



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENAN MENDES RUIZ

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO
MÉTODO SPADNS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
FLUORETO EM ÁGUAS POR ANÁLISE DE IMAGEM
DIGITAL**

Londrina
2017

RENAN MENDES RUIZ

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO
MÉTODO SPADNS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
FLUORETO EM ÁGUAS POR ANÁLISE DE IMAGEM
DIGITAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ruiz, Renan Mendes.

Desenvolvimento, otimização e validação do método SPADNS para a quantificação de fluoreto em águas por análise de Imagem Digital / Renan Mendes Ruiz. - Londrina, 2017.

86 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto Paulinetti Camara.

Coorientador: Suzana Lucy Nixdorf.

Coorientador: Emilia Kiyomi Kuroda.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2017.

Inclui bibliografia.

1. Análise de Imagem Digital - Tese. 2. Scanner - Tese. 3. Planejamento Experimental - Tese. 4. SPADNS - Tese. I. Camara, Carlos Alberto Paulinetti. II. Nixdorf, Suzana Lucy. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . IV. Título.

RENAN MENDES RUIZ

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO
SPADNS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE FLUORETO EM ÁGUAS
POR ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti
da Camara.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Emilia Kiyomi Kuroda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 02 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara, pela orientação, amizade, paciência e confiança.

A Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf pelos ensinamentos e apoio para a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Yamashita, Prof. Dr. João Carlos Alves e Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley pelos ensinamentos, sugestões e disponibilidade para realização do trabalho.

A Profa. Dra. Emilia Kiyomi Kuroda pela participação na conclusão do trabalho.

A Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Departamento de Química, que possibilitou esta oportunidade de amadurecimento intelectual.

Aos amigos de laboratório, Alan, Leandro, Lycio, Paulo e Tamires agradeço pela amizade, apoio, ajuda e convivência.

A todos aqueles que me estenderam a mão, e de alguma forma me ajudaram, obrigado.

*A vida é a arte do encontro, embora haja tanto
desencontro pela vida. (Vinícius de Moraes)*

RUIZ, Renan Mendes. **Desenvolvimento, Otimização e Validação do Método SPADNS para a quantificação de Fluoreto em águas por Análise de Imagens Digitais**. 2017. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A concentração de íons fluoreto em águas de abastecimento tem despertado o interesse em relação as suas funções de prevenção da cárie dentária. O limite de ingestão de íons fluoreto é muito estreito com o de toxicidade, e relatos de fluorose dentária e óssea são encontrados na literatura. Uma opção bastante interessante para o monitoramento de fluoreto em águas, consiste no uso de método colorimétrico por análise de imagens digitais (AID), considerando sua praticidade, baixo custo de implementação, e disponibilidade diante do avanço da tecnologia dos dispositivos para captura de imagens. Neste trabalho, a determinação quantitativa de fluoreto em águas foi realizada pelo sistema instrumental desenvolvido, proposto por um método empregando o reagente cromogênico SPADNS, tendo a sensibilidade otimizada por planejamento experimental. O planejamento experimental resultou em um aumento de dez vezes na sensibilidade do método proposto. O desempenho do método DIAScanner-SPADNS-RGB foi validado de acordo com a resolução da ANVISA e avaliado quanto ao desempenho, frente os métodos de referência: potenciométrico, empregando o eletrodo íons seletivo de fluoreto (ISEF), e espectrofotométrico (Vis-SPADNS). Foi obtida a linearidade em uma faixa de concentração de íons fluoreto em água de 0,05 a 1,20 mg L⁻¹. O coeficiente angular da curva apresentou desvio padrão igual a 0,01651 e, o coeficiente linear de 0,01052. O limites LD e LQ apresentaram valores de 0,039 mg L⁻¹ e 0,129 mg L⁻¹, respectivamente. As concentrações de fluoreto nas amostras analisadas foram comparadas por ANOVA frente aos métodos de referência e os resultados não diferem significativamente ao nível de 95 % de confiança. Os cálculos realizados pelo software QuantColour foram avaliados por ANOVA e não diferiram ao nível de significância. O volume de reagente SPADNS foi reduzido em 30 % pelo método proposto. O método DIAScanner-SPADNS-RGB se mostrou muito eficiente na quantificação de fluoreto em amostras de água.

Palavras-chave: Fluoreto. Planejamento Experimental. SPADNS. Scanner. Análise de Imagem Digital.

RUIZ, Renan Mendes. **Development, Optimization and Validation of the SPADNS Method to Fluoride quantification in waters by Digital Image Analysis**. 2017. 86 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The fluoride ions concentration in water supply has attracted interest because the functions in dental caries prevention. The fluoride ions ingestion limit is narrow with the toxicity, and reports in the literature of dental and bone fluorosis are found. A very interesting option to monitoring fluoride in waters is the colorimetric method by digital image analysis (AID), considering it is practicality, low implementation cost and the technology advances of the image capture devices. This present work, the quantitative determination of fluoride in waters was performed by the instrumental method developed, consisting at the SPADNS chromogenic reagent use, with the sensitivity optimized by experimental design. The experimental design resulted into a ten-fold increase in the proposed method sensitivity. The DIAScanner-SPADNS-RGB method performance was validated according to ANVISA and evaluated faced to the reference methods: potentiometric, using the ion selective electrode of fluoride (ISEF) and spectrophotometric (Vis-SPADNS). The linearity was obtained to fluoride ions concentration range in water of 0.05 to 1.20 mg L⁻¹. The analytical curve angular coefficient had a standard deviation of 0.01651 and the linear coefficient of 0.01052. The detection (LD) and quantification (LQ) limits presented values of 0.039 mg L⁻¹ and 0.129 mg L⁻¹, respectively. The fluoride concentrations into the analyzed samples were compared by ANOVA faced to the reference methods and the results obtained did not differed significantly at the 95% confidence level. The calculations performed by the QuantColour software were evaluated faced to Excel by ANOVA and did not differ at the significance level. The SPADNS reagent volume was reduced in 30% by the proposed method. The DIAScanner-SPADNS-RGB method proved as a very efficient in fluoride ions quantification in waters samples.

Keywords: Fluoride. Experimental Desing. SPADNS. Scanner. Digital Image Analysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de substâncias interferentes para o método ISEF que causam um erro de 0,1 mg L ⁻¹ em relação as amostras de referência com 1,0 mg L ⁻¹ de fluoreto	24
Tabela 2. Concentrações de substâncias interferentes que causam um erro de 0,1 mg L ⁻¹ em amostras com 1,0 mg L ⁻¹ para o método SPADNS	25
Tabela 3. Níveis descodificados das variáveis de entrada - volume de SPADNS, tempo de reação, brilho, contraste, gama e saturação, para planejamento fatorial fracionado 2 ⁶⁻²	52
Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial fracionado 2 ⁶⁻² com ponto central em quadruplicata	53
Tabela 5. Equações de codificação para as variáveis independentes.....	53
Tabela 6. Efeitos calculados para o planejamento FRACIONADO 2 ⁶⁻²	54
Tabela 7. Níveis descodificados das variáveis de entrada brilho, contraste e gama para o planejamento fatorial completo 2 ³	56
Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial completo 2 ³ com ponto central em triplicata	56
Tabela 9. Equações de codificação para as variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2 ³	57
Tabela 10. Efeitos calculados para o planejamento fatorial completo 2 ³	57
Tabela 11. ANOVA para o modelo.	59
Tabela 12. Níveis reais e codificados das variáveis de entrada contraste e gama para o delineamento central composto 2 ²	60
Tabela 13. Matriz do delineamento central composto 2 ² com ponto central em triplicata.	60
Tabela 14. Equações de Matriz do planejamento fatorial completo 2 ³ com ponto central em triplicata DCC 2 ²	61
Tabela 15. Efeitos calculados para o delineamento central composto 2 ² com ponto central em triplicata	61
Tabela 16. Espécies químicas interferentes analisadas, concentração limite (APHA), concentrações de íons fluoreto (mg L ⁻¹) via DIAScanner-SPADNS-RGB, desvio padrão relativo (DPR) e desvio da	

concentração de íons fluoreto (mg L^{-1}) nas amostras contaminadas em relação a amostra de referência ($n = 3$).....	65
Tabela 17. Concentrações de íons fluoreto (MG L^{-1}) em amostras de águas determinadas pelos métodos de referência utilizando diferentes equipamentos: potenciômetro (ISEF) e espectrofotômetro (VIS-SPADNS) e pelo sistema/método proposto de imagem digitalizada (DIAscanner-SPADNS-RGB).....	69
Tabela 18. ANOVA na comparação do método de referência ISEF e o proposto DIAscanner-SPADNS-RGB.	69
Tabela 19. ANOVA na comparação do método de referência ISEF e o proposto DIAscanner-SPADNS-RGB	70
Tabela 20. concentrações de íons fluoreto (MG L^{-1}) adicionadas à matriz de referência, concentração recuperada (MG L^{-1}), desvio padrão relativo (DPR) e Recuperação (%) do método DIAscanner-SPADNS-RGB para duas amostras analisadas.	71
Tabela 21. ANOVA na comparação da determinação de íons fluoreto em amostras de água em duas placas (Placa I e II) distintas de polietileno com volume de SPADNS DE 0,70 mL.....	72
Tabela 22. ANOVA na comparação da determinação de íons fluoreto em amostras de água em dois níveis de volumes de SPADNS adicionados, 0,70 mL e 0,75 mL na mesma placa de polietileno.....	73
Tabela 23. ANOVA na comparação da determinação de íons fluoreto em amostras de água nos formatos de imagem BMP e JPEG.....	73
Tabela 24. ANOVA na comparação da determinação de íons fluoreto em amostras de água pelos softwares QuantColour e Exce®.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto clínico da cavidade bucal em crianças com cárie severa.	20
Figura 2. Dentes de paciente com fluorose dentária, aparência marrom e esmalte comprometido.	21
Figura 3. Reação do complexo Zr- SPADNS com os íons fluoreto.....	25
Figura 4. Comprimentos de onda do espectro eletromagnético.	27
Figura 5. Espectro correspondente às cores vermelha, verde e azul.	27
Figura 6. cubo RGB normalizado (RGB/255) com as cores primárias nos eixos principais.	28
Figura 7. Correção Gama.....	29
Figura 8. Um ponto luminoso é convertido em uma linha de varredura pela ação de um <i>scanner</i>	30
Figura 9. Representação bidimensional de uma imagem.....	31
Figura 10. Imagem da tela de iniciação do <i>software</i> QuantColour.	40
Figura 11. Janela gráfica do software QuantColour mostrando a área de seleção utilizada para AID POR MEIO dos valores das intensidades RGB mensuradas.....	41
Figura 12. (A) Espectrofotometro UVMini-1240. (B) Especificações de <i>hardware</i> . (C) Cubeta de vidro ótico.....	43
Figura 13. Imagem da placa de poliestireno com 96 poços sem adição e com a adição das soluções contendo as soluções padrão com SPADNS e as amostras de água.	45
Figura 14. Identificação das amostras; Foto digitalizada da microplaca contendo soluções padrão para curva analítica e amostras de água (n = 3).	46
Figura 15. Imagem do sistema DIAScanner desenvolvido.....	46
Figura 16. Imagem da placa de poliestireno branca anexada ao suporte de polietileno pronta para digitalização por scanner na posição invertida.....	47
Figura 17. No detalhe as concentrações de íons fluoreto (mg L^{-1}) e os coeficientes da regressão para as curvas analíticas, determinadas utilizando as intensidades RGB, pelo sistema proposto empregando aid via software QuantColour.	48

Figura 18. (A) Curva analítica das intensidades (RGB) versus concentração de fluoreto (MG L^{-1}); (B) Curva analítica do log das intensidades normalizadas ($\text{RGB}/255$) versus concentração de fluoreto (MG L^{-1}).....	49
Figura 1. espectro de absorção de 400 a 700 nm das concentrações de íons fluoreto utilizadas na confecção da curva analítica variando-se de 0,05 a 1,20 mg L^{-1} com adição de reagente SPADNS.....	50
Figura 20. Resíduos dos ajustes dos dados: (A) Distribuição dos resíduos; (B) Respostas observadas versus valores estimados pelo modelo.....	59
Figura 21. Efeito de interação de correção das variáveis contraste e gama na sensibilidade da curva analítica: (A) Curva de contorno; (B) Superfície de resposta.....	62
Figura 22. (A) Gráfico das intensidades (RGB) versus concentração de fluoreto (mg L^{-1}) em condição otimizada empregando o método DIAscanner-SPADNS-RGB proposto; (B) Gráfico de log intensidade ($R/255$) versus concentração de fluoreto (mg L^{-1}) em condição otimizada empregando o método DIAscanner-SPADNS-RGB proposto.....	63
Figura 23. Gráfico do logaritmo intensidade ($R/255$) versus concentração de fluoreto (mg L^{-1}); (● – condição normal; ■ – condição otimizada) para o método DIAscanner-SPADNS-RGB.....	64
Figura 24. Avaliação da linearidade do método para o sistema DIAscanner-SPADNS-RGB.....	66
Figura 25. Gráfico de absorbância versus $[F^-]$ (mg L^{-1}) para o método espectrofotométrico (Vis-SPADNS).....	67
Figura 26. Gráfico do potencial (mV) versus $\log [F^-]$ (MG L^{-1}) para o método potenciométrico (ISEF).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AID	Análise de Imagem Digital
ANOVA	Análise de Variância
APHA	<i>American Public Health Association</i>
BITMAP	mapa de bits
BMP	bitmap
CCD	<i>Central Composite Design</i>
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
DPI	Dots per Inch
MIA	Multivariate Image Analysis
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	<i>Principal Components Analysis</i>
PLS	Partial Least Squares
ISEF	Ion Selective Electrode of Fluoride
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
TISAB	<i>Total Ionic Strength Adjustment Buffer</i>
SPADNS	Sal trissódico do ácido 1,8-dihidroxi-2-(4-sulfenilazo)-naftaleno-3,6-dissulfônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	FLÚOR	18
2.1.1	FLÚOR NO MEIO AMBIENTE	18
2.1.2	FUNÇÕES BIOLÓGICAS E CONSEQUÊNCIAS PARA SAÚDE	19
2.1.3	LEGISLAÇÃO	22
2.2	MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE FLUORETO	23
2.2.1	MÉTODO DO ELETRODO ÍON SELETIVO	23
2.2.2	MÉTODO SPADNS	24
2.3	ANÁLISE COLORIMÉTRICA	26
2.3.1	MODELO DE CORES	26
2.3.2	BRILHO E CROMATICIDADE	28
2.3.3	CORREÇÃO GAMA	29
2.3.4	USO DE SCANNER NA CAPTURA DE IMAGENS	30
2.3.5	IMAGEM DIGITALIZADA	31
2.4	QUIMIOMETRIA	32
2.5	APLICAÇÕES ANALÍTICAS POR ANÁLISE DE IMAGENS DIGITAIS	33
3	OBJETIVOS GERAIS	38
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	HARDWARE E SOFTWARE	39
4.1	MICROCOMPUTADOR	39
4.2	SCANNER	39
4.3	IRFANVIEW	39
4.4	EXCEL®	39
4.5	QUANTCOLOUR	40
5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	42
5.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	42

5.1.1	PADRÃO FLUORETO	42
5.1.2	SPADNS.....	42
5.1.3	TISAB.....	42
5.1.4	AMOSTRAS DE ÁGUA.....	43
5.2.	ESPECTROFOTÔMETRO (VIS-SPADNS).....	43
5.3	ELETRODO ÍON SELETIVO DE FLUORETO E POTENCIÔMETRO	44
5.4	DIASCANNER-SPADNS-RGB	48
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1	ESTUDO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAI E ANALÍTICAS	50
6.1.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO	50
6.1.2	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	51
6.2	ESTUDO DOS INTERFERENTES	64
6.3	DESEMPENHO ANALÍTICO.....	66
7	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

O Flúor é um dos elementos mais abundantes no ambiente, sendo encontrado como mineral, e quanto à concentração, figura entre os vinte mais abundantes na crosta terrestre. Os humanos são expostos aos íons fluoreto por meio dos alimentos consumidos, bebidas, água e até mesmo por inalação. Por meio do consumo de água, são ingeridas 75 % da concentração total diária de fluoreto. Estudos apontam que os benefícios e malefícios relacionados ao consumo de fluoreto, dependem da concentração ingerida (TAGUIPOUR et al., 2016).

A cárie dentária é uma doença desenvolvida de forma infecciosa, causada por dieta inadequada, principalmente pelo consumo excessivo de açúcares e carboidratos, acarretando na desmineralização da estrutura dentária (BORGES et al., 2016). A cárie dentária atinge todas as faixas etárias, e a fluoretação de águas de abastecimento tem sido o método coletivo de controle mais eficiente, aplicado por mais de cinco décadas, com significativa melhora na saúde bucal dos cidadãos (BELLE et al., 2009).

Em contraponto, há relatos na literatura sobre a fluorose óssea e dentária, causadas pela ingestão de águas com teores elevados de íons fluoreto por longos períodos (RAMESH et al., 2016). No Brasil, Forte et. al. (2001) relatam a incidência de fluorose nas localidades da Paraíba (FORTE et al., 2001).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma faixa de concentração para íons fluoreto em águas de 0,5 até 1,5 mg L⁻¹ (OMS, 2011). No Brasil, esta é regulamentada pelo Ministério da Saúde, que desde o ano de 1975, estabelece os limites entre 0,6 mg L⁻¹ a 1,7 mg L⁻¹ (SILVA et al., 2014).

A fluoretação é uma medida consagrada na prevenção de cárie dentária, e os teores ideais para consumo variam com as temperaturas médias diárias do ar para cada região. Foi avaliado que para localidades com a média de temperaturas máximas diárias entre 26,3 °C e 32,5 °C, a concentração ideal de íons fluoreto está entre 0,55 mg L⁻¹ e 0,84 mg L⁻¹ (MOINMAZ et al., 2012).

Ainda que sejam comprovados os benefícios do flúor no organismo, necessita de consumo controlado por ser uma substância farmacologicamente ativa, pois concentrações acima ou abaixo da estreita faixa ideal podem facilmente atingir os limites de risco-benefício em relação às dosagens consumidas (TOASSI et al., 2007).

Sendo um parâmetro importante para a avaliação da qualidade da água de consumo, além da pequena faixa de concentração de íons fluoreto entre os benefícios e toxicidade, estabelecer e controlar os níveis de segurança para o teor de fluoreto é muito importante para a manutenção da saúde da população, diminuindo os riscos inerentes à contaminação por íons fluoreto e prevenção da cárie dentária (STANCARI et al., 2014; FRAZÃO et al., 2011).

Para determinação de fluoreto em águas é mais utilizado o método potenciométrico com eletrodo íons seletivos para fluoreto (*ISEF – Ion Selective Electrode of Fluoride*), por requerer um tempo menor para análise e maior simplicidade para operação em relação ao método cromatográfico. O espectrofotométrico empregando o reagente SPADNS apresenta maior sensibilidade, porém é menos utilizado por apresentar pouca seletividade e dispender um tempo maior para análises (NOH, COETZEE, 2007).

A Análise de Imagem Digital (AID) é uma técnica de ampla aplicação, por ser rápida, de baixo custo e não destrutiva. A facilidade e rapidez para captura das imagens associados à AID, tem se tornado mais interessante devido a evolução dos dispositivos como câmera digital, câmera de dispositivos móveis, scanner e webcam, podendo ser aplicados em diferentes campos da ciência e tecnologia (SOUZA et al., 2014).

São encontrados trabalhos com aplicação de imagens digitais em diversas áreas como: percepção humana (DE-SHENG, GUAN-LING, 2009), ortodontia (MACHADO, SOUKI, 2004), alimentos (DALEN, 2003), geociências (SANTOS; GALO, 2016), agricultura (GODOY, 2007), engenharia (VERMA, VERMA, 2015) e saneamento de esgoto (PRADO, CAMPOS, 2008).

Devido à importância do controle da concentração de íons fluoreto em águas de abastecimento e a busca de metodologias alternativas para as verificações, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento, otimização e validação de um método rápido e versátil para determinação de íons fluoreto em águas utilizando AID.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FLÚOR

O flúor pertence ao grupo dos halogênios, que do grego significa formador de sal, sendo o elemento mais reativo conhecido. Este elemento apresenta sete elétrons no nível eletrônico mais externo, com configuração eletrônica s^2p^5 . O flúor se comporta como um agente oxidante muito forte, e por não possuir orbital d de baixa energia, é o único elemento dos halogênios que não existe em níveis de oxidação mais elevados (LEE, 1999).

As águas subterrâneas são consideradas as maiores fontes de flúor. Os íons fluoreto, formam complexos estáveis com os compostos orgânicos, boro, alumínio, ferro e cálcio. O flúor foi incorporado aos minerais por meio de solidificação de uma fase fluida com grande concentração do elemento, dependendo de variáveis como pH, pressão, temperatura, composição das fases e tempo de reação. Os minerais estão presentes nas rochas da crosta terrestre como também, no magma e fluidos hidrotermais associados a processos metamórficos (HYPOLITO et al., 2010).

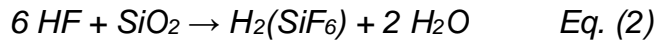
2.1.1 FLÚOR NO MEIO AMBIENTE

O flúor é encontrado em minerais que se formam em rochas ígneas como granito, sienito ou pegmatitos, em rochas vulcânicas alcalinas (riólitos, andesitas, fonólitos), em rochas metamórficas (féisico e mica) e, em menor grau, em depósitos sedimentares derivados de rochas parentais ricas em flúor, cinzas vulcânicas, sedimentos e material rochoso geotérmico sobreposto ou folhelhos marinhos. Os íons fluoreto e hidroxila por apresentarem carga e raio parecidos substituem-se constantemente nas estruturas minerais, formando complexos mais solúveis com cátions como hidrogênio, magnésio e alumínio (OLACA et al., 2016).

Conforme características de halogênio, o flúor existe na forma de molécula diatômica F_2 e apresenta a coloração amarelo claro. A maior fonte de flúor é o mineral fluorita (CaF_2), com produção mundial de 3,6 milhões de toneladas. Outro mineral bastante encontrado é fluorapatita ($3(Ca(PO_4)_2 \cdot CaF_2)$) (LEE, 1999).

