

UFSCar – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CCET – CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
DQ – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

*Trabalho de Conclusão de Curso*

Heitor de Barros Santos

**Dispositivos analíticos colorimétricos para desenvolvimento de  
tecnologias sustentáveis e sensíveis**

São Carlos

2025

Heitor de Barros Santos

**Dispositivos analíticos colorimétricos para desenvolvimento de  
tecnologias sustentáveis e sensíveis**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de São Carlos,  
para obtenção do título de Bacharel em  
Química.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Coorientador: Prof. Dr. Evandro Piccin

São Carlos

2025



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET**

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905  
Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 5/2025/DQ/CCET

**Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso**

**Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**HEITOR DE BARROS SANTOS**

**DISPOSITIVOS ANALÍTICOS COLORIMÉTRICOS PARA DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS  
SUSTENTÁVEIS E SENSÍVEIS**

**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Universidade Federal de São Carlos - Campus São Carlos**

São Carlos, 10 de fevereiro de 2025

**ASSINATURAS E CIÊNCIAS**

<b>Cargo/Função</b>	<b>Nome Completo</b>
Orientador	Prof. Dr. Emanuel Carrilho
Membro da Banca 1	Dr. Eduardo Luiz Rossini
Membro da Banca 2	Dr. Manoel de Jesus de Aquino Lima



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Samuel Schwab, Professor(a)**, em 11/02/2025, às 13:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1742346** e o código CRC **19AB2C72**.

**Referência:** Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.001933/2024-38

SEI nº 1742346

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço aos meus pais, Caio e Simone, pelo incansável apoio, principalmente durante todos os anos de graduação que, além de me fazerem sentir amado apesar da distância física, fizeram de tudo para que eu tivesse a melhor vivência possível.

Agradeço aos meus irmãos, Amanda e Vinicius, por toda a convivência, aprendizados e experiências compartilhadas, graças a eles sinto que amadureci muito como pessoa e estou sempre aprendendo algo novo. Agradeço à minha namorada, Beatriz, por todo apoio, amor e carinho que me deu mesmo durante todas as dificuldades que a vida colocou no nosso caminho.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela oportunidade de realizar minha formação superior, em especial, aos docentes do Departamento de Química pelos ensinamentos. Agradeço ao professor Dr. Emanuel Carrilho, à professora Dra. Lúcia Mascaro e ao professor Dr. Edenir Pereira e por me receberem em seus laboratórios de pesquisa como aluno de iniciação científica e pela orientação ativa e enriquecedora ao longo dos anos.

Meus agradecimentos, também, para todos os meus amigos e colegas de laboratório do Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações (BioMicS), pelo companheirismo, respeito e aprendizados. Por último, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que esse momento chegasse, não estaria aqui e não seria quem sou sem vocês.

## Resumo

Os dispositivos analíticos colorimétricos emergiram como instrumentos cruciais tanto na ciência quanto na indústria por oferecerem uma aplicação técnica analítica versátil, econômica e ambientalmente amigável. Com foco no uso potencial para monitoramento ambiental, produção agrícola e diagnósticos médicos, este trabalho examina seu desenvolvimento histórico, conceitos fundamentais e aplicações contemporâneas. Há uma discussão detalhada sobre os conceitos básicos da colorimetria, que se baseiam na relação entre luz, objetos e percepção humana. A teoria tricromática, a mistura aditiva e subtrativa de cores e os modelos de cores como RGB, HSI e CIELab que permitem a quantificação numérica precisa de estímulos colorimétricos e formam a base da colorimetria. Esses conceitos possibilitam a distinção de pequenas variações de cor que podem ser invisíveis ao olho humano. Este trabalho também destaca os fundamentos espectroscópicos do funcionamento dos dispositivos colorimétricos. A revisão bibliográfica investiga fenômenos como transmitância e absorvância, conforme definidos pela lei de Lambert-Beer, ao examinar a interação entre luz eletromagnética e materiais. Essas ideias constituem a base para estudos quantitativos e qualitativos e são essenciais para compreender a relação entre a intensidade da cor e a concentração do analito. No contexto das inovações recentes, destaca-se a evolução para dispositivos analíticos avançados e como principal exemplo neste trabalho utilizou-se os dispositivos microfluídicos à base de papel ( $\mu$ PADs), que incorporam os princípios da colorimetria em plataformas compactas e de baixo custo. Esses dispositivos atendem aos padrões ASSURED para testes no local de atendimento (*point-of-care*), proporcionando soluções rápidas, sensíveis e ecologicamente corretas, especialmente em locais remotos e com poucos recursos. Além disso, sua integração com tecnologias móveis potencializa sua aplicação para análises em tempo real e no campo. A versatilidade dos  $\mu$ PADs reflete seu alinhamento com os objetivos de desenvolvimento sustentável, promovendo métodos analíticos mais verdes e acessíveis.

**Palavras-chave:** Dispositivos colorimétricos; Microfluídica em papel; Sustentabilidade analítica.

## Abstract

Because they provide a versatile, economical, and environmentally friendly analytical technique, analytical colorimetric devices have emerged as crucial instruments in both science and industry. With a focus on their potential in environmental monitoring, agricultural production, and medical diagnostics, this essay examines their historical development, underlying concepts, and contemporary applications. There is a detailed discussion of the basic concepts of colorimetry, which are based on the relationship between light, objects, and human perception. The trichromatic theory, additive and subtractive color mixing, and color models such as RGB, HSI, and CIELab, which allow for the precise numerical quantification of color stimuli, form the foundation of colorimetry. These concepts make it possible to distinguish subtle color variations that may be invisible to the human eye. The spectroscopic underpinnings of colorimetric devices' operation are also highlighted in this essay. The review investigates phenomena like transmittance and absorbance as defined by the Beer-Lambert's law by examining the interaction between electromagnetic light and materials. These ideas form the foundation of both quantitative and qualitative studies and are essential to comprehending the relationship between color intensity and analyte concentration. In the context of recent innovations, the evolution of advanced analytical devices stands out, with paper-based microfluidic devices ( $\mu$ PADs) being the main example used in this study. These devices incorporate the principles of colorimetry into compact and low-cost platforms. They meet the ASSURED criteria for point-of-care testing, providing rapid, sensitive, and environmentally friendly solutions, particularly in remote locations with limited resources. Furthermore, their integration with mobile technologies enhances their applicability for real-time and field analyses. The versatility of  $\mu$ PADs reflects their alignment with sustainable development goals, promoting greener and more accessible analytical methods.

**Keywords:** Colorimetric devices; Paper-based microfluidics; Analytical sustainability.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Infográfico das publicações de pesquisas PoC no mundo. a) Distribuição mundial de publicações sobre testes no ponto de cuidado (PoC). b) Número de publicações por ano e distribuição de dados da literatura relacionados à colorimetria. ....	14
<b>Figura 2.</b> Diferença entre a eficiência luminosa fotópica (555 nm) e escotópica (505 nm)....	15
<b>Figura 3.</b> Distribuição espectral de energia radiante de um estímulo de cor Q.....	16
<b>Figura 4.</b> Diagrama da combinação das cores primárias e secundárias em sistemas aditivos e subtrativos.....	17
<b>Figura 5.</b> Distribuições espectrais de energia do exemplo. a) Distribuição espectral de energia de uma cor arbitrária [C]. b) Distribuição espectral de energia do branco de referência [W]. c) Distribuição espectral de energia do vermelho primário [P1]. d) Distribuição espectral de energia do verde primário [P2]. e) Distribuição espectral de energia do azul primário [P3]...	18
<b>Figura 6.</b> Função de comparação de cores do padrão RGB CIE de 1931. ....	19
<b>Figura 7.</b> Espaço de três estímulos, RGB, e diagrama de cromaticidade.....	20
<b>Figura 8.</b> Comparação do diagrama de cores em três e duas dimensões.....	21
<b>Figura 9.</b> Diagrama de cromaticidade do padrão RGB CIE de 1931.....	22
<b>Figura 10.</b> Função de comparação de cores do padrão XYZ CIE de 1931. ....	23
<b>Figura 11.</b> Diagrama de cromaticidade do padrão XYZ CIE de 1931. ....	23
<b>Figura 12.</b> Comparação das curvas das CMFs XYZ CIE de 2° vs 10°. ....	24
<b>Figura 13.</b> Cubo do modelo de cores RGB.....	26
<b>Figura 14.</b> Triângulo do modelo de cores HSI particionando o cubo RGB. ....	27
<b>Figura 15.</b> Modelo tridimensional de cores CIELab. ....	29
<b>Figura 16.</b> Representação da REM e suas componentes vetoriais elétrica (E) e magnética (H). ....	30
<b>Figura 17.</b> Comprimentos de onda de radiação eletromagnética. ....	31
<b>Figura 18.</b> Círculo cromático de cores. ....	31
<b>Figura 19.</b> Espectros de absorção de soluções de Rodamina B com diferentes concentrações em água, medidos utilizando o espectrofotômetro de feixe duplo. ....	33
<b>Figura 20.</b> Curva analítica de Rodamina B em água medida em $\lambda_{max}$ .....	33
<b>Figura 21.</b> Exemplo mostrando como uma padronização de ponto único leva a um erro na concentração reportada de um analito caso assumam-se incorretamente que $kA$ é constante. ...	37
<b>Figura 22.</b> Métodos para melhorar a precisão. a) Método para alta absorvância. b) Método para baixa absorvância. c) Método para máxima precisão.....	38

<b>Figura 23.</b> Métodos de fabricação de $\mu$ PADs. ....	42
<b>Figura 24.</b> Funcionamento e exemplo de design. a) Esquema a de um canal microfluídico à base de papel. b) Exemplo de um dispositivo fabricado. ....	43
<b>Figura 25.</b> Exemplos de mecanismos de titulação de complexação. a) Mecanismo de complexação do negro de Eriocromo T (NET) com o íon $Mg^{2+}$ . b) Mecanismo de complexação da murexida com o íon $Ca^{2+}$ . ....	44
<b>Figura 26.</b> Comparação das curvas do espectro de UV/Vis da solução de Calcon com $Ca^{2+}$ em diferentes concentrações, de 0 mM a 20 mM. ....	45
<b>Figura 27.</b> Exemplo de um $\mu$ PAD de calibração para detecção de $Ca^{2+}$ . ....	46
<b>Figura 28.</b> Exemplificação de curvas analíticas para AgroPADs. a) Curva analítica para o $\Delta RGB$ . b) Curva analítica para a saturação. ....	46
<b>Figura 29.</b> Passos para a discretização de uma imagem: a) Imagem contínua, b) amostragem, c) quantização, e d) codificação. ....	47

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Fórmulas de conversão entre espaços de cores do padrão NTSC (Comitê Nacional de Sistemas de Televisão – <i>National Television Systems Committee</i> ). .....	25
--	----

## Lista de Siglas e Abreviações

ASSURED	<i>Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and Robust, Equipment-free and Deliverable to end-users</i> (Acessível, Sensível, Específico, Fácil de usar, Rápido e Robusto, Livre de Equipamentos e Entregável aos usuários finais)
CMF	<i>Color-matching function</i> (Função de comparação de cores)
CMYK	<i>cyan, magenta, yellow, and black ink color space</i> (Espaço de cores ciano, magenta, amarelo e tinta preta)
CIE	<i>Comission Internationale de l'Eclairage</i> (Comissão Internacional de Iluminação)
CIELab	<i>L*, a* and b* color space</i> (Espaço de cores L*, a* e b*)
CHI	Ionóforo de potássio I
DEER	Distribuição espectral de energia radiante
DOS	<i>Diocetyl sebacate</i> (Dioctilo sebacato)
HSI	<i>Hue, saturation and intensity color space</i> (Espaço de cores matiz, saturação e intensidade)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Limite de detecção)
NTSC	<i>National Television Systems Committe</i> (Comitê Nacional de Sistemas de Televisão)
NET	Negro de Eriocromo T
NaTFBP	Tetraquis[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borato de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
POCT	<i>Point-of-care testing</i> (Testes no local de atendimento)
RGB	<i>Red, green and blue color space</i> (Espaço de cores vermelho, verde e azul)
REM	Radiação eletromagnética
UV/Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível
μPADs	<i>Mircrofluidic Paper-Based Analytical Device</i> (Dispositivos microfluídicos à base de papel)

## Sumário

Resumo .....	5
Abstract.....	6
Lista de Figuras .....	7
Lista de Tabelas .....	9
Lista de Siglas e Abreviações.....	10
<b>1. Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Revisão da Literatura .....</b>	<b>15</b>
2.1. Conceitos básicos da colorimetria .....	15
2.1.1. Igualdade de cores – “Color matching”.....	16
2.1.2. Espaço de três estímulos.....	20
2.1.3. Sistemas colorimétricos.....	21
2.1.4. Modelos de cores .....	24
2.2. A espectroscopia em dispositivos colorimétricos.....	29
2.2.1. Fundamentos espectroscópicos.....	30
2.2.2. Sensibilidade, padronização, erros e ruídos.....	34
2.3. Dispositivos colorimétricos avançados .....	39
2.3.1. $\mu$ PADs .....	39
<b>3. Considerações Finais.....</b>	<b>47</b>
<b>4. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>48</b>

## 1. Introdução

A noção de cor está fundamentalmente relacionada com a percepção visual do sistema humano, ou seja, a cor não é uma propriedade intrínseca de um objeto, mas sim uma percepção que envolve três fatores importantes. O primeiro deles é a fonte de luz, *i.e.*, uma fonte luminosa que emite a radiação eletromagnética, chamada de luz visível, e que pode ser receptada pelo olho humano, por exemplo, quando os corantes presentes em um material refletem ou transmitem seletivamente parte da luz irradiada, levando ao segundo fator importante, que é a reflexão ou transmissão da luz modificada pelo objeto, essa entra em contato com os olhos do observador e estimula a sensação que é a chamada de cor do material. O observador é, portanto, o terceiro fator essencial que deve ser considerado.<sup>[1,2]</sup>

Para explicar como o olho humano processa cores, Thomas Young postulou no início do século XIX que a vasta gama de cores que vemos é o resultado da interação dos receptores de cores vermelho, verde e azul no olho humano. Ao demonstrar que a luz vermelha, verde e azul poderia combinar-se para produzir quase qualquer cor desejada, James Clerk Maxwell avançou ainda mais esta noção.<sup>[2,3]</sup> Em 1860, Maxwell desenvolveu o *colorbox*, um colorímetro rudimentar, que se utilizava de um prisma para ajustar os feixes de luz vermelha, verde e azul de forma independente para corresponder à cor da amostra. Ele demonstrou que tais comprimentos de onda poderiam ser medidos como um tipo de energia eletromagnética.<sup>[2,3]</sup> Anos depois, em 1870, Louis Jules Duboscq, um fabricante de instrumentos francês, fez um colorímetro para um professor de química industrial na *College Commercial* em Paris. O colorímetro de Duboscq não foi o primeiro no mercado, mas o primeiro que permitiu a comparação simultânea da cor de dois líquidos, um dos princípios da colorimetria.<sup>[4,5]</sup>

A colorimetria é uma das partes da ciência das cores que tem o intuito de determinar numericamente a cor de um estímulo visual de interesse e, por consequência, especificar pequenas diferenças de cor que podem passar despercebidas pelo observador. É frequentemente utilizada como método analítico na pesquisa química, tendo em vista que qualquer substância que se conecte com cromógenos formadores de cor pode produzir cor e variações na intensidade da cor levam a variações na absorção de luz.<sup>[1]</sup> Porém, no início do século XX, foi observado que fontes de luz com a mesma potência não apresentavam o mesmo brilho se suas cores variassem. Uma série de estudos comparando cor e brilho para duas fontes de luz do mesmo tamanho e intensidade foram realizadas em 1923.<sup>[6]</sup> Assim, o conhecimento humano de percepção e quantificação de cores foi aprimorado pela definição de conceitos colorimétricos básicos, como a teoria tri-cromática de cores, definição matemática de funções de comparação

