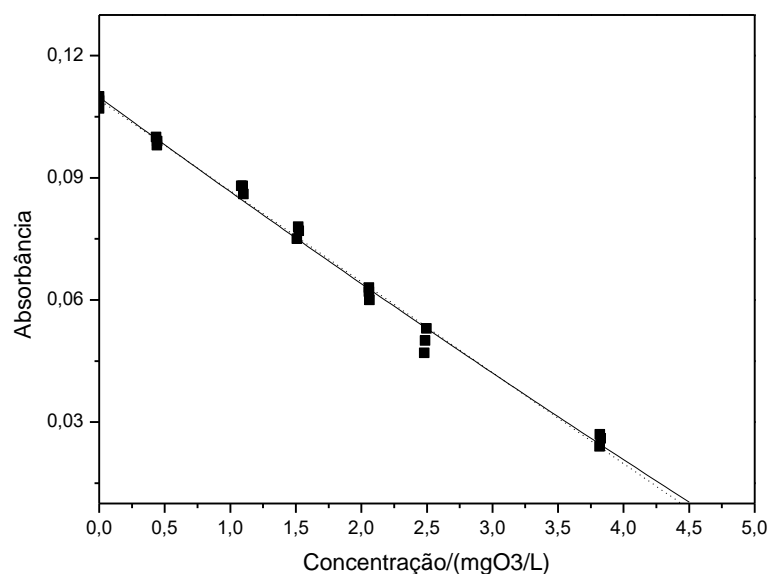


Figura 23. Curva analítica do método com índigo-trissulfonato para o ozônio. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.

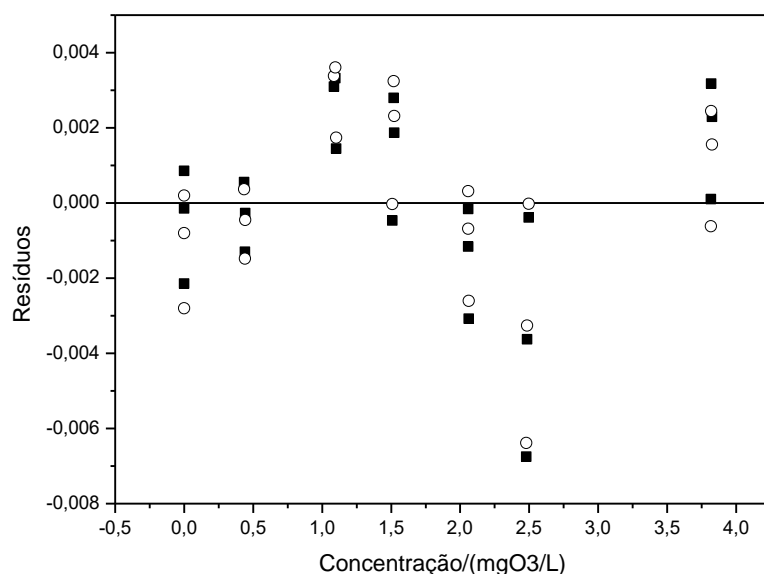


Figura 24. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com índigo-trissulfonato para o ozônio. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático.

Os dois modelos apresentaram grande semelhança, que pôde ser confirmada pelo gráfico de resíduos da Figura 24. Logo, pelo Princípio da Parcimônia considerou-se que o modelo linear explicou adequadamente os dados experimentais (Equação 34).

$$\hat{A} = (109,1 \pm 1,0) \cdot 10^{-3} + (-22,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \cdot c(O_3)$$

$$R_{aj}^2 = 0,9912; s(res) = 0,0026$$

Equação 34

O valor elevado do branco (termo constante) se deve à oxidação do reagente índigo-trissulfonato.

A sensibilidade analítica para o método foi igual a 0,022 L/mgO₃. A absorvidade molar aparente para esse método foi igual a 1,4.10⁴ L/(mol.cm).

Método com o índigo-trissulfonato para o hipoclorito

A curva analítica do método espectrofotométrico para o sistema ácido-base do hipoclorito está apresentada na Figura 25. O modelo quadrático foi

aplicado a todos os pontos e o modelo linear, de 10,0 a 50,0 mgCl/L. O gráfico de resíduos para os dois modelos está apresentado na Figura 26.

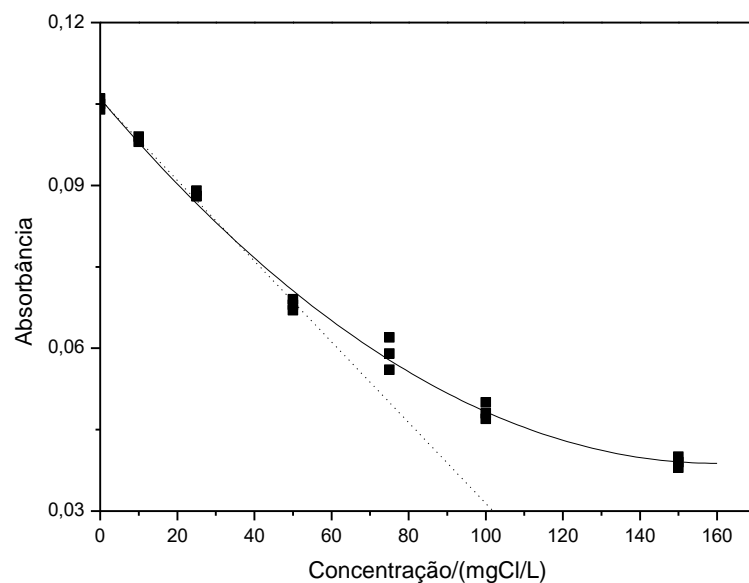


Figura 25. Curva analítica do método com índigo-trissulfonato para o hipoclorito. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.

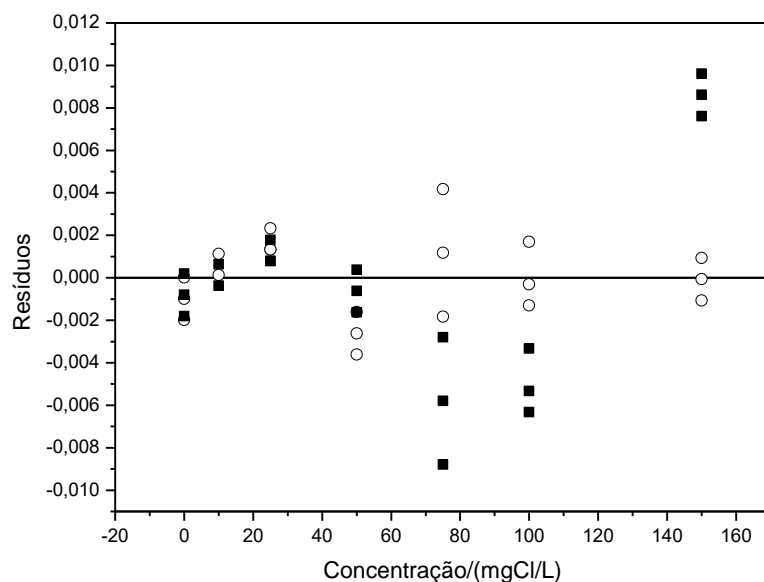


Figura 26. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com índigo-trissulfonato para o hipoclorito. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático.

De acordo com as faixas analíticas selecionadas, os modelos se adequam aos dados experimentais, ou seja, o modelo quadrático (Equação 35) explica o comportamento dos dados em toda faixa de concentração do hipoclorito estudada. Já o modelo linear (Equação 36) explica o comportamento dos dados na região de 10,0 até 50,0 mgCl/L, pois acima desse valor os resíduos são muito grandes (em módulo).

$$\begin{aligned}\hat{A} &= (106,0 \pm 0,8) \cdot 10^{-3} + (-0,8 \pm 0,02) \cdot 10^{-3} \cdot c(\text{ClO}^-) \\ &\quad + (0,003 \pm 0,0002) \cdot 10^{-3} \cdot c(\text{ClO}^-)^2\end{aligned}\tag{Equação 35}$$
$$R_{aj}^2 = 0,9936; s(\text{res}) = 1,9 \cdot 10^{-3}$$

$$\begin{aligned}\hat{A} &= (105,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} + (-0,7 \pm 0,02) \cdot 10^{-3} \cdot c(\text{ClO}^-)\end{aligned}\tag{Equação 36}$$
$$R_{aj}^2 = 0,9942; s(\text{res}) = 1,1 \cdot 10^{-3}$$

A sensibilidade analítica do modelo quadrático variou de $5,4 \cdot 10^{-5}$ a $8,4 \cdot 10^{-4}$ L/mgCl. A absorvidade molar aparente foi estimada em $4,9 \cdot 10^2$ L/(mol.cm). Esse valor mais baixo para a mesma espécie absorvente da radiação é devido a fatores associados à eficiência das reações, que são muito baixos comparados ao método com índigo-trissulfonato para o ozônio.

4.1.3. Curvas analíticas utilizando o verde malaquita

Método com o verde malaquita para o hipoclorito

A curva analítica do método com verde malaquita para o hipoclorito está apresentada na Figura 27. Foram avaliados os modelos linear e quadrático. O gráfico de resíduos para estes modelos está apresentado na Figura 28.

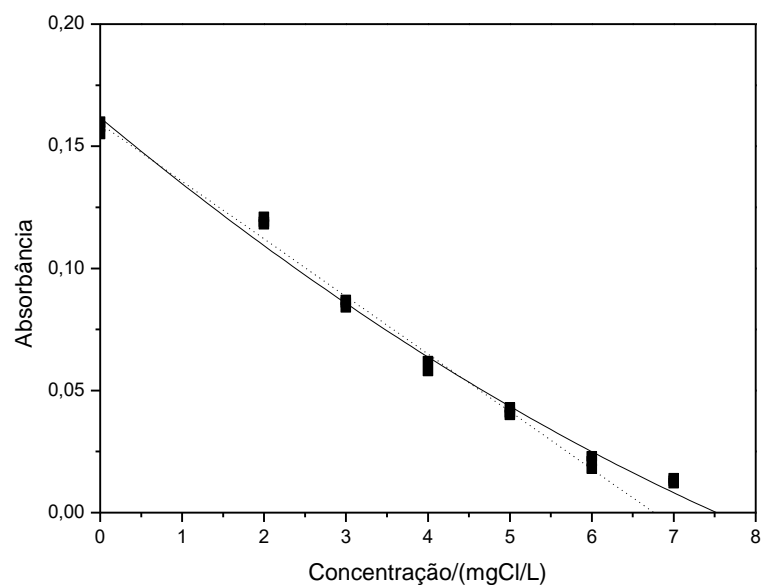


Figura 27. Curva analítica do método com verde malaquita para o hipoclorito. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.

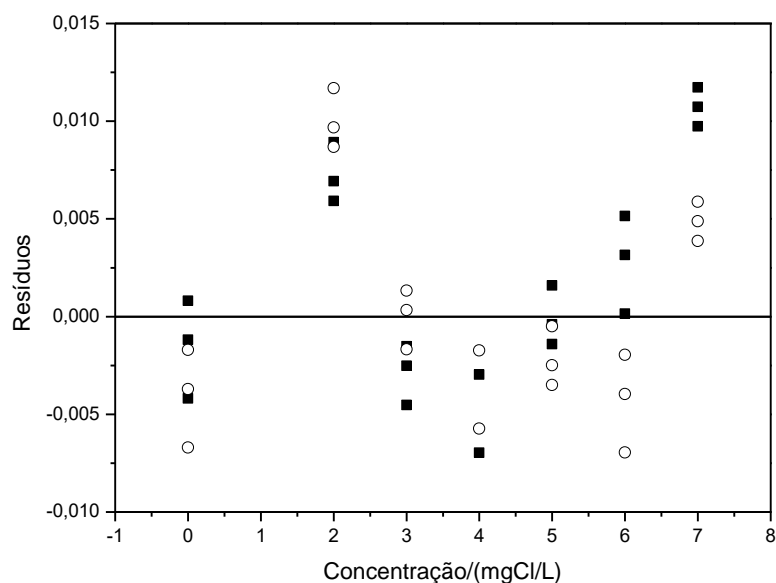


Figura 28. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com verde malaquita para o hipoclorito. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático.

Devido à grande semelhança entre os dois modelos, que pôde ser confirmada pelo gráfico de resíduos da Figura 28, considerou-se pelo

Princípio da Parcimônia que o modelo linear explicou adequadamente os dados experimentais (Equação 37).

$$\hat{A} = (159,2 \pm 2,2) \cdot 10^{-3} + (-23,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-3} \cdot c(\text{ClO})$$
$$R_{aj}^2 = 0,9903; s(\text{res}) = 4,7 \cdot 10^{-3}$$

Equação 37

O valor elevado do branco (termo constante) se deve à oxidação do reagente verde malaquita.

A sensibilidade analítica para o método foi igual a 0,024 L/mgCl. A absorvidade molar aparente para esse método foi igual a $8,6 \cdot 10^3$ L/(mol.cm).

Método com o verde malaquita para o ozônio

A curva analítica do método com verde malaquita para o ozônio está apresentada na Figura 29. Foram avaliados os modelos linear e quadrático. O gráfico de resíduos para estes modelos está apresentado na Figura 30.

