

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**USO DE IMAGENS DIGITAIS E FERRAMENTAS
QUIMIOMÉTRICAS PARA IDENTIFICAÇÃO E
DETERMINAÇÃO DE Cr (VI) EM SOLOS CONTAMINADOS**

Luciana Fontes de Oliveira*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

***Bolsista CNPq**

SÃO CARLOS – SP
2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

O48ui

Oliveira, Luciana Fontes de.

Uso de imagens digitais e ferramentas quimiométricas para identificação e determinação de Cr (VI) em solos contaminados / Luciana Fontes de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
72 f.

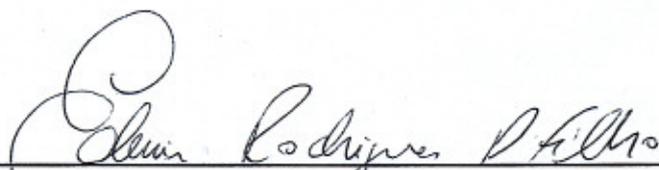
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Química analítica. 2. Quimiometria. 3. Crômio. 4. Imagens digitais. 5. Solos. I. Título.

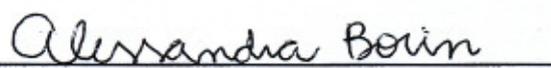
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

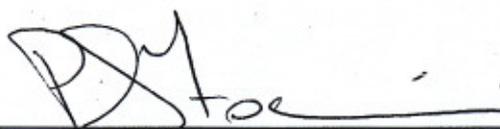
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata
Luciana Fontes de Oliveira, realizada em 23 de março de 2012:



Prof. Dr. Edenír Rodrigues Pereira Filho



Profa. Dra. Alessandra Borin



Prof. Dr. Pedro Sérgio Fadini

“Uma imagem vale mais que mil palavras”

Autor desconhecido

*“Aos meus pais, aprendi com vocês a ter
coragem, não desanimar e saborear a vitória”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por guiar meus passos e olhar sempre por minha caminhada;

Ao professor Edenir Rodrigues Pereira Filho pela amizade, ensinamentos, confiança e pela excelente orientação;

Aos meus pais, João Silvino de Oliveira e Andréa da Silva Fontes de Oliveira, por não medirem esforços e por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões. Sem vocês nada seria possível;

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar por terem me proporcionado uma boa formação acadêmica;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida (Projeto número 552633/2010-0);

Ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade;

Aos professores Drs. Joaquim Araújo Nóbrega e Ana Rita Araújo Nogueira pelas importantes sugestões durante o seminário ministrado e durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos professores Drs. Alessandra Borin e Pedro Sérgio Fadini por terem aceitado o convite para compor a banca e pela avaliação do trabalho;

Aos funcionários do DQ/UFSCar, em especial aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação;

À Natália Tostes Canevari pela amizade e por ter colaborado muito durante as realizações das análises deste trabalho;

À Poliana Macedo dos Santos pelo apoio na otimização das rotinas e parâmetros para aquisição das imagens e por estar sempre disposta a ajudar;

Ao Dr. Marcelo Braga Bueno Guerra por ceder as amostras utilizadas neste trabalho;

A todos os colegas do Grupo de Análise Instrumental Aplicada – GAIA, por esses dois anos de convivência e ensinamentos;

Aos meus irmãos, Fabiana, André, Maria Eduarda e João Gabriel por serem fontes de inspiração e alegria;

Ao meu namorado Renan, por estar sempre ao meu lado, me apoiar e ser uma pessoa com quem sempre pude contar;

As amigas de São Carlos, Daniele, Ana Carolina, Ana Luiza, Jaqueline, Amanda e Érica pela convivência agradável e amizade;

A todos os meus familiares e amigos de Poços de Caldas que sempre torceram pela minha felicidade;

Finalmente, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.

LISTA DE ACRÔNIMOS

AS	Auto-escalonamento
B	Azul (Blue)
bpp	Bits por pixel
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CM	Centrar na média
CMY	Modelo de cores baseado nas cores secundárias ciano, magenta e amarelo
CMYK	Variante do modelo CMY, onde K denota a cor preta
CRM	Material de referência certificado (Certified Reference Material)
CV AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor a frio
DFC	Reagente 1,5 difenilcarbazida
dpi	Pontos por polegada (Dots per inch)
EAM	Espectrometria de absorção molecular
ETAAS	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (Electrothermal atomic absorption spectrometry)
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (Flame atomic absorption spectrometry)
G	Verde (Green)
H	Matiz (Hue)
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamentos (Hierarchical Cluster Analysis)

HSI	Modelo de cores baseado no matiz, saturação e intensidade
I	Intensidade (Intensity)
ICP AES	Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado
LOD	Limite de detecção (Limit of detection)
LOQ	Limite de quantificação (Limit of quantification)
L^T	Matriz de loadings
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (National Institut of Standards and Technology)
PC's	Componentes principais
PCA	Análise de componentes principais (Principal components analysis)
PCR	Regressão por componentes principais (Principal Components regression)
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais (Partial least squares).
PRESS	Soma dos quadrados dos erros de previsão
R	Vermelho (Red)
RGB	Modelo de cores baseado nas cores primárias vermelho, verde a azul
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio de calibração (Root mean square error of calibration)
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio de previsão (Root mean square error of prediction)
RSD	Desvio padrão relativo (Relative standard deviation)

S	Saturação (Saturation)
SD	Desvio padrão (Standard deviation)
SID-ICP-MS	Diluição isotópica e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
T	Matriz de scores
UV-vis	Espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível
VI	Valor de Intervenção
VP	Valor de Prevenção
VRQ	Valor de referência de qualidade
W	Matriz de dados
YIQ	Modelo padrão do NTSC de TV em cores

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Valores estipulados para o elemento Cr pela CETESB.....	8
TABELA 5.1 - Reagentes utilizados para determinação colorimétrica de Pb [60].	35
TABELA 5.2 - Concentrações médias de Cr pseudototal (mg kg^{-1}) nas amostras de solos. Os resultados representam os valores médios e os respectivos desvios (SD) padrão e desvios padrão relativos (RSD).....	41
TABELA 5.3 - Uso de diferentes extratores alcalinos e concentrações de Cr (VI) calculadas.	43
TABELA 5.4 - Concentrações de Cr (VI) (mg kg^{-1}) nas amostras de solo. Os resultados representam os valores médios ($n = 6$) e os respectivos desvios padrão (SD) e desvios padrão relativos (RSD).	44
TABELA 5.5 - Porcentagem de Cr (VI) em relação ao Cr pseudototal.....	45
TABELA 5.6 - Valores de R, G e B para os padrões descontando o valor de R, G e B da respectiva imagem sem difenilcarbazida.....	52
TABELA 5.7 - Concentração de Cr (VI) real calculada através do UV-vis e prevista pelo modelo de calibração.....	57
TABELA 5.8 - Concentrações de Cr (VI) calculadas e recuperações para o CRM utilizando UV-vis e imagens digitais.....	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 - Espécies de Cr em função do pH e do potencial redox [15].	8
FIGURA 3.2 Representação esquemática de um espectrofotômetro.	11
FIGURA 3.3 - Cubo de cores RGB, e representação da escala de cinza, que parte da coloração preta (0, 0, 0) até a coloração branca (1, 1, 1).	13
FIGURA 3.4 - Exemplo do modelo RGB para coloração verde.	14
FIGURA 3.5 - (a) Corte transversal no modelo de cores RGB e (b) triângulo do modelo de cores HSI.	15
FIGURA 3.6 - Modelo de cores HSI baseado em plano triangular.	15
FIGURA 3.7 - (a) Esquema de formação de grupos para cinco amostras fictícias e (b) dendograma dos dados usando HCA para as amostras.	23
FIGURA 3.8 - Projeção das componentes principais (PCs).	24
FIGURA 3.9 - Representação simplificada do PLS.	26
FIGURA 4.1 - Procedimento geral para determinação de Cr (VI) utilizando imagens digitais e espectrofotômetro.	33
FIGURA 5.1 - Imagens dos padrões para Pb e seus respectivos valores de R, G e B.	38
FIGURA 5.2 - Gráfico de <i>loadings</i> (a) e <i>scores</i> (b) para PCA dos padrões de Pb.	38
FIGURA 5.3 - Imagens da amostra e fortificações em diferentes concentrações de Cr (VI).	46
FIGURA 5.4 - Gráfico de <i>loadings</i> para a PCA das imagens das fortificações.	47
FIGURA 5.5 - Gráfico de <i>scores</i> para PCA utilizando como classe as concentrações permitidas de Cr (VI) em solos no Canadá.	48
FIGURA 5.6 - Gráfico de <i>scores</i> para PCA utilizando como classe as concentrações permitidas de Cr (VI) em solos na Itália.	49
FIGURA 5.7 - Gráfico de <i>scores</i> para PCA utilizando como classe a concentração permitida de Cr (VI) em solos na Suécia.	50
FIGURA 5.8 - Análise hierárquica de agrupamentos: dendograma.	51
FIGURA 5.9 - Imagens para os padrões de Cr (VI) nas concentrações de 0,1 a 1,0 mg L ⁻¹ sem difenilcarbazida (a) e com difenilcarbazida (b) e seus respectivos valores de R, G e B.	52

FIGURA 5.10 - Gráfico de <i>scores</i> (a) e gráfico de <i>loadings</i> (b) para PCA das imagens das extrações de Cr (VI) para brancos e padrões com pré-processamento centrado na média.....	54
FIGURA 5.11 - <i>Scores</i> da PCA para os dados originais. Compreendendo brancos, padrões, amostras e CRM.....	55

RESUMO

USO DE IMAGENS DIGITAIS E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS PARA IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE Cr (VI) EM SOLOS CONTAMINADOS

A determinação de metais tóxicos em solos é considerada um fator importante para avaliar a sua qualidade ou identificar possível contaminação. O elemento Cr apresenta dupla característica: o Cr III é essencial para os humanos e a espécie Cr VI é tóxica. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é a proposição de um teste simples para a determinação de Cr (VI) em amostras de solos combinando o uso de imagens digitais e recursos quimiométricos. As amostras utilizadas neste projeto foram coletadas na Antártica Marítima, ao redor da Estação Antártica Comandante Ferraz (estação científica brasileira). Extraíu-se o Cr (VI) das amostras em meio alcalino e adicionou-se o agente cromogênico para desenvolvimento da coloração. Para obtenção das imagens digitais, os extratos foram depositados em placas de Petri e utilizou-se uma impressora multifuncional. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles calculados a partir da determinação por espectrometria de absorção molecular (EAM). Com relação às imagens, utilizou-se o programa MatLab versão R2009a para obtenção dos valores médios das cores R, G, B, H, S, V, r, g, b e L e o programa Pirouette 4.0 foi utilizado para aplicar as ferramentas quimiométricas. Avaliou-se a potencialidade das imagens digitais serem utilizadas para proposição de modelos de classificação e também aplicou-se o método de calibração supervisionada por regressão por mínimos quadrados parciais (PLS - *Partial least squares*). Dois tipos de pré-processamento foram utilizados para o cálculo dos modelos PLS: centrado na média e auto-escalonamento. Para o conjunto de calibração foram utilizados os brancos e padrões no total de 52 soluções e como conjunto de validação foram utilizadas 44 soluções (réplicas das amostras). O modelo com os dados centrados na média apresentou os melhores resultados. Além disso, quando os valores reais e previstos foram comparados o coeficiente de correlação foi de 0,991. As imagens também se mostraram com grande potencial para serem aplicadas em modelos de classificação. O método proposto configura-se uma estratégia simples e de baixo custo para a detecção de Cr (VI) em amostras de solos. Também se tentou determinar o elemento Pb utilizando imagens digitais, porém problemas em relação ao pH das soluções impediram a aplicação da metodologia para amostras reais.

ABSTRACT

USE OF DIGITAL IMAGES AND CHEMOMETRIC TOOLS FOR THE IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF Cr (VI) IN CONTAMINATED SOILS

The determination of toxic metals in soils is an important factor to access their quality or identify possible contamination. The element Cr has double feature: Cr (III) is essential for human beings and Cr (VI) is toxic. In this context, the aim of this work is to propose a simple test for the determination of Cr (VI) in soil samples using digital images and chemometric tools. The samples used in this project were collected at Maritime Antarctica, around the Comandante Ferraz Antarctic Station (a Brazilian scientific station). Alkaline medium was used to extract Cr (VI) of the samples and the chromogenic reagent was added to color development. To obtain the digital images, the extracts were placed in Petri dishes and a multifunction printer was employed. The results were compared with those calculated by molecular absorption spectrometry. For the images, the MatLab program version R2009a was used to obtain the mean values of colors R, G, B, H, S, V, r, g, b and L, and the Pirouette 4.0 program to the chemometric tools application. The digital images were evaluated in order to be applied for the proposition of models of classification and supervised calibration method PLS (Partial Least Squares). Two types of preprocessing were used to calculate PLS models: autoscaled and mean centered. For the calibration set was used the blanks and standards in a total of 52 solutions and as validation set was used 44 solutions (samples replicas). The model using the mean centered preprocessing was better. Furthermore, when the real values were compared with the predicted the coefficient of correlation was 0,991. It is evident that the proposed method is a simple strategy with low cost for the detection of Cr (VI) in soil samples. Furthermore, the images have great potential to be applied for classification models. The Pb determination using digital images was also tested, but problems with the solutions pH did not permit the application of the methodology for real samples.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	2
2 - OBJETIVO	5
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 - O elemento Cr	7
3.1.1 - Métodos para extração e determinação de Cr (VI)	9
3.2 - Imagens digitais.....	12
3.2.1 - Modelos de cores.....	13
3.2.1.1 - Modelo RGB.....	13
3.2.1.2 - Modelo HSI.....	14
3.2.2 - Aplicação de imagens digitais.....	17
3.3 - Métodos de Análise Multivariada.....	21
3.3.1 - Tipos de pré-processamento	21
3.3.2 - Análise Hierárquica de Agrupamentos.....	22
3.3.3 - Análise de Componentes Principais	23
3.3.4 - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais.....	25
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 - Amostras	29
4.2 - Reagentes e soluções.....	29
4.3 - Digestão e determinação de Cr pseudototal	30
4.4 - Extração e determinação de Cr (VI)	31
4.4.1 - Determinação de Cr (VI) utilizando UV-vis.....	31
4.4.2 - Determinação de Cr (VI) utilizando imagens digitais	31
4.4.3 - Ensaio de fortificações para avaliação do uso de imagens digitais em modelos de classificação	33
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

5.1 - Testes para determinação de Pb utilizando imagens digitais e rodizonato de sódio	35
5.2 - Determinação de Cr pseudototal	39
5.3 - Extração e determinação espectrofotométrica de Cr (VI)	42
5.4 - Potencialidades do uso de imagens na proposição de modelos de classificação para Cr (VI)	46
5.5 - Determinação de Cr (VI) utilizando imagens digitais	51
6- CONCLUSÕES	61
7 - REFERÊNCIAS	64
Apêndice 1	
Apêndice 2	
Anexo 1	

Capítulo 1

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

O solo é uma mistura de minerais, matéria orgânica, água e contém espaços preenchidos por ar. O solo pode ser definido também como o produto final do intemperismo, ação física, química e biológica nas rochas e geralmente possui uma textura porosa capaz de manter a vida vegetal na superfície no planeta. A parte orgânica dos solos consiste da biomassa vegetal em vários estágios de decomposição e podem ser encontrados no solo uma grande população de bactérias, fungos e animais [1].

A determinação de metais em solos é relevante devido a sua persistência e, quando em concentrações elevadas, os mesmos exibem efeitos negativos à saúde humana, aos animais e as plantas [2]. Diante deste fato alguns elementos devem ser monitorados em áreas de risco para evitar a contaminação do lençol freático e de plantações, por exemplo. Um destes elementos é o cromo (Cr). O Cr é o vigésimo quarto elemento da tabela periódica e não ocorre na natureza na sua forma metálica, sendo sua principal fonte o mineral cromita (FeOCr_2O_3) [3].

A toxicidade do Cr depende do seu estado de oxidação e a determinação de Cr (VI) é de grande relevância, devido aos seus bem documentados efeitos deletérios sobre os sistemas biológicos [4,5,6]. Neste contexto, a determinação de Cr (VI) em amostras de solos é um parâmetro importante para avaliar o nível de contaminação de um sítio em estudo [4], sendo utilizado como uma ferramenta valiosa para o monitoramento ambiental em programas que deverão nortear as estratégias para recuperação de áreas.

O Cr (VI) forma um complexo de coloração arroxeada com a difenilcarbazida, a reação é sensível, seletiva e com poucos interferentes [7]. Comumente determina-se a quantidade de uma substância colorida fazendo uso de aparelhos que operam na região do visível do espectro eletromagnético, como espectrofotômetros. Porém, qualquer equipamento que detecte variação da intensidade da coloração é capaz de possibilitar medidas qualitativas ou semi-quantitativas, como uma câmera digital ou um scanner. Nestes casos as imagens digitais podem ser avaliadas usando-se programas computacionais de fácil operação e aquisição [8].

Além disso, como a amostragem de solos é considerada um fator crítico para o resultado da análise, métodos *in situ* têm se tornado uma alternativa

atrativa mesmo sendo menos sensíveis, uma vez que eles minimizam as incertezas inerentes a distribuição dos metais nos solos de áreas contaminadas [9].

Tendo em vista a tendência de realizações das análises de uma forma mais ágil e de determinações *in situ*, como no caso de contaminação de solos em que são necessárias decisões expeditas, neste trabalho foi desenvolvido um método simples para a determinação de Cr (VI) em amostras de solo. Uma extração alcalina foi utilizada para posterior determinação da espécie com o auxílio de ferramentas quimiométricas e imagens digitais adquiridas por uma impressora multifuncional comercial e de baixo custo de aquisição. Também foi realizada a determinação do teor total de Cr nas amostras, para comprovar que estes solos estavam contaminados.

Capítulo 2

Objetivo

2 - OBJETIVO

O objetivo desse trabalho de mestrado é a proposição de um teste simples para a determinação de Cr (VI) em amostras de solos contaminados a fim de melhorar a frequência analítica, e obter informações confiáveis sobre a área de estudo com a determinação *in situ* para evitar gastos com transporte de amostra e equipamentos, especialmente quando são realizados estudos em áreas remotas. Para esta finalidade imagens digitais adquiridas em uma impressora multifuncional de baixo custo e ferramentas quimiométricas serão utilizadas.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - O elemento Cr

O Cr é o vigésimo-quarto elemento da tabela periódica e está situado entre o vanádio e o manganês. É o vigésimo-primeiro elemento mais abundante (em peso) na crosta terrestre e o único minério de crômio com importância comercial é a cromita (FeCr_2O_4). Além disso, o Cr forma uma camada superficial de óxido e por isso é muito utilizado como material a ser eletrodepositado em ferro e outros metais para evitar corrosão [10].

Os dois estados de oxidação mais comumente encontrados no meio ambiente, isto é Cr (III) e Cr (VI), possuem características drasticamente diferentes em relação às reatividades química e bioquímica e as propriedades físico-químicas [4]. O Cr (VI) é amplamente utilizado na indústria química para fabricação de tintas, ligas de aço, acabamentos em metais, entre outros. Em contrapartida, sais de Cr (III) são utilizados como suplementos nutricionais e têm exibido inúmeros benefícios a saúde humana e dos animais [5].

O Cr (VI) tem reconhecida toxicidade e a exposição a esta forma redox do Cr causa uma variedade de problemas clínicos, os quais podem ser citados: problemas respiratórios, asma, bronquite, dermatites, doenças de pele, entre outros. Já o Cr (III) é considerado um elemento essencial, e está relacionado ao controle do metabolismo de lipídios e da glicose em mamíferos [4,11], entretanto estudos recentes vêm questionando a essencialidade do Cr (III) [12,13,14].

Em meio aquoso o comportamento das espécies de Cr são afetadas pelo potencial redox e pelo pH, como pode ser observado na Figura 3.1 [15]. Em meio ácido o Cr (III) tende a ser mais estável, e em condições alcalinas o potencial redox diminui indicando uma estabilização do Cr (VI) [16].

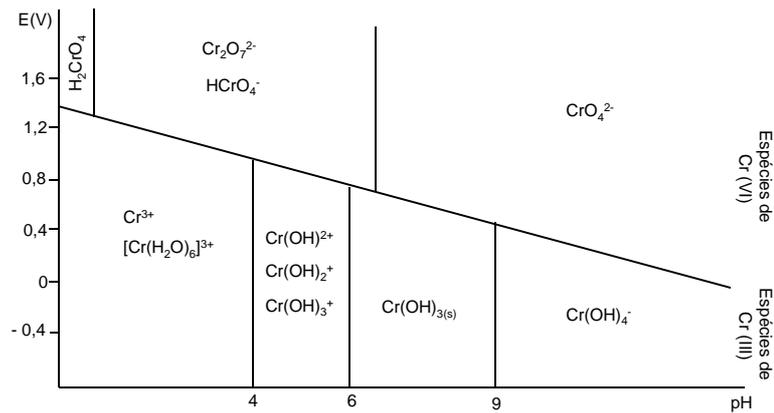


FIGURA 3.1 - Espécies de Cr em função do pH e do potencial redox [15].

Assim como em meio aquoso, em solos a espécie dominante de Cr depende extremamente do pH. Em solos ácidos ($\text{pH} < 4,0$) predomina a forma $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, já em $\text{pH} < 5,5$ ocorre reações de hidrólise e a espécie dominante é CrOH^{2+} . Em solos neutros a alcalinos Cr (VI) predomina na forma de cromatos solúveis (Na_2CrO_4) ou cromatos pouco solúveis (CaCrO_4 , BaCrO_4), em solos ainda mais ácidos ($\text{pH} < 6$) prevalece a espécie HCrO_4^- [4]. Reações de oxidação e redução podem converter Cr (VI) a Cr (III) e vice-versa [17].

