



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA**

**Programa de Pós-graduação em Química**

**JOÃO HONORATO SANTOS NETO**

**INSTRUMENTAÇÃO DE BAIXO CUSTO PARA ANÁLISE  
QUÍMICA BASEADA EM IMAGEM DIGITAL**

SALVADOR - BA  
Dezembro/2020

**JOÃO HONORATO SANTOS NETO**

**INSTRUMENTAÇÃO DE BAIXO CUSTO PARA ANÁLISE  
QUÍMICA BASEADA EM IMAGEM DIGITAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientadora: Professora Dra. Ana Maria Pinto dos Santos  
Coorientador: Professor Dr. Cleber Galvão Novaes

SALVADOR - BA  
Dezembro/2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de  
Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

S237 Santos Neto, João Honorato  
Instrumentação de baixo custo para análise química baseada  
em imagem digital/ João Honorato Santos Neto. – Salvador,  
2020.  
152 f.  
  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Maria Pinto dos Santos  
  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto  
de Química, 2020.  
  
1. Imagem digital. 2. Colorimetria. 3. Química Analítica. 4.  
Ureia. I. Santos, Ana Maria Pinto dos. II. Universidade Federal  
da Bahia. III. Título.  
  
CDU 543.42



*Este trabalho é dedicado integralmente a  
minha família, em especial a minha mãe  
Marlene.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao longo desta jornada que finda hoje, cada dia em singular foi um tijolo importante para a construção de um indivíduo pouco menos incompleto do que me torno agora. Muitas pessoas, e digo muitas porque são, passaram pelo meu caminho durante esta jornada. Algumas se foram por cumprir as obrigações da vida, algumas ainda estão passando e outras ficaram, estreitando laços peculiares que a vida acadêmica sempre insiste em deixar. Os agradecimentos são, por diversas razões, os mais variados e todos são e serão de extrema importância para todos que escolhem seguir esta importante e longa jornada cheia de obstáculos. Sendo assim, esboço aqui algumas palavras de agradecimento para os que comigo estiveram nessa caminhada, mas nem de longe estes rabiscos expressarão minha gratidão e o bem que me fizeram.*

*Agradeço a minha mãe Marlene, que em orações e me guardando de longe, todos os dias reforçara o meu espírito com muito amor e paz para que eu seguisse forte durante a minha caminhada.*

*A minha companheira Tâmara, minhas irmãs Carol, Mariana e Vera e meus sobrinhos Arthur e Heitor pelo apoio incondicional.*

*Aos meu primo Sinho e meu cunhado José Correia pela parceria de sempre.*

*A Professora Ana Pinto pela oportunidade, confiança e ensinamentos.*

*Ao amigo e orientador Cleber Galvão Novaes por desde o começo acreditar no meu potencial, sempre com paciência e disposição.*

*Ao Professor Sergio Ferreira, por cuidar de nós, do GRPQQ, como filhos.*

*Ao Professor Djalma Menezes pelos conselhos e por acreditar no meu trabalho desde o começo.*

*Aos amigos que fiz no GRPQQ pela parceria e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.*

*Às amigas do Instituto de Química da UFBA, externas ao laboratório, que contribuíram de uma forma ou de outra para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos Professores da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia Marcos de Almeida Bezerra e Valfredo Azevedo Lemos pelo apoio intelectual oferecido sempre que necessário.*

*Ao essencial auxílio financeiro concedido pelo governo da Bahia sob a regulação do órgão de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB).*

*Aos professores do Instituto de Química da UFBA.*

*Aos importantíssimos professores de todas as escolas que passei, desde o fundamental ao ensino médio, por que foram a base para uma parte do que sou hoje e sem eles seria impossível eu estar aqui.*

*E aos tantos mais que contribuíram nesta minha jornada que não constam o nome aqui por me faltar a memória neste momento, mas, que nem por isso, são menos importantes.*

*O meu sincero Obrigado*

## RESUMO GERAL

Os trabalhos apresentados nesta Tese aplicaram a inovação dos métodos de análise química por imagem digital aliadas as instrumentações de fácil construção obtidas por materiais acessíveis e de baixo custo se comparados a outras instrumentações para química analítica. Dois equipamentos foram construídos para capturar imagens digitais de reações colorimétricas. No primeiro trabalho, foi utilizada uma câmera tipo webcam como detector e uma caixa de madeira para isolamento externo da luz, para capturar imagens de reações colorimétricas, usando o reagente cromogênico 1,10 ortofenantrolina, a fim de quantificar Fe (II) e Fe (III) em amostras de vinho branco. O método apresentou precisão de 3,47% para Fe (II) e 5,36 % para ferro total com limite de detecção (LD) de 0,042 mg/L e limite de quantificação (LQ) de 0,141 mg/L. Seis amostras de vinho branco foram analisadas e o conteúdo encontrado variou de 0,41 a 1,67 mg/L para Fe (II) e de 0,69 a 1,71 mg/L para ferro total. No segundo trabalho, uma câmera digital tipo microscópio foi utilizada como detector acoplada a um sistema com aspiração manual à base de tubos de policloreto de vinila (PVC) com a finalidade de capturar imagens e medir a variação colorimétrica de uma reação empregando diacetilmonoxima (butano-2,3-diona monoxima) e determinar ureia em amostras de leite líquido UHT. Esse método foi submetido a três diferentes tratamentos matemáticos apresentando variação de precisão de 1,58 a 5,77% com LD variando de 0,35 a 1,77 mg/L e LQ variando de 0,52 a 2,54 mg/L. Oito amostras foram analisadas e o teor de ureia variou entre 161,37 e 420,33 mg/L. Processos de otimização multivariada e de validação analítica foram utilizados nos dois métodos desenvolvidos. Com a utilização de materiais simples e de baixo custo, as figuras de mérito apresentadas como linearidade, precisão e exatidão foram bastante satisfatórias para os objetivos das análises. As concentrações encontradas dos analitos nas amostras foram concordantes a trabalhos anteriores aplicados para os mesmos tipos de amostra. Foi possível concluir que os métodos baseados em imagens digitais são alternativas promissoras para análises químicas de diversas áreas onde a instrumentação complexa e onerosa se apresenta como única alternativa. Além disso, a versatilidade na construção de equipamentos dessa natureza possibilita ao analista adaptá-los de acordo a sua necessidade e essa característica é muito importante diante da diversidade de situações apresentadas cotidianamente no ambiente científico.

**Palavras-chave:** Imagem digital, colorimetria, especiação de ferro, ureia.

## ABSTRACT

The works in this thesis applied the innovation of the methods of chemical analysis by digital image combined with instruments of easy construction by recovered materials and of low cost when compared to other instruments for analytical chemistry. Two devices were built to capture digital images of colorimetric reactions. In the first work, a webcam was used as a detector and a wooden box for external isolation of light, to capture images of colorimetric reactions, using the chromogenic reagent 1,10 orthophenanthroline, in order to quantify Fe (II) and Fe (III) in white wine samples. The method presented accuracy of 3.47% for Fe (II) and 5.36% for total iron with detection limit (LD) of 0.042 mg/L and quantification limit (LQ) of 0.141 mg/L. Six wine white samples was analyzed and the concentrations found varied from 0.41 to 1.67 mg/L for Fe (II) and from 0.69 to 1.71 mg/L for total iron. In the second work, a digital microscope camera was used as a detector coupled to a system with manual aspiration based on polyvinyl chloride (PVC) tubes to capture images and measure the colorimetric variation of a reaction using diacetylmonoxime (butane-2, 3-dione monoxime) and determine urea in UHT liquid milk sed. This method was subjected to three different mathematical treatments and these showed an accuracy of 1.58 to 5.77% with LD ranging from 0.35 to 1.77 mg/L and LQ ranging from 0.52 to 2.54 mg/L. Eight milk samples were analyzed and the urea concentrations varied between 161.37 and 420.33 mg/L. Multivariate optimization and accuracy processes were used in the two methods developed. With the use of simple and low-cost materials, the figures of merit as linearity, precision and accuracy were quite satisfactory for the purposes of the analyzes. The concentrations found in the analytes were in agreement with previous studies for the same types of sample. It was possible to conclude that the methods based on digital images are promising alternatives for analysis of diverse areas where a complex and costly instrumentation presents itself as the only alternative. In addition, the versatility in the construction of equipment of this nature allows the analyst to adapt them according to his needs and this characteristic is very important in view of the diversity of location daily in the scientific workplace.

**Keywords:** Digital image, Colorimetry, Iron (II) / (III) speciation, urea.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Evolução das aplicações baseadas em imagem digital .....	25
<b>Tabela 2.</b> Domínio experimental para os planejamentos fatoriais aplicados no método de Fe(II) e Ferro total .....	56
<b>Tabela 3.</b> Sinais extraídos do sistema RGB para cada canal e suas respectivas absorvâncias.....	57
<b>Tabela 4.</b> Matriz e resultados para otimização do sistema para determinação de Fe(II)59	
<b>Tabela 5.</b> Estudo da análise de variância (ANOVA) do modelo empregado no método para determinação de Fe(II).....	60
<b>Tabela 6.</b> Matriz e resultados para otimização do método para determinação de ferro total .....	62
<b>Tabela 7.</b> Estudo da análise de variância (ANOVA) do modelo empregado no método para determinação de ferro total .....	62
<b>Tabela 8.</b> Valores definidos para determinação de Fe(II) e ferro total de acordo com os planejamentos experimentais.....	63
<b>Tabela 9.</b> Dados obtidos em valores de Red, Green e Blue e suas respectivas absorvâncias em diferentes concentrações .....	64
<b>Tabela 10.</b> Réplicas e valores de LD e LQ obtidos a partir dos sinais do canal blue....	66
<b>Tabela 11.</b> Comparação de características analíticas obtidas entre o método proposto e outros métodos para determinação de ferro em vinho.....	67
<b>Tabela 12.</b> Valores de precisão para sete porções da mesma amostra de vinho branco	67
<b>Tabela 13.</b> Concentrações expressas em um intervalo de confiança de 95% e exatidão por HR-CS FAAS. ....	68
<b>Tabela 14.</b> Referência da conversão de valores para os espaços de cores e seus respectivos canais .....	89

<b>Tabela 15.</b> Matriz do Planejamento Doehlert com valores reais, codificados e as respostas obtidas.....	98
<b>Tabela 16.</b> Análise de Variância (ANOVA) para o teste de falta de ajuste dos modelos de acordo com cada tratamento de dados em um intervalo de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ). .....	99
<b>Tabela 17.</b> Fotografias dos experimentos e seus respectivos brancos analíticos obtidos pelo planejamento Doehlert.....	100
<b>Tabela 18.</b> Níveis aplicados no planejamento fatorial completo $2^2$ para avaliação da robustez.....	102
<b>Tabela 19.</b> Matriz e resultados do Planejamento fatorial $2^2$ para cada tratamento matemático.....	102
<b>Tabela 20.</b> Teste de falta de ajuste dos modelos de acordo com cada tratamento de dados .....	103
<b>Tabela 21.</b> Matriz do planejamento fatorial completo $2^4$ com valores reais, codificados e as respostas obtidas.....	104
<b>Tabela 22.</b> Teste de falta de ajuste dos modelos de acordo com cada tratamento matemático.....	107
<b>Tabela 23.</b> Matriz e respostas do Planejamento Box-Behnken para 3 fatores.....	109
<b>Tabela 24.</b> Valores dos efeitos para os termos lineares e quadráticos.....	110
<b>Tabela 25.</b> Análise de variância (ANOVA) para o teste de falta de ajuste dos modelos de acordo com cada cálculo do planejamento box-behnken .....	111
<b>Tabela 26.</b> Valores observados, preditos e resíduos para o modelo L+Q obtidos pela matriz Box-Behnken e suas respectivas respostas para os cálculos de $I_B$ , $F_S$ e $F_{HSV}$ ...	112
<b>Tabela 27.</b> Tabela de valores críticos a partir dos modelos obtidos por $I_B$ , $F_S$ e $F_{HSV}$ .	114
<b>Tabela 28.</b> Termos do modelo quadrático com interação linear x linear e suas respectivas significâncias .....	115

<b>Tabela 29.</b> Níveis aplicados no planejamento fatorial completo $2^4$ para o teste de robustez .....	115
<b>Tabela 30.</b> Matriz do planejamento fatorial $2^4$ , seus respectivos níveis e as respostas em função dos cálculos estudados .....	116
<b>Tabela 31.</b> Estudo da falta de ajuste para os modelos obtidos pelos três cálculos ( $\alpha=0,05$ ) .....	117
<b>Tabela 32.</b> Comparação das inclinações obtidas pela regressão linear para as três formas de cálculo .....	120
<b>Tabela 33.</b> Valores de recuperação obtidos para os três cálculos com $N=3$ .....	122
<b>Tabela 34.</b> Dados extraídos da fotografia retirada com o sistema sem radiação .....	123
<b>Tabela 35.</b> Estudo da degradação do produto colorimétrico em função do tempo .....	124
<b>Tabela 36.</b> Valores médios ( $n=6$ ) para diferentes concentrações de ureia utilizadas na curva de calibração. ....	124
<b>Tabela 37.</b> Valores dos termos da regressão linear e dos limites de detecção e quantificação .....	127
<b>Tabela 38.</b> Desvio padrão relativo obtidos pelos três cálculos referentes às amostras B e F sem considerar o cálculo de diluição .....	129
<b>Tabela 39.</b> Concentrações de ureia obtidas em amostras de leite UHT usando o método proposto e a Espectrometria no Infravermelho .....	129
<b>Tabela 40.</b> Diferenças percentuais entre os valores médios das concentrações obtidas e os valores verdadeiros .....	130
<b>Tabela 41.</b> Concentrações de ureia nas amostras de leite UHT ( $n = 3$ ) .....	131

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Espectro eletromagnético e as bandas de radiação sensíveis às células cone.	21
<b>Figura 2.</b> Cores primárias aditivas propostas pela teoria de Young-Helmholtz.....	22
<b>Figura 3.</b> Derivação lógica para transformação das cores primárias aditivas em cores digitais .....	23
<b>Figura 4.</b> Fotografia de um monitor de notebook em escala microscópica que demonstra a apresentação das cores em projeções digitais RGB.....	24
<b>Figura 5.</b> Representação de uma decomposição de imagem digital e seus canais red, green e blue.....	24
<b>Figura 6.</b> Sistema para aquisição de imagem digital em formato genérico e utilizado em análises químicas: A -Posições da lâmpada em relação à câmera; B - Reação colorimétrica genérica em diferentes concentrações. ....	28
<b>Figura 7.</b> Projeção em 3D do sistema de aquisição de imagem digital .....	51
<b>Figura 8.</b> a) Vista lateral (esquerda) e b) inferior (direita) do sistema de aquisição de imagem e a disposição da lâmpada LED sobre o sistema .....	52
<b>Figura 9.</b> Sistema para aquisição de imagem digital em funcionamento .....	52
<b>Figura 10.</b> Vista superior da câmara de captura de imagem.....	52
<b>Figura 11.</b> Vista aproximada da webcam e suporte de acomodação da cubeta.....	53
<b>Figura 12.</b> Região de interesse (ROI) e área de trabalho do software de aquisição de imagem ImageJ.....	54
<b>Figura 13.</b> Histogramas das frequências dos pixels na ROI por canal de cor no espaço RGB.....	54
<b>Figura 14.</b> Curvas de calibração para definição do canal de cor mais correlacionado..	58
<b>Figura 15.</b> Estudo dos efeitos das variáveis do método para determinação de Fe(II) ...	60

<b>Figura 16.</b> Estudo dos efeitos das variáveis do método para determinação de ferro total .....	63
<b>Figura 17.</b> Curvas de calibração para os Canais Red, Green e Blue e suas respectivas correlações e equações.....	65
<b>Figura 18.</b> Ciclo de transformação da ureia em produto colorimétrico.....	75
<b>Figura 19.</b> Aparato de aquecimento com sistema de condensação (esquerda) e disposição dentro da bandeja sobre as placas de aquecimento (direita).....	78
<b>Figura 20.</b> Bandeja e superfície de proteção contra aquecimento direto.....	78
<b>Figura 21.</b> Superfície de proteção contra aquecimento direto.....	78
<b>Figura 22.</b> Esquema de distribuição das partes do sistema de aquisição de imagens digitais em fluxo.....	79
<b>Figura 23.</b> Projeção 3D do sistema de aquisição de imagens digitais em fluxo.....	79
<b>Figura 24.</b> Projeção 3D com detalhes aproximados do sistema de aquisição de imagens digitais em fluxo.....	80
<b>Figura 25.</b> Lâmpada tipo LED de encaixe em Bulbo como fonte de radiação eletromagnética.....	81
<b>Figura 26.</b> Corte da vista frontal e lateral do compartimento da conexão tipo “T” onde se acomoda o recipiente da amostra.....	81
<b>Figura 27.</b> Microscópio digital com Zoom em 1600x e ajuste de foco manual.....	82
<b>Figura 28.</b> Vista superior e inferior da câmara para isolamento da luz externa.....	83
<b>Figura 29.</b> Cortes em acrílico e base do receptáculo translúcido.....	83
<b>Figura 30.</b> Vistas lateral, frontal e de fundo do sistema de aquisição de imagem digital em sua montagem completa.....	84
<b>Figura 31.</b> Sistema em funcionamento sem a capa de proteção contra radiação externa. .....	87

<b>Figura 32.</b> Janela de seleção da região de interesse (ROI) na rotina Data_hand_gui ...	88
<b>Figura 33.</b> Escala Hue utilizada na aplicação do espaço de cor HSV .....	89
<b>Figura 34.</b> Descrição do procedimento de injeção em fluxo .....	91
<b>Figura 35.</b> Regressão linear para avaliação do melhor canal de trabalho obtida a partir das absorvâncias e intensidades inversas calculadas no espaço RGB.....	94
<b>Figura 36.</b> Varredura em espectrometria UV-Vis com a concentração de ureia em 2,0 mg/L.....	95
<b>Figura 37.</b> Regressão linear para avaliação do melhor canal de trabalho de acordo com a correlação entre concentração de ureia e sinais analíticos calculados a partir do espaço HSV .....	96
<b>Figura 38.</b> Superfícies de resposta para definição da proporção ácida em função das respostas $I_B$ , $F_S$ e $F_{HSV}$ . .....	98
<b>Figura 39.</b> Sinais analíticos em função do volume final de ácido para os diferentes tratamentos matemáticos. ....	101
<b>Figura 40.</b> Gráficos de pareto para o estudo da robustez nos diferentes cálculos. ....	103
<b>Figura 41.</b> Estudo dos efeitos para os cálculos $I_B$ , $F_S$ e $F_{HSV}$ e seus respectivos testes de curvatura representados pelos gráficos de Pareto.....	106
<b>Figura 42.</b> Indicação da região ótima a partir dos Gráficos de contorno em função das variáveis AF/AS e Tempo obtidos a partir dos cálculos $I_B$ , $F_S$ e $F_{HSV}$ . ....	108
<b>Figura 43.</b> Superfícies de resposta construídas a partir do modelo com o cálculo $I_B$ ..	113
<b>Figura 44.</b> Superfície de resposta construída a partir do modelo com o cálculo $F_S$ . ...	113
<b>Figura 45.</b> Superfície de resposta construída a partir do modelo com o cálculo $F_{HSV}$ .	113
<b>Figura 46.</b> Gráficos de Pareto para os efeitos padronizados calculados por $F_S$ , $F_{HSV}$ e $I_B$ .....	117

<b>Figura 47.</b> Procedimento completo das etapas de tratamento de amostra e preparo de soluções .....	119
<b>Figura 48.</b> Gráficos de regressão linear para as curvas de calibração e suas respectivas adições de analito.....	120
<b>Figura 49.</b> Gráfico da variação da concentração de ureia adicionada em função da taxa de recuperação .....	122
<b>Figura 50.</b> Fotografia retirada do sistema com a radiação interna desligada .....	123
<b>Figura 51.</b> Fotografia das imagens obtidas para curva de calibração com diferentes concentrações de ureia.....	125
<b>Figura 52.</b> Gráficos das regressões lineares simples para as três formas de cálculo...	126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LED	Diodo fotoemissor. Do inglês <i>Light-Emitting Diode</i>
RGB	Vermelho, verde e azul. Do inglês <i>Red, Green and Blue</i>
HSV	Matiz, saturação e Brilho. Do inglês <i>Hue, Saturation e Value</i>
DLSR	Reflexo digital de lente única. Do inglês <i>Digital Single Lens Reflex</i>
CIE	Comissão Internacional de Iluminação. Do inglês <i>International Commission on Illumination</i>
CIE XYZ	CIE com interpolação RGB
CIELAB	CIE com valores de brilho (L) e cromaticâncias (l e b)
3D	Três dimensões
ROI	Região de interesse em uma imagem digital. Do inglês, <i>Region of Interest</i>
LOC	Laboratório em um chip. Do inglês <i>Lab on chip</i>
PVC	Policloreto de Vinila
PDMS	Polidimetilsiloxano
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DI	Imagem digital
JPEG	Grupo do conjunto de especialistas em fotografia. Do ingles <i>Joint Photographics Experts Group</i>
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama. Do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectroscopy</i>
MAS	Espectrofotometria de absorção molecular. Do inglês, <i>Molecular Absorption Spectroscopy</i>
SMD	Tecnologia de montagem em superfícies. Do inglês <i>Surface Mount Tecnology</i>

HR-CS FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama de Fonte Contínua de Alta Resolução. Do inglês <i>High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
ANOVA	Análise de variância
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
UHT	Temperatura ultra-alta. Do inglês <i>Ultra High Temperature</i>
DAM	Diacetilmonoxima (butano-2,3-diona monoxima)
PS	Poliestireno Simples
DC	Corrente contínua
mA	Miliampér
DFC	Difenilcarbazida (1,5-Difenilcarbazida)
AS	Ácido sulfúrico
AF	Ácido Fosfórico
ISO	Organização Internacional de Normalização
IDF	Federação Internacional de Laticínios. Do inglês <i>International Dairy Federation</i>
AOAC	Associação dos Químicos Oficiais de Agricultura. Do inglês <i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva. Do inglês <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DNS	Ácido Dinitrosalicílico

## SUMÁRIO

REFERENCIAL TEÓRICO .....	21
1. <i>Análise química por imagem digital</i> .....	25
2. <i>Aplicações das análises por imagem digital</i> .....	29
2.1. Detecção.....	29
2.2. Construção dos dispositivos.....	30
2.3. Portabilidade .....	31
2.4. Modo de introdução da amostra.....	32
2.4.1. Análises por imagem digital usando modo em batelada .....	32
2.4.2. Análises por imagem digital com introdução mecânica em fluxo .....	41
2.5. Considerações .....	44
CAPÍTULO I .....	45
ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE Fe(II) e Fe(III) EM VINHO BRANCO BASEADA EM IMAGEM DIGITAL .....	45
RESUMO.....	46
1. INTRODUÇÃO .....	47
2. OBJETIVOS.....	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	50
3.1. Reagentes .....	50
3.2. Amostras .....	50
3.3. Instrumentação.....	50
3.4. Aquisição e avaliação de dados RGB .....	50
3.5. Extração e tratamento de dados dos sistemas de cores .....	53
3.6. Procedimento geral .....	54
3.7. Definição do canal de trabalho no sistema de cor RGB e otimização do método	
55	

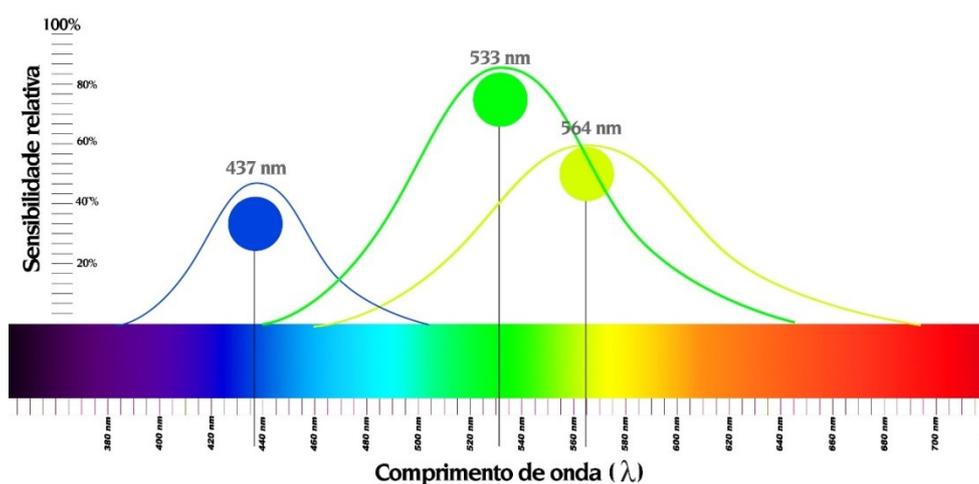
3.8.	Aplicação do planejamento fatorial completo de dois níveis .....	55
3.9.	Exatidão do método .....	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
4.1.	Seleção do canal de cor mais correlacionado .....	57
4.2.	Otimização do método para determinação de Fe(II).....	58
4.3.	Otimização do método para determinação de ferro total .....	61
4.4.	Método otimizado .....	63
4.5.	Características analíticas do método para análise de especiação de ferro em vinho	64
4.6.	Aplicação - Análise de especiação de ferro em amostras de vinho .....	68
5.	CONCLUSÃO .....	70
CAPÍTULO II.....		71
EMPREGO DE IMAGENS DIGITAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DE UREIA EM LEITE UHT.....		71
RESUMO.....		72
1.	INTRODUÇÃO .....	73
2.	OBJETIVOS.....	76
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	77
3.1.	Instrumentação.....	77
3.1.1.	Sistema de aquecimento e processo de resfriamento .....	77
3.1.2.	Sistema de imagem digital com amostragem em fluxo.....	79
3.2.	Extração e tratamento de dados dos sistemas de cores.....	87
3.3.	Procedimento experimental .....	90
3.3.2.	Definição do canal de trabalho.....	92
3.3.4.	Extração da ureia em leite .....	93
3.3.5.	Teste de adição e recuperação de analito .....	93
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	94
4.1.	Definição dos canais de cor para o espaço RGB e HSV.....	94

4.2.	Proporções dos ácidos.....	97
4.3.	Triagem dos fatores.....	104
4.4.	Aplicação do planejamento Box-Behnken e definição dos valores ótimos...	109
4.5.	Teste de robustez.....	115
4.6.	Preparo da solução colorimétrica com valores otimizados.....	118
4.7.	Estudo do efeito de Matriz.....	119
4.8.	Teste de adição e recuperação.....	121
4.9.	Estabilidade da reação.....	123
4.10.	Regressão linear e figuras de mérito .....	124
4.11.	Precisão .....	128
4.12.	Exatidão do método.....	129
4.13.	Aplicação do método .....	130
5.	CONCLUSÃO .....	132
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	134
	Apêndice A.....	145
	Apêndice B .....	146
	Apêndice C .....	147
	Apêndice D.....	148

## REFERENCIAL TEÓRICO

A percepção das cores pelo olho humano é realizada a partir de três grupos de células, chamadas de cones, que ficam localizadas no revestimento interno da retina e são sensíveis a bandas de radiações eletromagnéticas, cujos picos máximos relativos à sensibilidade das cores são distribuídos em 564 nm (amarelo), 533 nm (verde) e 437 nm (azul), como mostra a Figura 1 [1, 2].

**Figura 1.** Espectro eletromagnético e as bandas de radiação sensíveis às células cone.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

Com base nesse sistema desenvolvido pelo olho humano para detectar cores, os cientistas Thomas Young e Hermann Von Helmholtz desenvolveram, no século 19, a teoria conhecida como Teoria de Young-Helmholtz. Esse estudo atribuiu à percepção da cor a partir de três cores primárias: vermelho (R, do inglês *red*), verde (G, do inglês *green*) e azul (B, do inglês *blue*), formando então o sistema RGB. A origem de todas as outras cores do espectro visível percebidas pelo olho humano é uma combinação do sistema RGB em diferentes proporções, como mostra a Figura 2 [1, 3].

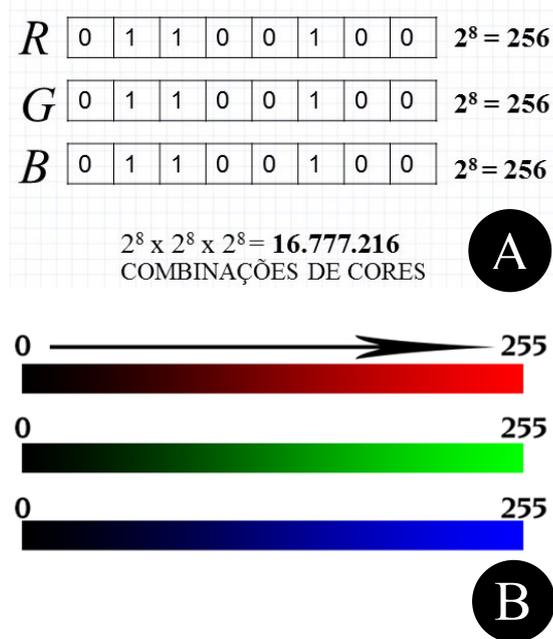
**Figura 2.** Cores primárias aditivas propostas pela teoria de Young-Helmholtz.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

A adaptação desse sistema de cores primárias aditivas compostas pelas cores vermelho, verde e azul, ou RGB, no sistema lógico de computação gráfica foi implementada a partir do BIT (do inglês *Binary Digit*). O BIT é a menor unidade de informação que pode ser armazenada ou transferida por um sistema lógico, apresentando somente valores de 0 e 1 distribuídos em 8 sinais de pulso elétrico positivos para o valor 1 e nulo para o valor 0. Para representar as três cores primárias nesse formato digital, cada canal de cor apresenta 256 tonalidades obtidas da combinação de 2 níveis lógicos (0 e 1) e 8 variáveis ou sinais de pulso elétrico, como mostra a seção A da Figura 3. A combinação dessas cores primárias no âmbito digital divide o espectro eletromagnético visível em 16.777.216 possibilidades de cores e brilhos diferentes. A intensidade de saturação de cada canal de cor tem seu ponto mínimo em 0 e o seu ponto máximo em 255, como mostra a Figura 3 na seção B [4].

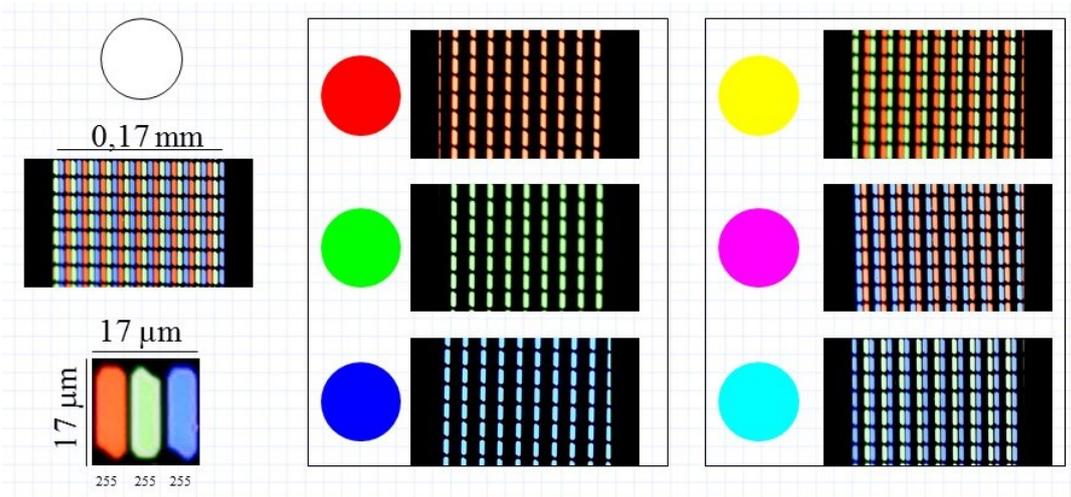
**Figura 3.** Derivação lógica para transformação das cores primárias aditivas em cores digitais.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

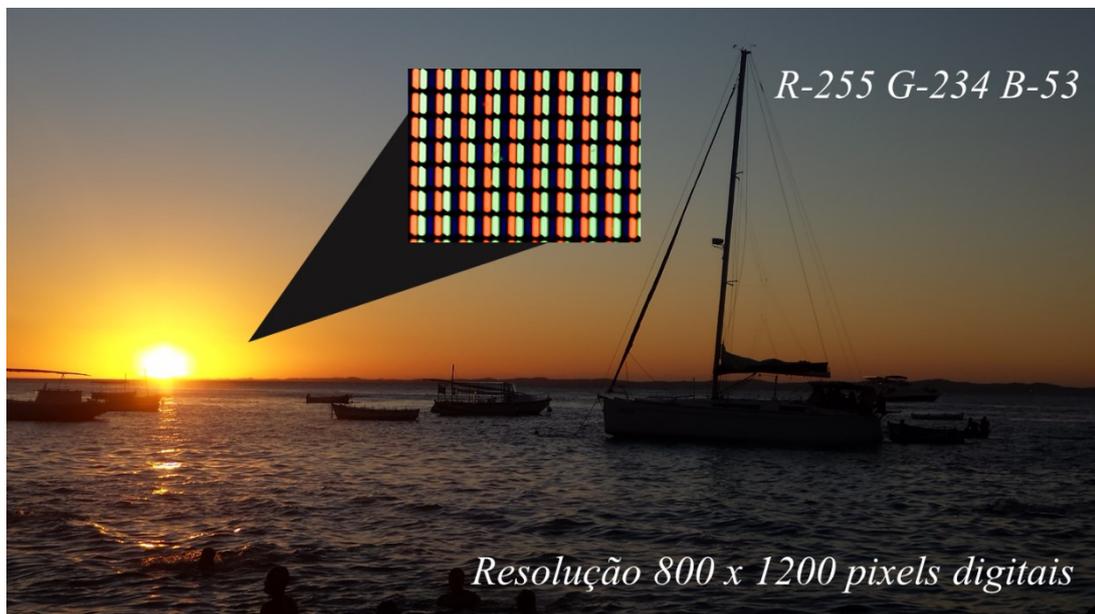
Esse sistema de cores é empregado tanto para transformação da imagem real em valores lógicos, como é o caso da fotografia digital que converte fótons em pulsos elétricos, como também para projeções de monitores de computador, smartphones e aparelhos de TV, onde os pulsos elétricos controlam a intensidade dos pontos de luz vermelho, verde e azul distribuídos na tela. Na Figura 4 é demonstrada, a partir de uma fotografia real de um monitor de notebook, a projeção de algumas cores utilizando a regulação da intensidade luminosa de cada canal dos pontos de luz contendo as cores do sistema RGB, inclusive o branco com todos os valores das cores primárias em máximo. Esse sistema é ampliado e a partir das variações dos valores RGB distribuídos em uma matriz bidimensional é possível se formar uma imagem completa, como mostra a Figura 5.

**Figura 4.** Fotografia de um monitor de notebook em escala microscópica que demonstra a apresentação das cores em projeções digitais RGB.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 5.** Representação de uma decomposição de imagem digital e seus canais red, green e blue.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

### 1. Análise química por imagem digital

A análise química por imagem digital consiste em estudar características de um sistema a partir dos valores fornecidos pelos canais do sistema RGB obtidos pela decomposição dos pixels de uma imagem ou vídeo digital. A aquisição da imagem, como mostra a seção A da Figura 6, é dada por um comando externo ou interno em um dispositivo de captura, geralmente uma câmera DSLR (do inglês *Digital Single Lens Reflex*), webcam, smartphone ou scanner de mesa, que tem sua face de detecção ou detector direcionado para uma superfície, região ou objeto contendo o material de interesse. Esses materiais são submetidos a uma fonte de radiação constituída de uma lâmpada ou flash, usualmente de cor branca, que são acomodados na posição axial, radial ou paralelo à detecção da câmera, quando no emprego dos smartphones, e têm a função de interagir com o material estudado para revelar propriedades eletromagnéticas [5, 6].

A estrutura dos sistemas dessa natureza convém apresentar isolamento da luz externa e compartimento interno ou externo para fixar o detector e a fonte de radiação. Além disso, o suporte onde a amostra é fotografada, seja ela líquida ou sólida, tende a ser imóvel e resistente a movimentos súbitos durante a operação do equipamento a fim de garantir a reprodutibilidade das fotografias. Para atender a esses requisitos os projetos são geralmente confeccionados em caixa de madeira, papelão e em impressões 3D, conforme citados na literatura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Evolução das aplicações baseadas em imagem digital.

Ano	Resposta analisada	Modo de introdução da amostra	Construção	Portabilidade	Deteção	Ref.
1998	Lípidios	Batelada	Aberta	Não	DSLR	[7]
2006	Óleo/Ácidos graxos	Batelada	Aberta	Não	DSLR	[8]
2006	HCl e H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Em fluxo	Caixa em papelão	Não	Webcam	[9]
2008	Bolhas em sistema hidráulico	Em fluxo	Aberta	Não	DSLR	[10]
2009	Lítio, sódio e cálcio	Em fluxo	Caixa de madeira e tubo de papelão	Não	Webcam	[11]
2009	Fosfato	Batelada Simultânea	Aberta	Não	Scanner	[12]
2011	Níquel e Ferro	Batelada Simultânea	Aberta	Não	DSLR	[13]
2012	TNT	Batelada	Aberta	Não	DSLR	[14]
2012	pH	Batelada Simultânea	Sem aparato	Sim	Smartphone	[15]
2013	Al(III) e Cr(VI)	Em fluxo	Resina e caixa de madeira	Não	Webcam	[16]
2013	Taninos	Em fluxo	Resina e caixa	Não	Webcam	[17]

Ano	Resposta analisada	Modo de introdução da amostra	Construção	Portabilidade	Deteção	Ref.
2013	Cálcio	Batelada	Caixa – Material não especificado	Não	DSLR	[18]
2014	Vitamina D	Batelada	3D	Sim	Smartphone	[19]
2014	Cromo e Ferro	Batelada Simultânea	Aberto	Não	DSLR	[20]
2014	Cortisol	Batelada	3D e resina	Sim	Smartphone	[21]
2014	Amilase	Batelada Simultânea	Caixa papelão	Não	Smartphone	[22]
2014	pH e Nitrito	Batelada Simultânea	Sem aparato	Sim	Smartphone	[23]
2015	Glucose e Ureia	Batelada	Caixa – Material não especificado	Não	Smartphone	[24]
2015	Nitrato de amônio	Batelada	Caixa em plástico	Não	DSLR	[25]
2015	Álcool Etilico	Batelada	3D	Sim	Smartphone	[26]
2016	Catecols	Batelada Simultânea	Caixa impressa em material 3D	Sim	Smartphone	[27]
2016	TNT	Batelada Simultânea	Caixa em plástico	Não	Smartphone	[28]
2016	Glucose e Troponina cardíaca	Batelada	3D	Sim	Smartphone	[29]
2017	Zearalenona	Batelada Simultânea	3D	Sim	Smartphone	[30]
2017	Ferro total	Batelada Simultânea	Aberta	Não	Scanner	[31]
2017	pH, glicose, proteínas e glóbulos vermelhos	Batelada Simultânea	3D e resina	Sim	Smartphone	[32]
2018	Amilase	Batelada Simultânea	Aberto	Não	Smartphone	[33]
2019	Glicose e Hemoglobina A	Batelada Simultânea	3D	Sim	Smartphone	[34]
2020	Ferro e Hipoclorito	Batelada	3D	Sim	Webcam	[35]
2020	Cobalto	Batelada	Caixa de madeira	Sim	Microscópio digital 600x	[36]
2020	Cobalto	Batelada	Caixa de madeira	Sim	Webcam Microscópio digital 600x	[37]
2020	Níquel	Fluxo	Caixa de madeira	Sim	Microscópio digital 600x	[38]

*DSLR: do inglês Digital Single Lens Reflex; TNT: trinitrotolueno*

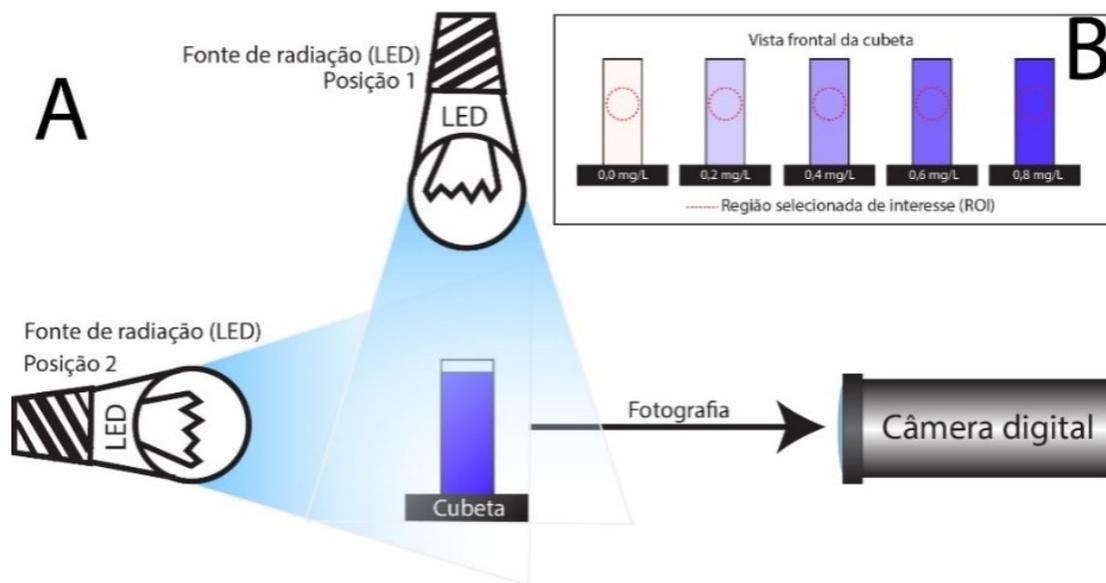
Análises utilizando amostras líquidas impregnadas em superfícies porosas ou líquidos viscosos obtidos de microextrações já foram utilizadas para análises colorimétricas por imagem digital. Em outros sistemas químicos que envolvam meios reacionais com altas concentrações de oxidantes, ácidos ou bases, não há necessidade de correção dessas condições por conta do equipamento, pois a maioria dos compartimentos de amostra para injeção em fluxo ou batelada, geralmente é confeccionada com vidro, quartzo ou polímeros de alta densidade.