O flúor é obtido na forma de ácido fluorídrico (HF), pela reação de CaF_2 com ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), como mostra a Equação 1. O HF produzido

reage com o dióxido de silício (SiO_2) formando o ácido fluossilícico ($\text{H}_2(\text{SiF}_6)$), como apresentado pela Equação 2. O $\text{H}_2(\text{SiF}_6)$ é utilizado na fluoretação de água potável no lugar de fluoreto de sódio (NaF) (LEE, 1999).



O flúor é um elemento presente nos alimentos, medicamentos, suplementos nutricionais, creme dental e água mineral, sendo necessário o controle rígido da concentração pelos órgãos reguladores (JESUS, 2005).

2.1.2 FUNÇÕES BIOLÓGICAS E CONSEQUÊNCIAS PARA SAÚDE

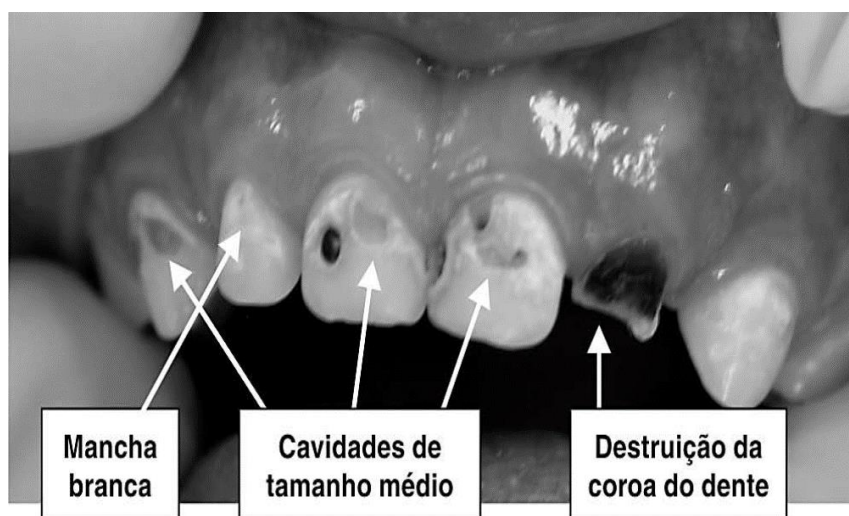
A função biológica e a toxicidade dos íons fluoreto dependem da concentração consumida. O consumo de água fluoretada responde aproximadamente por 60 % da quantidade total de íons fluoreto ingerida (DAS et al., 2005). Apesar das incertezas entre os cientistas sobre a necessidade da presença de íons fluoreto para o consumo humano, acredita-se que concentrações de fluoreto adequadas atuam na prevenção da cárie dentária. Por outro lado, o consumo elevado de íons fluoreto na dieta afeta negativamente a saúde humana na forma de fluorose óssea e dentária, aumento nas fraturas ósseas, diminuição na taxa de natalidade, aumento de urolitíase (cálculo renal), disfunções na tireóide e índices menores de inteligência em crianças (CHEN et al., 2013).

Foi detectada a correlação entre a ocorrência da fluorose dentária e a concentração de íons fluoreto em água para consumo, como também, a baixa incidência de cárie dentária nas mesmas regiões. Em 1958, foi reconhecida pela OMS a importância da fluoretação das águas de abastecimento, sendo implementada como medida de saúde pública. Em 1975 a OMS desenvolveu um programa para fluoretação de águas de abastecimento, com aprovação por unanimidade dos 148 países membros (RAMIRES, 2007).

A cárie dentária é uma doença crônica, que atinge todas as faixas etárias, resultante da dissolução mineral dos tecidos dentários por ácidos produzidos no metabolismo de carboidratos, em especial a sacarose (ALVES, 2008). O açúcar

disponível eleva a acidez localizada, ocorrendo a dissolução do fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) das superfícies estruturais do esmalte dental, liberando-o no meio bucal. O avanço na perda mineral acarreta a formação de cavidades que em casos mais graves, podendo levar a destruição da coroa dentária (NARVAI, 2000). A Figura 1 mostra uma cavidade bucal com severa cárie dentária.

Figura 1. Aspecto clínico da cavidade bucal em crianças com cárie severa



Fonte: LOSSO et al., (2009).

A adição de fluoreto em águas para abastecimento público é um método eficaz e seguro para prevenção da cárie dentária, além do ótimo custo benefício de aproximadamente US\$ 0,03 por pessoa/ano na cidade de São Paulo, Brasil. A fluoretação de águas de abastecimento, é considerada um dos dez maiores avanços na Saúde Pública no século XX nos Estados Unidos (PANIZZI, 2008).

Santos et al. (2012) relatam que de forma geral, há diferenças marcantes em relação ao índice de cárie em crianças de até 12 anos, residentes em municípios com e sem adição de fluoreto em águas de abastecimento, havendo uma melhor condição para as cidades com fluoretação (SANTOS et al., 2012).

A importância da avaliação e manutenção da concentração de íons fluoreto em água de abastecimento em nível adequado é muito importante, sendo encontrado

diversos trabalhos na literatura sobre o heterocontrole em diferentes regiões brasileiras (VILLENA et al., 1996; MOURA et al., 2016; PIRES et al., 2002; SANTOS; SANTOS, 2011).

Alguns programas de saúde bucal coletiva se popularizaram com a distribuição de géis fluoretados, que apresentam uma boa relação custo-benefício e facilidade de manipulação, principalmente onde a população de crianças com idade superior a 6 anos, formam o grupo de maior risco à cárie. É contraindicado para gestantes a utilização de suplementos contendo fluoreto, uma vez que não há comprovação científica dos benefícios gerados ao bebê (CASCAES et al., 2012).

O creme dental fluoretado é responsável por ótimos índices de redução na incidência de cáries durante as últimas décadas. Entretanto, seu uso também pode acarretar o desenvolvimento da fluorose dentária, com riscos mais elevados para crianças menores de 6 anos (OMENA et al., 2006).

Os índices de fluorose dentária estão seguindo um padrão inverso ao da cárie, com taxas aumentando significativamente, manifestando-se principalmente nas formas leve e muito leve, observadas em comunidades com e sem águas de abastecimento fluoretadas (CARVALHO et al., 2009). A Figura 2 apresenta a imagem de um paciente com fluorose dentária constatada.

Figura 2. Dentes de paciente com fluorose dentária, aparência marrom e esmalte comprometido.



Fonte: GUPTA et al., (2016).

A fluorose dentária é uma complicação que afeta o germe dentário durante a formação devido ao consumo de concentrações elevadas de íons fluoreto. A fluorose dentária acarreta na desmineralização do esmalte, e pode ser classificada como fluorose simples, fluorose opaca e fluorose combinada com porosidade. As lesões são proporcionais às quantidades consumidas, duração da exposição, causando desde alterações na pigmentação dos dentes em tons de marrom com manchas brancas, até o esmalte dental tornar-se poroso e altamente manchado (GONÇALVES et al., 2013).

A fluorose óssea é causada pela exposição crônica aos íons fluoreto, onde ocorre um aumento da densidade do osso e calcificação de ligamentos. A reabsorção óssea é aumentada junto à formação óssea, podendo agravar a situação ao estado de osteonecrose (MEDEIROS et al., 2014).

São relatadas também alterações no metabolismo em tecidos moles como a tireóide, órgãos reprodutores, cérebro, fígado e rins. Os íons fluoreto causam aumento nos hormônios estimulantes da glândula tireóide e hipotireoidismo em algumas populações. Estudos na China apontam níveis inferiores na capacidade mental e no Quociente de Inteligência (QI) em crianças nascidas e criadas em áreas endêmicas em relatos de fluorose (RUIZ-PAYNAN et al., 2005).

2.1.3 LEGISLAÇÃO

De acordo com o *Guideline for Drinking-Water Quality* publicado pela OMS (2001), a faixa adequada para concentração de fluoreto é de 0,5 mg L⁻¹ a 1,5 mg L⁻¹. A OMS adverte que a concentração entre 0,9 e 1,2 mg L⁻¹ pode acarretar em efeitos como a fluorose óssea e dentária, dependendo das exposições por outras fontes de ingestão. É reconhecido pela OMS que o índice de 1,5 mg L⁻¹ precisa ser revisado, e uma concentração mais segura é de 0,5 a 1,0 mg L⁻¹ (OMS, 2011).

No Brasil, a Lei Federal n.º 6.050 de 24 de maio de 1974, que dispõe sobre a fluoretação da água em sistemas de abastecimento quando existir estação de tratamento, foi regulamentada por meio do decreto n.º 76.872 em 22 de dezembro de 1975. A portaria n.º 635/Bsb, de 26 de dezembro de 1975, no Diário Oficial da União de 30/01/76, aprova as normas e padrões sobre a fluoretação de água dos sistemas

públicos de abastecimento destinada ao consumo humano. A concentração de fluoreto recomendada varia entre o mínimo de $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ e o ótimo de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$, dependendo da média das temperaturas máximas diárias (Brasil, 1975).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais, como também das condições e padrões de lançamentos de efluentes, por meio da Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005. A concentração de fluoreto máxima permitida em água doce (classe 1) é $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ (Brasil, 2005).

Em 12 de dezembro de 2011, o Ministério da Saúde por meio da Portaria n.º 2.914, dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de portabilidade. O valor máximo permitido é de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Brasil, 2011).

2.2 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE FLUORETO

Muitas técnicas são propostas para a determinação de fluoretos em águas, potenciometria (ANTES et al., 2012;), espectroscopia de fluorescência (MATSUNAGA et al., 2006; CHAVALI et al., 2015; WU et al., 2016), cromatografia (KWON et al., 2014; DAREI et al., 2015; MARAVER et al., 2014) e espectroscopia visível (SAHIN et al., 2016; PARTHIBAN et al., 2015; PARHAM et al., 2009; KIM et al., 2015).

O *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005), propõe os seguintes métodos para determinação de íons fluoreto em amostras de água: cromatografia iônica, eletroforese capilar iônica, eletrodo íons seletivo para fluoreto (ISEF), métodos colorimétricos de SPADNS e da Alizarina (APHA, 1999).

2.2.1 MÉTODO DO ELETRODO ÍON SELETIVO

O ISEF é um sensor para íons específicos, que funciona por um cristal de fluoreto de lantânio (LaF_3) dopado com fluoreto de európio EuF_2 . O cristal apresenta vacâncias devido à dopagem do cristal com EuF_2 , possibilitando uma resposta por meio do potencial, com os íons fluoretos livres nas amostras (RATOVVIC, 2009).

A membrana do eletrodo em contato com a solução de referência em uma das faces, e à outra solução contendo os íons fluoreto, tem o potencial estabilizado e aferido por meio de um medidor de pH na função potenciométrica, com valores

expressos em escala de milivolts (mV). O método potenciométrico que utiliza o ISEF é aplicado em uma faixa linear de 0,1 a 10,0 mg L⁻¹ e apresenta uma lista de interferentes de acordo com a Tabela 1 (APHA, 1999).

Tabela 1. Concentrações de substâncias interferentes para o método ISEF que causam um erro de 0,1 mg L⁻¹ em relação as amostras de referência com 1,0 mg L⁻¹ de fluoreto

Interferente	[Interferente] (mg L ⁻¹)	Tipo de Erro
Alcalinidade (CaCO ₃)	7 000	+
Alumínio (Al ³⁺)	3	-
Cloreto (Cl ⁻)	20 000	-
Ferro (Fe ³⁺)	200	-
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	50 000	-
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	50 000	-

Fonte: APHA, (1999).

A cela eletrolítica para o ISEF pode ser representada pela Equação 3.

$Ag|AgCl, Cl^- (3,0 \text{ mol L}^{-1}), F^- (0,001 \text{ mol L}^{-1})|LaF_3|solução \text{ teste}|eletrodo \text{ de referência} \quad Eq. (3)$

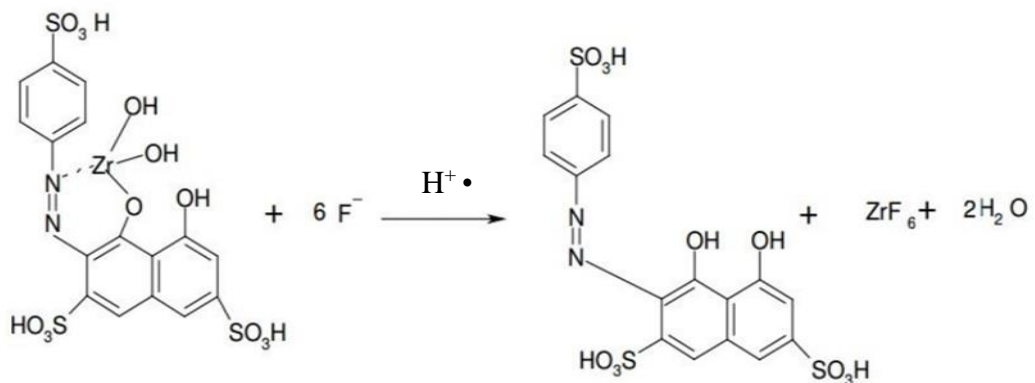
O ISEF não determina a concentração, mas sim a atividade dos íons fluoreto em solução. A concentração de íons fluoreto é determinada por meio do coeficiente de atividade da solução, que é dependente da força iônica total, do pH e dos complexos de fluoreto formados (SHEN, 2016). Assim, é necessária a utilização de uma solução ajustadora para manter a força iônica constante e o pH em valores que evitem a formação de complexos com íons fluoreto (APHA, 2005).

2.2.2 MÉTODO SPADNS

Dos métodos colorimétricos citados para determinação da concentração de íons fluoreto em águas, o método SPADNS é o mais empregado, por apresentar menos interferentes, comparado à vários outros aplicados na determinação de íons fluoreto, e proporciona uma velocidade de reação mais rápida que o método da alizarina, isto é, sendo a cor produzida estável em um tempo menor para obtenção de

uma leitura espectrofotométrica satisfatória. Baseia-se na reação do íon fluoreto com íons zircônio presentes no reagente SPADNS (vermelho escuro) que leva a formação do complexo incolor hexafluorozirconato (IV) (ZrF_6^{2-}), conforme apresentado na Figura 3. A adição de fluoreto atenua a coloração da solução levando a uma tonalidade de vermelho mais claro na medida em que a concentração de fluoreto aumenta (FAWELL et al., 2006).

Figura 3. Reação do complexo Zr- SPADNS com os íons fluoreto



Fonte: SINGH; MAJUMDER, 2015.

O método SPADNS apresenta-se linear na faixa de 0,0 a 1,40 mg L⁻¹ e uma lista de interferentes, apresentada na Tabela 2. Os interferentes são avaliados nas quantidades necessárias para produzir um erro de 0,1 mg L⁻¹, em amostras com concentrações de 1,0 mg L⁻¹ de íons fluoreto. Em amostras turvas, possui a desvantagem exigir destilação.

Tabela 2. Concentrações de substâncias interferentes que causam um erro de 0,1 mg L⁻¹ em amostras com 1,0 mg L⁻¹ para o método SPADNS

Interferente	[Interferente] (mg L ⁻¹)	Tipo de Erro
Alcalinidade (CaCO ₃)	5 000	-
Alumínio (Al ³⁺)	0,1	-
Cloreto (Cl ⁻)	7 000	+
Ferro (Fe ³⁺)	10	-
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	16	+
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	200	-

Fonte: APHA, (1999).

2.3 ANÁLISE COLORIMÉTRICA

A variação de cor de um sistema, com a modificação da concentração de certo componente, constitui a base do que os químicos denominam análise colorimétrica. A cor é provocada por um composto corado, resultante da adição de um reagente apropriado, ou pode ser intrínseca ao constituinte analisado. A intensidade pode ser comparada com o que se obtém pelo tratamento idêntico de uma quantidade conhecida da substância (JEFREY et al., 1992).

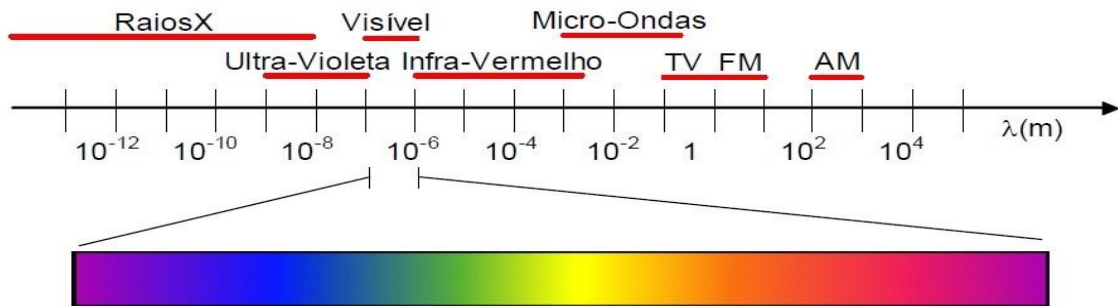
2.3.1 MODELO DE CORES

A colorimetria estuda e quantifica a forma com que o sistema visual humano percebe a cor, tentando transformá-las numericamente por meio de estímulos e especificações das funções contínuas dos parâmetros físicos, que definem a energia no espectro de luz. Newton descreveu a luz como uma emissão de partículas, que chamou de fótons, que se comportam como onda ou partícula, em diferentes situações (MORITZ, 2011).

Basicamente, as cores que os seres humanos percebem num objeto são determinadas pela natureza da luz refletida no objeto. A luz visível é composta de uma banda de frequências relativamente estreita no espectro eletromagnético. Um corpo que reflete a luz e é relativamente balanceado em todos os comprimentos de onda visíveis, aparece como branco para o observador. Entretanto, um corpo com maior refletância em uma variação limitada do espectro visível exibe alguns tons de cores (GONZALES, WOODS, 1992).

Como a luz pode ser caracterizada pela sua distribuição espectral, ela pode então ser modelada matematicamente por uma função unidimensional, que depende do comprimento de onda. Mas, quando o interesse diz respeito à cor, no sentido da sensação humana para diferentes espectros de luz, a definição de cor envolve uma característica perceptual da espécie humana. Até porque, é sabido que cada espécie, possui uma percepção de cor diferente (JEFREY et al., 1992). A Figura 4 apresenta o espectro eletromagnético com as faixas de comprimento de onda destacadas.

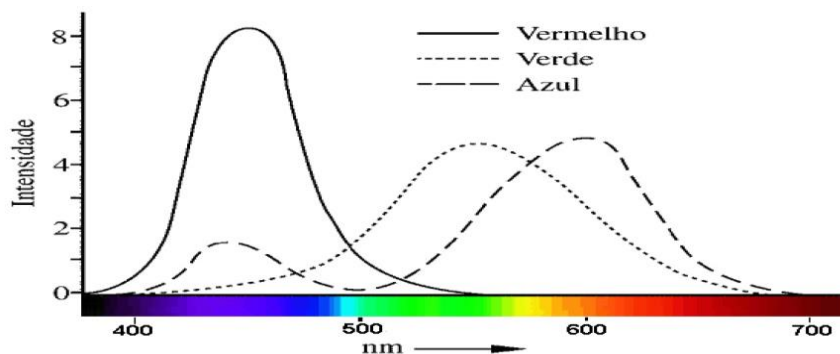
Figura 4. Comprimentos de onda do espectro eletromagnético



Fonte: SCURI, 1999.

A ciência que estuda cor do ponto de vista físico é chamada de colorimetria. A ciência que estuda a cor do ponto de vista perceptual é chamada de fotometria. Nós percebemos luz entre aproximadamente 380 nm e 780 nm. A luz de 380 nm a 500 nm parece azul, de 500 nm a 600 nm parece verde, e de 600 nm a 780 nm parece vermelho, como ilustrado na Figura 5 (FILHO, NETO, 1999).

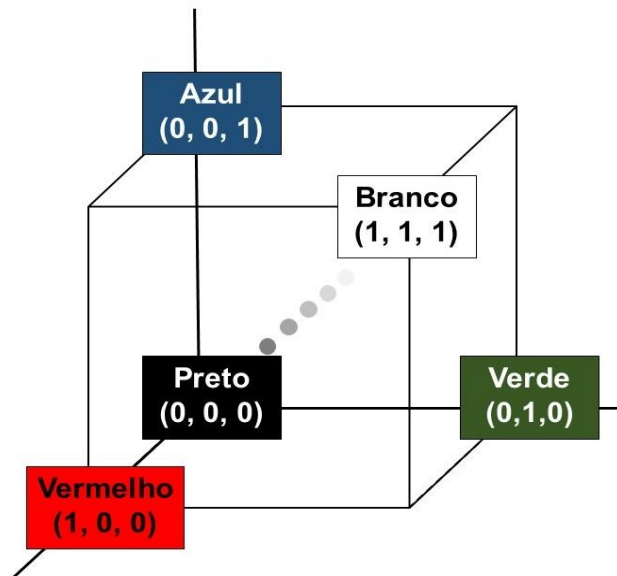
Figura 5. Espectro correspondente às cores vermelha, verde e azul



Fonte : Próprio autor, 2017.

O modelo de cores RGB (R - vermelho; G - verde; B - azul) para formação de uma cor usa um sistema de coordenadas cartesianas cujo subespaço de interesse é um cubo (Figura 6). Na origem (0, 0, 0) localiza-se a cor preta e quando todas as bandas alcançam o seu valor máximo (255, 255, 255) tem-se a cor branca. Na diagonal que liga a origem com o ponto máximo situam-se os níveis de cinza. As cores (bandas) primárias vermelha, verde e azul são aditivas, isto é, sua contribuição individual é somada para formar a cor resultante (SOUZA et al., 2004).

Figura 6. Cubo RGB normalizado (RGB/255) com as cores primárias nos eixos principais



Fonte: Próprio autor, 2017.

Outros modelos como o CMYK (Ciano – Magenta – Yellow - Black) e HSI (Hue, Saturation, Intensity) possuem a vantagem de desacoplar as cores e a escala cinza em uma mesma imagem (ACHARYA, RAY, 2005).

2.3.2 BRILHO E CROMATICIDADE

A caracterização da luz é essencial para a ciência das cores. Se a luz for acromática (ausência de cores), seu único atributo será a intensidade, ou quantidade. O nível de cinza em uma imagem refere-se a uma medida escalar de intensidade que varia do preto aos tons de cinza chegando ao branco (GONZALES; WOODS, 1992).

Segundo Gonzalez e Woods (1992), as características normalmente usadas para distinguir uma cor da outra são brilho, matiz e saturação.

- **Brilho:** é um fator subjetivo praticamente impossível de ser medido. Ele incorpora a noção acromática de intensidade, sendo um dos fatores chave da descrição da sensação das cores.
- **Matiz:** atributo associado com o comprimento de onda dominante em uma mistura de ondas de luz. Dessa forma, o matiz representa a cor dominante, como percebida por um observador.

- **Saturação:** refere-se à pureza relativa, ou, quantidade de luz branca misturada com um matiz. As cores do espectro puro são completamente saturadas.

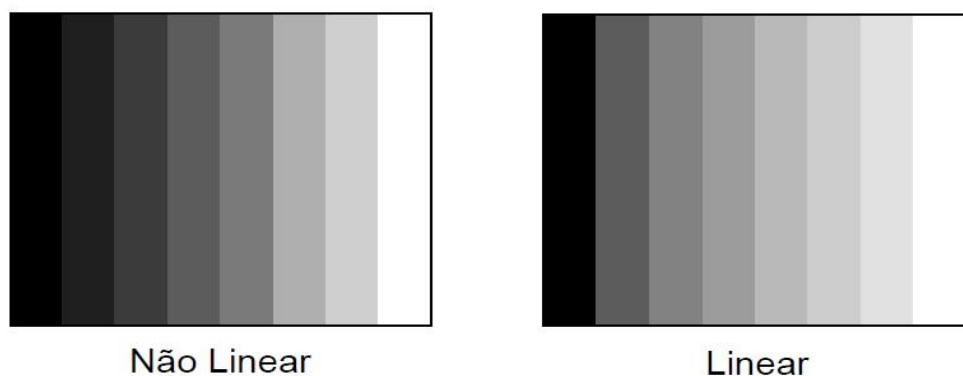
O matiz e a saturação, quando tomados conjuntamente, são denominados cromaticidade e, portanto, uma cor pode ser caracterizada pelo seu brilho e cromaticidade.

2.3.3 CORREÇÃO GAMA

Um outro aspecto interessante sobre o brilho é que embora este varie de acordo com as condições de iluminação, o olho possui uma capacidade enorme de se adaptar a essas variações. É uma mudança na escala de percepção para poder captar o máximo de detalhes com a luminosidade disponível. De um outro ponto de vista podemos dizer que o olho está se “adaptando ao branco”, ou seja a percepção de branco é dependente das condições de visualização (SCURI, 2002).

O olho humano não responde linearmente à intensidade de cor emitida, acarretando em uma distorção na escala de tons percebida pelo olho em determinados casos, ou seja, a gama de tons percebida não corresponde a variações equivalentes de intensidade. A Correção Gama pode compensar esse problema, aplicando uma função inversa à resposta do olho para obter uma escala linear percebida (SCURI, 1999). Podemos observar as duas situações na Figura 7.

Figura 7. Correção Gama



Fonte: SCURI, 1999.

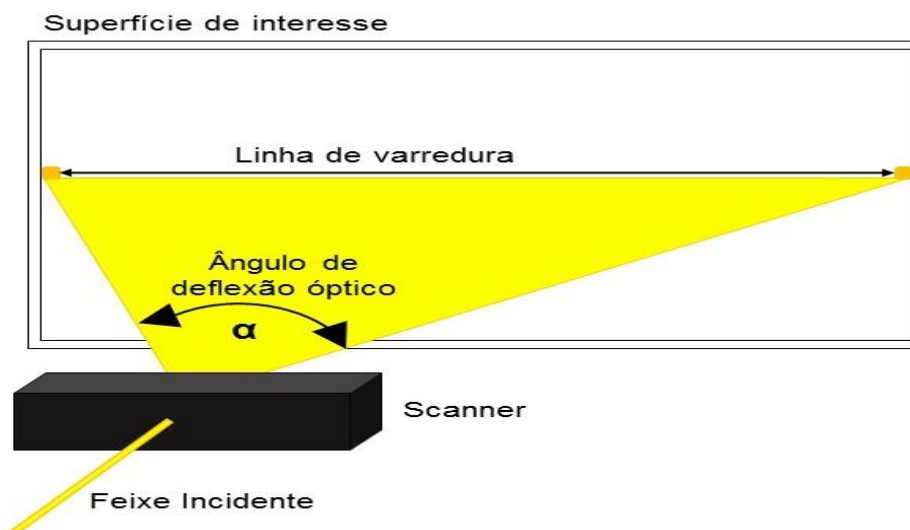
2.3.4 USO DE SCANNER NA CAPTURA DE IMAGENS

O *scanners* são dispositivos para captura de imagens que possuem alta resolução, podendo reproduzir diversos tipos de superfícies. Os *scanners* utilizam o modelo de cor RGB, dispondo de uma fonte de luz em forma de linha que faz uma varredura por toda a região de interesse, e um conjunto de foto-detectores que convertem a luz emitida captada, em sinal elétrico (SCURI, 1999).

Os *scanners* funcionam por meio de Dispositivos de Carga Acoplada (*CCD – Charge-Coupled Device*) com sensores lineares, que são matrizes com elementos fotossensíveis dispostos em uma linha de alta resolução. As informações luminosas das imagens são convertidas em sinais elétricos através do tempo de deslocamento da linha de varredura em relação à superfície de interesse. Sensores de imagens coloridas utilizam três sensores monocromáticos para captar as cores primárias RGB, que são combinadas matematicamente para gerar o sinal de luminância, responsável pela cor (FILHO, NETO, 1999).

A Figura 8 apresenta esquematicamente a função de um *scanner*, no qual um feixe luminoso puntual incidente é defletido em um ângulo variante com o tempo, $\alpha(t)$, a uma velocidade $v(t)$. A partir desta deflexão forma-se um padrão luminoso no plano de trabalho.

Figura 8. Um ponto luminoso é convertido em uma linha de varredura pela ação de um *scanner*



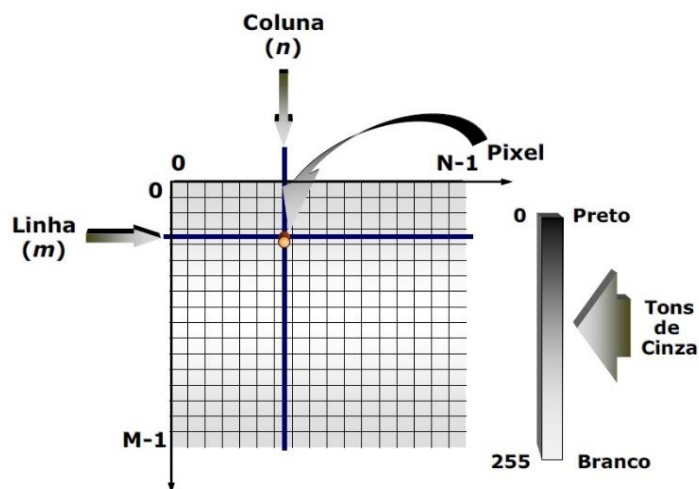
Fonte: Próprio autor, 2017.

A escolha dos DPI (*dots per inch*) a serem utilizadas é o fator mais crítico no uso do *scanner*. Para análise científica, onde o objetivo é obter medidas na imagem, a resolução vai indicar a precisão dos valores que se deseja obter no espaço da imagem. Esta precisão indicará a menor distância entre dois *pixels*, o que por consequência ditará os DPI (SCURI, 1999).

2.3.5 IMAGEM DIGITALIZADA

Uma imagem monocromática pode ser descrita matematicamente por uma função bidimensional da intensidade luminosa $f(x,y)$, com o valor em qualquer ponto de coordenadas espaciais (x,y) , proporcional ao brilho da imagem naquele ponto. Cada ponto na coordenada espacial é denominado de *pixel* ou elemento de imagem (QUEIROZ; GOMES, 2001). A Figura 9 representa uma imagem formada no plano bidimensional.

Figura 9. Representação bidimensional de uma imagem



Fonte: QUEIROZ; GOMES, 2001.

A função $f(x,y)$ representa o produto da interação entre a iluminância $i(x,y)$, que exprime a quantidade de luz que incidente sobre o objeto, e refletância, representada pela função $r(x,y)$, associada a fração de luz incidente que o objeto refletirá no ponto (x,y) (QUEIROZ; GOMES, 2001).

Estes conceitos estão ilustrados na Equação 4, onde $0 < i(x,y) < \infty$ e $0 < r(x,y) < 1$.

$$f(x,y) = i(x,y) \cdot r(x,y) \quad \text{Eq. (4)}$$

O sinal analógico de vídeo obtido pelo dispositivo de aquisição deve ser submetido a uma discretização espacial (amostragem), e também dos valores de brilho (quantização). Basicamente, a amostragem converte a imagem analógica em uma matriz de M por N pixel, como mostra a Equação 5 (QUEIROZ; GOMES, 2001).

$$\begin{pmatrix} f(0,0) & f(0,1) & f(0,2) & \cdots & f(0,N-1) \\ f(1,0) & f(1,1) & f(1,2) & \cdots & f(1,N-1) \\ f(2,0) & f(2,1) & f(2,2) & \cdots & f(2,N-1) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ f(M-1,0) & f(M-1,1) & f(M-1,2) & \cdots & f(M-1,N-1) \end{pmatrix} \quad \text{Eq. (5)}$$

Ao ser digitalizada a imagem assume um tamanho adimensional, em *pixels*. Conhecendo o tamanho real da imagem e o número de pixels, podemos determinar a resolução da imagem, que utiliza a unidade de medida DPI. As imagens das telas de computadores são criadas no formato BMP (BITMAP – mapa de bits), e portanto, são mais facilmente gravadas do mesmo modo. As imagens BMP também são utilizadas para reprodução em impressoras, cujo método de formação de imagens é semelhante ao de varredura dos monitores de vídeos. Um dos problemas práticos existentes é o tamanho da imagem, que pode demandar vários megabytes para armazenamento e processamento, no caso de uma imagem colorida de alta resolução (FILHO, NETO, 1999).

O modelo JPEG (*Joint Photographic Experts Group*) é o primeiro tipo de arquivo padrão para compressão de imagens de diversos tamanhos. Este modelo oferece a maior taxa de compressão existente para imagens fotográficas através de *hardware* e *software* específico (ACHARYA; RAY, 2005).

2.4 QUIMIOMETRIA

A utilização de computadores para análises químicas aumentou a quantidade de informações e variáveis que podem ser analisadas em uma única amostra. A quimiometria procura resolver problemas de interesse químico por meio de ferramentas de trabalho provenientes da computação, estatística e matemática visando planejar e otimizar experimentos (FERREIRA et al., 1999).

A calibração de um método ocorre primeiramente por uma etapa descritiva, destinada a construir um modelo que relacione as espécies de interesse com as

grandezas aferidas. Por conseguinte, uma etapa preditiva, utiliza o modelo elaborado para determinar as concentrações de amostras por meio dos sinais analíticos respectivos (PIMENTEL; NETO, 1996).

Os planejamentos fatoriais são utilizados para estudo das variáveis independentes e a seleção do planejamento depende do objetivo do pesquisador e etapa do trabalho. Para um estudo inicial, planejamentos fracionados são empregados na triagem de variáveis que mais interferem na resposta. As avaliações quantitativas para a influência das variáveis, são mais bem exploradas por planejamentos fatoriais completos em dois níveis, que descrevem o modelo pelo método dos mínimos quadrados (BREITKREITZ; SOUZA; POPPI, 2013).

Se o experimento requerer um modelo mais robusto, o Planejamento Composto Central (*Central Composite Design* - CCD) é indicado, pois permite o cálculo dos coeficientes quadráticos. O CCD otimiza e determina a função estabelecida entre as variáveis que mais interferem na resposta, possibilitando a obtenção de valores que irão produzir o melhor resultado experimental (Souza et al., 2015).

2.5 APLICAÇÕES ANALÍTICAS POR ANÁLISE DE IMAGENS DIGITAIS

A AID é uma metodologia de ampla aplicação, rápida, de baixo custo, que possui diferentes dispositivos de aquisição como câmera digital, *scanner*, *webcam* e câmera de dispositivos móveis (GRASEL et al., 2016). As análises univariada e multivariada associada à AID, tem se tornado mais interessantes devido a evolução dos dispositivos de captura, que podem ser aplicados em diferentes campos da ciência e tecnologia (FERNÁNDEZ-OLIVERASPOZO, RUBIÑO, 2013).

São encontrados trabalhos sobre aplicações de imagens digitais em diversas áreas como alimentos, engenharia, farmacêuticas, agricultura, ciências forenses e como uma frente de estudo bastante promissora na área de química, devido aos constantes avanços tecnológicos dos *hardwares* e *softwares* de aquisição e tratamento de imagens digitais (SARRAFZADEH et al., 2015; HAMAD et al., 2007; GODOY et al., 2007; CREMON et al., 2009; THANAKIATKRAI et al., 2013).

Momeni e colaboradores (1999) utilizaram uma câmera com dispositivo de carga acoplada (CCD) como sistema detector em capilares para proteínas de ligação do retinol por quimiluminescência. O registro da quimiluminescência no ensaio foi

realizado em função de vários fatores, como a concentração de analito no substrato, a cinética de atenuação da luz envolvida entre o emissor de espécies, a distância entre o capilar e a câmera, bem como, o período de exposição do capilar à câmera (MONEMI et al., 1999).

Maleki e colaboradores desenvolveram um modelo para determinação simultânea de Al (III) e Fe (III) em ligas de cromo utilizando azulol S como reagente cromogênico e uma câmera CCD como detector. Tanto o Al (III) como o Fe (III) foram determinados na faixa de concentração de 0,25 a 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ com precisão e exatidão (MALEKI et al., 2004).

Huang e Zhang (2008) analisaram o espectro de cores nos modelos RGB e HSV das imagens da chama do metano em diferentes condições de queima utilizando uma câmera convencional. Resultados apresentaram que cada chama tem as próprias características nos modelos RGB e HSV. Foi demonstrado também que as imagens das chamas podem ser utilizadas para análise no espectro visível e também no infravermelho (HUANG, ZHANG, 2008).

Kompany-Zareh e colaboradores (2002) propuseram um método simples e rápido para determinação colorimétrica de Fe (III) utilizando um *scanner* de mão. Foram avaliados os parâmetros *pixels* por polegada, brilho, contraste e correção gama variando simultaneamente. Foi construída uma curva analítica da intensidade observada em escala RGB por concentração de Fe (III), variando de 6,0 a 45,0 mmol L^{-1} de Fe (III). De acordo com os autores, o método foi aplicado com sucesso e os resultados comprovam a exatidão, precisão, rapidez e baixo custo para as análises colorimétricas (KOMPANY-ZAREH et al., 2002).

Shishkin e colaboradores (2004) publicaram um trabalho propondo um novo método para estimar a intensidade luminosa na escala de cores RGB em função da concentração de diferentes compostos por meio da análise de imagens digitais em *scanner* de mesa. Foi estudada a intensidade em função da concentração para os íons nitrito, ácido salicílico, ácido gálico, dodecilsulfato de sódio, ácido 4-hidroxibenzóico e cobalto. As escalas de cores foram obtidas utilizando o *software* Adobe Photoshop 7.0 e os dados foram tratados pelo *software* Oringin 6.0. Os resultados confirmaram que a dependência da luminosidade com a concentração é descrita por um decaimento exponencial de 1ª ordem (SHISHKIN et al., 2004).

Godinho e colaboradores (2008) desenvolveram um método de caracterização de amostras de refrigerante com base na cor, utilizando análise de

componentes principais das imagens (*PCA – Principal Components Analysis*) dos refrigerantes obtidas em um *scanner* comum. As amostras de refrigerantes foram classificadas pelas suas imagens, e os resultados obtidos pela classificação das PCA podem ser correlacionadas com os resultados de teor de sacarose, de ácido sórbico e o pH (GODINHO et al., 2008).

Gomes e colaboradores (2008) propuseram um método para determinação de ácido ascórbico em medicamentos utilizando um *scanner* de mesa para aquisição das imagens. Imagens digitalizadas da amostra foram convertidas numericamente utilizando o modelo de cores RGB. Por meio do método proposto foi possível a determinação de ácido ascórbico em 11 soluções simultaneamente. Os resultados obtidos estavam de acordo com a metodologia espectrofotométrica convencional (GOMES et al., 2008).

Feng e colaboradores (2012) propuseram um método baseado na fluorescência e colorimetria para determinação de íons Cu^{2+} utilizando um *scanner* de mesa e uma câmera como dispositivo para aquisição de imagens. A AID foi avaliada em função das intensidade no modelo RGB, e o método proposto apresentou boa sensibilidade as variações de cores na faixa de 20,0 a 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (FENG et al., 2012).

Santos e Pereira-filho (2013) utilizaram AID como método alternativo para identificação de leite adulterado. Foi utilizado um *scanner* de mesa como dispositivo de aquisição das imagens e foram avaliados os parâmetros de informações da imagem, vermelho, verde, azul, saturação e matiz. Foram utilizados os métodos de regressão dos mínimos quadrados parciais e análise dos componetes principais. Os resultados obtidos foram comparados com metodologia de referência espectrofotométrica, não apresentando diferença em nível de confiança de 95%. O método se apresenta como uma alternativa aos métodos tradicionais (SANTOS, PEREIRA-FILHO, 2013).

Morais e Lima (2014) utilizaram AID por *scanner* de mesa como dispositivo de aquisição da imagem de uma microplaca para análise simultânea de glucose, creatina, triglicérides, colesterol total e proteínas totais em amostra de sangue. Os resultados mostraram que a AID pode ser uma metodologia alternativa para ensaios bioquímicos, apresentando vantagens na redução da quantidade de reagentes utilizados, redução dos custos em relação aos métodos espectrofotométricos e, execução de quantidade de análises simultâneas (MORAIS, LIMA, 2014).

Damasceno e colaboradores (2015) aplicaram a análise multivariada de imagens (*MIA – Multivariate Image Analysis*) utilizando um *scanner* de mesa para determinar o pH de água de consumo com o azul de bromotimol como indicador de pH e reagente cromogênico. Foi utilizado PLS (*Partial Least Squares*) como método de calibração multivariada. O tratamento computacional dos dados multivariados e obtenção das informações das imagens foram realizados pelo *software* livre GNU Octave. O modelo MIA-PLS gerado a partir de imagens digitais de soluções aquosas para determinação do pH da água de consumo mostrou-se analiticamente equivalente à metodologia convencional de medição com um pHmetro (DAMASCENO et al., 2015).

Wongwilai e colaboradores (2010) utilizaram uma *webcam* como detector de baixo custo em um reator *lab-made* para determinar a neutralização ácido-base entre ácido acético e hidróxido de sódio, com fenoftaleína como indicador. A metodologia se apresentou eficiente para determinação de viragem (WONGWILAI et al., 2010).

Tôrres e colaboradores (2011) propuseram um método para AID que utiliza uma *webcam* para a determinação da acidez de vinhos tinto por titulação sem uso de indicador externo. Foram levantadas curvas de titulação baseadas nas intensidades RGB para determinação do ponto final pelo método da segunda derivada. Os resultados obtidos foram comparados como metodologia de referência que utiliza a titulação potenciométrica com solução padronizada de NaOH, e não foram observadas diferenças em nível de 95% de confiança. O método proposto apresentou resultados mais precisos que o da metodologia de referência (TÔRRES et al., 2011).

Lima e colaboradores (2013) propuseram pela primeira vez uma metodologia que utiliza a análise de imagens digitais, utilizando o modelo de cores RGB, adquiridas de uma *webcam* com sensor CCD acoplada a um micro analisador *lab-made*, utilizando resina de uretano-acrilato, de fluxo descontínuo. A metodologia estudada foi comparada à de referência espectrofotométrica e os resultados não apresentaram diferença em nível de confiança de 95% (LIMA et al., 2013).

Masawat e colaboradores (2015) desenvolveram um colorímetro de imagem digital por *iphone* como uma ferramenta portátil para determinação de tetraciclina em leite bovino. Foi desenvolvido um aplicativo de nome *ColorConc* para a plataforma do *iphone* utilizando algoritmos da imagem para determinar a concentração. Foram medidos os parâmetros de cor R, G, B, matiz, saturação, brilho e cinza para cada solução padrão (MASAWAT et al., 2015).

Morais e Lima (2015) utilizaram um *scanner* de mesa e uma câmera de celular para determinar a concentração de creatina em amostras de soro. Foi realizada AID nos modelos RGB, HSV e intensidade de cinza pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados obtidos para ambos os dispositivos não apresentaram diferença significativa em nível de confiança de 95% em relação ao método de referência espectrofotométrico (MORAIS, LIMA, 2015).

3. OBJETIVOS GERAIS

O trabalho teve como objetivo o desenvolvimento, otimização e validação de um método colorimétrico alternativo para determinação simultânea em 96 poços, com redução de volume dos reagentes tóxicos, baixo custo, fácil operação, rápido e eficaz, aplicado para determinação da concentração de íons fluoreto em águas utilizando o método SPADNS através da análise de imagens digitais (AID) por *scanner* (DIAScanner-SPADNS-RGB), comparado a um espectrofotômetro UV/Vis comercial (Vis-SPADNS) e um eletrodo íons seletivo de fluoreto (*ISEF - Ion Selective Electrode of Fluoride*).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um sistema para aquisição de imagens digitais via *scanner* de mesa na posição invertida empregando uma placa elisa com 96 poços contendo as amostras;
- Estudar e definir as condições instrumentais e analíticas adequadas para a aplicação da técnica espectrofotométrica ao método DIAScanner-SPADNS-RGB para quantificação de íons fluoreto em águas empregando AID;
- Otimizar a resposta do DIAScanner-SPADNS-RGB utilizando o planejamento experimental;
- Avaliar o efeito de possíveis interferentes na determinação da concentração de íons fluoreto em água;
- Validar o método DIAScanner-SPADNS-RGB proposto;
- Validar o *software* QuantColour frente ao *software* Excel®;
- Aplicar o método DIAScanner-SPADNS-RGB proposto na quantificação de íons fluoreto em água;
- Avaliar a quantificação de íons fluoreto em águas por AID em formatos imagem JPEG e BMP;

4. HARDWARE E SOFTWARE

4.1 MICROCOMPUTADOR

Foi utilizado um microcomputador equipado com processador Intel Core 2 Quad Q6600 (2,40 GHz), memória RAM de 4 GB DDR2, placa de vídeo NVIDIA GeForce GT 430, monitor LG Flatron M228WA-BM. A resolução da tela foi de 1024 por 768 pixel e qualidade de cor máxima de 32 bits.

4.2 SCANNER

O *scanner* CanoScan FB 330P, responsável pela aquisição das imagens digitalizadas foi interfaciado ao microcomputador através da porta paralela. O *software* utilizado para escanear as imagens foi o CanoCraft CS-P (versão 3.7) e a resolução do scanner foi de 300 DPI. O tipo de scannerização foi de 24 bits, onde cada um dos *pixels* pode assumir qualquer uma das 16 milhões de cores. Os arquivos foram armazenados em formato BMP, que não utilizam nenhum esquema de compressão de imagem. Desse modo, apesar dos arquivos gerados serem muito grandes, o formato BMP fornece informações precisas sobre cada *pixel* e cores.

4.3 IRFANVIEW

O IrfanView® (Versão 4.18) é um *software* de plataforma livre para visualização e edição de imagens. O *software* é de fácil utilização e compacto para uso não comercial. As imagens capturadas pelo *scanner* no formato BMP, foram editadas com correções de cor para brilho, contraste, gama e saturação.

Através do programa IrfanView as imagens digitalizadas foram convertidas para o formato JPEG. Optou-se em salvar os arquivos no formato JPEG em qualidade de imagem de 80%, visando uma diminuição no tamanho do arquivo com menor perda de qualidade.

4.4 EXCEL®

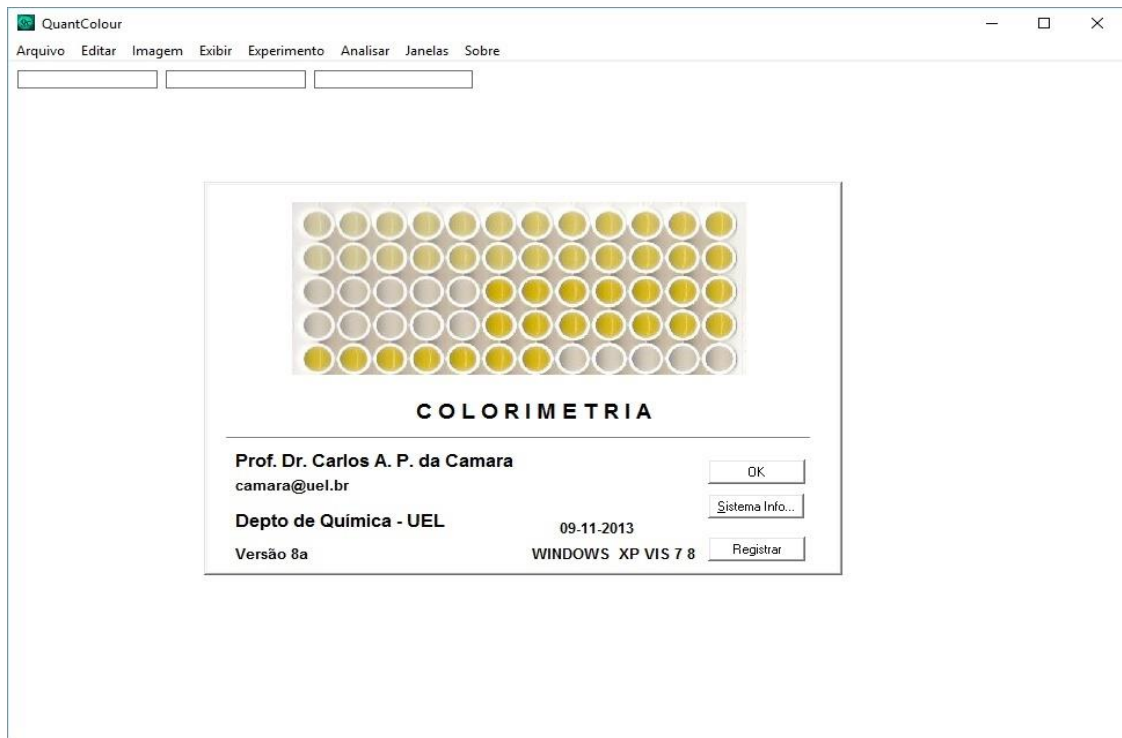
O Excel® (Versão 15.0.4569.1506) foi o *software* escolhido para elaboração e edição de planilhas, é desenvolvido pela Microsoft, pertencente ao pacote Microsoft Office, que utiliza o sistema operacional Microsoft Windows, além de outras

plataformas para diferentes dispositivos. O Excel possibilita a construção de planilhas de cálculos com fórmulas complexas, assim, representar os dados em forma de gráficos diversos.

4.5 QUANTCOLOUR

A AID foi realizada utilizando o *software* “lab-made” denominado QuantColour (Figura 10) desenvolvido pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara em linguagem Microsoft Visual Basic® 6.0 que trabalha em ambiente multitarefa Windows XP/Vis/7/8/10 (32 bits).

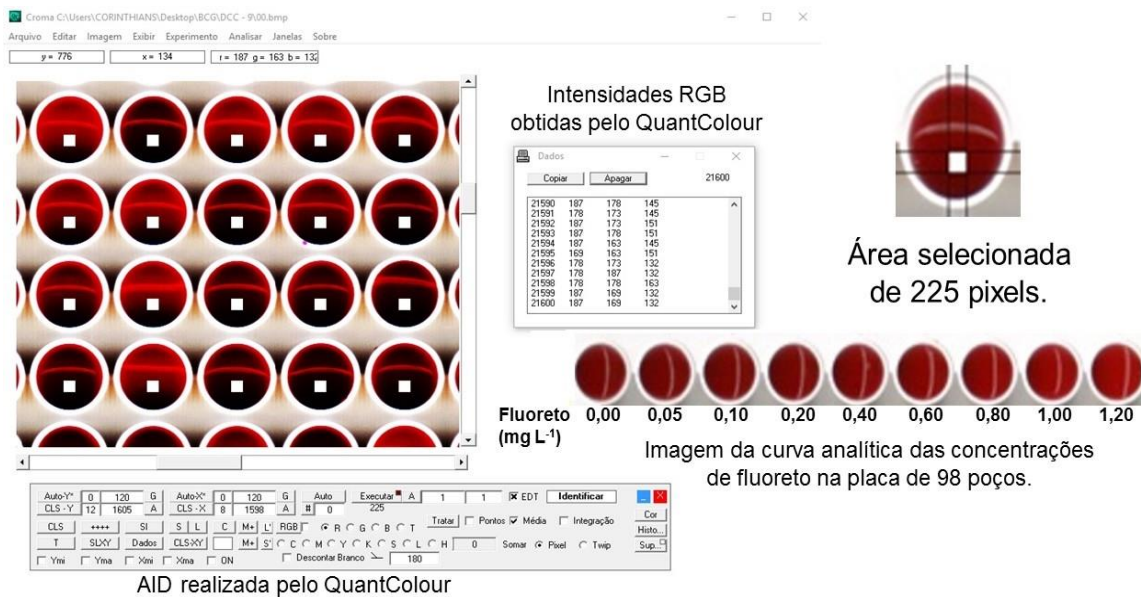
Figura 10. Imagem da tela de iniciação do *software* QuantColour



Fonte: Próprio autor, 2017.

O *software* QuantColour analisa a imagem digitalizada contendo as soluções em uma janela gráfica. São selecionadas áreas de 225 *pixels*, onde são identificadas em cada área, as médias das intensidades de cores primárias RGB, como apresentado na Figura 11. A determinação das concentrações nas amostras é realizada pela técnica proposta pelo prof. Camara de regressão linear múltipla.

Figura 11. Janela gráfica do software QuantColour mostrando a área de seleção utilizada para AID por meio dos valores das intensidades RGB mensuradas



Fonte: Próprio autor, 2017.

A regressão linear múltipla é uma técnica multivariada utilizada com a finalidade principal de se obter uma relação matemática entre uma das variáveis (dependente) e o restante das variáveis (independentes) que descrevem o sistema. A principal aplicação, após encontrar a relação matemática, é produzir valores para a variável dependente quando se têm as variáveis independentes (HAIR Jr., 2005).

Deve-se ressaltar que o programa permite a transferência direta dos dados experimentais para a planilha eletrônica Microsoft Excel® para tratamentos posteriores (correlação, análise da variância, regressão linear, ajuste não linear, etc).

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ cm a 25 °C) utilizada nas análises foi obtida por meio do sistema Simplicity 125 (Millipore, Billerica, USA).

5.1.1 PADRÃO FLUORETO

Para a construção da curva foi utilizada uma solução padrão (SP) de íons fluoreto na concentração de 1000,0 mg L⁻¹ com certificado de análise (ISEF1000-500, NIST Test # 822/275197-07, Fluoreto (F⁻) 1000 mg L⁻¹; solução padrão para eletrodos de íons seletivo (ISE), Specsol[®], Quimlab, Jacareí, SP, BR). Diluindo-se 1,0 mL de SP em balão volumétrico de 50,0 mL em água ultrapura, foi preparada uma solução estoque (SE) na concentração de 20,0 mg L⁻¹. A partir de SE foram realizadas as diluições para a construção da curva analítica nas concentrações de 0,00; 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60 0,80; 1,00 e 1,20 mg L⁻¹ de fluoreto. Foram preparadas SE para cada análise realizada em todos os dias.

5.1.2 SPADNS

Foi utilizada a solução reagente SPADNS (SpecSol[®], Jacareí, SP, BR). De acordo com as especificações, o reagente SPADNS é composto por ácido clorídrico (10,0 a 15,0 %, v/v), SPADNS (0,1 a 0,2 %, m/v), oxicloreto de zircônio (0,01 a 0,02 %, m/v) e arsenito de sódio (0,1 a 0,2 %, m/v).

5.1.3 TISAB

A solução tampão TISAB (*Total Ionic Strength Adjustment Buffer*) é adicionada para manter os valores de pH, evitar a variação da força iônica e a formação de complexos com íons fluoreto, na determinação por ISEF. A solução TISAB foi preparada por dissolução de 57,0 mL de ácido acético glacial (Synth), 58,0 g de cloreto de sódio (Cinética) e 0,375 g de citrato de sódio tribásico (Cinética) em água ultrapura, diluindo a mistura para aproximadamente 980,0 mL. Foi adicionado hidróxido de sódio lentamente até a estabilização do pH da solução em 5,0. Foi

transferida a solução para um balão volumétrico de 1,0 L, e aferido com H₂O ultrapura até o menisco (APHA, 1999).


5.1.4 AMOSTRAS DE ÁGUA

Foram analisadas amostras de águas minerais comercializadas em Londrina-PR, e amostras de águas de abastecimento.

5.2 ESPECTROFOTÔMETRO (Vis-SPADNS)

As determinações espectrofotométricas nas amostras de íons fluoreto em águas pelo método SPADNS foram realizadas em espectrofotômetro UV Mini 1240 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japan), equipado com uma cubeta de vidro ótico (Navelab, caminho ótico de 10 mm e volume 3,5 mL, Curitiba, PR) (Figura 12).

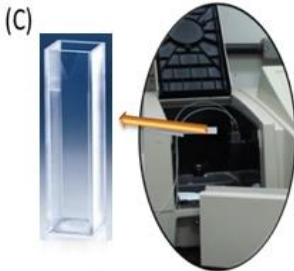
Figura 12. (A) Espectrofotometro UVMini-1240; (B) Especificações de *hardware*; (C) Cubeta de vidro ótico

(A) 

(B) Specifications

Hardware Specifications

Optical Design	Wavelength range	190.0 to 1100.0 nm
	Display wavelength	0.1nm step
	Selectable wavelength	0.1nm step (1nm step in spectrum mode)
	Scan speed	Wavelength change: approximately 3800 nm/min. Scan: approximately 24 to 1400 nm/min
	Light source change	Selectable from following 3 types: • Auto change with wavelength Selectable wavelength 295nm to 354nm: 1nm interval Recommended wavelength: 340nm • Halogen lamp only • Deuterium (D ₂) lamp only
	Measurement method	Single beam measurement
	Light source	Auto correction with the computer memory 20W Halogen lamp (long-life 2000 hours) Deuterium lamp (socket type) Auto adjustment for maximum sensitivity
	Monochromator	Incorporates aberration-correcting concave blazed holographic grating
	Detector	Silicon photodiode
	Performance Specifications	Spectrum bandwidth
Wavelength accuracy		± 1.0 nm
Wavelength repeatability		± 0.3 nm
Stray light		less than 0.05% (220.0 nm NaI, 340.0 nm NaHO ₂ & UV39)
Photometric range		Absorbance: -0.3 to 3.0 Abs
		Transmittance: 0.0 to 200%
Recording range		Absorbance: -3.99 to 3.99 Abs
		Transmittance: -399 to 399%
Photometric accuracy		± 0.005 Abs (at 1.0 Abs)
		± 0.003 Abs (at 0.5 Abs)
Photometric repeatability		± 0.002 Abs (at 1.0 Abs)
Drift		less than ± 0.001 Abs/h (after 2 hr warm-up)
Baseline flatness	± 0.010 Abs (after 1 hr warm-up, at 1100 to 200 nm)	
Noise	less than 0.002 Abs, Peak to Peak less than 0.0005 Abs, RMS	
Site Requirements	Sample compartment	Interior dimensions W110.0 × D230.0 × H105.0 mm (partial depth: 155.0 mm) 2 screw ports for option accessory installation
	Display	6 inch LCD (320 × 240 dot) with CFD lighting with contrast adjustment
	Power supply	100-120 V 50/60 Hz 160 VA 220-240 V 50/60 Hz 160 VA
	Dimensions	W416 × D379 × H274mm
	Weight	11 kg
	Ambient temperature	15 to 35°C
	Ambient humidity	45 to 80%, less than 70% if over 30°C

(C) 

Fonte: Manual do Espectrofotometro UVMini-1240 (B); Laboratório DIA - UEL (A e C).

O UVMini 1240 possibilitou realizar as medidas de absorvância em comprimentos de onda fixo e efetuar varredura produzindo o espectro completo de amostras na faixa de 190 a 1100 nm. Os resultados podem ser impressos ou enviados para a saída RS232 a uma taxa de transferência de 2 Hz, ou seja, a cada 0,5 segundo é enviado o valor do display (absorvância) pela porta serial. Os dados são transferidos ao programa AQUISUVMini-1240 e posteriormente são tratados pelo *software* Excel®.

De acordo com metodologia de referência APHA (1999), a proporção adicionada é de cinco partes da amostra ou padrão de íons fluoreto para uma parte do reagentes SPADNS (APHA, 1999). Foram adicionados em tubos de ensaio tipo falcon com rosca, 10,0 mL de padrão de íons fluoreto ou amostras de água com 2,0 mL de reagente SPADNS. Os tubos foram fechados e agitados. As leituras de absorvância para cada amostra e padrão foram realizadas em uma cubeta de vidro ótico no comprimento de onda de 580 nm.

A partir dos dados de absorvância das soluções padrão de íons fluoreto foram construídas as curvas analíticas (absorvância em função da concentração) por regressão linear, utilizando o método dos mínimos quadrados. A representação gráfica das curvas analíticas e os cálculos de regressão linear foram realizados pelo programa Origin® 7.0 da OriginLab Corporation.

5.3 ELETRODO ÍON SELETIVO DE FLUORETO E POTENCIÔMETRO

As leituras empregando eletrodo de íons seletivos para fluoreto (Cole-Parmer Combination Ion Selective Electrodes, Fluoride (F) EW-27504-14, IL, USA), foram realizadas em um medidor de pH na função potenciômetro (mPA210, MS Tecnopon, Piracicaba, SP, BR) a fim de que os dados fossem comparados com a AID via *scanner*.

Foi montado um sistema com agitador magnético e o medidor de pH na função potenciométrica, com leituras em mV (milivolt). Utilizando-se copos plásticos descartáveis de 50 mL, foi adicionado 10,0 mL de solução padrão fluoreto ou amostra de água e 10,0 mL de solução TISAB. Os copos descartáveis contendo as soluções de interesse foram colocados sobre o agitador magnético e introduzido o ISEF para leitura do potencial.

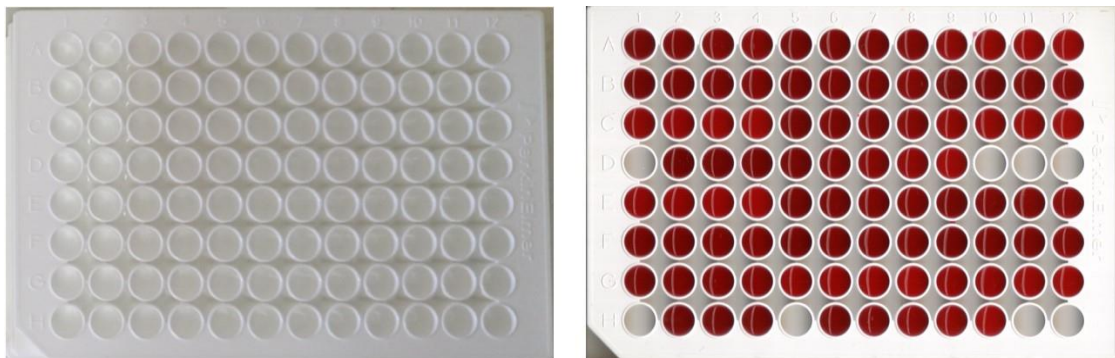
A partir dos potenciais aferidos das soluções padrão de íons fluoreto, foram construídas as curvas analíticas (potencial em função logaritmo da $[F^-]$) por regressão

linear, utilizando o método dos mínimos quadrados. A representação gráfica das curvas analíticas e os cálculos de regressão linear foram realizados pelo programa Origin® 7.0 da OriginLAB Corporation.

5.4 DIAScANNER-SPADNS-RGB

Foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços (OptiPlate-96 by PerkinElmer de 8,54x12,76x0,96 cm) para distribuir as curvas analíticas e as amostras de águas, digitalizadas pelo *scanner* de mesa na posição invertida, como mostra a Figura 13.

Figura 13. Imagem da placa de poliestireno com 96 poços sem adição e com a adição das soluções contendo as soluções padrão com SPADNS e as amostras de água



Placa de poliestireno de 96 poços utilizada para distribuir as soluções.

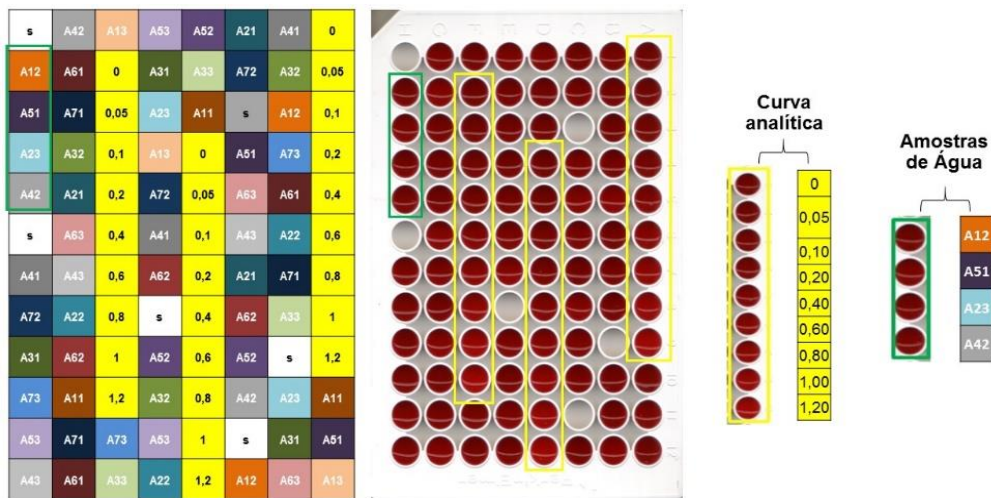
Placa de poliestireno de 96 poços com as soluções distribuídas.

Fonte: Próprio autor, 2017.

Foram adicionados em tubos de ensaio com tampa de rosca, 5,0 mL de solução padrão de íons fluoreto ou amostras de água e 1,0 mL de reagente SPADNS. Os tubos foram fechados e agitados. Com o auxílio de uma micropipeta (LABMATE, St. Albans, Inglaterra), foi adicionado a cada poço da placa de poliestireno com 96 poços, 350 µL de solução padrão ou amostra de água contendo o reagente SPADNS.

Para distribuição das soluções sobre a placa de poliestireno, foi elaborada uma planilha contendo as posições indicadas a receber as soluções padrão para construção da curva analítica, e as amostras de água para análise da concentração de íons fluoreto. A Figura 14 mostra a identificação das amostras de acordo com as posições definidas e a imagem da placa já com as soluções distribuídas.

Figura 14. Identificação das amostras; Foto digitalizada da microplaca contendo soluções padrão para curva analítica e amostras de água ($n = 3$)



Planejamento e programação de distribuição das amostras.

Foto digitalizada da placa de poliestireno branco contendo soluções padrão e amostras.

Fonte: Próprio autor, 2017.

A Figura 15 apresenta a imagem do sistema DIAScanner desenvolvido para a captura das imagens digitais via *scanner* de mesa, pelo grupo DIA (Desenvolvimento de instrumentação, automação e metodologia analítica) do Departamento de Química – UEL.

Figura 15. Imagem do sistema DIAScanner desenvolvido



Suporte de polietileno construído para acoplar as placas de poliestireno de 96 poços e adaptar scanner de mesa na posição invertida para captura das imagens.



Scanner de mesa na posição invertida acoplado em suporte de polietileno

Fonte: Próprio autor, 2017.

Foi elaborado um suporte, feito em chapa de polietileno de alta densidade, com espaço exato para as dimensões da microplaca de poliestireno. O *scanner* foi acoplado ao suporte em posição invertida (área de digitalização do *scanner* em cima), como mostra a Figura 15. Este sistema foi elaborado com a finalidade de manter a placa sempre na mesma posição, o que facilita o tratamento da imagem digitalizada e evita a interferência de luz externa. A digitalização das imagens é realizada pelo *scanner* via *software* CanoCraft CS-P, com a resolução de 300 DPI (Figura 16).

Figura 16. Imagem da placa de poliestireno branca anexada ao suporte de polietileno pronta para digitalização por *scanner* na posição invertida



Aquisição das imagens da placa de poliestireno por scanner na posição invertida.

