



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

TALLIS PACHECO TONON

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES COLORIMÉTRICOS EM PAPEL E
SOFTWARE DE COLORIMETRIA DIGITAL PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE
DE ÁGUA DIRETAMENTE EM CAMPO**

**CAMPINAS
2024**

TALLIS PACHECO TONON

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES COLORIMÉTRICOS EM PAPEL E
SOFTWARE DE COLORIMETRIA DIGITAL PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE
DE ÁGUA DIRETAMENTE EM CAMPO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. William Reis de Araujo

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno Tallis Pacheco Tonon e orientada pelo Prof. Dr. William Reis de Araujo.

**CAMPINAS
2024**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

T616d Tonon, Tallis Pacheco, 1996-
Desenvolvimento de sensores colorimétricos em papel e software de colorimetria digital para avaliação da qualidade de água diretamente em campo / Tallis Pacheco Tonon. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: William Reis de Araujo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química.

1. Colorimetria. 2. Água - Qualidade - Medição. 3. Escherichia coli. 4. Biossensores. 5. Dispositivos em papel. I. Araujo, William Reis de, 1991-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Development of colorimetric paper-based devices and digital colometry software for on-site water quality evaluation

Palavras-chave em inglês:

Colorimetry

Water quality - Measurement

Escherichia coli

Biosensors

Paper-based devices

Área de concentração: Química Analítica

Títuloção: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

William Reis de Araujo [Orientador]

Thiago Regis Longo Cesar da Paixão

Cassiana Carolina Montagner

Data de defesa: 28-05-2024

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0000-3251-0839>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5964136698192209>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. William Reis de Araujo (Orientador)

Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão (IQ - USP)

Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner (IQ - Unicamp)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno **Tallis Pacheco Tonon**, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de maio de 2024.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família pelo suporte contínuo, à minha mãe, Maria Antônia, pelas palavras de sabedoria e amor incondicional, ao meu pai, Bonifácio, pela generosidade e conselhos, e a minha irmã pela inspiração e por se mostrar sempre capaz. Sem vocês não seria quem estou me tornando.

Às minhas tias, Vânia, Mariângela e Renata, por serem afeto em tempos difíceis, porto seguro quando as ondas andavam altas e generosidade sem tamanho quando a esperança andava fraca.

Ao meu orientador, Prof. William, pelo suporte, paciência e confiança. Agradeço pelos conselhos e palavras de reforço.

À Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) pela oportunidade de ter cursado o mestrado, ao Instituto de Química da Unicamp (IQ) pela estrutura disponibilizada e aos funcionários e técnicos do IQ que me ajudaram durante esse período.

Aos integrantes do Laboratório de Sensores Químicos Portáteis (LSQP) por toda a ajuda.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo nº 136551/2019-0 - pelos recursos na forma de bolsa de pesquisa.

As agências de fomento que me proporcionaram subsídio para custear a pesquisa.

À Fapesp: (Processos: 2022/03250-7 e 2018/04061-8).

Ao CNPq (Processo: 438828/2018-6).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos meus amigos, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo.

Os de longe e os de perto, aqui vai meu muito obrigado.

RESUMO

A análise da qualidade de recursos hídricos é de suma importância para assegurar saúde pública e saneamento básico. Atualmente, buscam-se métodos mais rápidos e acessíveis que substituam processos demorados e custosos comumente utilizados nessas análises. Sensores colorimétricos em papel, também conhecidos como PADs (*paper-based analytical devices*), têm ganhado espaço devido à sua simplicidade, portabilidade, baixo custo e fácil uso. Assim, no capítulo 1, descrevemos o uso de câmera de *smartphone* para a determinação semiquantitativa de pH e a detecção de β -galactosidase (β -gal) utilizando sensores em papel criados por impressão a cera e colorimetria digital. A enzima β -gal é um reconhecido biomarcador para a detecção de *Escherichia coli*, sendo, portanto, um analito de interesse na detecção indireta desse patógeno. Ao avaliar indicadores de pH, observou-se correlação linear, com coeficientes de determinação maiores que 0,98, para todos os canais de cor RGB empregando azul de bromotimol (ABT) 0,05% (m/v), como condição ótima, na determinação de pH na faixa de 6,0 a 9,0. Para a detecção enzimática de β -gal, ensaios de otimização como: concentração do substrato cromogênico vermelho de cromofenol- β -D-galactopiranosose (CPRG), tempo reacional e diâmetro do spot foram realizados. O sensor foi capaz de detectar a presença de β -gal em 20 minutos com limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) iguais a $6,4 \times 10^{-3}$ e $2,1 \times 10^{-2}$ U mL⁻¹, respectivamente. A reprodutibilidade do método apresentou um desvio padrão relativo de 4,18% (n=12), empregando valores de cor do canal verde. Adicionalmente, no capítulo 2, uma aplicação de visão computacional (CV) foi desenvolvida e aplicada de forma automatizada aos ensaios de colorimetria digital propostos. O *software* desenvolvido (*Water Sensing App*) permite a identificação automatizada dos *spots* colorimétricos, extração dos parâmetros de cor e tratamento de dados como seleção da região homogênea de cor, permitindo remoção de eventuais defeitos de impressão e presença de reflexos durante a aquisição da imagem digital da solução confinada nos *spots*. Os dados obtidos pelo sistema CV desenvolvido apresentou excelente concordância entre os resultados (nível de confiança de 95% segundo o teste t de Student) quando comparado ao uso de um *software* comercial (Gimp®) e tradicional empregado em colorimetria digital. Assim, os resultados obtidos até o momento permitem vislumbrar um avanço em automatização e processamento de dados em campo, principalmente para uso por não especialistas.

ABSTRACT

The analysis of water resources quality is of utmost importance to ensure public health and sanitation. Currently, there is a search for faster and more accessible methods to replace time-consuming and costly processes commonly used in these analyses. Colorimetric paper-based sensors, also known as PADs (paper-based analytical devices), have gained prominence due to their simplicity, portability, low cost, and ease of use. Therefore, in Chapter 1, we describe the use of a smartphone camera for the semiquantitative determination of pH and the detection of β -galactosidase (β -gal) using paper sensors created by wax printing and digital colorimetry. The enzyme β -gal is a recognized biomarker for detecting *Escherichia coli*, and thus, an analyte of interest in the indirect detection of this pathogen. When evaluating pH indicators, a linear correlation was observed, with determination coefficients greater than 0.98 for all RGB color channels employing 0.05% (m/v) bromothymol blue as the optimal condition for pH determination in the range of 6.0 to 9.0. For β -gal enzymatic detection, optimization assays such as chromogenic substrate concentration, reaction time, and spot diameter were performed. The sensor was able to detect the presence of β -gal in 20 minutes with detection limits (LD) and quantification limits (LQ) equal to 6.4×10^{-3} and 2.1×10^{-2} U mL⁻¹, respectively. The method's reproducibility presented a relative standard deviation of 4.18% (n=12), employing green channel color values. Additionally, in Chapter 2, a computer vision (CV) application was developed and applied in an automated manner to the proposed digital colorimetry assays. The developed software (Water Sensing App) allows for the automated identification of colorimetric spots, extraction of color parameters, and data processing such as selection of the homogeneous color region, allowing for the removal of any wax printing defects and presence of light reflections during the acquisition of digital images of the solution confined in the spots. The data obtained by the developed CV system showed excellent agreement between the results (95% confidence level according to the Student's t-test) when compared to the use of commercial and traditional software (Gimp®) employed in digital colorimetry. Thus, the results obtained so far allow us to envision an advancement in field automation and data processing, especially for use by non-specialists.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Percentual de Municípios com serviço de: a) abastecimento de água por rede geral de distribuição e b) esgotamento sanitário por rede coletora, segundo as Grandes Regiões - 1989/2017. Reproduzido de IBGE, 2020.^{6,8} Notas: * e **..... 21
- Figura 2. Percentual de Municípios com serviço de abastecimento de água por rede geral de distribuição em funcionamento e que realizavam captação de água doce, por tipo de ponto de captação, segundo as Grandes Regiões e as classes de tamanho da população dos Municípios – 2017. Reproduzido de IBGE, 2020.^{6,8} 22
- Figura 3. Esquema ilustrativo dos métodos de fabricação de dispositivos analíticos em papel. Reproduzido da ref. ⁴⁵, com permissão. 25
- Figura 4. a) Escala RGB representada tridimensionalmente. b) Cone tridimensional representando os parâmetros do modelo HSV.⁵¹..... 27
- Figura 5. Exemplo de modelos de sensores colorimétricos com spots circulares com diâmetro de: a) 1,0 cm, b) ~1,0 cm após impressão e aquecimento, c) 0,5 cm e d) ~0,4 cm após impressão e aquecimento, respectivamente. 29
- Figura 6. A) Imagem capturada no momento de impressão 3D e b) módulo central finalizado após aproximadamente 29 horas de impressão. 30
- Figura 7. Projeção tridimensional completa de todas as peças que compõem o projeto da câmara para controle de luminosidade. a) suporte personalizado para encaixe de smartphone, b) módulo central denominada câmara escura com furos para câmera e fiações, c) pequeno pino para fixar o suporte dos LEDs, d) suporte interno para o apoio de 4 LEDs e e) tampa inferior para apoio do sensor e vedação da câmara..... 31
- Figura 8. Captura do momento da extração dos parâmetros de cor da região central do spot utilizando ferramenta de seleção em formato quadrado com lados equivalentes a 60 px com o software Gimp®. 35
- Figura 9. Teste de resistência dos spots (~0,4 cm de diâmetro) às misturas de água/etanol em proporções de: a) 15% (v/v) e b) 20% (v/v) etanol (n=12 spots)..... 37
- Figura 10. A) Gráfico referente a variação da intensidade relativa de dCor pelo volume de indicador ABF. B) Gráfico referente a variação da intensidade de dCor pelo volume de indicador VBC. C) Imagem digital dos spots referentes ao indicador ABF. D) Imagem digital dos spots referentes ao indicador VBC. Ensaios realizados em triplicata (n=3). 38
- Figura 11. a) Imagem digital dos spots ainda úmidos com a variação de pH utilizando os indicadores ABF, ABT, VBC e VC em concentração de 0,025% (m/v). b) Paleta de cores do teste de pH utilizando a média dos valores em triplicata, extraídos pelo Gimp®, dos spots coloridos (n=3)..... 39
- Figura 12. Curvas analíticas utilizando a intensidade relativa de dCor em função do pH para diferentes indicadores: a) valores de RGB para o uso de ABT; b) valores de

RGB para o uso de VC c) valores de CMYK para o uso de ABT; d) valores de CMYK para o uso de VC; e) valores de HSV para o uso de ABT; f) valores de HSV para o uso de VC; g) valores de DE para o uso de ABT; h) valores de DE para o uso de VC. Todos os resultados foram obtidos em triplicata (n=3)..... 41

Figura 13. Paleta de cores obtida utilizando a média dos valores dos spots úmidos e secos dos indicadores ABT e VC (n=3). 42

Figura 14. Gráfico comparando valores de dCor: a) com a variação do pH entre spots úmidos (1 min) e secos (70 min) do indicador ABT a 0,025% (m/v); e b) dB com a variação do pH entre spots úmidos (1 min) e secos (70 min) do indicador VC a 0,025% (m/v) (n=3). 43

Figura 15. Gráfico referente a variação da intensidade de cor RGB pelo volume de indicador ABF (n=3). 43

Figura 16. a) Imagem digital dos spots úmidos com a variação de pH utilizando os indicadores ABF, ABT, VBC, VC e VM em concentração de 0,05% (m/v) em etanol 10% (v/v). b) Paleta de cores do teste de pH utilizando a média dos valores em triplicata dos spots coloridos (n=3). 44

Figura 17. Curvas analíticas utilizando a intensidade relativa de dCor pelo pH para o indicador: a) ABT; b) VC; e c) VM e seus respectivos fittings lineares (n=3)..... 45

Figura 18. A) Paleta de cores utilizando a média dos valores em triplicatas dos spots úmidos e secos, respectivamente, dos indicadores ABT, VC e VM. B) Gráfico comparando valores de dCor vermelho com a variação do pH entre spots úmidos e secos do indicador ABT (n=3)..... 46

Figura 19. A) Paleta de cores utilizando a média dos valores em triplicatas dos spots do indicador ABT com 0,05 e 0,025% (m/v). B) Gráfico referente a variação de dR pelo pH comparando duas concentrações de indicador ABT e respectivos fittings entre pH 6,0 e 9,0 (n=3). 47

Figura 20. Imagens digitais dos ensaios com a) spots úmidos e secos, respectivamente, da mistura ABT e VC nas proporções 1:1, e b) spots úmidos e secos, respectivamente, da mistura ABT e VC mesmas proporções utilizando aplicação dupla (n=3)..... 48

Figura 21. A) Paleta de cores da mistura de ABT e VC utilizando uma e duas aplicações de solução. B) Gráfico que representa a variação de cor RGB em função do pH para a mistura de ABT e VC na proporção de 1:1 (n=3). 48

Figura 22. Imagens digitais dos ensaios com a) spots úmidos e secos, respectivamente, da mistura ABT e VM nas proporções 1:2, e b) spots úmidos e secos, respectivamente, da mistura ABT e VM mesmas proporções utilizando aplicação dupla. 49

Figura 23. A) Paleta de cores da mistura de ABT e VM utilizando uma e duas aplicações de solução, respectivamente. B) Gráfico que representa a variação de cor pelo pH de ABT e VM na proporção de 1:2. 49

Figura 24. Gráfico de barras correspondente ao valor do pH e respectivos desvios obtidos para análises com PAD e pHmetro, em triplicata, para três matrizes distintas (n=3).	51
Figura 25. Paleta de cores composta por média das respostas, em triplicata, para os ensaios de determinação do pH para: variação de pH de 6,0 a 9,0 utilizando tampão BR; e amostras provenientes de lagoa, água mineral e torneira.	52
Figura 26. A) Equação química esquematizada da reação enzimática do CPRG e β -gal e b) Imagem de dois eppendorfs contendo solução amarela (somente CPRG) e solução vermelha-vinho (contendo mistura de CPRG e β -gal após cerca de 10 min de reação).	53
Figura 27. A) Imagem digital de uma grade de spots para a reação de β -gal (10^{-1} U mL $^{-1}$) e CPRG (0,1 a 2,0 mmol L $^{-1}$) em tempos diferentes de reação (até aquisição da imagem digital), utilizando spots de 1,0 cm de diâmetro. B) Paleta de cores da média das triplicatas da reação de β -gal e CPRG variando a concentração e tempo (n=3).	54
Figura 28. A) Gráfico do valor de vermelho (R) pela concentração de CPRG em diferentes tempos de análise. b) Gráfico do valor de verde (G) pela concentração de CPRG em diferentes tempos de análise. c) Gráfico do valor de azul (B) pela concentração de CPRG em diferentes tempos de análise. d) Gráfico do valor de distância euclidiana (DE) pela concentração de CPRG em diferentes tempos de análise (n=3).....	55
Figura 29. Gráfico correlacionando a resposta relativa do canal de cor: a) R, b) G, c) B e d) DE ao longo do tempo reacional para diferentes concentrações de CPRG (n=3).	57
Figura 30. a) Imagem digital da grade de spots da reação de β -gal (10^{-1} U mL $^{-1}$) e CPRG (0,1 a 10,0 mmol L $^{-1}$) ao longo de até 30 min. Foram utilizados spots de 0,5 cm de diâmetro. b) Paleta de cores da média das triplicatas da reação de β -gal e CPRG variando a concentração e tempo (n=3).....	58
Figura 31. Gráficos de intensidade relativa de G (dG) para variação de a) concentração de CPRG e b) tempo de reação (n=3).	58
Figura 32. a) Imagem digital da grade de spots da reação de β -gal (10^0 U mL $^{-1}$) e CPRG (0,1 a 10,0 mmol L $^{-1}$) em tempos diferentes e spots de 0,5 cm de diâmetro. b) Paleta de cores da média das triplicatas da reação de β -gal e CPRG, variando a concentração de CPRG e tempo de reação (n=3).	59
Figura 33. Gráficos de intensidade relativa de dG para variação de a) concentração de CPRG e b) tempo de reação (n=3).	60
Figura 34. Disco de Newton representando o caráter complementar cromático.	60
Figura 35. Imagem digital dos spots de diâmetro de 0,5 cm representando visualmente a curva analítica da variação de β -gal utilizando [CPRG]=2,0 mmol L $^{-1}$ em 20 min (n=3).	61

Figura 36. Curva analítica utilizando a intensidade relativa do canal verde em função da concentração de β -gal (n=3). Foi aplicado o fitting não-linear do tipo sigmoidal (hill).....	61
Figura 37. Curva analítica linearizada. Fitting linear da curva analítica da variação de β -gal pelo inverso da resposta do canal verde (1/G) (n=3). Faixa linear de 1×10^{-3} a 1×10^{-1} U mL ⁻¹	62
Figura 38. Sensor em papel contendo 12 spots utilizados para teste de reprodutibilidade. Condições: tempo=20 min; [CPRG] = 2,0 mmol L ⁻¹ ; [β -gal] = $1,0 \times 10^{-1}$ U mL ⁻¹ (n=12).	63
Figura 39. Fitting linear da curva de adição de β -gal pelo inverso da resposta do canal verde (1/G) para duas matrizes diferentes (água de lagoa e mineral). Faixa linear de 0,0 a $4,9 \times 10^{-1}$ U mL ⁻¹ (n=3).	64
Figura 40. Divisão do mercado mundial de diferentes OS entre 2009 e 2020. Reproduzido da referência ¹⁵ , com permissão.	76
Figura 41. Ilustração representativa do fluxo de dados em uma aplicação web RESTful.	77
Figura 42. QR Code com redirecionamento para a aplicação web WS.	82
Figura 43. Screenshots da aplicação WS das telas de: a) Authentication Screen (login e cadastramento) e b) Data Screen (tela principal responsável por mostrar todas as análises realizadas pelo usuário e acesso a novas capturas de imagens) exemplificada sem dados.....	84
Figura 44. Screenshots da aplicação WS das telas de Analysis: a) mostrando o formulário inicial contendo nome, número de amostras, replicatas e nome do analito/unidade; b) especificando a parte do formulário voltada para o preenchimento dos valores de unidade referentes a cada amostra; c) expondo o formulário responsável pelas configurações avançadas; e d) referente a etapa de captura de imagem utilizando a funcionalidade da tela em câmera.....	85
Figura 45. Screenshots da aplicação WS das telas: a) Data Screen contendo uma análise realizada; e b) Result Screen com o resultado da captura.	86
Figura 46. Esquema em fluxograma que lista ordenadamente as etapas principais do processamento da imagem até a resposta de cor. Os estágios foram divididos em três: visão computacional, valores de cor e manipulação dos dados. Em ordem, tem-se: imagem original, limitação da imagem, máscara na imagem, detecção de círculos, transposição de pontos, média de valores RGB, conversão dos valores de cor, processamento de dados e processamento estatístico.	87
Figura 47. Imagens ilustrativas do estágio de visão computacional com etapas de thresholding, máscara e círculos detectados.....	88
Figura 48. Círculo em máscaras considerando tratamentos de outliers diferentes: spot original (WS), threshold dos canais RGB (RGBHH) e threshold do padrão HSV	

(HSVTHR). Spot referente ao teste de robustez da reação de β -gal (10^{-1} U mL $^{-1}$) e CPRG (2,0 mmol L $^{-1}$) em 20 min..... 89

Figura 49. Histogramas correspondentes ao spot da figura anterior. Linhas correspondem ao valor máximo e limitações máximas e mínimas de acordo com o tratamento empregado. a) correspondente ao padrão RGB e ao tratamento RGBHH. b) correspondente ao canal H e tratamento HSVTHR; e c) correspondente aos canais S e V, e tratamento HSVTHR..... 90

Figura 50. Regressão linear multivariada correspondendo às respostas de dR obtidas a partir da extração dos valores de cor pelo software Gimp® e aplicação WS (n=3). 92

Figura 51. Curva de calibração referente a intensidade de dR em função do pH para o indicador ABT 0,05% (m/v) em etanol 10% (v/v) em diferentes modos de obtenção das respostas, assim como seus fittings na faixa de pH de 6,0 a 9,0..... 95

Figura 52. Curva analítica e fitting lineares da concentração de β -gal por intensidade do inverso do canal verde em diferentes modos de extração de valores de cor. 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações referentes às faixas de viragem e transição de cores de cada indicador. ⁵⁵	40
Tabela 2. Dados estatísticos para cada regressão linear dos valores de RGB aplicada às curvas referente aos indicadores ABT, VC e VM variando o pH.	46
Tabela 3. Dados estatísticos para a regressão linear dos valores de RGB aplicada às curvas referente ao indicador ABT variando-se a concentração.	47
Tabela 4. Respostas médias do pH correspondente a três amostras de água provenientes de fontes distintas, obtidas por análise em pHmetro e PADs, e seus respectivos desvios padrão (n=3).	50
Tabela 5. Análise estatística do tipo t-student para valores de pH correspondentes às análises utilizando pH (gl = 4; α = 0,05).....	51
Tabela 6. Dados estatísticos relacionado aos fittings das curvas de calibrações para β -gal (n=3).	62
Tabela 7. Dados deste trabalho comparado a retirados da literatura contendo matriz, LD e tempo de análise.	63
Tabela 8. Dados estatísticos referentes aos fittings lineares da curva de adição e recuperação com três diferentes matrizes.	65
Tabela 9. Dados estatísticos obtidos a partir do fittings linear da curva de adição e recuperação de β -gal em duas matrizes distintas. (n=3).	65
Tabela 10. Valores de custos para produção de spots individuais considerando volume de 15 μ L para ensaio do pH e 5 μ L para o ensaio enzimático.	66
Tabela 11. Lista de chamadas à API da aplicação WS e suas informações.	82
Tabela 12. Informações da regressão linear multivariada das respostas de dR/px referente a extração utilizando Gimp® e WS (n=3).	92
Tabela 13. Dados comparativos entre todos os métodos de extração de valores de cor do ensaio de robustez. Reação de β -gal (10^{-1} U mL ⁻¹) e CPRG (2,0 mmol L ⁻¹) em 20 min (n=12).	93
Tabela 14. Dados comparativos dos métodos de extração de valores de cor do ensaio de robustez com 70% do valor original do raio. Reação de β -gal (10^{-1} U mL ⁻¹) e CPRG (2,0 mmol L ⁻¹) em 20 min. (n=12)	94
Tabela 15. Dados referentes aos fittings das curvas de dR pelo pH para modos de extração de valores de cor diferentes.	95
Tabela 16. Comparação entre respostas para matrizes diferentes em relação aos modos de extração de valores de cor.	96

Tabela 17. Comparação entre dados das regressões lineares das curvas analíticas de β -gal por intensidade do inverso do canal verde.	97
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1/G	Inverso da resposta do canal verde
3D	Três dimensões (tridimensional)
ABF	Azul de Bromofenol
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABT	Azul de Bromotimol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BR	Tampão Britton-Robinson
CCD	<i>Charged Coupled Device</i>
CHT	<i>Hough Circle Transform</i>
CMOS	<i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i>
CMYK	<i>Cian, Magenta, Yellow e Black</i>
CPRG	Vermelho de Cromofenol- β -D-galactopiranosose
CV	<i>Computer Vision</i>
dCor	Variação do valor de cor
DE	Distância Euclidiana
DPR	Desvio Padrão Relativo
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
HSV	<i>Hue, Saturation e Value</i>
HSVTHR	<i>HSV Threshold</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LD	Limite de Detecção
LED	Diodo Emissor de Luz
LQ	Limite de Quantificação
NBR	Norma Brasileira
NMP	Número Mais Provável
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

OMS	Organização Mundial de Saúde
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosose
ONU	Organização das Nações Unidas
OpenCV	<i>Open Source Computer Vision Library</i>
OS	Sistema Operacional
PADs	Dispositivos Analíticos em Papel
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido Polilático
PNSB	Pesquisa Nacional de Saneamento Básico
R ²	Coeficiente de determinação
RGB	<i>Red, Green e Blue</i>
RGBHH	<i>RGB Half Height</i>
RT	Transcriptase Reversa
VBC	Verde de Bromocresol
VC	Vermelho de Cresol
VM	Vermelho de Metila
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosose
β -gal	β -Galactosidase

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	19
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Atual panorama hídrico	20
1.2. Coliformes	23
1.3. (Bio)sensores em papel	24
1.4. Padrão de cores	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1. Fabricação dos sensores colorimétricos em papel	29
3.2. Fabricação de câmara de suporte e controle de iluminação para aquisição das imagens colorimétricas por <i>smartphone</i>	29
3.3. Avaliação da resistência química da barreira dos PADS	31
3.4. Preparo de soluções de indicadores ácido-base e seus usos	31
3.5. Análises colorimétricas	32
3.5.1. <i>Análise de indicadores em função do pH</i>	32
3.5.2. <i>Análise de mistura de indicadores em função do pH</i>	32
3.5.3. <i>Quantificação do pH em amostras de água</i>	33
3.5.4. <i>Otimização do tempo de reação e concentração de CPRG no ensaio colorimétrico enzimático</i>	33
3.5.5. <i>Curva analítica para o ensaio colorimétrico enzimático</i>	34
3.6. Aquisição dos valores de cor	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Parametrização inicial e teste de resistência a solvente	37
4.2. Análise da interação de indicadores a 0,025% (m/v) com tampão BR ...	39
4.3. Uso de indicadores a 0,05% (m/v)	43
4.4. Avaliação do uso de mistura de indicadores	47
4.6. Reação enzimática de β -Gal e CPRG	52
5. CONCLUSÃO	67
6. REFERÊNCIAS	68
CAPÍTULO II	72
1. INTRODUÇÃO	73
1.1. Colorimetria digital	73
1.2. Visão computacional	74

1.3.	Ferramentas atuais	75
2.	OBJETIVOS	78
2.1.	Objetivo geral	78
2.2.	Objetivos específicos	78
3.	MÉTODOS	79
3.1.	Ambiente de desenvolvimento	79
3.2.	Testes de detecção de <i>spots</i>	79
3.3.	Tratamento dos valores de cor por <i>spot</i>	79
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1.	Lógica por traz do fluxo de dados	81
4.2.	Experiência do usuário	83
4.3.	Melhoria do algoritmo	86
4.4.	Comparação de metodologias de extração de valores de cor	91
4.4.1.	<i>Validação por regressão multivariada</i>	91
4.4.2.	<i>Comparação por ensaio de robustez</i>	92
4.4.3.	<i>Comparação por ensaio da variação de pH</i>	94
4.4.4.	<i>Comparação por ensaio enzimático</i>	96
5.	CONCLUSÃO	98
6.	REFERÊNCIAS	99

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. Atual panorama hídrico

Água é um bem comum a todos, portanto, é dever do Estado garantir seu manejo e distribuição segura a toda população.¹ Em sua amplitude, o saneamento básico contempla o tratamento e abastecimento de água, esgotamento sanitário, drenagem de águas pluviais e limpeza urbana, além da gestão de resíduos sólidos. Estes aspectos socioambientais, em conjunto com políticas públicas conscientizadoras, têm impacto direto na qualidade de vida e desenvolvimento da sociedade. É estimado que a cada dólar investido na área de saneamento urbano, há uma economia de 4,3 dólares em saúde.^{2,3} Assim, é de suma importância a atenção de políticas públicas voltadas para a manutenção e atendimento urbano, principalmente em áreas isoladas. A Organização das Nações Unidas (ONU) atende a uma agenda para até 2030, denominada Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), a qual o Brasil e mais 193 países assinam no intuito, dentre outros, de protocolar o compromisso na universalização do acesso à água potável.^{2,4,5}

Nacionalmente, houve avanço no atendimento municipal ao abastecimento por rede de distribuição entre 1989 e 2017. Em geral, a grande maioria dos municípios já contavam com os serviços de distribuição de água, o aumento expressivo aconteceu principalmente na região Norte, que em 28 anos, dispôs de um crescimento de 86,9 para 98,4% em sua cobertura (Figura 1a).⁶

Certamente, a democratização do acesso a água tratada está relacionada à implementação de políticas públicas. Um exemplo é a Lei 9.433 de 1997, também conhecida como Lei das Águas do Brasil, que define normas do uso sustentável e estabelece instrumentos na gestão e mobilização de órgãos que regulam o uso dos corpos hídricos de domínio federal.⁷

Porém, é importante salientar que é necessário interpretar tais dados associados a outras perspectivas para obter-se uma visão macroscópica acurada da realidade. Apesar de uma vasta rede de distribuição em 99,6% dos municípios brasileiros, somente 60,3% conta com esgotamento sanitário para sua população (Figura 1b). O esgotamento sanitário comporta todas as ações e estruturas urbanas que viabilizam coleta, transporte, tratamento e disposição final adequada de esgotos domésticos e industriais. Além disto, sabe-se que nem toda população de um município usufruirá deste direito fundamental, o saneamento básico.⁸

É notório que com o crescimento da população urbana a partir do século XX, diferentes abordagens foram desenvolvidas para permitir o abastecimento de água potável que atendesse as demandas por todo o mundo. Em países desenvolvidos, sistemas coletivos de distribuição são o principal meio de fornecimento de água de qualidade, suprimindo as necessidades populacionais de modo geral. Contrariamente, os demais países apresentam parcelas significativas de suas populações urbanas e rurais sem acesso à água potável e sistema de tratamento adequado.⁹ Mais de uma

em quatro pessoas no mundo, em torno de 2 bilhões de pessoas, não tem acesso a um sistema básico de saneamento.¹⁰

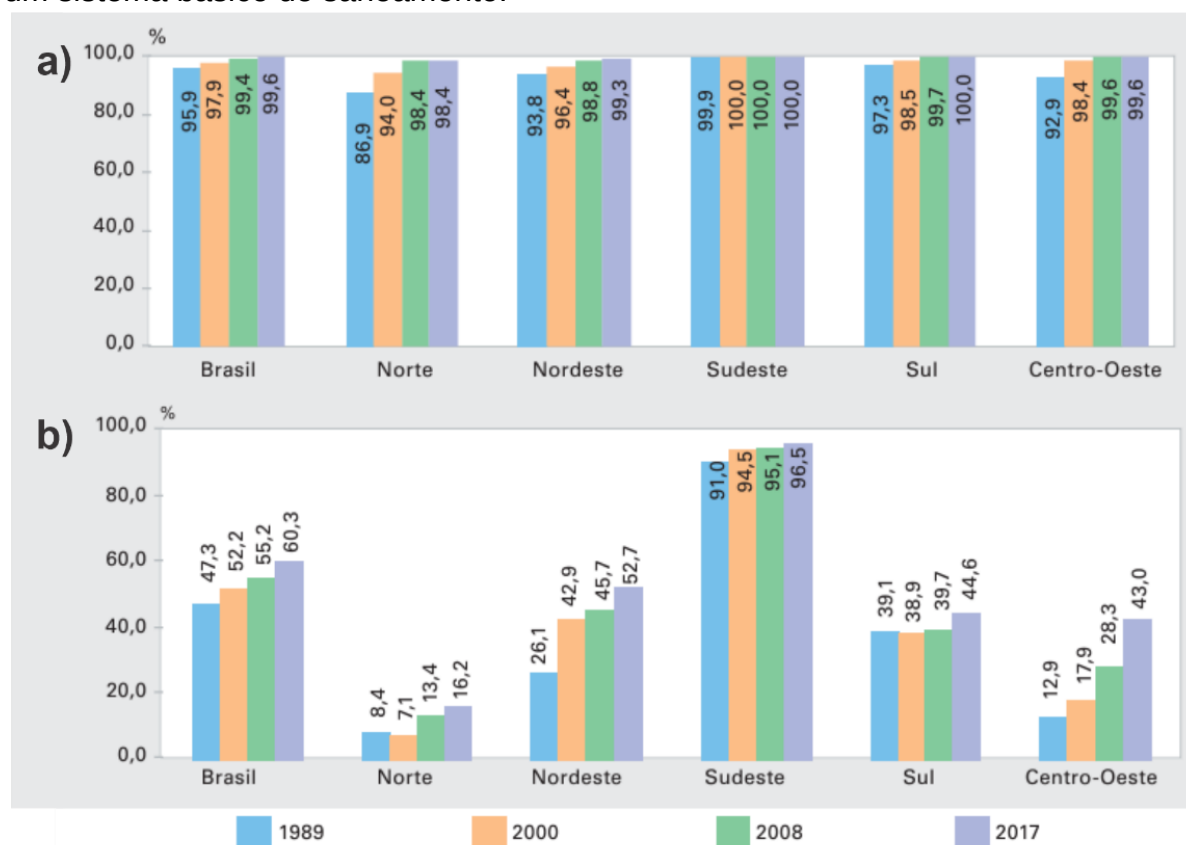


Figura 1. Percentual de Municípios com serviço de: a) abastecimento de água por rede geral de distribuição e b) esgotamento sanitário por rede coletora, segundo as Grandes Regiões - 1989/2017. Reproduzido de IBGE, 2020. ^{6,8} Notas: * e **.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% das doenças que ocorrem em países em desenvolvimento são decorrentes de contaminação da água.¹¹ Em torno de 297 mil crianças abaixo dos cinco anos de idade perdem a vida anualmente devido a diarreia, cólera e hepatite A, doenças transmitidas por meios aquosos, somado a desnutrições.¹² As áreas rurais são as mais afetadas, pois a maior parte da água utilizada para abastecimento dos moradores provém de poços, localizados próximos às residências, onde na maioria das vezes não é realizado processos de tratamento correto antes do consumo.^{13, 14}

* Para os anos de 1989, 2000 e 2008, considera-se o Município em que pelo menos um Distrito (mesmo que apenas parte dele) seja abastecido por rede geral de distribuição de água, sem diferenciação por condição de funcionamento do serviço ou é esgotado por rede coletora. Na PNSB (Pesquisa Nacional de Saneamento Básico) 2017, considera-se o Município em que ao menos uma entidade executora informou possuir serviço de abastecimento de água por rede geral de distribuição ou esgotamento sanitário por rede coletora em funcionamento, em implantação ou paralisado.

