

LUIZ FELIPE APOLÔNIO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO E
DETERMINAÇÃO DE LEUCO VERDE MALAQUITA E VERDE MALAQUITA
EM ÁGUAS POR ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL EM SUPERFÍCIE
ADSORVENTE**

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
2015**

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

T

A644d
2015 Apolônio, Luiz Felipe, 1990-
Desenvolvimento de método para pré-concentração
e determinação de leuco verde malaquita e verde
malaquita em águas por análise de imagem digital em
superfície adsorvente / Luiz Felipe Apolônio. - Viçosa,
MG, 2015.

xvi, 58f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Espectrofotometria. 2. Química analítica.
3. Adsorção. 4. Cores - Análise. 5. Corantes. 6. Imagens
digitais. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-graduação
em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 543.55

LUIZ FELIPE APOLÔNIO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO E
DETERMINAÇÃO DE LEUCO VERDE MALAQUITA E VERDE MALAQUITA
EM ÁGUAS POR ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL EM SUPERFÍCIE
ADSORVENTE**

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: 1 de dezembro de 2015

Fernanda Fernandes Heleno

Renata Pereira Lopes Moreira

Antônio Augusto Neves
(Coorientador)

Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Coorientadora)

André Fernando de Oliveira
(Orientador)

“Seremos julgados pela coragem
dos nossos corações”

Sense8

*Dedico este trabalho a
minha mãe, Geralda, por todo
amor, incentivo e apoio em todos
os momentos de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Quero aproveitar para dizer que nada na vida se conquista sozinho. A pesquisa é difícil, mas surpreendente, e todo esforço vale a pena. O mais importante é a aprendizagem. E como existem coisas a serem aprendidas, por isso, serei sempre um aprendiz!

A Deus, pela vida, e principalmente pela força e coragem na superação dos momentos difíceis;

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

A minha família, em especial a minha mãe Geralda pelo apoio e orações, a minha vó Rosária pelo suporte em momentos difíceis.

Ao Prof. André Fernando, pela orientação, amizade e paciência; aos meus coorientadores: Prof.^a Maria Eliana e ao Prof. Antônio Augusto, pelos ensinamentos e momentos de descontração.

Aos membros da banca:

Aos amigos do Laqua, pelo companheirismo e receptividade;

A todos aqueles que contribuíram de forma direta e indiretamente nesse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Luiz Felipe Apolônio, filho de Geralda Perpetua Luiza Ferreira e José Luiz Apolônio, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 21 de novembro de 1990.

Em março de 2009 iniciou o Curso de Licenciatura Plena em Química na Universidade do Estado de Minas Gerais, diplomando-se em fevereiro de 2013.

Em agosto de 2013 ingressou no programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química Analítica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de dissertação em dezembro de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. Introdução	1
1.1 Aquicultura no Brasil	2
1.2 Verde malaquita na aquicultura.....	4
1.3 Aspectos químicos	5
1.4 Aspectos toxicológicos	6
1.5 Legislação e Fiscalização	7
1.6 Métodos de análises e pré-concentração.....	8
1.7 Análises por imagens digitais.....	9
1.8 Análise de Componentes Principais – PCA	10
1.9 Regressão Linear Múltipla – MLR	13
1.10 Objetivos	14
1.10.1 Objetivos Gerais	14
1.10.2 Objetivos Específicos.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Material, reagentes e soluções.....	15
2.2 Instrumentação.....	15
2.2.1 Método espectrofotométrico no UV-Vis	15
2.2.2 Cabine fotográfica para análise por imagem.....	16
2.3 Procedimento experimental.....	16
2.3.1 Caracterização do verde malaquita e leuco verde malaquita em solução aquosa por espectrofotometria no UV-Vis	16

2.3.1.1 Faixa linear do instrumento.....	16
2.3.1.2 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do instrumento.....	17
2.3.1.3 Comportamento do verde malaquita em solução aquosa	17
2.3.2 Desenvolvimento do método de pré-concentração em filme adsorvente..	17
2.3.2.1 Avaliação dos componentes do filme adsorvente	18
2.3.2.2 Otimização da extração no filme	18
2.3.2.2.1 Efeito do tempo na adsorção.....	18
2.3.2.2.2 Influência do pH na adsorção no filme	18
2.3.2.3 Software ImageJ na análises das imagens.....	19
2.3.3 Oxidação do leuco verde malaquita	20
2.3.4 Tratamento de dados multivariados	20
2.3.4.1 Análise de Componentes Principais – PCA	20
2.3.4.2 Regressão Linear Simples e Múltipla – MLR	21
2.3.5 Figuras de Mérito	21
2.3.5.1 Seletividade	21
2.3.5.2 Faixa de trabalho do método	21
2.3.5.3 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LQ) do método	22
2.3.5.4 Precisão	22
2.3.5.5 Exatidão	22
2.3.6 Determinação de VM em amostras de águas	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.1 Caracterização do Verde Malaquita e Leuco Verde Malaquita em solução aquosa	24
3.1.1 Espectrofotometria no UV-Vis.....	24
3.1.1.1 Faixa analítica do método espectrofotométrico.....	24
3.1.1.2 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do aparelho	26
3.1.2 Comportamento do verde malaquita em solução aquosa	26

3.1.3	Otimização da confecção do filme	28
3.1.3.1	Suporte	29
3.1.3.2	Adesivo	30
3.1.3.3	Adsorvente	30
3.1.4	Otimização da extração no filme	32
3.1.4.1	Efeito do tempo na adsorção do VM no adsorvente	32
3.1.4.2	Influência do pH na adsorção do verde malaquita no filme.....	33
3.1.5	Análise por imagens	34
3.1.5.1	Curvas analíticas e linearidade da resposta do método	34
3.1.5.1.1	Análise de Componentes Principais	36
3.1.5.1.2	Regressão Linear Múltipla	38
3.1.5.2	Oxidação do leuco verde malaquita	39
3.1.5.3	Figuras de Mérito	43
3.1.5.3.1	Seletividade	43
3.1.5.3.2	Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método	49
3.1.5.3.3	Precisão	50
3.1.5.3.4	Exatidão	51
3.1.5.4	Determinação de VM em amostras de águas ambientais	54
4.	Conclusão	54
5.	Referências Bibliográficas	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- VM – Verde malaquita
- LVM – Leuco verde malaquita
- SPE – Extração em fase sólida
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CG/MS – Cromatografia líquida com detector de massa
- CG/MS-MS – Cromatografia líquida com detector de massa massa
- UV/Vis – Espectrofotometria no ultravioleta/visível
- RGB – Sistema de representação de cores, com três canais red (R), green (G) e blue (B).
- L – Sistema de representação de cores em escala de cinza (grey)
- MLR – Regressão linear múltipla
- PCA – Análise de componentes principais
- PC1 – Primeira componente principal
- LOD – Limite de detecção
- LOQ – Limite de quantificação
- S_{res} – Desvio padrão dos resíduos
- % R – Porcentagem de recuperação
- DP – Desvio padrão
- CV – Coeficiente de variação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução da produção e da renda gerada pela aquicultura brasileira durante o período de 1984 a 2004 (Fonte: OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).....	3
Figura 2. Estruturas químicas do verde de malaquite (A) e leuco verde malaquite (B).	6
Figura 3. Representação matricial da análise de componentes principais.	11
Figura 4. Representação geométrica de duas componentes principais em um espaço com três variáveis (3D). (Fonte: TEÓFILO, 2007).	12
Figura 5. Cabine fotográfica utilizada na produção das imagens.	16
Figura 6. Histogramas dos canais RGB de imagem obtidos com o programa <i>ImageJ</i>	19
Figura 7. Espectros de absorção do (a) verde malaquita em concentração $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (b) leuco verde malaquita em concentração $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, em solução aquosa.	24
Figura 8. Curva analítica preparada a partir de soluções padrão de VM na faixa de concentração $2,0$ a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtidas por espectrofotometria na região do visível ($\lambda = 618$).	25
Figura 9. Curva analítica preparada a partir de soluções padrão de LVM na faixa de concentração 10 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtidas por espectrofotometria, na região do ultravioleta ($\lambda = 256$).	25
Figura 10. Espectros do verde malaquita $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em função do tempo nos valores de pH: (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 7,0; (d) 10,0.	27
Figura 11. Comportamento do VM em solução aquosa em função do pH no decorrer do tempo. Concentração inicial: $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda = 618$	28
Figura 12. Filme empregado na adsorção do VM em fase sólida.	29
Figura 13. Suportes utilizados na confecção dos filmes (a) polipropileno e (b) acetato de celulose.	29
Figura 14. Filmes produzidos com adesivo (a) epóxi (Araldite) e (b) silicone acético em suporte de acetato de celulose.	30
Figura 15. Adsorção do VM em florissil, sílica 60 e resina XAD-7. Concentração de VM: $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, pH próximo de 6, dose de adsorvente de $0,5 \text{ g} / 100 \text{ mL}$	31
Figura 16. Adsorção do verde malaquita em florissil. Solução de VM $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 100 mL . Massa de florissil $0,5 \text{ g}$. $\lambda = 618$	33
Figura 17. Influência do pH na adsorção de verde malaquita $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ no filme (área de 2 cm^2), em função do (a) número de <i>bits</i> ; (b) concentração.	33
Figura 18. Filmes utilizados na produção da curva analítica para VM. Concentração: $0,10$ a $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$. Volume: 100 mL . Filmes 2 cm^2 . pH: $5 - 7$. Tempo de agitação: 60 min	34
Figura 19. Curvas analíticas para o verde malaquita nas concentrações $0,10$ a $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os canais R (a) e G (b).	35

Figura 20. Curvas analíticas para o verde malaquita nas concentrações 0,10 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os canais B (c) e L(d).....	35
Figura 21. Curva analítica para o verde malaquita nas concentrações 0,10 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os canais RGB e L.....	37
Figura 22. Curvas analíticas para o leuco verde malaquita, após oxidação, nos canais R (a), G (b), B (c) e L (d).	40
Figura 23. Curvas analíticas para o LVM, após oxidação, e compressão dos dados de RGB e L por PCA.....	41
Figura 24. Estruturas dos corantes avaliados com interferentes: (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.....	43
Figura 25. Estudo de seletividade para o verde malaquita no canal R, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.	44
Figura 26. Curvas analíticas para o verde malaquita no canal G, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.	45
Figura 27. Curvas analíticas para o verde malaquita no canal R, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.	46
Figura 28. Curvas analíticas para o verde malaquita no canal L, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM e LVM.	26
Tabela 2. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM nos canais RGB e L.	36
Tabela 3. Parâmetros da curva analítica obtidas para o VM utilizando a primeira componente principal como resposta nos canais RGB e L.....	38
Tabela 4. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM nos canais RGB e L, e para o PCA.	41
Tabela 5. Porcentagens de recuperação (% R), e coeficiente de variação (CV) para os canais RGB e L, e para o PCA e MLR nos ensaios de oxidação do LVM.	42
Tabela 6. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM no canal R, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.....	44
Tabela 7. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM no canal G na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.....	45
Tabela 8. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM no canal B na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.....	46
Tabela 9. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM no canal L, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.....	47
Tabela 10. Porcentagens de recuperação (% R), e coeficiente de variação (CV) para os canais RGB e L, e para o PCA e MLR nos ensaios com os corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.	48
Tabela 11. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) das curvas analíticas dos canais RGB e L, e para o PCA e o MLR.	49
Tabela 12. Porcentagens de recuperação (% R), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os canais RGB e L, para o PCA e o MLR.	50
Tabela 13. Porcentagens de recuperação (% R), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os canais RGB e L, para o PCA e o MLR.	51
Tabela 14. Avaliação da exatidão do método, para os ensaios de recuperação e coeficiente de variação.	53

RESUMO

APOLÔNIO, Luiz Felipe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2015.
Desenvolvimento de método para pré-concentração e determinação de leuco verde malaquita e verde malaquita em águas por análise de imagem digital em superfície adsorvente. Orientador: André Fernando de Oliveira.
Coorientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Antônio Augusto Neves.

O verde malaquita (VM) é um corante da classe dos trifenilmetanos, bastante eficaz no tratamento de parasitas, infecções por fungos e bactérias em peixes e em ovos de peixes. Após absorvido pelo organismo, nos peixes, o VM é rapidamente reduzido à forma Leuco Verde Malaquita (LVM) e acumulado no tecido adiposo. Entretanto, devido à sua toxicidade em seres humanos, o seu uso na aquicultura tem sido proibido em vários países, mas decorrente do seu baixo custo e sua alta eficácia antifúngica este ainda está sendo usado ilegalmente. Desta maneira, é importante a existência de métodos analíticos simples e com baixos limites de detecção, de preferência portáteis, para auxiliar na fiscalização ambiental. Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método simples e portátil utilizando pré-concentração em superfície adsorvente e análise por imagem digital para a determinação de verde malaquita (VM) e leuco verde malaquita (LVM) em águas. As condições ótimas de produção e extração no filme foram avaliadas. O processamento das imagens digitais foram realizadas com auxílio do *software ImageJ*, onde as imagens foram decompostas em histogramas de cor, os quais descrevem a distribuição estatística dos pixels como uma função do componente da cor gravada, obtidas em sistema de cor RGB e L (*grey*). Inicialmente foram estabelecidas as condições ótimas de pH das amostras e tempo de adsorção. Foram obtidas curvas analíticas a partir de cada canal de cor, onde os parâmetros do sistema RGB e L foram utilizados para os modelos de regressão linear múltipla (MLR) e simples, e também, os valores do escore da primeira componente após aplicado a análise de componentes principais (PCA). O método apresentou curvas analíticas com coeficientes de determinação acima de 0,99 e a faixa analítica de 0,10 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação do método estabelecido para VM variaram de 0,023-0,030 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,069-0,091 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente. O limite de quantificação obtido é cerca de 3 vezes menor que os valores mínimos esperados de 0,27 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,1 ppm) em

ambientes aquáticos destinados a aquicultura, quando empregado o tratamento com VM. A repetitividade apresentou coeficientes de variação entre 1,8 e 4,9%, e apresentou precisão intermediária com coeficiente de variação máximo de 3.6%. A exatidão avaliada pelo método de recuperação apresentou coeficientes de variação entre 0,06 e 15,11%, e valores de recuperação entre 102,5 e 122,1%. O método se mostrou eficiente para análise de VM em águas com porcentagens de recuperação maiores que 70 % e baixos limites de quantificação.

ABSTRACT

APOLÔNIO, Luiz Felipe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december 2015. **Development of a method for pre-concentration and determination of malachite green leuco and malachite green in water by digital image analysis in adsorbent surface.** Advisor: André Fernando de Oliveira. Co-advisors: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and Antônio Augusto Neves.

Malachite green (MG) is a dye of the triphenylmethane class, highly effective in the treatment of parasites, fungal and bacterial infections in fish and fish eggs. After absorbed by the body, the fish, the MG is rapidly reduced to the form leuco malachite green (LMG) and accumulated in the adipose tissue. However, because of its toxicity in humans, its use in aquaculture has been banned in several countries, but due to its low cost and its high efficacy of antifungal agents that are still being used illegally. Thus, it is important to have simple analytical methods and low limits of detection, portable preferably to assist in environmental monitoring. This work was developed and validated a simple and portable using pre-concentration on adsorbent surface and analysis by digital image for the determination of malachite green (MG) and leuco malachite green (LMG) in water. The optimum conditions for the production and extraction in the film were evaluated. The digital image processing were performed using the ImageJ software, where images are decomposed into color histograms which describe a statistical distribution of pixels as a recorded color component function obtained RGB and L color system (gray). Initially establishes the pH of excellent conditions of samples and time of adsorption. analytical curves from each color channel have been obtained, where the parameters of the RGB and L system were used for the multiple linear regression models (MLR) and simple, and also the score of the values of the first component after applied to analysis principal components (PCA). The method presented analytical curves with correlation coefficients above 0.99 and the analytical range from 0.10 to 1.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The limits of detection and quantification method established for VM ranged from 0.023 to 0.030 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and from 0.069 to 0.091 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectively. The limit of quantification is about 3 times lower than the minimum expected value of 0.27 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0.1 ppm) in aquatic environments for aquaculture, when employed treatment with MG. The repeatability showed coefficients of variation between 1.8

and 4.9%, and showed intermediate precision with maximum coefficient of variation of 3.6%. The accuracy evaluated by the recovery method showed coefficients of variation between 0.06 and 15.11%, and recovery values between 102.5 and 122.1%. The method was efficient for MG analysis in waters with higher recovery percentages than 70% and low limits of quantification.