No Estado de São Paulo a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) classifica os Valores orientadores para solo como: (1) Valores de Referência de Qualidade (VRQ); (2) Valor de Prevenção (VP) e (3) Valor de Intervenção (VI) que se subdivide em agrícola (área de proteção máxima), residencial e industrial. Os valores estipulados para o Cr estão descritos na Tabela 3.1. A CETESB não faz menção às espécies de Cr e sim somente à concentração total [18].

TABELA 3.1 - Valores estipulados para o elemento Cr pela CETESB.

Substância	Solo (mg kg^{-1} de peso seco)				
	Referência de qualidade	Prevenção	Intervenção		
			Agrícola	Residencial	Industrial
Cr (total)	40	75	150	300	400

Diferentemente do Brasil, alguns países estabelecem concentrações específicas para as formas redox de Cr. O Canadá possui uma das legislações mais restritivas permitindo $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ para solos residenciais e destinados a agricultura e

1,4 mg kg⁻¹ de Cr (VI) para solos comerciais e industriais. A Suíça estabelece a concentração de 5 mg kg⁻¹ de Cr (VI) e na Itália esses valores variam de 2 a 15 mg kg⁻¹ dependendo do tipo de solo [19].

As espécies mais lábeis de Cr são CrO₄²⁻ e HCrO₄⁻ e quando presentes em solos podem ser absorvidas por plantas ou contaminar os lençóis freáticos, por exemplo [4]. Desta forma, e devido a sua reconhecida toxicidade, a necessidade de avaliar a presença de Cr (VI) em solos vem crescendo e as legislações têm contribuído estabelecendo limites máximos toleráveis de Cr/Cr (VI) dependendo do tipo de solo. Assim, existe a necessidade real do desenvolvimento de técnicas, para detecção e determinação de Cr (VI), mais simples e que possam trazer resultados rápidos e exatos.

3.1.1 - Métodos para extração e determinação de Cr (VI)

Quando não se deseja um limite de detecção muito baixo, Cr pode ser quantificado utilizando-se Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (*Flame Atomic Absorption Spectrometry* - FAAS). Em um atomizador de chama uma solução da amostra é nebulizada por um fluxo de gás oxidante e combustível gasoso e levado à chama onde ocorre a atomização. Na chama ocorre um conjunto complexo de processos: nebulização, volatilização, dissociação e atomização. A mistura de gases utilizadas na chama geralmente é ar/acetileno que produz uma chama com temperatura de 2.400 – 2.700 K, quando temperaturas maiores são necessárias utiliza-se a mistura óxido nitroso/acetileno [20].

Além disso, o Cr, especificamente a forma redox Cr (VI), pode ser determinado colorimetricamente. Para isto, geralmente são utilizados aparelhos que operam na região do ultravioleta e visível do espectro eletromagnético, como os espectrofotômetros.

Porém, para se determinar Cr (VI) em amostras de solos deve ser utilizado um preparo de amostra adequado, uma vez que é necessário evitar que ocorra a degradação da espécie, contaminação, perdas do analito e interconversão entre as diferentes espécies que podem estar presentes [21].

Diversos estudos mostraram que a extração de Cr (VI) em amostras de solos em meio alcalino é mais eficiente que a extração em meio ácido, uma vez que o meio alcalino minimiza os processos de interconversão entre as espécies, além disso, os compostos de cromato são mais solúveis nesse meio [16, 19, 22].

James *et al.* [22] avaliaram diferentes procedimentos de extração para o Cr (VI) em amostras de solos. Os extratores avaliados foram: a) água destilada, b) tampão fosfato (K_2HPO_4 - 5 mmol L⁻¹ e KH_2PO_4 - 5 mmol L⁻¹), c) NaOH (0,1 mol L⁻¹) com sonicação e d) Na_2CO_3 (0,1 mol L⁻¹) / NaOH (0,5 mol L⁻¹) com e sem aquecimento. Os autores concluíram que a extração utilizando-se Na_2CO_3 (0,1 mol L⁻¹) / NaOH (0,5 mol L⁻¹) sob aquecimento solubilizava a maior parte das espécies de Cr (VI) e reduzia processos de oxidação e redução das espécies.

Panichev *et al.* [23] extraíram Cr (VI) do solo com solução de Na_2CO_3 , foram avaliadas várias concentrações para este extrator e 0,1 mol L⁻¹ obteve os melhores resultados. Além disso, os autores descrevem o uso de borbulhamento de CO_2 em água para extração do Cr (VI) que pode ser naturalmente extraído do solo.

O extrator Na_2CO_3 também foi utilizado para extrair Cr (VI) de amostras de solos contaminados com solução sulfocrômica [24]. Foram realizados testes de estabilidade para verificar se havia interconversão entre as espécies de Cr durante o processo de extração. Além disso, testes de adição e recuperação foram realizados em um solo com 13 g kg⁻¹ de matéria orgânica e um solo calcinado (quantidade de matéria orgânica abaixo do limite de detecção). Os autores concluíram que não há interconversão das espécies quando se utiliza este extrator, porém em solos com teores significativos de matéria orgânica pode haver uma queda na recuperação de Cr (VI).

Depois de extraído o Cr (VI) pode ser determinado por diversas técnicas como FAAS, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS - *Eletrothermal Atomic Absorption Spectrometry*), diluição isotópica e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (SID-ICP-MS), espectrofotometria de absorção molecular na região do visível (UV-vis), entre outras [25, 26].

Dentre estas técnicas a UV-vis se destaca por ser uma técnica simples, de baixo custo e fácil manipulação. Geralmente esses equipamentos possuem uma fonte contínua (lâmpada de tungstênio) que emite radiação, um monocromador para seleção do comprimento de onda desejado, a célula onde é colocada a solução de interesse e o sistema para aquisição de dados, como exemplificado na Figura 3.2.

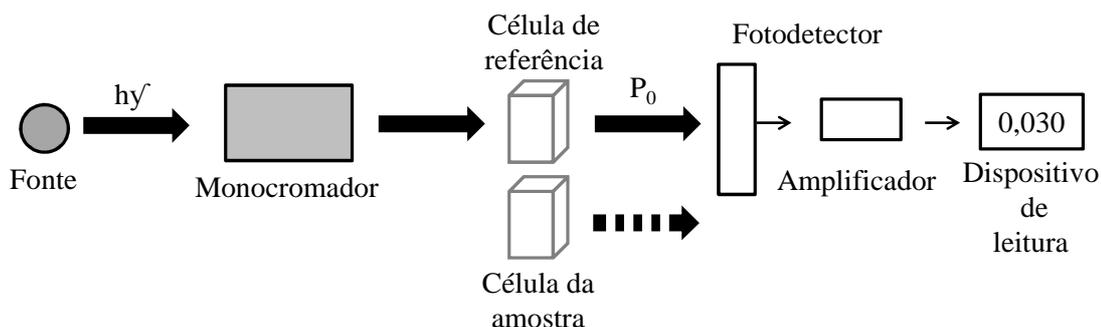
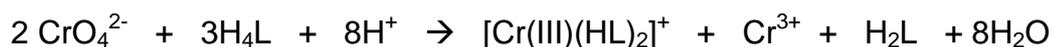


FIGURA 3.2 Representação esquemática de um espectrofotômetro.

A reação colorimétrica entre o Cr e o reagente cromogênico difenilcarbazida em meio ácido é rápida, sensível, seletiva e com poucos interferentes [7].

A equação 3.1 mostra a reação entre o Cr e a difenilcarbazida [27].



(equação 3.1)

A difenilcarbazida (H_4L) é oxidada a difenilcarbazona (H_2L), em contrapartida o Cr (VI) se reduz a Cr (III) formando o complexo de coloração violeta Cr (III) - difenilcarbazona $[\text{Cr(III)(HL)}_2]^+$, a reação ocorre em meio ácido e o complexo tem absorvância máxima em 540 nm [27].

Recentemente Franco *et al.* [9] utilizaram a reação colorimétrica entre Cr e difenilcarbazida para que análises *screening* de Cr (VI) fossem realizadas em campo. As concentrações avaliadas pelos autores variaram de 10 a 150 mg kg⁻¹ de Cr (VI). As extrações eram conduzidas em meio alcalino (NaOH (0,28 mol L⁻¹)/ Na₂CO₃ (0,5 mol L⁻¹)) a temperatura ambiente. As concentrações foram determinadas a olho nu comparando-se com soluções referências nas faixas de concentração: < 10 mg kg⁻¹, entre 10 e 40 mg kg⁻¹, entre 40 e 150 mg kg⁻¹ e maior que 150 mg kg⁻¹. Foram obtidas recuperações satisfatórias e as vantagens do método são rapidez, baixo custo, entre outros.

Assim como os espectrofotômetros e o olho humano, qualquer equipamento que detecte a mudança de coloração de amostras comparando com soluções de referência pode ser utilizado para fazer medidas qualitativas ou quantitativas [8]. Neste sentido, as imagens digitais adquiridas através de scanner, câmera digital, entre outros, têm sido amplamente utilizadas. Estas podem ser

manipuladas computacionalmente e trazer informações diversas sobre diferentes sistemas.

3.2 - Imagens digitais

Uma imagem digital é formada por uma matriz de m linhas e n colunas que possui um número finito de estruturas, que são definidas como *pixels*. Os *pixels* possuem localização e valores discretos e em geral quanto maior o número de *pixels* melhor a qualidade da imagem quando esta é ampliada.

O termo *color depth* ou profundidade de cor é utilizado para descrever a quantidade de bits usados para representar a cor de um único pixel em uma imagem. Quando especificado o número de bits usados, esse conceito é conhecido como *bits por pixel* (bpp). O número de tons que uma imagem pode apresentar depende da profundidade da cor e é dado pela equação 3.2.

$$2^n = \text{número de tons}$$

(equação 3.2)

Onde n representa a profundidade da cor. Assim quanto maior a profundidade da cor maior o número de tons que a imagem pode assumir.

As imagens digitais podem ser classificadas quanto a sua forma de armazenar as informações através da representação numérica dos pixels. Desta forma, uma imagem pode ser binária (*black* e *white*), tons de cinza (*grayscale*), indexadas (*indexed*) ou RGB. Nas imagens RGB cada pixel também possui três valores pertencentes às cores primárias vermelho (R), verde (G) e azul (B). Este tipo de imagem apresenta um arranjo de dimensão $m \times n \times 3$, em que cada matriz apresenta os valores referentes às cores primárias. Normalmente as imagens RGB possuem 8 bits para cada cor totalizando 24 bits, podendo assumir aproximadamente 16 milhões de cores diferentes ($256^3 = 16.777.216$) [28].

3.2.1 - Modelos de cores

Os modelos de cores foram criados para permitir a especificação das cores em um formato padronizado. Em linhas gerais, um modelo de cores é uma representação tridimensional na qual cada cor é representada por um ponto no sistema de coordenadas 3-D. Os modelos mais utilizados para representação de cores são: RGB (red, green, blue), CMY (cyan, magenta, yellow), CMYK (variante do modelo CMY, onde K denota black), YIQ (padrão NTSC de TV em cores) e HSI (hue, saturation, intensity), às vezes também denominado HSV (hue, saturation, value) [28].

Neste trabalho foram utilizados os modelos RGB e HSV, os quais serão explicados mais detalhadamente a seguir.

3.2.1.1 - Modelo RGB

O modelo de cores RGB é baseado nas três cores primárias (vermelho, verde e azul) e em um sistema de coordenadas cartesianas. O subespaço de interesse é um cubo, como representado na Figura 3.3, no qual as três cores primárias estão em três vértices, e alternadamente as cores secundárias (ciano, magenta e amarelo) em outros três vértices. A cor preta se localiza na origem desse cubo e oposto encontra-se a coloração branca, além disso, entre essas duas cores há a escala de cinza (pontos em que valores de RGB são iguais). Por convenção usa-se valores normalizados de 0 a 1 para cada cor e as cores neste modelo são definidas por vetores que parte da origem [28].

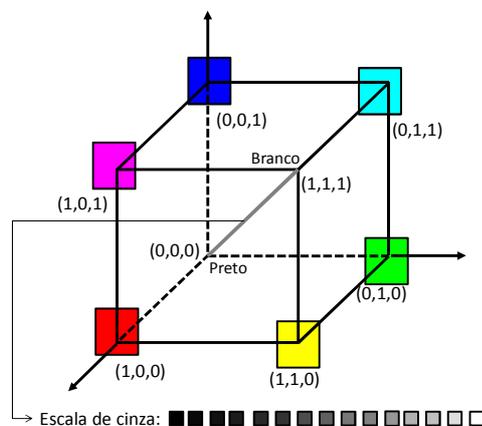


FIGURA 3.3 - Cubo de cores RGB, e representação da escala de cinza, que parte da coloração preta (0, 0, 0) até a coloração branca (1, 1, 1).

A Figura 3.4 representa um exemplo da coloração verde, na qual tem-se 0 para o vermelho, 0 para o azul e 255 (ou 1) para o verde. Este modelo pode assumir aproximadamente 16 milhões de cores diferentes $(2^8)^3$ (8 bits para cada cor).

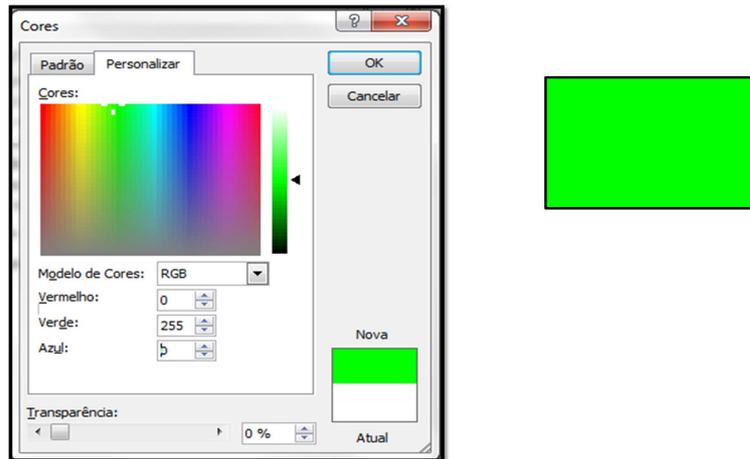


FIGURA 3.4 - Exemplo do modelo RGB para coloração verde.

3.2.1.2 - Modelo HSI

Quando o olho humano percebe uma cor esta é descrita pelo matiz, saturação e intensidade. Desta forma, o modelo de cores HSI é importante por fornecer informações de como percebemos as cores. O Matiz é a cor como percebida, uma cor pura (por exemplo: vermelho, amarelo, entre outras). Já a saturação é a pureza do matiz, ou seja, o grau de mistura da cor pura com o branco. E a intensidade é a luminosidade ou escurecimento relativo da cor, geralmente medido como a porcentagem de brilho mínimo (preto) a brilho máximo (branco) [28].

Geometricamente, para o modelo de cores HSI é feito um corte transversal no modelo de cores RGB, obtendo-se um triângulo em que os vértices apresentam as três cores primárias (vermelho, verde e azul) e o centro corresponde a combinação dessas três cores em iguais proporções, como demonstrado na Figura 3.5.

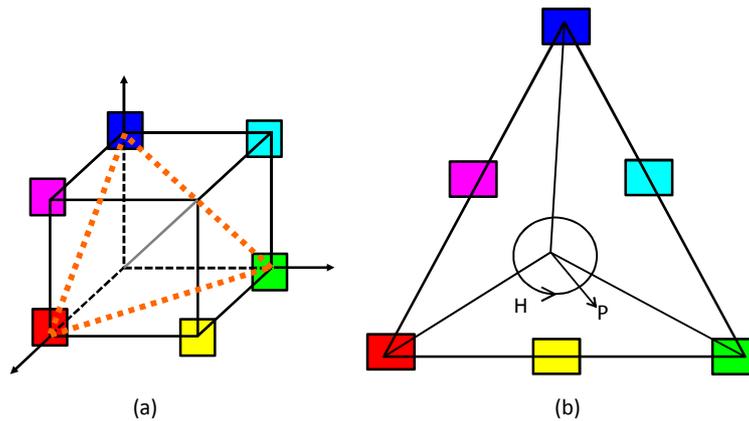


FIGURA 3.5 - (a) Corte transversal no modelo de cores RGB e (b) triângulo do modelo de cores HSI.

Na Figura 3.5, o valor do H (*Hue* - matiz) no ponto P, corresponde ao ângulo do vetor da cor P com a cor vermelha. Assim, quando $H = 0^\circ$, a cor é vermelha, quando $H = 60^\circ$, a cor é amarela, e assim por diante. O valor da S (*Saturation* - saturação) (mistura com a coloração branca) é proporcional à distância do ponto P até o centro do triângulo. Quanto mais distante o ponto P estiver do centro do triângulo, mais saturada será a cor. O valor de I (*Intensity* - intensidade) é medida em relação a uma linha perpendicular ao triângulo, passando através do seu centro. As intensidades ao longo dessa linha que ficam abaixo do triângulo tendem do escuro até o preto, enquanto que as intensidades acima do triângulo tendem ao branco. A medida de intensidade pode ser visualizada na Figura 3.6.

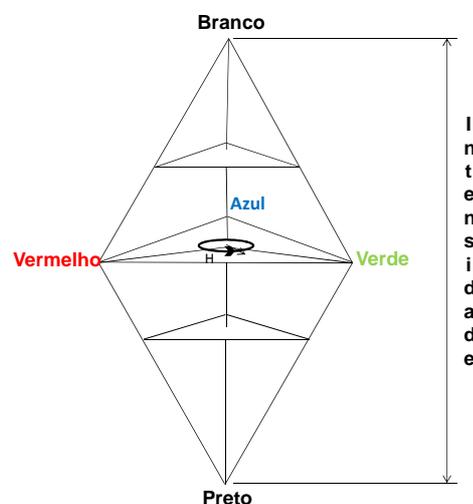


FIGURA 3.6 - Modelo de cores HSI baseado em plano triangular.

Este modelo utiliza os valores normalizados de vermelho, verde e azul (r, g e b). Estes percentuais recebem o nome de coeficientes tricromáticos e são dados pelas equações:

$$r = \frac{R}{R + G + B}$$

(equação 3.3)

$$g = \frac{G}{R + G + B}$$

(equação 3.4)

$$b = \frac{B}{R + G + B}$$

(equação 3.5)

Também foi utilizado o valor da luminosidade (L), o qual é calculado pela equação 3.6 a seguir.

$$L = R + G + B$$

(equação 3.6)

Matematicamente pode-se converter os valores de R, G e B para H, S e I utilizando as equações a seguir:

$$H = \cos^{-1} \left\{ \frac{1/2[(R - G) + (R - B)]}{[(R - G)^2 + (R - B)(G - B)]^{1/2}} \right\}$$

(equação 3.7)

$$S = 1 - \frac{3}{R + G + B} [\min(R, G, B)]$$

(equação 3.8)

$$I = \frac{1}{3} (R + G + B)$$

(equação 3.9)

3.2.2 - Aplicação de imagens digitais

As imagens digitais têm sido amplamente utilizadas em diversas áreas, inclusive na química analítica. As aplicações variam de determinações de metais em diversas matrizes [29, 30, 31, 32], controle de qualidade alimentícia [33, 34, 35], monitoramento ambiental [36], entre outros [37, 38, 39, 40]

Anwar *et al.* [29] desenvolveram um método para determinar As, Hg e Pb usando um scanner e *spot test* em 1 μL de amostras líquidas. Neste caso, a densidade da cor foi o parâmetro estudado na imagens digitais. A faixa da curva de calibração foi de 1 a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. E de acordo com os autores as vantagens do método em relação aos métodos espectrofotométricos são os menores custos, tempo de preparo e manuseio.

Kompany-Zareh *et al.* [30] desenvolveram um método para determinação de Fe (III) em amostras de aço utilizando um scanner. O método foi baseado na reação colorimétrica entre o analito e o íon tiocianato (SCN^-). Os autores aperfeiçoaram parâmetros como contraste, brilho, pontos por polegada (dpi - dots per inch), entre outros. Para calibração os autores utilizaram redes neurais e através dos resultados obtidos fica evidente que as imagens podem ser utilizadas, uma vez que os erros foram menores que 4%.

Utilizando também uma reação colorimétrica e um scanner de mesa Paciornick *et al.* [31] determinaram Hg em amostras de peixes. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles gerados por Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor a Frio (CV AAS, *Cold vapour AAS*). Os autores utilizaram três modelos de cores diferentes para interpretação dos dados (RGB, CYM e o HLS), e o modelo HLS, mais especificamente o componente Hue (matiz) mostrou os melhores resultados. O limite de detecção da técnica proposta foi de 0,007 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Titânio foi determinado em amostras de plásticos por Lopéz-Molinero *et al.* [32] utilizando a reação colorimétrica que ocorre entre o analito e o peróxido de hidrogênio em meio ácido. As imagens foram adquiridas com uma câmera digital e as intensidade de RGB calculadas foram linearmente correlacionadas com as concentrações de Ti variando de 2,0 a 30 mg L^{-1} . Os resultados foram concordantes

com aqueles obtidos por ICP AES (espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado).

Um método quantitativo baseado na captura de imagens (utilizando uma câmera digital) da chama durante o processo de emissão dos elementos foi desenvolvido por Lyra *et al.* [41]. O método foi aplicado para determinação de lítio, sódio e cálcio em drogas antidepressivas, soro fisiológico e água, respectivamente. O modelo de cores utilizado foi o RGB. Os autores relatam que com o uso da câmera não é necessário um seletor de comprimento de onda, o que torna as medidas de emissão mais simples e com menor custo. Porém, em matrizes complexas as medidas ficam mais suscetíveis a interferências espectrais e/ou efeitos de matriz.