** Os totais de Municípios eram 4.425, 5.507, 5.564 e 5.570, em 1989, 2000, 2008 e 2017, respectivamente.

Segundo o IBGE, em 2017, a maioria dos municípios brasileiros contavam com rede de distribuição utilizando água de poços profundos, em torno de 68,5%. Em regiões com menos de 5 mil habitantes este número é ainda mais expressivo, 76,2%, Figura 2. Ademais, águas superficiais são manejadas de forma mais intensiva, principalmente em locais com grandes quantidades de moradores. Portanto, há diversificações regionais na origem da água de abastecimento.^{6,8}

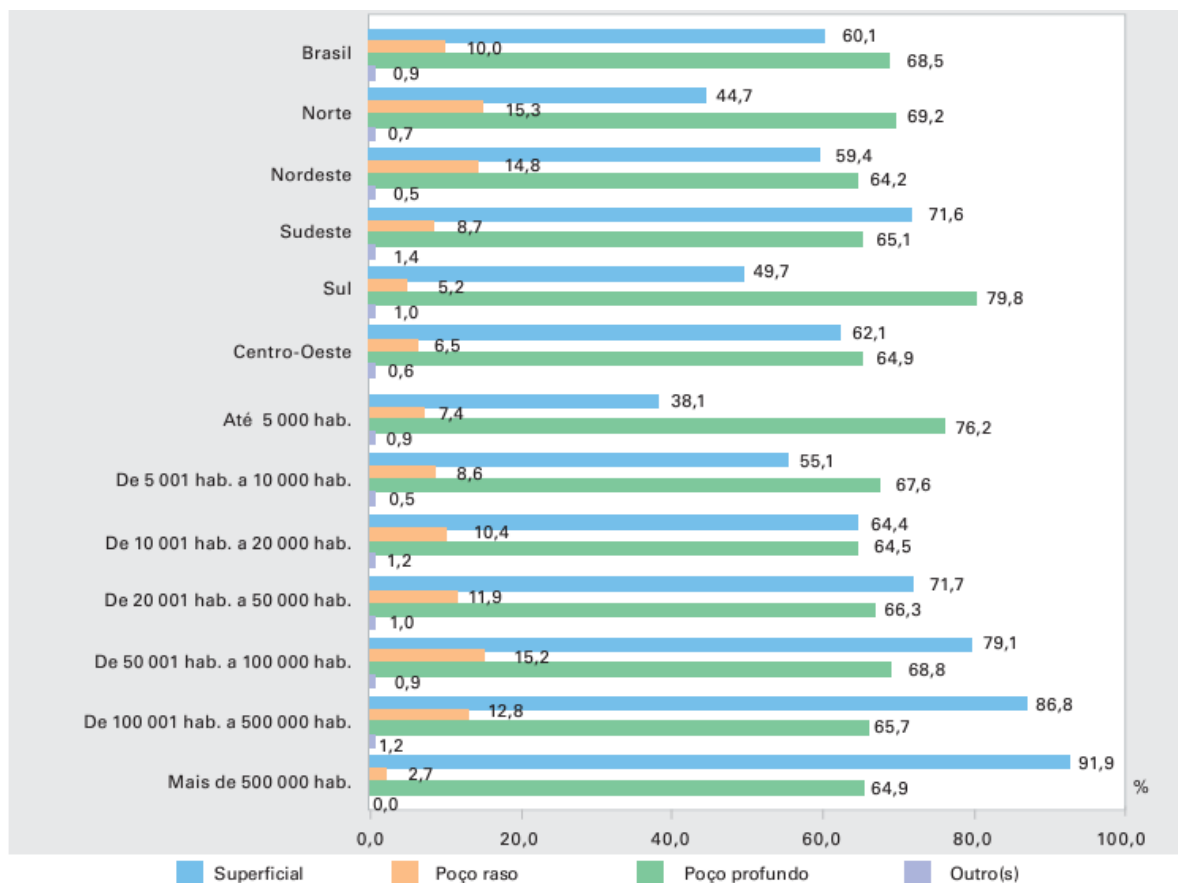


Figura 2. Percentual de Municípios com serviço de abastecimento de água por rede geral de distribuição em funcionamento e que realizavam captação de água doce, por tipo de ponto de captação, segundo as Grandes Regiões e as classes de tamanho da população dos Municípios – 2017. Reproduzido de IBGE, 2020.^{6,8}

O uso de águas não tratadas de rios também é responsável por diversos problemas de saúde pública, principalmente por sua capacidade de ser veículo de patógenos e contaminantes químico-biológicos.¹⁵ Outros fatores como localização, fossas sépticas construídas de maneira inadequada, proximidade a plantações com uso intensivo de agrotóxicos e inadequada conservação dos reservatórios, são alguns exemplos que podem influenciar drasticamente a qualidade da água consumida. Logo, é de extrema importância a avaliação microbiológica e físico-química nestes locais com possíveis sinais de contaminação e recontaminação.^{16, 17}

A Portaria de Consolidação nº 888 do Ministério da Saúde, estabelece parâmetros indicadores da potabilidade da água para consumo humano.¹⁸ Tal legislação contempla restritamente a vigilância do padrão de águas de abastecimento distribuídas individual ou coletivamente, não aplicando-se a águas

após envasamento ou utilizadas como matéria-prima para elaboração de produtos ou águas de reuso. Nestes casos, as diretrizes e regulamentações são realizadas, respectivamente, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).^{19,20} Dentre a lista de parâmetros físico-químico-biológicos, o anexo estabelece como normativa a ausência de microrganismos patogênicos e pH entre 6,0 e 9,0.¹⁸

O reuso de água, por sua vez, deve seguir limites exigidos pela Norma Brasileira (NBR) 13.969 para fins que exijam qualidade da água não potável, porém sanitariamente segura. São separadas em quatro classes de reuso, restritas pela atividade destinada e parâmetros mínimos exigidos. Lavagem de automóveis ou outras atividades que envolvam contato direto (Classe 1) necessitam de valores de pH entre 6,0 e 8,0 e coliformes totais inferiores a 200 NMP/100 mL (Número Mais Provável por Cem Mililitros). Usos urbanos como lavagem de calçadas, irrigação de jardins (Classe 2), reuso em descargas de vasos sanitários (Classe 3) modificam a quantia total de coliformes a número inferior a 500 NMP/100 mL. Por fim, reuso em escoamento superficial ou irrigação pontual de pomares, pastagens ou outros cultivos (Classe 4), ameniza o padrão de coliformes totais a valores inferiores que 5.000 NMP/100 mL.²⁰

1.2. Coliformes

Os coliformes totais e termotolerantes servem como indicadores da qualidade da água, associados à contaminação fecal de humanos e animais de sangue quente. Em termos gerais, os riscos microbianos mais significativos estão relacionados à ingestão de água contaminada com fezes destes animais.²¹ A principal espécie responsável para contagem de coliformes é a *Escherichia coli*, um anaeróbio facultativo predominante na flora intestinal de humanos e, por meio de mutualismo, participativo no mantimento da fisiologia de seu hospedeiro. Embora a maioria das cepas de *E. coli* não sejam consideradas patógenos, elas podem atuar como oportunistas em hospedeiros imunossuprimidos. Além disto, existem também cepas patogênicas que quando ingeridas causam infecções, doenças gastrointestinais e até mesmo a morte de humanos saudáveis.^{22, 23}

A legislação impõe a necessidade de verificar a presença de coliformes e contar bactérias heterotróficas para avaliar a qualidade da água destinada ao consumo humano.^{24, 25} As técnicas estabelecidas, regimentalmente visam atender às especificações do *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water* (do inglês, Métodos de Análise de Água e Esgoto), uma publicação de relevância internacional. O principal método baseia-se na contagem de colônias por meio de plaqueamento e incubação em condições laboratoriais por pelo menos 24 horas, mas que podem levar mais de 3 dias para obtenção de valores quantitativos.^{24,26}

Outras abordagens comumente empregadas na detecção de *E. coli* incluem o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e a reação em cadeia de polimerase (PCR). A estratégia imunológica oferece uma detecção altamente específica e

sensível, embora exija um tempo de análise de 24 horas, devido à necessidade de pré-enriquecimento das culturas, além da exigência de profissionais altamente treinados e equipamentos especializados.²⁷⁻²⁹

No que tange à técnica molecular, o PCR tem se destacado devido à sua elevada sensibilidade e rapidez. A abordagem convencional apresenta desafios ao detectar tanto células mortas quanto vivas. Entretanto, é possível a utilização de um método mais robusto conhecido como Transcriptase Reversa (RT-PCR), que supera essa limitação e facilita as análises. Vale ressaltar que essa técnica requer o uso de um composto altamente nocivo (monoazida de propídio), sendo também complexa e dispendiosa.^{28, 29}

Ademais, quando se visam aplicações em amostras de locais distantes ou de difícil acesso, análises tradicionais tornam-se indiscutivelmente caras e lentas para o monitoramento da qualidade da água e sua aprovação para o consumo. Assim, nota-se a carência de métodos portáteis para a realização das análises rápidas para tomada de decisão sobre a qualidade da água diretamente nos pontos de necessidade, como em áreas rurais com poços artesianos, por exemplo. Os métodos convencionais demandam coleta em campo, envio à laboratório com infraestrutura adequada, usualmente encontrados apenas em grandes centros urbanos para então realizar a análise e posterior emissão de resultado.³⁰ Além de que atenção ao armazenamento e transporte da amostra do ponto de coleta até os laboratórios de análises são imprescindíveis para obtenção de resultados acurados.

Métodos alternativos têm ganhado espaço na missão de superar alguns destes desafios. (Bio)sensores com respostas colorimétricas, por fluorescência, eletroquímica, dentre outras, desempenham um novo cenário na detecção de microrganismos. Estes métodos fornecem, por muitas vezes, respostas rápidas, acessíveis e portáteis para a detecção de metabólitos empregados como biomarcadores.³¹

Um exemplo de biomarcador de *E. coli* é a enzima β -galactosidase (β -gal), que se situa no periplasma e citosol da célula bacteriana, e é a responsável pela hidrólise da lactose em galactose e glicose. Sua detecção está intimamente ligada a contaminação de coliformes fecais, podendo ser realizada por meio de suas propriedades catabólicas empregando substratos de afinidade após a lise da parede celular e sua exposição ao meio reacional. Moléculas como 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranoase (X-gal), o-nitrofenil- β -D-galactopiranoase (ONPG) e vermelho de cromofenol- β -D-galactopiranoase (CPRG) são alguns exemplos de agentes cromogênicos voltados para respostas seletivas à presença de β -gal.³²⁻³⁸

1.3. (Bio)sensores em papel

Dispositivos analíticos em papel (PADs) são ferramentas úteis em análises bioanalíticas e físico-químicas devido à sua simplicidade, portabilidade, baixo custo e fácil uso.³⁹ Nos últimos anos, PADs têm despertado grande interesse por facilitar testes que, por muitas vezes, dependem de equipamentos caros, sofisticados e de difícil acesso, além de que necessitam de profissionais altamente treinados para

manuseio. Em contrapartida, estes (bio)sensores se mostram promissores na tarefa de identificar e quantificar analitos em amostras de diferentes naturezas por métodos de fácil manejo e leitura. Análises ambientais de uma variedade de moléculas podem ser feitas em tempos curtos, tornando a testagem, em ambientes de difícil acesso, rotineira.^{40, 41}

Além disso, a utilização do substrato em papel se mostra altamente atrativa para bioanálises. Este material tem uso difundido, resistência mecânica, apesar de flexibilidade, e superfície biocompatível, passível de modificações químicas. Para mais, se mostra estável termicamente e possui biodegradabilidade.⁴²

Entre os desafios encontrados nestes sensores, a detecção colorimétrica se propõe a identificar analitos por meio de resposta a cor e realizar a quantificação utilizando a intensidade da cor. Este é o método mais comum utilizado nas análises em PADs, apesar de limitar o usuário a percepções acuradas a olho nu. Entretanto, existe a possibilidade do uso de dispositivos externos, como scanners e câmeras de *smartphones*, para fazer o registro da análise química. Com auxílio de *softwares* ou aplicativos de imagens, podem-se obter parâmetros de cor dos ensaios químicos, os quais são guias fundamentais na precisão e exatidão das análises.^{43, 44}

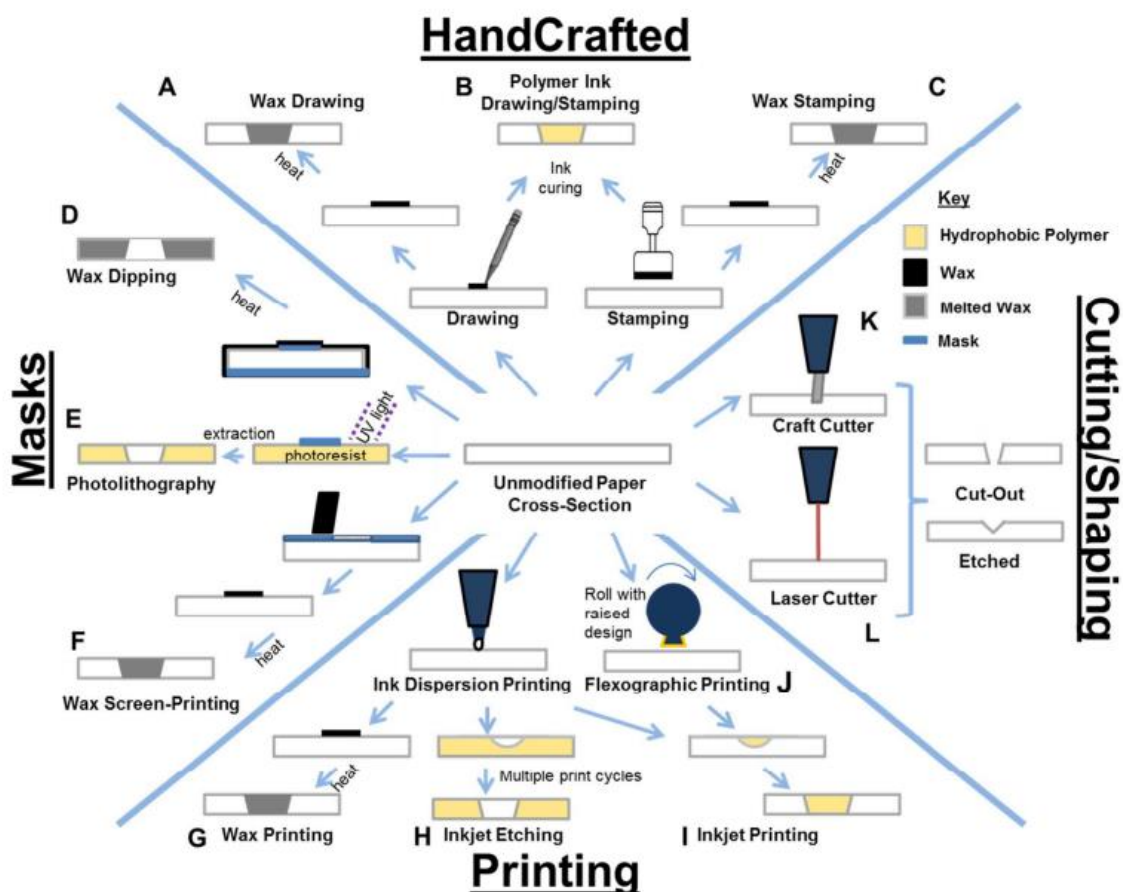


Figura 3. Esquema ilustrativo dos métodos de fabricação de dispositivos analíticos em papel. Reproduzido da ref. ⁴⁵, com permissão.

As formas de conceber padrões em substratos de papel podem ser divididas em quatro categorias generalistas: métodos manuais (Figura 3ABC), estampagens (Figura 3 DEF), impressões (Figura 3GHIJ) e cortes (Figura 3KL). Em geral, regiões reacionais são isoladas por meios físicos ou químicos, como cera ou polímeros hidrofóbicos.⁴⁵

Citando alguns métodos de produção de PADs, na impressão com cera, há o depósito do material à superfície do papel por meio de uma impressora. Na sequência, por meio de aquecimento, ocorre a fusão da cera permitindo a penetração tridimensional na estrutura celulósica do papel, hidrofobizando-o. A fotolitografia utiliza resinas fotocuráveis para impermeabilização da superfície do papel seguida pela remoção seletiva por meio de plasma, delimitando padrões hidrofílicos para a ocorrência de reações em meios aquosos e posterior detecção colorimétrica. O método de corte delimita os *spots* fisicamente por meio de cisões a matriz celulósica. Já na impressão por jato de tinta (*inkjet*), usa-se deposição controlada de gotas de materiais hidrofóbicos com volumes de até picolitros. Uma potencial vantagem desta técnica é a sua utilização também para aplicação dos reagentes nos canais ou regiões de detecção delimitados no papel.^{46–48}

A detecção, como já discorrida, pode-se ser realizada por meio de um dispositivo óptico. O uso de câmeras de *smartphone* se torna vantajoso por ser portátil e amplamente disponível. Além disso, conta com suporte a aplicativos que permitem realizar análises rápidas e definir respostas aos testes. Porém, para a portabilidade do método, há desafios da padronização na obtenção de imagens reprodutivas usando *smartphones*. Isto se deve aos fatores externos, como luz, nitidez/focalização, além de possíveis reflexos ou sombras que podem afetar a leitura da região reacional. Portanto, uma câmara com iluminação própria pode ser utilizada como suporte e controle de luminosidade e tem papel importante na padronização das análises.⁴⁹

1.4. Padrão de cores

Os modelos de cores têm por intuito padronizar e facilitar a demonstração e reprodução de cores percebidas pela visão humana. Em suma, cada modelo conta com uma abordagem diferente da representação do espectro de cor visível, a depender do seu uso. Cada representação individual de uma cor necessita da junção de valores individuais de todos os parâmetros da escala de cor, sendo estes valores triplos ou quádruplos.⁵⁰

Tendo seu uso difundido em dispositivos eletrônicos, o padrão RGB (*Red*, *Green* e *Blue*, do inglês, vermelho, verde e azul) é a representação do espectro de cor visível nas três cores principais absorvidas pelo olho humano. Cada cor, portanto, é a junção de três números que representam a intensidade do vermelho, verde e azul, respectivamente (Figura 4a). A escala pode ser dada por um número de zero a um, porém em computadores, normalmente, é utilizado 8 bits de informação, resultando em 256 valores (0 a 255) para cada subunidade de cor.⁵¹

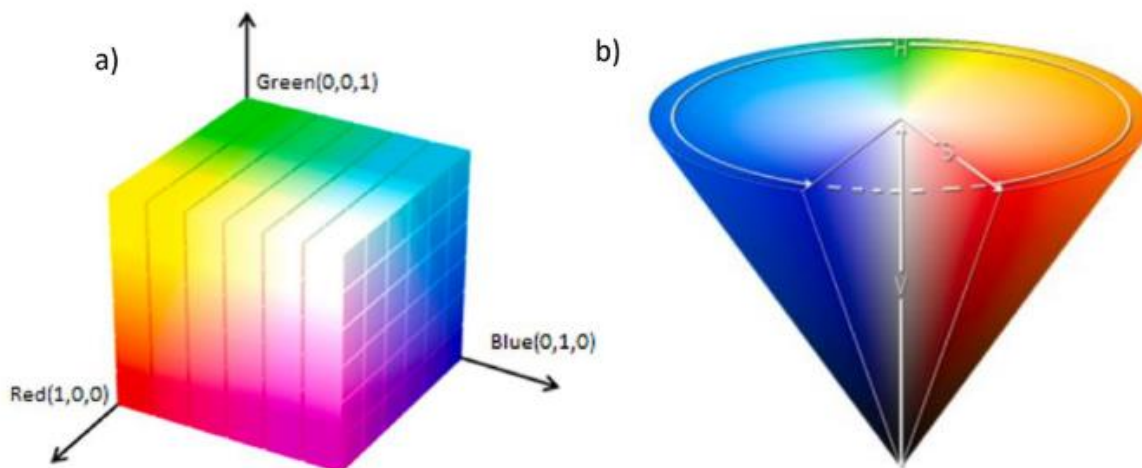


Figura 4. a) Escala RGB representada tridimensionalmente. b) Cone tridimensional representando os parâmetros do modelo HSV.⁵¹

Na escala de cor CMYK (*cian, magenta, yellow e black*, do inglês, ciano, magenta, amarelo e preto), por sua vez, utiliza um sistema subtrativo de cores. Seu principal uso se dá em impressões, onde a mistura e acúmulo de tintas gera diferentes tonalidades cromáticas. Sendo este modelo de cor visualmente o inverso do RGB (em relação a adição ou subtração de cores), originalmente era formado por três canais, sendo estes CMY. O valor de preto tornou-se útil ao entender-se que só existiria impressão com aspecto escuro de qualidade a partir do momento que adicionasse uma coloração pura de preto. Isto pois, em tintas comerciais, a mistura de ciano, magenta e amarelo provém cor amarronzada.^{50, 51}

Dentre outras escalas de representação de cores, está o HSV (Figura 4b). Três componentes são separados em tipo de cor: matiz (H, *Hue*), como verde, vermelho e amarelo, que se estende de 0 a 360°; saturação (S, *Saturation*) sendo representado em porcentagem a intensidade da cor pura até tons de cinza; e por fim existe o valor, ou brilho (V, *Value*), quantidade também expressa em porcentagem atribuindo fator de brilho a imagem podendo ir do branco ao preto, dependendo da saturação.⁵¹

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver sensores colorimétricos em papel para a determinação do valor de pH e rápida triagem de presença de *Escherichia coli* em amostras de água utilizando câmeras portáteis de *smartphones* como detectores. Adicionalmente, estudar o uso dos padrões de cores para análises (semi)quantitativas por colorimetria digital.

2.2. Objetivos Específicos

- Fabricar sensores em papel utilizando impressão a cera;
- Construir uma câmara escura em impressora 3D para aquisição padronizada das imagens digitais;
- Construir e avaliar curvas analíticas associando respostas de cor e variação do pH;
- Realizar a otimização das condições de análise enzimática: concentração de CPRG, tempo de reação e tamanho do *spot*;
- Construir curvas analítica para a quantificar β -gal.
- Aplicar os sensores visando aplicação em amostras de águas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Fabricação dos sensores colorimétricos em papel

O processo de fabricação dos sensores utilizou papel filtro de gramatura e espessura de 80 g m^{-2} e $0,2 \text{ mm}$, respectivamente, em impressora a cera (*Xerox ColorQube 8570*). Padrões em formato retangular foram criados no *software* CorelDraw, contando com regiões circulares isentas de cor (*spots*), organizadas em matriz 6×3 ou 8×3 , Figura 5. Após impressão, a folha foi submetida à prensa térmica aquecida a $130 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por cerca de 90 segundos.

A cera impressa funde-se e penetra tridimensionalmente na estrutura da folha, criando uma barreira hidrofóbica aos *spots*. Na sequência, foi aplicado papel adesivo (Contact®) em um dos lados do dispositivo para impedir vazamentos, e prensado novamente por aproximadamente 10 segundos em temperatura de $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O *design* tipo *spots* (Figura 5) permitiu que análises pontuais fossem feitas onde a cera não foi impressa.

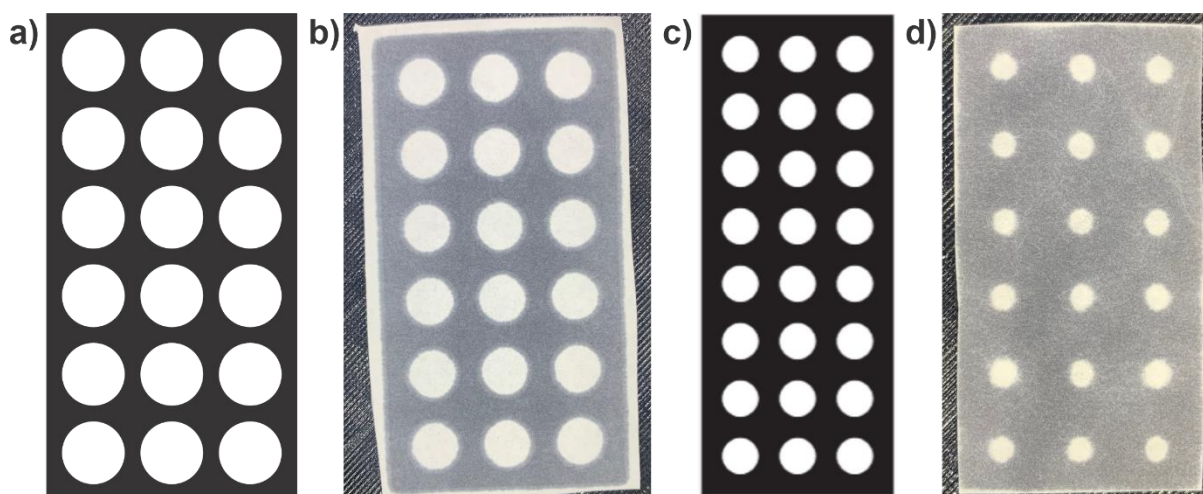


Figura 5. Exemplo de modelos de sensores colorimétricos com *spots* circulares com diâmetro de: a) $1,0 \text{ cm}$, b) $\sim 1,0 \text{ cm}$ após impressão e aquecimento, c) $0,5 \text{ cm}$ e d) $\sim 0,4 \text{ cm}$ após impressão e aquecimento, respectivamente.

3.2. Fabricação de câmara de suporte e controle de iluminação para aquisição das imagens colorimétricas por *smartphone*

Uma plataforma de apoio para o *smartphone* e câmara escura foi idealizada, produzida e impressa em impressora 3D (*Seth3D AiP A3*) for fusão, deposição e modelagem (FDM) com filamento PLA de $1,75 \text{ mm}$ de espessura, na cor preta. Inicialmente, a câmara escura foi projetada em quatro peças principais e dois apoios a partir do *software* *Openscad* (Figura 6). Os componentes 3D do projeto contam com: a parte superior designada como suporte do *smartphone*; o módulo central sendo a câmara escura, com 10 cm largura, 20 cm de comprimento e 10 cm de

altura; no interior, um suporte para LEDs e por baixo, a estrutura conta com uma tampa inferior para suporte do dispositivo em papel e vedação da câmara (Figura 7).

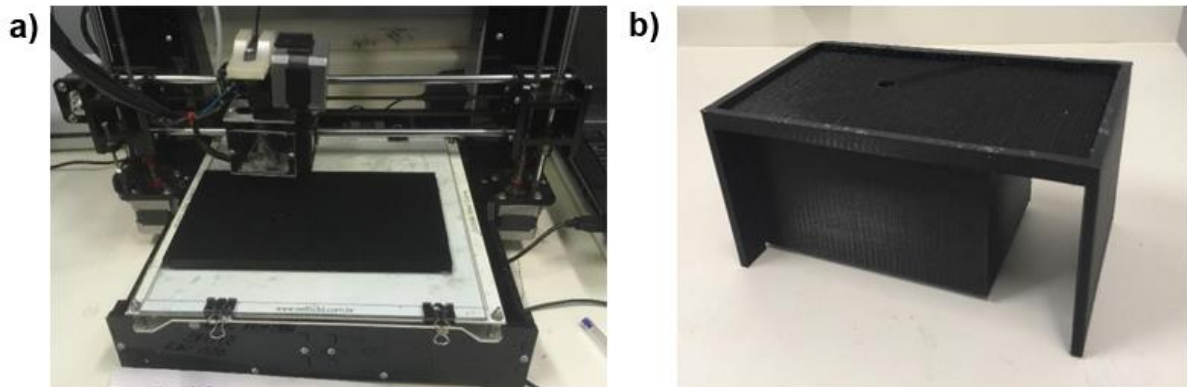


Figura 6. A) Imagem capturada no momento de impressão 3D e b) módulo central finalizado após aproximadamente 29 horas de impressão.

Um circuito simples foi instalado contendo quatro LEDs de cor branca conectados em série, interruptor e fonte a pilha AA. Cada LED ocupava um local nos quatro furos menores do suporte. Após alguns testes, percebeu-se que regiões de luz e sombra se formavam ao fundo da câmara escura. Concluiu-se que a intensidade moderada dos LEDs, distâncias entre si e altura promoviam tal variação. Como alternativa, o simples circuito foi substituído por uma fita de LEDs, colada por toda lateral interna da câmara.

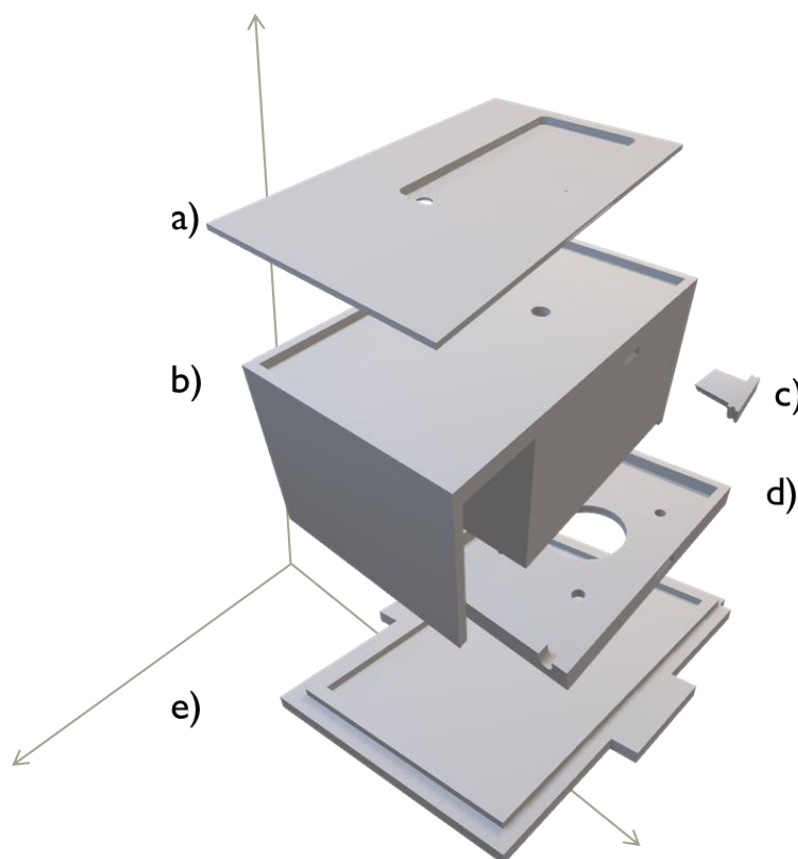


Figura 7. Projeção tridimensional completa de todas as peças que compõem o projeto da câmara para controle de luminosidade. a) suporte personalizado para encaixe de smartphone, b) módulo central denominada câmara escura com furos para câmera e fiações, c) pequeno pino para fixar o suporte dos LEDs, d) suporte interno para o apoio de 4 LEDs e e) tampa inferior para apoio do sensor e vedação da câmara.

3.3. Avaliação da resistência química da barreira dos PADs

Preparou-se duas soluções de etanol 15 e 20 % (v/v) utilizando etanol anidro e água deionizada. Em dois sensores em papel distintos, cada um com 12 spots de aproximadamente 0,3 cm de diâmetro, foram aplicados 5 μ L de soluções etanólicas. Esperou-se 5 minutos e uma foto foi retirada utilizando câmara de controle de iluminação.

3.4. Preparo de soluções de indicadores ácido-base e seus usos

A partir de método adaptado da literatura, soluções 0,025% e 0,05% (m/v) em etanol 10% (v/v) de cada indicador foram preparadas.⁵² O teste de pH foi realizado utilizando azul de bromofenol (ABF - Carlo Erba), azul de bromotimol (ABT - Vetec), verde de bromocresol (VBC - Química Moderna), vermelho de cresol (VC - Fisher Scientific) e vermelho de metila (VM - Carlo Erba).

Os ensaios para quantificação colorimétrica de pH foram realizados em *spots* de 1,0 cm, como aqueles ilustrados na Figura 5. Assim, foram avaliados o efeito da

concentração (0,025% e 0,05% (m/v)) e volume (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 μL) utilizados para otimizar a resposta analítica (intensidade e homogeneidade da cor). Após completa distribuição do líquido, o dispositivo foi inserido na parte interna da câmara de controle de iluminação para a captura da imagem digital.

3.5. Análises colorimétricas

As análises foram divididas em duas principais frentes de estudo: detecção do valor do pH a partir de indicadores ácido-base e análise indireta de *E. coli* por β -gal e CPRG. Ambos os testes utilizaram procedimentos semelhantes quanto a adição de soluções de reagentes e amostra.

Utilizando uma micropipeta, a solução contendo o agente cromóforo foi adicionada ao *spot*. O espalhamento radial pela área reacional aconteceu uniformemente, beneficiando-se da capilaridade do suporte do papel. Após completa secagem (70 min ao ar livre), uma solução contendo amostra foi micropipetada e o sensor foi submetido à captura de imagens com *smartphone* no interior da câmara 3D.