A análise por imagem digital ainda não apresenta uma forma simples para extração e tratamento de dados, ficando dependente de softwares específicos para decomposição de imagens. Além dessa extração, posteriores aplicações matemáticas devem ser empregadas para se obter a melhor forma de interpretação dos dados, que vão desde as formulações da Lei de Lambert-Beer para quantificação de analitos até a análise multivariada para reconhecimento de padrões [6].

Na seção A da Figura 6 são apresentadas duas posições mais comuns para a iluminação do compartimento da amostra. Posições da iluminação onde a câmera é posicionada radialmente, as linhas escuras nas imagens fotografadas (efeito estroboscópico) são diminuídas ou eliminadas por conta da menor intensidade luminosa sobre o detector da câmera. O contrário ocorre com a incidência direta da iluminação sobre o detector (Posição axial) que, neste caso, deve ter sua intensidade luminosa diminuída com distância aumentada em relação a câmera ou uso de controladores de potência da lâmpada. Uma desvantagem da posição radial é a comum formação de sombras sobre o compartimento fotografado, mas esta condição pode também ser atenuada com o controle da luminosidade interna para iluminações mais homogêneas e paredes do equipamento de cor branca ou preta. As duas posições de iluminação são eficazes na iluminação do compartimento e a diferença de uso está no objetivo da construção. Equipamentos maiores tendem a apresentar iluminação radial por conta da facilidade de montagem, mas esta condição não é limitante dada a ampla possibilidade de dispositivos para montagem desses sistemas de aquisição de imagens digitais.

Na seção B da Figura 6 é apresentada uma simulação de uma curva de calibração com faixa de concentração de 0,0-0,8 mg/L para uma reação colorimétrica genérica que mostra o aumento da concentração de um analito proporcional à intensidade da cor azul. A região de interesse (do inglês *Region of Interest - ROI*), demonstrada pelo círculo pontilhado em vermelho na figura, é estabelecida em cada estudo como área e posição de coleta dos pixels a serem analisados. A extração dos dados de uma imagem digital geralmente é feita por programas específicos como ImageJ [39], Matlab e aplicativos para smartphones, que a partir da decomposição dos pixels selecionados na ROI extraem valores de 0-255 referente ao canal de acordo com o sistema RGB.

**Figura 6.** Sistema para aquisição de imagem digital em formato genérico e utilizado em análises químicas: A - Posições da lâmpada em relação à câmera; B - Reação colorimétrica genérica em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborada pelo autor

Da decomposição de cores primárias podem-se obter vários outros espaços de cores entre eles o HSV (do inglês *Hue, Saturation e Value*), CIE XYZ (do inglês *International Commission on Illumination* com interpolação RGB), CIELAB (do inglês *International Commission on Illumination* com valores de brilho (L) e cromaticidades (l e b) e Escala de cinza [6]. Esses espaços de cores, bem como os canais do sistema RGB, podem ser diretamente correlacionados com propriedades ou fenômenos da matéria, a exemplo da variação da concentração de um analito considerando a diminuição ou aumento de um dos canais desse espaço.

Esses métodos são atrativos quando a aquisição de equipamentos de grande porte ou insumos se torna inviável ou quando as condições da reação química ou da amostra não são compatíveis com o equipamento disponível. Nesse caso, um simples dispositivo com possibilidade de realizar fotografia ou filmagem pode ser empregado a depender da necessidade. Além do baixo custo para a construção da maioria desses sistemas se comparado a outros equipamentos com a mesma finalidade, a versatilidade no uso de amostras em diferentes consistências e a viável portabilidade também podem ser consideradas como vantagens.

## *2. Aplicações das análises por imagem digital*

A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos relevantes em análise por imagem digital, publicados desde o ano de 1998 até 2020, que demonstram a evolução quanto aos recursos disponíveis para construção dos aparatos de aquisição das imagens, bem como as tecnologias envolvidas nos detectores de captura da imagem. Nota-se que os aparatos desenvolvidos para esse tipo de análise possuem estruturas variadas, pois suas aplicações atendem a diversos requisitos que dependem do objetivo da análise. Estas características peculiares do sistema como material e tipo de construção, detectores e portabilidade são melhor adaptadas quando se define o modo de introdução da amostra, que pode ser em fluxo (análise imediatamente após cada processo ou ensaio) ou em batelada (análise após um conjunto de ensaios).

### *2.1. Detecção*

As primeiras análises utilizando imagem digital com a finalidade de extração de dados e obtenção de informações de um sistema foram realizadas com o emprego de câmeras digitais tipo DSLR [7, 8]. A maioria desses dispositivos não apresentava comandos ativados por computador ou outro aparato, limitando o comando para fotografia direto na própria câmera. Equipamentos para obtenção de dados em função das cores chamados de optodos já eram também observados, mas não foram tão bem difundidos como as câmeras que apresentavam aplicação mais simplificada. A introdução das câmeras específicas para computadores, comumente chamadas de webcam, possibilitou um avanço significativo nas análises por imagem digital, visto que todas as câmeras dessa natureza, com o emprego de um software específico, possibilitavam a captura e armazenamento das imagens via computador e não mais com o acionamento direto, como ocorria com as câmeras DSLR. Além dessa vantagem, o custo dos dispositivos é menor, se comparados também com as câmeras, entretanto, por se tratar de dispositivos reduzidos, a qualidade e resolução das imagens tendem a ser inferiores.

Apesar de mais antigo que alguns dispositivos para aquisição de imagem, o Scanner de mesa, criado em 1963, foi utilizado em análise por imagem digital bem depois das câmeras DSLR e Webcams já estarem bem estabelecidas. A ideia de depositar as amostras sobre uma superfície um tanto sensível, mesmo que contidas em recipientes ou embebidas em superfícies porosas, limita a introdução da amostra e talvez por essa razão a literatura

registra poucas aplicações do scanner se comparadas a outros sistemas de detecção de cor para análise química por imagem digital.

No início da década de 2010, com o advento da telefonia móvel a maioria da população mundial passou a adquirir estes dispositivos como meio de comunicação. Com a melhoria dos recursos apresentados pelos modelos mais modernos, os chamados smartphones, esses passaram a disponibilizar câmeras de alta qualidade e softwares com funções específicas para a necessidade de cada usuário. Poucos anos depois essa tecnologia possibilitou uma nova vertente na imagem digital, com equipamentos independentes, muitas vezes em menor tamanho e, posteriormente, com os softwares dedicados à análise por imagem digital.

## *2.2. Construção dos dispositivos*

A preocupação pela iluminação controlada nas análises por imagem digital vem desde as primeiras aplicações da técnica com a maioria dos trabalhos apresentado fonte de iluminação dedicada em sistemas abertos e fechados. Em câmaras fechadas, a iluminação controlada tem sua fonte em lâmpadas comuns ou diodos emissores de luz (LED, do inglês *Light-Emitting Diode*), em sua maioria branca, mas podendo ter colorações específicas entre vermelho, verde ou azul para aplicações peculiares no estudo da absorção da radiação. Nos primeiros trabalhos que descrevem análise por imagem digital essas câmaras eram construídas em forma cúbica e constituídas de madeira ou papelão [9, 11]. Posteriormente, materiais poliméricos foram empregados tanto para a construção das estruturas quanto para o desenvolvimento de recipientes translúcidos como reatores para mistura das amostras em análise por fluxo ou dispositivos lab-on-a-chip (LOC). Hoje em dia a construção dessas câmaras geralmente é adaptada ao objetivo da análise, possibilidade aprimorada com o advento das impressões 3D e dos moldes de acrílico construídos para fins específicos.

O uso da impressora 3D vem se tornando uma alternativa quando o projeto requer uma especificidade para adaptação das câmeras e sistemas de iluminação, porém essa alternativa torna-se inviável quando o analista não possui capacidade técnica para manipular o software específico para construção de projetos 3D ou não dispõe de recursos financeiros para aquisição da impressora 3D e seu material de impressão. Esta execução, portanto, requer mão de obra especializada em função do detalhamento do projeto para

que o produto impresso apresente adaptação exata aos periféricos e também isolamento da luz externa. Sendo assim, quem não dispõe de recurso financeiro para aquisição e desenvolvimento desse tipo de tecnologia acaba se limitando a projetos elaborados com madeira, papelão ou outros materiais de menor custo.

Mesmo com o caráter inovador e a especificidade dos dispositivos impressos em 3D, muitos métodos também podem apresentar características analíticas equivalentes quando desenvolvidos com equipamentos construídos de materiais simples, como caixas de madeira e papelão. Entretanto, estes materiais podem apresentar limitações quando se busca reduzir as dimensões do dispositivo de captura de imagens para adaptação em smartphones, pois estes sistemas de captura tendem a se moldar e fixar aos aparelhos de telefone e com o máximo de isolamento da luz externa. Desta forma, as junções das faces para isolamento da luz externa bem como a sua fixação ao smartfone de equipamentos feitos de madeira ou papelão pode não apresentar tanta precisão para o encaixe ou isolamento da luz externa quanto um dispositivo impresso em 3D.

Os equipamentos desenvolvidos com caixa de papelão, madeira ou outros materiais de baixo custo não devem ser considerados como de menor qualidade quando comparados aos impressos em 3D. Estes apenas apresentam limitações que depender da necessidade do analista não são impedimentos para o desenvolvimento de um método com boas características analíticas e menos oneroso.

### *2.3. Portabilidade*

Com o uso dos smartphones ou webcams e a viabilidade oferecida por impressões 3D e estruturas acrílicas para a construção de dispositivos mais compactos, foi permitida a criação de dispositivos portáteis de pequena e média escala que possibilitaram análises em campo. A portabilidade destes sistemas também os torna mais independentes em função da sua fonte de energia própria e processamento dos resultados em tempo real. Entretanto, as estruturas acrílicas utilizadas podem apresentar algumas desvantagens como reflexão da luz sobre área fotografada devido ao aspecto espelhado do material, redução da transparência em razão da composição do próprio material. Além disso, a redução das dimensões para as elaborações em 3D exige melhores resoluções das impressoras empregadas uma vez que os acoplamentos, conexões e compartimentos são bem reduzidos.

Mesmo assim, as aplicações abordadas nos trabalhos existentes da literatura demonstram uma tendência dessas propriedades, e isso é observado na Tabela 1 pelo predominante emprego de smartphones e construções 3D para a quantificação ou detecção de diversos analitos em áreas variadas.

#### *2.4. Modo de introdução da amostra*

A escolha do modo de introdução da amostra nestes métodos precede a etapa de aquisição dos materiais para construção do sistema, pois as configurações das partes do sistema devem ser definidas e adquiridas a partir do projeto elaborado para o método. Em alguns casos, e principalmente devido à falta de recursos financeiros ou técnicos do analista, a adaptação ocorre em função da disponibilidade das partes do sistema com configurações próprias e a junção dessas partes resulta em um equipamento para análise digital. Quando assim se desenvolve, o objeto da análise não deve exigir altos graus de sensibilidade ou precisão, ficando o estudo limitado, em sua maior parte, à capacidade do equipamento construído e conferindo características singulares às análises por imagem digital em fluxo e em batelada.

##### *2.4.1. Análises por imagem digital usando modo em batelada*

A análise em batelada aplicada para imagem digital segue o mesmo princípio das análises convencionais, pois a introdução da amostra para detecção, neste caso fotografia ou filmagem, é realizada em lotes e, geralmente, não demandam desenvolvimento de aparatos mecânicos ou elétricos que condicionam a amostra para medida e seu respectivo descarte. Um dos primeiros trabalhos envolvendo o uso dos dados de uma imagem digital pra esse tipo de análise foi realizado por W. Liu et. al. em 1998 [7]. Nesse estudo foi desenvolvido um método para medir o grau de moagem de grãos de arroz a partir dos lipídios contidos nas suas superfícies. Uma câmera convencional em modelo DLSR foi posicionada na parte superior de uma esteira de rolos, com iluminação vinda por tubos de fibra ótica devidamente posicionados, que giravam continuamente para viabilizar a fotografia da superfície completa dos grãos. Esse método foi limitado somente a amostragens sólidas e, especificamente, por conter uma esteira de rolos aplicado para observar superfícies de partículas com o tamanho de grãos de arroz, não sendo

recomendado para fotografia de sólidos com partículas mais reduzidas ou líquidos de qualquer natureza.

No ano 2000, Hirayama utilizou um método com base em optodos em PVC e papel para determinação de lítio em saliva [40]. Apesar de serem dispositivos independentes e compactos, por conterem em um mínimo espaço o reagente, a fonte de iluminação e o detector, esses envolvem construção complexa e conhecimento especializado para manipulação de polímeros e transdutores. Tais dispositivos de aquisição não necessitavam de câmera digital, mas a tradução dos sinais obtidos em cores por equações matemáticas demonstrava a possibilidade de se aplicar diferentes tratamentos matemáticos aos dados obtidos por imagem digital.

Em 2006, Choong et al. desenvolveram um método para estimar o teor de óleo em cocos que apresentava interação óptica sensível ao canal vermelho do sistema RGB. Para capturas de imagens foi utilizada a própria sala com luz controlada e uma câmera convencional digital DSLR para fotografia das imagens [8]. Apesar desse método ter demonstrado a versatilidade da análise por imagem quanto ao uso da luz ambiente e apresentar-se vantajoso pela sua simplicidade, a precisão e o limite de detecção ficam vulneráveis a sofrer alterações quando houver variação na luz externa por variáveis incontroláveis como o clima ou sombra do próprio analista.

Para análises colorimétricas em microescala, Soldat et al. (2009) utilizaram um scanner de mesa e placas de Elisa para aquisição das imagens dos produtos reacionais coloridos [12]. Apesar da construção e operação simples, a execução do procedimento deve ter manuseio cuidadoso para evitar imprecisão ou contaminação, uma vez que os poços que compõem a placa de Elisa são muito próximos e acondicionam um volume máximo de apenas 300  $\mu$ L. Entretanto, esse trabalho foi importante para aplicar outra forma de aquisição de imagem além da captura por câmeras, o modo de fotografia simultânea, já que uma fotografia tem a capacidade de capturar até 96 amostras por vez e reduzir o volume final de amostra para análise.

Zamora et. al., em 2011, utilizaram um recipiente branco de porcelana com poços de volume máximo de 1mL, iluminados por lâmpada fluorescentes, filtros para homogeneização da luz e minimização da reflexão para determinar níquel e ferro em amostras de meteorito [13]. Esse sistema, depois de receber as alíquotas com as respectivas reações colorimétricas, foi fotografado a 20 cm de distância com uma câmera modelo DLSR, com todas as fotografias em ângulos inclinados e em suporte fixo. O sistema apresentou simplicidade, mas apresenta desvantagens semelhantes ao método

para scanner [12] e pode não apresentar sensibilidade suficiente quando as amostras apresentarem saturações de cor semelhantes, uma vez que a captura dessas imagens é realizada em ângulo para evitar a reflexão da luz sobre a superfície. Além da vantagem de captura simultânea, esse método busca minimizar a interferência da luz refletida no recipiente da amostra, o que ainda não havia sido citado em estudos dessa natureza.

A aplicação da análise por imagem digital empregada no ano de 2012 por Chang et. al. utiliza papel para se obter medidas quantitativas de pH a partir de fotografias obtidas com um smartphone [15]. Apesar do princípio da técnica apresentar inovação com a construção de um pHmetro baseado neste fundamento a instrumentação utilizada, bem como a sua aplicação poderia ter sua precisão e reprodutibilidade aumentada se esse sistema fosse isolado da luz externa e a câmera fosse imobilizada. Ainda assim, esse trabalho é considerado relevante devido ao seu caráter portátil, aplicação do smartphone e introdução de amostra batelada simultânea.

Em outro estudo, realizado em 2013, a análise por imagem digital foi empregada para quantificar cálcio em água potável a partir da reação colorimétrica com aglyoxalbis (2-hydroxyanil) [18]. Para esse fim, Lopez-Moliner et. al. construíram um sistema em que uma cubeta é fotografada a 30cm de distância por uma câmera fotográfica digital DSLR e iluminada por uma lâmpada fluorescente, sendo todo esse aparato acondicionado em uma caixa para isolamento de luz externa. Esse sistema se assemelha aos demais e não apresenta inovação, além disso, a distância mínima requerida pela câmera dessa configuração e o tamanho dela para acomodação dentro da caixa torna-se uma desvantagem. Ainda que apresentasse desvantagens, o estudo idealizou uma construção mais simples para aparatos de aquisição de imagem com luz controlada empregando recipientes transparentes e reutilizáveis.

Utilizando nanopartículas de ouro impregnadas na superfície de uma fita sensível à vitamina D, Lee et. al. desenvolveram, no ano de 2014, um dos primeiros dispositivos portáteis construídos em impressão 3D para medida em batelada utilizando um smartphone. Esse dispositivo fotografava o produto colorimétrico em fitas impregnadas acomodadas em um aparato isolado da luz externa [19]. Nesse dispositivo, um Led âmbar de 5mm é incorporado em um difusor feito de polidimetilsiloxano (PDMS) que é posicionado na parte de trás da fita onde ocorre a reação colorimétrica. Tal sistema é alimentado por uma bateria para relógio e há um interruptor para ligar e desligar o led, apresentando dimensões totais de aproximadamente 5cm(L)x3cm(A)x1cm(C). Todo o sistema é imobilizado na estrutura do smartphone, posicionado e centralizado em frente

à câmera do celular. A operação do sistema é simples, mas a sua aquisição depende de um software específico para obtenção dos dados. Apesar de inovador, esse sistema não apresenta fácil construção, pois sua construção é feita a partir de um projeto de impressão 3D. Além disso, o projeto se torna limitado apenas para reações realizadas sobre a superfície dessa fita, o que inviabilizaria reações colorimétricas que ocorrem em líquido ou solução. Outro fator crítico é quanto à inserção manual das fitas, o que aumenta a possibilidade de contaminação tanto da superfície sensível das fitas quanto das paredes do próprio sistema.

Firdausa (2014) utilizou a imagem digital para determinação de ferro e cromo [20]. Esse estudo não apresentou inovação quanto à captação por injeção em fluxo ou sofisticação na construção do aparato, pois foi utilizada uma câmera DLSR modelo convencional. Um sistema semelhante foi proposto para determinação de cálcio em água [18], porém a captação da imagem simultânea foi aplicada para cinco cubetas com posições fixas contendo a solução colorimétrica.

Um sistema semelhante para quantificação de amilase foi construído por Thongprajukaew et. al. usando uma caixa com 30cm(L)x30cm(C)x10 cm(A) contendo 6 diodos de Led brancos e 6 compartimentos para introdução das amostras [22]. Todo o sistema foi isolado da luz externa e as amostras foram fotografadas por um smartphone. O emprego da fotografia simultânea para esses sistemas contribui positivamente para a reprodutibilidade do método, já que a reposição da amostra nos recipientes pode alterar, mesmo que minimamente, a posição da fotografia e os parâmetros da câmera quando estão configurados para modo automático. O modelo genérico desses projetos possibilita a adaptação em smartphone e a substituição das cubetas por recipientes translúcidos de qualquer natureza, o que o torna um modelo acessível e com a vantagem de medida simultânea de amostra. Esse princípio serviu de embasamento para alguns trabalhos publicados posteriormente [24, 25, 28]. Apesar da simples construção e do baixo custo de ambos, comparado às construções de outros equipamentos, esses aparatos não possuem a possibilidade de uma adaptação para sistemas em fluxo e introdução manual da amostra, o que aumenta o risco de contaminação.

Um sistema para aquisição de imagens foi desenvolvido por Choi et. al. (2014) para determinação de cortisol em saliva humana [21]. Nesse sistema, um smartphone é acoplado em um suporte impresso por impressora 3D, com dimensões de 70mm (Altura) x90 mm (Largura) x130mm (Comprimento), que isola a luz externa e direciona o flash do smartphone junto com a sua câmera para o compartimento a uma distância de 70 mm

onde se encontra a superfície com o reagente sensível ao cortisol. A fotografia é adquirida e processada por um aplicativo específico para esse fim, que converte os sinais obtidos em concentração do cortisol. O sistema é dependente de construções específicas para o compartimento, com necessidade de impressão 3D e de aplicativos específicos para a finalidade proposta, mas é uma das primeiras aplicações com spot teste comercial adaptado ao aparato de aquisição de imagem digital. Um sistema utilizando aparato análogo foi desenvolvido por Lee et. al. (2014) para determinação de vitamina D [19].

Com a mesma ideia dos testes rápidos e baseado nas fitas colorimétricas, Lopez-Ruiz et. al.(2014) construíram um sistema para medir nitrito e pH simultaneamente utilizando um papel de baixo custo embebido em reagentes colorimétricos.-Esse sistema, ao entrar em contato com a amostra, desenvolve colorações específicas em cada área delimitada no papel. A discriminação dessas áreas, bem como a intensidade das cores apresentadas está relacionada às faixas de pH e/ou a concentração de nitrito. Esse papel é fotografado por um smartphone que contém um software específico para essa finalidade e os dados são processados de acordo com o algoritmo personalizado do aplicativo. Apesar do sistema físico para aquisição da imagem se apresentar simples, o método depende de um aplicativo para o tratamento das imagens, além de impossibilitar um sistema em fluxo de amostra [23]. No entanto, o estudo demonstra a capacidade de alinhar a proposta de portabilidade e uso de baixas quantidades de reagentes a testes rápidos baseados em imagem digital, da mesma forma como os estudos citados anteriormente.

Jung et. al.(2015), com base nas propostas anteriores de portabilidade e testes rápidos usando fitas, elaboraram um dispositivo miniaturizado com dimensões de 25 mm(A)x12 mm(L)x12 mm(C), construído a partir de uma impressão em 3D para quantificar álcool etílico em saliva [26]. Nesse aparato, uma câmera de smartphone é direcionada para um compartimento contendo a amostra, o qual é iluminado por um espelho que reflete o flash do próprio smartphone que a fotografa. O caráter inovador desse dispositivo permite a portabilidade para análises em campo, mas a sua construção também depende exclusivamente de impressão em 3D e apresenta seu projeto limitado somente ao smartphone da marca Samsung e modelo Galaxy S4. Seu grau de reprodutibilidade quanto à imobilização da imagem e o foco da câmera não são citados no estudo, mas esse projeto torna-se importante para evidenciar a capacidade de síntese que dispositivos destinados às análises com imagem digital podem alcançar.

Em uma aplicação unindo as propostas de trabalhos anteriores usando caixa com luz controlada, uso do scanner e placas de Elisa para aplicações em microescala, Wang et. al.

(2016) construíram um sistema para quantificação de catecols em amostras de água doce [27]. O sistema possibilita a captura das imagens a partir de um smartphone acoplado na parte superior de uma caixa que contém uma placa de Elisa na sua base e é iluminada na parte inferior por uma superfície difratora de luz branca em diodos LED. Da mesma forma como os estudos citados anteriormente, esse sistema possui captura de imagem simultânea, não possibilita a adaptação por imagem em fluxo e sua construção é um pouco mais complexa do que os demais por envolver impressão 3D e iluminação indireta, mas o uso do smartphone e sua iluminação inferior possibilitou tornar portátil uma aplicação que só era viável com o uso de scanners de mesa e câmeras DSLR.

Um sistema desenvolvido por Wang et. al. para determinação de glucose e troponina cardíaca em humanos utilizou um novo contexto para análise por imagem digital. Neste aparato, um compartimento construído a partir de impressão 3D é posicionado em frente à câmera e ao disparo do flash de um smartphone. O sistema funciona com a radiação do flash direcionada por uma fenda de 1 mm que transpassa uma cubeta contendo a amostra e atinge a superfície de um disco compacto (CD, do inglês *compact disk*) e essa superfície dispersa a luz atenuada pela cubeta que reflete sobre a câmera do smartphone. As medidas e o tratamento são realizados utilizando as informações da imagem do espectro eletromagnético completo que é decomposto pela grade de difração e incidido na câmera. O princípio desse método é inédito, pois utiliza a imagem fotografada do próprio espectro eletromagnético para medir a absorção, além da aplicação de uma grade de difração simples e de baixo custo, entretanto a sua construção ainda é limitada ao projeto 3D e suas impressoras [29].

Em 2017, buscando aplicar os conceitos já apresentados em outros trabalhos de portabilidade e microescala adaptados à smartphones, Chen et. al. construíram um sistema para detecção de zearalenona a partir de um dispositivo impresso em 3D modelado para acondicionamento de uma placa de Elisa de 8 poços em linha e fixação na estrutura de um smartphone [30]. Nesse sistema, que é alimentado por pilhas de relógio para a iluminação do LED diodo, a placa de Elisa contendo as amostras é introduzida manualmente e a fotografia é realizada sequencialmente na parte inferior com a movimentação unilateral da placa. Além de um sistema miniaturizado que viabiliza a portabilidade, esse ainda possui a possibilidade de amostragem líquida com modo de introdução de amostra em batelada sequencial e capacidade para análise de oito amostras por vez, empregando também a ideia de portabilidade apresentada em trabalhos anteriores semelhantes [19, 26]. Mesmo com essas vantagens, a construção desse equipamento

apresenta a mesma complexidade dos citados anteriormente devido à dependência de impressão 3D, soldagem na parte elétrica e aplicativo de celular específico para esse fim.

Peng et. al.(2017) utilizaram a mesma técnica para aquisição de imagens a partir de um scanner de mesa, mas utilizando um papel reativo escaneado para determinar ferro total em amostras de água e alimentos utilizando microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) para pré-concentração [31]. Essa aplicação aprimorou o conceito de uso do scanner para aquisição de imagens e reduziu ainda mais o uso de amostras e reagentes. Entretanto, apesar de utilizar mínimas quantidades de amostra e pouca geração de resíduos, o método não permite adaptação para fluxo ou portabilidade como os seus antecessores.

Jalal et. al.(2017) buscaram conceitos de portabilidade e testes rápidos a partir de um sistema com plataforma transparente e translúcida contendo quatro superfícies descartáveis na parte interna, sensíveis e seletivas para pH, glicose, proteínas e glóbulos vermelhos e uma microbomba manual para aspiração da amostra de urina [32]. Após a inserção da amostra, o smartphone é acoplado à plataforma que é posicionada sobre uma caixa construída por impressão 3D e dedicada para iluminar a reação. Esse sistema apresenta estrutura inovadora em relação aos apresentados anteriormente pelo fato do aparato apresentar possibilidade de medida de quatro analitos simultaneamente e a inserção da amostra ser via bomba manual acoplada no próprio aparato, entretanto, sua construção é dependente de impressão em 3D e a aquisição das imagens é feita e tratada por um aplicativo específico.

Dangkulwanich et. al.(2018) aplicaram os princípios das análises baseadas em uso de scanners, que apresentam iluminação pela parte inferior, para estudar a reação de hidrólise da amilase em função da temperatura [33]. Nesse método, a efetividade da hidrólise é relacionada com a variação da temperatura quando em contato com ácido dinitrosalicílico (DNS), resultando em um produto colorido proporcional à concentração do analito. A solução é transferida em alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  em poços feitos no papel filtro (com auxílio de perfurador comum de escritório) depositado em placa de Petri. Essa placa é disposta sobre uma folha de papel sulfite branca, imobilizada por garras, iluminada na sua parte inferior por uma lâmpada convencional e fotografada na parte superior. O sistema é vantajoso devido ao seu baixo custo e a sua viabilidade de construção, visto que os materiais utilizados são de fácil aquisição e a sua montagem não demanda conhecimento específico, além da captura da imagem simultânea. Adicionalmente, as aplicações utilizadas nas análises por scanner como uso de placa de Elisa e folhas de papel contendo

as amostras podem ser adaptadas nesse sistema. Entretanto, o sistema pode ter sua precisão afetada quando a luz ambiente é alterada ou o posicionamento da câmera é modificado por constantes manuseios da posição da garra, lâmpada ou placa de petri.

Em outro trabalho, proposto por Chen et. al.(2019) para determinar glicose e hemoglobina A em humanos, a fotografia da amostra é obtida por um smartphone sobre uma caixa com dimensões de 80mm(A)x100mm(L)x70mm(C) construída com um inédito aparato em formato de V, para dispersar e homogeneizar a luz incidida pelo flash do próprio smartphone [34]. Essa iluminação é direcionada para as paredes brancas da caixa e a iluminação indireta diminui a reflexão do flash na amostra, melhorando a sensibilidade e aumentando o limite de detecção do método. Da mesma forma como o trabalho citado anteriormente, que utiliza iluminação indireta inferior na análise de Catecol [27], o sistema retoma esse conceito, mas com iluminação na parte superior, medidas simultâneas e com uma elaboração simples. Tal sistema apresenta a desvantagem de não viabilizar a amostragem em fluxo utilizando essa conformação. Além disso, a estrutura da caixa e do dispersor de luz é construída a partir de impressão 3D, o que apresenta mais uma limitação.

Danchana et. al. publicaram, em 2020, um estudo que desenvolveu um sistema portátil para aquisição de imagens digitais baseado em um aparato impresso por 3D que acondiciona uma cubeta, iluminada por um diodo LED, e uma webcam em formato cilíndrico [35]. Esse sistema é uma versão minimizada de caixas com luz controlada para aquisição de imagens digitais e demonstra o avanço das tecnologias para construção de aparatos para esse fim, pois esse, apesar de apresentar conceitos de miniaturização, comporta uma webcam ao invés de acoplamento em smartphone. A portabilidade é uma vantagem desse sistema, pois possibilita aplicação em campo se a câmera for conectada a um smartphone via porta universal USB (do inglês *Universal Serial Bus*), entretanto a sua construção é dependente de impressão em 3D e da elaboração de circuito eletrônico para modulação da iluminação. Além disso, o sistema oferece a injeção de apenas uma amostra por vez e não apresenta luz uniforme quando o LED é posicionado na posição axial, podendo ser utilizado apenas na posição superior à cubeta para uma medida mais precisa. Essa condição limitada da posição do LED inviabiliza o uso de compartimentos transparentes para fluxo, já que esses apresentam vias de entrada e saída superiores, inferiores ou ambas, sendo necessária a construção de aparatos específicos para essa finalidade com vias laterais.

Para determinar cobalto em amostras de alimentos, águas naturais e vitamina B12, Barreto et. al. (2020) desenvolveram um sistema para captura de imagem a partir de uma caixa de madeira de dimensões 32 cm (largura) x 23 cm (Comprimento) x 8 cm (Altura) e iluminação interna controlada. Esse sistema seria comum quando comparado aos citados aqui, mas o seu modo de captura acontece a partir de um microscópio digital compacto de aproximação em 600x. O mesmo é fixado de forma concêntrica em um tubo vazio de caneta esferográfica e esse conjunto é introduzido no interior de um tubo de centrifuga, que se encontra na caixa de madeira e contém o material a ser fotografado previamente centrifugado e com seu sobrenadante removido [36, 37]. O aparato para captura por imagem digital apresenta a vantagem de ser portátil e possibilita sua aplicação em campo, porém o encaixe do dispositivo e do recipiente da amostra para fotografia se torna uma desvantagem quando a quantidade de amostras for numerosa. A reprodução das imagens também pode ser comprometida se a fixação da câmera em relação ao ponto de fotografia não for robusta.

Observa-se nas análises por imagem digital em batelada uma grande versatilidade na construção de equipamentos. Tal característica contribui para obtenção de sistemas com variação no estado físico da superfície a ser fotografada, bem como a fotografia simultânea, que é um fator importante quando se busca minimizar erros causados por equalização automática do brilho e cor dos dispositivos de aquisição de imagem. São observados também o uso de recipientes e superfícies para acomodação da amostra de vários materiais e conformações, destacando-se entre eles as superfícies de porcelana, papéis e recipientes translúcidos de vidro ou acrílico que são os mais usados. Além disso, o posicionamento da fonte de iluminação também é bastante explorado, uma vez que o uso de recipientes translúcidos favorece, em muitas aplicações, o estudo de uma incidência luminosa otimizada. Esses sistemas tendem a ser de baixo custo e sua tendência ao longo do tempo é permitir a portabilidade devido ao uso dos smartphones e câmeras mais reduzidas, porém a miniaturização bem como o uso de fontes de radiação mais reduzidas, como diodos LED necessários em alguns casos, implicam em projetos de impressão em 3D e conhecimento básico em eletrônica. A reposição manual de lotes de amostras pode interferir na precisão das medidas devido a ajustes automáticos das câmeras como brilho, cor e foco diante da modificação do posicionamento dos recipientes. A contaminação das amostras deve também ser considerada, uma vez que os recipientes ou superfícies são preenchidos a cada medida e isso favorece o aumento de erros sistemáticos. Entretanto, essas desvantagens apresentam uma breve atenuação

quando as amostras são introduzidas em lotes para fotografia simultânea, que contribuem também para diminuir o tempo de análise.

#### *2.4.2. Análises por imagem digital com introdução mecânica em fluxo*

Equipamentos para análise por imagem digital em fluxo são aparatos com introdução de amostra mecânica que não sofrem interferência manual do analista no seu percurso até a medida fotográfica e seu respectivo descarte. Partindo desse princípio e considerando a evolução dos equipamentos dessa natureza ao longo do tempo, Gaiao et. al. (2006) utilizaram um método de titulação colorimétrica com base em imagem digital (DIB), sendo a aquisição de imagem obtida a partir de um sistema em fluxo com aspiração da amostra através de uma bomba peristáltica externa de grande porte com a finalidade de determinar HCl e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em soluções aquosas e alcalinidade total em águas minerais. Nesse sistema a amostra é direcionada para uma cubeta de fluxo, que fica acondicionada em uma câmara cúbica com medidas de 11cm (Altura) x14cm (Comprimento) x9cm (Largura) e iluminada por uma lâmpada fluorescente de bulbo em uma de suas arestas. A iluminação não é centralizada em relação à cubeta, o que forma um sombreamento no lado esquerdo da imagem fotografada, podendo levar a imprecisão dos resultados. Além disso, a câmera utilizada não apresenta o foco otimizado para curtas distâncias e essa limitação não é desejável quando a câmera utiliza foco automático e esse pode ser alterado sob súbitas mudanças de cor ou heterogeneidade do líquido provocada por bolhas na cubeta [9], mas foi possível a partir desse trabalho aplicar técnicas já existentes, como a da construção de câmaras com luz controlada adaptadas às injeções em fluxo.

Busciglio et. al. (2008) avaliaram a influência de bolhas no funcionamento de um sistema hidráulico para camas de leitos hospitalares e utilizaram um sistema baseado em imagens digitais com a finalidade de medir parâmetros como distribuição, dimensões e velocidade das bolhas. Nesse sistema, uma câmera digital fotografa um aparato translúcido que tem como luz de fundo uma fonte de iluminação difusa e, para uniformizar essa iluminação, utiliza-se superfícies refletoras na parte anterior a este aparato translúcido. O sistema, apesar de apresentar viabilidade para trabalho em fluxo, apresenta seus componentes (lâmpadas, placas reflexivas e tamanhos) aumentados para se adaptar a visualização da simulação do sistema hidráulico real dessas camas hospitalares. O custo envolvido na construção desse sistema e a sua eventual miniaturização para adaptação em outras finalidades, como por exemplo, para o uso de

análises químicas com volumes de amostras reduzidos se torna laborioso e sem a certeza da eficácia. Entretanto, a ideia de se construir recipientes translúcidos de amostras para análise em fluxo a partir do dispositivo cilíndrico empregado nesse trabalho [10] é observada atualmente.

Para quantificar lítio, sódio e cálcio em medicamentos antidepressivos, soro fisiológico e água, Lyra et. al. (2009) aplicaram um método baseado em imagem digital utilizando a captura de imagens das emissões dos elementos citados. Assim, uma câmera encapsulada em um tubo de papelão para evitar interferência externa foi direcionada para a chama de um fotômetro. Todo esse sistema de captura que envolve a câmera e parte do acoplamento no fotômetro de chama foi isolado por um compartimento de madeira adaptado para as medidas do sistema. Apesar do sistema apresentar caráter inovador por não conter na literatura da época trabalhos que envolvessem emissão atômica e imagem digital, esse não apresenta configuração simples para construção, uma vez que o seu funcionamento depende, exclusivamente, de uma fonte de energia térmica por chama e a amostra deve ser nebulizada para alimentar o sistema. Além disso, a baixa energia fornecida pela chama limita a quantidade de analitos a serem analisados no sistema e os interferentes espectrais podem não ser eliminados devido ao sistema de captação de imagem somar os comprimentos de onda emitidos para a representação de uma cor [11].

Para determinar cromo e alumínio em águas naturais, Andrade et. al. (2013) construíram um sistema para análise em fluxo que fotografa, por meio de uma webcam, uma câmara de reação contida em uma caixa de iluminação controlada por uma lâmpada fluorescente [16]. Nesse sistema são utilizadas cinco válvulas solenoides, uma bomba peristáltica multivias e um agitador magnético com os dispositivos controlados por uma central lógica e comando de um software específico. Apesar da viabilidade desse aparato atender à análise sequencial dos analitos citados e a análise em fluxo reduzir a contaminação do sistema proveniente do contato do analista, a construção de um sistema como esse é complexa e exige conhecimento nas áreas de informática e eletrônica. Considerando que a característica principal do estudo é a aquisição por imagem digital, a parte atribuída a essa finalidade pode ser aperfeiçoada a partir da centralização da iluminação para a redução de sombras no reator pouco transparente e a diminuição da câmara para torná-lo mais adaptado a uma aplicação em campo. O projeto desse equipamento foi importante na evolução da análise por imagem digital, pois foi um dos primeiros a incorporar as técnicas de câmaras de reação translúcidas, antes somente

utilizadas em sistemas em batelada, para servirem como recipiente de fotografia para amostras.

Para a determinação de taninos em chá verde, Lima et. al. utilizaram um sistema em fluxo cuja câmara de reação translúcida se encontrava dentro de uma caixa constituída de paredes brancas e com iluminação em LED para fotografia por webcam [17]. Esse sistema, pela sua complexidade em automatizar as injeções, assemelha-se ao citado anteriormente [16], mas possui aprimorações devido à forma de iluminação e cuidados com a homogeneidade do ambiente. Mesmo considerando todos esses requisitos, a parte que implica na aquisição por imagem digital mantém os mesmos princípios se comparado aos sistemas anteriores apresentados até aqui.

Utilizando uma estrutura análoga ao dispositivo construído por Barreto et. al. [36, 37], Santos et. al. (2020), para determinação de níquel em amostras ambientais, adaptaram uma câmara de extração para pré-concentração alimentada por fluxo no interior desta caixa de madeira [38]. Neste sistema, a câmara de extração é constituída de acrílico translúcido com a face contendo a região do sorvente voltada para o microscópio digital. A amostra, bem como as outras soluções, são injetadas e descartadas nesta câmara a partir de uma bomba peristáltica externa. O procedimento de fotografia bem como a adaptação do microscópio na caixa de madeira, ocorria de forma análoga ao dispositivo construído por Barreto et. al.. Acrescentando mais vantagens ao seu antecessor, esta adaptação em fluxo apresenta uma nova vertente nos dispositivos para análise por imagens digitais, uma vez que a injeção em fluxo em equipamentos portáteis e de forma tão simplificada ainda não foram bem explorados.