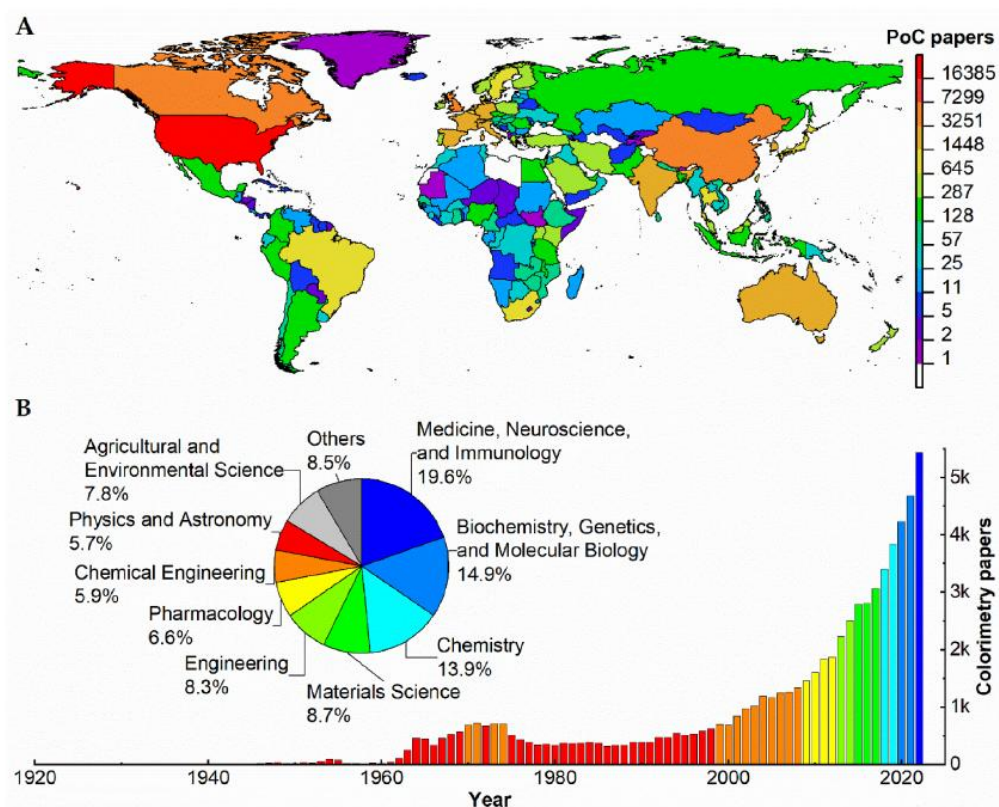
de cores (CMFs), definição do espaço tri-estímulo e sistemas colorimétricos com modelos de cores, como RGB, HSI e CIELab.<sup>[6,7]</sup> Essas estruturas auxiliam no desenvolvimento de tecnologias de inteligência artificial, imagem e exibição, além de oferecer suporte a aplicações analíticas.<sup>[6]</sup>

A colorimetria tem amplas aplicações, desde o rastreamento de poluentes no meio ambiente até a identificação de doenças. Esses instrumentos oferecem respostas analíticas rápidas, precisas e econômicas. Sua simplicidade e mobilidade, ou seja, capacidade de uso *in loco*, aumentaram ainda mais sua utilidade, especialmente em ambientes com recursos limitados onde as ferramentas analíticas convencionais não seriam viáveis. Em contraste com as técnicas convencionais de laboratório, que frequentemente exigem equipamentos complexos e grandes, os dispositivos colorimétricos são feitos para serem facilmente operados e acessíveis.<sup>[7]</sup> Os dispositivos colorimétricos também se destacam por sua sustentabilidade e adaptabilidade. Muitos aparelhos contemporâneos são desenvolvidos com foco em baixa produção de resíduos e baixo consumo de energia. Sua compatibilidade ambiental é reforçada pelo uso de materiais biodegradáveis e melhorias nos componentes reutilizáveis, tornando-os uma opção popular na era da química verde, que é definida como um conjunto de princípios que orientam o desenvolvimento de processos químicos mais sustentáveis e ambientalmente amigáveis. Eles foram propostos por Paul Anastas e John Warner em 1998 e visam minimizar ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas ao meio ambiente e à saúde humana.<sup>[7,8]</sup>

As pesquisas analíticas têm se concentrado em técnicas de microfabricação voltadas para testes no local de atendimento (*point-of-care testing* - POCT), resultando em quase 60 mil publicações científicas nas últimas três décadas, com ampla distribuição global (Figura 1), especialmente na América do Norte, Europa, sul da Ásia e Austrália.<sup>[8]</sup> Os dispositivos POCT têm como objetivo facilitar a medição de pequenas quantidades de amostras por meio de equipamentos portáteis e de baixo custo, abrangendo desde testes em papel até biossensores vestíveis.<sup>[9]</sup> De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), um dispositivo analítico POCT deve ser acessível (*Affordable*), sensível (*Sensitive*), específico (*Specific*), fácil de usar (*User-friendly*), rápido e robusto (*Rapid and Robust*), livre de equipamentos (*Equipment-free*) e entregável aos usuários finais (*Deliverable to end-users*) — critérios conhecidos como ASSURED.<sup>[9]</sup> Futuramente, sistemas de biossensoriamento para liberação controlada de medicamentos também poderão ser considerados dispositivos POCT, porque combinam a capacidade de detecção específica de biomarcadores em tempo real com respostas terapêuticas automatizadas, permitindo intervenções rápidas e personalizadas diretamente no local de

atendimento.<sup>[8]</sup> Esses dispositivos têm potencial para otimizar o manejo de doenças crônicas, reduzir internações hospitalares e melhorar a adesão ao tratamento, alinhando-se aos princípios de acessibilidade, rapidez e portabilidade dos dispositivos em questão.<sup>[8,9]</sup>

**Figura 1.** Infográfico das publicações de pesquisas PoC no mundo. a) Distribuição mundial de publicações sobre testes no ponto de cuidado (PoC). b) Número de publicações por ano e distribuição de dados da literatura relacionados à colorimetria.



Fonte: Retirado de Palladino, P.<sup>[8]</sup>

A configuração simples e de baixo custo dos dispositivos de diagnóstico móvel permite seu uso também em países com poucos recursos e em áreas subdesenvolvidas. Especificamente, os dispositivos microfluídicos à base de papel ( $\mu$ PADs), que emergiram como uma solução prática para aplicações analíticas sustentáveis, atendendo aos critérios ASSURED.<sup>[8]</sup>

Este trabalho tem como objetivo principal explorar os conceitos fundamentais e aplicações práticas dos dispositivos colorimétricos, com ênfase nos  $\mu$ PADs. Além disso, discute-se como esses dispositivos se destacam em termos de sustentabilidade, abordando comparações quantitativas de impacto ambiental com métodos analíticos tradicionais. Por fim, apresenta-se a relevância desses dispositivos no contexto dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) definidos pela Organização das Nações Unidas (ONU), ressaltando sua contribuição para uma ciência mais verde e acessível.<sup>[10]</sup>

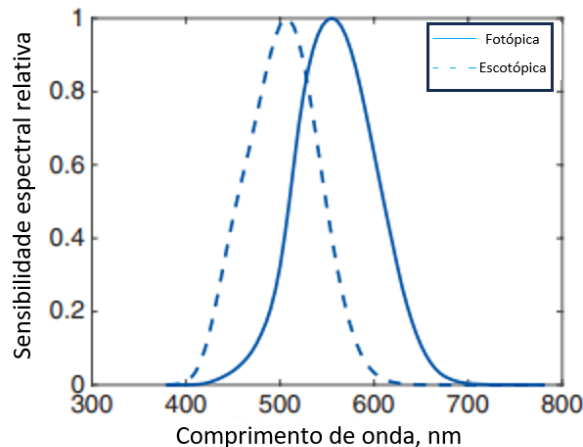
## 2. Revisão da Literatura

Esta revisão bibliográfica irá elucidar os principais conceitos envolvidos na colorimetria, apresentar dispositivos colorimétricos avançados, suas aplicações e a sensibilidade e sustentabilidade desse método analítico.

### 2.1. Conceitos básicos da colorimetria

Antes que o trabalho fundamental da colorimetria ocorresse, a CIE (Comissão Internacional de Iluminação), publicou uma função em 1924 que definiu o conceito de eficiência luminosa, essa descreve a sensibilidade do olho humano à luz em diferentes comprimentos de onda da luz visível, para visão fotópica  $V(\lambda)$ , a qual relaciona-se com a sensibilidade do olho em condições de intensa luminosidade, e em 1951 sobre os valores para visão escotópica  $V'(\lambda)$ , a qual é produzida pelo olho em condições de baixa luminosidade como mostrado na Figura 2.<sup>[11]</sup>

**Figura 2.** Diferença entre a eficiência luminosa fotópica (555 nm) e escotópica (505 nm).



**Fonte:** Adaptado de Kruschwitz, J. D. T.<sup>[6]</sup>

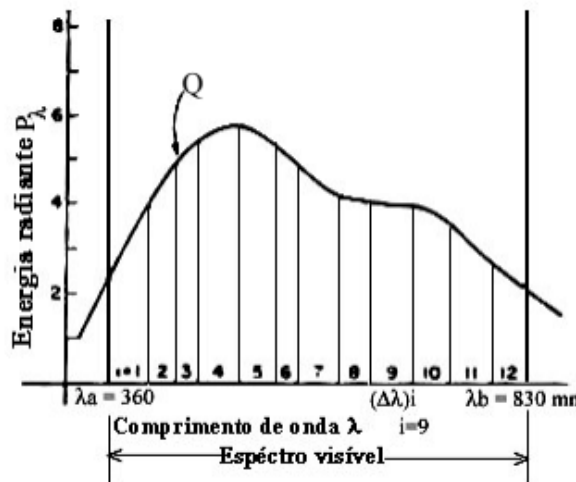
Na colorimetria um estímulo de cor pode ser obtido através de combinações aditivas de três estímulos distintos e fixados, cujas energias radiantes devem ser ajustadas adequadamente sob condições observacionais. Isso é conhecido como generalização tricromática em colorimetria.<sup>[11]</sup>

A distribuição espectral de energia radiante (DEER), que na verdade é a soma dos vários comprimentos de onda do espectro que compõem o estímulo em questão, pode ser usada para descrever uma fonte de energia radiante.<sup>[12]</sup> A integral da distribuição de energia espectral, conforme demonstrado na Eq.1, fornece a energia total emitida por uma fonte radiante que caracteriza o estímulo, a teoria de Planck explica as leis fenomenológicas discutidas anteriormente.

$$P = \int_0^{\infty} Q(\lambda) d\lambda \quad [\text{Eq. 1}]^{[12]}$$

A potência total emitida pelo corpo negro por unidade de área (P), é dada pela integral da radiância espectral sobre todas as frequências, ou seja, deve-se na verdade interpretar  $\rho_c Q(\lambda) d\lambda$  como a probabilidade de obter um valor da energia no intervalo  $[Q(\lambda), Q(\lambda) + d\lambda]$ .<sup>[11,12]</sup> A Figura 3 a seguir mostra o gráfico correspondente a um determinado estímulo Q.

**Figura 3.** Distribuição espectral de energia radiante de um estímulo de cor Q.



Fonte: Adaptado de Wyszecki, G.<sup>[11]</sup>

### 2.1.1. Igualdade de cores – “Color matching”

A teoria tri-cromática da visão de cores é baseada na ideia de que a mistura aditiva, ou seja, um estímulo de cor que, por definição, possui uma energia radiante, em um intervalo qualquer de comprimento de onda e em qualquer parte do espectro, numericamente igual à soma das energias, no mesmo intervalo, das constituintes. As cores, vermelho ( $\lambda_R = 700$  nm), verde ( $\lambda_G = 546,1$  nm) e azul ( $\lambda_B = 435,8$  nm) representam essas constituintes, que são utilizadas, por exemplo, nas televisões em cores quando o sinal é projetado em uma superfície com características ideais de reflexão difusa.<sup>[11,12]</sup>

Nesta revisão o foco principal está nos sistemas aditivos, porém também existem sistemas de cores subtrativas, como o CMYK (ciano, magenta, amarelo e preto), que possuem constituintes diferentes que são, usualmente, cores secundárias como o ciano (verde + azul), magenta (vermelho + azul) e amarelo (vermelho + verde) e é chamado de subtrativo porque funciona com base na subtração de luz refletida.<sup>[11]</sup> Isso significa que as cores são produzidas pela absorção (ou subtração) de certas partes do espectro de luz visível e pela reflexão das restantes. Estes são plenamente utilizados em sistemas de fotografia e impressão. A Figura 4 mostra um diagrama das cores primárias e secundárias.<sup>[12]</sup>

**Figura 4.** Diagrama da combinação das cores primárias e secundárias em sistemas aditivos e subtrativos.



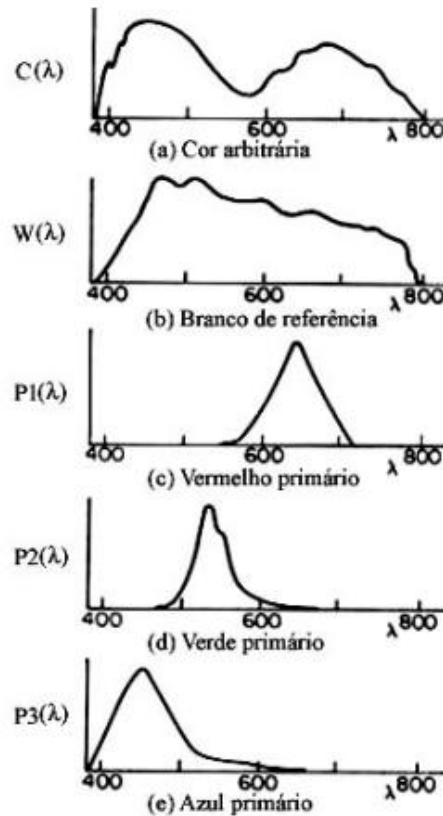
**Fonte:** Adaptado de Bernardazzi, R.<sup>[13]</sup>

Em 1853, Hermann Grassmann mostrou que as luzes coloridas produzidas pela combinação de diferentes quantidades de vermelho, verde e azul seguiam um modelo algébrico, ou seja, um espaço tridimensional linear, dando origem à lei de Grassmann, que é definida pelas funções de comparação de cores (CMFs), *i.e.*, fórmulas que visam calcular o estímulo de cor de um único comprimento de onda a partir de um feixe monocromático, ao combinar uma quantidade específica de luz vermelha, verde e azul.<sup>[1,11]</sup>

Por exemplo, considere que uma luz de cor [C] com distribuição espectral de energia arbitrária  $C(\lambda)$ , como mostrada na Figura 5a, é projetada em uma superfície difusa ideal. Então, uma luz branca [W] de referência com distribuição de energia igual à da Figura 5b, é projetada na mesma superfície com três luzes primárias [P1], [P2] e [P3], cujas distribuições espectrais estão mostradas na Figura 5 c, d e e, respectivamente. Essas, então, são sobrepostas e suas intensidades ajustadas até que a região sobreposta se iguale com o branco de referência em termos de brilho, cromaticidade e saturação. Em seguida, a intensidade das primárias é ajustada até que uma igualdade seja alcançada com a luz colorida [C]. Assim, a intensidade das primárias  $A1[C]$ ,  $A2[C]$  e  $A3[C]$ , são gravadas e normalizadas para  $T1[C]$ ,  $T2[C]$  e  $T3[C]$  como mostrado na Eq. 2, esses são chamados de valores de tri-estímulo.<sup>[12]</sup>

$$T_n [C] = \frac{A_n(C)}{A_n(W)} \quad [\text{Eq. 2}]^{[12]}$$

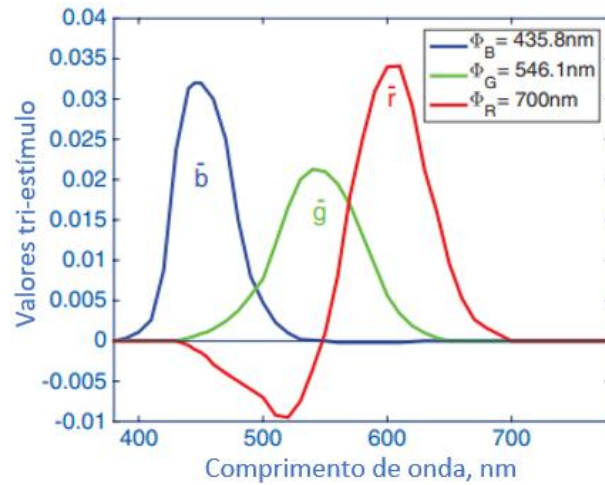
**Figura 5.** Distribuições espectrais de energia do exemplo. a) Distribuição espectral de energia de uma cor arbitrária [C]. b) Distribuição espectral de energia do branco de referência [W]. c) Distribuição espectral de energia do vermelho primário [P1]. d) Distribuição espectral de energia do verde primário [P2]. e) Distribuição espectral de energia do azul primário [P3].