1. Introdução

A aquicultura no Brasil mostrou expressiva evolução desde os anos 1990, com taxas de crescimento superiores às de criações de bovinos e aves. Com a finalidade de alcançar uma maior produtividade, sistemas de cultura intensiva de peixe são empregados. A cultura intensiva tem como consequência uma maior susceptibilidade dos animais a doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e parasitas. A reduzida disponibilidade de medicamentos veterinários aprovados para uso na aquicultura no Brasil tem levado os piscicultores ao uso indiscriminado de várias substâncias químicas com atividade antimicrobiana, como o corante verde malaquita (VM) (HASHIMOTO et al., 2011; SANTOS, 2007).

O verde malaquita é corante orgânico da família dos trifenilmetanos. É utilizado como um corante de indústria têxtil e também bastante eficaz no tratamento de parasitas, infecções por fungos e bactérias em peixes e em ovos de peixes. Após absorvido pelo organismo, nos peixes, o VM é rapidamente reduzido à forma leuco verde malaquita (LVM) e depositado no tecido adiposo (BILANDZIC et al., 2012; CHEN et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2011).

Entretanto, a presença de resíduos desses compostos representa um risco para a saúde humana e meio ambiente devido à sua toxicidade. Tem havido associação da sua presença em peixes com a formação de tumores no fígado e a efeitos carcinogênicos, de maneira que o uso do VM como microbicida tem sido abolido em vários países. Entretanto ainda é usado ilegalmente devido ao seu baixo custo e sua alta eficácia antifúngica, o que pode ser um dos principais motivos de barreiras para a comercialização no país e para exportação (HASHIMOTO et al., 2011).

Devido à preocupação dos efeitos adversos do VM em animais aquáticos, destinados a alimentação, e a saúde humana, faz-se, necessários desenvolvimentos de métodos analíticos sensíveis e seletivos para a determinação de VM em amostras reais, tais como amostras de águas e amostras de tecido de peixes (CHEN et al., 2013; MIRZAJANI; AHMADI, 2015; XIE et al., 2013).

Embora vários trabalhos descrevam a aplicação de novos procedimentos analíticos para a detecção e determinação do verde malaquita em tecidos de espécies de peixes, relativamente, apenas poucos métodos foram desenvolvidos para monitorar resíduos de VM em água de piscicultura e em amostras de tecidos de peixes. Na maioria dos casos, os procedimentos para a análise utilizam a cromatografia líquida e técnicas de pré-concentração que são empregados a partir de amostras de peixes a partir sequenciais etapas de extração (MIRZAJANI; AHMADI, 2015; MITROWSKA; POSYNIAK; ZMUDZKI, 2008).

O uso de imagem digital tornou-se cada vez mais importante devido à capacidade de realizar análises rápidas e de baixo custo. A cor é uma das características mais importantes da imagem porque contém a informação elementar de uma imagem armazenada nos pixels. A reprodução de cor em sistemas digitais pode ser efetuada por sistemas de cores, tais como o RGB, CYMK, HSI dentre outros (COSTA et al., 2015; PAULA; LIMA, 2014; ZHENG; SUN; ZHENG, 2006).

A extração em fase sólida (SPE) é a técnica mais comumente utilizada para pré-concentração de analitos em várias matrizes, devido às suas vantagens: como elevado fator de enriquecimento, rápida separação de fase, baixo custo, baixo consumo de solventes orgânicos e capacidade de combinação com diferentes técnicas de detecção (MIRZAJANI; AHMADI, 2015).

Dessa maneira, é necessário o desenvolvimento de um método simples, mas de baixo limite de detecção para auxiliar na fiscalização de criações de peixes. Neste trabalho foi proposto um método de pré-concentração em superfície adsorvente e de determinação por análise de imagem de leuco verde malaquita e verde malaquita em águas.

1.1 Aquicultura no Brasil

A aquicultura é uma das atividades com mais rápido crescimento de produção de alimentos do mundo. Dados da Organização para Agricultura e Alimentação (FAO) das Nações Unidas para o período entre 1960 e 2012 indicaram que a produção global aumentou a uma taxa de aproximadamente

20 milhões de toneladas por ano, atingindo, em 2012, esses valores da ordem 160 milhões de toneladas, sendo que cerca da metade produzido por aquicultura e a outra metade, por extrativismo. A aquicultura teve um grande desenvolvimento a partir da década de 80, quando representava cerca de 10% da produção total (FAO, 2014).

O Brasil é considerado um dos países que apresentam o maior potencial no mundo para a produção aquícola, devido à extensão do seu território, com 2/3 localizados em regiões tropicais, além da quantidade privilegiada de recursos hídricos, com destaque para bacia Amazônia, que é responsável por 20% da água doce disponível no mundo (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

Atualmente, o Brasil é o segundo país mais importante da América do Sul para a aquicultura, com taxas de crescimento superiores à média mundial desde 1995. Aquicultura apresenta uma taxa de crescimento maior do que a pesca extrativista, e destaca-se em relação a produção de aves, suínos, e gado (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

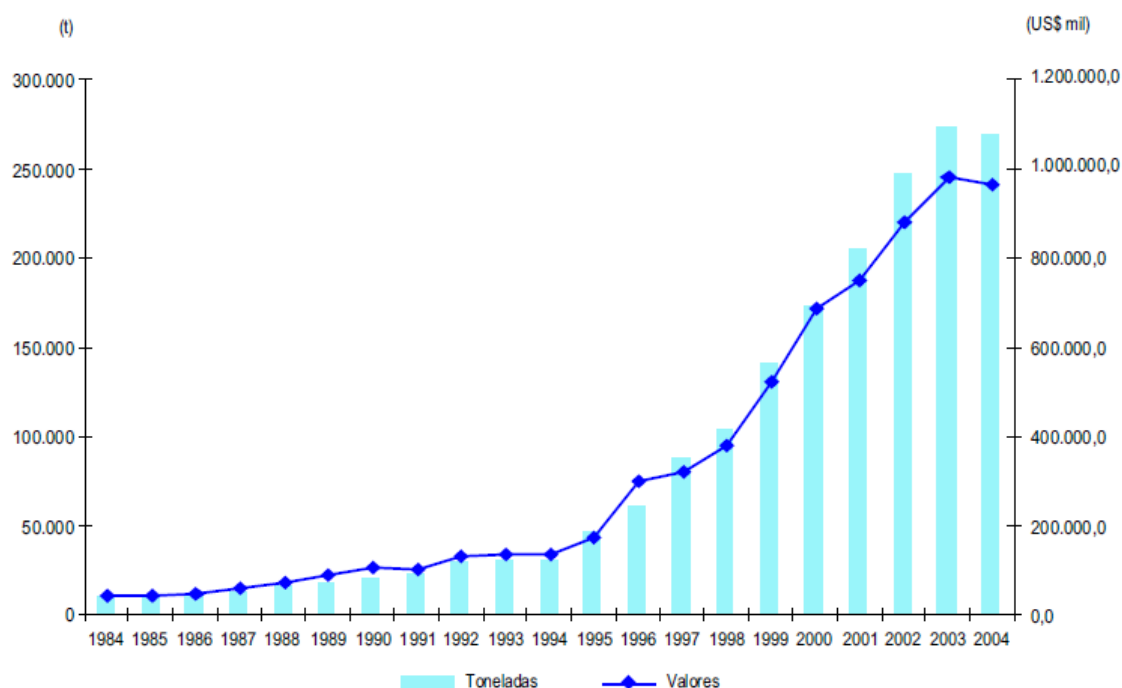


Figura 1. Evolução da produção e da renda gerada pela aquicultura brasileira durante o período de 1984 a 2004 (Fonte: OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

Ao longo dos últimos anos, a aquicultura tem desempenhado um papel importante na balança comercial no Brasil, devido à produção de peixes, crustáceos e moluscos. Essa contribuição é devido principalmente a investimentos dos piscicultores em estruturas de produção intensiva, frente a subjugada estagnação da cultura de pesca extrativa (HASHIMOTO et al., 2011).

Aquicultura no Brasil é baseada principalmente em regimes de produção intensiva, em grande parte por tanques escavados. As larvas e alevinos são colocados em lagoas e alimentados durante todo o período de crescimento. Também é comum o uso de gaiolas de peixes instalados em reservatórios e grandes lagoas (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

As doenças mais comuns que afetam a cultura de peixe são causadas por agentes patogênicos facultativos. Estas doenças são especialmente comuns em peixes submetidos ao estresse crônico. As principais causas de estresse estão diretamente relacionadas a má qualidade da água, a práticas inadequadas de criação e a rações de baixa qualidade que não atendam as necessidades nutricionais das diferentes espécies de peixes, aumentando, desta forma, as chances de ocorrência de doenças e consequente altas taxas de mortalidade (SANTOS, 2007).

Os resultantes da intensificação dessas condições são caracterizados por modificações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais, com um possível aumento na susceptibilidade aos processos infecciosos causados por agentes patogênicos como vírus, bactérias, fungos, e parasitas (SANTOS, 2007).

Uma das dificuldades relacionadas com a prevenção e tratamento de doenças em peixes no Brasil são a falta de legislação específica e de medicamentos veterinários aprovados para uso na aquicultura (HASHIMOTO et al., 2011).

1.2 Verde malaquita na aquicultura

O verde malaquita (VM) é um corante diamina trifênil metileno, originalmente usado na indústria têxtil e também amplamente utilizado na piscicultura desde o início da década de 1930 (BILANDZIC et al., 2012; CHEN

et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2011; MIRZAJANI; AHMADI, 2015; XIE et al., 2013).

Sua alta dissipação é decorrente de sua ampla atividade antimicrobiana e a sua eficiência na prevenção e tratamento de certos tipos de doenças de peixes. O VM é capaz de inibir os ectoparasitas e o desenvolvimento de fungos em ovos, larvas de peixe e peixe adulto. Ao ser absorvido pelos peixes o VM é metabolicamente reduzido a um composto não polar e incolor conhecido como leuco verde malaquite (LVM). A maior parte dos resíduos de VM em tecido de peixe são encontrados na forma de LVM, que se acumulam nos tecidos adiposos (AFKHAMI; MOOSAVI; MADRAKIAN, 2010; CHEN et al., 2013; WU et al., 2007; XIE et al., 2013).

Assim, devido a problemas de saúde dos peixes causados pelo confinamento, carência de medicamentos adequados, e aliados à falta de informações científicas sobre tratamentos alternativos para controlar as doenças de peixes, têm levado ao uso indiscriminado de substâncias como o VM por muitos piscicultores de todo o mundo, apesar do perigo e restrições para seu uso em peixes cultivados para consumo humano (HASHIMOTO et al., 2011).

Os programas de monitoramento e inspeção em ação em vários países já emitiram notificações referentes a barreiras às importações, devido à presença de resíduos de VM em produtos da aquicultura. No Brasil, existem poucos dados disponíveis sobre o controle dos resíduos de VM em peixes, mas não há evidência do uso desta substância na piscicultura (HASHIMOTO et al., 2011).

1.3 Aspectos químicos

O verde de malaquita ou 4-[(4-dimetilaminofenil)-fenil-metil]-N,Ndimetil-anilina (IUPAC) é um pigmento catiônico sintético da classe trifenilmetano usado para tingir seda, lã, juta, couro, algodão e papel. Também é usado em baixas concentrações, mínimo de 0,1 ppm ($0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$), como agente fungicida e ectoparasiticida na aquicultura desde o início da década de 1930 (BILANDZIC et al., 2012; CHEN et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2011; MIRZAJANI; AHMADI, 2015; XIE et al., 2013).

As estruturas químicas do VM e do seu produto de biotransformação (LVM) são demonstradas na Figura 2.

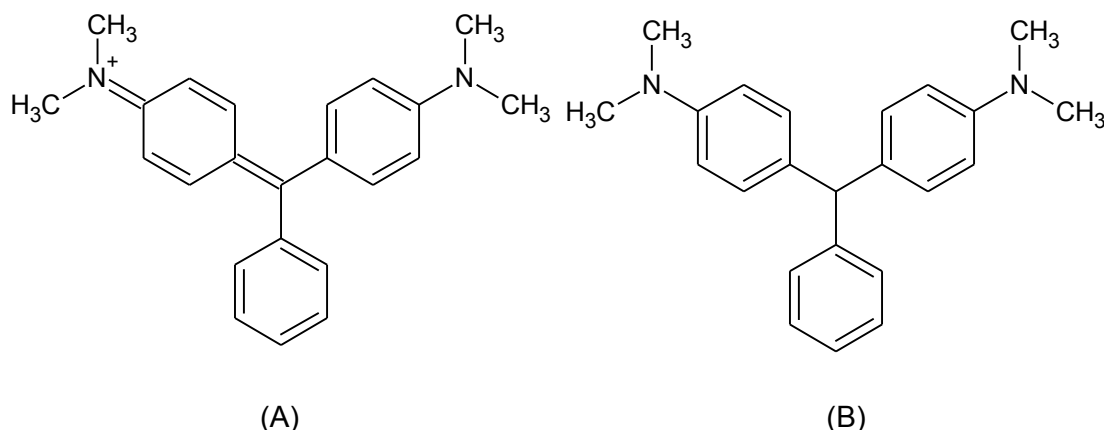


Figura 2. Estruturas químicas do verde de malaquite (A) e leuco verde malaquite (B).

O VM tem comportamento ácido base monoprotico de Bronsted, com pKa estimado entre 3,7 e 4,8 (ACD/LABS, 2015). Entretanto soluções desse corante são amarelas em valores de pH inferiores a 1, verdes para um pH entre 2 e 12, e incolor para um pH superior a 12 (GUENFOUD; MOKHTARI; AKROUT, 2014). O VM não possui alta biodegradação, de maneira que sua DBO₅ é praticamente igual a zero.

O LVM também apresenta comportamento ácido-base de Bronsted, com duas aminas aromáticas. Seus valores de pKa são muito próximos, com estimativas com pK₁ igual a $4,7 \pm 0,4$ e pK₂ igual a $5,5 \pm 0,4$ (ACD/LABS, 2015).

1.4 Aspectos toxicológicos

Resíduos de verde malaquita persistem no ambiente e podem causar toxicidade aguda para um vasto grupo de animais aquáticos e terrestres, resultando em sérios riscos para a saúde pública e um potencial problema ambiental. Vários efeitos já foram reportados em peixes como carcinogênese, teratogênese, redução da fertilidade e toxicidade respiratória (BILANDZIC et al., 2012; MIRZAJANI; AHMADI, 2015; SRIVASTAVA; SINHA; ROY, 2004).

Os estudos clínicos e experimentais indicam que em mamíferos o VM atua como um composto tóxico em múltiplos órgãos. Entre outros efeitos, foram

citados: alterações renais em coelhos; em ratos verificou-se redução no crescimento e fertilidade; além de danos no fígado, baço, rim e coração; lesões de pele, olhos, pulmões e ossos; e efeitos teratogênicos e carcinogênicos (BILANDZIC et al., 2012; SRIVASTAVA; SINHA; ROY, 2004).

1.5 Legislação e Fiscalização

A definição de resíduo pela legislação da União Europeia inclui substâncias farmacologicamente ativas, seus metabólitos e outras substâncias que podem ser transferidas aos produtos de origem animal e que podem ser perigosos para a saúde humana.

O Regulamento n.º 2377/90 do Conselho da Comunidade Europeia, estabelece limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos produtos de origem animal para consumo humano, requer que somente as substâncias farmacologicamente ativas aprovadas podem ser utilizadas para tratamento veterinário. São definidas quatro categorias de substâncias farmacologicamente ativas e o verde malaquita está incluído no Anexo IV, que enumera as substâncias que não têm limites máximos determinados, pois as mesmas são proibidas para aplicação em animais utilizados para consumo humano (COMISSÃO EUROPEIA, 1990).

Em 2002, a Comissão Europeia publicou a Diretiva 2002/657/CE, que lida com o desempenho de métodos e interpretação dos resultados analíticos, e define os limites máximos de resíduos (LMR) e limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) aplicável a determinação de contaminantes em alimentos. E a Diretiva 2004/25/CE acrescenta um LMDR igual a 2 mg kg^{-1} para a soma de VM e LVM nos produtos da aquicultura à diretiva anterior.

Diretiva FAO 07/2005/QD-BTS também inclui MG na lista de compostos químicos banidos utilizados na aquicultura (FAO, 2005).

No Brasil, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal – PNCRC Animal foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51 de 06 de maio de 1986, e adaptado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O plano tem programas específicos para o controle de resíduos em carne, leite, mel e peixe, resultantes da utilização de agrotóxicos e

medicamentos veterinários ou devido a acidentes envolvendo contaminantes ambientais (BRASIL, 1995).

1.6 Métodos de análises e pré-concentração

Numerosos métodos estão disponíveis para a determinação de VM e LVM em tecidos de espécies aquáticas. Mas relativamente poucos métodos foram desenvolvidos para monitorar resíduos de VM e LVM na água (CHEN et al., 2013; MITROWSKA; POSYNIK; ZMUDZKI, 2008; XIE et al., 2013).

