

Artigo

Uso de Imagens Digitais e Análise de Componentes Principais na Identificação dos Níveis de Cr (VI) em Amostras de Solos

Oliveira, L. F.; Canevari, N. T.; Jesus, A. M. D.; Pereira-Filho, E. R.*

Rev. Virtual Quim., 2013, 5 (2), 169-178. Data de publicação na Web: 22 de março de 2013

<http://www.uff.br/rvq>

Use of Digital Images and Principal Component Analysis for the Identification of Cr (VI) Levels in Soil Samples

Abstract: The proposition of simple and rapid methods for the identification of Cr (VI) levels in soil samples is desirable to guide remediation strategies. The aim of the present study was to develop a method for soils samples identification with Cr (VI) concentrations exceeding the values specified by international legislations. A soil sample was spiked with Cr (VI) concentrations varying from 0 to 20 mg kg⁻¹ (total of 61 fortifications) and subsequently submitted to an alkaline extraction. The extracts were deposited in Petri plates and diphenylcarbazide 0.2 % (m v⁻¹) as colorimetric reagent and H₂SO₄ (5 mol L⁻¹) for pH adjustment were added. After color development, the plates were placed in a commercial scanner and images of their bottom part were acquired. The images were treated with computer programs to calculate the following color descriptors: R, G, B, H, S, V, r, g, b, L and an analysis by PCA (Principal Component Analysis) was performed. There was a good separation between values above and below the Italian legislation, which specifies a maximum value of 2.0 mg kg⁻¹ for Cr (VI). Also were used the Cr (VI) values set by legislation of Canada and Sweden were used and, in general, the images allowed the identification of levels of Cr (VI) for these countries. Furthermore, through the visual analysis of PCA it is possible to state that digital images have potential to be used for the proposition of classification models.

Keywords: Digital images; scanner; principal component analysis; hexavalent chromium; soils.

Resumo

A proposição de métodos simples e rápidos para a identificação dos níveis de Cr (VI) em amostras de solos é desejável para nortear estratégias de remediação. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um procedimento para a identificação de amostras de solos com concentrações de Cr (VI) superiores aos valores estabelecidos pelas legislações internacionais. Uma amostra de solo foi fortificada com concentrações de Cr (VI) que variaram de 0 a 20 mg kg⁻¹ (total de 61 fortificações) e posteriormente submetidas a extração alcalina. Os extratos foram colocados em placas de Petri, aos quais se adicionou difenilcarbazida 0,2 % (m v⁻¹) como reagente colorimétrico e H₂SO₄ (5 mol L⁻¹) para o ajuste do pH. Após o desenvolvimento da coloração, as placas foram posicionadas em um scanner comercial e obtidas imagens da parte inferior. As imagens foram tratadas com programas computacionais para cálculo dos seguintes descritores de cores (R, G, B, H, S, V, r, g, b e L) e, efetuou-se uma análise por ACP (Análise de componentes principais - *Principal Component Analysis*). Houve uma boa separação entre os valores acima e abaixo da legislação italiana, a qual define um valor máximo de 2,0 mg kg⁻¹ para Cr (VI). Também foram utilizados os valores de Cr (VI) das legislações do Canadá e da Suécia e, em geral, as imagens permitiram a identificação dos níveis de Cr (VI) para estes países. Através da análise visual da ACP é possível afirmar que as imagens digitais são passíveis de uso para a proposição de modelos de classificação.

Palavras-chave: Imagens digitais; scanner; análise de componentes principais; cromo hexavalente; solos.

* Universidade Federal de São Carlos, Grupo de Análise Instrumental Aplicada, Departamento de Química, Rod. Washington Luiz, km 235, Caixa Postal 676, CEP 13565-905, São Carlos - SP.

✉ erpf@ufscar.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20130019](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130019)

Uso de Imagens Digitais e Análise de Componentes Principais na Identificação dos Níveis de Cr (VI) em Amostras de Solos

Luciana F. Oliveira, Natália T. Canevari, Amanda M. D. Jesus, Edénir R. Pereira-Filho*

Universidade Federal de São Carlos, Grupo de Análise Instrumental Aplicada, Departamento de Química, Rod. Washington Luiz, km 235, Caixa Postal 676, CEP 13565-905, São Carlos - SP.