As publicações dos estudos envolvendo os equipamentos construídos para amostragem em fluxo estão presentes em menor número se comparado ao sistema de introdução usando modo em batelada manual. Certamente isso ocorre devido à complexidade de construção desses sistemas e, no caso em específico da análise por imagem digital de certos impedimentos tais como: i) posição da câmera sobre a amostra; ii) recipientes de amostras translúcidos com melhor adaptação às estruturas existentes até o momento e iii) câmera com capacidade de aproximação suficiente para capturar áreas de 4 mm<sup>2</sup> das cubetas de fluxo convencionais. Outra desvantagem da análise em fluxo por imagem digital se apresenta quando a iluminação sobre a cubeta provoca diminuição da sensibilidade causada pela atenuação da iluminação. Essa atenuação ocorre geralmente por sombreamento provocado pelas vias de fluxo que se encontram na parte superior das cubetas. Por outro lado, essa configuração em fluxo pode diminuir o tempo de análise

gasto em mistura de reagentes e reposição de amostra e, quando o recipiente translúcido é reutilizável, pode-se eliminar a etapa de descontaminação para cada medida. Uma peculiaridade vantajosa da injeção em fluxo para análise por imagem digital se encontra na possibilidade de observação das propriedades de uma reação ou amostra em função do tempo ou de adição de reagentes a partir de filmagens ou de fotografias sequenciais realizadas em reatores translúcidos.

### *2.5. Considerações*

Por esse levantamento realizado nesta tese, focando nos trabalhos de relevância para discutir a evolução dos componentes e construções das análises por imagem digital ao longo destes 20 anos, deve-se considerar que a tecnologia, como naturalmente acontece, contribui consideravelmente para o aprimoramento dos sistemas dedicados a essa finalidade. Câmeras digitais com maior definição, resolução de imagens proporcionadas por seus detectores mais avançados, lentes de aumento para captação de detalhes, construções 3D exclusivas de câmaras e recipientes/reatores de alta transparência e iluminações por fontes de radiação em diodos LED cada vez menores, proporcionam ampla flexibilidade na adaptação de processos químicos para seu melhor entendimento. Entretanto, o avanço das análises nesse campo para obtenção de resultados mais precisos e sensíveis demanda um custo mais elevado devido ao emprego de novas tecnologias em suas composições. Ainda assim, tais sistemas são menos onerosos quando a referência é adquirir e custear manutenção de espectrômetros cujo uso seria para a mesma finalidade. Além disso, alternativas mais baratas são citadas neste levantamento como o uso de scanners e smartphones, estruturas em papelão ou a luz ambiente, equipamentos que estão ao alcance de muitos analistas, mas com suas peculiares limitações.

Além dos estudos desta pesquisa, um artigo de revisão de alta qualidade foi publicado em 2015 a fim de contribuir para a melhoria dos sistemas e métodos desenvolvidos na área química empregando análise por imagem digital. Mesmo assim, a literatura ainda é carente de revisões com temas abordando amostras de interesse da química analítica, como amostras ambientais, biológicas, geológicas, etc.



## **CAPÍTULO I**

### **ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE Fe(II) e Fe(III) EM VINHO BRANCO BASEADA EM IMAGEM DIGITAL**

# ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE Fe(II) e Fe(III) EM VINHO BRANCO BASEADA EM IMAGEM DIGITAL

## RESUMO

Este trabalho propõe uma estratégia analítica utilizando imagens digitais para a especiação inorgânica de ferro em vinho branco. A instrumentação utilizada foi de baixo custo utilizando apenas uma caixa de madeira, uma lâmpada led, uma webcam e uma cubeta para aquisição das imagens digitais. O método foi estabelecido pela reação de íons Fe(II) com o reagente cromogênico 1,10 ortofenantrolina. O ferro total foi determinado usando o mesmo reagente após a adição de hidroxilamina como agente redutor. Em ambos os casos, imagens digitais dos padrões/reagente cromogênicos e amostras foram obtidas e armazenadas no formato JPEG. A região de interesse (ROI) foi determinada com um quadrado de forma constante para todas as imagens. O ROI foi submetido à decomposição em valores de cores de acordo com o sistema RGB. Os dados obtidos pelo canal azul foram os utilizados na construção das curvas analíticas por apresentar a maior sensibilidade. A otimização das condições experimentais do procedimento foi realizada empregando técnicas multivariadas. A precisão foi avaliada usando uma amostra de vinho com Fe(II) e teores totais de ferro de 0,46 e 0,51 mg/L, respectivamente. Os resultados expressos em desvios padrão relativos foram de 3,47% para Fe(II) e 5,36% para ferro total. A exatidão do método foi avaliada por meio de comparação entre os resultados obtidos para o ferro total pelo método usando imagem digital com os resultados encontrados usando a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). O método desenvolvido foi aplicado para análise de especiação em seis amostras de vinho e o conteúdo encontrado variou de 0,41 a 1,67 mg/L para Fe(II) e de 0,69 a 1,71 mg/L para ferro total. Esses resultados estão de acordo com os encontrados em outros estudos para análise de especiação de ferro em amostras de vinho. O conteúdo de Fe(III) pôde ser encontrado pela diferença entre o conteúdo total de ferro e Fe(II). O método se apresentou com boa sensibilidade e linearidade, podendo ser utilizado para análises com matrizes análogas ao vinho na intenção de diminuir os custos elevados provenientes de equipamentos mais sofisticados.

## 1. INTRODUÇÃO

A análise por especiação inorgânica de ferro em vinho é considerada importante, pois quantifica os compostos insolúveis de Fe(III) nessa matriz. O parâmetro de controle tecnológico nas vinícolas está diretamente relacionado com a qualidade e, conseqüentemente, com o seu valor de mercado após o engarrafamento [41-43].

Nesse sentido, vários métodos foram propostos para a análise de especiação de ferro em vinhos [44-50]. Rousseva et al. [44] utilizaram um procedimento de extração em fase sólida para avaliar a presença das formas hidrofóbica, catiônica e residual de cobre e ferro em amostras de vinho. Costa e Araújo [45] propuseram um método para a determinação de Fe(III) e ferro total em matrizes de vinho. Para o Fe(III), o procedimento baseou-se na extração líquida do complexo de tiocianato de Fe(III) e na quantificação empregando análise sequencial de injeção e espectrofotometria de absorção molecular (MAS), enquanto o ferro total foi determinado por FAAS. Outro método também utilizou a espectrofotometria de absorção molecular para a determinação de Fe(II) e ferro total em vinho. O Fe(II) foi determinado usando o reagente 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)-fenol (Br-PADAP), enquanto o ferro total foi quantificado utilizando o mesmo reagente após uma etapa de redução usando ácido ascórbico [46]. Lopez et al. [47] propuseram um procedimento usando o reagente 2,2'-dipiridilcetona picolinoylidrazona (DPKPH) na ausência e presença de ácido ascórbico para a quantificação de Fe(II) e ferro total em vinho usando "MAS". Camara et al. [48] propuseram um biossensor descartável para a detecção de Fe(III) em vinhos. Mitreva et al. [49] desenvolveram um polímero com íons impressos para extração de Fe(II) em amostras de vinho. Recentemente, Lao et al. [50] empregaram a técnica da membrana de Donnan para a extração de espécies livres de Zn(II), Fe(III), Ca(II) e Mg(II) em vinho tinto.

Nos últimos anos, muitos métodos analíticos convencionalmente estabelecidos por espectrofotometria de absorção molecular foram adaptados usando métodos baseados em imagem digital [6], como o emprego de um scanner [51, 52], câmera digital, smartphone [53], tablet, computador e webcam [6, 53, 54]. Essas novas abordagens permitiram o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas, de baixo custo, precisas, com potencial de portabilidade e a capacidade de enviar remotamente os resultados através de tecnologias como Wi-Fi ou Bluetooth, representando uma verdadeira popularização das ciências das medidas analíticas [6].

Nesse contexto, vários métodos analíticos foram propostos e aplicados com sucesso para quantificação de ferro em matrizes complexas por meio de imagem digital [55-59]. Firdaus et al. [55] desenvolveram um procedimento para a determinação de cromo e ferro em soluções sintéticas usando um complexo formado por íons Fe(III) e tiocianato. O processamento dos dados foi realizado utilizando a regressão linear simples (SLR) da cor individual R, G ou B, e também o método dos mínimos quadrados parciais dessas três cores. Igoe e Parisi [56] propuseram um método analítico para a avaliação da corrosão do ferro usando uma câmera de smartphone. Barros et. al. [57] empregaram uma webcam para adquirir as imagens digitais durante a determinação de alumínio, ferro total, nitrito e fósforo solúvel em água. As intensidades de vermelho, verde e azul foram convertidas em absorvâncias para estabelecer a técnica de calibração externa. O reagente cromogênico utilizado para a determinação do ferro foi 1,10 ortofenantrolina. Masawatet. al. [58] também usaram 1,10 ortofenantrolina como reagente complexante na Colorimetria de Imagem Digital para determinação do ferro total em água natural. Os autores realizaram um estudo aprofundado sobre a relação entre a concentração de ferro (II) e os sete parâmetros da imagem (Red, Green e Blue, além de Hue, Saturation, Intensity e Gray). Cardoso et al. [59] desenvolveram um sistema de imagem digital para estudar a corrosão de chapas de aço usando um dispositivo de poliéster impresso a laser. As espécies coloridas foram formadas pela reação de Fe(III) com tiocianato.

Muitos métodos desenvolvidos têm obtido melhor desempenho quando suas variáveis são otimizadas através de planejamento experimental. O planejamento fatorial completo de dois níveis tem sido frequentemente empregado para avaliação preliminar das variáveis experimentais dos processos, essa ferramenta quimiométrica estabelece modelos lineares que permitem o cálculo dos efeitos dos fatores [60-63].

Neste trabalho, um novo método baseado em imagem digital obtida por equipamento de baixo custo para análise de especiação de ferro em vinho branco é apresentado pela primeira vez. Essa nova abordagem combina a reação colorimétrica bem estabelecida entre o Fe(II) e a 1,10 ortofenantrolina (como reagente cromogênico) e as vantagens de usar uma medida analítica com base em visão computacional.

## 2. OBJETIVOS

- Construir um sistema para aquisição de imagem digital com baixo custo, simples e eficaz para quantificações químicas baseadas em reações colorimétricas;
- Otimizar um método colorimétrico para quantificação de Fe(II) e Ferro Total a partir de planejamento experimental multivariado;
- Quantificar Fe(II) e Fe(III) em amostras de vinho branco;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Reagentes

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água de alta pureza com resistividade de 18,2MΩcm obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, EUA) e, posteriormente fervida para eliminação de oxigênio. Além disso, os reagentes utilizados em todas as experiências foram de qualidade analítica (Merck, Darmstadt, Alemanha).

#### 3.2. Amostras

Todas as amostras analisadas neste trabalho foram de vinho branco comercial tipo seco e envasados em recipientes de 1L. Essas amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador, no estado da Bahia, e com diferentes marcas. As análises foram realizadas imediatamente após a abertura das garrafas e sempre com alíquotas adquiridas diretamente do recipiente original.

#### 3.3. Instrumentação

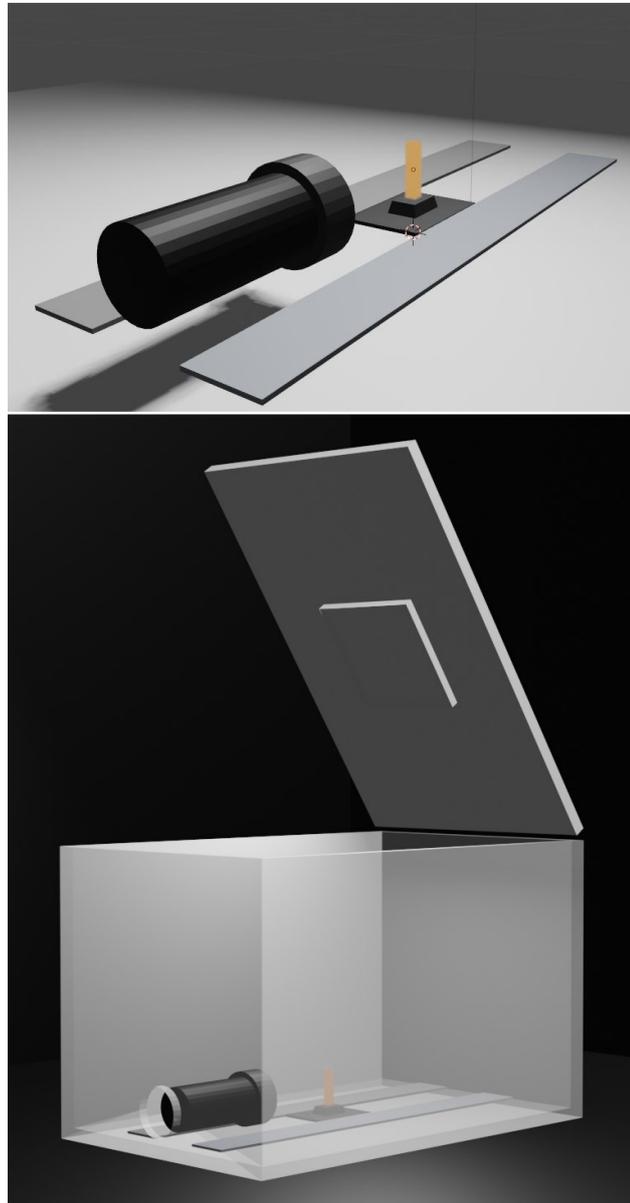
A determinação do ferro total em amostras de vinho foi realizada utilizando um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua por chama (HR-CS FAAS) modelo ContrAA 700 da AnalytikJena AG (Jena, Alemanha), usando a linha de absorção atômica primária de ferro (248,327 nm).

#### 3.4. Aquisição e avaliação de dados RGB

Para captura da imagem digital foi construído um sistema fechado de iluminação controlada com a finalidade de homogeneizar a iluminação, imobilizar o compartimento da amostra e, com isso, melhorar a reprodutibilidade das imagens durante as medidas (Figura 7). Nesse sistema, um display quadrado com LEDs SMD (110V/220V, 6W, 6500K) é acomodado na parte superior de uma caixa de madeira ( Figura 9) com tampa e revestimento interno branco opaco (21 × 25 × 30 cm), tem seu feixe de luz direcionado para a parte superior de uma cubeta que se encontra no assoalho dessa caixa(Figura 10 e

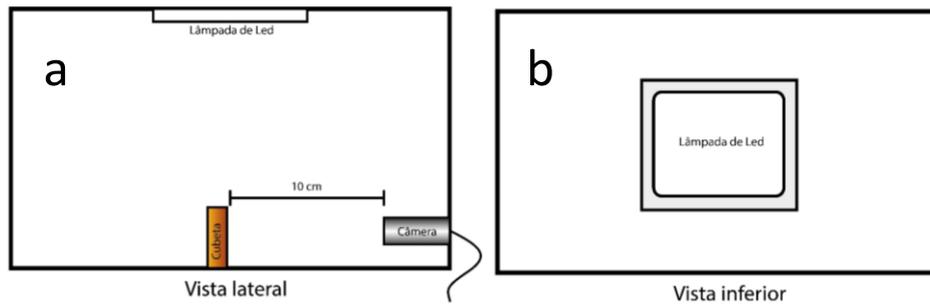
Figura 11). Voltado para a face transparente dessa cubeta, e também no assoalho dessa caixa, é posicionada uma câmera digital a 10 cm de distância, em formato webcam (Microsoft, Lifecam Cinema), que se encontra conectada a um computador e possui configuração automática para foco e brilho.

**Figura 7.** Projeção em 3D do sistema de aquisição de imagem digital.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 8.** a) Vista lateral (esquerda) e b) inferior (direita) do sistema de aquisição de imagem e a disposição da lâmpada LED sobre o sistema.



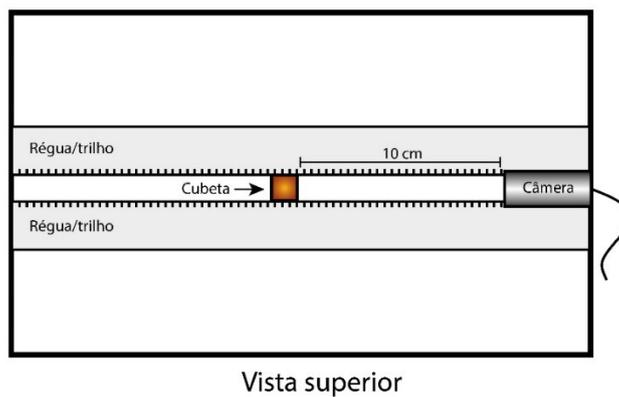
*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 9.** Sistema para aquisição de imagem digital em funcionamento.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 10.** Vista superior da câmara de captura de imagem.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 11.** Vista aproximada da webcam e suporte de acomodação da cubeta.



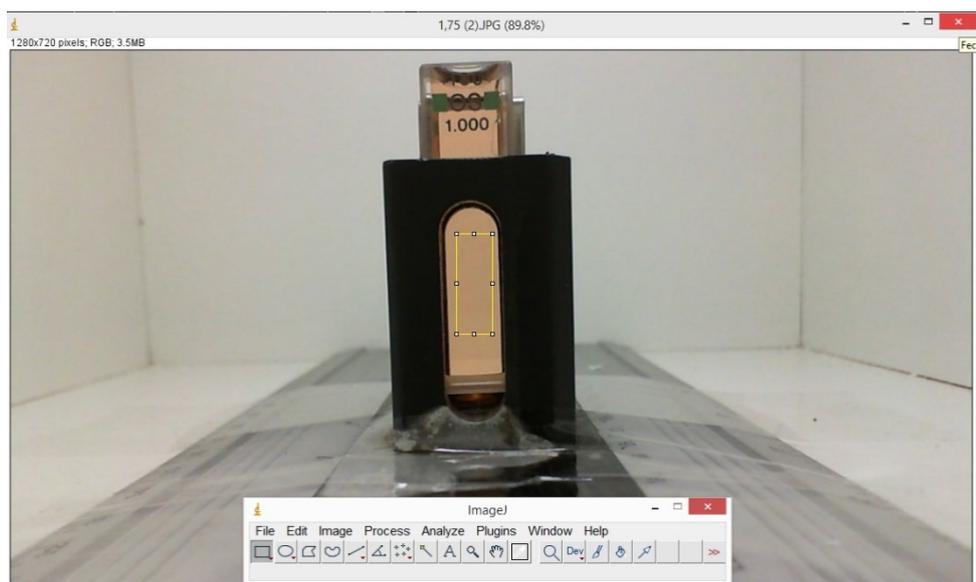
*Fonte: Elaborada pelo autor*

O computador utilizado para aquisição e processamento das imagens foi da Marca Sony, modelo vaio com processador Intel Core I3-3110M 2.4GHz, memória de 4,00GB e adaptador de vídeo Intel HD Graphics 4000. Todas as imagens capturadas foram adquiridas pelo software “Câmera”, disponível gratuitamente no Windows 8.1 64bits e com resolução ajustada pra 1280 x 720 px.

### *3.5. Extração e tratamento de dados dos sistemas de cores*

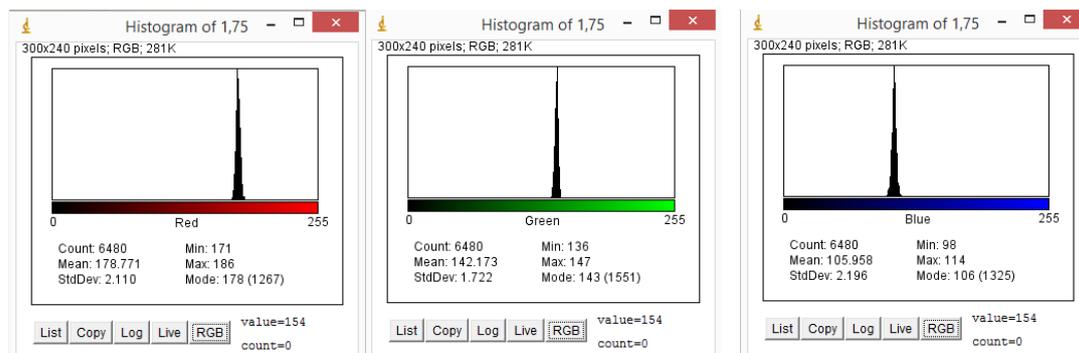
Para extração da matriz de dados do sistema RGB foi utilizado o software ImageJ [39]. A área de captura, denominada ROI (do inglês *Region of Interest*), foi retangular e fixa em todas as fotografias, como mostra a Figura 12. Foi importante se aumentar a área da ROI o máximo possível para uma maior amostragem dos pixels e melhor representação da amostra. Entretanto, este procedimento foi realizado com cautela para não comprometer a homogeneidade dos pixels selecionados em razão de partes indesejadas como sombras, reflexões ou bordas do compartimento da cubeta. Os dados foram extraídos para cada imagem individualmente a partir das informações disponíveis em função do comando “Histogram” do software (Figura 13). Essas informações são organizadas em um histograma de cores e o valor médio de cada canal de cor, vermelho (R), verde (G) e azul (B) é calculado. A definição dos sinais analíticos com base no valor da cor em conformidade compatível com a lei de Beer foi definida como  $-\log(P/P_0)$ , onde P é o valor médio de R, G e B para solução padrão ou amostra e  $P_0$  é o valor médio de R, G e B para o branco analítico.

**Figura 12.** Região de interesse (ROI) e área de trabalho do software de aquisição de imagem ImageJ.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 13.** Histogramas das frequências dos pixels na ROI por canal de cor no espaço RGB.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

### 3.6. Procedimento geral

O procedimento relatado para a determinação de ferro com o reagente cromogênico 1,10-ortofenantrolina foi utilizado como base para desenvolvimento dos métodos seguintes [64]. Neste procedimento, 2,0 mL de ácido clorídrico concentrado e 1,0 mL de cloridrato de hidroxilamina (10% m/v) são adicionados a 50 mL de amostra de água, previamente preparada para disponibilidade do ferro e, após este procedimento para redução do Fe(II) em ferro total, são adicionados 2,5 mL do reagente 1,10-Ortofenatrolina (0,1% m/v) e aguardado de 10 a 15 minutos para o desenvolvimento da cor. Após a reação

colorimétrica completa, estas soluções são levadas para medida em um espectrofotômetro fixado em um comprimento de onda de 510 nm.

### *3.7. Definição do canal de trabalho no sistema de cor RGB e otimização do método*

Um estudo para identificar o canal de cor com maior correlação com a concentração de Fe(II) foi realizado. As soluções foram preparadas na ordem crescente de concentração com a adição de água ultrapura, alíquotas de Fe(II) na faixa de 0,00-4,00 mg/L, 4 mL de ortofenantrolina 0,1% (m/v) e 4,00 mL de tampão acetato pH 4,0 para 50mL de solução final. As fotografias de cada solução bem como seu tratamento de dados foram realizadas como relatado no item anterior (3.4.). A correlação da absorção da radiação é dada pela atenuação proporcional de um dos canais dentro do sistema RGB. Geralmente, um desses canais, que compreende uma faixa de comprimento de onda dentro da radiação eletromagnética visível, possui maior correlação com a concentração analítica estudada e se torna suficiente para explicar o sistema a partir de um modelo de predição.

### *3.8. Aplicação do planejamento fatorial completo de dois níveis*

A partir da definição do canal de cor, um planejamento fatorial completo de dois níveis foi aplicado com a finalidade de aumentar a sensibilidade do método, bem como otimizar as quantidades empregadas de reagentes na reação colorimétrica. Foram utilizados como fatores o pH e volume de ortofenantrolina 0,1% (m/v) na reação com Fe(II). Para otimização do método de quantificação do ferro total foi realizado outro planejamento fatorial variando os fatores pH, volume de ortofenantrolina 0,1% (m/v) e volume de cloridrato de hidroxilamina a 10% (m/v). Os domínios experimentais foram estabelecidos considerando as concentrações apresentadas no procedimento geral [64] (Tabela 2). Triplicatas dos pontos centrais foram realizadas para determinar o teste de curvatura e o erro experimental em ambos os planejamentos. Todos os experimentos foram realizados de forma aleatória utilizando um volume constante de vinho.

**Tabela 2.** Domínio experimental para os planejamentos fatoriais aplicados no método de Fe(II) e Ferro total.

Fatores	Fe(II)			Ferro total		
	Níveis			Níveis		
	(-1)	0	(+1)	(-1)	0	(+1)
pH	3,75	3,88	4,00	3,75	3,88	4,00
Volume de O-fenantrolina. (mL)	2,00	4,00	6,00	2,00	4,00	6,00
Volume de cloridrato de Hidroxilamina (mL)	-	-	-	2,00	4,00	6,00

### 3.9. Exatidão do método

Para avaliar a exatidão do método proposto, as amostras de vinho foram digeridas em uma placa de aquecimento usando peróxido de hidrogênio 30% e ácido clorídrico concentrado. O ferro total foi determinado empregando HR-CS FAAS usando a linha espectral de 248,327 nm e chama ar-acetileno.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Seleção do canal de cor mais correlacionado

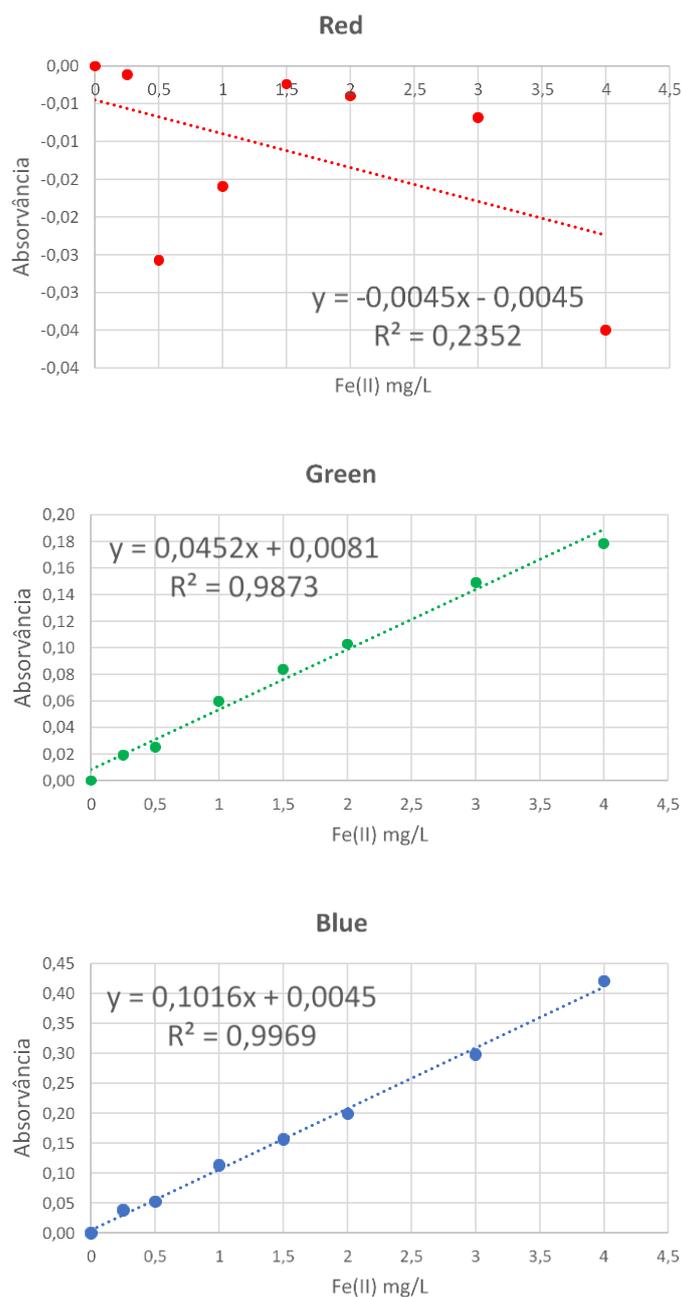
Os resultados obtidos com o estudo para seleção do canal mais sensível em função do aumento da concentração de Fe(II) estão apresentados na Tabela 3. A partir desses resultados foram construídas as curvas de calibração referentes aos canais do sistema RGB e, a partir dessas, calculados os valores de correlação como demonstra a Figura 14. O canal R não apresentou proporção linear com a concentração de Fe(II) e esse foi descartado para o estudo. Os canais G e B apresentaram melhores valores de correlação sendo esses 0,9873 e 0,9969, respectivamente, porém o canal B foi selecionado para ser aplicado nos estudos posteriores por apresentar a maior correlação e maior sensibilidade.

**Tabela 3.** Sinais extraídos do sistema RGB para cada canal e suas respectivas absorvâncias.

[Fe(II)] mg/L	R	Abs R	G	Abs G	B	Abs B
0,00	154,267	0,000	154,745	0,000	148,408	0,000
0,25	154,660	-0,001	148,104	0,019	135,940	0,038
0,50	163,662	-0,026	146,121	0,025	131,481	0,053
1,00	160,044	-0,016	134,832	0,060	114,154	0,114
1,50	155,121	-0,002	127,529	0,084	103,426	0,157
2,00	155,688	-0,004	122,051	0,103	93,703	0,200
3,00	156,705	-0,007	109,796	0,149	74,690	0,298
4,00	167,192	-0,035	102,567	0,179	56,288	0,421

R: Red; G: Green e B: Blue.

**Figura 14.** Curvas de calibração para definição do canal de cor mais correlacionado.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

#### 4.2. Otimização do método para determinação de Fe(II)

A Tabela 4 mostra a matriz completa do planejamento fatorial  $2^2$  com os domínios experimentais dos fatores, bem como seus valores codificados, valores reais (entre parênteses) e as absorvâncias obtidas a partir dos dados do canal B, que se apresentou o

mais sensível dentro do espaço RGB. Nessa tabela constam também os valores correspondentes à triplicata do ponto central (PC), realizadas para determinar o erro experimental e o teste de curvatura.

**Tabela 4.** Matriz e resultados para otimização do sistema para determinação de Fe(II).

Exp.	Fatores		Respostas	
	pH	Or-fen (mL)	Blue	Log (Branco/Sinal)
Branco	+1 (4,00)	+1 (6,0)	170	0,000
1	-1 (3,75)	-1 (2,0)	153	0,046
2	+1 (4,00)	-1 (2,0)	151	0,051
3	-1 (3,75)	+1 (6,0)	151	0,051
4	+1 (4,00)	+1 (6,0)	155	0,040
PC	0 (3,88)	0 (4,0)	152	0,049
PC	0 (3,88)	0 (4,0)	150	0,054
PC	0 (3,88)	0 (4,0)	151	0,051

Or-fen: Ortofenantrolina; PC: Ponto Central.

Para avaliar o ajuste do modelo e sua validação foi aplicada a análise de variância (ANOVA) a partir das respostas obtidas com o intervalo de confiança de 95% (Tabela 4). Esse estudo indicou que o modelo obtido pelo planejamento fatorial  $2^2$  para o método de determinação de Fe(II) demonstra alto ajuste ( $p > 0,05$ ) dentro do domínio experimental estudado, como é demonstrado na Tabela 5. A partir da validação desse modelo foi possível avaliar com segurança as indicações do estudo dos efeitos demonstradas no gráfico de Pareto da Figura 15. Nesse gráfico, os dois fatores estudados, bem como a interação entre eles não apresentaram significância estatística para alteração do sinal analítico. Isso implica dizer que o método, dentro dos domínios experimentais aplicados aos fatores, não apresenta variação significativa do sinal e isso confere robustez ao sistema desenvolvido. A robustez de um método é uma característica que mede a capacidade do sistema em resistir a pequenas variações dos seus parâmetros sem influenciar na alteração significativa do sinal analítico [65].

O complexo  $[\text{Fe}(1,10\text{-Or-Fen})_3]^{2+}$  não apresenta variação na intensidade de cor quando a faixa de pH se encontra entre 3,0 a 9,0. Um valor de pH entre 2,9 e 3,5 garante a mais rápida formação do complexo e essa velocidade vai diminuindo quando o pH aumenta, sendo esse comportamento relacionado com a propriedade de base orgânica fraca da 1,10-ortofenantrolina [64, 66]. Nesse estudo não foi percebido diferença no tempo de formação do complexo até o pH 4,00 e quando testada em pHs próximos a 7, o complexo colorimétrico apresentou-se instável. A sensibilidade medida pela intensidade

de cor do complexo não apresentou diferença significativa na faixa de pH do domínio experimental (pH 3,75 a 4,00), mesmo com a variação da concentração de 1,10-ortofenantrolina adicionada.

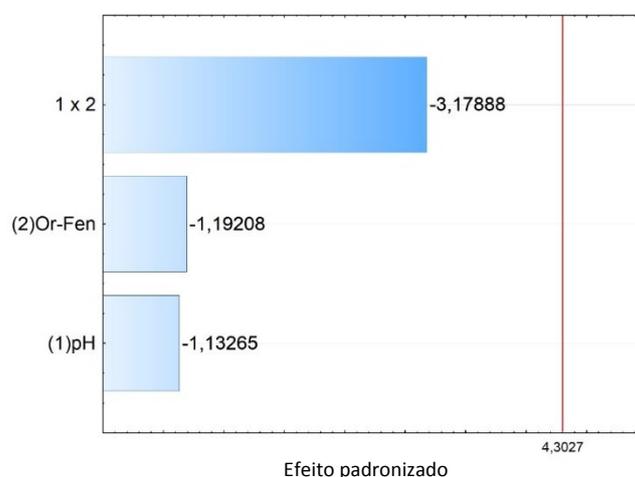
Assim, considerando que qualquer valor dentro do domínio experimental pode ser utilizado, foram considerados os menores níveis para minimizar o descarte de resíduos. Por outro lado, o uso de quantidades reduzidas também pode diminuir a faixa linear da curva de calibração já que afetaria a concentração de ortofanantrolina empregada. Nessas condições, foram estabelecidos os valores dos pontos centrais para aplicação do método.

**Tabela 5.** Estudo da análise de variância (ANOVA) do modelo empregado no método para determinação de Fe(II).

	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1)pH	0,000008	1	0,000008	1,28291	0,374873
(2)Or-Fen	0,000009	1	0,000009	1,42105	0,355497
1 × 2	0,000064	1	0,000064	10,10526	0,086336
Falta de ajuste	0,000033	1	0,000033	5,22085	0,149692
Erro Puro	0,000013	2	0,000006		
Total SQ	0,000127	6			

SQ = soma quadrática; gl = grau de liberdade; MQ = média quadrática; F=Distribuição F de Fisher-Snedecor; valor p = nível de probabilidade.

**Figura 15.** Estudo dos efeitos das variáveis do método para determinação de Fe(II).



*Fonte: Elaborada pelo autor*

### *4.3. Otimização do método para determinação de ferro total*

Outro planejamento fatorial completo de dois níveis foi realizado para a otimização do método para determinação de ferro total. Os fatores estudados foram: pH do meio reacional, volume de 1,10-ortofenantrolina e volume do agente redutor cloridrato de hidroxilamina. A Tabela 6 apresenta os fatores e os resultados obtidos concordantes com a Tabela 4. O estudo da análise de variância também foi aplicado a esse planejamento, o qual apresentou falta de ajuste significativa com o valor de  $p=0,037$ , como demonstra a Tabela 7. Esse pequeno distanciamento do limite de significância ( $p=0,05$ ) pode ser ocasionado por erros sistemáticos provocados por alíquotas adicionadas de hidroxilamina ou da própria solução padrão de Fe(III). Considerando esse modelo, o estudo dos efeitos foi aplicado e nenhuma variável ou interação se mostrou significativa, concordante com o estudo do Fe(II) (Figura 12). Como o sinal analítico é dado pela formação do complexo colorimétrico, a hidroxilamina não tem participação direta nessa etapa. A não participação desse reagente torna o sistema químico para determinação de ferro total concordante com o comportamento apresentado pelo método para determinação de Fe (II).

Assim, sendo os três fatores estudados e as suas interações não significativas, é possível afirmar que esse método é robusto e as variações dentro desse domínio experimental não apresentaram alterações significativas no sinal analítico e, considerando tais afirmações, os valores ótimos para determinação de ferro total foram definidos com os mesmos valores dos pontos centrais, como foi feito na otimização do método para determinação de Fe (II).

**Tabela 6.** Matriz e resultados para otimização do método para determinação de ferro total.

Exp.	Fatores			Respostas	
	Hidroxilamina (mL)	Or-fen (mL)	pH	Blue	Log (Branco/Sinal)
Branco	+1 (6,0)	+1 (6,0)	+1 (4,00)	169	0,000
1	- 1(2,0)	-1 (2,0)	- 1(3,75)	151	0,049
2	+1 (6,0)	- 1(2,0)	- 1(3,75)	153	0,043
3	- 1(2,0)	+1 (6,0)	- 1(3,75)	154	0,040
4	+1 (6,0)	+1 (6,0)	-1 (3,75)	157	0,032
5	- 1(2,0)	- 1(2,0)	+1 (4,00)	155	0,038
6	+1 (6,0)	- 1(2,0)	+1 (4,00)	152	0,046
7	- 1(2,0)	+1 (6,0)	+1 (4,00)	152	0,046
8	+1 (6,0)	+1 (6,0)	+1 (4,00)	150	0,052
PC	0 (4,0)	0 (4,0)	0 (3,88)	147	0,061
PC	0 (4,0)	0 (4,0)	0 (3,88)	148	0,058
PC	0 (4,0)	0 (4,0)	0 (3,88)	149	0,055

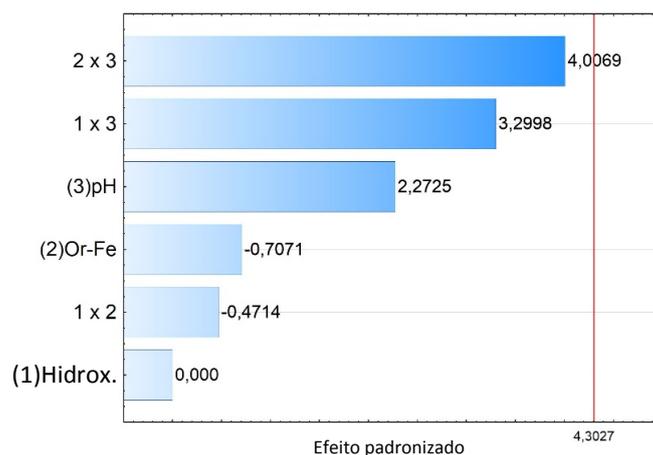
Or-fen: 1,10 ortofenantrolina.

**Tabela 7.** Estudo da análise de variância (ANOVA) do modelo empregado no método para determinação de ferro total.

	SQ	gl	MQ	F	p
(1) Hidrox.	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000
(2)Or-Fen	0,000	1,000	0,000	0,500	0,553
(3)pH	0,000	1,000	0,000	5,164	0,151
Hidrox.× Or-Fen	0,000	1,000	0,000	0,222	0,684
Hidrox. × pH	0,000	1,000	0,000	10,889	0,081
Or-Fen × pH	0,000	1,000	0,000	16,056	0,057
Falta de ajuste	0,000	2,000	0,000	26,039	0,037
Erro Puro	0,000	2,000	0,000		
Total SQ	0,001	10,000			

Hidrox. = hidroxilamina; Or-fen: 1,10 ortofenantrolina; SQ = soma quadrática; gl = grau de liberdade; MQ = média quadrática; F = Distribuição F de Fisher-Snedecor; valor p = nível de probabilidade.

**Figura 16.** Estudo dos efeitos das variáveis do método para determinação de ferro total.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

#### 4.4. Método otimizado

Utilizando como base os resultados obtidos pelos planejamentos experimentais realizados foram definidos os valores apresentados na Tabela 8 para a determinação do Fe(II) e ferro total usando o sistema de imagem digital proposto. Os valores foram acrescentados seguindo a ordem apresentada na tabela.

**Tabela 8.** Valores definidos para determinação de Fe(II) e ferro total de acordo com os planejamentos experimentais.

Parâmetro	Condição	
	Fe(II)	Fe(III)
Volume de amostra, mL	15,0	15,0
Volume de solução de hidroxilamina 10% (m/v) (utilizado 5 minutos antes da adição da ortofenantrolina), mL	---	2,0
Volume de solução de ortofenantrolina a 0,1% (m/v), mL	2,0	2,0
Volume de solução-tampão acetato - pH 3,88, mL	2,5	2,5
Volume final da solução (avolumado com água ultrapura previamente fervida), mL	25,0	25,0

#### 4.5. Características analíticas do método para análise de especiação de ferro em vinho

A curva de calibração foi construída para a determinação de Fe(II) a partir de oito soluções padrões de ferro em uma faixa de concentração de 0,00 a 2,00 mg/L. Os dados da imagem digital foram processados e os valores obtidos nos três canais do espaço RGB são mostrados na Tabela 9.