Fonte: Adaptado de Pratt, W. K.<sup>[12]</sup>

Portanto, um valor tri-estímulo define a quantidade de cores primárias necessárias para se equiparar à um estímulo de cor qualquer.<sup>[11]</sup> Assim, em 1931 a Comissão Internacional de Iluminação – “*Comission Internationale de l’Eclairage*” (CIE), uma organização autônoma, que é aceita como maior autoridade no que se refere à iluminação e é reconhecida pela ISO como um corpo internacional de padronização, definiu três funções, chamadas de funções de comparação de cores RGB, utilizando um campo visual de 2°, daí o nome Observador Padrão 2°,<sup>[14,15]</sup> nelas define-se que  $\bar{r}$  é o valor tri-estímulo para o vermelho primário,  $\bar{g}$  é o valor para verde e  $\bar{b}$  para o azul, simbolizando que é uma média de múltiplas observações. A Figura 6 abaixo mostra a CMF para o conjunto primário de  $\Phi_R$ ,  $\Phi_G$  e  $\Phi_B$ .<sup>[6]</sup>

**Figura 6.** Função de comparação de cores do padrão RGB CIE de 1931.



Fonte: Adaptado de Kruschwitz, J. D. T.<sup>[6]</sup>

Adicionalmente, se os resultados da comparação das cores obedecerem a uma certa linearidade é obtida uma formulação mais quantitativa da generalização tri-cromática. Então, é possível utilizar as leis lineares de proporção, adição, simetria e transitividade.<sup>[12]</sup>

A lei da proporcionalidade nos diz que se A é igual a B, então  $\alpha A$  é igual a  $\alpha B$ , onde  $\alpha$  é qualquer fator positivo no qual a energia radiante do estímulo de cor poderá aumentar ou diminuir, enquanto sua distribuição espectral de energia radiante se mantém a mesma. Já a lei da simetria postula que se um estímulo de cor A é igual a outro estímulo B, então B é igual a A, da mesma forma, a lei da transitividade mostra que se A é igual a B e B é igual a C, então A é igual a C.<sup>[12]</sup>

A lei da adição, postula, também, que se A, B, C e D são quatro estímulos de cor quaisquer, se qualquer conjunto de duas das três igualdades seguintes for verdadeiro, ou seja, que A é igual a B, C é igual a D e (A+B) é igual a (C+D), a proposição seguinte também será:<sup>[12]</sup>

$$(A+D) \text{ é igual a } (B+C)$$

Essas leis são afirmações concisas do que está implícito na lei de mistura de cores aditivas de Grassmann. Porém, mesmo com todas essas ferramentas foi observado que uma igualdade perfeita de cores não pode ser obtida e vários fatores podem ser causadores das mínimas diferenças, como: condições de observação, possíveis efeitos de diferentes exposições anteriores ao observador, diferentes observadores podem obter diferentes resultados.<sup>[12]</sup>

### 2.1.2. Espaço de três estímulos

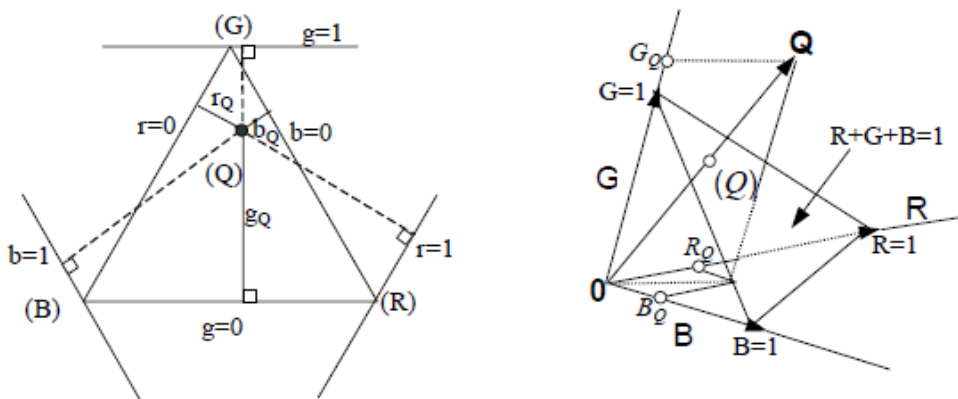
No espaço de três estímulos, um estímulo de cor é definido, unicamente, por sua distribuição espectral de energia radiante,  $\{P\lambda d\lambda\}$ .<sup>[11]</sup> Tendo em vista essa definição, uma comparação entre um estímulo  $Q$  e uma mistura aditiva das três primárias,  $R$ ,  $G$  e  $B$  pode ser expressa pela Eq. 3 a seguir:

$$Q = R_Q R + G_Q G + B_Q B \quad [\text{Eq. 3}]^{[11]}$$

Na qual, os multiplicadores escalares,  $R_Q$ ,  $G_Q$  e  $B_Q$ , atribuídos a cada estímulo primário, são os valores tri-estímulo de  $Q$ . Assim, para representar todos os vetores de três estímulos, como  $Q$ , utiliza-se um plano unitário  $R + G + B = 1$ , no qual, os vetores devem interceptar o plano em um ponto  $Q$  como mostrado na Figura 7.<sup>[11]</sup> As coordenadas de crominância, ou seja, cor menos intensidade, são dadas pela Eq.4 a seguir:

$$r = \frac{R}{R+G+B}, g = \frac{G}{R+G+B}, b = \frac{B}{R+G+B}, \text{ onde } r + g + b = 1 \quad [\text{Eq. 4}]^{[11]}$$

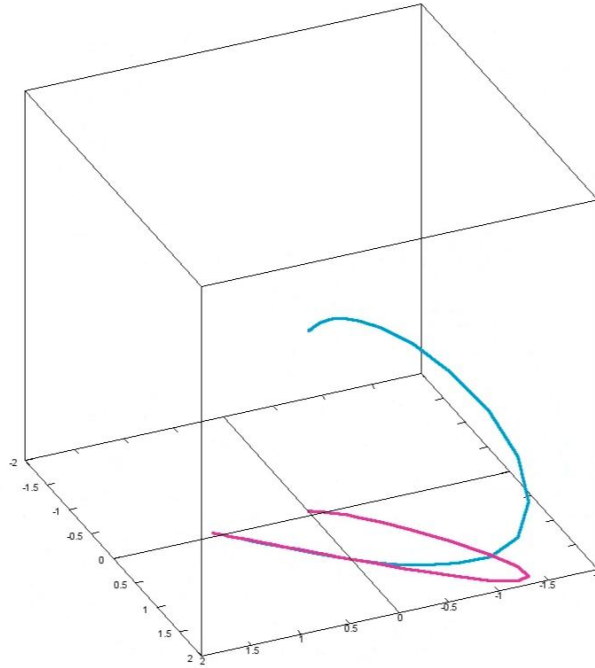
**Figura 7.** Espaço de três estímulos, RGB, e diagrama de crominância.



**Fonte:** Retirado de Wyszecki, G.<sup>[11]</sup>

O diagrama apresentado acima está na forma de um triângulo, chamado de “triângulo colorido de Maxwell”, porém, cores definidas como valores de três-estímulos são difíceis de visualizar.<sup>[11]</sup> Um jeito de solucionar esse problema é remover as informações de intensidade dos dados, assim, convertendo um espaço tridimensional em um bidimensional sem perda significativa de informação. Solução essa que é possível aproveitar para gerar visualizações simplificadas quando os eixos das coordenadas  $r$  e  $g$  são perpendiculares, chamado de projeção no plano  $rg$ , como mostra a Figura 8.<sup>[16, 17]</sup>

**Figura 8.** Comparação do diagrama de cores em três e duas dimensões.



**Fonte:** Retirado do site Medium.<sup>[17]</sup>

Tendo em vista que  $Q$  pode ser definido como  $\{P\lambda d\lambda\}Q$ , que pode ser imaginada como uma mistura aditiva de um conjunto de estímulos primários  $Q_i$ , com distribuição espectral de energia radiante  $\{P\lambda d\lambda\}Q_i$  confinadas em  $n$  intervalos de comprimento de onda, que subdividem completamente o espectro de luz visível, como na Figura 3 que  $n = 12$ , de largura  $\Delta\lambda$ , onde  $i$  varia de 1 até  $n$ .<sup>[11,16]</sup>

Assim, a quantidade de energia radiante no intervalo de comprimento de onda de largura  $d\lambda$ , centrado em  $\lambda$ , se define como um estímulo monocromático de comprimento de onda  $\lambda$ , indicado por  $Q\lambda$ . Quando todos os estímulos monocromáticos  $Q\lambda$ , contidos no espectro de uma determinada cor  $Q$ , possuem energia radiante unitária em qualquer  $\lambda$  do espectro visível, determina-se um conjunto importante de valores de três-estímulos, chamado de “estímulo de igual energia”, e é denotado por  $E$ , que obedece à Eq. 5 a seguir:<sup>[11,16]</sup>

$$E_\lambda = \bar{r}(\lambda)R + \bar{g}(\lambda)G + \bar{b}(\lambda)B \quad [\text{Eq. 5}]^{[11]}$$

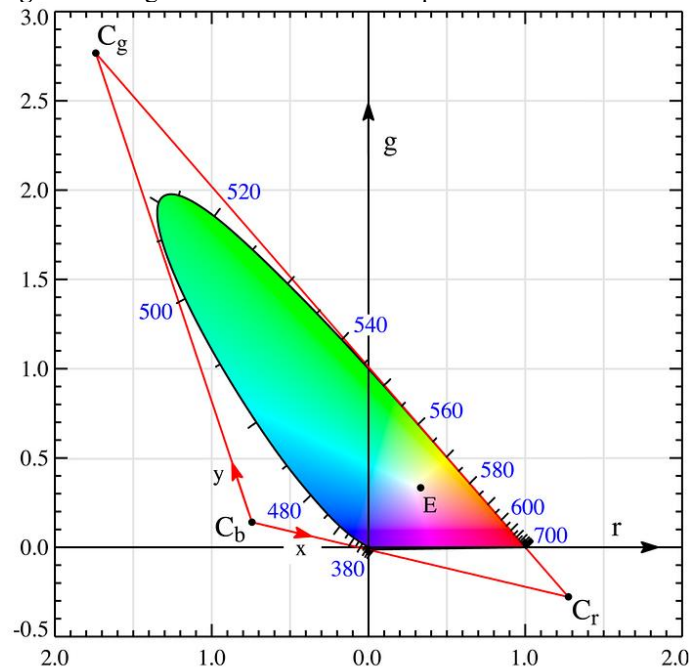
### 2.1.3. Sistemas colorimétricos

Considerando os conceitos apresentados é possível definir que, na prática, a colorimetria tem como principal objetivo obter resultados válidos para uma observação tricromática normal. Portanto, as propriedades de igualdade de cores de um observador tri-

cromático ideal são definidas em três funções independentes de comprimento de onda, ou as “funções de comparação de cores ideais para o observador”.<sup>[11,12]</sup>

Os resultados dessas funções ideais são definidos como a comparação de cores de um observador normal ou da média de um grupo de observadores como já definido. Consensualmente, as especificações de padrões de observação para uso em colorimetria e fotometria são providas pela CIE. A Figura 6 mostra a função de comparação de cores e a Figura 9, a seguir, mostra o diagrama cromático do padrão RGB de 1931 da CIE.<sup>[12,18]</sup>

**Figura 9.** Diagrama de crominância do padrão RGB CIE de 1931.



Fonte: Retirado do site Medium.<sup>[17]</sup>

Porém, as funções de cores e as coordenadas de crominância correspondentes incluem valores negativos, os quais são inconvenientes na prática, por isso, a CIE adotou uma transformação no sistema tri-cromático RGB para um sistema XYZ de estímulos primários imaginários, ou seja, não correspondem a nenhuma cor real, isso porque, no espaço de três estímulos, eles são representados por vetores que saem do domínio dos vetores que representam estímulos reais.<sup>[11,18]</sup>

A grande ideia do sistema XYZ é que uma das três funções poderia ser transformada de modo que se alinhasse muito de perto com a função de luminosidade de 1924,  $V(\lambda)$ .<sup>[6,11]</sup> Isso significa que a luminosidade de uma cor pode ser determinada inteiramente a partir da observação de um dos valores primários dessa cor, assim o estímulo Y foi escolhido como equivalente à luminância da cor a ser igualada. Além disso, antes dos computadores, a

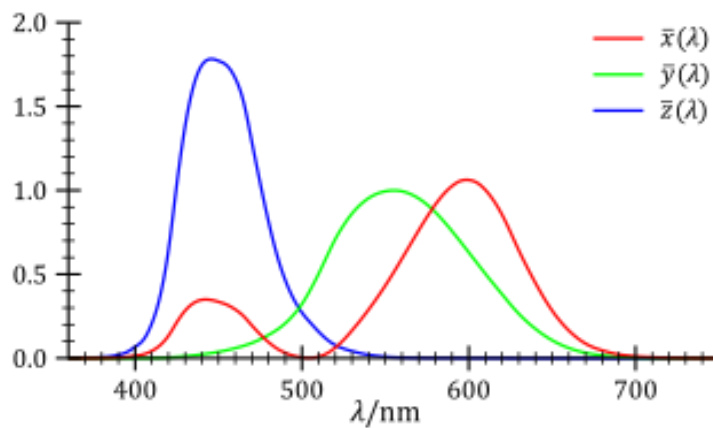
matemática manual envolvida no uso das CMFs era difícil e havia um desejo de ter funções que não contivessem valores negativos. [17,18]

A Figura 10 mostra a função de comparação de cores e a Figura 11 o diagrama cromático do padrão XYZ de 1931 da CIE e a relação entre os valores RGB e XYZ é dada pela equação linear Eq.6 a seguir:

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 2.7690 & 1.7518 & 1.1300 \\ 1.0000 & 4.5907 & 0.0601 \\ 0.0000 & 0.0565 & 5.5943 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix}$$

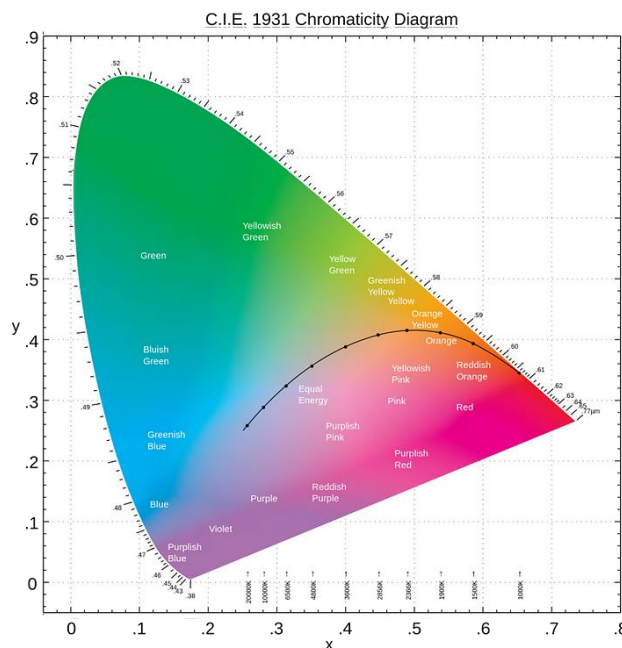
[Eq. 6]<sup>[11]</sup>

**Figura 10.** Função de comparação de cores do padrão XYZ CIE de 1931.



Fonte: Retirado do site Medium.<sup>[17]</sup>

**Figura 11.** Diagrama de crominância do padrão XYZ CIE de 1931.

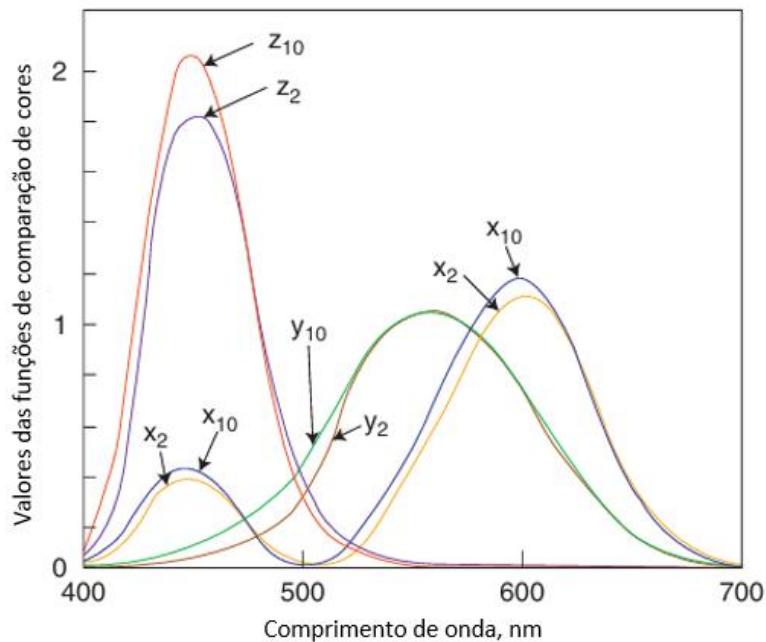


Fonte: Retirado do site Medium.<sup>[17]</sup>

Em 1964, a CIE definiu um Observador Padrão adicional, desta vez baseado em um campo visual de  $10^\circ$ , que ficou conhecido como Observador Padrão Suplementar  $10^\circ$ . Para termos uma ideia do que seria um campo de visualização de  $2^\circ$ , comparado com um campo de visualização de  $10^\circ$  à uma distância de 50 cm, o campo de visão de  $2^\circ$  seria um círculo de  $\varnothing$  1,7 cm, enquanto que o campo de visão de  $10^\circ$  seria um círculo de  $\varnothing$  8,8 cm. O observador Padrão  $2^\circ$  deve ser utilizado para ângulos de visualização entre  $1^\circ$  a  $4^\circ$ , enquanto que o Observador Padrão  $10^\circ$  deve ser utilizado para ângulos de visualização maiores que  $4^\circ$ .<sup>[18]</sup>

Na Figura 12 a seguir observa-se a função de comparação de cores e o diagrama cromático para o sistema RGB e para o sistema transformado XYZ.