Gomes *et al.* [8] propuseram um experimento para determinação de ácido ascórbico presente em comprimidos de aspirina fazendo o uso de imagens digitais e a formação do complexo azul da Prússia. As imagens foram digitalizadas com o uso de um scanner de mesa e foi utilizado o padrão de cores RGB para tratamento numérico das mesmas. Verificou-se, após comparação dos resultados obtidos através da digitalização com aqueles provenientes da espectrofotometria, que o método pode ser utilizado em laboratórios de graduação que eventualmente não dispõem de espectrofotômetros, uma vez que os resultados foram satisfatórios.

Pereira & Bueno [42] desenvolveram uma metodologia adicional para avaliação de qualidade de tintas com o uso de scanner convencional. As imagens foram convertidas em histogramas e utilizou-se de ferramentas quimiométricas como PCA - Análise de componentes principais (*Principal components analysis*) e HCA - Análise Hierárquica de Agrupamentos (*Hierarchical Cluster Analysis*) para que não houvesse interpretação subjetiva. Os resultados mostraram que o método pode ser utilizado como uma ferramenta adicional e pode ser aplicado à outras matrizes como por exemplo vernizes.

Godinho *et al.* [43] classificaram amostras de refrigerantes do tipo cola, laranja e guaraná fazendo o uso de imagens digitais e ferramentas quimiométricas. As amostras comercializadas no estado de Goiás foram desgaseificadas em ultrassom e adicionadas em uma placa de Petri, em seguida registraram-se as imagens em um scanner de mesa e foram obtidos os histogramas para cada canal de cores (RGB) e estes foram tratados matematicamente. Em seguida utilizou-se da

ferramenta multivariada de análise dos componentes principais para a classificação das amostras. Os resultados obtidos mostraram que, em linhas gerais, os refrigerantes puderam ser classificados por suas imagens digitais.

Realpe & Velázquez [44] utilizaram processamento da escala de cinza de imagens para determinar a concentração de misturas em pó. Diversos pós de diferentes colorações foram utilizados para preparar as misturas. As imagens coloridas foram capturadas por uma câmera e convertidas em níveis de cinza. A câmera e as amostras eram isoladas da iluminação do laboratório para que não houvesse interferência durante a aquisição das imagens e os resultados foram comparados com aqueles obtidos através de espectroscopia de infravermelho próximo. A metodologia apresentou excelentes resultados, e em geral a precisão da análise para prever a concentração aumenta com o aumento da diferença da média do valor de cinza. Os resultados obtidos foram próximos aqueles obtidos pela espectroscopia de infravermelho próximo. A repetibilidade do sistema de imagens mostrou que a metodologia é adequada para prever a concentração de misturas em pó com componentes de diferentes colorações.

Borin et al. [45] quantificaram *Lactobacillus* em leite fermentado, cultivados em meio seletivo (MRS Ágar), utilizando imagens digitais de placas de Petri com o objetivo de eliminar a limitação humana pela contagem visual. Um modelo de calibração multivariada construído a partir dos histogramas das cores RGB e HSI (*Hue, saturation e intensity*) foi usado com o intuito de determinar o número de lactobacilos no leite fermentado. Além disso, os autores determinaram os coeficientes tricromáticos e a luminosidade (soma das cores RGB). Os resultados permitiram o desenvolvimento de modelos de calibração com erro inferior a 10%.

Santos et al. [46] utilizaram imagens digitais adquiridas de um scanner de mesa para identificar adulterações em leite de vaca. Adulterações com NaOH e água foram avaliadas com o uso de indicadores ácido base (azul de bromofenol, vermelho de metila, nitrofenol, azul de bromotimol e verde de bromocresol). Após a aquisição das imagens calculou-se os descritores de cores R, G, B, H, S, V, r, g, b e L. O indicador azul de bromofenol foi o que apresentou os melhores resultados e modelos PCR - Regressão por Componentes Principais (Principal components regression) e PLS foram utilizados com resultados satisfatórios.

Borah & Bhuyan [47] monitoraram a fermentação de chás que normalmente é feita visualmente por especialistas da área utilizando imagens digitais. Uma câmera digital, acoplada com um arranjo de iluminação foi usada para capturar as imagens durante o processo de fermentação. Como o modelo RGB não é um modelo robusto, usou-se sempre a mesma iluminação, direção e distância na aquisição das imagens. Foram capturadas 28 imagens distinguindo-se em não fermentada (NF), sub fermentada (UF), bem fermentada (WF) e sobre fermentada (OF). A melhor imagem foi considerada como padrão (WF) e as restantes foram comparadas utilizando-se o valor R que apresentou melhor desempenho. Os resultados mostraram boa concordância com os obtidos por três especialistas em chá. Porém, reconhece-se que as utilizações de técnicas de inteligência artificial como Redes Neurais e algoritmos genéticos podem minimizar a falsa detecção de cor.

Gaião *et al.* [48] determinaram HCl, H_3PO_4 e alcalinidade total em água de torneira e mineral, utilizando uma titulação baseada em imagens digitais. As imagens foram adquiridas com uma câmera CCD (webcam) e os dados foram tratados utilizando-se o modelo de cores RGB. Os autores concluíram que as imagens digitais são viáveis para aplicações analíticas principalmente quando o ponto final é de difícil visualização.

Vidal *et al.* [49] utilizaram imagens adquiridas em um scanner e o modelo de cores RGB para analisar a qualidade de chapas de aço eletrodepositadas por níquel. As imagens foram utilizadas para verificar a evolução da eletrodeposição do metal e a concentração dos aditivos no banho. PCA foi utilizada para identificar amostras anômalas e encontrar direções de máxima variabilidade. Os resultados foram concordantes com aqueles obtidos através da técnica de referência (refletância especular).

Percebe-se que as imagens digitais têm uma ampla aplicação e podem ser obtidas e tratadas de diferentes formas. Cabe ressaltar ainda que quase a totalidade dos trabalhos mencionados faz uso de ferramentas quimiométricas para tratamento das imagens digitais.

3.3 - Métodos de Análise Multivariada

Genericamente pode-se dividir os métodos de análise multivariada em três classes distintas: os de análise exploratória de dados, os de construção de modelos de calibração e os de construção de modelos de classificação. Neste trabalho foram utilizados métodos de análise exploratória de dados como PCA e HCA e também foi construído um modelo de calibração utilizando PLS.

3.3.1 - Tipos de pré-processamento

O pré-processamento é uma etapa crucial para a análise multivariada, e é definido como uma manipulação matemática que é realizada antes da análise original. Esta manipulação matemática é utilizada para remover ou reduzir fontes irrelevantes de variação (randômicas ou sistemáticas). Existem vários tipos de pré-processamento e a escolha depende do tipo de dado que está sendo analisado. Os pré-processamentos mais utilizados são o centrar na média (CM) e auto-escalonamento (AS) [50].

No CM calcula-se a média de cada variável (equação 3.10) e em seguida subtrai-se os dados originais pela média calculada (equação 3.11).

$$\bar{x}_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_{ij}$$

(equação 3.10)

$$x_{ij(CM)} = x_{ij} - \bar{x}_i$$

(equação 3.11)

Onde: \bar{x}_i é a média dos dados x_{ij} em uma coluna (variáveis).

Já no AS, calcula-se a variância dos dados, s^2 , de acordo com a equação 3.12:

$$s_j^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$

(equação 3.12)

E divide-se os dados centrados na média pelo desvio padrão segundo a equação 3.13:

$$x_{ij(AS)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_j}$$

(equação 3.13)

Normalmente utiliza-se o CM para dados espectrais e o AS é utilizado quando se quer dar a mesma importância para todas as variáveis (dados de concentração e propriedades físico-químicas).

3.3.2 - Análise Hierárquica de Agrupamentos

A HCA é uma técnica não supervisionada que examina as distâncias entre todas as amostras e representa as informações na forma de um gráfico em duas dimensões chamado dendograma. Para gerar o dendograma, os métodos HCA formam grupos de amostras baseados em suas proximidades. Uma forma comum de se fazer isso é inicialmente tratar todas as amostras como um grupo e juntar os grupos mais próximos até que não reste nenhum grupo. Existem várias formas para se calcular as distâncias entre as amostras e a mais utilizada é a distância Euclidiana (vizinho mais próximo) [50].

A Figura 3.7 ilustra como as amostras são separadas em grupos e como é gerado o dendograma. Neste caso, foram consideradas cinco amostras diferentes e a princípio todas foram consideradas grupos isolados Figura 3.7 (a)(i), e como as amostras 1 e 2 são as mais próximas estas foram agrupadas como indicado pela linha preta. O processo é então repetido para os quatro grupos restantes, desta forma as amostras 4 e 5 foram agrupadas por serem mais próximas Figura 3.7 (a)(ii) e assim por diante até que se forme apenas um grupo Figura 3.7 (a)(iv).

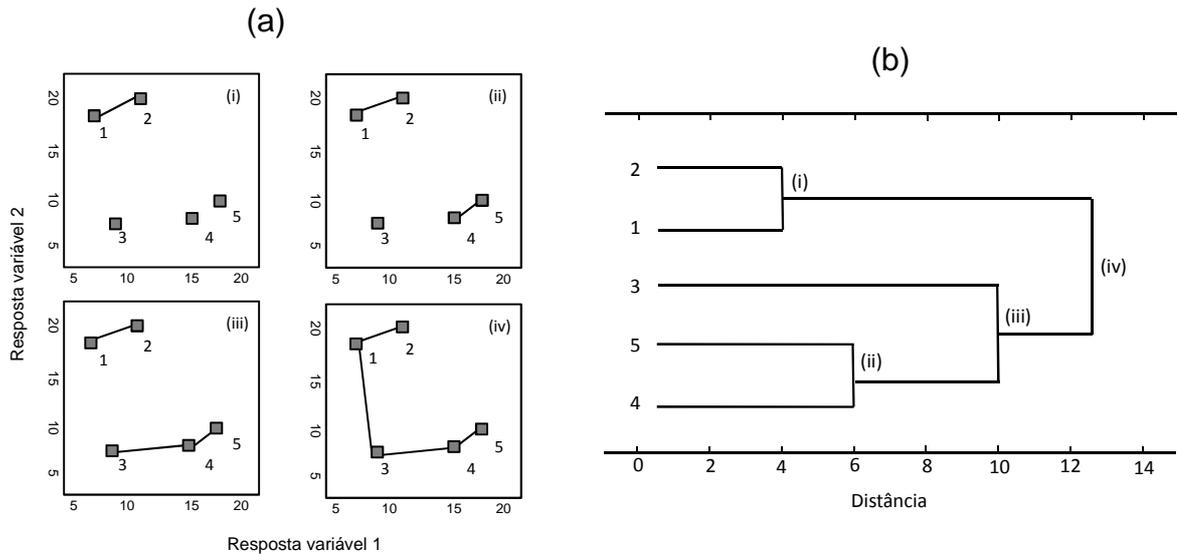


FIGURA 3.7 - (a)Esquema de formação de grupos para cinco amostras fictícias e (b) dendograma dos dados usando HCA para as amostras.

Os dados da Figura 3.7 (a) podem ser representadas em um dendograma Figura 3.7 (b). No dendograma as linhas verticais indicam quais amostras estão em um grupo e no eixo x está a distância entre as amostras. Por exemplo a linha vertical que une os grupos 1 e 2 indica que a distância entre esses dois pontos é de aproximadamente 4 unidades. Alguns *softwares* convertem as distâncias em valores de similaridade variando de 0 a 1, nos quais grupos iguais tem similaridade igual a 1. Apesar das Figuras 3.7 (a) e (b) representarem as mesmas informações é importante ressaltar que algumas informações são perdidas quando se constrói um dendograma. Por exemplo, o grupo 3 se uniu ao grupo 4 e 5 porém no dendograma não indica se 3 está mais próximo de 4 ou de 5 [50,51].

3.3.3 - Análise de Componentes Principais

A PCA é utilizada principalmente para representar as n -dimensões do conjunto de dados em um número menor de dimensões, usualmente duas ou três. Permitindo assim observar grupos entre as amostras, *outliers*, etc., que definem a estrutura do conjunto [51].

A PCA pode ser mais bem entendida usando-se um exemplo com apenas duas variáveis. Como mostrado na Figura 3.8, tem-se o conjunto de dados

e traça-se uma componente principal (PC1) e ortogonalmente traça-se a componente principal 2 (PC2). Neste caso a matriz de dados corresponde a duas colunas (variáveis) e 30 linhas (amostras) representadas pelos pontos. Em termos geométricos as componentes principais devem descrever a variação ou espalhamento entre os pontos usando o menor número possível de eixos. As distâncias entre as amostras são usadas para definir similaridades e diferenças [50, 52].

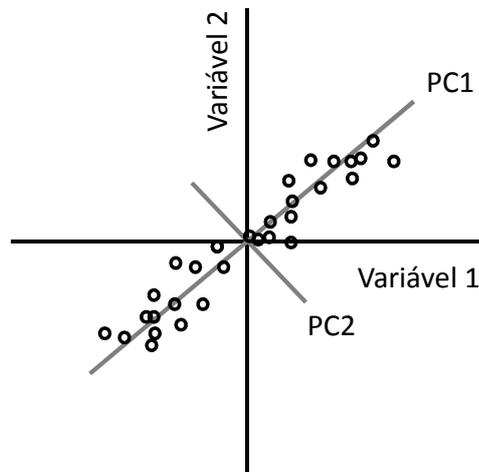


FIGURA 3.8 - Projeção das componentes principais (PCs).

Em termos matemáticos, a PCA corresponde a decomposição da matriz \mathbf{W} , de dimensões $m \times n$, em duas matrizes menores: \mathbf{T} e \mathbf{L}^t , sendo que \mathbf{T} representa a matriz de *scores* e \mathbf{L}^t a matriz de *loadings*. A equação que representa o processo está descrito na equação 3.14.

$$\mathbf{W} = \mathbf{T} * \mathbf{L}^t$$

(equação 3.14)

Para otimizar o número de componentes principais que será utilizada é preciso levar em consideração a porcentagem de variância descrita para cada PC. E cada caso deve ser analisado com cautela, pois cada conjunto de dados tem sua peculiaridade. Em geral deve-se escolher o menor número de fatores que descrevem a maior variância dos dados.

A partir do gráfico de *scores* é possível analisar agrupamentos e tendências das amostras, além de verificar se existem amostras muito diferentes do conjunto como um todo. Analisando o gráfico de *loadings* é possível verificar quais são as variáveis mais importantes que estão contribuindo para a separação das amostras.

3.3.4 - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

A Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) é uma das técnicas de calibração supervisionada mais utilizadas. Este método permite relacionar vários blocos de dados (matrizes de dados) para serem caracterizados. Em muitos estudos é necessário entender as inter-relações entre várias partes de um sistema complexo. Em tais problemas, os blocos de dados estão conectados por algum esquema pré-determinado e o método PLS permite que a influência de cada bloco seja avaliada. O PLS permite também que todas as variáveis sejam retidas no problema extraíndo as “variáveis latentes”. Essas são encontradas por um processo iterativo e são mutualmente ortogonais (dentro de cada bloco), através de combinações lineares de todas as variáveis originais [53].

A vantagem do PLS é devido ao fato de que as variáveis latentes simultaneamente: (a) descrevem a máxima variância de um bloco, e (b) promove o melhor ajuste para o modelo.

De maneira geral, o PLS pode ser explicado na Figura 3.9. Calcula-se uma PCA para a matriz de dados X (variáveis) e uma PCA para o vetor de dados Y (por exemplo concentração de um analito). Os *scores* de ambas as matrizes são então utilizados para calcular coeficientes de regressão (b).

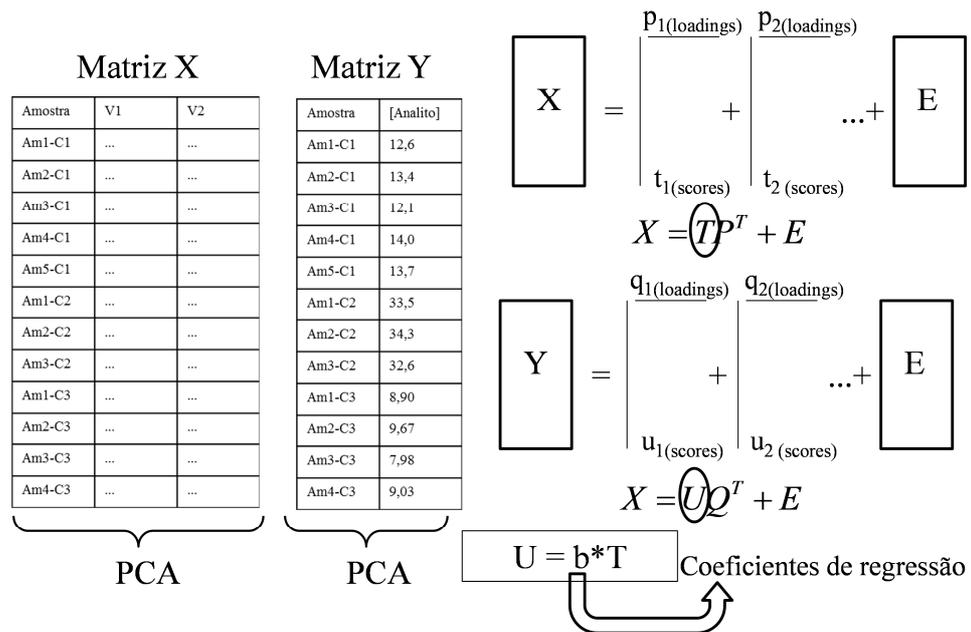


FIGURA 3.9 - Representação simplificada do PLS.

Porém, antes da utilização do modelo este precisa ser validado. A validação é feita para verificar se de fato o modelo reflete o comportamento do analito de interesse. Geralmente o que se faz é a validação cruzada, que utiliza a magnitude dos erros de previsão de um modelo para escolher o número de variáveis latentes a ser utilizada. Os seguintes passos são utilizados para a validação cruzada: (1) remove-se uma ou mais amostras do conjunto de calibração e constrói-se o modelo; (2) usa-se o modelo construído para prever as amostras que foram removidas; (3) calcula-se o erro de previsão e em seguida a soma dos quadrados desse erro (PRESS) [52]. A soma dos quadrados dos erros é calculado pela equação 3.15:

$$\sum_i (c_i - \hat{c}_i)^2$$

(equação 3.15)

Também pode-se calcular a raiz quadrada RMSEP, dado pela equação 3.16, onde n é o número de amostras.

$$\sqrt{\frac{\sum_i (c_i - \hat{c}_i)^2}{n}}$$

(equação 3.16)

Este processo de validação é repetido diversas vezes, e escolhe-se a melhor variável latente onde se tem o menor erro de previsão.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Amostras

As amostras de solo utilizadas neste projeto de mestrado foram coletadas ao redor da Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz na Ilha Rei George, Antártica Marítima. Essas amostras foram utilizadas pelo Dr. Marcelo Braga Bueno Guerra no desenvolvimento de sua tese de doutoramento, e dentre as várias amostras por ele coletadas 8 foram selecionadas para este trabalho, sendo 6 coletadas em áreas com evidente impacto antrópico, próximas aos tanques de óleo diesel que abastecem a estação (amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e 2 coletadas distantes até quatro quilômetros da estação (amostras 7 e 8). Mais informações sobre as amostras podem ser encontradas no trabalho desenvolvido por Guerra *et al* [54], as amostras de 1 a 8 correspondem as amostras 2A, 3A, 3B, 4A, 5A, 6, 11A e 15B, respectivamente.

No laboratório as amostras foram secas em estufa a 60 °C (Qualxtron, EUA), peneiradas para uma granulometria menor que 2 mm (Bertel, Caieiras, Brasil), moídas em moinho de facas (A11 basic Analytical mill, IKA®, EUA) e novamente peneiradas para granulometria menor que 212 µm (Bertel).

Para verificar a exatidão dos métodos utilizados foram analisadas amostras de materiais de referência certificados (CRM - Certified Reference Material). Para Cr pseudototal foi utilizado *Sewage Sludge from Industrial Origin* BCR 146R, com concentração certificada de $174 \pm 7 \text{ mg kg}^{-1}$. E para Cr (VI) foi utilizado material de referência certificado de solo NIST *Hexavalent Chromium in contaminated soil (High Level)* SRM 2701 com concentração certificada de $551,2 \pm 34,5 \text{ mg kg}^{-1}$.

4.2 - Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com reagentes de grau analítico (PA). Água desionizada, obtida à partir de um purificador de água Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA), foi utilizada para todas as diluições e preparo das soluções. Para evitar contaminação por metais, toda vidraria foi lavada, mantida em banho de HNO₃ 10% (v v⁻¹) durante 24 hrs e enxaguada com água desionizada antes do uso.

Solução estoque contendo 1000 mg L^{-1} de Cr (VI) foi preparada dissolvendo-se 1,41g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Synth, São Paulo, Brasil), previamente seco a $160 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 hrs, em 500 mL de água desionizada. Solução de água-régia, utilizada na digestão pseudototal, foi preparada utilizando-se HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha) e HNO_3 (Merck) na proporção de 3:1. Os reagentes hidróxido de sódio (utilizado na extração de Cr (VI)), acetona, ácido sulfúrico 98% (m m^{-1}) e 1,5 difenilcarbazida (estes três últimos utilizados para extração e determinação do Cr (VI)) foram obtidos da Merck.

Além disso, a difenilcarbazida (0,2%) foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,2 g do reagente em acetona suficiente (aproximadamente 10 mL), o volume aferido com água desionizada para 100 mL e a solução foi armazenada em frasco âmbar para evitar a degradação pela ação da luz.