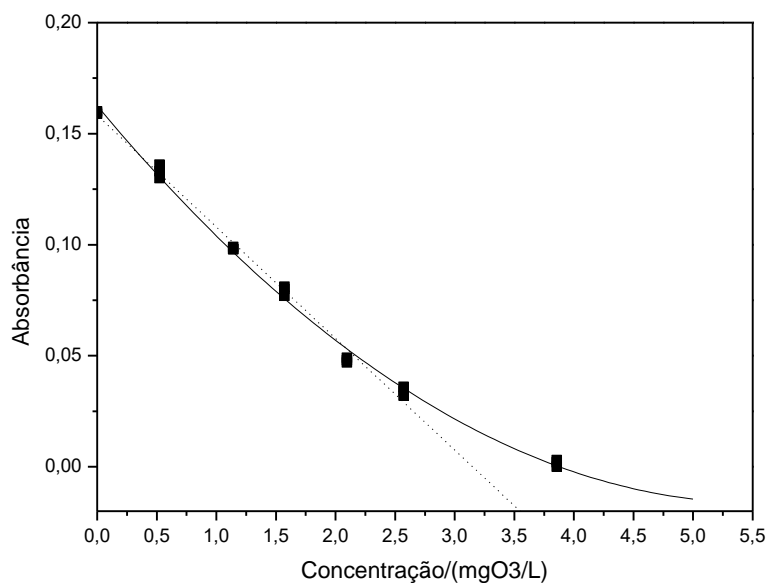


Figura 29. Curva analítica do método com verde malaquita para o ozônio. (.....) modelo linear; (—) modelo quadrático.

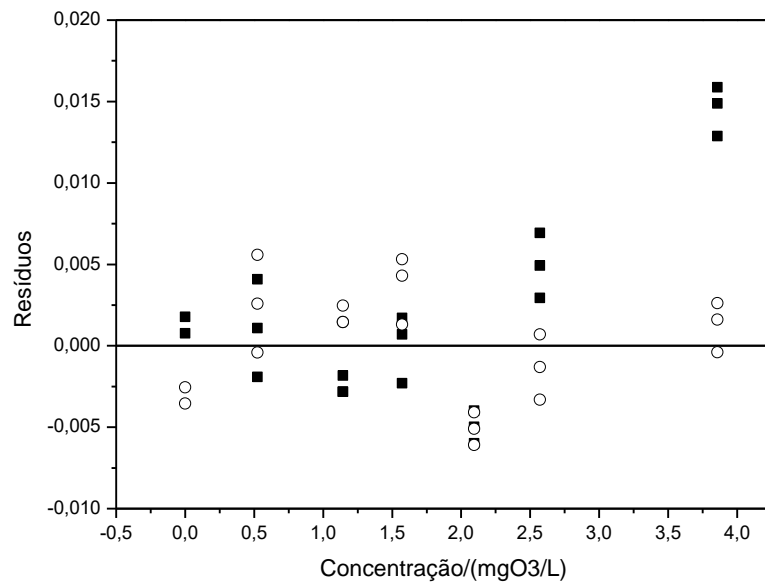


Figura 30. Gráfico de resíduos para a curva analítica do método com verde malaquita para o ozônio. (■) modelo linear; (○) modelo quadrático.

Observou-se uma grande semelhança entre os dois modelos, que pôde ser confirmada pelo gráfico de resíduos da Figura 30. Logo, considerou-se pelo Princípio da Parcimônia que o modelo linear explicou adequadamente os dados experimentais (Equação 38).

$$\hat{A} = (158,2 \pm 1,6) \cdot 10^{-3} + (-50,2 \pm 1,0) \cdot 10^{-3} \cdot c(O_3)$$

$$R_{aj}^2 = 0,9936; s(res) = 3,7 \cdot 10^{-3}$$

Equação 38

O valor elevado do branco (termo constante) se deve à oxidação do reagente verde malaquita.

A sensibilidade analítica para o método foi igual a 0,050 L/mgO₃. A absorvidade molar aparente para esse método foi igual a 1,8.10⁴ L/(mol.cm). Esse valor mais alto para a mesma espécie absorvente da radiação é devido a fatores associados à eficiência das reações, que são muito altos comparados ao método com verde malaquita para o hipoclorito.

O objetivo inicial deste trabalho era desenvolver um método baseado na análise por imagens digitais para a determinação simultânea de ozônio e

hipoclorito em águas. Assim, era necessário utilizar um reagente que apresentasse uma resposta o mais parecido possível para os dois analitos, sendo este o verde malaquita. Porém, no decorrer dos experimentos, percebeu-se a necessidade de primeiramente desenvolver métodos individuais para a determinação do ozônio e do hipoclorito com o verde malaquita.

4.2. Estudo cinético do verde malaquita

Foi feito um estudo cinético para verificar o comportamento do verde malaquita na presença de ozônio e na presença de hipoclorito.

Este estudo cinético foi realizado com auxílio de um planejamento multivariáveis baseado na Matriz de Doehlert para duas variáveis, pH e concentração analítica do verde malaquita, de acordo com a Tabela 2 (página 33). Para cada condição experimental em diferentes concentrações de ozônio ou hipoclorito, a cinética foi realizada diretamente na cubeta, sendo obtidos espectros automaticamente a cada 15 s.

A partir dos resultados obtidos para cada condição experimental verificou-se que o ozônio reage completamente com o verde malaquita antes mesmo de realizar a leitura no espectrofotômetro, diferentemente do hipoclorito, que leva alguns minutos para reagir completamente com o verde malaquita (Figura 31). Devido a esta observação, foi realizado o estudo cinético apenas para o hipoclorito.

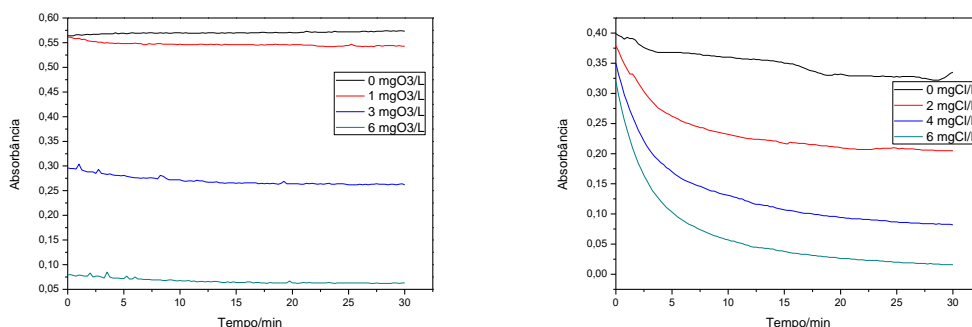


Figura 31. Exemplos dos resultados obtidos para as condições experimentais definidas pela Matriz de Doehlert: (esquerda) ozônio, pH 4,5 e concentração

de verde malaquita igual a 22,5 $\mu\text{mol/L}$; (direita) hipoclorito, pH 6,0 e concentração de verde malaquita igual a 15,0 $\mu\text{mol/L}$.

Na Figura 32 é apresentado o exemplo do comportamento observado para a condição experimental com verde malaquita 15 $\mu\text{mol/L}$ na presença de hipoclorito 2,0 mgCl/L (56,0 $\mu\text{mol/L}$) e pH 7,5. O ajuste de cinética de 1ª ordem (Equação 39), obtido com o modelo “ExpDec1” no OriginLab Origin®, foi adequado para explicar o comportamento do sistema. Como pode ser visto pelo gráfico de resíduos apresentado com inserto da Figura 32.

$$\hat{A} = A_{eq} + A_o e^{-kt} \quad \text{Equação 39}$$

onde A_{eq} é a estimativa da absorbância do verde malaquita ao final da reação (no estado de equilíbrio), enquanto que A_o é a estimativa da absorbância do verde malaquita no tempo zero e k , a constante de reação observada de primeira ordem.

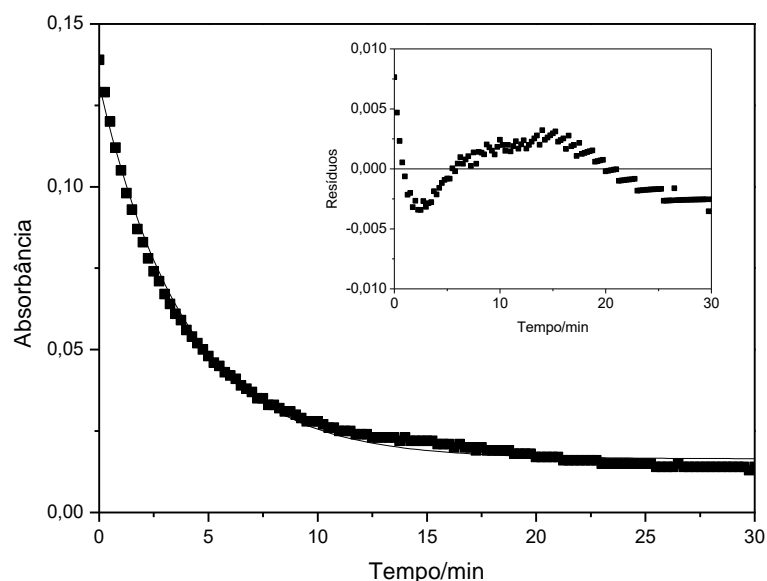


Figura 32. Comportamento cinético do verde malaquita 15 $\mu\text{mol/L}$ na presença de hipoclorito 2,0 mgCl/L (56,0 $\mu\text{mol/L}$) e pH 7,5. Inserto: Gráfico de resíduos.

Foi observado que todos os estudos cinéticos desse planejamento puderam ser analisados por essa equação cinética e assim, os parâmetros

obtidos para cada situação experimental foram compilados e apresentados nas Figura 33 e Figura 35.

Na Figura 33 são apresentados os valores da constante de reação em cada condição experimental para concentração de hipoclorito nos ensaios do planejamento. A informação importante a ser observada é a falta de um padrão entre os diferentes ensaios, ou seja, não apenas as velocidades de reação variaram entre as concentrações de hipoclorito, mas o padrão das curvas, como por exemplo, algumas apresentaram curvaturas para cima e outras para baixo. Este comportamento aumenta a complexidade no tratamento de dados do planejamento experimental.

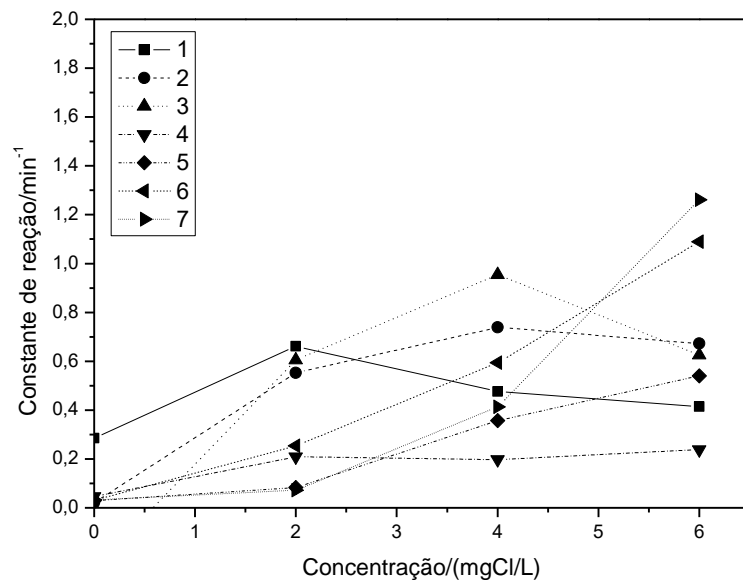


Figura 33. Constantes de reação observadas para os diferentes ensaios do planejamento experimental baseado na Matriz de Doehlert para o hipoclorito. Os traços são apenas para melhorar observação dos pontos referentes ao mesmo ensaio.

Devido à complexidade citada, optou-se por analisar a influência das variáveis (pH e concentração de verde malaquita) para cada concentração de hipoclorito.

Neste trabalho optou-se por utilizar um planejamento experimental com a Matriz de Doehlert ao invés de um planejamento fatorial. No planejamento fatorial o número de condições experimentais definidas seria menor que

aquelas definidas pelo planejamento experimental com a Matriz de Doehlert, visto que para o primeiro seriam possíveis quatro condições e para o segundo foram possíveis sete condições. Devido a isto, preferiu-se utilizar o planejamento experimental com a Matriz de Doehlert.

O planejamento experimental com a Matriz de Doehlert permite explicar as respostas obtidas pela equação quadrática apresentada na Equação 40, usando as variáveis codificadas (*code*), ou seja, normalizadas de maneira que os valores máximos e mínimos do pH (*code A*) e da concentração de verde malaquita (*code B*) adquirissem o valor de +1 e -1 e +0,866 e -0,866, respectivamente (FERREIRA et al., 2004).

$$\hat{R} = aA^2 + bB^2 + cAB + dA + eB + f \quad \text{Equação 40}$$

Foi utilizado o procedimento de seleção de termos para selecionar os termos significativos do modelo, descartando os demais (ANDRADE et al., 2016). A planilha DOE-Doehlert2 (OLIVEIRA, 2016) foi utilizada para fazer todo o tratamento da matriz.

Observou-se um padrão no comportamento da matriz, ou seja, apenas os termos quadráticos (com coeficiente '*a*') e linear (com coeficiente '*d*') do pH e o termo quadrático da concentração de verde malaquita (com coeficiente '*b*') influenciaram a velocidade de reação observada para as diferentes concentrações de hipoclorito (Figura 34). Além disso, pode-se observar um padrão nos coeficientes dos parâmetros para as concentrações de hipoclorito.