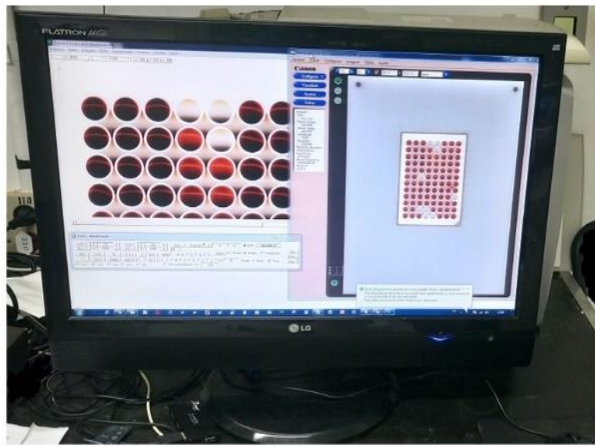
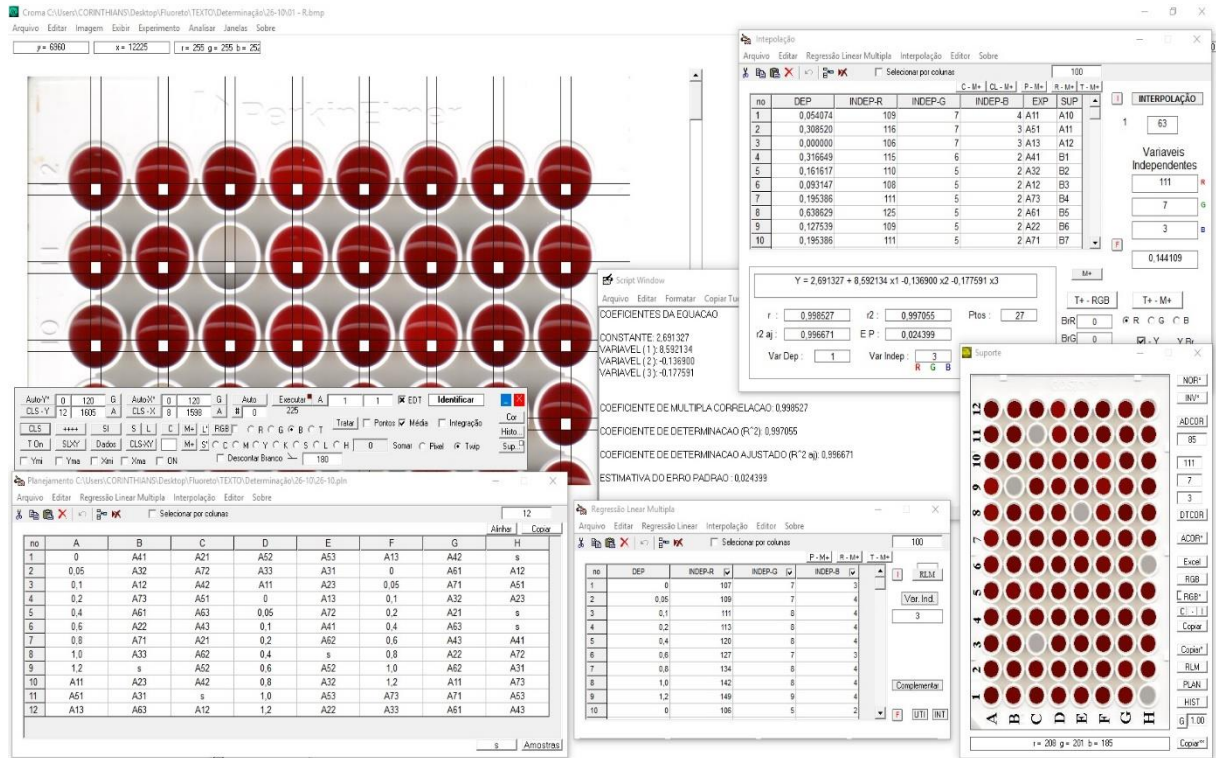


Imagem da placa digitalizada por scanner de mesa na posição invertida pronta para AID pelo software QuantColour.

Fonte: Próprio autor, 2017.

Para as imagens digitais capturadas pelo *scanner* de mesa, foram utilizados os modelos BMP e o JPEG. As imagens digitalizadas são inseridas no *software* QuantColour, no qual são determinados os valores das intensidades RGB médias das áreas selecionadas em cada poço, contendo as amostras de águas e as soluções padrão para construção das curvas analíticas, distribuídas conforme a identificação. Os dados referentes às intensidades RGB em cada poço selecionado (225 pixels), as curvas analíticas, os teores de íons fluoreto e os coeficientes referentes as regressões das curvas analíticas construídas, são fornecidos pelo QuantColour (Figura 17).

Figura 17. No detalhe as concentrações de íons fluoreto (mg L^{-1}) e os coeficientes da regressão para as curvas analíticas, determinadas utilizando as intensidades RGB, pelo sistema proposto empregando AID via software QuantColour



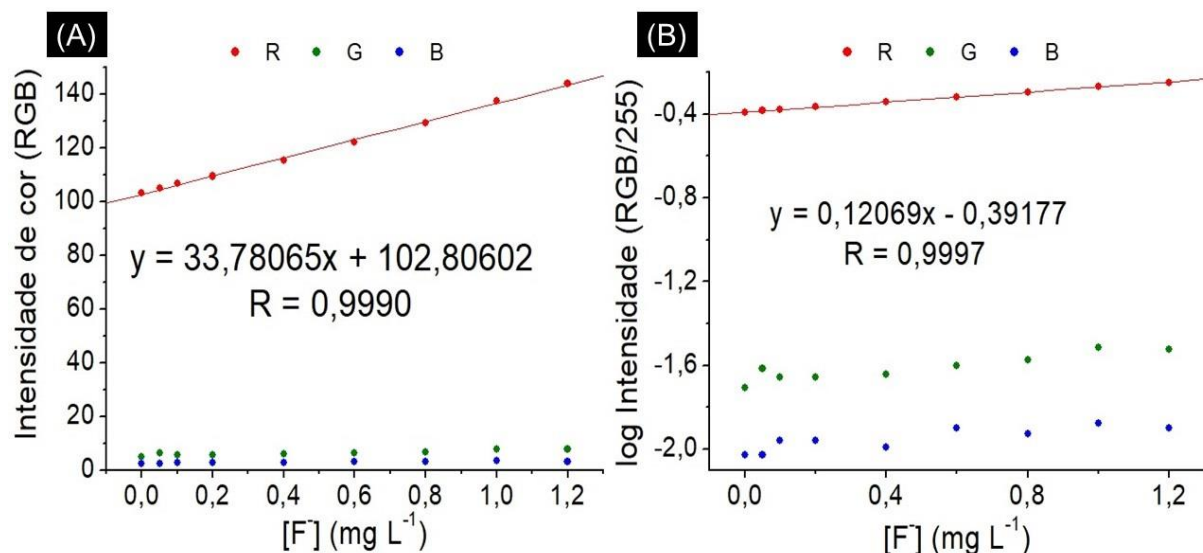
Fonte: Próprio autor, 2017.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTUDO DAS CONDIÇÕES INSTRUMENTAI E ANALÍTICAS

Foram determinadas as intensidades médias das cores RGB nas imagens digitais capturadas, e analisadas em função das concentrações de fluoreto utilizando o *software* QuantColour, como apresentado na Figura 18.

Figura 18. (A) Curva analítica das intensidades (RGB) versus concentração de fluoreto (mg L^{-1}); (B) Curva analítica do log das intensidades normalizadas (RGB/255) versus concentração de fluoreto (mg L^{-1})



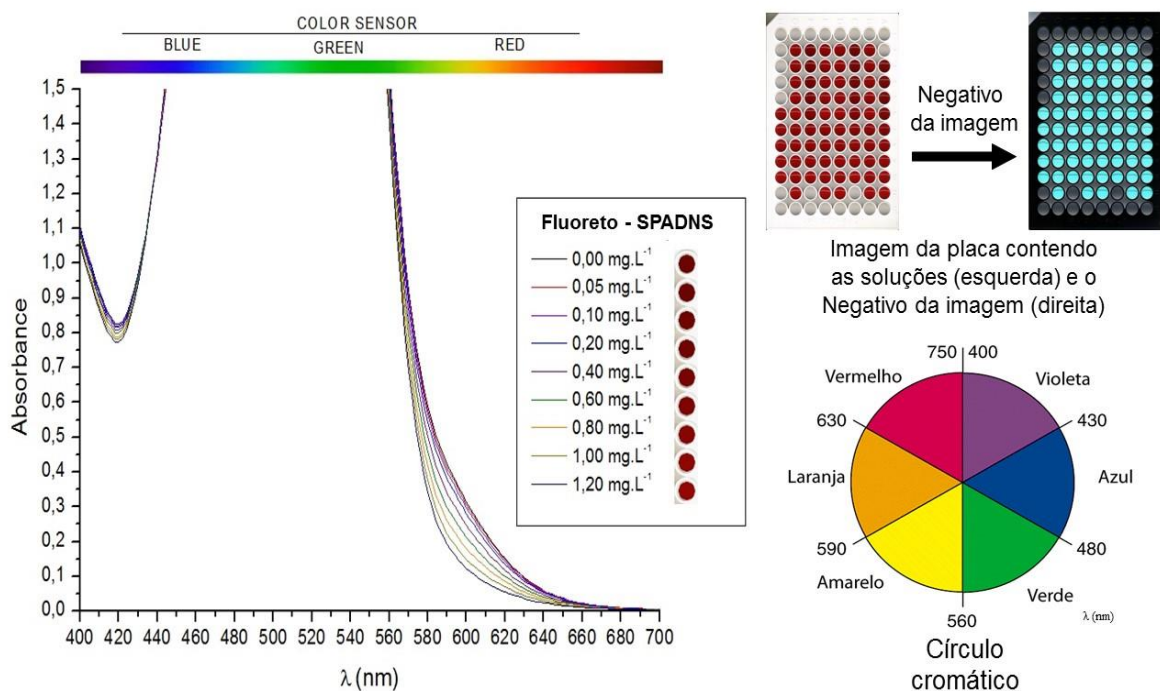
Fonte: Próprio autor, 2017.

A Figura 18 (A) apresenta a relação entre as intensidades das cores RGB com as concentrações de fluoreto. Foi verificada uma sensibilidade maior para a cor primária R (vermelho) frente as intensidades em G (verde) e B (azul). Observa-se um adequado ajuste, considerando-se o coeficiente de correlação no valor de 0,9990 para a regressão da intensidade R. A forma logarítmica das intensidades RGB normalizadas (intensidade em RGB/255) em relação às concentrações de íons fluoreto também foi analisada, como mostra a Figura 18 (B). Para a relação logarítmica das intensidades RGB ($\log(\text{RGB}/255)$), não foi observada variação significativa para as intensidades G e B em relação às concentrações de íons fluoreto. Novamente se observa uma maior sensibilidade para a intensidade R ($\log(\text{R}/255)$), com linearidade adequada comprovada pelo coeficiente de correlação de 0,9997.

6.1.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO

A Figura 19 apresenta o espectro de absorção molecular UV/VIS da curva analítica utilizando as soluções padrão de íons fluoreto com adição do reagente SPADNS.

Figura 19. Espectro de absorção de 400 a 700 nm das concentrações de íons fluoreto utilizadas na confecção da curva analítica variando-se de 0,05 a 1,20 mg L⁻¹ com adição de reagente SPADNS



Fonte: Próprio autor, 2017.

Para um melhor entendimento entre as faixa de comprimento de onda e as intensidades das cores RGB obtidas nas imagens digitais, foram contruídos espectros de absorção de 400 a 700 nm nas concentrações empregadas para o levantamento das curvas analíticas, variando-se de 0,05 a 1,20 mg L⁻¹ com a adição do reagente SPADNS, como mostra a Figura 19. Analisando-se os espectros de absorção apresentados, verifica-se que nos comprimentos de onda de 570 a 620 nm, um deslocamento da absorbância das soluções com o aumento da concentração de fluoreto para a região do verde, elucidando a maior intensidade emitida para a cor vermelha.

Na prática, quando se trabalha com imagem digitalizada, para escolher a intensidade de cor primária (RGB) que fornece uma maior sensibilidade de calibração, basta inverter as cores da imagem digitalizada (negativo da imagem), conforme ilustração da Figura 19. Ao analisar a imagem da placa digitalizada na forma negativa, observa-se que há uma absorção para a cor verde, também comprovando a maior sensibilidade para a intensidade emitida na cor vermelha. A cor emitida para a absorção da cor verde, é a cor vermelha, como mostra o círculo de cores complementares da Figura 19.

6.1.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A fim de otimizar a sensibilidade do método proposto, um planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} foi aplicado, para verificar a influência das seis variáveis de entrada: volume de SPADNS, tempo de reação, brilho, contraste, gama e saturação, sobre a sensibilidade, como variável de resposta.

Os parâmetros que interferem na sensibilidade do método DIAScanner-SPADNS-RGB foram investigados através do volume de reagente SPADNS na faixa de 0,70 a 0,90 mL para 5,00 mL de solução padrão, o tempo de reação entre 5 e 25 min da mistura, a taxa de correção de cor para brilho de -20 a +20, contraste de -30 a +30, gama de 0,85 a 1,15 e saturação de -20 a +20, sobre a inclinação da curva analítica como variável de resposta. É importante ressaltar que o tempo de reação fixado em 5 min, se deve ao tempo necessário após a adição da solução reagente SPADNS, para fechar e agitar os tubos contendo as misturas dos reagentes, e posterior distribuição das soluções na placa de poliestireno. Os níveis descodificados para as variáveis independentes são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Níveis descodificados das variáveis de entrada - volume de SPADNS, tempo de reação, brilho, contraste, gama e saturação, para planejamento fatorial fracionado 2^{6-2}

Variáveis Originais	Níveis		
	-1	0	+1
(X_1) SPADNS (mL)	0,70	0,80	0,90
(X_2) Tempo (min)	5,0	15,0	25,0
(X_3) Brilho	-20	0	+20
(X_4) Contraste	-30	0	+30
(X_5) Gama	0,85	1,00	1,15
(X_6) Saturação	-20	0	+20

As avaliações dos parâmetros na resposta (sensibilidade da curva analítica), foram realizadas através do levantamento de curvas analíticas utilizando somente a intensidade de cor R em função da concentração de íons fluoreto (mg L^{-1}). Utilizando o *software* QuantColour, foram construídas curvas analíticas para cada condição proposta pelo planejamento. O delineamento experimental foi constituído de um planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} , com resolução IV, totalizando 16 ensaios com ponto central em quadruplicata, e como variável resposta a sensibilidade (coeficiente angular da reta). A Tabela 4 apresenta a matriz do delineamento.

Tabela 4. Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} com ponto central em quadruplicata

Ordem	Ensaio	Variáveis em unidades codificadas						Resposta (y)
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	
14	1	1	-1	1	1	-1	-1	0,13276
13	2	-1	-1	1	1	1	-1	0,13069
5	3	-1	-1	1	-1	1	1	0,09203
3	4	-1	1	-1	-1	1	1	0,10709
18(C)	5	0	0	0	0	0	0	0,12499
19(C)	6	0	0	0	0	0	0	0,12007
2	7	1	-1	-1	-1	1	-1	0,06898
8	8	1	1	1	-1	1	-1	0,06061
1	9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,13756
9	10	-1	-1	-1	1	-1	1	0,21658
7	11	-1	1	1	-1	-1	-1	0,12731
16	12	1	1	1	1	1	1	0,10164
4	13	1	1	-1	-1	-1	1	0,09325
17(C)	14	0	0	0	0	0	0	0,12242
15	15	-1	1	1	1	-1	1	0,18553
12	16	1	1	-1	1	-1	-1	0,16256
6	17	1	-1	1	-1	-1	1	0,08396
20(C)	18	0	0	0	0	0	0	0,12175
10	19	1	-1	-1	1	1	1	0,11896
11	20	-1	1	-1	1	1	-1	0,17147

X₁: SPADNS; X₂:Tempo; X₃:Brilho; X₄:Contraste; X₅:Gama; X₆:Saturação; y:Sensibilidade.

A Tabela 5 apresenta as equações de codificação para as variáveis quantitativas analisadas.

Tabela 5. Equações de codificação para as variáveis independentes

Variáveis	Equação de Codificação
(X ₁) Volume de SPADNS	$X_1 = \frac{V - 0,80}{0,20}$
(X ₂) Tempo de Reação	$X_2 = \frac{T - 15}{10}$
(X ₃) Brilho	$X_3 = \frac{B - 0}{20}$
(X ₄) Contraste	$X_4 = \frac{C - 0}{30}$
(X ₅) Gama	$X_5 = \frac{G - 1,00}{0,15}$
(X ₆) Saturação	$X_6 = \frac{S - 0}{20}$

V: Volume de SPADNS; T: Tempo de reação; B: Brilho;

C: Contraste; G: Gama; S: Saturação.

Os efeitos estimados para a sensibilidade da curva analítica (coeficiente angular da reta) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Efeitos calculados para o planejamento fracionado 2^{6-2}

Parâmetro	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Média	0,1244	0,0005	0,0000
Curvatura	-0,0043	0,0023	0,1590
1 (Volume de SPADNS)	-0,0432	0,0010	0,0000
2 (Tempo de Reação)	0,0035	0,0010	0,0418
3 (Brilho)	-0,0202	0,0010	0,0003
4 (Contraste)	0,0562	0,0010	0,0000
5 (Gama)	-0,0360	0,0010	0,0001
6 (Saturação)	0,0009	0,0010	0,4488
7 (12)	-0,0001	0,0010	0,8971
8 (13)	0,0040	0,0010	0,0286
9 (14)	-0,0039	0,0010	0,0316
10 (15)	0,0054	0,0010	0,0130
11 (16)	-0,0077	0,0010	0,0049
12 (24)	0,0021	0,0010	0,1365
13 (26)	-0,0095	0,0010	0,0026

Efeito: Sensibilidade da curva analítica (coeficiente angular da reta).

$$R^2 = 0,9988$$

Os parâmetros mais significativos foram as variáveis contraste (4) e volume de SPADNS (1), seguidos por gama (5) e brilho (3). Note que, os efeitos 1, 2, 3, 4 e 5 calculados são estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os efeitos 1, 3 e 5 são negativos, no sentido que contribuem para a diminuição da sensibilidade da curva analítica. Os efeitos 2, 4 e 6 são positivos, isto é, contribuem para o aumento da sensibilidade da curva analítica.

O fator 3 (brilho) é menos importante, mas também atua na diminuição da sensibilidade da curva analítica. Se examinarmos seus efeitos, constatamos que a mudança do nível inferior para o nível superior produz uma diminuição da sensibilidade da curva analítica. Os efeitos destacados interferem linearmente para o aumento e diminuição da sensibilidade da curva, assim outras regiões devem ser

exploradas. A checagem da curvatura mostrada na Tabela 6, o valor-p obtido de 0,1590 ($p > 0,05$), indica que a faixa escolhida para os parâmetros está fora da região de máximo, como consequência um modelo linear descreve a variável resposta em relação às variáveis independentes.

Quanto aos parâmetros relacionados a variável volume de SPADNS, a mudança do nível inferior (0,70 mL) para o nível superior (0,90 mL), resultou diminuição dos valores médios da sensibilidade da curva. Entretanto, uma avaliação em níveis de volumes menores de SPADNS adicionados, torna a faixa linear insuficiente para a validação do método e determinação das concentrações de íons fluoreto em águas. Assim, a variável volume de SPADNS foi fixada no nível inferior de 1,40 mL.

Como o tempo de reação estudado (5,0 a 25,0 minutos), não apresentou mudança significativa na variável resposta (0,0035), representando um aumento de 2,81 % no valor da sensibilidade, o parâmetro foi fixado no nível inferior (5,0 min), optando-se por um tempo de realização das análises mais curto. A pequena alteração na sensibilidade da curva percebida para a variável saturação de 0,0009, não foi significativa estatisticamente ($p 0,4488 > p 0,05$), optou-se então por fixá-la no ponto central para os estudos realizados, eliminando a necessidade de correção de saturação das imagens.

O contraste em nível superior (+ 30) resultou no ganho, em média, 0,0562 na sensibilidade da curva, isso representa o aumento de 45,18 % no sinal da sensibilidade. Para a variável gama, em média, a diminuição de 0,0360 na sensibilidade da curva, representa 28,94 % na diminuição da resposta em caso de mudança do nível inferior (0,85) para o superior (1,15).

Como o planejamento fatorial apresentou-se fora da região de máximo, para um valor de prova maior que 5 % ($p 0,1590 > p 0,05$), as variáveis mais representativas do modelo linear foram deslocadas, caminhando na superfície de resposta em direção a região de máximo, o ponto da superfície onde a sensibilidade do sistema começa a diminuir (FERREIRA et al., 2004).

Aplicou-se um planejamento fatorial completo 2^3 para verificar a influência das variáveis de entrada brilho, contraste e gama, sobre a sensibilidade como variável de resposta. Os níveis reais e codificados para as variáveis estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Níveis descodificados das variáveis de entrada brilho, contraste e gama para o planeamento fatorial completo 2^3

Variáveis Originais	Níveis		
	-1	0	+1
(X_1) Brilho	-30	-40	-50
(X_2) Contraste	90	100	110
(X_3) Gama	0,75	0,80	0,85

Foram construídas curvas analíticas pelo *software* QuantColour para as condições propostas pelo planeamento fatorial completo 2^3 , com resolução III, totalizando 11 ensaios com ponto central em triplicata e tendo a máxima sensibilidade da curva como resposta. A matriz do delineamento é apresentada pela Tabela 8.

Tabela 8. Matriz do planeamento fatorial completo 2^3 com ponto central em triplicata

Ordem	Ensaio	Variáveis em unidades codificadas			Resposta (y)
		X_1	X_2	X_3	
9 (C)	1	0	0	0	0,7546
1	2	-1	-1	-1	0,5776
4	3	1	1	-1	1,4063
6	4	1	-1	1	0,5125
5	5	-1	-1	1	0,5112
11 (C)	6	0	0	0	0,7145
10 (C)	7	0	0	0	0,7384
8	8	1	1	1	1,2329
3	9	-1	1	-1	1,3174
2	10	1	-1	-1	0,5868
7	11	-1	1	1	1,1701

X_1 : Brilho; X_2 : Contraste; X_3 : Gama.

A Tabela 9 apresenta as equações de codificação para as variáveis quantitativas analisadas para o planeamento fatorial completo 2^3 .

Tabela 9. Equações de codificação para as variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2^3

Variáveis	Equação de Codificação
(X_1) Brilho	$X_1 = \frac{B + 40}{10}$
(X_2) Contraste	$X_2 = \frac{C - 100}{10}$
(X_3) Gama	$X_3 = \frac{G - 0,80}{0,05}$

B: Brilho; C: Contraste; G: Gama

A análise dos efeitos estimados para a sensibilidade da curva analítica é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Efeitos calculados para o planejamento fatorial completo 2^3

Parâmetro	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Média	0,9143	0,0071	0,0001
Curvatura	-0,3570	0,0273	0,0058
1 (Brilho)	0,0405	0,0143	0,1046
2 (Contraste)	0,7346	0,0143	0,0004
3 (Gama)	-0,1154	0,0143	0,0149
4 (1x2)	0,0353	0,0143	0,1316
5 (1x3)	-0,0085	0,0143	0,6110
6 (2x3)	-0,0450	0,0143	0,0874

Efeito: Sensibilidade da curva analítica (coeficiente angular da reta).

$$R^2 = 0,99928$$

Os parâmetros mais significativos foram as variáveis contraste (2) e gama (3), seguidos por brilho (1). Os efeitos 2 e 3 calculados são estatisticamente significativos ($p < 0,05$). O efeito 3 (gama) é negativo, no sentido que diminui a sensibilidade da curva analítica. Os efeitos 1 (brilho) e 2 (contraste) são positivos, aumentam a sensibilidade da curva analítica.

O fator 1 (brilho) interfere menos na resposta que os efeitos 2 (contraste) e 3 (gama). Examinando os efeitos do fator 1, constatamos que a mudança do nível inferior para o nível superior produz um aumento muito pequeno na sensibilidade da curva analítica (0,0405), representando 4,43 % do valor médio. Como a região de

máxima resposta para a variável brilho está localizada no maior nível, o parâmetro foi fixado em - 50 para próximos estudos.

O contraste em nível superior (+ 110) resultou em aumento (0,7346) na sensibilidade da curva, isso representa um ganho significativo (80,34 %) na resposta. Para a variável gama, em média, a diminuição (-0,1154) na sensibilidade da curva, representa 12,62 % na diminuição da resposta em caso de mudança do nível inferior (0,75) para o superior (0,85).

A checagem da curvatura mostrada na Tabela 10, o valor-p obtido de 0,0058 ($p < 0,05$), indica que a faixa escolhida para os parâmetros está dentro da região de máximo.

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais foi realizada a análise de variância ou ANOVA. O desvio das respostas e das estimativas feitas pelo modelo em torno da média podem ser representados pela Equação 6.

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r \quad \text{Eq. (6)}$$

Na Equação 6, SQ_T é a soma quadrática total, SQ_R é a soma dos quadrados explicada pelo modelo e SQ_r é a soma dos quadrados devido ao resíduo. A SQ_r ainda pode ser decomposta em duas partes, como mostra a Equação 7.

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj} \quad \text{Eq. (7)}$$

Na Equação 7, SQ_{ep} é a soma dos quadrados devido ao erro puro e SQ_{faj} é a soma dos quadrados devido a falta de ajuste do modelo. A primeira parcela da Equação 7 nada tem a haver com o modelo, é a dispersão das respostas repetidas em torno do ponto central. O segundo termo deve ser ajustado de acordo com as respostas observadas. A Tabela 11 fornece a análise de variância pelo método dos mínimos quadrados do modelo linear.

Tabela 11. ANOVA para o modelo

Fonte de variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade	Média Quadrática (MQ)
Regressão	1,185479	7	0,169354
Resíduos	0,000853	3	0,000284
Falta de ajuste	0,000041	1	0,000041
Erro puro	0,000812	2	0,000406
Total	1,186332	10	0,118633

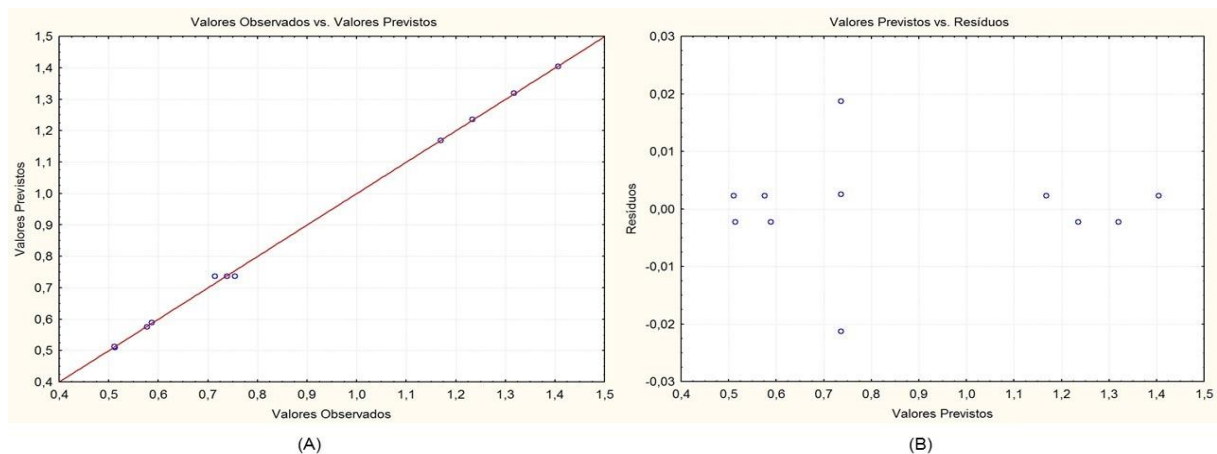
O valor do coeficiente de determinação (R^2), obtido a partir da Equação 8, indica o quanto da variação da resposta em torno da média é explicado pelo modelo.

$$\frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{1,185478}{1,186332} = 0,99928 \quad Eq. (8)$$

O valor de R^2 indica que 99,93 % da variabilidade dos dados é explicada pela regressão, restando para os resíduos apenas 0,07 %.

O valor de R^2 ajustado (R^2_{aj}), fornecido pela ANOVA, explica não apenas o quanto da variação é explicado pelo modelo, como também considera o número de fatores. Foi obtido o valor de 0,9976 para R^2_{aj} , comprovando o ajuste do modelo elaborado.

Figura 20. Resíduos dos ajustes dos dados: (A) Distribuição dos resíduos; (B) Respostas observadas versus valores estimados pelo modelo



Fonte: Próprio autor, 2017.

O bom ajuste é confirmado pela distribuição aleatória em torno de zero, como mostra a Figura 20 (A), além da baixa variância residual deixada entre os valores observados e os estimados pelo modelo, Figura 20 (B).

Como o planejamento fatorial apresentou-se dentro da região de máximo, foi elaborado um planejamento do tipo delineamento composto central (DCC) para avaliar o efeito da interação das variáveis contraste e gama sobre a sensibilidade como resposta (BAS; BOYACI, 2007). A Tabela 12, apresenta os níveis das variáveis reais e codificadas para o DCC.

Tabela 12. Níveis reais e codificados das variáveis de entrada contraste e gama para o Delineamento Central Composto 2^2

Variáveis Originais	Níveis				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$-\sqrt{2}$
(X_1) Contraste	96	100	110	120	124
(X_2) Gama	0,54	0,60	0,75	0,90	0,96

Foram construídas curvas analíticas pelo *software* QuantColour para as condições propostas pelo DCC 2^2 , totalizando 12 ensaios com ponto central em quadruplicata e a sensibilidade da curva como resposta. A matriz do DCC 2^2 é apresentada pela Tabela 13.

Tabela 13. Matriz do delineamento central composto 2^2 com ponto central em triplicata

Ordem	Ensaio	Variáveis em unidades codificadas		Resposta (y)
		X_1	X_2	
11 (C)	1	0,000	0,000	1,2753
3	2	1,000	-1,000	0,6696
10 (C)	3	0,000	0,000	1,2617
7	4	0,000	-1,414	-0,3665
2	5	-1,000	1,000	-0,9351
1	6	-1,000	-1,000	1,0368
6	7	1,414	0,000	-0,5560
4	8	1,000	1,000	-0,6553
9 (C)	9	0,000	0,000	1,3147
5	10	-1,414	0,000	0,7000
8		0,000	1,414	1,0053

X_1 : Contraste; X_2 :Gama.

A Tabela 14 apresenta as equações de codificação para as variáveis quantitativas analisadas.

Tabela 14. Equações de codificação para as variáveis independentes do DCC 2²

Variáveis	Equação de Codificação
(X ₁) Contraste	$X_2 = \frac{C - 110}{10}$
(X ₂) Gama	$X_3 = \frac{G - 0,75}{0,15}$

C: Contraste; G: Gama

A análise dos efeitos estimados para a sensibilidade da curva analítica é apresentada na Tabela 15.

Tabela 15. Efeitos calculados para o delineamento central composto 2² com ponto central em triplicata

Parâmetro	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Média	1,2839	0,01589	0,00015
1 (Contraste) (L)	-0,4659	0,01946	0,00174
2 (Contraste) (Q)	-1,2953	0,02316	0,00032
3 (Gama) (L)	-0,3392	0,01946	0,00327
4 (Gama) (Q)	-1,0479	0,02316	0,00049
5 (1x2) (L)	0,3235	0,02752	0,00716

Efeito: Sensibilidade da curva analítica (coeficiente angular da reta).

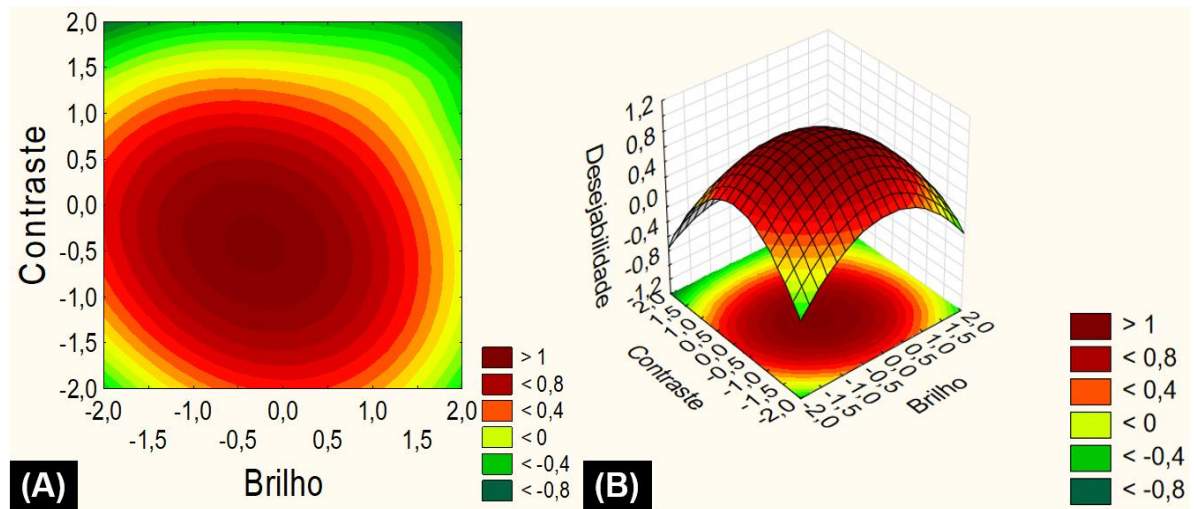
$$R^2 = 0,92449$$

A Equação 9 apresenta o modelo quadrático para o planejamento, em que os pontos ótimos obtidos foram de - 0,7071 para o contraste e 0,0 para o gama.

$$Y = 1,28 - 0,47 X_1 - 1,30 X_1^2 + 0,34 X_2 - 1,04 X_2^2 + 0,32 X_1 X_2 \quad \text{Eq. (9)}$$

A curva de contorno e a superfície de resposta da interação do contraste e gama, que mostram a região de máximo estão apresentadas na Figura 21 (A) e (B).

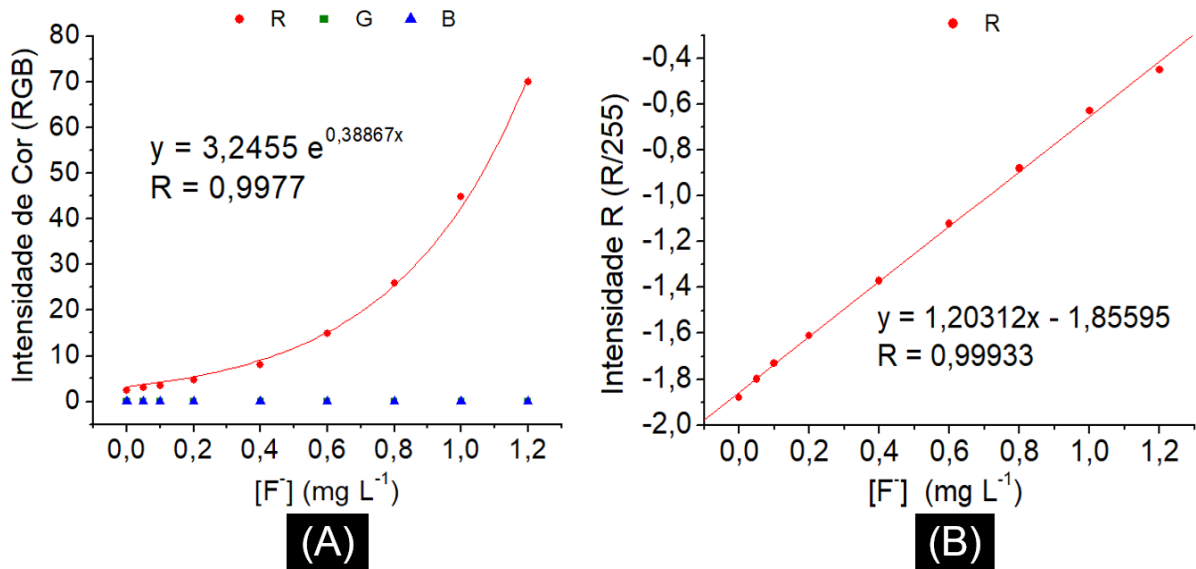
Figura 21. Efeito de interação de correção das variáveis contraste e gama na sensibilidade da curva analítica: (A) Curva de contorno; (B) Superfície de resposta.



Fonte: Próprio autor, 2017.

Através do planejamento experimental realizado, foram definidas as condições ótimas para operação do sistema DIAScanner-SPADNS-RGB em: volume de SPADNS adicionado de 0,70 mL de reagente em 5,0 mL de solução, tempo de reação de 5,0 minutos, taxa de correção de brilho em - 50, taxa de correção de contraste em 110, taxa de correção gama em 0,75 e taxa de correção de saturação em 0 (sem edição de saturação). Foram construídas as curvas analíticas por AID utilizando o *software* QuantColour, das intensidades emitidas versus as concentrações de íons fluoreto em condições otimizadas, como mostra a Figura 22.

Figura 22. (A) Gráfico das intensidades (RGB) versus concentração de fluoreto (mg L^{-1}) em condição otimizada empregando o método DIAScanner-SPADNS-RGB proposto; (B) Gráfico de log Intensidade ($R/255$) versus concentração de fluoreto (mg L^{-1}) em condição otimizada empregando o método DIAScanner-SPADNS-RGB proposto.



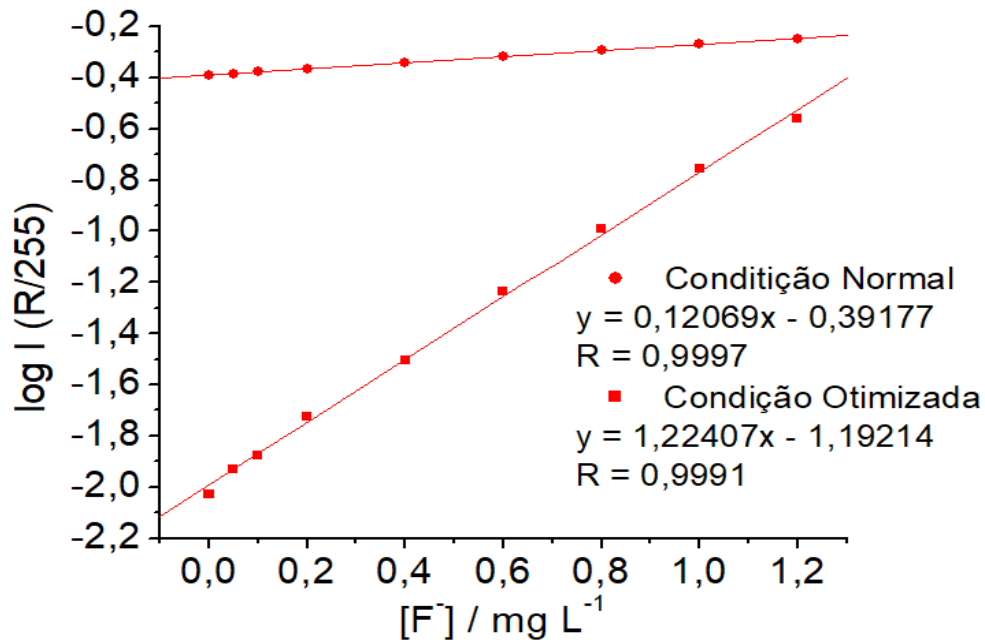
Fonte: Próprio autor, 2017.

Quando se utiliza as intensidade RGB na condição ótima, o gráfico se torna exponencial para a cor primária R, conforme apresentado na Figura 22 (A), tornando mais trabalhosa a análise dos dados por esta forma. Para as cores primárias G e B não foi observada relação entre as intensidades em função das concentrações de fluoreto. Utilizando a forma logarítmica da intensidade da cor primária R normalizada ($R/255$) na condição otimizada, foi observada uma relação com as concentrações de fluoreto, comprovada pelo coeficiente de correlação (R) de 0,9993. Em condições otimizadas, não foram obtidas variações de intensidades para as cores primárias G e B normalizadas em função das concentrações de fluoreto, conforme pode ser observado na Figura 22 (A e B).

Quando se trabalha com a relação das intensidades da cor primária R com a concentrações de fluoreto, de acordo com a Figura 23, observa-se um aumento de sensibilidade de calibração. Houve um ganho de aproximadamente dez vezes na sensibilidade passando de 0,12069 (método AID-Scanner com SPADNS normal) para 1,20312 (AID-Scanner com SPADNS nas condições otimizadas), confirmando o efeito

do planejamento na sensibilidade do método para o sistema DIAScanner-SPADNS-RGB.

Figura 23. Gráfico do logaritmo da Intensidade de cor (R/255) versus concentração de fluoreto (mg L^{-1}); (● – condição normal; ■ – condição otimizada) para o método DIAScanner-SPADNS-RGB.



Fonte: Próprio autor, 2017.

6.2 ESTUDO DOS INTERFERENTES

O método DIAScanner-SPADNS-RGB foi avaliado de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA) para concentrações das substâncias interferentes que causam um erro de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de íons fluoreto (APHA, 1999). Foram adicionados os íons interferentes: alcalinidade - $5000,0 \text{ mg L}^{-1}$, alumínio (Al^{3+}) - $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, cloreto (Cl^-) - 7000 mg L^{-1} , ferro (III) (Fe^{3+}) - $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, sulfato (SO_4^{2-}) $200,0 \text{ mg L}^{-1}$, em solução de fluoreto na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Os resultados foram avaliados mediante os desvios nas concentrações das amostras com interferentes em relação a amostra de referência ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), determinados através da construção de curvas analíticas em triplicata, nas concentrações de $0,05$ a $1,20 \text{ mg L}^{-1}$ de íons fluoreto versus o logaritmo da intensidade

I (log R/255). A precisão das determinações foi expressa como desvio padrão relativo (DPR %) de acordo com a Equação 10.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Eq. (10)}$$

Na Equação 10, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada. A Tabela 16 apresenta os valores de concentração dos interferentes adicionados nas amostras de fluoreto, as concentrações determinadas de íons fluoreto (mg L^{-1}) para cada interferente e o respectivo desvio padrão relativo ($n = 3$) para DIAScanner-SPADNS-RGB e os desvios na concentração de íons fluoreto em relação à amostra de referência.

Tabela 16. Espécies químicas interferentes analisadas, concentração limite (APHA), concentrações de íons fluoreto (mg L^{-1}) via DIAScanner-SPADNS-RGB, desvio padrão relativo (DPR) e desvio da concentração de íons fluoreto (mg L^{-1}) nas amostras contaminadas em relação a amostra de referência ($n = 3$)

Espécies Químicas	[APHA] (mg L^{-1})	[DIAScanner-SPADNS-RGB] (mg L^{-1})	DPR (%)	[Desvio] (mg L^{-1})
Referência	----	1,02	4,41	----
Alcalinidade	5000	0,95	6,58	-0,07
Al ³⁺	0,1	0,96	4,84	-0,06
Cl ⁻	7000	1,06	5,50	0,04
Fe ³⁺	10	1,04	4,65	0,02
SO ₄ ²⁻	20	1,09	3,55	0,07

DPR: Desvio padrão relativo ($n=3$)

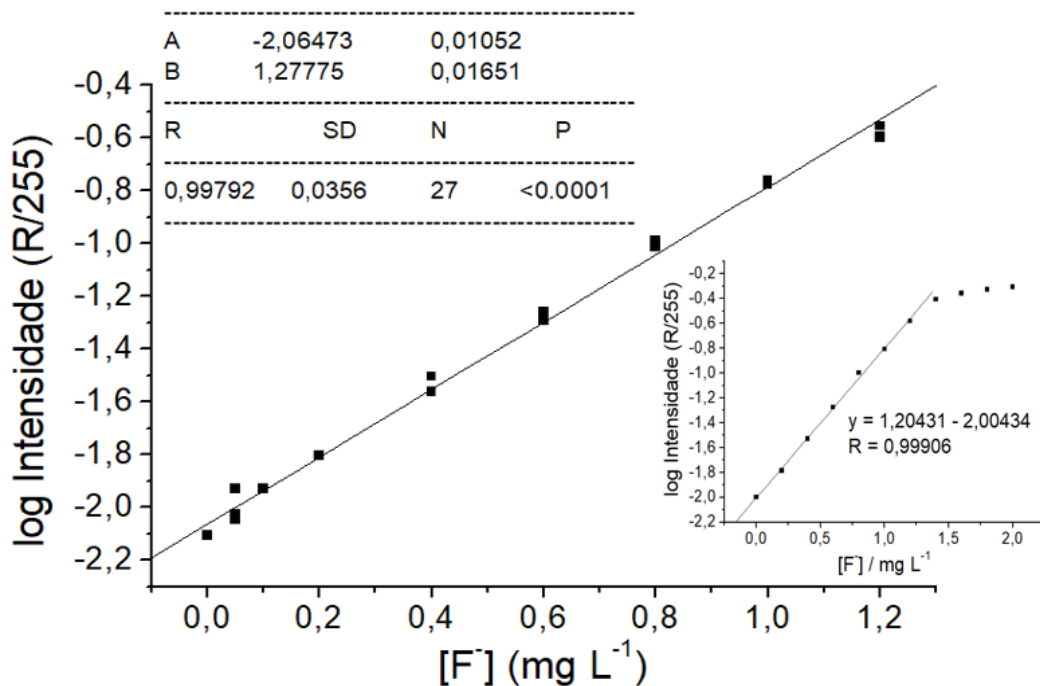
Analisando os valores apresentados na tabela 16, pode ser observado que as amostras contendo os interferentes apresentaram desvio menor do que o esperado de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. A utilização de 30 % a menos no volume de reagente SPADNS em comparação com a metodologia de referência, não causou um desvio maior que o esperado para as amostras contendo os interferentes avaliados.

6.3 DESEMPENHO ANALÍTICO

A validação da metodologia analítica foi conduzida segundo a Resolução da ANVISA RE nº 899, a qual determina que os parâmetros de linearidade e faixa de trabalho (intervalo), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), seletividade (interferentes), precisão, exatidão e robustez devem ser avaliados (Brasil, 2003).

A faixa linear foi determinada por meio da construção de cinco curvas analíticas em doze níveis de concentração entre 0,05 a 2,00 mg L⁻¹ de fluoreto versus o logaritmo da intensidade de cor R normalizada (R/255), todas determinadas nas melhores condições experimentais obtidas para o sistema. A linearidade do método DIAScanner-SPADNS-RGB foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, como mostra a Figura 24.

Figura 24. Avaliação da linearidade do método para o sistema DIAScanner-SPADNS-RGB



Fonte: Próprio autor, 2017.

O método DIAScanner-SPADNS-RGB proposto apresentou linearidade em uma faixa de concentração de íons fluoreto em água de 0,05 a 1,20 mg L⁻¹, com variações de concentração analisadas até 2,00 mg L⁻¹. As curvas analíticas obtidas em triplicata puderam ser descritas através da Equação 11: $\log I (R/255) = 1,27775 C - 2,06473$ obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentando um coeficiente

de correlação $R = 0,99686$, conforme apresentado na Figura 24. O coeficiente angular da curva apresentou desvio padrão igual a 0,01651 e, o coeficiente linear de 0,01052.

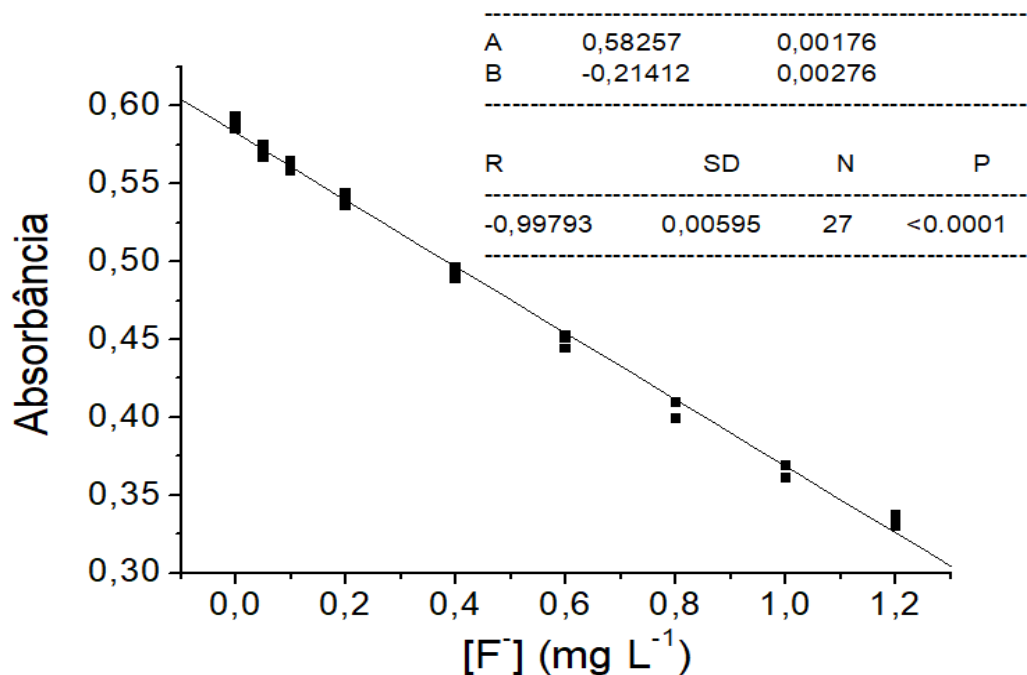
Limite de detecção (LD) foi determinado por meio da Equação 12 e o limite de quantificação (LQ) de acordo com a Equação 13, onde DP é o desvio padrão do coeficiente linear das curvas analíticas e IC é a inclinação da curva analítica (Brasil, 2003).

$$LD = \frac{3 \times DP}{IC} \quad \text{Eq. (12)} \quad LQ = \frac{10 \times DP}{IC} \quad \text{Eq. (13)}$$

O limites LD e LQ apresentaram valores de $0,039 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,129 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

A exatidão para o método DIAScanner-SPADNS-RGB foi avaliada por meio da correlação dos valores de concentração de íons fluoreto frente os métodos de referência potenciométrico (ISEF) e espectrofotométrico (Vis-SPADNS). A Figura 25 mostra as curvas analíticas obtida pelo método Vis-SPADNS.

Figura 25. Gráfico de absorbância versus $[F^-]$ (mg L^{-1}) para o método espectrofotométrico (Vis-SPADNS)

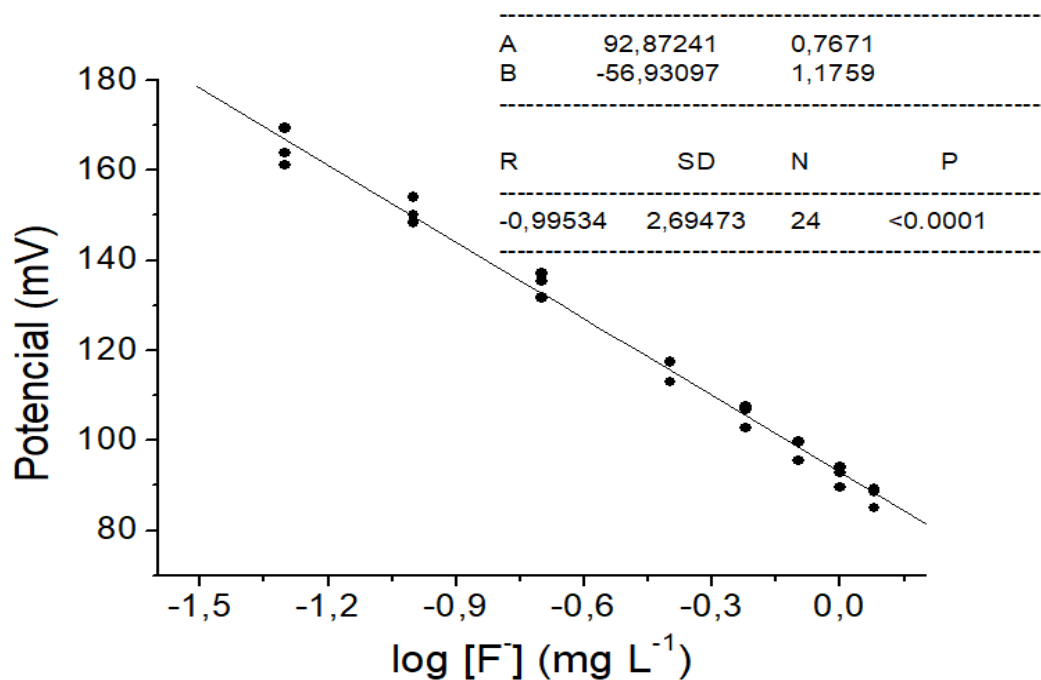


Fonte: Próprio autor, 2017.

As curvas analíticas para o Vis-SPADNS, obtidas em triplicata, puderam ser descritas através da Equação 14: $A = - 0,21412 C + 0,58257$, em que A é a absorbância e C é a concentração de íons fluoreto. A Equação 14 foi obtida pelo método dos mínimos quadrados apresentando um coeficiente de correlação (R) igual a $0,99793$, como apresentado na Figura 25.

A Figura 26 mostra as curvas analíticas obtida pelo método ISEF.

Figura 26. Gráfico do potencial (mV) versus $\log [F^-]$ (mg L^{-1}) para o método potenciométrico (ISEF)



Fonte: Próprio autor, 2017.

Construídas em triplicata, as curvas analíticas para o método ISEF, foram descritas através da Equação 15: $E = - 56,93097 L + 92,87241$, em que E é o potencial medido em milivolts (mV) e L é o logaritmo da concentração de íons fluoreto. A Equação 15 foi obtida pelo método dos mínimos quadrados apresentando um coeficiente de correlação (R) igual a $0,99534$, como ilustrado na Figura 26.

Os valores das concentrações de íons fluoreto em águas, determinados pelos três métodos estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Concentrações de íons fluoreto (mg L^{-1}) em amostras de águas determinadas pelos métodos de referência utilizando diferentes equipamentos: potenciômetro (ISEF) e espectrofotômetro (Vis-SPADNS) e pelo método proposto de imagem digitalizada (DIAScanner-SPADNS-RGB)

[F ⁻] (mg L^{-1})* \pm IC							
Amostra	DIAScanner- SPADNS- RGB	DPR (%)	ISEF	DPR (%)	Vis-SPADNS	DPR (%)	
1	0,83 \pm 0,010	0,49	0,83 \pm 0,032	1,58	0,85 \pm 0,009	0,43	
2	0,38 \pm 0,019	2,01	0,36 \pm 0,016	1,80	0,40 \pm 0,014	1,39	
3	0,54 \pm 0,050	3,74	0,50 \pm 0,024	1,96	0,55 \pm 0,018	1,32	
4	0,60 \pm 0,009	0,58	0,57 \pm 0,023	1,61	0,62 \pm 0,034	2,22	
5	1,07 \pm 0,035	1,31	1,06 \pm 0,035	1,35	1,07 \pm 0,014	0,52	

*Valor Médio \pm (IC) Intervalo de confiança. 95% de grau de confiança.

DPR: desvio padrão relativo. n= 3.

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com fator único, a qual permite analisar de forma isolada o fator método. Analisando a Tabela 18 é possível destacar alguns pontos importantes referentes às interações existentes entre o sistema proposto DIAScanner-SPADNS-RGB frente ao método de referência por ISEF.

Tabela 18. ANOVA na comparação do método de referência ISEF e o proposto DIAScanner-SPADNS-RGB

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância			
ISEF	5	3,3195	0,6639	0,0768			
DIAScanner- SPADNS-RGB	5	3,4191	0,6838	0,0727			
ANOVA							
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico	
Entre grupos	0,0010	1	0,0010	0,0133	0,9112	5,3177	
Dentro dos grupos	0,5980	8	0,0748				
Total	0,5990	9					

De acordo com a Tabela 18, o *valor-P* entre os grupos de 0,9112, maior do que o nível de significância de 0,05, pode-se concluir que os métodos avaliados não

interferem na determinação dos teores de fluoreto nas amostras de água. Assim como, ao se analisar o valor de F (0,0133) o qual foi menor do que o $F_{crítico}$ (5,3177), conclui-se que o fator equipamento não influencia na determinação da concentração de fluoreto em água, confirmando a correlação do método DIAScanner-SPADNS-RGB proposto com o método potenciométrico ISEF de referência.

A Tabela 19 apresenta as interações obtidas por ANOVA, existentes entre o sistema proposto DIAScanner-SPADNS-RGB frente ao método de referência Vis-SPADNS.

Tabela 19. ANOVA na comparação do método de referência espectrofotométrico Vis-SPADNS e o proposto DIAScanner-SPADNS-RGB

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Vis-SPADNS	5	3,4935	0,6987	0,0688		
DIAScanner-SPADNS-RGB	5	3,4191	0,6838	0,0727		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0006	1	0,0006	0,0078	0,9316	5,3177
Dentro dos grupos	0,5662	8	0,0708			
Total	0,5668	9				

Analisando a Tabela 19, por meio do *valor-P* nas linhas entre os grupos de 0,9316, maior do que o nível de significância 0,05, como também pelo valor de F (0,0078), menor que $F_{crítico}$, (5,3177), podemos comprovar a correlação dos valores obtidos pelo método DIAScanner-SPADNS-RGB proposto frente ao método de referência Vis-SPADNS.

A precisão para o método AID-Scanner foi determinada pela recuperação com adição de padrão em 4 níveis de concentração dos íons fluoreto de 0,05; 0,10; 0,20; 0,40 mg L⁻¹ em duas amostras (A1 e A2). Os ensaios realizados em triplicata, foram realizados intradia (A e B) e interdia (C), com os valores expressos em função das médias das concentrações em relação às amostras sem adição do padrão. A recuperação foi determinada de acordo com a Equação 16, em que CF é a concentração da amostra com adição de padrão, CR é a concentração de referência sem adição dos íons fluoreto e CA é a concentração adicionada a amostra fortificada.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{CF - CR}{CA} \times 100 \quad \text{Eq. (16)}$$

As porcentagens de recuperação obtidas para os três níveis de concentrações avaliados, são apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20. Concentrações de íons fluoreto (mg L^{-1}) adicionadas à matriz de referência, concentração recuperada (mg L^{-1}), desvio padrão relativo (DPR) e Recuperação (%) do método DIAScanner-SPADNS-RGB para duas amostras analisadas

Amostra	1					2				
Adicionado (mg L^{-1})	0,000	0,050	0,100	0,200	0,400	0,000	0,050	0,100	0,200	0,400
Recuperado (A) (mg L^{-1})	0,366	0,423	0,479	0,567	0,768	0,783	0,833	0,881	0,980	1,160
DPR (%)	5,40	3,63	2,02	3,08	2,24	0,50	0,96	0,65	1,17	0,66
Recuperação (%)	-	113,46	112,50	100,10	100,37	-	98,24	97,29	98,31	94,06
Adicionado (mg L^{-1})	0,000	0,050	0,100	0,200	0,400	0,000	0,050	0,100	0,200	0,400
Recuperado (B) (mg L^{-1})	0,366	0,416	0,470	0,551	0,738	0,798	0,853	0,910	1,002	1,160
DPR (%)	2,70	2,46	2,97	8,41	0,86	0,13	0,51	0,59	0,30	1,14
Recuperação (%)	-	98,98	103,62	92,18	92,86		109,29	112,08	102,03	90,33
Adicionado (mg L^{-1})	0,000	0,050	0,100	0,200	0,400	0,000	0,050	0,100	0,200	0,400
Recuperado (C) (mg L^{-1})	0,402	0,459	0,490	0,590	0,773	0,800	0,847	0,899	1,001	1,160
DPR (%)	0,18	1,93	1,48	1,59	0,62	0,60	0,74	0,48	0,63	1,35
Recuperação (%)	-	114,71	88,26	93,84	92,85	-	94,30	99,67	100,39	90,09

(A): Dia 1; (B): Dia 1 – Interdia; (C): Dia 2

DPR: Desvio padrão relativo (n=3)

Analisando a Tabela 20, observa-se que a faixa de recuperação ficou entre 88,26 % e 114,71 % nas condições otimizadas, mostrando o potencial do sistema como ferramenta de análise de rotina na determinação de íons fluoreto em água.

A robustez do DIAScanner-SPADNS-RGB foi avaliada por meio da determinação da concentração de íons fluoreto em amostras de águas em duas placas de poliestireno diferentes (Placa I e Placa II) com volume de SPADNS adicionado na proporção de 0,70 mL para 5,00 mL de amostra. Foram determinadas as curvas analíticas em triplicata e os valores obtidos de concentração de íons fluoreto

foram comparados por ANOVA. A Tabela 21 apresenta as interações obtidas por ANOVA para a robustez do sistema proposto DIAScanner-SPADNS-RGB.

Tabela 21. ANOVA na comparação da determinação de íons fluoreto em amostras de água em duas placas (Placa I e II) distintas de polietileno com volume de SPADNS de 0,70 mL

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Placa I	5	1,68539	0,33708	0,12092		
Placa II	5	1,72312	0,34462	0,10117		
ANOVA	0					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,00014	1	0,00014	0,00128	0,97231	5,31766
Dentro dos grupos	0,88836	8	0,11104			
Total	0,8885	9				

Podemos verificar a robustez do sistema, analisando os valores da ANOVA realizada com os valores das concentrações de fluoreto obtidas por meio das placas de poliestireno I e II, através do *valor-P* (0,9723) maior do que o nível de significância de 5,0 %. Avalia-se a robustez também pelo valor de *F* (0,00128), menor que *F_{crítico}* (5,3177), como apresentado na Tabela 21, comprovando a correlação dos valores determinados nas placas (I e II) analisadas.

Foi avaliada a robustez também por determinação da concentração de íons fluoreto em dois níveis de volumes de SPADNS adicionados, de 0,70 mL e 0,75 mL para 5,00 mL de amostra, analisadas na mesma placa. A Tabela 22 apresenta as interações obtidas por ANOVA para a robustez entre os volumes adicionados de solução reagente SPADNS para o sistema proposto DIAScanner-SPADNS-RGB.

Tabela 22. ANOVA na comparação da determinação de íons fluoreto em amostras de água em dois níveis de volumes de SPADNS adicionados, 0,70 mL e 0,75 mL na mesma placa de polietileno

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
0,70 mL SPADNS	5	1,74851	0,3497	0,0842		
0,75 mL SPADNS	5	1,72312	0,34462	0,10117		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	6,4E-05	1	6,4E-05	0,0007	0,97961	5,31766
Dentro dos grupos	0,74146	8	0,09268			
Total	0,74153	9				

De acordo com a Tabela 22, podemos confirmar a correlação das concentrações analisadas por meio do *valor-P* de (0,9796) maior do que o nível de significância 5,0 %, e pelo valor de *F* (0,0007) menor que *F_{crítico}* (5,3177), comprovando assim a robustez entre os volumes adicionados de SPADNS para o sistema proposto.

Utilizando o programa de edição de imagem IrfanView - Versão 4.18, as imagens digitalizadas foram convertidas para o formato JPEG. Optou-se em salvar os arquivos no formato JPEG em qualidade de imagem de 80%, visando diminuir o tamanho do arquivo, entretanto, com menor perda de qualidade. Em cada formato de imagem avaliado, foram determinadas as concentrações de íons fluoreto e os valores comparados por ANOVA. A Tabela 23 apresenta as interações obtidas por ANOVA para a determinação das concentrações de fluoreto em água nos formatos de imagem BMP e JPEG pelo sistema proposto DIAScanner-SPADNS-RGB.

Tabela 23. ANOVA na comparação da determinação de íons fluoreto em amostras de água nos formatos de imagem BMP e JPEG

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
BPM	5	1,8834	0,37668	0,10215		
JPEG	5	1,769	0,3538	0,10298		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0013087	1	0,00131	0,01276	0,91284	5,31766
Dentro dos grupos	0,820512	8	0,10256			
Total	0,8218208	9				

Para os formatos de arquivo de imagem avaliados BMP e JPEG, obtém-se um tamanho muito menor para JPEG (185 Kb) em relação ao BMP (4225 Kb), correspondente a uma taxa de compressão de 95,6 %. Podemos confirmar a correlação das concentrações analisadas por meio do *valor-P* de (0,9128) maior do que o nível de significância de 5,0 %, e pelo valor de *F* (0,01276) menor que $F_{crítico}$ (5,31766), com mostra a Tabela 23. O resultado obtido mostrou que para o tratamento por imagem digitalizada utilizando o QuantColour, a influência proporcionada pelo parâmetro compressão não apresentou variações significativas na concentração, podendo ser aceita a possibilidade do trabalho ser realizado com imagens em JPEG.

Foi realizada também a validação dos cálculos via *software* QuantColour, comparando os valores determinados pelo programa frente aos resultados obtidos utilizando o Excel®. A Tabela 24 apresenta as interações obtidas por ANOVA para a determinação das concentrações de fluoreto em água utilizando o *software* QuantColour frente ao Excel® por meio do sistema proposto DIAScanner-SPADNS-RGB.

Tabela 24. ANOVA na comparação da determinação de íons fluoreto em amostras de água pelos softwares QuantColour e Exce®

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Vis-SPADNS	5	3,4935	0,6987	0,0688		
DIAScanner	5	3,4191	0,6838	0,0727		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0006	1	0,0006	0,0078	0,9316	5,3177
Dentro dos grupos	0,5662	8	0,0708			
Total	0,5668	9				

A validação dos cálculos por meio do *software lab-made* QuantColour frente ao Excel®, pode ser verificada por meio do *valor-P* (0,9934), maior do que o nível de significância de 5,0 %, como também pelo valor de *F* (0,0001), menor que $F_{crítico}$ (5,3177), com mostra a Tabela 24.

7. CONCLUSÃO

O sistema proposto empregando o DIAScanner-SPADNS-RGB para determinação da concentração de íons fluoreto em águas, utilizando SPADNS como reagente cromóforo mostrou-se eficiente. Os resultados empregando o DIAScanner-SPADNS-RGB tratados pelo *software* “lab-made” QuantColour utilizando a intensidade de cor R foram equivalentes aos obtidos pelos métodos de referência: potenciométrico com eletrodo de íon seletivo de fluoreto (ISEF) e espectrofotométrico (Vis-SPADNS), comprovada por meio da análise de variância.