3.5.1. Análise de indicadores em função do pH

Para simular a variação do potencial hidrogeniônico, preparou-se 15 soluções tampão Britton-Robinson (BR) 40 mmol L^{-1} entre valores de pH 2 a 12 (pH = 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 10,0; 11,0; 12,0). Em triplicata, 10 μL de cada solução dos indicadores foram aplicados aos spots de 1,0 cm de diâmetro e esperado secagem completa (70 min ao ar livre). A seguir, aplicou-se 10 μL de cada uma das soluções do tampão BR, esperou-se 1 minuto e fez-se a captura das imagens utilizando a câmara escura. Para análise dos *spots* secos após aplicação do tampão, esperou-se 70 minutos, ao ar livre, para nova captura de imagem.

3.5.2. Análise de mistura de indicadores em função do pH

As soluções previamente preparadas dos indicadores selecionados (ABT, VC e VM), em concentração de 0,05% (m/v) em 10% (v/v) etanol, foram misturados em béqueres independentes nas seguintes proporções: mistura de ABT e VC em proporção 1:1; mistura de ABT e VM em proporção de 1:2.

Os ensaios obedeceram aos mesmos parâmetros utilizados previamente: *spots* de 1,0 cm de diâmetro, 10 μL de soluções da mistura dos indicadores e tampão BR. Foram realizadas análises variando o pH entre 5,5 e 8,5 (pH = 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5) em triplicata. Esperou-se secagem completa, ao ar livre, da mistura de indicadores, seguido de aplicação das soluções tampão. Após 1 minuto, foi realizada a captura da imagem de modo semelhante as demais, utilizando a câmara 3D.

Para o teste simulando o dobro da concentração da mistura dos indicadores, um ensaio foi realizado aplicando-se por duas vezes mesmo volume da mistura ao

spot. Após sua secura completa, a solução tampão foi aplicada e a captura da imagem foi realizada depois de 1 minuto.

3.5.3. Quantificação do pH em amostras de água

Empregando *spots* de 1,0 cm de diâmetro, 10 μL de uma solução do indicador ABT em concentração de 0,05 (m/v) em 10% (v/v) etanol foram adicionados e esperou-se secura completa. Amostras de água provenientes de três fontes diferentes: lago do Parque Ecológico Prof. Hermógenes de Freitas Leitão – Campinas/SP (-22.811076, -47.074075), água mineral da marca Lindoia e água da torneira do Bloco I do Instituto de Química da Unicamp foram analisadas em triplicata.

O mesmo volume de amostra foi adicionado (10 μL) ao *spot* seco, aguardou-se 1 minuto e foi realizado a captura da imagem dentro da câmara escura. O valor do pH foi obtido a partir da equação da regressão linear obtida da melhor condição encontrada nos ensaios anteriores.

3.5.4. Otimização do tempo de reação e concentração de CPRG no ensaio colorimétrico enzimático

A partir de uma solução estoque de β -gal 1500 U mL^{-1} , alíquotas de 10 μL foram retiradas e diluídas em tampão fosfato (pH = 7,5). Os ensaios colorimétricos foram realizados utilizando concentração de 10^{-1} e 10^{-2} U mL^{-1} de β -gal. Para o substrato cromogênico CPRG, as seguintes concentrações foram avaliadas: 10,0; 5,0; 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,8; 0,5; 0,3; 0,1 mmol L^{-1} .

Iniciou-se os ensaios empregando sensores de 1,0 cm de diâmetro, cortados em grades de 3x2 *spots*. Em cada um dos sensores, 14 μL da solução de CPRG nas diferentes concentrações foram aplicados e esperado sua secagem completa, em triplicata (n=3). Os tempos de incubação da solução teste (amostra contendo β -gal) antes da aquisição da foto do ensaio foram: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 70 (seco) minutos.

A captura da imagem foi realizada de modo semelhante aos ensaios para quantificação do pH. O sensor foi mantido no interior da câmara escura e foram capturadas imagens para cada um dos tempos de análise. Os demais ensaios colorimétricos enzimáticos obedeceram mesmos padrões metodológicos com pequenas alterações: variação dos diâmetros dos *spots* (d = 0,5 cm), volume pipetado de CPRG e β -gal (V = 5 μL para *spots* menores), variação da concentração de β -gal e tempo de 20 minutos até as capturas de imagens.

Por fim, a “solução mãe” de CPRG, 10 mmol L^{-1} , foi mantida em congelador ou ambiente resfriado para evitar degradação, enquanto todas as diluições de β -gal eram descartadas e repreparadas para cada ensaio individual.

3.5.5. Curva analítica para o ensaio colorimétrico enzimático

A curva analítica obedeceu a padrões semelhantes aos ensaios anteriores. Utilizou-se sensores em *grid* (grade) de 3x2 *spots* de 0,5 cm de diâmetro. Cada um dos sensores conduziu ensaios em triplicata para um ponto da curva analítica e branco experimental. Após otimização, foram aplicados 5 μL de soluções de CPRG 2 mmol L^{-1} , variando a concentração de β -gal ($1,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-2}$; $5,0 \times 10^{-2}$; $1,0 \times 10^{-1}$; $5,0 \times 10^{-1}$; $1,0 \text{ U mL}^{-1}$). O tempo de reação até aquisição da imagem digital foi de 20 minutos.

3.5.6. Curva de adição e recuperação para ensaio enzimático em amostras reais

Em triplicata, 5 μL de CPRG 2,0 mmol L^{-1} foi adicionado a *spots* de 0,5 cm e esperado secagem completa. Utilizou-se amostras de dois locais distintos: lago do Parque Ecológico Prof. Hermógenes de Freitas Leitão e água mineral da marca Lindoia. As amostras foram preparadas em concentrações pré-estabelecidas de β -gal ($1,0 \times 10^{-2}$; $5,0 \times 10^{-2}$; $1,0 \times 10^{-1}$; $5,0 \times 10^{-1}$; $1,0 \text{ U mL}^{-1}$) na amostra real, completado com tampão fosfato (pH = 7,5). Em um *grid* de 3x6 os ensaios foram realizados com volume de 5 μL de amostra, esperando 20 minutos para a realização da captura da imagem.

Além da curva analítica, *spots* em triplicata foram usados com amostra sem adição de β -gal. Com intuito de investigar qualquer variação da resposta em cor, a amostra foi diluída em tampão fosfato pH 7,5 em proporção 1:1. Em triplicata, a amostra foi observada em reação com CPRG no *spot* após 20 minutos, de forma *in natura* e sonicada por 2 minutos. O processo de sonicação foi empregado como processo físico de lise celular, o que permitiria a detecção de β -gal de eventual presença de *E. coli* nas amostras. Este tempo foi adaptado do método reportado na literatura, em que utilizaram 20 segundos para esta finalidade.³⁷

3.6. Aquisição dos valores de cor

As imagens dos ensaios foram capturadas a partir da câmera traseira do *smartphone* iPhone XR® e importadas para o *software* Gimp®. Foi utilizado a ferramenta de seleção que retorna a média dos valores de RGB para cada seleção (Figura 8).

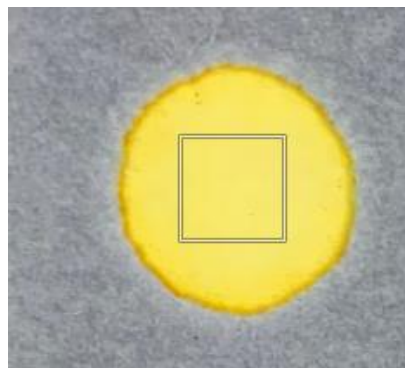


Figura 8. Captura do momento da extração dos parâmetros de cor da região central do *spot* utilizando ferramenta de seleção em formato quadrado com lados equivalentes a 60 px com o *software* Gimp®.

O lado do quadrado circunscrito no *spot*, da Figura 8, equivale à dimensão em *pixels* da ferramenta de seleção. Portanto a variação do diâmetro do *spot* naturalmente necessita modificação da área de seleção do *software*. Como padronização, foram considerados os valores de 60 px para *spots* com 1,0 cm de diâmetro e 25 px para 0,5 cm. A título de curiosidade, o diâmetro do círculo do *spot* equivale a 60 e 125 px para 0,5 e 1,0 cm, respectivamente.

A partir da escala de cor RGB, demais padrões de cores foram adquiridos por meio de normalizações e conversões. A começar pela normalização da escala RGB (Eq. 1), onde o valor de cada canal de cor é dividido pelo máximo da escala, 255, retornando valores entre 0 e 1. Demais normalizações seguem mesma regra: divisão pelo máximo da escala retornando valores com limites unitários (Eq. 7, Eq. 13, Eq. 15). Exemplificando, o padrão CMYK é dado em percentagens, portanto, normalizou-se dividindo por 100.

Para a escala CMYK foi necessário encontrar o valor máximo dentre os três canais RGB (Eq. 2), seguido das conversões individuais de cada um dos canais da escala de cor (Eq. 3 – 6). Nota-se aqui uma relação matemática intrínseca entre cada valor do padrão RGB ao CMY, respectivamente para cada canal. Na conversão para a escala HSV, condições são aplicadas aos cálculos dependendo de valores máximos (Eq. 8), mínimos (Eq. 9) e diferenciais (Eq. 10). Para o retorno do matiz (H – *hue*) e saturação (S), a equação utilizada deve obedecer a certa condição (Eq. 11 e 12). Observa-se na equação 11 o uso do artifício matemático conhecido como aritmética modular ($\text{mod}6$) na condição em que o valor máximo é equivalente a normalização do canal vermelho. Tal ferramenta, de modo geral, utiliza números inteiros com a propriedade cíclica, como um relógio, de atingir um máximo pré-estabelecido. O caráter cíclico do valor H contribui para o uso desta ferramenta matemática. Além dos canais de cor convencionais, também foi utilizado a distância euclidiana (DE) entre os três pontos referente aos valores de RGB (Eq. 14).⁵³

$$R' = \frac{R}{255}; G' = \frac{G}{255}; B' = \frac{B}{255} \quad \text{Eq. 1}$$

$$C_{max} = \max(R', G', B') \quad \text{Eq. 2}$$

$$K = 1 - C_{max} \quad \text{Eq. 3}$$

$$C = \frac{(1-R'-K)}{1-K} = 1 - \frac{R'}{C_{max}} \quad \text{Eq. 4}$$

$$M = \frac{(1-G'-K)}{1-K} = 1 - \frac{G'}{C_{max}} \quad \text{Eq. 5}$$

$$Y = \frac{(1-B'-K)}{1-K} = 1 - \frac{B'}{C_{max}} \quad \text{Eq. 6}$$

$$C' = \frac{C}{100}; M' = \frac{M}{100}; Y' = \frac{Y}{100}; K' = \frac{K}{100} \quad \text{Eq. 7}$$

$$V = C_{max} = \max(R', G', B') \quad \text{Eq. 8}$$

$$C_{min} = \min(R', G', B') \quad \text{Eq. 9}$$

$$\Delta = C_{max} - C_{min} \quad \text{Eq. 10}$$

$$H = \begin{cases} 0, & \Delta = 0 \\ 60 \left(\frac{G'-B'}{\Delta} \bmod 6 \right), & C_{max} = R' \\ 60 \left(\frac{B'-R'}{\Delta} + 2 \right), & C_{max} = G' \\ 60 \left(\frac{R'-G'}{\Delta} + 4 \right), & C_{max} = B' \end{cases} \quad \text{Eq. 11}$$

$$S = \begin{cases} 0, & C_{max} = 0 \\ \frac{\Delta}{C_{max}}, & C_{max} \neq 0 \end{cases} \quad \text{Eq. 12}$$

$$H' = \frac{H}{360}; S' = S; V' = V \quad \text{Eq. 13}$$

$$DE = \sqrt{R'^2 + G'^2 + B'^2} \quad \text{Eq. 14}$$

$$DE' = \frac{DE}{\sqrt{3.255^2}} = \frac{DE}{441,67} \quad \text{Eq. 15}$$

A determinação dos valores referentes a variação de cor, também chamada de dCor, está representada na Equação 16. Para ensaios para quantificação do pH, o branco é representado pela cor do papel, pois sempre existirá presença de potencial hidrogeniônico em solução aquosa. Em outras palavras, o indicador contará sempre com cor relativa à concentração de prótons (H⁺) em solução, portanto preferiu-se usar o valor do papel isento de indicador para o cálculo do dCor. Em relação à reação enzimática, utilizou-se como branco analítico a cor retirada dos *spots* impregnados com CPRG em tampão fosfato pH 7,5.

$$dCor = Cor_{branco} - Cor_{ensaio} \quad \text{Eq.16}$$

Onde cor é a descrição genérica para qualquer parâmetro utilizado nos modelos de cores descritos acima e Cor_{branco} representa o valor relativo ao branco do papel ou branco analítico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Parametrização inicial e teste de resistência a solvente

Os primeiros testes colorimétricos foram realizados com intuito de padronizar parâmetros iniciais de volume, uniformidade na leitura e resistência química a mistura de solventes a serem utilizados posteriormente. Os critérios avaliados foram: i) intensidade – concentração e volume adicionado do cromóforo que obtém melhor resposta visual e analítica; ii) uniformidade – otimização do menor volume suficiente para cobrir uniformemente a totalidade da parte hidrofílica do sensor; iii) repetibilidade – *spots tests* com volumes iguais devem ter mesmo aspecto visual e sinal analítico exato; e iv) sensibilidade – variação do analito promove mudança colorimétrica relevante, intensa e previsível.

Para os *spots* impressos com aproximadamente 0,3 cm de diâmetro, foi aplicado teste de resistência da barreira de cera utilizando uma mistura de água destilada e etanol em duas diferentes proporções (Figura 9). Uma vez que se faz necessário o emprego de misturas com polaridade reduzida no preparo de soluções de indicadores ácido-base, foram escolhidas duas concentrações etanólicas superiores a 10% (v/v) para os testes. É importante verificar se não há particionamento para a fase cera, comprometendo a integridade da barreira do sensor, culminando em vazamentos e deformações. Contudo, pode-se notar que não houve deformações visuais significativas da camada hidrofóbica ao contato com a mistura etanólica em até 20% (v/v).

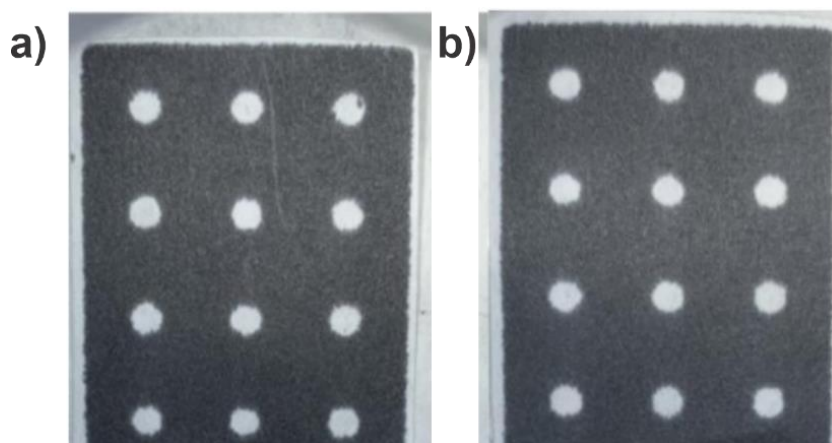


Figura 9. Teste de resistência dos *spots* (~0,4 cm de diâmetro) às misturas de água/etanol em proporções de: a) 15% (v/v) e b) 20% (v/v) etanol (n=12 *spots*).

Utilizando soluções de indicadores (ABT, ABF, VBC e VC) em concentração de 0,025% (m/v) em etanol 10% (v/v), volumes entre 2 e 16 μL foram aplicados a *spots* de 1,0 cm de diâmetro em triplicata. Na Figura 10 é possível visualizar a resposta de dCor (dR, dG, Db) pelo volume de solução aplicada. Os valores de cor foram normalizados para a faixa de 0 a 1,0.

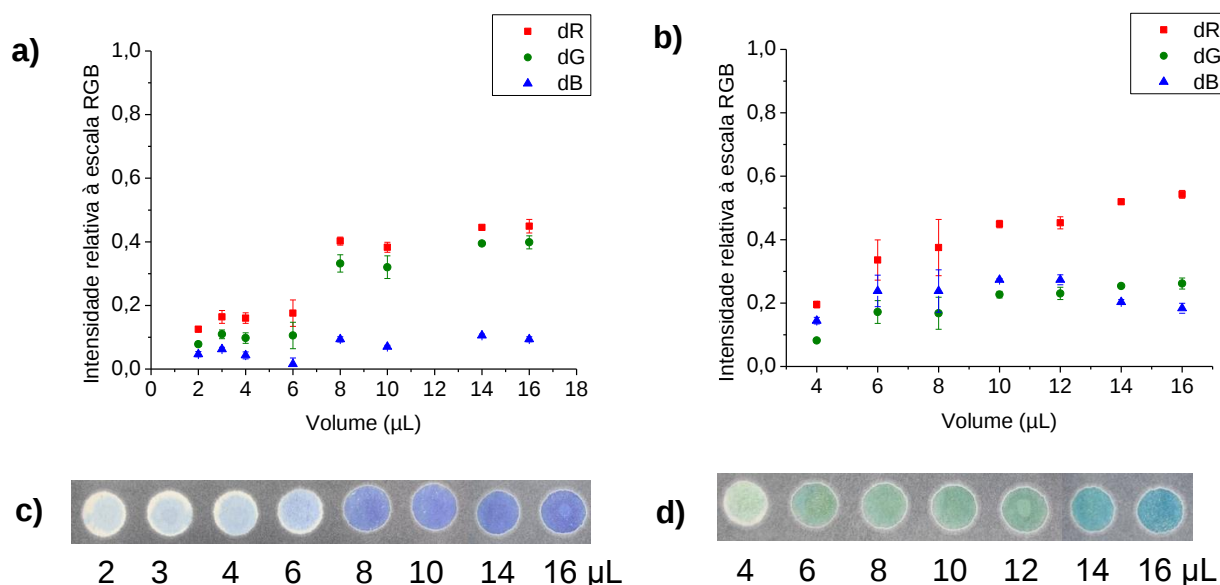


Figura 10. A) Gráfico referente a variação da intensidade relativa de dCor pelo volume de indicador ABF. B) Gráfico referente a variação da intensidade de dCor pelo volume de indicador VBC. C) Imagem digital dos *spots* referentes ao indicador ABF. D) Imagem digital dos *spots* referentes ao indicador VBC. Ensaios realizados em triplicata (n=3).

Visualizando o efeito do volume com os indicadores ABF e VBC, nota-se tendência de aumento das intensidades de cor correlacionada ao incremento de indicador. Na Figura 10a, referente ao ABF, é perceptiva a elevação do sinal a partir de 8 µL, seguido de moderada estabilidade. No gráfico referente ao indicador VBC (Figura 10b), de maneira semelhante o sinal de delta vermelho (dR) tem maior intensidade, assim como tendência de aumento dos valores de cor com o volume.

Outro aspecto importante a ser mencionado é a ocorrência de pequenas bolhas de ar entre o papel e a fita inferior de selagem. De modo geral, esta falha na produção do sensor pode afetar os resultados quantitativos, ocasionando variação expressiva na precisão dos experimentos. Para contornar este problema, após a selagem com papel adesivo do tipo Contact®, o sensor foi novamente submetido à prensa térmica (60 °C por 90 segundos) para melhor adesão dos dois materiais.

O volume ótimo de 10 µL foi escolhido para os experimentos referentes a concentração de 0,025% (m/v) de indicador. Este volume tem cobertura completa no *spot*, garante alta repetibilidade, com base em desvios baixos comparados com volumes menores, possui intensidade relativa aos canais de cor próximo aos volumes maiores e não conta com tempos grandes para secagem (iguais ou maiores a 70 min). Volumes maiores se mostram igualmente válidos para as análises, porém necessitariam de períodos longos para secar completamente.

Após o estabelecimento dos primeiros parâmetros, as análises foram divididas em duas principais frentes de estudo: quantificação do pH utilizando indicadores ácido-base e detecção indireta de *E. coli* por detecção de β-gal a partir do cromóforo CPRG.

4.2. Análise da interação de indicadores a 0,025% (m/v) com tampão BR

A Figura 11 apresenta a variação de quatro indicadores químicos em soluções com pH na faixa de 2 a 12. A média dos valores de cor RGB é mostrada pelas paletas de cor resultante na Figura 11b.

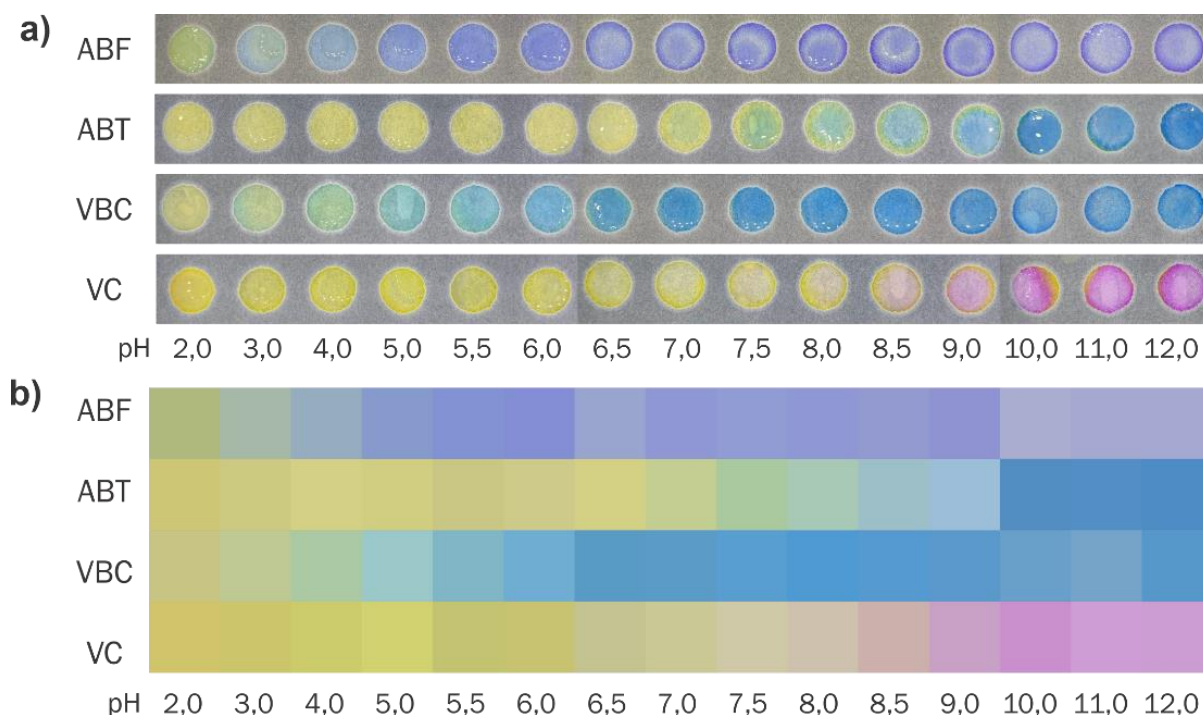


Figura 11. a) Imagem digital dos *spots* ainda úmidos com a variação de pH utilizando os indicadores ABF, ABT, VBC e VC em concentração de 0,025% (m/v). b) Paleta de cores do teste de pH utilizando a média dos valores em triplicata, extraídos pelo Gimp®, dos *spots* coloridos (n=3).

De maneira geral, as paletas de cores têm aspecto fluido, modificando-se gradativamente. Entretanto, determinadas variações de pH contam com escurecimento ou clareamento extrapolando a tendencia posterior (como entre pH 6,0 e 6,5 do ABF e VC, entre 7,0 e 7,5 do VBC, entre 9,0 e 10,0 do ABF).

Observando a Figura 11a, notam-se alguns desafios a serem contornados que influenciam a heterogeneidade vinculada à distribuição de cor no *spot*: efeito de *coffee ring* e borda do *spot* com cor anterior à aplicação do tampão.⁵⁴

Buscando alguma correlação entre os valores de cor e pH, variações visuais foram os primeiros aspectos levados em consideração. Por se tratar de uma análise em água para consumo humano, sabe-se que os potenciais hidrogeniônicos esperados estarão na faixa próxima a neutralidade (pH entre 6,0 e 9,0). Portanto, um indicador ideal deve ter transição de cor visível nesta zona. Entre os valores de pH 6,0 e 9,0, dois indicadores se destacam: ABT, transiciona do amarelo ao azul claro e VC, amarelo ao rosáceo. Os demais mantêm cores sem variação expressiva a olho nu, o que está de acordo com as regiões de viragem para estes indicadores (Tabela 1).

Tabela 1. Informações referentes às faixas de viragem e transição de cores de cada indicador.⁵⁵

Indicador	Faixa de viragem	Transição de cores
ABF	3,0 – 4,6	Amarelo – violeta – azulado
ABT	6,0 – 7,6	Amarelo – azul
VBC	3,8 – 5,4	Amarelo – azul – esverdeado
VC	0,2 – 1,8	Vermelho – amarelo
	7,0 – 8,8	Amarelo – violeta – avermelhado
VM	4,4 – 6,2	Vermelho – amarelo

A Figura 12 contempla graficamente a relação entre pH e todos os canais de cor dos modelos propostos. Certos pontos com desvios grandes podem ser explicados por efeito de *coffee ring*, ocasionado pela diferença entre a cor do centro e dos entornos por arraste das moléculas em efeito de capilaridade. À medida que o tampão é aplicado no centro do *spot* com o indicador já seco, tais moléculas passam pela solubilização e percorrem o mesmo trajeto radial feito pela solução.⁵⁴

Nota-se que existe linearidade na zona de interesse do estudo entre algumas respostas de dCor. Entre o pH 6,5 e 9,0, ambos indicadores apresentaram uma tendência de correlação linear inversa com a variação de azul (dB), Figuras 12a e 12b. Além disso, o ABT também apresentou tendência linear neste intervalo para o dR.

Com exceção do valor de preto (dK), o padrão de cores CMYK demonstra consonância ao modelo RGB. Existe tendência similar relacionada aos canais de cores complementares ($dR \approx dC$, $dG \approx dM$ e $dB \approx dY$), portanto se torna redundante análise individual de ambos os padrões (Figura 12c e Figura 12d). Percebe-se que, em relação ao modelo HSV, há tendência sigmóide de curva relacionada ao valor de delta *hue* (dH) para o indicador ABT (Figura 12e). Entretanto, observando a Figura 12f, percebemos um desvio padrão em praticamente toda a região do sinal do mesmo componente. Isto se deve ao caráter angular do componente matiz, relacionado ao aspecto intrínseco a cor.³⁵ Seu valor não normalizado (0 a 360°), percorre um círculo virtual contendo todas as cores em seu estado, diga-se, primário. Desta forma, é possível que cores próximas em aspecto visual obtenham grandezas em seus limites opostos, fomentando desvios padrão não correspondente a análise experimental. Demais canais não obtiveram variação expressiva. Logo, adiante levou-se em conta a interpretação das cores somente com base no modelo RGB.

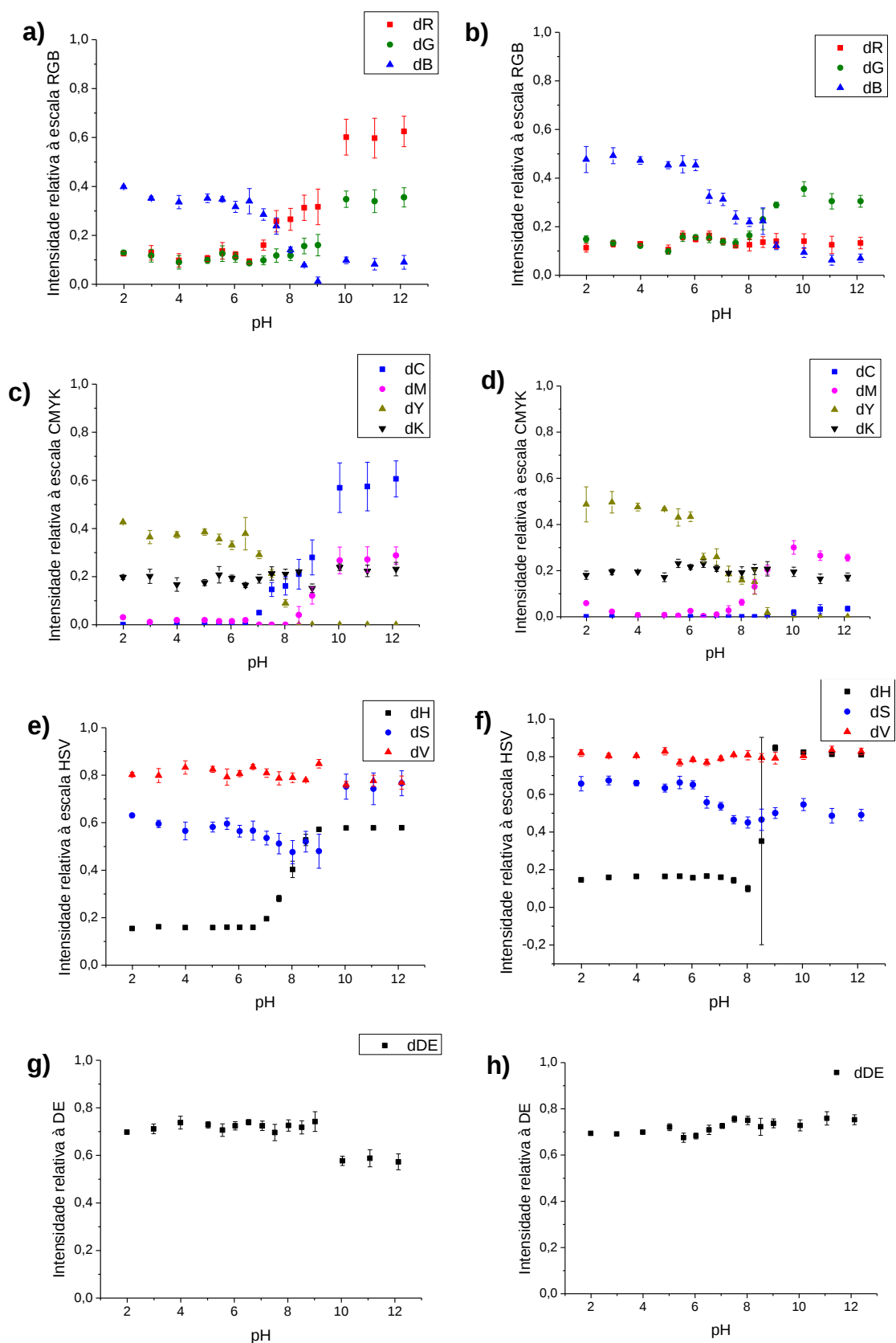


Figura 12. Curvas analíticas utilizando a intensidade relativa de dCor em função do pH para diferentes indicadores: a) valores de RGB para o uso de ABT; b) valores de RGB para o uso de VC c) valores de CMYK para o uso de ABT; d) valores de CMYK para o uso de VC; e) valores de HSV para o uso de ABT; f) valores de HSV para o

uso de VC; g) valores de DE para o uso de ABT; h) valores de DE para o uso de VC. Todos os resultados foram obtidos em triplicata (n=3).

Por se tratar de uma medida do potencial hidrogeniônico, a resposta foi observada padronizando-se os tempos de captura, a fim de verificar a influência da umidade (solução aquosa) presente no *spot* na manutenção da coloração. Os dois tempos aqui comparados, tem intuito de analisar a resposta instantânea (1 minuto – úmido), à persistência do sinal colorimétrico em situação extrema de secagem (70 minutos – seco) na faixa de pH relevante (6,0 a 9,0) para as aplicações em amostras de águas naturais.¹⁸ A partir destes ensaios, verificou-se que não existe comportamento semelhante a alguns testes comerciais, que de modo geral, atuam como laudos acrônicos.

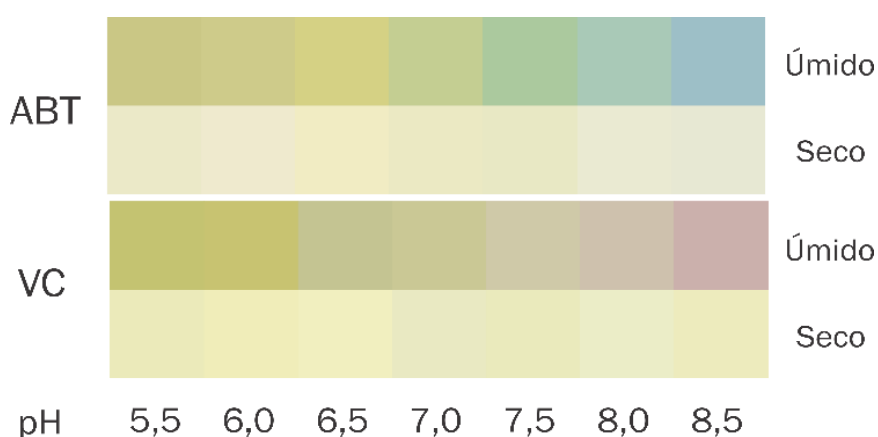


Figura 13. Paleta de cores obtida utilizando a média dos valores dos *spots* úmidos e secos dos indicadores ABT e VC (n=3).

Quando se espera a solução tamponante secar completamente, as variações de cor deixam de ser expressivas, como é possível perceber na Figura 13. Há desbotamento quase que completo, evidenciando a cor mais clara inerente ao papel. Deste modo, não é possível utilizar o sensor em sua versão seca, afinal, não há distinção dos valores de pH visualmente. Na Figura 14, percebe-se que o desbotamento com a secagem dos *spots* afeta o sinal analítico.