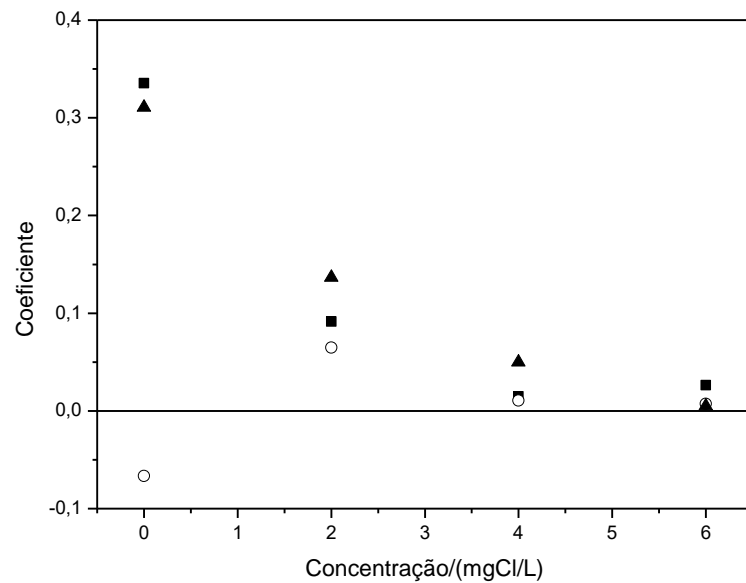


Figura 34. Coeficientes significativos (em unidades codificadas) para explicar o comportamento do pH e concentração de verde malaquita no planejamento experimental. (■) quadrado do valor do pH, (○) valor do pH e (▲) quadrado da concentração de verde malaquita.

Uma vez que a absorbância no equilíbrio é uma resposta útil para uma curva analítica, foram obtidos os modelos quadráticos da curva analítica obtida a partir da absorbância no equilíbrio, para cada ensaio (Equação 41).

$$\hat{A} = B + I c + Q c^2 \quad \text{Equação 41}$$

Os coeficientes foram analisados na Matriz de Doehlert. O padrão de comportamento para cada ensaio foi melhor comportado (Figura 35), ou seja, há um padrão similar em todos ensaios, com exceção da concentração zero.

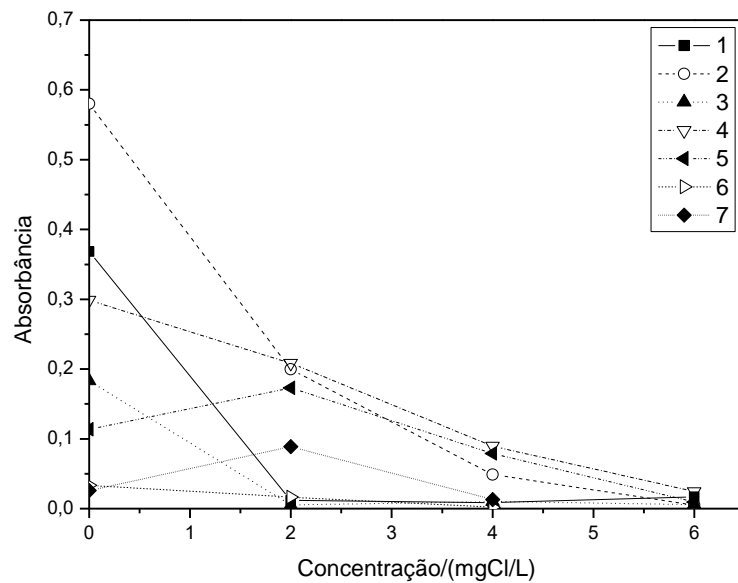


Figura 35. Termo A_{eq} estimados para os diferentes ensaios do planejamento experimental baseado na Matriz de Doehlert. Os traços são apenas para melhorar observação dos pontos referentes ao mesmo ensaio.

A equação obtida é apresentada para o termo B_1 (inclinação) da curva analítica (Equação 42).

$$B_1 = 0,095 \text{ code(pH)} \text{code(VeM)} - 0,079 \text{ code(VeM)} - 0,064 \quad \text{Equação 42}$$

O termo B_2 não foi explicado por nenhuma combinação de termos.

Para a determinação das condições mais adequadas para a reação entre o ozônio e o hipoclorito com o verde malaquita foram analisadas as inclinações, os coeficientes de determinação (R^2) e os desvios padrão dos resíduos para cada ensaio, cuja condições estão apresentadas na Tabela 2 (página 33), como apresentado na Tabela 3. Para o ozônio, verificou-se que o modelo linear apresentou um ajuste melhor, já para o hipoclorito o modelo quadrático apresentou um melhor ajuste.

Tabela 3. Inclinações, coeficientes de determinação e desvios padrão dos resíduos para as curvas analíticas do O₃ e ClO⁻.

Ensaio	Inclinação	R ²	s(res)	Inclinação	R ²	s(res)
	O ₃ (t=0 min)			ClO ⁻ (t=10 min)		
1	0,0621	0,9101	0,0508	0,085	0,8198	0,0756
2	0,0870	0,9523	0,0511	0,030	0,9890	0,0268
3	0,0314	0,7089	0,0498	0,039	0,7844	0,0450
4	0,0510	0,9586	0,0278	0,030	1,0000	3,99.10 ⁻¹⁷
5	0,0467	0,9600	0,0250	0,049	0,9741	0,0281
6	0,0294	0,9357	0,0200	0,037	0,9914	-
7	0,0443	0,9344	0,0307	0,083	1,0000	-

Quanto maior a inclinação da curva, maior a sensibilidade analítica e portanto, melhor é a condição de reação. Assim verificou-se que para o ozônio, o ensaio 2 apresentou a maior inclinação e um bom ajuste, sendo este definido como a melhor condição. Para o hipoclorito, a maior inclinação foi apresentada para o ensaio 1, logo este não apresentou um bom ajuste. Desta maneira, verificou-se que o ensaio 4 apresentou um ótimo ajuste, além do desvio padrão dos resíduos ter sido muito pequeno, sendo este ensaio definido como melhor condição para o hipoclorito.

4.3. Método de análise por imagens digitais com o verde malaquita

4.3.1. Influência do tratamento do sinal analítico

O sinal analítico fornecido pela imagem digital é a intensidade de luz de cada filtro (RGB). Com a câmara usada, foi possível obter 4 tipos de sinais: cubeta com amostra, cubeta com branco, da luz sem passar pelas cubetas e da região sem incidência de luz (*Key Black*).

Considerando esses sinais analíticos, foram avaliadas respostas analíticas obtidas funções de resposta apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Respostas analíticas obtidas a partir do sinal analítico fornecido pela imagem digital.

Resposta analítica	Função de resposta
Varição de Intensidade (com Branco)/bit – ΔI_B	$\Delta I_B = I_B - I$
Absorbância absoluta – A_A	$A_A = \log(\Delta I_B)$
Absorbância – A	$A = -\log\left(\frac{I}{I_B}\right)$
Absorbância Expandida – A_E	$A_E = -\log\frac{(I_B - I)}{I_B}$
%Transmitância – %T	$\%T = \frac{I}{I_B} \cdot 100$
%Transmitância Expandida – %T _E	$\%T_E = \frac{(I - I_B)}{(I_B - I_K)} \cdot 100$

I_B é a intensidade obtida na cubeta com o branco (água tipo 1) e I é a intensidade obtida na cubeta com a amostra.

Para a comparação entre as diferentes funções de resposta, uma vez que várias das respostas não podem ser comparadas entre si, foi proposto o uso do parâmetro Resolução, ou seja, a menor variação que pode ser observada para a variação de uma unidade de resposta. Quanto menor a resolução, melhor qualidade do método (Figura 36).

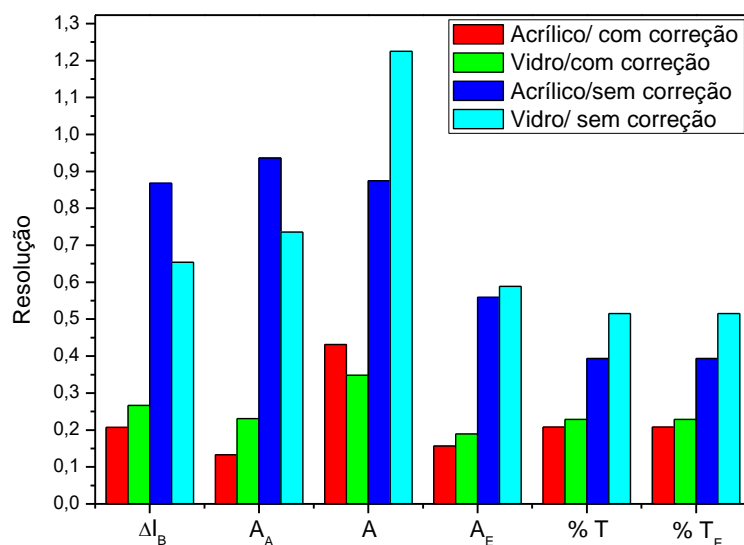


Figura 36. Resolução para cada tratamento aplicado aos dados experimentais para o filtro R para *webcam* com correção e sem correção de branco.

Observa-se que, para uma condição de iluminação constante, a resolução foi muito influenciada pelo tipo de *webcam* (com ou sem correção de branco). Para *webcam* com correção de branco, todas as respostas forneceram baixas resoluções (entre 0,1 e 0,3 L/ μ mol), com exceção da Absorbância (A). Além disso, não foi observada diferença significativa entre as respostas para cubeta de vidro e cubeta de acrílico para esse tipo de *webcam*.

Resultados similares para diferentes funções de respostas não são esperados para espectrofotômetros com larguras de banda de luz monocromática estreitas, como é o caso de espectrofotômetros comerciais com largura de banda usualmente abaixo de 2 nm, em que a Lei de Beer-Lambert-Bouger pode ser aplicada para a resposta analítica.

Com o aumento da largura de banda, a premissa principal da Lei de Beer-Lambert-Bouger pode não ser válida, ou seja, a incidência da luz monocromática (ou com largura de banda estreita o suficiente).

Para larguras de banda maiores, o sinal obtido (absorbância ou transmitância) é função da absortividade molar em cada comprimento de onda no intervalo de comprimento de ondas do monocromador (de λ_i até λ_s , considerando tanto o espectro de absorção do filtro quanto o espectro de absorção da espécie absorvente) (Equações 43 a 45) (SKOOG et al., 2006).

$$T_{\bar{\lambda}} = \frac{\int_{\lambda_i}^{\lambda_s} I_{T,\lambda} d\lambda}{\int_{\lambda_i}^{\lambda_s} I_{o,\lambda} d\lambda} \quad \text{Equação 43}$$

pela Lei de Beer-Lambert Bouguer

$$T_{\bar{\lambda}} = \frac{\int_{\lambda_i}^{\lambda_s} I_{o,\lambda} \cdot 10^{-b \cdot [i] \cdot \epsilon_{\lambda}} d\lambda}{\int_{\lambda_i}^{\lambda_s} I_{o,\lambda} d\lambda} \quad \text{Equação 44}$$

$$A_{\bar{\lambda}} = -\log T_{\bar{\lambda}} \quad \text{Equação 45}$$

Ainda que os valores dessas integrais não sejam tratados nesse trabalho, apenas para ilustrar, os perfis típicos de filtros de *webcam* são apresentados na Figura 37. Eles foram obtidos digitalizando (usando o *software Plot Digitizer*) os espectros de absorção de filtros da *Kodak* para esse fim. Os filtros apresentam bandas largas sob o ponto de vista a espectrofotometria.

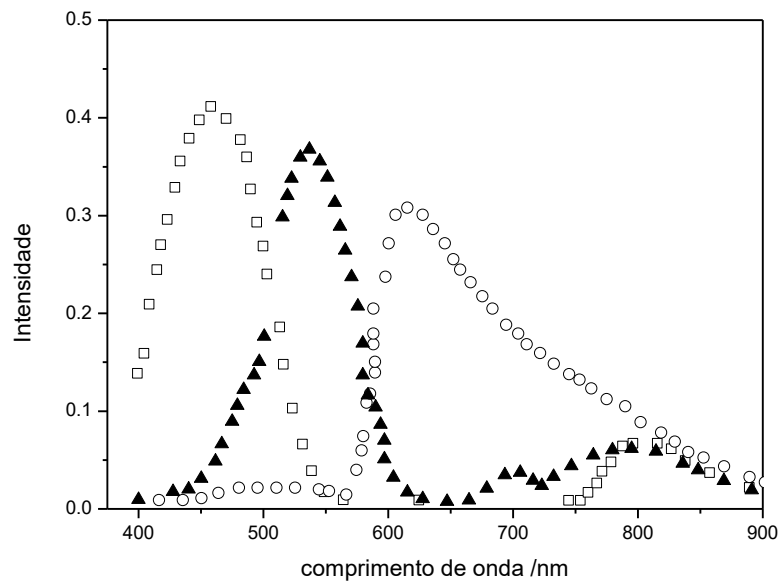


Figura 37. Perfis típicos de filtros de *webcam*. Filtros GREEN(□), RED(▲) e BLUE(○).

Dessa maneira, não há garantias que o comportamento observado para a solução de verde malaquita apresentará uma linearidade entre sua concentração e a absorbância, ou mesmo um comportamento exponencial em relação à transmitância, como previsto pela Equação de Beer-Lambert-Bouger para luz monocromática, uma vez que a largura de banda do verde malaquita é menor que a larguras dos filtros (Figura 38).