A maioria dos protocolos analíticos para a determinação de VM e LVM em produtos aquáticos são baseados em cromatografia líquida em combinação com espectrometria de massa (LC-MS), sendo o método mais utilizado para a detecção e quantificação de VM, devido à sua alta sensibilidade (menor limite de detecção), precisão, e pequena influência de interferentes (HASHIMOTO et al., 2011; XIE et al., 2013).

Outros métodos incluem cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica e com detecção espectrofotométrica após extração em fase sólida magnética (MSPE) ou de extração em ponto de nuvem; além da eletroforese capilar e imunoenaios (ELISA) (AFKHAMI; MOOSAVI; MADRAKIAN, 2010; CHEN et al., 2013; MITROWSKA; POSYNIK; ZMUDZKI, 2008; XIE et al., 2013)

A exatidão da quantificação de VM e LVM foram melhoradas através da utilização de LC-MS/MS, com etapas de extração em fase sólida (SPE) e de procedimentos de *clean up*. No entanto, devido a questões relacionadas com a extração e estabilidade do analito, a análise de VM e LVM para matrizes complexas é ainda um desafio. Assim, o pré-tratamento da amostra continua a ser um passo importante no caso de análise de resíduos de alimentos (CHEN et al., 2013; XIE et al., 2013).

A SPE é a técnica mais comum utilizada para pré-concentração de analitos em várias matrizes devido às suas vantagens: como elevado fator de enriquecimento, rápida separação de fase, baixo custo, baixo consumo de solventes orgânicos e capacidade de combinação com diferentes técnicas de detecção. Em SPE, o adsorvente desejado é um fator importante para obter uma boa recuperação e alto fator de enriquecimento (CHEN et al., 2013).

1.7 Análises por imagens digitais

A imagem digital na química analítica tornou-se cada vez mais importante devido à sua capacidade de realizar determinações rápidas e de baixo custo. As imagens digitais podem ser obtidas a partir de diversos dispositivos, incluindo câmeras digitais, *webcams*, *scanners* e até mesmo *smartphones*. O uso de imagens digitais pode substituir o sistema visual humano em métodos semiquantitativos, baseados na comparação da cor com uma escala, eliminando a subjetividade da análise, que é substancialmente influenciado por condições ambientais e sujeito a inconsistências (COSTA et al., 2015; PAULA; LIMA, 2014).

Nos dispositivos, a imagem é capturada por uma matriz 2D de detectores após sua focalização pelo uso de lentes e após atravessar três filtros em paralelo, obtendo-se assim 3 “cores” para cada pixel (unidade de ponto da imagem). Comparado com instrumentos analíticos clássicos, é como se, para cada pixel da imagem existissem três fotômetros de filtro. E assim como nos fotômetros, uma boa linearidade é obtida para cromóforos com larga banda de absorção na região do visível do espectro eletromagnético (COSTA et al., 2015; PAULA; LIMA, 2014).

A faixa de intensidade de luz de cada canal armazenada é segmentada em 256 níveis, o que é similar a instrumentos analíticos com conversores analógico-digital (ADC) de 8 bits, muito comuns até a início do século XX, quando conversores de 10 bits (1024 níveis) ou 12 bits (4096 níveis) se tornaram mais comuns. Além disso, a sensibilidade dos sensores pode ser alterada pelo aumento de sua corrente elétrica nos sensores, de maneira similar à sensibilidade em filmes fotográficos (COSTA et al., 2015; PAULA; LIMA, 2014; ZHENG; SUN; ZHENG, 2006).

Os três filtros utilizados, visam mimetizar a percepção de cor do ser humano e são formados pelas chamadas cores primárias: azul, verde e vermelho. O tratamento matemático das informações contidas em cada pixel permite obter diversas informações sobre a “cor”. O sistema de cor RGB correspondente à forma como as câmeras detectam e exibem uma cena. Existe uma série de tipos de sistemas de cores, mas os sistemas de cores

Red-Green-Blue (RGB), Matiz-Saturação-Intensidade (HSI) e escala de cinza (grey) são os sistemas de cores mais utilizados (COSTA et al., 2015; PAULA; LIMA, 2014; ZHENG; SUN; ZHENG, 2006).

Há diversos softwares para analisar imagens, fornecendo várias informações não apenas de cada pixel, mas da imagem como um todo. Para fins analíticos, as imagens digitais são decompostas em histogramas de cor, que descrevem a distribuição estatística dos pixels como uma função do componente de cor gravada; eles têm sido utilizados com sucesso como dados de entrada para a classificação e qualidade de vegetais, cervejas e refrigerantes, chás, méis, cafés e de bactérias (COSTA et al., 2015; DIAS, 2008; PAULA; LIMA, 2014; ZHENG; SUN; ZHENG, 2006).

1.8 Análise de Componentes Principais – PCA

O PCA é fundamentalmente um método de tratamento de dados formados por várias variáveis e várias respostas, de maneira a extrair novas variáveis (*loadings*) e respostas (*scores*), em número menor, mas que ainda explique a maior porcentagem de variância possível. Ela auxilia, portanto, no estabelecimento de hipóteses sobre possíveis relações existentes entre as variáveis e respostas. Em algumas situações, essas novas variáveis e respostas podem ser usadas para a calibração multivariada, onde vários analitos são quantificados simultaneamente.

Do ponto de vista da álgebra linear, o PCA é um método utilizado para projetar dados multivariados em um espaço de dimensão menor reduzindo, assim, a dimensionalidade do espaço original do conjunto dos dados, sem que as relações entre as amostras sejam afetadas, evidenciando as informações relevantes dos dados. O PCA realiza o que é chamado de compressão dos dados, onde uma perda controlada de informações é compensada por uma melhora na compreensão do conjunto de dados (FERREIRA, 2015).

O PCA realiza a compressão dos dados, quando considerado espaço tridimensional, dispostos de n variáveis, é projetado os dados em um espaço de menor dimensão. A proposta da PCA é expressar as informações mais significativas contidas nas variáveis originais em um pequeno número de novas

variáveis, as então, chamadas componentes principais (PC) (FERREIRA, 2015).

Do ponto de vista matemático, o procedimento da análise de componentes principais pode ser descrito como a decomposição de matriz $X(I \times J)$ em duas matrizes, uma de escores T e uma matriz de loadings (ou pesos) P (Equação 1).

$$X = TP^t \quad (1)$$

Onde os escores expressam as relações entre as amostras, enquanto os loading indicam as relações entre as variáveis. Essa decomposição equivale a uma mudança de base do espaço das variáveis originais, de dimensão J , R^J , para o espaço das componentes principais, também definido no R^J . Cada uma das J colunas da matriz P define a direção de um eixo, isto é, de uma componente principal no novo conjunto base (FERREIRA, 2015).

O princípio geométrico básico do PCA está em produzir uma aproximação da matriz de dados X , em termos do produto de duas matrizes T e P^t conforme a Equação 2.

$$\hat{X} = T_h P_h^t \quad (2)$$

Em que o subscrito h representa o número do truncamento (rank) das matrizes, isto é, quantas componentes foram usadas para reconstruir a matriz X , definida por $\hat{X}$.

$$\begin{matrix} & J \\ \boxed{\hat{X}} & \\ I & \end{matrix} = \begin{matrix} & h \\ \boxed{T} & \\ I & \end{matrix} \times h \begin{matrix} & J \\ \boxed{P^t} & \\ h & \end{matrix}$$

Figura 3. Representação matricial da análise de componentes principais.

Como mostrado na Figura 3 a matriz T , de escores, o número de linhas é igual ao número de linhas da matriz original, usualmente o número de amostras. O número de colunas é igual ao número h de componentes significativos nos dados, e pode ser qualquer número entre 1 e $\min \{I, J\}$. O

número de componentes significativos é comumente definido como a dimensionalidade intrínseca dos dados ou posto químico da matriz original. Na matriz P^t , de loadings, o número de colunas é igual ao número de colunas na matriz original, usualmente o número de variáveis. O número de linhas corresponde ao número de componentes principais h (FERREIRA, 2015; TEÓFILO, 2007).

Cada componente é construída a partir da combinação das variáveis originais. Em termos matemáticos, a contribuição de cada eixo original para uma componente principal é o cosseno do ângulo entre o eixo da variável com o eixo da componente. Os valores destes cossenos são os loadings e variam na faixa de -1 a 1 (FERREIRA, 2015; TEÓFILO, 2007).

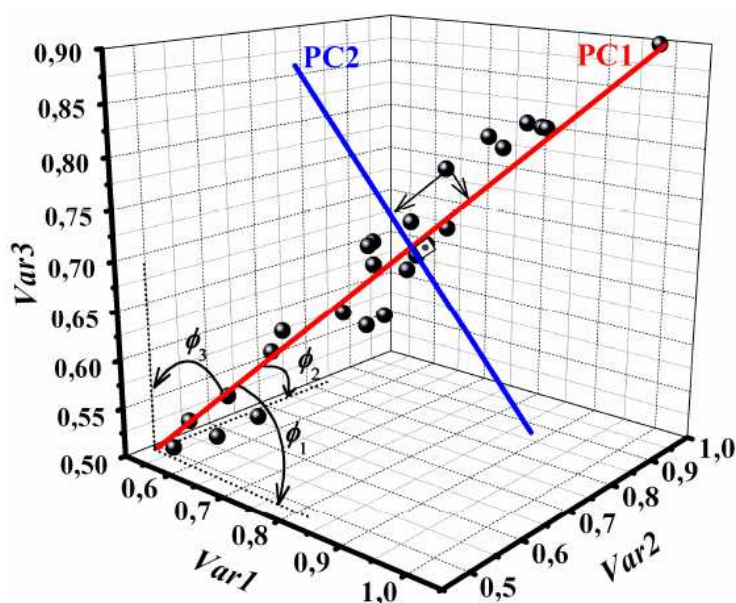


Figura 4. Representação geométrica de duas componentes principais em um espaço com três variáveis (3D). (Fonte: TEÓFILO, 2007).

A direção da primeira componente principal descreve o espalhamento máximo das amostras (linhas), ou seja, a quantidade máxima de variação possível dos dados e pode ser definida como o melhor ajuste da reta no espaço multidimensional. A próxima componente, perpendicular à primeira (Figura 4), captura a variância comum em sua direção e em menor quantidade

que a primeira e assim sucessivamente, sendo calculadas em ordem decrescente de significância (FERREIRA, 2015; TEÓFILO, 2007).

Apos à reorientação das coordenadas do sistema de maneira a obter a máxima variância comum, a maioria das informações dos dados pode ser capturada por um pequeno número de componentes, que compacta as informações, eliminando as redundâncias e correlações nos dados originais (FERREIRA, 2015; TEÓFILO, 2007). Segundo Ferreira (2015), havendo correlação entre as variáveis originais, nem todas as componentes principais são necessárias para representar adequadamente os dados, mas apenas um subconjunto delas, as restantes devem conter informações irrelevantes ou aleatórias.

1.9 Regressão Linear Múltipla – MLR

A regressão linear múltipla (MLR) é um método estatístico de regressão onde várias variáveis são linearmente relacionadas a uma resposta. A diferença entre a regressão linear simples e a múltipla é que no MLR são tratadas duas ou mais variáveis explicativas. Ainda que seja considerado um método linear, um aspecto interessante na regressão linear múltipla é a possibilidade de avaliar termos quadráticos ou de interação entre as variáveis. O MLR é indicado quando é verificado um numero pequeno de variáveis não correlacionadas linearmente entre si (FERREIRA et al., 1999).

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e otimizar um método para a determinação de leuco e verde malaquita em água através de análise por imagem digital em superfície adsorvente.

1.10.2 Objetivos Específicos

Avaliar os componentes para a confecção de filme adsorvente para a extração e pré-concentração de VM em amostras de água;

Otimizar as condições experimentais para o processo de extração do VM no filme adsorvente de amostras de água;

Realizar a obtenção e processamento das imagens digitais dos filmes obtidos após extração do VM de amostras de água.

Relacionar as informações das imagens digitais (valores dos canais RGB e L) com a concentração de VM em amostras de água.

Avaliar diferentes modelos de curva analítica a partir dos dados de imagem digitais, a citar, regressão linear simples, múltipla (MLR) e análise de componentes principais (PCA);

Realizar um procedimento de oxidação do LVM (forma incolor) em VM (forma cromática);

Validação do método otimizado e aplicação e amostras de águas de lagoas do campus da Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa – MG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material, reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas em água tipo 1 (MilliQ-Millipore).

Foram preparadas soluções estoques de verde malaquita (VM) (Sigma-Aldrich) e leuco verde malaquita (LVM) (Sigma-Aldrich) com concentração de $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. As soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas a partir da diluição desta matriz.

Para o preparo da solução de LVM, à massa medida foram adicionadas gotas de etanol (Vetec) de maneira a garantir a formação de uma pasta. A pasta foi então dissolvida em água destilada.

Solução tampão citrato foi preparada ajustando-se o pH de uma solução de ácido cítrico (Vetec) com soluções de ácido clorídrico ($1,2 \text{ mol L}^{-1}$, Vetec) e hidróxido de sódio ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$, Vetec) e o volume completado com água, formando uma solução citrato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ no pH desejado.

Para a confecção e otimização do filme adsorvente foram utilizados florissil, sílica 60 e resina XAD-7, todos da marca Merck; adesivo silicone transparente neutro (Tekved) e adesivo epóxi (Araldite®); e placa de polipropileno e acetato de celulose como suportes.

Para a realização de teste de oxidação do LVM foram utilizados os oxidantes: ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzóico, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio; e também o iodeto de potássio, todos os reagentes da marca Merck.

Para se avaliar a seletividade do método selecionou os corantes: violeta de metila, azul de bromotimol e alaranjado de metila, no qual se preparou uma solução estoque para cada corante na concentração $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$.

2.2 Instrumentação

2.2.1 Método espectrofotométrico no UV-Vis

O espectro de absorção do verde malaquita e seu metabólico leuco verde malaquita foram obtidos na faixa de comprimento de onda entre 200 nm e 1100 nm, utilizando um espectrofotômetro Agilent modelo 8453.

2.2.2 Cabine fotográfica para análise por imagem

Para produção das imagens foi confeccionado uma cabine fechada constituída de papelão com 10 cm de altura, e com uma lâmpada fluorescente de 15 W de potência, e sem influência de fatores externos para realização das fotografias e geração das imagens. Foi utilizado um smartphone com uma câmara de 8 megapixels, posicionado a câmara sobre a abertura localizado no topo da caixa .



Figura 5. Cabine fotográfica utilizada na produção das imagens.

2.3 Procedimento experimental

2.3.1 Caracterização do verde malaquita e leuco verde malaquita em solução aquosa por espectrofotometria no UV-Vis

2.3.1.1 Faixa linear do instrumento

A faixa de trabalho foi verificada pelas curvas analíticas do fungicida verde malaquita nas concentrações de 2,0 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para o leuco verde malaquita, as concentrações foram 10,0 a 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após a análise espectrofotométrica, foi construída uma curva analítica, relacionando os valores das absorbâncias, com as concentrações dos analitos. A faixa de trabalho foi avaliada a partir de parâmetros de ajuste a regressão linear.

2.3.1.2 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do instrumento

Foram construídas curvas analíticas contendo VM nas concentrações na faixa de 2,0 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. E para LVM foram construídas curvas analíticas nas concentrações faixa de 10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção e quantificação foram calculados através dos parâmetros da curva analítica, na qual podem ser expressos pelas Equações 3 e 4.

$$LOD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (3)$$

e

$$LOQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (4)$$

Onde,

s = estimativa do desvio padrão da resposta do termo linear da equação;

S = inclinação da curva analítica.

2.3.1.3 Comportamento do verde malaquita em solução aquosa

O estudo para avaliar o comportamento do verde malaquita (VM) em função do pH, foi realizado para valores de pH de 2, 4, 7 e 10. Esses valores foram ajustados com soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Foram adicionados aos béqueres 50,0 mL de uma solução de VM com concentração de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com pH previamente ajustado. O comportamento foi avaliado por meio de leituras no espectrofotômetro na região do visível, durante intervalo de tempo de 0 a 120 min.

2.3.2 Desenvolvimento do método de pré-concentração em filme adsorvente

Foi produzido um filme, com a superfície recoberta por um adsorvente. O filme foi preparado utilizando um suporte, onde foi depositado uniformemente em toda a superfície um adesivo e em seguida uma camada do adsorvente foi espalhada sobre o adesivo e deixado secar durante 24 h. Após o tempo de secagem o filme foi lavado, seco a temperatura ambiente, e recortado em forma de quadrado com área de 2 cm^2 .

