



DETERMINAÇÃO DE NITRITO EM ÁGUA DE PISCICULTURA BASEADO EM IMAGEM DIGITAL

Ewerton Moraes Luna¹, Francisco Alixandre Ávilla Rodrigues² Lígia Cláudia Castro de Oliveira³

Resumo: O nitrito é uma espécie química que pode prejudicar a produção de peixes nos criatórios de piscicultura devido a sua toxicidade. Portanto, é importante monitorar o teor desta espécie química nos criatórios para evitar prejuízos na produção. Nesta perspectiva, esta pesquisa objetiva desenvolver um método que seja capaz de quantificar o teor de nitrito na água de piscicultura utilizando imagens digitais. Para isto, foi desenvolvido um protótipo de captura de imagens de soluções padrões de nitrito. Os valores de intensidade dos canais de RGB dos pixels situados nas regiões da imagem contendo as soluções padrões foram obtidos e, em seguida, utilizados para a produção de uma curva analítica. Os resultados apontam que o sinal do canal G (Verde) possui o melhor potencial para ser utilizado como sinal analítico. Pressupomos que, quando concluído, este método poderá se tornar uma alternativa, de quantificação de nitrito, aos métodos baseados em espectrometria.

Palavras-chave: Nitrito. Imagem digital. Reação de *Griess*. Água de piscicultura.

1. Introdução

O nitrito (NO_2^-) é uma espécie química que pode afetar a produção de peixes devido a sua toxicidade. Esta espécie química surge devido a ação de bactérias que nitrificam a amônia presente nas fezes e nas rações dos animais (KROUPOVA *et al.*, 2005). Entre os principais danos causados nos peixes devido ao nitrito está a deficiência na oxigenação celular. O nitrito oxida o ferro (II), presente na hemoglobina do sangue, em ferro (III), formando a metahemoglobina, que é incapaz de transportar o oxigênio para as diversas partes do corpo do animal (TILAK *et al.*, 2007), podendo levar os peixes ao óbito.

Entretanto, apesar dos danos causados devido a exposição prolongada a altas concentrações serem permanentes e levarem a morte, as consequências devido a exposição a um baixo teor de nitrito podem ser reversíveis (ZHANG *et al.*, 2021). Desse modo, o monitoramento do nitrito nos criatórios de peixes é um fator preponderante para a qualidade da produção e para a redução de prejuízos.

O principal método de quantificação de nitrito em amostras de água é através da medição da absorvância de um corante azo formado após a ocorrência da reação de *Griess* (Vogel, 1989). Entretanto, este método exige a utilização de

¹ Universidade Regional do Cariri, email: ewerton.luna@urca.br

² Universidade Federal do Cariri. email: alixandre.avila@ufca.edu.br

³ Universidade Regional do Cariri, email: ligia.castro@urca.br

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



um espectrômetro. Sendo este, um equipamento que pode ser inacessível para pequenos criadores ou laboratórios de pequeno porte.

A utilização de imagens digitais pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de um método de quantificação de nitrito em água de piscicultura. As imagens digitais, normalmente são geradas em um espaço formado por três canais representando as cores R (vermelho), G (verde) e B (azul), sendo que as demais cores são formadas devido a variação da intensidade destes canais (FAN *et al.*, 2021).

Em uma reação colorimétrica, como a reação de *Griess* feita para o nitrito, é possível investigar se a intensidade dos pixels presentes nos canais (R, G e B), ou em combinações deles, podem resultar em valores que variam com a intensidade do analito. A partir desta perspectiva, nosso trabalho foi desenvolver um método de determinação de nitrito em amostras de água de piscicultura utilizando imagens digitais, reduzindo assim os custos envolvidos nesse tipo de análise.

2. Metodologia

Inicialmente foi realizado a reação de *Griess* ao mesmo tempo em que as soluções padrões foram produzidas. Para isso, foram criadas cinco soluções padrões de nitrito nas concentrações de 0; 0,494; 0,593; 0,693; 0,790 e 0,909 mg/L. Todas com um volume de 10 ml. Este volume foi aferido com a adição de 1,0 ml de uma solução de sulfanilamida, $6,057 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, seguido por um intervalo de tempo de 5 a 8 minutos, e adição posterior de uma solução de naftil-1 etileno dihidroclorato (NED), $5,016 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, e água deionizada. Todos os reagentes para a reação de *Griess* foram feitas seguindo as orientações de Vogel (1989).