Devido ao maior ajuste da maior banda de absorção do verde malaquita com o filtro RED, é esperado uma maior sensibilidade em relação a esse filtro.

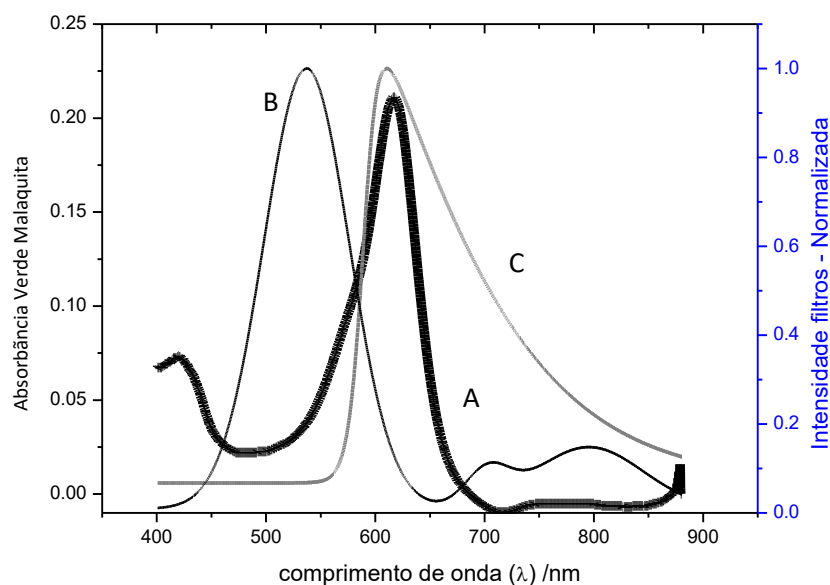


Figura 38. Sobreposição do espectro de absorção do verde malaquita (A) e os espectros de transmissão (normalizados) dos filtros *Kodak* para *webcam*: filtro GREEN (B); filtro BLUE (C).

Um exemplo desse comportamento previsto é apresentado na Figura 39, onde são apresentadas curvas analíticas do verde malaquita obtidas pelas imagens digitais dos três filtros. O filtro RED apresenta maior sensibilidade analítica e o filtro BLUE não apresenta correlação com a concentração de verde malaquita. Esse resultado é coerente com a grande área de recobrimento do filtro RED com a banda do verde de malaquita e com praticamente toda área de recobrimento do filtro BLUE com o espectro de absorção. O filtro GREEN apresentou uma sensibilidade intermediária e um recobrimento também intermediário.

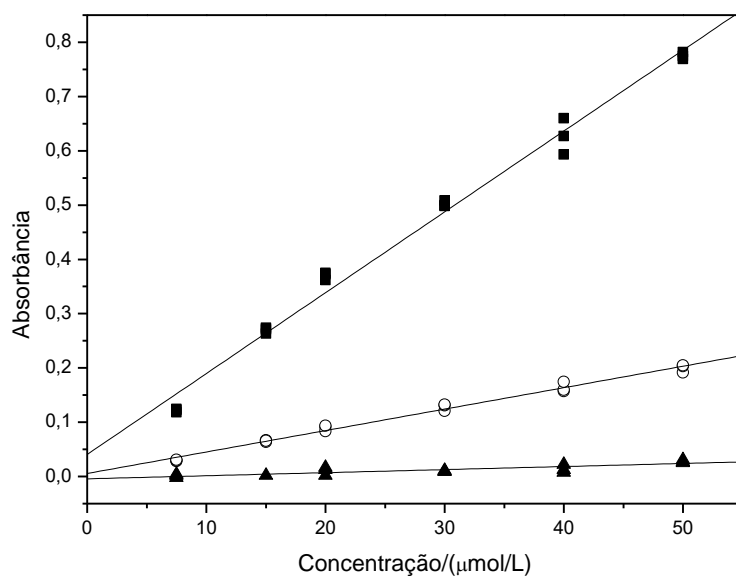


Figura 39. Exemplo do comportamento da absorvância medida de verde malaquita a partir das imagens digitais para os três canais (RED - ■; GREEN - ○; BLUE - ▲).

Na Figura 40 é apresentada uma comparação da curva analítica em absorvância, obtida em um espectrofotômetro com resolução espectral de cerca de 1 nm (US2000+, Ocean Optics, Brasil) e com imagem digital utilizando o filtro RED. A curva analítica obtida a partir da imagem digital é menos sensível do que aquela obtida com o espectrofotômetro com maior resolução espectral e que segue a Lei de Beer-Lambert-Bouguer.

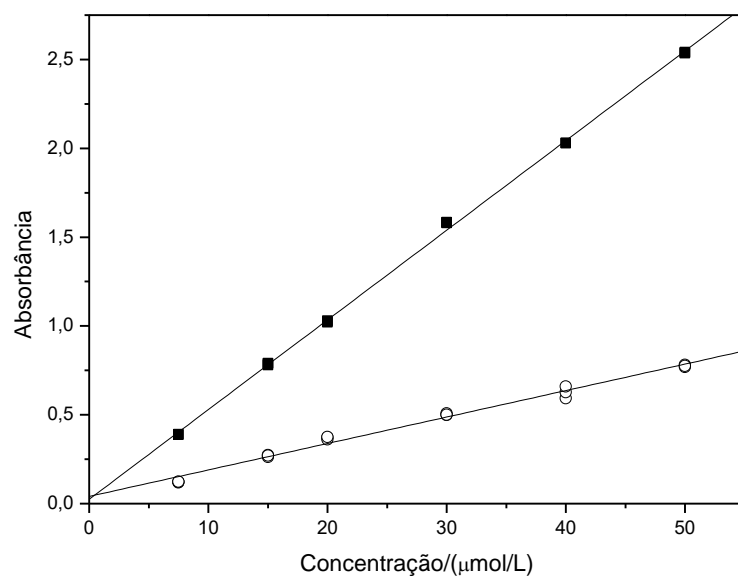


Figura 40. Comparação da curva analítica em termos de absorvância de verde malaquita obtida em um espectrofotômetro (■) no comprimento de absorção máxima e em um sistema de imagem digital (○), com o filtro RED.

Na Figura 41, os mesmos sinais analíticos da Figura 40 são apresentados em termos de transmitância. As curvas analíticas para a transmitância obtidas no espectrofotômetro e no sistema de imagem digital apresentaram um comportamento exponencial, também previsto pela Lei de Beer. Logo, a curva para o espectrofotômetro apresentou um comportamento exponencial mais acentuado que a curva para o sistema de imagem digital, devido a maior sensibilidade obtida com o primeiro.

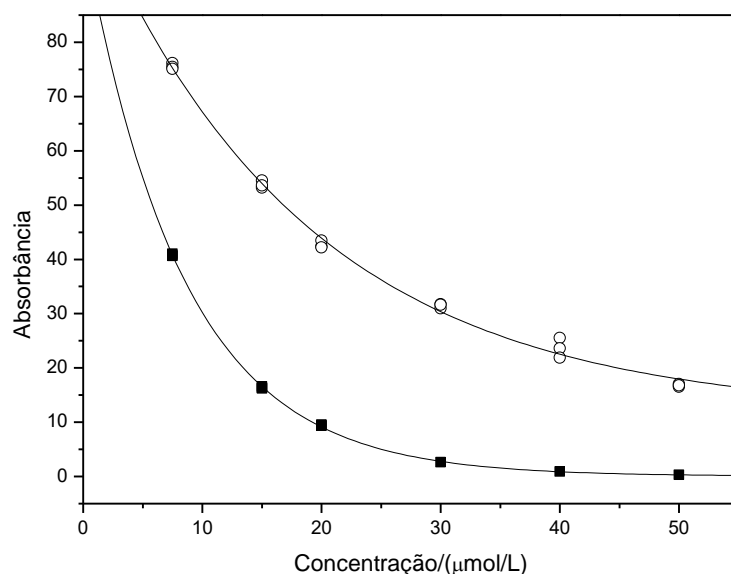


Figura 41. Comparação da curva analítica em termos de transmitância de verde malaquita obtida em um espectrofotômetro (■) no comprimento de absorção máxima e em um sistema de imagem digital (○), com o filtro RED.

4.3.2. Influência do material da cubeta

A influência do tipo de material da cubeta foi avaliada sobre repetibilidade do branco, obtendo a diferença de intensidade do branco (I_B) em relação à intensidade do dispersor (I_D). A distribuição de frequência observada é apresentada na Figura 42.

A cubeta de vidro apresentou uma dispersão dos dados (amplitude igual a 5 bit) menor que a cubeta de acrílico (amplitude igual a 8 bit). O perfil da distribuição não permite afirmar que é observado um comportamento normal (ou seja, com distribuição normal), de maneira que parâmetros estatísticos paramétricos (média, desvio-padrão, etc.) e seus testes de inferência devem ser usados com cuidado.

Na Tabela 5 alguns parâmetros estatísticos são apresentados. A amplitude foi razoavelmente bem estimada pelo intervalo de confiança considerando o teste t-Student a 95% de confiança. Esse resultado sugere a possibilidade de utilizar a estatística paramétrica para esse conjunto de dados.

A dispersão dos dados para a cubeta de vidro e de acrílico observada nesse estudo não foi observada no estudo das funções de resposta.

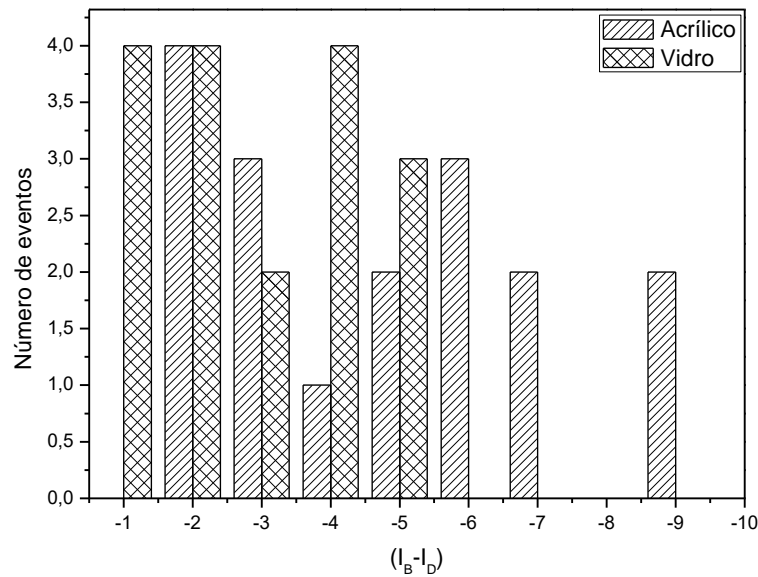


Figura 42. Frequência de desvios entre as intensidades do branco (I_B) e do dispersor de luz (I_D) para cada cubeta.

Tabela 5. Parâmetros estatísticos para cada cubeta (acrílico e vidro).

Parâmetros	Acrílico	Vidro
Média/bit	-4,8	2,9
s/bit	1,4	0,9
s. $t_{95\%/2;16}$./bit*	3,0	1,9
Mínimo estimado	-1,8	-1,0
Máximo estimado	-7,8	-4,8
Amplitude/bit	5	8

* $t_{95\%/2;16} = 2,12$

É interessante ressaltar que grande parte dos espectrofotômetros de feixes simples (com resolução de 0,001 unidades de absorbância), utilizavam conversores analógicos-digitais (ADC) de 8 *bit*, ou seja, o sinal analógico era convertido para uma faixa contendo 256 intervalos, com resolução de 1 *bit*, que é similar as *webcams* utilizadas nesse trabalho.

4.3.3. Influência do tipo de *webcam* e cubeta

Para avaliar o comportamento do sistema de imagens digitais, foram obtidas curvas analíticas nos filtros RGB para o verde malaquita na faixa de concentração de 7,5 a 22,5 $\mu\text{mol/L}$ com diferentes distâncias da fonte, usando *webcam* com e sem correção de branco e com cubeta de vidro e de acrílico.

A melhor função de resposta para os dados coletados com a *webcam* para o filtro RED com correção de branco foi a absorbância absoluta ($\log \Delta I_B$) enquanto que, para *webcam* sem essa correção de branco, a variação da intensidade (ΔI_B) (Figura 43).