**Figura 12.** Comparação das curvas das CMFs XYZ CIE de  $2^\circ$  vs  $10^\circ$ .



Fonte: Adaptado de Broadbent, A. D.<sup>[25]</sup>

#### 2.1.4. Modelos de cores

Vários modelos de cores foram propostos, frequentemente baseados em pelo menos três componentes, para descrever uma cor, similar ao sistema XYZ. Para muitas aplicações que utilizam imagens coloridas, a representação RGB, muitas vezes, gera bons resultados, devido, principalmente, à não uniformidade desse espaço de cores e a junção entre luminância e crominância.<sup>[12,18]</sup> Todas as cores reais terão suas coordenadas dentro de um limite que define o espaço de cores XYZ. A diferença de cor entre duas amostras então corresponde à distância entre os dois pontos para suas respectivas coordenadas.<sup>[18,19]</sup> Um grande problema com o sistema CIE XYZ é que o espaço de cores não é visualmente uniforme.

Isto significa, por exemplo, que dois verdes, que são apenas perceptivelmente diferentes em cores, terão uma distância consideravelmente maior entre si do que se comparado a posições no espaço de um par de vermelhos ou azuis, que tem a mesma diferença perceptiva. Assim, uma regra não pode ser formada entre as cores. Isto anula um dos principais objetivos de ter um sistema de medição de cores.<sup>[19]</sup>

Assim, dependendo da aplicação, torna-se necessário o uso de diferentes representações de cores. Na Tabela 1 podem ser consultados vários métodos de conversão do espaço RGB para outras representações de cores.

**Tabela 1.** Fórmulas de conversão entre espaços de cores do padrão NTSC (Comitê Nacional de Sistemas de Televisão – *National Television Systems Committee*).

$R_N G_N B_N$	$\begin{bmatrix} R_N \\ G_N \\ B_N \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1.910 & -0.532 & -0.288 \\ -0.985 & 2.000 & -0.028 \\ 0.058 & -0.118 & 0.898 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix}$
$YIQ$	$\begin{bmatrix} Y \\ I \\ Q \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.000 & 1.000 & 0.000 \\ 1.407 & -0.842 & -0.451 \\ 0.932 & 1.189 & 0.233 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix}$
$YUV$	$\begin{bmatrix} Y \\ U \\ V \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.000 & 1.000 & 0.000 \\ 1.688 & -0.058 & -0.251 \\ 0.015 & 1.456 & 0.441 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix}$
$UVW$	$\begin{bmatrix} U \\ V \\ W \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.667 & 0.000 & 0.000 \\ 0.000 & 1.000 & 0.000 \\ -0.500 & 1.500 & 0.500 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix}$

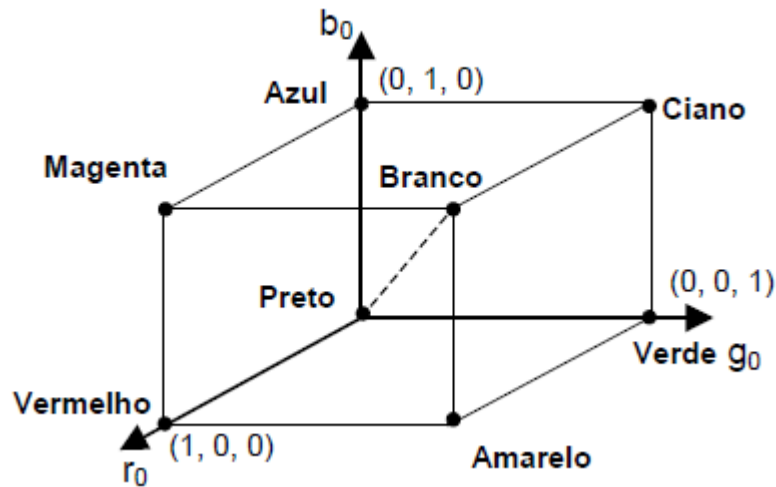
Fonte: Retirado de Martindale, D.<sup>[20]</sup>

Os espaços apresentados acima foram, basicamente, propostos para uso do padrão *NTSC* (Comitê Nacional de Sistemas de Televisão – *National Television Systems Committee*). Porém, os modelos mais comuns são o RGB, HSI e CIELab.<sup>[20-22]</sup>

### Modelo de Cores RGB

O modelo de cores RGB que segue o padrão *NTSC* usa as três cores primárias para descrever uma cor em uma imagem colorida, na qual cada componente da cor representa um eixo ortogonal em um espaço euclidiano tridimensional, como mostra a Figura 13.<sup>[21,22]</sup>

Figura 13. Cubo do modelo de cores RGB.



Fonte: Adaptado de Weeks, A. R.<sup>[21]</sup>

Seis dos oito vértices da Figura 13 acima descrevem as três cores primárias e as três secundárias, já os dois cantos adicionais representam os tons branco e preto. A linha pontilhada corresponde a todas as combinações de valores iguais das três componentes de cor, o que resulta nos possíveis níveis de cinza que uma imagem digital pode conter neste padrão.<sup>[21]</sup>

O modelo de cores RGB é um espaço normalizado e é definido por suas componentes como mostra a Eq.7:

$$r = \frac{R}{R_{max}}, g = \frac{G}{G_{max}} \text{ e } b = \frac{B}{B_{max}} \quad [\text{Eq. 7}]^{[21]}$$

Onde  $R_{max}$ ,  $G_{max}$  e  $B_{max}$  são as intensidades máximas para cada componente de cor correspondente e  $r$ ,  $g$  e  $b$  são as componentes normalizadas em valores de 0 a 1. Esse modelo, portanto, trata uma imagem como um conjunto de três imagens independentes em tons de cinza, cada uma representando as cores vermelho, verde e azul.<sup>[21]</sup>

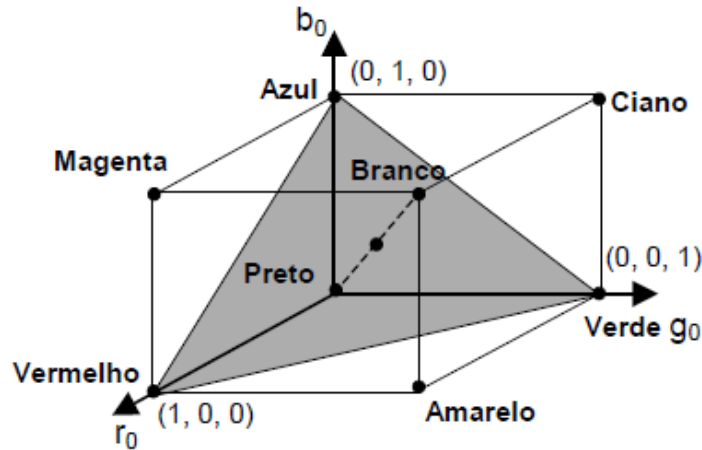
A problemática com este modelo é que não há produção de componentes de cor que refletem com fidelidade o sistema visual humano. Assim, um outro modelo de cores que produz componente que melhor se assemelham ao entendimento das cores é aquele determinado pelas componentes matiz, saturação e intensidade, ou o modelo HSI.<sup>[22]</sup>

### Modelo de Cores HSI

Existem muitos modelos para representar os componentes de matiz e saturação de uma imagem colorida, porém o mais comum é o HSI, que é baseado no triângulo de Maxwell, derivado do cubo de cores RGB. A Figura 14 mostra o triângulo HSI como um plano que

intercepta as coordenadas  $r$ ,  $g$  e  $b$ , transformando o cubo tridimensional em um triângulo bidimensional, separando o componente luminosidade da crominância. [21-23]

**Figura 14.** Triângulo do modelo de cores HSI particionando o cubo RGB.



Fonte: Adaptado de Weeks, A. R. [21]

Nos vértices encontram-se as três cores primárias, já no centro do triângulo é traçada uma linha conectando os tons branco e preto, correspondendo aos possíveis níveis de cinza de uma cor e o centro corresponde às cores com nível de saturação zero. [21]

Assim, o componente saturação ( $S$ ) é medido pelo comprimento de um vetor que parte do centro do triângulo até uma determinada cor (Eq.4), sendo as bordas equivalentes a 100% de saturação, já a matiz ( $\theta$ ) é definida como um ângulo entre  $0^\circ$  e  $360^\circ$  e tem como referência uma linha traçada do centro até o vértice da cor vermelha, correspondente a  $0^\circ$ . Dessa forma, para transformar os componentes de cor RGB para HSI e vice-versa é necessário que o componente matiz,  $H$ , seja dividido em três regiões, *i.e.*, quando a componente azul é a menor das três, a cor encontra-se na base do triângulo e o ângulo da matiz está entre  $0^\circ$  e  $120^\circ$ , já se a componente vermelha for a mínima, a cor está do lado direito do triângulo e entre  $120^\circ$  e  $240^\circ$ , e, finalmente, se a componente verde for a mínima, a cor se encontra do lado esquerdo e entre  $240^\circ$  e  $360^\circ$ . [21-25]

As componentes desse modelo, intensidade ( $I$ ), saturação ( $S$ ) e matiz ( $\theta$ ), em termo de componentes RGB, são definidas pelas Eq. 8, 9 e 10 a seguir:

$$I = \frac{R+G+B}{3} \quad [\text{Eq. 8}]^{[21]}$$

$$S = 1 - 3 \times \min [r, g, b] \quad [\text{Eq. 9}]^{[21]}$$

$$\theta = \cos^{-1} \left[ \frac{\frac{2}{3}(r-\frac{1}{3}) - \frac{1}{3}(g-\frac{1}{3}) - \frac{1}{3}(b-\frac{1}{3})}{\sqrt{\left(\frac{2}{3}\right) \left[ \left(r-\frac{1}{3}\right)^2 + \left(b-\frac{1}{3}\right)^2 + \left(g-\frac{1}{3}\right)^2 \right]}} \right] \quad [\text{Eq. 10}]^{[21]}$$

É importante notar que sempre que  $b > g$ , a matiz será maior que  $180^\circ$ , pois, neste caso, por ser um cosseno inverso e esse ser definido dentro do intervalo de  $0^\circ$  a  $180^\circ$ ,  $0^\circ$  é substituído por  $360^\circ - 0^\circ$ .<sup>[21]</sup> Portanto, ao calcular os valores de intensidade, saturação e matiz para cada pixel da imagem RGB original é possível gerar três imagens em níveis de cinza representando cada componente.<sup>[25]</sup>

Porém, uma das limitações deste modelo é o fato de que se considera cada componente do RGB como igual quando se calcula a intensidade, ou luminosidade, de uma imagem. Sendo assim, o melhor mapeamento para a intensidade pode ser obtido através da transformação apresentada na Eq. 11, na qual o valor (V), ou brilho, substitui a componente I, dando origem ao modelo de cores HSV.<sup>[21,25]</sup>

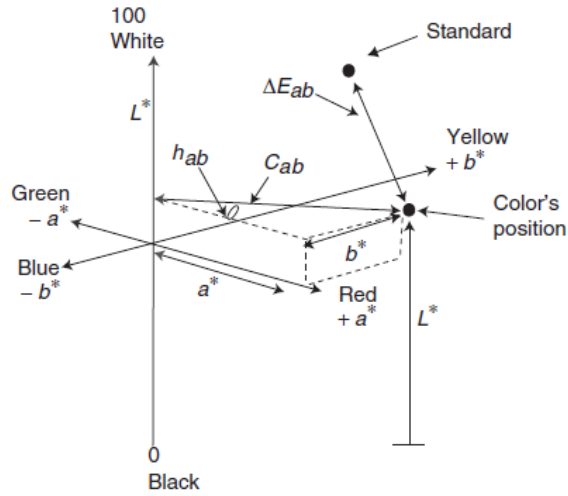
$$V = 0,299R + 0,587G + 0,114B \quad [\text{Eq. 11}]^{[21]}$$

### Modelo de cores CIELab

O espaço de cores CIELab foi desenvolvido a partir das primeiras tentativas de transformar os valores de três-estímulos X, Y e Z em coordenadas que providenciariam um espaço de cores mais visualmente uniforme e baseado no conceito Lab, descrito na teoria da visão de cores de Hering.<sup>[25]</sup> Esse sistema foi apresentado em 1976 e se tornou muito popular para especificação de cor e diferenciação de cores.<sup>[18]</sup>

Apesar das células cone no olho humano responderem aos estímulos primários de vermelho, verde e azul, os impulsos nervosos enviados para o córtex visual são sinais em termos de luminosidade ( $L^*$ ) e cores opostas vermelho – verde ( $a^*$ ) e amarelo – azul ( $b^*$ ). O valor de  $L^*$  para uma determinada cor varia entre 100 (branco perfeito) e 0 (preto perfeito), enquanto o valor de  $a^*$  varia entre valores positivos para vermelho e negativos para verde, da mesma forma, os valores de  $b^*$  positivos são para amarelo e os negativos para azul, como mostra a Figura 15.<sup>[25,26]</sup>

**Figura 15.** Modelo tridimensional de cores CIELab.



Fonte: Retirado de Broadbent, A. D.<sup>[25]</sup>

O cálculo desses valores é, usualmente, feito a partir da divisão dos valores de três-estímulos, usando o observador padrão suplementar de 1964, pelo seu valor de três-estímulos correspondentes de uma referência selecionada ( $X_n$ ,  $Y_n$  e  $Z_n$ )<sup>[25]</sup>, como mostra as Eqs. 12, 13 e 14 a seguir:

$$L^* = 116 \times \left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{1/3} - 16 \quad [\text{Eq. 12}]^{[25]}$$

$$a^* = 500 \times \left[ \left(\frac{X}{X_n}\right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{1/3} \right] \quad [\text{Eq. 13}]^{[25]}$$

$$b^* = 200 \times \left[ \left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n}\right)^{1/3} \right] \quad [\text{Eq. 14}]^{[25]}$$

É importante denotar que as funções de raiz cúbica para  $(X/X_n)$ ,  $(Y/Y_n)$  e  $(Z/Z_n)$  são substituídas por outras fórmulas caso seus valores sejam iguais ou menores que 0,008856, ou seja, para tons muito escuros.<sup>[26]</sup>

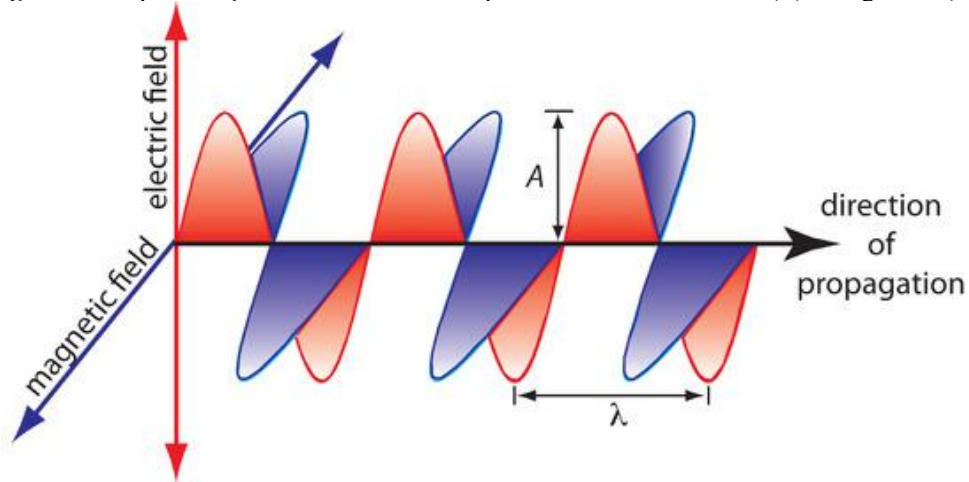
## 2.2. A espectroscopia em dispositivos colorimétricos

Uma característica que destaca os dispositivos colorimétricos de outras técnicas analíticas é a possibilidade de obter um dispositivo sustentável e barato, mas sem abrir mão da sensibilidade se comparado às suas contrapartes.<sup>[27]</sup> Neste seguimento será apresentado os principais conceitos espectroscópicos utilizados em dispositivos analíticos colorimétricos.