2.3.2.1 Avaliação dos componentes do filme adsorvente

O acetato de celulose e o polipropileno foram avaliados como suporte para a confecção do filme adsorvente. O silicone acético e o epóxi foram avaliados como adesivos na composição do filme adsorvente.

O florisil, a sílica 60 e a resina XAD-7 foram avaliados como adsorventes na produção do filme adsorvente, foram realizados ensaios para se avaliar a capacidade de adsorção dos adsorventes selecionados. Foi pesado uma massa de 0,5 g do adsorvente e adicionado a um béquer contendo 100,0 mL de uma solução de VM com concentração de $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, sob agitação. Durante o intervalo de tempo de 0 a 220 minutos, alíquotas de 5,0 mL foram retiradas, centrifugadas (2 min) e analisadas no espectrofotômetro na região do visível ($\lambda = 618 \text{ nm}$) e retornadas ao béquer, a cada 5 minutos.

2.3.2.2 Otimização da extração no filme

2.3.2.2.1 Efeito do tempo na adsorção

Após selecionado o adsorvente, foi realizado um ensaio para se avaliar sua capacidade de adsorção. Foram pesados 0,5 g do adsorvente e adicionados em 100 mL de uma solução de VM de concentração $40 \mu\text{mol L}^{-1}$. O processo de adsorção foi acompanhado por medições em intervalos de tempo de 5 min de alíquotas (5 mL) no espectrofotômetro, durante 60 min.

2.3.2.2.2 Influência do pH na adsorção no filme

O estudo para avaliar a influencia do pH na adsorção do verde malaquita (VM) no filme, foi realizado para valores de pH que variaram de 3 a 10. Esses valores foram ajustados com soluções de ácido clorídrico ($1,2 \text{ mol L}^{-1}$) e hidróxido de sódio ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$). Foram adicionados a um béqueres de 100,0 mL uma solução de VM com concentração de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ com pH previamente ajustado. Posteriormente um filme adsorvente de área de 2 cm^2 , foi adicionado a esta solução e mantida sob agitação. Os filmes ficaram em contato com a solução durante 24 h. Após esse período os filmes foram retirados, secos e levados para cabine fotográfica onde foram produzidas as imagens.

2.3.2.3 Software ImageJ na análises das imagens

Para análise das imagens, foi utilizado o programa *ImageJ* de código aberto desenvolvido por Wayne Rasband, do U. S. National Institute of Health (NIH), em plataforma Java. O programa possui diversas ferramentas de processamento e análise de imagens, como ajuste de brilho e contraste, segmentação e análise, medição de distâncias e ângulos, entre outras (RASBAND, 2015). As imagens obtidas via câmera fotográfica do smartphone foram carregadas no programa mencionado, sendo selecionado a área total do filme e em seguida aplicado o comando “*Analyze – Histogram*”, para obter os valores médios dos canais RGB (*red, green e blue*) e L (*grey*) das áreas. A Figura 6 apresenta exemplos de histogramas obtidos com este comando.

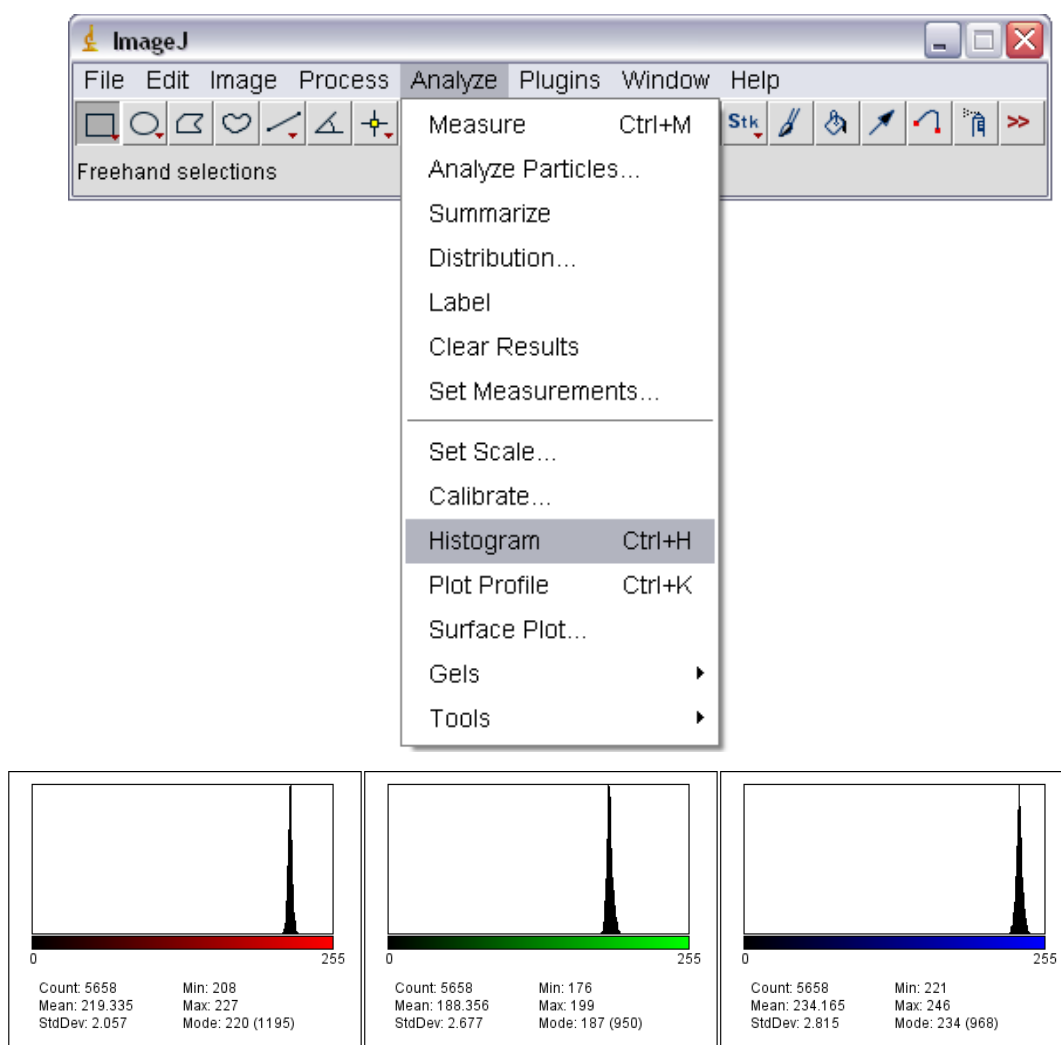


Figura 6. Histogramas dos canais RGB de imagem obtidos com o programa *ImageJ*.

2.3.3 Oxidação do leuco verde malaquita

A etapa de oxidação de leuco verde malaquita teve intuito de converter todo LVM, que é incolor, em sua forma cromática VM. Dessa maneira, foi introduzida no método a etapa de oxidação e seguida pela etapa de adsorção e análise da imagem.

Foram testados os oxidantes: ácido dinitrosalicílico (ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzóico), peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio na presença e ausência de catalisador Iodeto de potássio.

Em béqueres foram adicionados 100 mL das amostras 0,10 - 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LVM e 0,5 mL da solução 0,01 mol L^{-1} do oxidante e deixado sobre agitação durante 6 h, em mesa agitadora. Após este procedimento as amostras foram utilizadas nas etapas de adsorção.

2.3.4 Tratamento de dados multivariados

O uso de métodos matemáticos e estatísticos tem sido de grande valia na química, proporcionando um aproveitamento máximo dos resultados disponíveis quando produzidos no ambiente atual científico, com inúmeras ferramentas aplicadas a análises químicas, acoplado a um crescente desenvolvimento computacional e consequente alta complexidade dos dados obtidos.

A aplicação de métodos matemáticos a um conjunto de dados por natureza multivariada permite uma simplificação do mesmo no sentido de comprimir o espaço dimensional a que este está confinado, possibilitando dessa forma uma melhor interpretação e visualização.

Neste trabalho foram aplicados dois métodos de tratamento de dados multivariados, o PCA e o MLR, com objetivos de obter uma única informação, neste caso, a concentração de VM em solução, com base no conjunto de dados obtidos, isto é, as respostas para os quatros canais estudados, RGB e L.

2.3.4.1 Análise de Componentes Principais – PCA

Para realizar a compressão dos dados através da Análise de Componentes Principais utilizou-se o software Matlab com PLS toolbox, sendo

selecionados os escores das componentes principais que representaram a maior variância dos dados. Com a nova matriz de dados obtidos através das componentes principais foi montada uma curva analítica para determinação de VM.

2.3.4.2 Regressão Linear Simples e Múltipla – MLR

Para a construção dos modelos de regressão linear simples e múltipla para determinação da concentração de VM foram utilizados as informações geradas pelos canais RGB e L, o cálculo foi realizado pelo software Origin Pro 8.

2.3.5 Figuras de Mérito

2.3.5.1 Seletividade

Para se avaliar a seletividade do método selecionou os corantes: violeta de metila, azul de bromotimol e alaranjado de metila, no qual se preparou uma solução estoque para cada corante na concentração $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A seletividade refere-se à capacidade de detecção do analito sobre a presença de vários corantes, na mesma concentração deste ($0,25$ e $0,75 \mu\text{mol L}^{-1}$). A seletividade foi avaliada através da % de recuperação, considerando os modelos lineares para cada canal do sistema RGB e L, e para escore da primeira componente principal obtido pela compressão de dados realizada por PCA e as respostas obtidas pelo modelo MLR. Foram avaliados os corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

2.3.5.2 Faixa de trabalho do método

A faixa de trabalho foi verificada pelas curvas analíticas do fungicida verde malaquita nas concentrações de $0,10$ a $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$. A partir de ensaios de adsorção, onde cada filme, de 2 cm^2 foi colocado em contato com 100 mL de solução em diferentes concentrações de VM e mantidas sobre agitação durante 60 min . Foram construídas curvas analíticas de acordo os valores de RGB e L, os valores de escore obtidos pela compressão de dados realizada por PCA e as respostas obtidas pelo modelo MLR versus concentração (mol L^{-1}). Deste modo, as determinações da concentração do VM nos filmes durante os ensaios realizados foram obtidas através do processamento das imagens e

obtenção dos valores dos canais de RGB e L. A faixa de trabalho foi avaliada pelo coeficiente de determinação determinado pela regressão linear.

2.3.5.3 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LQ) do método

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não essencialmente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser realmente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através dos parâmetros da curva analítica, obtidas para cada canal de cor na faixa de 0,10 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, no qual podem ser expressos pelas Equações 3 e 4.

2.3.5.4 Precisão

A precisão do método foi verificada sob condições de repetibilidade e precisão intermediária.

Amostras ($n=7$) foram fortificadas com 0,75 mL de uma solução de concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o verde malaquita para uma concentração final 0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em um volume de 100 mL de amostra.

Para avaliar a precisão intermediária, foram realizadas nove ensaios nas mesmas condições preparadas para o estudo da repetibilidade, utilizando os mesmos equipamentos, pelo mesmo analista e no mesmo laboratório, modificando apenas os dias de análise. Após o primeiro dia, o procedimento foi repetido sete dias e 30 dias depois.

2.3.5.5 Exatidão

Entre as maneiras de avaliar a exatidão de um método, os ensaios de recuperação são os mais utilizados. Nos ensaios de recuperação, 100 mL de amostra de água foram fortificadas com 1,00, 0,75, 0,50 e 0,25 e 0,10 mL de uma solução de concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o verde malaquita. Os valores das recuperações obtidas nos ensaios foram utilizados para avaliar este parâmetro.

2.3.6 Determinação de VM em amostras de águas

Foram testadas amostras de águas de duas lagoas do Campus da Universidade Federal de Viçosa na cidade de Viçosa – MG, as amostras coletadas foram filtradas em filtro de 0,45 µm e armazenadas a 4 °C. Foi aplicado o método otimizado para a determinação de VM nas amostras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do Verde Malaquita e Leuco Verde Malaquita em solução aquosa

3.1.1 Espectrofotometria no UV-Vis

Foi determinado o comprimento de onda de máxima absorção em 618 nm através da varredura na região do visível para o verde malaquita, conforme mostrado na Figura 7 (a). Enquanto que para o leuco verde malaquita o comprimento de onda de máxima absorção foi encontrado em 256 nm (Figura 7 (b)). Estes valores foram utilizados para as determinações da concentração através do método espectrofotométrico UV/Vis.

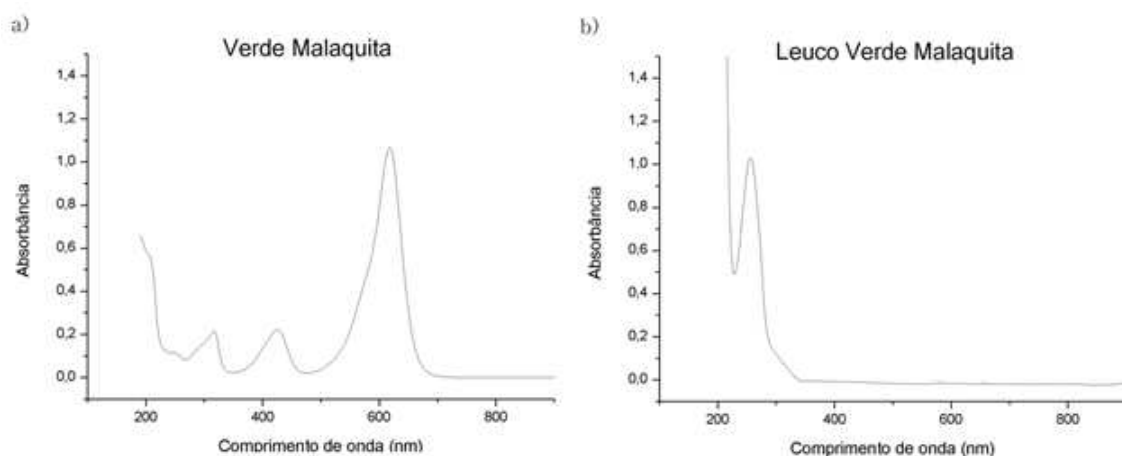


Figura 7. Espectros de absorção do (a) verde malaquita em concentração $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (b) leuco verde malaquita em concentração $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, em solução aquosa.

3.1.1.1 Faixa analítica do método espectrofotométrico

Por meio de curvas analíticas, foi possível verificar a linearidade de resposta do equipamento. Nas Figuras 8 e 9 estão representadas as curvas analíticas obtidas por análise de soluções padrão de VM e LVM por espectrofotometria. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de determinação determinado pela regressão linear.

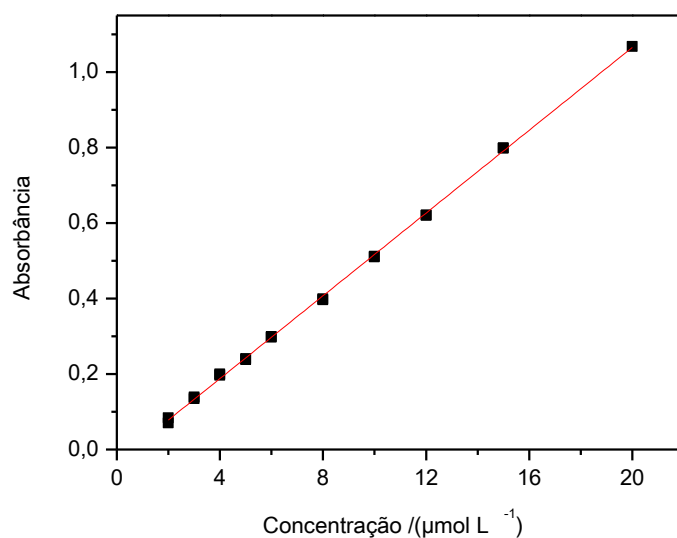


Figura 8. Curva analítica preparada a partir de soluções padrão de VM na faixa de concentração 2,0 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ obtidas por espectrofotometria na região do visível ($\lambda = 618$).

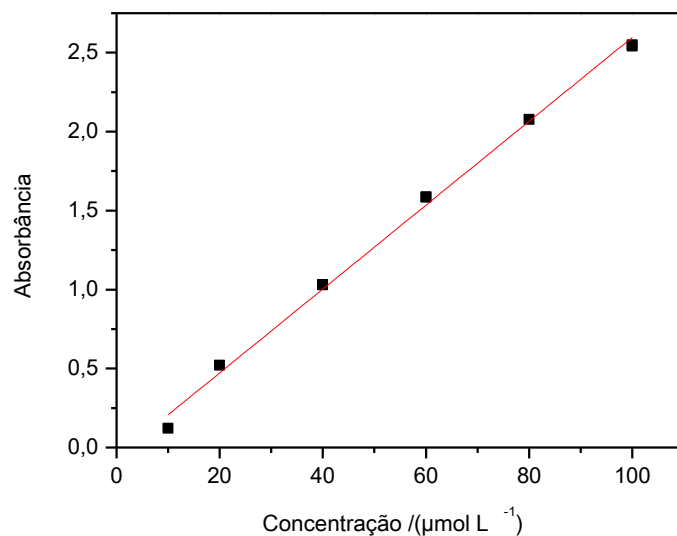


Figura 9. Curva analítica preparada a partir de soluções padrão de LVM na faixa de concentração 10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ obtidas por espectrofotometria, na região do ultravioleta ($\lambda = 256$).