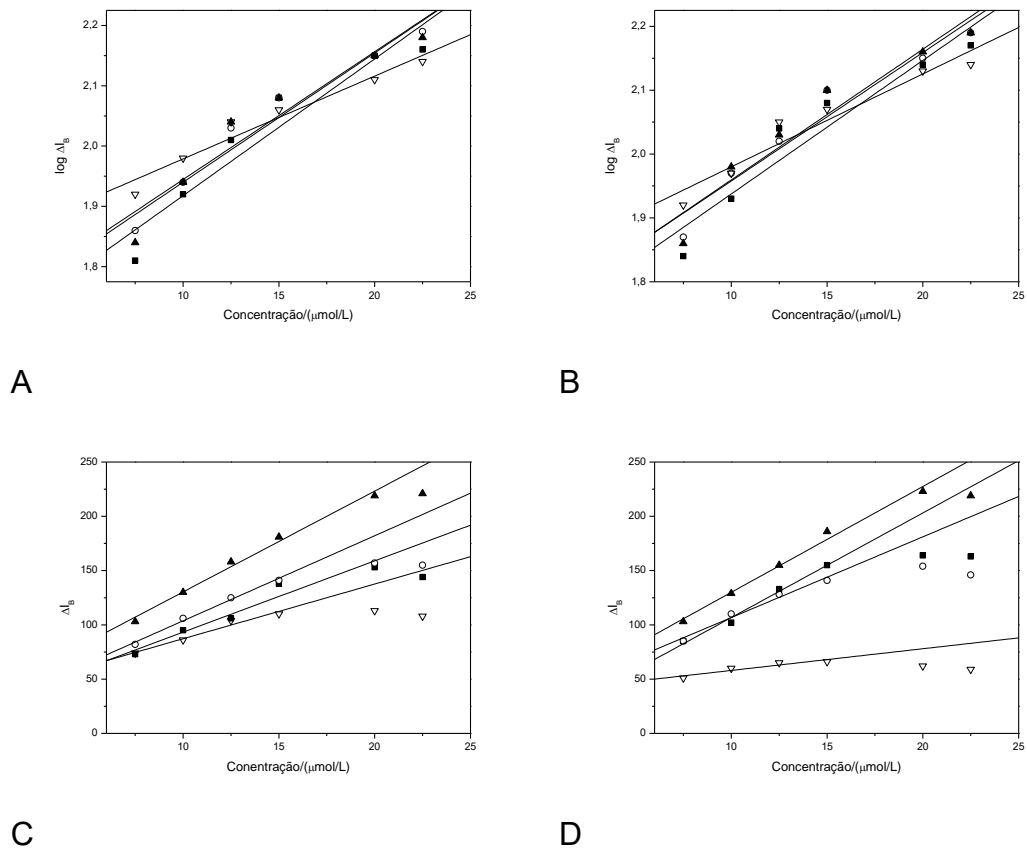


Figura 43. Curvas analíticas obtidas com *webcam* no filtro RED com (A e B) e sem (C e D) correção de branco, com cubeta de acrílico (A e C) e cubeta de vidro (B e D); para diferentes distâncias da fonte de luz. (■) 10 cm; (○) 20 cm; (▲) 30 cm; (▽) 40 cm.

Para facilitar a observação do comportamento a cada distância, foram apresentadas as médias de cada concentração. Exemplos de dispersão dos dados da *webcam* com e sem correção de branco são apresentados para os três filtros (Figura 44).

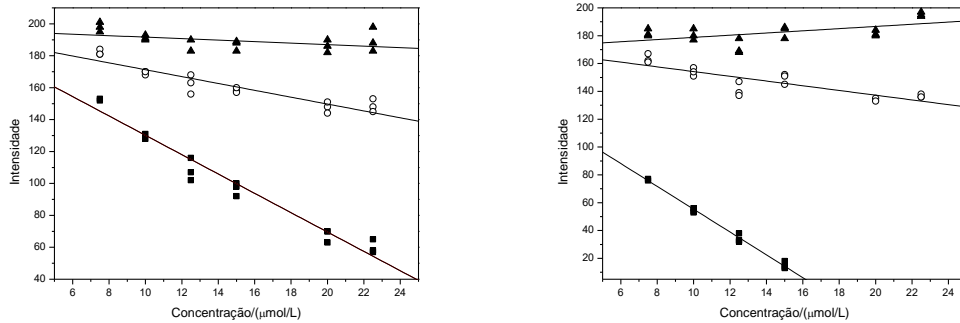


Figura 44. Curvas analíticas para os filtros R (■), G (○) e B (▲) utilizando cubeta de acrílico, 10 cm de distância da fonte de radiação. (Esquerda) *webcam* com correção de branco; (Direita) sem correção do branco.

O comportamento das duas cubetas (vidro e acrílico) foi similar entre si, tanto para a *webcam* com correção de branco quanto para aquela sem essa correção de branco.

Com o aumento da distância da fonte de radiação, há uma diminuição da intensidade de luz. A correção de branco da fonte tenta corrigir a diminuição da intensidade da luz da fonte em todos os filtros (a cor branca, em RGB é expressa por 255, 255, 255) e todos os pixels. Essa correção deve ser influenciada pela relação entre a área “livre” e a área da solução colorida. A hipótese que uma grande área livre deve ser mantida foi utilizada na construção da câmara (Figura 45).

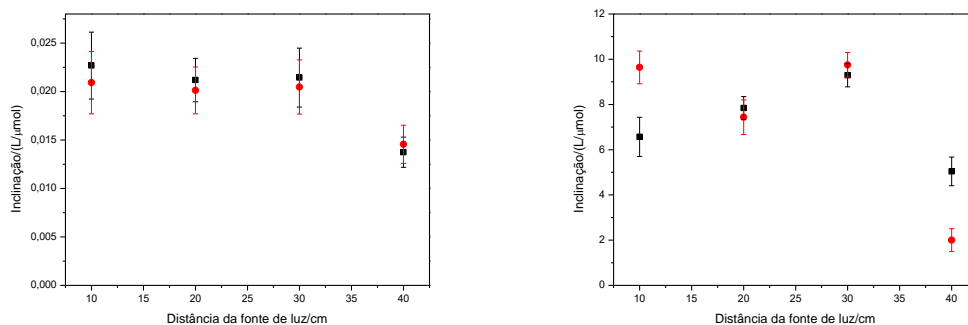


Figura 45. Influência da distância da fonte de luz sobre a sensibilidade da curva analítica para (esquerda) *webcam* com correção de branco e (direita) sem correção do branco – (●) vidro; (■) acrílico.

O uso da imagem digital ainda é um campo novo, e o comportamento dos métodos em função de variáveis do instrumento ainda não é bem conhecido.

O estudo realizado permitiu verificar o comportamento experimental da intensidade de luz (distância da fonte de luz). A *webcam* sem correção de branco mantém uma dependência da intensidade da fonte, enquanto que essa dependência não ocorre para a *webcam* com correção de branco. Na comparação das cubetas, observou-se comportamentos distintos da curva analítica, inclusive em relação a melhor função de resposta. É possível que a razão dessa diferença esteja vinculada ao viés do experimento, uma vez que as áreas relativas das duas cubetas foram diferentes.

Verificou-se que a distância de 20 cm se apresentou mais adequada para a aplicação do método de análise por imagens digitais. Optou-se por esta devido a facilidade no manuseamento do equipamento.

Dessa maneira, ainda que os métodos sejam otimizados, são necessários mais estudos visando compreender o comportamento dessa variação das técnicas espectrofotométricas.

4.4. Validação dos métodos analíticos

4.4.1. Método de análise por imagens digitais para quantificação de ozônio em águas com o verde malaquita

As figuras de mérito para quantificação de ozônio em águas com verde malaquita usando imagens digitais foram obtidas.

Utilizou-se a câmera com correção de branco e a distância de 20 cm da câmara à fonte de luz. A obtenção do sinal digital foi realizada imediatamente após a adição de 10,0 mL de solução de verde malaquita 22,5 $\mu\text{mol/L}$ em tampão acetato pH 4,5 sobre 5,0 mL de amostra diretamente na cubeta de vidro. A curva analítica foi construída para o filtro RED a partir da absorbância absoluta, ou seja, $\log \Delta_B$ em função da concentração. A curva analítica obtida é apresentada na Figura 46.

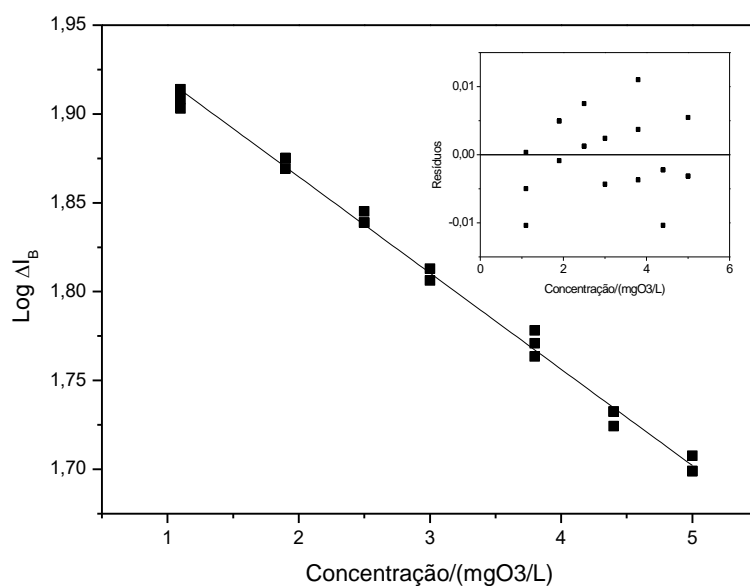


Figura 46. Curva analítica do método com verde malaquita em pH 4,5 para determinação de ozônio. Foi utilizado o filtro RED da *webcam* com correção de branco. Inseto: Gráfico de Resíduos.

O modelo da curva analítica da Figura 46 é apresentado na Equação 46.

$$\log \Delta I_B = (1973,1 \pm 3,2) \cdot 10^{-3} + (-54,2 \pm 0,9) \cdot 10^{-3} \cdot c(O_3) \quad \text{Equação 46}$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9940, que está acima do valor mínimo considerado pelo INMETRO para certificação de métodos, ou seja, igual a 0,99 (INMETRO, 2010), enquanto que o desvio padrão dos resíduos, igual a 0,0056. Dessa maneira, a resolução do método foi 0,103 mgO₃/L. O gráfico de resíduos está apresentado como inserto na Figura 46, em que verificou-se que os dados experimentais se ajustam bem ao modelo.

O limite de detecção (LOD) igual a 0,18 mgO₃/L foi baseado na estimativa do desvio-padrão do branco (s_B) da curva analítica de acordo com a definição pela IUPAC (Equação 47):

$$\text{LOD} = \frac{3s_B}{S} \quad \text{Equação 47}$$

onde S é a sensibilidade analítica (inclinação do modelo linear).

O desvio-padrão em imagens digitais não pode ser obtido por medidas repetidas de uma solução isenta do analito pois o desvio padrão obtido é enviesado. Uma vez que as imagens digitais têm um intervalo de valores possíveis discretos maiores que zero e menores que 255, os valores próximos aos limites tendem a não apresentar uma distribuição normal. O limite de detecção mínimo possível parece ser aquela concentração referente a 1 *bit* de variação do filtro. Nesse caso, esse limite mínimo possível seria 0,0039 mgO₃/L.

O limite de quantificação (LOQ) igual a 0,58 mgO₃/L foi calculado de acordo com a definição pela IUPAC pela Equação 48.

$$\text{LOQ} = \frac{10s_B}{S} \quad \text{Equação 48}$$

A partir do limite de quantificação, a faixa analítica foi de 0,58 mgO₃/L a 5,0 mgO₃/L.

Avaliou-se a repetitividade em duas concentrações diferentes (1,5 e 3,0 mgO₃/L) e também a partir de uma amostra de água de torneira, sendo os valores do coeficiente de variação (CV) obtidos iguais a 0,55; 0,88 e 0,38%, respectivamente. Para métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20%, logo os valores obtidos estão dentro do permitido (RIBANI et al., 2004).

4.4.1.1. Estudo de interferentes

Foi realizado o estudo de concomitantes (Fe³⁺, Cu²⁺, CO₃²⁻, Mn²⁺ e Cl⁻) para avaliar se poderiam causar interferência no método, sendo está avaliada através do teste t-Student, com 95% de confiança, que verifica a existência de diferença significativa entre a medida do branco e da solução contendo o concomitante. Na ausência de ozônio, nenhum íon estudado causou interferência, como pode ser verificado na Tabela 6.

Tabela 6. Valores obtidos para absorvância absoluta do branco e com os íons concomitantes na ausência de ozônio.

Interferente	Absorvância absoluta	Status
Fe ³⁺	1,990 ± 0,005	n sig
Cu ²⁺	1,978 ± 0,009	n sig
CO ₃ ²⁻	1,988 ± 0,005	n sig
Mn ²⁺	1,987 ± 0,004	n sig
Cl ⁻	1,978 ± 0,009	n sig
Branco	1,984 ± 0,008	

Entretanto, verificou-se a interferência de Fe³⁺ e Cu²⁺ na presença de ozônio. O uso de uma solução de EDTA 0,002 mol/L eliminou a interferência devido à complexação dos metais (Tabela 7). Neste caso, a interferência também foi considerada verificando a existência de diferença significativa entre a medida do branco e da solução contendo o interferente através de um teste t-Student, com 95% de confiança.

Tabela 7. Valores obtidos para absorvância absoluta do branco, com os interferentes (Fe^{3+} e Cu^{2+}) e com os interferentes + EDTA, na presença de ozônio.

Condição	Absorvância Absoluta	Status
Branco	$1,984 \pm 0,008$	
Fe^{3+}	$1,903 \pm 0,009$	dif sig
Fe^{3+} + EDTA	$1,997 \pm 0,007$	n sig
Cu^{2+}	$1,847 \pm 0,009$	dif sig
Cu^{2+} + EDTA	$1,997 \pm 0,007$	n sig

A exatidão do método foi verificada com um teste de adição e recuperação (RIBANI et al., 2004). Foram realizadas adições de volumes conhecidos de solução aquosa de ozônio (2,5 a 15,0 mL) sobre amostras de água de torneira, de maneira que a concentração de ozônio adicionada foi entre 0,5 e 4,0 mgO_3/L (em triplicata) para verificar se houve interferência matricial (Figura 47).