4.3 - Digestão e determinação de Cr pseudototal

O Cr pseudototal foi determinado nas amostras de solo de acordo a norma alemã DIN 38414-S7 [55], que consistiu na pesagem de 300 mg da amostra de solo para um tubo de vidro e a adição de 3 mL de água-régia, deixados em repouso em uma etapa de pré-digestão por 12 horas. Em seguida a mistura foi aquecida em um bloco digestor (Q-327M242, Quimis, São Paulo, Brasil) por 3 horas a $120 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando-se um funil de vidro para permitir o refluxo da mistura ácida. Após o resfriamento ajustou-se o volume final para 10 mL em tubos tipo Falcon® e centrifugou-se durante 10 min a 3500 rpm (Hermle Z200A, Labnet, Woodbridge, EUA).

O Cr pseudototal foi determinado no sobrenadante das soluções utilizando-se um Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama - FAAS (AA240FS, Varian, Mulgrave, Austrália) equipado com uma lâmpada de deutério para correção da radiação de fundo e uma lâmpada de cátodo oco (Varian) de Cr operando em $357,9 \text{ nm}$. A corrente aplicada na lâmpada foi de $7,0 \text{ mA}$ e a resolução espectral de $0,2 \text{ nm}$. A chama foi produzida por fluxos de óxido nitroso e acetileno de $10,24$ e $6,63 \text{ L min}^{-1}$, respectivamente. Cabe ressaltar que as condições utilizadas foram todas recomendadas pelo fabricante.

4.4 - Extração e determinação de Cr (VI)

Extraiu-se o Cr (VI) das amostras utilizando-se solução alcalina sob aquecimento. O meio alcalino foi escolhido por minimizar os riscos de redução do Cr (VI) a Cr (III). A solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ foi utilizada como extrator [22]. Essa solução foi preparada pesando-se 4g de hidróxido de sódio e dissolvendo essa massa para um volume de 1 L de água desionizada.

Uma massa de aproximadamente 2g de amostra de solo foi pesada em Erlenmeyers e adicionou-se 15 mL da solução extratora. A mistura foi aquecida em chapa aquecedora (208-2D, Nova Ética, São Paulo, Brasil) a temperatura de 90 °C durante 60 min com agitação esporádica [19, 22]. Quando os frascos atingiam a temperatura ambiente a massa final era ajustada para 15 g, e 10 mL do extrato era transferido para tubos tipo Falcon® que foram centrifugados durante 10 min a 3500 rpm.

Para as determinações de Cr (VI) adicionou-se 500 µL de difenilcarbazida (0,2% m v⁻¹) em 5 mL do sobrenadante da extração alcalina. Como a reação da difenilcarbazida com o Cr (VI) ocorre em meio ácido, adicionou-se em seguida 200 µL de H₂SO₄ (5,0 mol L⁻¹) para ajustar o pH para 1. A determinação do Cr (VI) foi realizada utilizando-se dois métodos distintos: espectrofotometria de absorção molecular na região do espectro eletromagnético visível e imagens digitais como será discutido nas próximas sessões.

4.4.1 - Determinação de Cr (VI) utilizando UV-vis

As determinações utilizando UV-vis foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro da marca Femto, (600 plus, Femto, São Paulo, Brasil). As medidas foram feitas utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico no comprimento de onda de 540 nm. Como alguns extratos possuíam certa coloração, todas as medidas foram inicialmente realizadas sem a adição do reagente colorimétrico (difenilcarbazida), e essa absorbância foi subtraída do sinal de absorbância da respectiva amostra após adição de difenilcarbazida.

4.4.2 - Determinação de Cr (VI) utilizando imagens digitais

As imagens digitais foram adquiridas utilizando-se uma impressora multifuncional modelo Deskjet F4180, marca Hewlett-Packard (HP). Para isso,

placas de Petri de vidro contendo as soluções foram diretamente posicionadas no vidro da impressora multifuncional e as imagens coletadas com uma resolução de 300 dpi na escala RGB. Os ajustes automáticos da impressora foram desabilitados.

As condições utilizadas foram sempre as mesmas (realces: 35; sombras: -69 e meio-tons: 0) e foram desabilitados os demais parâmetros de ajuste da imagem.

Dois aparatos, um sendo branco e outro preto, foram utilizados simultaneamente, o primeiro para permitir a reflexão da luz (uma vez que as soluções eram translúcidas) e o segundo (acima do primeiro) para evitar interferência da iluminação ambiente [56].

A cada digitalização era possível obter imagens de 6 amostras diferentes, uma vez que este era o número máximo de Placas de Petri que poderiam ser simultaneamente colocadas diretamente no vidro da impressora multifuncional. Foi utilizado um gabarito de papel cartão para que as posições fossem sempre as mesmas, o que facilitava durante o tratamento das imagens. As amostras eram colocadas aleatoriamente nas 6 posições. Antes do tratamento dos dados as imagens eram recortadas com tamanho de 301 x 301 *pixels*.

Assim como as medidas espectrofotométricas, as imagens dos extratos sem a adição de difenilcarbazida foram realizadas para impedir a interferência da coloração original dos extratos. O procedimento geral está representado na Figura 4.1. As imagens digitais obtidas eram matematicamente tratadas usando o programa Matlab 2009a (The Math Works Inc., Natick, EUA) e os valores médios de dez descritores de cores foram calculados de acordo com Cantrell e colaboradores [57] para vermelho (R - red), verde (G - green), azul (B - blue), matiz (H - hue), saturação (S - saturation), valor (V - value), cores relativas (r, g e b) e luminosidade (L).

Uma matriz de dados foi organizada para ambas as imagens adquiridas (com e sem adição de difenilcarbazida). Os dez descritores de cores obtidos com a adição de difenilcarbazida foram subtraídos daqueles valores obtidos sem adição de difenilcarbazida. A matriz resultante foi analisada utilizando o programa Pirouette 4.0 rev.2 (Bothell, Washington, EUA).

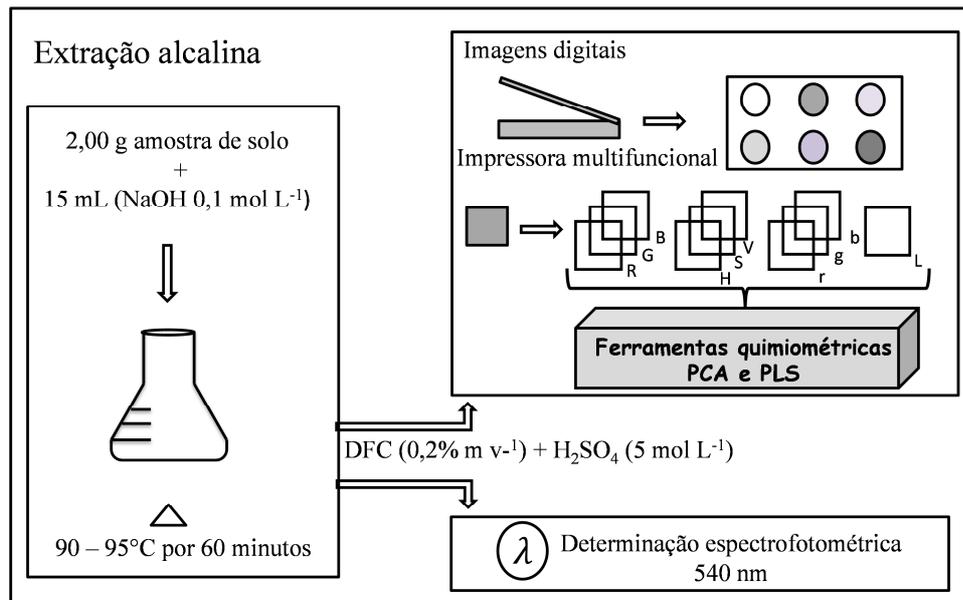


FIGURA 4.1 - Procedimento geral para determinação de Cr (VI) utilizando imagens digitais e espectrofotômetro.

4.4.3 - Ensaios de fortificações para avaliação do uso de imagens digitais em modelos de classificação

Os procedimentos de aquisição e tratamento das imagens foram os mesmos descritos no item 4.4.2. Porém, para estes experimentos foi utilizada uma amostra com uma baixa concentração de Cr (VI) e foram realizadas fortificações com base nas legislações vigentes de países que estabelecem limites para essa forma redox do Cr.

Além da amostra sem fortificação foram realizadas um total de 61 fortificações. Após a pesagem de aproximadamente 2 g de uma mesma amostra adicionou-se um volume de solução estoque de Cr (VI) (preparada como descrito no item 4.2) e seguiu-se com a extração alcalina e determinação. A concentração final das fortificações variaram de 0 a 20 mg kg⁻¹. As concentrações adicionadas estão especificadas na tabela do Apêndice 1.

Capítulo 5

Resultados e discussão

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Testes para determinação de Pb utilizando imagens digitais e rodizonato de sódio

Este projeto de mestrado também visava a determinação de Pb (II) utilizando reagentes colorimétricos e imagens digitais. O principal minério de Pb é a galena e conseqüentemente o minério mais utilizado para extração deste elemento. Cerca de 55% do Pb produzido mundialmente são utilizados na fabricação de baterias e acumuladores de Pb/ácido. O Pb também é utilizado na fabricação de placas, tubulações, soldas, na indústria de tintas e pigmentos, entre outros [10,58].

Além disso, o Pb é um dos poluentes metálicos mais tóxicos, e está associado a danos nos rins, fígado, redução do quociente de inteligência (QI), hiperatividade, perda auditiva e pode causar a morte em crianças [59].

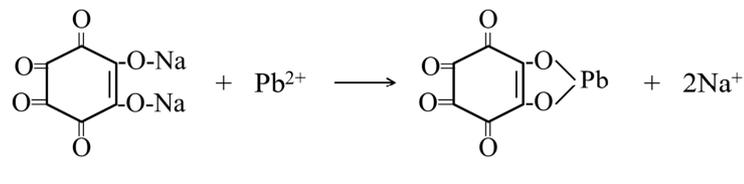
O Pb não possui uma reação colorimétrica clássica descrita na literatura. A Tabela 5.1 [60] relaciona os vários reagentes que já foram utilizados para determinação colorimétrica de Pb, a fase em que estes se dissolvem, o comprimento de onda utilizado para determinação e os metais que interferem na reação.

TABELA 5.1 - Reagentes utilizados para determinação colorimétrica de Pb [60].

Reagente	Fase	λ_{\max} (nm)	Interferências
Ditizona	CCl ₄	520	Sensível à luz, Hg, Zn, Cu e Fe
Dietilditio-carbamato	CCl ₄	435	-
4-(2-Piridilazo)	Aquosa	520	Ag, Cd, Co, Cu, Hg, Ni e Zn
Resorcinol difenilcarbazona	Aquosa pH = 9,0 - 10,4	525	-
Arsenazo III	Aquosa pH = 2,5 - 4,5	660	Fe, Al, Cu, Th, Ti e U
2-(2-Thiazolylazo)-p-cresol	Aquosa pH = 9,0 - 10,0	650	Cu, Ni, Co, Zn, Fe e Cd
Compostos Porfirinos	Aquosa pH = 10,4	479	Cu, Zn, Ni, Hg, Fe, Mn, Cd, Ca e Mg

Como pode ser visto na Tabela 5.1 alguns reagentes devem ser dissolvidos em meio de tetracloreto de carbono, além disso, são vários os metais que interferem nas reações.

O reagente utilizado para a reação colorimétrica do Pb nesta dissertação foi o rodizonato de sódio, este reagente foi escolhido com base nos trabalhos desenvolvidos por Preer & Murchison Jr. [61] e Anwar *et al.* [29]. Além disso, o rodizonato de sódio se dissolve em meio aquoso e segundo Feigl & Anger [62] os metais que interferem na reação entre o rodizonato e o Pb são Tl^+ , Ag^+ , Cd^{2+} , Ba^{2+} e Sn^{2+} . Ainda segundo esses autores o rodizonato forma um complexo de coloração violeta em soluções neutras e em soluções levemente ácidas forma um complexo de coloração vermelha. A seguir é mostrada a reação entre o rodizonato de sódio e o Pb [62].



Entretanto, foram encontrados vários obstáculos durante a realização desta etapa do projeto, os quais serão descritos a seguir.

Os testes iniciais para o elemento Pb foram realizados com base no trabalho desenvolvido por Anwar e colaboradores [29]. Neste trabalho os autores desenvolveram uma metodologia para determinação de As, Hg e Pb em microvolumes, em que 1 μL da amostra é depositado em uma placa de cromatografia delgada e em seguida adiciona-se 1 μL do reagente colorimétrico específico (rodizonato). Após secagem, essas placas de cromatografia delgada eram digitalizadas e os dados tratados computacionalmente.

Assim, a partir do padrão comercial de 1000 mg L^{-1} de Pb (Chemis) preparou-se soluções de concentrações intermediárias. Também foi preparada uma solução de rodizonato de sódio (Aldrich) (0,2%). Diferentemente do artigo anteriormente mencionado, os testes realizados foram feitos em meio aquoso. Porém, em nenhuma das proporções testadas, os padrões de Pb nas concentrações que variavam de 1 a 10 mg L^{-1} (preparados a partir do padrão comercial) e o rodizonato de sódio havia o desenvolvimento de coloração, todas as soluções ficaram incolores.

Resolveu-se então preparar um padrão a partir do sal $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Ecibra) (previamente seco em estufa por 2 hrs a $160\text{ }^\circ\text{C}$), fazendo-se a dissolução de 0,3220g desse sal em 200 mL de água desionizada, como descrito no artigo em questão. Entretanto, quando este padrão foi acidificado não houve o desenvolvimento de coloração na reação com o rodizonato de sódio, ficando evidenciado que em meio ácido a reação não estava ocorrendo. Para os padrões comerciais, o problema foi o mesmo já que estes são fabricados em meio ácido para maior durabilidade.

Em meio alcalino, a coloração amarelada tornava-se mais fraca com o aumento da concentração de Pb nos padrões, o que seria inviável para as medidas. A melhor condição encontrada foi utilizando meio neutro, e as concentrações dos padrões variando de 1 a 10 mg L^{-1} de Pb, sendo o padrão preparado a partir do sal $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Esses testes resultaram nas colorações amarelo clara, amarelo mais escurecido e arroxeadado para 5 ml dos padrões de 1, 5 e 10 mg L^{-1} , respectivamente. Além disso, apenas uma gota do indicador era necessária para que houvesse o desenvolvimento da coloração, quando se adicionava três gotas do rodizonato de sódio todas as soluções resultavam na mesma coloração (amarelada).

Também foram realizados testes com o rodizonato de sódio em uma concentração menor e testes em placas de cromatografia delgada, exatamente como descrito no trabalho desenvolvido por Anwar *et al.* [29]. Porém, os resultados destes testes não foram promissores e não conseguimos reproduzir os dados descritos pelos autores. Desta forma, todas as imagens realizadas posteriormente foram obtidas utilizando-se 5 ml das soluções padrões (preparados a partir do sal $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) e uma gota do rodizonato de sódio 0,2%.

Fez-se então uma curva de calibração nas concentrações de 0, 1, 3, 5, 7 e 10 mg L^{-1} de Pb. As imagens para esta curva foram realizadas em triplicada e não se alterou o pH das soluções (pH aproximadamente neutro). As condições para aquisição das imagens foram as mesmas utilizadas para o Cr (VI).

A Figura 5.1 mostra as imagens obtidas para uma das réplicas dos padrões e seus respectivos valores de R, G e B. Pode-se perceber através dos valores de R, G e B que há uma tendência do valor de G diminuir e B aumentar com o aumento da concentração. Além disso, os padrões nas concentrações de 3 e 5 mg L^{-1} se confundem apresentando valores de G iguais, assim como ocorre para o

branco e o padrão de concentração 1 mgL⁻¹ que apresentaram valores de R e G iguais.

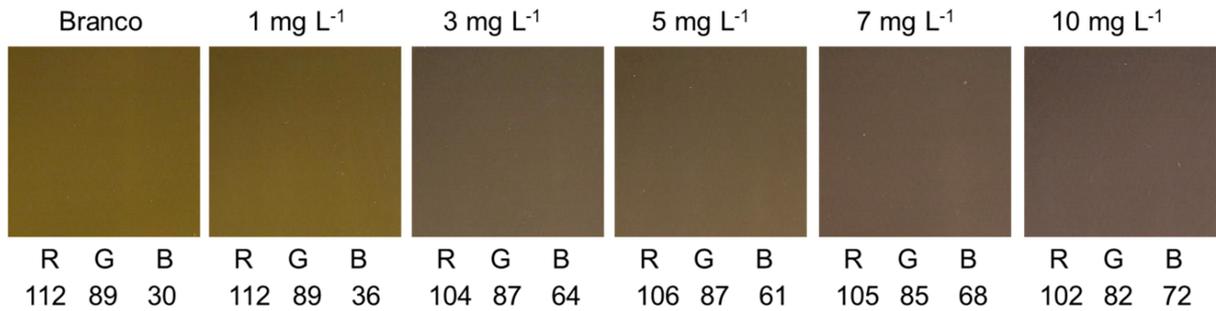


FIGURA 5.1 - Imagens dos padrões para Pb e seus respectivos valores de R, G e B.

Como as imagens foram feitas em triplicata obteve-se uma matriz de dados de 10 colunas (variáveis) e 18 linhas (brancos e padrões). A partir da matriz de dados obtida calculou-se uma PCA utilizando-se como pré-processamento centrar na média. A Figura 5.2 mostra o gráfico de *loadings* (a) e *scores* (b) para esta PCA.

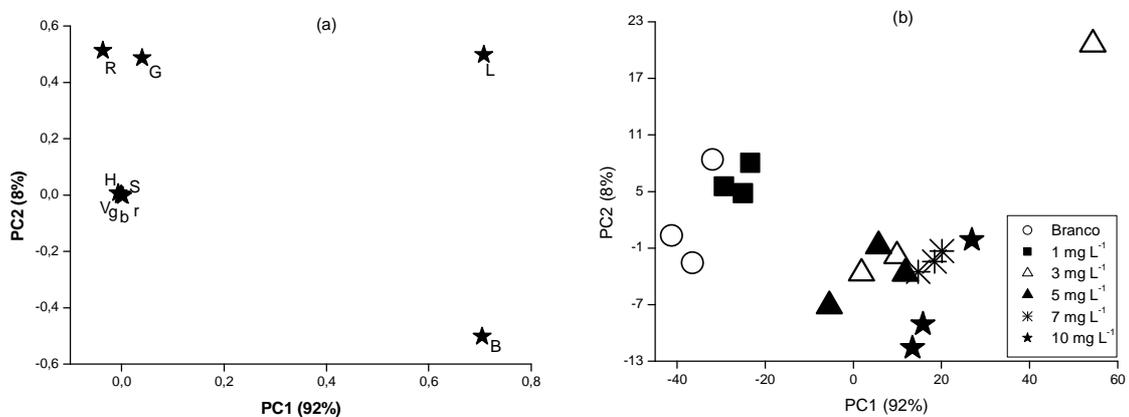


FIGURA 5.2 - Gráfico de *loadings* (a) e *scores* (b) para PCA dos padrões de Pb.

Como pode ser visto no gráfico de *loadings*, as variáveis mais significativas para estas imagens foram os valores de R, G, B e L. Porém, em relação ao gráfico de *scores*, as diferenças entre os padrões de 3 e 5 mg L⁻¹ não são perceptíveis. Além disso, um dos padrões de concentração de 3 mg L⁻¹, representado como um triângulo vazio, ficou muito discrepante dos outros padrões na mesma concentração. Acredita-se que isso ocorreu uma vez que as placas de

Petri utilizadas eram descontaminadas em banho de HNO₃ 10% e certamente havia vestígio de ácido na placa quando a imagem foi realizada, mudando o pH do meio e consequentemente a coloração dessa amostra.

Porém, o maior problema ocorreu quando se tentou aplicar a metodologia para amostras reais. As amostras foram digeridas de acordo como a norma alemã DIN 38414-S7 [55] para a determinação de Pb pseudototal. Como descrito anteriormente, neste procedimento é utilizado uma mistura dos ácidos clorídrico e nítrico na proporção 3:1. Desta forma, o extrato resultante é muito ácido e o maior problema encontrado estava no ajuste do pH para neutro desses extratos, uma vez que, para cada amostra estava sendo necessário um volume diferente de solução de NaOH para neutralização. Como seriam necessárias várias réplicas de cada amostra para a construção de modelos de calibração o procedimento se tornaria muito laborioso e inviável de ser executado do ponto de vista prático.

Assim sendo, a metodologia proposta para Pb não foi aplicada para amostras reais uma vez que a reação é altamente dependente do pH, além disso como a matriz utilizada era solo, acredita-se que um maior número de metais com valência 2⁺ iriam interferir na reação do Pb com o rodizonato de sódio (equação 5.1). Uma alternativa que poderia ser testada é a utilização de um reagente colorimétrico que tenha uma reação com o Pb em meio ácido.

5.2 - Determinação de Cr pseudototal

Optou-se por utilizar a digestão pseudototal como alternativa aos procedimentos de digestão total das amostras de solos. A digestão pseudototal fornece as concentrações de metais que estão disponíveis para plantas, além disso, os elementos que não são liberados nesse procedimento estão ligados aos silicatos e são menos utilizados para estimar a mobilidade e o comportamento de metais [63].

A digestão pseudototal consiste na digestão de amostras de solo utilizando-se uma mistura 3:1 de HCl e HNO₃ que reagem entre si para formarem a água-régia de acordo com a reação [63].



(equação 5.2)

No caso deste trabalho utilizou-se a norma alemã DIN 38414-S7 [55] como procedimento para a digestão da amostra e para avaliar a exatidão do método foi utilizado CRM *Sewage Sludge from Industrial Origin* BCR 146R, com concentração de Cr total certificada de $174 \pm 7 \text{ mg kg}^{-1}$.