Após 10 dez minutos de descanso dos padrões, os mesmos foram adicionados em uma placa de microdiluição de 96 poços. Foram destinados seis poços para cada padrão, sendo que cada um dos poços foi preenchido com um volume de 300 μL de solução.

A placa de microdiluição foi adicionada a um aparato instrumental construído para a captação de imagens digitais (Figura 1). Este aparelho é composto por uma caixa cilíndrica, de 50 cm de altura e 20 cm de diâmetro, contendo um painel de LED em sua extremidade inferior e uma câmera de um *smartphone Galaxy A03* da Samsung em sua extremidade superior. A câmera deste aparelho foi configurada com uma resolução no modo *Full*, modo Pro, Iso 100, balanço de branco em 5500 K e exposição da luz em 0.0.

Após a captura da imagem da microplaca, geramos as respectivas imagens dos canais R, G e B. Para cada canal, extraímos as intensidades de 05 pixels situados nas proximidades do centro de cada um dos poços da microplaca, totalizando 30 pixels por solução padrão. A construção da curva analítica foi feita utilizando a média das intensidades dos pixels de cada padrão, ou seja, consideramos as intensidades dos pixels como sinais analíticos. Todos os

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

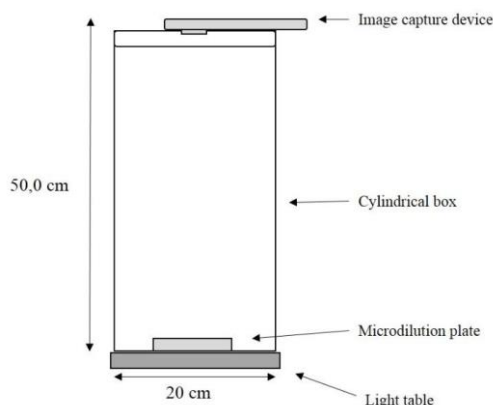
12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



processamentos realizados com as imagens foram feitos com o auxílio do software R (R PROJECT, 2022).

Figura 1: Estrutura do dispositivo desenvolvido para a captura das imagens.



3. Resultados

A imagem obtida no aparato instrumental desenvolvido, e suas variantes nos canais RGB, é apresentada na Figura 2. Observa-se nas figuras 2(C), 3(C) e 3(D) que apenas o canal G apresenta uma intensidade de sinal que varia linearmente em função da concentração. Enquanto os canais R (Figuras 2(B), 3(A), 3(B)) e B (Figuras 2(D), 3(E), 3(F)) se mantêm constantes, com a exceção dos brancos (Essa igualdade foi observada através de um Teste ANOVA, sendo os fatores a concentração dos padrões. Foi utilizado um nível de significância de 5%). Este resultado é um indicativo de que a variação da intensidade da cor da reação de *Griess* é causada pela variação da intensidade da cor verde e não da cor vermelha e azul.

Ao produzir as curvas analíticas para cada canal, observa-se que o canal G apresenta uma equação linear (Figura 3C) com o maior R^2 , com um valor de 0,9932. Enquanto os canais R e B apresentaram valores de 0,7943 e 0,7964, respectivamente. Este resultado sugere que a intensidade do canal G, diferente dos demais canais, pode ser explicada pela variação da concentração. Portanto, este canal possui o potencial de ser utilizado como sinal analítico de um método baseado em imagens digitais.

Estudos posteriores a este resultado estão sendo realizados para determinar outros parâmetros de qualidade do método. Tais como, os limites de detecção e quantificação, e se os sinais analíticos são afetados pela presença de outras espécies que compõem uma matriz de água de piscicultura. Testes comparando o teor de nitrito de uma amostra de água de piscicultura obtida através do método desenvolvido e de um método já validado também estão sendo realizados.

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: "DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL"



Figura 2: Imagens obtidas dos padrões para a construção da curva analítica. **(A)** Imagem original; **(B)** Imagem do canal R; **(C)** Imagem do canal G; **(D)** Imagem do canal B.