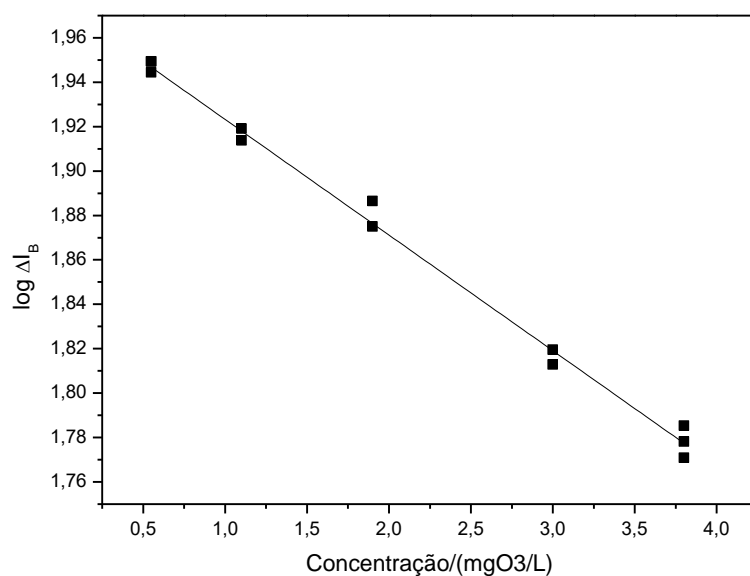


Figura 47. Curva analítica com amostras de água da torneira fortificadas com volumes conhecidos de água ozonizada.

A equação da reta obtida para a curva analítica para as amostras fortificadas está apresentada na Equação 49.

$$\log \Delta I_B = (1975,4 \pm 2,5) \cdot 10^{-3} + (-52,1 \pm 1,1) \cdot 10^{-3} \cdot c(O_3) \quad \text{Equação 49}$$

Sendo o coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9943, onde este apresenta-se acima do valor mínimo considerado pelo INMETRO para certificação de métodos, ou seja, igual a 0,99 (INMETRO, 2010). O desvio padrão dos resíduos foi igual a 0,0049. Dessa maneira, a resolução do método foi 0,093 mgO₃/L. O limite de detecção (LOD) igual a 0,14 mg O₃/L e o limite de quantificação (LOQ) igual a 0,48 mg O₃/L.

Como não foi observada diferença significativa entre as inclinações das duas curvas (em água tipo 1 e na matriz da amostra (água de torneira)), não foi observada interferência matricial para essa matriz. Para essa comparação foi utilizado o teste t-Student apresentado na Equação 50 (MEIER; ZUND, 2000). O valor calculado igual a 2,1, foi menor que o valor crítico (2,3), para um grau de liberdade igual a 15 e 95% de confiança em um teste bicaudal.

$$t_{\text{calc}} = \frac{|S_1 - S_2|}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}} \quad \text{Equação 50}$$

onde S_i é a inclinação e s_i é o quadrado da estimativa do desvio-padrão dessa inclinação.

A exatidão foi avaliada pelas recuperações obtidas, ou seja, foram 85 ± 10%, 96 ± 5%, 91 ± 6%, 96 ± 2% e 95 ± 4%, valores razoáveis para um método analítico.

4.4.1.2. Comparação com o método espectrofotométrico do índigo

Para verificar a eficiência do método para determinação de ozônio em águas por imagens digitais, este foi comparado ao método espectrofotométrico do índigo proposto pelo *Standard methods for the examination of water and wastewater* (APHA et al., 2005).

Foi construída uma curva analítica para o ozônio no comprimento de onda de máxima absorção (λ_{\max}) de 600 nm (Figura 48).

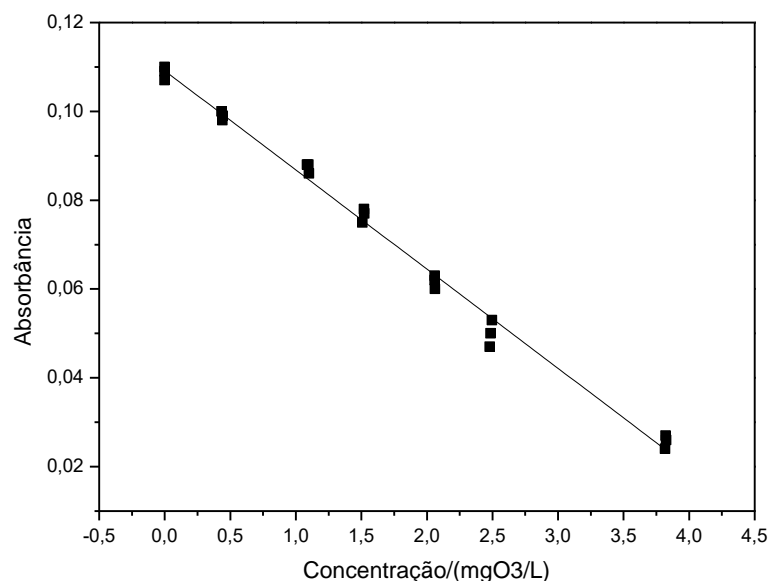


Figura 48. Curva analítica para o ozônio pelo método espectrofotométrico do índigo.

A equação da reta obtida para a curva analítica para o método espectrofotométrico do índigo está apresentada na Equação 51.

$$A = (109,1 \pm 0,9) \cdot 10^{-3} + (-22,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \cdot c(O_3) \quad \text{Equação 51}$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9912, enquanto que o desvio padrão dos resíduos, igual a 0,0026. Dessa maneira, a resolução do método foi 0,116 mgO₃/L. O limite de detecção (LOD) igual a 0,13 mgO₃/L e o limite de quantificação (LOQ) igual a 0,42 mgO₃/L.

Também foi construída uma curva analítica pelo método por imagens digitais utilizando o reagente índigo-trissulfonato e o filtro RED (aquele que apresentou um melhor ajuste), em que as concentrações conhecidas variaram de aproximadamente 0,5 – 4,5 mgO₃/L (Figura 49).

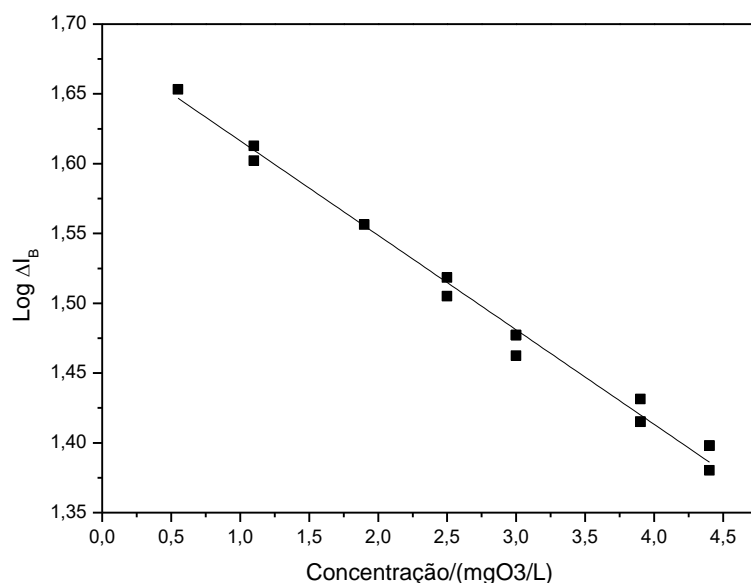


Figura 49. Curva analítica pelo método de análise por imagens digitais com o reagente índigo-trissulfonato.

A equação da reta obtida para a curva analítica pelo método de análise por imagens digitais com o reagente índigo-trissulfonato está apresentada na Equação 52.

$$\log \Delta I_B = (1684,1 \pm 3,8) \cdot 10^{-3} + (-67,7 \pm 1,4) \cdot 10^{-3} \cdot c(O_3) \quad \text{Equação 52}$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9921, enquanto que o desvio padrão dos resíduos, igual a 0,0081. Dessa maneira, a resolução do método foi 0,119 mgO₃/L. O limite de detecção (LOD) igual a 0,17 mgO₃/L e o limite de quantificação (LOQ) igual a 0,56 mgO₃/L.

Os métodos de análise por imagens digitais com o verde malaquita e o índigo-trissulfonato e o espectrofotométrico do índigo apresentaram valores similares de limite de detecção e de quantificação, como pode ser verificado na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação entre os métodos analíticos aplicados para determinação de ozônio em águas.

Métodos	R ²	LOD (mgO ₃ /L)	LOQ
Imagens digitais - verde malaquita	0,9940	0,18	0,58
Espectrofotométrico - índigo	0,9912	0,13	0,42
Imagens digitais - índigo	0,9921	0,17	0,56

4.4.2. Método de análise por imagens digitais para quantificação de hipoclorito com o verde malaquita

As figuras de mérito para quantificação de hipoclorito em águas com verde malaquita usando imagens digitais foram obtidas.

Utilizou-se a câmera com correção de branco e a distância de 20 cm da câmara à fonte. A obtenção do sinal digital foi realizada após 10 min da adição de 10,0 mL de solução de verde malaquita 15,0 µmol/L em tampão fosfato pH 6,0 sobre 5,0 mL de amostra diretamente na cubeta de vidro. A curva analítica foi construída para o filtro RED a partir da absorbância absoluta, ou seja, $\log \Delta I_B$ em função da concentração. A curva analítica obtida é apresentada na Figura 50.

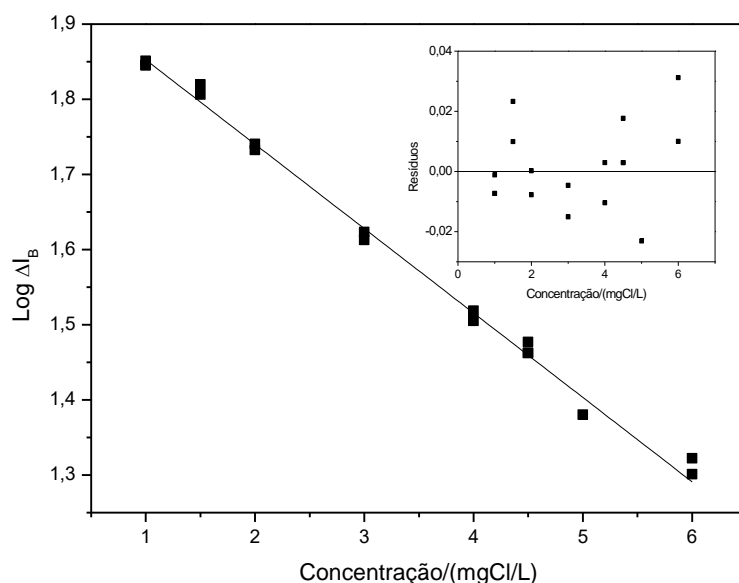


Figura 50. Curva analítica do método com verde malaquita em pH 6,0 para determinação de hipoclorito. Foi utilizado o filtro RED da *webcam* com correção de branco. Inserto: Gráfico de Resíduos.

O modelo da curva analítica da Figura 50 é apresentado na Equação 53.

$$\log \Delta I_B = (1964,7 \pm 7,0) \cdot 10^{-3} + (-112,3 \pm 1,9) \cdot 10^{-3} \cdot c(\text{ClO}^-) \quad \text{Equação 53}$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9938, que está de acordo com o valor mínimo considerado pelo INMETRO para certificação de métodos, ou seja, igual a 0,99 (INMETRO, 2010), enquanto que o desvio padrão dos resíduos, igual a 0,0152. Dessa maneira, a resolução do método foi 0,135 mgCl/L. O gráfico de resíduos, apresentado como inserto na Figura 46, em que verificou-se que os dados experimentais se ajustam bem ao modelo. O limite de detecção (LOD) igual a 0,19 mgCl/L foi baseado na estimativa do desvio-padrão do branco (s_B) da curva analítica de acordo com a definição pela IUPAC pela Equação 47.

O desvio-padrão em imagens digitais não pode ser obtido por medidas repetidas de uma solução isenta do analito pois o desvio padrão obtido é enviesado. Uma vez que as imagens digitais têm um intervalo de valores possíveis discretos maiores que zero e menores que 255, os valores próximos aos limites tendem a não apresentar uma distribuição normal. O limite de detecção mínimo possível parece ser aquela concentração referente a 1 *bit* de variação do canal. Nesse caso, esse limite mínimo possível seria 0,0039 mgCl/L.

O limite de quantificação (LOQ) igual a 0,62 mgCl/L foi calculado de acordo com a definição pela IUPAC apresentado na Equação 48. A partir do limite de quantificação, a faixa analítica foi de 0,62 mgCl/L a 6,0 mgCl/L.

Avaliou-se a repetitividade em duas concentrações diferentes (1,0 e 3,0 mgCl/L) e também a partir de uma amostra de água da torneira, sendo os valores do coeficiente de variação (CV) obtidos iguais a 0,71; 0,79 e 1,12%, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

4.4.2.1. Estudo de interferentes

Foi realizado o estudo de concomitantes (Fe^{3+} , Cu^{2+} , CO_3^{2-} , Mn^{2+} e Cl^-) para avaliar se estes poderiam causar interferência no método, sendo está avaliada através do teste t-Student, com 95% de confiança, que verifica a existência de diferença significativa entre a medida do branco e da solução contendo o concomitante. Na ausência de hipoclorito, nenhum íon estudado causou interferência (Tabela 9).