Foi comprovada também a possibilidade de utilizar o formato JPEG para determinação das concentrações de íons fluoreto, pois utiliza-se menos espaço para armazenamento com correlação dos valores obtidos em nível de significância de 5 % frente ao formato BMP.

Os cálculos realizados pelo *software* QuantColour foram validados frente ao *software* Excel® por meio de ANOVA, já que os valores não apresentaram diferença significativa em nível de 95 % de confiança.

Considerando a ocorrência de grande número de trabalhos relacionados ao controle da concentração de íons fluoreto em águas, destaca-se a versatilidade da instrumentação, a robustez, a pequena quantidade de reagentes utilizada, os baixos custos de implementação comparando-se ao espectrofotômetro e potenciômetro com eletrodo íon seletivo de fluoreto, associado ao pequeno intervalo de tempo para análise das amostras, já que permite analisar 96 amostras simultaneamente, tornam o sistema DIAScanner-SPADNS-RGB proposto interessante.

A seguir são apresentadas sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros dentro da mesma linha de pesquisa:

- Desenvolver o *software* QuantColour para as plataformas Android e IOS utilizadas para *smartphones*;
- Desenvolver o sistema de captura de imagens para *smartphones*;
- No método colorimétrico, estudar outros reagentes para fluoreto que não utilizem o composto tóxico arsenito como componente;
- Incluir ao *software* QuantColour funções de edição de imagens;
- Aproveitar o sistema DIAScanner-RGB desenvolvido em outras aplicações analíticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. C.; VASCONCELOS, M. M.V. B. Motivação, cooperação e comunicação na promoção de saúde bucal e prevenção da cárie dentária. **International Journal of Dentistry**, v. 7, p. 116-124, 2008.

ANTES, F. G.; PEREIRA, J. S. F.; SPADOA, L. C.; MULLER, E. I., FLORES, E. M.; DRESSLER, V. L. Fluoride Determination in Carbon Nanotubes by Ion Selective Electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1193-1198, 2012.

ACHARYA, T.; RAY, A. K. **Image Processing - Principles and Applications**. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2005.

BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 836-845, 2007.

BELLÉ, B. L. L.; LACERDA, V. R.; CARLI, A. D. D.; AZFALON, E. J.; PEREIRA, P. Z. Análise da fluoretação da água de abastecimento público da zona urbana do município de Campo Grande. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, p. 1261-1266, 2009.

BORGES, T. S.; SCHWANKE, N. L.; REUTER, C. P.; NETO, L. K.; BURGOS, M. S. Fatores associados à cárie: pesquisa de estudantes do sul do Brasil. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 34, p. 489-494, 2016.

Brasil, CONAMA, Resolução n.º 357, Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União 2015.

Brasil, Ministério da Saúde, Portaria n.º 685/Bsb, de 25 de dezembro de 1975, Aprova as normas e padrões sobre a fluoretação da água dos sistemas públicos de abastecimento, destinada ao consumo. Diário Oficial da União 1976.

Brasil, Ministério da Saúde, Resolução RE n.º 899, de 29 de maio de 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União 2003.

BRATOVČIĆ, A.; ODOBAŠIĆ, A.; ĆATIĆ, S. The Advantages of the Use of Ion-Selective Potentiometry in Relation to UV/VIS Spectroscopy. **Agriculturae Conspectus Scienti**, v. 74, p. 139-142, 2009.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: Avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, p. 564-573, 2014.

CARVALHO, R. B.; MEDEIROS, U. V.; SANTOS, K. T.; FILHO, A. C. P. Influência de diferentes concentrações de flúor na água em indicadores epidemiológicos de saúde/doença bucal. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 164, p. 3059-3518, 2011.

CASCAES, A. M.; KAMIMURA, L. C. B.; PERES, K. G.; PERES, M. A. Conhecimento sobre uso de fluoretos em saúde bucal coletiva entre coordenadores municipais de saúde bucal do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 1, p. 89-98, 2012.

CHAVALI, R.; GUNDA, N. S. K.; NAICKER, S.; MITRA, S. Rapid detection of fluoride in potable water using a novel fluorogenic compound 7-O-tert-butyldiphenylsilyl-4-methylcoumarin. **Analytical Chemistry Research**, v. 6 p. 26-31, 2015.

CHEN, S., LI, B., LIN, S., HUANG, Y., ZHAO, X., ZHANG, M., XIA, Y., FANG, X., WANG, J., HWANG, S. E YU, S. Change of urinary fluoride and bone metabolism indicators in the endemic fluorosis areas of southern china after supplying low fluoride public water. **BMC Public Health**, v. 13, p. 156-166, 2013.

CREMON, C.; JÚNIOR, E. J. R.; SERAFIM, M. E.; ONO, F. B. Análise micromorfométrica de agregados de um latossolo vermelho distroférrico em diferentes sistemas de manejo. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, p. 139-146, 2009.

DALEN, G. V. Determination of the size distribution and percentage of broken kernels of rice using flatbed scanning and image analysis. **Food Research International**, v.37, p. 51–58, 2004.

DAMASCENO, D.; TOLEDO, T. G.; GODINHO, M. S.; SILVA, C. P.; OLIVEIRA, S. B.; OLIVEIRA, A. E. Análise multivariada de imagens na Química: Um experimento para determinação do pH de águas potáveis. **Química Nova**, v. 38, p. 836-841, 2015.

DAREI, H.; MALEKI, A.; MAHVI, A. H.; ALEI, L.; REZAEE, R.; GHAHREMANI, E.; MIRZAEI, N. Simultaneous Determination of Inorganic Anions in Bottled Drinking Water by the Ion Chromatography Method. **Journal of Water Chemistry and Technology**, v. 37, p. 253-257, 2015.

DAS, N.; PATTANAIK, P.; DAS, R. Defluoridation of drinking water using activated titanium rich bauxite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 292, p. 1-10, 2005.

DOVIDAUSKAS, S.; OKADA, I. A.; OKADA, M. M. BRIGANTI, R. T.; OLIVEIRA, C. C. Determinação de fluoreto em baixas concentrações: validação de método com eletrodo íon seletivo para análise da água utilizada na preparação de soluções de diálise. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, p. 347-360, 2015.

KWON, S. M.; SHIN, H. S. Sensitive determination of fluoride in biological samples by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with 2-(bromomethyl) naphthalene. *Analytica Chimica Acta*, v. 852, p. 162-167, 2014.

LI-JIE, Y.; DE-SHENG, L.; GUAN-LING, Z. Automatic Image Segmentation Base on Human Color Perceptions. **I.J. Image, Graphics and Signal Processing**, v. 1, p. 25-32, 2009.

FAWELL, J.; BAILEY, K.; CHILTON, J. DAHI, E.; FEWTRELL, L.; MAGARA, Y. Fluoride in Drinking-water, TJ International, Cornwall, 1^a ed., 2006.

FENG, L.; LI, H.; LV, Y.; GUAN, Y. Colorimetric and “turn-on” fluorescent determination of Cu²⁺ ions based on rhodamine–quinoline derivative. **The Royal Society of Chemistry**, V. 137, P. 5829-5833, 2012.

FERNÁNDEZ-OLIVERAS, A.; POZO, A. M.; RUBIÑO, M. Speckle-Based Modulation Transfer Function Measurements for Comparative Evaluation of CCD and CMOS Detector Arrays. **Optical Review**, v. 20, p. 41-49, 2013.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 2008.

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

FORTE, F. D. S.; FREITAS, C. H. S.; SAMPAIO, F. C.; JARDIM, M. C. A.M. Fluorose dentária em crianças de Princesa Isabel, Paraíba. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, p. 87-90, 2001.

FRAZÃO, P.; PERES, M. A.; CURY, J. A. Qualidade da água para consumo humano e concentração de fluoreto. **Revista Saúde Pública**, v. 45, p. 964-973, 2011.

GODINHO, M. S.; PEREIRA, R. O.; RIBEIRO, K. O.; SCHIMIDT, F.; OLIVEIRA, A. E. Classificação de refrigerantes através de análise de imagens digitais e análise de componentes principais (PCA). **Química Nova**, v. 31, p. 1485-1489, 2008.

GODOY, L. J. G.; YANAGIWARA, R. S.; BÔAS, R. L. V.; BACKERS, C.; LIMA, C. P. Análise da imagem digital para estimativa da área foliar em plantas de laranja pêra. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 420-424, 2007.

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. **Química Nova**, v. 31, p. 1577-1581, 2008.

GONÇALVES, A. C.; SILVA, P. D. S.; SINIMBU, C. M. B., MAGALHÃES, A. C. C.; NASCIMENTO, L. S. Estudo da prevalência da fluorose dentária em um grupo de escolares de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, p. 37-42, 2013.

GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E. **Digital Image Processing**. 1ª. ed., Edgard Blücher, p. 509, 1992.

GRASEL, F. S.; MARCELO, M. C. A.; FERRÃO, M. F. A non-destructive, rapid and inexpensive methodology based on digital images for the classification of natural tannin extracts. **The Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 32358-32364, 2016.

GUPTA, N.; GUPTA, N.; CHHABRA, P. Image Diagnosis: Dental and Skeletal Fluorosis. **The Permanente Journal**, v. 20, p. 105-106, 2016.

HAIR Jr. J. F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. **Análise multivariada de dados**. 5^o ed., Porto Alegre, Bookman, 2005.

HAMAD, L. M.; ELLISON, C. D.; KHAN, M. A.; LYON, R. C. Drug Product Characterization by Macropixel Analysis of Chemical Images. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 3390-3401, 2007.

HYPOLITO, R.; EZAKI, S; PÉREZ-AGUILAR, A. Fluoreto nas águas subterrâneas dos aquíferos Tubarão e Cristalino, região de Salto-Indaiatuba (SP). **Revista Escola de Minas**, v. 63, p. 715-726, 2010.

HUANG, H. W., ZHANG, Y. Flame colour characterization in the visible and infrared spectrum using a digital camera and image processing. **Measurement Science and Technology**, v. 19, p. 1-9, 2008.

JEFREY, G.H.; BASSET,J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. **Vogel Análise Química Quantitativa**, 5^a ed., Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 1992.

JESUS, G. A.; SILVA, L. M.; ARREBOLA, T. M. Avaliação dos teores de fluoreto na água potável distribuída pela concessionária CESAN que abastece o município de Vitória/ES. **Vértices**, v. 7, p. 129, 2005.

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

LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5^a ed. inglesa. Editora Edgard Blücher Ltda. pp. 24, 217, 360-370. 1999.

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

LOSSO, E. M.; TAVARES, M. C.; SILVA, J. Y.B.; URBAN, C. A. Severe early childhood caries: an integral approach. **Jornal de Pediatria**, v. 85, p. 295-300, 2009.

LU, G.; YAN, Y.; COLECHIN, M. A Digital Imaging Based Multifunctional Flame Monitoring System. **IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement**, v. 53, p. 1152-1158, 2004.

MACHADO, A. W.; SOUKI, B. Q. Simplificando a obtenção e a utilização de imagens digitais - scanners e câmeras digitais. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 9, p. 133-156, 2004.

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

MARAVÉ, F.; VITÓRIA, I.; ALMERICH-SILLA, J. M.; ARMIJO, F. Fluoruro en aguas minerales naturales envasadas en España y prevención de la caries dental. **Atención Primaria**, v. 47, p. 15-24, 2015.

FILHO, O. M.; NETO, H. V. **Processamento Digital de Imagens**. Brasport, Rio de Janeiro, 1999.

MARSUNAGA, H.; KANNO, C.; YAMADA, H.; TAKAHASHI, Y.; SUZUKI, T. M. Fluorometric determination of fluoride ion by reagent tablets containing 3-hydroxy-2-sulfoflavone and zirconium (IV) ethylenediamine tetraacetate. **Talanta**, v. 68, p. 1000-1004, 2006.

MASAWAT, P.; HARFIELD, A.; NAMWONG, A. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk. **Food Chemistry**, v. 184, p. 23-29, 2015.

MEDEIROS, C. M.; ZERBINI, T.; SÁ, E. C., BAPTISTA, P. A. L.; ANDRADE, R. M.; CINTRA, R. B. Deposição óssea por fluoreto de alumínio: intoxicação ocupacional? **Revista Brasileira Medicina do Trabalho**, v. 13, p. 13-6, 2014.

MOIMAZ, S. A. S.; SLIBA, O.; GARBIN, C. A. S.; SUMIDA, D. H.; CHIBA, F. Y.; CORRÊA, M. V.; SALIBA, N. A. Fluoretação das águas de abastecimento público no município de Araçatuba/SP. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 33, p. 54-60, 2012.

MONEMI, N.; RAMANATHAN, K; LARSSON, P. O.; DANIELSSON, B.; BENGMARK, S.; KHAYYAMI, M. CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein. **Analytica Chimica Acta**, v. 387, p. 21-27, 1999.

MORAIS, C. L. M.; LIMA, K. M. G. A colorimetric microwell method using a desktop scanner for biochemical assays. **Talanta**, v. 126, p. 145-150, 2014.

MORAIS, C. L. M.; LIMA, K. M. G. Determination and analytical validation of creatinine content in serum using image analysis by multivariate transfer calibration procedures. **Analytical Methods**, v. 7, p. 6904-6910, 2015.

MORITZ, A. R. Existe cor em nossas vidas – **A colorimetria aplicada em nossos dias**. 1ª ed., BrasEq, Virgínia, 2011. (176p)

MOTTER, J.; MOYSES, S. T.; FRANÇA, B. H. S.; CARVALHO, M. L.; MOYSÉS, S. J. Análise da concentração de flúor na água em Curitiba, Brasil: comparação entre técnicas. **Rev. Panam Salud Publica**, v. 29, p. 120, 2011.

MOURA, M. S.; BARBOSA, P. R. R.; NUNES-DOSSANTOS, D. L.; DANTAS-NETA, N. B.; MOURA, L. F. A. D., LIMA, M. D. M. Vigilância epidemiológica da fluorose dentária em município de clima tropical com água de abastecimento público fluoretada. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 1247-1254, 2016.

NARVAI, P. C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 5, p. 381-392, 2000.

NOH, J.H.; COETZEE, P. Evaluation of the potentiometric determination of trace fluoride in natural and drinking water with a fluoride ISE. **Water SA**, v. 33, p. 509-530, 2007.

OLAKA, L. A.; WILKE, F. D. H., OLAGO, D. O.; ODADA, E. O., MULCH, A., MUSOLFF, A. Groundwater fluoride enrichment in an active rift setting: Central Kenya Rift case study. **Science of the Total Environment**, v. 545, p. 641-653, 2016.

OMENA, L. M.F.; SILVA, M. F. A.; PINHEIRO, C. C.; CAVALCANTE, J. C., SAMPAIO, F. C. Fluoride intake from drinking water and dentifrice by children living in a tropical área os Brazil. **Journal of Applied Oral Science**, v. 14, p. 382-387, 2006.

PANIZZI, M.; PERES, M. A. Dez anos de heterocontrole da fluoretação de águas em Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 2021-2031, 2008.

PARHAM, H.; RAHBAR, N. Solid phase extraction–spectrophotometric determination of fluoride in water samples using magnetic iron oxide nanoparticles. **Talanta**, v. 80, p. 664-669, 2009.

PARTHIBAN, C.; ELANGO, K. P. Amino-naphthoquinone and its metal chelates for selective sensing offluoride ions. **Sensors and Actuators**, v. 215, p. 544–552, 2015.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

PIRES, L. D.; MACÊDO, J. A. B.; ROCHA, H. V. A.; LIMA, D. C.; VAZ, U. P.; OLIVEIRA, R. F. Determinação do índice de fluoreto em águas de abastecimento público na cidade de Juiz de Fora. **Revista de Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 7, p. 21-29, 2002.

PRADO, G. S.; CAMPOS, J. R. O emprego da análise de imagem na determinação da distribuição de tamanho de partículas da areia presente no esgoto sanitário. **Revista Engenharia Sanitária**, v.14, p. 401-410, 2008.

QUEIROZ, J. E. R.; GOMES, H. M. Introdução ao Processamento Digital de Imagens. **Revista RITA**, v. 3, p. 1-31, 2001.

RAMESH, M.; NARASIMHAN, M.; KRISHNAN, R; CHALAKKAL, P.; ARUNA, R. M.; KURUVILAH, S. The prevalence of dental fluorosis and its associated factors in Salem district. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 7, p. 203-208, 2016.

RAMIRES, I.; BUZALAF, M. A. R. A fluoretação da água de abastecimento público e seus benefícios no controle da cárie dentária – cinquenta anos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 1057-1065, 2007.

RUIZ-PAYAN, A., ORTIZ, M. E DUARTE-GARDEA, M. Determination of fluoride in drinking water and in urine of adolescents living in three counties in Northern Chihuahua Mexico using a fluoride ion selective electrode. **Microchemical Journal**, v, 81, p. 19-22, 2005.

SANTOS, C. C. M.; RODRIGUES, J. C. S.; LOPES, M. R. V.; POVINELLI, R. F.; TERRERI, A. L. M. Avaliação da concentração de flúor nas águas de abastecimento público: estudo retrospectivo e de heterocontrole. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, p. 507-153, 2012.

SANTOS, M. G. C.; SANTOS, R. C. Fluoretação das Águas de Abastecimento Público no Combate à Cárie Dentária. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, p. 75-80, 2011.

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

SANTOS, R. C.; GALO, M. Classificação de nuvem de pontos laser utilizando o conceito de análise de componentes principais e o fator de não ambiguidade. **Boletim de Ciências Geodésicas**, v. 22, p. 196-216, 2016.

SARRAFZADEH, M. H.; LA, H. J.; LEE, J. Y., CHO, D. H.; SHIN, S. Y.; KIM, W. J.; OH, H. M. Microalgae biomass quantification by digital image processing and RGB color analysis. **Journal Of Applied Phycology**, v. 27, p. 205-209, 2015.

SCURI, A. E. **Fundamentos da Imagem Digital**. Tecgraf-PUC, Rio de Janeiro, 1999.

SHEN, J.; GAGLIARDI, S.; MCCOUSTRA, M. R. S., ARRIGHI, V. Effect of humic substances aggregation on the determination of fluoride in water using an ion selective electrode. *Chemosphere*, v. 159, p. 66-71, 2016.

SHISHKIN, Y. L.; DMITRIENKO, S. G.; MEDVEDEVA, O. M.; BADAKOVA, S. A.; PYATKOVA, L. N. Use of a Scanner and Digital Image-Processing Software for the

Quantification of Adsorbed Substances. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 59, p. 119-124, 2004.

SILVA, L. F. B., DEUS, A. G., ALVES, J. C., PINESE, J. P. P. Teores de flúor nas águas de abastecimento público de Londrina (PR) no ano de 2011. **Geographia Opportuno Tempore**, v. 1, p. 380-397, 2014.

SINGH, T. P.; MAJUMDER, C. B. Removal of fluoride using groundnut shell in batch reactor: Kinetics and equilibrium studies. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 603-613, 2015.

SOUZA, F. R.; JUNIOR, G. F. D.; GARCIA, P. T.; COLTRO, W. K. T. Utilização de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. **Química Nova**, Vol. 37, No. 7, 1171-1176, 2014.

SOUZA, L. A. C.; SPEHAR, C.R.; SANTOS, R. L. B. Análise de imagem para determinação do teor de saponina em quinoa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**. v. 39, n. 4, p. 397-401, 2004.

SOUZA, M. O.; RAINHA, K. P.; CASTRO, E. V. R.; CARNEIRO, M. T. W. D.; FERREIRA, R. Q. Análise exploratória das concentrações dos metais Na, Ca, Mg, Sr e Fe em extrato aquoso de petróleo, determinados por IPC OES, após otimização empregando planejamento de experimentos. **Química Nova**, v. XY, p. 1-7, 2015.

STANCARI, R. C. A.; JÚNIOR, F. L. D.; FREDDI, F. G. Avaliação do processo de fluoretação da água de abastecimento público nos municípios pertencentes ao Grupo de Vigilância Sanitária XV-Bauru, no período de 2002 a 2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, p. 239-248, 2014.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association (APHA), 20^o ed., Washington, 1999.

TAGHIPOUR, N.; AMINI, H.; MOSAFERI, M.; YUNESIAN, M.; POURAKBAR, M.; TAGHIPOUR, N. National and sub-national drinking water fluoride concentrations and prevalence of fluorosis and of decayed, missed, and filled teeth in Iran from 1990 to 2015: a systematic review. **Environ Sci. Pollut Res**, v. 23, p. 5077-5098, 2016.

TANGSIR, S.; HAFSHEJANI, L. D.; LAHDE, A.; MALJANEN, M.; HOOSHMAND, A.; NASERI, A. A.; MOAZED, H.; JOKINIEMI, J.; BHATNAGAR, A. Water defluoridation using Al_2O_3 nanoparticles synthesized by flame spray pyrolysis (FSP) method. **Chemical Engineering Journal**, v. 288, p. 198, 2016.

THANAKIATKRAI, P.; YAODAM, A.; KITPIPIT, T. Age estimation of bloodstains using smartphones and digital image analysis. **Forensic Science International**, v. 233, p. 288–297, 2013.

TOASSI, R. F. C.; KUHNEN, M.; CISLAGHI, G. A.; BERNARDO, J. R. Heterocontrole da fluoretação da água de abastecimento público de Lages, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 727-732, 2007.

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

VERMA, M. L.; VERMA, A. Study of membrane morphology of SEM image of polymer nanocomposite membrane by digital Image processing. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 1, p. 1332-1336, 2015.

VILLENA, R. S.; BORGES, D. G.; CURY, J. A. Avaliação da concentração de flúor em águas minerais comercializadas no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 30, p. 512-8, 1996.

WHO, **Guidelines for drinking-water quality**, 4^a ed., Malta, Gutenberg, 2011.

WONGWILAI, W.; LAPANANTNOPPAKHUN, S.; GRUDPAN, S.; GRUDPAN, K. Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach. **Talanta**, v. 81, p. 1137-1141, 2011.

WU, Y. C.; HUO, J. P.; CAO, L.; DING, S. WANG, L. Y.; CAO, D.; WANG, Z. Y. Design and application of tri-benzimidazolyl star-shape molecules as fluorescent chemosensors for the fast-response detection of fluoride ion. **Sensors and Actuators**, v. 237, p. 865–875, 2016.