Na Tabela 1 são apresentadas as equações das curvas analíticas obtidas para o VM e LVM por espectrofotometria e os respectivos coeficientes de determinação.

Tabela 1. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM e LVM.

Analito	Modelo de Regressão	Coefficiente de determinação (R^2)
Verde malaquita	$\hat{A} = (59509,37 \pm 431,64) \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) - (0,065 \pm 0,009)$	0,9987
Leuco verde malaquita	$\hat{A} = (26551,62 \pm 510,57) \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) - (0,059 \pm 0,011)$	0,9959

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os valores dos coeficientes de correlação (r) recomendados devem ser iguais ou superiores a 0,95, ou seja, coeficientes de determinação (R^2) maiores que 0,90 (ANVISA, 2003). Entretanto, tradicionalmente, na espectrofotometria molecular, valores aceitáveis são superiores a 0,99, como observado nas curvas analíticas desses analitos.

3.1.1.2 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do aparelho

Os limites de detecção e quantificação foram calculados pelos os parâmetros da curva analítica, na qual podem ser expressos pelas Equações 3 e 4.

Desta forma, o limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método estabelecido para verde malaquita foi de $0,53 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,61 \mu\text{mol L}^{-1}$, e leuco verde malaquita $3,85 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $11,60 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Estes valores são muito altos comparados com outros métodos de determinação e não são adequados para uso direto na determinação de VM e LVM em águas, uma vez o objetivo é obter métodos com limites de quantificação inferiores a $0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$ (0,1 ppm), que é a concentração indicada para tratamento com o VM, em lagoas de criação.

3.1.2 Comportamento do verde malaquita em solução aquosa

Nos estudos realizados para avaliar o comportamento do verde malaquita ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função do pH e do tempo, foram obtidos espectros de absorção nas regiões do ultravioleta e do visível do espectro eletromagnético em valores de pH que variaram de 2 a 10 e tempos de até 2 h.

Pode-se observar que nos pH's 4 e 7 não houveram alteração significativa na absorção do VM (Figura 10 b e c) durante o tempo avaliado, sendo portanto uma faixa estável para o VM em solução aquosa. Também se observou uma diminuição das três bandas características do VM, com o tempo, tanto para pH 2,0 (Figura 10 a) quanto para pH 10,0 (Figura 10 d). Esse tipo de comportamento tem sido sugerido na literatura (YONG et al., 2015) e pode estar associado a modificações da estrutura do verde malaquita, como a formação do carbinol em meios fortemente alcalinos por um ataque nucleofílico da hidroxila a carbono central. No pH 2, tem sido sugerida a existência de uma espécie protonada (VMH^{+2}) de coloração amarelada (SAMIEY; TOOSI, 2010), embora esse argumento explique a cinética observada, uma vez que equilíbrios ácido-base de Bronsted são estabelecidos rapidamente. A ausência de valores confiáveis de pKa também não permitem uma melhor avaliação desse comportamento.

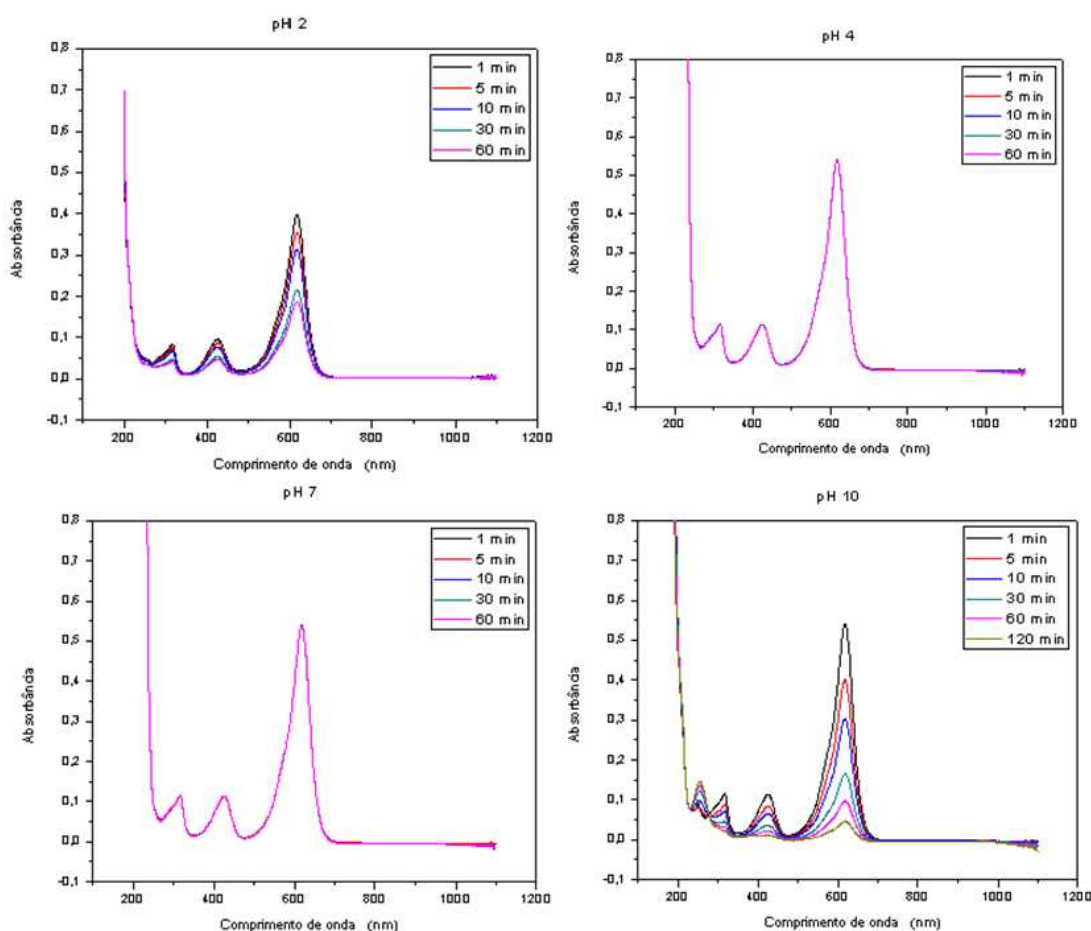


Figura 10. Espectros do verde malaquita $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em função do tempo nos valores de pH: (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 7,0; (d) 10,0.

O comportamento da concentração do verde malaquita em função do tempo a partir das absorbâncias medidas em 618 nm é apresentada na Figura 11.

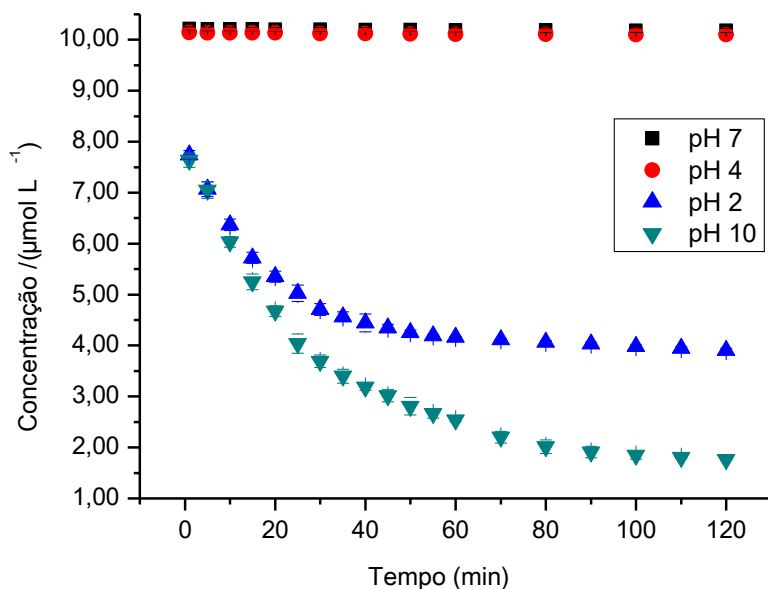


Figura 11. Comportamento do VM em solução aquosa em função do pH no decorrer do tempo. Concentração inicial: $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\lambda = 618$.

Portanto selecionou a faixa de pH entre 4 e 7, pois apresentou maior estabilidade para o VM em solução aquosa, para os estudos de adsorção.

3.1.3 Otimização da confecção do filme

Foram produzidos filmes (Figura 12), com a superfície recoberta pelos adsorventes a serem testados. O filme foi preparado utilizando um suporte, onde foi depositado uniformemente em toda a superfície o adesivo e em seguida uma camada do adsorvente foi espalhada sobre o adesivo e deixado secar durante 24 horas. Após o tempo de secagem o filme foi lavado com água destilada, seco e recortado em forma de quadrado com área de 2 cm^2 .



Figura 12. Filme empregado na adsorção do VM em fase sólida.

3.1.3.1 Suporte

O acetato de celulose e o polipropileno foram avaliados como suporte para a confecção do filme. O polipropileno é um material maleável, de baixo custo e incolor, utilizado em capas de materiais encadernados com espirais. O acetato de celulose é um material rígido, de fácil acesso e azulado, usado como suporte para filmes fotográficos para radiografias.

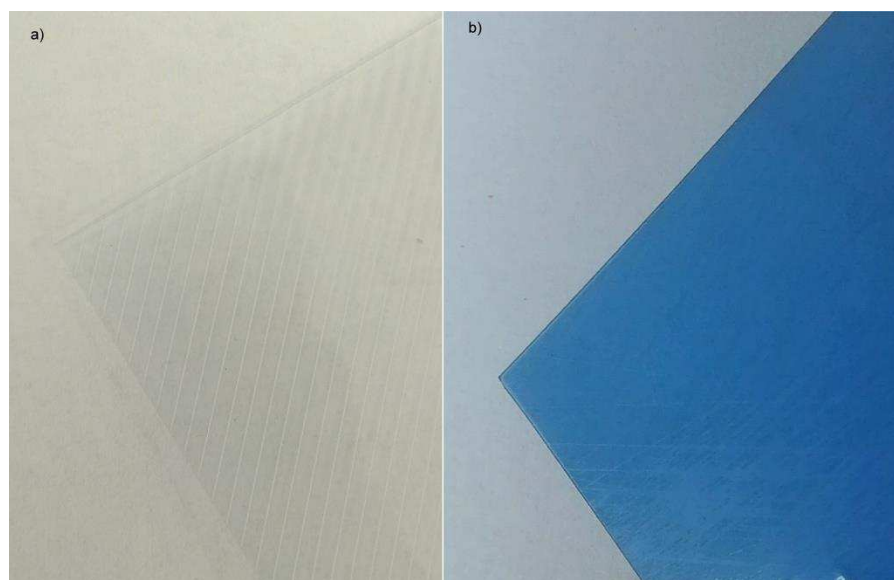


Figura 13. Suportes utilizados na confecção dos filmes (a) polipropileno e (b) acetato de celulose.

A coloração azulada do suporte de acetato de celulose interferiu nas imagens obtidas, de maneira que o suporte polipropileno foi selecionado para a produção dos filmes.

3.1.3.2 Adesivo

Para a adesão do material absorvente, foram avaliados dois tipos de adesivos: o adesivo de silicone acético e o adesivo epóxi. O adesivo de silicone acético possui baixo custo, fácil manuseio, sem etapa de preparo, incolor e tempo de secagem lenta (cerca de 24 h). O adesivo epóxi possui custo intermediário, difícil manuseio, etapa de preparo (mistura com o catalisador), cor amarelado e tempo de secagem rápida (2 h). O adesivo de silicone acético, visualmente, apresentou um filme com uma superfície uniforme se comparada ao adesivo epóxi que apresentou filmes com áreas irregulares como mostra a Figura 14. Desta forma o adesivo de silicone acético foi selecionado como adesivo para produção dos filmes.

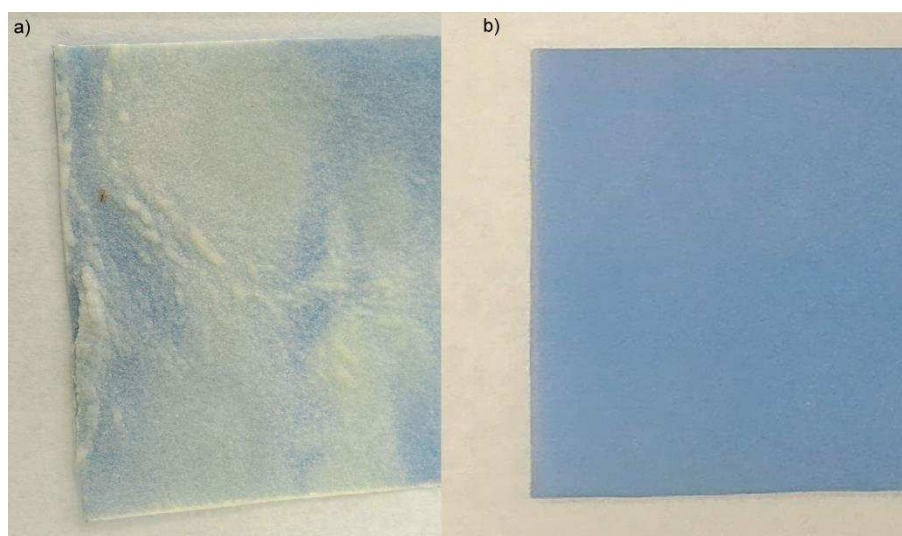


Figura 14. Filmes produzidos com adesivo (a) epóxi (Araldite) e (b) silicone acético em suporte de acetato de celulose.

3.1.3.3 Adsorvente

O florissil, a sílica 60 e a resina XAD-7 foram avaliados como adsorventes na produção dos filmes.

Para a concentração de $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em pH próximo de 6, com uma dose de adsorvente de $0,5 \text{ g} / 100 \text{ mL}$ de solução, a cinética de adsorção sobre os diferentes adsorventes é apresentada na Figura 15.

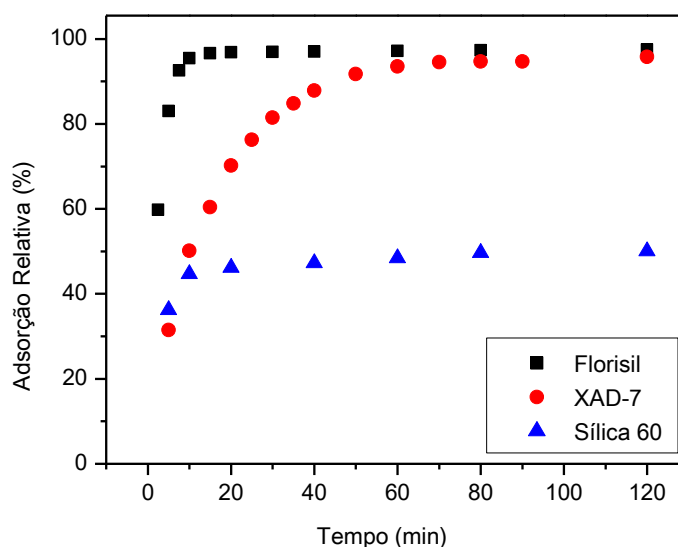


Figura 15. Adsorção do VM em florisil, sílica 60 e resina XAD-7. Concentração de VM: $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, pH próximo de 6, dose de adsorvente de $0,5 \text{ g} / 100 \text{ mL}$.

O verde malaquita adsorve rapidamente sobre a sílica 60, atingindo o equilíbrio antes de 10 min. Entretanto, apenas 50% de adsorção é obtida. Nesse pH próximo de 6, a superfície da sílica é básica, uma vez que seu pH de carga nula situa-se entre 3 e 5 (DEOLIN et al., 2013) .

A resina XAD-7 apresentou uma cinética de adsorção mais lenta que a sílica, porém com uma adsorção próxima de 96%. A cinética lenta pode estar associada à penetração do VM nos macroporos da resina. Oliveira *et al.* (2009) também observaram uma elevada taxa de adsorção de um composto aromático catiônico com quaternário de amônio (etídeo) sobre a resina XAD-7 e verificaram experimentalmente que essa resina não apresenta grupos tituláveis. Segundo Pan & Zhang (2013) a alta polarizabilidade das nuvens eletrônicas tanto da resina quanto dos aromáticos explicam a adsorção de cátions orgânicos.