Tabela 9. Valores obtidos para absorvância absoluta do branco e com os íons concomitantes na ausência de hipoclorito.

Interferente	Respostas	Status
Fe^{3+}	1,849 ± 0,009	n sig
Cu^{2+}	1,865 ± 0,003	n sig
CO_3^{2-}	1,832 ± 0,010	n sig
Mn^{2+}	1,861 ± 0,003	n sig

Cl ⁻	1,849 ± 0,004	n sig
Branco	1,851 ± 0,013	

Entretanto, verificou-se a interferência de Fe³⁺ e Cu²⁺ na presença de hipoclorito. O uso de uma solução de EDTA 0,002 mol/L eliminou a interferência devido à complexação dos metais (Tabela 10). Logo, a interferência também foi considerada verificando a existência de diferença significativa entre a medida do branco e da solução contendo o interferente através de um teste t-Student, com 95% de confiança.

Tabela 10. Valores obtidos para absorvância absoluta do branco, com os interferentes (Fe³⁺ e Cu²⁺) e com os interferentes + EDTA, na presença de hipoclorito.

Condição	Log DI	Status
Branco	1,857 ± 0,012	
Fe ³⁺	1,368 ± 0,010	dif sig
Fe ³⁺ + EDTA	1,857 ± 0,012	n sig
Cu ²⁺	1,457 ± 0,009	dif sig
Cu ²⁺ + EDTA	1,879 ± 0,007	n sig

A exatidão do método foi verificada com um teste de adição e recuperação (RIBANI et al., 2004). Foram realizadas adições de volumes conhecidos de solução estoque de hipoclorito (7,0 a 70,0 µL) sobre amostras de água de torneira, de maneira que a concentração de hipoclorito adicionada foi entre 0,5 e 4,0 mgCl/L (em triplicata) para verificar se houve interferência matricial (Figura 51).

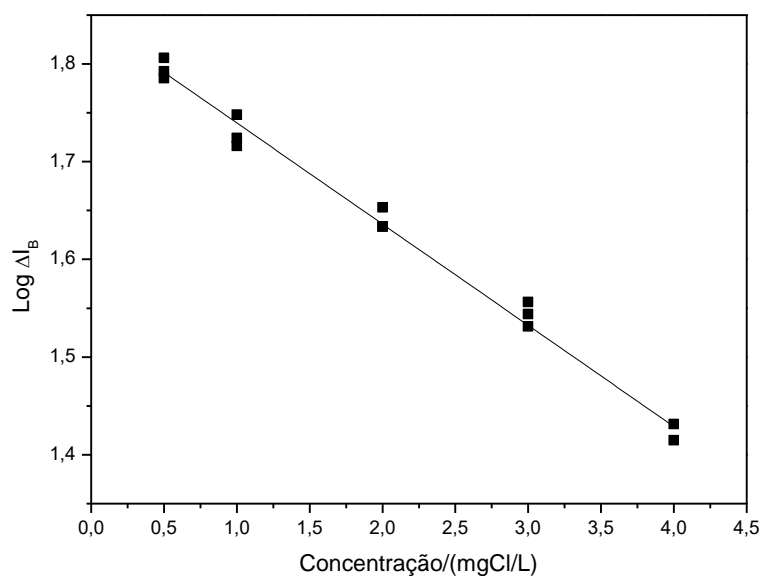


Figura 51. Curva analítica com amostras de água de torneira fortificadas com volumes conhecidos da solução estoque de hipoclorito.

A equação da reta obtida para a curva analítica para as amostras fortificadas está apresentada na Equação 54.

$$\log \Delta I_B = (1843,3 \pm 6,9) \cdot 10^{-3} + (-103,6 \pm 2,8) \cdot 10^{-3} \cdot c(\text{ClO}^-) \quad \text{Equação 54}$$

Sendo o coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9900, onde este apresenta-se acima do valor mínimo considerado pelo INMETRO para certificação de métodos, ou seja, igual a 0,99 (INMETRO, 2010). O desvio padrão dos resíduos foi igual a 0,0139. Dessa maneira, a resolução do método foi 0,135 mgCl/L. O limite de detecção (LOD) igual a 0,20 mgCl/L e o limite de quantificação (LOQ) igual a 0,67 mgCl/L.

Como foi observada diferença significativa entre as inclinações das duas curvas (Figuras 50 e 51) (em água tipo 1 e na matriz da amostra (água de torneira)), foi observada interferência matricial para essa matriz. Para essa comparação foi utilizado o teste t-Student apresentado na (Equação 50). O

valor calculado igual a 3,6, foi maior que o valor crítico (2,3), para um grau de liberdade igual a 15 e 95% de confiança em um teste bicaudal.

Logo, para eliminar a interferência matricial, foi construída uma nova curva analítica (Figura 52), adicionando-se EDTA 0,002 mol/L, com o intuito de formar complexos com os interferentes e estes não interferirem na reação do hipoclorito com o verde malaquita.

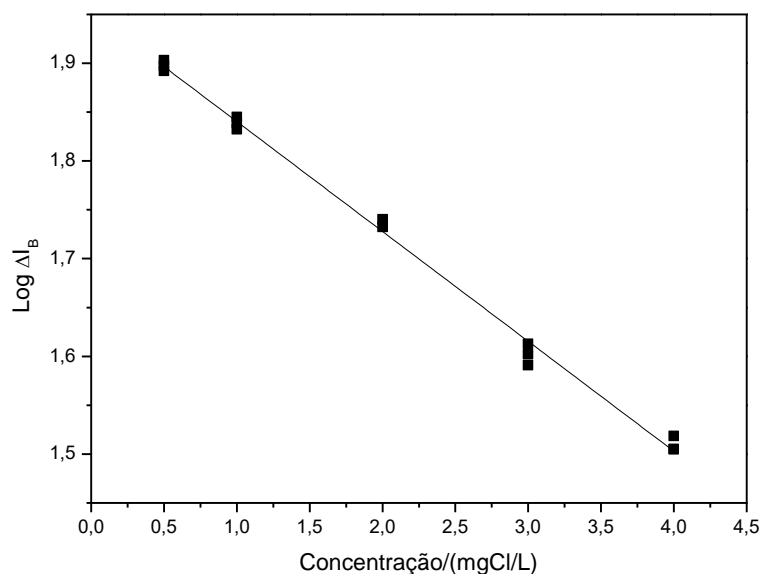


Figura 52. Curva analítica com amostras de água de torneira fortificadas com volumes conhecidos da solução estoque de hipoclorito e EDTA 0,002 mol/L.

A equação da reta para a curva analítica para as amostras fortificadas na presença de EDTA está apresentada na Equação 55.

$$\log \Delta I_B = (1952,8 \pm 5,1) \cdot 10^{-3} + (-112,5 \pm 2,1) \cdot 10^{-3} \cdot c(\text{ClO}^-) \quad \text{Equação 55}$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9953, enquanto o desvio padrão dos resíduos foi igual a 0,0103. Dessa maneira, a resolução do método foi 0,091 mgCl/L. O limite de detecção (LOD) igual a 0,14 mg mgCl/L e o limite de quantificação (LOQ) igual a 0,45 mg mgCl/L.

Como não foi observada diferença significativa entre as inclinações das duas curvas (Figuras 50 e 52) (em água tipo 1 e na matriz da amostra (água de torneira) com EDTA 0,002 mol/L), não foi observada interferência matricial para essa matriz. Para esta comparação foi utilizado o teste t-Student apresentado na (Equação 50). O valor calculado igual a 0,1, foi menor que o valor crítico (2,3), para um grau de liberdade igual a 15 e 95% de confiança em um teste bicaudal.

A exatidão avaliada pelas recuperações obtidas, ou seja, foram $119 \pm 10\%$, $112 \pm 6\%$, $102 \pm 2\%$, $108 \pm 3\%$ e $101 \pm 2\%$, valores razoáveis para um método analítico.

4.4.2.3. Comparação com o método espectrofotométrico da orto-tolidina

Para verificar a eficiência do método para determinação de hipoclorito em águas por imagens digitais, este foi comparado ao método espectrofotométrico da orto-tolidina.

Foi construída uma curva analítica do hipoclorito no comprimento de onda de máxima absorção (λ_{\max}) de 437 nm (Figura 53).

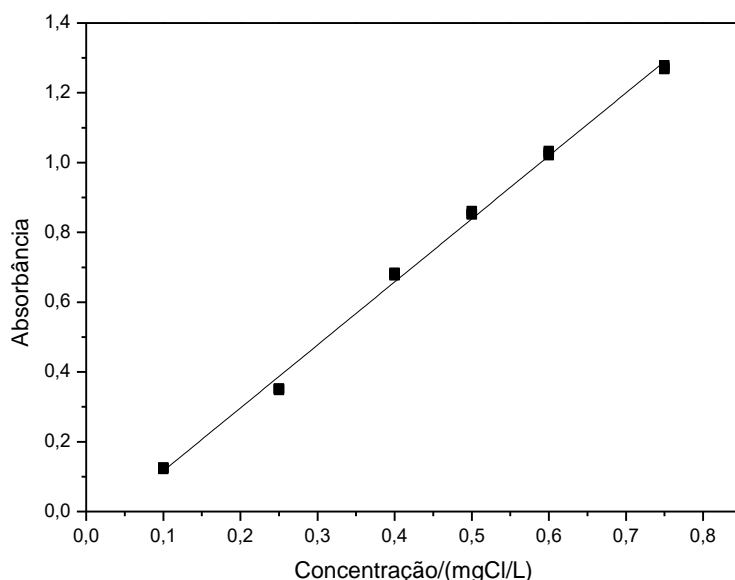


Figura 53. Curva analítica para o hipoclorito pelo método espectrofotométrico da orto-tolidina.

A equação da reta obtida para a curva analítica do método espectrofotométrico da orto-tolidina está apresentada na Equação 56.

$$A = (-6,4 \pm 1,2) \cdot 10^{-2} + (180,6 \pm 2,4) \cdot 10^{-2} \cdot c(\text{ClO}^-) \quad \text{Equação 56}$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9970, enquanto que o desvio padrão dos resíduos, igual a 0,0223. Dessa maneira, a resolução do método foi 0,0123 mgCl/L. O limite de detecção (LOD) igual a 0,020 mgCl/L e o limite de quantificação (LOQ) igual a 0,070 mgCl/L.

Também foi construída uma curva analítica pelo método por imagens digitais utilizando a orto-tolidina e o filtro BLUE (aquele que apresentou melhor ajuste) (Figura 54).

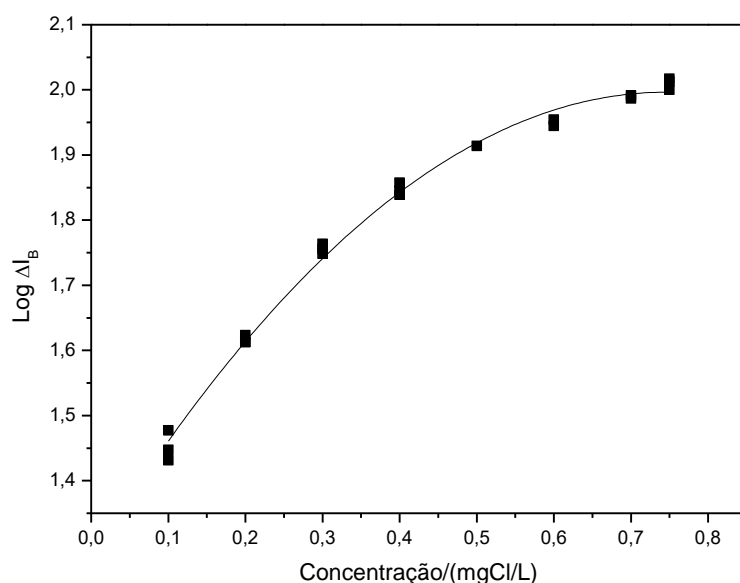


Figura 54. Curva analítica para o hipoclorito pelo método de análise por imagens digitais com a orto-tolidina.

A equação da reta obtida para a curva analítica pelo método de análise por imagens digitais com a orto-tolidina está apresentada na Equação 57.

$$\log \Delta I_B = (-128,2 \pm 1,2) \cdot 10^{-2} + (191,5 \pm 6,5) \cdot 10^{-2} \cdot c(\text{ClO}^-) + (-128,32 \pm 7,3) \cdot 10^{-2} \cdot c(\text{ClO}^-)^2$$

Equação 57

O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,9943, enquanto que o desvio padrão dos resíduos, igual a 0,0143. Dessa maneira, a resolução do método foi 1,490 mgCl/L. O limite de detecção (LOD) foi igual a 0,019 mgCl/L e o limite de quantificação (LOQ) igual a 0,062 mgCl/L.

Os métodos de análise por imagens digitais com o verde malaquita e a orto-tolidina e o espectrofotométrico da orto-tolidina apresentaram valores adequados de limite de detecção e de quantificação (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação entre os métodos analíticos aplicados para determinação de hipoclorito.

Métodos	R^2	LOD	LOQ
		(mgCl/L)	
Imagens digitais – verde malaquita	0,9938	0,19	0,62
Espectrofotométrico - orto-tolidina	0,9970	0,020	0,070
Imagens digitais – orto-tolidina	0,9943	0,019	0,062

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver métodos analíticos baseado na análise por imagens digitais para determinação de ozônio e hipoclorito em águas.

Testou-se diferentes reagentes (DPD, índigo-trissulfonato e verde malaquita) para verificar qual seria selecionado para o propósito do trabalho, sendo este o corante verde malaquita (VM).

