UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CHEILANE TAVARES DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS ANALÍTICOS PORTÁTEIS ESPECTROFOTOMÉTRICO E FLUORIMÉTRICO BASEADOS EM IMAGEM DIGITAL

Tese de doutorado

Salvador - Ba
Outubro de 2021

CHEILANE TAVARES DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS ANALÍTICOS PORTÁTEIS ESPECTROFOTOMÉTRICO E FLUORIMÉTRICO BASEADOS EM IMAGEM DIGITAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutora em Química

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira

Salvador - Ba
Outubro de 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

CHEILANE TAVARES DE SOUZA

"DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS ANALÍTICOS PORTÁTEIS ESPECTROFOTOMÉTRICO E FLUORIMÉTRICO BASEADOS EM IMAGEM DIGITAL"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Sergio Luis Costa Ferreira_____
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC - Rio)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. João Batista Pereira Junior_____
Doutorado em Química, Universidade Federal do Pará (UFPA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro_____
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal de Pelotas

Profª. Drª. Maria Elisabete Machado_____
Doutorado em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Universidade Federal da Bahia

Profª. Drª. Ivanice Ferreira dos Santos_____
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Estadual de Feira de Santana

Salvador, 08 de outubro de 2021.

Emitido em 08/10/2021

TERMO DE AVALIAÇÃO Nº 52/2021 - IQUI (12.01.15)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado eletronicamente em 02/12/2021 11:18)
LUCIANA SANTOS DA SILVA
ASSISTENTE EM ADMINISTRACAO
PPGQ (12.01.15.07)
Matrícula: 2048239

Para verificar a autenticidade deste documento entre em https://sipac.ufba.br/documentos/ informando seu número: **52**, ano: **2021**, tipo: **TERMO DE AVALIAÇÃO**, data de emissão: **02/12/2021** e o código de verificação: **68be35e6dd**

S729 Souza, Cheilane Tavares de

Desenvolvimento de sistemas analíticos portáteis espectrofotométrico e fluorimétrico baseados em imagem digital/ Cheilane Tavares de Souza. – Salvador, 2021.

108 f.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química, 2021.

1. Espectrofotometria. 2. Análise espectral. 3. Processamentos matemáticos. I. Ferreira, Sérgio Luís Costa. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 543.2

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que contribuíram direta/indiretamente e de forma especial ao meu querido tio Joel (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar os meus caminhos e me fortalecer nos momentos difíceis;

À minha família, por todo incentivo e cuidado, que me acompanhou nesta longa jornada;

Ao Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira, pela orientação, amizade, confiança, oportunidades e bons momentos compartilhados;

À banca avaliadora, Prof. Dr. Anderson Ribeiro, Profa. Dra. Daniele Muniz, Prof. Dr. Geovani Cardoso, Profa. Dra. Ivanice Ferreira, Prof. Dr. João Batista e Profa. Dra. Maria Elisabete Machado pelas contribuições, correções e novas perspectivas;

Ao Prof. Dr. Víctor Cerdà Martín por ter me recebido para um estágio em seu laboratório, no Grupo de Pesquisa em Química Analítica, Automatização e Meio Ambiente, na Universidade das Ilhas Baleares, Palma de Maiorca, Espanha;

As coautoras do trabalho publicado, Kaewta Danchanaa e Piyawan Phansib, por toda ajuda e acolhimento durante o estágio;

Ao Prof. Dr. Ronaldo Lopes Oliveira, pela parceria no trabalho desenvolvido no Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA;

A Pedro Henrique Soares Mazza, pela colaboração durante minha estadia na Fazenda Experimental de São Gonçalo dos Campos;

À Profa. Dra. Heloysa Martins Carvalho Andrade que me acompanhou, por mais de 2 anos, em um outro projeto de tese. Admiro de forma profunda esta profissional que me proporcionou momentos de aprendizagem;

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria (GRPQQ);

Aos amigos da vila, mais que amigos, uma grande família que tenho em Salvador;

Aos amigos da vida, parceiros dos bons, e não tão bons, momentos;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química que contribuíram com a minha formação;

Aos grandes mestres da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) que me forneceram uma excelente base para seguir este caminho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia;

A todos os profissionais do Instituto de Química, em especial, aos membros do colegiado do programa;

Ao Núcleo de Estudos Ambientais (NEA), do Instituto de Geociência, pela parceria e disponibilidade;

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

...Da favela, da humilhação imposta pela cor
Eu me levanto
De um passado enraizado na dor
Eu me levanto
Sou um oceano negro, profundo na fé,
Crescendo e expandindo-se como a maré.
Deixando para trás noites de terror e atrocidade
Eu me levanto
Em direção a um novo dia de intensa claridade
Eu me levanto
Trazendo comigo o dom de meus antepassados,
Eu carrego o sonho e a esperança do homem escravizado.
E assim, eu me levanto

Eu me levanto

Eu me levanto.
Maya Angelou: “Ainda assim eu me levanto”

RESUMO

No presente trabalho foram desenvolvidos e aplicados sistemas portáteis para determinações analíticas baseadas em análise de imagem digital. O primeiro capítulo apresenta informações gerais sobre a utilização de dados de cor, a partir de imagens digitais, para construção do sinal analítico. O segundo capítulo apresenta o desenvolvimento de um sistema espectrofotométrico portátil que emprega um dispositivo 3D para acoplamento de uma câmera webcam como sistema de detecção; o sistema é totalmente alimentado por portas USB de um computador e faz uso de um LED como fonte de radiação, alimentado por uma fonte de tensão ajustável. O desempenho preliminar do sistema foi avaliado em determinações de ferro (II) e hipoclorito, utilizando os dados de cor do espaço RGB e o processamento matemático absorvância efetiva. O sistema apresentou bom desempenho analítico posicionando o LED no topo da cubeta e fonte de radiação com máxima intensidade. O terceiro capítulo apresenta a aplicação do sistema espectrofotométrico desenvolvido na determinação do marcador externo, dióxido de titânio, em fezes bovina. O método apresentou limites de detecção e quantificação de 0,57 e 0,85 mg 100 g^{-1}, respectivamente; faixa linear de trabalho de 0,85 a 10 mg 100 g^{-1} e precisão, expressa em termos de DPR, de 1,86%. A exatidão do método foi verificada comparando os resultados encontrados pelo método proposto com o método espectrofotométrico de referência e não observou-se diferença significativa. O quarto capítulo apresenta um sistema fluorimétrico portátil, que faz uso de um LED monocromático na etapa de excitação, para determinação de quinina em amostras comerciais de água tônica. O sistema apresentou desempenho satisfatório, com faixa linear de trabalho de 0,99 a 10 mg L^{-1}, coeficiente de determinação igual a 0,9980 e precisão (DPR) média de 1,14%. As amostras apresentaram teores de quinina de 47,8 a 66,7 mg L^{-1}, dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente. Os sistemas desenvolvidos apresentaram bom desempenho, mostrando-se como alternativas promissoras aos métodos de referência, para determinações analíticas baseadas em análise de imagem digital.

Palavras-chave: Análise de imagem digital, RGB, processamentos matemáticos, sistemas portáteis, dispositivos 3D, dióxido de titânio, fezes bovinas e quinina.

ABSTRACT

In the present work, portable systems for analytical determinations based on digital image analysis were developed and applied. The first chapter presents general information about the use of color information, from digital images, to build the analytical signal. The second chapter presents the development of a portable spectrophotometric system that employs a 3D device to attach a webcam as a detection system; the system is fully powered by a computer's USB ports and makes use of an LED as a radiation source, powered by an adjustable voltage source. The preliminary performance of the system was evaluated in iron (II) and hypochlorite determinations, using color data from the RGB space and the effective absorbance mathematical processing. The system showed good analytical performance placing the LED on top of the cuvette and radiation source with maximum intensity. The third chapter presents the application of the spectrophotometric system developed in the determination of the external marker, titanium dioxide, in bovine feces. The method presented detection and quantification limits of 0.57 and 0.85 mg $100g^{-1}$, respectively; linear working range from 0.85 to 10 mg $100g^{-1}$ and accuracy, expressed in terms of RSD, of 1.86%. The accuracy of the method was verified by comparing the results found by the proposed method with the reference spectrophotometric method and there was no significant difference. The fourth chapter presents a portable fluorimetric system, which makes use of a monochromatic LED in the excitation stage, to determine quinine in commercial samples of tonic water. The system presented satisfactory performance, with a linear working range from 0.99 to 10 mg L^{-1}, correlation coefficient equal to 0.998 and average precision (RSD) of 1.14%. The samples had quinine contents from 47.8 to 66.7 mg L^{-1}, within the standards established by current legislation. The developed systems showed good performance, proving to be promising, alternatives to the reference methods, for analytical determinations based on digital image analysis.

Keywords: Digital image analysis, RGB, math processing, handheld systems, 3D devices, titanium dioxide, bovine feces and quinine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Publicações empregando análise de imagem digital nos últimos 10 anos 20
Figura 2 - Publicações por categoria da Web of Science 21
Figura 3 - Gráfico de uma função unidimensional 22
Figura 4 - Processo de amostragem 23
Figura 5 - Processo de quantização 23
Figura 6 - Representação esquemática do sistema espectrofotométrico 43
Figura 7 - Fotografia do sistema espectrofotométrico 43
Figura 8 - Esquema eletrônico da fonte de tensão ajustável para alimentação dos LEDs 44
Figura 9 - Fonte de tensão ajustável para alimentação do LED convencional de 5 mm e suportes para acoplamento, frontal e superior, no dispositivo 3D 45
Figura 10 - Fonte de tensão ajustável para alimentação do LED SMD 45
Figura 11 - Design do dispositivo 3D criado com o programa Rhinoceros 5 46
Figura 12- Imagem do dispositivo impresso em 3D com a webcam acoplada e setas vermelhas indicando possíveis posições para a fonte de radiação 46
Figura 13 - Imagem das soluções obtidas com o programa YouCam 47
Figura 14 - Áreas selecionadas com o programa ImageJ para a deconvolução de cores RGB. À esquerda para a iluminação alinhada ao detector, à direita para as imagens obtidas com a iluminação superior 48
Figura 15 - Histogramas dos canais vermelho (R), verde (G) e azul (B) 48
Figura 16 - A) Soluções de 0 a 100 mg L^{-1} do complexo Fe (II) com o-fenantrolina, B) espectros das soluções 50
Figura 17 - Representações esquemáticas das condições do sistema para estudo do melhor posicionamento da fonte de radiação, A) LED na posição frontal (alinhado com o detector) e B) LED no topo (posicionado na parte superior da cubeta) 51
Figura 18 – Recorte das imagens dos padrões analíticos, A) utilizando o LED alinhado com o detector e B) LED posicionado no topo da cubeta 52
Figura 19 - Curvas analíticas construídas a partir das intensidades RGB, A) LED branco em posição frontal e baixa intensidade, B) LED branco posicionado no topo da cubeta e alta intensidade 53

Figura 20 - Curvas analíticas construídas a partir das intensidades RGB quando LEDs SMD foram utilizados como fonte de radiação, com baixa intensidade, posicionados no topo da cubeta. A) LED SMD comercial e B) LED SMD confeccionado no laboratório 54
Figura 21 - Curvas analíticas construídas a partir da configuração do sistema utilizando um LED verde posicionado no topo da cubeta com média intensidade da fonte de tensão..... 55
Figura 22 - Espectros de absorção do complexo hipoclorito e tetrametilbenzidina 56
Figura 24- Teste do procedimento de preparo das amostras de fezes bovina, contendo dióxido de titânio, (a) ao fim do processo de digestão e (b) logo após adição de H_2O_2, sem homogeneização..... 67
Figura 25 - Fonte de tensão ajustável do sistema fluorimétrico 78
Figura 26 - Design do dispositivo 3D empregando no sistema fluorimétrico, elaborado com o auxílio do programa Rhinoceros 5..... 79
Figura 27 - Fotografia do dispositivo 3D empregado no sistema fluorimétrico. 79
Figura 28 - Estrutura do sulfato de quinina em soluções diluídas de H_2SO_4.... 81
Figura 29 - ROI 100x100, coordenadas x230y-180, das imagens digitais do branco e padrões analíticos 82
Figura 30 - Curva analítica para determinação de quinina, construída a partir dos valores de intensidade do canal B..... 84
Figura 31 - Curva analítica para determinação de quinina, construída a partir do processamento matemático norma vetor dos valores de intensidades RGB ... 84
Figura 32 - Curvas analíticas construídas a partir do processamento matemático absorvância efetiva para os canais R, G e B..... 92
Figura 33 - Curvas analíticas construídas a partir do processamento matemático cor relativa para os canais R, G e B..... 92
Figura 34 - Curva analítica construída a partir do processamento matemático norma vetor 93
Figura 35 - Curvas analíticas construídas a partir do processamento matemático dado pela expressão 255 – intensidades RGB 93
Figura 36 - Dados obtidos com a intensidade de radiação no mínimo..... 94
Figura 37 - Dados obtidos com a intensidade de radiação máxima..... 94
Figura 38 - Dados obtidos sem posicionar a tampa no porta-cubeta 95

Figura 39- Dados obtidos com a tampa posicionada no porta-cubeta. 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Artigos publicados em 2021 baseados em análise de imagem digital 35
Tabela 2- Parâmetros analíticos..... 57
Tabela 3 - Processamentos matemáticos analisados na construção do sinal analítico a partir dos dados de cor RGB..... 66
Tabela 4 - Intensidades RGB dos brancos e padrões analíticos em triplicata.. 68
Tabela 5 - Parâmetros analíticos obtidos a partir de distintos processamentos matemáticos dos dados de cor..... 69
Tabela 6 - Teores de TiO_2 nas amostras A, B e C determinados pelo método proposto, análise de imagens digitais, e o de referência, espectrofotometria molecular UV-Vis..... 71
Tabela 7 - Determinação de TiO2 empregando análise de imagens digitais em cinco amostras de fezes bovina 72
Tabela 8 - Intensidades médias RGB para os brancos e padrões analíticos em triplicata..... 83
Tabela 9 - Precisão do método verificada em termos de DRP%..... 87
Tabela 10 - Exatidão do método proposto 87
Tabela 11 - Teores de quinina em amostras comerciais de água tônica, obtidos na aplicação do método proposto 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Três dimensões
AALLME	Microextração Líquido-Líquido Assistida por Ar (*do inglês, Air-Assisted Liquid-Liquid Microextration*)
CACHAS	Sistemas Analíticos Baseados em Histogramas Coloridos Assistidos por Quimiometria (*do inglês, Chemometrics-Assisted Color Histogram-Based Analytical Systems*)
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada (*do inglês, Charge-Coupled Device*)
CIE	Comissão Internacional de Iluminação
CMOS	Semicondutor de Óxido Metálico Complementar (*do inglês, Complementary Metal–Oxide–Semiconductor*)
CVAC	Visão Computacional Baseada em Química Analítica (*do inglês, Computer Vision-Based Analytical*)
DIA	Análise de Imagem Digital (*do inglês, Digital Image Analysis*)
DIB	Métodos baseados em Imagem Digital (*do inglês, Digital Image-Based*)
DIB-FES	Espectrometria de Emissão de Chama Baseado em Imagem Digital (*do inglês Digital Image-Based Flame Emission Spectrometric*)
DIC	Colorimetria de Imagem Digital (*do inglês, Digital Image Colorimetry*)
DPI	Pontos por polegada (*do inglês, Dots Per Inch*)
EMEVZ	Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (*do inglês, Food and Drug Administration*)
FDAi	Fibra em Detergente Ácido indigestível
FDNi	Fibra em Detergente Neutro indigestível
FESGC	Fazenda Experimental de São Gonçalo dos Campos
GRPQQ	Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria
HD	Alta Definição (*do inglês, High Definition*)

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*do inglês, High Performance Liquid Chromatography*)
HSB	Matiz, Saturação e Brilho
HSI	Matiz, Saturação e Intensidade
HSL	Matiz, Saturação e Luminância
HSV	Matiz, Saturação e Valor
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (*do inglês, International Union of Pure and Applied Chemistry*)
JPEG	(*do inglês, Join Photographic Experts Group*)
LANA	Laboratório de Nutrição Animal
LED	Diodo Emissor de Luz (*do inglês, light-emitting diode*)
LOCI	Laboratório de Instrumentação Ótica e Computacional (*do inglês, Laboratory for Optical and Computacional Intrumentation*)
MSi	Matéria Seca indigestível
NIR	Infravermelho Próximo (*do inglês, Near Infrared*)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PV-IS-DLLME	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva por Variação de Pressão em Seringa (*do inglês, Pressure Variation in Syringe Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*)
RAM	Memória de Acesso Aleatório (*do inglês, Random Access Memory*)
RGB	Vermelho, Verde e Azul (*do inglês, Red, Green e Blue*)
ROI	Região de interesse (*do inglês, Region of Interest*)
SDME	Microextração por Imersão direta em Gota Única (*do inglês, Direct-immersion Single-Drop Liquid-Phase Microextraction*)
SMD	Diodo Montado em Superfície (*do inglês, Surface Mounted Diode*)
USB	Porta Serial Universal (*do inglês, Universal Serial Bus*)
UV/Vis	Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

Capítulo 1 18

FUNDAMENTOS BÁSICOS E APLICAÇÕES ANÁLITICAS DA ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL 18

1.0 INTRODUÇÃO 19

1.1 FUNDAMENTOS BÁSICOS DE IMAGEM DIGITAL 22

1.2 DISPOSITIVOS UTILIZADOS COMO DETECTORES 26

1.3 ESPAÇOS DE CORES 27

1.4 PROCESSAMENTO MATEMÁTICO 31

1.5 NOVAS PERSPECTIVAS DA ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL NA QUÍMICA ANALÍTICA 37

Capítulo 2 39

SISTEMA ESPECTROFOTOMÉTRICO BASEADO EM UM DISPOSITIVO CRIADO POR IMPRESSÃO 3D PARA O ACOPLAMENTO DE UMA CÂMERA WEBCAM COMO SISTEMA DE DETECÇÃO 39

2.1 INTRODUÇÃO 40

2.2 OBJETIVOS 42

2.2.1 Objetivo Geral 42

2.2.2 Objetivos Específicos 42

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 43

2.3.1 Descrição do sistema 43

2.3.2 Descrição dos componentes do sistema 44

2.3.3 Aquisição e análise da imagem digital 47

2.3.4 Aplicação analítica 48

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 50

2.4.1 Determinação de ferro (II) 50

2.4.2 Determinação de hipoclorito 55

2.4.3 Validação do método 56

Capítulo 3 59

DETERMINAÇÃO DE MARCADOR EXTERNO, DIÓXIDO DE TITÂNIO, EM FEZES BOVINAS EMPREGANDO ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL 59

3.1 INTRODUÇÃO 60

3.2 OBJETIVOS 63

3.2.1 Objetivo Geral 63

3.2.2 Objetivos específicos 63

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 64

3.3.1 Aquisição e pré-tratamento das amostras de fezes bovina 64

3.3.2 Materiais e reagentes 64

3.3.3 Preparo de amostra 64

3.3.4 Análise de imagem digital 65

3.3.5 Processamento matemático dos dados de cor 65

3.3.6 Validação e aplicação 66

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 67

3.4.1 Preparo de amostra 67

3.4.2 Processamento matemático dos dados de cor 68

3.4.3 Validação e aplicação do método 70

3.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS 73

Capítulo 4 74

DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE QUININA EMPREGANDO UM SISTEMA PORTÁTIL E PROCESSAMENTO DE IMAGEM DIGITAL 74

4.1 INTRODUÇÃO 75

4.2 OBJETIVOS 77

4.2.1 Objetivo geral 77

4.2.2 Objetivos específicos 77

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 78

4.3.2 Reagentes e soluções 78

4.3.1 Sistema fluorimétrico 78
4.3.2 Aquisição e processamento das imagens 80
3.3.3 Validação e aplicação do sistema 80
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 81
4.4.1 Sistema fluorimétrico 81
4.4.2 Processamento matemático dos dados de cor do espaço RGB 82
4.4.3 Validação do método 84
4.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS 89
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS 90
APÊNDICE 91
6.0 REFERÊNCIAS 96

Capítulo 1

FUNDAMENTOS BÁSICOS E APLICAÇÕES ANÁLITICAS DA ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL

1.0 INTRODUÇÃO

Cor é uma sensação do cérebro humano transmitida pelo olho e nervo óptico, resultante da luz visível, isto é, radiação eletromagnética com comprimento de onda entre 380 e 780 nm. A percepção de cores do olho humano ocorre após o estímulo sensorial atravessar o sistema óptico do olho, que converte a energia luminosa em sinais elétricos que são transmitidos, através do nervo óptico, para o cérebro [1, 2].

A teoria tricromática de Young e Helmholtz assume que o olho humano possui três tipos de receptores sensíveis ao vermelho, verde e azul; e a mistura aditiva dessas cores primárias permite produzir todas as outras cores. Cinza e Branco são percebidos quando todos os três receptores estão igualmente excitados e o preto é resultado da ausência de estímulo luminoso [1].

Em parte, as informações que temos hoje relacionadas à matéria, no que se refere a objeto de estudo da Química, são resultantes de observações das interações dos diferentes tipos de matéria com a radiação eletromagnética. Diversas análises envolvem esse princípio básico de interação. O estudo dos dados de cor de uma imagem, resultante de uma reação química, vem se tornando uma alternativa de pesquisa a ser explorada [3].

O uso da cor como uma propriedade óptica da matéria que contém informações químicas e tais informações podem ser quantificadas está principalmente relacionado a dois domínios: (1) o uso de dispositivos de imagem como instrumentos analíticos e (2) o desenvolvimento de sistemas analíticos rápidos para uso fora do laboratório. Mesmo com todas as desvantagens inerentes, por não serem dispositivos projetados com finalidade analítica, as análises de imagem digital vêm crescendo exponencialmente [4, 5].

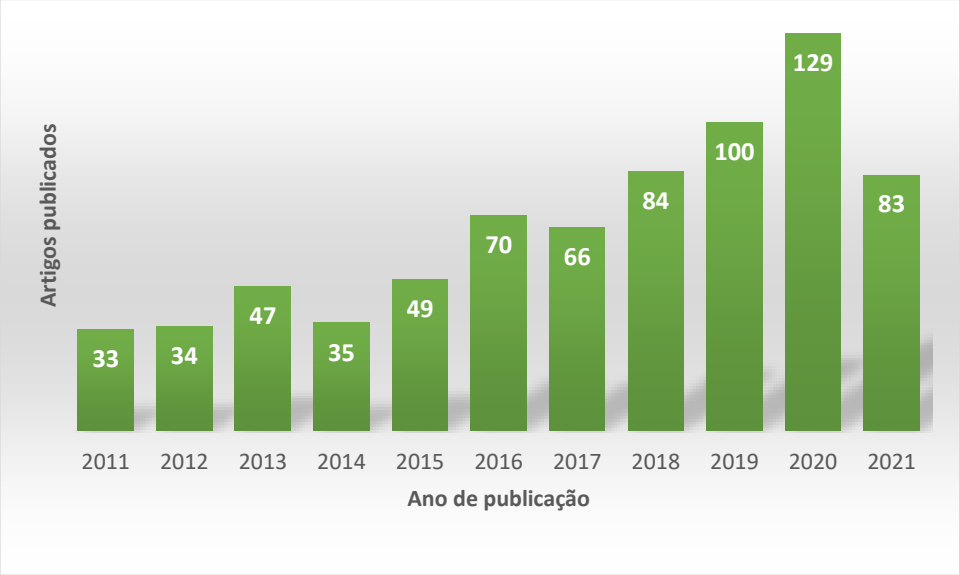
Um exemplo de dispositivo utilizado, comumente, na análise de imagem digital é o smartphone. Em todo o planeta, segundo o relatório de Economia Móvel de 2020 da GSMA, em 2019 havia 5,2 bilhões de smartphones com conexão. A popularização de dispositivos móveis, assim como, o avanço tecnológico de aquisição e processamento de imagens são fatores que contribuem para o atual cenário [4, 6].

Análise de imagem digital (DIA, do inglês *Digital Image Analysis*) não é o único termo atribuído a estudos de componentes de cores de uma imagem, do sistema de interesse, para construção de parâmetros analíticos a partir de uma

reação colorimétrica. Outras termologias incluem colorimetria digital [7], colorimetria de imagem digital (DIC, do inglês *Digital Image Colorimetry*) [8, 9], imagem digital [10], visão computacional baseada em química analítica (CVAC, do inglês, *Computer Vision-Based Analytical*) [11, 12] e métodos baseados em imagem digital (DIB, do inglês *Digital Image-Based*) [13].

Em um levantamento feito, com auxílio da base de dados *Web of Science* – coleção principal (*Clavirate Analytics*), no dia 21 de setembro de 2021, utilizando o termo de busca "*digital image analysis*" (análise de imagem digital), localizou-se 63.959 trabalhos. Aplicando o filtro "categorias" do Web of Science e selecionando "*chemistry analytical*" (Química Analítica), foram encontrados 930 artigos; dentre estes, 38 artigos de revisão. Como pode ser visto na Figura 1, que apresenta um gráfico do número de trabalhos publicados de 2011 até o dia do levantamento, trata-se de uma linha de pesquisa em crescimento.

Figura 1 - Publicações empregando análise de imagem digital nos últimos 10 anos



Fonte: Elaborado pela autora.

Os artigos de revisão apresentam informações e dados sistematizados fundamentais para compreensão da DIA e suas aplicações em Química Analítica [4, 14, 15]. Bock e colaboradores [36] apresentaram uma revisão de trabalhos que utilizam smartphones para aquisição de imagens com fins analíticos, com foco especial no aplicativo PhotoMetrix.

Uma revisão publicada por Diniz [3] sistematiza, pela primeira vez, os chamados "Sistemas Analíticos Baseados em Histogramas Coloridos Assistidos

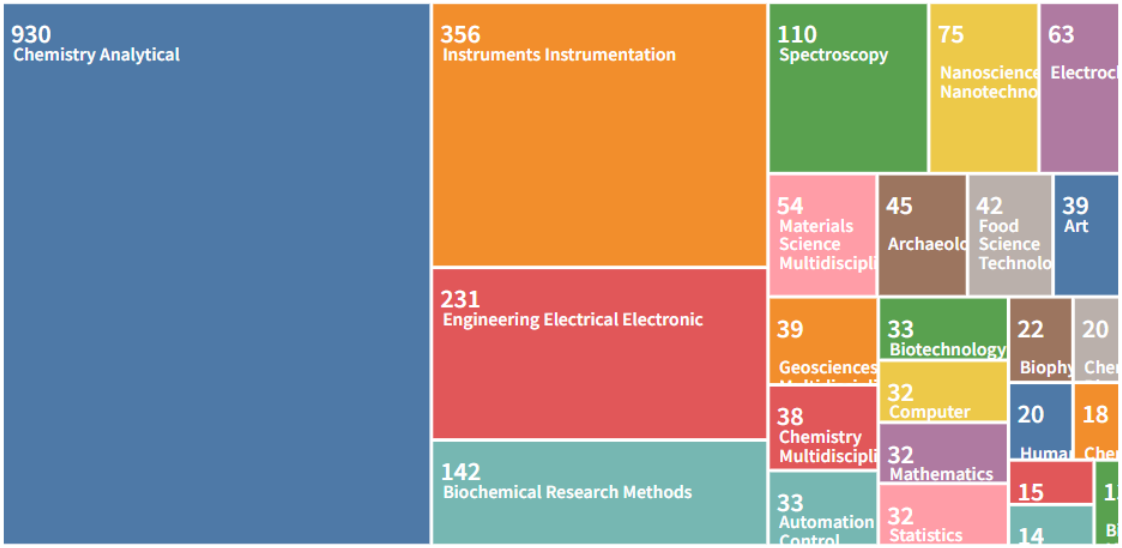
por Quimiometria” (CACHAS, do inglês *Chemometrics-Assisted Color Histogram-Based Analytical Systems*).

A revisão inclui a apresentação de métodos que usam histogramas de cores como dados de entrada para construção de modelos quimiométricos, sem a necessidade de nenhum processamento de imagem; a não ser a extração dos histogramas, que são construídos pela contagem da distribuição de frequência dos diferentes tons de cores de todos os pixels; delimitados por uma região de interesse em uma imagem digital [3].

Publicações que empregam dispositivos domésticos de captura de imagens, como scanners de escritório, câmeras digitais, webcam e smartphones, em análises quantitativas foram reunidas no artigo de revisão publicado por Apyari e colaboradores [6].

Como pode ser observado na Figura 2, as publicações reportadas envolvem diversas categorias da referida base de dados como, por exemplo, instrumentação, engenharia elétrica, bioquímica, espectroscopia, nanotecnologia, entre outras, o que reafirma a DIA com um campo de pesquisa amplo, versátil e em expansão.

Figura 2 - Publicações por categoria da Web of Science



Fonte: Adaptado da base de dados Web of Science (2021)

A utilização de imagens digitais em estudos analíticos exige um certo conhecimento das características gerais de uma imagem digital. Uma abordagem sucinta será feita, no que se refere a fundamentos básicos, dispositivos de captura, espaços de cores e processamentos matemáticos de imagens digitais empregados na Química Analítica.

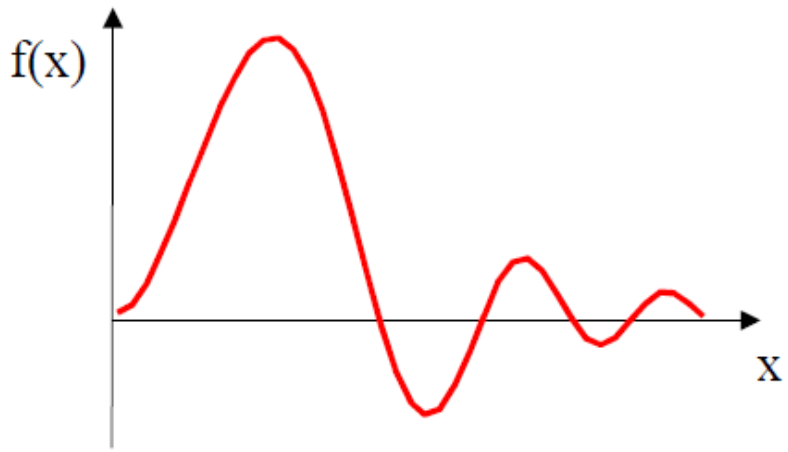
1.1 FUNDAMENTOS BÁSICOS DE IMAGEM DIGITAL

Dois aspectos que definem uma imagem digital é a resolução e a cor. E pontos importantes nesse processo é a captura (entrada), visualização (saída), armazenamento e, por fim, processamento [16].

O computador só é capaz de armazenar bits, um valor que pode ser 0 ou 1. Buscando simplificar, juntou-se 8 bits para forma um byte. Um byte, então, pode assumir 2^8 = 256 valores diferentes, variando de 0 a 255. Assim, o computador trabalha sempre com números inteiros e, por consequência, não é possível representar uma função contínua [16, 17].

Quando nos referimos a função contínua aqui, trata-se de uma função real definida na reta toda, onde para cada valor de x fornecido sempre existe um único valor de f(x) obtido. Como é o caso de uma função unidimensional, Figura 3.

Figura 3 - Gráfico de uma função unidimensional



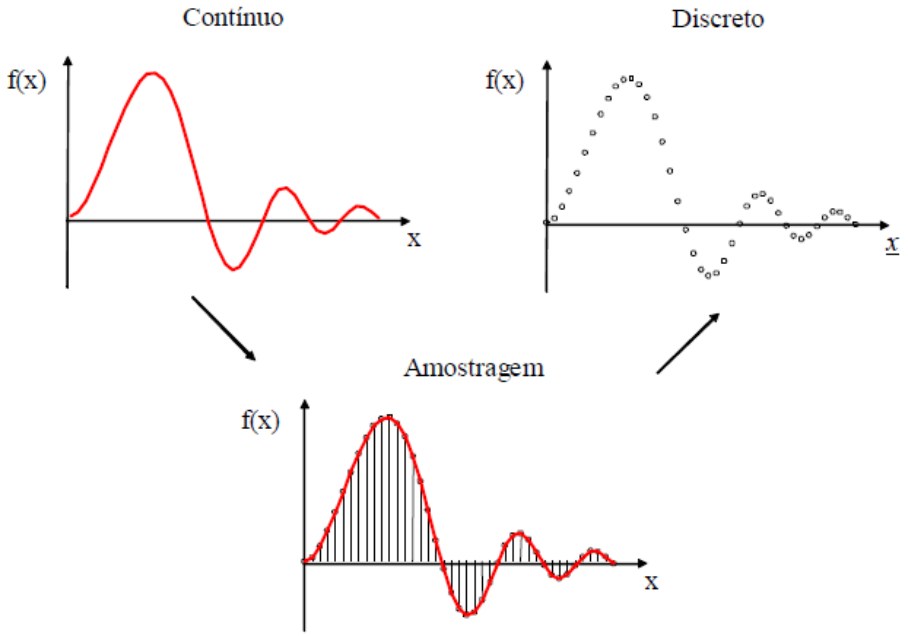
Fonte: Scuri (1999).

Portanto, o processo para transferir uma função contínua para o computador é a discretização (ou digitalização), isto é, tomando valores pontuais ao longo do eixo x e guardando o valor de f(x) correspondente. Como o eixo f(x) também é contínuo, faz-se necessário discretiza-lo. O processo de discretização do eixo x (o domínio) é chamado de amostragem, o do eixo f(x) (o contradomínio) é chamado de quantização [16].

Resumidamente, a discretização de qualquer sinal contínuo primeiro passa por uma amostragem e depois por uma quantização. Uma amostragem

comum, implementada na grande maioria de dispositivos de captura, é a uniformemente espaçada, onde cada amostra é tomada em intervalos iguais, como mostra a Figura 4 [16].

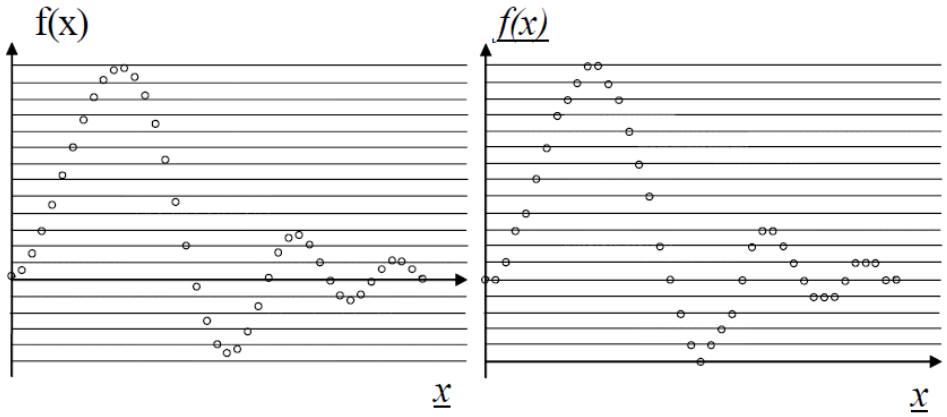
Figura 4 - Processo de amostragem



Fonte: Scuri (1999).

A quantização (Figura 5), mais comum, consiste em tomar o valor máximo e o valor mínimo da função, e dividir este segmento em intervalos iguais de acordo com o número de bits definido para armazenar uma amostra. Logo, o número de valores possíveis será 2^n bits [16].

Figura 5 - Processo de quantização



Fonte: Scuri (1999).

Basicamente, para estudar um determinado fenômeno, ou objeto da natureza, digitalmente falando, precisamos associá-lo a um modelo matemático e então encontrar uma representação discreta para esse modelo [16].

A imagem fotográfica é obtida através de câmeras ou sensores que captam luz. Para o processo de discretização, a imagem contínua é modelada matematicamente pela função expressa na equação 1, sendo x e y números reais [16].

$$I(x,y) = \text{cor no ponto } (x,y) \qquad (1)$$

A imagem digital é obtida a partir de uma amostragem e de uma quantização dessa função. Uma vez amostrado o plano, tem-se uma matriz de valores que representam a cor. Cada elemento dessa matriz é chamado de pixel (elemento de imagem) [16].

Após a digitalização, a imagem assume um tamanho adimensional em pixels. E a qualidade da amostragem, denominada resolução, pode ser conhecida determinando-se a razão entre o número de pixels obtido e o tamanho da imagem real. Em geral, a resolução é medida em pontos por polegada (DPI, do inglês *Dots Per Inch*) [16].

Do ponto de vista físico, quando nos referimos a cor estamos falando de luz. A luz percorre o espaço, ora se comportando como uma onda, ora como uma partícula, e isso caracteriza a natureza dual da luz. Para se estudar a cor é preciso observar o comportamento da luz como uma onda. Assim, a luz é uma radiação eletromagnética que possui uma certa “energia” para cada comprimento de onda [3, 16].

No nosso olho existem dois tipos de sensores; cones e bastonetes. Bastonetes são sensíveis a todos os comprimentos de onda ponderadamente e por isso não são capazes de distinguir cor; possuem melhor resposta à luz de baixa intensidade (visão noturna). Já os cones são menos sensíveis à luz, mas permitem a distinção de cores porque existem três tipos de cones; sensíveis a comprimentos de onda próximos a 450 nm, a 550 nm e a 600 nm. Desta forma, ocorre o processo de discriminação de cor do olho, chamado de tricromacidade [16].

A imagem podem ser capturada por diferentes dispositivos e, logo depois, pode ser armazenada na memória do computador como uma sequência de

bytes, ou melhor, um mapa de bits (Bitmap). A imagem digital é simplesmente uma matriz de pixels, como já mencionado, onde cada pixel é um número que representa o valor da cor naquela posição [16, 18, 19].

Quanto maior o número de pixels, maior o tamanho da imagem na memória. Assim, foram criados métodos de compressão de imagem que podem ser classificados em dois tipos, com perdas e sem perdas. Os com perdas são baseados no fato de que pequenos detalhes podem ser eliminados que percentualmente não serão notados de imediato. Dentre os métodos com perdas se destaca o JPEG (*Join Photographic Experts Group*) [16].

Como a memória RAM (memória de acesso aleatório, do inglês *Random Access Memory*) do computador é volátil, precisamos de algum mecanismo de persistência para a imagem, ou seja, gravá-la em um arquivo. Não sendo universais, existem vários padrões. O formato JPEG usa a compressão JPEG, que lhe deu o nome, e permite gravar imagens em diferentes espaços de cores, mas sempre comprimidas com perdas. Mesmo com perdas, é o melhor formato para armazenar imagens de alta qualidade [16].

As funções de processamento de imagens digitais podem ser classificadas em dois grupos, por escopo ou por resultado. Por escopo está relacionado com técnicas de processamento e por resultado está relacionado com os tipos de resultado de cada técnica. Um fator comum nas duas classes é a qualidade [16].

A restauração busca compensar distorções específicas, normalmente geradas no momento da aquisição. Quando se pode identificar experimentalmente a função que representa a deformação ou construir um modelo matemático adequado, é possível buscar a função inversa e aplicá-la sobre a imagem deformada [16].

Quando o processamento de imagens é de interesse cientifico, o mais comum é obter dados relacionados com os objetos presentes na imagem. Assim, são necessárias operações de segmentação que procurarão isolar regiões de pixels e operações para extração de atributos que vão olhar para essas regiões e calcular uma série de parâmetros que as descreverão [16, 20].

Operações pontuais ocorrem quando um pixel da imagem resultante depende apenas do mesmo pixel na imagem original. Neste caso, a única informação que nós temos é a cor do pixel. E embora as funções pontuais

estejam restritas somente ao pixel sendo processado, o processamento em si pode levar em consideração dados globais da imagem, como por exemplo, o histograma [16].

O histograma é uma função estatística da imagem que, para cada nível de tonalidade, calcula quantos pixels existem naquela tonalidade [3, 21]. Quanto aos softwares, existem diversos sistemas de processamento de imagens no mercado [16]. Qualquer área do conhecimento em que se possa capturar uma imagem e dela obter resultados é uma área na qual pode-se empregar um sistema de processamento de imagem [16].

1.2 DISPOSITIVOS UTILIZADOS COMO DETECTORES

A maioria dos dispositivos de captura de imagem, disponíveis comercialmente, utilizam sensores de dispositivos de carga acoplada (CCD, do inglês *Charge-Coupled Device*) e semicondutor de óxido metálico complementar (CMOS, do inglês *Complementary Metal–Oxide–Semiconductor*). O funcionamento de ambos é semelhante, a diferença se concentra na maneira como os pixels são digitalizados e como a leitura das cargas é feita. Nos dois casos, o sensor de imagem é um conjunto de elementos sensíveis à luz, geralmente, feitos de silício [19, 22].

Nos sensores CCD, as informações medidas por cada célula são transformadas em voltagem, resultando em um sinal analógico que será digitalizado posteriormente pela câmera. Os pixels em uma matriz CCD capturam luz simultaneamente, fornecendo uma saída mais uniforme. Mas, uma grande desvantagem é a necessidade de um dispositivo adicional para processar as informações de saída do sensor, o que resulta em câmeras digitais mais caras e maiores [22].

Os sensores CMOS têm um design de pixels independente e ativo. Os pixels são fornecidos com capacitores e amplificadores, portanto a digitalização pode ser feita internamente, oferecendo melhor velocidade de processamento e eliminando a necessidade de um chip externo, como no caso do CCD, reduzindo o custo e o tamanho do equipamento [22].

Os pixels transformam os fótons de entrada de luz em transportadores de carga por meio do efeito fotoelétrico. Cada pixel acumula a carga induzida pela luz durante o tempo de exposição até que seja lida e processada. O sinal

de saída é proporcional à carga acumulada, dependendo da quantidade de luz capturada pelo pixel, e o tempo de exposição [22].

O sensor divide a luz recebida em diferentes comprimentos de onda, que são unidos na fase de pós-processamento para criar a imagem digital colorida. O ideal seria o uso de um sensor para cada comprimento de onda, mas o custo seria elevado. Assim, é comum usar filtros que capturam diferentes faixas de cores como, por exemplo, o filtro Bayer, que filtra a luz em três componentes de cor: azul, verde e vermelho [22].

A imagem final e as informações de cores são obtidas combinando esses três canais; embora as informações de cada canal individual possam ser facilmente extraídas através do processamento de imagem. Desta forma, torna-se possível usar cada coordenada individualmente para determinar a resposta de vários analitos separadamente, realizando análises simultâneas de espécies em um único experimento [4].

Vidal et al. [23] determinaram, simultaneamente, os aditivos de cor tartrazina (E102) e vermelho allura (E129) em produtos alimentícios, utilizando análise de imagem digital como uma alternativa ao método de referência que emprega Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). As imagens foram adquiridas por meio de um scanner de mesa (Epson Stylus DX 7400); o espaço de cor vermelho, verde e azul (RGB) foi convertido em outros espaços de cores, obtendo-se limites de detecção de 1,8 mg L^{-1} (tartrazina) e 0,6 mg L^{-1} (vermelho allura).

Diferentes dispositivos de imagem podem ser usados para coletar informações de cores. Os mais usados são: scanners, câmera digital, microscópio baseado em câmera CCD, smartphones, tabletes, webcam, colorímetros e outros instrumentos portáteis [4].

1.3 ESPAÇOS DE CORES

A colorimetria é a ciência que estuda os processos relacionados à cor, mas para além do que o nome indica, a colorimetria não se resume a medição de cores. Com a decomposição, análise e descrição da luz visível é possível processar e quantificar informações de cores para diferentes finalidades científicas [4, 24].

No que se refere as determinações analíticas, alterações de cor que podem ser capturadas por meio de um detector óptico ou imagem, possibilitam o uso das coordenadas de cores, ou uma magnitude relacionada, para obtenção de um parâmetro analítico, podendo ser de finalidade qualitativa ou quantitativa [4]. Uma tendência nas análises de imagem digital é a utilização de espaços de cores, também denominados sistemas ou modelos de cores, para construção da resposta analítica.

Frequentemente utilizado, o espaço vermelho, verde e azul é um modelo de cores aditivas que desempenha um papel de extrema importância no processamento de imagens. Usando três canais: vermelho (R, do inglês *Red*), verde (V, do inglês *Green*) e azul (B, do inglês *Blue*), cada canal possui um valor que varia de 0 a 255 (formato 8 bits) ou de 0 a 1 (formato fracionário). Assim, cada cor possui um valor de R, um valor de G e um valor de B, ou seja, a cor é representada na forma de (R, G, B); na qual (0,0,0) e (255,255,255) refere-se ao preto e branco, respectivamente. Por meio desse intervalo e dos três canais, o espaço RGB pode produzir mais de 16 milhões de cores diferentes [7, 25].

Neto et al. [20] propuseram um método para análise de especiação de ferro (II/III) em amostras de vinho branco, com base na reação de íons ferro (II) com o reagente cromogênico 1,2 orto-fenantrolina. O ferro total foi determinado com o mesmo reagente após adição de um agente redutor.

Após obtenção das imagens utilizando um dispositivo webcam, a região de interesse (ROI, do inglês *Region of Interest*) foi delimitada, com auxílio do programa ImageJ, e os dados de cor, a partir do espaço RGB, foram obtidos. O canal que apresentou melhor sensibilidade foi o B, assim, foi empregado na construção do sinal analítico. O método proposto apresentou um limite de detecção de 0,042 mg mL^{-1} e limite de quantificação de 0,141 mg mL^{-1} [20].

Colorimetria por imagem digital foi aplicada por Zarghampour et al. [7] em um método para extração, pré-concentração e determinação de quantidades traços de cromo (VI) em amostras de água, considerando a complexação seletiva de cromo (VI) com 1,5-difenilcarbazida.

A etapa de detecção foi realizada diretamente em uma plataforma baseada em chip. Após obtenção da imagem digital da fase sólida, o processamento foi feito utilizando a ferramenta iDropper e o espaço de cores RGB, sendo as intensidades correspondentes ao canal G utilizadas para

obtenção do sinal analítico. Sob as condições estudadas, foi possível alcançar limite de detecção de 10 µg L^{-1}, limite de quantificação de 30 µg L^{-1}, faixa linear de trabalho de 30 a 1000 µg L^{-1} e coeficiente de determinação de 0,9969 [7].

As cores RGB podem ser convertidas para o espaço de cor Matiz, Saturação e Valor (HSV), que é mais próximo do modo como os humanos discernem as sensações de cores. Matiz é um atributo que descreve uma cor pura, como amarelo, laranja ou vermelho. A saturação é uma medida do grau em que uma cor pura é diluída pela luz branca, por exemplo, a distinção entre vermelho e rosa; e o componente de valor refere-se ao brilho da cor [26, 27]. Para calcular os valores HSV, as seguintes equações podem ser utilizadas:

$$H = \left(\frac{G-B}{\max \text{canal} - \min canal} + 0\right)/6 \text{ se o valor máximo R} \quad (2)$$

$$H = \left(\frac{B-R}{\max \text{canal} - \min canal} + 2\right)/6 \text{ se o valor máximo G} \quad (3)$$

$$H = \left(\frac{R-G}{\max \text{canal} - \min canal} + 4\right)/6 \text{ se o valor máximo B} \quad (4)$$

$$S = \frac{\max canal - \min canal}{\max canal} \quad (5)$$

$$V = \max_{\text{canal}} \quad (6)$$

Cantrell e colaboradores [28] utilizaram o espaço de cores HSV como parâmetro analítico quantitativo para sensores ópticos bitonais. Segundo os autores, a natureza robusta desse parâmetro fornece uma melhor precisão para a medição de sensores que mudam de cor na especiação de molécula indicadora. Uma comparação foi feita entre os espaços RGB e HSV, demonstrando este último ser 2 a 3 vezes superior.

Os espaços de cores usando matiz, saturação e valor, também são denominados espaços de cores fenomenais, derivados do RGB. Nesse contexto, há os espaços HSB, em que B significa brilho; HSI, onde I representa intensidade e o HSL em que L é a luminância da cor. Mesmo não sendo espaços equivalentes, devido à variação na definição de saturação, todos são orientados a matiz [4].

Os espaços orientados a matiz são empregados com diversas finalidades analíticas, incluindo desenvolvimento de dispositivo baseado em papel para detecção de pesticida [10]; uso de smartphone para estimar níveis e fontes de

material particulado no ambiente aéreo [29]; desenvolvimento de um fotômetro de diodos emissores de luz no infravermelho próximo (LEDs NIR), usando uma webcam como detector de transmitância [30] e utilização de um sistema de fluxo para classificação da origem geográfica de méis argentinos [31].

O espaço CIE XYZ ou CIE, criado pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE), é definido por duas coordenadas que definem a cromaticidade, X e Z, e uma terceira, Y, que define a luminância (também conhecida como valores tristímulo). Assim, para cada valor de Y, X e Z, é descrito todas as cromáticas possíveis do espaço. Projetado para incluir todas as cores que o sistema visual humano é capaz de ver, esse espaço é utilizado como intermediário para possibilitar as transformações entre o RGB e outros [4].

No espaço CIELAB, a cor é descrita pelas coordenadas L* (luminância), a* (mudança de cor de vermelho para verde) e b* (mudança de cor de amarelo para azul). Com a utilização desse espaço, ou do seu similar CIELUV, é possível obter uma percepção uniforme. Isto é, uma alteração mínima nas coordenadas de cromaticidade produz uma mudança igual na percepção visual da cor [32].

Para se obter as coordenadas L*, a* e b* do espaço de cores RGB, faz-se necessário uma etapa intermediaria utilizando o XYZ. Por consequência, o processamento das informações exige maiores recursos e não é um processamento muito rápido. A principal vantagem se refere a possibilidade, por causa da uniformidade do espaço, de extrair diferenças entre duas cores fazendo uso da distância euclidiana [4].

O espaço CIELAB foi empregado por Meszaros e colaboradores [33] para prever o conteúdo de fármacos em comprimidos de Meloxicam (um anti-inflamatório), após inspeção de comprimidos, utilizando uma ferramenta tecnológica de processo para determinar a força de compressão e força de esmagamento aplicadas na produção da formulação.

Na Química Analítica, outros espaços de cores foram usados em combinação com análises colorimétricas para fornecer informações relacionadas ao analito como, por exemplo, o CMYK [30]. Mas, o espaço de cores RGB é o mais utilizado nos trabalhos reportados na literatura [4].

1.4 PROCESSAMENTO MATEMÁTICO

Após captura das imagens e delimitação da ROI, a análise dos componentes de cores deve ser processada. Partindo do princípio que o processamento consiste em extrair informações que apresentem uma relação com o analito, vários parâmetros analíticos colorimétricos podem ser utilizados [4].

Diversos softwares podem ser empregados nessa etapa, incluindo o ImageJ, Image Gui, Matlab, MathWorks, entre outros. Em sua maioria, os softwares permitem representar os pixels de intensidade usando a opção "histograma" que mostra a distribuição dos pixels coloridos na faixa de variação das coordenadas de cores, assim como, as intensidades médias da imagem analisada [4, 26, 34-36].

Com isto, a representação do histograma possibilita mostrar e calcular vários parâmetros para se construir a curva analítica que descreve o sistema, como média, modo e intensidade mediana dos canais vermelho, verde e azul. O parâmetro analítico pode ser simplesmente o valor médio dos canais R, G ou B, dos pixels que constitui a ROI, ou pode ser expresso como absorvância efetiva, conhecida também como intensidade efetiva [4, 35].

A absorvância efetiva é expressa pela equação 7, onde A_R, A_G e A_B são as absorvâncias efetivas para os canais R, G e B, respectivamente. E os valores R_S, G_S, B_S e R_b, G_b, B_b são os valores desses canais para amostra (ou solução padrão) e para o branco analítico, respectivamente. A seleção do canal, como sinal analítico, se baseia na adequação das figuras de mérito ao interesse do estudo. Silva e colaboradores [37] aplicaram a absorvância efetiva no processamento das imagens de comprimidos farmacêuticos e optaram pelo canal G para quantificar aspirina nessas formulações.

$$A_R = - \log \frac{Rs}{Rb}$$

$$A_G = - \log \frac{Gs}{Gb} \qquad (7)$$

$$A_B = - \log \frac{Bs}{Bb}$$

Um outro processamento matemático, aplicado em determinações analíticas, utiliza a expressão: S = 255 – (R, G ou B), sendo S o sinal analítico e R, G ou B a intensidade para cada canal [38].

Buscando oferecer um método alternativo, Soares et al. [38] realizaram a determinação de metanol em biodiesel por imagem digital, utilizando um smartphone, baseado na oxidação do metanol em formaldeído e reação subsequente com o reagente Schiff, resultando em um produto violeta.

Utilizando o sistema de cores RGB, o sinal analítico (S) foi obtido subtraindo os valores do canal G, canal selecionado para análise que se refere à cor complementar do produto da reação, do valor total de reflexão (255). Mostrando-se uma alternativa para as análises de rotina, o método proposto obteve um coeficiente de variação (n=10) de 4,8 % e limite de detecção (nível de confiança de 99,7%) de 10 mg Kg^{-1} [38].

É possível encontrar na literatura estudos que aplicam e comparam diferentes processamentos matemáticos. Porto e colaboradores [8] propuseram um método para determinação de ácido ascórbico em sucos naturais de frutas. O sistema de cores empregado foi o RGB e os dados obtidos foram avaliados por duas formas distintas de processamento. O primeiro processamento, em conformidade com a lei de Beer, aplicou a absorvância efetiva.

O segundo processamento foi feito pela determinação do sinal analítico (S), usando a expressão S = 255 – B, sendo B o valor médio do canal azul; canal selecionado pelos autores para realização da análise. Este processamento apresentou uma melhor sensibilidade; com limite de detecção e quantificação de 0,005 mg L^{-1} e 0,015 mg L^{-1}, respectivamente [8].

A cor relativa também é aplicada no processamento de imagens digitais, na etapa de construção do sinal analítico, podendo ser calculada pela expressão apresentada na equação 8, onde r, g e b é a cor relativa para o canal vermelho, verde e azul, respectivamente.

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

$$g = \frac{G}{R+G+B} \qquad (8)$$

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

Lyra et al. [17] apresentaram pela primeira vez um método Espectrométrico de Emissão de Chama Baseado em Imagem Digital (DIB-FES, do inglês *Digital Image-Based Flame Emission Spectrometric*) para análise química quantitativa de lítio em antidepressivos, sódio em soro fisiológico e cálcio

em água. Uma webcam foi utilizada como detector, o sistema de cores RGB foi empregado e um novo modelo matemático foi desenvolvido.

A abordagem matemática, com relação linear entre o valor RGB e a concentração do analito, foi desenvolvida e aplicada pela seguinte expressão (equação 9):

$$\| \mathrm{v} \| = \sqrt{\mathrm{R}_{\mathrm{s-b}}^2} + \mathrm{G}_{\mathrm{s-b}}^2 + \mathrm{B}_{\mathrm{s-b}}^2 \qquad (9)$$

Sendo R_{s-b}, G_{s-b} e B_{s-b} resultantes da diferença entre os R_s, G_s e B_s, valores médios de todos os pixels da região delimitada nas imagens digitais das soluções de calibração e amostras, e R_b, G_b e B_b, valores do branco analítico, considerando que há uma relação linear entre os vetores norma RGB e a concentração do analito [17]. O vetor norma associado a imagem digital do branco analítico pode ser expresso por

$$\| v_b \| = \sqrt{\mathrm{R}_{\mathrm{b}}^2} + \mathrm{G}_{\mathrm{b}}^2 + \mathrm{B}_{\mathrm{b}}^2 \qquad (10)$$

Onde R_b, G_b e B_b são os valores médios de todos os pixels da ROI das imagens digitas obtidas a partir do branco. Justifica-se o uso do novo tratamento matemático com base na associação, agora feita, da resposta analítica com um vetor norma baseado nas três variáveis experimentais, isto é, nos componentes R, G e B.

Com o crescimento do uso das análises de imagens digitais em aplicações analíticas para determinações de diversos analitos, em amostra de distintos graus de complexidade, e possibilidade de obtenção de diferentes parâmetros como sinal, a escolha do processamento matemático a ser empregado é feita com base no sistema de estudo e adequação da resposta ao interesse da pesquisa.

Diniz e colaboradores [34] em seu estudo sobre classificação de chás naturais não processados, utilizaram quatro sistemas de cores diferentes empregando: (a) RGB, (b) HSB, (c) escala de cinza e (d) RGB + escala de cinza + HSB. Os modelos foram então compostos pelas variáveis (a) 3 x 256, (b) 3 x 256, (c) 1 x 256 e (d) 768+256+768. Utilizando triplicata para cada amostra, foi calculado um histograma médio para posterior classificação quimiométrica.

Carretero-Pena [29] em seu estudo sobre níveis e fontes de material particulado em ambiente aéreo, urbano e rural, após captura das imagens das amostras depositadas em filtros, utilizaram os espaços de cores RGB, HSV e HSL. A partir do espaço RGB, buscando facilitar e simplificar a análise, o sistema em escala de cinza foi abordado por permitir a obtenção de um único parâmetro da intensidade de cor.

A conversão de RGB em escala de cinza pode ser feita por três métodos com diferentes algoritmos: método de luminosidade (equação 11), método de média (equação 12) e método lividez (equação 13) [29].

$$I = 0{,}21R + 0{,}72G + 0{,}07B \quad (11)$$

$$I = (R+G+B)/3 \quad (12)$$

$$I = [\max(R, G, B) + \min(R, G, B)]/2 \quad (13)$$

O método de luminosidade considera o grau de apreciação de cada cor pelo olho humano, de modo que os coeficientes RGB são diferentes entres si, sendo a principal metodologia para a conversão do sistema RGB em escala de cinza. O método médio é o mais simples e o método de lividez considera as cores cada vez menos intensas [29].

A análise de imagem digital se apresenta como uma área de pesquisa promissora, podendo ser aplicada em diversas determinações analíticas. A escolha do sistema, dispositivo de captura, espaço de cores e processamento matemático deve se relacionar com os objetivos de estudo, considerando as características das amostras.

A Tabela 1 apresenta trabalhos publicados no ano de 2021, destacando-se analitos/parâmetros analíticos, amostras, espaços de cores, processamentos matemáticos e softwares empregados. É notório a predominância da utilização de dados de cor a partir do espaço RGB.

Tabela 1 - Artigos publicados em 2021 baseados em análise de imagem digital

Amostra	Analito/Parâmetro	Espaço de cores	Detector	Processamento matemático	Softwares/ aplicativos	Referências
Colírios farmacêuticos	pH e fosfatos	RGB	Smartphone	log R_0/R e PLS	--------	[39]
Águas residuais, unidades de sistema de caldeira e amostras biológicas	Ferro (II)	RGB	Smartphone	- log (B/B_0)	ColorMeter	[40]
Formulações farmacêuticas e urina humana	Paracetamol	RGB	Smartphone	Intensidades de B	ImageJ	[9]
Água	Ferro (III)	RGB e escala de cinza	Smartphone	I = 255 - cinza	Adobe Photoshop e Phyton	[41]
Suplementos de ferro	Fe (III)	RGB	Câmera Digital	Intensidade do canal G	ImageJ	[42]
Saliva	Ácido úrico	RGB	Smartphone	255 - G	PhotoMetrix® 1.8	[43]
Ar ambiente	Dióxido de nitrogênio	RGB	Smartphone	EA_G = -log (G/G_b)	AppNO_2 lyzer, Corel Draw e Matlab	[44]
Bebidas destiladas	Cobre (II)	RGB	Smartphone	log (B_0/B)	Color Grab	[45]
Leite	Ácidos graxos livres	RGB	Smartphone	Resposta Colorimétrica Digital (DCR%)	Python Imaging Library (PIL), Statistics e Matplotlib	[46]
Água	Vanádio	RGB	Microscópio portátil multifuncional	-log (R / R_0)	ImageJ	[47]
Água	Sulfeto	RGB	Smartphone	Intensidade de G	ImageJ	[12]
Água	Cromo (III) e (VI)	RGB	Smartphone	-log (G / G_0)	Color Grab	[48]

Tabela 1 – Continuação e conclusão

Amostra	Analito/Parâmetro	Espaço de cores	Detector	Processamento matemático	Software/ Aplicativo	Referências
Águas superficiais	Microplástico	RGB e escala de cinza	Webcam	Intensidades RGB	----------	[49]
Água e urina	Íon amônio e uréia	RGB	Smartphone	Intensidade de R	ImageJ	[50]
Azeite extra virgem	Compostos fenólicos	RGB	Smartphone	S = 255 – (G ou B)	ImageJ	[51]
Água	Manganês, Cobre, Ferro, Nitrato, fosfato, sulfato, dureza total e pH	RGB, CMYK, HSV e CIELAB	Scanner	Intensiddaes dos canais	Matlab 2010	[52]
Suor e lágrimas	pH	RGB, escala de cinza e CIELAB	Smartphone	Croma e ângulo	ImageJ e Colormine	[53]
Soro humano	Fenilanina	RGB e escala de cinza	Smartphone	Intensidade da escala de cinza	ImageJ	[5]

Fonte: Elaborado pela autora.

1.5 NOVAS PERSPECTIVAS DA ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL NA QUÍMICA ANALÍTICA

As primeiras aplicações da análise digital de imagens começaram na década de 1960 para obter informações úteis de imagens médicas e de satélite [54], sendo os primeiros usos de histogramas de cores realizados apenas cerca de duas décadas depois, por Martens et al. [3] e Erlich et al. [55]. Com o atual avanço tecnológico, a DIA vem ganhando destaque para fins analíticos, pois torna o processo extremamente viável dentro e fora dos laboratórios, devido ao seu baixo custo, simplicidade e versatilidade [18].

Dentre as possibilidades oferecidas pela análise de imagem digital em aplicações analíticas, sua combinação com outras técnicas vem despertando o interesse de pesquisadores. Khoshmaram e Mohammadi [48] desenvolveram um novo método para análise de especiação de cromo e, combinando a Microextração Liquido-Líquido Assistida por Ar (AALLME, do inglês *Air-Assisted Liquid-Liquid Microextration*) com a DIC, foi possível obter limites de detecção e quantificação de 0,9 e 3,0 µg L^{-1}, respectivamente, para determinação de cromo VI.

A extração de pares de íons foi combinada com DIC, por Phadungcharoen e colaboradores [56], como uma plataforma promissora para análises farmacêuticas. No método proposto, o fármaco incolor carregado positivamente reagiu com um corante laranja de metila aniônico, formando um complexo de par de íons amarelo que foi extraído com um solvente verde, alcançando um limite de detecção de 0,76 µg mL^{-1} e de quantificação de 2,30 µg mL^{-1}.

A Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) em combinação com a DIC foi empregada por Jain e colaboradores [9], para determinação quantitativa de paracetamol em formulações farmacêuticas e amostras de urina humana.

Fazendo uso de ferramentas quimiométricas de planejamento de experimentos, o método oferece uma abordagem de fácil manuseio, econômica, rápida, amigável ao meio ambiente e um ensaio de alto rendimento de amostras, sendo viável para análise de 16 amostras em 60 min, obtendo-se limites de detecção e quantificação de 8,4 e 28,1 µg mL^{-1} e valores de DRP (%), intra e inter-dia (n=5), inferiores a 5% e 10% [9].

Dispositivos analíticos baseados em papel microfluídico estão emergindo como opções promissoras para detecção rápida de contaminantes químicos na água. O acoplamento desses dispositivos com a DIA foi objeto de estudo de Balasubramanian e colaboradores [41].

Barreto e colaboradores [18] aplicaram pela primeira vez a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva por Variação de Pressão em Seringa (PV-IS-DLLME, do ingês *Pressure Variation in Syringe Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), combinada com a DIC para a determinação de cobalto em alimentos. Apresentando limites de detecção e quantificação de 0,08 e 0,23 μg g^{-1}, respectivamente; o fator de enriquecimento estimado foi de 65 e precisão de 4,6%, em termos de desvio padrão relativo. O método foi aplicado em amostras de farinha de banana verde, tempero baiano, berinjela e *Tribulus terrestris*.

O acoplamento da análise de imagem digital e análise catalítica, para a determinação extremamente sensível de Cr (VI), foi apresentado por Mohamed e colaboradores [57]. A medição cinética de tempo fixo foi aplicada seguindo o produto de oxidação após 10 min da mistura dos reagentes usando uma câmera digital. Com um limite de detecção de 0,1 ng mL^{-1}, o método proposto foi aplicado para determinação de Cr VI em águas residuais, industriais, naturais e poluídas. O método desenvolvido é duas ordens de magnitude mais sensível do que o método espectrofotométrico de referência com difenilcarbazida.

Um método baseado em Microextração por Imersão Direta em Gota Única (SDME, do inglês *Direct-immersion Single-Drop Liquid-Phase Microextraction*) foi desenvolvido, para determinação de vanádio em água, por Nunes e colaboradores [47]. O sistema de detecção utiliza imagens digitais obtidas diretamente da gota de solvente após a sorção de vanádio (V). Empregando como solvente de extração o líquido iônico, hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilmidazólio, o método apresentou um fator de enriquecimento de 50, para 3,5 mL de amostra, e um limite de detecção de 0,6 μg L^{-1}.

As vantagens inerentes à análise de imagem digital, combinada aos conhecimentos e técnicas da Química Analítica, apresenta um cenário amplo e versátil na pesquisa científica.

Capítulo 2

SISTEMA ESPECTROFOTOMÉTRICO BASEADO EM UM DISPOSITIVO CRIADO POR IMPRESSÃO 3D PARA O ACOPLAMENTO DE UMA CÂMERA WEBCAM COMO SISTEMA DE DETECÇÃO

2.1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo, a observação com o olho humano tem sido um método importante utilizado na investigação científica [58]. Na Química, esta observação foi amplamente explorada em análises qualitativas, em que o aparecimento, desaparecimento ou mudança de cor na região do visível resulta em informações para identificação de espécies orgânicas e inorgânicas a partir de uma reação química [59].

Para uma análise quantitativa, os fenômenos ópticos associados às variações de concentração das espécies químicas não podem ser acessados com uma simples observação “a olho nu”, porque a percepção da cor e suas diferentes intensidades dependem de vários fatores, sendo comumente empregados métodos tradicionais, como procedimentos colorimétricos e espectrofotométricos [60].

Recentemente, os métodos de análise colorimétrica baseados em imagens digitais vêm ganhando visibilidade por empregarem dispositivos comerciais simples e de fácil acesso para produzir imagens digitais com excelente definição e resolução [3, 17, 60, 61]. Do ponto de vista prático, um aspecto fundamental é garantir a aplicabilidade e bom desempenho do método, garantindo a reprodutibilidade e repetibilidade das medidas [6].

Para tanto, um sistema de captura de imagem adequado deve ser rigorosamente projetado para manter o posicionamento fixo, a luminosidade, o foco e a distância entre a amostra e o dispositivo de captura [4, 34, 60].

Alguns estudos, que empregam scanners na etapa de aquisição de imagem, dispensam a construção de um sistema para controle das condições operacionais. Assim, este papel é desenvolvido pelo próprio dispositivo de captura que, algumas vezes, dispõe de compartimento fechado [62-64], sendo possível realizar o controle de iluminação e reprodutibilidade das imagens fazendo uso de uma superfície branca em conjunto com um padrão de cor. Posteriormente, se necessário, as imagens fora das linhas de controle são submetidas a processos de correção através de softwares [39, 65].

O planejamento da arquitetura de cada sistema analítico e sua respectiva instrumentação depende da finalidade da aplicação, do tipo e da natureza das amostras e analitos. De forma geral o sistema consiste de quatro partes essenciais: (1) um suporte para condicionar as amostras, (2) uma fonte de

iluminação, (3) um dispositivo de captura de imagem e (4) um dispositivo, computador e/ou smartphone, com software de processamento de imagens para extração dos dados de cor [34].

Diversos sistemas fechados, visando controle da iluminação interna, de diferentes materiais são reportados na literatura [42-44, 47], destacando-se os dispositivos 3D. O uso da tecnologia de impressão 3D tem mostrado um enorme potencial no que diz respeito à fabricação de dispositivos científicos dedicados. Assim, é possível desenvolver modelos em diferentes dimensões e materiais, reduzindo o custo e o impacto ambiental, tendo como produto final dispositivos mais práticos, leves e resistentes [56, 66-68].

As novas abordagens têm permitido o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas, de baixo custo, precisas e com potencial de portabilidade que contribui para o processo de democratização das ciências [4, 20, 69]. O desenvolvimento tecnológico coloca à disposição de pesquisadores, e educadores, dispositivos, hardwares e softwares eletrônicos de consumo, oportunizando novas perspectivas na condução de experimentos e estratégias de ensino [69].

Considerando o conceito de portabilidade e as vantagens de sistemas compactos e de fácil alimentação, este trabalho apresenta o desenvolvimento de um sistema espectrofotométrico, baseado na análise de imagem digital, alimentado por uma Porta Serial Universal (USB) de um computador. O estudo foi desenvolvido em parceria com o Laboratório de Química Analítica, Automatização e Meio Ambiente, da Universidade das Ilhas Baleares, Palma de Maiorca, Espanha.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver um sistema espectrofotométrico baseado na análise de imagem digital com um dispositivo 3D, totalmente alimentado por portas USB de um computador, que possibilite um instrumento portátil, compacto e de fácil manuseio.

2.2.2 Objetivos Específicos

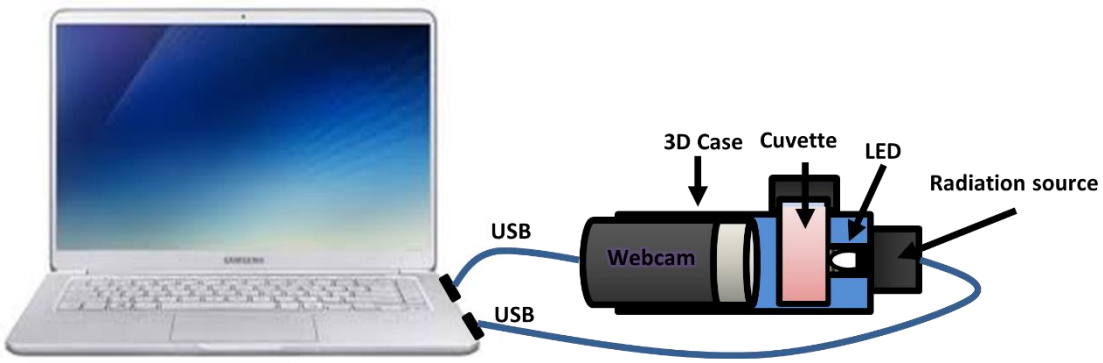
- Desenvolver e imprimir em 3D um dispositivo para acomodação dos componentes necessários ao sistema espectrofotométrico;
- Empregar uma fonte de tensão ajustável para alimentação e controle da fonte de radiação;
- Avaliar diferentes tipos e posições da fonte de radiação;
- Verificar o desempenho preliminar do sistema desenvolvido, aplicando-o nas determinações de ferro (II) e hipoclorito.

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.3.1 Descrição do sistema

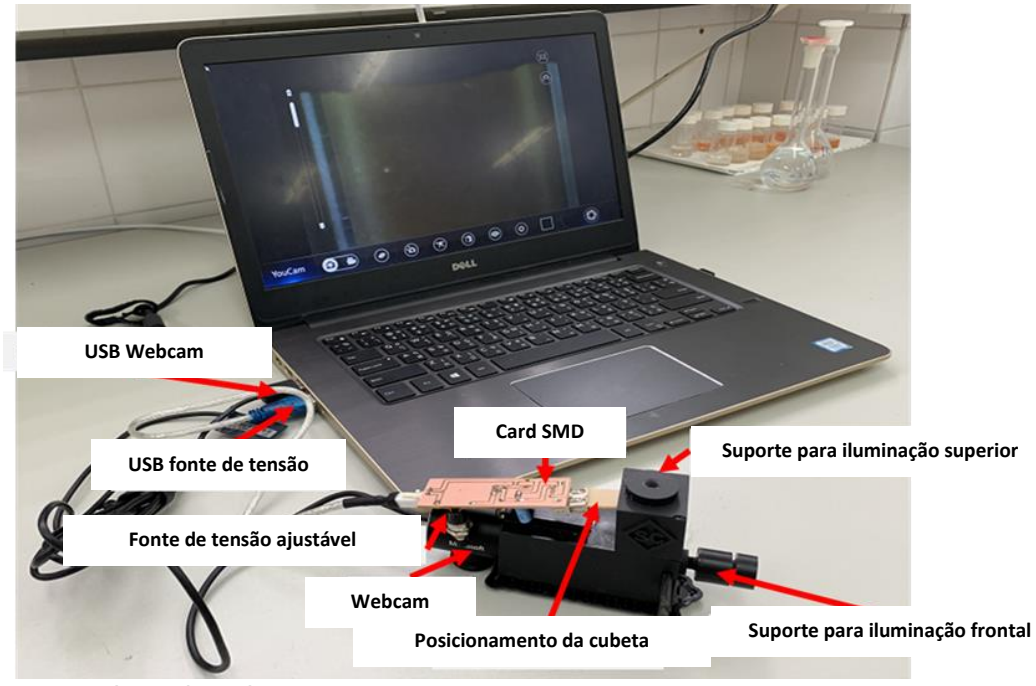
O sistema constitui-se de uma webcam acoplada a um dispositivo criado por impressão 3D e, também conectado ao dispositivo, um diodo emissor de luz (LED) empregado como fonte de radiação; alimentado por uma fonte de tensão ajustável. Como pode ser visto na representação esquemática, Figura 6, tanto a webcam quanto a fonte de radiação são alimentadas diretamente por portas USB de um computador. A Figura 7 apresenta uma imagem do sistema e a indicação de seus componentes.

Figura 6 - Representação esquemática do sistema espectrofotométrico



Fonte: Danchana (2020).

Figura 7 - Fotografia do sistema espectrofotométrico



Fonte: Danchana (2020).

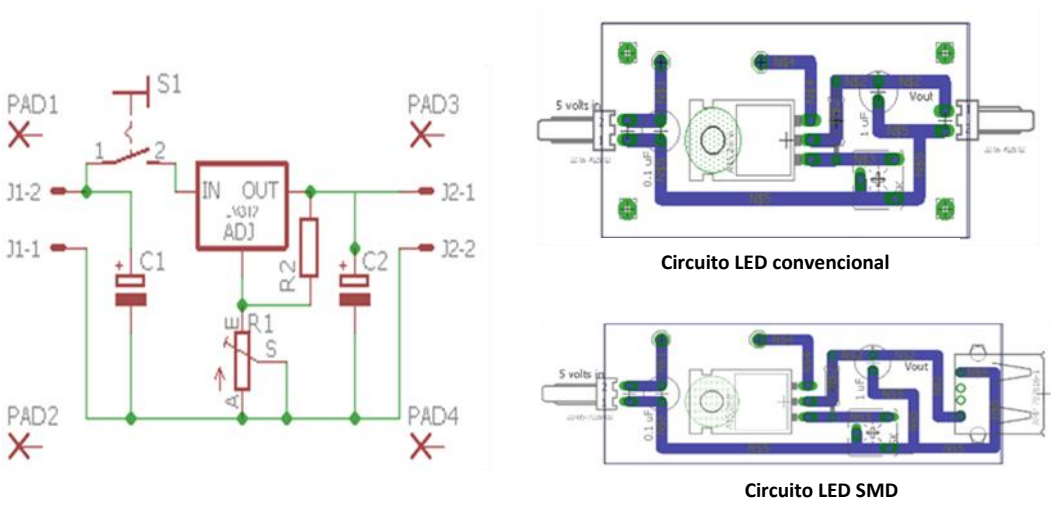
2.3.2 Descrição dos componentes do sistema

2.3.2.1 Fonte de radiação

Como fonte de radiação, diferentes tipos de LEDs convencionais e Dispositivos Montados em Superfície (LEDs SMD) foram avaliados. Nos testes iniciais, LEDs de luz branca foram utilizados e, na etapa de aplicação, LEDs monocromáticos, selecionados de acordo com o analito em questão, também foram incluídos no estudo.

Para alimentação dos LEDs, a partir de uma porta USB de um computador, foi necessário desenhar e construir uma fonte de tensão ajustável com auxílio do software Eagle-7.7 (Autodesk, versão gratuita) e o puglin pcb-gcode [70, 71]. A Figura 8 inclui o circuito eletrônico utilizado na construção da fonte de tensão ajustável.

Figura 8 - Esquema eletrônico da fonte de tensão ajustável para alimentação dos LEDs



Fonte: Danchana (2020).

As Figuras 9 e 10 apresentam as placas desenvolvidas, a partir do circuito elétrico da fonte de tensão ajustável, para alimentação do LED convencional de 5 mm e o SMD. É possível visualizar também o suporte impresso em 3D para acomodação do LED convencional em diferentes posições no dispositivo. Para acoplamento do LED SMD, fendas foram adicionadas no design do dispositivo; próximas ao porta-cubeta.

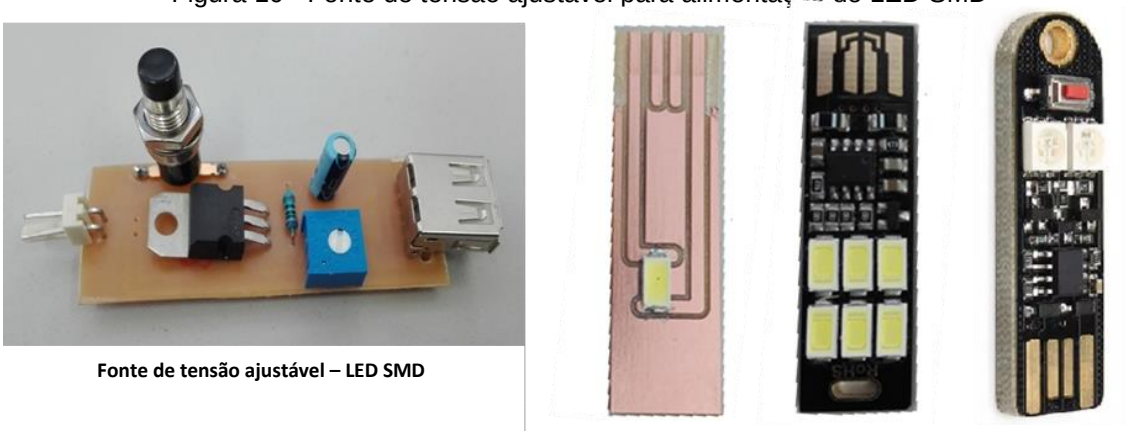
Figura 9 - Fonte de tensão ajustável para alimentação do LED convencional de 5 mm e suportes para acoplamento, frontal e superior, no dispositivo 3D

Fonte de tensão ajustável – LED convencional

Suporte para acoplamento do LED convencional

Fonte: Danchana (2020).

Figura 10 - Fonte de tensão ajustável para alimentação do LED SMD



Fonte de tensão ajustável – LED SMD

LED SMD branco – Card produzido no laboratório

LED SMD branco – comercial

LED SMD monocromático – comercial

Fonte: Danchana (2020).

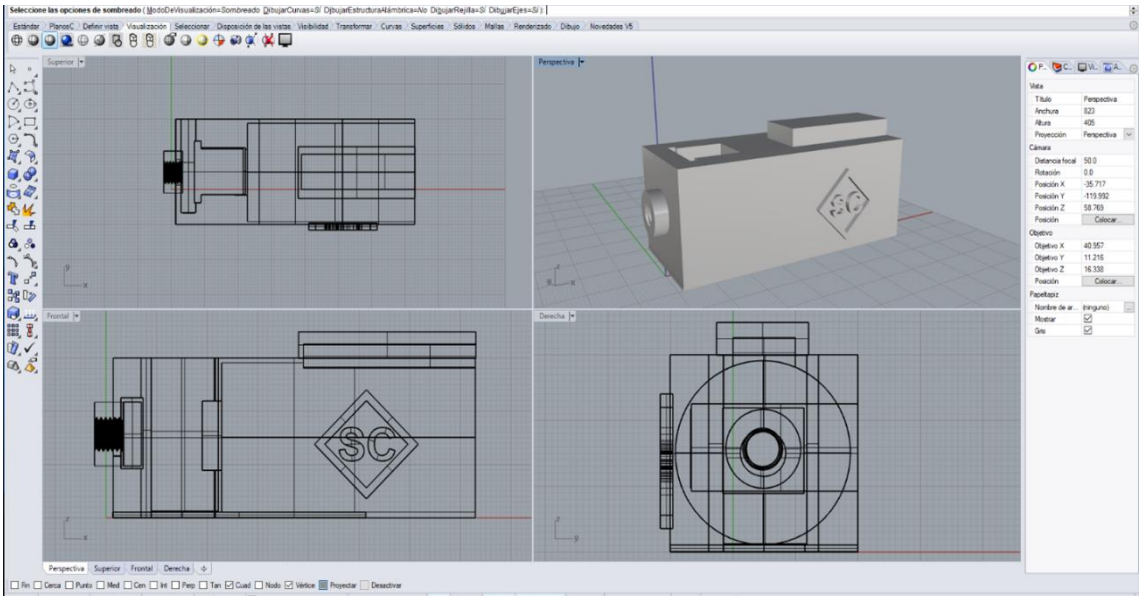
2.3.2.2 Dispositivo de captura de imagem - Webcam

No sistema proposto, um dispositivo de captura de imagem desenvolve a função de detecção. Deste modo, utilizou-se uma câmera webcam Microsoft, Lifecam Cinema 720p HD, acoplada ao dispositivo 3D.

2.3.2.3 Dispositivo 3D

Um dispositivo (10 x 5 x 4.5 cm), para acomodação da webcam, fonte de radiação e cubeta, foi desenvolvido nas dimensões apropriadas, considerando todos os componentes do sistema. O design do dispositivo foi criado com o auxílio do programa Rhinoceros 5 [72], com layout exibido na Figura 11.

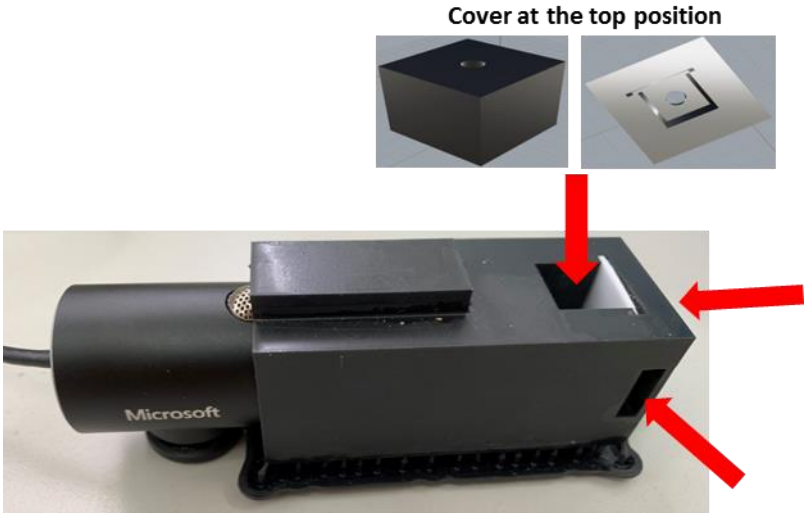
Figura 11 - Design do dispositivo 3D criado com o programa Rhinoceros 5



Fonte: Danchana (2020).

O arquivo, em formato adequado, foi enviado para impressão, em uma impressora 3D estereolitográfica (FormsLabs 2+), com resina de metacrilato preta. Uma imagem do dispositivo final é apresentada na Figura 12.

Figura 12- Imagem do dispositivo impresso em 3D com a webcam acoplada e setas vermelhas indicando possíveis posições para a fonte de radiação



Fonte: Danchana (2020).

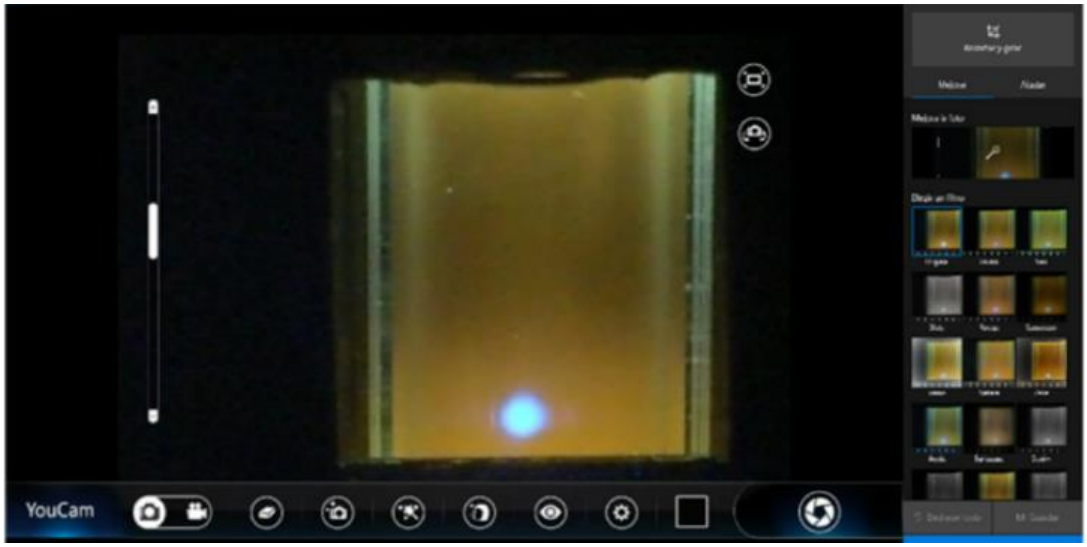
No momento da impressão, selecionou-se a opção com suporte, visando fornecer uma maior estabilidade ao sistema. Após impressão, o dispositivo foi lavado com álcool isopropílico (Scharlau, Espanha), para remoção de resina líquida, e transferido para um reticulador ultravioleta, modelo UVP CL – 1000, para secagem do material.

2.3.3 Aquisição e análise da imagem digital

Na aplicação do sistema, diferentes softwares disponíveis gratuitamente foram utilizados; incluindo o YouCam [73], na etapa de captura das imagens, e o ImageJ [74], no processamento das imagens.

Após preparo dos brancos, padrões analíticos e amostras, posicionou-se a cubeta contendo a solução no porta-cubeta, do dispositivo 3D, e imagens em triplicatas foram obtidas, como mostra a Figura 13.

Figura 13 - Imagem das soluções obtidas com o programa YouCam



Fonte: Danchana (2020).

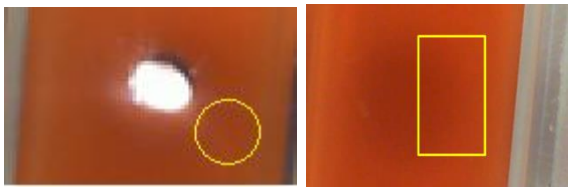
As imagens foram registradas em diferentes condições do sistema, modificando-se o tipo de LED, como mencionado anteriormente, e sua posição; fonte de radiação alinhada ao detector e na parte superior da cubeta. A intensidade da fonte de radiação foi verificada em termos qualitativos como baixa, média e alta intensidade, fazendo uso do botão de controle na fonte de tensão ajustável.

Visando adquirir informações numéricas a partir dos dados de cor, as imagens foram transferidas para o programa ImageJ [74] do National Institutes of Health e do Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI), Universidade de Wisconsin, Madison, Estados Unidos.

Utilizando-se as ferramentas disponíveis no layout do referido programa, as seguintes regiões de interesse (ROI), Figura 14, foram selecionadas: (i) LED posicionado no topo da cubeta, ROI retangular, coordenadas x169/y36 (ponto central superior da figura geométrica) e x169/y170 (ponto central inferior da figura geométrica); (ii) LED alinhado ao detector, ROI circular, coordenadas

x109/y46 (ponto central superior da figura geométrica) e x109/y79 (ponto central inferior da figura geométrica).

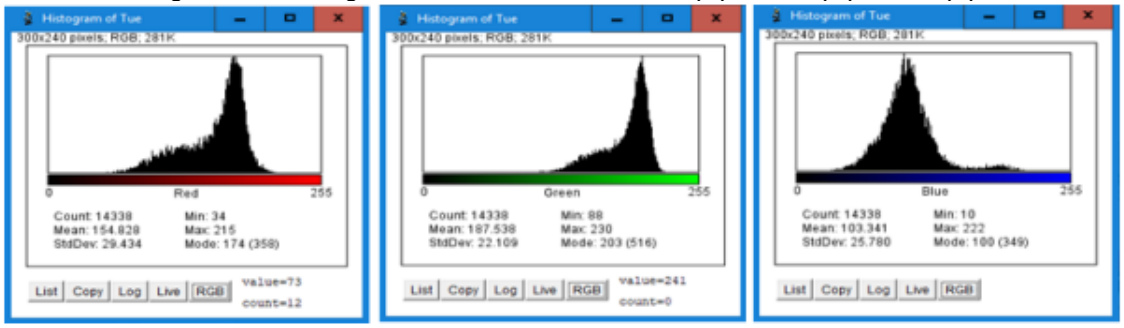
Figura 14 - Áreas selecionadas com o programa ImageJ para a deconvolução de cores RGB. À esquerda para a iluminação alinhada ao detector, à direita para as imagens obtidas com a iluminação superior



Fonte: Danchana (2020).

Em seguida, tomou-se nota das intensidades dos canais vermelho, verde e azul, a partir dos histogramas (Figura 15) obtidos. As intensidades dos canais foram empregadas na construção do sinal analítico, aplicando-se o processamento matemático absorvância efetiva.

Figura 15 - Histogramas dos canais vermelho (R), verde (G) e azul (B)



Fonte: Danchana (2020).

2.3.4 Aplicação analítica

Buscando-se verificar pontos para otimização e melhoria, uma avaliação preliminar do sistema espectrofotométrico proposto foi realizada com as determinações de ferro (II), empregando orto-fenantrolina como reagente cromogênico para formação de um complexo de cor vermelha, e hipoclorito, fazendo uso do reagente tetrametilbenzidina, originando um complexo de cor amarela.

Para determinação de Fe (II), as seguintes soluções foram preparadas:

a. Solução tampão acetato, 0,2 mol L^{-1}, pH 4,5;
b. Orto-fenantrolina 0,002 mol L^{-1} em solução tampão;
c. 0,5% de cloridrato de hidroxilamina ($HONH_2 \cdot HCl$), Scharlau, Espanha;
d. 100 mg L^{-1} de Fe (II) (Sulfato de amônio e ferro (II), $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H2O$, Prolabo, França) em 0,5% de cloridrato de hidroxilamina;

e. Soluções padrão de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg L^{-1} foram preparadas e uma mistura com o-fenantrolina, na proporção 1:1, foi realizada.

Para determinação de hipoclorito, utilizou-se os seguintes reagentes e soluções:

a. Solução de 200 mg L^{-1} de hipoclorito de sódio, preparado a partir de uma solução concentrada de 5%. Padrões analítico na faixa de 0,1 a 2 mg L^{-1};
b. 0,1 mmol L^{-1} de tetrametilbenzidina foi preparada dissolvendo-se 5 mg de 3,3'5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma, EUA) em 500 µL de N, N – dimetilformamida concentrada (Scharlau, Espanha). A mistura foi preparada para um volume final de 200 mL, contendo 0,05 mol L^{-1} de H_3PO_4 e HCl (Scharlau, Espanha)
c. Mistura da solução padrão com tetrametilbenzidina na proporção 1:1.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O design do dispositivo é baseado na estrutura de um espectrofotômetro convencional. Assim, o protótipo inicial já incluía o acoplamento do detector (webcam), fonte de radiação e porta-cubeta; sendo modificado no processo de desenvolvimento para adequado uso dos componentes já mencionados.

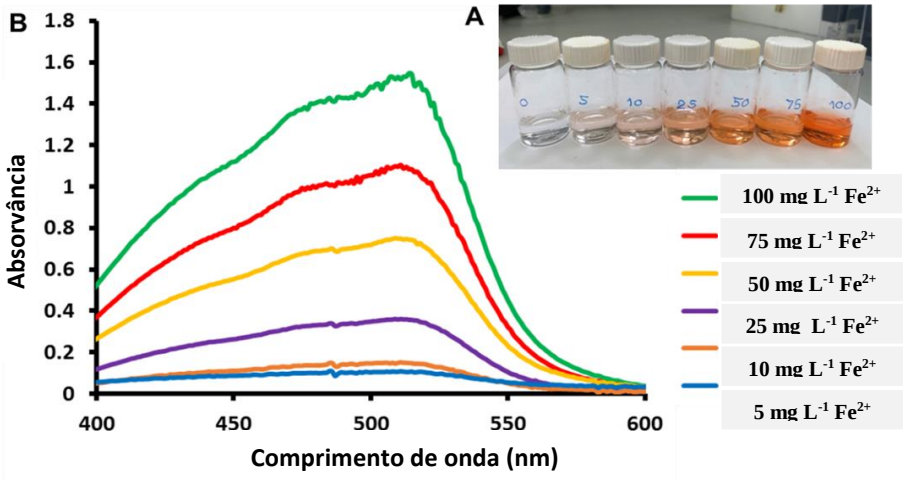
A construção da fonte de tensão ajustável foi feita por pesquisadores parceiros do Grupo de Química Analítica, Automatização e Meio ambiente da Universidade das Ilhas Baleares, coordenado pelo professor Víctor Cerdà Martín, funcionando satisfatoriamente no sistema proposto. Trata-se de um ponto passível de melhoria, na fonte de tensão ajustável, o controle quantitativo da intensidade da fonte de radiação.

O estudo apresentado neste capítulo foi publicado no ano de 2020, na revista científica Talanta, com o título “Spectrophotometric system based on a device created by 3D printing for the accommodation of a webcam chamber as a detection system” [75].

2.4.1 Determinação de ferro (II)

Buscando-se uma avaliação preliminar, o sistema foi empregado na determinação de ferro (II), utilizando-se o reagente cromogênico orto-fenantrolina. Na Figura 16 é possível observar uma imagem das soluções preparadas, sendo notório a graduação de cores de acordo com a variação da concentração. Os espectros das referidas soluções, obtidos através de um espectrofotômetro convencional, também é apresentado.

Figura 16 - A) Soluções de 0 a 100 mg L^{-1} do complexo Fe (II) com o-fenantrolina, B) espectros das soluções



Fonte: Danchana (2020).

Visando analisar fatores que influenciam o desempenho do sistema, diferentes tipos de LEDs, convencional de 5 mm e SMD, branco e monocromático, em diferentes posições, foram verificados.

Primeiramente, utilizando as soluções preparadas para construção da curva analítica, avaliou-se o emprego de um LED convencional de 5 mm, branco, em diferentes posições: (i) na parte frontal do dispositivo 3D, alinhado com o detector (webcam), e (ii) na parte superior do sistema, no topo da cubeta. Representações esquemáticas das condições analisadas, ao que se refere a posição da fonte de radiação, são apresentadas na Figura 17.

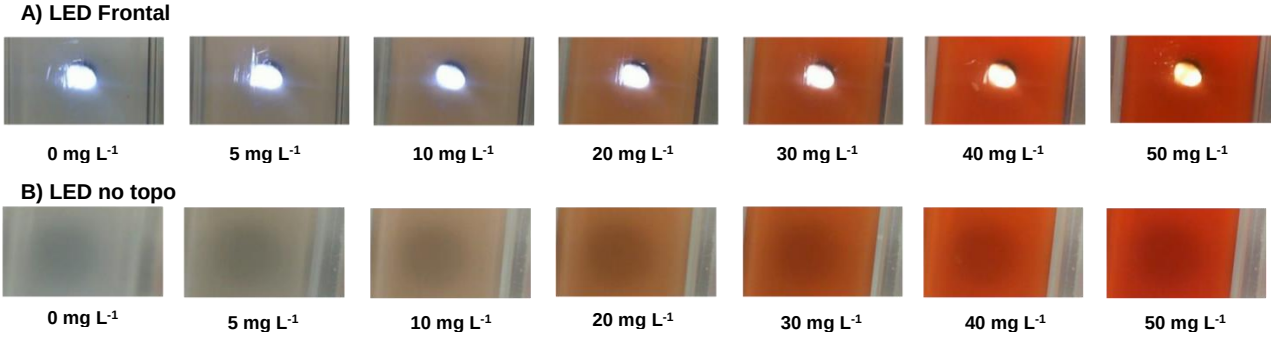
Figura 17 - Representações esquemáticas das condições do sistema para estudo do melhor posicionamento da fonte de radiação, A) LED na posição frontal (alinhado com o detector) e B) LED no topo (posicionado na parte superior da cubeta)

Fonte: Danchana (2020).

Configurou-se a fonte de tensão ajustável para baixa intensidade na condição de análise em que o LED encontrava-se em posição frontal. Como mostra a Figura 18A, nesta posição, um ponto de luminosidade proveniente do LED é observado na captura da imagem. Uma maior intensidade da fonte de radiação resultou em uma maior interferência da referida luminosidade; limitando, assim, a região disponível para uma adequada análise dos dados de cor.

Uma alta intensidade foi aplicada quando posicionou-se o LED no topo do dispositivo e as imagens apresentadas na Figura 18B foram capturadas. Uma configuração da fonte de tensão em baixa intensidade, para o LED posicionado no topo da cubeta, não apresentou uma iluminação adequada para o sistema.

Figura 18 – Recorte das imagens dos padrões analíticos, A) utilizando o LED alinhado com o detector e B) LED posicionado no topo da cubeta



Fonte: Danchana (2020).

As informações do espaço de cor RGB, em termos das intensidades dos canais, foram inseridas em uma planilha Excel e o sinal analítico foi construído empregando-se o processamento matemático absorvância efetiva [44], em conformidade com a lei de Lambert Beer, expresso pela equação 14.

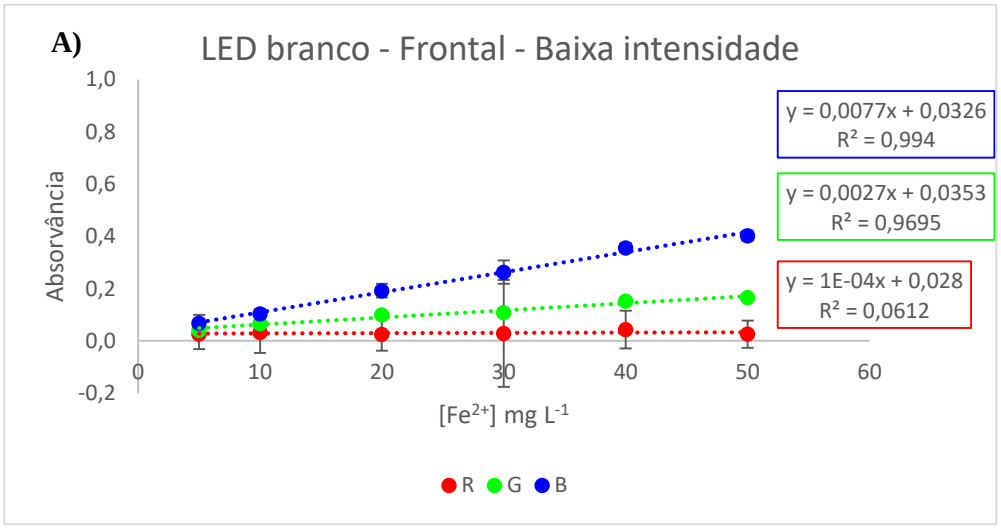
$$EA_{RGB} = -Log\left(\frac{RGB_s}{RGB_b}\right) \qquad (14)$$

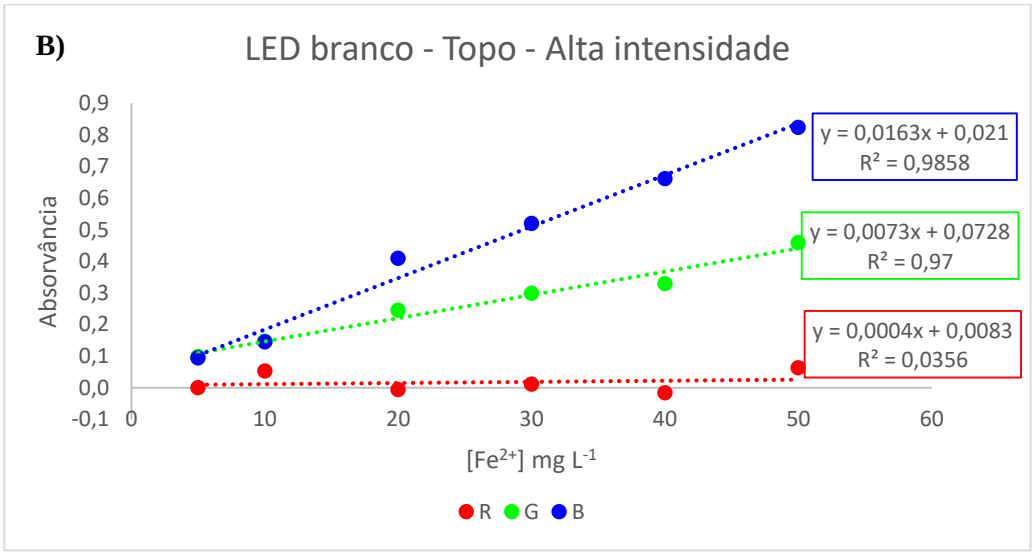
Onde EA_{RGB} é a absorvância efetiva para o canal R, G ou B; RGB_s é o valor médio do canal R, G ou B do padrão analítico e/ou amostra e RGB_b é o valor médio do canal R, G ou B do branco analítico.

Como mostra as curvas analíticas na Figura 19, as intensidades do canal R, em todas as condições analisadas, não apresentaram correlação significativa com a variação da concentração do analito, não sendo uma opção viável para construção do sinal analítico.

Os dados dos canais G e B apresentaram um comportamento satisfatório e semelhante na correlação com a concentração de Fe(II), sendo possível observar que o canal B apresentou maior sensibilidade. Este comportamento foi observado por Neto et al [20] e Porto et al [8] em estudos envolvendo determinações de Fe(II) com o reagente cromogênico orto-fenantrolina, empregando análise de imagem digital.

Figura 19 - Curvas analíticas construídas a partir das intensidades RGB, A) LED branco em posição frontal e baixa intensidade, B) LED branco posicionado no topo da cubeta e alta intensidade





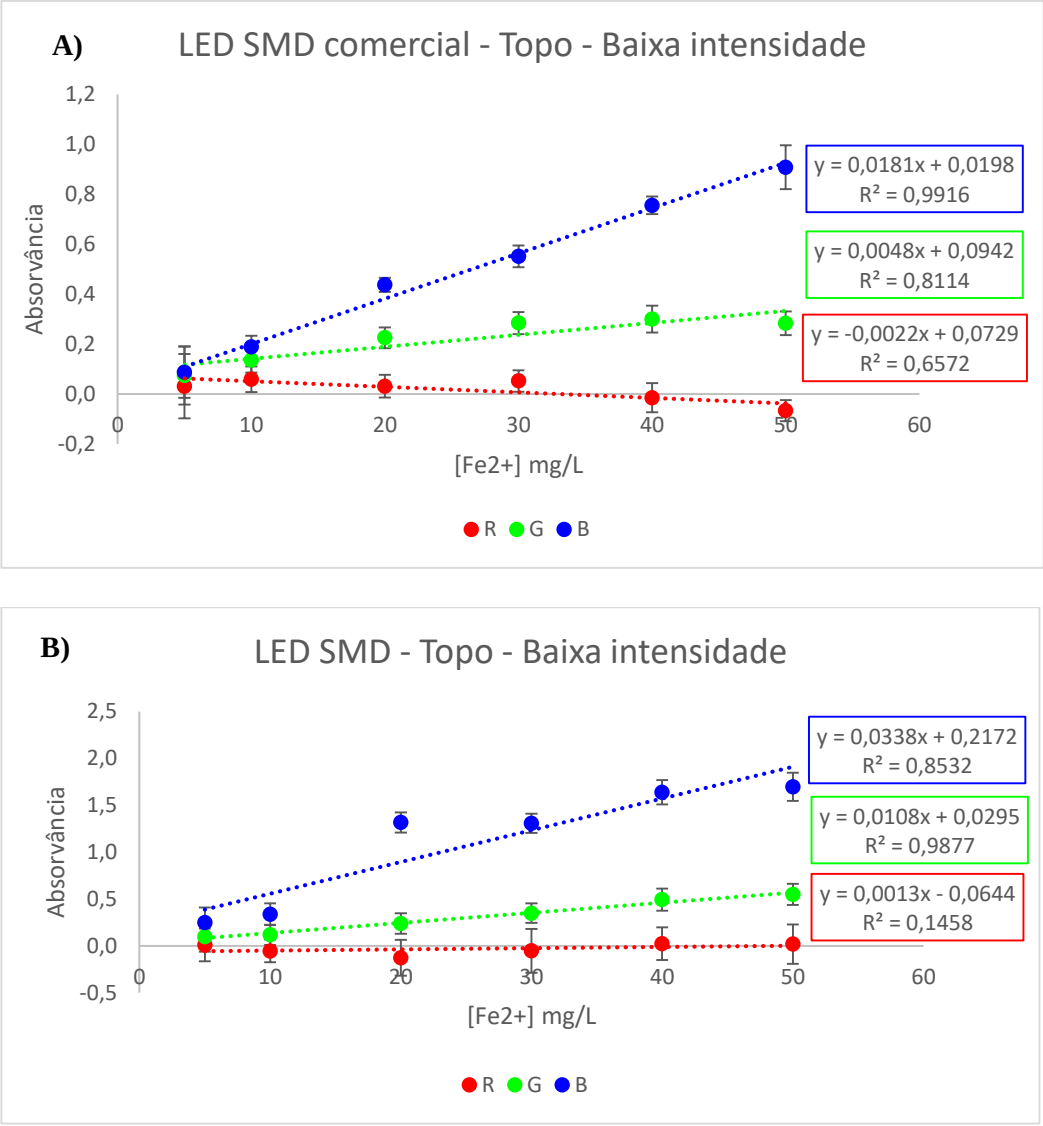
Fonte: Elaborado pela autora.

Dentre as duas primeiras condições estudadas, o sistema apresentou melhor desempenho estando a fonte de radiação posicionada no topo do sistema, parte superior da cubeta, com fonte de tensão ajustada para alta intensidade.

Em seguida, verificou-se a utilização de LEDs SMD posicionados no topo do sistema. Considerando a alta luminosidade de LEDs desta natureza, o sistema foi operado com a fonte de radiação em baixa intensidade, empregando-se um LED SMD branco disponível comercialmente e um LED SMD produzido no laboratório do Grupo de Química Analítica, Automatização e Meio ambiente da Universidade das Ilhas Baleares.

Analisando os resultados obtidos e as curvas analíticas, apresentadas na Figura 20, verificou-se que o sinal analítico foi superestimado com o uso do LED SMD confeccionado no laboratório. No que tange o comportamento das intensidades dos canais RGB para construção da curva analítica, o canal azul continua apresentando melhor desempenho.

Figura 20 - Curvas analíticas construídas a partir das intensidades RGB quando LEDs SMD foram utilizados como fonte de radiação, com baixa intensidade, posicionados no topo da cubeta. A) LED SMD comercial e B) LED SMD confeccionado no laboratório

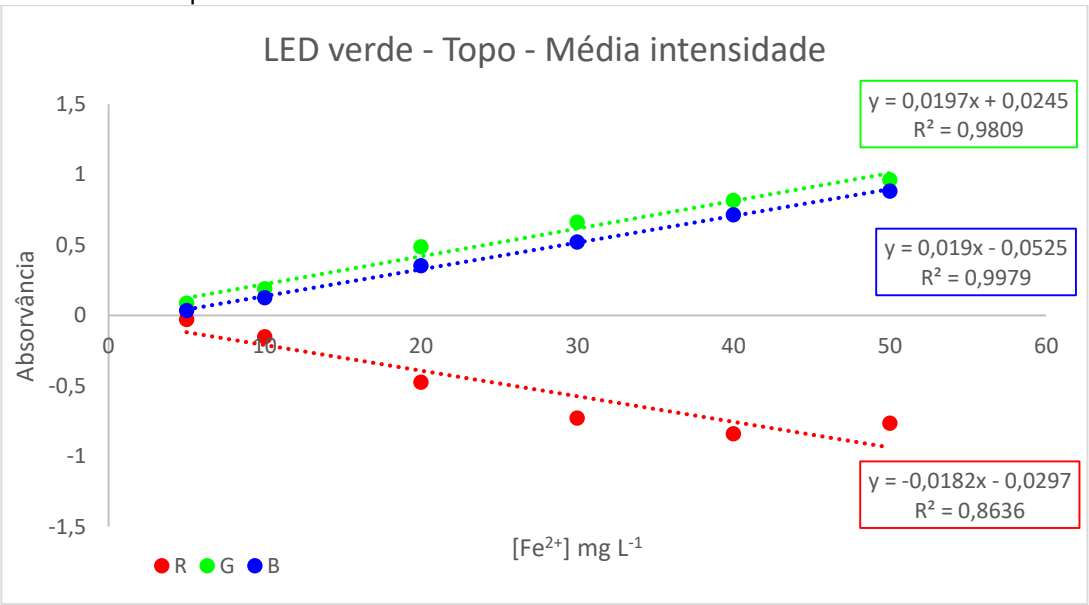


Fonte: Elaborado pela autora.

Considerando a coloração vermelha do complexo resultante da reação em estudo e a relação de complementaridade das cores, um LED verde foi empregado na análise de LEDs monocromáticos. Assim, posicionou-se o LED convencional de 5 mm, no topo do sistema, com a fonte de tensão ajustada para

média intensidade e as intensidades RGB extraídas das imagens foram utilizadas para construção das curvas analíticas apresentadas na Figura 21.

Figura 21 - Curvas analíticas construídas a partir da configuração do sistema utilizando um LED verde posicionado no topo da cubeta com média intensidade da fonte de tensão



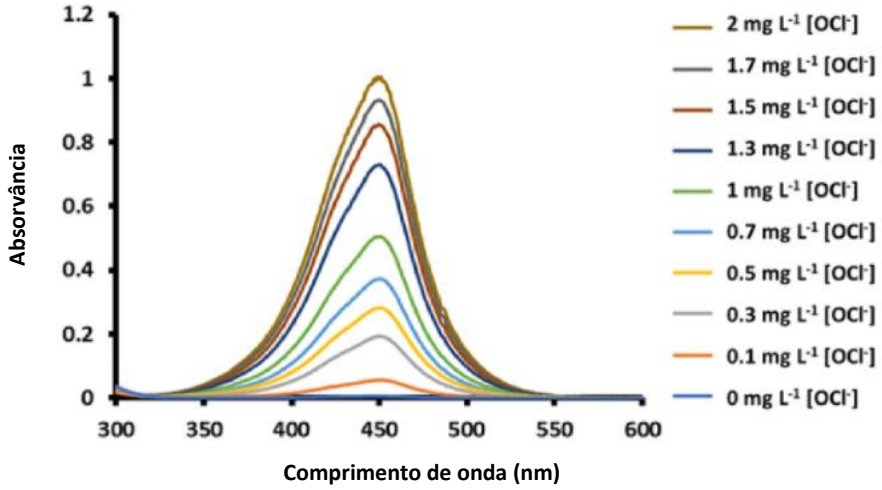
Fonte: Elaborado pela autora.

De modo geral, um melhor desempenho foi observado empregando-se o LED verde, posicionado no topo da cubeta e intensidade média da fonte de tensão ajustável. Referente a escolha do canal para tratamento dos dados, os valores do canal vermelho não apresentaram correlação significativa com as concentrações, enquanto resultados satisfatórios, e de comportamento próximo, foram obtidos com os canais verde e azul. O canal azul, por apresentar melhores características analíticas, foi selecionado para análise.

2.4.2 Determinação de hipoclorito

Para determinação do hipoclorito, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina foi utilizado como reagente cromogênico, por ser sensível, específico ao analito de interesse e menos nocivo. A Figura 22 mostra os espectros de absorção obtidos a partir de um espectrofotômetro convencional, com leitura realizada no comprimento de onda de 445 nm, máxima absorção para o complexo em estudo.

Figura 22 - Espectros de absorção do complexo hipoclorito e tetrametilbenzidina



Fonte: Danchana (2020)

O mesmo procedimento de captura e tratamento das imagens aplicado anteriormente, para a determinação de Fe (II), foi utilizado. A posição da fonte de radiação selecionada foi na parte superior da cubeta, com emprego do LED de cor azul. Observando-se as curvas analíticas, os canais G e B apresentaram melhor desempenho para construção do sinal analítico.

A determinação de hipoclorito foi incluída, no estudo preliminar, visando analisar o comportamento do sistema na análise colorimétrica de complexos de cores distintas. Buscando, assim, ampliar as possibilidades de aplicações analíticas.

2.4.3 Validação do método

A Tabela 2 apresenta parâmetros analíticos dos dois métodos testados e permite a comparação dos resultados obtidos usando o sistema proposto neste trabalho com os resultados adquiridos com um espectrofotômetro convencional.

Tabela 2- Parâmetros analíticos

Parâmetros analíticos	**Determinação de ferro (II)**		**Determinação de hipoclorito**	
	Webcam / LED verde	**Espectrofotômetro 510 nm**	**Webcam / LED azul**	**Espectrofotômetro 445 nm**
Curva analítica	A = 0,011 [Fe^{2+}] + 0,0069	A = 0,009 [Fe^{2+}] + 0,0012	A = 0,5361 [OCl^-] – 0,021	A = 0,5442 [OCl^-] + 0,011
Coeficiente de determinação (R^2)	0,998	0,999	0,994	0,998
Faixa de linearidade	0-50 mg L^{-1}	0-50 mg L^{-1}	0-1,7 mg L^{-1}	0-2 mg L^{-1}
LOD (3Ɗ)	2,95 mg L^{-1}	0,52 mg L^{-1}	0,15 mg L^{-1}	0,10 mg L^{-1}
LOQ (10Ɗ)	9,84 mg L^{-1}	1,72 mg L^{-1}	0,50 mg L^{-1}	0,34 mg L^{-1}
Repetibilidade (%DPR)	3,5%	1,0%	1,6%	0,5%

Fonte: Adaptado de Danchana (2020).

Tratando-se de uma análise preliminar, o sistema proposto se apresenta como uma alternativa aos métodos convencionais. Para determinação de hipoclorito, o método apresenta desempenho satisfatório, com limites de detecção e quantificação próximos do método de referência, principalmente ao serem consideradas as vantagens de portabilidade, baixo custo e fácil manuseio.

Na determinação de ferro (II), observou-se uma diferença significativa entre os limites de detecção e quantificação do método proposto e do método de referência. Identificou-se elevados valores de desvio padrão na triplicata de algumas imagens, indicando problemas na estabilidade do sistema, sendo necessário maiores estudos neste aspecto.

2.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

É válido destacar que o objetivo principal deste estudo foi o desenvolvimento de um sistema espectrofotométrico portátil e de fácil alimentação baseado na análise de imagem digital, estando as aplicações analíticas direcionadas, neste momento, para avaliação preliminar de desempenho do sistema proposto, visando aprimorar suas potencialidades.

O emprego da fonte de tensão ajustável, a alimentação por portas USB de um computador e o tamanho do dispositivo 3D, imprime no sistema um potencial notável, no que tange a portabilidade, para aplicações em análises espectrofotométricas gerais e, especialmente, *in situ.*

O desempenho analítico do sistema se relaciona diretamente com a definição de alguns fatores como fonte de radiação, intensidade de radiação, posicionamento da fonte de radiação, escolha dos dados de cor e processamento matemático para construção do sinal analítico. Embora o design desenvolvido tenha considerado, em suas dimensões, o acoplamento da webcam, o uso combinado do programa Rhinoceros e da impressora 3D permite uma adaptação rápida para uso de outros dispositivos de captura.

Considerando que a troca manual da cubeta, entre uma amostra e outra, pode interferir na estabilidade do sistema e demanda um cuidado extra, principalmente quando a fonte de radiação se localiza no topo da cubeta, a combinação da análise em fluxo com o sistema proposto é um aspecto a ser investigado, visando melhorar a repetibilidade do sistema e frequência analítica.

Estudos analíticos, empregando o sistema proposto, foram interrompidos com a suspensão das atividades presenciais provocada pelo cenário de pandemia causado pelo novo coronavírus, desde março de 2020. O estudo e otimização dos fatores que influenciam a análise de imagem digital, em conjunto com os interesses analíticos, são pontos determinantes para o desempenho satisfatório do sistema.

Capítulo 3

DETERMINAÇÃO DE MARCADOR EXTERNO, DIÓXIDO DE TITÂNIO, EM FEZES BOVINAS EMPREGANDO ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL

3.1 INTRODUÇÃO

A avaliação do valor nutritivo dos alimentos consumidos por ruminantes em condições de pastejo ou confinados tem sido um desafio no acompanhamento da nutrição animal, sendo a digestibilidade um fator determinante para o processo [76, 77].

A digestibilidade de uma dieta na nutrição animal de um ruminante é baseada na indigestibilidade aparente. Portanto, a excreção fecal é um parâmetro básico de indigestibilidade de um alimento e/ou dieta, pois representa, aparentemente, a porção de comida ingerida que não foi utilizada durante a passagem pelo trato gastrointestinal [78, 79].

A coleta total de fezes é um procedimento difícil de ser feito em bovinos, por motivos como o volume e a consistência. Com isto, métodos indiretos para estimativa da massa fecal, como o uso de marcadores de digestibilidade, são frequentemente empregados [80].

Há diferentes tipos de marcadores que podem ser classificados em externos e internos. Os externos referem-se aos marcadores que são administrados ao animal, como o óxido de cromo (Cr_2O_3) e o dióxido de titânio (TiO_2), e os internos estão naturalmente presentes no alimento ofertado; incluindo, por exemplo, Matéria Seca Indigestível (MSi), Fibra em Detergente Neutro Indigestível (FDNi), Fibra em Detergente Ácido Indigestível (FDAi), entre outros [76, 81, 82].

Diversos estudos envolvendo digestibilidade, reportados na literatura, empregam marcadores externos. Para tal finalidade, faz-se necessário que o composto utilizado não interaja com a dieta/alimento e não interfira nos eventos do trato gastrointestinal. Uma alta e constante recuperação nas fezes também é um fator crucial [80, 83].

O Cr_2O_3 é o marcador externo mais utilizado em ensaios bovinos. Por questões legais, em relação à aplicação, o uso deste marcador não é aprovado para alimentação humana ou animal pela *Food and Drug Administration* (FDA) e, isto posto, outros marcadores externos são constantemente avaliados [81].

Um marcador externo indigestível que pode ser usado para estimar a digestibilidade das dietas de ruminantes é o TiO_2, que se apresenta como uma alternativa ao Cr_2O_3. O TiO_2 pode ser adicionado legalmente em produtos para

alimentação humana, como aditivo de cor, e não tem limitação quanto à sua inclusão na alimentação animal [81, 84, 85].

O protocolo de administração do marcador externo pode ser feito misturando-se o composto com o alimento que será ofertado; direcionando o consumo em comedouros [81], em cápsulas de celulose [77], por cânulas [86] ou sonda esofágica [80]. A dose do marcador é fornecida de acordo com o objetivo do estudo, sendo comumente analisado o teor de 10 mg por dia, para cada animal [80].

Titgemeyer e colaboradores [81] conduziram experimentos buscando avaliar se o TiO_2 é um marcador de digestibilidade apropriado para gado alimentado com dietas à base de forragem e grãos. No estudo, analisou-se fatores como: ração, suplemento, adaptação à dieta, períodos de alimentação e coleta das amostras, resultando em recuperações fecais de 90 a 95%.

Sampaio e colaboradores [80], em seu trabalho de estimativa da recuperação fecal de marcadores externos e internos, analisando o viés de longo prazo, em um ensaio de digestibilidade com bovinos alimentados com dietas diferentes, concluíram que o dióxido de titânio pode ser seguramente usado como substituto do óxido de cromo já que sua recuperação não é afetada por diferentes condições de alimentação.

Visando os poucos estudos empregando TiO_2 como um marcador de digestibilidade para ruminantes, Myers e colaboradores [82] desenvolveram um procedimento espectrofotométrico rápido e preciso para preparação e determinação das concentrações de TiO_2 em amostras de matéria orgânica; obtendo uma média de recuperação de 97,56%.

Uma etapa crucial na verificação das características ideais de um composto, candidato a marcador externo, é a avaliação de sua recuperação após a passagem pelo trato gastrointestinal [87]. Assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de novos procedimentos para o preparo e determinação de TiO_2 em amostras de fezes bovina.

A análise de imagem digital vem sendo aplicada em determinações espectrofotométricas, como uma alternativa ao uso do espectrofotômetro convencional [8, 64, 88]. Embora já existam sistemas espectrofotométricos miniaturizados, disponíveis comercialmente, a introdução dos sistemas digitais

oferece alternativas inovadoras, econômicas, versáteis e fáceis de transportar, que fazem uso de dispositivos acessíveis como detector [20, 40, 89-92].

Dentre as vantagens características da DIA, a portabilidade merece destaque na viabilização de análises rápidas e *in situ,* com resultados analíticos satisfatórios [93]. Para tanto, é necessário o desenvolvimento de sistemas que possibilitem a aquisição das imagens, de forma individualizada [20] ou múltiplas amostras por vez [39], em um ambiente com controle de iluminação e condições reprodutíveis.

Considerando a vertente de portabilidade e as vantagens de sistemas compactos e de fácil alimentação, este trabalho emprega um sistema espectrofotométrico com um dispositivo impresso em 3D, baseado na análise de imagem digital, alimentado por Portas Serial Universal (USB) de um computador. A aplicação do sistema foi realizada em parceria com o Laboratório de Nutrição Animal (LANA), situado na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Campus Ondina, Salvador-Ba.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

- Determinar o teor do marcador externo, dióxido de titânio (TiO_2), em amostras de fezes bovina empregando análise de imagem digital.

3.2.2 Objetivos específicos

- Analisar diferentes processamentos matemáticos dos dados de cor para construção do sinal analítico;
- Desenvolver um método simples e rápido que possibilite análises i*n situ*;
- Aplicar a metodologia proposta para determinação de TiO_2 em amostras de fezes bovina.

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Aquisição e pré-tratamento das amostras de fezes bovina

As amostras de fezes bovina, com e sem o marcador externo TiO_2, foram adquiridas a partir de ensaios com ruminantes realizados na Fazenda Experimental de São Gonçalo dos Campos (FESGC), localizada no distrito de Sergi Mercê, município de São Gonçalo dos Campos, no Recôncavo Baiano, a 110 Km de Salvador-Ba.

As amostras foram previamente secas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 55 °C, por 48 horas; em seguida, foram moídas com o auxílio de um moinho tipo Wiley, modelo 4, peneira de 1 mm. Devidamente armazenadas e identificadas, as amostras foram transportadas para o Laboratório do Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria (GRPQQ), localizado no Instituto de Química (IQ) da UFBA, Campus Ondina.

3.3.2 Materiais e reagentes

Todas as vidrarias e materiais utilizados foram previamente descontaminados em um processo envolvendo as seguintes etapas: (1) lavagem com detergente neutro, (2) enxague com água corrente, (3) enxague com água deionizada, (4) banho de ácido nítrico 10 % (v/v) por 24h, (5) enxague com água deionizada e (6) secagem à temperatura ambiente.

Os reagentes, de grau P.A, dióxido de titânio (TiO_2), sulfato de potássio (K_2SO_4), sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4.5H_2O$), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, foram utilizados.

3.3.3 Preparo de amostra

O procedimento analítico empregado no preparo das amostras e determinação de TiO_2, descrito a seguir, foi desenvolvido por Myers e colaboradores [82], sendo o método de referência utilizado em análises desta natureza no LANA.

1. Com o auxílio de uma balança analítica, pesou-se 0,5 g de amostra de fezes bovina, com o marcador TiO_2, em tubos de digestão Kjeldahl. Utilizou-se também uma amostra de fezes de animais do grupo de acompanhamento que não receberam o marcador;

2. Uma mistura catalítica contendo 3,5 gramas de K_2SO_4 e 0,4 g de $CuSO_4.5H_2O$ foi adicionada em cada tubo;
3. Adicionou-se 13 mL de H_2SO_4 concentrado e prosseguiu-se a digestão, em bloco digestor Tecnal com controle Wi-Fi (modelo TE 040/25), por 2 horas a 420 °C. Buscando evitar projeção da mistura, elevou-se a temperatura gradativamente;
4. Após digestão, o sistema foi resfriado em temperatura ambiente e adicionou-se 10 mL de H_2O_2 30% (v/v);
5. A mistura foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume aferindo com água deionizada;
6. A absorvância foi medida a 410 nm em um espectrofotômetro de absorção molecular, QUIMIS G798U (Diadema, São Paulo).

O procedimento descrito foi aplicado no preparo e leitura dos brancos, padrões analíticos e amostras. A curva analítica construída foi de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg 100 g^{-1} a partir do padrão de TiO_2.

3.3.4 Análise de imagem digital

Após leitura no espectrofotômetro, as cubetas contendo brancos, padrões e amostras foram condicionadas no sistema de análise de imagem digital apresentado no capítulo anterior. Utilizando um LED branco, fonte de tensão em intensidade máxima, posicionado na parte superior da cubeta, imagens em triplicata foram capturadas.

Através do software de captura do computador utilizado, as imagens foram compactadas em JPEG (1280x720 pixels) e transferidas para o software de processamento de imagens, Chemostat (versão: V2 030918.d3e5d19) [94]. Em seguida, selecionou-se as configurações de corte da imagem, ROI no pixel central (tamanho 50x50), coordenadas x-13 e y-22. Os dados de cor, intensidades dos canais RGB e os histogramas, foram obtidos.

3.3.5 Processamento matemático dos dados de cor

Em posse dos valores das intensidades de R, G e B, visando a construção do sinal analítico, os seguintes processamentos matemáticos foram avaliados: (1) absorvância efetiva, (2) cor relativa, (3) norma vetor e (4) o processamento que considera a diferença entre a intensidade máxima (255) e a intensidade

observada. A expressão matemática de cada processamento pode ser visualizada na Tabela 3.

Tabela 3 - Processamentos matemáticos analisados na construção do sinal analítico a partir dos dados de cor RGB

Processamento	Expressão matemática	
Absorvância efetiva	$\boldsymbol{S = -\log \frac{P}{P_0}}$	(15)
Cor relativa	$\boldsymbol{S = \frac{R, G\ ou\ B}{R + G + B}}$	(16)
Norma vetor	$\boldsymbol{\| v \| = \sqrt{R_{s-b}^2 + G_{s-b}^2 + B_{s-b}^2}}$	(9)
Diferença entre a intensidade máxima e a intensidade observada	$\boldsymbol{S = 255 - R\ (G\ ou\ B)}$	(17)

Fonte: Adaptado de Porto (2019), Rajeev (2021) e Lyra (2009) [8, 9, 17].
Nota:
(1) S: sinal analítico, P: intensidade RGB do padrão analítico e/ou amostra, P_0: intensidade RGB do branco analítico, RGB: intensidades dos canais, v: norma vetor, s-b: diferença entre a intensidade do canal do padrão analítico/amostra e o branco.

3.3.6 Validação e aplicação

Os seguintes parâmetros analíticos foram analisados na etapa de validação: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. A metodologia proposta foi aplicada na determinação de TiO_2 em cinco amostras de fezes bovina.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Preparo de amostra

Após digestão, observou-se que o digerido apresentava uma coloração verde/azulada (Figura 23) cuja intensidade diminuiu, em pequena escala, com o resfriamento à temperatura ambiente. É valido inferir que esta coloração se relaciona ao $CuSO_4.5H_2O$ presente na mistura catalítica utilizada no processo de preparo. Com a adição do H_2O_2, observou-se que os brancos apresentavam a coloração verde/azulada e as amostras/padrões analíticos variavam entre uma intensidade média de verde a uma cor laranja intensa, dependendo da concentração de TiO_2.

Figura 23- Teste do procedimento de preparo das amostras de fezes bovina, contendo dióxido de titânio, (a) ao fim do processo de digestão e (b) logo após adição de H_2O_2, sem homogeneização

Fonte: acervo da autora.

Este comportamento foi relatado por Myers e colaboradores [82]. Mas, considerando que verde e laranja possuem diferentes comprimentos de onda no espectro eletromagnético e, no que tange a análise de imagem digital com o espaço de cor RGB, apresentam cor correspondente distintas que refletem em diferentes intensidades dos canais vermelho, verde e azul, não foi observado interferência nos resultados.

A cor laranja/amarela utilizada como parâmetro para extração de dados matemáticos e construção do sinal analítico é característica da reação, em pH baixo, entre TiO_2 e H_2O_2 [95]. Snell e Snell sugeriram que a espécie mais provável, resultante desta mistura, é H_4TiO_5; Vogel et al. [82] propuseram que o

íon $TiO_2(SO_4)^{2-}$ é formado e ambos os compostos podem estar presentes, com a reação inicial formando H_4TiO_5 que se dissocia em $TiO_2(SO_4)^{2-}$.

3.4.2 Processamento matemático dos dados de cor

A partir de uma análise preliminar dos dados de intensidades dos canais RGB, descritos na Tabela 4, verificou-se que os canais G e B apresentaram uma significativa variação dos dados de intensidade com o aumento da concentração de TiO_2, na faixa de trabalho estudada.

Tabela 4 - Intensidades RGB dos brancos e padrões analíticos em triplicata

Concentração (mg 100 g^{-1})	R	G	B
0	178,6459	181,2137	110,5126
2,0	178,2615	174,3704	72,6722
4,0	176,6504	171,3581	44,2363
6,0	178,3244	162,2622	29,7174
8,0	177,3404	128,3385	18,6211
10	178,6978	111,7500	12,5767

Fonte: Elaborado pela autora.

O canal R não apresentou variação significativa nas intensidades. Assim, os valores de R foram analisados apenas no processamento matemático norma vetor, equação 17. Para os demais processamentos, considerou-se as intensidades de G e B.

Examinando as curvas analíticas, expressas com intervalo de confiança de 95%, trazidas no Apêndice A, e os parâmetros abordados na Tabela 5, observa-se que o processamento absorvância efetiva, $S = - \log P/P_0$, com dados de intensidade do canal B, demonstrou uma melhor sensibilidade, expressa por limites de detecção e quantificação inferiores aos outros processamentos, e comportamento linear na faixa dinâmica de trabalho (LQ – 10 mg 100 g^{-1}).

O desempenho satisfatório do processamento absorvância efetiva que apresenta conformidade com a lei de Lambert Beer, aplicado com os dados de cor do canal B, coloca em destaque um conceito importante na análise de imagem digital, a complementaridade das cores. A cor azul é complementar à cor laranja/amarela do produto resultante da reação entre TiO_2 e H_2O_2 nas condições estudadas.

Tabela 5 - Parâmetros analíticos obtidos a partir de distintos processamentos matemáticos dos dados de cor

Parâmetro analítico	**Absorvância efetiva**		**Cor relativa**		**Norma vetor**	**255 - RGB**	
	G	**B**	**G**	**B**	**RGB**	**G**	**B**
Inclinação da reta (Slope)	0,0210 ± 0,0021	0,0952 ± 0,0008	-0,0018 ± 0,0018	-0,0191 ± 0,0013	11,6998 ± 0,5093	7,0634 ± 0,6481	9,5193 ± 0,7561
R^2	0,8575	0,9992	0,0554	0,9354	0,9706	0,8813	0,9084
Limite de detecção (mg/100g)	6,47	0,50	-------	-------	2,83	5,84	5,08
Limite de quantificação (mg/100g)	9,61	0,74	-------	-------	4,24	9,70	9,39
Linearidade (LQ a 10 mg/100g)	não linear	linear	não linear	não linear	não linear	não linear	não linear

Fonte: Elaborado pela autora.
Notas:
(1) Intervalo de confiança de 95%
(2) ------- valores negativos

Nos trabalhos reportados na literatura, não há uma indicação específica a respeito do processamento matemático adequado para cada aplicação analítica. A seleção do processamento e canal, a ser utilizado na construção do sinal, se baseia no desempenho do método, expresso em termos das figuras de mérito, e nos objetivos do estudo.

O desempenho não satisfatório do processamento norma vetor pode ter relação com a inclusão das intensidades do canal R na expressão matemática. Como apontado anteriormente, o canal R não apresentou uma correlação significativa com a variação da concentração de TiO_2.

As expressões matemáticas dos processamentos cor relativa e diferença entre intensidade máxima (255) e intensidade observada não descreveram adequadamente os dados do estudo aqui relatado. Assim, selecionou-se as intensidades do canal B, tratadas com o processamento matemático absorvância efetiva, para construção do sinal analítico.

3.4.3 Validação e aplicação do método

3.4.3.1 Linearidade

Com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9992, seguindo recomendações da IUPAC [96, 97], a linearidade do método foi verificada comparando-se os valores de F_{exp} e F crítico, no intervalo de confiança de 95%. Sendo o valor de F_{exp} maior que o $F_{0,05,16,10}$ (3,048), observa-se que há correlação linear na faixa dinâmica de trabalho de LQ a 10 mg/100g.

3.4.3.2 Limites de detecção e quantificação

Os cálculos dos limites de detecção e quantificação foram feitos com base na recomendação da IUPAC [97], considerando os parâmetros da curva analítica e o intervalo de confiança. Apesar de envolver cálculos mais complexos, o método apresenta maior confiabilidade. Valores de LD e LQ de 0,50 e 0,74 mg 100 g^{-1}, respectivamente, para o intervalo de 95% de confiança, foram obtidos a partir das equações 18, 19 e 20.

$$\text{LD: } \frac{3.3\ S_{y/x}}{A}\sqrt{1+\ h_0+\frac{1}{I}} \qquad (18)$$

$$\text{LQ: } \frac{10\ S_{y/x}}{A}\sqrt{1+\ h_0+\frac{1}{I}} \qquad (19)$$

Onde $S_{y/x}$ trata-se do desvio padrão residual, A é a inclinação da curva analítica e I é o número de padrões analíticos; h_0 é dado pela equação 20, onde $\bar{C}_{cal}$ é a média da concentração analítica e C_i é cada um dos valores de concentração dos padrões analíticos.

$$h_0 = \frac{\bar{C}_{cal}^2}{\sum_{i=1}^{I}(C_i - \bar{C}_{cal})^2} \quad (20)$$

3.4.3.3 Precisão

A precisão foi verificada em termos do desvio padrão relativo (DPR%), a nível de repetibilidade, a partir de nove medidas consecutivas de uma amostra com concentração intermediária da curva de calibração, 4,67 mg 100 g^{-1}; obtendo-se o valor de DPR de 1,86%.

3.4.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada comparando-se os resultados obtidos com a metodologia espectrofotométrica de referência, utilizando um espectrofotômetro molecular UV-Vis, a qual é de reconhecida exatidão e precisão. Verifica-se na Tabela 6 que não há diferença significativa, intervalo de confiança de 95%, entre os valores obtidos pelo método proposto e o de referência.

Tabela 6 - Teores de TiO_2 nas amostras A, B e C determinados pelo método proposto, análise de imagens digitais, e o de referência, espectrofotometria molecular UV-Vis

Amostra	**Absorvância efetiva/Canal B (S = - log P/P_0) (mg/100g)**	**Absorção molecular (410 nm) (mg/100g)**
A	4,79 ± 0,15	4,82 ± 0,12
B	8,26 ± 0,21	8,33 ± 0,08
C	6,08 ± 0,17	6,47 ± 0,30

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.3.5 Aplicação

O método proposto, baseado na análise de imagem digital, foi aplicado na determinação de TiO_2 em cinco amostras de fezes bovina, descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Determinação de TiO2 empregando análise de imagens digitais em cinco amostras de fezes bovina

Amostra	**Absorvância efetiva/Canal B ($S = - \log P/P_0$)** **(mg/100g)**
A	4,79 ± 0,15
B	8,26 ± 0,21
C	6,08 ± 0,17
D	8, 56 ± 0,24
E	9,13 ± 0,32

Fonte: Elaborado pela autora.

Dito isto, algumas informações são necessárias para uma visão mais ampla dos resultados encontrados. Durante a realização do experimento foi adotado um teor diário de 10 mg de TiO_2, por animal, divididas em duas doses de 5 mg, administrado junto à dieta em comedouros.

A amostra A foi coletada antes da segunda dosagem diária; as amostras B, C, D e E após a segunda dose diária. Foi identificado na amostra C, uma sobra considerável da dieta nos comedouros, indicando que não houve o consumo da dosagem diária em sua totalidade.

Os trabalhos disponíveis na literatura, sobre nutrição animal, fazem menção aos teores do marcador externo TiO_2, em amostras de fezes bovina, via recuperação fecal, não possibilitando uma comparação simples e direta com valores aqui calculados para a determinação de TiO_2 empregando análise de imagem digital.

3.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O emprego da análise de imagem digital como um sistema alternativo para determinação do marcador externo TiO_2, em amostras de fezes bovina, viabilizou o desenvolvimento de um método analítico, não reportado na literatura, simples, rápido, eficiente e portátil, que pode ser aplicado no mesmo local de realização dos experimentos.

No estudo do processamento matemático dos dados de cor do espaço RGB, para construção do sinal analítico, o processamento denominado absorvância efetiva ($S = - \log P/P_0$), aplicando-se as intensidades do canal B, apresentou melhor desempenho quando comparado aos processamentos cor relativa, norma vetor e o processamento dado pela expressão 255 – RGB.

O melhor desempenho apresentado pelas intensidades do canal azul na construção do sinal analítico destaca a relação de complementaridade das cores na análise de imagem digital. A cor azul é complementar à cor laranja/amarela resultante da reação, em pH baixo, entre TiO_2 e H_2O_2.

O método proposto apresentou desempenho satisfatório, analisado por meio dos parâmetros analíticos calculados a partir de recomendações da IUPAC, apontando viabilidade de aplicação para determinação de TiO_2. Considerando a alta amostragem envolvida em estudos de nutrição animal, a frequência analítica do método poderia ser ampliada adaptando-se o sistema para captura de múltiplas imagens por vez.

Capítulo 4

DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE QUININA EMPREGANDO UM SISTEMA PORTÁTIL E PROCESSAMENTO DE IMAGEM DIGITAL

4.1 INTRODUÇÃO

A análise de imagem digital tem sido amplamente empregada em Química Analítica, pela facilidade de operação, portabilidade, rapidez e bom desempenho analítico [66]. Resumidamente, uma imagem ou vídeo de reações colorimétricas ou luminescentes é convertida em dados mensuráveis que são correlacionados com a concentração do analito [13].

Diversos estudos são reportados na literatura, empregando DIA como um método alternativo à utilização de técnicas convencionais como espectrofotometria UV-Vis [40], quimioluminescência [98], potenciometria [39], cromatografia [43], espectrometria de absorção atômica [45, 48], fluorimetria [99], entre outras.

Uma das tendências na pesquisa em Química Analítica é o desenvolvimento de ferramentas de fácil uso e universalmente acessíveis. Desde o início dos anos 2000, tem havido um aumento significativo de publicações científicas empregando scanners, câmera digital, webcam, e smartphones em metodologias de análises químicas [4, 6]. Apesar de existentes, há poucos estudos empregando microscópios digitais na captura de imagens [47].

Os microscópios digitais são dispositivos de captura de imagens que podem ser conectados diretamente a um computador ou notebook. Estes dispositivos possibilitam a utilização de zoom para ampliação manual ou automática de objetos em um alcance óptico de 50 até 1000x, podendo ser ajustado a diferentes sistemas [100].

Desenvolvimentos recentes em tecnologias optoeletrônicas lançaram LEDs mais potentes, estáveis e baratos, que se tornaram uma ferramenta interessante para projetos de dispositivos portáteis e miniaturizados baseados em reações colorimétricas [14]. O uso do LED dispensa o uso de lentes e filtros ópticos em relação a outras fontes de radiação, como as lâmpadas de xenônio [66].

Um método fluorimétrico baseado em imagem digital, usando uma plataforma impressa em 3D e uma câmara UV-LED feita de ácido polilático biodegradável (PLA), para quantificação de quinina em bebidas foi proposto por da Silva e colaboradores [66], apresentando limites de detecção e quantificação de $6{,}9 \times 10^{-8}$ e $1{,}39 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}. Um smartphone foi usado como detector e a

câmera em 3D foi irradiada por quatro LEDs para excitação da molécula, sendo necessário um sistema mais robusto para refrigeração e alimentação do sistema.

Leal e colaboradores [12] desenvolveram uma plataforma impressa em 3D, portátil, para determinação fluorimétrica. O dispositivo foi adaptado para determinação de sulfeto, em águas, pela geração de vapor de H_2S com H_3PO_4 seguido pelo desbotamento da cor verde do acetato de mercúrio-fluoresceína quando excitado com um LED de 470 nm. O método apresentou limites de detecção e quantificação de 0,02 e 0,1 µM, destacando a importância da análise de correntes constante para alimentação do LED.

Quando a radiação eletromagnética interage com a matéria, muitos fenômenos podem ocorrer isolados ou simultaneamente, como absorção de luz, reflexão, dispersão refração, entre outros. A percepção humana das cores é criada no cérebro pela superposição dos sinais neurais de diferentes tipos de fotorreceptores que são sensíveis a regiões do espectro eletromagnético visível [14].

A cor não é propriedade intrínseca de um objeto, mas sua percepção envolve três fatores importantes: a fonte de luz, o modo de detecção da radiação após interação com o objeto e o observador/detector. Portanto, a aquisição do sinal analítico é uma das etapas mais importantes na análise colorimétrica [14].

Assim, este trabalho foi realizado no Laboratório de Química Analítica, Automatização e Meio Ambiente, da Universidade das Ilhas Baleares, Palma de Maiorca, Espanha, e apresenta o desenvolvimento de um sistema fluorimétrico, baseado em análise de imagens digitais, para determinação de quinina em amostras comerciais de água tônica; empregando um microscópio digital como dispositivo de captura de imagem e um LED monocromático como fonte de radiação.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo geral

- Desenvolver um sistema fluorimétrico portátil, compacto e de fácil alimentação, baseado na análise de imagem digital, para determinação de quinina em água tônica.

4.2.2 Objetivos específicos

- Projetar e imprimir em 3D um dispositivo para determinação fluorimétrica;
- Empregar um microscópio USB como detector;
- Aplicar o sistema desenvolvido na determinação de quinina em água tônica.

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.2 Reagentes e soluções

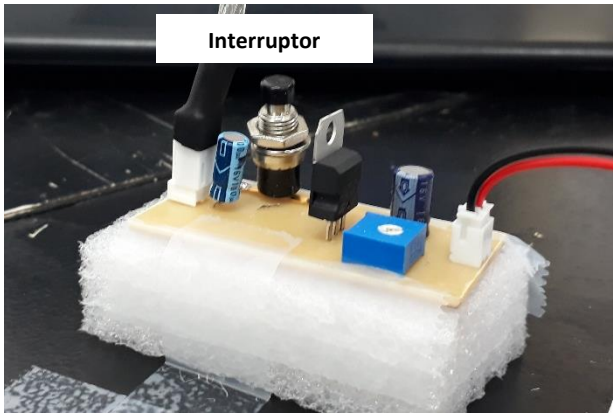
Reagentes de grau P.A e água duplamente deionizada (água DDI, resistividade 18,2 MΩ) proveniente de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) foram utilizados no preparo das soluções. Preparou-se uma solução intermediária de 100 mg L^{-1} de quinina pela dissolução de sulfato de quinina dihidratado, $C_2OH_{24}N_2O_2 \cdot 2H_2O$, extra puro (Scharlau, Espanha) em ácido sulfúrico, H_2SO_4 (Scharlau, Espanha) 0,05 mol L^{-1} e padrões analíticos nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 mg L^{-1} foram utilizados na construção da curva analítica.

4.3.1 Sistema fluorimétrico

Assim como o sistema apresentado no capítulo 2, o sistema fluorimétrico proposto constitui-se por um dispositivo, impresso em 3D, para acomodação do dispositivo de captura, cubeta e fonte de radiação, cuja alimentação é viabilizada por portas USB de um computador, utilizando-se uma fonte de tensão ajustável.

O circuito elétrico exibido, na Figura 8, foi empregado na criação da fonte de tensão, com o diferencial da presença de um interruptor, como mostra a Figura 24. Assim, quando conectado ao computador, além do controle de intensidade da fonte de radiação, é possível permitir ou interromper a passagem de corrente.

Figura 24 - Fonte de tensão ajustável do sistema fluorimétrico

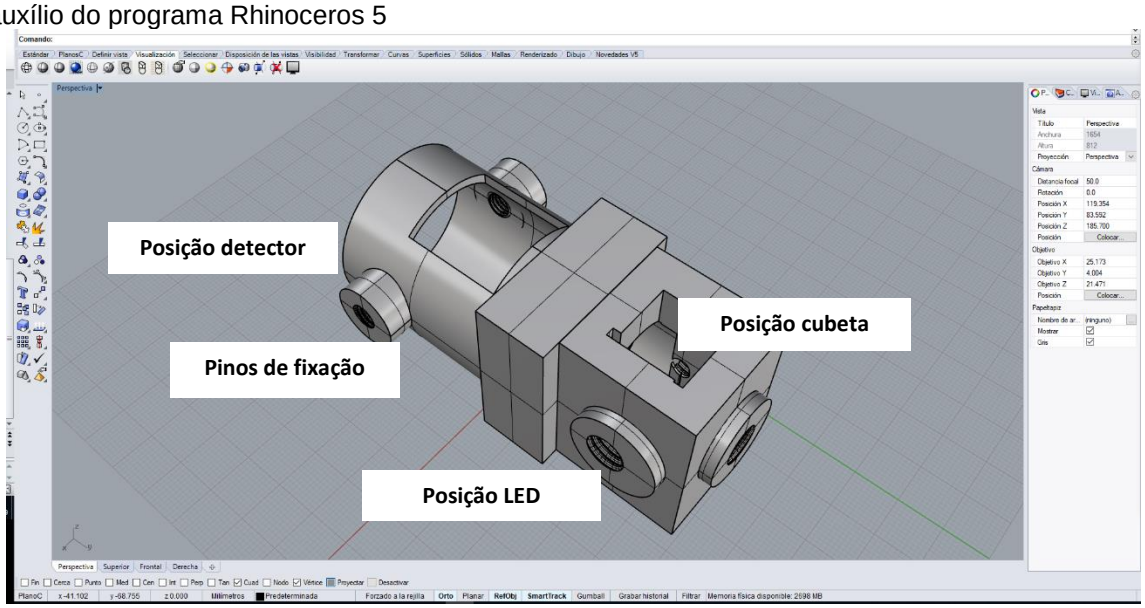


Fonte: Acervo da autora.

O design do dispositivo 3D foi elaborado com o auxílio do programa Rhinoceros 5, Figura 25, semelhante ao dispositivo espectrofotométrico anteriormente descrito; excetuando-se a posição da fonte de radiação. O LED

foi posicionado perpendicularmente ao detector, isto é, dispositivo de captura de imagem. Como fonte de radiação, visando excitação do composto químico em estudo, fez-se uso de um LED convencional de 5 mm, com comprimento de onda (ʎ) de aproximadamente 346 nm.

Figura 25 - Design do dispositivo 3D empregando no sistema fluorimétrico, elaborado com o auxílio do programa Rhinoceros 5



Fonte: Elaborado pela autora.

Uma fotografia do dispositivo 3D, impresso com uma base para suporte e estabilidade, é apresentada na Figura 26, sendo possível observar que um microscópico digital, Knup KP-8012, foi utilizado para captura das imagens.

Figura 26 - Fotografia do dispositivo 3D empregado no sistema fluorimétrico

Fonte: Acervo da autora.

4.3.2 Aquisição e processamento das imagens

Na etapa de aquisição, com auxílio do software YouCam, as imagens foram arquivadas no formato JPEG e processadas com software Chemostat (versão: V2 030918.d3e5d19); ROI no pixel central, tamanho 100x100, coordenadas x230 e y-180. Em posse dos dados de cor do espaço RGB, o sinal analítico foi calculado a partir das intensidades do canal B e o processamento norma vetor foi analisado.

3.3.3 Validação e aplicação do sistema

Na validação, os seguintes parâmetros analíticos foram verificados: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão; mediante comparação dos resultados obtidos com aqueles empregando um espectrômetro de luminescência PerkinElmer LS-50B.

O sistema proposto foi empregado na determinação de quinina em amostras de água tônica disponíveis comercialmente na cidade de Palma de Maiorca, Ilhas Baleares, Espanha. Por se tratar de uma bebida gaseificada, as amostras foram submetidas à agitação para eliminação do dióxido de carbono presente na composição. Em seguida, as amostras foram diluídas, fator de diluição igual a 10, com uma solução de ácido sulfúrico 0,05 mol L^{-1} e as leituras foram realizadas.

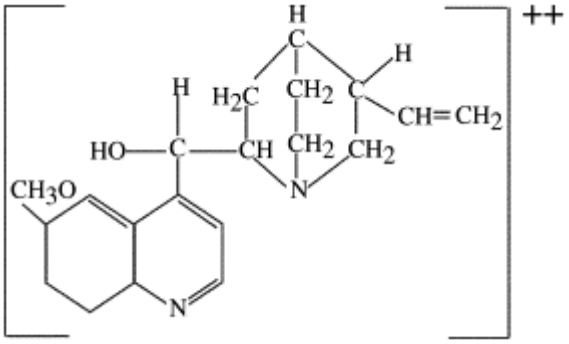
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1 Sistema fluorimétrico

Como dito anteriormente, o design do sistema espectrofotométrico, apresentado no capítulo 2, foi utilizado como projeto base. Para acoplamento do dispositivo de captura no sistema fluorimétrico, o diâmetro do compartimento não foi modificado, adicionou-se duas roscas (1/4 28) laterais visando uma melhor fixação e o porta-cubeta foi projetado para acomodação de uma cubeta padrão de 10 mm.

Em soluções diluídas de H_2SO_4, o sulfato de quinina está presente como uma espécie di-catiônica, que é bastante estável [101-103] e cuja estrutura molecular é mostrada na Figura 27. Assim, branco, padrões analíticos e amostras foram preparados em soluções de H_2SO_4 0,05 mol L^{-1}.

Figura 27 - Estrutura do sulfato de quinina em soluções diluídas de H_2SO_4



Fonte: Mishra (2006).

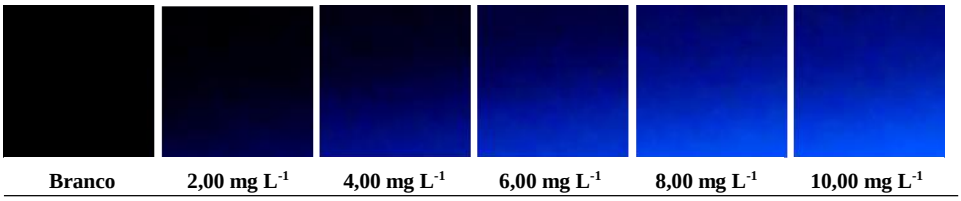
Observando os espectros, obtidos com um espectrômetro de luminescência PerkinElmer LS-50B, notou-se que a máxima intensidade de absorção e emissão ocorre nos comprimentos de onda de 347 e 452 nm, respectivamente. No sistema fluorimétrico proposto, como fonte de radiação/excitação foi utilizado um LED convencional de 5 mm com comprimento de onda de aproximadamente 346 nm.

Uma adequada excitação, com comprimento de onda específico, permite uma melhor emissão; interferindo diretamente na sensibilidade do método [104]. Os LEDs, cuja adequação foi investigada e validada, apresentam características interessantes para aplicação em sistema fluorimétricos portáteis como, por exemplo, emissão de luz monocromática, popularidade, baixo custo e disponibilidade de cores [105-107].

Smartphones, webcam e scanner são dispositivos comumente empregados na análise de imagem digital [8, 20, 62, 63, 108, 109]; apesar de existente, há um número limitado de trabalhos que utilizam microscópio portátil na captura de imagem [110]. A aplicação de um microscópio USB no sistema fluorimétrico proposto, apresentou resultados satisfatórios, sendo possível uma melhor focalização da imagem.

Dois fatores foram analisados, visando aplicação do sistema: (1) A intensidade da fonte de radiação; mínima e máxima e (2) o emprego de uma tampa no compartimento da cubeta para controle da iluminação interna. Após análise das curvas e parâmetros analíticos apresentados no Apêndice B, selecionou-se as condições de intensidade máxima da fonte de radiação e utilização de uma tampa, impressa em 3D, na parte superior do porta-cubeta. Com as condições definidas, as imagens dos brancos e padrões analíticos foram obtidas, como mostra a Figura 28.

Figura 28 - ROI 100x100, coordenadas x230y-180, das imagens digitais do branco e padrões analíticos



Fonte: Acervo da autora.

4.4.2 Processamento matemático dos dados de cor do espaço RGB

Após obtenção das intensidades dos canais RGB, considerando que o fenômeno da fluorescência está relacionado a emissão de radiação e que a quinina, em solução ácida diluída, apresenta intensidade máxima de emissão em comprimento de onda de 452 nm, correspondendo a cor azul no diagrama de cromaticidade CEI [111], as intensidades do canal B apresentaram melhor correlação com a variação de concentração, como pode ser visto na Tabela 8. Silva e colaboradores [66], em seu estudo de quantificação de quinina em bebidas, também observaram que o canal B apresentou maior intensidade de fluorescência e foi empregado nas determinações.

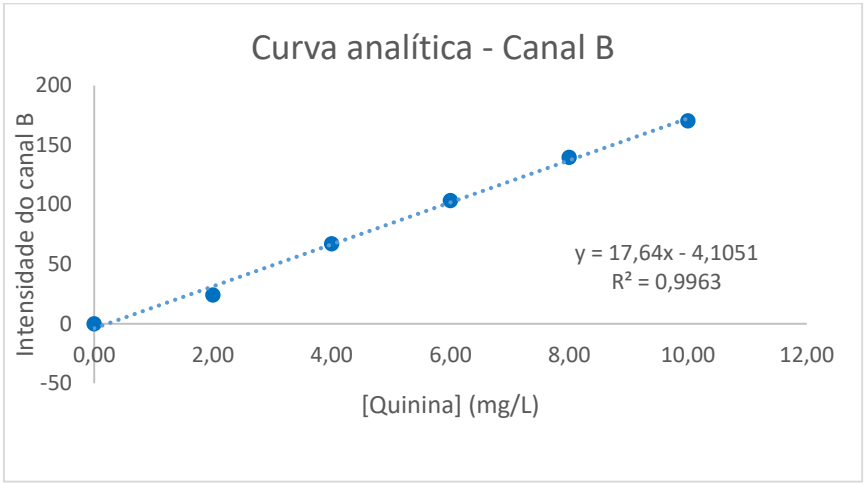
Tabela 8 - Intensidades médias RGB para os brancos e padrões analíticos em triplicata

[Quinina/H_2SO_4 0,05 mol L^{-1}] mg L^{-1}	**R**	**G**	**B**
0 (Branco)	0,00	0,00	0,00
0 (Branco)	0,00	0,00	0,00
0 (Branco)	0,00	0,00	0,00
2,00	0,29	0,26	24,25
2,00	0,50	0,26	23,60
2,00	0,42	0,24	24,31
4,00	0,60	2,65	66,73
4,00	0,57	2,92	66,87
4,00	0,64	3,04	67,99
6,00	0,60	10,01	104,05
6,00	0,67	9,56	102,35
6,00	0,66	9,67	103,41
8,00	0,67	20,74	139,35
8,00	0,65	20,84	139,99
8,00	0,65	20,73	139,73
10,00	0,66	34,50	170,52
10,00	0,65	34,54	169,93
10,00	0,68	34,19	170,65

Fonte: Elaborado pela autora.

Assim, as intensidades do canal azul foram empregadas na construção da curva analítica, Figura 29. Buscando-se verificar a construção do sinal analítico, considerando as contribuições das intensidades dos canais R, G e B, o processamento matemático norma vetor ($\| v \| = \sqrt{R_{s-b}^2} + G_{s-b}^2 + B_{s-b}^2$) foi avaliado.

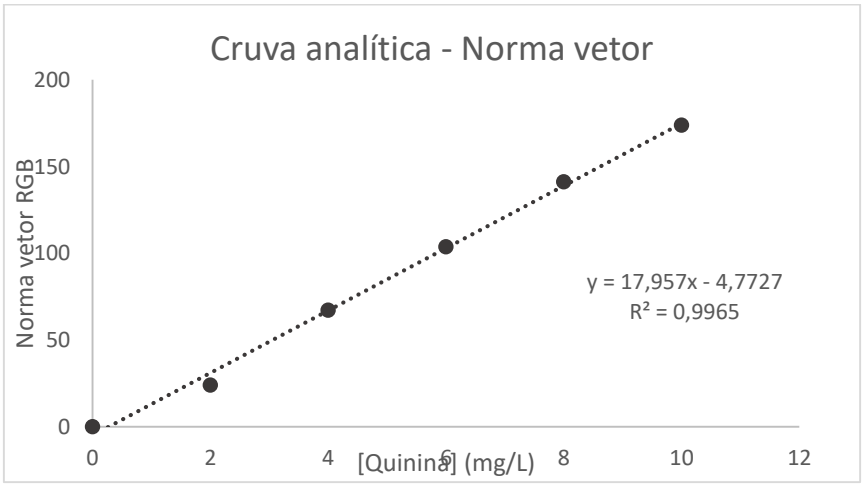
Figura 29 - Curva analítica para determinação de quinina, construída a partir dos valores de intensidade do canal B



Fonte: Elaborado pela autora.

É possível observar, na Figura 30, que o processamento matemático norma vetor apresentou um comportamento semelhante ao uso das intensidades do canal B, sem processamento matemático. Apresentando uma maior inclinação da curva analítica e sensibilidade, em termos dos limites de detecção e quantificação, o processamento norma vetor foi utilizado na aplicação do sistema fluorimétrico.

Figura 30 - Curva analítica para determinação de quinina, construída a partir do processamento matemático norma vetor dos valores de intensidades RGB



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.3 Validação do método

Como recomenda a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), comissão da divisão de Química Analítica sobre aspectos gerais nas diretrizes para calibração [112], o branco analítico foi incluindo na projeção da curva analítica e todas as concentrações da curva foram analisadas em triplicata,

possibilitando uma regressão mais robusta e avaliação da linearidade da curva, entre outros parâmetros analíticos [96]. A adequação do ajuste da curva analítica, construída a partir dos dados de cor para o sistema fluorimétrico para determinação de quinina, foi confirmada pelo coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9965.

4.4.3.1 Linearidade

O R^2 da curva analítica é comumente empregado na avaliação da linearidade de um método, a partir da análise de sua proximidade do valor 1. No entanto, o valor de R deve ser associado a relação linear entre a concentração e o sinal. Assim, na avaliação da linearidade, os valores de F experimental e crítico devem ser analisados [113].

Buscando-se avaliar a linearidade do método proposto, o valor de F experimental, correspondente à razão entre a variância residual e o erro puro quadrado, dado pela equação 21, e o F crítico tabulado foram comparados.

$$F_{exp} = \left(\frac{S_{y/x}}{S_y}\right)^2 \qquad (21)$$

Sendo $S_{y/x}$ o desvio padrão residual e S_y o erro puro, existem duas hipóteses estatísticas: H_0, denominada hipótese nula e a hipótese alternativa (H_1). A hipótese nula deve ser rejeitada, no nível de significância α estudado, se F_{exp} exceder o valor crítico no nível α, F (α, I - 2, I – L), onde I é o número de amostras de calibração e L é o número de níveis de concentração [112].

Considerado o melhor indicador de linearidade, adequado para verificar estatisticamente se a variância residual é maior do que o erro quadrado puro, derivado do estudo das amostras em triplicata [96], o teste foi aplicado na análise da linearidade do método fluorimétrico proposto. Observou-se um valor de F experimental, 4449, muito superior ao F crítico tabulado, 4.45, resultando na rejeição da hipótese nula, havendo, assim, linearidade na faixa dinâmica de trabalho analisada, LQ a 10 mg L^{-1}.

A recomendação do estudo da linearidade por meio da comparação dos valores de F, deve-se ao fato da ocorrência do ajuste de dados de calibração a uma análise de regressão linear, apresentando coeficiente de determinação próximo a 1, mesmo não apresentando linearidade.

4.4.3.2 Limites de detecção e quantificação

A sensibilidade de um método é comumente expressa em termos dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). No entanto, muitos trabalhos estimam o LD, quantidades mínimas detectáveis, aplicando a antiga definição da IUPAC, com base na concentração do analito que dá um sinal pelo menos três vezes maior do que o desvio padrão do sinal do branco, considerando a inclinação da curva analítica [114].

Em termos gerais, a última recomendação da IUPAC [96, 114] define o LD com um nível de concentração para o qual o risco de falsos negativos, também denominados erros β ou erros Tipo II, tem uma probabilidade β associada, como mostra a equação 22.

$$\text{LD} = t(\alpha, v)\sigma_{c,0} + t(\beta, v)\sigma_{c,LD} = \frac{3{,}3S_{x/y}}{A}\sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \qquad (22)$$

Onde, $t(\alpha, v)\sigma_{c,0}$ e $t(\beta, v)\sigma_{c,LD}$ são coeficientes de Student com v graus de liberdade e probabilidade α e β, respectivamente; $\sigma_{c,0}$ e $\sigma_{c,LD}$ são os erros padrão de concentração para o branco e os níveis de LD; A é a inclinação da curva de calibração; I é o número de amostras de calibração e $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual [96]. Assumindo $\sigma_{c,0} = \sigma_{c,LD}$, nível de confiança de 95% (α = β = 0,05) e um grande número de graus de liberdade, h_0 pode ser obtido pela equação 8. O mesmo conceito é aplicado no cálculo do LQ, dado pela expressão da equação 19.

A definição antiga subestima significativamente os valores de LD e LQ, sendo comum a recomendação atual resultar em valores maiores. O método proposto apresentou limites de detecção e quantificação de 0,99 e 1,46 mg L^{-1}, no intervalo de confiança de 95%, com os dados obtidos a partir do processamento matemático norma vetor.

4.4.3.3 Precisão

A precisão fornece a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio, e seu valor numérico é estimado pelo desvio padrão relativo (DPR) [115], expresso na equação 23, onde s é o desvio padrão e $\bar{x}$ é o valor médio do número total de amostras.

$$\text{DRP} = \frac{100_s}{\bar{x}} \qquad (23)$$

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade, seguindo as recomendações da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, do inglês, *International Conference on Harmonisation*), resolução 899 da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) [116-118], realizando-se nove determinações em amostras contendo uma concentração equivalente à concentração média da curva analítica, valores de DPR de 1,15 e 1,13% foram obtidos, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9 - Precisão do método verificada em termos de DRP%

Amostra	**Repetições (mg L^{-1})**									**DRP%**
Amostra F	4,82	4,73	4,80	4,91	4,86	4,80	4,88	4,87	4,88	1,15
Amostra G	5,49	5,54	5,39	5,54	5,39	5,46	5,50	5,56	5,52	1,13

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.3.4 Exatidão

A exatidão reflete a proximidade entre o valor medido (x_i) e um valor de referência considerado verdadeiro (X_v) e relaciona-se com o erro absoluto de uma medida [115]. A exatidão foi verificada comparando-se os resultados obtidos no método proposto, a partir da análise de imagem digital, com os resultados obtidos a partir de um espectrômetro de luminescência PerkinElmer LS-50B, comprimento de onda emissão de 452 nm, como mostra a Tabela 10.

Tabela 10 - Exatidão do método proposto

Amostra	**Método proposto** ($\| \boldsymbol{v} \| = \sqrt{\boldsymbol{R}_{s-b}^2 + \boldsymbol{G}_{s-b}^2 + \boldsymbol{B}_{s-b}^2}$) **(mg L^{-1})**	**Luminescência PerkinElmer LS-50B (452 nm) (mg L^{-1})**
1	55,0 ± 0,19	55,1 ± 0,01
2	64,3 ± 0,02	64,2 ± 0,02
3	47,8 ± 0,22	47,9 ± 0,02

Fonte: Elaborado pela autora.

Observou-se que não há diferença significativa entre os valores medidos com o método proposto e os valores do método de referência.

4.4.3.5 Aplicação

O método proposto foi aplicado na determinação de quinina em 7 amostras de água tônica, como mostra a Tabela 11, e teores de 47, 8 a 66, 7 mg L^{-1} foram calculados.

Tabela 11 - Teores de quinina em amostras comerciais de água tônica, obtidos na aplicação do método proposto

Amostra	[Quinina] (mg $L^{-1)}$	Desvio padrão
A	54,7	0,29
B	64,8	0,24
C	66,7	0,23
D	49,4	0,38
E	63,7	0,25
F	48,2	0,40
G	47,8	0,43

Fonte: Elaborado pela autora.

O decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918 (de julho de 1994), que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registo, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, estabelece em seu Art. 25 que “Água tônica de quinino é o refrigerante que contiver, obrigatoriamente, de três a sete miligramas de quinino ou seus sais, expressos em quinino anidro, por cem mililitros de bebida” e a FDA estabelece 83 mg L^{-1}, como teor máximo de quinina em água tônica [119, 120]. Assim, as concentrações calculadas, das amostras estudadas, estão dentro do padrão estabelecido pela legislação vigente.

4.5 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O sistema fluorimétrico apresentou desempenho satisfatório para determinação de quinina em amostras comerciais de água tônica. O sistema apresenta possibilidades de melhorias, observando as figuras de mérito calculadas, a partir de estudos detalhados de fatores que influenciam o sistema, como faixa de ampliação de foco do microscópio digital e corrente elétrica de alimentação do LED.

Estudos sobre a utilização de diferentes ângulos de posicionamento do LED, distância entre o porta-cubeta e dispositivo de captura, utilização de espelhos e quantidades de diodos emissores de luz foram iniciados mas não concluídos, em decorrência do cenário de pandemia causado pelo novo coronavírus.

O método proposto destaca-se pela simplicidade e boa faixa linear de trabalho, considerando os altos teores de quinina nas amostras de interesse; sendo uma alternativa ao método de referência.

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescimento no número de trabalhos publicados na área de análise de imagem digital se justifica pelas vantagens apresentadas pela técnica, como simplicidade, baixo custo, rapidez, portabilidade, utilização de dispositivos comuns de captura, combinação com outras técnicas e excelentes desempenhos analíticos.

A variedade de materiais disponíveis comercialmente, amplia as possibilidades de construção e adaptação de dispositivos adequados para aplicação em sistemas desta natureza. Os sistemas aqui desenvolvidos, com a otimização adequada dos fatores que interferem significativamente na análise, podem ser aplicados em diversas determinações analíticas.

A utilização de LEDs, em conjunto com o desenvolvimento de sistemas para alimentação da fonte de radiação, é um campo em expansão que vem despertando o interesse de pesquisadores. A iluminação por LED oferece uma radiação homogênea que reforça o aspecto de portabilidade dos sistemas que empregam análise colorimétrica digital.

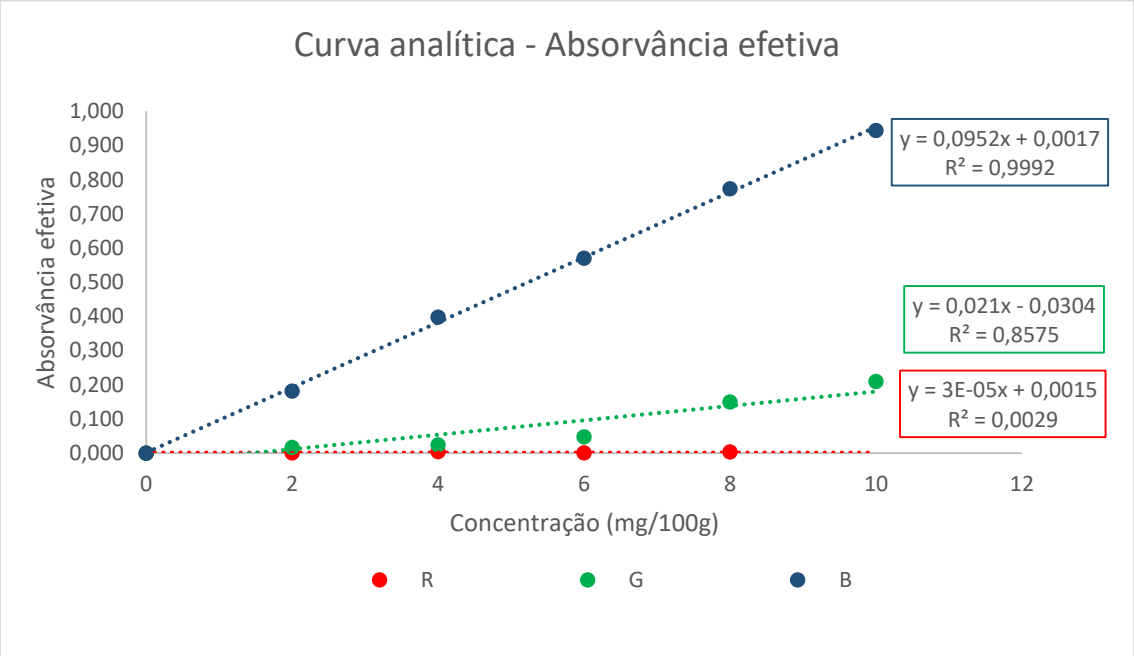
Uma atenção especial deve ser dada ao processamento matemático dos dados de cor para construção do sinal analítico que interfere diretamente no desempenho do sistema, expresso em termos das figuras de mérito.

A análise química, baseada no processamento de imagem digital, se caracteriza como uma vertente promissora, ao apresentar possibilidades de alta portabilidade, promovendo acessibilidade para aplicação e divulgação da pesquisa e do conhecimento cientifico.

APÊNDICE

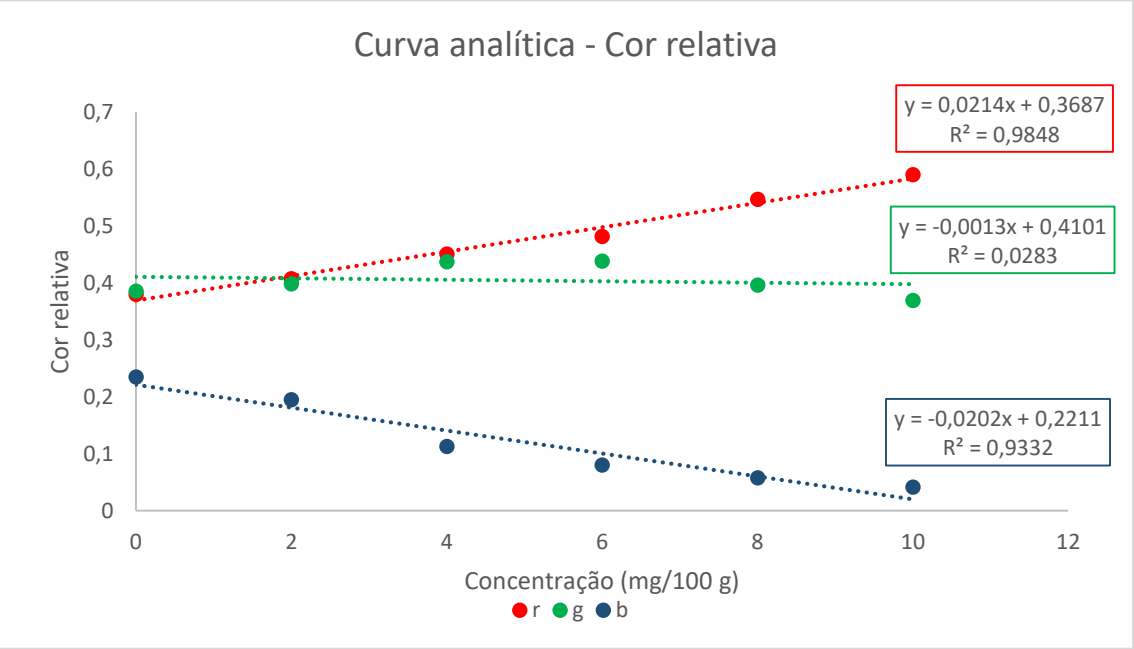
APÊNDICE A – Curvas analíticas dos distintos processamentos matemáticos aplicados para determinação de TiO_2 em fezes bovinas.

Figura 31 - Curvas analíticas construídas a partir do processamento matemático absorvância efetiva para os canais R, G e B



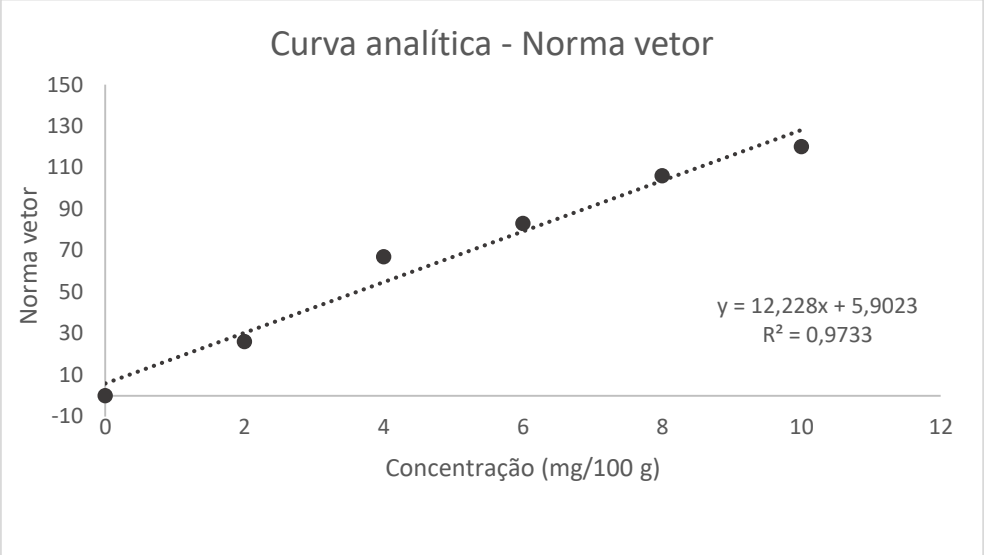
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 32 - Curvas analíticas construídas a partir do processamento matemático cor relativa para os canais R, G e B



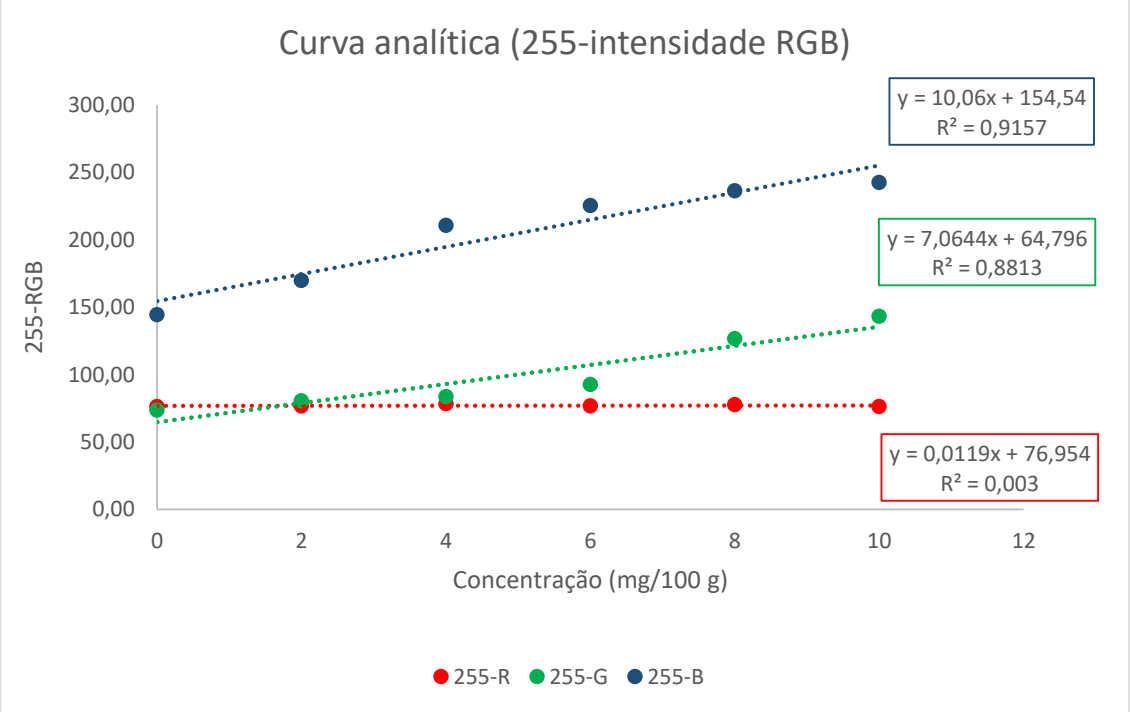
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 33 - Curva analítica construída a partir do processamento matemático norma vetor



Fonte: Elaborado pela autora.

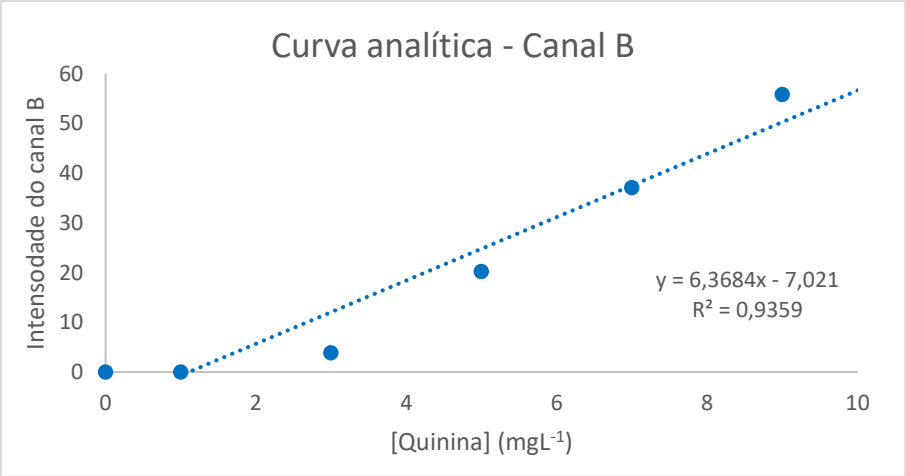
Figura 34 - Curvas analíticas construídas a partir do processamento matemático dado pela expressão 255 – intensidades RGB



Fonte: Elaborado pela autora.

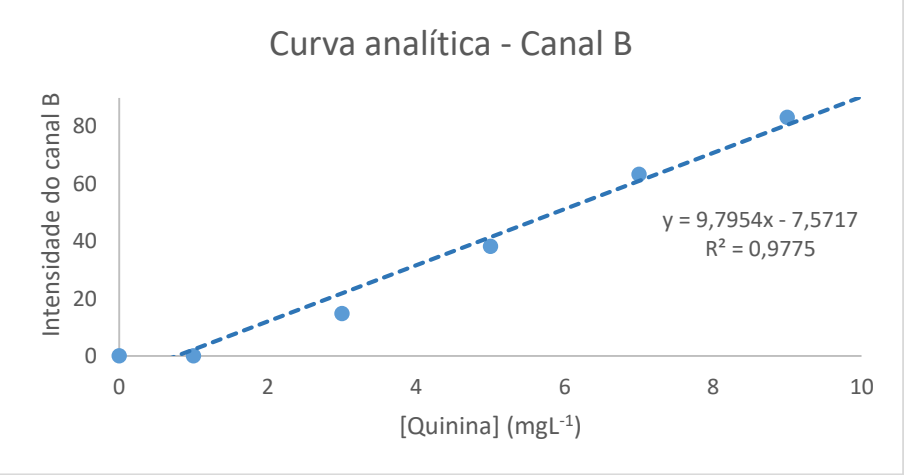
APÊNDICE B – Curvas analíticas construídas na análise univariada (etapa de otimização) da intensidade da fonte de radiação e desempenho do sistema fluorimétrico, com/sem tampa, a partir dos valores de intensidades do canal B.

Figura 35 - Dados obtidos com a intensidade de radiação no mínimo



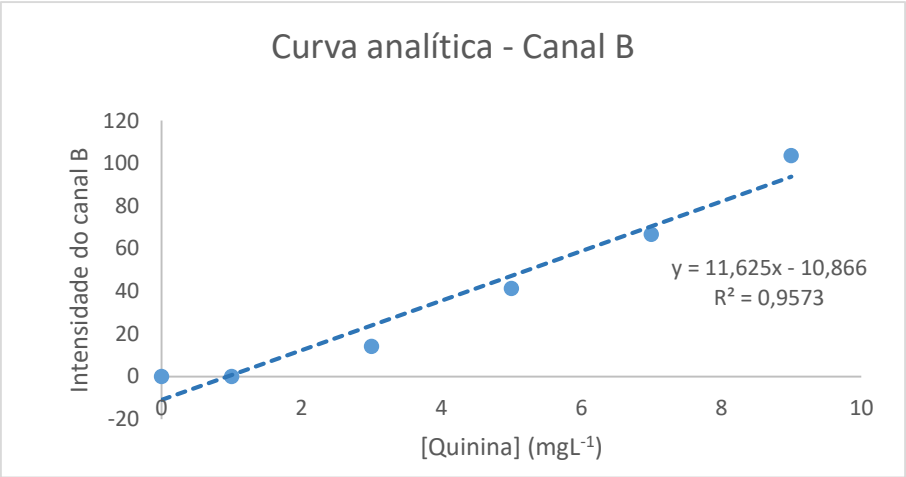
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 36 - Dados obtidos com a intensidade de radiação máxima



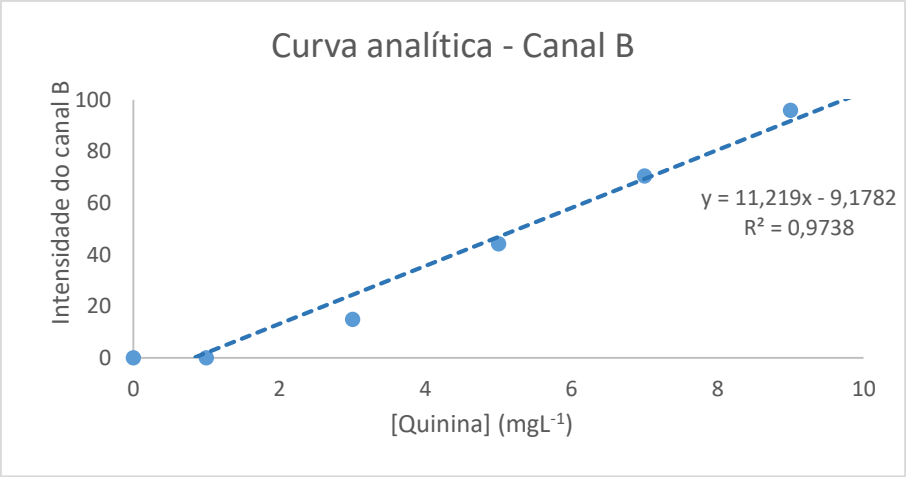
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 37 - Dados obtidos sem posicionar a tampa no porta-cubeta



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 38- Dados obtidos com a tampa posicionada no porta-cubeta.



Fonte: Elaborado pela autora.

6.0 REFERÊNCIAS

1. Pohlmann, A., *Measures and numbers for colors. The color system of Wilhelm Ostwald.* Chemtexts, 2020. **6**(1): p. 15.
2. Chowdhary, C.L., et al., *Analytical Study of Hybrid Techniques for Image Encryption and Decryption.* Sensors, 2020. **20**(18).
3. Diniz, P., *Chemometrics-assisted color histogram-based analytical systems.* Journal of Chemometrics, 2020. **34**(12).
4. Capitan-Vallvey, L.F., et al., *Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review.* Analytica Chimica Acta, 2015. **899**: p. 23-56.
5. Jafari, P., et al., *Colorimetric biosensor for phenylalanine detection based on a paper using gold nanoparticles for phenylketonuria diagnosis.* Microchemical Journal, 2021. **163**.
6. Apyari, V.V., et al., *Use of household color-recording devices in quantitative chemical analysis.* Journal of Analytical Chemistry, 2017. **72**(11): p. 1127-1137.
7. Zarghampour, F., et al., *On-chip electromembrane extraction followed by sensitive digital image-based colorimetry for determination of trace amounts of Cr(vi).* Analytical Methods, 2020. **12**(4): p. 483-490.
8. Porto, I.S.A., et al., *Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry.* Microchemical Journal, 2019. **149**: p. 4.
9. Jain, R., et al., *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with digital image colorimetry for paracetamol analysis.* Microchemical Journal, 2021. **162**: p. 9.
10. Sankar, K., et al., *Digital image-based quantification of chlorpyrifos in water samples using a lipase embedded paper based device.* Talanta, 2020. **208**: p. 9.
11. Solana-Altabella, A., et al., *Computer vision-based analytical chemistry applied to determining iron in commercial pharmaceutical formulations.* Talanta, 2018. **188**: p. 349-355.
12. Leal, V.G., A.D. Batista, and J.F.D. Petruci, *3D-printed and fully portable fluorescent-based platform for sulfide determination in waters combining vapor generation extraction and digital images treatment.* Talanta, 2021. **222**.

13. Benedetti, L.P.D., et al., *A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks.* Analytical Methods, 2015. **7**(10): p. 4138-4144.
14. Fernandes, G.M., et al., *Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry - A review.* Analytica Chimica Acta, 2020. **1135**: p. 187-203.
15. Pohanka, M., *Colorimetric hand-held sensors and biosensors with a small digital camera as signal recorder, a review.* Reviews in Analytical Chemistry, 2020. **39**(1): p. 20-30.
16. Scuri, A.E., *Fundamentos da imagem digital.* Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 1999: p. 13.
17. Lyra, W.S., et al., *Digital image-based flame emission spectrometry.* Talanta, 2009. **77**(5): p. 1584-1589.
18. Barreto, J.A., et al., *Pressure variation in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction associated with digital image colorimetry: Determination of cobalt in food samples.* Microchemical Journal, 2020. **157**.
19. Lamarca, R.S., et al., *Determination of formaldehyde in cosmetic products using gas-diffusion microextraction coupled with a smartphone reader.* Analytical Methods, 2019. **11**(29): p. 3697-3705.
20. Neto, J.H.S., et al., *Speciation analysis based on digital image colorimetry: Iron (II/III) in white wine.* Talanta, 2019. **194**: p. 86-89.
21. Zhou, H.Y., et al., *Digital image modification detection using color information and its histograms.* Forensic Science International, 2016. **266**: p. 379-388.
22. Fernandez, E.G., et al., *Digital Image Tamper Detection Technique Based on Spectrum Analysis of CFA Artifacts.* Sensors, 2018. **18**(9): p. 18.
23. Vidal, M., et al., *Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis.* Talanta, 2018. **184**: p. 58-64.
24. Robertson, A.R., *COLORIMETRY.* Reports on Progress in Physics, 1978. **41**(4): p. 469-510.
25. Abdolmaleky, M., et al., *Red-Green-Blue multi-channel quantum representation of digital images.* Optik, 2017. **128**: p. 121-132.

26. Santos, P.M., P.D. Wentzell, and E.R. Pereira, *Scanner Digital Images Combined with Color Parameters: A Case Study to Detect Adulterations in Liquid Cow's Milk.* Food Analytical Methods, 2012. **5**(1): p. 89-95.
27. Helfer, G.A., et al., *PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices.* Journal of the Brazilian Chemical Society, 2017. **28**(2): p. 328-335.
28. Cantrell, K., et al., *Use of the Hue Parameter of the Hue, Saturation, Value Color Space As a Quantitative Analytical Parameter for Bitonal Optical Sensors.* Analytical Chemistry, 2010. **82**(2): p. 531-542.
29. Carretero-Pena, S., L.C. Blazquez, and E. Pinilla-Gil, *Estimation of PM10 Levels and Sources in Air Quality Networks by Digital Analysis of Smartphone Camera Images Taken from Samples Deposited on Filters.* Sensors, 2019. **19**(21): p. 19.
30. Dantas, H.V., et al., *An inexpensive NIR LED Webcam photometer for detection of adulterations in hydrated ethyl alcohol fuel.* Microchemical Journal, 2017. **135**: p. 148-152.
31. Dominguez, M.A., et al., *Geographical origin classification of Argentinean honeys using a digital image-based flow-batch system.* Microchemical Journal, 2014. **112**: p. 104-108.
32. Bishop, T. and G. Lee, *TAOS Colorimetry Tutorial: The Science of Color.* Texas Advanced Optoelectronic Solutions, 2006: p. 7-12.
33. Meszaros, L.A., et al., *Digital UV/VIS imaging: A rapid PAT tool for crushing strength, drug content and particle size distribution determination in tablets.* International Journal of Pharmaceutics, 2020. **578**: p. 13.
34. Diniz, P., et al., *Using a simple digital camera and SPA-LDA modeling to screen teas.* Analytical Methods, 2012. **4**(9): p. 2648-2652.
35. Araujo, A., W. Marinho, and A.D. Gomes, *A Fast and Inexpensive Chemometric-Assisted Method to Identify Adulteration in Acai (Euterpe oleracea) Using Digital Images.* Food Analytical Methods, 2018. **11**(7): p. 1920-1926.
36. Oliveira, L.F., et al., *Proposition of a simple method for chromium (VI) determination in soils from remote places applying digital images: A case study from Brazilian Antarctic Station.* Microchemical Journal, 2013. **109**: p. 165-169.

37. da Silva, R.S. and E.M. Borges, *Quantitative Analysis Using a Flatbed Scanner: Aspirin Quantification in Pharmaceutical Tablets.* Journal of Chemical Education, 2019. **96**(7): p. 1519-1526.
38. Soares, S., et al., *A novel spot test based on digital images for determination of methanol in biodiesel.* Talanta, 2019. **195**: p. 229-235.
39. Berasarte, I., et al., *pH measurement and phosphate determination in pharmaceutical eye drops for eye diseases by digital image analysis.* Microchemical Journal, 2021. **162**.
40. Altalhi, T.A., et al., *Mesopores silica nanotubes-based sensors for the highly selective and rapid detection of Fe2+ ions in wastewater, boiler system units and biological samples.* Analytica Chimica Acta, 2021. **1180**.
41. Balasubramanian, S., et al., *Digital colorimetric analysis for estimation of iron in water with smartphone-assisted microfluidic paper-based analytical devices.* International Journal of Environmental Analytical Chemistry.
42. Ballesteros, J.I., H.J.R. Caleja-Ballesteros, and M.C. Villena, *Digital image-based method for iron detection using green tea (Camellia sinensis) extract as natural colorimetric reagent.* Microchemical Journal, 2021. **160**.
43. Soares, S. and F.R.P. Rocha, *Spot test for determination of uric acid in saliva by smartphone-based digital images: A new proposal for detecting kidney dysfunctions.* Microchemical Journal, 2021. **162**.
44. Cerrato-Alvarez, M., et al., *A portable, low-cost, smartphone assisted methodology for on-site measurement of NO2 levels in ambient air by selective chemical reactivity and digital image analysis.* Sensors and Actuators B-Chemical, 2021. **338**: p. 9.
45. Franco, M.D.K., et al., *A color reaction for the determination of Cu2+ in distilled beverages employing digital imaging.* Analytica Chimica Acta, 2021. **1177**.
46. Weston, M., R.P. Kuchel, and R. Chandrawati, *Digital analysis of polydiacetylene quality tags for contactless monitoring of milk.* Analytica Chimica Acta, 2021. **1148**.
47. Nunes, L.S., M.G.A. Korn, and V.A. Lemos, *A novel direct-immersion single-drop microextraction combined with digital colorimetry applied to the determination of vanadium in water.* Talanta, 2021. **224**.

48. Khoshmaram, L. and M. Mohammadi, *Combination of a smart phone based low-cost portable colorimeter with air-assisted liquid-liquid microextraction for speciation and determination of chromium (III) and (VI).* Microchemical Journal, 2021. **164**.
49. Bertoldi, C., et al., *Microplastic abundance quantification via a computer-vision-based chemometrics-assisted approach.* Microchemical Journal, 2021. **160**.
50. Martinez-Avino, A., et al., *NQS-Doped PDMS Solid Sensor: From Water Matrix to Urine Enzymatic Application.* Biosensors-Basel, 2021. **11**(6).
51. Scroccarello, A., et al., *Metal nanoparticles based lab-on-paper for phenolic compounds evaluation with no sample pretreatment. Application to extra virgin olive oil samples.* Analytica Chimica Acta, 2021. **1183**.
52. Phuangsaijai, N., J. Jakmunee, and S. Kittiwachana, *Investigation into the predictive performance of colorimetric sensor strips using RGB, CMYK, HSV, and CIELAB coupled with various data preprocessing methods: a case study on an analysis of water quality parameters.* Journal of Analytical Science and Technology, 2021. **12**(1).
53. Sruthi, P.S., et al., *Eco-friendly pH detecting paper-based analytical device: Towards process intensification.* Analytica Chimica Acta, 2021. **1182**.
54. Geladi, P., S. Wold, and K.J.A.C.A. Esbensen, *Image analysis and chemical information in images.* 1986. **191**: p. 473-480.
55. Ehrlich, R., et al., *Petrographic image analysis; I, Analysis of reservoir pore complexes.* 1984. **54**(4): p. 1365-1378.
56. Phadungcharoen, N., et al., *Ion pair extraction coupled with digital image colorimetry as a rapid and green platform for pharmaceutical analysis: An example of chlorpromazine hydrochloride tablet assay.* Talanta, 2020. **219**.
57. Mohamed, A.A., E.M. Ismail, and S. Ali, *Ultrasensitive catalytic assessment of chromium(VI) using digital imaging.* Microchemical Journal, 2020. **157**.
58. Geladi, P. and K.J.J.o.C. Esbensen, *Can image analysis provide information useful in chemistry?* 1989. **3**(2): p. 419-429.

59. Byrne, L., et al., *Digital imaging as a detector for generic analytical measurements.* Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2000. **19**(8): p. 517-522.
60. Wu, D. and D.W. Sun, *Colour measurements by computer vision for food quality control - A review.* Trends in Food Science & Technology, 2013. **29**(1): p. 5-20.
61. Roda, A., et al., *Smartphone-based biosensors: A critical review and perspectives.* Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2016. **79**: p. 317-325.
62. Costa, G.D., et al., *Iodine determination in table salts by digital images analysis.* Analytical Methods, 2018. **10**(36): p. 4463-4470.
63. Luiz, V.H.M., et al., *Paper platform for determination of bumetanide in human urine samples to detect doping in sports using digital image analysis.* Microchemical Journal, 2019. **147**: p. 43-48.
64. Albizu, G., et al., *Analytical control of nickel coating baths by digital image analysis.* Microchemical Journal, 2020. **154**: p. 6.
65. Vidal, M., et al., *Flatbed scanners as a source of imaging. Brightness assessment and additives determination in a nickel electroplating bath.* Analytica Chimica Acta, 2011. **694**(1-2): p. 38-45.
66. da Silva, E.K.N., et al., *A fluorescence digital image-based method using a 3D-printed platform and a UV-LED chamber made of polyacid lactic for quinine quantification in beverages.* Microchemical Journal, 2020. **157**.
67. Zhang, Y., S.G. Ge, and J.H. Yu, *Chemical and biochemical analysis on lab-on-a-chip devices fabricated using three-dimensional printing.* Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2016. **85**: p. 166-180.
68. Gomes, P.C., et al., *Determination of theobromine and caffeine in fermented and unfermented Amazonian cocoa (Theobroma cacao L.) beans using square wave voltammetry after chromatographic separation.* Food Control, 2020. **108**.
69. Ozcan, A., *Mobile phones democratize and cultivate next-generation imaging, diagnostics and measurement tools.* Lab on a Chip, 2014. **14**(17): p. 3187-3194.
70. Autodesk. *Eagle versão 7.7*. 12 de setembro de 2021]; Available from: http://eagle.autodesk.com/eagle/software-versions/1.

71. Groups.io. *pcb-gcode*. [cited 2021 12 de setembro]; Available from: https://groups.io/g/pcbgcode.
72. Revit, R.I. *Rhinoceros*. [cited 2021 12 de setembro]; Available from: https://www.rhino3d.com/es/.
73. CyberLink. *YouCam*. 2019 [cited 2019 23 July]; Available from: https://www.cyberlink.com/products/youcam/features_en_US.html?r=1.
74. Health, N.I.o. *ImageJ*. 2017 [cited 2019 23 July]; Available from: https://imagej.nih.gov/ij/download.html.
75. Danchana, K., et al., *Spectrophotometric system based on a device created by 3D printing for the accommodation of a webcam chamber as a detection system.* Talanta, 2020. **206**: p. 6.
76. Ferreira, M.d.A., et al., *Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: digestibilidade.* 2009. **38**: p. 1568-1573.
77. Peres, M.T.P., et al., *Titanium dioxide (TiO2) as a marker to estimate fecal output in sheep.* Ciencia Rural, 2019. **49**(12).
78. Detmann, E., et al., *Avaliação da técnica dos indicadores na estimação do consumo por ruminantes em pastejo.* 2004. **46**(1): p. 40-57.
79. Moyo, M. and I. Nsahlai, *Consequences of Increases in Ambient Temperature and Effect of Climate Type on Digestibility of Forages by Ruminants: A Meta-Analysis in Relation to Global Warming.* Animals, 2021. **11**(1).
80. Sampaio, C.B., et al., *Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle.* Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science, 2011. **40**(1): p. 174-182.
81. Titgemeyer, E.C., et al., *Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle.* Journal of Animal Science, 2001. **79**(4): p. 1059-1063.
82. Myers, W.D., et al., *Technical note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide.* Journal of Animal Science, 2004. **82**(1): p. 179-183.
83. Glindemann, T., et al., *Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep.* Animal Feed Science and Technology, 2009. **152**(3-4): p. 186-197.

84. Ministério da Saúde, C.N.d.N.e.P.p.A. *Resolução Nº 44*. 1977 [cited 2021 06 de setembro]; Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cnnpa/1977/res0044_00_00_1977.html.
85. Ministério da Saúde, A.N.d.V.S. *Resolução - RDC Nº 45, De 3 de Dezembro de 2010*. 2010 [cited 2021 06 de setembro]; Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/rdc0045_03_11_2010.html.
86. Berchielli, T.T., et al., *Comparison of markers used to estimate fecal production and digesta flow of cattle.* Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science, 2005. **34**(3): p. 987-996.
87. Detmann, E., et al., *Avaliação do vício de" tempo longo" de indicadores internos em ensaio de digestão com ruminantes.* 2007. **59**: p. 182-188.
88. Tzoka, S., M. Tarara, and D.L. Giokas, *Photography-based photometry: High throughput UV photometric analysis without scientific equipment based on contact printing photography and common imaging devices.* Sensors and Actuators B-Chemical, 2021. **328**: p. 9.
89. Albizu, G., et al., *Analytical control of nickel coating baths by digital image analysis.* Microchemical Journal, 2020. **154**.
90. Jain, R., et al., *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with digital image colorimetry for paracetamol analysis.* Microchemical Journal, 2021. **162**.
91. Kılıç, V., N. Horzum, and M.E.J.C.D. Solmaz, *From sophisticated analysis to colorimetric determination: Smartphone spectrometers and colorimetry.* 2018: p. 1-19.
92. Barros, J., et al., *Digital Image Analysis for the Colorimetric Determination of Aluminum, Total Iron, Nitrite and Soluble Phosphorus in Waters.* Analytical Letters, 2017. **50**(2): p. 414-430.
93. Cerrato-Alvarez, M., et al., *Measurement of tropospheric ozone by digital image analysis of indigotrisulfonate-impregnated passive sampling pads using a smartphone camera.* Microchemical Journal, 2020. **154**.
94. Helfer, G.A., et al., *Chemostat: exploratory multivariate data analysis software.* Química Nova, 2015. **38**(4): p. 575-579.

95. Short, F.J., et al., *Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies.* Animal Feed Science and Technology, 1996. **59**(4): p. 215-221.
96. Olivieri, A.C., *Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial.* Analytica Chimica Acta, 2015. **868**: p. 10-22.
97. Neto, B.B., M.F. Pimentel, and M.C.U. Araujo, *Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration (Reprinted from Pure Appl Chem, vol 70, pg 993, 1998).* Quimica Nova, 2002. **25**(5): p. 856-865.
98. Sevastou, A., et al., *Mix-and-read method for assessment of milk pasteurization using a smartphone or a common digital camera.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020. **412**(23): p. 5663-5669.
99. Leal, V.G., A.D. Batista, and J.F.D. Petruci, *3D-printed and fully portable fluorescent-based platform for sulfide determination in waters combining vapor generation extraction and digital images treatment.* Talanta, 2021. **222**: p. 7.
100. Danchana, K. and V. Cerda, *Design of a portable spectrophotometric system part II: Using a digital microscope as detector.* Talanta, 2020. **216**: p. 6.
101. Mishra, H., et al., *Edge excitation red shift and energy migration in quinine bisulphate dication.* Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2006. **177**(2-3): p. 197-204.
102. Kristoffersen, A.S., et al., *Testing Fluorescence Lifetime Standards using Two-Photon Excitation and Time-Domain Instrumentation: Fluorescein, Quinine Sulfate and Green Fluorescent Protein.* Journal of Fluorescence, 2018. **28**(5): p. 1065-1073.
103. Oliveira, D.M., et al., *Desenvolvimento de um Fluorímetro Artesanal e Propostas para sua Aplicação nas Aulas Práticas de Disciplinas de Química Analítica Instrumental nos Cursos de Graduação.* Revista Virtual de Química, 2015. **7**(6): p. 2438-2456.
104. Granica, M. and Ł. Tymecki, *Analytical aspects of smart (phone) fluorometric measurements.* Talanta, 2019. **197**: p. 319-325.

105. Fiedoruk-Pogrebniak, M., M. Granica, and R. Koncki, *Compact detectors made of paired LEDs for photometric and fluorometric measurements on paper.* Talanta, 2018. **178**: p. 31-36.
106. Tymecki, Ł., et al., *Fluorimetric detector and sensor for flow analysis made of light emitting diodes.* Analytica chimica acta, 2012. **721**: p. 92-96.
107. Friedrichs, A., et al., *SmartFluo: A method and affordable adapter to measure chlorophyll a fluorescence with smartphones.* Sensors, 2017. **17**(4): p. 678.
108. Berasarte, I., et al., *pH measurement and phosphate determination in pharmaceutical eye drops for eye diseases by digital image analysis.* Microchemical Journal, 2021. **162**: p. 7.
109. Saraji, M. and N. Bagheri, *Paper-based headspace extraction combined with digital image analysis for trace determination of cyanide in water samples.* Sensors and Actuators B-Chemical, 2018. **270**: p. 28-34.
110. Santos, L.B., et al., *Solid-Phase Extraction and Detection by Digital Image Directly in the Sorbent: Determination of Nickel in Environmental Samples.* Water Air and Soil Pollution, 2020. **231**(9): p. 9.
111. Zhao, H.D., et al., *Display the CIE 1931 Color Chromaticity Diagram with Digital Image Processing*, in *2013 International Conference on Optical Instruments and Technology: Optoelectronic Imaging and Processing Technology*, X. Lin and J. Zheng, Editors. 2013, Spie-Int Soc Optical Engineering: Bellingham.
112. Danzer, K., L.A. Currie, and C. Commission Gen Aspects Analyt, *Guidelines for calibration in analytical chemistry - Part 1. Fundamentals and single component calibration (IUPAC recommendations 1998).* Pure and Applied Chemistry, 1998. **70**(4): p. 993-1014.
113. Ortiz, M., M. Sánchez, and L. Sarabia, *Quality of analytical measurements: univariate regression.* 2020.
114. Currie, L.A., *Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995).* Analytica Chimica Acta, 1999. **391**(2): p. 105-126.
115. Ribeiro, F.A.d.L., et al., *Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados.* Química Nova, 2008. **31**(1): p. 164-171.

116. Harmonization, I.C.o., *Q2A: Text on validation of analytical procedures.* Fed Regist, 1995. **60**: p. 11260-11262.
117. BRASIL, *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a Publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos".* Diário Oficial da União, 2003.
118. Instituto Nacional de Metrologia, N.e.Q.I., *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. 2003, DOQ-CGCRE-008, Rio de Janeiro.
119. Presidência de República, C.C., Subchefia para Assuntos Jurídicos. *Decreto Nº 6.871, de 4 de Junho de 2009*. 2009 [cited 2021 22 de setembro]; Available from: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm.
120. Agricultura, M.d. *Anexo à norma interna DIPOV nº 01/2019*. 2019 [cited 2021 22 de setembro]; Available from: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/consolidacao-das-normas-de-bebidas-fermentados-aceticos-vinho-e-derivados-da-uva-e-do-vinho.