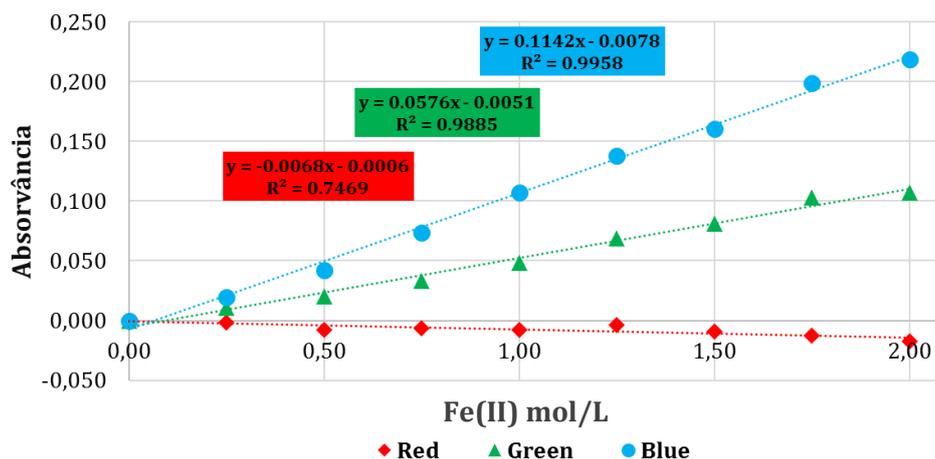
**Tabela 9.** Dados obtidos em valores de Red, Green e Blue e suas respectivas absorvâncias em diferentes concentrações.

[Fe(II)] mg/L	Sinal analítico			Abs		
	R	G	B	R	G	B
0,00	173,17	175,47	163,05	0,000	0,000	0,000
0,25	173,8	171,34	155,88	-0,002	0,010	0,020
0,50	176,47	167,44	148,04	-0,008	0,020	0,042
0,75	175,69	162,5	137,63	-0,006	0,033	0,074
1,00	176,29	157,05	127,35	-0,008	0,048	0,107
1,25	174,81	149,83	118,69	-0,004	0,069	0,138
1,50	176,77	145,58	112,74	-0,009	0,081	0,160
1,75	178,2	138,41	103,15	-0,012	0,103	0,199
2,00	180,33	137,05	98,594	-0,018	0,107	0,218

A partir das absorvâncias obtidas para cada canal foram construídas três curvas de calibração (Figura 17) referente aos canais Red, Green e Blue utilizando o método de regressão linear simples. Os valores obtidos para as correlações demonstram, como visto anteriormente, que o canal Blue possui maior sensibilidade entre os canais e esse foi selecionado para obtenção do modelo de predição (equação 1), cálculo de limites de detecção e quantificação (Tabela 10) e estimativa de precisão (Tabela 12).

$$\text{Absorvância} = 0,1142 \cdot [\text{Fe(II)}] + 0,0078 \quad (\text{Equação 1})$$

**Figura 17.** Curvas de calibração para os Canais Red, Green e Blue e suas respectivas correlações e equações.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

O cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi realizado de acordo com as equações 2 e 3, respectivamente, onde  $S$  é o desvio padrão amostral entre as réplicas do branco e  $a$  é o valor da inclinação da curva de calibração. Réplicas autênticas de 10 brancos analíticos contendo todos os reagentes, com exceção do analito, foram preparadas de acordo com o método otimizado e foram fotografados. Os sinais analíticos para cada réplica foram referentes ao canal blue, bem como os seus respectivos cálculos de absorvâncias, LD e LQ, dispostos na Tabela 10.

$$LD = \frac{3S}{a} \quad (\text{Equação 2}) \quad LQ = \frac{10S}{a} \quad (\text{Equação 3})$$

**Tabela 10.** Réplicas e valores de LD e LQ obtidos a partir dos sinais do canal blue.

Réplicas	Respostas	
	Blue	Absorvância em Blue
1	160,231	0,008
2	161,448	0,004
3	160,497	0,007
4	161,600	0,004
5	160,567	0,007
6	161,448	0,004
7	160,490	0,007
8	161,341	0,005
9	161,201	0,005
10	159,929	0,008
Média	160,875	0,006
Desvio Padrão	0,596	0,002
<b>LD</b>		<b>0,042 mg/L</b>
<b>LQ</b>		<b>0,141 mg/L</b>

LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação.

Os valores obtidos para limites de detecção e quantificação foram de 0,042 mg/L e 0,141 mg/L, respectivamente. Esses limites conferem alta sensibilidade ao método e essa característica pode ser atribuída ao branco analítico não apresentar cor e nem opacidade. A limitação de detectar e quantificar Fe(II) nesse método pode ser ocasionada pela interação da luz com a quantidade de reagente contidos no branco analítico, como também pela variação automática do firmware da câmera digital. Os valores obtidos nesse método foram comparáveis com outros trabalhos realizados na quantificação de ferro em vinho e estão expressos na Tabela 11. Assim, por se tratar de um método simples e de baixo custo de aplicação, mostra-se mais vantajoso que os métodos apresentados desde que não se exija limites de quantificação abaixo de 0,141 mg/L.

**Tabela 11.** Comparação de características analíticas obtidas entre o método proposto e outros métodos para determinação de ferro em vinho.

Método	LD	LQ	Precisão	Referência
Método proposto	0,042 mg/L	0,141 mg/L	3,47-5,36%	-
MSFIA e espectrofotometria	0,11 mg/L	-	0,42%	[67]
Sistema em fluxo por multiseringa e espectrofotometria	0,034 mg/L	0,114 mg/L	-	[68]
Polímero impresso e FAAS	0,03 mg/L	0,1 mg/L	3-7%	[49]
Reagente cromogênico ferrozina e FAAS	0,02 mg/L	0,06 mg/L	0,4-10,1%	[69]

A precisão do método foi expressa como desvio padrão relativo (RSD) e foi determinada a partir da análise de sete porções de uma amostra de vinho contendo Fe(II). Os RSDs obtidos, bem como as concentrações encontradas são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Valores de precisão para sete porções da mesma amostra de vinho branco.

Porção	Fe(II)			Ferro total		
	Blue	Abs	[Fe <sup>2+</sup> ]	Blue	Abs	[Fe <sup>2+</sup> ]
1	140,886	0,063	0,49	140,016	0,067	0,52
2	141,320	0,062	0,48	139,915	0,068	0,52
3	142,093	0,060	0,45	139,95	0,068	0,52
4	142,450	0,059	0,45	139,599	0,069	0,53
5	142,210	0,059	0,45	140,097	0,067	0,52
6	141,951	0,060	0,46	139,947	0,068	0,52
7	142,459	0,059	0,45	142,592	0,059	0,45
<b>Média</b>	141,910	0,060	0,460	140,302	0,066	0,513
<b>Desvio Padrão</b>	0,594	0,002	0,02	1,022	0,003	0,03
<b>Desvio padrão relativo</b>	0,42%	3,02%	<b>3,47%</b>	0,73%	4,73%	<b>5,36%</b>

Os valores obtidos de desvio padrão relativo para os métodos que quantificam Fe(II) e Ferro total foram de 3,47% e 5,36%, respectivamente. O maior valor apresentado ao método de ferro total pode ser atribuído à flutuação normal da efetividade da Hidroxilamina no meio reacional para redução do Fe(III). Além disso, o balanço automático de cor e brilho da câmera digital pode contribuir para o aumento desses valores, uma vez que essa calibração é realizada a cada fotografia. Mesmo assim, esses valores são concordantes com trabalhos realizados para determinação de ferro em vinho

através de polímeros impressos (3% a 7%) e reagente cromogênico ferrozina (0,4 a 10,1%) como também demonstra a Tabela 11.

#### 4.6. Aplicação - Análise de especiação de ferro em amostras de vinho

O método proposto foi aplicado para análise de especiação de ferro inorgânico em seis amostras de vinho. Os teores de Fe(II) e ferro total obtidos variaram de 0,41 a 1,67 mg/L e de 0,69 a 1,71 mg/L, respectivamente, e são apresentados na Tabela 13. O conteúdo de Fe(III) foi encontrado calculando a diferença entre o valor total de ferro total e Fe(II). Nessa tabela também são apresentados os valores obtidos pela técnica de espectrometria de absorção atômica a fim de se avaliar a exatidão do método proposto. Nesses resultados quatro amostras apresentaram igualdade estatística (IC=95%) com os resultados obtidos pelo método de imagem digital para ferro total, dessa forma, pode-se considerar válido o método proposto.

**Tabela 13.** Concentrações expressas em um intervalo de confiança de 95% e exatidão por HR-CS FAAS.

Amostra	Concentração (mg/L)			Ferro Total HR CS FAAS
	Fe(II)	Ferro Total	Fe(III)	
1	0,41 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,28	0,73 ± 0,06
2	0,90 ± 0,07	1,04 ± 0,04	0,14	0,96 ± 0,10
3	1,09 ± 0,07	1,16 ± 0,09	0,07	1,13 ± 0,10
4	0,99 ± 0,03	1,10 ± 0,06	0,11	1,19 ± 0,11
5	1,67 ± 0,08	1,71 ± 0,09	0,04	---
6	0,68 ± 0,07	0,74 ± 0,09	0,06	---

A concentração de Fe(II) contida no vinho é, em sua maioria, oriunda da reação de compostos fenólicos na redução do Fe (III) (Equação 4). O oxigênio do meio oxida Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> e produz o radical superóxido (Equação 5). O radical superóxido reage com o próton do meio ácido formando o radical hidroxiperoxila (equação 6). O Fe (II) agora em presença do radical hidroxiperoxila e em meio ácido é oxidado a Fe (III) e transforma esse radical em peróxido de hidrogênio (Equação 7). O Fe (II) também é oxidado pelo peróxido de hidrogênio do meio e resulta em um íon hidroxila e um radical hidroxil (equação 8), e esses alteram cor, sabor, odor e concentração alcoólica do vinho. Sendo assim, a adição de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) reage com a quinona regenerando os

compostos fenólicos, anula o efeito oxidante do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e evita a oxidação do etanol [70]. Os resultados da concentração de Fe(II) obtidos nesse estudo foram superiores a concentração de Fe(III), o que evidencia a ação redutora da adição de SO<sub>2</sub> e a boa conservação dos vinhos analisados.



Os teores de ferro encontrados em vinho estão de acordo com aqueles obtidos por Ferreira et al. de 0,8 a 9,22 mg/L [46, 71] e por Phansi et. al. de 1,89 a 7,87 mg/L [72]. Nesses estudos, valores mais elevados de ferro são provenientes de amostras de vinho tinto, que geralmente estão acima de 5 mg/L e esse comportamento também foi evidenciado na amostra 1 (0,41 mg/L) que apresentava cor mais clara, e na amostra 5 (1,67 mg/L), que apresentava cor mais escura.

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, pela primeira vez, foi demonstrada a eficiência de uma metodologia analítica para quantificação e especiação do ferro inorgânico em amostras de vinho branco. Essa metodologia combinou com êxito uma reação colorimétrica bem conhecida e uma abordagem baseada em visão computacional para gerar um método que atenda aos requisitos de rapidez, robustez, baixo custo e precisão.

O equipamento elaborado a partir de materiais acessíveis, de baixo custo e com sua construção simples se mostrou muito promissor por apresentar baixos limites de quantificação e alta precisão. O manuseio do sistema, bem como sua construção também é simplificado, uma vez que o seu formato envolve uma caixa de madeira, que pode ser de qualquer outro material, revestida de material branco com orifícios para passagem dos fios de comunicação e eletricidade, já que todos os componentes desse equipamento são alocados internamente.

Além dos aspectos analíticos, a presente proposta tem potencial como uma tecnologia útil de controle da qualidade do vinho, tornando-a uma ferramenta eficaz, por exemplo, para cooperativas de produtores de vinho. Esse tipo de tecnologia de baixo custo contribuirá para o desenvolvimento de vinhos de alta qualidade a preços competitivos no mercado consumidor. A sensibilidade do método é perfeitamente compatível com as concentrações de Fe(II) e ferro total presente em vinhos brancos uma vez que esta amostra e a coloração do complexo  $[\text{Fe}(1,10\text{-Or-Fen})_3]^{2+}$  são bem distintas. A aplicação em vinhos mais escuros como rosé ou tintos, por exemplo, pode ser possível a partir de uma maior diluição, que é permitida pelo baixo limite de quantificação e alta concentração de ferro nesses tipos de vinho. Uma revisão do tratamento matemático também deve ser aplicada para melhor diferenciar a coloração entre a amostra diluída, que tende a ser mais escura, e a coloração do complexo formado.



## **CAPÍTULO II**

### **EMPREGO DE IMAGENS DIGITAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DE UREIA EM LEITE UHT**

# EMPREGO DE IMAGENS DIGITAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DE UREIA EM LEITE UHT

## RESUMO

Este trabalho propõe uma estratégia analítica baseada em imagens digitais e um sistema construído por tubos PVC, um microscópio digital e uma minibomba peristáltica a fim de capturar imagens digitais de uma reação colorimétrica para determinação de ureia em leite. Nesse método, a diacetilmonoxima (butano-2,3-dionamonoxima) reage com a ureia presente no meio formando a diazina e conferindo cor amarela à solução, proporcional à concentração de ureia. Para encontrar as condições ótimas das concentrações de reagentes utilizados no método foram aplicados o planejamento Fatorial completo, Doehlert e Box-Behnken e foram utilizadas três formas de calcular os resultados a partir dos dados de RGB e HSV extraídos das imagens digitais. O método obtido após as otimizações apresentou limites de detecção e quantificação entre 0,35 mg/L a 1,77 mg/L e 0,52 mg/L a 2,64 mg/L, respectivamente. Os limites mais baixos foram calculados a partir do canal Saturação ( $F_S$ ) enquanto que os limites mais altos foram obtidos a partir do canal Azul ( $F_B$ ). A precisão avaliada para os três tipos de cálculo variou entre 1,58% e 5,77%, sendo os melhores valores também encontrados a partir do cálculo pelo canal Saturação ( $F_S$ ). A validação foi realizada utilizando comparação com a técnica de infravermelho médio e as concentrações de ureia encontradas no método proposto e na técnica de infravermelho apresentaram igualdade estatística. O método foi aplicado em oito amostras e essas apresentaram concentrações de ureia variando de 161,37 a 420,33 mg/L com a aplicação dos cálculos  $F_S$  e  $F_{HSV}$ . Os valores médios obtidos para o cálculo do  $F_S$  foram, em sua maioria, dentro da faixa esperada para ureia em leite (172 a 341 mg/L). A partir de materiais simples e acessíveis empregados na construção desta instrumentação, o método apresentou sensibilidade e linearidade adequadas para determinação de ureia por colorimetria. Além das amostras de leite, amostras como sucos, bebidas lácteas, bebidas alcoólicas, entre outras, também podem ser utilizadas, desde que preparadas de forma adequada. O sistema em fluxo se mostrou uma ótima alternativa principalmente para análises de rotina, uma vez que esse pode ser automatizado e o seu custo de manutenção é bem inferior se comparados às instrumentações analíticas que servem ao mesmo propósito.

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2017 a produção mundial de leite sob inspeção sanitária foi de 827,9 bilhões de litros distribuídos entre o leite líquido para consumo direto e seus derivados. No Brasil essa produção alcançou 24,33 bilhões de litros, sendo equivalente a 3,27 litros de leite diários por habitante brasileiro se parte dessa produção não fosse exportada. Nos últimos 20 anos mais de 390 bilhões de litros foram produzidos no Brasil, demonstrando o alto consumo desse alimento para finalidades como produção de leite UHT (24,86%), queijos (24,84%), leite em pó (9,18%), iogurte (7,50%), leite condensado (6,67%), leite resfriado (6,51%), bebidas lácteas (4,21%), leite pasteurizado (3,25%), creme de leite (2,84%), manteiga (2,35%), leites fermentados (1,46%), doce de leite (1,02%) e outros (5,30%), de acordo com os dados de pesquisa industrial do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2016 [73].

Por ser um produto de alta demanda comercial, o leite bovino é constantemente alvo de adulterações realizadas para aumentar o seu valor de mercado. A sua matriz complexa dificulta a identificação de componentes adicionados para alterações das suas características físico-químicas como densidade, aumento de volume e valor protéico [74, 75]. Para manter a densidade do leite com o aumento do seu volume através de componentes adicionados já foram identificadas quantidades de melanina [76], sacarose, cloretos, urina, pus e ureia agropecuária [77].

A quantidade de ureia no leite é um parâmetro para verificar possíveis alterações que podem ser estimadas para indicar os níveis de adulteração, mas também serve para avaliar a nutrição animal e degradação provocada por produto deteriorado [74]. A ingestão de ureia em concentrações superiores a 700 mg/L pode causar indigestão, acidez estomacal, ulcera, câncer e mal funcionamento dos rins [78, 79].

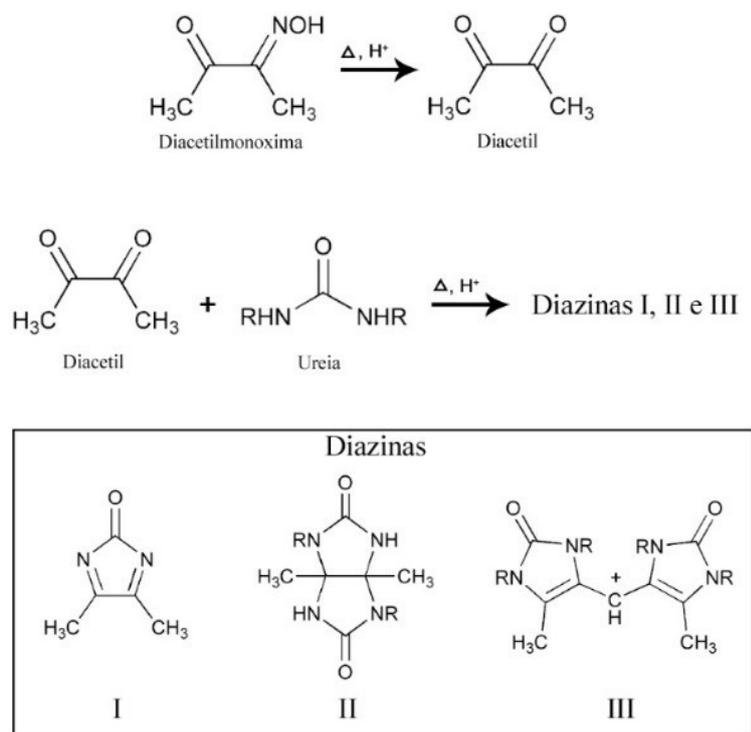
Os métodos existentes para quantificação de ureia em diversas matrizes envolvem: i) medidas diretas por Espectrometria no Infravermelho e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; ii) medidas indiretas por degradação ou uso da enzima urease para hidrolisar a ureia e produzir amônia, que é medida através de métodos espectrofotométricos, potenciométricos, amperométricos e condutimétricos e iii) medidas colorimétricas através da reação da ureia com diacetilmonoxima(butano-2,3-dionamoxima) [74, 80].

Estudos sobre a quantificação de ureia a partir da reação com a diacetilmonoxima são relatados desde os anos 60 [81, 82] e são baseadas na reação de Fearon [83]. Para quantificar ureia em água do mar, Price e Harrison compararam o método da diacetilmonoxima com o método da urease, que demonstrou limitações com a variação do pH e a presença de inibidores naturais contidos na matriz, enquanto o método da diacetilmonoxima foi seletivo e de reprodução aceitável, considerando somente a citrulina (ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)pentanóico) como interferente [84]. Apesar desse reagente apresentar alta estabilidade e seletividade em muitas matrizes [74], autores relatam a imprecisão como uma das dificuldades do método, já que o produto tende a se degradar com o tempo, exposição à luz ou variações bruscas na temperatura da reação [82, 84-86].

Na Figura 18 é demonstrado o ciclo de transformação da ureia em um produto colorido. A reação ocorre com a conversão da molécula de diacetilmonoxima em diacetil a partir de uma reação de hidrólise. O diacetil sob aquecimento reage com a ureia presente no meio, formando três moléculas de diazinas a depender das condições do meio como acidez e temperatura, sendo que somente a diazina III (R=H) confere coloração amarelo alaranjado à solução [74, 83, 87]. A adição de ácido sulfúrico aumenta a sensibilidade do método, mas concentrações muito altas desse reagente degradam o produto colorimétrico. Uma mistura com ácido fosfórico pode ser utilizada para manter níveis suficientes de acidez, porém, com menor sensibilidade [87].

A reação colorimétrica entre a ureia e a diacetilmonoxima não segue a lei de Beer. Alguns métodos foram estudados para minimizar a imprecisão e aumentar a estabilização do produto. Substâncias como sais de Fe(III) entre outros são usados para consumir a hidroxilamina formada como reação paralela durante a reação em meio ácido. Esse procedimento é realizado pois a hidroxilamina reage com o produto colorimétrico e há um decréscimo na coloração da solução. Além da acidez extrema que tende a degradar a diazina, o uso da tiossemicarbazida é relatado em alguns métodos para redução da fotossensibilidade desse produto [86].

**Figura 18.** Ciclo de transformação da ureia em produto colorimétrico



*Fonte: Elaborada pelo autor*

Métodos estabelecidos na quantificação de ureia ainda dependem de instrumentações complexas como equipamentos ópticos de análise e cromatógrafos. Alguns kits reacionais comercializados para testes rápidos também são utilizados, mas alguns apresentam precisão baixa se comparado aos métodos anteriores. A busca por métodos de baixo custo é frequente para quantificar ureia e isso não define um método padrão ou mais utilizado para essa finalidade, mas ainda assim os métodos ópticos são mais simplificados para esse fim. Todos os métodos colorimétricos aplicados para determinação de ureia são através de medidas por espectrofotômetros. Esses equipamentos costumam apresentar manuseio simples e precisão satisfatória para os métodos estudados até o momento, mas apresentam limitações por precisar atender à Lei de Lambert-Beer.

Visando à contribuição na área de análise de imagens, este trabalho desenvolveu um sistema modificado de simples construção e operação, acessível e de baixo custo para ser aplicado na determinação de ureia em leite UHT a partir de uma reação colorimétrica com a diacetylmonoxima (butano-2,3-dionamonoxima) empregando análise por imagens digitais.

## **2. OBJETIVOS**

- Construir um sistema de aquisição em imagem digital para análise química de baixo custo, acessível e de simples construção, viável para amostragem em fluxo;
- Otimizar o método colorimétrico para determinação de ureia aplicando planejamentos experimentais multivariados;
- Propor um novo tratamento matemático para quantificação de ureia a partir dos dados extraídos de imagens digitais;
- Aplicar o método desenvolvido para quantificar ureia em leite integral UHT.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### *3.1. Instrumentação*

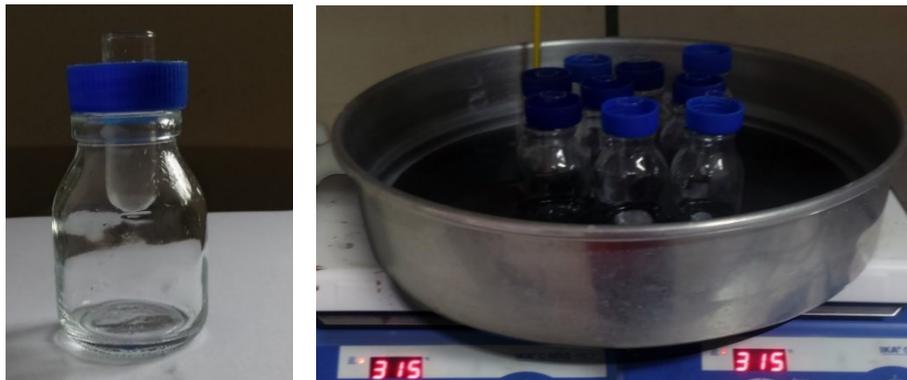
##### *3.1.1. Sistema de aquecimento e processo de resfriamento*

Para o aquecimento das soluções de calibração e das amostras analisadas no método foi construído um sistema composto por recipientes de vidro (50 mL), conjugado com um condensador elaborado a partir de uma tampa de tubo de centrífuga (50 mL) e um tubo de ensaio de 5 mL, como apresenta a Figura 19. Esse aparato foi acondicionado em um recipiente de alumínio com 36 cm de diâmetro e 7 cm de altura (Figura 20).

Uma superfície emborrachada (Figura 21) possuindo relevos circulares voltados para baixo e em contato direto com o metal do recipiente, distribuídos em intervalos regulares com altura em torno de 3mm foi utilizada para evitar o contato direto da superfície metálica com os recipientes de vidro. Orifícios de 1cm de diâmetro foram abertos na superfície para facilitar o fluxo de glicerina para a parte superior e aumentar a homogeneidade da temperatura.

Glicerina bidestilada (2 L) foi utilizada para envolver completamente as soluções contidas nos recipientes de vidro e o aquecimento foi fornecido por placas (IKA, C-MAG HS 7) com temperatura fixada em 315°C. Os recipientes de vidro (50mL) contendo as soluções de análise foram imersos com a temperatura da glicerina estabilizada em 100 °C e agrupados no centro do banho de aquecimento, como mostra a Figura 19. A etapa de aquecimento foi seguida com o imediato resfriamento em banho de gelo por 5 minutos, aferidos para 25 mL e posteriormente fotografados. Todos os aquecimentos foram realizados em capela fechada e com a temperatura ambiente em 25 °C, sendo a temperatura da glicerina monitorada por um termômetro de mercúrio com capacidade máxima de 150 °C.

**Figura 19.** Aparato de aquecimento com sistema de condensação (esquerda) e disposição dentro da bandeja sobre as placas de aquecimento (direita).



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 20.** Bandeja e superfície de proteção contra aquecimento direto.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 21.** Superfície de proteção contra aquecimento direto.

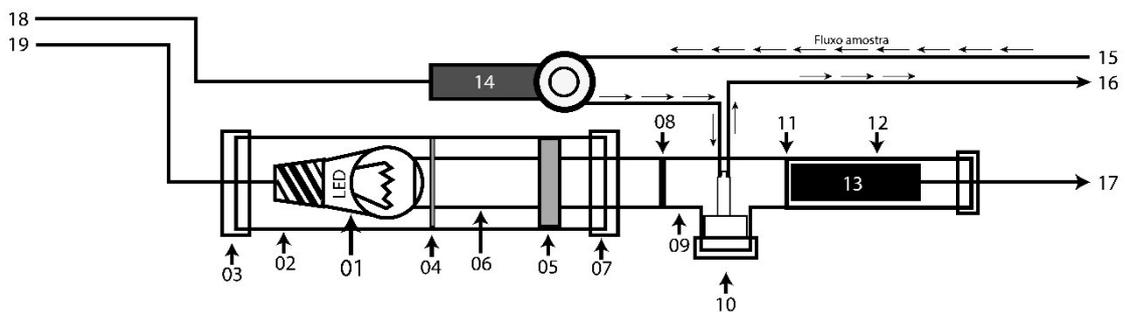


*Fonte: Elaborada pelo autor*

### 3.1.2. Sistema de imagem digital com amostragem em fluxo

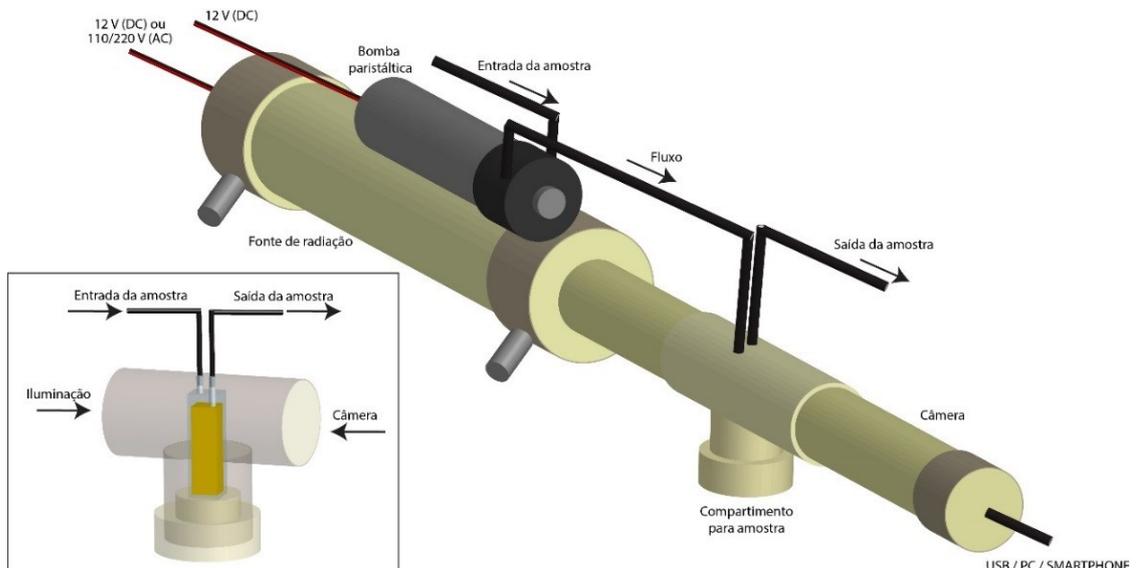
O sistema em fluxo para captura da imagem digital foi construído de acordo com a figuras 22, 23 e 24. Nesse sistema, uma lâmpada bulbo de LED (110V/220V) com 430 lúmens e fator de potência 0,7 (OUROLUX, Superled 4,7W, 6500K) (Figura 25) tem seu feixe de luz direcionado para uma cubeta de fluxo através de um tubo de material em PVC de 75 mm de diâmetro recoberto internamente com papel sulfite branco.

**Figura 22.** Esquema de distribuição das partes do sistema de aquisição de imagens digitais em fluxo.



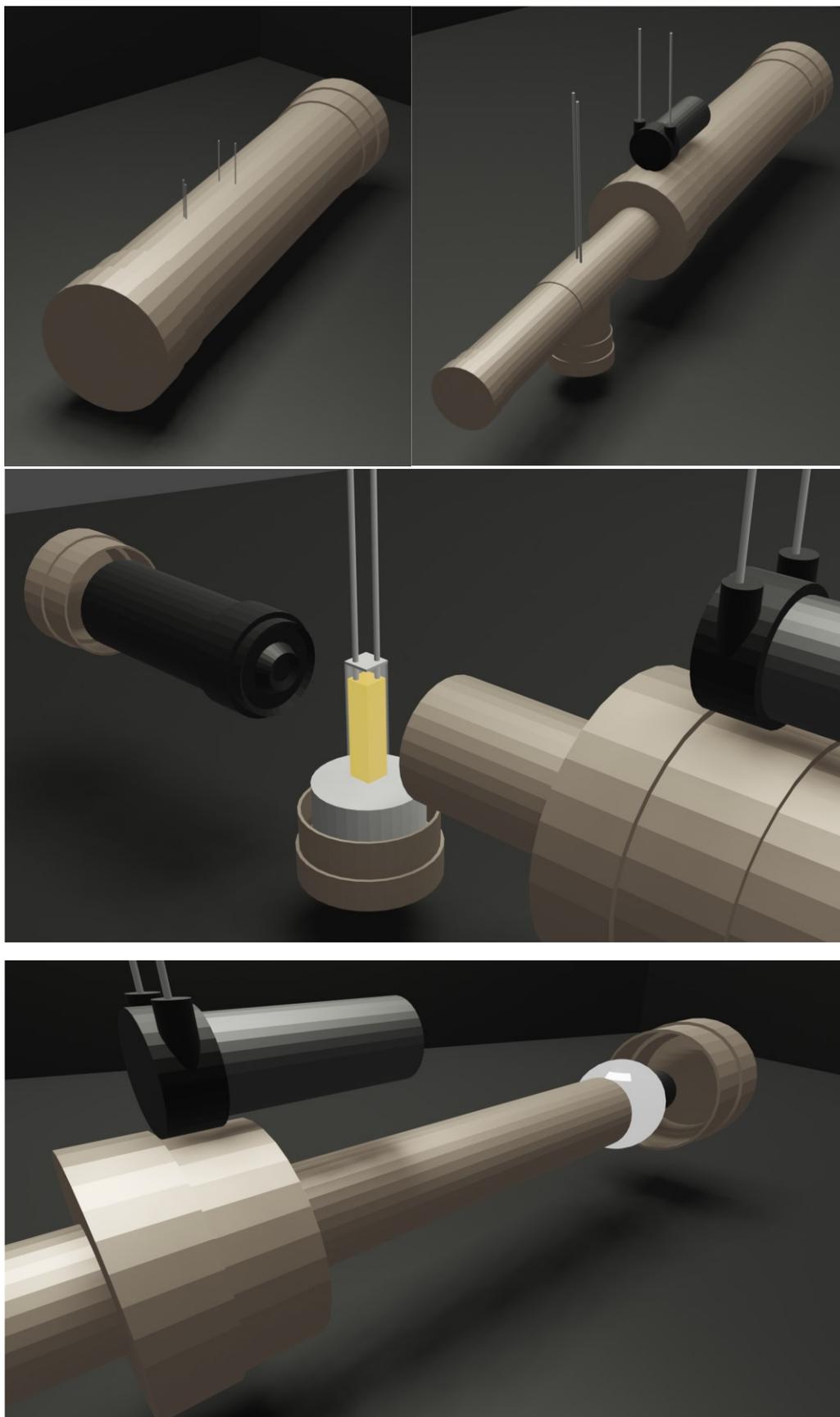
*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 23.** Projeção 3D do sistema de aquisição de imagens digitais em fluxo.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 24.** Projeção 3D com detalhes aproximados do sistema de aquisição de imagens digitais em fluxo.



*Fonte: Elaborada pelo próprio autor*

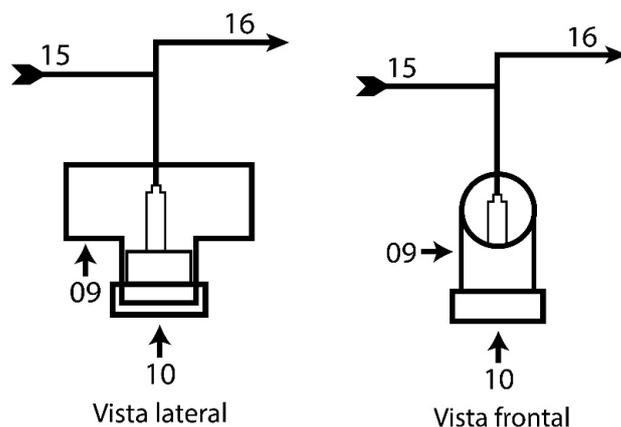
**Figura 25.** Lâmpada tipo LED de encaixe em Bulbo como fonte de radiação eletromagnética.



Fonte: <http://ourolux.com/>

Uma cubeta de vidro com configuração para fluxo foi acomodada em uma conexão de PVC tipo “T”, como mostra a Figura 26. Nessa conexão, um orifício foi aberto na parte superior para a passagem das mangueiras de fluxo com o objetivo também de mantê-la fixa durante a medida e garantir maior precisão das fotografias.

**Figura 26.** Corte da vista frontal e lateral do compartimento da conexão tipo “T” onde se acomoda o recipiente da amostra.



Fonte: *Elaborada pelo autor*

Um microscópio digital (China, 1600x) (Figura 27) contido em outro tubo de PVC de 40mm de diâmetro foi direcionado em posição axial à iluminação para fotografia da cubeta. O foco da imagem digital foi ajustado e fixado manualmente e a frequência de captura foi fixada em 60 Hz com a finalidade de diminuir o efeito estroboscópico. Para atenuação da radiação emitida pela lâmpada LED e também diminuição do efeito estroboscópico foi utilizado um disco de 40 mm de diâmetro

feito com poliestireno simples (PS) de superfície porosa, com transmitância de 85%, acomodado na saída do “T” entre a radiação e a cubeta. O fluxo foi alimentado por uma minibomba peristáltica (12V DC 200mA) com vazão fixa de 100mL/min para introdução da amostra e eliminação do descarte.

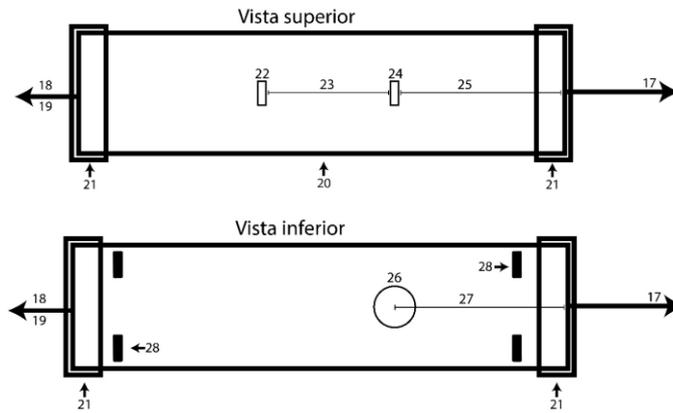
**Figura 27.** Microscópio digital com Zoom em 1600x e ajuste de foco manual.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

Todo o sistema foi acomodado em uma câmara construída a partir de um tubo em PVC (Figura 28). A câmara apresenta em sua parte superior dois orifícios para passagem das mangueiras de fluxo e na parte inferior um orifício circular cuja finalidade é acomodar o suporte do receptáculo da amostra. Todo esse aparato é sustentado por parafusos acomodados na parte inferior da sua estrutura e possibilita a regulagem de altura e nivelamento horizontal da câmara. Apesar de não exercer função direta no processo de aquisição das imagens, esse aparato se torna importante para estabilização mecânica, aumentando a precisão das imagens fotografadas/filmadas e diminuindo a incidência de luz externa.

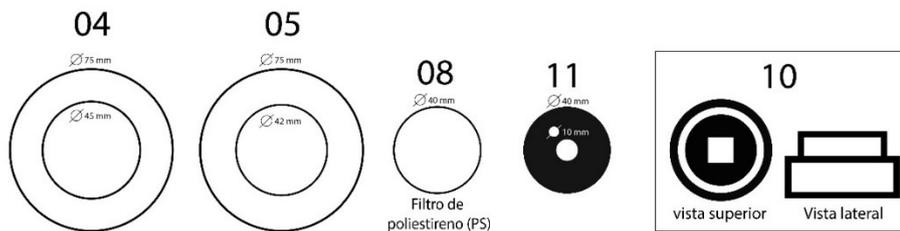
**Figura 28.** Vista superior e inferior da câmara para isolamento da luz externa.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

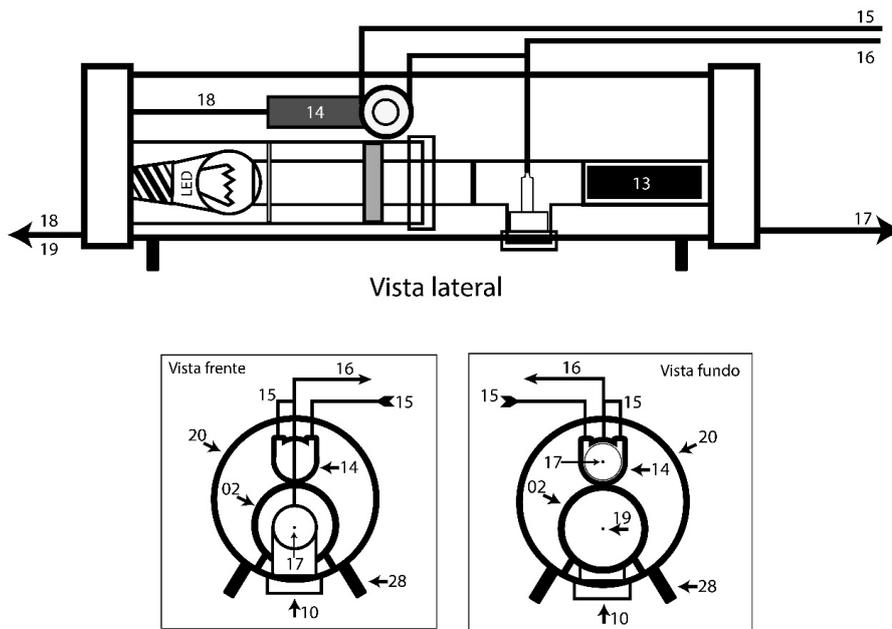
As partes detalhadas dos filtros de luz e suportes internos estão apresentadas na Figura 29 e o esquema do sistema completo com suas vistas lateral, frontal e traseira encontra-se detalhado na Figura 30. A Figura 31 apresenta imagens reais fotografadas do sistema em sua parte interior (seção 1), do computador conectado ao sistema e seu respectivo software de aquisição de imagem (seção 2), visão interna da cubeta com a iluminação ao fundo (seção 3) e o recipiente de acomodação da amostra (seção 4).

**Figura 29.** Cortes em acrílico e base do receptáculo translúcido.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 30.** Vistas lateral, frontal e de fundo do sistema de aquisição de imagem digital em sua montagem completa.