A partir do estudo cinético para a reação do hipoclorito e das condições ótimas para as reações do ozônio e hipoclorito com o verde malaquita definidas com auxílio de um planejamento de multivariáveis baseado na Matriz de Doehlert, definiu-se que para determinação de ozônio a melhor condição foi o pH 4,5 e a concentração de VM de 22,5 $\mu\text{mol/L}$, onde a reação se completa imediatamente após a adição de todos os reagentes. Para a determinação de hipoclorito a melhor condição foi o pH 6,0 e a concentração de VM de 15,0 $\mu\text{mol/L}$, onde a reação demanda alguns minutos para se completar, logo definiu-se o tempo de 10 min para realização das análises após a adição de todos os reagentes.

Quanto ao método de análise por imagens digitais as melhores condições obtidas foram através do filtro RED, câmera com correção de branco, cubeta de vidro, distância da fonte de luz de 20 cm da câmara de análises e tratamento absorvância absoluta ($\log \Delta I_B$).

O método proposto para a determinação de ozônio apresentou faixa linear de 0,58 a 5,0 mgO_3/L , com sensibilidade analítica 0,0542 L/mgO_3 , coeficiente de determinação de 0,9940, limite de detecção de 0,18 mgO_3/L , resolução de 0,103 mgO_3/L e coeficiente de variação $\leq 0,88\%$. A interferência matricial não foi significativa. O método foi validado utilizando amostras de água de torneira fortificadas em diferentes níveis de concentração, e as recuperações alcançadas foram entre 85,0 e 96,0%.

O método proposto para a determinação de hipoclorito apresentou faixa linear de 0,62 a 6,0 mgCl/L , com sensibilidade analítica 0,1123 L/mgCl , coeficiente de determinação de 0,9938, limite de detecção de 0,19 mgCl/L , resolução de 0,135 mgCl/L e coeficiente de variação $\leq 1,12\%$. A interferência

matricial foi significativa, sendo esta verificada por meio de um teste t-Student, com 95% de confiança, logo está foi eliminada adicionando EDTA 0,002 mol/L às amostras. O método foi validado utilizando amostras de água de torneira fortificadas em diferentes níveis de concentração, e as recuperações alcançadas foram entre 101,0 e 119,0%.

Os métodos desenvolvidos mostraram bom desempenho analítico, com boa sensibilidade e limites de detecção e quantificação adequados, em comparação com outros métodos já utilizados. Os métodos foram otimizados com sucesso usando um planejamento de multivariáveis baseado na Matriz de Doehlert. Os métodos propostos são simples e rápidos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho, apresentaram informações para a realização de novos estudos com o intuito de aprimorar os métodos propostos. Desta forma, pretende-se:

- Desenvolver um método baseado na análise por imagens digitais para determinação simultânea de ozônio e hipoclorito em águas;
- Verificar se os íons Al^{3+} e NO_3^- podem causar interferência nos métodos desenvolvidos;
- Desenvolver uma câmara para análise desses analitos *in situ*;
- Desenvolver um aplicativo para celular para as análises;
- Desenvolver um sistema em fluxo baseado em imagens digitais para monitoramento de estações de tratamento;
- Estudar as variáveis da imagem digital (influência da fonte de luz, tipo de correção, tipo de função de resposta, dentre outras) para outras espécies absorventes; e
- Simular o comportamento das imagens digitais visando agilizar o desenvolvimento dos métodos de imagem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACD/LABS. Disponível em: <<https://ilab.acdlabs.com/iLab2>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

ANDRADE, C. E. O.; OLIVEIRA, A. F.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. A new spectrophotometric method for determination of EDTA in water using its complex with Mn (III). **Spectrochimica Acta part A: Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 168, p. 253-257, 2016.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A.; DURÁN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, p. 818-824, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION - AWWA; WATER ENVIRONMENT FEDERATION - WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington: American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation, 2005.

ARAÚJO, G. F. R.; TONANI, K.A.A.; JULIÃO, F.C.; CARDOSO, O.O.; ALVES, R.I.S.; RAGAZZI, M.F.; SAMPAIO, C.F.; SEGURA-MUÑOZ, S.I. Qualidade físico-química e microbiológica da água para o consumo humano e a relação com a saúde: estudo em uma comunidade rural no estado de São Paulo. **Revista O Mundo da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 98-104, 2011.

BAZZOLI, N. **O Uso da Desinfecção no Combate à Cólera**. Apostila da Fundação Nacional de Saúde – Coordenação Regional de Minas Gerais. Recife: FNS/Opas. (Mimeo.), 1993.

BERTOLINI, C. **Sistema para medição de cores utilizando espectrofotômetro**. 95 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências da Computação), Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2010.

BILANDZIC, N. et al. Malachite green residues in farmed fish in Croatia. **Food Control**, v. 26, p. 393–396, 2012.

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

CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; LÓPEZ-RUIZ, N.; MARTÍNEZ-OLMOS, A.; ERENAS, M. M.; PALMA, A. J. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: a tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 899, p. 23-56, 2015.

CASALI, C. A. **Qualidade da água para consumo humano ofertada em escolas e comunidades rurais da região central do Rio Grande do Sul**.

173 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.

CHEN, L. et al. Application of graphene-based solid-phase extraction for ultrafast determination of malachite green and its metabolite in fish tissues. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1383–1389, 2013.

CHIATTONE, P. V.; TORRE, L. M.; ZAMBIAZI, R. C. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 341-349, 2008.

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

COSTA, I. **Educação visual e tecnológica**. Disponível em: <<https://evtisabelcosta.files.wordpress.com/2010/11/pontilhismo.jpg>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

CURTI, K. C. F. **Estudo comparativo da degradação do inseticida endossulfan através de: ozônio, fotólise e ozonização fotolítica**. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

DIAS, F. C. **Uso do software image j para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais**. 145 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores), Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), São José dos Campos, 2008.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. São Carlos: Rima, 2005. 784 p.

DI BERNARDO, L.; DI BERNARDO, A.; CENTURIONE FILHO, P. L. **Ensaio de Tratabilidade de Água e dos Resíduos Gerados em Estações de Tratamento de Água**. São Paulo: Rima, 2002.

EWING, G.W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 1972. 312 p.

FAIR, G. M.; GEYER, J.C.; OKUN, D.A. **Purificación de aguas y tratamiento y remoción de aguas residuales**. México: Limusa, 1973. 764 p.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061 -1067, 2004.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. **Manual Técnico de análises de água para consumo humano**. Brasília. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 1999.

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

GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997.

GOMES, M. S.; TREVIZAN, L. C.; NÓBREGA, J. A. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química nova**, v. 31, n. 6, p. 1577-1581, 2008.

GORDON, G. The chemistry and reactions of ozone in our environment. **Progress in nuclear energy**, v. 29, p. 89-96, 1995.

GOTTSCHALK, C.; LIBRA, J. A.; SAUPE, A. **Ozonation of water and waste water: a practical guide to understanding ozone and its applications**. 2. ed. Weinheim: Wiley, 2009. 378 p.

GUENFOUD, F.; MOKHTARI, M.; AKROUT, H. Electrochemical degradation of malachite green with BDD electrodes: Effect of electrochemical parameters. **Diamond and Related Materials**, v. 46, p. 8–14, 2014.

GURLEY, B., Ozone: pharmaceutical sterilant of the future? **Journal of Parenteral Science and Technology**, v. 39, p. 256-261, 1985.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, San Diego, v. 37, n. 4, p. 453-460, 2004.

HASHIMOTO, J. C. et al. Considerations on the Use of Malachite Green in Aquaculture and Analytical Aspects of Determining the Residues in Fish: A Review. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 20, n. 3, p. 273–294, 2011.

HELBLING, D. E.; VANBRIESEN, J. M. Free chlorine demand and cell survival of microbial suspensions. **Water Research**, v. 41, n. 19, p. 4424-4434, 2007.

HELENO, F. F. **Ozonização: uma estratégia para remoção de resíduos de agrotóxicos em alimentos**. 86 f. Tese (Doutorado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

INMETRO. **INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA**. DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999

KIM, T. J.; SILVA, J. L.; CHAMUL, R. S.; CHEN, T. C. Influence of ozone, hydrogen peroxide, or salt on microbial profile, TBARS and color of channel catfish filets. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1210-1213, 2000.

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

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. **Ozone in water treatment: application and engineering**. Chelsea: AWWARF and Lewis Publishers, 1991. 568 p.

LANGLAIS, B. **Ozone in water treatment: application and engineering: cooperative research report**. 1. ed. Chelsea: CRC Press, 1991. 592 p.

LAPOLLI, F. R.; SANTOS, L. F.; HÁSSEMER, M. E. N.; AISSE, M. M.; PIVELI, R. P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In. GONÇALVES, R. F. (Coord.). **Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica**. Vitória: PROSAB, 2003. p. 169-208.

LEÃO, A. C. **Gerenciamento de cores para imagens digitais**. 135 f. Dissertação (Mestrado em Artes Visuais), Escola de Belas Artes, Belo Horizonte, 2005.

LEITE, F. N. **Calibração de dispositivos de cores utilizando uma câmera digital**. 58 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica), Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

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

LOPEZ-MOLINERO A.; LINAN D.; SIPIERA D.; FALCON R. Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 2, p. 380-385, 2010.

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

MEIER, P. C.; ZUND, R. E. **Statistical Methods in analytical chemistry**. 2. ed. Canadá: J. D. Winefordner, 2000. 456 p.

MEYER, S. T. O Uso de Cloro na Desinfecção de Águas, a Formação de Trihalometanos e os Riscos Potenciais à Saúde Pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, p. 99-110, 1994.

MINOLTA. **Precise color communication: color control from perception to Instrumentation**. Japan: Minolta Co. Ltd., 2007. 59 p.

MIRZAJANI, R.; AHMADI, S. Melamine supported magnetic iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄@Mel) for spectrophotometric determination of malachite green in water samples and fish tissues. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 23, p. 171–178, 2015.

MORRIS, J.C. Química del agua. In: FAIR, G. M.; GEYER, J.C.; OKUN, D.A. **Purificación de águas y tratamiento y remoción de aguas residuales**. México: Limusa, 1973. 764 p.

OLIVEIRA, A. F. **DOE-Doehlert2 - Versao Beta**. Disponível em: <http://www.deq.ufv.br/area/laboratorio_docente/11>. Acesso em: 15 dez. 2016.

OLIVEIRA, A. F. **Equilíbrio em solução aquosa orientado à aplicação**. Átomo: Campinas, 2009. 314 p.

OLIVEIRA, L. F. **Uso de imagens digitais e ferramentas quimiométricas para identificação e determinação de Cr (VI) em solos contaminados**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

OLIVEIRA, N. S.; OLIVEIRA, A. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A.A. Desenvolvimento de método não titulométrico para determinação de acidez em amostras de vinagre. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2017. No prelo.

PASCHOALATO, C. F. P. R.; TRIMAILOVAS, M. R.; DI BERNARDO, L. Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e peroxônio e pós-cloração em água contendo substância húmica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.13, p. 313-322, 2008.

RASBAND, W.S. **ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2016**. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 20 out. 2016.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICE, R. G.; ROBSON, C. M.; MILLER, G. W.; HILL, A. B. Uses of ozone in drinking water treatment. **Journal of the American Water Works Association**, v. 73, n. 1, p. 44-47, 1981.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826 p.

SANTOS, J. L.O. **Estratégias analíticas para determinação de nitrito e nitrato em matrizes ambientais e alimentícias, empregando análise de imagens digitais**. 130 f. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

SHAPLEY R.; HAWKEN M. Neural mechanisms for color perception in the primary visual cortex. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 4, p. 426-32, 2002.

SILVA, L. M.; JARDIM, W. F. Trends and strategies of ozone application in environmental problems. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 310-317, 2006.

SILVEIRA, I. C. T. **Cloro e ozônio aplicados a desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em DAPHNIA SIMILIS**. 168 p. Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental), Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8ª edição Norte-Americana, São Paulo: Thomson Learning, 2006. 1124 p.

SOARES, S.S.; ARRUDA, P. N.; LOBÓN, G. S.; SCALIZE, P. S. Avaliação de métodos para determinação de cloro residual livre em águas de abastecimento público. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 37, n. 1, p. 119-130, 2016.

SOLDAT, D. J.; BARAK, P.; LEPORE, B. J. Microscale Colorimetric Analysis Using a Desktop Scanner and Automated Digital Image Analysis. **Journal of Chemical Education**, v. 86, n. 5, p. 617-620, 2009.

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

THOMAS, C. **Espectro eletromagnético**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/fisica/espectro-eletromagnetico/>>. Acesso em: jan. 2017.

TORNQUIST, J. **Color y luz: teoría y práctica**. Barcelona: Gustavo Gili, 2008. 320 p.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**. 1999. Disponível em: <<http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternativedisinflectantsguidance.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

VIDAL, F. J. R. **Proceso de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización**. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 2003. 253 p.

XIE, J. et al. Determination of malachite green , crystal violet and their leucometabolites in fish by HPLC – VIS detection after immunoaffinity column cleanup. **Journal of Chromatography B**, v. 913-914, p. 123–128, 2013.

WICKRAMANAYAKE, G. B. Disinfection and sterilization by ozone. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection and sterilization and preservation**. 4. ed. Philadelphia: Lea and Febiyer, p. 182-190, 1991.

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