### 2.2.1. Fundamentos espectroscópicos

A radiação eletromagnética (REM) é composta por dois vetores, elétrico (E) e magnético (H), que oscilam em planos perpendiculares como mostra a Figura 16. Radiações de alta energia (como raios gama e raios X) são compostas por ondas muito curtas, com comprimentos de onda tão pequenos quanto  $10^{-16}$  metros de comprimento de onda ( $\lambda$ ), de crista a crista. Ondas mais longas possuem muito menos energia e, portanto, são menos perigosas para os seres vivos, como a luz visível e ondas de rádio.<sup>[28]</sup>

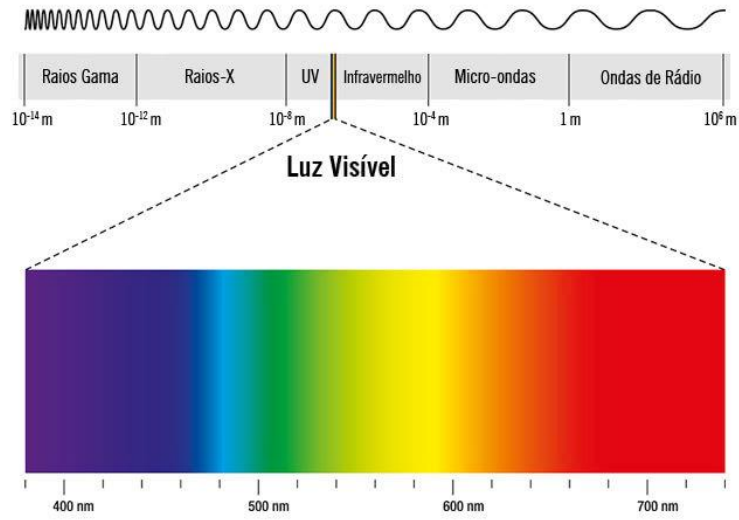
**Figura 16.** Representação da REM e suas componentes vetoriais elétrica (E) e magnética (H).



**Fonte:** Retirado de Harvey, D.<sup>[29]</sup>

O estudo da absorção e emissão de luz, bem como de outras radiações pela matéria, é conhecido como espectroscopia. Essa técnica consiste em decompor a luz em seus comprimentos de onda constituintes, de forma semelhante ao processo pelo qual um prisma separa a luz em um arco-íris de cores.<sup>[29,30]</sup> Por isso, é um método analítico utilizado para quantificação, caracterização e análise estrutural de uma substância com base na interação da luz com essa substância. Na colorimetria, por exemplo, quando uma amostra colorida é irradiada por uma luz monocromática, essa absorve em um certo comprimento de onda dentro do espectro visível, que é composta por comprimentos de onda entre 380 e 780 nm, como apresentado na Figura 17, então relaciona-se a quantidade de luz absorvida ou transmitida pela amostra com a concentração do analito de interesse.<sup>[29,30]</sup>

**Figura 17.** Comprimentos de onda de radiação eletromagnética.



**Fonte:** Retirado do site todamateria.<sup>[31]</sup>

A cor de um objeto está diretamente relacionada ao comprimento de onda da luz que o mesmo absorve. Esse fenômeno é explicado pela teoria das cores complementares, que estabelece que a cor percebida é aquela complementar à luz absorvida.<sup>[32]</sup> O círculo cromático na Figura 18 mostra a relação complementar entre as cores absorvidas por uma solução e as transmitidas. Assim, quando uma amostra absorve luz de uma determinada cor, percebemos o objeto como a cor complementar, ou seja, a cor oposta à cor absorvida no círculo cromático. Por exemplo, se uma amostra absorve luz vermelha, a amostra aparecerá esverdeada aos nossos olhos.<sup>[32]</sup> Esse princípio é essencial na espectrofotometria para relacionar a concentração de substâncias em solução com base na absorção seletiva de luz em diferentes comprimentos de onda.<sup>[32,33]</sup>

**Figura 18.** Círculo cromático de cores.



**Fonte:** Retirado do site comodesenvolver.<sup>[33]</sup>

A relação entre a intensidade da cor com a concentração do corante nas soluções provavelmente foi observado antes que a lei exata fosse expressa matematicamente, porém foi Pierre Bouguer quem escreveu que a transmissão da luz estava relacionada com a espessura do meio absorvente.<sup>[2,34]</sup> Várias décadas depois, Johann Heinrich Lambert fez a afirmação de que quando um feixe de luz monocromático atravessa um meio transparente homogêneo, cada camada deste meio absorvia uma fração igual da luz incidente, independentemente da intensidade da luz. A partir desta conclusão foi enunciada a seguinte lei: “*A intensidade da luz emitida decresce exponencialmente à medida que a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente.*” Igualmente importante, foi observado que: “*Quanto maior for a quantidade de luz captada, maior será o número de partículas dentro de um determinado volume e maior será a área de superfície de uma partícula única.*”<sup>[2,34]</sup>

Quase um século depois, em 1852, August Beer mostrou que a concentração tem um efeito semelhante na intensidade da luz transmitida e absorvida em relação à espessura da camada.<sup>[2,34]</sup> Dessa forma, a concentração da substância que gera uma variação na cor da solução está diretamente correlacionada com a intensidade da cor, dando origem à lei de Lambert-Beer, geralmente escrita como a relação entre a transmitância (T), Eq.15 e a absorbância (A), Eq. 16:<sup>[34,35]</sup>

$$T = \frac{I}{I_0} \text{ ou } T(\%) = 100 \times \frac{I}{I_0} \quad [\text{Eq. 15}]^{[34]}$$

$$A = -\log T, \text{ logo, } A = \log \frac{I_0}{I} \quad [\text{Eq. 16}]^{[34]}$$

A transmitância é a razão entre a intensidade da luz transmitida (I) e a intensidade da luz incidente (I<sub>0</sub>), e é geralmente expressa em %, já a absorbância, ou densidade óptica, é uma grandeza adimensional e representa a quantidade de luz absorvida pela substância colorida e possui uma relação logarítmica com a transmitância; com uma absorbância de 0 correspondendo a 100% de transmitância e uma absorbância de 1 correspondendo a 10% de transmitância.<sup>[34,35]</sup> Porém, a lei de Lambert-Beer (conhecida também como Lei de Beer) é a relação linear entre a absorbância e a concentração,  $A \propto c$ , dessa forma, define-se a Eq.17 a seguir:<sup>[34]</sup>

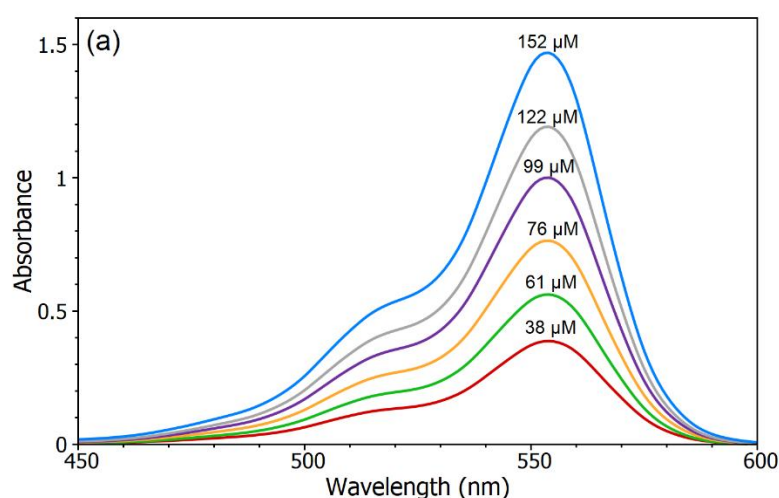
$$A = \varepsilon \times c \times l \quad [\text{Eq.17}]^{[34]}$$

Na qual, “ $\varepsilon$ ” é o coeficiente de absorção molar ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), uma propriedade dependente da amostra e mede o quão fortemente essa absorve um determinado comprimento

de onda da luz. O “ $c$ ” é a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$  ou M) do analito e o “ $l$ ” é o caminho óptico da cubeta utilizada (cm) na medida, sendo tipicamente 1 cm. Esta relação linear entre absorbância e concentração possibilita o cálculo da concentração de um analito a partir da absorbância ou transmitância. [34,35]

Para demonstrar essa relação linear tome como exemplo cinco soluções de Rodamina B em água que foram medidas utilizando um espectrofotômetro de feixe duplo, [35] mostrado na Figura 19.

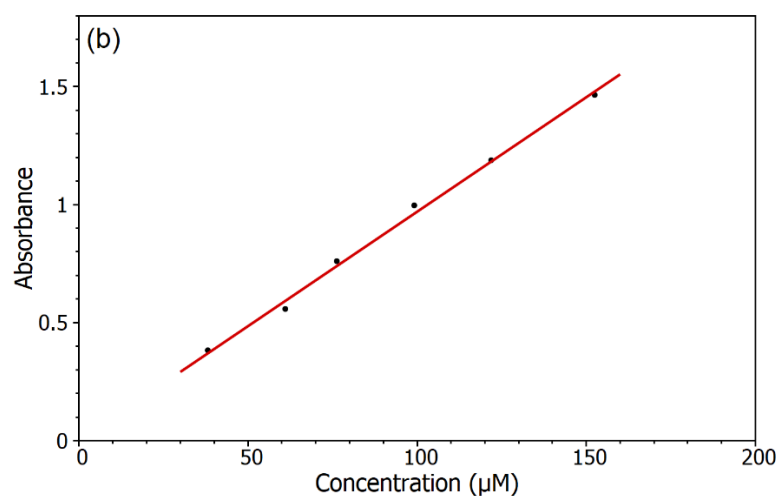
**Figura 19.** Espectros de absorção de soluções de Rodamina B com diferentes concentrações em água, medidos utilizando o espectrofotômetro de feixe duplo.



**Fonte:** Retirado do site Edinst. [35]

A partir desses espectros de absorção, criou-se uma curva de calibração linear de absorbância versus concentração, como mostra a Figura 20.

**Figura 20.** Curva analítica de Rodamina B em água medida em  $\lambda_{\text{max}}$ .



**Fonte:** Retirado do site Edinst. [35]

Usando essa curva analítica, a concentração de uma solução desconhecida de Rodamina B pode ser determinada medindo sua absorvância, o que é a principal utilidade da lei de Lambert-Beer. [35]

Porém, quando falamos de medir a cor de uma superfície difusa como o papel que é a base para os dispositivos analíticos microfluídicos a base de papel ( $\mu$ PADs), diferentemente do exemplo acima em que a Rodamina B está em solução, o parâmetro a ser relacionado com a concentração do analito é a reflectância, que caracteriza o processo de reflexão e é definida como a razão entre o fluxo radiante refletido e o fluxo radiante incidente (ou potência), ou seja, é regime separado para análise espectroscópica de superfícies e camadas de materiais. Assim, conhecer as propriedades ópticas do papel é de uma grande importância em toda a indústria de fabricação do mesmo. [36]

Geralmente, a reflectância em qualquer comprimento de onda pode ser considerada a soma de dois componentes: reflectância regular (especular), para a qual se aplicam as conhecidas equações de Fresnel, e reflectância difusa (não direcional). [36,37] Para uma discussão qualitativa, será suficiente considerar uma incidência perpendicular, para o qual a refletividade especular ( $r$ ) é dada pela Eq. 18:

$$r = \frac{[(n-1)^2 + k_0^2]}{[(n+1)^2 + k_0^2]} \quad [\text{Eq. 18}]^{[37]}$$

Na qual, “ $n$ ” é o índice de refração relativo do material da amostra e “ $k_0$ ” é o índice de absorção, definido através da Lei de Lambert-Beer mostrado na Eq. 19:

$$I = I_0 \times \exp\left[\frac{-4\pi k_0 d}{\lambda}\right], \text{ onde, } \alpha = \frac{4\pi k_0}{\lambda} \quad [\text{Eq. 19}]^{[37]}$$

Aqui “ $d$ ” é a distância percorrida no material absorvente para o qual a radiação é reduzida de  $I_0$  para  $I$  e “ $\alpha$ ” é o coeficiente de absorção característico da substância. [37] Tanto a reflectância especular quanto a difusa geralmente contribuem para a refletância total, cuja magnitude depende do tamanho da partícula, estrutura, microrrelevo e outras propriedades que definem o "estado da superfície". Em medições de laboratório, a reflectância geralmente é feita em pequenas áreas, neste caso predomina a refletância difusa. [36,37]

### 2.2.2. Sensibilidade, padronização, erros e ruídos

Na Química Analítica, a sensibilidade refere-se à capacidade de um instrumento ou método de detectar pequenas mudanças na concentração de um analito. [28] Para métodos colorimétricos, a sensibilidade é comumente definida como a menor mudança detectável na cor

que pode ser correlacionada com uma mudança mensurável na concentração do analito. Portanto, uma alta sensibilidade significa uma maior resposta na mesma concentração de um analito. É importante saber qual a menor concentração do analito necessária para obter um sinal que possa ser distinguido do ruído de fundo, chamado de Limite de Detecção (LD), caso contrário, não há como obter os valores da medida de interesse. [38,39]

A sensibilidade de um dispositivo colorimétrico é crítica, pois determina o LD da substância em investigação. [28] O LD é uma métrica de desempenho crucial, especialmente em situações onde é necessário detectar quantidades vestigiais de uma substância, como em monitoramento ambiental ou diagnósticos clínicos. [28,40] Assim, para padronizar um método analítico deve-se, também, determinar a sensibilidade do método ao analito,  $k_A$ , mostrado na Eq.20.

$$S_{total} = k_A \times n_A + S_{reag} \quad [\text{Eq.20}]^{[39]}$$

Na qual,  $S_{total}$  é o sinal total medido,  $k_A$  é a sensibilidade do método em relação ao analito,  $n_A$  é a quantidade do analito, em mol, e  $S_{reag}$  é a parte do sinal que é atribuída ao meio. Em princípio, é possível derivar o valor de  $k_A$  para qualquer método analítico, se todas as reações químicas e processos físicos responsáveis pelo sinal forem completamente compreendidos. Porém, esses cálculos são inviáveis caso não haja um modelo teórico suficientemente desenvolvidos dos processos físicos ou se as reações químicas apresentarem comportamento não ideal. Nessas situações deve-se determinar o valor da sensibilidade analisando uma ou mais soluções padrão, cada uma com uma quantidade conhecida do analito. [40,41]