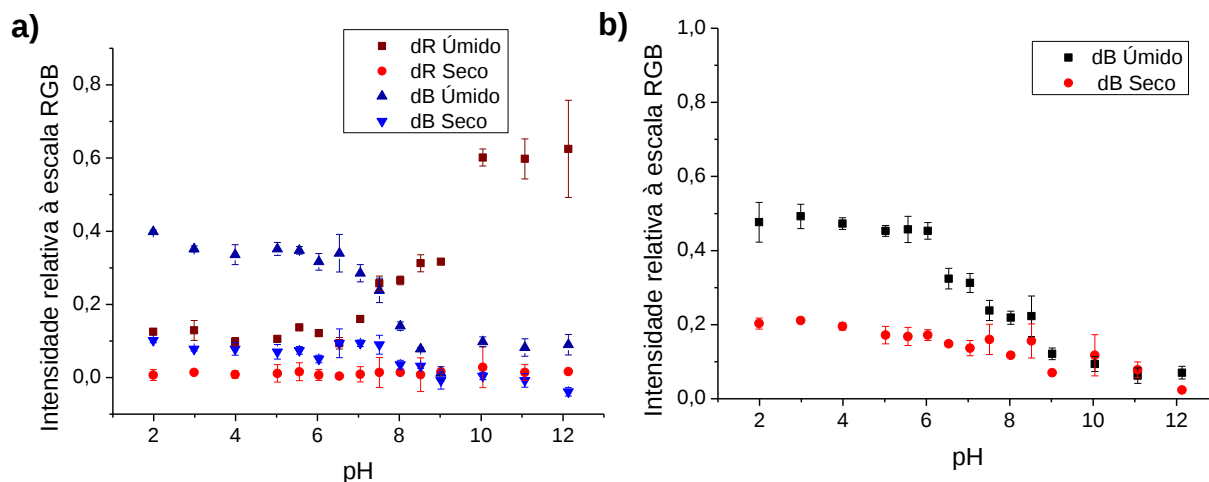


Figura 14. Gráfico comparando valores de dCor: a) com a variação do pH entre *spots* úmidos (1 min) e secos (70 min) do indicador ABT a 0,025% (m/v); e b) dB com a variação do pH entre *spots* úmidos (1 min) e secos (70 min) do indicador VC a 0,025% (m/v) (n=3).

As alternativas estabelecidas para uma otimização da resposta foram: dobrar a concentração das soluções de indicadores e utilizar um volume maior de amostra visando mitigar efeitos de arraste, aumento da resposta visual analítica e homogeneidade de cor no *spot*.

4.3. Uso de indicadores a 0,05% (m/v)

A solução de indicador passou a ter concentração de 0,05% (m/v), consequentemente um novo teste de volume foi realizado (Figura 15) para verificar se existe uniformidade, sensibilidade e repetibilidade na resposta do sensor.

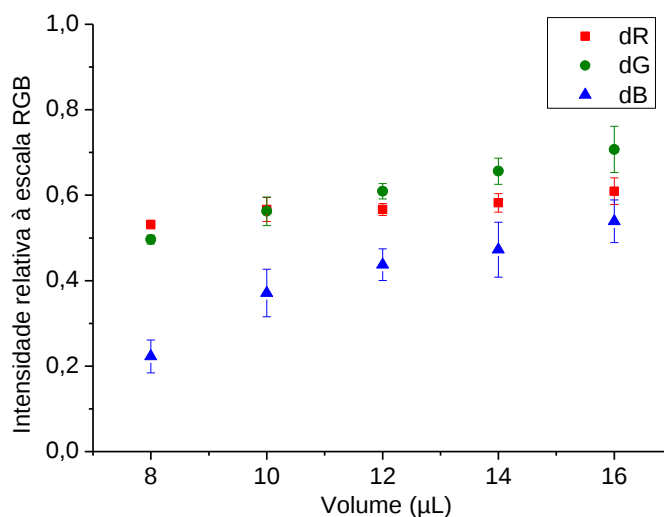


Figura 15. Gráfico referente a variação da intensidade de cor RGB pelo volume de indicador ABF (n=3).

Nota-se similar incremento no sinal de cor com aumento do volume, além de baixo valor de desvio padrão, corroborando para uma boa repetibilidade experimental. Em contraponto com a análise anterior com metade da concentração, houve maior resposta analítica e visualmente, cores mais intensas (Figura 15). Sendo assim, para a escolha do novo volume para os experimentos posteriores, levou-se em conta valores mínimos e máximos que correspondam a: uma cobertura completa do *spot* e volume suficiente para obter estabilidade máxima da intensidade. Portanto, escolheu-se um volume de 14 μL .

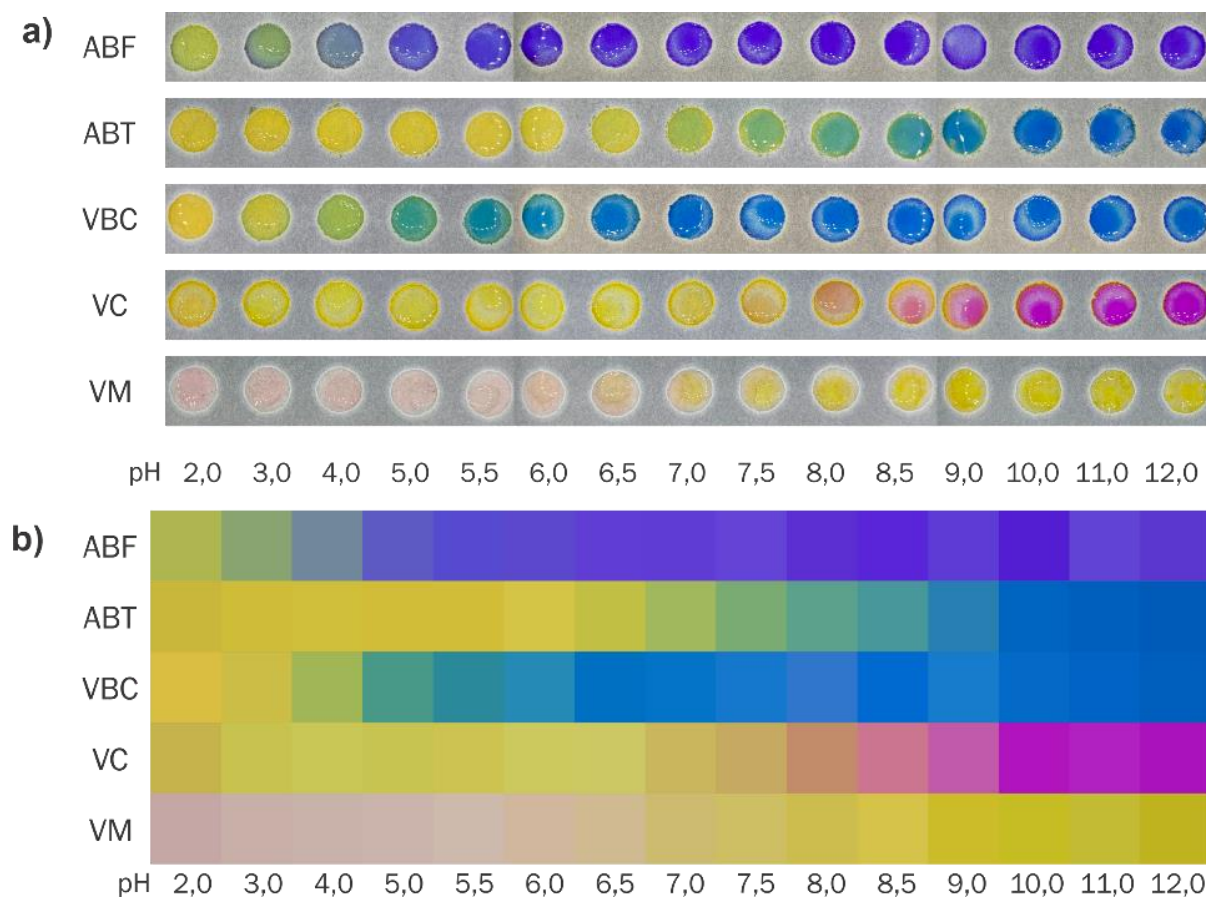


Figura 16. a) Imagem digital dos *spots* úmidos com a variação de pH utilizando os indicadores ABF, ABT, VBC, VC e VM em concentração de 0,05% (m/v) em etanol 10% (v/v). b) Paleta de cores do teste de pH utilizando a média dos valores em triplicada dos *spots* coloridos (n=3).

A Figura 16 apresenta os *spots* com a variação de cor por pH, assim como a paleta de cores com as médias das triplicatas obtidas. Desta vez, foi utilizado um indicador a mais, vermelho de metila (VM). Primeiramente, é importante destacar uma melhora na tonalidade das cores a olho nu. Dos efeitos que causam aumento do erro associado a medida experimental, houve melhora geral na cobertura e homogeneidade dos *spots*. Entretanto, em alguns casos o efeito de *coffee ring* e reflexo persistiu, apesar de ocorrer em menor intensidade desta vez.

Da mesma forma, entre valores de pH de 6,0 e 9,0, os indicadores ABT e VC apresentam significativa variação de cor, Figura 17. O novo indicador, VM, também se enquadra nessa categoria, variando entre o rosa claro e amarelo.

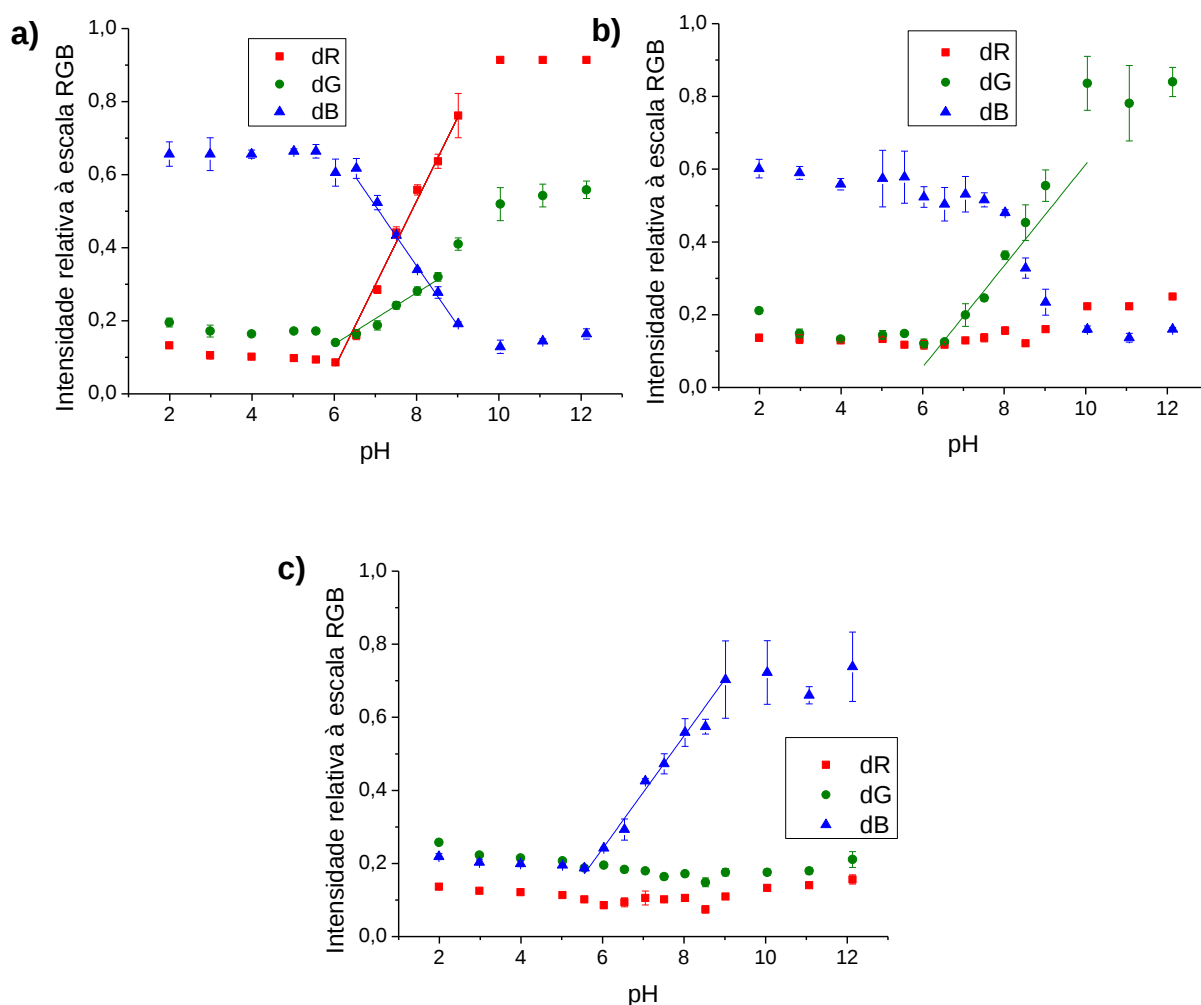


Figura 17. Curvas analíticas utilizando a intensidade relativa de dCor pelo pH para o indicador: a) ABT; b) VC; e c) VM e seus respectivos *fittings* lineares ($n=3$).

Graficamente, nota-se aumento expressivo da sensibilidade do método. Por exemplo, a variação do canal dR para o ABT na faixa de pH de 6,0 a 9,0 vai de 0,2 (Figura 12a) para 0,7 (Figura 17a) em intensidade de cor. Para todos os indicadores, pelo menos um canal de cor obtém correlação entre as variáveis na faixa alvo próximo a $\text{pH}=7,0$. Comparando os indicadores por meio dos *fittings* (Tabela 2), o ABT se destaca por obter coeficiente de determinação maior que 0,98 para todos os canais de cor RGB na faixa de pH de 6,0 / 6,5 e 8,5 / 9,0. Além disso, os parâmetros dR e dB dispõem de notória sensibilidade, ou seja, os maiores coeficientes angulares (variação de cor por variação de pH).

Tabela 2. Dados estatísticos para cada regressão linear dos valores de RGB aplicada às curvas referente aos indicadores ABT, VC e VM variando o pH.

Indicador	Parâmetro	Faixa de pH	Equação da Reta	R ²
ABT	dR	6,0 – 9,0	$dR = 0,23(\pm 0,01)pH - 1,30(\pm 0,07)$	0,986
	dG	6,0 – 8,5	$dG = 0,07(\pm 0,01)pH - 0,029(\pm 0,03)$	0,983
	dB	6,5 – 9,0	$dB = -0,16(\pm 0,05)pH + 1,66(\pm 0,05)$	0,992
VC	dG	6,0 – 10,0	$dG = 0,14(\pm 0,02)pH - 0,78(\pm 0,11)$	0,913
VM	dB	5,5 – 9,0	$dB = 0,15(\pm 0,01)pH - 0,69(\pm 0,06)$	0,972

Ao esperar a secura completa dos sensores, novamente observou-se completa perda visual de cor (Figura 18a), assim como diminuição expressiva do sinal de cor (Figura 18b). Ou seja, repetidamente não é possível utilizar o após a secagem para obter respostas de pH.

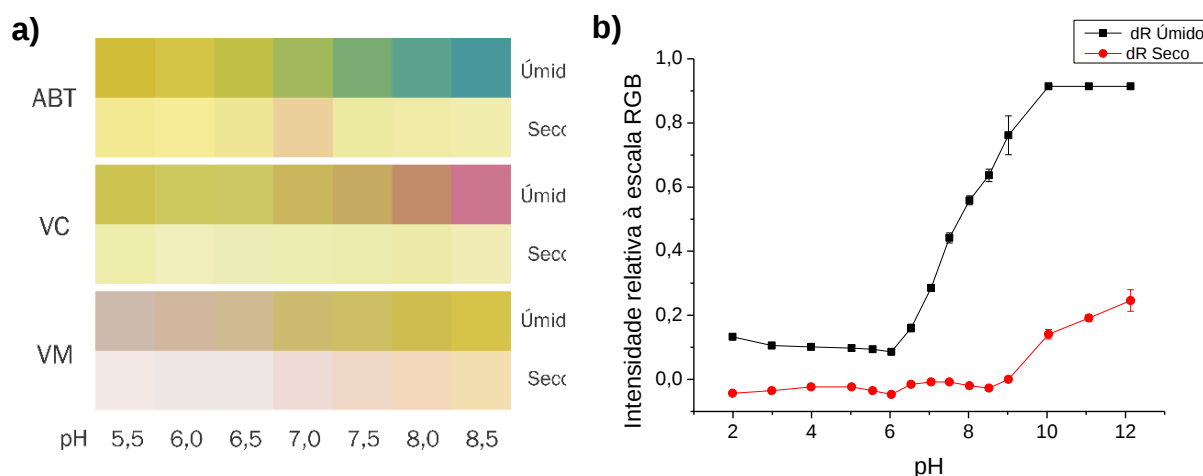


Figura 18. A) Paleta de cores utilizando a média dos valores em triplicatas dos *spots* úmidos e secos, respectivamente, dos indicadores ABT, VC e VM. B) Gráfico comparando valores de dCor vermelho com a variação do pH entre *spots* úmidos e secos do indicador ABT (n=3).

Por fim, na Figura 19 há a comparação visual e gráfica do aumento da concentração de indicador utilizando o parâmetro R de cor, que apresentou melhor sensibilidade e menores desvios relativos (Tabela 2). As cores se tornam mais intensas, aspecto que diferencia facilmente a variação do potencial hidrogeniônico, assim como maior sensibilidade analítica em intervalo por volta de 6,0 a 9,0 (Tabela 3).

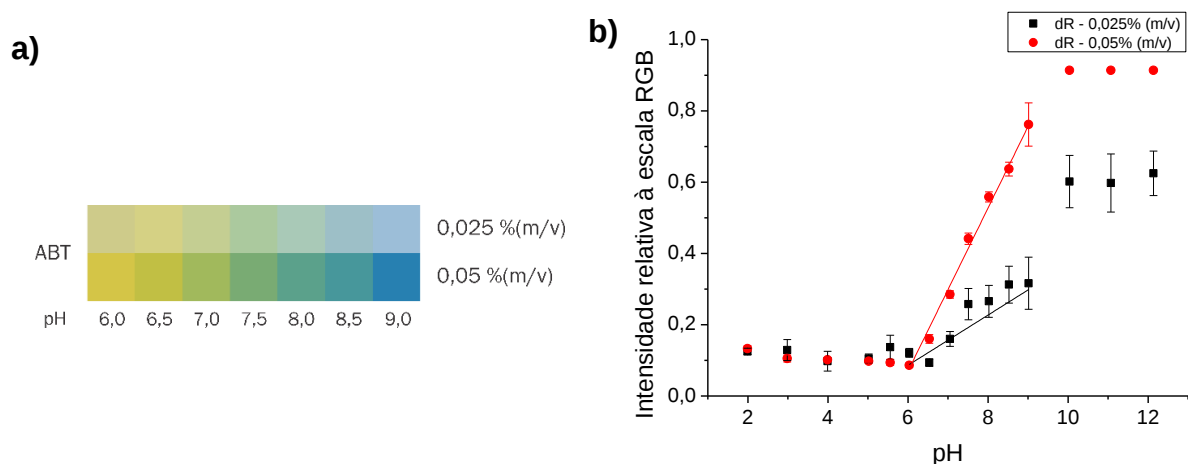


Figura 19. A) Paleta de cores utilizando a média dos valores em triplicatas dos *spots* do indicador ABT com 0,05 e 0,025% (m/v). B) Gráfico referente a variação de dR pelo pH comparando duas concentrações de indicador ABT e respectivos *fittings* entre pH 6,0 e 9,0 (n=3).

Tabela 3. Dados estatísticos para a regressão linear dos valores de RGB aplicada às curvas referente ao indicador ABT variando-se a concentração.

Indicador	Parâmetro	Conc. (% m/v)	Equação da Reta	R ²
ABT	dR	0,025	$dR = 0,07(\pm 0,02) \text{ pH} - 0,34(\pm 0,16)$	0,551
		0,05	$dR = 0,23(\pm 0,01) \text{ pH} - 1,30(\pm 0,07)$	0,986

Ao dobrar a concentração de indicador ABT, o sinal de cor dR passa a atingir valores entre ~0,1 a ~0,8 (variação de 0,7). Além disso, o coeficiente angular passa de 0,07 a 0,23, aumentando aproximadamente 330%. Portanto, ademais de outros testes de variação do pH a serem apresentados posteriormente, estabelece-se como parâmetros otimizados: indicador ABT em 0,05 % (m/v) em 10 % etanol, *spots* de 1,0 cm de diâmetro, variação do pH entre 6,0 e 9,0, e o parâmetro dR como sinal ideal em regressão linear.

4.4. Avaliação do uso de mistura de indicadores

Visando verificar a potencialidade de uso de mistura de indicadores para melhora dos parâmetros analíticos, avaliou-se duas soluções a partir de misturas entre o indicador ABT com VC e ABT com o VM. Avaliou-se apenas estas duas condições, pois uma mistura entre VC e VM não seria interessante já que os indicadores apresentam variação inversa das cores amarela e vermelha.

A proporção utilizada foi de 1:1 para os indicadores ABT e VC, já a mistura de ABT e VM contou com proporção de 1:2. A decisão foi tomada a partir da significativa diferença de intensidade de cor do VM em relação aos demais corantes. Continuadamente, ao misturar-se os indicadores, diluem-se os mesmos. Portanto,

um outro conjunto de *spots* foi preparado aplicando duas vezes o volume da solução da mistura. Desta forma, pretende-se que a intensidade de cor se assemelhe ao experimento utilizando indicador em concentração de 0,05%(m/v).

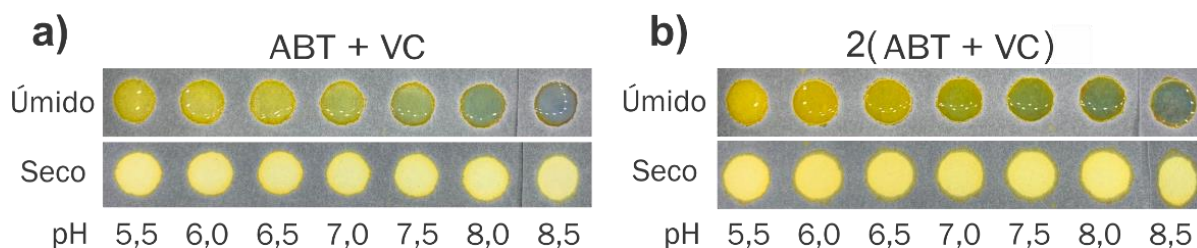


Figura 20. Imagens digitais dos ensaios com a) *spots* úmidos e secos, respectivamente, da mistura ABT e VC nas proporções 1:1, e b) *spots* úmidos e secos, respectivamente, da mistura ABT e VC mesmas proporções utilizando aplicação dupla (n=3).

Na Figura 20, é possível visualizar uma variação de cor da solução da mistura na faixa ideal de pH. A solução, mesmo em uma única aplicação tem aspecto visual que distingue bem o pH, principalmente a partir de 6,5. Ao secar-se completamente, novamente a cor se perde. Para avaliação quantitativa, construiu-se a Figura 21.

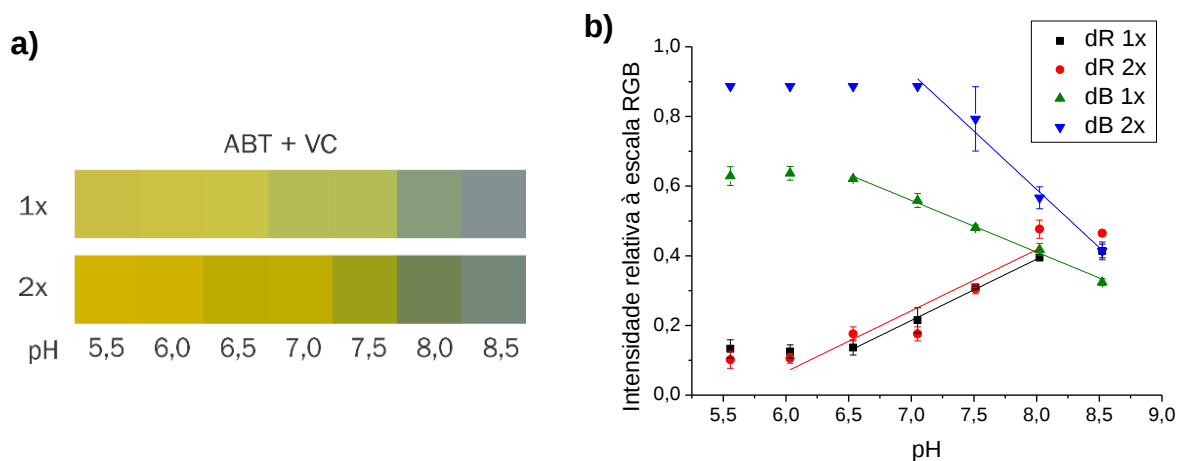


Figura 21. A) Paleta de cores da mistura de ABT e VC utilizando uma e duas aplicações de solução. B) Gráfico que representa a variação de cor RGB em função do pH para a mistura de ABT e VC na proporção de 1:1 (n=3).

Utilizando a média da triplicata, nota-se que a paleta de cores (Figura 21a) tem aspecto técnico positivo. Graficamente (Figura 21b), nota-se uma tendência de reposta linear entre tais parâmetros. O que podemos notar é uma saturação da cor azul (dB) em 2x para pH menor que 7,0. O valor de vermelho (dR) não tem modificação expressiva com a dupla aplicação.

Utilizando a mistura de ABT e VM, de mesma forma, é notável a mudança de cor na faixa de 5,5 a 8,5, Figura 22. Repetidamente, os *spots* secos perderam cor e não são relevantes para a análise.

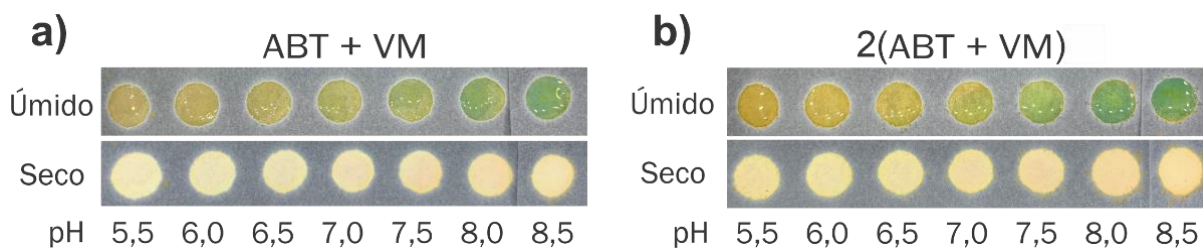


Figura 22. Imagens digitais dos ensaios com a) spots úmidos e secos, respectivamente, da mistura ABT e VM nas proporções 1:2, e b) spots úmidos e secos, respectivamente, da mistura ABT e VM mesmas proporções utilizando aplicação dupla.

Nota-se um gradiente de cor na faixa utilizada, ainda mais em aplicação dupla da mistura, sendo que nesta condição a distinção visual na faixa de pH 5,5 e 6,5 é mais nítida. A Figura 23 traz a paleta de cores e a curva de calibração resultante, mostrando que existe uma tendência linear possível (variação de 6,5 a 8,0) do valor de vermelho (dR) que não se distingue tanto comparando-se as duas aplicações.

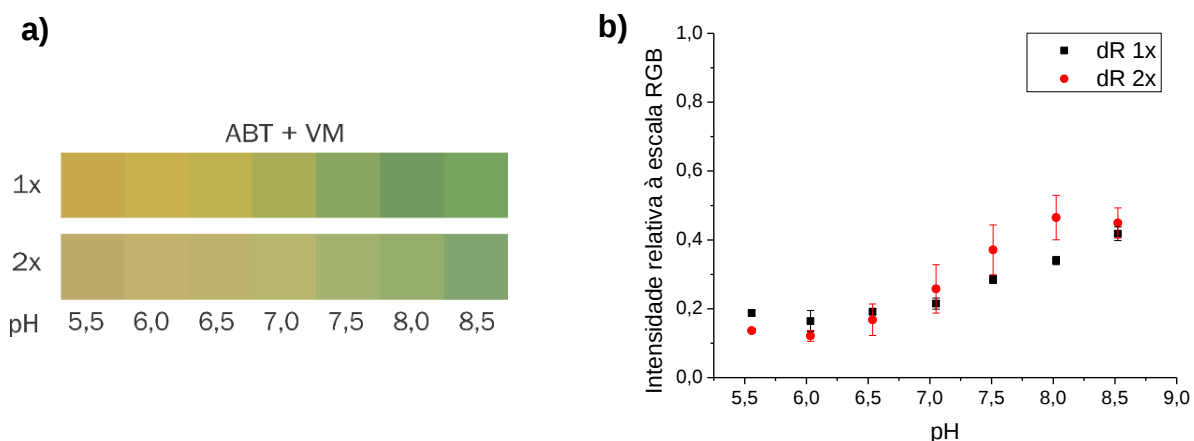


Figura 23. A) Paleta de cores da mistura de ABT e VM utilizando uma e duas aplicações de solução, respectivamente. B) Gráfico que representa a variação de cor pelo pH de ABT e VM na proporção de 1:2.

No entanto, a melhor condição analítica ainda é a utilização de apenas ABT 0,05% (m/v) e uso do canal vermelho para fins quantitativos, uma vez que apresentou melhor sensibilidade e maior faixa linear de resposta. Além de que o intervalo de pH calibrado corresponde a faixa relevante para as aplicações de qualidade de água.¹⁸ Assim, esta condição foi usada para análises de amostras reais.

4.5. Ensaaios de determinação do pH em amostras reais

Amostras aquosas provenientes de três fontes distintas foram utilizadas em uma análise comparativa entre a resposta obtida pelo sensor em papel e com uso de pHmetro. O parâmetro dR, estabelecido como sinal ótimo, foi aplicado na respectiva equação da regressão linear para obtenção do pH na faixa de 6,0 e 9,0. Ademais, propagou-se o erro a partir dos desvios da média dos ensaios em triplicata e dos erros associados aos coeficientes da regressão. É possível visualizar os resultados na Tabela 4. Respostas médias do pH correspondente a três amostras de água provenientes de fontes distintas, obtidas por análise em pHmetro e PADs, e seus respectivos desvios padrão (n=3).

Tabela 4. Respostas médias do pH correspondente a três amostras de água provenientes de fontes distintas, obtidas por análise em pHmetro e PADs, e seus respectivos desvios padrão (n=3).

		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
pHmetro	Lagoa	7,39 ± 0,06	7,38 ± 0,02	7,31 ± 0,09
	Mineral	6,71 ± 0,07	7,08 ± 0,03	6,73 ± 0,01
	Torneira	8,40 ± 0,02	8,34 ± 0,01	8,32 ± 0,03
PADs	Lagoa	6,50 ± 0,45	6,43 ± 0,45	6,46 ± 0,45
	Mineral	6,53 ± 0,45	6,86 ± 0,47	6,80 ± 0,47
	Torneira	6,77 ± 0,46	7,35 ± 0,48	7,19 ± 0,48

Em três ensaios distintos, vê-se maior erro associado ao método colorimétrico comparado ao eletroquímico. O sensor em papel conta com desvio padrão na ordem de 0,5 unidades de pH. Entende-se que a robustez do método está associada a alguns fatores, dentre eles, flutuações do sinal da cor decorrentes de efeito de *coffee-ring*, dispersão heterogênea do agente cromóforo, aspectos luminosos como reflexos, sombras e imperfeições na estrutura celulósica do papel. Estes obstáculos podem ser padronizados e minimizados, como foi feito neste estudo. Porém a capacidade restritiva de leitura do padrão RGB em 8 bits, comumente utilizadas nas câmeras convencionais, limita a resposta do sinal colorimétrico em 256 valores de cor discretos, o que resulta em menor resolução das respostas colorimétricas.

Ao compararmos as respostas e tomarmos por ideal o pH obtido pelo método eletroquímico, amplamente estabelecido, observa-se condições diversas para cada origem amostral. Visualmente, com auxílio da Figura 24, é possível notar que para cada matriz, a água mineral obteve resultados mais próximos entre os métodos. Seu erro relativo está em torno de 2,6% ao compararmos as médias dos valores de pH para cada amostra de água mineral. Enquanto para as demais, 12,3 e 14,3% de erro para água proveniente da lagoa e torneira, respectivamente.

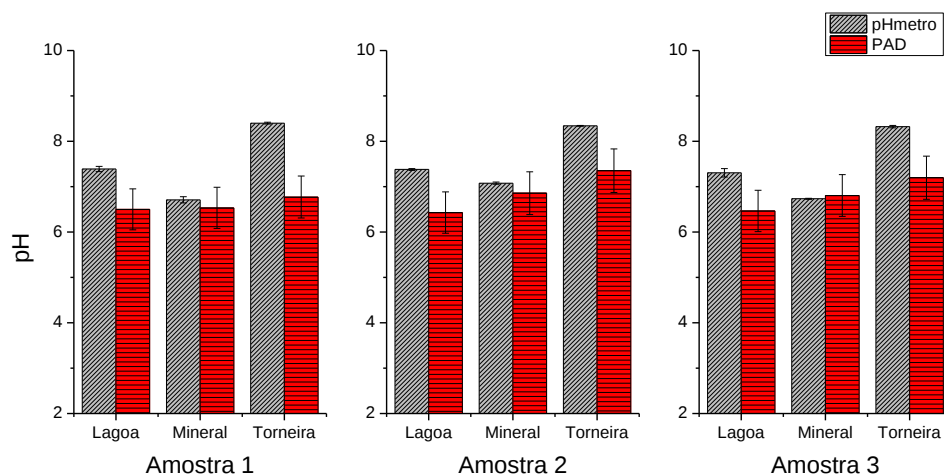


Figura 24. Gráfico de barras correspondente ao valor do pH e respectivos desvios obtidos para análises com PAD e pHmetro, em triplicata, para três matrizes distintas (n=3).