A Tabela 5.2 mostra os resultados obtidos para as determinações de Cr pseudototal, assim como os respectivos desvios padrão (SD - standard deviation) e desvios padrão relativos (RSD - Relative standard deviation) para cada amostra. Para as amostras e para CRM o número de réplicas foi igual a 6, sendo que desse total 3 réplicas foram realizadas pelo Dr. Marcelo Braga Bueno Guerra durante o desenvolvimento da sua tese de doutoramento. Os dados obtidos pelo Dr. Marcelo foram utilizados uma vez que as amostras de solo apresentam grande heterogeneidade e um maior número de determinações poderiam gerar resultados mais confiáveis e representativos.

TABELA 5.2 - Concentrações médias de Cr pseudototal (mg kg^{-1}) nas amostras de solos. Os resultados representam os valores médios e os respectivos desvios (SD) padrão e desvios padrão relativos (RSD).

Amostra	Cr pseudototal (mg kg^{-1})	SD (n=6)	RSD (%)
1	266	28	10,5
2	327	38	11,6
3	50,0	7	14,0
4	280	21	7
5	246	29	11,7
6	90	4	4,4
7	47	17	36,2
8	51	18	35,3
CRM	185	26	14,1

O limite de detecção (LOD - *limit of detection*) e o limite de quantificação (LOQ - *limit of quantification*) foram de 7 e 24 mg kg^{-1} , respectivamente, e a curva de calibração apresentou um coeficiente de correlação satisfatório de 0,9982 (n=15). Além disso, a exatidão do método foi comprovada uma vez que, ao se realizar um teste-*t* de *Student* não pareado não foram observadas diferenças significativas com um nível de 95%, entre o valor certificado e o valor encontrado para Cr no material de referência. Os valores de *t* calculado e tabelado para 5 graus de liberdade foram de 0,929 e 2,571, respectivamente.

As concentrações encontradas apresentaram valores que variaram de 47 a 327 mg kg^{-1} de Cr pseudototal. Além disso, cabe ressaltar que as amostras próximas aos tanques de óleo (amostras 1 a 6) apresentaram concentrações

maiores em relação às amostras coletadas distante dos mesmos (amostras 7 e 8), com exceção da amostra 3 que está próxima aos tanques de óleo e apresentou 50 mg kg^{-1} de Cr pseudototal.

Pode-se perceber que os RSDs foram relativamente altos para as determinações, porém as amostras com as menores concentrações de Cr pseudototal, amostras 6 e 7, foram as que apresentaram os maiores desvios relativos (da ordem de 36 %) justamente por estarem em uma faixa de concentração crítica para determinação (muito próximas ao valor de LOQ após as diluições). Para as demais amostras, o RSD foi de no máximo 14%, o que pode ser considerado tolerável em se tratando de amostras complexas como as de solo [64].

Fazendo-se um paralelo dos valores obtidos com os valores orientadores para solo recomendados pela CETESB [18], a qual estabelece a concentração de Cr de 75 mg kg^{-1} de peso seco (valor de intervenção – pode ocorrer alterações na qualidade do solo), pode-se verificar que de um total de 8 amostras 5 ultrapassam esse limite. O que pode indicar uma possível contaminação destas amostras por Cr.

5.3 - Extração e determinação espectrofotométrica de Cr (VI)

Determinações de Cr (VI) em solos geralmente necessitam de dois passos principais: a extração e a detecção [26]. Um dos métodos mais utilizados para a extração de Cr(VI) de solos, sedimentos, efluentes e descartes sólidos é o 3060A recomendado pela USEPA [65]. Após a extração, o Cr(VI) pode ser quantificado com boa sensibilidade e seletividade pelo método da difenilcarbazida com detecção por espectrofotometria [7]. Como o intuito do trabalho era a determinação utilizando imagens digitais, o método de detecção por espectrofotometria foi utilizado como método padrão para fins comparativos.

As primeiras extrações realizadas neste trabalho de mestrado foram feitas utilizando-se o extrator NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$)/ Na_2CO_3 ($0,28 \text{ mol L}^{-1}$), porém durante a determinação com o reagente difenilcarbazida o desenvolvimento da coloração arroxeadada, que se desenvolve quando o Cr (VI) está presente, não estava ocorrendo. Entretanto, um teste utilizando-se absorção atômica com chama nesses mesmos extratos comprovou a presença de Cr.

Uma das hipóteses levantadas era de que a concentração de Cr (VI) presente nas amostras estava muito baixa, desta forma foram feitos testes de adição e recuperação adicionando-se 1 mg L⁻¹ de Cr (VI) no solo antes de se realizar o procedimento de extração. Todavia, mesmo adicionando-se o padrão de Cr (VI) a recuperação estava próxima de zero, ou seja, algum fator até o momento não identificado estava interferindo durante a etapa do desenvolvimento da coloração.

Em amostras com matrizes complexas, como no caso de solos, a formação do complexo Cr(III)-difenilcarbazona pode ser prejudicada, devido por exemplo, a presença de grandes quantidades de agentes redutores, que ao serem solubilizados durante a extração, podem causar erros negativos durante a determinação [26]. Alguns autores descrevem que esses erros podem ser minimizados, invertendo-se a ordem de adição dos reagentes, ou adicionando-se simultaneamente o ácido e a difenilcarbazida [19].

Desta forma, a alternativa encontrada para solucionar o problema da baixa recuperação de Cr (VI) nos extratos foi a inversão da ordem de adição dos reagentes. Ou seja, primeiramente adicionou-se a difenilcarbazida e em seguida acidificava-se o meio. Todas as determinações realizadas neste trabalho foram feitas utilizando os reagentes nessa ordem.

Na busca de um extrator o mais simples possível, foi realizado um experimento utilizando: NaOH (0,5 mol L⁻¹) / Na₂CO₃ (0,28 mol L⁻¹) que é recomendado pela USEPA (3060A) [65], e o extrator NaOH (0,1 mol L⁻¹) utilizado com base no trabalho desenvolvido por James *et al.* [22]. Escolheu-se uma amostra (amostra 3), aplicou-se a extração e em seguida foi feita a determinação de Cr (VI) com a difenilcarbazida em meio ácido. A Tabela 5.3 mostra as concentrações calculadas já considerando o volume de ácido necessário para acidificação do meio.

TABELA 5.3 - Uso de diferentes extratores alcalinos e concentrações de Cr (VI) calculadas.

Extrator utilizado	Concentração Cr (VI) (mg kg⁻¹)
NaOH (0,5 mol L ⁻¹) / Na ₂ CO ₃ (0,28 mol L ⁻¹)	3,22 ± 0,45
NaOH (0,1 mol L ⁻¹)	3,39 ± 0,27

Como pode ser observado na Tabela 5.3 os dois extratores utilizados proporcionaram extrações que resultaram em concentrações muito próximas de Cr (VI), porém optou-se por utilizar o NaOH 0,1 mol L⁻¹ por ser necessária uma menor quantidade de ácido para acidificação do meio e não haver a liberação de gases durante a reação de neutralização.

Com estas condições estabelecidas foi possível extrair e determinar o Cr (VI) das amostras de solo (Tabela 5.4).

TABELA 5.4 - Concentrações de Cr (VI) (mg kg⁻¹) nas amostras de solo. Os resultados representam os valores médios (n = 6) e os respectivos desvios padrão (SD) e desvios padrão relativos (RSD).

Amostra	Cr (VI) UV-vis (mg kg ⁻¹)	SD	RSD (%)
1	2,6	0,4	15
2	2,8	0,2	7
3	3,4	0,3	9
4*	1,6	-	-
5	< LOD	-	-
6	< LOD	-	-
7	0,8	0,3	37
8	< LOD	-	-

*Não foram efetuadas réplicas para esta amostra.

O número de réplicas para cada amostra foi igual a 6, com exceção da amostra 4, a qual apenas uma réplica foi efetuada já que havia pouca massa disponível dessa amostra. O LOD e o LOQ foram de 78,4 µg kg⁻¹ e 261,3 µg kg⁻¹, respectivamente, e a curva de calibração apresentou um coeficiente de correlação satisfatório de 0,9981 (n=30).

As amostras 5, 6 e 8 apresentaram valores abaixo do limite de detecção e as amostras próximas aos tanques (1, 2 e 3) apresentaram maiores concentrações de Cr (VI). A Tabela 5.5 mostra a porcentagem de Cr (VI) em relação as concentrações de Cr pseudototal.

TABELA 5.5 - Porcentagem de Cr (VI) em relação ao Cr pseudototal.

Amostra	Cr pseudototal (mg kg ⁻¹)	Cr (VI) UV-vis (mg kg ⁻¹)	% Cr (VI)
1	266	2,6	0,9
2	327	2,8	0,8
3	50,0	3,4	6,8
4	280	1,6	0,6
5	246	< LOD	-
6	90	< LOD	-
7	47	0,8	1,7
8	51	< LOD	-

A amostra 3 apresentou a maior porcentagem de Cr (VI) em relação ao valor de Cr pseudototal (próximo a 7%). As demais amostras apresentaram entre 0 e 1,65% de Cr (VI). Compostos como a matéria orgânica, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e Fe(II) podem promover a redução do Cr (VI) a Cr (III) em solos [66]. Desta forma, as baixas concentrações encontradas podem estar relacionadas ao tempo decorrente entre a coleta e a análise dessas amostras, este tempo provavelmente foi suficientemente longo para que esses processos de oxidação e redução ocorressem.

5.4 - Potencialidades do uso de imagens na proposição de modelos de classificação para Cr (VI)

No Estado de São Paulo a CETESB [18] não faz menção as espécies de Cr e sim somente a concentração total. A concentração permitida de Cr (VI) na Itália varia de 2 a 15 mg kg⁻¹ de acordo com o tipo de solo, na Suécia este valor é estipulado em 5 mg kg⁻¹, o Canadá possui a legislação mais restritiva de 0,4 mg kg⁻¹ para solos destinado a agricultura e residenciais e 1,4 mg kg⁻¹ para solos industriais [19].

Com base nesses valores uma amostra de solo que continha uma baixa concentração de Cr (VI) foi fortificada em concentrações diferentes acima e abaixo das legislações desses países, para verificar a potencialidade das imagens digitais serem utilizadas em modelos de classificação. Além disso, o extrato da amostra escolhida possuía uma coloração original bem amarelada, sendo possível verificar se amostras naturalmente coloridas (após a extração) poderiam ser diferenciadas.

Foram realizadas um total de 61 fortificações e as concentrações variaram de 0 a 20 mg kg⁻¹ de Cr (VI). A Figura 5.3 mostra uma das réplicas das imagens obtidas para a amostra sem difenilcarbazida, amostra não fortificada e fortificações em diferentes concentrações de Cr (VI).

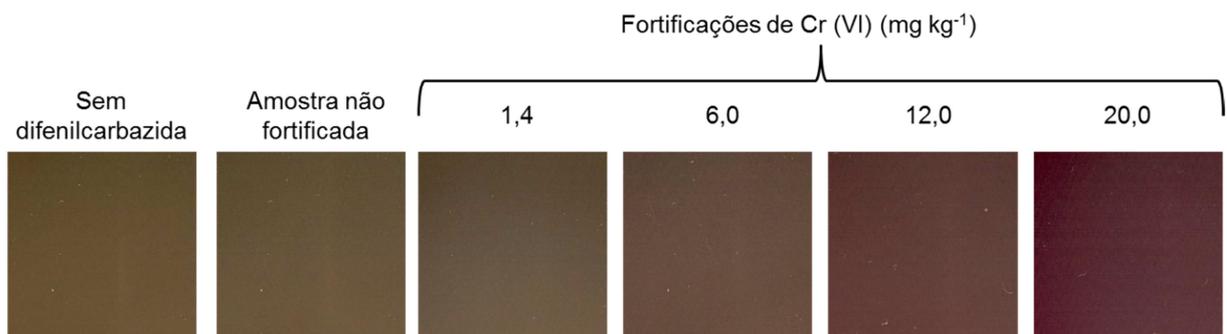


FIGURA 5.3 - Imagens da amostra e fortificações em diferentes concentrações de Cr (VI).

Assim como foi feito para as determinações espectrofotométricas, as imagens eram realizadas sem a adição de difenilcarbazida e com a adição do reagente e eram utilizados os descritores de cores calculados a partir da diferença entre as medidas (sem e com difenilcarbazida).

Neste caso a matriz de dados utilizada era composta de 10 colunas (variáveis – R, G, B, H, S, V, r, g, b, L) e 61 linhas (fortificações variando de 0 a 20,0 mg L⁻¹) (Apêndice 1). Para o cálculo da PCA apenas dois componentes principais foram necessários para explicar 100% da variância dos dados. Além disso, o pré-processamento centrado na média mostrou os melhores resultados. A Figura 5.4 mostra o gráfico de *loadings* para a PCA, sendo as variáveis mais significativas os valores de R, G, B e L.

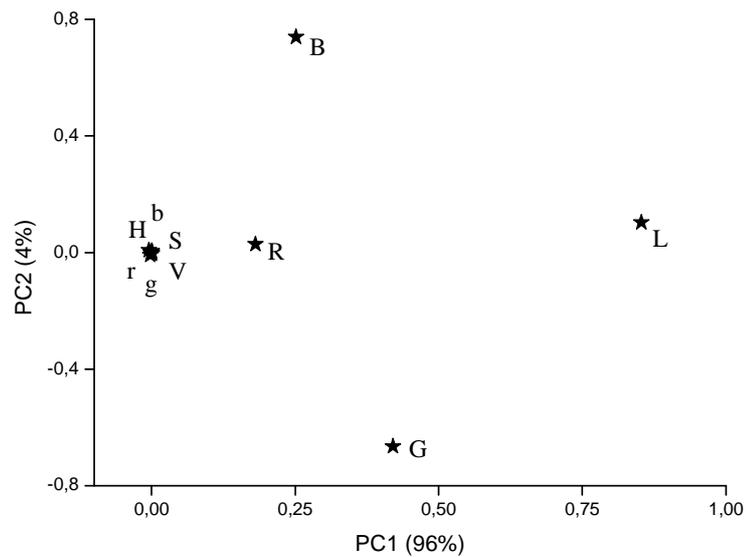


FIGURA 5.4 - Gráfico de *loadings* para a PCA das imagens das fortificações.

A Figura 5.5 a e b mostra os gráficos de scores para a PCA utilizando como classe as concentrações permitidas de Cr (VI) em solos para o Canadá (0,4 mg kg⁻¹ de Cr (VI) (a) e 1,4 mg kg⁻¹ de Cr (VI) (b)).

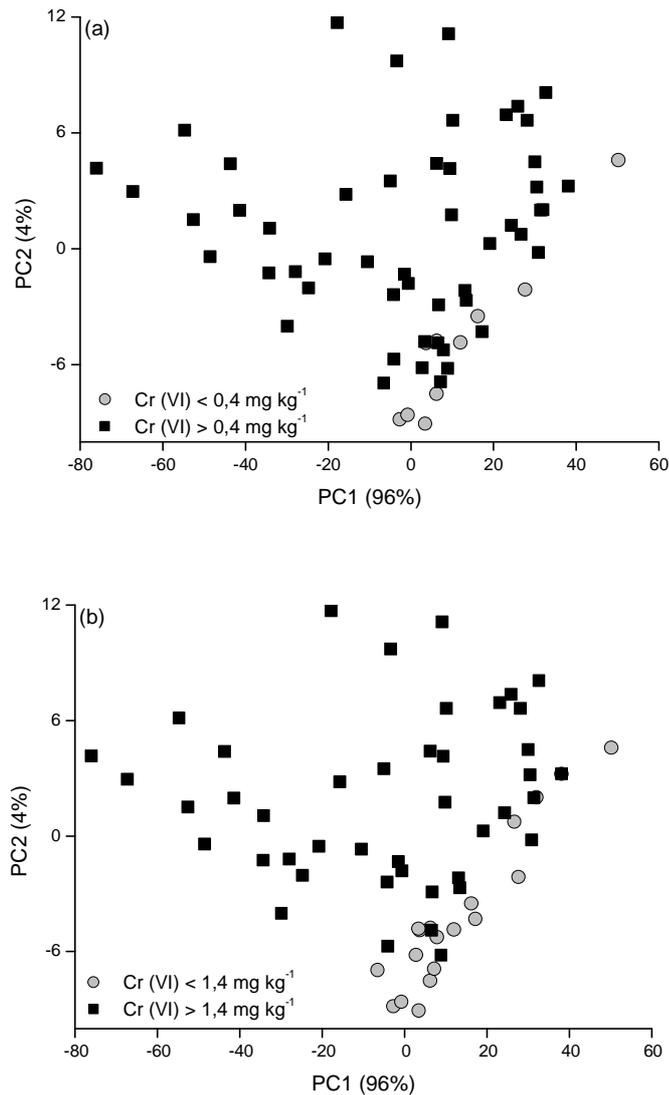


FIGURA 5.5 - Gráfico de scores para PCA utilizando como classe as concentrações permitidas de Cr (VI) em solos no Canadá.

Pode-se perceber que as amostras abaixo de $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ tendem a se confundirem com as amostras acima desse valor. Essa separação melhora um pouco quando se analisa a concentração de $1,4 \text{ mg kg}^{-1}$, porém não há uma separação muito clara uma vez que a legislação do Canadá estipula valores muito baixos de Cr (VI) em solos. Provavelmente na construção de um modelo de classificação para a legislação canadense haveria um número significativo de erros se os solos analisados estivessem próximos às faixas estipuladas.

Ao contrário da legislação canadense, a legislação italiana é bem menos restritiva, com valores que variam de 2 a 15 mg kg^{-1} de Cr (VI). A Figura 5.6 a

e b mostra os gráficos de *scores* considerando como classes ambas as concentrações.

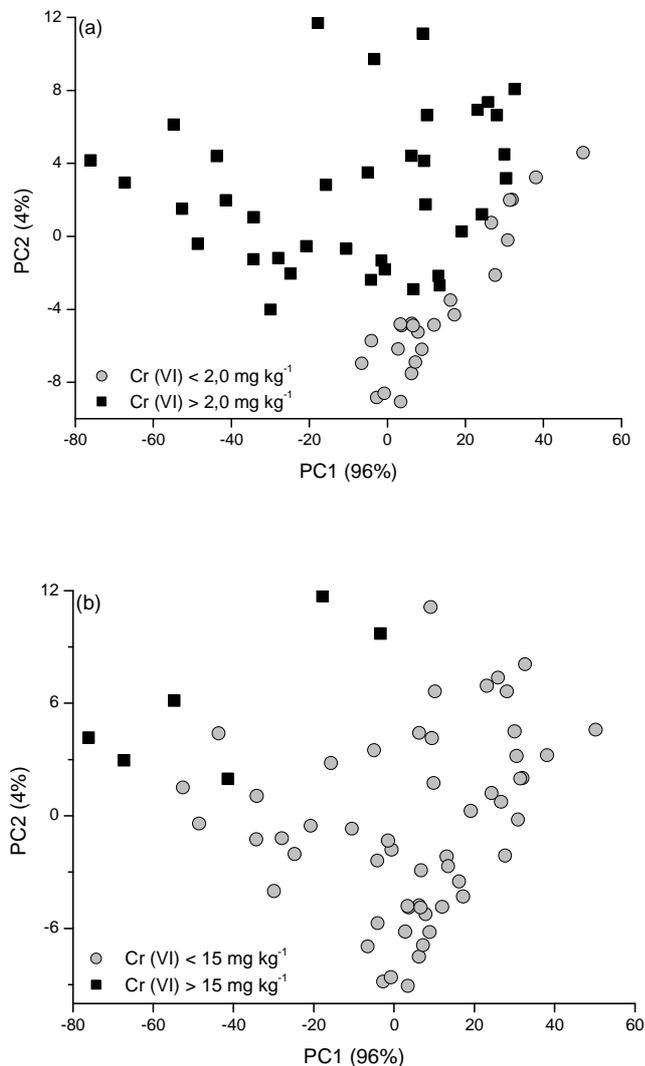


FIGURA 5.6 - Gráfico de *scores* para PCA utilizando como classe as concentrações permitidas de Cr (VI) em solos na Itália.

Como evidenciado nos gráficos de *scores* para a PCA, utilizando as concentrações permitidas de Cr (VI) em solos da Itália, as imagens digitais poderiam ser utilizadas para proposição de modelos de classificação, uma vez que houve visualmente uma boa separação entre as concentrações estipuladas por esse país para Cr (VI). Em relação a concentração de 15 mg kg⁻¹ talvez um maior número de amostras com concentrações acima desse valor poderiam proporcionar uma separação ainda melhor.

Além disso, também calculou-se a PCA utilizando como classe a concentração de Cr (VI) estipulada pela Suécia ($5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cr (VI)). A nítida separação dos valores de concentração fica clara no gráfico de *scores* apresentado na Figura 5.7.

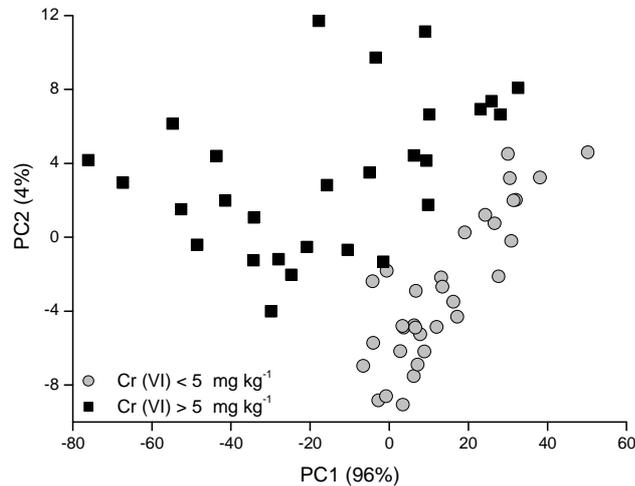


FIGURA 5.7 - Gráfico de *scores* para PCA utilizando como classe a concentração permitida de Cr (VI) em solos na Suécia.