* erpf@ufscar.br

Recebido em 24 de agosto de 2012. Aceito para publicação em 28 de outubro de 2012

1. Introdução

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes e soluções

2.2. Extração alcalina e identificação das concentrações de Cr (VI)

2.3. Fortificações e obtenção das imagens

3. Resultados e discussão

4. Conclusões

1. Introdução

Estudos toxicológicos e bioquímicos ganham cada vez mais importância ao mostrarem que o estado de oxidação em que um determinado elemento é introduzido no ambiente é importante para os organismos vivos.¹ O interesse pela especiação redox do elemento cromo está relacionada com as diferenças existentes entre suas espécies mais abundantes e estáveis, Cr(III) e Cr(VI). Essas espécies apresentam diferentes propriedades físico-químicas. O Cr(III) é considerado essencial para o funcionamento adequado dos organismos vivos, e o Cr(VI) é muito tóxico para sistemas biológicos.^{2,3}

As atividades antrópicas são a fonte a principal de contaminação de Cr em solos.

Este elemento e seus compostos derivados são empregados em diversos processos industriais. Efluentes industriais contaminados com Cr(VI) representam um sério problema ambiental. Vários países estabeleceram limites de concentração específicos para Cr(VI) em amostras de solo. Por exemplo, no Canadá é tolerado até 0,4 mg kg⁻¹ de Cr(VI) em solos destinados à agricultura, áreas verdes e residenciais. Este limite aumenta para 1,4 mg kg⁻¹ para solos com fins comerciais e industriais. Na Itália as concentrações máximas permitidas para áreas verdes e regiões industriais são iguais a, respectivamente, 2 e 15 mg kg⁻¹, e na Suécia o limite é de 5 mg kg⁻¹ para Cr(VI).⁴

No Brasil a legislação não definiu, ainda, um valor de referência para Cr (VI). Em São Paulo, a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) classifica os

valores orientadores para solo como: (1) Valor de Referência de Qualidade (VRQ) - concentração de determinada substância que define o solo como limpo; (2) Valor de Prevenção (VP) - concentração acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e (3) Valor de Intervenção (VI) - concentração de determinada substância acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, e se subdivide em agrícola-área de proteção máxima, residencial e industrial. Para o Cr total, esses valores são iguais a 40, 75, 150, 300 e 400 mg kg⁻¹, respectivamente.⁵ Como a legislação brasileira não faz menção aos valores de Cr (VI) ou (III), neste trabalho utilizou-se a legislação de outros países como valores de referência. O objetivo deste trabalho não é estudar os solos destes diferentes países, e sim mostrar a potencialidade do uso de imagens digitais em combinação com ferramentas quimiométricas para o estudo de solos impactados com espécies de Cr(VI).

Diferentes métodos de especiação de Cr de baixo custo, alta sensibilidade e reduzida geração de resíduos são descritos na literatura.⁶⁻¹⁰ O desenvolvimento de métodos que empregam a análise por imagens digitais é comum em diversos domínios do conhecimento, inclusive na química analítica. As aplicações variam de determinações de metais em diversas matrizes,¹¹⁻¹⁴ controle de qualidade de alimentos,¹⁵⁻¹⁸ monitoramento ambiental,^{19,20} entre outros.²¹⁻²⁴

Kompany-Zareh e colaboradores¹² desenvolveram um método para determinação de Fe (III) em amostras de aço utilizando um scanner. O método foi baseado na reação colorimétrica entre o analito e o íon tiocianato. Os autores aperfeiçoaram parâmetros como contraste, brilho, resolução da imagem (pontos por polegada; dpi= *dots per inch*), entre outros. Para calibração, os autores utilizaram redes neurais e através dos resultados obtidos ficou evidente que as imagens poderiam ser utilizadas, uma vez que os erros relativos foram inferiores a 4%.