Utilizando um teste t-Student para a comparação estatística entre as médias (Tabela 5), pode-se notar que somente as amostras de água mineral possuem t-valor inferior ao t-tabelado, para nível de significância de 0,05. Uma hipótese que pode explicar as divergências das respostas analíticas é a constituição química de tais amostras e suas possíveis interações com o agente cromóforo. Apesar do método colorimétrico mostrar-se ser menos preciso, os desvios se aproximam das médias da resposta do pHmetro. O que reforça o aspecto semiquantitativo do ensaio. Porém, entende-se que a menor exatidão da matriz torneira é originada da plausível variação de cor pelo efeito químico da amostra.

Tabela 5. Análise estatística do tipo t-student para valores de pH correspondentes às análises utilizando pH ($gl = 4$; $\alpha = 0,05$)

	t-valor			t _{tab}
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	
Lagoa	3,40	3,65	3,32	2,13
Mineral	0,68	0,81	0,48	
Torneira	6,13	3,57	3,49	

No processo de tratamento de água realizado pelas agências de captação e fornecimento hídrico, há uma etapa de cloração, responsável pela desinfecção e mantimento dos níveis microbiológicos por toda a rede de distribuição. O cloro residual livre, composto por sais clorados como hipocloritos e cloridratos, deve estar na faixa de 0,2 a 0,5 mg L⁻¹ para adentrar as normas de potabilidade.¹⁸ Em estudos colorimétricos realizados em PADs, notou-se capacidade oxidantes do hipoclorito, que mesmo em concentração baixa, tem interação oxidativa com indicadores.⁵⁸ Portanto, a resposta obtida pelo *spot* em papel pode ter sofrido variação de cor, que mesmo em tempo curto afetara o sinal analítico provindo do indicador ABT. Em relação ao ensaio com água da lagoa, não se sabe ao certo qual espécie influenciou a variação da resposta colorimétrica, mas de forma geral, dada a maior

complexidade da amostra visto que é de uma região urbana e com notória contaminação de origem humana, apresentou efeito matriz significativo nos ensaios colorimétricos.

A Figura 25 dispõe uma representação em cor das médias dos valores RGB retirados dos *spots* para cada amostra, assim como uma paleta proveniente dos estudos prévios com variação do pH para comparação. É perceptível ligeira tendência ao verde mais escuro para água proveniente da torneira, seguido da água mineral. A contraposição visual com a escala de pH de 6,0 a 9,0 infere a amostra oriunda da lagoa está entre 6,0–6,5; a água mineral, entre 6,5–7,0; e torneira, de 7,0–7,5 (com exceção da amostra 1).

É importante reforçar que, muito embora o efeito matriz possa impedir determinações de pH exatas, continua-se obtendo resposta visual por meio da variação de cor do *spot*. Os PADs utilizados na determinação do pH são ferramentas de baixo custo e rápidas na tarefa de averiguar uma estimativa no que tange a potabilidade da água.

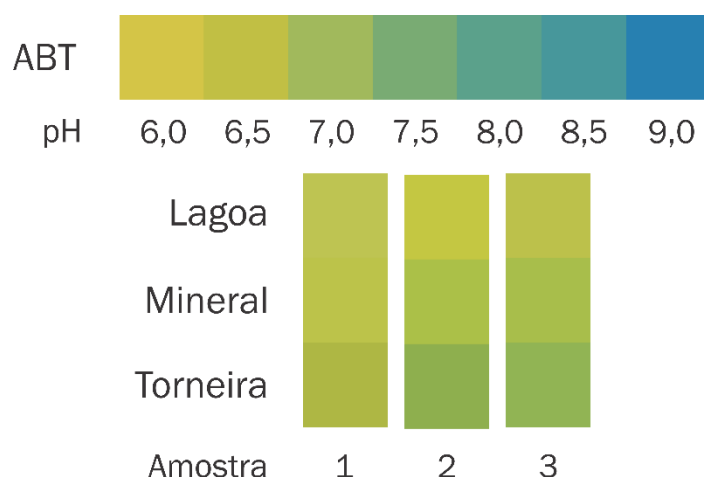


Figura 25. Paleta de cores composta por média das respostas, em triplicata, para os ensaios de determinação do pH para: variação de pH de 6,0 a 9,0 utilizando tampão BR; e amostras provenientes de lagoa, água mineral e torneira.

4.6. Reação enzimática de β -Gal e CPRG

A reação enzimática utilizando o agente cromóforo CPRG e a enzima β -galactosidase já é reportada na literatura e pode ser utilizada para a detecção indireta da presença de *E. coli*.⁵⁶ Em presença enzimática, uma solução originalmente amarela do CPRG tem sua cor transicionada gradativamente para o vermelho-vinho (Figura 26). Isto ocorre pela afinidade do sítio catalítico da enzima à galactose associada ao indicador vermelho de clorofenol (CPR).

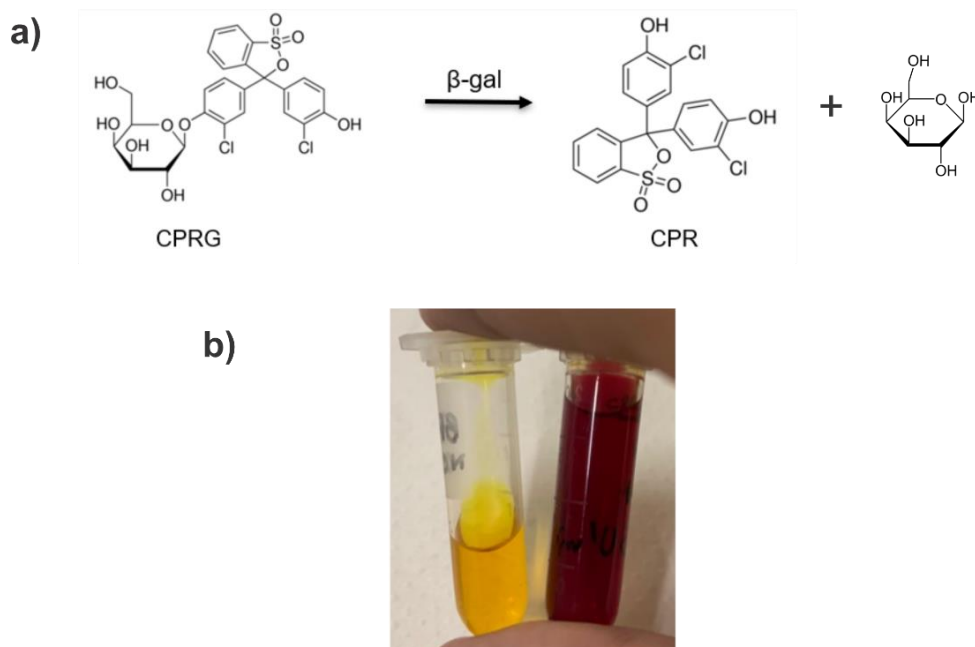


Figura 26. A) Equação química esquematizada da reação enzimática do CPRG e β -gal e b) Imagem de dois eppendorfs contendo solução amarela (somente CPRG) e solução vermelha-vinho (contendo mistura de CPRG e β -gal após cerca de 10 min de reação).

Primeiramente, foi estudada a dinâmica do efeito do tempo e concentração de CPRG utilizando uma concentração constante da enzima. Portanto, variou-se o agente cromóforo de 0,1 a 2,0 mmol L⁻¹ e aplicou-se uma solução de 10⁻¹ U mL⁻¹ de β -gal em triplicata (Figura 27). Imagens foram retiradas em diferentes tempos, variou-se de 1 a 30 minutos, além de se fazer o registro da reação com o *spot* seco.

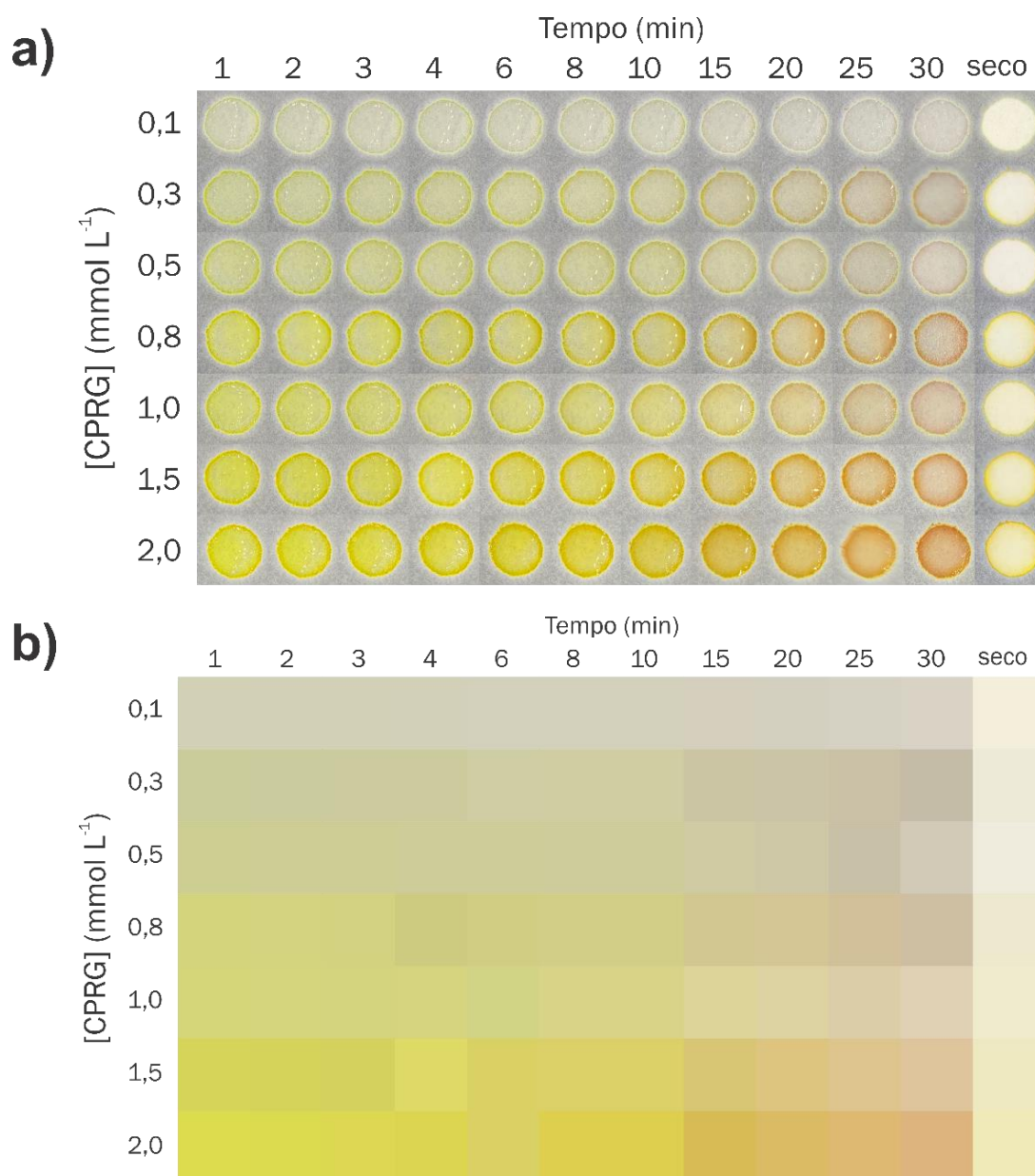


Figura 27. A) Imagem digital de uma grade de *spots* para a reação de β -gal (10^{-1} U mL⁻¹) e CPRG (0,1 a 2,0 mmol L⁻¹) em tempos diferentes de reação (até aquisição da imagem digital), utilizando *spots* de 1,0 cm de diâmetro. B) Paleta de cores da média das triplicatas da reação de β -gal e CPRG variando a concentração e tempo (n=3).

A grade de *spots* apresentada na Figura 27 configura que a reação ocorre em taxas diferentes conforme a concentração de CPRG. A reação só ocorre enquanto o *spot* está úmido, portanto, a taxa de formação da cor vermelha (produto reacional), está intrinsicamente ligado a disponibilidade de solução na superfície do *spot*. Isto leva a um contraponto, quanto maior o tempo de reação, maior a disponibilidade de interações entre a enzima e CPRG, gerando mais produto colorido. Porém, quanto maior o tempo de exposição do sensor ao ar, mais seco este se torna, até a completa secagem, interrompendo a reação.

Este contraponto converge para uma concentração e tempo ótimo, provenientes do estudo analítico das respostas de cor desta interação. A Figura 28 conta com os gráficos que representam a variação de cor e concentração de CPRG. Cada curva temporal reflete a taxa de formação do produto de cor avermelhada.

Percebe-se que a mudança de cor do ambiente químico reflete a modificação na resposta de intensidade do canal B, como é visto na Figura 28c. Os demais canais de cor mantiveram aspecto relativamente constante (Figura 28). Em relação a totalidade da cor, interação dos três canais RGB que refletem na cor final exibida visualmente, há valores altos constantes de vermelho e verde, em detrimento da queda abrupta do sinal de azul com a crescente concentração de CPRG.

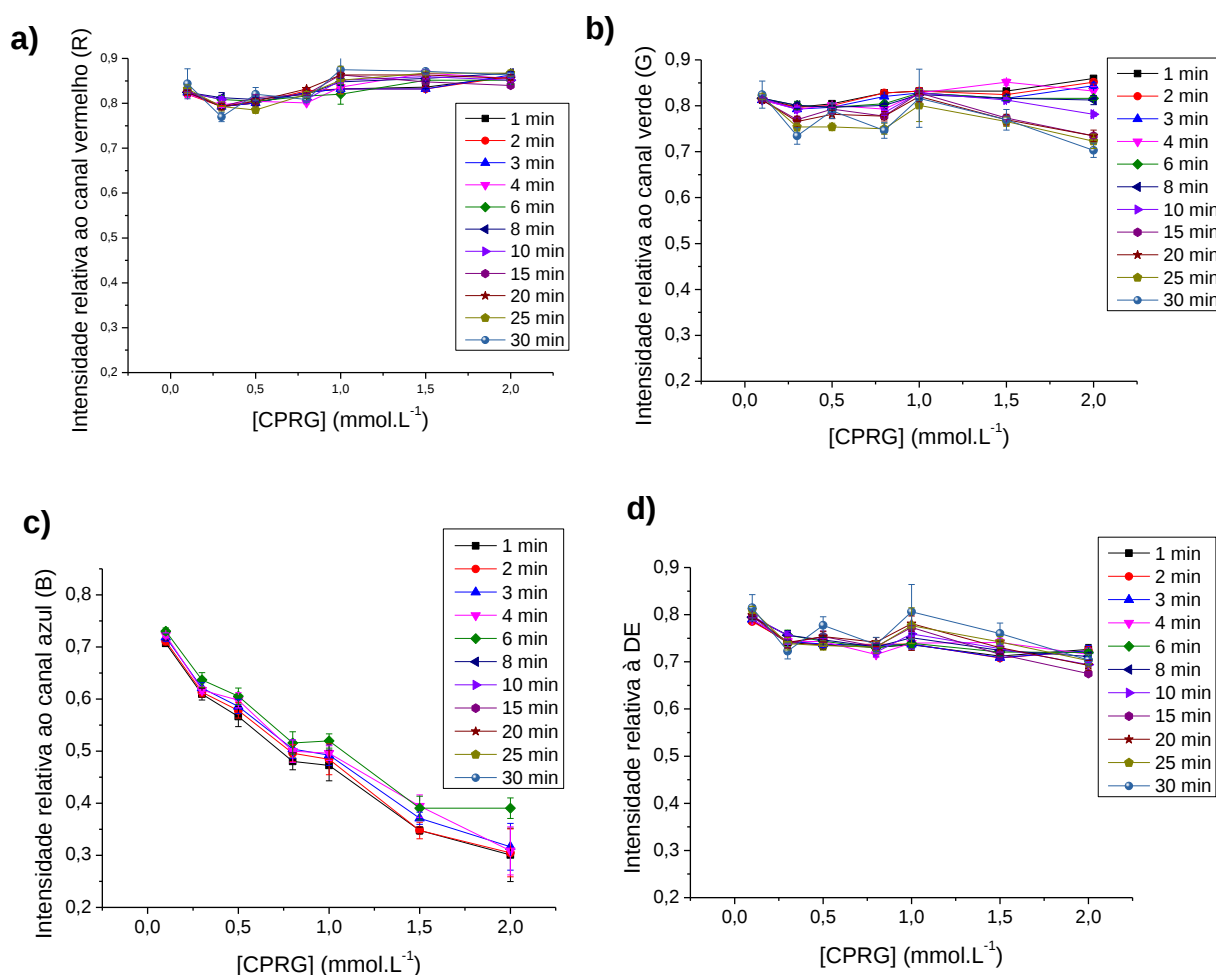


Figura 28. A) Gráfico do valor de vermelho (R) pela concentração de CPRG em diferentes tempos de análise. b) Gráfico do valor de verde (G) pela concentração de CPRG em diferentes tempos de análise. c) Gráfico do valor de azul (B) pela concentração de CPRG em diferentes tempos de análise. d) Gráfico do valor de distância euclidiana (DE) pela concentração de CPRG em diferentes tempos de análise (n=3).

Observando a resposta de cor pelo tempo, percebe-se na Figura 29 uma correlação expressiva, principalmente do valor do canal verde (G). Exceto pela

resposta da cor vermelha (Figura 29a), pode-se notar tendência na modificação do sinal de resposta com o passar do tempo de reação para os demais canais de cores. Visualmente, a cor do *spot* fica mais rosácea à medida que a reação ocorre (Figura 27a). Isto é refletido no sinal de cor G por supressão de sua cor complementar amarela. À medida que há consumo do substrato e desbotamento da cor inicial impregnada no *spot*, perde-se sinal de cor verde proporcionalmente ao tempo e concentração de CPRG (Figura 29b).

Nota-se que, mesmo com aumento da concentração do agente cromóforo, não há, visualmente, aumento intenso do contraste de cor. Após 15 min em concentração de CPRG superior a $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, existe percepção da cor um pouco mais vermelho-escurecida. Entretanto, em relação ao seu sinal analítico, R, prova-se que este canal de cor não é afetado pela mudança da coloração reacional pelo aparecimento do produto, também colorido.

O efeito de *coffee-ring* pode ser evidenciado visualmente nos *spots* (Figura 27a). Percebe-se que com o passar do tempo de reação, e tendência de secagem do *spot*, ocorre o desbotamento da coloração vermelha. No entanto, as bordas continuam visualmente intensas, principalmente em concentrações mais elevadas. Portanto, há lixiviação de moléculas para as laterais durante todo o tempo reacional e efeito semelhante ao aparecimento da cor clara do papel, ao centro do *spot*, como nos ensaios de pH.

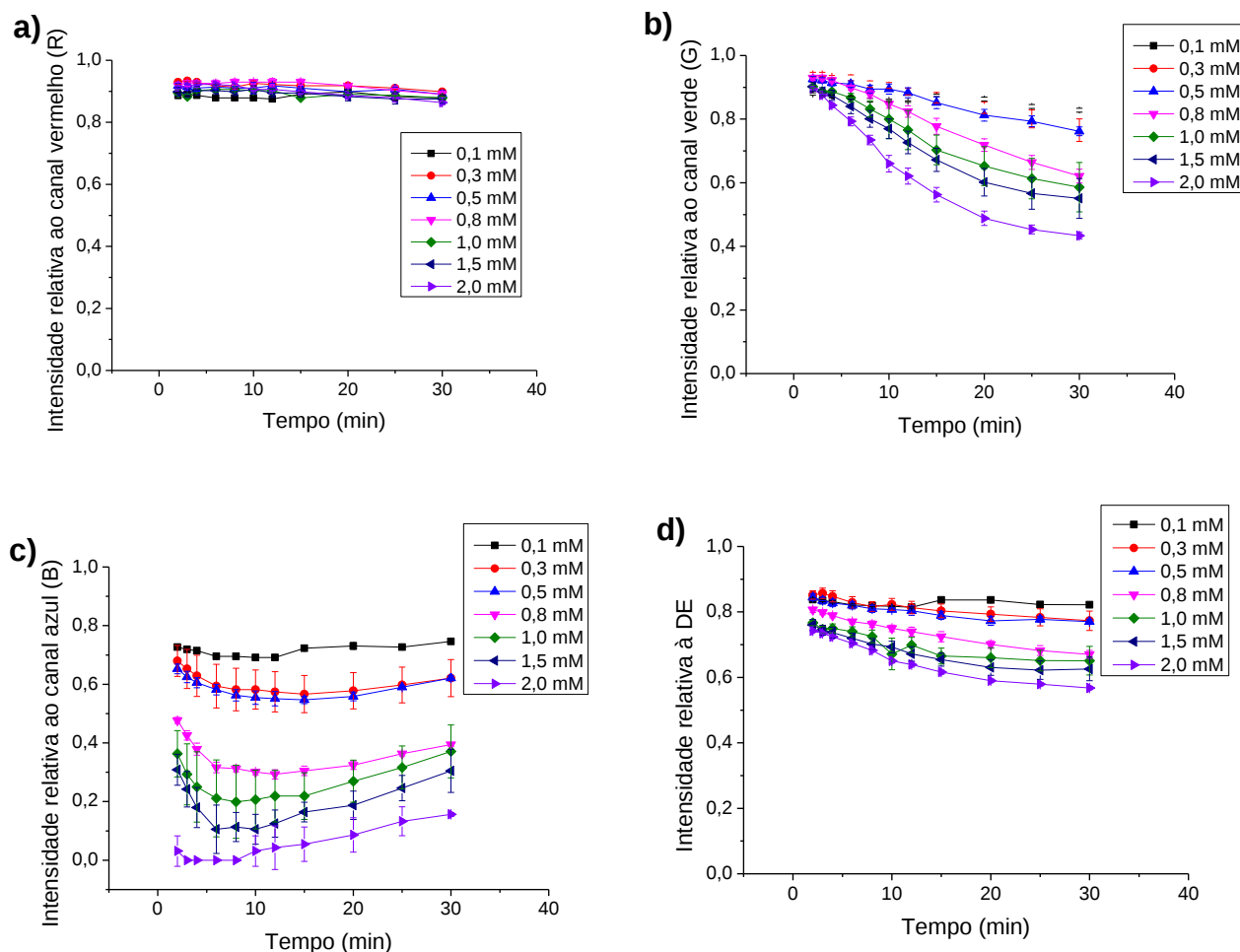


Figura 29. Gráfico correlacionando a resposta relativa do canal de cor: a) R, b) G, c) B e d) DE ao longo do tempo reacional para diferentes concentrações de CPRG (n=3).

Na sequência, variou-se a concentração de cromóforo para reforçar o sinal de cor mantendo constante o volume de solução aplicada. Contudo, esta abordagem não pode ser mantida, já que compromete os limites de detecção do método, uma vez que a elevada intensidade de cor do substrato CPRG dificulta identificar pequenas variações de cor do produto formado para baixas concentrações de β -gal (levaria a menor detectabilidade). Em outras palavras, deve-se buscar uma alternativa para o aumento do sinal analítico e minimização do efeito de *coffee-ring*.

Sendo assim, para evitar alternativas mais laboriosas como modificação da superfície do papel dos *spots* para minimizar o arraste das espécies durante a aplicação das soluções por *drop-casting*, optou-se por apenas diminuir o tamanho dos *spots*. De 1,0 cm, o diâmetro do círculo limitado por cera passou a ter aproximadamente 0,5 cm. Na Figura 30 tem-se uma grade das reações nas mesmas condições apresentadas anteriormente. O sinal visual tem efetividade de contraste, assim como previsto. Em concentrações superiores a 1,5 mmol L⁻¹ de CPRG, pode-se notar cor mais intensa a partir de 15 min de reação.

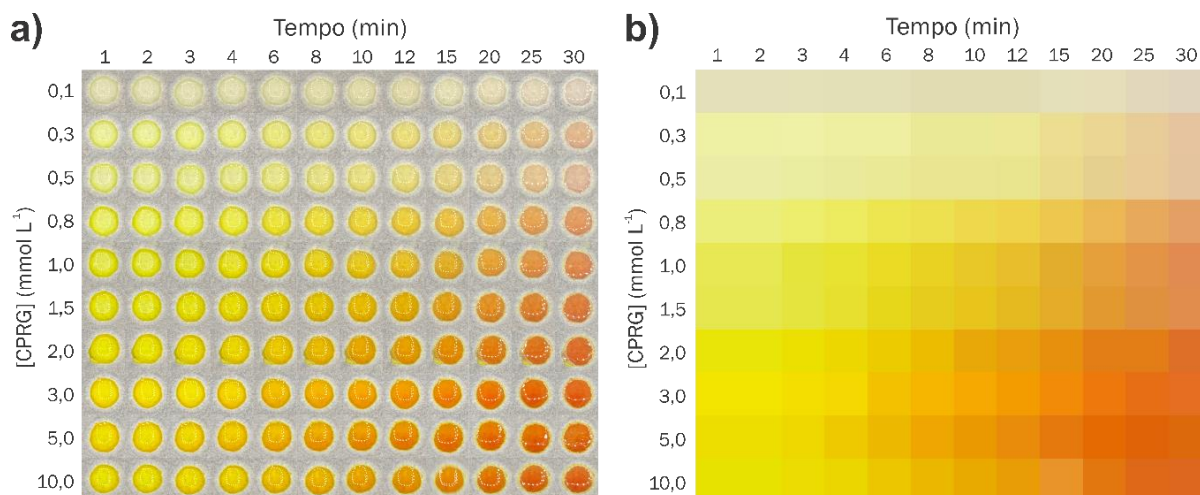


Figura 30. a) Imagem digital da grade de *spots* da reação de β -gal (10^{-1} U mL $^{-1}$) e CPRG (0,1 a 10,0 mmol L $^{-1}$) ao longo de até 30 min. Foram utilizados *spots* de 0,5 cm de diâmetro. b) Paleta de cores da média das triplicatas da reação de β -gal e CPRG variando a concentração e tempo (n=3).

Nota-se a partir da Figura 31 uma tendência de saturação da cor a partir de aproximadamente 20 minutos com um máximo de cor utilizando a concentração de CPRG 2,0 mmol L $^{-1}$. Assim, podemos otimizar o tempo de 20 minutos como condição ótima para a análise.

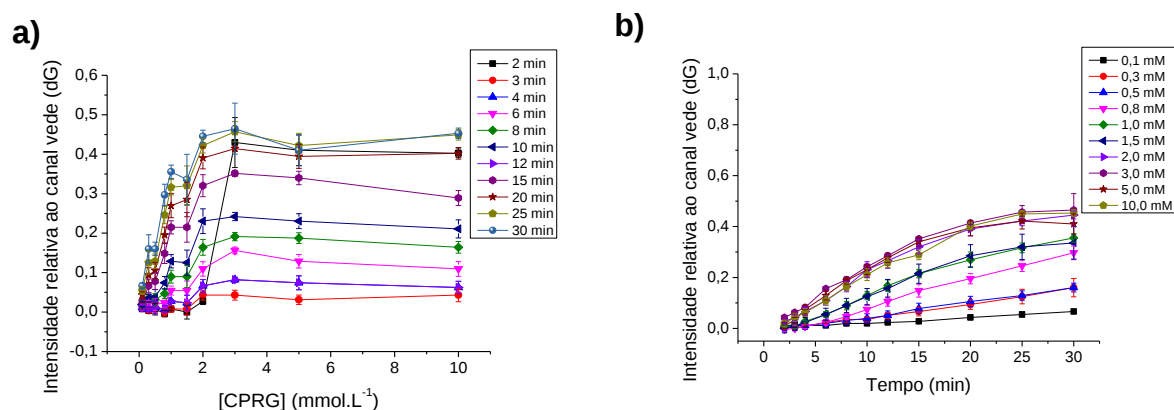


Figura 31. Gráficos de intensidade relativa de G (dG) para variação de a) concentração de CPRG e b) tempo de reação (n=3).

Para confirmar que a espécie limitante era a enzima (analito) e que as condições acima não estavam já saturadas, repetiu o ensaio anterior utilizando β -gal 1,0 U mL $^{-1}$ (Figura 32), nota-se de maneira clara o aumento do contraste e intensidade de cor. Para este caso, utilizando até 0,5 mmol L $^{-1}$ de CPRG, o *spot* atinge máximo em cor rosácea-esbranquiçada a partir de 8 minutos. A partir de 0,8 mmol L $^{-1}$ de CPRG, resposta já é visual em 2 minutos, mantendo ápice próximo de 20 minutos.

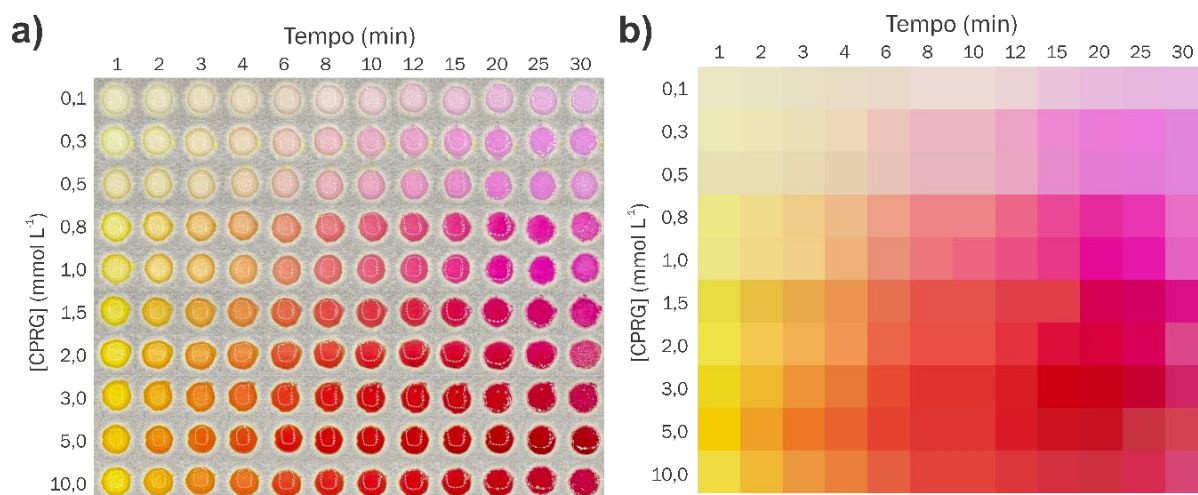


Figura 32. a) Imagem digital da grade de *spots* da reação de β -gal (10^0 U mL⁻¹) e CPRG (0,1 a 10,0 mmol L⁻¹) em tempos diferentes e *spots* de 0,5 cm de diâmetro. b) Paleta de cores da média das triplicatas da reação de β -gal e CPRG, variando a concentração de CPRG e tempo de reação (n=3).

Com base neste teste, os gráficos para o canal verde (parâmetro que apresentou melhor correlação com a variação de concentração de CPRG) foram plotados, Figura 33. Nota-se que a resposta de delta verde (dG) se inicia próximo a 0,0 e aumenta até região próximo a 1,0 (máximo do sinal analítico), Figura 33a. Visualmente, o comportamento da curva se dá por uma crescente, seguida de estabilização da resposta próximo a 2,0 mmol L⁻¹.

Em relação ao tempo (Figura 33b), o ápice na resposta analítica próximo a seu máximo (1,0) ocorre em concentrações de CPRG a partir de 1,5 mmol L⁻¹ e tempo reacional de 15 min. Em tempos superiores a 25 min, há perda de sinal analítico em decorrência de secamento do papel. Além disto, nota-se que concentrações superiores a 1,5 mmol L⁻¹, semelhante comportamento analítico é performedo. Portanto, foi escolhido como parâmetros ótimos para as próximas etapas: concentração do cromóforo equivalente a 2,0 mmol L⁻¹ e tempo de análise de 20 min, uma vez que estas condições proporcionaram os melhores resultados dentro das condições preestabelecidas.

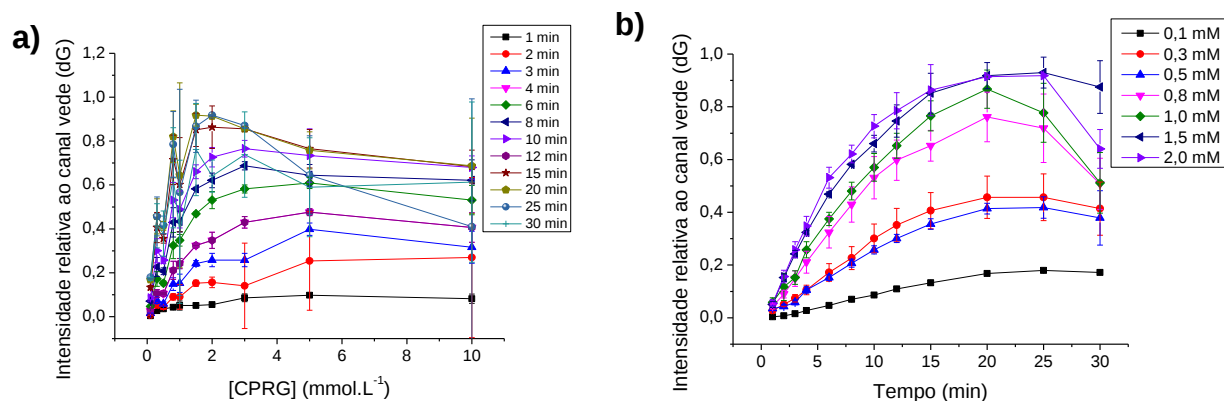


Figura 33. Gráficos de intensidade relativa de dG para variação de a) concentração de CPRG e b) tempo de reação ($n=3$).