Para simplificar, há a opção de assumir que  $S_{reag}$  é um meio branco adequado, permitindo substituir  $S_{total}$  pelo sinal do analito,  $S_A$ , porém, também é possível medir o sinal do meio e mantê-lo constante. [41] A maneira mais simples de determinar o valor de  $k_A$  é usar uma padronização de ponto único, na qual medimos o sinal de um padrão,  $S_{std}$ , que contém uma concentração conhecida de analito,  $C_{std}$ . Substituindo esses valores na Eq.18, obtemos o valor de  $k_A$ . Uma vez determinado  $k_A$ , podemos calcular a concentração de analito em uma amostra medindo seu sinal,  $S_{samp}$ , e calculando  $C_A$  usando a Eq.21. [40,41]

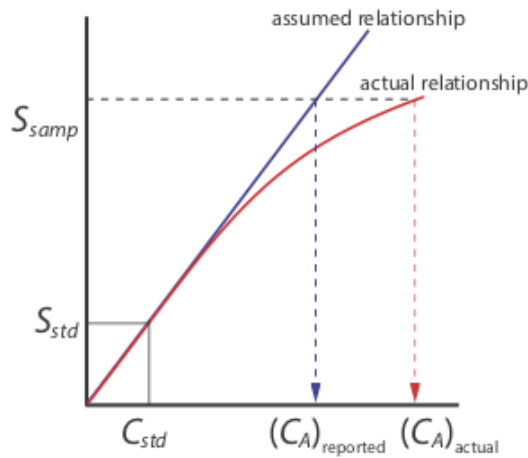
$$k_A = \frac{S_{std}}{C_{std}}, \text{ logo, } C_A = \frac{S_{samp}}{k_A} \quad [\text{Eq.21}]^{[39]}$$

A padronização de ponto único é o método mais indesejável para padronizar um método. Há duas razões para isso, primeiro, qualquer erro na determinação de  $k_A$  é transferido

para o cálculo de  $C_A$  e, o segundo motivo é o fato de que o valor experimental de  $k_A$  baseia-se em uma única concentração de analito. <sup>[40-42]</sup> Para estender o valor de  $k_A$  a outras concentrações de analito, é necessário assumir uma relação linear entre o sinal e a concentração do analito, uma suposição que muitas vezes não é verdadeira. Apesar dessas limitações, padronizações de ponto único são amplamente utilizadas quando o intervalo esperado de concentrações do analito é pequeno. Nessas condições, geralmente é seguro assumir que  $k_A$  é constante, como é o caso de laboratórios clínicos, nos quais muitos analisadores automáticos usam apenas um padrão. <sup>[41]</sup>

A melhor maneira de padronizar um método é preparar uma série de padrões, cada um contendo uma concentração diferente de analito. Os padrões são escolhidos de forma a abranger o intervalo esperado de concentrações do analito. Uma padronização de múltiplos pontos deve incluir pelo menos três padrões, embora mais padrões sejam preferíveis. Um gráfico de  $S_{std}$  versus  $C_{std}$  é chamado de curva de calibração, como mostrado na Figura 19. <sup>[40,41]</sup> Há duas vantagens em uma padronização de múltiplos pontos. Primeiro, embora um determinado erro em um padrão introduza uma variância, seu efeito é minimizado pelos demais padrões. Segundo, como o sinal para várias concentrações de analito é medido, não é necessário assumir que  $k_A$  é independente da concentração do analito. Em vez disso, constrói-se uma curva de calibração semelhante à "relação real", mostrado na Figura 21. <sup>[40-42]</sup> Portanto, apesar de utilizarem os mesmos princípios espectroscópicos, há grandes diferenças entre os dispositivos colorimétricos modernos e suas contrapartes mais tradicionais. Esses dispositivos são suscetíveis a várias fontes de erro e ruído, o que pode comprometer a precisão e a confiabilidade das medidas. Na espectroscopia de absorção, a precisão é limitada por erros indeterminados, como o ruído instrumental e são introduzidos quando medimos a absorbância. <sup>[43]</sup>

**Figura 21.** Exemplo mostrando como uma padronização de ponto único leva a um erro na concentração reportada de um analito caso assuma-se incorretamente que  $k_A$  é constante.



**Fonte:** Retirado do site Chem.libretexts.<sup>[39]</sup>

A incerteza de uma medida está mais relacionada à exatidão, que mede o quão próximo um valor medido está do valor verdadeiro ou aceito. Mas também pode ter conexões indiretas com a precisão, que mede a reprodutibilidade ou consistência das medições, ou seja, o quão próximas estão as medidas entre si, independentemente de quão corretas elas sejam.<sup>[43]</sup> Assim, embora a incerteza não esteja diretamente associada à precisão, medições com alta precisão (baixa dispersão) podem reduzir componentes da incerteza, especialmente em medições repetidas.<sup>[43]</sup> A precisão geralmente é pior para baixas absorvâncias e para altas absorvâncias, espera-se, portanto, que a precisão varie com a transmitância.<sup>[44]</sup> Adicionalmente, é possível derivar uma expressão matemática entre a precisão e a transmitância ao reescrever a lei de Beer como na Eq. 22 a seguir:

$$C = -\frac{1}{\epsilon b} \log T \quad [\text{Eq. 22}]^{[41]}$$

Então, completa-se com a propagação de incerteza, o que resulta em:

$$s_c = -\frac{0,4343}{\epsilon b} \times \frac{s_t}{T} \quad [\text{Eq. 23}]^{[41]}$$

Onde “ $s_t$ ” é a incerteza absoluta da transmitância. Assim, dividindo a Eq.23 pela Eq.22, temos a incerteza da concentração:

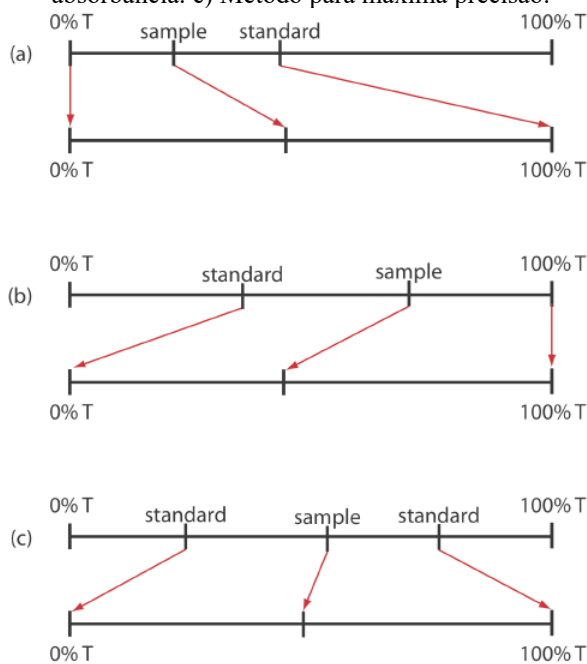
$$\frac{s_c}{C} = \frac{0,4343 s_t}{T \log T} \quad [\text{Eq. 24}]^{[41]}$$

Logo, se conhecermos a incerteza absoluta na transmitância, podemos determinar a incerteza relativa na concentração para qualquer transmitância medida. O valor de  $s_t$  é

diretamente proporcional à transmitância para erros indeterminados que resultam de flutuações na intensidade da fonte e da incerteza no posicionamento da amostra dentro do espectrômetro. Este último é particularmente importante porque as propriedades ópticas de uma célula de amostra não são uniformes.<sup>[43,44]</sup> Como resultado, reposicionar a célula de amostra pode levar a uma alteração na intensidade da radiação transmitida. Esta fonte de erros indeterminados geralmente é o fator diferencial entre espectrofotômetros UV/Vis de alta qualidade quando a absorbância é relativamente baixa.<sup>[28,43]</sup>

Quando a incerteza relativa na concentração ( $s_c$ ) é limitada pela resolução de leitura da transmitância ( $T\%$ ) é possível melhorar a precisão da análise ao redefinir os valores de  $T(100\%)$  com um branco e  $T(0\%)$  ao impedir que a radiação da fonte alcance o detector.<sup>[44,45]</sup> Assim, se a absorbância for muito alta, a precisão pode ser melhorada redefinindo  $T(100\%)$  usando uma solução padrão do analito cuja concentração seja maior que a da amostra.<sup>[44]</sup> Já para uma amostra cuja absorbância seja muito baixa, a precisão pode ser melhorada ao redefinir  $T(0\%)$  usando uma solução padrão do analito com uma concentração menor que a da amostra, neste caso é necessário usar uma curva de calibração, pois a relação linear entre absorbância e concentração deixa de existir. A precisão pode ser melhorada ainda mais se houver a combinação desses dois métodos, como mostrado na Figura 22.<sup>[44,45]</sup>

**Figura 22.** Métodos para melhorar a precisão. a) Método para alta absorbância. b) Método para baixa absorbância. c) Método para máxima precisão.



**Fonte:** Retirado do site Chem.libretexts.<sup>[41]</sup>

### 2.3. Dispositivos colorimétricos avançados

A detecção colorimétrica pode ser explorada para fins qualitativos e quantitativos. Em um ensaio qualitativo, o desenvolvimento ou a mudança de coloração pode ser suficiente para fornecer respostas do tipo SIM/NÃO, sendo útil para a triagem rápida de marcadores potencialmente relevantes. Por outro lado, em ensaios quantitativos, a leitura colorimétrica é baseada na quantificação de um analito por meio da correspondência entre a intensidade da cor e sua concentração.<sup>[46]</sup>

Apesar da possibilidade de avaliar a mudança de cor a olho nu, diferentes metodologias para análise colorimétrica foram desenvolvidas, pois a análise visual tem natureza qualitativa e a comparação da mudança de cor após a reação pode ser interpretada de maneira diferente por cada usuário devido à iluminação, aos níveis de contraste e até mesmo ao tempo de resposta do observador. Em adição à abordagem quantitativa, a detecção colorimétrica pode ser explorada por meio de diferentes ferramentas de análise, como métodos multivariados e univariados. A maioria dessas ferramentas é baseada em modelos matemáticos e em técnicas quimiométricas, que descrevem a intensidade da cor como uma resposta analítica, permitindo assim a análise de diversos analitos em um único dispositivo.<sup>[46,47]</sup>

Avanços tecnológicos ocorrem a todo o tempo, com isso a tendência de diminuir as dimensões físicas e facilitar o uso e transporte dos aparelhos, sem perder a utilidade é muito comum e tem ocorrido também na química analítica. Neste seguimento será apresentado um exemplo de dispositivo colorimétrico com boa sensibilidade e alta sustentabilidade para diagnósticos na área da saúde e no meio ambiental, seja voltado para agricultura ou detecção de poluentes.

#### 2.3.1. $\mu$ PADs

Os dispositivos analíticos microfluídicos a base de papel ( $\mu$ PADs, *Microfluidic Paper-Based Analytical Device*) vem ganhando cada vez mais espaço na ciência e podem ser ideais para atender aos critérios ASSURED devido às suas principais características como o baixo custo, praticidade, rapidez, biodegradabilidade e principalmente, por ser utilizável no local de coleta da amostra.<sup>[46-48]</sup> O papel é um material barato, flexível e pode ser facilmente modificado. Além disso, devido a sua estrutura porosa, permite a devida imobilização dos reagentes colorimétricos como também o transporte de fluido através da propriedade física da capilaridade.<sup>[49,50]</sup> Estudos recentes demonstram que a pegada de carbono na produção de  $\mu$ PADs é significativamente menor em comparação com métodos analíticos tradicionais. Por

exemplo, a fabricação de espectrofotômetros envolve a utilização de metais pesados, plásticos não recicláveis e consumo elevado de energia.<sup>[51,52]</sup> Ademais, a geração de resíduos também é consideravelmente menor. Enquanto um ensaio convencional pode gerar diversos resíduos químicos e necessitar de solventes orgânicos, os  $\mu$ PADs utilizam volumes mínimos de reagentes e evitam o uso de substâncias tóxicas, alinhando-se às práticas da Química Verde.<sup>[53]</sup> Os  $\mu$ PADs têm impacto direto em diversos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU).<sup>[10]</sup> Destacam-se os seguintes:

- **ODS 3 - Saúde e bem-estar:** Os  $\mu$ PADs possibilitam diagnósticos rápidos e de baixo custo, especialmente em regiões remotas, contribuindo para a prevenção e controle de doenças.<sup>[54,55]</sup>
- **ODS 6 - Água potável e saneamento:** Aplicados no monitoramento de qualidade da água, esses dispositivos auxiliam na detecção de contaminantes, promovendo o acesso à água segura.  $\mu$ PADs têm se mostrado eficazes na detecção de metais pesados em fontes de água, com sensibilidade comparável a métodos laboratoriais tradicionais.<sup>[56]</sup>
- **ODS 12 - Consumo e produção responsáveis:** Devido ao uso de materiais biodegradáveis e baixo consumo de reagentes, os  $\mu$ PADs fomentam a produção sustentável.<sup>[57,58]</sup>
- **ODS 13 - Ação contra a mudança global do clima:** A redução de emissões de carbono durante a produção e o uso de  $\mu$ PADs contribuem para a mitigação das mudanças climáticas.<sup>[57,58]</sup>

Esses impactos reforçam a relevância dos  $\mu$ PADs como ferramentas essenciais para avançar na agenda global de sustentabilidade. No entanto, o método de detecção associado a esses dispositivos também precisa atender aos critérios ASSURED e ODS.

Alguns estudos têm se dedicado a analisar as propriedades do material ao adicionar um agente cromogênico e o comportamento das amostras em relação à sua reação colorimétrica nesse substrato, por exemplo.<sup>[48,49]</sup> Portanto, a detecção colorimétrica, que se baseia no movimento passivo da amostra, sob efeito capilar, para a zona de teste do dispositivo, na qual o analito reage com determinados cromógenos que produzem uma diferença de cor detectável, é o método de detecção mais utilizado para quantificar e identificar os analitos de interesse em  $\mu$ PADs, sendo a primeira técnica de detecção relatada para o uso desses dispositivos.<sup>[40]</sup> Embora outros métodos de detecção tenham sido integrados a dispositivos baseados em papel, a

detecção colorimétrica tem sido amplamente utilizada para garantir a portabilidade e a facilidade de uso dos  $\mu$ PADs sem comprometer a sensibilidade ou a especificidade. Essa técnica apresenta um custo relativamente mais baixo em comparação com outros métodos, como a detecção eletroquímica, por exemplo. [46,59]

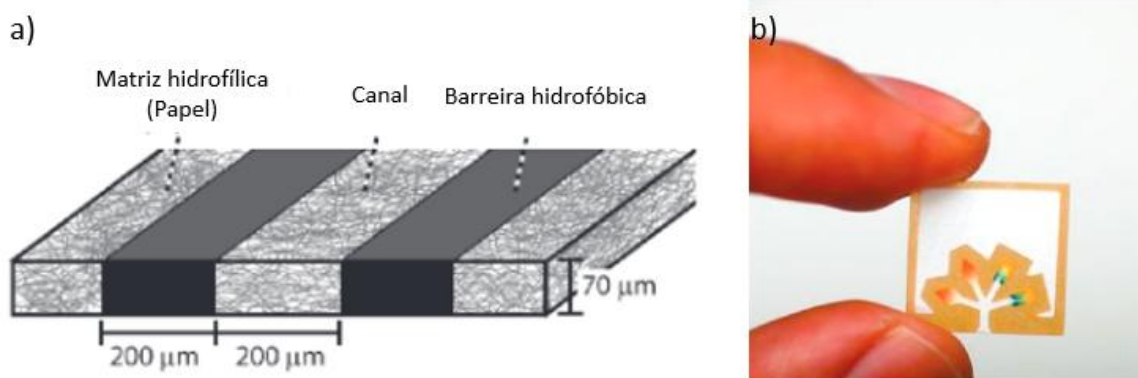
Além disso, faz uso de dispositivos eletrônicos muito mais simples e portáteis para captura de imagem, como smartphones, scanners e câmeras digitais, esses têm sido usados como detectores de refletância em conjunto com  $\mu$ PADs desde os primeiros relatos nesta tecnologia, com base nos princípios da espectroscopia de reflectância difusa. [36] Considerando a acessibilidade global e comercial desses dispositivos eletrônicos, a detecção colorimétrica torna-se bastante atrativa quando associada a plataformas de papel. [40,53] Talvez uma das principais vantagens do uso de  $\mu$ PADs aliados à detecção colorimétrica seja a capacidade de realizar múltiplos testes simultâneos em um único dispositivo utilizando a mesma amostra. [53] No entanto, alguns efeitos de *lateral flow* em dispositivos baseados em papel podem ser prejudiciais à uniformidade da cor dentro da zona de detecção, e por isso, a geometria e aspectos físicos de um  $\mu$ PAD são fundamentais em seu desenvolvimento. [46,60]

A geometria e o *layout* do  $\mu$ PAD utilizado dependem inteiramente da aplicação intencional. Embora as propriedades do fluido possam impactar significativamente o desempenho e o transporte fluídico, uma das maiores preocupações nas reações colorimétricas em papel é a uniformidade da cor. [52] Os fatores que influenciam a formação da cor, resultante da reação colorimétrica entre o cromógeno e o analito, dependem da interação química entre o substrato e o analito, do tempo de secagem, da cinética da reação, da taxa de absorção e o fluxo capilar, que é uma propriedade determinante no desempenho das reações colorimétricas em dispositivos baseados em papel. [46] Quando consideramos dispositivos que não exigem *lateral flow*, como *spot tests* (testes pontuais), deve-se prestar atenção à uniformidade da cor e à interação química entre o substrato e o analito para garantir uma resposta analítica confiável. [60]

Os  $\mu$ PADs podem ser modelados em duas ou três dimensões para transportar fluidos nas dimensões horizontal ou horizontal e vertical, respectivamente. Os métodos mais comuns de fabricação dependem da criação de barreiras físicas, como o corte seletivo no papel, ou hidrofóbicas através da impressão com cera, jato de tinta ou flexográfica, como mostrado na Figura 23. [61]



**Figura 24.** Funcionamento e exemplo de design. a) Esquema a de um canal microfluídico à base de papel. b) Exemplo de um dispositivo fabricado.