Através de reação colorimétrica e com um scanner de mesa, Paciornick e

colaboradores¹³ determinaram Hg em amostras de peixes. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles gerados por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor a frio (CV AAS, *Cold Vapor AAS*). Os autores utilizaram três modelos de cores diferentes para interpretação dos dados (RGB, CYM e HLS) e o modelo HSL ou HSV, matiz (H - *hue*), saturação (S - *saturation*) e luminosidade ou valor (L - *luminosity* ou V - *value*), mais especificamente o componente matiz mostrou os melhores resultados. O limite de detecção da técnica proposta foi de 0,007 mg g⁻¹.

Franco e colaboradores⁷ utilizaram a reação colorimétrica entre Cr e difenilcarbazida para análises de Cr (VI) em campo. As concentrações avaliadas pelos autores variaram de 10 a 150 mg kg⁻¹ de Cr (VI). As extrações foram conduzidas em meio alcalino com a mistura de NaOH (0,28 mol L⁻¹) e Na₂CO₃ (0,5 mol L⁻¹) à temperatura ambiente. As concentrações foram determinadas a olho nu comparando-se com soluções de referência nas faixas de concentração: < 10 mg kg⁻¹; entre 10 e 40 mg kg⁻¹; entre 40 e 150 mg kg⁻¹ e maior que 150 mg kg⁻¹. Foram obtidas recuperações satisfatórias e os autores destacaram como vantagens do método a rapidez, o baixo custo, entre outras características operacionais.

O objetivo do presente estudo é desenvolver um procedimento para a identificação de amostras de solos com concentrações de Cr (VI) superiores aos valores estabelecidos pelas legislações internacionais, a partir da análise de imagens digitais adquiridas com o emprego de uma impressora multifuncional. Estas imagens foram tratadas com programas computacionais, sendo também realizada a Análise de Componentes Principais.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes e soluções

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

Solução estoque contendo 1000 mg L⁻¹ de Cr (VI) foi preparada dissolvendo-se 1,41 g de K₂Cr₂O₇ (Synth, São Paulo, Brasil), previamente seco a temperatura de 160 °C durante 2 h, em 500 mL de água desionizada. Os reagentes químicos: hidróxido de sódio, acetona, ácido sulfúrico 98% (m m⁻¹) e 1,5-difenilcarbazida foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

As soluções de difenilcarbazida 0,2% (m v⁻¹) foram preparadas diariamente, dissolvendo-se 0,2 g do reagente em aproximadamente 10 mL de acetona e o volume final ajustado para 100 mL com água desionizada. A solução foi armazenada em frasco âmbar para evitar a degradação pela ação da luz.

2.2. Extração alcalina e identificação das concentrações de Cr (VI)

Para extração de Cr (VI) foi utilizada uma solução alcalina de NaOH 0,1 mol L⁻¹.²⁵ Esta solução foi preparada dissolvendo-se 4g de hidróxido de sódio em 1 L de água desionizada. O meio alcalino foi escolhido por minimizar os riscos de redução do Cr (VI) a Cr (III).⁴

Uma massa de aproximadamente 2g de amostra de solo foi pesada em frasco Erlenmeyer, ao qual se adicionou 15 mL de

solução extratora. A mistura foi colocada em uma chapa aquecedora (208-2D, Nova Ética, São Paulo, Brasil), sendo realizada a extração a uma temperatura de 90 °C, durante 60 min, com agitação esporádica.^{4,25} Quando os frascos atingiram a temperatura ambiente, a massa final foi ajustada para 15 g e 10 mL do extrato foram transferidos para tubos plásticos e centrifugados (Hermle Z200A, Labnet, Woodbridge, EUA) por 10 min a 3500 rpm.

Para a identificação das concentrações de Cr (VI) adicionou-se 500 µL de difenilcarbazida 0,2% (m v⁻¹) em 5 mL da solução sobrenadante proveniente da extração alcalina. Como a reação da difenilcarbazida com o Cr (VI) ocorre em meio ácido (pH igual a 1), adicionou-se em seguida 200 µL de H₂SO₄ (5 mol L⁻¹) para ajuste do pH. As concentrações de Cr (VI) foram determinadas utilizando-se imagens digitais, conforme será discutido nas próximas seções.

2.3. Fortificações e obtenção das imagens

Para estes experimentos foi utilizada uma amostra de solo com baixa concentração de Cr (VI). Esta amostra foi caracterizada como tendo 43% de areia, 29% de silte e 28% de argila (m m⁻¹), além de 7,2 g kg⁻¹ de carbono orgânico total (COT). Mais informações podem ser obtidas no artigo publicado por Guerra e colaboradores,²⁶ sendo a amostra em questão identificada como “amostra 6”. Desta forma, foram realizadas fortificações nesta amostra com base nas legislações vigentes de países que estabelecem limites para essa espécie de metal pesado.⁴

No total foram realizadas 61 extrações, incluindo as réplicas da amostra não fortificada e as que foram fortificadas com diversas concentrações conhecidas de Cr. Após a pesagem de aproximadamente 2 g de amostra, foram adicionados diferentes volumes de solução estoque 1000 mg L⁻¹ de Cr (VI) e, em seguida, procedeu-se as etapas de extração alcalina e identificação de Cr (VI).

As concentrações de Cr (VI) finais a partir das fortificações realizadas variaram de 0 a 20 mg kg⁻¹. As concentrações finais adicionadas e os

números de réplicas estão especificados na Tabela 1.

Tabela 1. Número de réplicas autênticas preparadas para diferentes concentrações de Cr (VI) adicionadas (concentrações variando de 0 a 20 mg kg⁻¹)

Cr (VI) adicionado (mg kg ⁻¹)	Número de réplicas autênticas para cada concentração
0	4
0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0 e 8,0	3
0,6; 1,2; 1,4; 1,6; 6; 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	2
17, 18, 19 e 20	1

Para aquisição das imagens digitais, as placas de Petri contendo as soluções dos extratos foram diretamente posicionadas no vidro de uma impressora multifuncional (Deskjet F4180, Hewlett-Packard, Brasil) e as imagens coletadas com uma resolução de 300 dpi na escala de cores RGB. Os ajustes automáticos do programa de digitalização foram desabilitados. Dois aparatos, sendo um branco e outro preto, foram utilizados simultaneamente, o primeiro para permitir a reflexão da luz (uma vez que as soluções eram translúcidas) e o segundo (acima do primeiro) para evitar interferência da iluminação ambiente.²⁷

A cada digitalização foi possível obter imagens de 6 extratos diferentes, uma vez que este era o número máximo de placas de Petri que poderiam ser simultaneamente colocadas diretamente no vidro da impressora multifuncional. Foi utilizado um gabarito de papel cartão para que as posições fossem sempre as mesmas, o que facilitava o tratamento das imagens. Os extratos eram colocados aleatoriamente nas 6 posições. Anteriormente ao tratamento dos dados, as

imagens eram recortadas com tamanho de 301 x 301 *pixels*.

Com o intuito de evitar a interferência da coloração original dos extratos, foram obtidas imagens sem a adição de difenilcarbazida. O procedimento geral está apresentado na Figura 1. As imagens digitais obtidas foram tratadas matematicamente usando o programa Matlab 2009a (The Math Works Inc., Natick, EUA) e os valores médios de dez descritores de cores foram calculados de acordo com Cantrell e colaboradores²⁸ para vermelho (R - red), verde (G - green), azul (B - blue), matiz (H - hue), saturação (S - saturation), valor (V - value), cores relativas (r, g e b) e luminosidade (L).

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

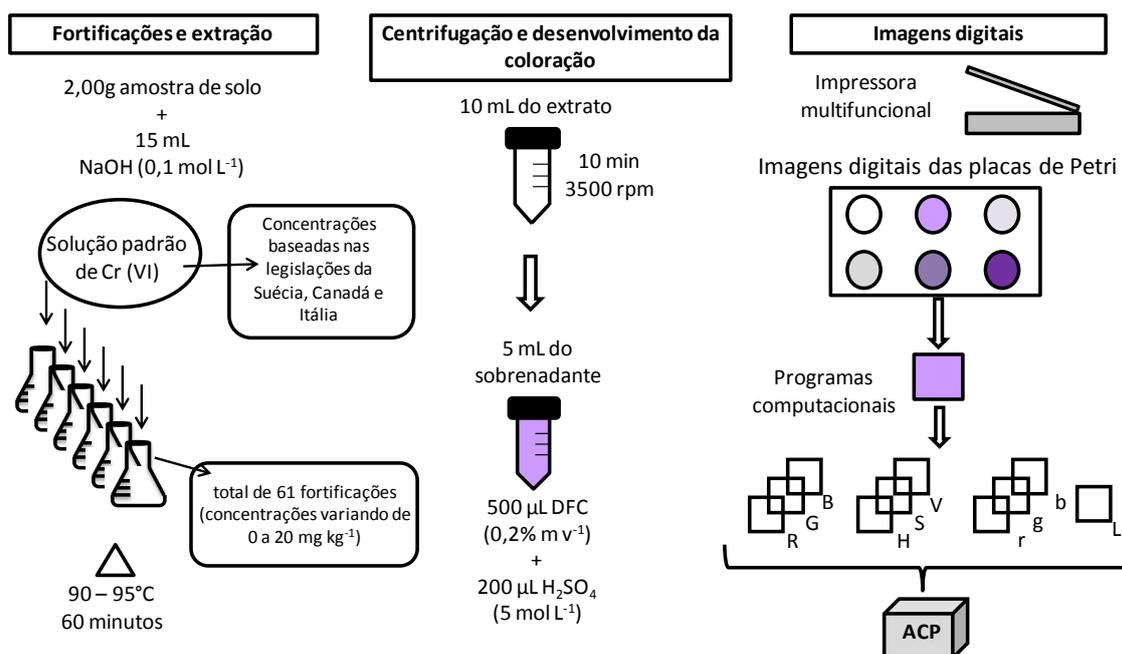


Figura 1. Esquema geral do procedimento aplicado para extração e identificação dos níveis de Cr (VI) das amostras de solo fortificadas utilizando imagens digitais

3. Resultados e discussão

Após a extração observou-se que o extrato da amostra escolhida possuía uma coloração bastante amarelada, sendo possível verificar se poderiam ser

diferenciadas amostras naturalmente coloridas. A Figura 2 mostra uma das réplicas das imagens obtidas (após a extração) para a amostra sem difenilcarbazida, amostra não fortificada e amostras fortificadas com diferentes concentrações de Cr (VI) (após a adição de difenilcarbazida).

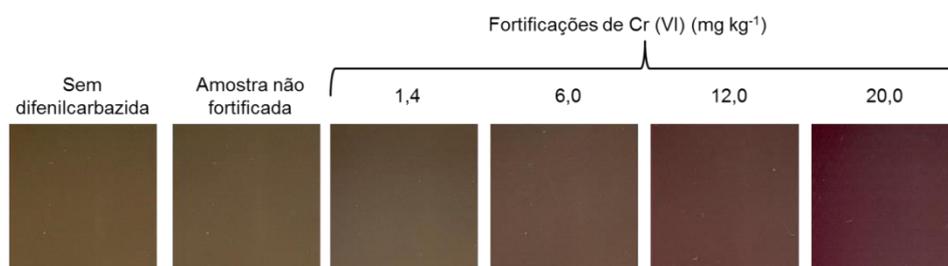


Figura 2. Imagens da amostra após a extração e fortificações com diferentes concentrações de Cr (VI)

A matriz de dados utilizada era composta de 10 colunas (variáveis – R, G, B, H, S, V, r, g, b, L) e 61 linhas (imagens das fortificações variando de 0 a 20 mg kg⁻¹). Para o cálculo da ACP apenas dois componentes principais foram necessários para reter 100% da variância dos dados. Além disso, o pré-

processamento centrado na média mostrou os melhores resultados. A Figura 3 mostra o gráfico de *loadings* para a ACP, sendo os valores de R, G, B e L as variáveis mais significativas. As variáveis G e L estão relacionadas com as baixas concentrações de

Cr (VI), já as variáveis R e B com altas concentrações desta espécie.

As Figuras 4(a) e (b) mostram os gráficos de scores para a ACP utilizando como classe

as concentrações máximas permitidas de Cr (VI) em solos para o Canadá, sendo (a) $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cr (VI) e (b) $1,4 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cr (VI).

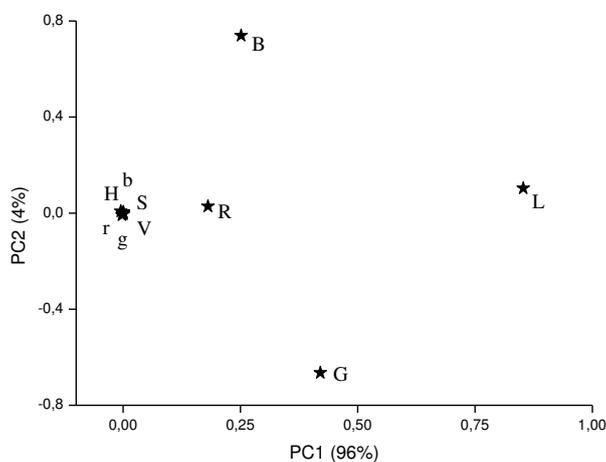


Figura 3. Gráfico de *loadings* para a ACP das imagens das fortificações

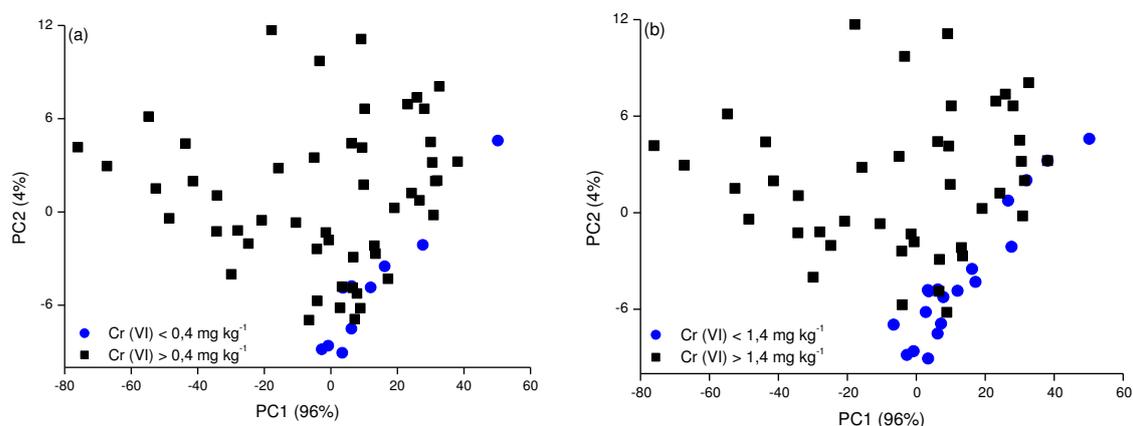


Figura 4. Gráfico de *scores* para ACP utilizando como classe as concentrações máximas permitidas de Cr (VI) em solos do Canadá

Pode-se perceber que as amostras abaixo de $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ tendem a ser confundidas com as amostras acima desse valor. Ocorre uma melhora na separação quando se analisa a concentração de Cr (VI) de $1,4 \text{ mg kg}^{-1}$, porém não há uma separação muito clara uma vez que a legislação do Canadá estipula valores muito baixos de Cr (VI) em solos. Provavelmente, na construção de um modelo de classificação supervisionado para a legislação canadense haveria um número

significativo de erros se os solos analisados estivessem próximos às faixas estipuladas.

Ao contrário da legislação canadense, a legislação italiana é bem menos restritiva, com valores que variam de 2 a 15 mg kg^{-1} de Cr (VI). As Figuras 5 (a) e (b) mostram os gráficos de *scores*, considerando como classes ambas as concentrações.

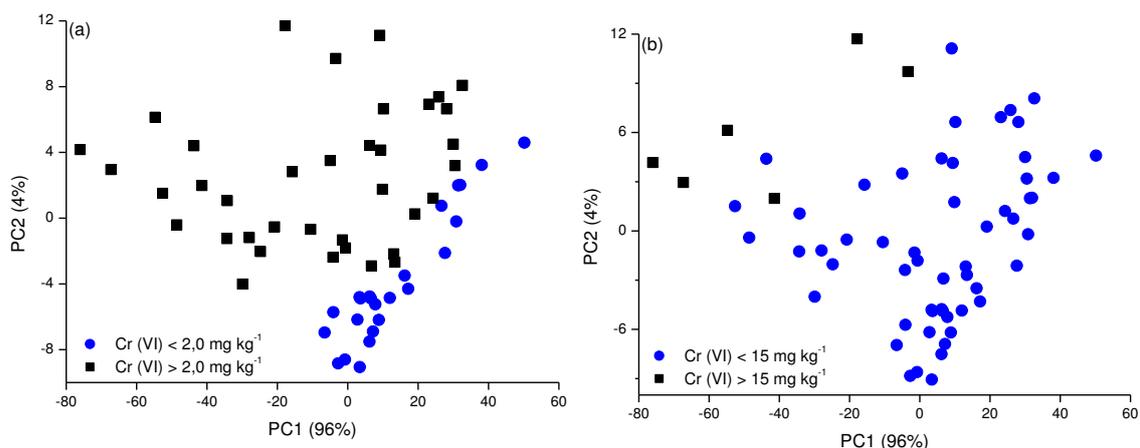


Figura 5. Gráfico de *scores* para ACP utilizando como classe as concentrações máximas permitidas de Cr (VI) em solos da Itália

Os gráficos de *scores* para a ACP utilizando as concentrações máximas permitidas de Cr (VI) em solos da Itália mostram que imagens digitais poderiam ser empregadas para a proposição de modelos de classificação supervisionada. Eles podem ser usados uma vez que houve visualmente uma boa separação entre as concentrações estipuladas por esse país para Cr (VI). Com relação à concentração de 15 mg kg⁻¹, uma

melhor separação poderia ser obtida empregando-se um maior número de amostras com concentrações acima desse valor.

Além disso, calculou-se a ACP utilizando como classe a concentração de Cr (VI) estipulada pela Suécia (5,0 mg kg⁻¹ de Cr (VI)). A nítida separação dos valores de concentração fica clara no gráfico de *scores* apresentado na Figura 6.

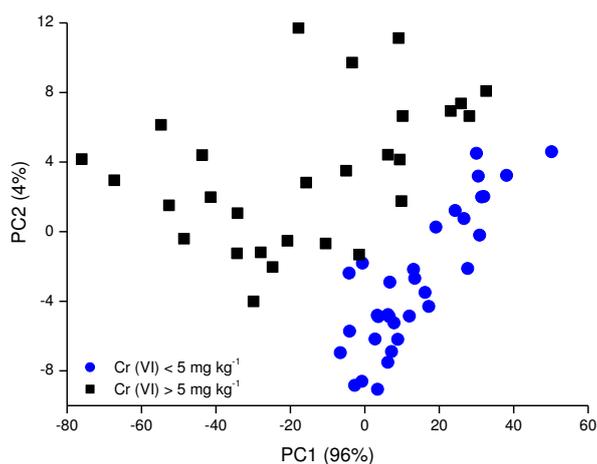


Figura 6. Gráfico de *scores* para ACP utilizando como classe a concentração máxima permitida de Cr (VI) em solos da Suécia

Com relação à Suécia, modelos de classificação supervisionada utilizando

imagens digitais também poderiam ser propostos e provavelmente não ocorreriam

erros significativos, mesmo com concentrações próximas a faixa máxima permitida de 5 mg kg⁻¹. Assim sendo, fica clara a potencialidade das imagens na proposição de modelos de classificação para identificação de Cr (VI) em amostras de solos. Além disso, os resultados foram promissores independentemente da coloração original do extrato.

4. Conclusões

As imagens digitais mostraram boa potencialidade para serem utilizadas em modelos de classificação. As fortificações e extrações de Cr (VI) realizadas com base nas legislações do Canadá, Itália e Suécia mostraram que de modo geral há uma boa separação na análise de componentes principais, principalmente quando os valores não estão próximos às faixas estabelecidas por estes países. Além disso, o uso de imagens digitais evita os erros visuais e, conseqüentemente, torna possível a identificação de amostras com baixas concentrações de Cr (VI).

Agradecimentos

Os autores são gratos à Fapesp, Capes e CNPq (Processo: 552633/2010-0) pelo apoio financeiro e pelas bolsas de estudo concedidas para o desenvolvimento deste estudo.

Referências Bibliográficas

- ¹ Mulaudzi, L. V.; van Staden, J. F.; Stefan, R. I. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *467*, 51. [CrossRef]
- ² Lee, J. D.; *Química inorgânica não tão concisa*, 5a. ed., Edgard Blücher LTDA: São Paulo, 1999.
- ³ Kotás, J.; Stasicka, Z. *Environ. Pollut.* **2000**, *107*, 263. [CrossRef]

- ⁴ Pettine, M.; Capri, S. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *540*, 231. [CrossRef]
- ⁵ Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB; Decisão de Diretoria nº 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005.
- ⁶ Andrade, J. C.; Rocha, J. C.; Pasquini, C.; Baccan, N. *Analyst* **1983**, *108*, 621. [CrossRef]
- ⁷ Franco, D. V.; Rodrigues, M. L. K.; Bavaresco, J.; Jardim, W. F. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1255. [CrossRef]
- ⁸ Potts, P. J.; Ellis, A. T.; Kregsamer, P.; Strelis, C.; Vanhoof, C.; West, M.; Wobrauschek, P. J. *Anal. At. Spectrom.* **2006**, *21*, 1076. [CrossRef]
- ⁹ Unceta, N.; Séby, F.; Malherbe, J.; Donard, O. F. X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1097. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Pires, C. K.; Reis, B. F.; Morales-Rubio, A.; de laGuardia, M. *Talanta* **2007**, *72*, 1370. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Anwar, J.; Waheed-uz-Zamam; Shafique, M. U.; Salman, M. *Anal. Lett.* **2010**, *43*, 367. [CrossRef]
- ¹² Kompany-Zareh, M.; Mansourian, M.; Ravaee, F. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *471*, 97. [CrossRef]
- ¹³ Paciornick, S.; Yallouz, A. V.; Campos, R. C.; Gannerman, D. J. *Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 156. [CrossRef]
- ¹⁴ Lopez-Molinero, A.; Liñan, D.; Sipiera, D.; Falcon, R. *Microchem. J.* **2010**, *96*, 380. [CrossRef]
- ¹⁵ Antonelli, A.; Cocchi, M.; Fava, P.; Foca, G.; Franchini, G. C.; Manzini, D.; Ulrici, A. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *515*, 3. [CrossRef]
- ¹⁶ Medina, W.; Skurtys, O.; Aguilera, J. M. *LWT – Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 238. [CrossRef]
- ¹⁷ Torrence, R.; Wright, R.; Conway, R. J. *Archeol. Sci.* **2004**, *31*, 519. [CrossRef]
- ¹⁸ Santos, P. M.; Wentzell, P. D.; Pereira-Filho, E. R. *Food Anal. Methods* **2012**, *5*, 89. [CrossRef]

- ¹⁹ Lapresta-Fernández, A.; Capitán-Vallvey, L. F. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Oliveira, L. F.; Canevari, N. T.; Guerra, M. B. B.; Pereira, F. M. V.; Schaefer, C. E. G. R. ; Pereira-Filho, E. R. *Microchem. J.* **2012**. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Foca, G.; Masino, F.; Antonelli, A.; Ulrici, A. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Lupetti, K. O.; Carvalho, L. C.; Moura, A. F.; Fatibello-Filho, O. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 548. [[CrossRef](#)]
- ²³ Maleki, N.; Safavi, A. ; Sedaghatpour, F. *Talanta* **2004**, *64*, 830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Vidal, M.; Amigo, J. M.; Bro, R.; Van Den Berg, F.; Ostra, M. ; Ubide, C. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ James, B. R.; Petura, J. C.; Vitale, R. J.; Mussoline, G. R. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 2377. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Guerra, M. B. B.; Schaefer, C. E. G. R.; Michel, R. F. M.; Rosa, P. F.; Pereira-Filho, E. R. *Br. J. Anal. Chem.* **2011**, *3*, 148. [[Link](#)]
- ²⁷ van Dalen, G. *Food Res. Int.* **2004**, *37*, 51. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Cantrell, K.; Erenas, M. M.; Orbe-paya, I.; Capitan-vallvey, L. F. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]