O florisil (silicato de magnésio) apresentou uma rápida cinética de adsorção, alcançando o equilíbrio com uma adsorção de cerca de 98%, após 60 min. O processo de adsorção não parece estar associado à presença de cargas na superfície do florisil, pois, embora seu pH de carga nula seja ao redor de 9,0 (FERRERO, 2010), observou-se uma eficiente adsorção do cátion VM sobre essa superfície. Ferrero (2010) também observou o mesmo

comportamento para azul de metileno, com taxas de adsorção similares em valores de pH abaixo e acima do pH de carga nula.

Embora a resina XAD-7 possuírem alta adsorção pelo VM, o seu uso foi descartado, pois a mesma possui granulometria maior se comparada ao florissil, que impossibilita a produção de um filme com a homogeneidade adequada. Além disso, por não serem transparentes, os íons de VM adsorvidos no interior dos macroporos não têm utilidade no método de espectrofotometria no estado sólido. A sílica, entre os três adsorventes, foi a que apresentou menor adsorção se comparada. Portanto, o adsorvente selecionado foi o florissil, por possuir alta capacidade de adsorção e menor granulometria.

3.1.4 Otimização da extração no filme

3.1.4.1 Efeito do tempo na adsorção do VM no adsorvente

O florissil foi selecionado como adsorvente, e realizou-se um ensaio para se avaliar sua capacidade de adsorção do filme, o processo de adsorção foi acompanhado por medições em intervalos de tempo de alíquotas no espectrofotômetro.

Na Figura 16 é apresentada a cinética de adsorção para o VM em florissil. O equilíbrio de adsorção foi atingido em cerca de 10 minutos. Utilizou-se o tempo de 60 min nos ensaios com os filmes adsorventes para garantir completa adsorção do VM presente em solução.

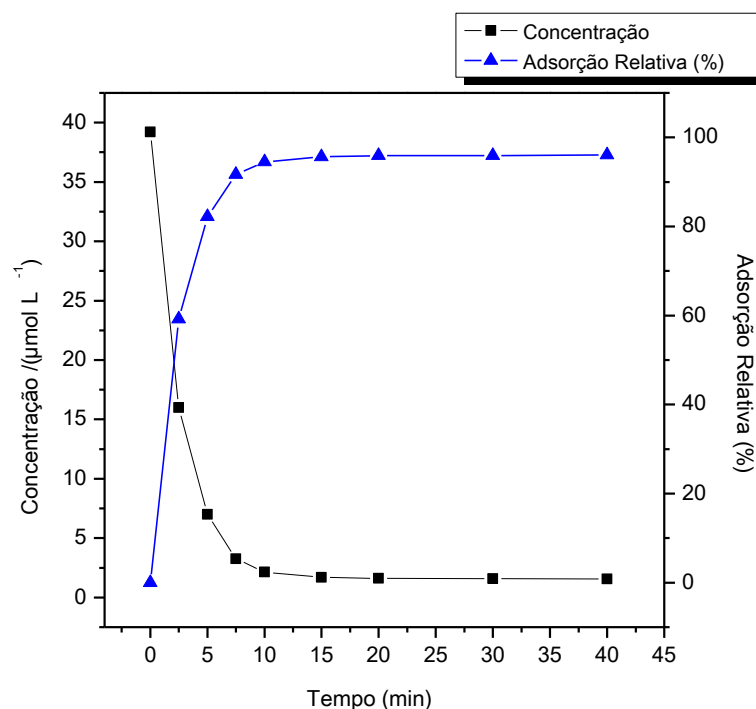


Figura 16. Adsorção do verde malaquita em florissil. Solução de VM $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 100 mL. Massa de florissil 0,5 g. $\lambda = 618$.

3.1.4.2 Influência do pH na adsorção do verde malaquita no filme

O estudo para avaliar a influencia do pH na adsorção do verde malaquita (VM) no filme de florissil, foi realizado para valores de pH que variaram de 3 a 10 (Figura 17).

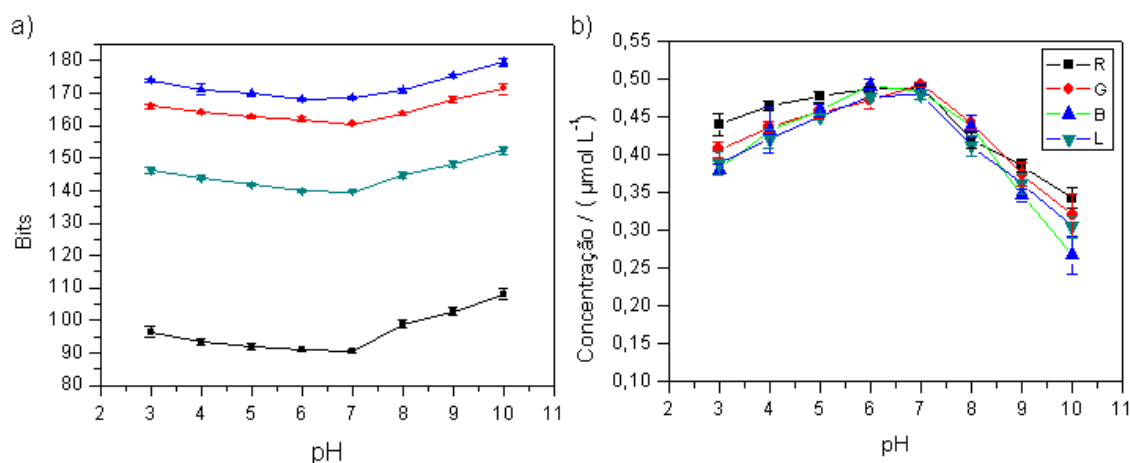


Figura 17. Influência do pH na adsorção de verde malaquita $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ no filme (área de 2 cm^2), em função do (a) número de *bits*; (b) concentração.

As concentrações foram obtidas através de modelos de regressão linear obtidos para o canal, relacionando a escala em *bits* (0 a 255) e a concentração na solução.

Observa-se na Figura 17 um máximo de adsorção em pH 7, diminuindo tanto com a diminuição quanto com o aumento do pH.

3.1.5 Análise por imagens

Para a quantificação dos resíduos de verde malaquita e leuco verde malaquita em amostras de água foi utilizada a análise por imagens digitais. Com o auxílio do *software ImageJ*, as imagens foram decompostas em histogramas de cor, que descrevem a distribuição estatística dos pixels como uma função do componente da cor gravada. Inicialmente foram estabelecidas as condições otimizadas de pH das amostras (pH 5-7) e tempo de extração (60 min).

3.1.5.1 Curvas analíticas e linearidade da resposta do método

A partir de ensaios de adsorção nos filmes (Figura 18) em condições otimizadas, foram determinadas as concentrações de VM nos filmes através da análise das imagens com *software ImageJ* dos quais foram obtidos os valores de RGB e L (cinza) para cada filme. Foram construídas curvas analíticas através dos ensaios com VM em concentração crescente de 0,10 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

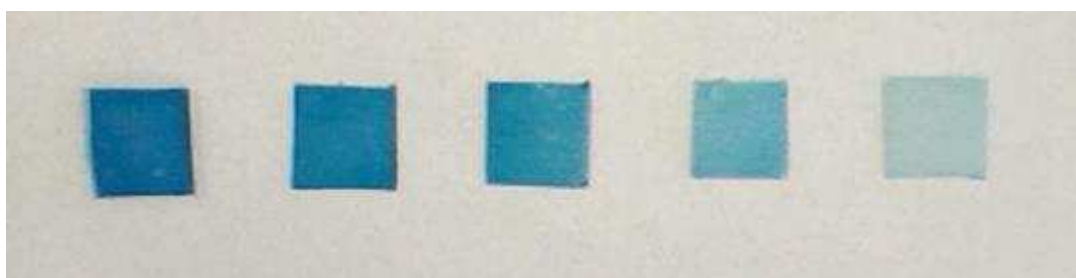


Figura 18. Filmes utilizados na produção da curva analítica para VM. Concentração: 0,10 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Volume: 100 mL. Filmes 2 cm². pH: 5 – 7. Tempo de agitação: 60 min.

A linearidade é a capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004). Por meio de curvas analíticas, foi

possível verificar a linearidade de resposta do método. Na Figura 19 estão representadas as curvas analíticas após análise das imagens dos filmes.

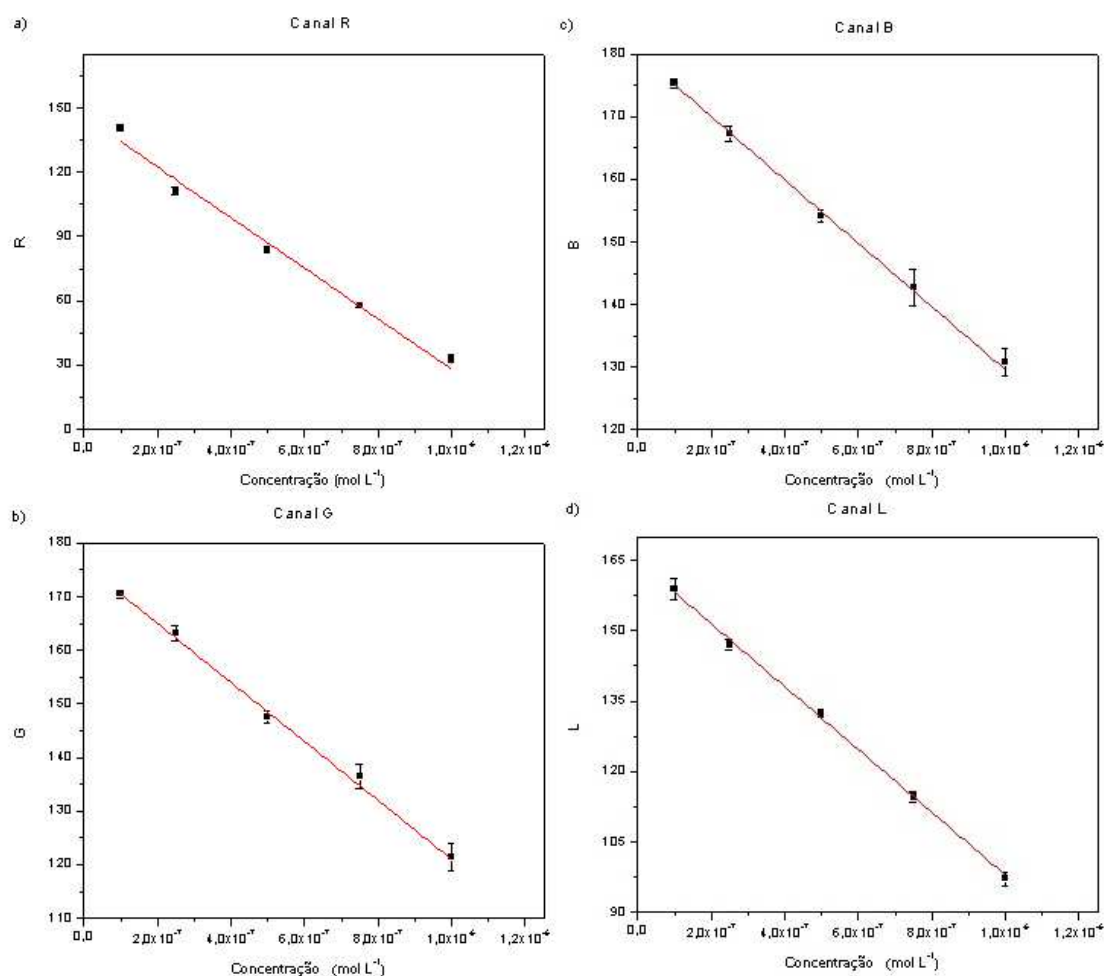


Figura 19. Curvas analíticas para o verde malaquita nas concentrações 0,10 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os canais R (a), G (b), B (c) e L(d).

A linearidade da resposta foi verificada através da regressão linear dos dados das curvas analíticas. As equações da reta e os dados de qualidade de ajuste são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM nos canais RGB e L.

Canal	Modelo de Regressão	Coefficiente de determinação (R^2)	$S_{\text{Resíduos}}$
R	$R = -1,04 \cdot 10^8 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 136,7$	0,9972	1,6
G	$G = -5,43 \cdot 10^7 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 176,0$	0,9900	2,0
B	$B = -4,94 \cdot 10^7 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 179,7$	0,9902	1,9
L	$R = -6,78 \cdot 10^7 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 165,3$	0,9953	1,4

Pode-se observar que o canal R é mais sensível ao verde malaquita, pois apresenta uma elevada inclinação, seguido pelos canais L, B e G. A combinação entre os canais expressa a cor original, sendo a cor do verde malaquita uma transição entre verde e azul, logo o canal R é mais sensível às mudanças de intensidade.

Os coeficientes de determinação encontrados foram maiores que 0,99, o que significa um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Os desvios-padrão dos resíduos foram entre 1,4 e 2,0 *bits*. O que é um bom valor, considerando que a variação de medida é 1 *bit*. Observando os resultados obtidos pela regressão linear dos dados experimentais, verifica-se a linearidade na faixa de concentração trabalhada para VM.

3.1.5.1.1 Análise de Componentes Principais

A base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados é o PCA (Principal Component Analysis), que consiste numa manipulação da matriz de dados com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de "fatores" (FERREIRA, 2015). A aplicação mais frequente do método PCA ocorre nos casos em que as colunas em na matriz de dados são altamente colineares, i.e., as variáveis são correlacionadas e apresentam redundâncias. Tais colinearidades indicam que a matriz de dados apresenta algum tipo de variabilidade dominante que carrega a maioria da informação disponível. Estas

redundâncias e pequenas variabilidades devem então ser removidas. A proposta da PCA é expressar as informações mais significativas contidas nas variáveis originais em um pequeno número de novas variáveis, as então chamadas componentes principais (PC) (TEÓFILO, 2007).

Para realizar a compressão dos dados através da Análise de Componentes Principais utilizou-se o software Matlab com PLS toolbox, após carregar a matriz contendo as informações de cada canal (RGB e L) foi realizado a compressão dos dados e obtido as componentes principais, sem autoescalar, onde a PC1 (primeira componente) representou quase totalmente a variância dos dados, cerca de 99,01%.

A partir dos dados obtidos pelo escore da PC1 foi possível construir uma curva analítica com mostra a Figura 20.

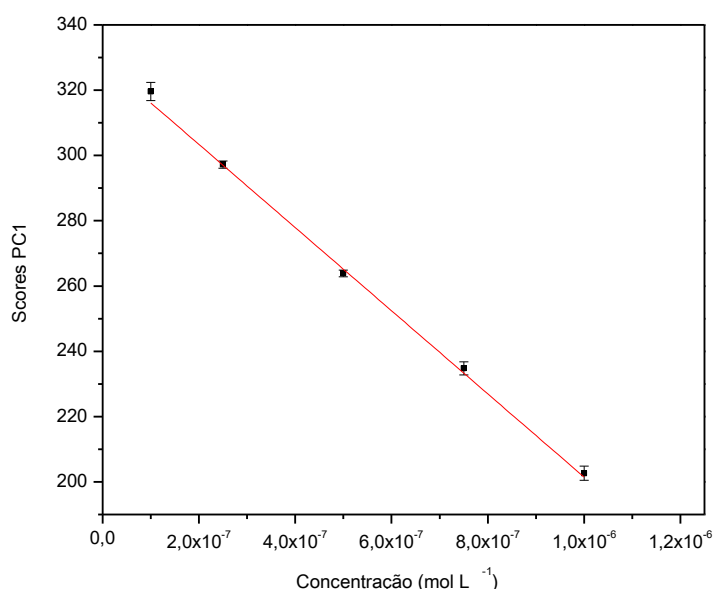


Figura 20. Curva analítica para o verde malaquita nas concentrações 0,10 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o escore da PC1.

O modelo de regressão e os dados sobre a qualidade de ajuste são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros da curva analítica obtidas para o VM utilizando a primeira componente principal como resposta nos canais RGB e L

Canal	Modelo de Regressão	Coefficiente de determinação (R^2)	$S_{\text{Resíduos}}$
PCA	$PC1 = -1,28.10^8 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 330,4$	0,9969	1,78

Ao compararmos a curva produzida com os dados comprimidos por PCA com as curvas dos canais RGB e L percebemos um aumento da sensibilidade e uma melhora no coeficiente de determinação.

3.1.5.1.2 Regressão Linear Múltipla

A regressão linear múltipla (MLR) é um conjunto de técnicas estatísticas para construir modelos que descrevem de maneira razoável relações entre várias variáveis explicativas de um determinado processo.