Fonte: Adaptado de Martinez, A.<sup>[64]</sup>

O exemplo principal desta revisão são os AgroPADs, ou seja, μPADs voltados para a agricultura, seguindo os princípios da agricultura 4.0, também conhecida como agricultura digital. Atualmente, os procedimentos adotados para quantificação dos cátions trocáveis do solo são baseados em titulação ( $H^+ + Al^{3+}$ ), espectrofotômetro de absorção atômica ( $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ ) e fotômetro de chama ( $K^+$ ). A espectroscopia de absorção atômica, por exemplo, envolve equipamentos de custo, operação e manutenção elevados e, além disso, geralmente está disponível em laboratórios longe do ponto de coleta do solo. Ademais, o agricultor não tem autonomia de monitorar o solo e saber quando é necessário fazer a adubação ou a calagem, ficando dependentes dos laboratórios de pesquisas, dificultando, desse modo, tomadas de decisões rápidas, práticas e assertivas. No entanto, é importante ressaltar que os μPADs têm algumas limitações. A capacidade de detecção e a sensibilidade desses dispositivos podem ser inferiores aos métodos tradicionais de análise.<sup>[65]</sup>

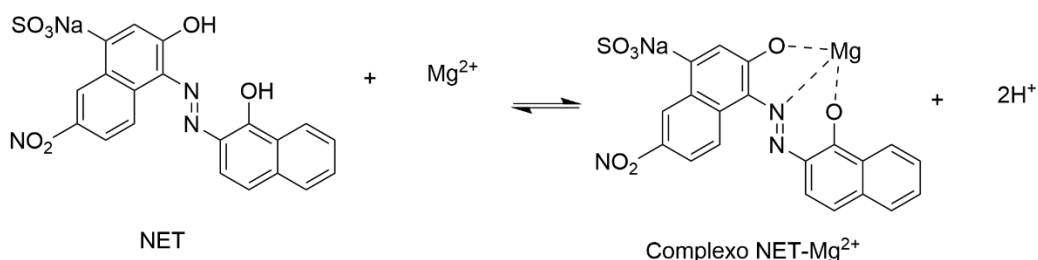
O principal mecanismo químico envolvido na quantificação desses cátions trocáveis é a titulação de complexação, ou quelatometria, é um dos métodos titulométricos clássicos desenvolvidos para a análise química rápida e quantitativa de íons metálicos. Os íons de interesse são titulados com o quelante de escolha por meio de uma reação de complexação de coordenação e rapidamente formam complexos monodentados ou multidentados estáveis. O quelante às vezes é chamado de reagente complexante ou, mais simplesmente, titulante. O ponto de viragem pode ser identificado por um corante indicador metalocrômico, que mostra uma mudança de cor, ou por outros indicadores instrumentais, como eletrodos seletivos de íons.<sup>[66]</sup>

No caso dos AgroPADs em questão são utilizados indicadores colorimétricos, como por exemplo a fenolftaleína para  $H^+ + Al^{3+}$  e  $H^+$  livres, no qual, espera-se a mudança de cor de incolor para rosa no ponto de viragem, o complexo do corante negro de eriocromo T (NET)

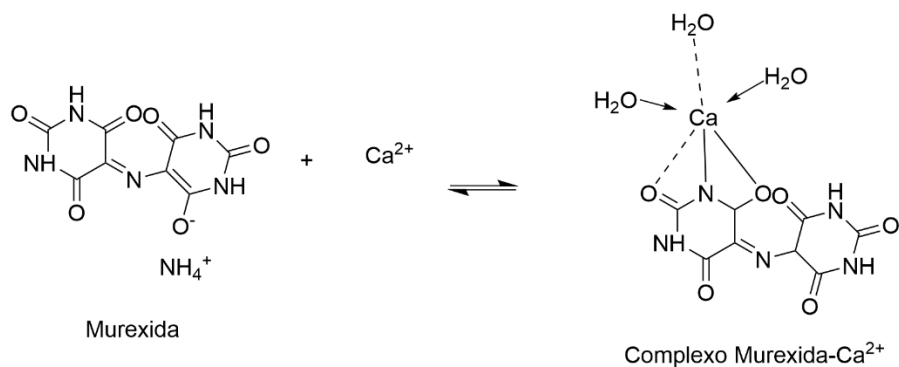
com  $Mg^{2+}$  (Figura 25a), nesse observa-se a mudança da cor azul à roxa, a murexida ou Calcon para o  $Ca^{2+}$ , que espera-se uma mudança de amarelo da murexida para vermelho-alaranjado do complexo (Figura 25b) com o cálcio e uma variação de azul para roxo em pH 13 para o Calcon, bem como a reação entre o ionóforo de potássio I, cromoionóforo I (CH1), tetraquis[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borato de sodio (NaTFPB), Pluronic F-127, dioctilo sebacato (DOS) e  $K^+$ , na qual a cor roxa é esperada.<sup>[67-69]</sup>

**Figura 25.** Exemplos de mecanismos de titulação de complexação. a) Mecanismo de complexação do negro de Eriocromo T (NET) com o íon  $Mg^{2+}$ . b) Mecanismo de complexação da murexida com o íon  $Ca^{2+}$ .

a)



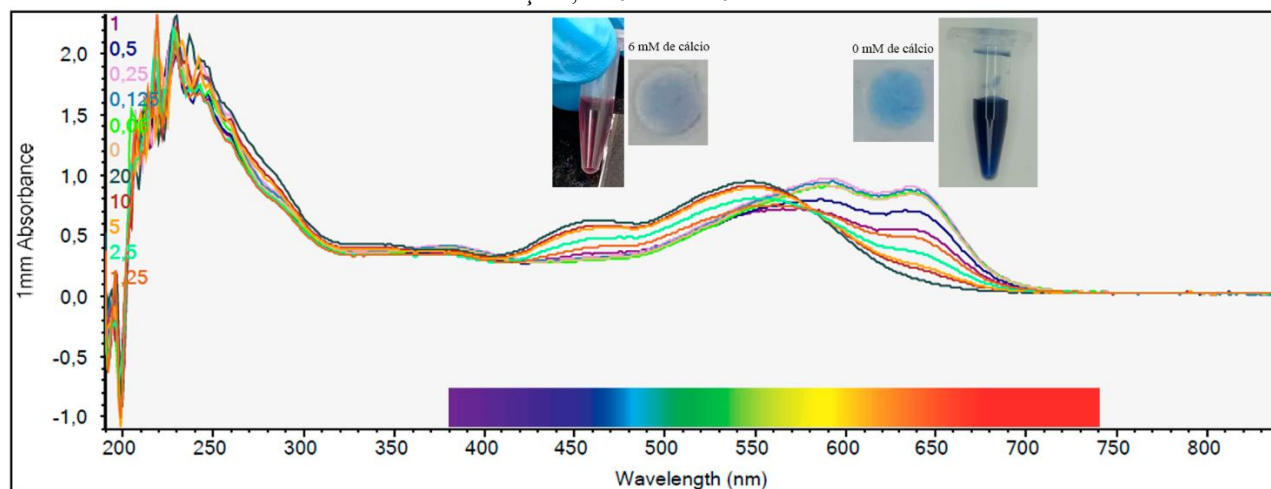
b)



Fonte: Adaptado de Albuquerque et al.<sup>[59]</sup>

Depreende-se, portanto, a necessidade de criar tecnologias que visem o aumento da produtividade agrícola e que, ao mesmo tempo, sejam modernas e conectadas. Diante disso, a construção de um dispositivo analítico microfluídico à base de papel para a análise simultânea de cátions trocáveis relacionados com os parâmetros de fertilidade solo que possam ser usados no local de coleta pelo agricultor foi proposto, na Figura 26 abaixo, está um exemplo de um espectro de UV/Vis de amostras de  $CaCl_2$  com concentrações conhecidas, variando de 0 mM ( $mmol L^{-1}$ ) até 20 mM, ao entrar em contato com o indicador colorimétrico Calcon, provocando uma mudança notável no espectro conforme a concentração de analito aumenta.

**Figura 26.** Comparação das curvas do espectro de UV/Vis da solução de Calcon com  $\text{Ca}^{2+}$  em diferentes concentrações, de 0 mM a 20 mM.



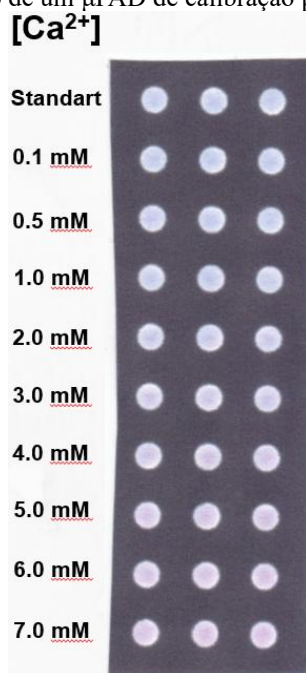
Fonte: Autoria própria

A partir desta clara diferença entre os espectros das soluções mais e menos concentradas em  $\text{Ca}^{2+}$  construiu-se um  $\mu\text{PAD}$  de padronização (Figura 27) para análise de bases trocáveis no solo, mais especificamente da reação entre o  $\text{Ca}^{2+}$  com o Calcon com uma solução de KOH para manter o pH 13 em meio de KCl, porém, por mais que a mudança de cor fosse visível entre a menor e a maior concentração as curvas de  $\Delta\text{RGB}$ , que seguem a Eq. 25, não apresentaram resultados significativos, como observado na Figura 28a. Assim, demonstra-se a importância de estudar e entender os demais modelos de cores, pois ao analisar o espectro HSV, mais especificamente a saturação, obteve-se o resultado mostrado na Figura 28b.

$$\Delta\text{RGB} = \sqrt{(R_t - R_0)^2 + (G_t - G_0)^2 + (B_t - B_0)^2} \quad [\text{Eq.25}]^{[59]}$$

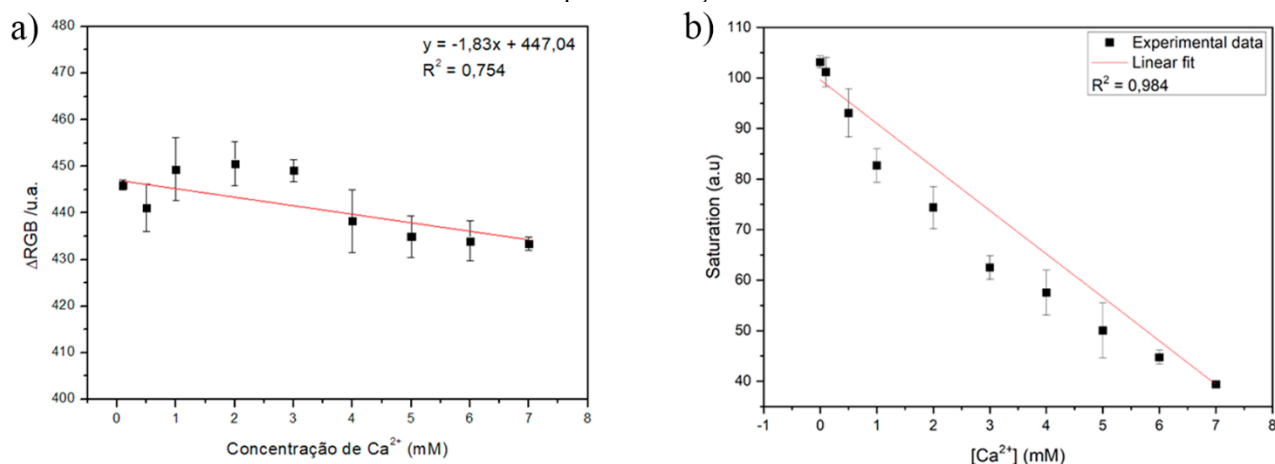
Para o RGB, a magnitude do vetor entre as coordenadas do branco (0 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ),  $R_0$ ,  $G_0$  e  $B_0$ , e o resto das coordenadas do teste contendo o analito ( $R_t$ ,  $G_t$  e  $B_t$ ), foi considerada para a obtenção do resultado mostrado na Figura 28a.

Figura 27. Exemplo de um  $\mu$ PAD de calibração para detecção de  $\text{Ca}^{2+}$ .



Fonte: Autoria própria

Figura 28. Exemplificação de curvas analíticas para AgroPADs. a) Curva analítica para o  $\Delta\text{RGB}$ . b) Curva analítica para a saturação.

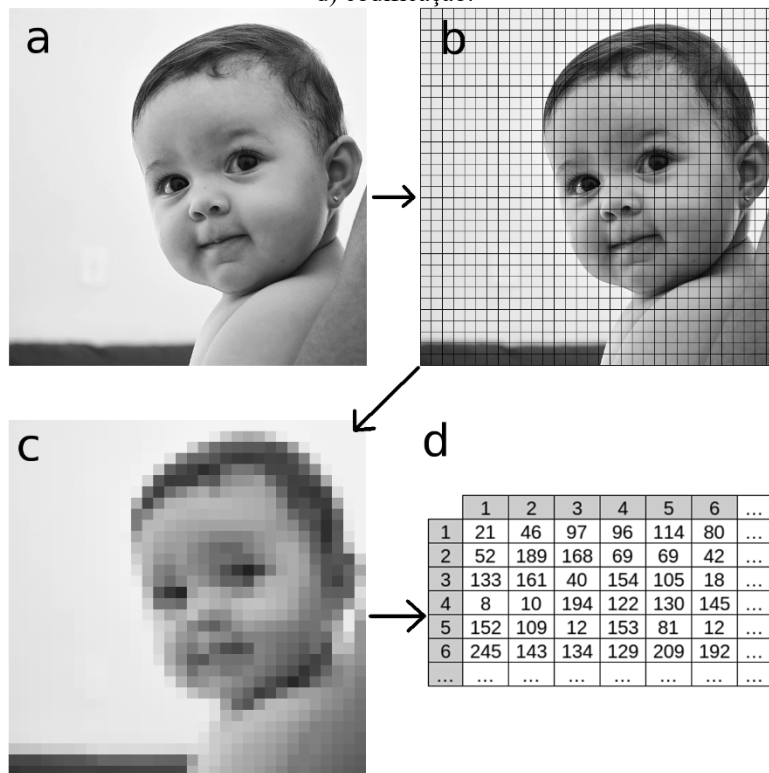


Fonte: Autoria própria

É importante denotar, então, que a aquisição dos dados de ensaio colorimétrico depende de alguns fatores, como luminosidade, área de detecção, gradiente de cor, entre outros. O mecanismo do software e do aplicativo para análise de cores fragmenta a imagem em elementos mais simples para análise de dados em pixels ou intensidade de cor na área analisada. Em geral, os sistemas gráficos utilizam o conceito de *color matching* para decompor a imagem em termos de pixels ou intensidade de cor, *i.e.*, cada pixel carrega um valor, como mostra a Figura 29, no caso de imagens coloridas, esses valores são representados pelas intensidades das componentes dos espaços de cores, como o RGB, HSV e CIELab já mostrados

anteriormente.<sup>[59]</sup> Assim, combinação das componentes dos modelos tridimensionais descrevem uma cor no espaço.<sup>[70]</sup>

**Figura 29.** Passos para a discretização de uma imagem: a) Imagem contínua, b) amostragem, c) quantização, e d) codificação.