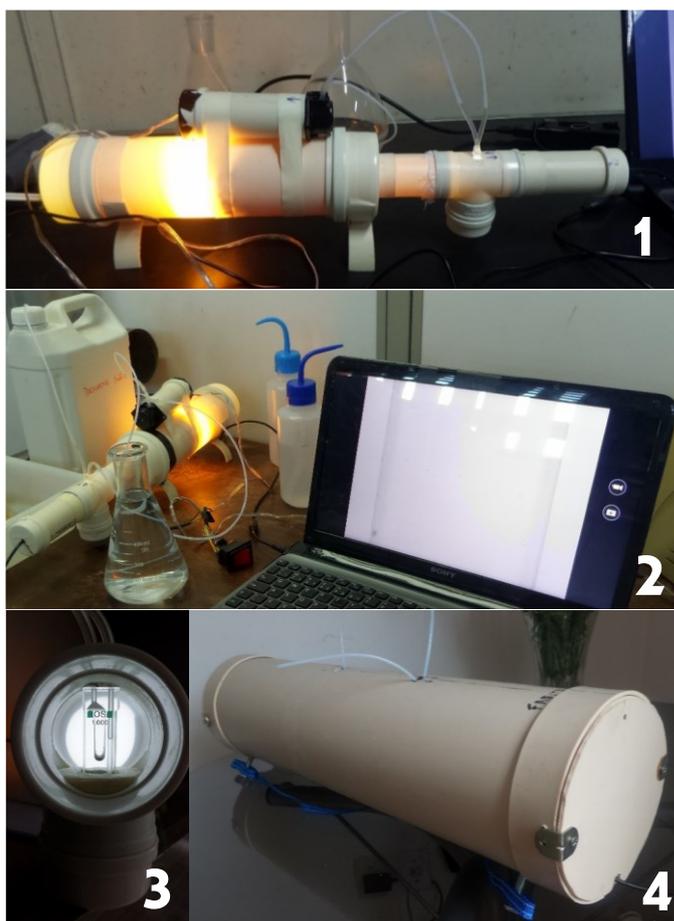
Fonte: Elaborada pelo autor

- 1) Fonte de radiação eletromagnética a partir de lâmpada bulbo de LED 110/220V (AC) ou 12V (DC).
- 2) Câmara de acomodação da lâmpada com suporte para o tubo centralizador da radiação construída a partir de um tubo PVC branco de 75 mm de diâmetro com 300 mm de comprimento.
- 3) Tampo de PVC com 75 mm de diâmetro e orifício central para passagem do fio de alimentação da fonte de radiação.
- 4) Anel de poliestireno leitoso com diâmetro externo de 75 mm, 45 mm de diâmetro interno e 3mm de espessura para acomodação e estabilização do tubo centralizador de radiação.
- 5) Anel de isopor (poliestireno expandido) com diâmetro externo de 75 mm, 42 mm de diâmetro interno e 30mm de espessura para acomodação e estabilização do tubo centralizador contra impactos.
- 6) Tubo centralizador da radiação: Tubo em PVC com 40mm de diâmetro e 200mm de comprimento com revestimento interno em papel sulfite branco.
- 7) Tampo de PVC com 75 mm de diâmetro e orifício central com 42 mm para passagem do tubo centralizador da radiação.

- 8) *Filtro de poliestireno leitoso: disco com diâmetro externo de 40mm, sendo acondicionado na entrada da câmara em forma de T que acomoda a cubeta. É utilizado para atenuar a radiação e diminuir o efeito estroboscópico causado por excesso de iluminação no detector da câmera digital. Esse filtro é utilizado em refletores LED para tornar a iluminação uniforme e são feitos através de placas rígidas de poliestireno poroso.*
- 9) *Câmara de acomodação da cubeta: Estrutura construída a partir de uma conexão PVC tipo "T". Contém suporte para cubeta, que tem sua face translúcida voltada para o feixe de luz e na parte superior desse compartimento um orifício de 7mm x 3mm para passagem dos tubos que alimentam a cubeta de fluxo.*
- 10) *Suporte para cubeta: Contém um tampo de 40 mm de tubo PVC com duas tampas de tubo de centrífuga (50 mL) empilhadas e com um entalhe central de aproximadamente 1,00x1,00cm para acomodação da cubeta. Essas são imobilizadas e encaixadas no tampo com fita tipo veda-rosca ou crepe.*
- 11) *Fenda da câmera: disco de acrílico preto fosco com diâmetro externo de 40mm e um orifício central de 10mm para atenuação da luz incidente no detector da câmera. O disco é acomodado entre a saída da conexão "T" e o microscópio digital.*
- 12) *Câmara de acomodação do microscópio digital: Construído a partir de um corte de 150mm de um tubo de PVC com 40mm de diâmetro e um tampo do mesmo diâmetro. Esse tampo contém um orifício central para passagem do cabo USB da câmera. A câmera contém dimensões de 140mm de comprimento e 32mm de diâmetro. Sua acomodação dentro do tubo de PVC é feita com fita crepe enrolada ao seu redor para criar volume uniforme e suficiente para se firmar na parede do tubo de PVC. É importante a imobilização da câmera para aumentar a precisão das fotografias.*
- 13) *Câmera digital tipo Microscópio com zoom de 1600x.*
- 14) *Minibomba peristáltica 12V (DC 200 mA) 100 mL/min.*
- 15) *Mangueira de introdução da amostra.*
- 16) *Descarte da amostra após passagem pela cubeta.*
- 17) *Cabo USB que liga câmera a um computador ou celular.*
- 18) *Ligação da minibomba peristáltica a uma bateria ou fonte de alimentação de 12V DC.*

- 19) *Alimentação elétrica da fonte de radiação através de tomada residencial para lâmpadas LED com tensão 110/220V (AC) e para lâmpadas LED de 12V (DC), fonte de alimentação eletrônica de 12V DC ou bateria química de 12V.*
20. *Recipiente para acomodação do sistema construído com tubo PVC com diâmetro de 150 mm e comprimento de 600mm;*
21. *Tampas para as extremidades do recipiente para acomodação com 150 mm de diâmetro e com orifícios em sua parte inferior de 10mm para saída dos cabos de alimentação elétrica e comunicação;*
22. *Orifício com medidas de 10mmx30mm para entrada e saída das mangueiras de fluxo na minibomba peristáltica;*
23. *Distância de 15 cm entre os orifícios;*
24. *Orifício com medidas de 10mmx30mm para entrada e saída das mangueiras de fluxo no receptáculo da amostra;*
25. *Distância de 20 cm entre o orifício 24 e a frente do recipiente de acomodação;*
26. *Orifício circular com 5 cm de diâmetro para encaixe do suporte do receptáculo da amostra;*
27. *Distância de 26 cm entre o orifício 26 e a frente do recipiente de acomodação;*
28. *Base de sustentação e elevação do recipiente de acomodação constituída com 4 parafusos sem ponta medindo 8 mm de diâmetro e 8 cm de comprimento.*

**Figura 31.** Sistema em funcionamento sem a capa de proteção contra radiação externa.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

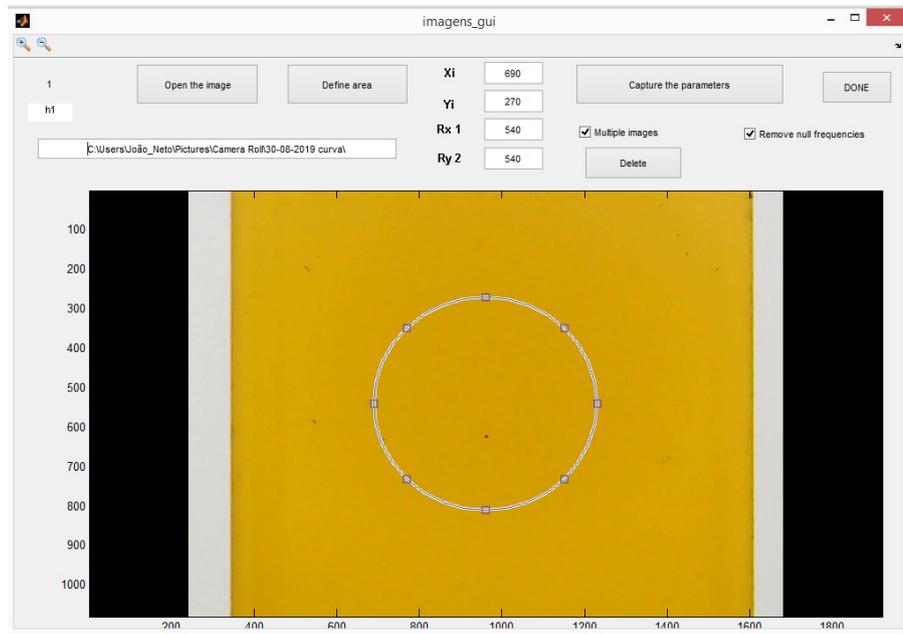
O computador utilizado para aquisição e processamento das imagens foi da marca Sony, modelo Vaio com processador Intel Core I3-3110M 2.4 GHz, memória 4,00 GB e adaptador de vídeo Intel HD Graphics 4000. O software utilizado para captura das imagens foi o “Câmera”, disponível gratuitamente no Windows 8.1 64 bits e com resolução ajustada pra 1920 x 1080 px.

### *3.2. Extração e tratamento de dados dos sistemas de cores*

Para extração dos dados dos sistemas HSV e RGB foi utilizado o software Matlab R2010a com o módulo “Imagem” da rotina Data\_Hand\_Gui [88]. A área de captura, denominada região de interesse (ROI), foi circular e fixa em todas as fotografias (Figura 32), sendo o seu valor pré-estabelecido em 540px de diâmetro no centro da imagem ( $690X_i \times 270Y_i$ ) com um valor de 228.974 pixels analisados por

imagem. Para cada amostra foi extraída uma matriz de  $1 \times 768$ , sendo esse valor correspondente à soma de 256 pixels dos três canais HSV ou RGB.

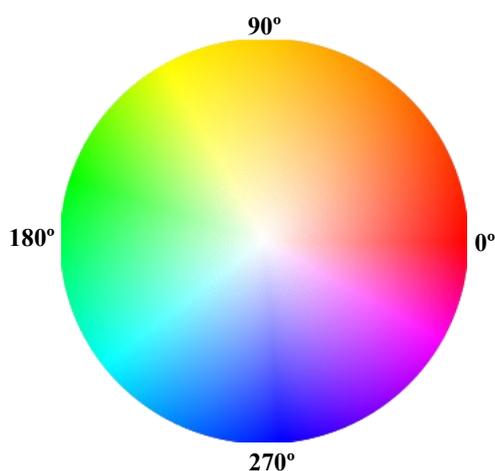
**Figura 32.** Janela de seleção da região de interesse (ROI) na rotina Data\_hand\_gui.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

No espaço RGB os canais são representados pelos valores dos pixels que variam de 0 a 255, já no espaço HSV os canais são representados de 0 a 360 para o Hue (H) e de 0 a 100 para o S (Saturation) e V (Value). No Hue esse valor é assim representado porque indica o espectro visível convertido em um círculo com sua extremidade a variação das cores com suas maiores saturações como mostra a Figura 33.

**Figura 33.** Escala Hue utilizada na aplicação do espaço de cor HSV.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

Nesse espaço a intensidade da cor e o seu brilho são representados em uma escala de percentagem, sendo o mais intenso o 100% e o menos intenso o 0%, aplicadas dentro dos canais Hue (H) e Saturation (S). Essa conversão, dentro do módulo de extração de dados para imagem “data\_hand\_gui” do Matlab foi atribuída, em todo o canal HSV, como sendo o valor mínimo em 0 e o máximo em 255 como mostra a Tabela 14.

**Tabela 14.** Referência da conversão de valores para os espaços de cores e seus respectivos canais.

<b>Referência</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Data_hand_gui	0	255
R (Red)	0	255
G (Green)	0	255
B (Blue)	0	255
H (Hue)	0°	360°
S (Saturation)	0%	100%
V (Value) / I (Intensity)	0%	100%

O valor de pixel mais frequente deve ser identificado com o intuito de determinar qual a cor predominante na seleção da imagem estudada, sendo assim a média da frequência dos pixels em cada canal de cada sistema de cor foi calculada

utilizando o software Microsoft Excel e aplicando a equação 1. Nessa equação,  $F_c$  é a frequência média por canal dentro do sistema RGB ou HSV,  $x$  é a frequência do pixel e  $y$  é o valor do pixel que tem intervalo de 0-255 para cada canal de cor. As contagens dos pixels de número 0 (zero) são incluídas nesse cálculo para eliminar os pontos escuros na seleção que não correspondem ao valor real. Se os valores fossem considerados como 256 unidades partindo do número 1, os pontos escuros provenientes das partículas aderidas nas paredes da cubeta ou bolhas formadas pela turbulência do fluido iriam interferir nas médias das frequências caso esses se apresentarem em quantidades elevadas, uma vez que esses valores seriam multiplicados pelo número 1. A multiplicação por 0 (zero) anula esses sinais e não os contabiliza nos cálculos finais.

$$F_c = [\sum(x_y \cdot y)] / (\sum x_y) \quad \text{Equação 1}$$

### 3.3. Procedimento experimental

O método descrito por L. A. Douglas e J. M. Bremner [82] foi utilizado como base para o desenvolvimento do método para quantificação da ureia em leite. Nesse método, uma solução colorimétrica é preparada a partir da mistura de Dicaetilmonoxima (0,012 mol/L), Tiossemicarbazida (0,5mmol/L), ácido fosfórico (8,2 mol/L) e ácido sulfúrico (0,33 mol/L). 30 mL desta solução colorimétrica é adicionada a 10 mL de uma solução extratora contendo ureia de amostras de solos ou solução padrão para curva de calibração e esta mistura é levada para aquecimento durante 30 minutos a 120 °C, resfriada em água corrente por 15 minutos e medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm.

Para esse estudo, a tiossemicarbazida (TSC) foi substituída pela difenilcarbazida (DFC) e o aquecimento por banho-maria foi substituído por banho de glicerina para assegurar a menor variação de temperatura e evitar reposição em razão da evaporação. Uma mistura de ácido sulfúrico (Synth, 99,8%) e ácido fosfórico (Synth, 85%) foi utilizada para a diminuição do pH, que é favorável à reação. Por apresentar moderada viscosidade, todas as soluções contendo a mistura ácida foram submetidas a um banho ultrassônico de 5 minutos com a finalidade de aumentar a homogeneidade da solução e promover maior interação entre os seus constituintes. O procedimento de sonicação foi também aplicado em cada balão volumétrico contendo as demais soluções utilizadas no método. Todas as amostras

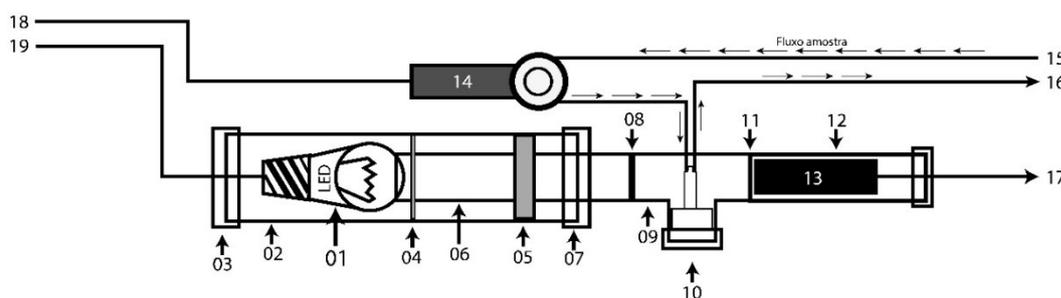
foram preparadas com a adição de 3 mL da solução de ácido tungstico, utilizada como solvente extrator para simular o meio racional.

### 3.3.1. Descrição do procedimento em fluxo

Na Figura 34 é demonstrado um esquema de como ocorre injeção em fluxo para o método proposto. Após os procedimentos para obtenção da reação colorimétrica, a amostra, previamente resfriada, é aspirada (15) por uma minibomba peristáltica (14) diretamente do balão volumétrico para uma cubeta em fluxo (10) que já se encontra iluminada por uma lâmpada tipo LED (01). A minibomba é desligada e essa cubeta contendo o produto colorimétrico é fotografada três vezes por uma câmera digital tipo microscópio (13). Após a aquisição e armazenamento das imagens digitais devidamente renomeadas com a identificação das amostras e suas réplicas, a minibomba é novamente acionada e uma quantidade suficiente de água destilada é injetada na cubeta para remoção da solução colorimétrica e seu respectivo descarte para recipiente apropriado (16). A extração e o tratamento de dados ocorrem conforme descrito no 3.2.

A finalidade deste sistema em linha é diminuir o tempo de medida proporcionado pela rápida injeção e descarte da amostra e evitar o contato direto com a solução colorimétrica fortemente ácida. Além disso, a utilização de um sistema como esse contribui para diminuição dos erros provocados por contaminações externas oriundas da manipulação de cubetas convencionais.

**Figura 34.** Descrição do procedimento de injeção em fluxo.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

### 3.3.2. Definição do canal de trabalho

Para correlacionar numericamente a intensidade do produto colorimétrico com a concentração da ureia, foi construída uma curva de calibração com parâmetros iniciais fixos em uma mistura de 1:1 com 4mL de ácidos fosfórico e sulfúrico, diacetilmonoxima (1000 mg/L), difenilcarbazida (100 mg/L) e ureia (0-40 mg/L) para um volume final de 25 mL com tempo de aquecimento de 30 minutos. Essa curva de calibração preliminar tem como objetivo selecionar o canal de cor do sistema RGB de maior correlação entre o sinal analítico e a concentração de ureia. Esse cálculo é realizado a partir do princípio da Lei de Lambert/Beer utilizando a conversão das médias das frequências em absorvância de acordo com a equação 2. Nessa equação,  $Abs_c$  é a absorvância do canal no sistema RGB,  $c$  é o canal correspondente,  $B_c$  é a frequência média do branco analítico para o canal e  $F_c$  a frequência média do canal.

$$Abs_c = \log(B_c/F_c) \quad \text{Equação 2}$$

O sistema de cores HSV (Hue, Saturation e Value) também foi utilizado para estimar a concentração de ureia. O  $F_c$  do canal S ( $F_S$ ) foi utilizado diretamente como sinal do analito, uma vez que esse canal apresenta variação linear com a intensidade cor. A equação 3, baseada na soma das normalizações dos valores de saturação em função dos valores da matiz (Hue) e de brilho (value), foi aplicada para os canais Hue, Saturation e Value ( $F_{HSV}$ ) como estudo de um novo tratamento matemático para obtenção do sinal analítico em correlação com a concentração. O objetivo deste cálculo é avaliar se as variações de Hue e Value, durante o uso da calibração automática de brilho e temperatura de câmeras digitais, diferem significativamente dos resultados obtidos com o uso do tratamento de dados utilizando o  $F_S$ , que no espaço HSV indica a intensidade de uma cor.

$$F_{HSV} = (F_S/F_H) + (F_S/F_V) \quad \text{Equação 3}$$

### 3.3.3. *Teste de adição padrão*

Duas curvas de calibração com faixa linear de 0 a 9,6 mg/L de ureia foram construídas. Em uma das curvas foi adicionado 2,0 mL do sobrenadante obtido a partir da extração de uma amostra para identificar a influência do efeito de matriz no método proposto. A presença significativa do efeito de matriz foi avaliada quanto às diferenças das inclinações das regressões lineares em um intervalo de confiança de 95%.

### 3.3.4. *Extração da ureia em leite*

Utilizando como base o método proposto por J. J. Coulombe e L. Favreau [87], foi adicionado 45 mL de uma solução 9:1 preparada a partir de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,043 mol/L):Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> (10% m/v) em 5mL de leite e submeteu a um banho ultrassônico durante 3 minutos. Essa mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos em tubos de 50 mL. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para medida das amostras, curva com adição padrão e teste de adição e recuperação.

### 3.3.5. *Teste de adição e recuperação de analito*

Quatro amostras com volumes de 5 mL foram enriquecidas com 0,8,1,6,2,4 e 3,2 mg/L de ureia e submetidas ao procedimento de extração. Do sobrenadante foi retirado 3 mL e o procedimento colorimétrico foi aplicado. A equação 4 foi utilizada para calcular os valores de recuperação, onde  $C_1$  é a concentração da amostra fortificada,  $C_2$  é a concentração da amostra não fortificada e  $C_3$  é a concentração adicionada.

$$R\% = [(C_1 - C_2) / C_3] \times 100$$

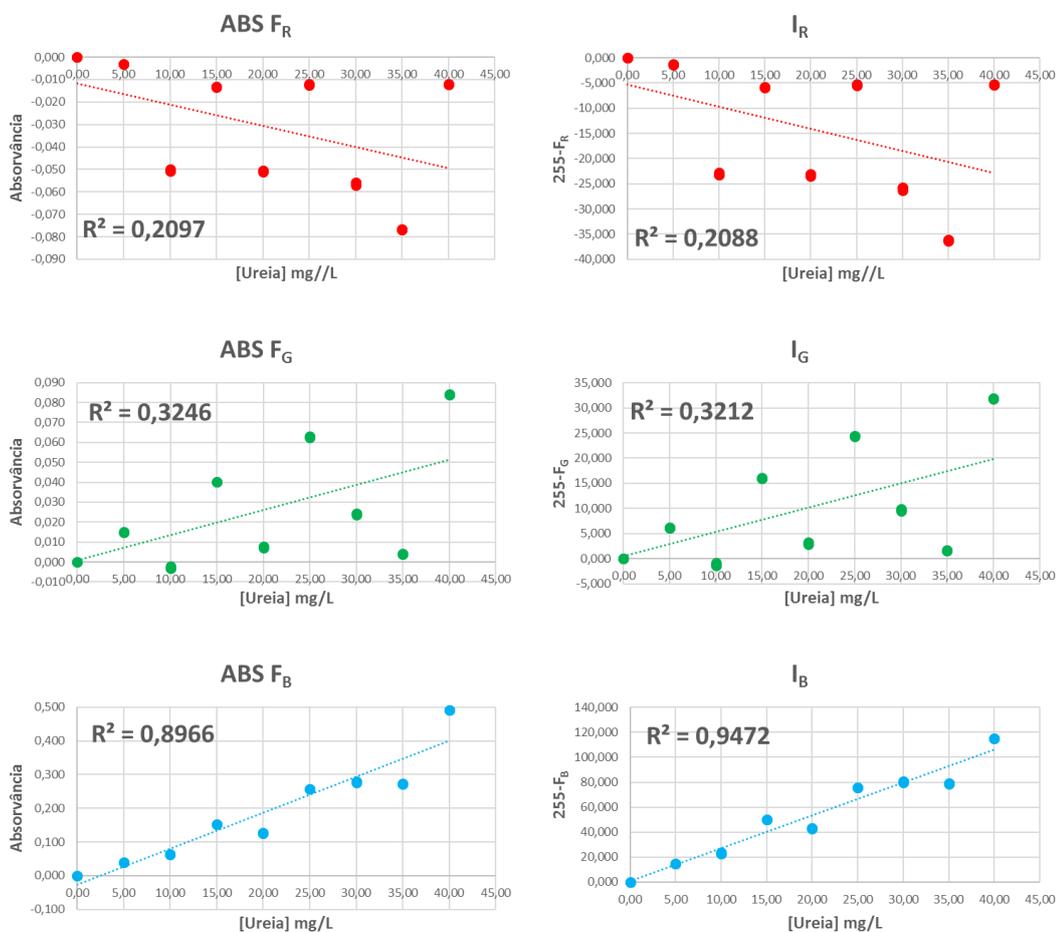
Equação 4

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Definição dos canais de cor para o espaço RGB e HSV

Os cálculos foram considerados para todos os canais em uma faixa de 0-40 mg/L de ureia nas condições estabelecidas anteriormente. As curvas de calibração e seus respectivos gráficos foram selecionados considerando o maior valor da correlação linear. No estudo do espaço de cor RGB, o canal Blue se apresentou como o mais sensível e linear entre os três canais. Como demonstram os gráficos na Figura 35, as maiores correlações foram de  $R^2=0,897$  e  $R^2=0,947$  para os cálculos empregados de Abs  $F_B$  e  $I_B$ , respectivamente.

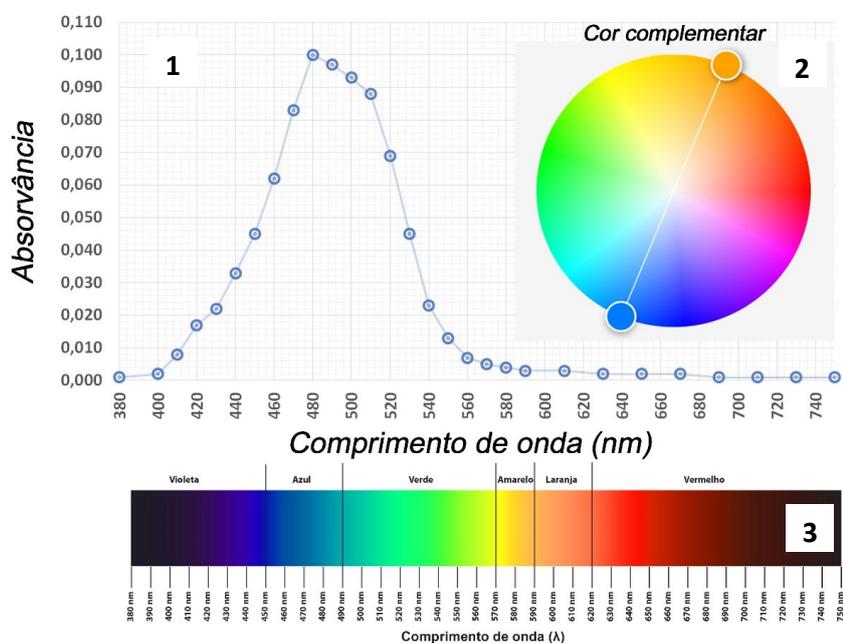
**Figura 35.** Regressão linear para avaliação do melhor canal de trabalho obtida a partir das absorvâncias e intensidades inversas calculadas no espaço RGB.



Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 36, a parte 1 apresenta o gráfico de varredura usando espectrometria UV-Vis com uma concentração de 2,0 mg/L de ureia. Nessa avaliação, o produto da reação tem sua absorção máxima da radiação eletromagnética quando o comprimento de onda é configurado para 480 nm. Essa informação é confirmada pelo gráfico Hue das cores complementares (Figura 36 - seção 2), onde a cor alaranjada é complementada pela cor azul. Quando relacionadas às cores do espectro visível com os valores numéricos dos seus respectivos comprimentos (Figura 36 - seção 3) a faixa de 480nm também indica a cor azul.

**Figura 36.** Varredura em espectrometria UV-Vis com a concentração de ureia em 2,0 mg/L.



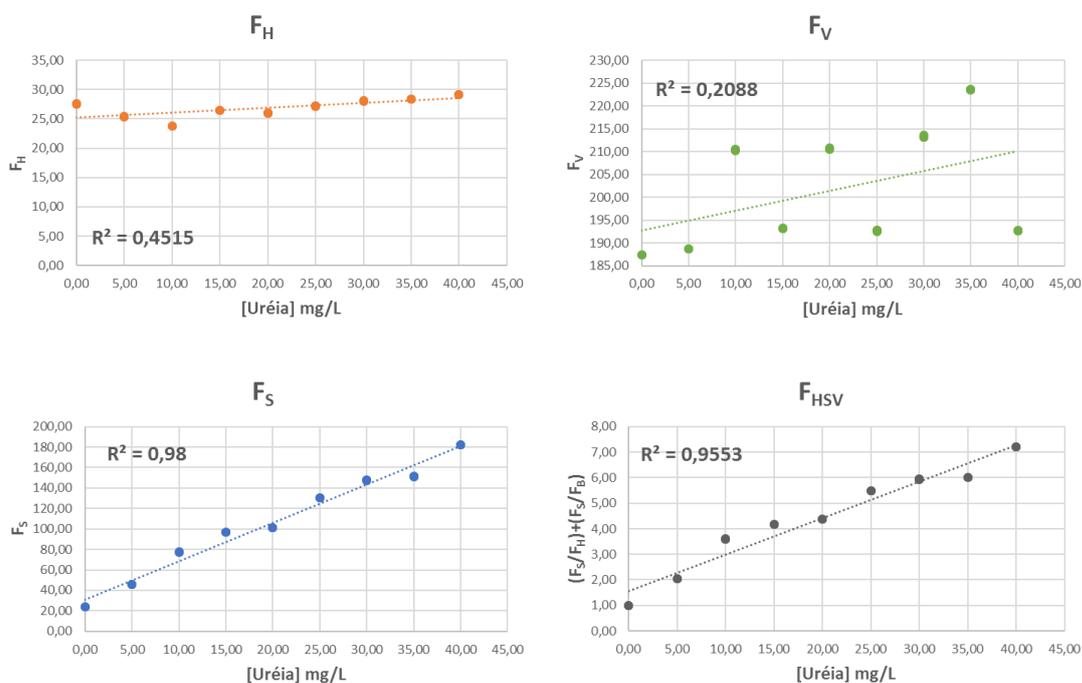
*Fonte: Elaborada pelo autor*

É demonstrado na literatura que o uso da diacetilmonoxima para determinação de ureia tem seu produto colorido com absorção máxima no comprimento de onda entre 475-535nm [80, 82, 86, 87, 89-91]. Essa faixa pode ser relacionada com a formação de produtos paralelos formados pela ureia [74], mas também pela formação de constituintes adicionados propositalmente na reação para intensificar a cor e aumentar a sensibilidade do método, a exemplo da reação da tiossemicarbazida com o Fe(II), que resulta na cor avermelhada e com isso absorve em comprimento de ondas maiores em torno de 530nm, de acordo com a teoria das cores complementares.

Esse fator é importante, pois sugere a redução dos reagentes utilizados para estabilização e sensibilidade, uma vez que esses podem mascarar a verdadeira coloração do produto formado e interferir na exatidão quando aplicado o método em matrizes mais complexas.

A Figura 37 apresenta os gráficos sem função dos canais Hue, Saturation e Value utilizando a equação 3. Os cálculos de  $F_S$  e  $F_{HSV}$  apresentaram as maiores correlações com  $R^2=0,9800$  e  $0,9553$ , respectivamente. Os valores observados com esses tratamentos foram mais próximos dos valores preditos com a precisão aumentada em relação aos cálculos realizados com os canais RGB para essa primeira avaliação. Observa-se também que para cada medida a fotografia tem uma grande variação de  $F_V$  (brilho) indicando o comportamento de ajuste automático da câmera frente a diferentes intensidades de cores. Os valores de  $F_H$  tendem a se manter constantes, mas observa-se uma pequena variação quando a fotografia ocorre em meio contendo menores concentrações, podendo indicar uma diminuição na sensibilidade da câmera utilizada para identificar variações de cores mais sutis. No entanto, esse comportamento não pode ser confirmado devido à reduzida amostragem.

**Figura 37.** Regressão linear para avaliação do melhor canal de trabalho de acordo com a correlação entre concentração de ureia e sinais analíticos calculados a partir do espaço HSV.



Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.2. Proporções dos ácidos

Para definir uma razão numérica em que a fração de ácido sulfúrico fosse reduzida com o propósito de garantir a integridade do complexo colorido formado sem comprometer significativamente a sensibilidade do método, como argumenta J.J. Coulombe e L. Favreau [87], foi aplicado um planejamento experimental Doehlert para estudar dois fatores (volumes dos ácidos). Alguns parâmetros de concentração foram fixados tais como: diacetilmonoxima (1000 mg/L), difenilcarbazida (100 mg/L) e ureia (20 mg/L) em um volume final de 25 mL. Os níveis de ácidos fosfórico e sulfúrico foram estabelecidos considerando o volume máximo de todos os reagentes adicionados e a diluição em 5 mL em água ultrapura  $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Foram capturadas imagens referentes aos 10 experimentos obtidos pela execução do planejamento e seus respectivos brancos analíticos. Os brancos para cada experimento foram considerados no estudo por apresentar em cores distintas cada condição dos ensaios. Os valores de  $F_{HSV}$ ,  $F_S$  e a intensidade inversa (I) (equação 5) foram utilizados no estudo dos planejamentos experimentais. O valor de I é obtido a partir do  $F_C$  extraído do canal com maior correlação do sistema RGB, nesse caso o Blue (B), como mostra a equação 5 aplicada por Porto et al. [92]. Os cálculos foram aplicados para os experimentos e seus brancos analíticos, sendo a subtração utilizada como valor real para avaliar o sistema.

$$I = 255 - F_c \quad \text{Equação 5}$$

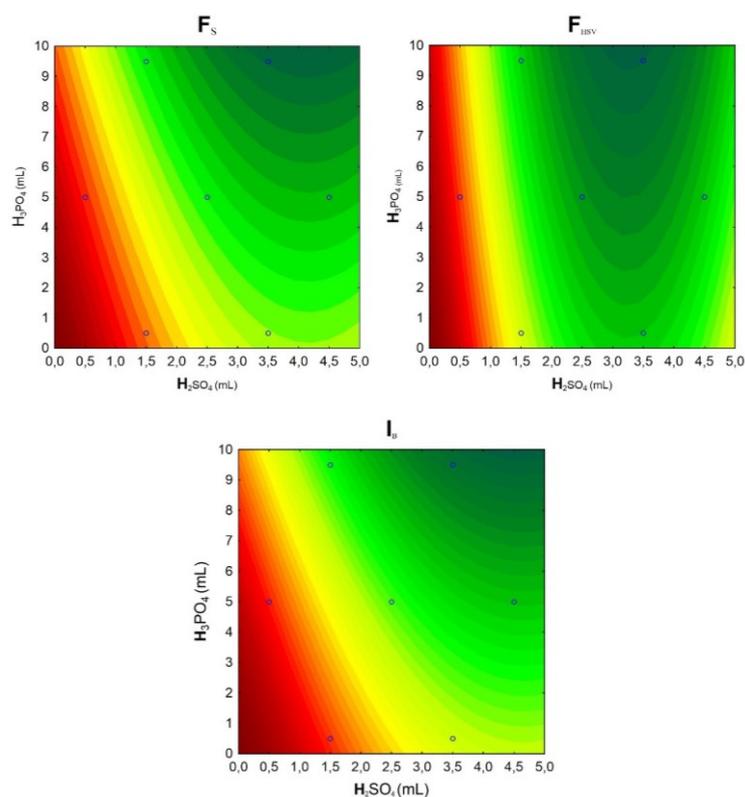
Os resultados obtidos para cada experimento, bem como seu domínio experimental com valores reais e codificados, são demonstrados na Tabela 15. Essas respostas foram utilizadas para o cálculo dos modelos e plotagem das superfícies de resposta da Figura 38, na qual a região de máximo está representada pela região de cor vermelha. A Análise de Variância (ANOVA) a 95% foi aplicada para avaliar a falta de ajuste e os modelos (linear e quadrático) das três respostas empregadas como mostra a Tabela 16.

**Tabela 15.** Matriz do Planejamento Doehlert com valores reais, codificados e as respostas obtidas.

Exp. (OE)	Volumes (mL)		Respostas			Vol. final dos ácidos
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	I <sub>B</sub>	F <sub>S</sub>	F <sub>H<sub>3</sub>SV</sub>	
1 (4°)	2,50 (0,000)	5,0 (0,000)	43,050	47,649	1,144	7,5 mL
2 (2°)	4,50 (1,000)	5,0 (0,000)	20,805	22,698	2,597	9,5 mL
3 (9°)	3,50 (0,500)	9,5 (0,866)	24,505	26,482	3,009	13,0 mL
4 (3°)	0,50 (-1,000)	5,0 (0,000)	128,560	175,714	6,858	5,5 mL
5 (8°)	1,50 (-0,500)	0,5 (-0,866)	133,588	165,538	6,345	2,0 mL
6 (5°)	3,50 (0,500)	0,5 (-0,866)	55,146	63,494	1,099	4,0 mL
7 (1°)	1,50 (-0,500)	9,5 (0,866)	16,439	17,490	0,915	11,0 mL
8 (6°)	2,50 (0,000)	5,0 (0,000)	43,882	49,477	2,187	7,5 mL
9 (10°)	2,50 (0,000)	5,0 (0,000)	68,718	79,032	3,217	7,5 mL
10 (7°)	2,50 (0,000)	5,0 (0,000)	55,172	60,746	1,852	7,5 mL

IB: intensidade do canal Blue; FS: Frequência da Saturação; FHSV: Frequência do cálculo HSV; OE: Ordem de execução.

**Figura 38.** Superfícies de resposta para definição da proporção ácida em função das respostas I<sub>B</sub>, F<sub>S</sub> e F<sub>H<sub>3</sub>SV</sub>.



Fonte: Elaborada pelo autor

**Tabela 16.** Análise de Variância (ANOVA) para o teste de falta de ajuste dos modelos de acordo com cada tratamento de dados em um intervalo de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ).

	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
I <sub>B</sub>	2104	2	1052	7,279	0,071
F <sub>S</sub>	3682	2	1841	8,855	0,055
F <sub>H<sub>SV</sub></sub>	13,673	2	6,836	9,190	0,053

IB: intensidade do canal Blue; FS: Frequência da Saturação; FHSV: Frequência do cálculo HSV; SQ: soma quadrática; gl: grau de liberdade; MQ: média quadrática; F: Distribuição F de Fisher-Snedecor; valor p: nível de probabilidade.

Apesar das superfícies de respostas obtidas apresentarem conformação em sela nos tratamentos F<sub>S</sub> e I<sub>B</sub> e conformação de mínimo no tratamento F<sub>H<sub>SV</sub></sub>, seus pontos críticos (máximos nesse caso) ainda puderam ser considerados devido a não significância da falta de ajuste nos modelos calculados pelos três tipos de cálculos aplicados.

A partir da análise dos gráficos da Figura 36, observam-se maiores sinais na presença de menores volumes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. No entanto, o aumento do volume de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> não contribuiu significativamente para o aumento dos sinais, dentro do domínio experimental avaliado, demonstrando maior robustez nas respostas em relação ao ácido sulfúrico.

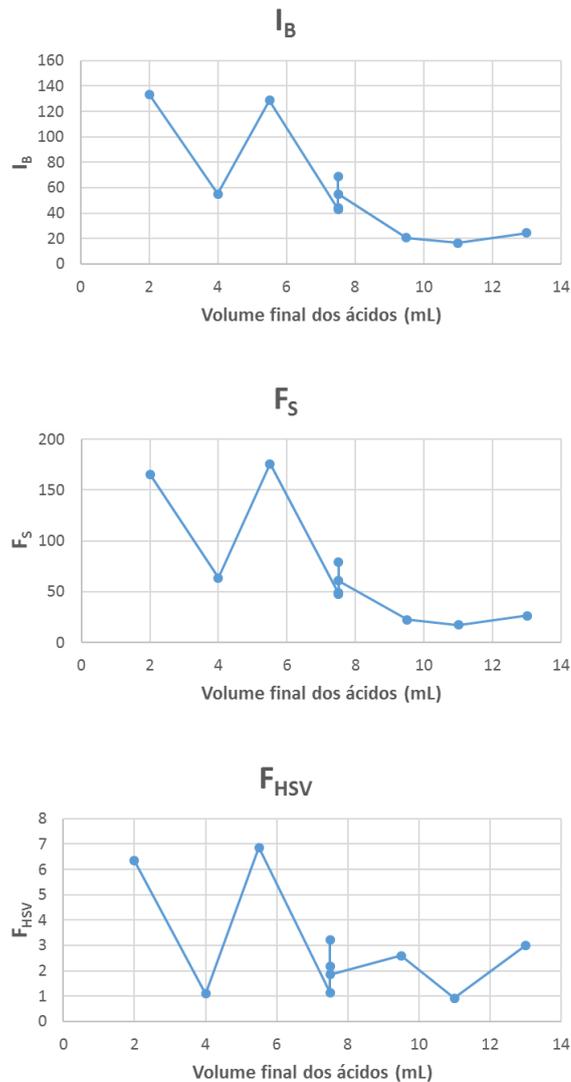
Outra observação notada é que o resultado visual da imagem fotografada na presença de ácido sulfúrico nos seus níveis mais altos resultava em uma cor laranja avermelhada, como mostra as figuras dos respectivos experimentos na Tabela 17, sendo essa intensidade de cor associada ao aumento do sinal no branco analítico que também apresenta coloração nessa tonalidade. Esse indicativo demonstra condições menos favoráveis à formação do produto colorimétrico, já que esse, como é indicado na literatura, apresenta coloração amarelada.