Para a Suécia modelos de classificação utilizando imagens digitais também poderiam ser propostos e provavelmente não haveria erros mesmo com concentrações próximas a faixa do máximo permitido de 5 mg kg^{-1} . Esse fato pode ser confirmado analisando-se o dendograma da Figura 5.8. Com o dendograma da HCA é possível visualizar dois grandes grupos e as amostras com concentração abaixo de 5 mg kg^{-1} ficaram praticamente todas no grupo inferior, e as amostras com concentração acima desse valor ficaram no grupo superior.

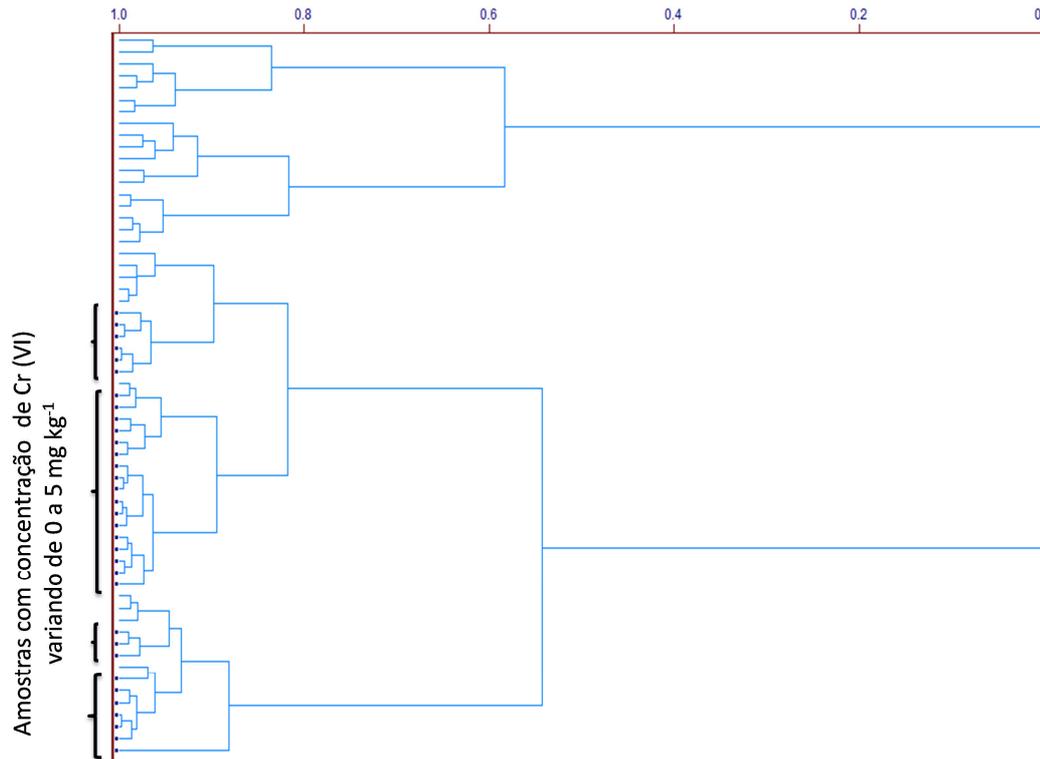


FIGURA 5.8 - Análise hierárquica de agrupamentos: dendrograma.

Assim sendo, fica clara a potencialidade das imagens na proposição de modelos de classificação para identificação de Cr (VI) em amostras de solos. Além disso, os resultados foram promissores independentemente da coloração original do extrato.

5.5 - Determinação de Cr (VI) utilizando imagens digitais

As imagens digitais utilizadas nos resultados desta seção foram adquiridas da mesma forma do item anterior.

Assim como foi feito para as determinações espectrofotométricas, as imagens foram obtidas sem a adição de difenilcarbazida e com a adição do reagente. A Figura 5.9 mostra as imagens para uma das réplicas dos padrões com difenilcarbazida (a) e sem difenilcarbazida (b) nas concentrações variando de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹, e os respectivos valores de R, G e B (valores arredondados para melhor visualização). Os brancos e padrões passaram pelo mesmo procedimento das amostras, desde a extração até a determinação.

Há uma clara tendência do valor de G diminuir quando se adiciona o reagente difenilcarbazida, como pode ser observado na Figura 5.9. Já os valores de R e B tendem a ficar constantes. Em relação a uma determinada tendência dos valores de R, G e B com o aumento da concentração, esta análise deve ser feita após a subtração dos valores das imagens com difenilcarbazida e sem difenilcarbazida descritos na Tabela 5.6. Os valores mostrados são um exemplo aleatório para essa subtração.

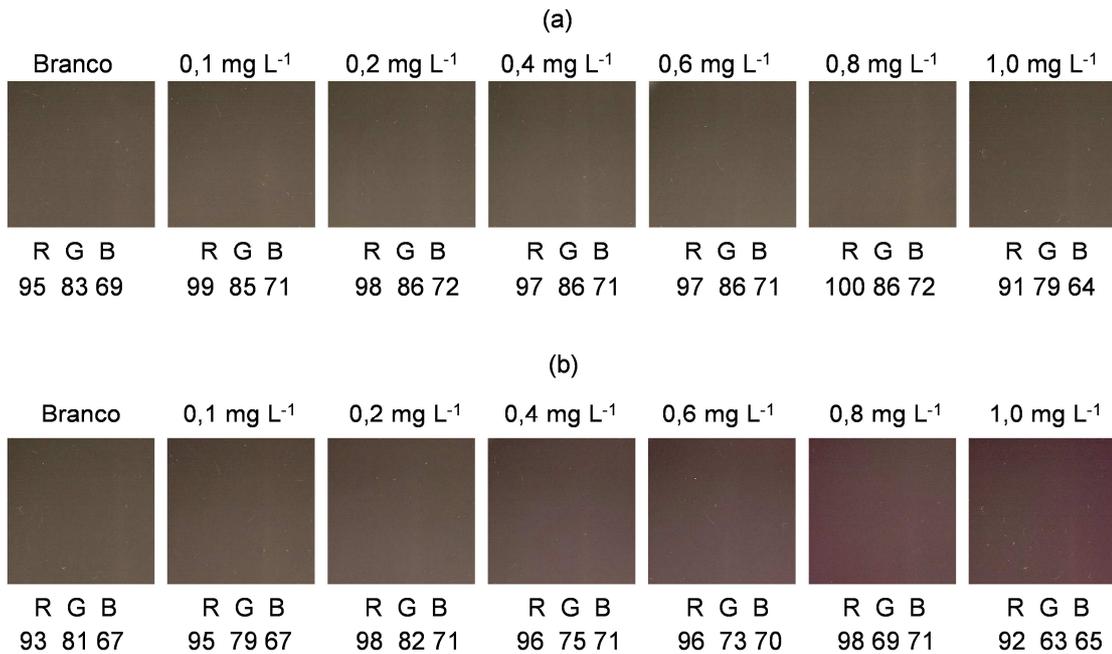


FIGURA 5.9 - Imagens para os padrões de Cr (VI) nas concentrações de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹ sem difenilcarbazida (a) e com difenilcarbazida (b) e seus respectivos valores de R, G e B.

TABELA 5.6 - Valores de R, G e B para os padrões descontando o valor de R, G e B da respectiva imagem sem difenilcarbazida.

	Padrões						
	Branco	0,1 mg L ⁻¹	0,2 mg L ⁻¹	0,4 mg L ⁻¹	0,6 mg L ⁻¹	0,8 mg L ⁻¹	1,0 mg L ⁻¹
R	-2,032	-3,650	-0,1284	-1,777	-1,534	-2,0564	1,440
G	-1,885	-6,124	-4,724	-10,73	-12,49	-17,11	-15,52
B	-1,977	-3,920	-0,4278	-0,6992	-0,5240	-1,226	1,119

Este procedimento de subtração da imagem sem a difenilcarbazida foi realizado para todos os padrões e amostras analisados, uma vez que os extratos destas apresentavam certa coloração. E como pode ser percebido nos exemplos de padrões da Tabela 5.6 não há uma tendência para nenhuma das variáveis com o aumento da concentração.

Desta forma, para uma análise exploratória dos dados foi realizado uma PCA para a matriz de dados dos padrões. Essa matriz de dados consistia de 10 colunas (variáveis – R, G, B, H, S, V, r, g, b, L) e 46 linhas (brancos e padrões variando de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹). Foram utilizados dois tipos de pré-processamento, o centrar na média (CM) e o auto-escalonar (AS). Geralmente o pré-processamento centrar na média é utilizado para dados espectrais, já o auto-escalonar é utilizado para dados de concentração ou intensidade [50].

Para os dois tipos de pré-processamento utilizados foi possível obter uma boa separação dos padrões. Porém os dados centrados na média foram ligeiramente melhores e a Figura 5.10 (a) mostra o gráfico de *scores* para a PCA. As duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) explicaram 100% da variância dos dados. As imagens dos brancos estão localizadas no canto inferior direito (círculos) do gráfico de *scores* e as imagens para o padrão de maior concentração (1 mg L⁻¹) no canto superior esquerdo (estrelas vazias). A Figura 5.10 (b) mostra o gráfico de *loadings* e os descritores de cores G e L estão relacionados com as concentrações mais baixas de Cr (VI). Já os parâmetros R, B, H, V, S, r, g e b estão relacionados com as concentrações mais altas de Cr (VI).

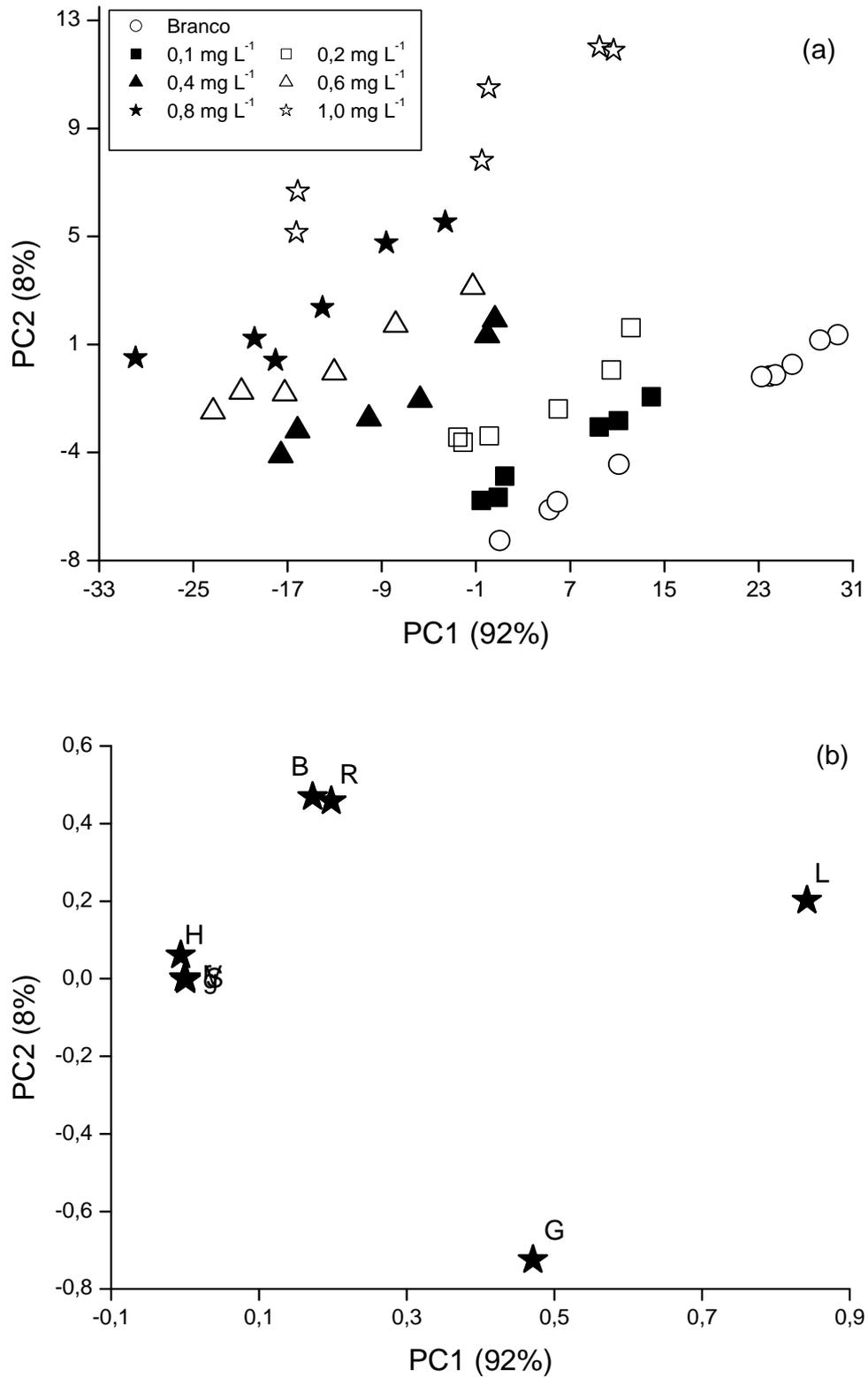


FIGURA 5.10 - Gráfico de *scores* (a) e gráfico de *loadings* (b) para PCA das imagens das extrações de Cr (VI) para brancos e padrões com pré-processamento centrado na média.

Também foi calculada uma PCA para todo o conjunto de dados, ou seja, 52 brancos e padrões, 44 amostras e réplicas e o CRM em triplicata (Apêndice 2). Foram necessários dois componentes principais para explicar 100% da variância e os dados foram centrados na média. A Figura 5.11 mostra os *scores* para a PCA, os brancos compreendem os círculos vazios os padrões as formas arroxeadas, as amostras as formas laranjas e as réplicas do CRM as estrelas verdes.

As amostras, as quais a determinação espectrofotométrica ficou abaixo do limite de detecção (amostras 5, 6 e 8), estão próximas aos brancos e são os losangos, os círculos e os asteriscos laranja, respectivamente. As réplicas da amostra 7, que apresentaram um valor um pouco acima do limite de detecção ($0,79 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cr (VI)) encontram-se discretamente mais distantes dos brancos (estrelas laranjas). As demais amostras que apresentaram concentrações maiores de Cr (VI) estão distribuídas entre os padrões de concentração variando de $0,2$ a $0,6 \text{ mg L}^{-1}$, assim como ocorre para o CRM.

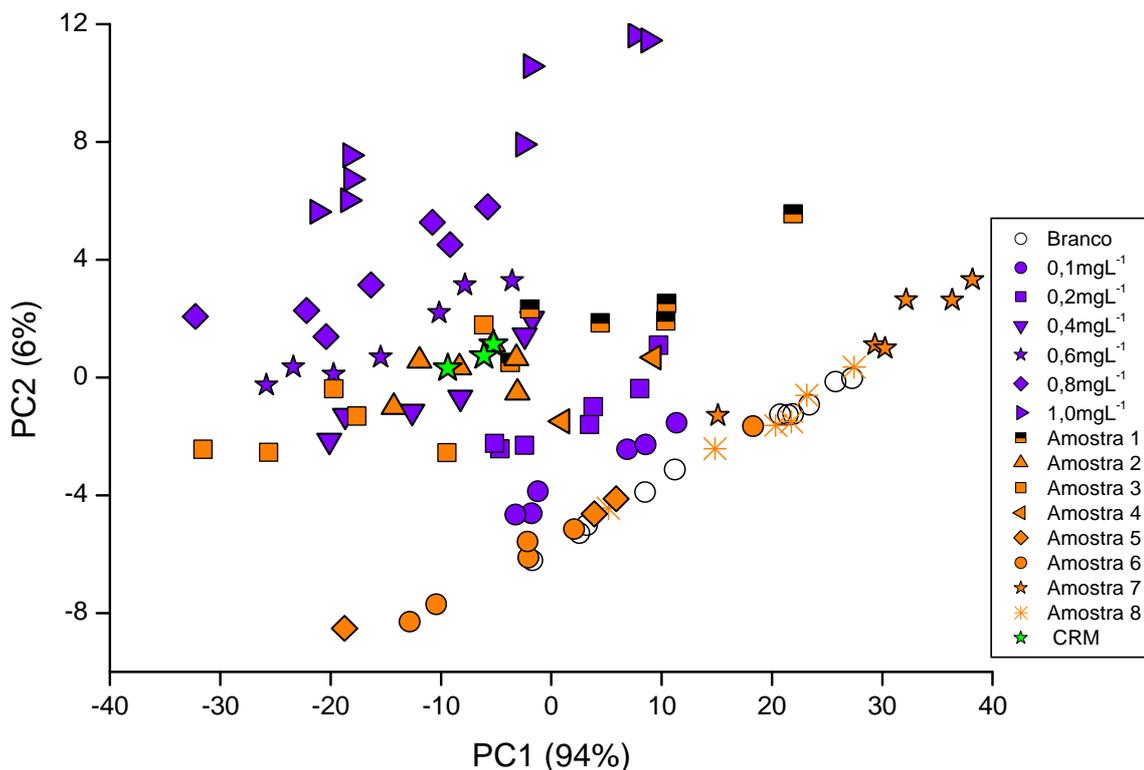


FIGURA 5.11 - Scores da PCA para os dados originais. Compreendendo brancos, padrões, amostras e CRM.

Com isso, foram construídos modelos de calibração supervisionada. Neste caso a ferramenta utilizada foi o PLS. Para o PLS foram utilizados os pré-processamento centrar na média e o autoescalamento e apenas os descritores das imagens dos padrões de Cr (VI) foram utilizados como conjunto de calibração. O melhor modelo foi alcançado com duas variáveis latentes, os dados centrados na média e o valor de RMSECV (*Root mean square error for cross validation*) [50] foi de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, e quando os valores reais e previstos foram comparados o coeficiente de correlação foi de 0,991.

O modelo proposto foi aplicado para determinação de Cr (VI) nas amostras de solos e a Tabela 5.7 mostra os valores previstos. Foi possível observar uma boa correlação entre os valores obtidos pela técnica de UV-vis e as imagens digitais. O erro relativo médio foi de 13% e foi realizado um teste-*t* pareado entre os dados obtidos pelo UV-vis e pelas imagens digitais e nenhuma diferença significativa foi observada com um nível de 95% de confiança. Os valores de *t* calculado e tabelado (3 graus de liberdade) foram de 2,135 e 3,182, respectivamente.

Os valores de erro de calibração (*Root mean square error of calibration*) e erros de previsão (*Root mean square error of prediction*) foram de $0,390 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,661 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. Um valor estimado para o LOD foi calculado com base no valor de RMSECV vezes o fator de diluição. Desta forma o valor de LOD para o método é $0,42 \text{ mg kg}^{-1}$ e LOQ é $1,4 \text{ mg kg}^{-1}$.

TABELA 5.7 - Concentração de Cr (VI) real calculada através do UV-vis e prevista pelo modelo de calibração.

Amostra	Cr (VI) real UV-vis (mg kg^{-1})	Cr (VI) previsto pelo modelo (mg kg^{-1})
1	$2,6 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,5$
2	$2,8 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,5$
3	$3,4 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,9$
4	1,6	$2,0 \pm 0,2$
5	< LOD	< RMSECV
6	< LOD	< RMSECV
7	$0,8 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,2$
8	< LOD	< RMSEC

Algumas explicações para a diferença entre os valores de Cr (VI) obtidos através das imagens em relação as concentrações de UV-vis podem estar relacionados com as Placas de Petri utilizadas, uma vez que estas não eram uniformes. Entretanto, esse problema pode ter sido resolvido ao subtrair os dados das imagens antes e após a adição de difenilcarbazida. Além disso, a posição de aquisição das imagens era aleatória, o que poderia contribuir para o aumento do desvio. Apesar da simplicidade do método proposto e com base nos dados da Tabela 5.7 pode-se afirmar que a proposta analítica apresenta grande potencialidade.

O CRM de Cr (VI) para solo NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia - *National Institut of Standards and Technology*) *Hexavalent Chromium in contaminated soil (High Level) 2701*, com concentração certificada de $551,2 \pm 34,5$ mg kg^{-1} de Cr (VI), foi analisado através da técnica UV-vis e também foi previsto pelo modelo de calibração. O valor certificado para este material foi determinado pela

técnica de SID-ICP-MS (método USEPA 6800) como informado no seu respectivo formulário. Porém, o formulário CRM em questão também continha os dados de concentração quando a técnica utilizada na determinação era a espectrofotometria (método USEPA 7196A). Para esta técnica os valores de concentração encontrados variaram de 266 a 503,8 mg kg⁻¹ de Cr (VI) e um valor da mediana de 364,9 mg kg⁻¹ (formulário fornecido pelo NIST - Anexo 1). Desta forma foram calculadas duas recuperações, utilizando a mediana para o método 6800 e para o método 7196A.

A concentração determinada e as recuperações encontram-se na Tabela 5.8.

TABELA 5.8 - Concentrações de Cr (VI) calculadas e recuperações para o CRM utilizando UV-vis e imagens digitais.

Técnica	Cr (VI) mg kg ⁻¹	Recuperação	
		Método 6800 (%)	Método 7196A (%)
UV-vis	335 ± 22	61	92
Imagens digitais	267 ± 6	48	73

As recuperações em relação ao método 6800 não foram satisfatórias. Porém, quando os valores foram comparados com a média dos valores obtidos pelo método 7196A as recuperações para o UV-vis e as imagens foram de 92 e 73 %, respectivamente. Isso pode ter ocorrido pelas sucessivas diluições que tiveram de ser feitas no material, que continha uma concentração alta de Cr (VI), para que o mesmo ficasse dentro da faixa da curva analítica utilizada. Além disso, cabe ressaltar que as amostras analisadas neste projeto eram bem diferentes (baixa identidade de matriz) do material certificado, uma vez que baixas concentrações de Cr (VI) foram encontradas.

De maneira geral, o valor médio de Cr (VI) encontrado para o CRM através do UV-vis apresentou uma boa recuperação quando comparado ao valor certificado para o método 7196A e em relação as imagens por se tratar de uma

técnica simples e com possibilidade de aplicação em campo pode-se considerar a recuperação obtida muito razoável.

Além do uso dos modelos de calibração (PLS), outro tipo de processamento dos dados foi empregado. Consistiu em usar os descritores de cores individualmente e a soma de seus valores, por exemplo R, G, B, H, S, V, R+G, R+B, G+B, H+S, e S+V, como uma tentativa de se realizar uma calibração univariada. Porém, esta estratégia não mostrou resultados consistentes quando comparados com os valores de referência, calculados com os dados do UV-vis. Desta forma, fica claro que a aplicação de estratégias multivariadas, como os modelos PLS, são necessárias para o processamento dos dados.

Capítulo 6

Conclusões

6- CONCLUSÕES

A reação entre o Pb e o rodizonato de sódio é altamente dependente do pH. A digestão realizada para determinar o Pb em amostras de solo foi efetuada em meio ácido (água-régia), porém sua determinação deveria ser realizada em meio neutro (melhor condição estabelecida para o desenvolvimento da coloração). Porém, para cada amostra uma quantidade diferente de hidróxido estava sendo necessária para neutralização, o que tornava o trabalho muito laborioso. Como o foco era um teste mais simples, com a possibilidade de aplicação em campo, não foi possível aplicar a metodologia proposta para o Pb em amostras reais.

Uma alternativa para que a metodologia pudesse ser aplicada seria fazer a extração e a determinação em meios com acidez semelhantes, ou seja, fazer a extração e a determinação em meio ácido. Uma vez estabelecida uma extração e o desenvolvimento de coloração compatíveis as imagens digitais certamente poderiam ser utilizadas para o tratamento dos dados.

Nas amostras de solos analisadas as concentrações de Cr pseudototal variaram de 48 a 336 mg kg⁻¹. A exatidão do método foi comprovada uma vez que, ao se realizar um teste-*t* não pareado não foram observadas diferenças significativas com um nível de 95%, entre o valor certificado e o valor encontrado para Cr no material de referência.

As amostras coletadas próximas aos tanques de óleo apresentaram concentrações de Cr pseudototal altas e comparando-se os valores encontrados com os valores estabelecidos pela CETESB fica evidenciada uma possível contaminação destes solos por Cr.

A determinação de Cr (VI) utilizando-se UV-vis foi utilizada como técnica de referência. O LOD e o LOQ para a metodologia foram de 78,4 µg kg⁻¹ e 261,3 µg kg⁻¹, respectivamente. As amostras apresentaram concentrações de Cr (VI) inferiores ao esperado, uma vez que a concentração de Cr pseudototal na maioria das amostras era alta. A amostra 3 apresentou a maior porcentagem de Cr (VI) em relação ao pseudototal, em torno de 7%.

Essa baixa concentração de Cr (VI) pode ser explicada pelo tempo decorrente entre a coleta e a análise das amostras este tempo provavelmente foi suficientemente longo para que processos de oxidação e redução ocorressem.

As imagens digitais mostraram boa potencialidade em serem utilizadas em modelos de classificação. As fortificações e extrações de Cr (VI) realizadas com base nas legislações de três países diferentes (Canadá, Itália e Suécia) mostraram que de modo geral há uma boa separação na análise de componentes principais, principalmente quando os valores não estão próximos às faixas estabelecidas por estes países.

Além disso, as imagens digitais também foram utilizadas para determinação de Cr (VI) nas amostras de solos e um teste-*t* pareado não mostrou diferenças significativas entre os valores encontrados e aqueles obtidos pela técnica de referência a um nível de 95% de confiança. Para isso foi utilizada a ferramenta quimiométrica PLS, e o pré-processamento com melhores resultados foi o centrado na média. Estipulou-se um valor de LOD para o método multiplicando-se o valor de RMSECV pelo fator de diluição, sendo o valor calculado de $0,42 \text{ mg kg}^{-1}$. E quando os valores reais e previstos foram comparados o coeficiente de correlação foi de 0,991.

A metodologia desenvolvida é uma alternativa simples, de baixo custo e com potencial para aplicação *in situ*, mesmo quando os solos apresentam baixas concentrações de Cr (VI) como nas amostras utilizadas.

Alguns dados obtidos nessa dissertação de mestrado foram aceitos para publicação na revista *Microchemical Journal*. Título do artigo: Proposition of a simple method for chromium (VI) determination in soils from remote places applying digital images: A case study from Brazilian Antarctic Station (doi:10.1016/j.microc.2012.03.007).

Referências

7 - REFERÊNCIAS

1. MANAHAN, S. E. *Environmental Chemistry*. Boca Raton, LLC, 2000.
2. MOROS, J.; MARTÍEZ-SÁNCHEZ, M. J.; PÉREZ-SIRVENT, C.; GARRIGUES, S. & DE LA GUARDIA, M. "Testing of the Region of Murcia soils by near infrared diffuse reflectance spectroscopy and chemometrics". *Talanta*, **78**: 388, 2009.
3. SEILER, H. G.; SIGEL, H. & SIGEL, A. *Handbook on toxicity of inorganics compounds*. Nova Iorque, Marcel Dekker, 1988.
4. KOTAS, J. & STASICKA, Z. "Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation". *Environ. Pollut.*, **107**: 263, 2000.
5. SHRIVASTAVA, R.; UPRETI, R. K.; SETH, P. K. & CHATURVEDI, U. C. "Effects of chromium on the immune system". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **34**: 1, 2002.
6. COTTON, F.A. & WILKINSON, G. *Advanced inorganic chemistry*. 6ª ed. Nova Iorque, John Wiley & Sons, 1999.
7. PFLAUM, R. T. & HOWICK, L. C. "The chromium-diphenylcarbazide reaction". *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**: 4862, 1956.
8. GOMES, M. S.; TREVISAN, L. C.; NÓBREGA, J. A. & KAMOGAWA, M. Y. "Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico". *Quim. Nova*, **31**: 1577, 2008.
9. FRANCO, D. V.; RODRIGUES, M. L. K.; BAVARESCO, J. & JARDIM, W. F. "A screening method for detection of hexavalent chromium levels in soils". *Quim. Nova*. **34** : 1255, 2011.
10. LEE, J. D. *Química Inorgânica Não Tão Concisa*. 5ª ed. Tradução: Henrique E. Toma, Koiti Araki e Reginaldo C. Rocha. São Paulo, Edgard Blücher, 1999.
11. ANDERSON, R. A. "Chromium, glucose intolerance and diabetes". *J. Am. Coll. Nutr.*, **17**(6): 548, 1998.
12. SUWALSKY, M.; CASTRO, R.; VILLENA, F. & SOTOMAYOR, C. P. "Cr (III) exerts stronger structural effects than Cr (VI) on the human erythrocyte membrane and molecular models". *J. Inorg. Biochem.*, **102**: 842, 2008.
13. LEVINA, A. & LAY, P. A. "Chemical properties and toxicity of chromium (III) nutritional supplements". *Chem. Res. Toxicol.*, **21**: 563, 2008.
14. DI BONA, K. R.; LOVE, S.; RHODES, N. R.; MCADORY, D.; SINHA, S. H.; KERN, N.; KENT, J.; STRICKLAND, J.; WILSON, A.; BEAIRD, J.; RAMAGE, J.; RASCO, J. F. & VICENT, J. B. "Chromium is not an essential trace element for mammals: effects of a "low-chromium" diet". *J. Biol. Inor. Chem.*, **16**: 381, 2011.
15. POURBAIX M. *Atlas d'équilibres électrochimiques à 25 °C*. França, 1964.
16. UNCETA, N.; SÉBY, F.; MALHERB, J. & DONARD, O. F.X. "Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review". *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**: 1097, 2010.
17. JAMES, B. R.; PETURA, J. C.; VITALE, R. J. & MUSSOLINE, G. R. "Oxidation-reduction chemistry of chromium: relevance to the regulation and remediation of chromate-contaminated soils". *Journal of soil Contamination.*, **6**(6): 569, 1997.
18. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB; Decisão de Diretoria Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005.

19. PETTINE, M. & CAPRI, S. "Digestion treatments and risks of Cr(III)-Cr(VI) interconversions during Cr(VI) determination in soils and sediments – a review". *Anal. Chim. Acta*, **540**: 231, 2005.
20. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre, Bookman, 2002.
21. CARUSO, J. A. & MONTES-BAYON, M. "Elemental speciation studies – new directions for trace metal analysis". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **56**: 148, 2003.
22. JAMES, B. R.; PETURA, J. C.; VITALE, R. J. & MUSSOLINE, G. R. "Hexavalent chromium extraction from soils: a comparison of five methods". *Environ. Sci. Technol.*, **29**: 2377, 1995.
23. PANICHEV, N.; MANDIWANA, K. & FOUKARIDIS, G. "Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of Cr (VI) in soil after leaching of Cr (VI) species with carbon dioxide". *Anal. Chim. Acta*, **491**: 81, 2003.
24. MATOS, W. O.; NÓBREGA, J. A.; SOUZA, G. B. & NOGUEIRA, A. R. A. "Especiação redox e cromo em solo acidentalmente contaminado com solução sulfocrômica". *Quim. Nova*, **31**(6): 1450, 2008.
25. GÓMEZ, V. & CALLAO, M. P., "Chromium determination and speciation since 2000". *Trends Anal. Chem.*, **25**(10): 1006.
26. HUO, D.; LU, H. & KINGSTON, H. M. "Determination and correction of analytical biases and study on chemical mechanisms in the analysis of Cr(VI) in soil samples using EPA protocols". *Environ. Sci. Technol.*, **32**: 3418, 1998.
27. ANDERSEN, J. E. T. "Introduction of hydrogen peroxide as an oxidant in flow injection analysis: speciation of Cr (III) and Cr (VI)". *Anal. Chim. Acta*. **361**: 125, 1998.
28. GONZALEZ, R. C & WOODS, R. E. *Digital Image Processing*. Estados Unidos da América, Pearson, 2008.
29. ANWAR, J.; WAHEED-UZ-ZAMAM; SHAFIQUE, M. U. & SALMAN, M. "Computational quantification of spot test by image scanning – a new analytical technique for micro samples". *Anal. Lett.* **43**: 367, 2010.
30. KOMPANY-ZAREH, M.; MANSOURIAN, M. & RAVAEE, F. "Simple method for colorimetric spot-test quantitative analysis of Fe(III) using a computer controlled hand-scanner". *Anal. Chim. Acta*, **471**: 97, 2002.
31. PACIORNICK, S.; YALLOUZ, A. V.; CAMPOS, R. C. & GANNERMAN, D. "Scanner image analysis in the quantification of mercury using spot-tests". *J. Braz. Chem. Soc.*, **17**(1): 156, 2006.
32. LOPEZ-MOLINERO, A.; LIÑAN, D.; SIPIERA, D. & FALCON, R. "Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics". *Microchem. J.*, **96**: 380, 2010.
33. ANTONELLI, A.; COCCHI, M.; FAVA, P.; FOCA, G.; FRANCHINI, G. C.; MANZINI, D. & ULRICI, A. "Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a walet-based classification algorithm". *Anal. Chim. Acta*, **515**: 3, 2004.
34. MEDINA, W. SKURTYIS, O. & AGUILERA, J. M. "Study on image analysis application for identification Quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd) geographical provenance". *LWT – Food Sci. Technol.*, **43**: 238, 2010.
35. TORRENCE, R.; WRIGHT, R. & CONWAY, R. "Identification of starch granules using image analysis and multivariate techniques". *J. Archeol. Sci.*, **31**: 519, 2004.
36. LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A.; CAPITÁN-VALLVEY, L. F. "Environmental monitoring using a conventional photographic digital camera for multianalyte disposable optical sensors". *Anal. Chim. Acta*, **706**: 328, 2011.

37. FOCA, G.; MASINO, F.; ANTONELLI, A. & ULCIRI, A. "Prediction of compositional and sensory characteristics using RGB digital images and multivariate calibration techniques". *Anal. Chim. Acta*, **706**: 238, 2011.
38. LUPETTI, K. O.; CARVALHO, L. C.; MOURA, A. F. & FATIBELLO-FILHO, O. "Análise de imagem em química analítica: empregando metodologias simples e didáticas para entender e prevenir o escurecimento de tecidos vegetais". *Quim. Nova*, **28**(3): 548, 2005.
39. MALEKI, N.; SAFAVI, A. & SEDAGHATPOUR, F. "Simple-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera". *Talanta*, **64**: 830, 2004.
40. VIDAL, M.; AMIGO, J. M.; BRO, R.; VAN DEN BERG, F.; OSTRÁ, M. & UBIDE, C. "Image analysis for maintenance of coating quality in nickel electroplating baths – real time control". *Anal. Chim. Acta*, **706**: 1, 2011.
41. LYRA, W. S.; SANTOS, V. B.; DIONÍZIO, A. G. G.; MARTINS, V. L.; ALMEIDA, L. F.; GAIÃO, E. N.; DINIZ, P. H. G. D.; SILVA, E. C. & ARAÚJO, M. C. U. "Digital image-based flame emission spectrometry". *Talanta*, **77**: 1584, 2009.
42. PEREIRA, F. M. V. & BUENO, M. I. M. S. "Image evaluation with chemometric strategies for quality control of paints". *Anal. Chim. Acta*, **588**: 184, 2007.
43. GODINHO, M. S.; PEREIRA, R. O.; RIBEIRO, K. O. SCHIMIDT, F.; OLIVEIRA, A. E. & OLIVEIRA, S. B. "Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA)". *Quim. Nova*, **31**(6): 1485, 2008.
44. REALPE, A. & VELÁZQUEZ, C. "Image processing and analysis for determination of concentrations of powder mixtures". *Powder Technol.*, **134**: 193, 2003.
45. BORIN, A.; FERRÃO, M. F.; MELLO, C.; CORDI, L.; PATACA, L. C. M.; DURÁN, N. & POPPI, R. J. "Quantification of *Lactobacillus* in fermented milk by multivariate image analysis with least-squares support-vector machines". *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**: 1105, 2007.
46. SANTOS, P. M.; WENTZELL, P. D. & PEREIRA-FILHO, E. R. "Scanner digital images combined with color parameters: a case study to detect adulterations in liquid cow's milk". *Food Anal. Methods*, **5**: 89, 2012.
47. BORAH, S. & BHUYAN, M. "A computer based system for matching colours during the monitoring of tea fermentation". *Int. J. Food Sci. Technol.*, **40**: 675, 2005.
48. GAIÃO, E. N., MARTINS, V. L.; LYRA, W. S.; ALMEIDA, L. F.; SILVA, E. C. & ARAÚJO, M. C. U. "Digital image-based titrations". *Anal. Chim. Acta*, **570**: 283, 2006.
49. VIDAL, M.; AMIGO, J. M. BRO, R.; OSTRÁ, M.; UBIDE, C. & ZURIARRAIN, J. "Flatbed scanners as a source of imaging. Brightness assessment and additives determination in a nickel electroplating bath". *Anal. Chim. Acta*, **694**: 38, 2011.
50. BEEBE, K. R.; PELL, R. J. & SEASHOLTZ, M. B. "Chemometrics a Practical Guide". Nova Iorque, Wiley, 1998.
51. MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. N.; MICHOTTE, Y. & KAUFMAN, L. "Chemometrics: a Textbook". Nova Iorque, Elsevier, 1988.
52. FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S. & VOLPE, P. L. O. "Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial". *Quim. Nova*, **22**(5): 724, 1999.
53. SHARAF, M. A.; IIMAN, D. L. & KOWALSKI, B. R. "Chemometrics". Nova Iorque, John Wiley & Sons, 1986.
54. GUERRA, M. B. B.; SCHAEFER, C. E. G. R.; MICHEL, R. F. M.; ROSA, P. F. & PEREIRA-FILHO, E. R. "Chemometric and analytical strategies for the study of soils from maritime Antarctica". *Br. J. Anal. Chem.*, **3**: 148, 2011.

55. DIN 38 414 Part 7. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge, sludge and sediment (Group S), Digestion using aqua regia for the subsequent determination of the acid-soluble portion of metals (S7). Berlin, 1983.
56. VAN DALEN, G. "Determination of the size distribution and percentage of broken kernels of rice using flatbed scanning and image analysis". *Food Res. Int.*, **27**: 51, 2004.
57. CANTRELL, K.; ERENAS, M. M.; ORBE-PAYA, I. & CAPITAN-VALLVEY, L. F. "Use of the Hue parameter of the Hue, Saturation, Value color space as a quantitative analytical parameter for bitonal optical sensors". *Anal. Chem.*, **82** : 531, 2010.
58. ASANO, T.; YABUSAKI, K.; WANG, Pi-chao & Iwasaki, A. "Determination of lead (II) in fly ash leachate using a newly developed simple spectrophotometric method". *Spectrochim. Acta, Part A*, **75**: 819, 2010.
59. DAVYDOVA, S. "Heavy metals as toxicants in big cities". *Microchem. J.*, **79**: 133, 2005.
60. LI, Z.; ZHU, Z.; CHEN, Y.; HSU, C. & PAN, J. "Spectrophotometric determination of lead in biological samples with dibromo-p-methyl-methylsulfonazo". *Talanta*, **48**: 511, 1999.
61. PREER, J. R. & MURCHISON JR, G. B. "A simplified method for detection of lead contamination of soil". *Environ. Pollut.*, **12(B)**: 1, 1986.
62. FEIGL, F. & ANGER, V. *Spot Tests in Inorganic Analysis*. 6a ed. Nova Iorque, Elsevier Publishing Company, 1972. p. 284.
63. CHEN, M.; MA, L. Q. "Comparisom of three aqua regia digestion methods for twenty Florida soils". *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **65**: 491, 2001.
64. YANG, X. J. & LOW, G. K.C. "Determination of the method detection limits for acid extractable metals in environmental solids: a comparative approach". *Accred. Qual. Assur.* **10**: 565, 2006
65. United States Environmental Protection Agency, 1996. Method 3060, in: Test Methods for Evaluating Solid Wastes, Physical/Chemical Methods, update, SW-846. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C
66. WITTBRODT, P. R. & PALMER, C. D. "Reduction of Cr (VI) in the presence of excess soil fulvic acid" *Environ. Sci. Technol.*, **29**: 255, 1995.

Apêndice 1

Valores de R, G, B, H, S, V, r, g, b e L para os testes com fortificação de Cr VI no solo.

[Cr] VI (mg/kg)	R	G	B	H	S	V	r	g	b	L
0	0,2652	1,322	8,489	-0,0052	-0,0983	0,0010	-0,0303	-0,0140	0,0443	10,08
0	2,684	2,905	4,215	-0,0014	-0,0304	0,0105	-0,0076	-0,0023	0,0098	9,805
0	-0,6934	1,148	3,842	-0,0002	-0,0439	-0,0027	-0,0115	-0,0015	0,0130	4,297
0	11,749	13,40	25,97	-0,0101	-0,2453	0,0461	-0,0747	-0,0274	0,1022	51,12
0,2	0,3834	1,500	4,179	-0,0018	-0,0423	0,0015	-0,0104	-0,0027	0,0132	6,063
0,2	2,430	4,524	10,32	-0,0055	-0,0905	0,0095	-0,0208	-0,0060	0,0268	17,28
0,2	7,538	8,357	15,32	-0,0053	-0,1415	0,0296	-0,0435	-0,0161	0,0597	31,21
0,4	0,1361	2,597	9,502	-0,0070	-0,0947	0,0005	-0,0212	-0,0068	0,0280	12,24
0,4	2,123	3,516	6,546	-0,0019	-0,0539	0,0083	-0,0132	-0,0029	0,0161	12,18
0,4	3,971	5,077	12,06	-0,0048	-0,1239	0,0156	-0,0402	-0,0148	0,0551	21,11
0,6	4,507	5,875	11,56	-0,0069	-0,0915	0,0177	-0,0206	-0,0070	0,0275	21,94
0,6	2,210	2,825	8,763	-0,0047	-0,0901	0,0087	-0,0275	-0,0124	0,0399	13,80
1	-2,759	-1,113	4,888	-0,0068	-0,0682	-0,0108	-0,0148	-0,0066	0,0214	1,016
1	0,2749	1,724	7,231	-0,0065	-0,0723	0,0011	-0,0159	-0,0062	0,0221	9,230
1	5,282	6,950	18,14	-0,0091	-0,1807	0,0207	-0,0524	-0,0214	0,0738	30,37
1,2	2,613	3,401	7,123	-0,0044	-0,0571	0,0102	-0,0130	-0,0047	0,0177	13,14
1,2	6,679	8,188	20,25	-0,0098	-0,2050	0,0262	-0,0623	-0,0252	0,0876	35,11
1,4	-0,3025	1,379	8,714	-0,0095	-0,0907	-0,0012	-0,0192	-0,0085	0,0278	9,791
1,4	8,163	9,803	22,53	-0,0113	-0,2103	0,0320	-0,0593	-0,0241	0,0835	40,50
1,6	1,090	2,443	9,111	-0,0090	-0,0862	0,0043	-0,0184	-0,0081	0,0264	12,64
1,6	7,575	8,692	17,81	-0,0070	-0,1726	0,0297	-0,0539	-0,0204	0,0743	34,07
2	3,716	3,295	7,712	-0,0083	-0,0578	0,0146	-0,0115	-0,0074	0,0189	14,72
2	-1,871	-1,065	6,246	-0,0114	-0,0759	-0,0073	-0,0148	-0,0096	0,0244	3,310
2	6,762	7,876	19,99	-0,0105	-0,2040	0,0265	-0,0617	-0,0265	0,0882	34,63
3	0,7280	1,375	10,81	-0,0164	-0,1065	0,0029	-0,0207	-0,0128	0,0335	12,91
3	3,618	2,825	12,19	-0,0192	-0,1013	0,0142	-0,0184	-0,0145	0,0328	18,63
3	4,806	5,672	17,91	-0,0121	-0,1789	0,0188	-0,0496	-0,0242	0,0737	28,39
4	-1,421	-3,492	8,522	-0,0283	-0,0961	-0,0056	-0,0134	-0,0203	0,0337	3,609
4	5,949	5,886	21,78	-0,0176	-0,2262	0,0233	-0,0633	-0,0346	0,0979	33,61
4	3,672	3,307	11,89	-0,0095	-0,1153	0,0144	-0,0310	-0,0188	0,0498	18,87
5	-0,3266	-2,557	9,653	-0,0294	-0,0994	-0,0013	-0,0139	-0,0207	0,0346	6,769
5	5,672	3,354	15,11	-0,0167	-0,1486	0,0222	-0,0374	-0,0285	0,0659	24,13
5	7,920	6,145	20,09	-0,0177	-0,2031	0,0311	-0,0562	-0,0344	0,0906	34,15
6	1,679	-4,170	8,847	-0,0375	-0,0818	0,0066	-0,0057	-0,0269	0,0327	6,356
6	1,281	-0,3498	15,09	-0,0211	-0,1656	0,0050	-0,0390	-0,0331	0,0721	16,03
7	3,154	4,744	23,98	-0,0197	-0,2676	0,0124	-0,0747	-0,0375	0,1122	31,88
7	-0,0943	-8,301	7,126	-0,0507	-0,0752	-0,0004	0,0013	-0,0344	0,0331	-1,269
7	-6,048	-13,24	0,8295	-0,0449	-0,0461	-0,0237	0,0081	-0,0327	0,0245	-18,46
8	4,228	2,696	23,32	-0,0275	-0,2530	0,0166	-0,0648	-0,0451	0,1100	30,25
8	1,189	-2,093	16,78	-0,0296	-0,1841	0,0047	-0,0391	-0,0418	0,0809	15,88
8	-3,656	-13,01	2,954	-0,0539	-0,0535	-0,0143	0,0097	-0,0384	0,0287	-13,71
9	6,774	4,504	24,97	-0,0286	-0,2540	0,0266	-0,0638	-0,0455	0,1094	36,25
9	-2,505	-12,49	4,903	-0,0594	-0,0658	-0,0098	0,0082	-0,0412	0,0330	-10,09
10	4,288	1,587	22,06	-0,0292	-0,2338	0,0168	-0,0564	-0,0465	0,1030	27,93
10	-4,590	-14,74	2,943	-0,0607	-0,0589	-0,0180	0,0111	-0,0429	0,0318	-16,39

[Cr] VI (mg/kg)	R	G	B	H	S	V	r	g	b	L
11	-5,144	-19,08	2,810	-0,0723	-0,0600	-0,0202	0,0193	-0,0564	0,0371	-21,42
11	1,567	-4,021	15,77	-0,0346	-0,1706	0,0061	-0,0309	-0,0472	0,0781	13,31
12	-3,639	-18,27	0,3738	-0,0674	-0,0269	-0,0143	0,0258	-0,0521	0,0263	-21,54
12	2,583	-3,939	18,30	-0,0377	-0,1993	0,0101	-0,0370	-0,0571	0,0941	16,95
13	-1,039	-7,886	12,52	-0,0377	-0,1456	-0,0041	-0,0189	-0,0512	0,0701	3,591
13	-8,624	-23,78	-1,508	-0,0479	-0,0375	-0,0338	0,0287	-0,0618	0,0330	-33,91
14	3,941	-7,975	20,72	-0,0569	-0,2282	0,0155	-0,0325	-0,0793	0,1118	16,69
14	-8,241	-27,20	-1,575	0,3859	-0,0239	-0,0323	0,0390	-0,0753	0,0363	-37,01
15	-1,911	-12,42	8,825	-0,0438	-0,1069	-0,0075	0,0027	-0,0609	0,0582	-5,503
15	-6,380	-25,45	2,721	0,5802	-0,0331	-0,0250	0,0309	-0,0777	0,0468	-29,11
16	0,0785	-11,61	17,24	-0,0617	-0,1979	0,0003	-0,0213	-0,0750	0,0963	5,702
16	-7,839	-22,12	2,302	0,0904	-0,0667	-0,0307	0,0207	-0,0633	0,0426	-27,66
17	-3,355	-18,63	15,47	-0,0730	-0,1964	-0,0132	-0,0021	-0,1041	0,1062	-6,522
18	-11,44	-34,09	-3,955	0,8604	0,0330	-0,0449	0,0569	-0,0975	0,0406	-49,49
19	-6,536	-32,03	0,4294	0,8485	0,0314	-0,0256	0,0495	-0,0983	0,0488	-38,13
20	-12,71	-38,70	-5,383	0,8745	0,0799	-0,0498	0,0725	-0,1164	0,0440	-56,80

Apêndice 2

Valores de R, G, B, H, S, V, r, g, b e L para os brancos, padrões e amostras utilizadas na proposição de modelos de calibração com PLS. As concentrações para os padrões 1, 2, 3, 4, 5 e 6 são iguais a 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/L, respectivamente.

	R	G	B	H	S	V	r	g	b	L
Branco	2,397054	1,785648	1,82562	-0,00214	-0,00118	0,0094	0,000272	-0,00093	0,000659	6,008322
Branco	-3,9693	-3,42363	-3,35481	0,00149	0,005579	-0,01557	0,000843	0,000727	-0,00157	-10,7477
Branco	2,54149	1,976021	1,897981	-0,00163	-0,0009	0,009967	0,000211	-0,00072	0,000506	6,415492
Branco	-1,85567	-1,87341	-1,71005	-0,00056	0,004252	-0,00728	0,001069	-0,00018	-0,00089	-5,43912
Branco	4,429129	3,39052	3,356928	-0,00318	-0,00208	0,017369	0,000355	-0,00142	0,001068	11,17658
Branco	-5,43088	-4,58125	-4,51291	0,002562	0,007055	-0,0213	0,000903	0,00121	-0,00211	-14,525
Branco	2,339295	1,471689	1,605766	-0,00318	0,000403	0,009174	0,000902	-0,0014	0,000501	5,41675
Branco	-3,77265	-3,32076	-3,01566	0,000407	0,003439	-0,01479	0,000656	0,000213	-0,00087	-10,1091
Branco	3,010248	2,371116	2,325217	-0,0019	-0,00182	0,011805	9,19E-05	-0,00087	0,000779	7,706582
Branco	3,882888	2,823098	3,157912	-0,00426	-0,00394	0,015227	0,000201	-0,00188	0,001681	9,863898
Branco	-1,04951	-1,26978	-0,70213	-0,00222	-0,0006	-0,00412	0,000395	-0,00092	0,000522	-3,02142
Padrão 1	-3,65025	-6,12429	-3,9201	-0,0143	0,014556	-0,01431	0,007157	-0,0065	-0,00066	-13,6946
Padrão 1	-1,16881	-3,66988	-1,73384	-0,0134	0,009443	-0,00458	0,00566	-0,006	0,000343	-6,57253
Padrão 1	-4,28853	-5,81527	-4,21209	-0,00961	0,012105	-0,01682	0,005264	-0,00429	-0,00097	-14,3159
Padrão 1	-4,53473	-6,40971	-4,60475	-0,01125	0,014421	-0,01778	0,006288	-0,00511	-0,00118	-15,5492
Padrão 1	0,132758	-2,39598	-0,35418	-0,01389	0,004543	0,000521	0,004625	-0,00617	0,001547	-2,6174
Padrão 1	-1,12735	-3,06451	-0,95055	-0,01251	0,00137	-0,00442	0,00349	-0,00546	0,001971	-5,14242
Padrão 2	-0,12849	-4,72431	-0,42782	-0,02798	0,003631	-0,0005	0,007724	-0,01186	0,004131	-5,28062
Padrão 2	-1,78963	-5,78811	-1,78029	-0,02531	0,004897	-0,00702	0,007299	-0,01066	0,003363	-9,35803
Padrão 2	-3,84356	-8,70316	-3,85763	-0,03088	0,011013	-0,01507	0,010254	-0,01331	0,00306	-16,4043
Padrão 2	-3,43799	-7,82612	-3,2253	-0,02867	0,007217	-0,01348	0,008737	-0,01222	0,003486	-14,4894
Padrão 2	1,626207	-5,0884	-0,10298	-0,03539	0,012395	0,006377	0,011849	-0,01556	0,003712	-3,56517
Padrão 2	-3,02632	-9,06992	-4,67493	-0,03176	0,00259	-0,01187	0,014325	-0,0144	7,27E-05	-16,7712
Padrão 2	-1,83105	-6,09394	-1,05947	-0,02818	-0,00215	-0,00718	0,006449	-0,01194	0,00549	-8,98446
Padrão 3	-1,77739	-10,7377	-0,69925	-0,06145	-0,00538	-0,00697	0,013951	-0,02614	0,012191	-13,2143
Padrão 3	-2,4162	-10,6101	-0,85665	-0,05821	-0,00869	-0,00948	0,012236	-0,02445	0,012215	-13,8829
Padrão 3	-6,86101	-15,6441	-5,65181	-0,0606	0,007614	-0,02691	0,017545	-0,02718	0,009636	-28,1569
Padrão 3	-7,51472	-15,6412	-6,38136	-0,05454	0,010366	-0,02947	0,017056	-0,02525	0,008194	-29,5373
Padrão 3	-5,24603	-13,1098	-4,61716	-0,05368	0,00867	-0,02057	0,01554	-0,02331	0,007773	-22,973
Padrão 3	-4,02674	-11,5682	-3,58368	-0,05074	0,006422	-0,01579	0,014199	-0,02196	0,007758	-19,1786
Padrão 4	-1,53459	-12,4911	-0,52408	-0,03852	-0,00395	-0,00602	0,017534	-0,03179	0,01426	-14,5498
Padrão 4	-3,18842	-14,5645	-2,60596	0,005559	0,00612	-0,0125	0,020505	-0,03325	0,01275	-20,3589
Padrão 4	-5,71647	-17,1609	-5,9324	0,009419	0,02216	-0,02242	0,024259	-0,03321	0,008955	-28,8097
Padrão 4	-4,81972	-15,7406	-4,54783	0,016	0,013921	-0,0189	0,021419	-0,03181	0,010391	-25,1082
Padrão 4	-6,28287	-18,9369	-6,67221	0,08985	0,027483	-0,02464	0,027205	-0,03697	0,00976	-31,892
Padrão 4	-6,97223	-19,5476	-7,54574	-0,01909	0,029844	-0,02734	0,028635	-0,03732	0,008681	-34,0655
Padrão 4	-3,05892	-14,2334	-0,93958	0,154326	-0,00711	-0,012	0,015983	-0,03193	0,015947	-18,2319
Padrão 5	-2,0564	-17,1177	-1,22686	0,593841	0,022754	-0,00806	0,024839	-0,04358	0,018743	-20,4009
Padrão 5	-5,1412	-19,8403	-5,57695	0,414361	0,03534	-0,02016	0,029619	-0,04256	0,012941	-30,5584
Padrão 5	-3,8346	-17,9509	-3,68199	0,414634	0,021789	-0,01504	0,026245	-0,04082	0,014572	-25,4675
Padrão 5	-0,55691	-15,3285	-0,15062	0,57809	0,0149	-0,00218	0,023542	-0,04121	0,017672	-16,036
Padrão 5	-5,79054	-18,4064	-5,01482	0,300547	0,020955	-0,02271	0,025083	-0,03805	0,012969	-29,2118
Padrão 5	-8,53521	-24,0497	-6,61581	0,694184	0,045304	-0,03347	0,031729	-0,05091	0,01918	-39,2007
Padrão 5	-1,52863	-15,8653	-1,74299	0,301177	0,016776	-0,00599	0,02384	-0,03837	0,014528	-19,1369
Padrão 6	1,440392	-15,5225	1,119204	0,594388	0,03224	0,005649	0,029958	-0,05151	0,021557	-12,9629
Padrão 6	-2,90778	-20,9984	-2,87013	0,792722	0,053174	-0,0114	0,036794	-0,05864	0,021848	-26,7763
Padrão 6	-2,52838	-22,0448	-1,78665	0,875996	0,068134	-0,00992	0,038714	-0,06535	0,026637	-26,3598
Padrão 6	5,029448	-13,8615	5,119392	0,859533	0,031054	0,019723	0,028612	-0,05571	0,027099	-3,71265
Padrão 6	4,967992	-13,2073	5,507599	0,87551	0,023743	0,019482	0,026572	-0,05408	0,02751	-2,73175
Padrão 6	2,420669	-17,1894	2,829936	0,874711	0,046916	0,009493	0,032125	-0,05998	0,027858	-11,9388
Padrão 6	-4,11079	-21,9041	-3,19289	0,823817	0,03998	-0,01612	0,028915	-0,04954	0,020626	-29,2078
Padrão 6	-3,10936	-21,3993	-1,92347	0,847277	0,041256	-0,01219	0,028684	-0,05096	0,022274	-26,4322

	R	G	B	H	S	V	r	g	b	L
Amostra 1	-2,71429	-10,4921	-1,93724	-0,04889	-0,0004	-0,01064	0,014133	-0,02424	0,010104	-15,1437
Amostra 1	5,381839	-3,11763	5,244346	-0,05065	-0,01578	0,021105	0,009789	-0,02302	0,013234	7,50856
Amostra 1	1,261984	-5,82388	1,813313	-0,04525	-0,01063	0,004949	0,009812	-0,02097	0,011159	-2,74858
Amostra 1	0,047637	-7,95986	-0,0666	-0,04781	6,08E-05	0,000187	0,013432	-0,02289	0,009456	-7,97882
Amostra 1	1,203739	-5,41272	1,30546	-0,04054	-0,00594	0,004721	0,009696	-0,01891	0,009215	-2,90352
Amostra 1	-1,47162	-11,0793	-0,78129	-0,0616	-0,00241	-0,00577	0,016817	-0,02948	0,012658	-13,3322
Amostra 2	-6,26669	-13,9495	-4,18573	-0,05226	-0,00343	-0,02458	0,0141	-0,02551	0,011405	-24,4019
Amostra 2	-4,32883	-12,3652	-2,41387	-0,05553	-0,00764	-0,01698	0,013248	-0,02573	0,012484	-19,1079
Amostra 2	-3,096	-9,44055	-2,21572	-0,04174	-0,00034	-0,01214	0,011276	-0,01941	0,008135	-14,7523
Amostra 2	-3,07747	-10,3523	-1,23229	-0,05203	-0,01042	-0,01207	0,011242	-0,02336	0,01212	-14,6621
Amostra 2	-2,27904	-11,625	-2,44522	-0,05498	0,00821	-0,00894	0,01737	-0,02642	0,009049	-16,3493
Amostra 2	-3,89286	-14,1237	-4,10554	-0,06012	0,014668	-0,01527	0,020944	-0,02973	0,008791	-22,1221
Amostra 3	-9,27898	-17,7239	-7,27875	-0,05802	0,009139	-0,03639	0,019551	-0,02938	0,009826	-34,2817
Amostra 3	-6,25227	-15,1831	-5,83183	-0,05343	0,015841	-0,02452	0,020306	-0,02789	0,007579	-27,2672
Amostra 3	-4,73924	-10,7024	-5,07007	-0,03326	0,019354	-0,01859	0,014802	-0,01717	0,002368	-20,5117
Amostra 3	-2,55247	-12,4894	-1,92586	-0,06041	0,001397	-0,01001	0,018065	-0,03004	0,011973	-16,9677
Amostra 3	-6,68324	-16,7722	-5,43839	-0,05642	0,008768	-0,02621	0,021428	-0,03269	0,011266	-28,8938
Amostra 3	-9,76031	-20,4048	-9,14756	-0,06368	0,027566	-0,03828	0,027694	-0,03519	0,007498	-39,3126
Amostra 4	-3,09221	-6,92766	-1,43203	-0,02543	-0,00634	-0,01213	0,006587	-0,01347	0,006884	-11,4519
Amostra 4	-0,50914	-4,94204	1,396011	-0,02956	-0,01842	-0,002	0,004605	-0,01511	0,010504	-4,05518
Amostra 5	-3,36808	-3,32046	-2,79417	-0,00141	0,00402	-0,01321	0,001229	-0,00056	-0,00067	-9,48271
Amostra 5	-2,63301	-2,85081	-2,23861	-0,0025	0,003563	-0,01033	0,001417	-0,00106	-0,00036	-7,72242
Amostra 5	-10,1279	-10,2518	-8,99901	-0,00404	0,020419	-0,03972	0,00577	-0,00179	-0,00398	-29,3787
Amostra 6	-5,35241	-4,8036	-4,65495	0,001268	0,0087	-0,02099	0,001578	0,000671	-0,00225	-14,811
Amostra 6	-3,9265	-3,73055	-3,46467	-0,00033	0,006738	-0,0154	0,001552	-5,6E-05	-0,0015	-11,1217
Amostra 6	1,50888	0,703568	1,045121	-0,00361	2,55E-05	0,005917	0,000885	-0,00154	0,000656	3,257569
Amostra 6	-5,127	-5,24601	-4,40615	-0,003	0,008542	-0,02011	0,002734	-0,00131	-0,00143	-14,7792
Amostra 6	-8,98489	-7,85134	-7,48876	0,002475	0,012254	-0,03523	0,002153	0,001157	-0,00331	-24,325
Amostra 6	-8,19383	-7,24569	-6,73629	0,001455	0,009525	-0,03213	0,001844	0,000586	-0,00243	-22,1758
Amostra 7	2,204909	3,478339	7,346806	-0,00328	-0,06663	0,008647	-0,01579	-0,00481	0,020604	13,03005
Amostra 7	3,782784	5,394885	10,04113	-0,00393	-0,0864	0,014834	-0,02051	-0,00579	0,0263	19,21879
Amostra 7	2,410316	3,967958	7,419951	-0,00186	-0,06725	0,009452	-0,01663	-0,0039	0,020529	13,79823
Amostra 7	4,102184	5,672542	11,09992	-0,00547	-0,09663	0,016087	-0,02242	-0,00719	0,02961	20,87465
Amostra 7	-1,90576	-0,91863	3,350305	-0,00469	-0,04699	-0,00747	-0,00986	-0,00539	0,015248	0,52591
Amostra 7	2,651759	3,567444	9,430624	-0,00787	-0,0858	0,010399	-0,01847	-0,00845	0,026921	15,64983
Amostra 8	0,112041	-0,22028	0,292293	-0,00227	-0,00256	0,000439	-6E-06	-0,00102	0,001029	0,184049
Amostra 8	-3,09224	-2,90764	-2,36369	-0,00089	0,002693	-0,01213	0,000798	-0,00026	-0,00054	-8,36357
Amostra 8	1,483957	1,571561	1,921668	-0,00066	-0,0089	0,005819	-0,00184	-0,00036	0,002203	4,977186
Amostra 8	1,954581	2,104127	2,166841	0,000373	-0,00842	0,007665	-0,00199	6,32E-05	0,001931	6,225549
Amostra 8	2,889251	2,045838	2,644	-0,00407	-0,00734	0,01133	-0,00057	-0,00195	0,002524	7,579089
Amostra 8	4,54963	3,17555	3,647531	-0,00519	-0,00585	0,017842	7,6E-05	-0,00249	0,002411	11,37271
CRM 1	-2,59974	-11,6175	-2,10734	-0,05413	0,002505	-0,0102	0,014254	-0,02361	0,009355	-16,3246
CRM 2	-2,79417	-11,6886	-2,63386	-0,05247	0,007038	-0,01096	0,015908	-0,02443	0,008523	-17,1167
CRM 3	-3,71952	-12,8171	-3,45474	-0,05369	0,008382	-0,01459	0,016487	-0,02497	0,008487	-19,9913

Anexo 1

Valores de Cr (VI) determinados por diferentes técnicas (parte do formulário do material de referência certificado NIST-2701).

Table A2. Multi-Laboratory Concentration Data (Dry-Mass Basis) for SRM 2701 by SW-846 Methods

Data Set	Method 7196A Hexavalent Cr mg/kg	Method 7199 Hexavalent Cr mg/kg	Method 6800 Hexavalent Cr mg/kg	Method 3050 Leachable Cr % mass fraction	Method 3052 Total Cr % mass fraction
1	503.8	389.1	553.0	0.294	1.025
2	314.3	354.4	568.7	0.384	
3	415.7	461.6	529.8	0.465	
4	408.7	391.1	549.4	0.514	
5	399.9	405.7	575.2	0.317	
6	326.2	363.3	544.3	0.255	
7	266.0	358.6		0.360	
8	500.5	557.2		0.597	
9	351.7	414.2		0.441	
10	364.9	274.2		0.833	
11	336.7	393.8		0.236	
12	469.2	439.3		0.235	
13	338.4	270.4			
14		368.3			
Mean	384.3	388.7	553.4	0.411	1.025
SD ^(a)	73.5	72.1	16.5	0.175	
RSD ^(b)	19.1	18.5	3.0	42.7	
Median	364.9	390.1	551.2	0.372	
Minimum	266.0	270.4	529.8	0.235	1.025
Maximum	503.8	557.2	575.2	0.833	1.025
# Labs ^(c)	12	10	3	10	1
# Measurements ^(d)	13	14	6	12	1
Recovery (%) ^(e)	69.7	70.5	100.4	9.6	24.1