Fonte: Retirado de Scuri, A.<sup>[71]</sup>

O processamento digital envolve a quantização da imagem. No contexto do processamento de sinal, quantização é o processo de converter valores contínuos em um conjunto limitado e discreto de valores, representando de forma aproximada os dados do mundo real por meio de uma forma digital.<sup>[70,71]</sup> Para representar sinais do mundo real, é possível medir a intensidade de uma imagem capturada por um sensor de câmera, por exemplo. Imagens coloridas apresentam dados das componentes dos espaços de cores, assim, a quantização pode ser realizada de forma individual ou conjunta (quantização vetorial), essa extração de informações das imagens digitais pode ser feita utilizando softwares de código aberto, como o ImageJ,<sup>[59]</sup> utilizado no exemplo da Figura 27.

### 3. Considerações Finais

Na ciência e na indústria contemporâneas, os instrumentos analíticos colorimétricos tornaram-se instrumentos essenciais. Desde seus primórdios históricos até seus usos atuais, os dispositivos analíticos colorimétricos demonstraram ser ferramentas fundamentais para a química analítica e suas aplicações práticas. Ao longo deste trabalho, destacaram-se os

dispositivos microfluídicos à base de papel ( $\mu$ PADs) como uma solução acessível, sensível e sustentável. Tais dispositivos possuem o potencial de revolucionar análises em áreas como monitoramento ambiental, diagnóstico clínico e agricultura, com destaque para a Agricultura 4.0.

Sua capacidade de realizar análises no ponto de coleta, sem necessidade de grandes infraestruturas laboratoriais, representa um avanço significativo, especialmente em regiões de recursos limitados. Além disso, a combinação de  $\mu$ PADs com tecnologias móveis, como *smartphones*, reforça a praticidade e a viabilidade econômica de seu uso. No entanto, desafios como a melhoria da sensibilidade e precisão ainda precisam ser superados para que esses dispositivos atinjam todo seu potencial. Com base nos conceitos e exemplos apresentados, é possível afirmar que a implementação de dispositivos analíticos colorimétricos, como os  $\mu$ PADs, contribui não apenas para a simplificação e popularização de análises químicas, mas também para o avanço da sustentabilidade na ciência.

#### 4. Referências Bibliográficas

- 1) Ohta, N., & Robertson, A. R. (2005). *Colorimetry*
- 2) SZABADVÁRY, F., & ROBINSON, A. (1980). *The history of analytical chemistry. Comprehensive Analytical Chemistry, 61–282.*
- 3) Kumari Shrestha, Yagya, and Shree Krishna Shrestha. ‘Fundamentals of Colorimetry’. *Advances in Colorimetry*, IntechOpen, 12 June 2024.]
- 4) Stock JT. The Duboscq Colorimeter and its Inventor. *Journal of Chemical Education*. 1994
- 5) Warner DJ. The Duboscq colorimeter. *Bulletin of the Scientific Instrument Society*. 2006
- 6) Jennifer D. T. Kruschwitz - *Field Guide to Colorimetry and Fundamental Color Modeling*, Spie., 2018
- 7) Wright, W.D. *Measurement of Colour*. A. Hilger Limited, 1944
- 8) Pasquale Palladino, Mariagrazia Lettieri, Simona Scarano, Maria Minunni, The golden age of colorimetry in diagnostics and drug analysis: Focus on the rising star of metabolite-based assays, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 180, 2024, 117947
- 9) UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases & World Health Organization. (2010). *Accessible quality-assured diagnostics: annual report 2009*. World Health Organization.
- 10) Objetivos de Desenvolvimento Sustentável – ONU. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 07 jan. 2025

- 11) Wyszecki, G. – Color Science: Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae, Wiley, New York, 1982.
- 12) Pratt, W. K. – Digital Image Processing – Wiley Interscience, Second Edition, 1991.
- 13) Bernardazzi, R. (2015). A cor e o figurino na construção de personagens na narrativa televisual: um estudo de caso da minissérie Capitu.
- 14) Commission Internationale de l'Éclairage (CIE). Publication No. 15, Colorimetry, 1986, 1971.
- 15) Commission Internationale de l'Éclairage (CIE). *Standard on Colorimetric Observers*, CIE S002, 1986.
- 16) Schmid, P. - Segmentation and Symmetry Measure for Image Analysis: Application to Digital
- 17) A Beginner's Guide to (CIE) Colorimetry. Chandler Abraham. Disponível em: <https://medium.com/hipster-color-science/a-beginners-guide-to-colorimetry-401f1830b65a>. Acesso em: 07 jan. 2025.
- 18) Schanda, J. Colorimetry: Understanding the CIE System. Wiley-Interscience, 2007
- 19) Colour Rendering of Spectra. John Walker. Disponível em: <https://www.fourmilab.ch/documents/specrend/>. Acesso em: 06 jan. 2025.
- 20) David Martindale and Alan W. Paeth. Television Color Encoding and “Hot” Broadcast Colors. In James Arvo, editor, Graphics Gems II, pages 147–158. Academic Press, Boston, 1991.
- 21) Weeks, A. R. – Fundamentals of Electronic Image Processing – IEEE Press, New York, 1996.
- 22) Russ, J. C. – The Image Processing Handbook – CRC Press, Florida, 1994.
- 23) C. A. Bouman: Digital Image Processing - January 8, 2025
- 24) Marcus, R. T. (1998). *The Measurement of Color. AZimuth*, 31–96.
- 25) Broadbent, A. D. (2010). *Colorimetry, Methods. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 372–379.
- 26) Outa N, Robertson AR. Colorimetry: Fundamentals & Applications. 2<sup>nd</sup> ed. Great Britain: IS & T; 2005, Chapter 1, Light, Vision, & Photometry;1-36. 2
- 27) Gummadi, S.; Kommoju, M. Colorimetric approaches to drug analysis and applications. A Review. *Am. J. PharmTech Res*, **2019**, 9(1), 14-37.
- 28) Pavia, D., Lampman, G. and Kriz, G. (2001) Introduction to Spectroscopy, a Guide for Students of Organic Chemistry. 3rd Edition, Thomson Learning, Boston, 22-368.

- 29) Overview of Spectroscopy. David Harvey. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Courses/Northeastern\\_University/10%3A\\_Spectroscopic\\_Methods/10.1%3A\\_Overview\\_of\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Courses/Northeastern_University/10%3A_Spectroscopic_Methods/10.1%3A_Overview_of_Spectroscopy). Acesso em: 12 jan. 2025.
- 30) Spectrophotometry and colorimetry. (n.d.). Disponível em: <https://rmit.pressbooks.pub/colourtheory1/chapter/colorimetry-spectrophotometry/>. Acesso em: 13 jan. 2025.
- 31) Espectro Eletromagnético: o que é, frequências e comprimentos de onda. Asth R. C. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/espectro-eletromagnetico/>. Acesso em: 13 fev. 2025
- 32) Spectrometry Primer. Disponível em: [https://sitesmedia.s3.amazonaws.com/chem/files/2012/08/Spectrophotometry\\_Primer.pdf](https://sitesmedia.s3.amazonaws.com/chem/files/2012/08/Spectrophotometry_Primer.pdf). Acesso em: 13 fev. 2025
- 33) Teoria das cores: breve guia para designers. Disponível em: <https://comodesenvolver.com.br/teoria-das-cores-breve-guia-para-designers/>. Acesso em: 13 fev. 2025
- 34) Dean Calloway, Beer-Lambert Law, *Journal of Chemical Education*, **1997** 74 (7), 744
- 35) The Beer-Lambert Law. (n.d.). Disponível em: <https://www.edinst.com/blog/the-beer-lambert-law/>. Acesso em: 13 jan. 2025.
- 36) Torrent, J., Barrón, V. (2015). Diffuse Reflectance Spectroscopy. SSSA Book Series, 367–385.
- 37) Wendlandt, W.W., Hecht, H.G. 1966. Reflectance spectroscopy. John Wiley & Sons, New York.
- 38) James A. Ferwerda and Chester F. Carlson. 2020. Fundamentals of color science. In ACM SIGGRAPH 2020 Courses (SIGGRAPH '20). Association for Computing Machinery, New York, NY, USA, Article 8, 1–46.
- 39) Determining the Sensitivity. David Harvey. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Analytical\\_Chemistry\\_2.1\\_\(Harvey\)/05%3A\\_Standardizing\\_Analytical\\_Methods/5.03%3A\\_Determining\\_the\\_Sensitivity](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey)/05%3A_Standardizing_Analytical_Methods/5.03%3A_Determining_the_Sensitivity). Acesso em: 13 jan. 2025.
- 40) L. D. Rothman, S. R. Crouch, and J. D. Ingle, Theoretical and experimental investigation of factors affecting precision in molecular absorption spectrophotometry, *Analytical Chemistry*, **1975** 47 (8), 1226-1233

- 41) Effect of Noise on Transmittance and Absorbance Measurements. David Harvey. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis\\_\(LibreTexts\)/13%3A\\_Introduction\\_to\\_Ultraviolet\\_Visible\\_Absorption\\_Spectrometry/13.03%3A\\_Effect\\_of\\_Noise\\_on\\_Transmittance\\_and\\_Absorbance\\_Measurements](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis_(LibreTexts)/13%3A_Introduction_to_Ultraviolet_Visible_Absorption_Spectrometry/13.03%3A_Effect_of_Noise_on_Transmittance_and_Absorbance_Measurements). Acesso em: 13 jan. 2025.
- 42) Willis B. Jones, Abigail J. Crossman, Bradley T. Jones. Calibration by Proxy. *Analytical Chemistry* **2024**, *96* (29), 11906-11914.
- 43) Treatment of Experimental Errors. (n.d.). Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Courses/University\\_of\\_California\\_Davis/Chem\\_4C\\_Lab%3A\\_General\\_Chemistry\\_for\\_Majors/zz%3A\\_Back\\_Matter/Appendix\\_A%3A\\_Treatment\\_of\\_Experimental\\_Errors](https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/Chem_4C_Lab%3A_General_Chemistry_for_Majors/zz%3A_Back_Matter/Appendix_A%3A_Treatment_of_Experimental_Errors). Acesso em: 13 jan. 2025.
- 44) Wilbur. Kaye, Low absorbance spectrophotometry, *Analytical Chemistry*, **1981** *53* (2), 369-374
- 45) Willis B. Jones, Bradley T. Jones. Rapid multi-channel dilution analysis for simultaneous measurements. *Microchemical Journal* **2025**, *208*, 112423.
- 46) H. A. Silva-Neto, L. R. Sousa, W. K. T. Coltro Chapter 4 – Colorimetric Paper-Based Analytical Devices, (Eds.), Paper-based Analytical Devices for Chemical Analysis and Diagnostics, Elsevier, (2022)
- 47) P.E. Resmi, P.V. Suneesh, T. Ramachandran, T.G. Satheesh Babu, Chapter Six - Paper based micro/nanofluidics devices for biomedical applications, Editor(s): Alok Pandya, Vijai Singh, Progress in Molecular Biology and Translational Science, Academic Press, Volume 186, Issue 1, 2022
- 48) XU, D.; HUANG, X.; GUO, J.; MA, X. Automatic smartphone-based microfluidic biosensor system at the point of care. *Biosensors and Bioelectronics*, Oxford, v. 110, p. 78–88, 2018.
- 49) OSTAD, M. A.; HAJINIA, A.; HEIDARI, T. A novel direct and cost effective method for fabricating paper-based microfluidic device by commercial eye pencil and its application for determining simultaneous calcium and magnesium. *Microchemical Journal*, New York, v. 133, p. 545–550, 2017.
- 50) AKYAZI, T.; BASABE-DESMONTS, L.; BENITO-LOPEZ, F. Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 1001, p. 1–17, 2018.

- 51) Hertwich, E.G. Increased carbon footprint of materials production driven by rise in investments. *Nat. Geosci.* **14**, 151–155 (2021).
- 52) Tecnologias sustentáveis. Claudia Conte Bortuluci. Disponível em: <https://semil.sp.gov.br/educacaoambiental/2023/07/tecnologias-sustentaveis/>. Acesso em: 14 jan. 2025.
- 53) Anastas, Paul T. and John Charles Warner. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford [England] ; New York, Oxford University Press, 1998.
- 54) Jefferies R., Ryan U.M., Irwin P.J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Vet. Parasitol.*
- 55) Karlikow, M., da Silva, S.J.R., Guo, Y. *et al.* Field validation of the performance of paper-based tests for the detection of the Zika and chikungunya viruses in serum samples. *Nat. Biomed. Eng* **6**, 246–256 (2022).
- 56) Yang Lin, Dmitry Gritsenko, Shaolong Feng, Yi Chen Teh, Xiaonan Lu, Jie Xu, Detection of heavy metal by paper-based microfluidics, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 83, 2016
- 57) Kung, C.-T., Hou, C.-Y., Wang, Y.-N., & Fu, L.-M. (2019). *Microfluidic paper-based analytical devices for environmental analysis of soil, air, ecology and river water. Sensors and Actuators B: Chemical*, 126855.
- 58) Meredith NA, Quinn C, Cate DM, Reilly TH 3rd, Volckens J, Henry CS. Paper-based analytical devices for environmental analysis. *Analyst*. 2016
- 59) J.R. Albuquerque et al. Low-cost precision agriculture for sustainable farming using paper-based analytical devices *RSC Adv.* (2024)
- 60) Pedro Estrela, Katarzyna M. Koczula, Andrea Gallotta; Lateral flow assays. *Essays Biochem* 30 June 2016
- 61) CATE, D. M., ADKINS, J. A., METTAKOONPITAK, J. & HENRY, C. S. Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Anal. Chem.* **87**, 19–41 (2014)
- 62) YETISEN, A. K., AKRAM, M. S. & LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip* **13**, 2210–2251 (2013)
- 63) OLTRO, W. K. T., JESUS, D. P., SILVA, J. A. F., LAGO, C. L. & CARRILHO, E. Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. *Electrophoresis* **31**, 2487–2498 (2010).

- 64) Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., & Carrilho, E. (2010). Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*, 82(1), 3–10.
- 65) INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/>. Acesso em: 24/05/2022.
- 66) Zhai, J., & Bakker, E. (2016). *Complexometric titrations: new reagents and concepts to overcome old limitations. The Analyst*, 141(14), 4252–4261.
- 67) GEROLD, Chase T.; BAKKER, Eric; HENRY, Charles S. Selective distance-based K<sup>+</sup> quantification on paper-based microfluidics. *Analytical chemistry*, v. 90, n. 7, p. 4894-4900, 2018.
- 68) MASOUD, M. S.; KASSEM, T. S.; SHAKER, M. A.; ALI, A. E. Studies on transition metal murexide complexes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Dordrecht, v. 84, n. 3, p. 549–555, 2006.
- 69) Mandal, Alispahić, A., Dedić, A., & Džudžević Čančar, H. (2019). *Spectrophotometric determination of magnesium oxide content in supplements of magnesium. Kemija u Industriji*, 68(5-6), 197–200.
- 70) Gonzalez, R.C. and Woods, R.E. (2018) *Digital Image Processing*. 4th Edition, Pearson Education, New York, 1022 p.
- 71) Scuri, A. (1999). *Fundamentos da imagem digital*.