**Tabela 17.** Fotografias dos experimentos e seus respectivos brancos analíticos obtidos pelo planejamento Doehlert.

Experimento	Branco	Sinal	Vol. final dos ácidos
1 (4°)			7,5 mL
2 (2°)			9,5 mL
3 (9°)			13,0 mL
4 (3°)			5,5 mL
5 (8°)			2,0 mL
6 (5°)			4,0 mL
7 (1°)			11,0 mL
8 (6°)			7,5 mL
9 (10°)			7,5 mL
10 (7°)			7,5 mL

À medida que os valores de volumes dos ácidos eram aumentados, notava-se também um aumento no branco analítico e, portanto, a diferença de sinal da amostra menos o sinal do branco era diminuído, como mostram os gráficos da Figura 39, para os três cálculos aplicados. Menores níveis de  $H_2SO_4$  com quantidade moderada de  $H_3PO_4$  favoreceram o aumento do sinal analítico e diminuíram a porção de  $H_2SO_4$  no sistema, como mostra o experimento 5 da matriz Doehlert. O experimento 4 e 5 apresentaram os melhores valores de sensibilidade no estudo dos ácidos, entretanto, o resultado apresentado do experimento 5 pode ser atribuído à quantidade majoritária de  $H_2SO_4$ , que apesar de diminuir o volume final dos ácidos adicionados (2,0 mL), não pode ser considerada devido à ação de degradação sobre o produto colorimétrico formado. O mesmo comportamento é visto no experimento 6, que agora apresenta também elevado sinal no branco analítico em função do aumento do volume de  $H_2SO_4$ .

**Figura 39.** Sinais analíticos em função do volume final de ácido para os diferentes tratamentos matemáticos.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

A partir da observação visual das três superfícies de resposta foi possível obter a proporção satisfatória de  $H_3PO_4:H_2SO_4$  para aplicação no método proposto como 30:1 (6,0 mL:0,2 mL), definida na região de máximo sinal analítico indicada pela cor vermelha nas superfícies. O volume de ácido fosfórico foi maior em relação ao ácido sulfúrico buscando manter o pH baixo para a promoção da reação com a degradação mínima do produto final provocada por grandes quantidades de ácido sulfúrico, que apesar de conferir sensibilidade ao método, pode diminuir a precisão dos resultados e aumenta os valores de branco.

Entretanto, as porções definidas como ótimas devem ser submetidas às variações do sistema ocasionadas por erros sistemáticos e aleatórios de pequena magnitude. Nesse caso, avaliou-se a robustez do método otimizado a partir de um planejamento fatorial completo  $2^2$  utilizando valores da região de máximo dessa superfície, de acordo com os níveis apresentados na Tabela 18, utilizando 3 pontos centrais. A matriz e as respostas dos experimentos para os 3 cálculos empregados encontram-se na Tabela 19.

**Tabela 18.** Níveis aplicados no planejamento fatorial completo  $2^2$  para avaliação da robustez.

Volumes de ácido (mL)	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (mL)	5,5	6,0	6,5
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL)	0,150	0,200	0,250

**Tabela 19.** Matriz e resultados do Planejamento fatorial  $2^2$  para cada tratamento matemático.

Exp. (OE)	Volumes dos ácidos (mL)		Respostas		
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	F <sub>HSV</sub>	F <sub>S</sub>	I <sub>B</sub>
1 (4°)	6,50	0,15	5,850	147,149	105,740
2 (6°)	6,50	0,25	6,509	155,291	112,130
3 (2°)	5,50	0,15	6,709	153,391	112,143
4 (7°)	5,50	0,25	6,775	154,641	112,435
5 (1°)	6,00	0,20	6,801	155,079	112,839
6 (5°)	6,00	0,20	5,770	145,403	104,988
7 (3°)	6,00	0,20	5,848	147,756	105,486

IB: intensidade do canal Blue; FS: Frequência da Saturação; FHSV: Frequência do cálculo HSV; OE: Ordem de execução.

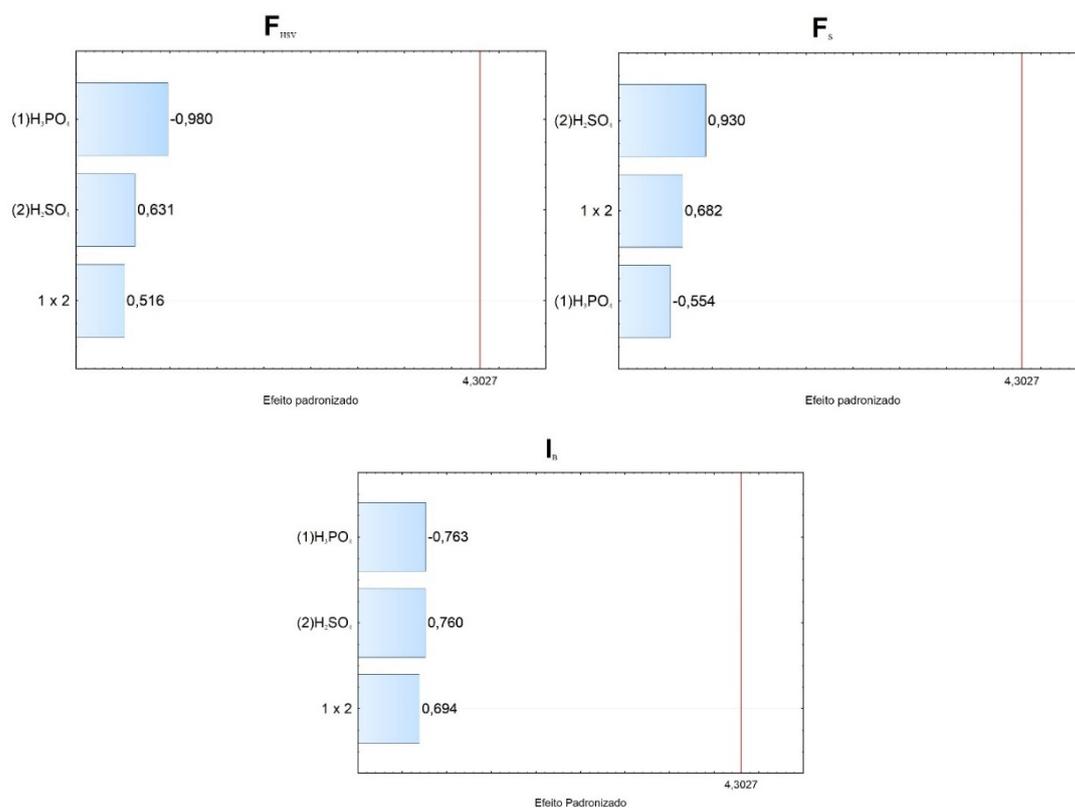
Os modelos obtidos para cada cálculo estão ajustados a um nível de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ), como demonstra os valores do estudo da falta de ajuste expostos na Tabela 20. A partir disso, pôde-se considerar que nenhuma das variáveis influencia na alteração do sinal analítico dentro do domínio experimental estudado, uma vez que não são significativas, e isso demonstra que o domínio estudado apresenta robustez aceitável. Essa afirmação pode ser observada também nos gráficos de Pareto da Figura 40, onde as variáveis estudadas e sua interação não apresentam significância estatística.

**Tabela 20.** Teste de falta de ajuste dos modelos de acordo com cada tratamento de dados.

Resposta	SQ	gl	MQ	F	p
I <sub>B</sub>	13,83400	1	13,83400	0,715771	0,486618
F <sub>S</sub>	17,6134	1	17,61342	0,691652	0,493086
F <sub>HSV</sub>	0,176560	1	0,176560	0,536067	0,540242

IB: intensidade do canal Blue; FS: Frequência da Saturação; FHSV: Frequência do cálculo HSV; SQ: soma quadrática; gl: grau de liberdade; MQ: média quadrática; F: Distribuição F de Fisher-Snedecor; valor p: nível de probabilidade.

**Figura 40.** Gráficos de pareto para o estudo da robustez nos diferentes cálculos.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

### 4.3. Triagem dos fatores

Para identificação dos fatores significativos no processo foi aplicado o planejamento fatorial completo  $2^4$  variando as concentrações de diacetilmonoxima (DAM) edifenilcarbazida (DFC), Tempo e Volume da mistura ácida, ácido fosfórico e ácido sulfúrico (AF/AS). Os resultados foram analisados quanto às suas influências no aumento da sensibilidade do método considerando a diminuição da coloração do branco analítico. A proporção da mistura ácida AF/AS foi otimizada no experimento 4.2. Foram aplicados 4 pontos centrais para estimativa do erro e os níveis foram definidos com base em trabalhos anteriores para determinação de ureia utilizando a diacetilmonoxima [82, 85, 87] e a concentração de ureia foi fixada em 20 mg/L. A matriz e resultados obtidos em função da aplicação do planejamento estão expostos na Tabela 21.

**Tabela 21.** Matriz do planejamento fatorial completo  $2^4$  com valores reais, codificados e as respostas obtidas.

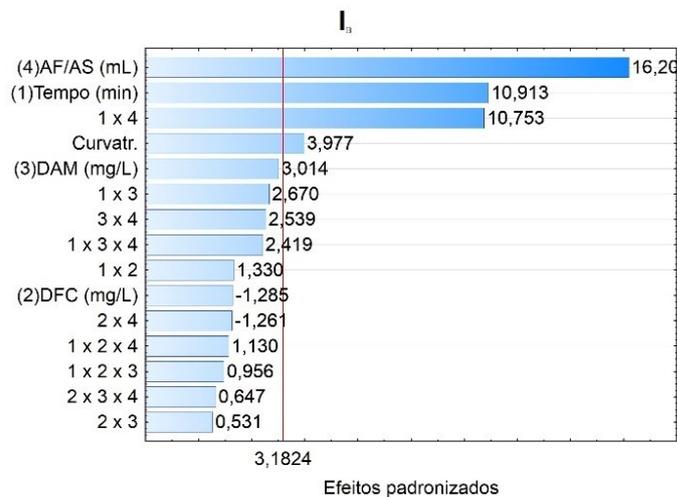
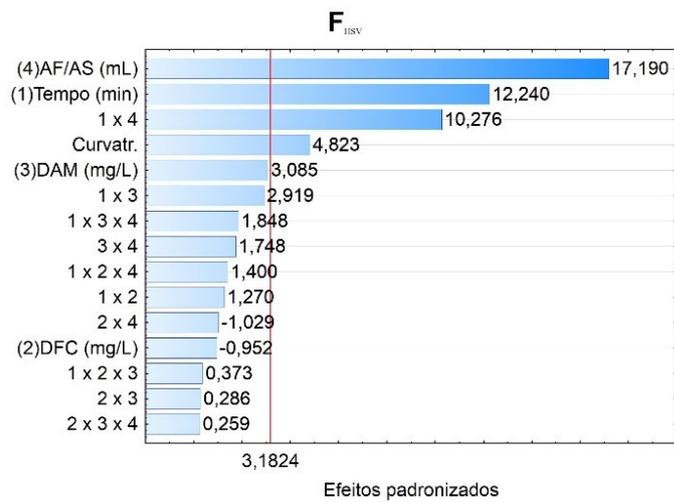
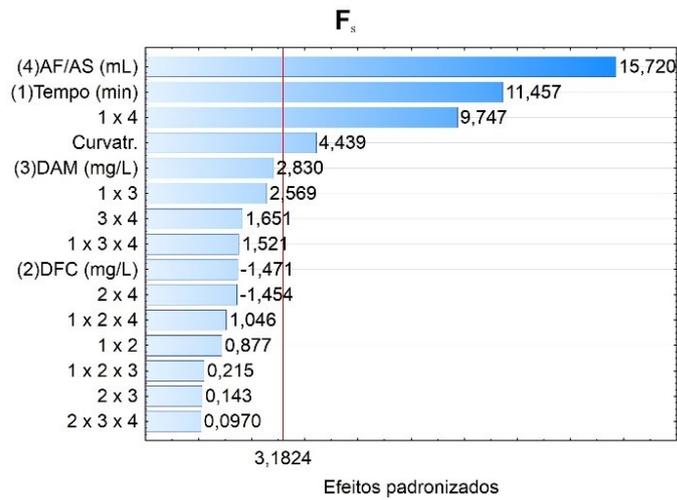
Exp. (OE)	Variáveis				Respostas		
	Tempo (min)	DFC (mg/L)	DAM (mg/L)	AF/AS (mL)	I <sub>B</sub>	F <sub>S</sub>	F <sub>HSV</sub>
1 (7°)	20 (-1)	30,00 (+1)	300,00 (+1)	5,0 (+1)	18,120	28,229	1,129
2 (4°)	20 (-1)	30,00 (+1)	300,00 (+1)	1,0 (-1)	0,000	2,790	0,115
3 (1°)	20 (-1)	30,00 (+1)	100,00 (-1)	5,0 (+1)	17,048	26,753	1,167
4 (6°)	20 (-1)	30,00 (+1)	100,00 (-1)	1,0 (-1)	1,952	1,498	0,040
5 (8°)	20 (-1)	10,00 (-1)	300,00 (+1)	5,0 (+1)	46,728	65,020	2,297
6 (3°)	20 (-1)	10,00 (-1)	300,00 (+1)	1,0 (-1)	4,382	1,346	0,052
7 (2°)	20 (-1)	10,00 (-1)	100,00 (-1)	5,0 (+1)	42,766	60,773	2,228
8 (5°)	20 (-1)	10,00 (-1)	100,00 (-1)	1,0 (-1)	0,000	0,731	0,000
9 (16°)	60 (+1)	30,00 (+1)	300,00 (+1)	5,0 (+1)	184,507	230,124	8,479
10 (20°)	60 (+1)	30,00 (+1)	300,00 (+1)	1,0 (-1)	5,853	21,705	0,802
11 (13°)	60 (+1)	30,00 (+1)	100,00 (-1)	5,0 (+1)	112,523	162,644	5,869
12 (18°)	60 (+1)	30,00 (+1)	100,00 (-1)	1,0 (-1)	0,000	5,101	0,226
13 (15°)	60(+1)	10,00 (-1)	300,00 (+1)	5,0 (+1)	170,744	232,551	7,998

Exp. (OE)	Variáveis				Respostas		
	Tempo (min)	DFC (mg/L)	DAM (mg/L)	AF/AS (mL)	I <sub>B</sub>	F <sub>S</sub>	F <sub>HSV</sub>
14 (19°)	60 (+1)	10,00 (-1)	300,00 (+1)	1,0 (-1)	2,987	22,720	0,817
15 (14°)	60 (+1)	10,00 (-1)	100,00 (-1)	5,0 (+1)	127,219	174,850	6,016
16 (17°)	60 (+1)	10,00 (-1)	100,00 (-1)	1,0 (-1)	0,959	6,795	0,242
17 (10°)	40(0)	20,00 (0)	200,00 (0)	3,0 (0)	70,755	95,579	3,455
18 (12°)	40(0)	20,00 (0)	200,00 (0)	3,0 (0)	71,273	97,547	3,477
19 (11°)	40(0)	20,00 (0)	200,00 (0)	3,0 (0)	55,987	89,932	3,260
20 (9°)	40(0)	20,00 (0)	200,00 (0)	3,0 (0)	82,449	122,843	4,334

IB: intensidade do canal Blue; FS: Frequência da Saturação; FHSV: Frequência do cálculo HSV; AF/AS: Misturas dos ácidos fosfórico e sulfúrico; DAM: Concentração de Diacetilmonoxima; DFC: Concentração de Difenilcarbazida; OE: Ordem dos experimentos.

A partir das respostas obtidas em função da matriz do planejamento (Tabela 21) foi realizado o estudo dos efeitos e o teste de curvatura em função de I<sub>B</sub>, F<sub>S</sub> e F<sub>HSV</sub>, considerando as interações de 3 vias para os efeitos, como mostram os gráficos de Pareto na Figura 41.

**Figura 41.** Estudo dos efeitos para os cálculos  $I_B$ ,  $F_S$  e  $F_{HSV}$  e seus respectivos testes de curvatura representados pelos gráficos de Pareto.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

Observando os gráficos de Pareto é possível afirmar que os efeitos dos fatores tempo e volume da proporção AF/AS foram significativos, indicando uma relação muito alta entre o aumento no tempo e da quantidade de ácido com o aumento da resposta analítica, sendo essa observação evidenciada nas três formas de cálculo.

A variável curvatura no estudo dos efeitos também foi significativa para os três cálculos, e isso implica na necessidade do estudo dessas variáveis mais significativas em uma superfície de resposta a partir de um modelo quadrático para a identificação dos valores ótimos em um domínio experimental ajustado.

Apesar do efeito DAM (concentração de diacetilmonoxima) está próximo do limite de significância, não foi considerada significativa, mas deve ser investigada em um estudo posterior, pois participa diretamente da reação com a ureia, podendo ter sua interação comprometida com a variação dos fatores significantes, além disso, a busca por diminuir o consumo de reagentes sem afetar a efetividade do método é sempre um fator positivo.

A concentração de difenilcarbazida (DFC) também não contribuiu significativamente para o aumento do sinal analítico nos níveis estudados e isso pode estar associado ao fato de que sua presença nesse sistema é somente para auxiliar a estabilização da cor.

Os valores de p para a análise de variância (ANOVA) em um intervalo de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ) para  $I_B$ ,  $F_S$  e  $F_{HSV}$  foram, respectivamente, 0,659, 0,844 e 0,719 para o teste de falta de ajuste (Tabela 22), indicando que a falta de ajuste é não significativa e o modelo está bem ajustado para o domínio experimental aplicado.

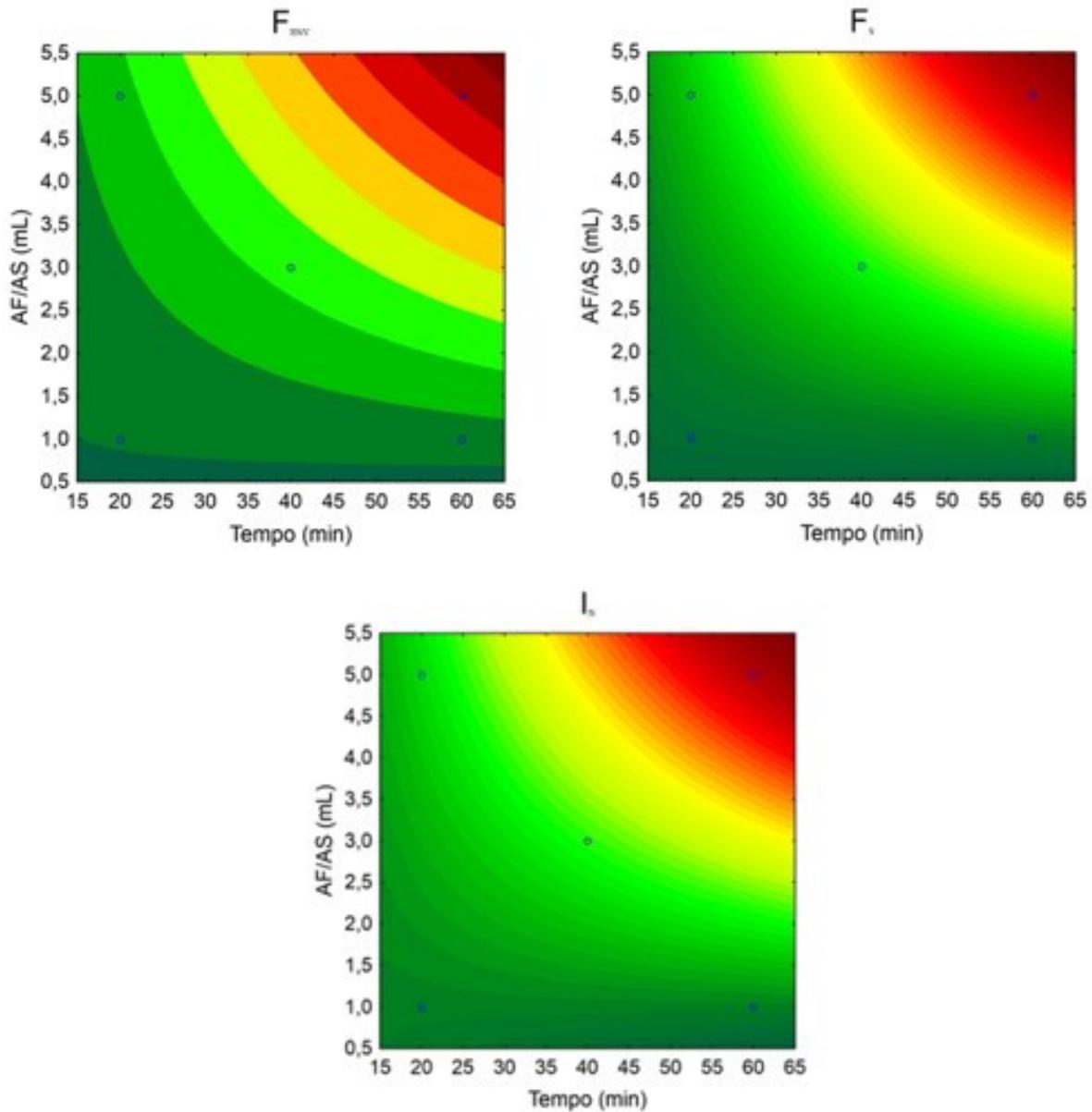
**Tabela 22.** Teste de falta de ajuste dos modelos de acordo com cada tratamento matemático.

<b>Respostas</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
$I_B$	28,06	1	28,06	0,2382	0,659
$F_S$	9,8	1	9,84	0,0461	0,844
$F_{HSV}$	0,0359	1	0,03588	0,1568	0,719

$I_B$ : intensidade do canal Blue;  $F_S$ : Frequência da Saturação;  $F_{HSV}$ : Frequência do cálculo HSV; SQ: soma quadrática; gl: grau de liberdade; MQ: média quadrática; F: Distribuição F de Fisher-Snedecor; valor p: nível de probabilidade.

Após a interpretação dos gráficos de efeitos foi feita a observação utilizando os gráficos de contorno (Figura 42), construídos a partir dos resultados obtidos na matriz do planejamento  $2^4$ .

**Figura 42.** Indicação da região ótima a partir dos Gráficos de contorno em função das variáveis AF/AS e Tempo obtidos a partir dos cálculos  $I_B$ ,  $F_S$  e  $F_{HSV}$ .



*Fonte: Elaborada pelo autor*

A partir da análise das superfícies de contorno, conclui-se que o aumento dos sinais analíticos é favorecido quando aplicados 5,0 mL de Volume da mistura ácida (AF/AS) e tempo de 60 minutos, como indica a área vermelha dos gráficos. O comportamento dessas variáveis indica que a reação é favorecida para formação do

produto com o pH menor e com maior exposição ao calor. É possível prever ainda que resultados mais favoráveis podem ser obtidos usando condições acima dos apresentados no domínio experimental atual para identificação desses pontos ótimos, e por isso foi aplicado um novo planejamento usando o modelo Box-Behnken.

Os fatores concentração de diacetilmonoxima (DAM) e concentração de difenilcarbazida (DFC) não apresentaram significância estatística para o aumento do sinal analítico. No entanto, a fim de aumentar a faixa linear da curva de calibração a variável DAM foi centrada em 300 mg/L para o próximo estudo. Por outro lado, a variável DFC não participa diretamente da reação e foi fixada em seu menor nível (10 mg/L).

#### 4.4. Aplicação do planejamento Box-Behnken e definição dos valores ótimos

A partir das informações obtidas na triagem dos fatores usando o planejamento fatorial completo, foi definido um novo domínio experimental para aplicação no planejamento Box-Behnken. Seus níveis, valores reais e suas respostas estão expostos na Tabela 23.

**Tabela 23.** Matriz e respostas do Planejamento Box-Behnken para 3 fatores.

Exp. (OE)	Variáveis			Respostas		
	Tempo (min)	DAM (mg/L)	AF/AS (mL)	I <sub>B</sub>	F <sub>S</sub>	F <sub>HSV</sub>
1 (8°)	40	100,0	5,0	61,544	97,169	3,537
2 (14°)	80	100,0	5,0	124,023	154,549	5,331
3 (6°)	40	500,0	5,0	192,933	239,851	8,652
4 (16°)	80	500,0	5,0	183,455	235,698	8,383
5 (11°)	40	300,0	3,0	85,939	126,953	4,345
6 (17°)	80	300,0	3,0	123,421	173,780	5,996
7 (7°)	40	300,0	7,0	188,625	235,400	8,077
8 (15°)	80	300,0	7,0	189,659	236,730	8,454
9 (12°)	60	100,0	3,0	37,824	66,777	2,362

Exp. (OE)	Variáveis			Respostas		
	Tempo (min)	DAM (mg/L)	AF/AS (mL)	I <sub>B</sub>	F <sub>S</sub>	F <sub>HSV</sub>
10 (2°)	60	500,0	3,0	155,777	194,806	6,646
11 (5°)	60	100,0	7,0	156,457	204,359	7,039
12 (9°)	60	500,0	7,0	187,511	234,888	8,334
13 (13°)	60	300,0	5,0	171,096	213,829	7,260
14 (1°)	60	300,0	5,0	179,182	224,033	7,711
15 (4°)	60	300,0	5,0	176,796	226,398	7,873
16 (10°)	60	300,0	5,0	174,426	229,840	7,942
17 (3°)	60	300,0	5,0	169,655	220,842	7,547

IB: intensidade do canal Blue; FS: Frequência da Saturação; FHSV: Frequência do cálculo HSV; AF/AS: Misturas dos ácidos fosfórico e sulfúrico; DAM: Concentração de Diacetilmonoxima; OE: Ordem experimental.

Mediante a análise de variância (ANOVA) para avaliar o ajuste dos modelos obtidos, foi considerado o modelo contendo os termos lineares, quadráticos e as interações lineares para definição dos valores ótimos. De acordo com os valores obtidos pelo cálculo dos efeitos quadráticos e lineares expostos na Tabela 24, a variável Tempo do modelo quadrático e a interação Tempo × Mistura de ácidos do modelo linear não são significativas. Esse comportamento é interessante, pois indica uma tendência do sistema em ser robusto para as variações do domínio experimental aplicado.

**Tabela 24.** Valores dos efeitos para os termos lineares e quadráticos.

Termos	I <sub>B</sub>		F <sub>S</sub>		F <sub>HSV</sub>	
	Efeito	$\alpha=0,05$	Efeito	$\alpha=0,05$	Efeito	$\alpha=0,05$
Intercepto ( $\beta_0$ )	140,597	0,000	183,413	0,000	6,430	0,000
Tempo (L)	22,879	0,001	25,346	0,004	0,889	0,010
Tempo (Q)	10,612	0,005	11,582	0,017	0,284*	0,100*
DAM (L)	84,957	0,000	95,597	0,000	3,436	0,000
DAM (Q)	23,131	0,000	29,590	0,001	0,907	0,002
AF/AS (L)	79,823	0,000	87,265	0,000	3,139	0,000
AF/AS (Q)	16,708	0,001	18,191	0,004	0,664	0,008
Tempo (L) × DAM (L)	-35,978	0,001	-30,766	0,007	-1,032	0,020
Tempo (L) × AF/AS (L)	-18,224	0,010	-22,749	0,020	-0,637*	0,081*
DAM (L) × AF/AS (L)	-43,450	0,000	-48,751	0,001	-1,495	0,005

\*não significativo

Os três modelos construídos a partir dos cálculos de  $I_B$ ,  $F_S$  e  $F_{HSV}$  apresentaram falta de ajuste não significativo e suas correlações foram de 0,990, 0,985 e 0,979, respectivamente, como mostra a Tabela 25.

**Tabela 25.** Análise de variância (ANOVA) para o teste de falta de ajuste dos modelos de acordo com cada cálculo do planejamento box-behnken.

<b>Respostas</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
$I_B$	287,82	3	95,94	6,200	0,055	0,990
$F_S$	540,69	3	180,23	4,865	0,080	0,985
$F_{HSV}$	0,87233	3	0,29078	3,874	0,112	0,979

$I_B$ : intensidade do canal Blue;  $F_S$ : Frequência da Saturação;  $F_{HSV}$ : Frequência do cálculo HSV; SQ: soma quadrática; gl: grau de liberdade; MQ: média quadrática; F: Distribuição F de Fisher-Snedecor; valor p: nível de probabilidade; R<sup>2</sup>: Correlação

Outro termo analisado foi em relação aos valores preditos e observados (Tabela 26), que mostra a variação dos resíduos entre os experimentos realizados através dos três cálculos. Nesses dados o cálculo realizado com  $I_B$ ,  $F_S$  e  $F_{HSV}$  apresentaram variação da taxa residual de -10,3 a 24,9, -8,3 a 12,42 e -6,86 a 14,84, respectivamente. A variação de erro apresentada pelo cálculo do  $I_B$  foi maior entre os demais cálculos e isso demonstra que a representação do sistema a partir do canal Blue, para esse estudo, não deve representar com precisão o comportamento de formação do produto colorimétrico estudado.

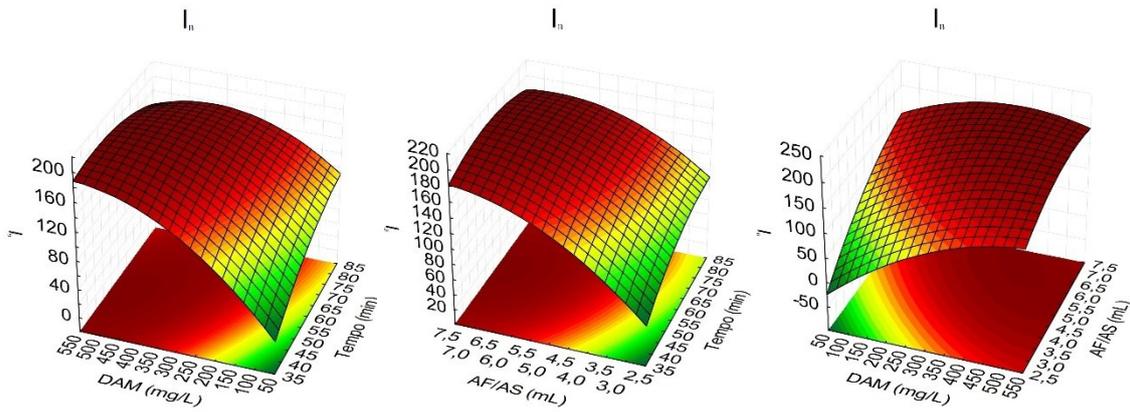
As figuras 43, 44 e 45 representam as superfícies de respostas construídas a partir dos modelos considerando os cálculos  $I_B$ ,  $F_S$  e  $F_{HSV}$ , respectivamente. Os pontos críticos também foram calculados e estão demonstrados na Tabela 27.

**Tabela 26.** Valores observados, preditos e resíduos para o modelo L+Q obtidos pela matriz Box-Behnken e suas respectivas respostas para os cálculos de  $I_B$ ,  $F_S$  e  $F_{HSV}$ .

Exp.	$I_B$				$F_S$				$F_{HSV}$			
	Observados	Preditos	Resíduos	Resíduos (%)	Observados	Preditos	Resíduos	Resíduos (%)	Observados	Preditos	Resíduos	Resíduos (%)
1	61,544	68,582	-7,037	-10,26	97,169	105,962	-8,793	-8,30	3,537	3,797	-0,261	-6,86
2	124,023	127,439	-3,416	-2,68	154,549	162,075	-7,525	-4,64	5,331	5,718	-0,386	-6,76
3	192,933	189,517	3,416	1,80	239,851	232,326	7,525	3,24	8,652	8,265	0,386	4,67
4	183,455	176,418	7,037	3,99	235,698	226,906	8,793	3,88	8,383	8,122	0,261	3,21
5	85,939	86,448	-0,509	-0,59	126,953	125,536	1,417	1,13	4,345	4,386	-0,041	-0,94
6	123,421	127,551	-4,13	-3,24	173,78	173,63	0,15	0,09	5,996	5,912	0,085	1,43
7	188,625	184,495	4,13	2,24	235,4	235,549	-0,15	-0,06	8,077	8,162	-0,085	-1,04
8	189,659	189,15	0,509	0,27	236,73	238,147	-1,417	-0,60	8,454	8,413	0,041	0,49
9	37,824	30,277	7,547	24,92	66,777	59,401	7,376	12,42	2,362	2,060	0,302	14,64
10	155,777	158,684	-2,907	-1,83	194,806	203,749	-8,942	-4,39	6,646	6,992	-0,345	-4,94
11	156,457	153,55	2,907	1,89	204,359	195,417	8,942	4,58	7,039	6,694	0,345	5,16
12	187,511	195,057	-7,547	-3,87	234,888	242,263	-7,376	-3,04	8,334	8,635	-0,302	-3,49
13	171,096	174,231	-3,135	-1,80	213,829	222,988	-9,16	-4,11	7,260	7,667	-0,407	-5,30
14	179,182	174,231	4,951	2,84	224,033	222,988	1,045	0,47	7,711	7,667	0,044	0,57
15	176,796	174,231	2,565	1,47	226,398	222,988	3,41	1,53	7,873	7,667	0,206	2,69
16	174,426	174,231	0,195	0,11	229,84	222,988	6,852	3,07	7,942	7,667	0,276	3,60
17	169,655	174,231	-4,576	-2,63	220,842	222,988	-2,146	-0,96	7,547	7,667	-0,119	-1,56

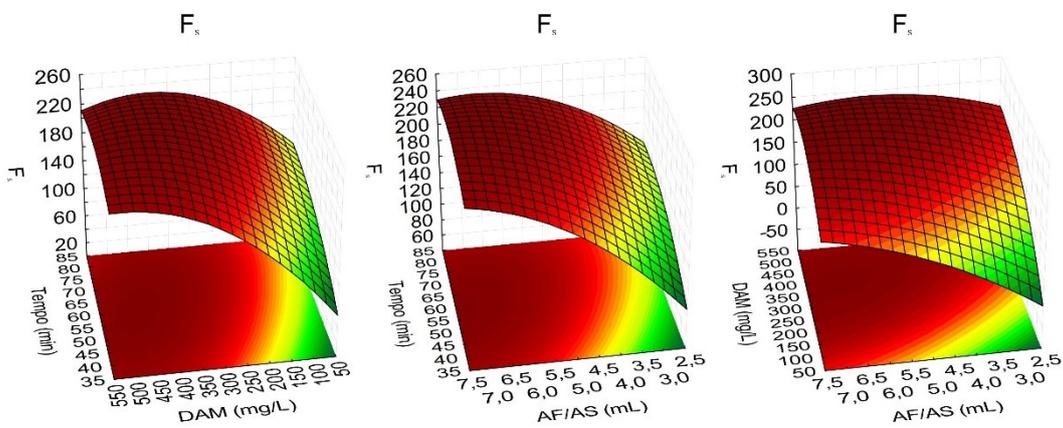
$I_B$ : Intensidade do canal Blue;  $F_S$ : Frequência da Saturação;  $F_{HSV}$ : Frequência do cálculo HSV.

**Figura 43.** Superfícies de resposta construídas a partir do modelo com o cálculo  $I_B$ .



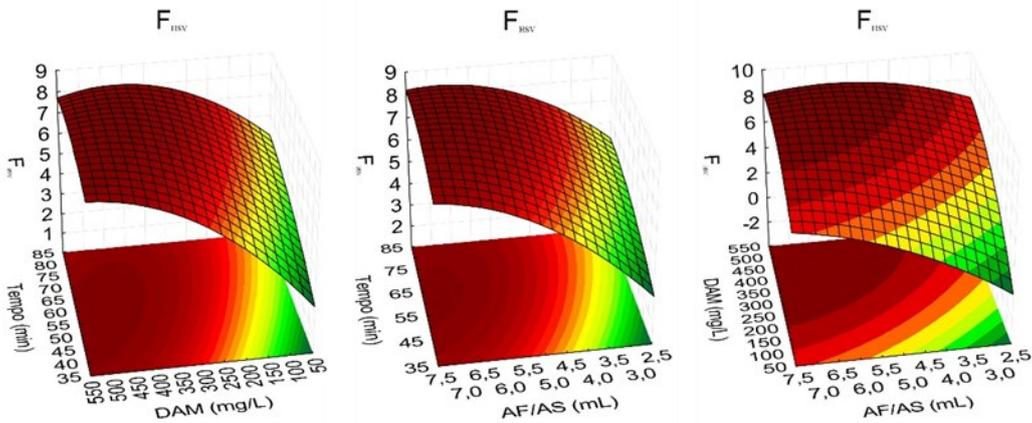
*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 44.** Superfície de resposta construída a partir do modelo com o cálculo  $F_S$ .



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 45.** Superfície de resposta construída a partir do modelo com o cálculo  $F_{HSV}$ .



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Tabela 27.** Tabela de valores críticos a partir dos modelos obtidos por  $I_B$ ,  $F_S$  e  $F_{HSV}$ .

Resposta	Variável	Mínimo	Valor crítico	Máximo
$I_B$	Tempo (min.)	40	52	80
	DAM (mg/L)	100,0	432,7	500,0
	AF/AS (mL)	3,0	6,7	7,0
$F_S$	Tempo (min.)	40	55	80
	DAM (mg/L)	100,0	395,3	500,0
	AF/AS (mL)	3,0	6,9	7,0
$F_{HSV}$	Tempo (min.)	40	54	80
	DAM (mg/L)	100,0	435,7	500,0
	AF/AS (mL)	3,0	6,8	7,0

$I_B$ : intensidade do canal Blue;  $F_S$ : Frequência da Saturação;  $F_{HSV}$ : Frequência do cálculo HSV; AF/AS: Mistura dos ácidos fosfórico e sulfúrico; DAM: Concentração de diacetilmonoxima; DFC: Concentração de difenilcarbazida.

Os valores indicados como máximo no cálculo dos pontos críticos foram considerados. Buscou-se diminuir um pouco os níveis a fim de reduzir o tempo, a quantidade de reagentes e facilitar o tratamento de dados sem afetar a sensibilidade obtida. Sendo assim, a consideração dos pontos ótimos foi definida nas zonas gráficas de máximo comum entre as superfícies de respostas obtidas através dos três cálculos e considerando os valores próximos à zona de máximo. Como as variáveis Tempo e Mistura dos ácidos foram as mais significativas no aumento do sinal analítico, as zonas de máximos foram consideradas, prioritariamente, utilizando as superfícies de respostas desses fatores. Os valores foram definidos como ótimos para a mistura ácida AF/AS em 6,00 mL, para o tempo de aquecimento em 50 minutos e a concentração de DAM de 400 mg/L, além do valor de DFC que foi estabelecido em 10 mg/L previamente. Todos os coeficientes dos modelos propostos pelos cálculos estudados foram significativos, exceto pelo coeficiente Tempo (Q) e Tempo (L)  $\times$  AF/AS (L) calculados a partir de  $F_{HSV}$ , como demonstra a Tabela 28.

**Tabela 28.** Termos do modelo quadrático com interação linear x linear e suas respectivas significâncias.

Termos	I <sub>B</sub>		F <sub>S</sub>		F <sub>HSV</sub>	
	Coefficiente	$\alpha=0,05$	Coefficiente	$\alpha=0,05$	Coefficiente	$\alpha=0,05$
Intercepto ( $\beta_0$ )	-506,320	0,000	-526,255	0,000	-16,431	0,001
Tempo (L)	6,244	0,001	6,684	0,003	0,186	0,014
Tempo (Q)	-0,027	0,005	-0,029	0,017	-0,001*	0,100*
DAM (L)	1,101	0,000	1,218	0,000	0,039	0,000
DAM (Q)	-0,001	0,000	-0,001	0,001	0,000	0,002
AF/AS (L)	91,688	0,000	102,637	0,000	3,484	0,001
AF/AS (Q)	-4,177	0,001	-4,548	0,004	-0,166	0,008
Tempo (L) × DAM (L)	-0,004	0,001	-0,004	0,007	0,000	0,020
Tempo (L) × AF/AS (L)	-0,228	0,010	-0,284	0,020	-0,008*	0,081*
DAM (L) × AF/AS (L)	-0,054	0,000	-0,061	0,001	-0,002	0,005

\*Não significativo; I<sub>B</sub>: intensidade do canal Blue; F<sub>S</sub>: Frequência da Saturação; F<sub>HSV</sub>: Frequência do cálculo HSV; AF/AS: Mistura dos ácidos fosfórico e sulfúrico; DAM: Concentração de diacetilmonoxima; DFC: Concentração de difenilcarbazida.

#### 4.5. Teste de robustez

Os valores definidos como ótimos para os parâmetros Volume de AF/AS (6,00 mL), Tempo (50 min), DAM (400 mg/L) e DFC (10 mg/L) foram estabelecidos como pontos centrais do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para o estudo da robustez do método e os níveis das variáveis foram definidos de acordo com a Tabela 29.

**Tabela 29.** Níveis aplicados no planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para o teste de robustez.

Variáveis	Níveis		
	(-1)	0 (PC)	(+1)
Volume de AF/AS (mL)	5,5	6,0	6,5
Tempo (min.)	45	50	55
Concentração de DAM (mg/L)	350	400	450
Concentração de DFC (mg/L)	5,0	10,0	15,0

AF/AS: Mistura dos ácidos fosfórico e sulfúrico; DAM: Concentração de Diacetilmonoxima; DFC: Concentração de Difenilcarbazida; PC: Ponto Central.

A matriz e as respostas dos experimentos em função da aplicação do planejamento fatorial completo realizado para o teste de robustez são demonstradas na Tabela 30.