O MLR têm algumas vantagens e desvantagens quando aplicados a problemas químicos. O MLR utiliza toda a informação contida na matriz de dados X para modelar a concentração, isto é, toda a informação espectral, incluindo informações irrelevantes (fazem pequena remoção de ruído). Contudo, o método MLR sofre do problema de colinearidade: o número de amostras deve exceder o número de variáveis, que por sua vez devem fornecer predominantemente informações únicas. Temos neste caso a opção de selecionar um certo número de variáveis que seja menor que o número de amostras e que produzam informação "única" o que pode ser demorado e tedioso (FERREIRA et al., 1999).

O modelo por MLR foi construído utilizando o software Origin Pro 8, a equação para o modelo e o coeficiente de determinação são descritos a seguir:

$$c (\text{mol.L}^{-1}) = -5,76.10^{-10} (R) - 4,09.10^{-9} (G) - 4,90.10^{-9} (B) - 6,90.10^{-9} (L) + 2,82.10^{-6}$$

O coeficiente de determinação ajustado obtido para o modelo foi 0,9975 com um desvio para os resíduos igual a $1,66.10^{-8}$ e um p-valor próximo de 0,0,

que é menor que o valor limite de 0,05 para 95% de confiança. Isso indica que o modelo apresentou um bom ajuste.

3.1.5.2 Oxidação do leuco verde malaquita

A etapa de oxidação do leuco verde malaquita teve intuito de converter todo LVM presente na amostra em VM. Dessa maneira, a etapa de adsorção e análise da imagem foi antecedida pela etapa de oxidação.

Foram testados os oxidantes: ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzóico, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio na presença e ausência de catalisador iodeto de potássio. Desses, apenas o ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzóico e na ausência de catalisador oxidou o LVM. A determinação de LVM por métodos espectrofotométricos vem sempre acompanhada por etapas de oxidação para o VM (forma cromática), estudos tem reportado o uso de 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) (ANDERSEN; TURNIPSEED; ROYBAL, 2005) bem como compostos como ácido salicílico e ácidos hidroxibenzoicos (FRIEDRICH, 2011).

Foi estudado o efeito da concentração de ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzóico na oxidação de LVM. A partir de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ é possível obter uma oxidação quantitativa (98%). Em béqueres foram adicionados 100 mL das amostras $0,1-1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LVM e 0,5 mL da solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzóico e deixado sob agitação durante 6 h, em mesa agitadora. Após este procedimento as amostras foram submetidas a etapas de adsorção com os filmes e análise das imagens. Assim, a diferença entre as concentrações de VM nos procedimentos sem a etapa de oxidação e com a etapa de oxidação se refere à concentração de LVM.

Nas Figuras 21 e 22 são apresentadas as curvas analíticas do LVM sobre filme de florissil após oxidação para cada canal RGB e L, e para o escore da PC1 após compressão dos dados por PCA, respectivamente.

Os parâmetros das curvas analíticas são apresentados na tabela 4.

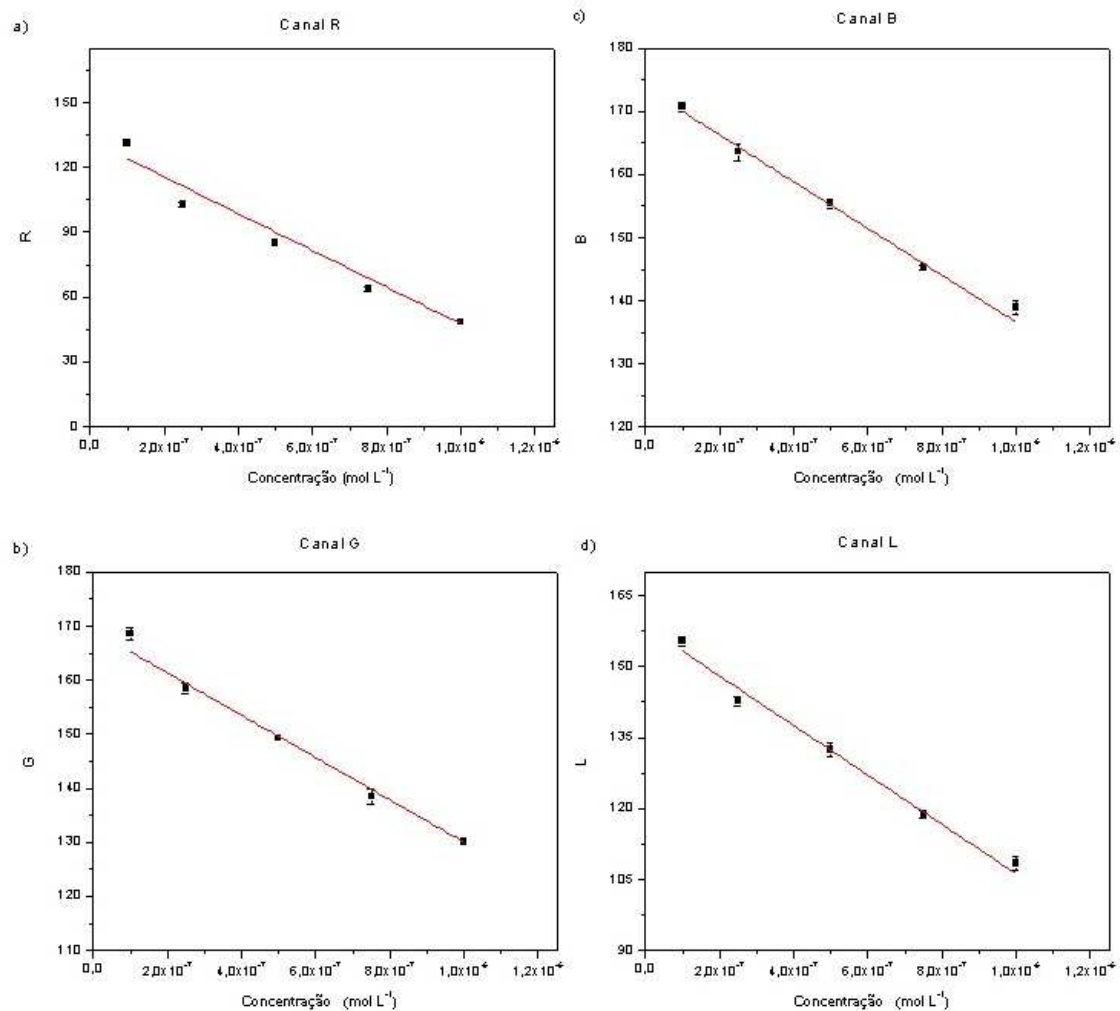


Figura 21. Curvas analíticas para o leuco verde malaquita, após oxidação, nos canais R (a), G (b), B (c) e L (d).

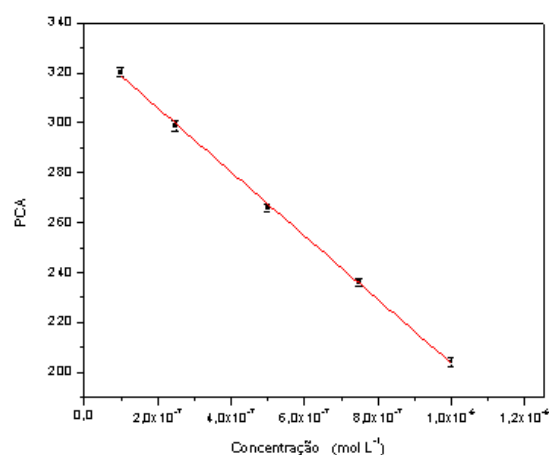


Figura 22. Curvas analíticas para o LVM, após oxidação, e compressão dos dados de RGB e L por PCA.

Tabela 4. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM nos canais RGB e L, e para o PCA.

Canal	Modelo de Regressão	Coefficiente de determinação (R^2)
R	$R = -1,05.10^8 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 137,82$	0,9990
G	$G = -5,48.10^7 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 176,88$	0,9938
B	$B = -4,67.10^7 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 178,29$	0,9938
L	$L = -6,75.10^7 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 165,91$	0,9968
PCA	$PC = -1,15.10^8 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 326,85$	0,9827

Tabela 5. Porcentagens de recuperação (% R), e coeficiente de variação (CV) para os canais RGB e L, e para o PCA e MLR nos ensaios de oxidação do LVM.

Canal	Concentração/($\mu\text{mol L}^{-1}$)									
	0,10		0,25		0,50		0,75		1,00	
	% R	CV (%)	% R	CV (%)	% R	CV (%)	% R	CV (%)	% R	CV (%)
R	83,29	2,42%	95,22	4,49%	99,56	0,62%	97,52	1,11%	99,56	1,69%
G	84,60	22,22%	91,14	9,02%	99,26	3,79%	99,24	1,70%	99,26	0,98%
B	88,06	13,65%	93,05	11,24%	96,99	2,55%	98,80	1,19%	96,99	2,22%
L	84,69	16,94%	97,37	2,31%	93,69	4,19%	98,54	1,44%	93,69	2,48%
PCA	97,86	3,93%	98,02	4,86%	98,00	1,55%	97,88	0,53%	98,00	0,41%
MLR	86,12	4,64%	94,33	5,38%	96,82	1,45%	98,39	0,58%	96,82	0,87%

A etapa de oxidação do LVM apresentou resultados satisfatórios, com recuperação entre 80 e 120%.

3.1.5.3 Figuras de Mérito

3.1.5.3.1 Seletividade

A seletividade refere-se à capacidade de detecção do analito na presença de outros analitos. A seletividade foi avaliada comparando os valores de RGB e L na presença de vários corantes na mesma concentração do analito de interesse ($0,25\text{--}0,75\ \mu\text{mol L}^{-1}$). Foram testados os corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila. Na Figura 23 são apresentadas as estruturas desses compostos.

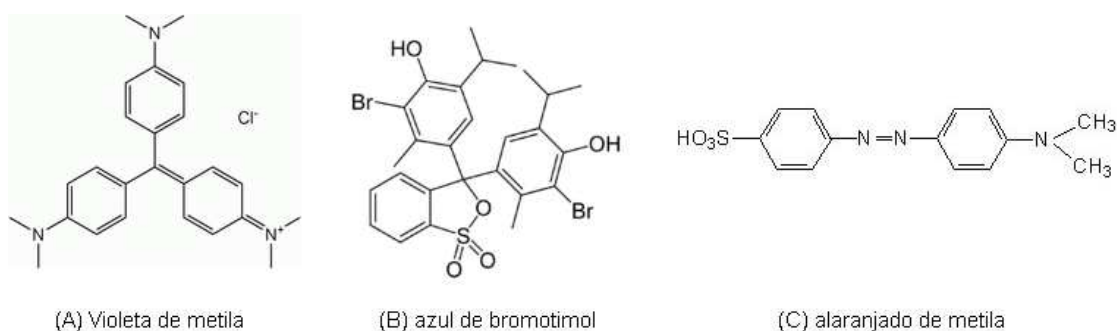


Figura 23. Estruturas dos corantes avaliados com interferentes: (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

Nas Figuras 24 a 27 são apresentadas as curvas analíticas para os ensaios realizados.

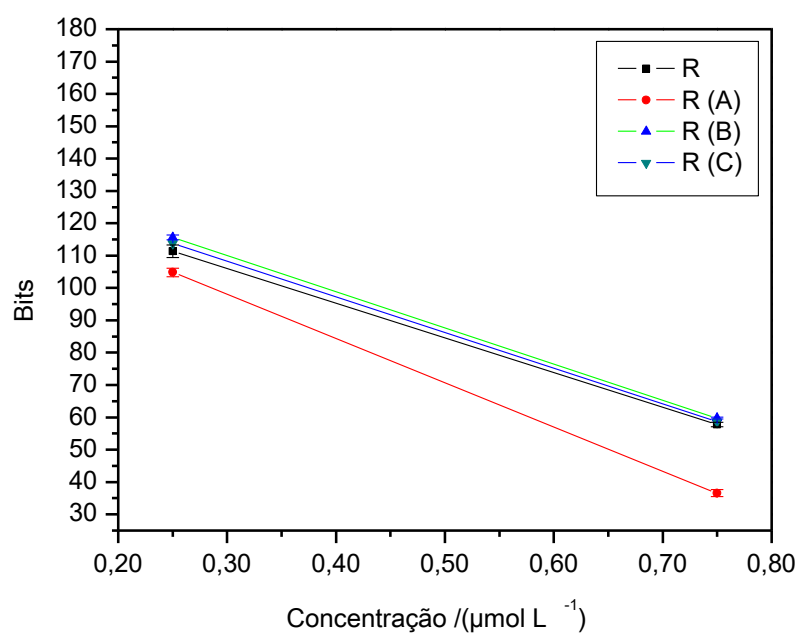


Figura 24. Estudo de seletividade para o verde malaquita no canal R, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

Tabela 6. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM no canal R, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

Interferentes	Modelo de Regressão	Coefficiente de determinação (R^2)
Isento	$R = -1,05 \cdot 10^8 \text{ c}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 137,82$	0,9990
A	$R = -1,37 \cdot 10^8 \text{ c}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 138,94$	0,9990
B	$R = -1,11 \cdot 10^8 \text{ c}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 143,50$	0,9997
C	$R = -1,10 \cdot 10^8 \text{ c}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 141,22$	0,9998

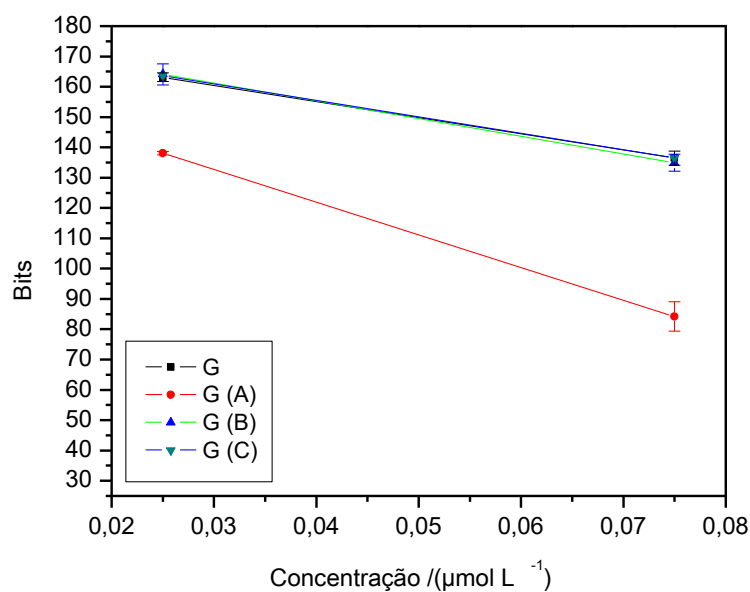


Figura 25. Curvas analíticas para o verde malaquita no canal G, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

Tabela 7. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM no canal G na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

Interferentes	Equação da reta	Coefficiente de determinação (R^2)
Isento	$G = -5,48.10^7 c/(\text{mol.L}^{-1}) + 176,88$	0,9938
A	$G = -1,08.10^8 c/(\text{mol.L}^{-1}) + 165,06$	0,98763
B	$G = -5,83.10^7 c/(\text{mol.L}^{-1}) + 178,67$	0,96585
C	$G = -5,45.10^7 c/(\text{mol.L}^{-1}) + 177,35$	0,98743

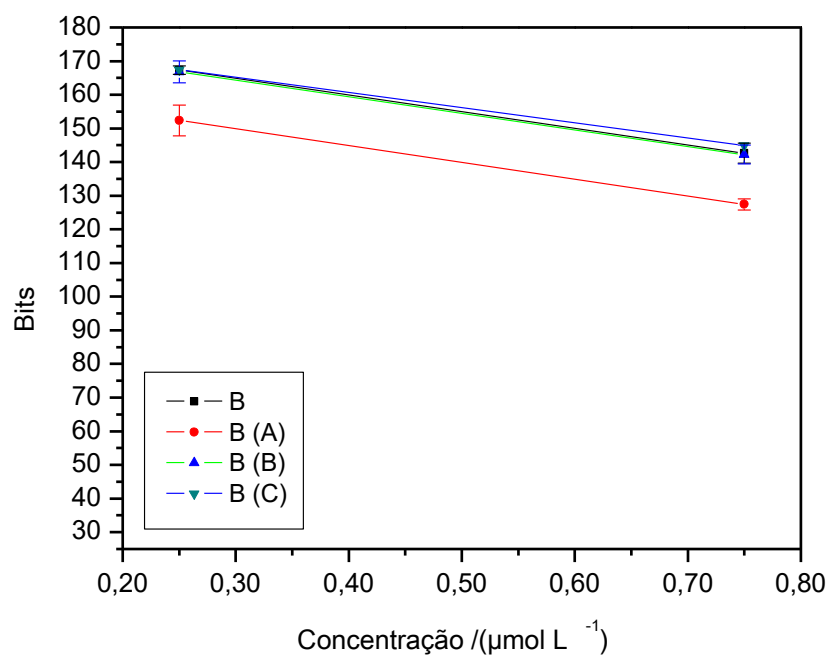


Figura 26. Curvas analíticas para o verde malaquita no canal R, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