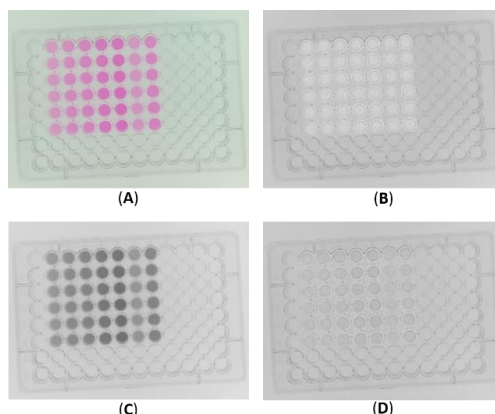
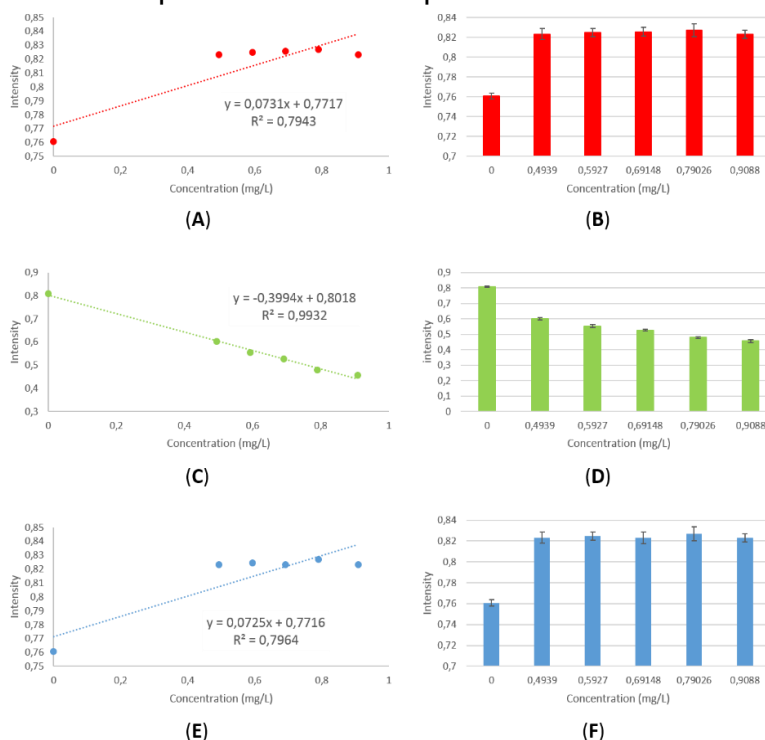


Figura 3: Curvas analíticas obtidas através das intensidades dos canais RGB. **(A)** Curva analíticas referente ao canal R; **(B)** Intensidade do canal R para cada um dos padrões **(C)** Curva analítica referente ao canal G; **(D)** Intensidade do canal G para cada um dos padrões **(E)** Curva analítica referente ao canal B; **(F)** Intensidade do canal B para cada um dos padrões.



VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV
Semana
de Iniciação Científica da URCA
e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



4. Conclusão

O método desenvolvido apresentou potencial para a determinação de nitrito em amostras de água de piscicultura. Sendo que o canal G das imagens dos padrões de nitrito apresentou o maior potencial para ser utilizado como sinal analítico. A curva analítica produzida a partir da intensidade deste canal apresentou linearidade favorável, com um R^2 de 0,9932. Mais estudos estão sendo realizados para a determinação de outros parâmetros de qualidade do método. Após ser finalizado, este método pode-se configurar como uma alternativa acessível, em relação aos métodos baseados em espectrometria, para a determinação de nitrito em amostras de água. Portanto, além de reduzir custos com a determinação de nitrito em amostras de água de piscicultura, nossa proposta é passível de adaptação para determinar outras espécies químicas neste tipo de matriz.

5. Referências

FAN, Yajun et al. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: **A review. Measurement**, v. 171, p. 108829, 2021.

(doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108829)

KROUPOVA, Hana et al. Nitrite influence on fish: a review. **Veterinarni medicina-praha-**, v. 50, n. 11, p. 461, 2005.

R PROJECT. **The R project for statistical computing**. 2022. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 10/11/2022.

TILAK, K. S.; VEERAI AH, K.; RAJU, J. Milton Prema. Effects of ammonia, nitrite and nitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). **Journal of environmental biology**, v. 28, n. 1, p. 45-47, 2007.

VOGEL, Arthur Israel et al. **Vogel's textbook quantitative inorganic analysis**. Revised by Jeffery, G. H; Bassett, J; Mendham, J; Denney, R. C. 5th ed. Longman Scientific & Technical, 1989.

ZHANG, Yanpeng et al. Effects of long-term low-concentration nitrite exposure and detoxification on growth performance, antioxidant capacities, and immune responses in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). **Aquaculture**, v. 533, p. 736123, 2021. (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736123>)