**Tabela 30.** Matriz do planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, seus respectivos níveis e as respostas em função dos cálculos estudados.

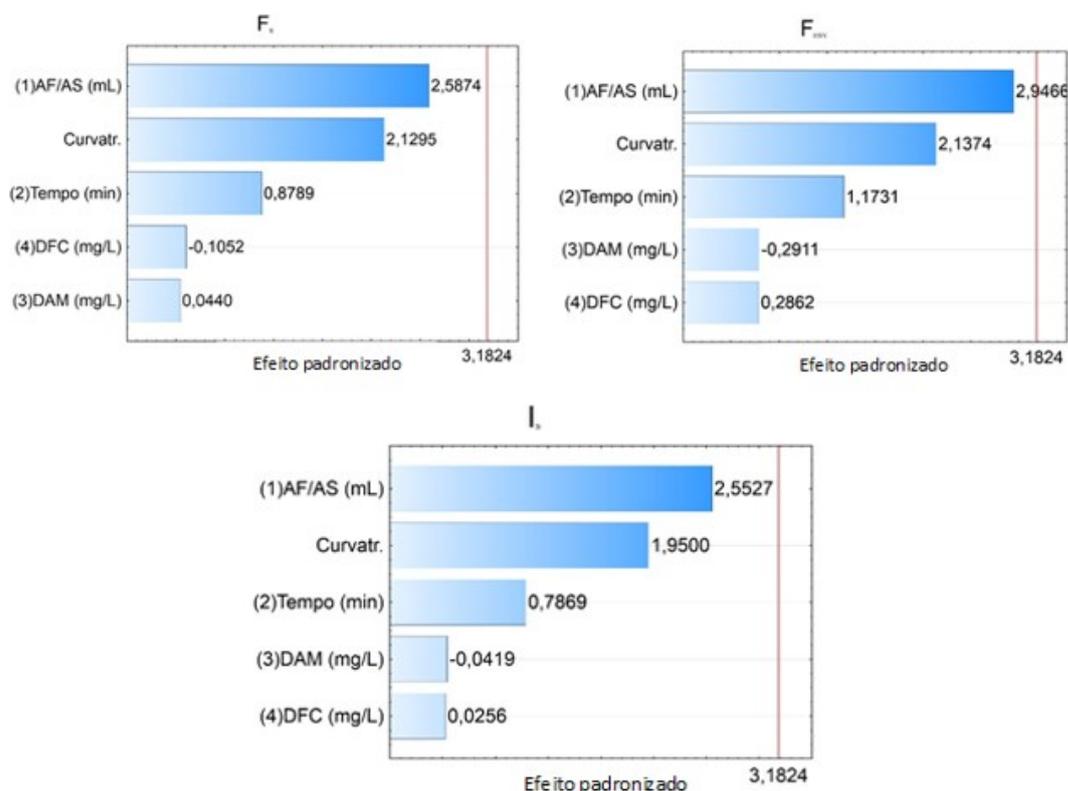
Exp. (OE)	Variáveis				Respostas		
	Volume AF/AS (mL)	Tempo (min)	Concentração (mg/L)		F <sub>S</sub>	F <sub>HSV</sub>	I <sub>B</sub>
			DAM	DFC			
1(19°)	6,50	55	450,00	15,00	200,481	7,177	207,194
2(15°)	6,50	55	450,00	5,00	199,688	7,162	206,597
3(18°)	6,50	55	350,00	15,00	202,438	7,308	209,084
4(13°)	6,50	55	350,00	5,00	198,277	7,101	205,459
5(2°)	6,50	45	450,00	15,00	199,265	7,102	206,287
6(1°)	6,50	45	450,00	5,00	200,230	7,116	206,466
7 (5°)	6,50	45	350,00	15,00	198,981	7,190	206,970
8 (7°)	6,50	45	350,00	5,00	201,705	7,181	207,629
9(16°)	5,50	55	450,00	15,00	194,857	6,964	202,203
10(20°)	5,50	55	450,00	5,00	194,125	6,936	201,795
11(17°)	5,50	55	350,00	15,00	189,601	6,850	198,824
12(14°)	5,50	55	350,00	5,00	194,335	6,942	201,885
13(3°)	5,50	45	450,00	15,00	185,349	6,609	195,613
14(8°)	5,50	45	450,00	5,00	186,483	6,633	196,259
15(4°)	5,50	45	350,00	15,00	187,126	6,791	197,103
16(6°)	5,50	45	350,00	5,00	186,612	6,631	196,535
17(11°)	6,00	50	400,00	10,00	209,213	7,506	214,334
18(9°)	6,00	50	400,00	10,00	197,577	6,987	204,182
19(10°)	6,00	50	400,00	10,00	197,843	7,158	204,527
20(12°)	6,00	50	400,00	10,00	213,247	7,481	216,390

I<sub>B</sub>: intensidade do canal Blue; F<sub>S</sub>: Frequência da Saturação; F<sub>HSV</sub>: Frequência do cálculo HSV; AF/AS: Mistura dos ácidos fosfórico e sulfúrico; DAM: Concentração de diacetilmonoxima; DFC: Concentração de difenilcarbazida; OE: Ordem dos experimentos.

O estudo dos efeitos observados nos gráficos de Pareto (Figura 46) demonstrou que os fatores Tempo e Volume de AF/AS ainda se apresentam com influência no sinal analítico maior que as outras variáveis, mas essa condição não foi

suficiente para conferir significância a esses fatores dentro do domínio experimental estudado, portanto o método é considerado robusto.

**Figura 46.** Gráficos de Pareto para os efeitos padronizados calculados por  $F_s$ ,  $F_{HSV}$  e  $I_B$ .



Fonte: Elaborada pelo autor

Esses modelos foram validados através do teste de falta de ajuste (ANOVA) que apresentou para os cálculos  $F_s$ ,  $F_{HSV}$  e  $I_B$  os valores de  $p$  igual a 0,845, 0,830 e 0,895, respectivamente, evidenciando modelos muito bem ajustados para um intervalo de confiança de 95% como mostra a Tabela 31.

**Tabela 31.** Estudo da falta de ajuste para os modelos obtidos pelos três cálculos ( $\alpha=0,05$ ).

Respostas	SQ	gl	MQ	F	p
$I_B$	193,55	12	16,12	0,39	0,895
$F_s$	365,32	12	30,44	0,48	0,845
$F_{HSV}$	0,39	12	0,32	0,50	0,830

$I_B$ : intensidade do canal Blue;  $F_s$ : Frequência da Saturação;  $F_{HSV}$ : Frequência do cálculo HSV; SQ: soma quadrática; gl: grau de liberdade; MQ: média quadrática; F: Distribuição F de Fisher-Snedecor; valor p: nível de probabilidade.

#### *4.6. Preparo da solução colorimétrica com valores otimizados*

Devido ao caráter levemente viscoso que é conferido à solução colorimétrica em função das quantidades de ácidos sulfúrico e fosfórico, foi preparada uma solução intermediária para garantir a sua homogeneidade e interação com o analito de igual forma. Desse modo, foi definido um volume fixo de 15 mL a ser transferido para um volume final de 25 mL da solução contendo o analito. Essa sequência é descrita a seguir e também está ilustrada na Figura 47. Em todos os passos que envolveram o uso do banho ultrassônico foi na intenção de aumentar a interação entre os reagentes.

Difenilcarbazida 334 mg/L (**Solução 1**) –16,7 mg de difenilcarbazida diluídos em 5 mL de acetona (P.A.) e avolumado com água ultrapura para 50 mL.

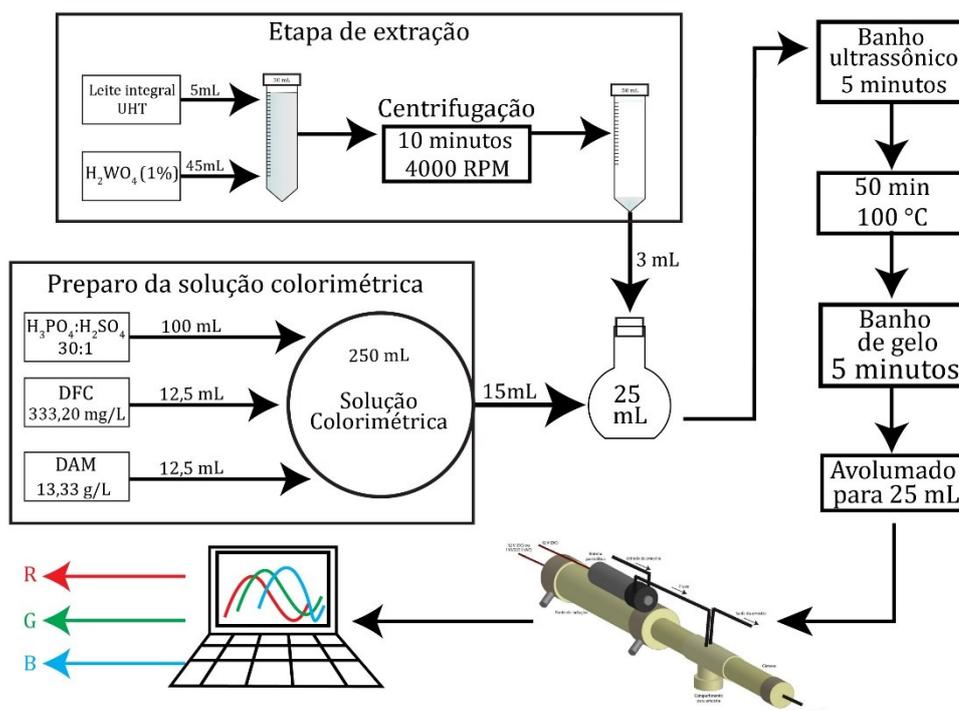
Diacetilmonoxima 13334 mg/L(**Solução 2**) –666,7 mg de diacetilmonoxima diluídos em 5 mL de acetona (P.A.) e avolumado com água ultrapura para 50 mL.

DAM/DFC (**Solução 3**) – Em um balão volumétrico de 25 mL foi adicionado 12,5 mL da solução 1 e 12,5 mL da solução 2.

Mistura ácida 30:1 (**Solução 4**) –96,7 mL de ácido fosfórico concentrado (85%) e 3,3 mL de ácido sulfúrico concentrado (99,8%).

**Solução colorimétrica** –50 mL de água ultrapura, em seguida adicionado 100 mL da solução 4 e resfriada em temperatura ambiente. Após 5 minutos, adicionados 25 mL da solução 3, completado com água para o volume final de 250 mL e colocado em banho ultrassom por 3 min. Essa solução foi preparada imediatamente antes do uso e contém 16,7 mg/L de difenilcarbazida e 666,7 mg/L de diacetilmonoxima.

**Figura 47.** Procedimento completo das etapas de tratamento de amostra e preparo de soluções.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

#### 4.7. Estudo do efeito de Matriz

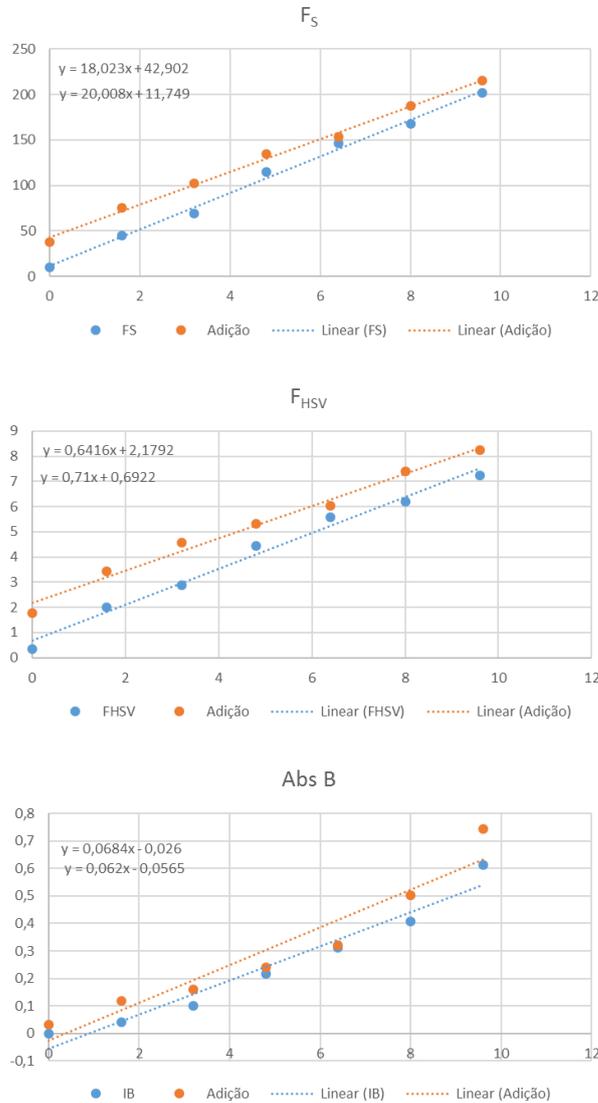
O estudo do efeito de matriz foi realizado a partir da comparação das curvas de calibração pela adição de analito em uma quantidade fixa de sobrenadante de 2,0mL. De acordo com a comparação das inclinações obtidas pelo estudo de regressão linear e considerando o erro calculado em um intervalo de confiança de 95%, não houve diferença significativa entre os ângulos das curvas de calibração. Pode-se afirmar que, estatisticamente, a matriz não interfere significativamente nos sinais analíticos obtidos a partir dos três cálculos como demonstra os resultados da Tabela 32 e da Figura 48. Gráficos de regressão linear para as curvas de calibração e suas respectivas adições de analito.

**Tabela 32.** Comparação das inclinações obtidas pela regressão linear para as três formas de cálculo.

		<b>Inclinação</b>	<b>DP (95%)</b>
Abs B	Adição	0,062	±0,015
	Curva	0,068	±0,024
F <sub>S</sub>	Adição	18,023	±1,284
	Curva	20,008	±1,746
F <sub>HSV</sub>	Adição	0,642	±0,089
	Curva	0,710	±0,095

Abs B: Absorvância do canal Blue; FS: Frequência da Saturação;  
FHSV: Frequência do cálculo HSV

**Figura 48.** Gráficos de regressão linear para as curvas de calibração e suas respectivas adições de analito.



Fonte: Elaborada pelo autor

A partir dos gráficos apresentados, observa-se uma sutil tendência de sobreposição das retas calculadas a partir de  $F_S$  e  $F_{HSV}$  com o aumento da concentração, mas esse fenômeno não deve ser considerado, uma vez que a faixa linear de trabalho da curva de calibração não apresenta intersecção dessas retas e as inclinações apresentaram igualdade estatística. Os resultados para  $Abs_{SB}$ , obtidos a partir de  $F_B$ , não apresentaram boa precisão em relação aos outros cálculos, entretanto, as retas obtidas a partir desses valores também não apresentaram diferença entre as suas inclinações.

#### *4.8. Teste de adição e recuperação*

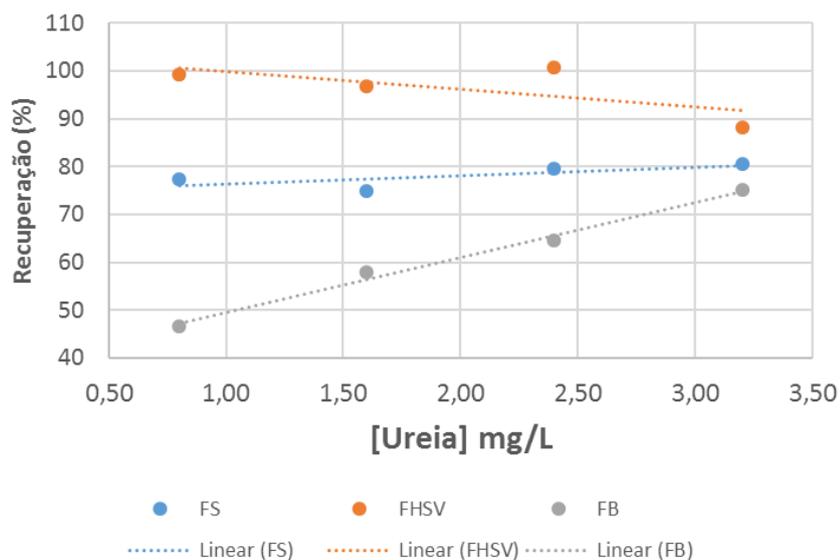
Como forma de validação do método proposto foi realizado o procedimento utilizando a adição de analito (ureia) e avaliação da recuperação. Os valores médios obtidos para  $F_S$ ,  $F_{HSV}$  e  $F_B$  foram, respectivamente, 78,14%, 96,26% e 61,01%, como mostra a Tabela 33. Foi observado que o cálculo de recuperação para  $F_S$  e  $F_{HSV}$  tende a ser proporcional com o aumento da concentração adicionada na faixa linear estudada e os percentuais obtidos tendem a ser constantes, enquanto a recuperação de  $F_B$  aumenta à medida que os valores adicionados são aumentados, de acordo com o gráfico da Figura 49. O valor de recuperação apresentado por  $F_B$  reflete a alta dispersão do erro evidenciado ao longo do estudo, a partir dos valores de recuperação obtidos é possível inferir que esse cálculo pode variar o valor da concentração predita de ureia em função do aumento ou diminuição das concentrações verdadeiras de ureia na amostra. Esse fenômeno pode levar a inexatidão de resultados se trabalhados em concentrações mais altas ou mais baixas de ureia na amostra.

**Tabela 33.** Valores de recuperação obtidos para os três cálculos com N=3.

	<b>Adicionado</b>	<b>0,00 mg/L</b>	<b>0,80 mg/L</b>	<b>1,60 mg/L</b>	<b>2,40 mg/L</b>	<b>3,20 mg/L</b>	<b>Recuperação média (%)</b>
F <sub>S</sub>	Resultado (mg/L)	2,19	2,81	3,39	4,10	4,77	---
	Teórico (mg/L)	---	2,99	3,79	4,59	5,39	---
	Recuperação (%)	---	77,45	74,87	79,60	80,62	78,14
F <sub>HSV</sub>	Resultado (mg/L)	2,13	2,93	3,68	4,55	4,96	---
	Teórico (mg/L)	---	2,93	3,73	4,53	5,33	---
	Recuperação (%)	---	99,30	96,84	100,73	88,15	96,26
F <sub>B</sub>	Resultado (mg/L)	2,33	2,70	3,26	3,88	4,73	---
	Teórico (mg/L)	---	3,13	3,93	4,73	5,53	---
	Recuperação (%)	---	46,55	58,02	64,47	75,02	61,01

FB: Frequência de do canal Blue; FS: Frequência da Saturação; FHSV: Frequência do cálculo HSV.

**Figura 49.** Gráfico da variação da concentração de ureia adicionada em função da taxa de recuperação.



Fonte: Elaborada pelo autor

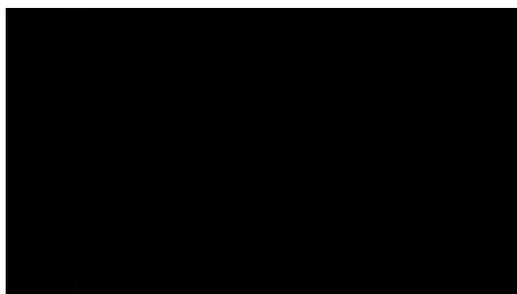
#### 4.9. Estabilidade da reação

O sistema foi avaliado quanto à interferência de luz externa a partir de fotografias da cubeta sem a radiação do sistema e sob iluminação ambiente. Os resultados são apresentados na Tabela 34 para os espaços de cores RGB e HSV e uma réplica da fotografia é apresentada na Figura 50.

**Tabela 34.** Dados extraídos da fotografia retirada com o sistema sem radiação.

	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>B</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>V</b>
Fotografia 1	0,009	0,002	0,004	0,004	0,010	0,000
Fotografia 2	0,010	0,003	0,004	0,005	0,012	0,000
Fotografia 3	0,011	0,002	0,004	0,006	0,013	0,000

**Figura 50.** Fotografia retirada do sistema com a radiação interna desligada.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

A estabilidade do produto colorimétrico formado, considerando a sua fotossensibilidade, foi avaliada a partir de uma amostra devidamente processada aplicando o método otimizado. A amostra foi aspirada para a cubeta de fluxo e exposta à radiação do próprio sistema durante 105 minutos, com fotografias realizadas em intervalos de 15 minutos. As respostas obtidas em cada momento de medição estão apresentadas na Tabela 35.

A partir dos resultados é possível inferir que não há uma tendência ao decréscimo do sinal analítico, sendo a variação existente atribuída ao erro instrumental do próprio sistema de aquisição de imagens. Para esse tempo, nessas condições de trabalho e com a iluminação artificial incidida, não foi possível identificar alteração nas características colorimétricas do produto decorrentes da degradação por iluminação, o que demonstra que há uma robustez do sistema em relação à fotodegradação.

**Tabela 35.** Estudo da degradação do produto colorimétrico em função do tempo.

<b>Tempo (min)</b>	<b>F<sub>S</sub></b>	<b>F<sub>HSV</sub></b>	<b>F<sub>B</sub></b>
0	57,098	2,292	0,058
15	57,099	2,269	0,050
30	57,247	2,273	0,050
45	57,429	2,296	0,059
60	57,243	2,273	0,050
75	57,427	2,299	0,059
90	57,053	2,266	0,050
105	57,198	2,278	0,050

F<sub>B</sub>: Frequência do canal Blue; F<sub>S</sub>: Frequência da Saturação; F<sub>HSV</sub>: Frequência do cálculo HSV.

#### 4.10. Regressão linear e figuras de mérito

A curva de calibração foi construída em uma faixa linear de 0,00 – 8,80 mg/L, considerando 6 réplicas para cada concentração e 12 réplicas para o branco analítico. As respostas obtidas para os três cálculos, bem como a faixa de concentração empregada estão expostas na Tabela 36. As imagens digitais obtidas estão expostas na Figura 51 e os gráficos plotados com esses resultados usando as três respostas estão apresentados na Figura 52. A partir dessas respostas o cálculo de regressão linear simples foi aplicado para obtenção da equação da reta e do seu coeficiente de correlação linear.

**Tabela 36.** Valores médios (n=6) para diferentes concentrações de ureia utilizadas na curva de calibração.

<b>[Ureia] mg/L</b>	<b>F<sub>S</sub></b>	<b>F<sub>HSV</sub></b>	<b>F<sub>B</sub></b>
0,00	10,032	0,358	0,000
0,80	30,836	1,282	0,021
1,60	43,494	2,011	0,023
2,40	54,114	2,307	0,070
3,20	82,812	3,238	0,110
4,00	92,613	3,569	0,141
4,80	113,273	4,355	0,161
5,60	123,749	4,554	0,218
6,40	149,949	5,397	0,262
7,20	163,900	5,879	0,289
8,00	185,833	6,652	0,318
8,80	193,850	6,880	0,369

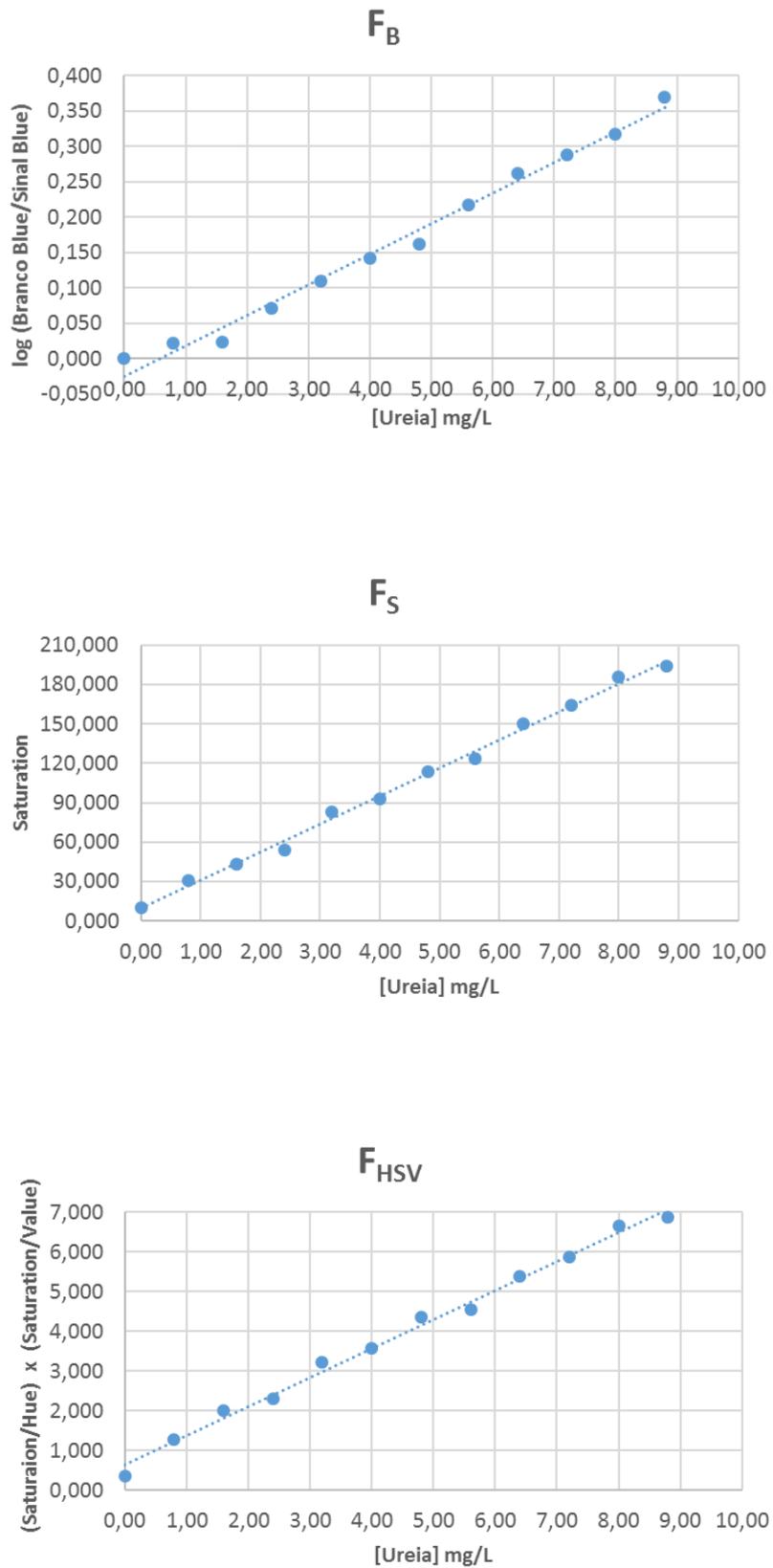
FB: Frequência do canal Blue; FS: Frequência da Saturação; FHSV: Frequência do cálculo HSV.

**Figura 51.** Fotografia das imagens obtidas para curva de calibração com diferentes concentrações de ureia.



*Fonte: Elaborada pelo autor*

**Figura 52.** Gráficos das regressões lineares simples para as três formas de cálculo.



Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados obtidos para as curvas de calibração foram satisfatórios para os três tipos de cálculo. As curvas analíticas obtidas a partir de  $F_S$  e  $F_{HSV}$  apresentaram comportamento em concordância com outras aplicações envolvendo esses cálculos durante todo o estudo. A curva de calibração obtida pelo cálculo  $F_B$  apresentou menor precisão. Essa tendência de  $F_B$ , como vista em outras partes do estudo, pode ser atribuída ao uso de um só canal (blue) no espaço RGB para representar o sistema estudado.

Os valores dos termos da regressão linear e seus respectivos erros, em um intervalo de confiança de 95%, estão apresentados na Tabela 37. Na mesma tabela estão apresentados os limites de detecção e quantificação, calculados de acordo com a planilha de validação para métodos analíticos univariados [93].

**Tabela 37.** Valores dos termos da regressão linear e dos limites de detecção e quantificação.

<b>Regressão linear e figuras de mérito</b>			
<b>Cálculo</b>	<b><math>F_S</math></b>	<b><math>F_{HSV}</math></b>	<b><math>F_B</math></b>
Coeficiente angular ( $a_1$ )	21,34± 0,99	0,731 ±0,043	0,0433 ±0,0034
Coeficiente Linear ( $a_0$ )	9,81± 5,13	0,655 ± 0,223	-0,0250 ± 0,0175
Coeficiente de determinação ( $R^2$ )	0,9957	0,9931	0,9880
Limite de detecção (LD) 95%	0,35	1,06	1,77
Limite de quantificação (LQ) 95%	0,52	1,57	2,64

$F_B$ : Frequência do canal Blue;  $F_S$ : Frequência da Saturação;  $F_{HSV}$ : Frequência do cálculo HSV.

Observou-se, pelos resultados apresentados na Tabela 37, que os cálculos realizados a partir de  $F_S$  apresentaram os melhores (mais baixos) limites de detecção e quantificação entre os três cálculos aplicados, com valores respectivos de 0,35 e 0,52 mg/L. Esse comportamento dos dados era esperado devido ao aumento da saturação ( $F_S$ ) acompanhar o aumento da concentração do analito. Entretanto, não se pode assegurar que essa tendência será sempre linear quando houver uma variação maior do brilho e do valor da Hue calibrado automaticamente pelo firmware do microscópio digital.

Apesar do cálculo realizado por  $F_{HSV}$  apresentar limites de detecção e quantificação de 1,06 e 1,57 mg/L, respectivamente, o triplo dos valores obtidos pelo  $F_S$ , esse aumento pode ser atribuído às variações dos valores de Hue e Value que são

aplicados automaticamente pelo software do microscópio digital e incluídos no cálculo de  $F_{HSV}$  para compensação dessas variações.

Os valores de LD e LQ para  $F_B$  foram, respectivamente, 1,77 e 2,64 mg/L. Esses valores são, aproximadamente, cinco vezes maiores do que os calculados com  $F_S$  e duas vezes maiores que  $F_{HSV}$ , refletindo a baixa precisão quando é aplicado esse tipo de cálculo.

As correlações calculadas foram de 0,996, 0,993 e 0,988, para  $F_S$ ,  $F_{HSV}$  e  $F_B$ , respectivamente. Apesar dos valores indicarem boa correlação, os erros calculados em um intervalo de confiança de 95% para os coeficientes lineares foram em torno de 50%, mas esse comportamento era esperado por conta da determinação indireta que envolve esse método.

Os valores obtidos para os Limites de detecção e quantificação calculados pelas três formulações propostas foram suficientes para serem aplicados no estudo de Ureia em Leite UHT em função dos valores encontrados na literatura.

#### *4.11. Precisão*

Para avaliar a precisão do método as amostras B e F foram medidas (N=9) e os resultados estão apresentados como desvio padrão relativo (DPR%) na Tabela 38. Para este estudo não foi considerado o fator de diluição com o objetivo de observar mais claramente a dispersão do erro na aplicação do método. Os cálculos com o emprego do  $F_S$  apresentaram melhores precisões com valores de 1,58 e 2,69%, talvez por não estarem sendo consideradas as variações de Hue e Intensity como implica o cálculo de  $F_{HSV}$  (3,26 e 5,77%) ou não serem representados apenas por um canal do espaço RGB, como acontece para  $F_B$  (1,96 e 4,18%).

É observada também, para todos os cálculos, uma tendência de aumento do DPR% com o aumento da concentração de ureia. Esse fenômeno, bem como a sua imprecisão, pode estar associado à composição do método que envolve extração molecular, determinação indireta por transformação de analito e detecção por fotografia, etapas que são mais suscetíveis aos erros sistemáticos e aleatórios.

**Tabela 38.** Desvio padrão relativo obtidos pelos três cálculos referentes às amostras B e F sem considerar o cálculo de diluição.

	Amostra B (mg/L)									DPR%
F <sub>S</sub>	2,32	2,35	2,35	2,40	2,41	2,33	2,41	2,35	2,32	1,58
F <sub>HSV</sub>	1,98	2,02	2,03	2,13	2,14	1,99	2,13	2,02	1,98	3,26
F <sub>B</sub>	2,87	2,93	2,93	3,01	3,01	2,88	3,00	2,94	2,87	1,96
	Amostra F(mg/L)									DPR%
F <sub>S</sub>	4,80	4,60	4,50	4,60	4,50	4,80	4,60	4,80	4,53	2,79
F <sub>HSV</sub>	5,42	4,95	4,77	4,94	4,77	5,42	4,94	5,42	4,76	5,77
F <sub>B</sub>	6,53	6,15	5,92	6,15	5,92	6,53	6,14	6,54	5,99	4,18

F<sub>B</sub>: Frequência do canal Blue; F<sub>S</sub>: Frequência da Saturação; F<sub>HSV</sub>: Frequência do cálculo HSV.

#### 4.12. Exatidão do método

Para avaliar a exatidão do método, uma análise interlaboratorial foi realizada utilizando a técnica de infravermelho médio com o equipamento MilkoScan™ 7 RM em conformidade com a norma ISO 9622/IDF 141:2013[94] e o método oficial AOAC 972.16, uma vez que o material de referência certificado para a ureia não foi encontrado [95]. Os resultados de quatro amostras submetidas ao método proposto e ao método usando infravermelho estão dispostos na Tabela 39, com os seus respectivos intervalos de confiança a 95%.

**Tabela 39.** Concentrações de ureia obtidas em amostras de leite UHT usando o método proposto e a Espectrometria no Infravermelho.

Amostra	Imagem digital (mg/L)			Infravermelho (mg/L)
	F <sub>S</sub>	F <sub>HSV</sub>	F <sub>B</sub>	
A	217,19 ± 7,59	201,46 ± 7,34	271,37 ± 14,19	219 ± 30,0
B	196,64 ± 2,40	170,51 ± 4,28	244,72 ± 3,69	198 ± 30,0
C	186,54 ± 2,08	161,37 ± 3,21	243,26 ± 0,85	170 ± 30,0
D	274,17 ± 7,00	248,86 ± 13,10	350,06 ± 0,42	245 ± 30,0

F<sub>B</sub>: Frequência do canal Blue; F<sub>S</sub>: Frequência da Saturação; F<sub>HSV</sub>: Frequência do cálculo HSV.

A partir dos dados obtidos pode-se considerar que os cálculos realizados pelos modelos F<sub>S</sub> e F<sub>HSV</sub> apresentaram igualdade estatística em relação aos valores considerados como verdadeiros, em um intervalo de confiança de 95%. As

concentrações obtidas a partir do cálculo de  $F_B$  não apresentaram essa igualdade e isso evidencia o comportamento irregular apresentado por essa aplicação ao longo do estudo.

Na Tabela 40 são apresentadas as diferenças percentuais entre os valores médios dos cálculos aplicados ( $F_S$  e  $F_{HSV}$ ) e os valores verdadeiros. A partir desses dados é possível observar que as concentrações obtidas a partir de  $F_S$  tendem a ser superiores, ao contrário do comportamento obtido por  $F_{HSV}$ . Essa flutuação dos dados era esperada como foi argumentado no estudo da precisão.

**Tabela 40.** Diferenças percentuais entre os valores médios das concentrações obtidas e os valores verdadeiros.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>Média</b>
$F_S$	-0,82	-0,69	9,73	11,91	5,03%
$F_{HSV}$	-8,01	-13,88	-5,08	1,58	-6,35%

As concentrações obtidas por  $F_S$  para as amostras C e D apresentaram-se sutilmente superiores aos valores médios verdadeiros, esse comportamento expressa uma tendência superlativa do modelo, visto que as amostras A e B se diferenciaram em menos de 1%. Em contrapartida, o cálculo realizado por  $F_{HSV}$  apresentou valor médio maior e negativo, com exceção da amostra D. Esse comportamento era esperado, uma vez que a maioria dos valores obtidos por esse cálculo tende a ser menos preciso e com valores de concentrações menores quando comparados ao  $F_S$ .

Considerando essas avaliações frente ao estudo da exatidão, somente os cálculos de  $F_S$  e  $F_{HSV}$  foram considerados para o estudo das amostras de Leite UHT.

#### *4.13. Aplicação do método*

Após otimização e validação, o método proposto foi aplicado em oito amostras de Leite UHT comercializadas na cidade de Salvador, Bahia. As concentrações obtidas para 3 réplicas, bem como seus respectivos intervalos de confiança em 95% estão demonstrados na Tabela 41.

**Tabela 41.** Concentrações de ureia nas amostras de leite UHT (n = 3).

Amostra	F <sub>S</sub>		F <sub>HSV</sub>	
	Média	IC (95%)	Média	IC (95%)
A	217,19	7,59	201,46	7,34
B (n=9)	196,64	2,40	170,51	4,28
C	186,54	2,08	161,37	3,21
D	274,17	7,00	248,86	13,10
E	363,82	10,69	395,60	21,28
F (n=9)	386,33	8,29	420,33	18,63
G	267,54	0,62	264,00	3,01
H	245,21	0,98	224,17	1,56
Média	267,18		260,79	

F<sub>S</sub>: Frequência da Saturação; F<sub>HSV</sub>: Frequência do cálculo HSV.

O valor médio da concentração de ureia entre as amostras obtido a partir dos cálculos F<sub>S</sub> e F<sub>HSV</sub> foram, respectivamente, 267,18 e 260,79 mg/L. Esses valores estão dentro das concentrações esperadas em leite de animais saudáveis, em diferentes fases de lactação e com alimentação balanceada de proteína, que tendem a apresentar níveis de ureia no leite na faixa de 172 a 341 mg/L (80 a 159 mg/L de nitrogênio ureico) [96]. Os resultados obtidos também são concordantes com os valores médios encontrados de 246,85±6,01 e 254,65±7,21 mg/L por S.M. Godden et al. em um estudo para análise de ureia em Leite UHT [97].

As amostras E e F apresentaram as maiores concentrações de Ureia e visualmente também foram amostras que apresentaram cor mais amarelada. A ação de bactérias no leite provenientes da deterioração por tempo de estocagem pode aumentar a concentração de ureia e essa hipótese não pode ser descartada, já que a produção de leite UHT é oriunda da mistura de leites de diferentes origens. Outra característica que pode ser associada também ao aumento da concentração é o metabolismo alterado das vacas que, a depender de condições como alimentação e diferentes fases de lactação, pode alterar a concentração de ureia. As outras amostras não apresentaram diferenças visuais entre si, mas a cor branca e os níveis normais de ureia não garantem qualidade ao produto, já que a adição de ureia bem como outros mascarantes também já foram reportados como adulterantes desse alimento.

## 5. CONCLUSÃO

O sistema para aquisição de imagem digital proposto para quantificação de ureia em leite UHT mostrou-se eficiente e apresentou resultados satisfatórios. Foi possível construí-lo utilizando materiais de baixo custo como tubos PVC, minibomba peristáltica e uma câmera tipo microscópio. A cubeta de fluxo foi o dispositivo menos acessível, por ser específica para fluxo e apresentar preço maior que o das cubetas convencionais, entretanto essa pode ser facilmente substituída por qualquer aparato transparente, já que o uso para essa aplicação não requer filtragem na região ultravioleta. A especificação dos tubos PVC utilizados para a estrutura não é rigorosa, podendo ser utilizados de qualquer marca, somente atendendo às exigências de dimensões e de cor clara. As mangueiras da minibomba constituídas de silicone apresentam limitação quanto à quantidade de solvente e concentrações dos ácidos aplicados. Por isso, essa foi substituída três vezes durante todo o trabalho desenvolvido. Para esse estudo, apesar da câmera digital tipo microscópio ter sido de baixa qualidade, situação observada nos resultados de otimização automática do brilho e da gama de cores, tal limitação não apresentou influência significativa no método. Nesse estudo a utilização dessa câmera foi satisfatória, mas em um método onde há exigência de se quantificar concentrações menores, uma câmera de alta qualidade com um detector mais sensível e seletivo pode se fazer necessária para distinguir sutis mudanças de coloração.

A otimização do método realizada através da aplicação de planejamentos experimentais foi importante para demonstrar e fundamentar fenômenos na reação química aplicada, uma vez que essa apresenta comportamento instável quanto a sua precisão e reconhecer variáveis significativas foram importantes para entender a natureza do processo. O uso da Matriz Doehlert mostrou-se eficiente e pôde estabelecer valores ótimos para a proporção dos ácidos envolvidos na reação.

Entre os tratamentos matemáticos aplicados, o  $F_S$  foi eficaz na predição das concentrações tanto quanto o modelo obtido por  $F_{HSV}$ . As concentrações de  $F_{HSV}$  foram, em média, 2,39% menores que as obtidas a partir do cálculo de  $F_S$ , talvez pela perda da representação real da saturação em razão das normalizações contidas na fórmula ou pela variação de Hue e Value não terem sido amplas o suficiente para se observar a eficiência da ferramenta proposta.