Tabela 8. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM no canal B na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

Interferentes	Equação da reta	Coefficiente de determinação (R^2)
Inseto	$B = -4,67 \cdot 10^7 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 178,29$	0,99380
A	$B = -4,99 \cdot 10^7 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 164,86$	0,95049
B	$B = -4,71 \cdot 10^7 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 179,08$	0,95561
C	$B = -4,51 \cdot 10^7 \text{ c}/(\text{mol.L}^{-1}) + 178,73$	0,99279

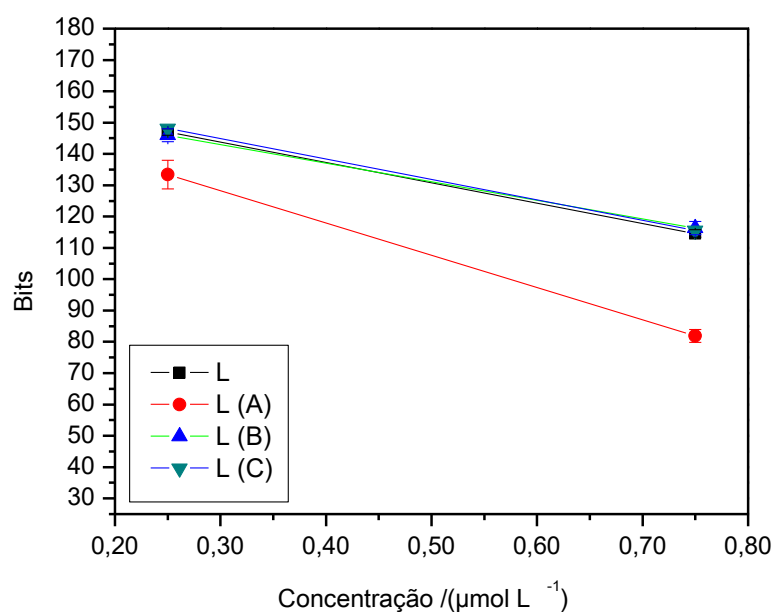


Figura 27. Curvas analíticas para o verde malaquita no canal L, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

Tabela 9. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o VM no canal L, na presença dos corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

Interferentes	Equação da reta	Coefficiente de determinação (R ²)
Isento	$L = -6,75 \cdot 10^7 \text{ c}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 165,91$	0,99680
A	$L = -1,03 \cdot 10^8 \text{ c}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 159,15$	0,98787
B	$L = -5,92 \cdot 10^7 \text{ c}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 160,74$	0,98577
C	$L = -6,50 \cdot 10^7 \text{ c}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 164,38$	0,99093

Tabela 10. Porcentagens de recuperação (% R), e coeficiente de variação (CV) para os canais RGB e L, e para o PCA e MLR nos ensaios com os corantes (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila.

Canal	A				B				C			
	0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$.		0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$.		0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$.		0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$.		0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$.		0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$.	
	% R	CV (%)	% R	CV (%)	% R	CV (%)	% R	CV (%)	% R	CV (%)	% R	CV (%)
R	144,41	2,0	128,21	1,10	89,78	3,14	98,62	0,36	93,11	4,42	99,96	0,54
G	280,08	1,52	224,76	5,29	97,40	15,42	101,13	6,73	96,44	6,42	97,38	4,92
B	221,61	16,67	141,30	1,33	92,68	9,91	101,36	7,46	99,50	9,87	94,11	2,86
L	187,30	14,17	162,95	1,24	99,29	8,84	95,77	4,20	101,06	14,66	97,12	0,32
PCA	206,52	7,42	161,16	2,51	98,64	4,02	98,71	4,25	101,28	1,29	96,94	1,98
MLR	211,71	9,23	164,56	2,52	95,34	4,27	98,97	5,04	98,25	0,75	96,55	2,17

Ao considerarmos a regressão para cada canal sobre a presença dos corantes: (A) violeta de metila, (B) azul de bromotimol e (C) alaranjado de metila pode-se perceber que somente o violeta de metila (A) provocou um aumento da intensidade dos valores de todos os canal, e maior porcentagem de recuperação (tabela 10) devido o mesmo pertence a família dos trifenilmetano e portanto possuir característica semelhantes ao VM o que permite sua adsorção no filme.

3.1.5.3.2 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão (INMETRO, 2011).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através dos parâmetros da curva analítica, na qual podem ser expressos pelas Equações 3 e 4.

Foram determinados os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) das curvas analíticas dos canais RGB e L, e para o PCA e o MLR, como mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) das curvas analíticas dos canais RGB e L, e para o PCA e o MLR.

Canal	LOD/($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{mol L}^{-1}$)
R	0,030	0,091
G	0,047	0,141
B	0,049	0,148
L	0,032	0,096
PCA	0,023	0,069
MLR	0,023	0,069

Ao considerar os LOD's e LOQ's encontrados pode-se concluir que entre os canais somente os canais R e L obtivam limites de quantificação adequados para faixa de trabalho estudada ($0,10$ a $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$), e que uma pequena melhora dos parâmetros é verificada quando se aplica o PCA e o MLR. Comparativamente, entretanto, o PCA exige um tratamento estatístico matemático muito mais elaborado e demorado do que o MLR.

Bahram (2011) em seu trabalho onde desenvolveu um método de extração em ponto nuvem usando hidrogel sensível ao pH e aplicado em amostras de água apresentou uma faixa linear $0,01 - 0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, com um LOD igual a $0,003 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Mirzajani (2015) em seu trabalho no qual desenvolveu um protocolo de preparo de nanopartículas de melanina combinada com Fe₃O₄ para extração e determinação de VM em amostras de água e tecidos de peixe que apresentou faixa analítica de 0,1 – 8 µmol L⁻¹ e LOQ igual 0,05 µmol L⁻¹.

3.1.5.3.3 Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão do método foi verificada sob condições de repetibilidade e precisão intermediária.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas por um mesmo método sob as mesmas condições de medição. Ela pode ser expressa quantitativamente em termos da característica de dispersão dos resultados determinada pelo desvio padrão de sete repetições ou mais (INMETRO, 2011).

Amostras (n = 7) foram fortificadas com 0,75 mL de uma solução de concentração 100 µmol L⁻¹ para o verde malaquita para uma concentração final 0,75 µmol L⁻¹ em um volume de 100 mL de amostra. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 12.

Tabela 12. Porcentagens de recuperação (% R), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os canais RGB e L, para o PCA e o MLR.

Canal	% R	DP	CV (%)
R	101,20	1,81	1,79%
G	101,25	6,50	6,42%
B	107,73	7,63	7,08%
L	95,01	3,99	4,20%
PCA	101,37	3,98	3,92%
MLR	102,64	4,50	4,38%

Os resultados do coeficiente de variação (CV) obtidos para as amostras variam entre 1,79 e 7,08 %, demonstrando alta repetitividade. Os métodos PCA

e MLR apresentaram desvios padrão maiores que aquele do canal R, porém menores que os obtidos para os demais canais.

A precisão intermediária refere-se às variações ocorridas dentro de um mesmo laboratório quando um ou mais fatores importantes são modificados, como diferentes analistas, diferentes dias ou diferentes equipamentos (RIBANI et al., 2004).

A precisão intermediária do método foi verificada pelos respectivos coeficientes de variação (CV) analisados em três dias diferentes. As análises foram realizadas no 1º, 7º e 30º dia, pelo mesmo analista, mesmo equipamento, etc. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13. Porcentagens de recuperação (% R), desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os canais RGB e L, para o PCA e o MLR.

Canal	Primeiro dia		Sétimo dia		Trigésimo dia		CV (%)
	% R	DP	% R	DP	% R	DP	
R	98,48	0,23	98,27	2,67	99,09	2,23	1,80
G	104,06	6,88	95,75	5,46	99,29	2,55	5,83
B	102,29	8,60	96,13	7,62	104,52	2,67	6,93
L	100,06	2,03	95,10	1,10	96,43	1,37	2,67
PCA	102,35	2,54	97,62	3,72	100,99	1,60	3,18
MLR	101,39	3,07	96,21	4,08	100,07	1,73	3,59

Observa-se (Tabela 13) que os valores dos coeficientes de variação encontrados para o VM em amostras de água são menores que 6,93%, indicando que o método apresenta boa precisão intermediária.

3.1.5.3.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2011).

Existem vários processos para avaliar a exatidão de um método, como o emprego dos materiais de referência, a comparação de métodos, e os ensaios de recuperação. Os ensaios de recuperação se baseiam na eficiência de recuperação (% R) que é definido como a proporção da quantidade de substância de interesse, previamente adicionada à matriz, que é extraída e passível de ser analisada. A exatidão de um método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2011).

A exatidão foi avaliada por adição de quantidades conhecidas do analito de interesse a amostra. Assim 100 mL de amostra de água foram fortificadas com 1,00, 0,75, 0,50, 0,25 e 0,10 mL de uma solução de verde malaquita na concentração $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 14. Avaliação da exatidão do método, para os ensaios de recuperação e coeficiente de variação.

Canal	Concentração $\mu\text{mol L}^{-1}$									
	0,10		0,25		0,50		0,75		1,00	
	% R	CV (%)	% R	CV (%)	% R	CV (%)	% R	CV (%)	% R	CV (%)
R	106,55	15,11%	104,50	3,03%	104,29	1,55%	102,48	0,34%	102,71	1,03%
G	116,98	6,71%	117,92	1,83%	121,52	1,24%	119,73	0,84%	118,01	0,14%
B	117,89	7,03%	116,31	2,60%	123,93	3,06%	115,20	0,65%	119,34	0,32%
L	117,27	8,63%	118,66	0,80%	121,76	0,77%	117,94	0,91%	111,41	0,74%
PCA	119,61	5,52%	116,34	2,84%	119,11	0,53%	111,11	0,23%	110,77	0,06%
MLR	116,18	2,76%	115,42	1,49%	119,25	0,90%	114,70	0,64%	113,60	0,20%

Os intervalos de recuperação e os coeficientes de variação encontrados são aceitáveis, levando em consideração que valores de recuperação entre 70 e 120 %, para o canal R e para os modelos MLR e escore da PC1, bem como um coeficiente de variação de até 20 %.

3.1.5.4 Determinação de VM em amostras de águas ambientais

Foram testadas amostra de águas ambientais da região de Viçosa – MG, utilizando o método otimizado para a determinação de VM.

Nas amostras analisadas, não foi constatada a presença de resíduos de VM.

4. Conclusão

Neste trabalho foi otimizado e validado um método para a determinação de verde malaquita e leuco verde malaquita em água através de análise por imagem digital em superfície adsorvente.

Foram avaliados os componentes para a confecção de filme adsorvente, como o suporte, o adesivo e o adsorvente, para a extração e pré-concentração de VM em amostras de água.

Na etapa de otimização das condições experimentais para o processo de extração do VM no filme adsorvente de amostras de água, avaliou-se o tempo de adsorção e o pH.

Foram produzidas as imagens digitais dos filmes após extração do VM de amostras de água, após processadas foram obtidas informações (valores dos canais RGB e L) e relacionadas à concentração de VM em amostras de água.

Ao se avaliar diferentes modelos de curva analítica a partir das informações contidas nas imagens digitais, a citar, regressão linear simples, múltipla (MLR) e análise de componentes principais (PCA); verificou-se que o modelo produzido com o score da primeira componente ao aplicar o PCA a matriz contendo as informações da imagem (valores dos canais RGB e L) apresentou melhores resultados se comparado com os demais modelos, e, portanto o mais indicado a ser aplicado para determinação de VM em amostras de águas.

Os parâmetros avaliados no processo de validação, tais como: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão indicaram que o método desenvolvido é eficiente para a extração de resíduos de VM em amostras de águas, além de um baixo limite de detecção.

O método otimizado e validado foi aplicado águas de lagoas do campus da Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa – MG, não sendo verificado resíduo de VM.

5. Referências Bibliográficas

ACD/LABS. Disponível em: <<https://ilab.acdlabs.com/iLab2>>. Acesso em: 14 nov. 2015.

AFKHAMI, A.; MOOSAVI, R.; MADRAKIAN, T. Preconcentration and spectrophotometric determination of low concentrations of malachite green and leuco-malachite green in water samples by high performance solid phase extraction using maghemite nanoparticles. **Talanta**, v. 82, p. 785–789, 2010.

ANDERSEN, W. C.; TURNIPSEED, S. B.; ROYBAL, J. E. Quantitative and Confirmatory Analyses of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish and Shrimp. **Laboratory Information Bulletin - FDA**, v. 4363, p. 15–25, 2005.

ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Agência Sanitária Nacional de Vigilância**, 2003.

BAHRAM, M.; KESHVARI, F.; NAJAFI-MOGHADDAM, P. Development of cloud point extraction using pH-sensitive hydrogel for preconcentration and determination of malachite green. **Talanta**, v. 85, p. 891–896, 2011.

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

Brasil. 1995. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria Ministerial nº 527, de 15/08/1995**. Ementa: Atribui ao Secretário de Defesa Agropecuária a responsabilidade de coordenar a execução do PNCRB. Publicado no Diário Oficial da União de 16/08/1995, Seção 2, Página 6048. Acessado em 14 de novembro de 2015 em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1631>

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

COSTA, G. B. et al. Digital image-based classification of biodiesel. **Talanta**, v. 139, p. 50–55, 2015.

DEOLIN, M. H. DA S. et al. **Obtenção do ponto de carga zero de materiais adsorventes**. Disponível em: <http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2013/oit_mostra/Mara_Helen_da_Silva_Deolin.pdf>. Acesso em: 16 out. 2015.

DIAS, F. DA C. **Uso do software ImageJ para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais**. [s.l.] Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2008.

European Commission. 1990, August 18. **Council Regulation (EEC) No 2377/90**. Official Journal of the European Communities L224: 1–8.

European Commission. 2002, August 17. **Directive 2002/657/EC**. Official Journal of the European Communities L221: 8–36.

European Commission. 2004, January 10. **Directive 2004/25/CE**. Official Journal of the European Communities L 6: 38.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome: [s.n.]. 2014.

FAO. **Decision No. 07/2005/QD-BTS of February 24, 2005** Promulgating the Lists of Chemicals and Antibiotics, Which Are Banned or Restricted from Use in Fisheries Production and Business. 2005.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I : calibração multivariada , um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 1–11, 1999.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Editora da ed. Campinas, SP: [s.n.] 2015.

FRIEDRICH, L. C. **Estudos mecanísticos da interferência de íons cobre (II) e zinco (II) na reação de fenton**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

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.

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.

INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos**. Instituto Nacional de Metrologia. DOQ-CGCRE-008, 2011.

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.

MITROWSKA, K.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J. Determination of malachite green and leucomalachite green residues in water using liquid chromatography with visible and fluorescence detection and confirmation by tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1, v. 1207, p. 94–100, 2008.

OLIVEIRA, M. W. DE et al. Estudo da adsorção de brometo de etídeo em resina XAD-7. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1134–1138, 2009.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: O**

Desafio é Crescer. FAO ed. Brasília: [s.n.], 2008.

PAN, B.; ZHANG, H. Interaction Mechanisms and Predictive Model for the Sorption of Aromatic Compounds onto Nonionic Resins. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, p. 17707–17715, 2013.

PAULA, V. I. DE; LIMA, D. R. DE S. Uso de análise de imagens para quantificação de compostos. **Revista Engenho**, v. 9, p. 63–76, 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SAMIEY, B.; TOOSI, A. R. Adsorption of malachite green on silica gel : Effects of NaCl , pH and 2-propanol. **Journal of Hazardous Materials**, v. 184, n. 1-3, p. 739–745, 2010.

SANTOS, R. L. **O uso de praguicidas nas atividades aquícolas: destino e efeitos após aplicações em tanques experimentais e avaliação nas pisciculturas e pesqueiros da bacia do rio Mogi-Guaçu.** [s.l.] Universidade de São Paulo, São Carlos., 2007.

SRIVASTAVA, S.; SINHA, R.; ROY, D. Toxicological effects of malachite green. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 319–329, 2004.

TEÓFILO, R. F. **Métodos Quimiométricos em Estudos Eletroquímicos de Fenóis sobre Filmes de Diamante Dopado com Boro.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2007.

WU, X. et al. Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in aquatic products by high-performance liquid chromatography – linear ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1172, p. 121–126, 2007.

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

YONG, L. et al. Photodegradation of malachite green under simulated and natural irradiation: Kinetics, products, and pathways. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 127–136, 2015.

ZHENG, C.; SUN, D.-W.; ZHENG, L. Recent developments and applications of image features for food quality evaluation and inspection - a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 642–655, 2006.