A supressão do sinal de cor verde, análoga a variação crescente de dG, está intimamente ligada ao aparecimento da cor vermelho-alaranjado intrínseco ao produto reacional do CPRG. Tais cores são complementares, como é mostrado na Figura 34, e justificam o contraponto entre absorção e reflexão da luz direcionada ao *spot*. A detecção colorimétrica ocorre a partir da reflectância produzida pela interação da luz e o *spot* reacional. Portanto, especificamente relacionada à variação do sinal de verde, sua resposta analítica é suprimida em antagonismo ao aparecimento do produto vermelho.



Figura 34. Disco de Newton representando o caráter complementar cromático.

Desta forma, uma curva analítica por colorimetria digital para a variação de β -gal foi construída. Utilizou-se valores concentração de enzima iguais a $1,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-2}$; $5,0 \times 10^{-2}$; $1,0 \times 10^{-1}$; $5,0 \times 10^{-1}$; $1,0 \times 10^0$ U mL^{-1} .

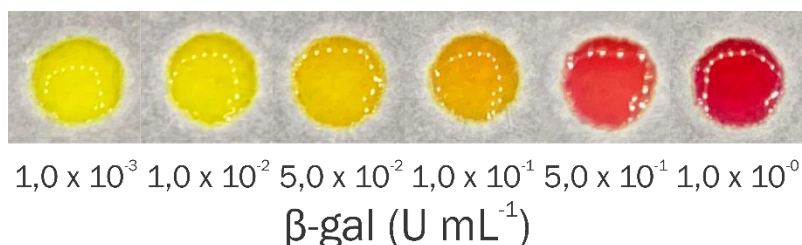


Figura 35. Imagem digital dos spots de diâmetro de 0,5 cm representando visualmente a curva analítica da variação de $\beta\text{-gal}$ utilizando $[\text{CPRG}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em 20 min ($n=3$).

A partir dos valores do canal verde, obteve-se as variações de cor para construção da curva analítica, Figura 36. Tendo em vista o perfil da curva, foi realizado o *fitting* utilizando a função sigmoidal (Hill).

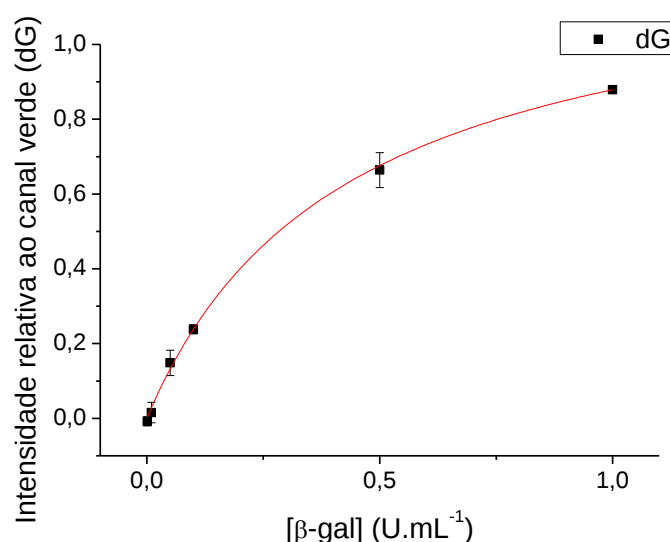


Figura 36. Curva analítica utilizando a intensidade relativa do canal verde em função da concentração de $\beta\text{-gal}$ ($n=3$). Foi aplicado o *fitting* não-linear do tipo sigmoidal (*hill*).

Visando linearizar a curva analítica, foi construído novo gráfico utilizando o recíproco da resposta analítica, isto é $1/G$. Nota-se que neste caso, a curva possui 1 ponto a menos devido a impossibilidade de cálculo para a concentração de 1 U mL^{-1} , já que se obteve um valor de 0,0 para o parâmetro verde.

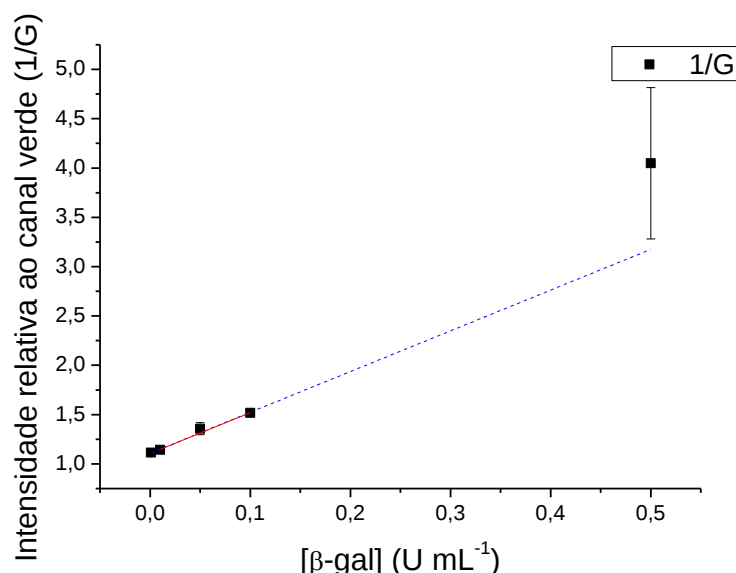


Figura 37. Curva analítica linearizada. *Fitting* linear da curva analítica da variação de β -gal pelo inverso da resposta do canal verde ($1/G$) ($n=3$). Faixa linear de 1×10^{-3} a 1×10^{-1} U mL⁻¹.

Os valores de coeficiente de correlação (R^2) foram superiores a 0,99 em ambos os *fittings* (Tabela 6). Porém, analiticamente, a resposta linear facilita a rápida aplicação em campo. A partir da curva linearizada, calculou-se os valores de limite de detecção ($LD = 6,4 \times 10^{-3}$ U mL⁻¹) e quantificação ($LQ=2,1 \times 10^{-2}$ U mL⁻¹).

Tabela 6. Dados estatísticos relacionado aos *fittings* das curvas de calibrações para β -gal ($n=3$).

Tipo de <i>fitting</i>	Equação	R^2
Sigmoidal (Hill)	$y = 1,26(\pm 0,19) \frac{x^{1,00(\pm 0,13)}}{0,43(\pm 0,16)^{1,00(\pm 0,13)} + x^{1,00(\pm 0,13)}}$	0,999
Linear	$y = 4,13(\pm 0,16)x + 1,11(\pm 0,01)$	0,994

Comparando este trabalho com a literatura (Tabela 7), é possível observar tempos de análises muito maiores e utilização de métodos custosos e de difícil implementação em campo. O maior tempo de testagem reportado, de forma geral, se deve a necessidade de pré-enriquecerem a amostra de *E. coli*. Já em relação ao LD, nota-se diferentes unidades de medida, portanto torna-se pertinente a conversão da unidade de medida utilizada neste trabalho (U mL⁻¹) às demais.

Segundo Sigma-Aldrich, a atividade específica da β -gal em temperatura de 25 °C é aproximadamente 30 U mg⁻¹.⁵⁷ Convertendo os valores de LD e LQ obtemos valores de 0,21 μ g mL⁻¹ e 0,63 μ g mL⁻¹, respectivamente. Assim, nota-se que o LD obtido é similar ao trabalho prévio reportado por Jokerst e colaboradores.³⁷ Entende-se que, mesmo utilizando estimativas quanto ao valor da atividade específica dado pela literatura, destaca-se que os autores empregaram estratégias de

enriquecimento da amostra previamente à aplicação no sensor, o que corrobora para um resultado animador do nosso ensaio, uma vez que há a diminuição expressiva no tempo de análise (de 8 h para 20 min) com LD proporcionalmente inferior. Já a correlação entre a concentração de β -gal com a quantidade de bactérias é dificilmente encontrada na literatura e assim, necessita realizar um estudo futuro acompanhando a sua produção com o crescimento de diferentes colônias.

Tabela 7. Dados deste trabalho comparado a retirados da literatura contendo matriz, LD e tempo de análise.

Trabalho	Método	Matriz	LD	Tempo
Creran, B., 2014 ³⁹	Colorimétrico (Enzimático)	Água	10^{-2} bactéria mL ⁻¹	5 min
Jokerst, J. C., 2012 ³⁷	Colorimétrico (Enzimático)	Comida (Bolonha)	$0,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ 10 CFU cm^{-2}	8 h
Schaumburg, F. 2019 ³⁸	Colorimétrico (Imunoensaio - LFA*)	Água	$9,2 \text{ CFU mL}^{-1}$	90 min
Este trabalho	Colorimétrico (Enzimático)	Água	$6,4 \times 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$ $0,21 \mu\text{g mL}^{-1}$	20 min

* LFA: Ensaio em fluxo lateral, CFU: unidades formadoras de colônias.

Foram realizados ensaios de reprodutibilidade do método (Figura 38), avaliando-se a concentração de β -gal $1,0 \times 10^{-1} \text{ U mL}^{-1}$ em 12 diferentes *spots*, sob a condição ótima. Calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) como sendo de 4,18% (n=12), o qual pode ser considerado excelente tendo em vista a simplicidade e baixo custo do método.

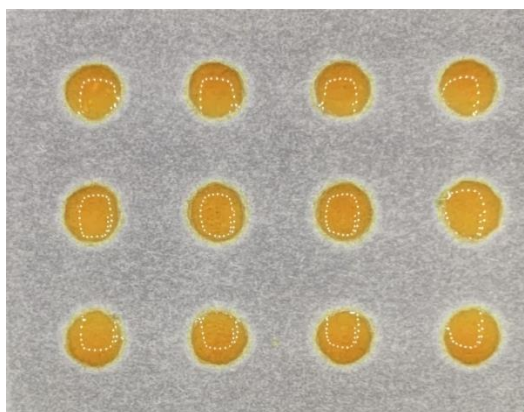


Figura 38. Sensor em papel contendo 12 *spots* utilizados para teste de reprodutibilidade. Condições: tempo=20 min; [CPRG] = $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$; [β -gal] = $1,0 \times 10^{-1} \text{ U mL}^{-1}$ (n=12).

4.7. Curva de adição e recuperação em amostras reais

Utilizando amostra de água provenientes de duas origens diferentes, preparou-se uma curva analítica a partir da contaminação com β -gal. Mesmo volume de amostra foi diluída na proporção de 1:1 com tampão fosfato pH=7,5 e β -gal nas concentrações determinadas ($[\beta\text{-gal}] = 1 \times 10^{-2}$; 5×10^{-2} ; 1×10^{-1} ; $5 \times 10^{-1} \text{ U mL}^{-1}$). O mesmo procedimento foi utilizado na metodologia da produção do *spot*, reação para variação na cor e captura da imagem ($d = 0,5 \text{ cm}$; $[\text{CPRG}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$; $V = 5 \mu\text{L}$; $t = 20 \text{ min}$).

A partir do parâmetro G , construiu-se a curva do seu inverso ($1/G$), considerando a concentração de $10^{-2} \text{ U mL}^{-1}$ como primeiro ponto, seguido das adições subsequentes. Na Figura 39 é possível visualizar as curvas e respectivas regressões para cada matriz. Comparado as demais matrizes, nota-se maior sensibilidade da amostra de água mineral.

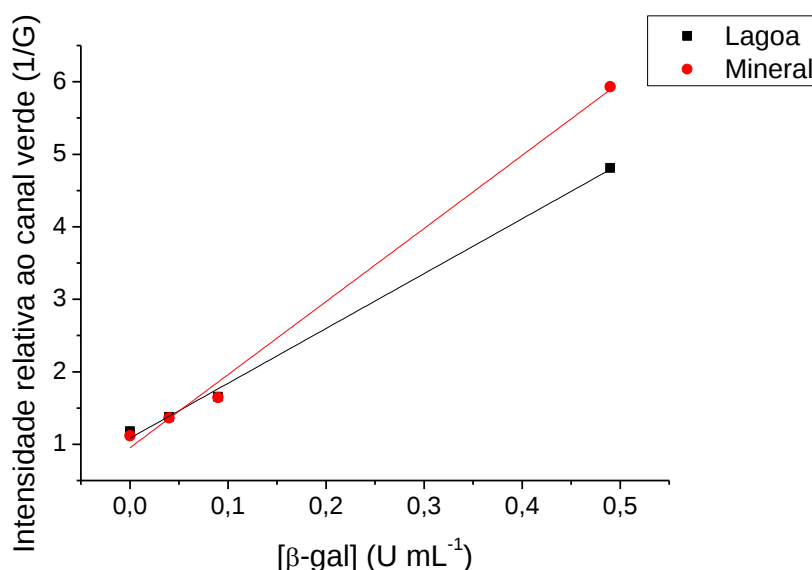


Figura 39. *Fitting* linear da curva de adição de β -gal pelo inverso da resposta do canal verde ($1/G$) para duas matrizes diferentes (água de lagoa e mineral). Faixa linear de $0,0$ a $4,9 \times 10^{-1} \text{ U mL}^{-1}$ ($n=3$).

A partir da Tabela 8, pode-se fazer uma análise do comportamento dos fittings lineares comparando as origens das amostras. As curvas contam com R^2 superiores a $0,9$, demonstrando caráter linear e correlacional entre as variáveis. Em relação a sensibilidade, como já descrito anteriormente, a água mineral contém maior coeficiente angular.

Tabela 8. Dados estatísticos referentes aos *fittings* lineares da curva de adição e recuperação com três diferentes matrizes.

Matriz	Equação da Reta	R ²
Lagoa	$y = 7,5(\pm 0,3) + 1,08(\pm 0,07)$	0,996
Mineral	$y = 10,1(\pm 0,5) + 1,0(\pm 0,1)$	0,992

Por se tratar de uma regressão adaptada, o inverso do sinal de verde normalizado afetará o procedimento para obter-se o valor da concentração de β -gal. Faz-se necessário encontrar o valor de intersecção da reta ao valor 1,0 no eixo das ordenadas ($y = 1,0$). Aplicando tal feito, obtém-se as médias das concentrações enzimáticas, desvios, recuperações e valores-t observados (teste t de Student) na Tabela 9.

Tabela 9. Dados estatísticos obtidos a partir do *fittings* linear da curva de adição e recuperação de β -gal em duas matrizes distintas. (n=3)

	[β -gal] (U mL ⁻¹)	Recuperação (%)	t _{obs}	t _{crit} (gl = 2)
Lagoa	0,007 $\pm$ 0,003	70 $\pm$ 30	0,77	2,92
Mineral	0,009 $\pm$ 0,003	90 $\pm$ 30	0,38	

Os ensaios realizados em triplicata obtiveram concentrações enzimáticas próximas a 1×10^{-2} U mL⁻¹ para a matriz lagoa e mineral. Um teste-t de *Student* foi efetuado a partir da comparação das médias calculadas e valor ideal almejado. Para todas os tipos de amostras, o t-valor observado se mostrou menor que o t-crítico para dois graus de liberdade (gl) e nível de significância de 5%. Portanto, rejeita-se a hipótese de que as médias das concentrações de β -gal estão fora do limite de significância normal.

Ambas as amostras obtiveram recuperação média superior a 70%, porém a resposta média contou com desvio alto de 30%. Assim, as duas matrizes obtiveram precisão proporcional, porém a água mineral obteve maior exatidão, como esperado, por ser uma matriz menos complexa quando comparada a água da lagoa.

4.8. Estimativa de custo para o sensor

Listando todos os materiais e reagentes necessários para a produção dos PADs, pode-se calcular o custo estimado por *spot* para cada analito. Na Tabela 10 foi catalogado as informações principais dos substratos e seus custos.

Tabela 10. Valores de custos para produção de *spots* individuais considerando volume de 15 µL para ensaio do pH e 5 µL para o ensaio enzimático.

Etapa	Item	Fornecedor	Valor (R\$)	Número	Valor por <i>spot</i> (R\$)
Impressão	Papel Filtro Qualitativo	Positiva Lab	1,00 por folha	648 <i>spots</i> por Folha A4	0,00154
	Cera Xerox Colorqube	Xerox	535,00 por 6 un.	4400 impressões	0,00003
pH	ABT	Sigma Aldrich	1156,00 por 25 g	7,494 µg por <i>spot</i>	0,00035
	Álcool Etílico Anidro	Sigma Aldrich	833,00 por 1 L	1,5 µL por <i>spot</i>	0,00125
β-gal	CPRG	Sigma Aldrich	706,00 por 250 mg	6,074 µg por <i>spot</i>	0,01715
	Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich	1932,00 por 2,5 Kg	44,36 µg por <i>spot</i>	0,00003
	NaH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich	2345,00 por 1 Kg	11,66 µg por <i>spot</i>	0,00003

As etapas de produção foram divididas em três: impressão, ou fabricação do sensor e seus *spots*; determinação do pH, com o preparo da solução do indicador ABT em álcool etílico; e detecção de β-gal, utilizando o cromóforo e sais para o tampão. Como para cada tipo de análise tem-se tamanhos diferentes de *spots*, estimou-se um número intermediário. Assim como na capacidade de impressões dos cartuchos de cera da impressora *Xerox ColorQube®*.

Foi calculado para cada reagente sua quantidade por unidade de *spot*. Adicionando os valores totais de cada matéria-prima, a etapa de impressão e o respectivo analito, chega-se em valores de R\$ 0,03 e R\$ 0,19 a cada dez *spots* para pH e β-gal, respectivamente. A diferença entre os custos das metodologias se dá pelo uso do CPRG na detecção enzimática, sendo este o reagente mais caro: aproximadamente dois centavos de Real por *spot*. No mais, ambos sensores se mostram terem custo baixo para análises rápidas em papel.

5. CONCLUSÃO

Utilizando sensor em substrato de papel, foi possível preparar sensores colorimétricos de baixo custo e de análises rápidas para a determinação de pH na faixa de 6,0 a 9,0 utilizando o indicador ABT e para triagem de forma indireta da presença de *E. coli*. Para este último, desenvolveu-se ensaio para a detecção da β -gal, um biomarcador relevante para a presença deste microrganismo, na faixa de concentração de 1×10^{-3} a 1×10^0 U mL⁻¹. Obteve-se LD e LQ iguais a $6,4 \times 10^{-3}$ e $2,1 \times 10^{-2}$ U mL⁻¹, respectivamente, e uma reprodutibilidade, com DPR de 4,18% (n=12). Em ensaios com amostra real, foi observado efeito matriz significativo em amostra de água de torneira. Adicionalmente, nota-se que o método ainda apresenta limitada sensibilidade para aplicações no controle de qualidade para água potável, mas pode ser interessante para uma primeira triagem em poços artesianos ou em águas de reuso, por exemplo.

As análises, apesar de disporem de curto tempo experimental, apresentam necessidades de tratamento de dados laboriosos: transferências de imagens, retirada dos valores de cor utilizando software específico e quantidade significativa de dados a serem interpretados na construção de curvas com replicatas. Portanto, algoritmos e aplicativos para automatizar o processo é uma etapa bastante promissora para a implementação destes sensores.

6. REFERÊNCIAS

1. Maia, I. L. B. "O acesso à água potável como direito humano fundamental no direito brasileiro." *Revista do CEPEJ* 20 (2017).
2. de Oliveira, F. P. S. et al. "Overview of sanitation drainage and waste solid management in camarajipe river hydrographic basin, Salvador-BA." *Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais* (2022): 24-35.
3. World Health Organization (WHO). "Investing in water and sanitation: increasing access, reducing inequalities, GLAAS 2014 findings-special report for Africa". No. WHO/FWC/WSH/15.05. World Health Organization (2015).
4. Aleixo, B., et al. "Direito humano em perspectiva: desigualdades no acesso à água em uma comunidade rural do Nordeste brasileiro." *Ambiente & Sociedade* 19 (2016): 63-84.
5. Machado, A. VM, et al. "Critical factors for the success of rural water supply services in Brazil." *Water* 11.10 (2019): 2180.
6. Pesquisa nacional de saneamento básico 2017: abastecimento de água e esgotamento sanitário / IBGE, Coordenação de População e Indicadores Sociais. - Rio de Janeiro: IBGE (2020).
7. BRASIL. Lei nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9433.htm. Acesso em: 03 de janeiro de 2024.
8. IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 1989/2017.
9. Pontes, C. A. Alves et al. "Bioética da proteção e papel do Estado: problemas morais no acesso desigual à água potável." *Cadernos de Saúde Pública* 20 (2004): 1319-1327.
10. World Health Organization (WHO). "Health at a glance: Asia/Pacific 2020 measuring progress towards universal health coverage: Measuring progress towards universal health coverage." OECD publishing, (2020).
11. Guerra, N. M. M. et al. "Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável." *Acta Sci. - Biol. Sci.* 28, (2006): 13–18.
12. World Health Organization. "WHO global water, sanitation and hygiene: annual report 2019." (2020).
13. Safavieh, M. et al. "A Simple Cassette as Point-of-Care Diagnostic Device for Naked-eye Colorimetric Bacteria Detection." *Analyst* 139, (2014): 482-487.
14. George, I., Crop, P. & Servais, P. "Use of β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase activities for quantitative detection of total and fecal coliforms in wastewater." *Can. J. Microbiol.* 47, (2001): 670–675.
15. Soto, F. R. M. et al. "Monitoramento da qualidade da água de poços rasos de escolas públicas da zona rural do Município de Ibiuna/SP: parâmetros microbiológicos, físico-químicos e fatores de risco ambiental." *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 65 (2006): 106–111.

16. Domingues, V. O. et al. "Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias." *Saúde (Santa Maria)* (2007): 15-19.
17. Stukel, T. A. et al. "A Longitudinal Study of Rainfall and Coliform Contamination in Small Community Drinking Water Supplies." *Environ. Sci. Technol.* 24, (1990): 571–575.
18. BRASIL. Portaria de Consolidação Nº888, de 04 de maio de 2021. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Disponível em: https://portalsinan.saude.gov.br/images/documentos/Legislacoes/Portaria_Consolidacao_5_28_SETEMBRO_2017.pdf. Acesso em: 06 de janeiro de 2024.
19. BRASIL. Resolução Nº 274, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para águas envasadas e gelo. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0274_22_09_2005.html. Acesso em: 06 de janeiro de 2024.
20. ABNT, NBR 13969, de setembro de 1997. Tanques sépticos - Unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos - Projeto, construção e operação. Disponível em www.ipaam.am.gov.br/wp-content/uploads/2021/01/NBR-13969-97-TS-Unid-trat-complem-e-disposicao-final.pdf. Acesso em: 06 de janeiro de 2024.
21. McFeters, G. A., et al. "Comparative performance of Colisure™ and accepted methods in the detection of chlorine-injured total coliforms and *E. coli*." *Water Science and Technology* 31.5-6 (1995): 259-261.
22. Giowanella, M. et al. "Microbiological quality of water from the rivers of Curitiba, Paraná State, Brazil, and the susceptibility to antimicrobial drugs and pathogenicity of *Escherichia coli*." *Environmental monitoring and assessment* 187 (2015): 1-9.
23. World Health Organization. "Guidelines for drinking-water quality." *WHO Chronicle: Fourth Edition* 38.4 (2011): 104-8.
24. Domingues, V. O., et al. "Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias." *Saúde (Santa Maria)* (2007): 15-19.
25. US Environmental Protection Agency, Office of Water, de fevereiro de 2006. Microbial laboratory guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockkey=2000UDF3.txt>. Acesso em: 06 de janeiro de 2024.
26. US Food and Drug Administration, de setembro de 2020. BAM chapter 4: enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>. Acesso em: 06 de janeiro de 2024.
27. Nurliyana, M. R., et al. "The detection method of *Escherichia coli* in water resources: A review." *Journal of Physics: Conference Series*. 995. IOP Publishing, (2018), 012065.

28. Pebdeni, A. B. et al. "Recent advances in optical biosensors for specific detection of E. coli bacteria in food and water." *Food Control* 135 (2022): 108822.
29. Pang, B. et al. "Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid Escherichia coli O157: H7 detection." *Analytical Biochemistry* 542 (2018): 58-62.
30. Noiphung, J. et al. "Development of paper-based analytical devices for minimizing the viscosity effect in human saliva." *Theranostics* 8, (2018): 3797–3807.
31. Pebdeni, A. B. et al. "Recent advances in optical biosensors for specific detection of E. coli bacteria in food and water." *Food Control* 135 (2022): 108822.
32. Özkanca, R. "β-Galactosidase activity of Escherichia coli under long-term starvation, alterations in temperature, and different nutrient conditions in lake water." *International Microbiology* 5 (2002): 127-132.
33. Matthews, B. W. "The structure of E. coli β-galactosidase." *Comptes rendus biologies* 328.6 (2005): 549-556.
34. Manafi, M. O. H. A. M. E. D., et al. "Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics." *Microbiological reviews* 55.3 (1991): 335-348
35. Mittelman, A. S. et al. "Amperometric Quantification of Total Coliforms and Specific Detection of Escherichia coli." *Analytical Chemistry* 74.4 (2002): 903-907.
36. Jokerst, J. C., et al. "Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogens." *Analytical chemistry* 84.6 (2012): 2900-2907.
37. Schaumburg, F. et al. "Rapid bacteria detection at low concentrations using sequential immunomagnetic separation and paper-based isotachopheresis." *Analytical chemistry* 91.15 (2019): 9623-9630.
38. Creran, Brian, et al. "Detection of bacteria using inkjet-printed enzymatic test strips." *ACS applied materials & interfaces* 6.22 (2014): 19525-19530.
39. Bordbar, Mohammad Mahdi, et al. "Disposable paper-based biosensors for the point-of-care detection of hazardous contaminations—A review." *Biosensors* 11.9 (2021): 316.
40. Noiphung, J. et al. "Development of paper-based analytical devices for minimizing the viscosity effect in human saliva." *Theranostics* 8, 3797–3807 (2018).
41. Fernandes, S. C. et al. "Reduction of blood volume required to perform paper-based hematocrit assays guided by device design." *Anal. Methods* 11, 2057–2063 (2019).
42. Nguyen, T. T. T. et al. "Disposable colorimetric paper-based probe for the detection of amine-containing gases in aquatic sediments." *ACS Omega* 4 (2019): 12665–12670.
43. Sun, X. et al. "Improved assessment of accuracy and performance using a rotational paper-based device for multiplexed detection of heavy metals." *Talanta* 178, 426–431 (2018).

44. Pratiwi, R. et al. "A selective distance-based paper analytical device for copper(II) determination using a porphyrin derivative." *Talanta* 174 (2017): 493–499.
45. Cate, D. M. et al. "Recent developments in paper-based microfluidic devices." *Anal. Chem.* 87 (2015): 19–41.
46. Morbioli, G. G. et al. "Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) - A review." *Anal. Chim. Acta* 970 (2017): 1–22.
47. Mazzu-Nascimento, T. et al. "Paper-based microfluidics immunoassay for detection of canine distemper virus." *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 60 (2017): 1–11.
48. Yamada, K. et al. "Paper-based inkjet-printed microfluidic analytical devices." *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54 (2015): 5294–5310.
49. Martinez, A. W. et al. "Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis." *Anal. Chem.* 80 (2008) 3699–3707.
50. Carneiro, F. A. A. et al. "Espectro de cores do ponto de vista matemático." *Cadernos do IME-Série Matemática* 13 (2019): 1-10.
51. Fan, Y. et al. "Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review." *Meas. J. Int. Meas. Confed.* 171 (2021): 108829.
52. Rahman, N. et al. "Extractive spectrophotometric methods for the determination of nifedipine in pharmaceutical formulations using bromocresol green, bromophenol blue, bromothymol blue and eriochrome black T." *Il Farmaco* 59.1 (2004): 47-54.
53. Ford, A. et al. "Colour space conversions." Westminster University, London 1998 (1998): 1-31.
54. de Freitas, Soraia V., et al. "Uncovering the formation of color gradients for glucose colorimetric assays on microfluidic paper-based analytical devices by mass spectrometry imaging." *Analytical chemistry* 90.20 (2018): 11949-11954.
55. Sabnis, Ram Wasudeo. *Handbook of acid-base indicators*. CRC Press, (2007).
56. Cazorla, D. et al. "Variable specific activity of *Escherichia coli* β -galactosidase in bacterial cells." *Biotechnology and bioengineering* 72.3 (2001): 255-260.
57. Sigma-Aldrich. " β -Galactosidase", 2024. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/roche/10105031001>>. Acessado em: 31 de janeiro de 2024.
58. Santos, Wendel Ferreira. Estudos com microdispositivos baseados em papel (PAD) para determinação colorimétrica em diferentes amostras. 2022. 1 recurso online (82 p.) Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/6098>. Acessado em: 12 de abril 2024.

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO

1.1. Colorimetria digital

A colorimetria digital tem sido objeto de extenso estudo e aplicação em diversos campos. Sua utilidade se baseia na capacidade de descrever e quantificar fisicamente a percepção de cor pela visão humana. Associado a vantagens na acessibilidade, rapidez e precisão, esta ciência tem revolucionado processos em indústrias alimentícia, farmacêutica, ambiental, clínica, dentre outras. Em contraponto à análise visual, onde variações na coloração de um alvo são analisadas a partir do olho nu, a utilização de métodos digitais aprimora a detecção de nuances por vezes imperceptíveis mesmo aos olhos bem treinados.¹

Continuamente há uma tendência geral no desenvolvimento de abordagens práticas, baixo custo e amigável aos usuários não experientes, no que tange a química analítica. A otimização de processos, diminuição do uso de recursos, descentralização e simplificação de respostas são necessidades de um mundo veloz e intimamente conectado. O uso de dispositivos ópticos modernos se tornam de interesse fundamental à ciência atual. Imagens capturadas por *scanners*, câmeras digitais, *webcams* ou *smartphones*, combinados a *softwares* de tratamento de imagens e pacotes para o processamento estatístico, tornam possíveis a implementação de análises colorimétricas digitais acessíveis, automatizadas e de fácil compartilhamento.²

Os *smartphones* se destacam por sua multifuncionalidade, portabilidade e custo reduzido. Comparado a demais tecnologias, atualmente há uma disponibilidade grande de dispositivos com câmeras de alta qualidade, com sensibilidade aprimorada e redução de ruídos. Isto se deve a grandes investimentos e desenvolvimento de novas tecnologias, associado a adesão maciça do uso por parte da população global. Portanto, análises colorimétricas digitais se mostram promissoras, principalmente associada a tecnologias modernas e de fácil manejo.^{2,3}

Além da portabilidade, custo acessível e alta qualidade de câmera, os *smartphones* são fáceis de usar, possuem maior capacidade de armazenamento e podem ser integrados com outras funcionalidades, como conexão à internet, serviço de localização e fácil compartilhamento de dados. Isto transforma-o em um poderoso instrumento para análises químicas qualitativas e quantitativas ideais para medições colorimétricas em campo ou em ambientes externos.^{3,4}

Câmeras de *smartphones* usam sensores CMOS (*Complementary Metal Oxide Semicondutor*, do inglês Óxido de Metal Semicondutor Complementar), responsáveis por converter luz em carga elétrica e detectar cada faixa de cor individualmente a partir da associação de filtros adequados. Apesar deste sensor apresentar diferentes sensibilidades para diferentes regiões do espectro

visível, esta proporcionalidade não afeta o desempenho geral das câmeras frente às análises colorimétricas. Os sensores CMOS gastam menos energia elétrica, têm valor reduzido e são mais rápidos do que os CCDs (*Charged Coupled Devices*, do inglês Dispositivos de Carga Acoplada) usuais na espectrofotometria UV-vis.³

Além disso, o uso da colorimetria digital foi melhorado por meio do desenvolvimento de aplicações gratuitas e *software* de fácil utilização para processamento de dados. Esses aplicativos permitem que os usuários capturem imagens e, em seguida, realizem análises colorimétricas diretamente no dispositivo. Existe a possibilidade de associar a obtenção dos sinais analíticos a tratamentos de dados. Somado a novas tecnologias, como automatização de detecção de formas e padrões em imagens digitais, pode-se obter dados analíticos de experimentos com maior complexidade em instantes.⁵

Alguns exemplos de *softwares* e aplicativos encontrados no mercado são: PhotoMetrix®, Gimp®, ImageJ® e ColorGrab. Todos eles permitem a obtenção do valor de cor, em diferentes sistemas de cores, para uma região específica da imagem. As aplicações PhotoMetrix e ColorGrab são específicas para *smartphones* e podem realizar a média de cores a partir da câmera do dispositivo.^{5,6}

Além disso, muitos desses aplicativos oferecem recursos adicionais, como a capacidade de salvar e compartilhar os resultados das análises, criar relatórios personalizados e até mesmo integrar-se com outros dispositivos e *softwares*. Com a crescente demanda por soluções de colorimetria digital acessíveis e portáteis, espera-se que o mercado de aplicativos nessa área continue a crescer nos próximos anos.⁵⁻⁷

1.2. Visão computacional

Além dos avanços na colorimetria digital, a visão computacional (CV, sigla do inglês para *computer vision*) tem se destacado como uma área interdisciplinar que combina métodos de processamento de imagem, inteligência artificial e aprendizado de máquina para análise e interpretação de dados visuais. O início desta área remonta à década de 1960, com o desenvolvimento dos primeiros algoritmos para detecção e reconhecimento de padrões em imagens. Nos últimos anos, o OpenCV (*Open Source Computer Vision Library*, do inglês, Biblioteca de Visão Computacional de Código Aberto) emergiu como uma das principais bibliotecas de CV, oferecendo uma ampla gama de funções e algoritmos para processamento de imagem, detecção de objetos, rastreamento de movimento e muito mais.⁷

O processamento de dados por artifícios matemáticos se dá pelo princípio da imagem digital ser dividida em uma matriz que contém em si os valores de cor. Por exemplo, para uma imagem em escala de cinza, cada

espaço desta matriz, também denominado *pixel*, contém um valor de cor. Já para uma imagem colorida, tem-se três valores para cada subunidade da imagem (valor de RGB por *pixel*). Cálculos preestabelecidos modificam a configuração e disposição dos *pixels*, podendo trazer informações valiosas sobre a imagem e seu contexto.⁸

Assim como o tratamento de imagens, é possível processar vídeos inteiros, dado que são formados por partes unitárias de imagens. Isto torna o uso de CV vasto, mediante a existência de aplicações desta tecnologia. É possível aplicar CV à inspeção de qualidade de arroz, avaliação da qualidade de cervejas, classificação de fenótipo em plantas, diagnóstico de COVID-19 a partir de imagens clínicas, dentre outras. Pode-se afirmar que as aplicações para o uso da visão computacional são vastas.⁹⁻¹²

Dentro do OpenCV, algumas funções se destacam por sua utilidade em uma variedade de aplicações. Por exemplo, o algoritmo *Canny* é amplamente utilizado para detecção de bordas em imagens, enquanto a transformada de *Hough* para círculos é eficaz na detecção e localização de círculos em uma imagem. Essas funções são essenciais para muitas tarefas de CV, desde a segmentação de objetos até a análise de formas e padrões.¹³

Além disso, a CV tem se mostrado extremamente útil quando combinada com técnicas de aprendizado de máquina. A capacidade de treinar modelos para reconhecer padrões e realizar tarefas específicas com base em exemplos de dados tem impulsionado avanços significativos em áreas como reconhecimento de imagem, classificação de objetos e até mesmo diagnósticos médicos assistidos por computador. Essa combinação de CV e *machine learning* está abrindo novas possibilidades em uma variedade de campos, desde a automação industrial até a medicina de precisão.^{13, 14}

1.3. Ferramentas atuais

Ao prospectar modelos atuais na produção de aplicações que auxiliem a captura de imagens, tratamento dos dados, produção e compartilhamento de relatórios, é possível se deparar com uma quantidade grande de alternativas. Atualmente, a maior parte dos detentores de *smartphones* se dividem entre usuários de iOS®, sistema operacional (OS) da Apple®, e Android®, OS do Google®. S. Gard cita que em 2020, 99% do mercado mundial contava com a soma dos OS destas grandes empresas. Destes, aproximadamente 73% dos aparelhos eram Android® e 26% iOS®.¹⁵

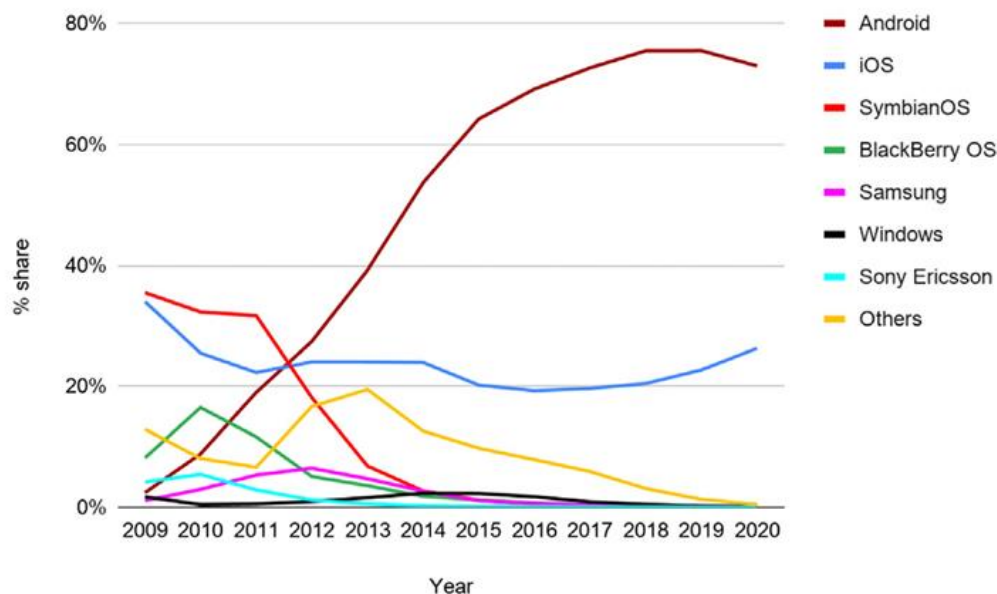


Figura 40. Divisão do mercado mundial de diferentes OS entre 2009 e 2020. Reproduzido da referência ¹⁵, com permissão.

Ambos OSs são distintos em aspecto visual, funcionamento e arquitetura. Portanto, versões da mesma aplicação que atendam mutuamente dispositivos de usuários distintos, produzidos nativamente e monitorados em relação a bugs e atualizações, se tornam desafiadores. Grandes empresas de tecnologia, como Google e Meta (antiga Facebook), investem consideráveis recursos financeiros anualmente para manter o suporte de seus aplicativos em escala global. Essas empresas, conhecidas como *big techs*, desenvolveram *frameworks cross-platform* para dispositivos móveis, abrangendo ambos OSs. Tais ferramentas, exemplificadas pelo React Native e Flutter, respectivamente criados pela Meta e Google, têm a finalidade de simplificar o processo de desenvolvimento de aplicativos móveis multiplataforma, permitindo que os programadores escrevam código uma única vez. O que resulta em maior eficiência e redução de custos de desenvolvimento.^{16, 17}

Uma alternativa interessante para desenvolvimento nativo são os usos de serviços *web*. Neste caso, os dispositivos, por meio de um navegador, acessariam um endereço na rede mundial de computadores e teriam em suas mãos uma aplicação idêntica a projetada especificamente para a instalação no seu aparelho. Como vantagem, pode-se considerar uma versatilidade maior ao possibilitar uma comunicação com servidor remoto. Este pode hospedar código ou tecnologia a interesse e necessidade do desenvolvedor. Diferente do uso de um *framework*, que apesar de fomentar agilidade na produção de aplicações multiplataformas, tem em sua constituição certa limitação.¹⁸

A exemplo da utilização da biblioteca OpenCV, esta é construída em algumas linguagens de programação. Dentre elas: C++, Python e Java. Para integrá-la a um dos *frameworks*, é necessário grandes habilidades e

conhecimentos, pois estas linguagens não atendem a nenhuma. Entretanto, um *web site* pode conter linguagens distintas e se comunicar internamente com sucesso.

O conceito de RESTful API (*REST Application Programming Interface*, do inglês Interface de Programação de Aplicações do tipo REST) se torna relevante como um lado estratégico na produção de um sistema versátil. Por definição, uma REST API é uma interface protocolada por requisições HTTP que intermedia os usuários às regras estabelecidas pela aplicação. O protocolo determina o “idioma” em que a API receberá estas informações, assim, não importa em qual linguagem de programação as aplicações estão escritas. Somente importa a organização dos dados a serem compartilhados com a API e sua estrutura interna.¹⁹⁻²¹

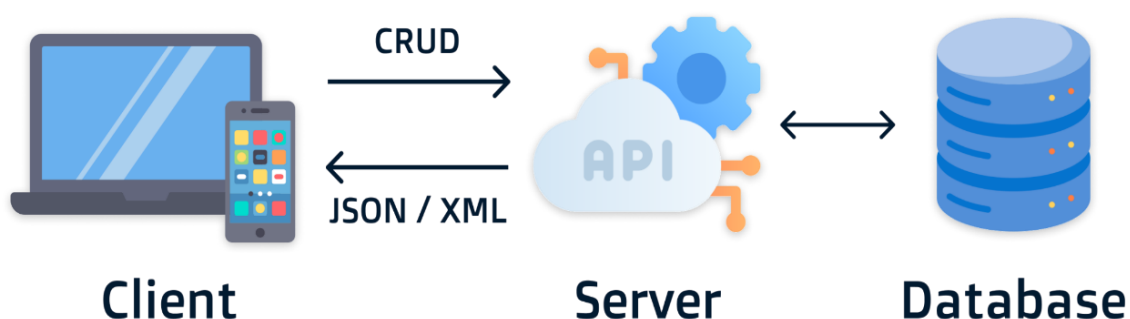


Figura 41. Ilustração representativa do fluxo de dados em uma aplicação web RESTful.

No âmbito do projeto de uma RESTful API destinada a suportar funcionalidades de CV e colorimetria digital em aplicativos *web*, torna-se imperativo considerar a estrutura dessa API. Tal consideração engloba a definição precisa de *endpoints* (endereços de rotas com objetivos definidos) e verbos do CRUD (*Create*, *Read*, *Update* e *Delete*, do inglês, Criar, Ler, Atualizar e Deletar) que representem diversas operações passíveis de serem realizadas pelo aplicativo, tais como o envio de imagens para análise de cor, a recuperação de resultados de análises anteriores e a atualização de configurações de calibração. Além disso, é essencial conceber uma interface de usuário intuitiva que possibilite aos usuários interagirem de forma fácil com as funcionalidades de CV e colorimetria digital, garantindo uma experiência satisfatória ao usuário.¹⁹⁻²¹

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Produzir uma aplicação *web* e *mobile*, chamada WS, para a captura e leitura de imagens de sensores colorimétricos do tipo *spot test*, e compará-lo à detecção usual com um *software* já estabelecido de imagens.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver algoritmo utilizando conceitos de visão computacional para extrair automaticamente valores de cor de regiões circulares em imagens contendo sensores do tipo *spot test*;
- Otimizar parâmetros de leitura com base em testes de acurácia e performance;
- Criar REST API que atue como servidor de recebimento, leitura, processamento e armazenamento de dados;
- Produzir interface simples e de fácil uso que permita captura de imagens, conexão com API, leitura e averiguação dos dados;
- Comparar resultados com os obtidos a partir do Gimp®.

3. MÉTODOS

3.1. Ambiente de desenvolvimento

Utilizando o *software* VS Code (Visual Studio Code), um programa voltado para escrita e depuração de código, o projeto foi dividido em três principais etapas: algoritmo de visão computacional, API vinculada a um banco de dados e plataforma *web* voltada ao usuário final.

Inicialmente, um ambiente de escrita e teste de código foi implementado por meio da extensão Jupyter Notebook para VS Code utilizando Python v3.10. As imagens previamente capturadas nos experimentos químicos foram utilizadas como instrumento de testes para melhoria do algoritmo. Utilizou-se OpenCV v4.6 como biblioteca de visão computacional e Pandas v2.1 para conversão de matrizes em tabelas e demais processamentos de dados. Para a etapa da criação da API, foi utilizado Flask v2.3 vinculado a um banco de dados MongoDB. E a plataforma de integração com o usuário final foi desenvolvida em React (e React Native).

3.2. Testes de detecção de *spots*

Para a detecção dos *spots*, o método de busca em grade foi utilizado como ferramenta de otimização dos parâmetros numéricos necessários. Estabeleceu-se uma faixa de cinco valores crescentes por parâmetro e cada um foi testado em combinação com os demais. Foram elencadas algumas imagens de sensores do banco de experimentos realizados previamente (capítulo I), assim, os parâmetros foram padronizados com base no tamanho dos sensores e cor aparente dos *spots*.

Após estabelecer-se valores ótimos, todo o banco de imagens dos sensores foi processado como procedimento final. Somente conjuntos de parâmetros que obtiveram mais de 80% de sucesso na detecção da quantidade de *spots* foram aceitos.

3.3. Tratamento dos valores de cor por *spot*

Para cada seção circular detectada, referente a cada *spot* do sensor, foram estabelecidas abordagens de tratamento de dados a fim de minimizar possíveis ruídos e *outliers*. Estes valores seriam provenientes de imperfeições na fabricação dos *spots* (manchas, por vezes imperceptíveis), reflexos provenientes de iluminação dos LEDs da câmara escura, variações anômalas no interior da zona reacional, ou mesmo discrepâncias na detecção automatizada dos círculos.

Utilizaram-se dois métodos baseando-se no tratamento das amostras com base nos seus histogramas. Os métodos foram nomeados RGBHH (RGB

Half Height, do inglês, Meia Altura) e HSVTHR (*HSV Threshold*). Estes foram comparados com os valores de média calculados tradicionalmente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Lógica por traz do fluxo de dados

A escolha das tecnologias utilizadas foi elencada desta forma: simples implementação e escrita, baseando-se nas linguagens já conhecidas pelo autor, vasta documentação e discussão em fóruns de tecnologia, API integrada a bibliotecas de processamento de imagem e resultados, e banco de dados não-relacional no intuito de não depender de lógicas complexas e fácil modificação, caso necessário.

O primeiro conceito da aplicação se baseava no processamento de imagens no próprio dispositivo. Ou seja, após a instalação, todas as funcionalidades estariam disponíveis sem qualquer conexão externa. Ao capturar alguma imagem de sensores colorimétricos, ou mesmo, utilizar fotografias armazenadas no *smartphone*, seus dados seriam lidos, processados e mantidos na memória interna do dispositivo eletrônico.

Em geral, este método conta com vantagens no âmbito de eficiência e portabilidade. Em outras palavras, manter o gerenciamento de informação interno à aplicação minimiza o tempo de processamento, independe de intervalos de transferências de arquivos e possibilita a utilização *offline* dos recursos em locais sem conexão.

Porém, sabe-se que atualmente existem inúmeros modelos de *smartphones* no mercado. São versões diferentes de sistemas operacionais, atualizações constantes e alta rotatividade de aparelhos. Isto torna o processo de produção de um aplicativo abrangente, difícil e custoso. Apesar de hoje existir uma adesão alta do mercado a *frameworks* que dão suporte ao desenvolvimento de aplicação mútua para iOS e Android, eles contam com linguagem distintas e próprias. Além de dificuldade de vínculo com algumas bibliotecas, como o OpenCV.

Foi proposto, portanto, o desenvolvimento de uma aplicação hospedada na rede mundial de computadores. Qualquer dispositivo com conexão pode ter acesso por meio de um navegador. Em relação ao usuário, não há a necessidade de *downloads*, atualizações de aplicativos, ou mesmo o armazenamento de arquivos que ocupem espaço interno do dispositivo pessoal. Ademais, suas capturas e imagens estariam disponíveis de qualquer lugar ou equipamento vinculado a *web*. Já em relação ao desenvolvedor de software, os benefícios se dão na centralização das funcionalidades em um servidor, facilidade na adesão ou mudança de tecnologias e possibilidade até de desenvolvimento de aplicações que podem se conectar ao servidor central.

Em contraponto a um sistema *offline*, a necessidade de conexão à internet incorpora uma dose de dificuldade a usuários de locais isolados ou sem acesso. Entende-se que um programa de colorimetria digital para análise de água, tem a função de atender regiões rurais e afastadas. Entretanto, sabe-

se que em caso da necessidade de uso de aplicativo interno ao dispositivo, o mesmo deve ser baixado por meio de conexão à internet. Além do mais, as análises feitas por esta aplicação podem ser realizadas a partir de fotografias previamente capturadas, não necessitando de conexão contínua para análises.

A aplicação *web* foi nomeada *WS (Water Sensor App)*, e sua divisão foi definida em duas partes principais: *frontend*, ou *client side*, onde é fornecido ao usuário uma interface interativa com todas as ferramentas disponíveis em sua versão atual; e *backend*, também chamada de *server side*, utilizado como camada de processamento, gerenciamento e armazenamento de informação não acessada diretamente pelos clientes. De fato, o servidor não tem a função de armazenar dados dos usuários, esta tarefa é encarregada ao banco de dados. Apesar de que, em tese, o servidor é o único meio de diálogo entre o armazenamento da aplicação e o mundo externo (ao menos nesta aplicação).



Figura 42. QR Code com redirecionamento para a aplicação web WS.

Após a captura da imagem, algumas informações sobre a natureza do sensor do tipo *spot* e seus parâmetros são solicitadas. Somado a algumas outras variáveis configuracionais, o conjunto de informação é enviado para o servidor por meio de uma requisição do tipo HTTP. No momento em que o servidor recebe estas informações, os dados são processados e uma resposta é gerada em retorno à chamada.

Em geral, toda interação do usuário vai depender de uma solicitação que comunica à API do servidor o que deve ser realizado. A Tabela 11 apresenta algumas chamadas à API integrada ao WS e suas características.

Tabela 11. Lista de chamadas à API da aplicação WS e suas informações.

Categoria	Verbo	Privado	Endpoint	Ação
Autorização	POST		/user	Criar usuário
Autorização	POST		/session	Criar sessão
Análise	POST	✓	/data	Submeter imagem, salvar e retornar valores de cor
Análise	POST	✓	/data/detect	Submeter imagem e retornar valores

				de posição dos <i>spots</i>
Análise	GET	✓	/result/<id>	Retornar análise por seu id
Análise	GET	✓	/result/<user_id>	Retornar todas as análises por usuário
Análise	PUT	✓	/result/<id>	Atualizar análise
Análise	DELETE	✓	/result/<id>	Deletar análise

As requisições fornecem informações protocoladas à API, que em sua função, retorna uma resposta e um *status* da operação. Para que informações sensíveis não sejam transmitidas para qualquer usuário com acesso ao *server side*, utiliza-se o método de rotas privadas no que tange o compartilhamento destas informações. Portanto, para utilizar ativamente a aplicação e suas ferramentas, deve-se existir uma autenticação inicial, neste caso, um cadastro.

4.2. Experiência do usuário

A aplicação pode ser dividida em três importantes partes funcionais: o cadastro (etapa de *login* ou cadastramento de um novo usuário), a análise (preenchimento de informações, configurações e captura de imagens a serem analisadas) e os resultados (disposição da imagem tratada, assim como tabelas, gráficos e tratamentos estatísticos fornecido pela API).

Após o usuário ter seu *login* autenticado, este é redirecionado para a tela principal do *App*. As etapas de análise e visualização de resultados são mediadas por esta rota intermediária chamada de *Data Screen*. Por meio dela, pode-se encontrar todas as análises realizadas previamente, assim como ter acesso a novas análises por meio de um botão com sinal de adição (Figura 43).

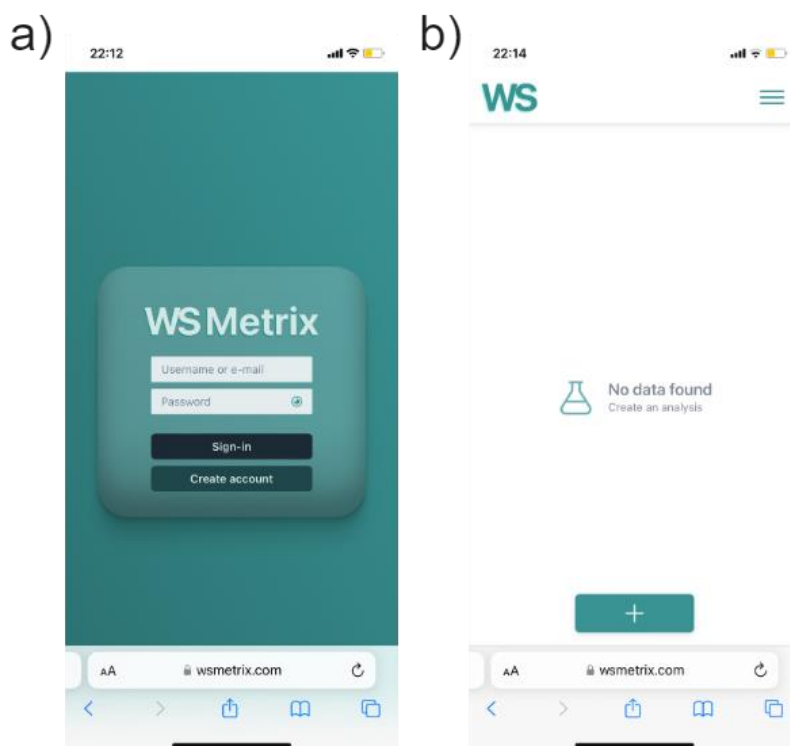


Figura 43. Screenshots da aplicação WS das telas de: a) *Authentication Screen* (login e cadastramento) e b) *Data Screen* (tela principal responsável por mostrar todas as análises realizadas pelo usuário e acesso a novas capturas de imagens) exemplificada sem dados.

Ao adentrar a etapa de criação, o usuário é redirecionado à *Analysis Screen*. São solicitadas informações como nome, número de amostras e replicatas, além do nome do analito ou unidade a ser detectado (Figura 44a). O formulário conta ainda com duas subseções compactadas: valores das amostras e configurações avançadas (Figura 44b e 44c).

Os campos com valores das amostras deverão ser preenchidos para cada uma das colunas ou linhas da grade de spots a serem processados digitalmente. Em relação às configurações, esta etapa está direcionada a modificação do processo de retirada de valores de cada *spot* (como quais canais de cor aparecerão nos resultados, modo de extração de cor, parâmetros para a detecção de círculos e raio máximo do *spot* desejado).

Após inserção das informações necessárias, é possível adicionar uma imagem ao formulário por meio de um campo com sinal de adição. O usuário é redirecionado para a funcionalidade de câmera, Figura 44d, onde captura-se a imagem ou utiliza-se a biblioteca de fotos para o feito. Ainda, é possível utilizar funcionalidades como a utilização de *flash* e modificação da câmera.

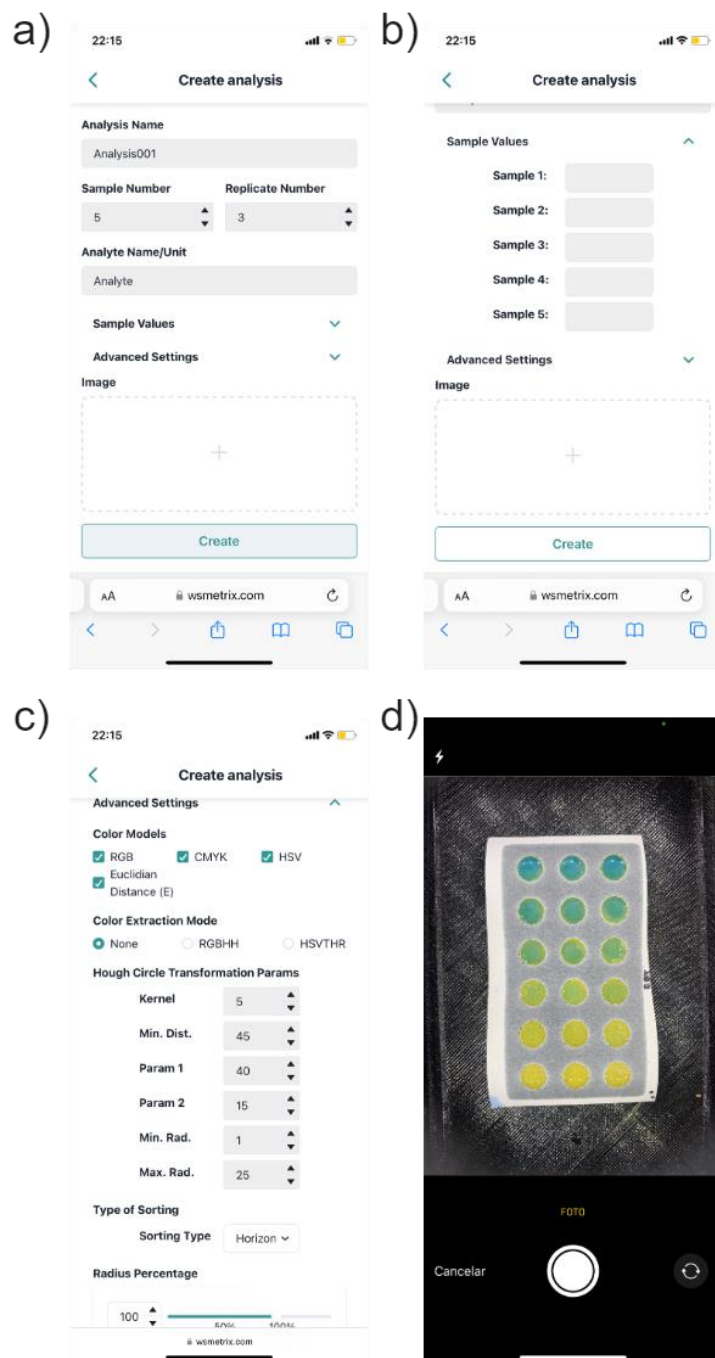


Figura 44. Screenshots da aplicação WS das telas de Analysis: a) mostrando o formulário inicial contendo nome, número de amostras, replicatas e nome do analito/unidade; b) especificando a parte do formulário voltada para o preenchimento dos valores de unidade referentes a cada amostra; c) expondo o formulário responsável pelas configurações avançadas; e d) referente a etapa de captura de imagem utilizando a funcionalidade da tela em câmera.

Por fim, o formulário é submetido, recebe-se os resultados por resposta do *backend* e estes são transmitidos ao usuário na tela de *Result Screen*. Por meio da tela de *Data Screen*, visualizam-se todas as análises prévias (Figura 45a). Ademais, os resultados contam com abas para cada padrão de cor e

divisões entre tabelas e gráficos (Figura 45b). Todas as informações podem ser exportadas, compartilhadas ou salvas no próprio dispositivo.

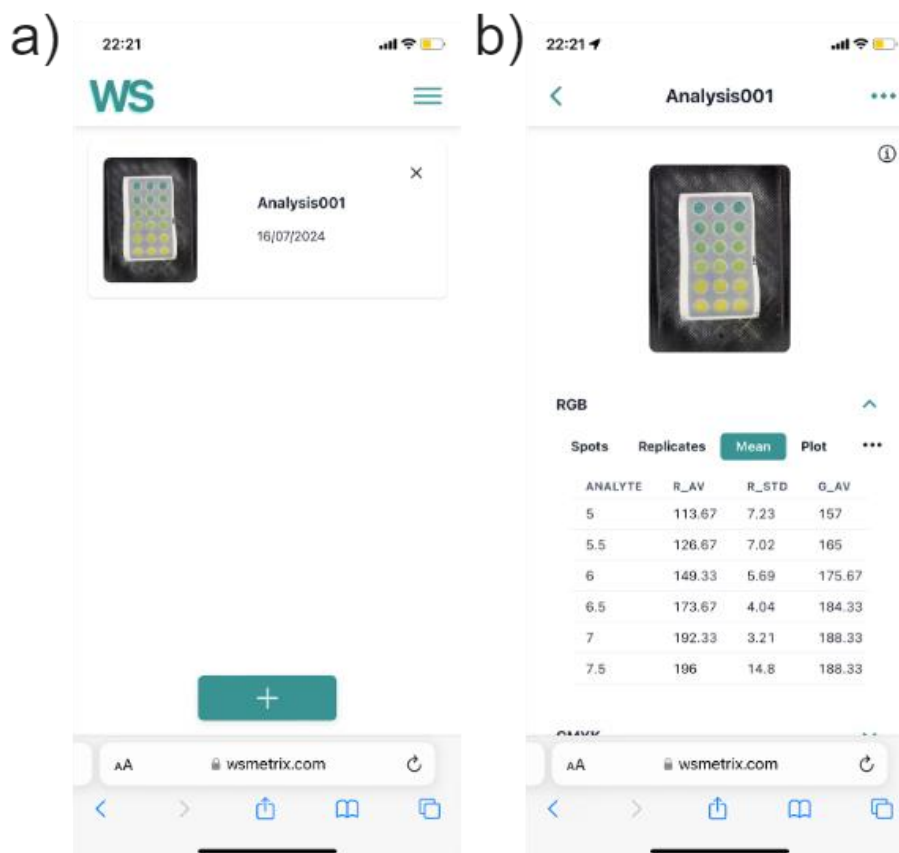


Figura 45. Screenshots da aplicação WS das telas: a) *Data Screen* contendo uma análise realizada; e b) *Result Screen* com o resultado da captura.

4.3. Melhoria do algoritmo

Quando a API recebe os dados referentes à análise, existe uma primeira etapa de validação das informações: se todas as variáveis estão listadas e se seus tipos correspondem às expectativas. A partir deste momento, inicia-se a etapa de detecção dos *spots*, retirada de valores de cor e processamento dos dados obtidos. A Figura 46 conta com um fluxograma em inglês dos processos computacionais que ocorrem desde a imagem original até os resultados estatísticos finais. Da imagem original até a compilação das informações úteis da detecção, três estágios foram organizados em subdivisões nomeadas estágio de visão computacional, estágio dos valores de cor e estágio de manipulação de dados.

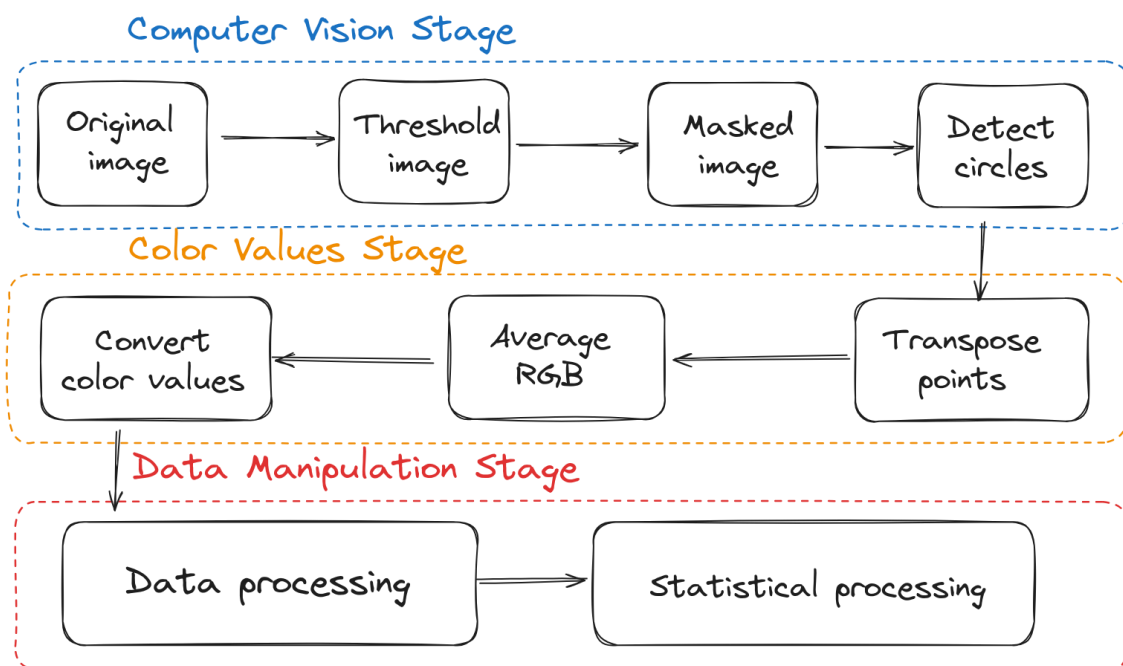


Figura 46. Esquema em fluxograma que lista ordenadamente as etapas principais do processamento da imagem até a resposta de cor. Os estágios foram divididos em três: visão computacional, valores de cor e manipulação dos dados. Em ordem, tem-se: imagem original, limitação da imagem, máscara na imagem, detecção de círculos, transposição de pontos, média de valores RGB, conversão dos valores de cor, processamento de dados e processamento estatístico.

A primeira etapa tem uso da biblioteca OpenCV com finalidade de detectar todos os círculos correspondentes aos *spots*. Neste momento, o retorno esperado são informações atribuídas aos círculos internos dos PADs, sendo estas a sua coordenada de posição do centro e raio estimado em *pixels*. A imagem original passa por procedimentos para minimização de fonte de erro, para que por fim, a função de CHT (*Hough Circle Transform*, do inglês, Transformada de Círculo Hough) seja implementada.

O PAD ocupa uma porção da imagem original, portanto, é aplicado um *threshold* (limite que define se o *pixel* toma cor branca ou preta), na imagem redimensionada, para que haja uma distinção entre o sensor e o fundo. Esta nova imagem obtida passa por um processo de detecção de bordas, identificação de polígonos, e por fim, é feita uma máscara na imagem original com os contornos do retângulo de maior área encontrado. Como abordado previamente, este tratamento visual reduz a detecção incerta de círculos por toda a imagem e confina o uso do algoritmo CHT ao PAD unicamente. Além disso, é importante salientar que o redimensionamento da imagem original atua como processo de economia de processamento e tempo de análise. Observa-se na Figura 47 algumas etapas no processamento da captura do sensor em papel.

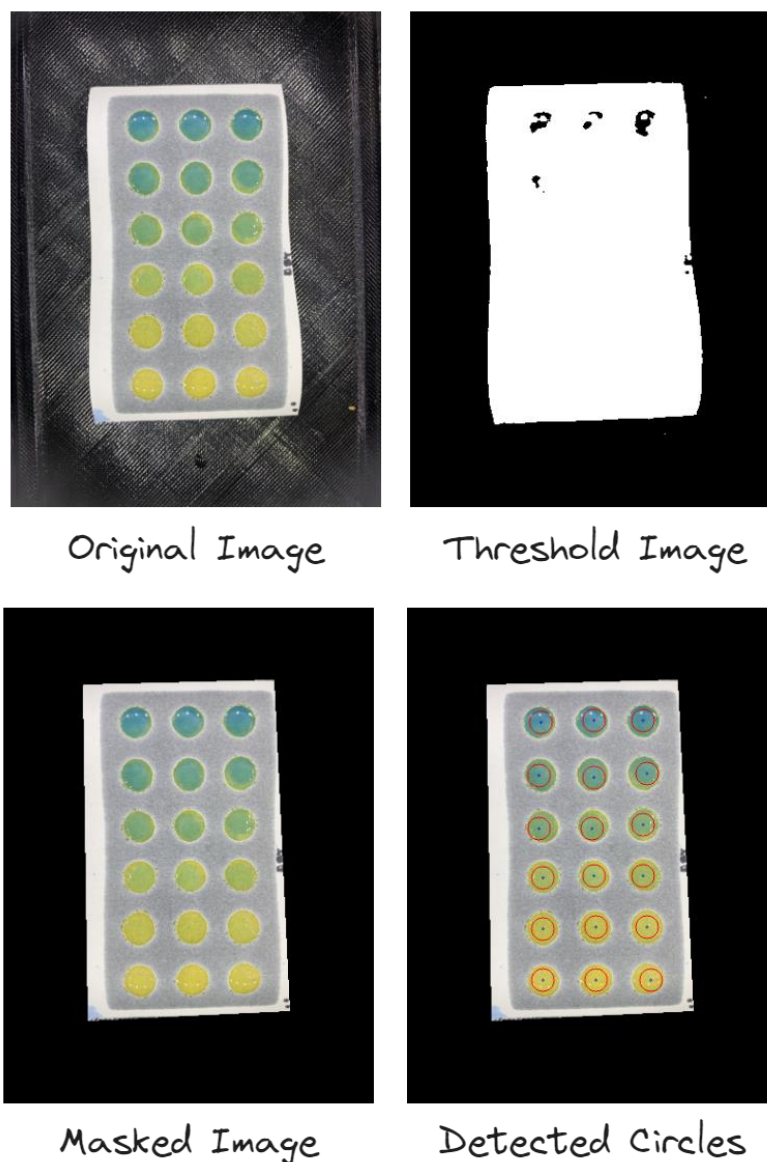


Figura 47. Imagens ilustrativas do estágio de visão computacional com etapas de *thresholding*, máscara e círculos detectados.

A Transformada CHT recebe seis parâmetros numéricos, denominados pela documentação do OpenCV como: DP, Distância Mínima, Parâmetro 1, Parâmetro 2, Raio Mínimo e Raio Máximo. DP está relacionado à razão inversa entre a resolução do acumulador e da imagem, porém é sempre ajustado para o valor de 1, nesta detecção. A distância mínima está ligada a menor distância entre os centros dos círculos, enquanto o raio máximo e mínimo está relacionado a limitação radial em que as circunferências detectadas poderão ocupar. Já os parâmetros 1 e 2, por fim, são limites para o detector de borda Canny e do acumulador para os centros dos círculos no estágio de detecção, respectivamente. No caso do parâmetro 1, este tem valor mais alto entre os dois (geralmente o dobro). Quanto menor for o parâmetro 2, mais círculos falsos poderão ser detectados.^{22, 23}

Para aumentar a eficiência da detecção dos círculos, é recomendado utilizar o método *Blur* (do inglês, borrar) precedendo o processo principal. Isto pois, o efeito de borrão suaviza anomalias, ruídos e imperfeições que possam corroborar para inexatidões.²⁴ Portanto, são passados para a API valores da matriz responsável pelo método *Blur*, assim como os cinco parâmetros variáveis do método CHT.

Estes passaram por processo de otimização, com a finalidade de obter o melhor retorno das informações de todas as regiões circulares de interesse. Alguns conjuntos destas variáveis retornavam posições de círculo irreais, tamanhos de *spots* divergentes, até mesmo não detectavam todas as regiões de interesse. Desta forma, selecionou-se cinco valores crescentes para cada parâmetro e realizou-se um teste de otimização em grade. As respostas válidas obtidas para cada conjunto de valor possível foram selecionadas e um novo teste foi efetuado com todas as imagens pré-armazenadas das análises experimentais produzidas anteriormente. O conjunto final selecionado de parâmetros obteve melhor performance na detecção dos *spots*.

Por continuidade, obtendo o conjunto de informações dos círculos encontrados, adentra-se a etapa de captura de valores de cor. A posição do centro e raio dos círculos são transpostos da imagem redimensionada para a com dimensões originais. Todas as capturas de valores médios de cor, aqui feitas, foram adquiridas da imagem original e a totalidade de seus *pixels*, assim como realizada no *software* Gimp®, para futura comparação.

Calculou-se a média dos valores RGB a partir dos *pixels* pertencentes à máscara circular delimitada pelos atributos da região detectada. Um dos aspectos avaliados neste estudo foi a eliminação de *pixels* anômalos. Correspondendo a zonas de reflexos, sombras ou imperfeições nos *spots*, entendeu-se como importante o tratamento destes valores para mitigar discrepância da média. A Figura 48 mostra um mesmo *spot* em diferentes versões de redução de *outliers*. É possível notar reflexos na imagem original, e sua supressão em diferentes modelos de tratamento.

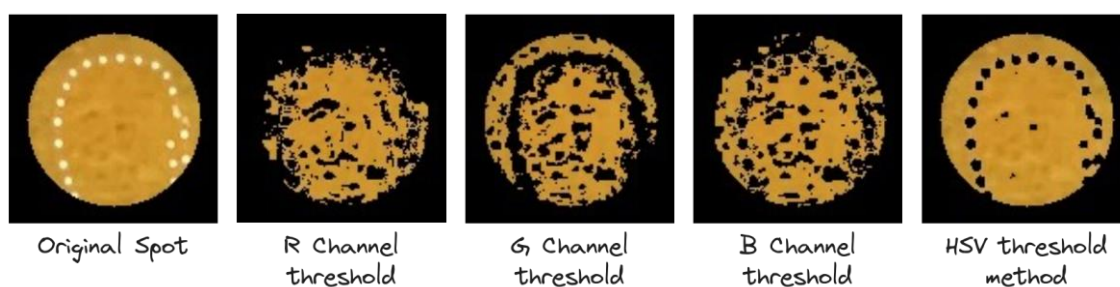


Figura 48. Círculo em máscaras considerando tratamentos de *outliers* diferentes: *spot* original (WS), *threshold* dos canais RGB (RGBHH) e *threshold* do padrão HSV (HSVTHR). *Spot* referente ao teste de robustez da reação de β -gal (10^{-1} U mL⁻¹) e CPRG (2,0 mmol L⁻¹) em 20 min.

Dois métodos diferentes foram estudados, como alternativa ao cálculo da média sem tratamento dos *pixels*. Ambos contam com a utilização de histograma da imagem do *spot* em máscara circular. O procedimento RGBHH realiza um novo cálculo da média dos valores em determinada região do histograma para cada um dos canais RGB. Considera-se as extremidades mínima e máxima da curva a meia altura do máximo da cor. A partir deste modelo, para cada canal, obtém-se um arranjo de *pixels* únicos, como pode ser visto na Figura 49a, referentes aos canais R, G e B.

O método HSVTHR, de módulo análogo, limita o cálculo da nova média com base no histograma com padrão de cor HSV. Aplica-se um *threshold* com base em cada canal HSV: H limitado a 80 valores de cor com o máximo ao centro, S considerando limites mínimo e máximo com 10% da altura ao ponto máximo, e S com valores superiores a 20. Após aplicação da máscara, a média dos valores RGB é calculada assim como a não utilização do método. É possível compreender com maior clareza o processo de *thresholding* de ambos os métodos a partir da Figura 49a e 48b.

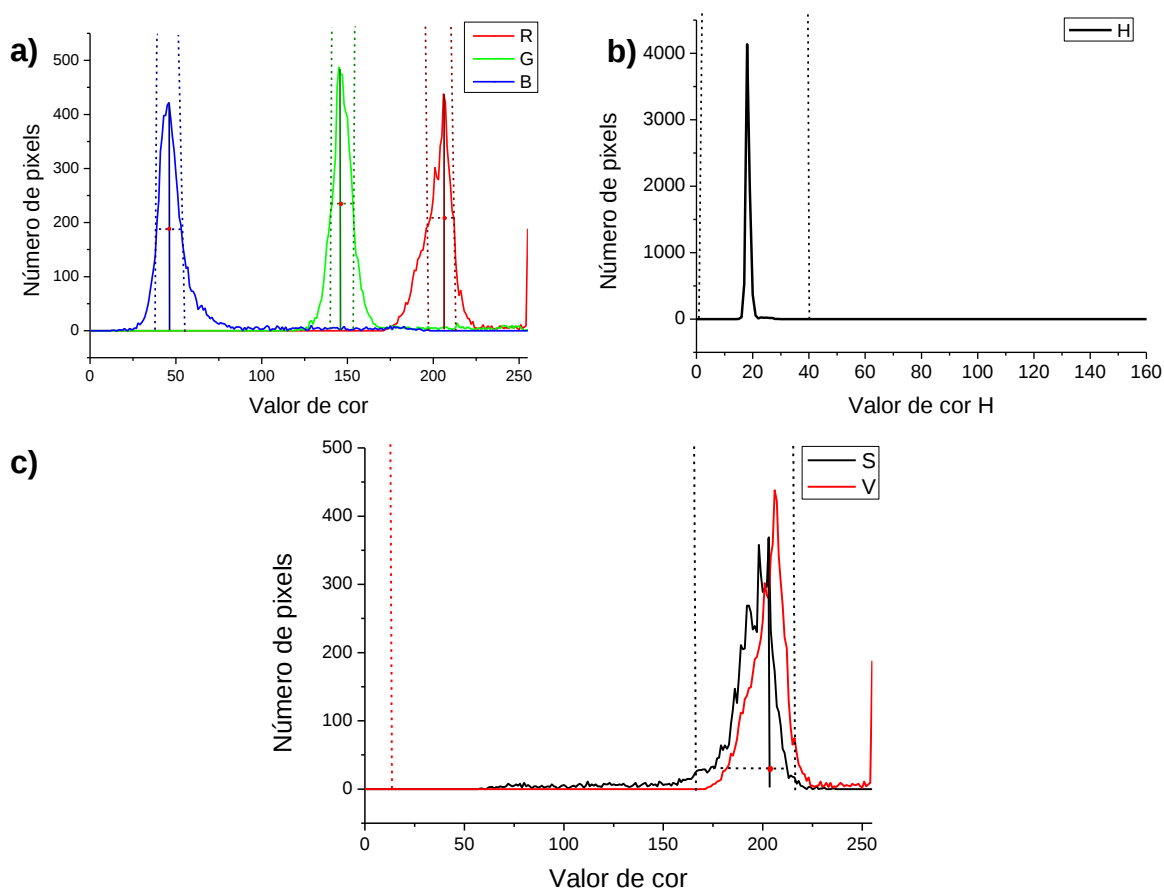


Figura 49. Histogramas correspondentes ao *spot* da figura anterior. Linhas correspondem ao valor máximo e limitações máximas e mínimas de acordo com o tratamento empregado. a) correspondente ao padrão RGB e ao tratamento RGBHH. b) correspondente ao canal H e tratamento HSVTHR; e c) correspondente aos canais S e V, e tratamento HSVTHR.

O padrão de cor HSV, em resumo, modifica a percepção cromática em matiz, saturação e valor. Sabe-se que as flutuações de cor na região do *spot* são facilmente detectadas visualmente pelo diferente aspecto da qualidade da cor (cores discrepantes da maioria das cores), cores com tonalidade próximo ao branco ou cores muito escuras, todas distintas da maioria dos outros *pixels* na região circular. Comparando com a escala RGB, uma região análoga em relação a valores de vermelho, não necessariamente é análoga em relação ao canal azul, e assim por diante. No entanto, o uso do padrão HSV determina eliminação de *outliers* em todo conjunto dos canais RGB, tornando a limitação de valores mais pontual e exata, como é possível observar na Figura 48 (o método HSV elimina somente *pixels* voltados aos reflexos).

Por fim, após todas as médias dos valores de cor RGB serem retirados e convertidos para os padrões de cores relevantes para a análise, os dados são organizados em relação às suas replicatas e ordenados assim como se deseja. Para a confecção de curvas, gráficos e *fittings*, obtêm-se os nomes das variáveis estudadas, assim como seus valores individuais. Trata-se estes dados estatisticamente, organiza-se de forma a simplificar o processo de consulta, armazenamento e compartilhamento dos dados. Esta última etapa finaliza por completo o processo, que retorna ao usuário a resposta final do ensaio realizado.

4.4. Comparação de metodologias de extração de valores de cor

Para validação das diferentes abordagens na extração de valores realizadas pela aplicação WS, comparou-se os resultados previamente obtidos no Capítulo I. A realização da retirada de cor pelo método Gimp® foi nomeada com seu próprio nome, o uso desta aplicação sem qualquer adição de tratamento por histograma foi nomeado WS e ambos os usos do *web app* com exclusão de *outliers* obtiveram nomes de suas metodologias: RGBHH ou HSVTHR.

4.4.1. Validação por regressão multivariada

A partir da resposta de cor dR referente ao ensaio colorimétrico do indicador ABT com variação do pH entre 2,0 e 12,0, é possível comparar correlação linear entre as variáveis referentes a extração com Gimp® e WS. Na Figura 50, pode-se observar o gráfico destas duas variáveis e sua respectiva curva da regressão linear.

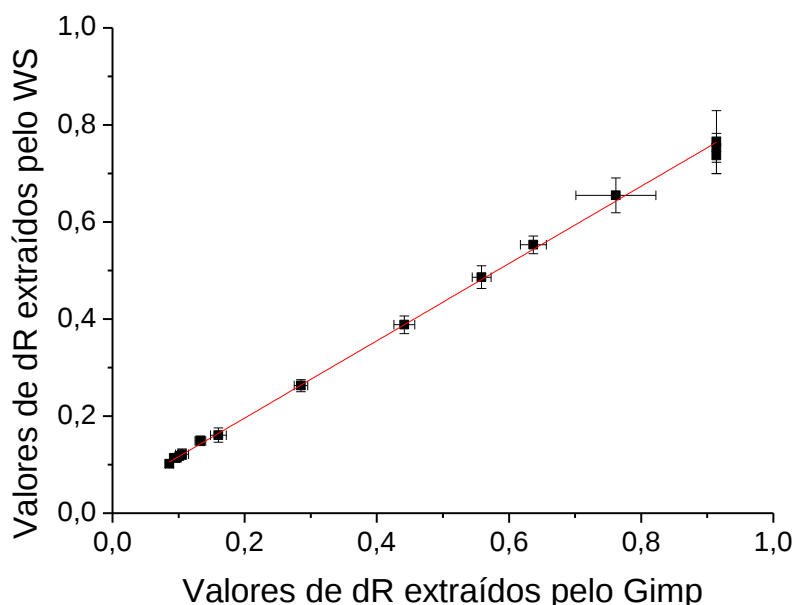


Figura 50. Regressão linear multivariada correspondendo às respostas de dR obtidas a partir da extração dos valores de cor pelo software Gimp® e aplicação WS (n=3).

Para cada ponto, a resposta da variação da cor vermelha é representada em ambos os eixos do gráfico. Isto é comprovado pelo coeficiente de determinação próximo ao valor de 1, observado na Tabela 12. O teste t de Student confirma a significância dos resultados (95% de confiança) e concordância dos valores obtidos por ambos os métodos, validando a resposta extraída do WS como equivalente a obtida utilizando o Gimp®. A automatização computacional, se mostra aqui, perfeitamente capaz de retornar valores de cor consistentes com o resultado padrão obtido pela extração manual.

Tabela 12. Informações da regressão linear multivariada das respostas de dR/px referente a extração utilizando Gimp® e WS (n=3).

Equação da Reta	R ²	t _{obs}	t _{crit} (gl = 13)
$y = 0,79(\pm 0,01) + 0,038(\pm 0,001)$	0,997	0,676	2,160

4.4.2. Comparação por ensaio de robustez

Após a validação dos dados obtidos pelo WS, entende-se como válido qualquer um dos modelos de tratamento proveniente dos seus resultados. O teste de robustez foi realizado no intuito de averiguar a reprodutibilidade do ensaio enzimático. Desta maneira, a comparação dos valores médios e desvios associados a análise múltipla destes *spots*, confere uma estimativa do comportamento do algoritmo frente a um tratamento destes dados.

Para o Gimp®, o DPR foi de 4,18%, como vê-se na Tabela 13. Quando foi empregado o WS, este valor diminuiu para 3,75%. Ao realizar-se os cálculos das novas médias com base na meia altura dos histogramas dos canais RGB (RGBHH), o desvio relativo retorna para o valor de 4,18%. Por fim, a retirada de *outliers* com base no padrão HSV (HSVTHR) promove maior redução neste valor de DPR.

Entende-se que ao realizar a detecção de círculos, a média calculada desta nova forma utiliza um número maior de *pixels* que o antigo modo manual da ferramenta de seleção 60x60. Uma maior amplitude de valores de cor e cobertura espacial do *spot*, pode contribuir para uma resposta mais precisa com o método WS.

Ao simplificarmos o número de *pixels* pelo histograma do padrão RGB, nota-se que há perda de informação. Os canais de cor são independentes, portanto, o método realiza a retirada de valores anômalos, apesar de ceifar informação dos limites próximos a eles. Isto corrobora para um aumento no desvio, comparado à extração do WS “puro”.

Não obstante, seu desvio se mantém equivalente ao resultado manual do Gimp®. O método HSVTHR alcançou menor desvio, isto pode ser explicado pela seleção mais refinada de *outliers*. Onde a média final de todos os pontos circulares está muito mais precisa após a retirada dos valores anômalos, principalmente reflexos, o que é ideal para análises de testes em PADs ainda úmidos. Em relação à média dos valores normalizados do canal verde, estes se mantêm próximos para Gimp®, WS e RGBHH, porém decresce a média de HSVTHR. Para esta ordem de grandeza (valor máximo para canal G normalizado igual a 1), os valores dos desvios se mantêm iguais a 0,02.

Tabela 13. Dados comparativos entre todos os métodos de extração de valores de cor do ensaio de robustez. Reação de β -gal (10^{-1} U mL⁻¹) e CPRG (2,0 mmol L⁻¹) em 20 min (n=12).

Modo	Valor de G'	DPR (%)	Nº de <i>pixels</i>
Gimp®	0,58 ± 0,02	4,18	625 ± 0
WS	0,60 ± 0,02	3,75	7213 ± 0
RGBHH	0,58 ± 0,02	4,18	5120 ± 665
HSVTHR	0,53 ± 0,02	3,18	6400 ± 155

Quando há a detecção dos círculos é possível que parte das extremidades dos *spots*, com aspectos de cor diferentes da região central, sejam adicionadas a captura final. Isto pode ser ajustado com base nos parâmetros da função CHT, porém uma estratégia alternativa foi proposta à medida que ajustes individuais se tornam desafiadores. Caso este círculo detectado pudesse ser ajustado para um diâmetro final menor em relação à detecção prévia, os limites com possíveis anomalias poderiam ser

desprezados. Assim, a percentagem do raio do círculo detectado foi proposta como novo parâmetro.

Neste ensaio, os *spots* contêm diâmetro físico de aproximadamente 0,5 cm. Ou seja, mesmo que digitalmente, a área ocupada pelos *spots* na imagem original contém uma quantidade inferior de *pixels*, ao limitarmos a região circular para 70% do valor original, perde-se informações valiosas experimentalmente. No que tange o tratamento posterior a detecção do círculo (RGBHH e HSVTHR), o DPR crescente mostra que nem toda informação retirada por estes algoritmos é anômala. E consequentemente, tratar quantidades reduzidas de amostras, neste caso baixas quantidades de *pixels*, não melhora a seleção mais precisa. No mais, entende-se que os algoritmos de tratamento de dados são relevantes, mas ainda necessitam de ajustes para ocasiões com limitações na população.

Tabela 14. Dados comparativos dos métodos de extração de valores de cor do ensaio de robustez com 70% do valor original do raio. Reação de β -gal (10^{-1} U mL $^{-1}$) e CPRG (2,0 mmol L $^{-1}$) em 20 min. (n=12)

Modo	Valor de G'	DPR (%)	Nº de <i>pixels</i>
Gimp®	0,58 $\pm$ 0,02	4,18	625 $\pm$ 0
WS	0,60 $\pm$ 0,02	3,63	3209 $\pm$ 0
RGBHH	0,58 $\pm$ 0,02	4,05	2330 $\pm$ 337
HSVTHR	0,52 $\pm$ 0,04	8,22	2950 $\pm$ 160

4.4.3. Comparação por ensaio da variação de pH

Observando a relação entre o sinal de dR e pH na faixa de 6,0 a 9,0 na interação entre o indicador ABT a 0,05% (m/v) em etanol 10 % (v/v), pode-se notar semelhança entre as respostas dos *fittings* lineares em todos os modos de extração de cores. Ao observarmos a Figura 51, percebe-se que os pontos dos métodos de retirada de valores têm proximidade em pHs inferiores. A partir de pHs maiores que 9,0, nota-se distância maior entre os pontos, porém eles possuem mesma tendência.

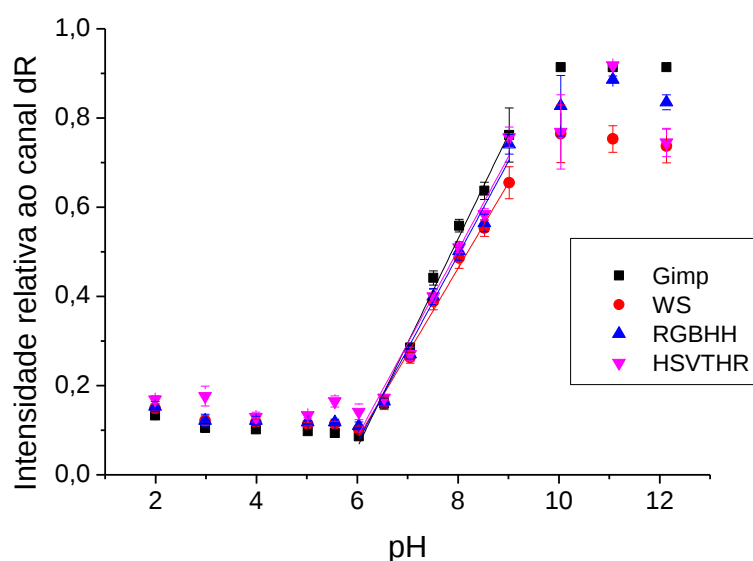


Figura 51. Curva de calibração referente a intensidade de dR em função do pH para o indicador ABT 0,05% (m/v) em etanol 10% (v/v) em diferentes modos de obtenção das respostas, assim como seus *fittings* na faixa de pH de 6,0 a 9,0.

Em relação aos dados estatísticos, como imaginado, estes se mantêm semelhantes dada a grande proximidade visual entre as curvas de regressão linear plotadas. Na Tabela 15, os coeficientes angulares e lineares de todos os modos de extração estão na mesma proporcionalidade, além do R^2 superior a 0,98. Concluindo que as curvas plotadas nos diferentes métodos são equivalentes, igualmente sensíveis e correlação próxima, sendo o WS o modo com maior correlação.

Tabela 15. Dados referentes aos *fittings* das curvas de dR pelo pH para modos de extração de valores de cor diferentes.

Modo	Faixa de pH	Equação da Reta	R^2
Gimp®	6,0 – 9,0	$y = 0,23(\pm 0,01)x - 1,30(\pm 0,07)$	0,986
WS		$y = 0,192(\pm 0,007)x - 1,07(\pm 0,06)$	0,991
RGBHH		$y = 0,21(\pm 0,01)x - 1,19(\pm 0,09)$	0,982
HSVTHR		$y = 0,21(\pm 0,01)x - 1,2(\pm 0,1)$	0,974

A resposta dada pelo sensor PAD para o pH das matrizes aquosas nos modos diferentes são estatisticamente equivalentemente (Tabela 16). Portanto, o uso prático dos algoritmos de retirada automática das cores dos *spots* pode ser visto como análogo a aquisição de valores por meio do *software* previamente utilizado manualmente.

Tabela 16. Comparação entre respostas para matrizes diferentes em relação aos modos de extração de valores de cor.

Modo/Matriz	Lagoa	Mineral	Torneira
Gimp®	$6,5 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,5$
WS	$6,4 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,4$
RGBHH	$6,7 \pm 0,5$	$6,7 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,5$
HSVTHR	$6,5 \pm 0,5$	$6,7 \pm 0,5$	$7,1 \pm 0,5$

4.4.4. Comparação por ensaio enzimático

Assim como compreendido nas demais comparações, entende-se que os métodos são complementares entre si, de forma a contemplarem semelhança visual e estatística na observação dos dados obtidos. Com base na Figura 52, as curvas analíticas da variação de β -gal por 1/G demonstram similaridade visual, tanto para todos os pontos, quanto para os *fiittings*. Independente de qual modelo de tratamento, se mantiveram fidedignos ao tradicional método manual utilizando o Gimp®.

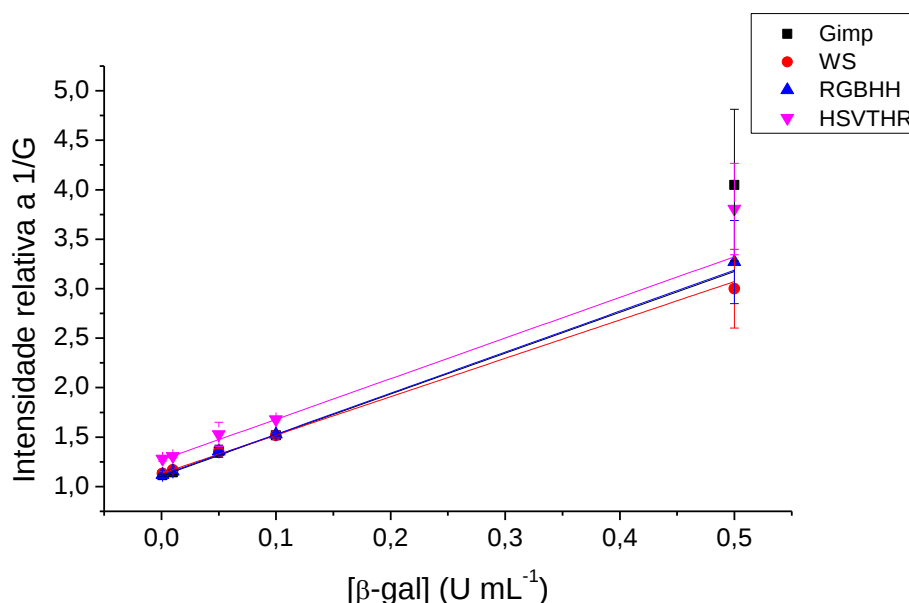


Figura 52. Curva analítica e *fiitting* lineares da concentração de β -gal por intensidade do inverso do canal verde em diferentes modos de extração de valores de cor.

Analisando numericamente, as respostas têm mesma proporcionalidade. Suas sensibilidades variam de 3,9 a 4,15, e R^2 superior a 0,99. Isto confirma o que já foi abordado: os métodos automatizados (com e sem tratamento dos *outliers*) retornam respostas congruentes e válidas ao Gimp®, um *software*

comercial e tradicional. Desta forma, qualquer um deles pode ser utilizado como algoritmo automatizado.

Tabela 17. Comparação entre dados das regressões lineares das curvas analíticas de β -gal por intensidade do inverso do canal verde.

	Equação da Reta	R²
Gimp®	$y = 4,1(\pm 0,2)x - 1,109(\pm 0,006)$	0,994
WS	$y = 3,9(\pm 0,1)x - 1,133(\pm 0,006)$	0,997
RGBHH	$y = 4,15(\pm 0,08)x - 1,114(\pm 0,003)$	0,998
HSVTHR	$y = 4,1(\pm 0,1)x - 1,27(\pm 0,01)$	0,995

5. CONCLUSÃO

Associado ao uso de ferramentas tecnológicas, é possível explorar novas formas de colorimetria digital e tratamento de dados. O uso automatizado de recursos como visão computacional pode revolucionar as perspectivas de ensaios químicos que utilizam a colorimetria digital. Sensores em papel que usam de respostas coloridas, além de terem sua análise de forma rápida, podem ter regiões específicas do sensor detectadas e processadas automaticamente, isentando os analistas de realizar este processo tedioso, principalmente para processamento de grande quantidade de dados. Os sistemas de CV aqui descrito para amostragens, replicatas e outros métodos com quantidades grandes de processamento de dados se mostraram equivalentes ao uso de *softwares* especializados. No entanto, o tratamento de dados pode ter seu tempo e complexidade diminuídos, assim como seus resultados passados por tratamento diferenciado e automatizado.

Neste estudo, comprovou-se que o uso de recursos atuais de visão computacional, vinculado a tecnologias e conceitos modernos de aplicações *web*, podem ser úteis na melhora da portabilidade, acessibilidade e velocidade na aquisição de resultados analíticos com base na colorimetria. Novas abordagens podem ser realizadas visando um refinamento ainda maior de valores que influenciam a média das respostas. Além disto, também podem ser úteis para a melhora da resposta deste sensor.

Aplicações futuras do método descrito para uma maior população amostral e de diferentes ensaios químicos permitirá a obtenção de dados estatísticos de performance mais robustos sobre o software e permitirá a incorporação de outras funcionalidades e tratamento de dados.

6. REFERÊNCIAS

1. Fan, Y., et al. "Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review." *Measurement* 171 (2021): 108829.
2. Pohanka, M. "Colorimetric hand-held sensors and biosensors with a small digital camera as signal recorder, a review." *Reviews in Analytical Chemistry* 39.1 (2020): 20-30.
3. Shogah, Z. A. C., et al. "Using Smartphones in Chemical Analysis." *Journal of Analytical Chemistry* 78.4 (2023): 426-449.
4. Soares, S., et al. "Smartphone-based digital images in analytical chemistry: Why, when, and how to use." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2023): 117284.
5. Oliveira, C. R. S., et al. "Métodos Baseados em Imagem Digital: das Considerações Gerais ao Ensino de Química." *Revista Virtual de Química* 16.2 (2024).
6. Böck, F. C., et al. "PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones." *Journal of Chemometrics* 34.12 (2020): e3251.
7. Maliamanis, T., et al. "Adversarial computer vision: a current snapshot." *Twelfth International Conference on Machine Vision (ICMV 2019)*. Vol. 11433. SPIE, 2020.
8. Sophokleous, A., et al. "Computer vision meets educational robotics." *Electronics* 10.6 (2021): 730.
9. Zalluhoğlu, C. "A Review of COVID-19 Diagnostic Approaches in Computer Vision." *Current Medical Imaging* 19.7 (2023): 695-712.
10. Zareiforush, H., et al. "Potential applications of computer vision in quality inspection of rice: a review." *Food engineering reviews* 7 (2015): 321-345.
11. Lukinac, Jasmina, et al. "Computer vision method in beer quality evaluation—A review." *Beverages* 5.2 (2019): 38.
12. Li, Z., et al. "A review of computer vision technologies for plant phenotyping." *Computers and Electronics in Agriculture* 176 (2020): 105672.
13. OpenCV. Canny Edge Detection. Disponível em: <https://docs.opencv.org/4.x/da/d22/tutorial_py_canny.html> Acesso em: 6 de março de 2024.
14. O'Mahony, Niall, et al. "Deep learning vs. traditional computer vision." *Advances in Computer Vision: Proceedings of the 2019 Computer Vision Conference (CVC), Volume 1* 1. Springer International Publishing, 2020.
15. Garg, Shivi, and Niyati Baliyan. "Comparative analysis of Android and iOS from security viewpoint." *Computer Science Review* 40 (2021): 100372.
16. Stender, Simon, and Hampus Åkesson. "Cross-platform Framework Comparison: Flutter & React Native." (2020).
17. Fentaw, Awel Eshetu. *Cross platform mobile application development: a comparison study of React Native Vs Flutter*. MS thesis. (2020).

18. Chakraborty, S., et al. "CRUD Operation on WordPress Database Using C# And REST API." *International Journal of Applied Engineering and Management Letters (IJAEML)* 7.4 (2023): 130-138.
19. Chen, Xianjun, et al. "Restful API architecture based on laravel framework." *Journal of Physics: Conference Series*. Vol. 910. No. 1. IOP Publishing, (2017).
20. Relan, Kunal. "Building REST APIs with Flask: Create Python Web Services with MySQL." 1. New Delhi: Apress, (2019).
21. De, B. "API Management: An Architect's Guide to Developing and Managing APIs for Your Organization." 1. Berkeley/CA: Apress, (2017).
22. ." Aufl. Apress, Berkeley (2017).
23. OpenCV. Hough Circle Transform. Disponível em: https://docs.opencv.org/4.x/d3/de5/tutorial_js_houghcircles.html. Acesso em: 6 de março de 2024.
24. OpenCV. Feature Detection - LineSegmentDetector. Canny Edge Detection. Disponível em: https://docs.opencv.org/4.x/dd/d1a/group__imgproc__feature.html#ga47849c3be0d0406ad3ca45db65a25d2d Acesso em: 6 de março de 2024.
25. OpenCV. Hough Circle Transform Tutorial. Disponível em: https://docs.opencv.org/3.4/d4/d70/tutorial_hough_circle.html Acesso em: 6 de março de 2024