O modelo  $F_B$  apresentou resultados inconsistentes e esse comportamento pode ser atribuído a esse tipo de tratamento matemático ser representado apenas pela absorção de um canal (Blue) do espaço RGB. O comprimento de onda de 480 nm absorvido pelo produto colorimétrico se encontra na faixa entre o azul e o verde no espectro eletromagnético e essa indefinição pode sugerir a integração dos canais azul e verde para uma melhor representação do sistema.

O método foi satisfatório para quantificar ureia em leite UHT e os valores obtidos para as amostras estudadas foram congruentes com as concentrações de ureia e nitrogênio uréico registradas na literatura. Desta forma, o método proposto apresenta-se como uma alternativa eficiente aos testes rápidos e à técnica de infravermelho que, mesmo sendo as mais utilizadas, ainda apresentam maiores custos de aquisição e manutenção.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado para aplicações instrumentais voltadas para análise por imagem digital existe uma grande versatilidade quanto à construção de equipamentos para essa finalidade. Alguns são construídos utilizando materiais simples como papelões, outros com resinas moldadas por impressoras 3D e alguns não necessitam de câmaras com controle de iluminação. A fonte de detecção é variada e pode ser utilizada desde scanners até smartphones e essa versatilidade oferece equipamentos com várias finalidades.

Equipamentos para aquisição de imagens digitais constituídos de câmeras com detectores CCDs, estruturas para isolamento externo sob medida a partir de impressoras em 3D e iluminações limitadas por controladores de tensão elétrica tem o seu custo aumentado em relação aos construídos para a mesma finalidade, mas podem apresentar resultados melhores em termos de fidelidade das imagens capturadas e robustez. Entretanto, essas características têm sua necessidade dependente do objetivo da análise para o qual o equipamento é construído, sobretudo quando equipamentos de construções simples e mais baratas satisfazem métodos onde não é exigida detecção e quantificação de baixos teores do analito.

Os métodos propostos nos trabalhos apresentados nesta tese, bem como a sua instrumentação com base em imagem digital foram eficazes nos propósitos estabelecidos e puderam demonstrar a flexibilidade de construção de equipamentos para essa finalidade. Métodos eficazes utilizando materiais de baixo custo possibilitam ótimas aplicabilidades em diversos segmentos com diferentes finalidades. A evolução dos detectores das câmeras, bem como as diminuições dos seus custos provocadas pelo surgimento de novas tecnologias possibilitam melhorar ainda mais a qualidade dos resultados obtidos sem se tornarem onerosas. Adicionalmente, o uso de materiais em madeira ou tubos em PVC para construção de câmaras com luz controlada e fontes de radiação eletromagnéticas de baixo custo, como lâmpadas de LED bulbo, favorecem a obtenção de equipamentos de fácil construção. Estas características tornam mais eficiente a rotina do analista pois a facilidade de obtenção e reposição de partes bem como sua manutenção se torna uma grande vantagem em razão da não exigência de mão de obra especializada.

A aplicação do microscópio digital para análises dessa natureza não foi evidenciada de acordo com o levantamento feito para este estudo, o que pode

representar uma nova vertente nesta área, já que a possibilidade de fotografia em escalas reduzidas aliadas a uma resolução de qualidade pode revelar informações limitadas até então por câmeras convencionais. O uso das lâmpadas em diodos LED também oferece uma melhor alternativa a esses sistemas, uma vez que essas oferecem iluminação homogênea e podem ser dimensionadas para tensões elétricas menores, ao contrário de lâmpadas de filamento metálico ou com vapores, que necessitam de altas tensões e reatores para geração de altas correntes elétricas. Os tubos de PVC empregados também oferecem a acessibilidade de construção, já que esses materiais são de baixo custo e facilmente encontrados, além disso, essas construções não empregam, em quase toda estrutura, adesivos ou colas para aderência das partes do sistema, sendo esses unidos apenas por encaixes oferecidos pela própria estrutura dos tubos de PVC.

Utilizando equipamentos de baixo custo e construção simples, os trabalhos apresentados aqui apresentaram resultados satisfatórios e promissores. A sensibilidade analítica obtida por esses métodos foi satisfatória para a quantificação dos analitos estudados, uma vez que nesses trabalhos as concentrações de ferro para o vinho e ureia para o Leite não foram em teores de parte por bilhão. A aquisição das imagens foi essencial para a obtenção de uma boa precisão sugerindo que a imobilização da câmera, bem como o uso de fluxo podem melhorar a reprodução das réplicas. Além disso, a iluminação controlada para os compartimentos fotografados foi de fundamental importância para se obter registros precisos das cores, principalmente dos brancos analíticos. Em comparação com métodos alternativos e até oficiais, como foi no caso da ureia em Leite UHT, os resultados apresentaram igualdade estatística com médias bem próximas dos ditos como verdadeiros. Isso implica dizer que os métodos propostos puderam satisfazer, com um alto nível e exatidão, a necessidade do método tão quanto métodos convencionais já estabelecidos.

Para reações químicas que envolvam alteração colorimétrica em função de qualquer propriedade do sistema químico em que o estado físico das soluções analisadas seja limitado ao líquido, os métodos aqui apresentados e suas respectivas instrumentações podem ser empregados como forma alternativa e de baixo custo a essas finalidades. Dessa forma, sucos, bebidas lácteas, bebidas alcoólicas entre outras apresentam características favoráveis, desde que preparadas corretamente, para aplicação nesses instrumentos. Cada sistema estudado a partir de imagens digitais

pode ser explorado com a variação de diversos parâmetros físicos como iluminação, tipo de câmera para captura e câmara de isolamento da luz externa e parâmetros lógicos que envolvem a interação dos canais dos espaços de cores RGB, HSV, entre outros. É notório que a ampla possibilidade de aplicações, bem como as suas variações podem ser exploradas a partir das análises por imagens digitais e essas perspectivas tornam a vertente promissora em várias áreas, principalmente nas áreas da ciência, didática e controle de qualidade em indústrias.

## REFERÊNCIAS

- [1] S. Finger, *Origins of Neuroscience: A History of Explorations Into Brain Function*, Oxford University Press 2001.
- [2] W. Kapit, *et al.*, *The Anatomy Coloring Book*, Pearson Education 2014.
- [3] Thomas Young, II. The Bakerian Lecture. On the theory of light and colours, 92 (1802) 12-48.
- [4] E. Azevedo, *et al.*, *Computação gráfica: Teoria e prática: geração de imagens*, Elsevier Editora Ltda. 2018.
- [5] Angelika University of Applied Sciences Offenburg Erhardt-Ferron, *Theory and applications of digital image processing*, 1 (2000) 3.
- [6] Luis Fermín Capitán-Vallvey, *et al.*, *Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review*, *Analytica Chimica Acta*, 899 (2015) 23-56.
- [7] W Liu, *et al.*, *Digital image analysis method for rapid measurement of rice degree of milling*, 75 (1998) 380-385.
- [8] Thomas SY Choong, *et al.*, *Digital image processing of palm oil fruits*, 2 (2006).
- [9] Edvaldo da Nobrega Gaiao, *et al.*, *Digital image-based titrations*, 570 (2006) 283-290.
- [10] Antonio Busciglio, *et al.*, *Analysis of the bubbling behaviour of 2D gas solid fluidized beds: Part I. Digital image analysis technique*, 140 (2008) 398-413.
- [11] Wellington Silva Lyra, *et al.*, *Digital image-based flame emission spectrometry*, 77 (2009) 1584-1589.
- [12] Douglas J Soldat, *et al.*, *Microscale colorimetric analysis using a desktop scanner and automated digital image analysis*, 86 (2009) 617.
- [13] L Lahuerta Zamora, *et al.*, *Quantitative colorimetric-imaging analysis of nickel in iron meteorites*, 83 (2011) 1575-1579.
- [14] Aree Choodum, *et al.*, *Rapid quantitative colourimetric tests for trinitrotoluene (TNT) in soil*, 222 (2012) 340-345.

- [15] Byoung-Yong Chang, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Smartphone-based chemistry instrumentation: digitization of colorimetric measurements, 33 (2012) 549-552.
- [16] Stéfani Iury E Andrade, *et al.*, A digital image-based flow-batch analyzer for determining Al (III) and Cr (VI) in water, 109 (2013) 106-111.
- [17] Marcelo B. Lima, *et al.*, A digital image-based micro-flow-batch analyzer, *Microchemical Journal*, 106 (2013) 238-243.
- [18] Angel Lopez-Molinero, *et al.*, Feasibility of digital image colorimetry—application for water calcium hardness determination, 103 (2013) 236-244.
- [19] Seoho Lee, *et al.*, A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels, 14 (2014) 1437-1442.
- [20] M Lutfi Firdaus, *et al.*, Determination of chromium and iron using digital image-based colorimetry, 20 (2014) 298-304.
- [21] Seoyeon Choi, *et al.*, Real-time measurement of human salivary cortisol for the assessment of psychological stress using a smartphone, 2 (2014) 8-11.
- [22] Karun Thongprajukaew, *et al.*, Smart phone: A popular device supports amylase activity assay in fisheries research, 163 (2014) 87-91.
- [23] Nuria Lopez-Ruiz, *et al.*, Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices, 86 (2014) 9554-9562.
- [24] Yuanyuan Wu, *et al.*, Clinical chemistry measurements with commercially available test slides on a smartphone platform: Colorimetric determination of glucose and urea, 448 (2015) 133-138.
- [25] Aree Choodum, *et al.*, On-site semi-quantitative analysis for ammonium nitrate detection using digital image colourimetry, 55 (2015) 437-445.
- [26] Youngkee Jung, *et al.*, Smartphone-based colorimetric analysis for detection of saliva alcohol concentration, 54 (2015) 9183-9189.
- [27] Yun Wang, *et al.*, A smartphone-based colorimetric reader coupled with a remote server for rapid on-site catechols analysis, 160 (2016) 194-204.

- [28] Aree Choodum, *et al.*, Poly vinyl alcohol cryogel as a selective test kit for pre and post blast trinitrotoluene, 222 (2016) 654-662.
- [29] Yi Wang, *et al.*, Smartphone spectrometer for colorimetric biosensing, 141 (2016) 3233-3238.
- [30] Yuan Chen, *et al.*, A smartphone colorimetric reader integrated with an ambient light sensor and a 3D printed attachment for on-site detection of zearalenone, 409 (2017) 6567-6574.
- [31] Bo Peng, *et al.*, Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with digital image colorimetric analysis for detection of total iron in water and food samples, 230 (2017) 667-672.
- [32] Uddin M Jalal, *et al.*, Paper-plastic hybrid microfluidic device for smartphone-based colorimetric analysis of urine, 89 (2017) 13160-13166.
- [33] Manchuta Dangkulwanich, *et al.*, Colorimetric Measurements of Amylase Activity: Improved Accuracy and Efficiency with a Smartphone, 95 (2018) 141-145.
- [34] Gang Chen, *et al.*, Improved analytical performance of smartphone-based colorimetric analysis by using a power-free imaging box, 281 (2019) 253-261.
- [35] Kaewta Danchana, *et al.*, Spectrophotometric system based on a device created by 3D printing for the accommodation of a webcam chamber as a detection system, 206 (2020) 120250.
- [36] Jeferson Alves Barreto, *et al.*, Pressure variation in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction associated with digital image colorimetry: Determination of cobalt in food samples, *Microchemical Journal*, 157 (2020) 105064.
- [37] Valfredo Azevedo Lemos, *et al.*, A new simple and fast method for determination of cobalt in vitamin B12 and water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and digital image analysis, 231 (2020) 1-8.
- [38] Luana Bastos Santos, *et al.*, Solid-Phase Extraction and Detection by Digital Image Directly in the Sorbent: Determination of Nickel in Environmental Samples, 231 (2020) 1-9.
- [39] Wayne S Rasband, *ImageJ*, Bethesda, MD, 1997.

- [40] Etsuko Hirayama, *et al.*, Visual and colorimetric lithium ion sensing based on digital color analysis, 72 (2000) 465-474.
- [41] Krystyna Pyrzynska, Chemical speciation and fractionation of metals in wine, 19 (2007) 1-8.
- [42] John C. Danilewicz, Fe(II):Fe(III) Ratio and Redox Status of White Wines, American Journal of Enology and Viticulture, 67 (2016) 146.
- [43] John C. Danilewicz, [Fe(III)]:[Fe(II)] Ratio and Redox Status of Red Wines: Relation to So-Called "Reduction Potential", American Journal of Enology and Viticulture, 69 (2018) 141.
- [44] Michaela Rousseva, *et al.*, Impact of wine production on the fractionation of copper and iron in Chardonnay wine: Implications for oxygen consumption, 203 (2016) 440-447.
- [45] Rui Cerdeira de Campos Costa, *et al.*, Determination of Fe (III) and total Fe in wines by sequential injection analysis and flame atomic absorption spectrometry, 438 (2001) 227-233.
- [46] Sergio LC Ferreira, *et al.*, Development of method for the speciation of inorganic iron in wine samples, 602 (2007) 89-93.
- [47] José A López-López, *et al.*, Simplification of iron speciation in wine samples: A spectrophotometric approach, 63 (2015) 4545-4550.
- [48] Fernando Cámara-Martos, *et al.*, Disposable biosensor for detection of iron (III) in wines, Talanta, 154 (2016) 80-84.
- [49] Mariya Mitreva, *et al.*, Iron(II) ion imprinted polymer for Fe(II)/Fe(III) speciation in wine, Microchemical Journal, 132 (2017) 238-244.
- [50] Mireia Lao, *et al.*, Speciation of Zn, Fe, Ca and Mg in wine with the Donnan Membrane Technique, Food Chemistry, 239 (2018) 1143-1150.
- [51] Mairer Vidal, *et al.*, Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis, Talanta, 184 (2018) 58-64.
- [52] Juliano Passaretti Filho, *et al.*, Development of a simple method for determination of NO<sub>2</sub> in air using digital scanner images, Talanta, 140 (2015) 73-80.

- [53] Samara Soares, *et al.*, A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone, *Microchemical Journal*, 133 (2017) 195-199.
- [54] Hebertty V. Dantas, *et al.*, An inexpensive NIR LED Webcam photometer for detection of adulterations in hydrated ethyl alcohol fuel, *Microchemical Journal*, 135 (2017) 148-152.
- [55] M. Lutfi Firdaus, *et al.*, Determination of Chromium and Iron Using Digital Image-based Colorimetry, *Procedia Environmental Sciences*, 20 (2014) 298-304.
- [56] D. Igoe, *et al.*, Characterization of the corrosion of iron using a smartphone camera, *Instrumentation Science & Technology*, 44 (2016) 139-147.
- [57] Juan A. V. A. Barros, *et al.*, Digital Image Analysis for the Colorimetric Determination of Aluminum, Total Iron, Nitrite and Soluble Phosphorus in Waters, *Analytical Letters*, 50 (2017) 414-430.
- [58] Prinya Masawat, *et al.*, Green Determination of Total Iron in Water by Digital Image Colorimetry, *Analytical Letters*, 50 (2017) 173-185.
- [59] Juliano Passaretti Filho, *et al.*, Determination of Fe (III) using digital images: study of corrosion in steel plates using a polyester laser printed device, 9 (2017) 655-663.
- [60] Sergio L. C. Ferreira, *et al.*, Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview, *Microchemical Journal*, 140 (2018) 176-182.
- [61] Sergio L. C. Ferreira, *et al.*, Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs, *Microchemical Journal*, 131 (2017) 163-169.
- [62] Felipe Obed Correia, *et al.*, Optimization of microwave digestion and inductively coupled plasma-based methods to characterize cassava, corn and wheat flours using chemometrics, *Microchemical Journal*, 135 (2017) 190-198.
- [63] Sergio LC Ferreira, *et al.*, Multivariate optimization techniques in food analysis—A review, 273 (2019) 3-8.
- [64] Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, Norma Técnica SABESP NTS 010, Método de ensaio, SABESP, São Paulo, 2001, pp. 10.

- [65] Alicia Maroto, *et al.*, Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process, 391 (1999) 173-185.
- [66] A.A. Schilt, *et al.*, Analytical Applications of 1,10-Phenanthroline and Related Compounds: International Series of Monographs in Analytical Chemistry, Elsevier Science 2013.
- [67] Piyawan Phansi, *et al.*, Multisyringe flow injection analysis (MSFIA) for the automatic determination of total iron in wines, 277 (2019) 261-266.
- [68] Cristina Andreu, *et al.*, Automated Spectrophotometric Multi-Pumping Flow System for the Determination of Total Iron in Wine, DOI (2020) 1-9.
- [69] Thi H. Nguyen, *et al.*, A Production-Accessible Method: Spectrophotometric Iron Speciation in Wine Using Ferrozine and Ethylenediaminetetraacetic Acid, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67 (2019) 680-687.
- [70] Vanesa Carrascón, *et al.*, The kinetics of oxygen and SO<sub>2</sub> consumption by red wines. What do they tell about oxidation mechanisms and about changes in wine composition, Food Chemistry, 241 (2018) 206-214.
- [71] Sérgio L. C. Ferreira, *et al.*, Direct determination of iron and manganese in wine using the reference element technique and fast sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry, Talanta, 74 (2008) 699-702.
- [72] Piyawan Phansi, *et al.*, Multisyringe flow injection analysis (MSFIA) for the automatic determination of total iron in wines, Food Chemistry, 277 (2019) 261-266.
- [73] Paulo Carmo Martins, *et al.*, Anuário Leite 2019, Embrapa, Brasil, SP, 2019, pp. 104.
- [74] Paul S Francis, *et al.*, Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends, 21 (2002) 389-400.
- [75] Maria Rociene Abrantes, *et al.*, Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor, 73 (2014) 244-251.
- [76] Kirti Sharma, *et al.*, The melamine adulteration scandal, 2 (2010) 97-107.
- [77] Fernanda Cristina Firmino, *et al.*, Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de Rio Pomba, Minas Gerais, 65 (2010) 5-11.

- [78] U. B. Trivedi, *et al.*, Potentiometric biosensor for urea determination in milk, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140 (2009) 260-266.
- [79] Boris Lakard, *et al.*, Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films, *Biosensors and Bioelectronics*, 19 (2004) 1641-1647.
- [80] Taher Alizadeh, *et al.*, Trace level and highly selective determination of urea in various real samples based upon voltammetric analysis of diacetylmonoxime-urea reaction product on the carbon nanotube/carbon paste electrode, *Analytica Chimica Acta*, 974 (2017) 54-62.
- [81] G. W. Watt, *et al.*, Spectrophotometric Method for Determination of Urea, *Analytical Chemistry*, 26 (1954) 452-453.
- [82] L. A. Douglas, *et al.*, Colorimetric Determination of Microgram Quantities of Urea, *Analytical Letters*, 3 (1970) 79-87.
- [83] W. R. Fearon, The carbamido diacetyl reaction: a test for citrulline, *The Biochemical journal*, 33 (1939) 902-907.
- [84] N. M. Price, *et al.*, Comparison of methods for the analysis of dissolved urea in seawater, *Marine Biology*, 94 (1987) 307-317.
- [85] R. N. Beale, *et al.*, A sensitive method for the colorimetric determination of urea, *Journal of Clinical Pathology*, 14 (1961) 418.
- [86] Tsutomu Momose, *et al.*, Determination of Urea in Blood and Urine with Diacetyl Monoxime-Glucuronolactone Reagent, *Clinical Chemistry*, 11 (1965) 113.
- [87] J. J. Coulombe, *et al.*, A New Simple Semimicro Method for Colorimetric Determination of Urea, *Clinical Chemistry*, 9 (1963) 102.
- [88] Adriano de Araújo Gomes, *Integrated platform for multivariate data handling*, Araraquara, São Paulo State, Brazil, 2017.
- [89] Elena BAR, *et al.*, New Spectrophotometric Method of Urea Determination from Milk. Comparative Study between Different Methods Used to Evaluate the Content of Urea from Milk and Milk Products, 2011, 68 (2011).

- [90] S. Cozzi, A new application of the diacetyl monoxime method to the automated determination of dissolved urea in seawater, *Marine Biology*, 145 (2004) 843-848.
- [91] R. Lugosi, *et al.*, A study of the reaction of urea with diacetyl monoxime and diacetyl, *Clinical Biochemistry*, 5 (1972) 171-181.
- [92] Icaro S. A. Porto, *et al.*, Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry, *Microchemical Journal*, 149 (2019) 104031.
- [93] Fabiana Alves de Lima Ribeiro, *et al.*, Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados *Química Nova*, 31 (2008) 164-171.
- [94] International Dairy Federation, Milk and liquid milk products - Guidelines for the application of midinfrared spectrometry, ISO - International Organization for Standardization, Switzerland, 2013.
- [95] AOAC Int Manual, Official method 972.16; fat, lactose, protein and solids in milk, mid-infrared spectroscopic method, 33 (2005) 31.
- [96] P. J. Rajala-Schultz, *et al.*, Association Between Milk Urea Nitrogen and Fertility in Ohio Dairy Cows, *Journal of Dairy Science*, 84 (2001) 482-489.
- [97] Sandra M Godden, *et al.*, Analytic validation of an infrared milk urea assay and effects of sample acquisition factors on milk urea results, 83 (2000) 435-442.



## Speciation analysis based on digital image colorimetry: Iron (II/III) in white wine



Joao H. Santos Neto<sup>a,b</sup>, Icaro S.A. Porto<sup>a,b</sup>, Mateus P. Schneider<sup>c</sup>, Ana M.P. dos Santos<sup>a,b</sup>, Adriano A. Gomes<sup>c,\*</sup>, Sergio L.C. Ferreira<sup>a,b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria, Campus Ondina, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, INCT, de Energia e Ambiente, Universidade Federal da Bahia, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, 90650-001 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords**  
Iron speciation  
Wine samples  
Digital image  
1,2 Ortho-phenanthroline

### ABSTRACT

This work proposes an analytical strategy utilizing digital images (DI) for the iron inorganic speciation in white wine. The method was established by the reaction of iron(II) ions with 1,2 ortho-phenanthroline as a chromogenic reagent. Total iron was determined using the same reagent after the addition of hydroxyl ammonium chloride as a reducing agent. In both cases, digital images of the standards/chromogenic reagent and samples were acquired and stored in JPEG format. The region of interest (ROI) was determined with a constant square shape for all images. The ROI was submitted to decomposition in color values according to the RGB additive color model. However, the data obtained by the blue channel was the one used in the construction of the analytical curves because it presented the highest sensitivity. The optimization of the experimental conditions of the procedure was performed by employing multivariate techniques. The precision was evaluated using a wine sample with iron (II) and total iron contents of 0.41 and 0.69 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The results expressed as relative standard deviations were 3.57% for iron (II) and 4.76% for total iron contents. A comparison between the results obtained for total iron by the DI method with the results found using flame atomic absorption spectrometry confirmed the method accuracy. The DI procedure was applied for speciation analysis in six white wine samples and the contents found varied from 0.41 to 1.67 mg L<sup>-1</sup> for iron (II) and from 0.69 to 1.71 mg L<sup>-1</sup> for total iron. These results are in agreement with those found for speciation analysis of iron in wine samples. Iron (III) contents can be found by the difference between the total iron and iron (II) contents.

### 1. Introduction

The iron inorganic speciation in wine is an important analysis because the iron (III) compounds in this matrix are insoluble and undesirable. Therefore, the iron (III) content is a parameter of technological control in the wineries, which can guarantee the quality and the price of the wine after bottling [1–3]. In this sense, several methods have been proposed for the iron speciation analysis in wine [4–10]. Rousseva et al. [4] used a solid phase extraction procedure to evaluate the presence of the hydrophobic, cationic and residual forms of copper and iron in wine samples. Costa and Araujo [5] proposed a method for the determination of iron(III) and total iron in wine matrices. For iron(III), the procedure was based on the liquid extraction of the iron(III) thiocyanate complex and quantification, employing

sequential injection analysis and molecular absorption spectrophotometry (MAS). Total iron was determined using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Another method also used MAS for the determination of iron(II) and total iron in wine. In this method, iron(II) was determined using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diethylamino)-phenol (Br-PADAP). Total iron was quantified utilizing the same reagent after a reduction step using ascorbic acid [6]. Lopez et al. [7] proposed a procedure using 2,2'-dipyridylketone picolonylhydrazone (DPKPH) in the absence and presence of ascorbic acid for the quantification of iron (II) and total iron in wine by MAS. Camara et al. [8] proposed a disposable biosensor for the detection of iron (III) in wines. Mitreva et al. [9] developed an ion-imprinted polymer for quantification of iron(II) in wine samples. Recently, Lao et al. [10] employed the Donnan membrane technique for the

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author at: Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria, Campus Ondina, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil.

E-mail addresses: [araujo.gomes@ufbrs.br](mailto:araujo.gomes@ufbrs.br) (A.A. Gomes), [slcf@ufba.br](mailto:slcf@ufba.br) (S.L.C. Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.102>

Received 13 August 2018; Received in revised form 25 September 2018; Accepted 27 September 2018

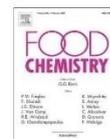
Available online 28 September 2018

0039-9140/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Multivariate optimization techniques in food analysis – A review

Sergio L.C. Ferreira<sup>a,b,c</sup>, Mario M. Silva Junior<sup>a,b</sup>, Caio S.A. Felix<sup>a,b</sup>, Daniel L.F. da Silva<sup>a,b</sup>, Adilson S. Santos<sup>a,b</sup>, João H. Santos Neto<sup>a,b</sup>, Cheilane T. de Souza<sup>a,b</sup>, Raineldes A. Cruz Junior<sup>a,b</sup>, Anderson S. Souza<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria, Campus Ondina, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, INCT, de Energia e Ambiente, Universidade Federal da Bahia, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords

Food  
Doehlert matrix  
Central composite design  
Box Behnken design  
Robustness  
Experimental design  
Factorial design

### ABSTRACT

This work presents a critical review of multivariate techniques employed for optimization of methods developed in food analysis. A comparison between the response surface methodologies has been performed, evidencing advantages and drawbacks of these. Applications of the main chemometric tools (central composite and Box Behnken designs and Doehlert matrix) often utilized for optimization of sample preparation procedures and also instrumental conditions of analytical techniques for determination of organic and inorganic species in food samples are shown. Also, a brief discussion on the use of multiple responses and robustness test in food analysis has been presented.

### 1. Introduction

Currently, multivariate optimization techniques have often been used in analytical chemistry, and they have been subjects for the publication of several review papers (Bezerra et al., 2016; Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar, & Escalera, 2008; Candiotti, De Zan, Camara, & Goicoechea, 2014; Novacs et al., 2016). In food analysis, these tools can be employed for evaluation preliminary of the factors (factor screening) and also for determination of the critical conditions of these. So, the optimization techniques can be divided into two kinds of designs.

#### 1.1. Tools for evaluation preliminary of the factors

The main technique employed for factor screening is the two-level full factorial design, whose number of experiments established by the matrix is determined by the expression ( $2^k$ ), being ( $k$ ) the number of factors investigated. It allows the determination of the effects and the significances of the factors and their interactions of the processes. However, when the number of factors is large, the use of two-level full factorial design becomes unacceptable. So, in this case, the fractional factorial designs ( $2^{k-x}$ ) may be the most recommended, where ( $x$ ) is the reduction of the number of experiments. These designs have the disadvantage that the effects of the main factors are confounded with the effects of interactions of other factors. A strategy to improve interpretation and decrease the risk of error is to establish designs whose the main effects are confounded with effects of high-order factor

interactions. This approach is defined by the design resolution that is represented by Roman numerals. Thus, for a fractional factorial of resolution III, the main effects are not confounded with other main effects, but they are confounded with two-factor interactions. In a fractional factorial of resolution IV the main effects are confounded with three-factor interactions, and also two-factor interactions are confounded with other two-factor interactions (Friedrich, Martins, Prestes, & Zanella, 2016; Massart et al., 2003).

#### 1.2. Response surface methodologies (RSM)

The response surface methodologies (RSM) establish quadratic models, they allowing the obtaining of the critical conditions of the factors (maximum or minimum). The RSM's more employed by analytical chemistry are central composite design (CCD), Doehlert matrix (DM), three-level factorial ( $3^k$ ) and Box Behnken designs (BBD). All these tools have their advantages and drawbacks. During the optimization of experimental factors using RSM, the validation study of the quadratic model is obligatory because in this case, the critical conditions of the method are being determined in this step. So, the analysis of variance (ANOVA) has been one of the best options for this evaluation. Also, the model obtained should not have lack of fit to ensure the efficiency of the optimization. By another hand, for the linear models, this requirement is lower because the two-level factorial designs full or fractional are employed for preliminary evaluation of the factors (Ferreira, 2015; Massart et al., 2003).

\* Corresponding author at: Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria, Campus Ondina, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil.  
E-mail address: [slef@ufba.br](mailto:slef@ufba.br) (S.L.C. Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.114>

Received 1 September 2017; Received in revised form 27 October 2017; Accepted 30 November 2017  
0308-8146/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.



## Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry



Icaro S.A. Porto<sup>a,b</sup>, Joao H. Santos Neto<sup>a,b</sup>, Liz O. dos Santos<sup>c</sup>, Adriano A. Gomes<sup>d</sup>, Sergio L.C. Ferreira<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria, Campus Ondina, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>b</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, INCT, de Energia e Ambiente, Universidade Federal da Bahia, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>c</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciência e Tecnologia em Energia e Sustentabilidade, 44085-132 Feira de Santana, Bahia, Brazil

<sup>d</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, 90650-001 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords

Ascorbic acid  
Fruit samples  
Digital images  
RGB model  
Factorial design

### ABSTRACT

This work proposes a procedure using digital image colorimetry for the determination of ascorbic acid in natural fruit juices. The method was established by measuring the color of the iron(II)-1,2 ortho-phenanthroline complex. The digital images obtained during the experiments were stored in JPEG format, and the region of interest (ROI) was submitted to decomposition in color values according to the RGB additive color model. However, the analytical procedure recommended the employment of the blue channel because it presented higher sensitivity than the red and green channels.

The optimization of the parameters of the colorimetric reaction was performed employing a full two-level factorial design. The influence of the distance from the webcam to the cuvette on the sensitivity and precision of the method was also evaluated. This experiment, demonstrated that there was no significant difference between the slopes obtained in the calibration curves under the conditions studied.

When utilizing the optimized conditions, the method allows the determination of ascorbic acid in fruit juices with limits of detection and quantification of 0.005 and 0.015 mg L<sup>-1</sup>, and precision expressed as the relative standard deviation of 1.2% for lemon juice with an ascorbic acid concentration of 24.8 mg/100 g. So, the procedure was applied for the determination of ascorbic acid in lemon, orange, grape, cashew, lime, pineapple, tangerine and mango natural juices. The concentrations found varied from 4.5 to 182.5 mg/100 g. The fruit juice samples were also analyzed by molecular absorption spectrophotometry using a classical method established using 1,2 ortho-phenanthroline. The results obtained were compared using the *t*-test, which showed that there was no significant difference between the ascorbic acid contents found by the two methods.

### 1. Introduction

Ascorbic acid (also known as vitamin C) is an antioxidant that is necessary for humans and its deficiency can cause a disease called scurvy, which may cause symptoms such as muscle weakness, tooth loss, rash, tiredness, and joint pain [1]. Therefore, this vitamin should be consumed daily because it is needed to maintain the health of blood vessels, skin, teeth, bone, and cartilage. Also, it is essential in anti-allergic treatments, strengthens the immune system and prevents flus and infections [2,3]. The main sources of ascorbic acid are fruits and vegetables. Among the fruits, the richest ones are acerola, guava, cashew, strawberry, orange, and lemon [4,5]. Yellow peppers, broccoli,

kale, spinach, peas are some vegetables with high levels of ascorbic acid [1,5,6].

In recent years, many conventional analytical methods established using molecular absorption spectrophotometry have been adapted for digital image colorimetry. In these, the measurements of the images have been made by smartphones, photographic cameras, scanners, webcams, etc. [7–14]. These strategies have allowed reducing costs, developing miniaturized and automated systems [15], and proposing specific procedures for field analysis [16]. In this context, many procedures involving digital image have been proposed for the determination of metals and organic compounds in several matrices. Rocha et al. proposed a procedure exploiting a smartphone for the

\* Corresponding author at: Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria, Campus Ondina, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil.

E-mail addresses: [arajujo.gomes@ufbrs.br](mailto:arajujo.gomes@ufbrs.br) (A.A. Gomes), [slcf@ufba.br](mailto:slcf@ufba.br) (S.L.C. Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104031>

Received 4 May 2019; Received in revised form 20 June 2019; Accepted 21 June 2019

Available online 22 June 2019

0026-265X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Apêndice D

### *Formação complementar*

- 2019 - 2019 Curso de curta duração em Aquisição de imagens digitais em química. (Carga horária: 8h).  
Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil  
*Palavras-chave: Imagem Digital, Colorimetria*
- 2017 - 2017 Curso de curta duração em Trace elements and isotopes in seawater: determinations and environmental p. (Carga horária: 40h).  
Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil  
*Palavras-chave: Águas naturais, Amostras ambientais, Composição química, Determinação Multielementar, ICP-MS, Química Analítica*
- 2017 - 2017 Curso de curta duração em Planejamento de experimentos com o software R. (Carga horária: 7h).  
Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Brasil  
*Palavras-chave: Software R, Planejamento experimental*

### *Apresentação de trabalho e palestra*

PORTO, I. S. A.; Santos Neto, J.H.; dos Santos, A.M.P.; A.GOMES, A.; FERREIRA, S. L. C.

Análise de especiação baseada em imagens digitais: Determinação de Fe(II)/Fe(III) em vinho branco, 2019. (Outra, Apresentação de Trabalho)

1. *Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: <http://www.xwquimiometria.ufba.br/>; Local: Campus Universitário de Ondina, UFBA.; Cidade: Salvador; Evento: X Workshop de Quimiometria; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal da Bahia*

2. SOUZA, C. T.; Santos Neto, J.H.; PORTO, I. S. A.; FERREIRA, S. L. C. Comparação preliminar de aplicações matemáticas para o tratamento de imagens digitais aplicadas à quantificação de titânio, 2019. (Outra, Apresentação de Trabalho)  
*Referências adicionais: Brasil/Português. . Home page: <http://www.xwquimiometria.ufba.br/>; Local: Campus Universitário de*

*Ondina, UFBA.; Cidade: Salvador; Evento: X Workshop de Quimiometria; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal da Bahia*

PORTO, I. S. A.; Santos Neto, J.H.; SANTOS, L. O.; A.GOMES, A.; FERREIRA, S. L. C.

Determinação de ácido ascórbico em sucos naturais utilizando imagens digitais, 2019. (Outra, Apresentação de Trabalho)

3.

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: <http://www.xwquimiometria.ufba.br/>; Local: UFBA, Campus de Ondina; Cidade: Salvador; Evento: X Workshop de quimiometria; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal da Bahia*

Santos Neto, J.H.; SOUZA, C. T.; AZEVEDO, R. S. A.; dos Santos, A.M.P.; FERREIRA, S. L. C.; GALVÃO NOVAES, CLEBER

Otimização multivariada de um método colorimétrico utilizando imagens digitais para quantificação de ureia, 2019. (Outra, Apresentação de Trabalho)

4.

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: <http://www.xwquimiometria.ufba.br/>; Local: Campus Universitário de Ondina, UFBA.; Cidade: Salvador; Evento: X Workshop de Quimiometria; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal da Bahia*

SANTOS, L. S.; SILVA, E. F. R.; Santos Neto, J.H.; BRANDAO, G. C.; SANTOS, L. O.; dos Santos, A.M.P.

Use of multiple responses and box-behnken design to optimize the anaciddecompositionmethodapplied in almondpulpand its mineralscomposition (TerminaliacatappaLinn.), 2019. (Outra, Apresentação de Trabalho)

5.

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: <http://www.xwquimiometria.ufba.br/>; Local: Campus Universitário de Ondina, UFBA.; Cidade: Salvador; Evento: X Workshop de Quimiometria; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal da Bahia*

FERREIRA, S. L. C.; Santos Neto, J.H.; PORTO, I. S. A.

6.

Análise de especiação baseada em imagens digitais: determinação de

Fe(II)/Fe(III) em vinho branco, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

*Palavras-chave: Especiação Química, Imagem Digital, Vinho Branco*

*Áreas do conhecimento: Análise de alimentos*

*Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: <http://enqa2018.com.br/trabalhos.html>; Local: Centro de Eventos e Convenções do DiRoma; Cidade: Caldas Novas/GO; Evento: 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de química / UFG / UnB*

FERREIRA, S. L. C.; PORTO, I. S. A.; SOUZA, C. T.; Santos Neto, J.H. Avaliação quimiométrica de métodos de cocção de alimentos visando atender controle de potássio em dietas para doentes renais crônicos, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

*Palavras-chave: Planejamento experimental, Doença renal, Potássio*

*Áreas do conhecimento: Quimiometria*

7. *Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: <http://enqa2018.com.br/index.html>; Local: Centro de Eventos e Convenções do DiRoma; Cidade: Caldas Novas/GO; Evento: 19º ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica e o 7º CIAQA - Congresso Iberoamericano de Química Analítica; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de química / UFG / UnB*

ARAUJO, D. G. G. R.; João H.S. Neto; dos Santos, A.M.P.

Otimização multivariada dos parâmetros de digestão ácida para determinação multielementar por HR-CS FAAS em alimentos com glúten e sem glúten, 2018. (Outra, Apresentação de Trabalho)

*Palavras-chave: Glúten, Planejamento fatorial, Decomposição ácida,*

8. *Otimização multivariada, Determinação Multielementar*

*Áreas do conhecimento: Quimiometria , Preparo de amostras*

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso.*

*Home page: <http://www.ixwquimiometria-ufrn.ufba.br/>; Local: Instituto de Química/UFRN; Cidade: Natal/RN; Evento: IX Workshop de*

*Quimiometria; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal do Rio Grande do Norte*

Santos Neto, J.H.; SILVA, D. L. F.; SANTOS, G. O.; FERREIRA, S. L. C.; ANDRADE, J. B.

Comparação entre resposta múltipla e função desejabilidade na otimização de parâmetros analíticos para determinação simultânea de Hg e Cd por CV AFS, 2017. (Outra, Apresentação de Trabalho)

9. *Palavras-chave: Vapor frio, CV AFS, Resposta múltipla, Mercúrio, Cádmiio*  
*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários;*  
*Local: UFBA-Ondina; Cidade: Salvador, Ba; Evento: VIII Workshop de Quimiometria; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal da Bahia - UFBA*

Santos Neto, J.H.; NOVAES, CLEBER GALVÃO; SANTOS, B. G.  
Estudo da composição mineral de frutas comercializadas na região sudoeste da Bahia através da análise de componentes principais (PCA) e Análise de agrupamentos hierárquicos, 2017. (Outra ,Apresentação de Trabalho)

10. *Palavras-chave: Frutas, Análise de componentes principais - PCA, Análise de componentes hierárquicos - HCA, Composição mineral*  
*Áreas do conhecimento: Química Analítica*  
*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários;*  
*Local: UFBA-Ondina.; Cidade: Salvador-Ba; Evento: VIII Workshop de Quimiometria; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal da Bahia - UFBA*

Santos Neto, J.H.; NOVAES, F. C.; NOVAES, CLEBER GALVÃO; dos Santos, A.M.P.

Resposta Múltipla Harmônica (H): Uma nova ferramenta para otimização multivariada em sistemas multi-respostas, 2017. (Outra, Apresentação de

11. Trabalho)  
*Palavras-chave: Resposta múltipla, Desejabilidade, Resposta Harmônica, Planejamento fatorial, Determinação Multielementar*  
*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários;*  
*Local: UFBA-Ondina; Cidade: Salvador-Ba; Evento: VIII Workshop de*

**Organização de evento**

SANTOS, A. S.; dos Santos, A.M.P.; SOUZA, C. T.; SILVA, D. L. F.;

PORTO, I. S. A.; Santos Neto, J.H.; FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N.

1. L.

X Workshop de Quimiometria, 2019. (Outro, Organização de evento)

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*

SOUZA, C. T.; GALVÃO NOVAES, CLEBER; SILVA, D. L. F.; Santos Neto, J.H.; FERREIRA, S. L. C.; KORN, M. G.

6º Encontro Brasileiro Sobre Especiação Química - EspeQBrasil, 2019.

2. (Outro, Organização de evento)

*Palavras-chave: Especiação Química*

*Áreas do conhecimento: Química Analítica*

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*

Santos Neto, J.H.; FERREIRA, S. L. C.; GALVÃO NOVAES, CLEBER; dos Santos, A.M.P.

3.

VIII Workshop de Quimiometria, 2017. (Outro, Organização de evento)

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários*

OLIVEIRA, D. M.; GALVÃO NOVAES, CLEBER; SILVA, E. G. P.; Santos Neto, J.H.

4.

I Workshop Multi-institucional sobre Estudos Avançados em Química:

Intercâmbio Científico entre os Programas de Pós-Graduação em Química da UESB/BA, UESC/BA e UFSM/RS, 2016. (Outro, Organização de evento)

*Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários*