

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Dissertação de Mestrado**

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROGRAMA COMPUTACIONAL PARA O  
TRATAMENTO DE IMAGENS DIGITALIZADAS E SUA APLICAÇÃO EM QUÍMICA  
ANALÍTICA**

Aluno: Fernando Schmidt

Orientador: Prof. Dr. Jarbas J. R. Rohwedder



UNIDADE ICA  
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP  
 V. E.  
 TOMAÇÃO DE 31369  
 PROG. 281197  
 C ☐ D ☒  
 PREÇO R\$ 11,00  
 DATA 13/02/97  
 N.º CPDE 9.000.99607.4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
 UNICAMP**

Sch34d Schmidt, Fernando  
 Desenvolvimento de um programa computacional para o tratamento de imagens digitalizadas e sua aplicação em química analítica / Fernando Schmidt. -- Campinas, [SP : s.n.], 1997.

Orientador: Jarbas José Rodrigues. Rohwedder

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. \*Tratamento de imagens. 2. Redes neurais. 3. Cromatografia em papel. I. Rohwedder, Jarbas José Rodrigues Rohwedder. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.



SCH34D

---

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece este encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto, e tem os olhos extintos.”

Albert Einstein  
(1879 - 1955)

“Na ciência, existem questões ingênuas, questões entediantes, questões apresentadas de modo inadequado. Mas cada questão é um grito para entender o mundo. Não existe pergunta estúpida.”

Carl Sagan  
(1934 - 1996)

## Agradecimentos

- Ao Jarbas, pela orientação;
- Ao professor Adilson do CBMEG, pelos materiais fornecidos;
- Aos professores Célio, Lauro e Ivo, pelas sugestões;
- Ao professor Ronei, pela ajuda no tratamento dos dados;
- A professora Isabel Bueno, pelo uso do espectrômetro de Fluorescência de Raios-X;
- A Shirley, e a Danielle, pela ajuda na parte experimental;
- Aos amigos, Elias, Cida, Rose, Helena, Noemi, Patrício, Lorena, Fernando, Jeferson, Renato, Airton, Roberta, Pedro, Eduardo, Henrique, Cleidiane, Viviane, Ileana, Cláudia, Saliba, Larisse, Daniel, Carol, Luís Eduardo, Silvana, Luís Larginho, César, Rodolpho, Marcelo, Lúcio, Patrícia, Marta, Ingrid, Éder e Eduardo Vasquez, pela solidariedade, apoio e amizade;
- Aos meus pais e aos meus irmãos, pelo apoio, carinho e compreensão;
- A Deus, pela paciência e saúde.

# ÍNDICE

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Índice de Tabelas.....	iii
Índice de Figuras.....	iv

## CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Construção de Imagens em Computadores.....	2
1.2. Digitalização de imagens através de Scanners.....	11
1.2.1. Refletância.....	12
1.3. Aplicações de Imagens.....	17
1.4. Redes Neurais.....	22
OBJETIVO DO TRABALHO.....	28

## CAPÍTULO 2

2.1. DESCRIÇÃO DO PROGRAMA DESENVOLVIDO.....	29
2.1.1. Leitura de refletância.....	35
2.2. Apresentação dos dados.....	37
2.3. Aquisição das imagens.....	39
2.4. PARTE EXPERIMENTAL	
2.4.1. Material e instrumentos utilizados.....	41
2.4.2. Cromatografia em papel - Violeta Ácido.....	42
2.4.3. Cromatografia em papel - Íons mercúrio (II) e chumbo (II).....	42
2.4.4. Indicadores de pH em papel.....	43

## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Comportamento do Scanner.....	45
3.2. Repetibilidade de aquisição das imagens.....	49
3.3. Cromatografia em papel - Violeta Ácido.....	53

3.3.1. Uso de filtros digitais.....	57
3.4. Cromatografia em papel - Íons mercúrio (II) e chumbo (II).....	63
3.5. Indicadores de pH suportados em papel.....	69

## CAPÍTULO 4

4.1. CONCLUSÃO.....	77
---------------------	----

## CAPÍTULO 5

5.1. Referências Bibliográficas.....	80
--------------------------------------	----

## RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um programa computacional, escrito em linguagem Visual Basic 3.0 para tratamento de dados de imagens digitalizadas, visando sua aplicação em determinação de espécies de interesse químico. As imagens foram digitalizadas utilizando-se um “scanner” comercial.

De maneira geral, pequenos volumes (1 - 2  $\mu\text{L}$ ) da solução contendo a espécie de interesse foi adicionada em suportes (na maioria das vezes, papel cromatográfico), então a imagem formada era digitalizada. Nos casos onde a espécie de interesse não forma imagens visíveis e portanto, impossíveis de serem adquiridas diretamente, um agente revelador foi adicionado ao suporte.

Para a avaliação do programa foram utilizadas cromatografia planar de corantes e metais tais como violeta ácido e íons  $\text{Pb(II)}$  e  $\text{Hg(II)}$ , respectivamente. O programa desenvolvido foi também aplicado na determinação de pH empregando indicadores suportados em papel e utilizando redes neurais artificiais no tratamento dos dados obtidos. Foi feita também uma avaliação para reprodutibilidade de imagens, com suporte homogêneo (fotografia) encontrando um desvio de 0,5 % para 6 medidas, e heterogêneo (papel) com um desvio de 1,2 % para 6 medidas.

Foram construídas curvas de calibração de concentração versus refletância, para o corante violeta ácido e para os metais. Foram encontrados um desvio médio de 17 % para triplicatas das medidas de refletância para o chumbo, e um desvio médio de 25% para triplicatas das medidas para o mercúrio, utilizando ditizona como reagente revelador. Foram encontradas faixas lineares de concentração entre 12,5 e 250  $\text{mg L}^{-1}$  para mercúrio, e de 5 a 125  $\text{mg L}^{-1}$  para chumbo. Para o corante violeta ácido foi encontrada uma faixa linear entre 50 e 400  $\text{mg L}^{-1}$  com desvios médios de 6,3 % para triplicatas.

A análise de imagens de papéis de pH em uma série de tampões de pH 1 a 13 permitiu estabelecer relações entre pH e intensidade de cor através do tratamento de dados com rede neural, apresentando uma precisão melhor que 4,6 %.



## ABSTRACT

This work describes a software, written in Visual Basic 3.0 language, developed for the treatment of data from digitized images aiming the determination of chemical species. The images were digitized using a commercial scanner.

In general, small volumes (1-2  $\mu\text{L}$ ) of the solution containing the species of interest was added on supports. After the image was formed it was digitized. In cases where the species of interest didn't produce colored images, a locating reagent was added to the support.

For the evaluation of the software, planar chromatography of violet acid and metal ions ( $\text{Pb(II)}$  and  $\text{Hg(II)}$ ) were used. The software was also employed for pH determination using dyes supported in commercial pH paper. Data were evaluated using artificial neural networks. An evaluation of the repeatability was also done by scanning images in a homogeneous (photograph) and heterogeneous support (chromatographic paper), and a r.s.d. of 0,5% and 1,2 % for 6 measurements were found, respectively

Calibration graphs of concentration versus reflectance were built for violet acid dye and metals solutions. A r.s.d. of 17 % was found for triplicate reflectance measurements of  $\text{Pb(II)}$ , and 25% as r.s.d. for triplicate measurements for  $\text{Hg(II)}$ , using ditizone as locating reagent. Linear range of concentration response was found for between 12,5 and 250  $\text{mg L}^{-1}$  for the  $\text{Hg(II)}$ , and between 5 and 125  $\text{mg L}^{-1}$  for the  $\text{Pb(II)}$ . For the violet acid dye a linear range between 50 and 400  $\text{mg L}^{-1}$  and 6,3 % as the r.s.d. for triplicate measurements, was found.

The analysis of images of pH papers obtained after dipping in a series of buffers of pH in the range 1 to 13, allowed to establish a relationship between pH and the intensity of colors through data treatment using artificial neural network. This methodology presented a r.s.d. of 4,6 %.

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Números binários para um sistema de 8 cores, utilizando-se o padrão RGB.....	6
<b>Tabela 2</b> - Números binários para um sistema de 16 cores, utilizando-se o padrão RGB.....	7
<b>Tabela 3</b> - Tipos de adaptadores gráficos mais utilizados em alguns dos seus modos de operação.....	9
<b>Tabela 4</b> - pHs das soluções tampão utilizadas no estudo das imagens de indicadores imobilizados em papel.....	44
<b>Tabela 5</b> - Resultado médio da integração de área para 6 diferentes aquisições de uma mesma imagem fotográfica de uma mistura de RNA de milho por eletroforese.....	52
<b>Tabela 6</b> - Estimativa do desvio padrão relativo em função dos fatores utilizados no filtro.....	60
<b>Tabela 7</b> - pHs das soluções tampão utilizadas no conjunto de treinamento.....	74
<b>Tabela 8</b> - Resultados da aplicação da rede neural para um conjunto de 8 dados.....	76

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Aquisição de uma imagem por um arranjo de CCD.....	3
<b>Figura 2</b> - Processo de digitalização de uma imagem.....	4
<b>Figura 3</b> - Formação das cores em um tubo de raios catódicos.....	10
<b>Figura 4</b> - Aquisição da imagem através de um scanner.....	11
<b>Figura 5</b> - Passagem de um feixe de luz de um meio para outro.....	13
<b>Figura 6</b> - Funcionamento de um densitômetro de transmissão.....	18
<b>Figura 7</b> - Representação de uma rede neural.....	23
<b>Figura 8</b> - Representação dos neurônios.....	24
<b>Figura 9</b> - Representações de um neurônio biológico e de uma sinapse.....	24
<b>Figura 10</b> - Representação da sinapse de um neurônio artificial.....	25
<b>Figura 11</b> - Funções de transferência usadas em redes neurais.....	26
<b>Figura 12</b> - Janela principal do programa desenvolvido para aquisição de dados de imagens.....	30
<b>Figura 13</b> - Ferramentas de trabalho .....	31
<b>Figura 14</b> - Procedimento de seleção da área da imagem e sua posterior varredura.....	32
<b>Figura 15</b> - Desenho esquemático mostrando a tela do computador, a janela de observação, a área de seleção e a representação da matriz gerada na varredura da imagem pela área de seleção.....	33
<b>Figura 16</b> - Escolha dos parâmetros de resolução no processo de leitura de uma imagem selecionada.....	34
<b>Figura 17</b> - Visualização gráfica gerada pelo programa.....	35

<b>Figura 18</b> - Escolha da região de background da mancha no cálculo da refletância.....	36
<b>Figura 19</b> - Pannel de resultados.....	39
<b>Figura 20</b> - Curva dos valores de refletância para padrões certificados em função dos valores de intensidades de cor (tons de cinza).....	45
<b>Figura 21</b> - Espectro de emissão da lâmpada do scanner.....	46
<b>Figura 22</b> - Refletância de quatro padrões em função do comprimento de onda.....	47
<b>Figura 23</b> - Imagem de uma mancha de corante Violeta Ácido e sua superfície 3D....	49
<b>Figura 24</b> - Imagem de uma mistura de RNA de milho separada por eletroforese e a representação gráfica em 3 dimensões de uma mancha.....	51
<b>Figura 25</b> - Gráfico da superfície de contorno de uma mancha do corante Violeta Ácido.....	53
<b>Figura 26</b> - Curva de calibração para corante Violeta Ácido em cromatografia em papel.....	55
<b>Figura 27</b> - Curva de calibração para corante violeta ácido em cromatografia em papel, dimensão da área de seleção aproximadamente 4 vezes maior que o tamanho da mancha.....	57
<b>Figura 28</b> - Desenho esquemático de funcionamento do filtro digital.....	59
<b>Figura 29</b> - Representação gráfica de uma superfície após a aplicação do filtro digital	62
<b>Figura 30</b> - Curvas de calibração para íons chumbo e mercúrio em cromatografia de papel.....	65
<b>Figura 31</b> - Aspecto das manchas dos metais eluídos após a aplicação da Ditizona.....	66
<b>Figura 32</b> - Curvas de calibração para os íons chumbo e mercúrio em papel por análise por Fluorescência de Raio-X.....	67
<b>Figura 33</b> - Padrão mostrando a mudança de cor para os quatro indicadores em função do pH.....	69

**Figura 34** - Variação de pH em relação a intensidade de cada componente R, G e B.. 71

**Figura 35** - Regiões lineares de resposta de intensidade de cor em função do pH..... 73

**Figura 36**- Arquitetura da rede neural B.P.E. utilizada..... 75

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

O uso de imagens, nos dias de hoje, está muito difundido pois está associado ao desenvolvimento de diversos setores da atividade humana, tais como aplicações industriais (controle da produção, segurança), comunicações (Internet, vídeo conferências) e pesquisa (aplicações em medicina, meteorologia, física, engenharias civil e mecânica)[1].

Estas aplicações continuam em crescente expansão principalmente devido à diminuição dos custos dos materiais empregados, ao grande desenvolvimento da microeletrônica e a informatização de sistemas para aquisição e processamento das imagens, as quais têm proporcionado um aumento no desempenho nestas aplicações [1].

Por muitos anos, a forma mais comumente empregada para a aquisição de imagens foi a fotografia. Mais recentemente, foram desenvolvidos novos dispositivos de aquisição de imagens, tais como a câmera de vídeo, onde as imagens são armazenadas em fitas magnéticas. Atualmente, existem sistemas modernos onde a aquisição da imagem pode ser feita por câmeras de vídeo e scanners e então, diretamente armazenadas na memória de microcomputadores.

Neste último dispositivo, a utilização de microcomputadores possibilitou um grande avanço na manipulação das imagens, com grande versatilidade e rapidez, permitindo suas aplicações em áreas onde eram pouco exploradas. Como exemplos destas aplicações pode-se destacar o seu emprego na medicina, onde a utilização de tomógrafos computadorizados tornou mais rápido o diagnóstico de doenças [2]; na agricultura, onde o processamento de fotos aéreas possibilita a localização de áreas deficientes em irrigação e adubação [2]; na indústria, onde a utilização de imagens vêm sendo empregada em diversos setores, podendo-se destacar o seu uso no controle de qualidade da produção.

As vantagens do emprego de microcomputadores na manipulação de imagens vêm sendo também exploradas em áreas de pesquisa, como química e bioquímica, onde suas utilizações têm crescido significativamente nos últimos anos.

Tais aplicações serão descritas posteriormente, destinando às próximas discussões a maneira pela qual uma imagem é manipulada com o auxílio de um microcomputador.

## 1.1. Construção de Imagens em Computadores

Quando uma imagem é capturada por algum dispositivo, e posteriormente transferida para um computador, ela é inicialmente decodificada em pontos e cada um desses pontos são devidamente armazenados em uma posição de memória. Posteriormente, estes pontos são transferidos para o monitor de vídeo do computador segundo critérios pré-estabelecidos, de modo a reconstruir a imagem.

Portanto, a qualidade de reprodução de uma imagem em computadores, depende das características do dispositivo de aquisição, do processador gráfico e do monitor de vídeo.

Os dispositivos de aquisição de imagens mais comumente empregados em conjunto com os computadores são as câmeras de vídeo e os scanners. Os modelos mais modernos destes equipamentos utilizam detectores eletrônicos baseados em dispositivos acoplados por carga (CCD<sup>#</sup>).

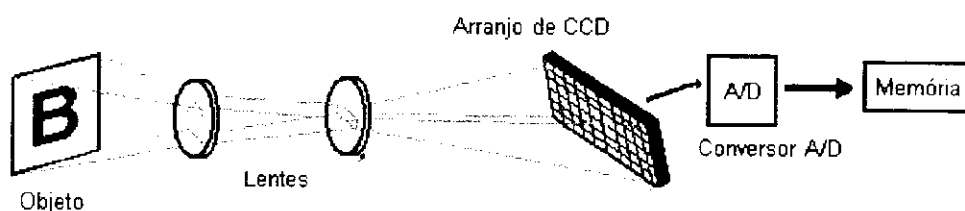
Estes detectores são formados por arranjos de semicondutores distribuídos em uma sequência linear ou em uma matriz retangular [3]. O primeiro modelo é mais comumente empregado em scanners, enquanto que o segundo é encontrado em câmeras de vídeo. Em ambos os casos, estes detectores são construídos com diferentes números de sensores, podendo variar de algumas centenas até milhares de elementos. Quanto maior o número de elementos empregados na aquisição da imagem, melhor será a sua qualidade ou, em outras palavras, melhor será a resolução da imagem obtida.

---

<sup>#</sup> do inglês. *Charge Coupled Device*

Cada elemento do detector transforma a radiação incidente proveniente de um objeto em uma diferença de potencial elétrico. Este sinal analógico é então convertido para um sinal digital, empregando uma interface apropriada. Esta conversão é necessária, pois os dispositivos de entrada, tais como os detectores de CCD, operam no domínio analógico, enquanto que os computadores operam no domínio digital. Então, para que possa haver transferências dos sinais de um instrumento para outro, é necessário o uso de uma interface [4].

A imagem adquirida após o processo de conversão, pode ser armazenada em uma memória, como mostra a Figura 1. Esta imagem pode ainda ser exibida no monitor de vídeo e, quando este processo ocorre, os dados da imagem agora no domínio digital, devem ser novamente convertidos para o domínio analógico, uma vez que, tais como os detectores de CCD, os monitores de vídeo só operam neste domínio.



**Figura 1** - Diagrama esquemático mostrando a aquisição de uma imagem por um arranjo de CCD, a conversão do sinal do domínio analógico para o digital e o seu armazenamento na memória.

Desta forma, pode-se dividir as interfaces gráficas em duas partes, as que controlam o dispositivo de aquisição de imagem e aquelas que controlam o dispositivo de geração de imagem. No primeiro caso, os sinais analógicos provenientes do dispositivo de aquisição de imagem são convertidos em sinais digitais. Este processo é realizado em circuitos integrados denominados de conversores analógico-digitais (A/D), sendo que os mais empregados são os de 8 bits. Estes circuitos são, em última instância, responsáveis pela velocidade e resolução do processo de digitalização da imagem, onde os sinais analógicos que representam a imagem são transformados em uma matriz de dados binários [4].

O passo seguinte é a exibição da imagem no monitor de vídeo, ocorrendo um processo contrário ao anterior. Agora, a matriz de dados binários que representa a imagem é

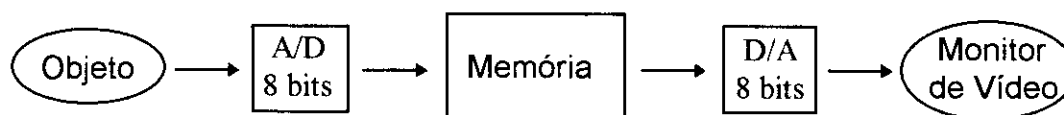


convertida em sinais analógicos empregando conversores digital-analógicos (D/A), sendo que os mais comuns são os de 8 bits, de acordo com o esquema mostrado na Figura 2. Estes sinais são enviados ao circuito eletrônico que controla o tubo de imagem [2].

Estas interfaces gráficas, também conhecidas como processadores de imagem, podem possuir tanto os conversores A/D como os D/A em uma única placa; neste caso estas interfaces são conhecidas como *Frame Grabber*.

Em certos casos, os dispositivos de aquisição de imagem são acoplados aos microcomputadores através de interfaces destinadas apenas ao controle dos mesmos, necessitando converter o sinal analógico para o digital e, portanto possuem somente o conversor A/D. Nestes casos, para que a imagem seja exibida no monitor de vídeo, é necessário o emprego das chamadas Placas Controladoras de Vídeo. Estas interfaces, encontradas normalmente em computadores, são responsáveis pela conversão digital-analógica dos dados que representam a imagem adquirida anteriormente, para que ela possa ser exibida no monitor de vídeo.

Neste processo, os sinais analógicos são enviados para o canhão de elétrons do tubo de imagem, modificando sua deflexão e intensidade do feixe de elétrons, durante a construção da imagem na tela do monitor de vídeo.



**Figura 2** - Desenho esquemático do processo de digitalização de uma imagem e sua exibição no monitor de vídeo, do computador.

Existem duas tecnologias para se gerar imagens em uma tela: por varredura randômica e por varredura matricial [2]. Atualmente, esta última é a mais utilizada e seu princípio de funcionamento baseia-se na divisão da tela em uma sequência de linhas horizontais, com um número fixo de pontos por linha. O feixe de elétrons varre a superfície da tela a partir da primeira linha, da esquerda para a direita e de cima para baixo, retornando ao início. Este processo ocorre muitas vezes por segundo e é chamado de renovação ou

atualização da tela. A repetição deste processo é essencial pois, a tela é revestida de uma camada de fósforo que tem uma persistência de curta duração à emissão de luz, provocada pelo bombardeio do feixe de elétrons, garantindo a manutenção da imagem na tela [2].

O circuito do tubo de imagem pode obter, através do processador gráfico, as informações sobre as coordenadas e as intensidades dos pontos da imagem para cada ciclo de renovação ou atualização da tela, alterando a deflexão do feixe de elétrons por determinados períodos de tempo [2].

Desta forma, pelo que foi discutido anteriormente, uma imagem a ser digitalizada é decomposta em um conjunto de pontos, os quais podem ser tratados individualmente. Este conjunto de pontos é sempre tratado na memória do computador como uma matriz de  $n$  linhas e  $m$  colunas e seu tamanho depende de alguns fatores, como por exemplo o número de elementos que compõem o detector de CCD. Outro importante fator é a natureza da imagem, que pode ser monocromática ou colorida.

Em uma imagem monocromática, há a necessidade de apenas uma cor para representá-la, e desta forma a matriz da imagem necessita conter apenas números “0s” e “1s”. Então, cada ponto da matriz pode ser representado por apenas um *bit* (matematicamente:  $2^n$ , onde  $n$  é igual a 1), o que torna o seu processamento mais simples pelo computador, uma vez que este trabalha essencialmente com números binários. Um exemplo clássico são os monitores monocromáticos (os antigos monitores de fósforo verde), onde uma imagem é formada por pontos acessos (bit igual a 1) e apagados (bit igual a 0). O tamanho da matriz e, portanto, o espaço que ela ocupa na memória dependerá da resolução do processo de digitalização. Por exemplo, se uma imagem que foi digitalizada empregando uma única cor e apresenta uma matriz de dimensões de 512 linhas por 512 colunas, ela pode ocupar 262.144 bits ( $512 \times 512$ ) ou 32.768 bytes (1 byte é igual a 8 bits) de memória do computador, o que corresponde a 32 Kbytes (1Kbyte é igual a 1024 bits). Este número de bits corresponde exatamente ao número de pontos da imagem digitalizada e, portanto, está diretamente relacionada a quantidade de memória.

Em uma imagem colorida é necessário que cada ponto da imagem seja representado por no mínimo 3 bits, ao invés de um único bit. Cada um desses bits estão relacionadas com as três cores básicas, vermelho, verde e azul, as quais formam o padrão RGB (Red, Green,

Blue) e são utilizadas em monitores coloridos. O número de cores possíveis para uma imagem, de acordo com este sistema binário, seria de  $2^n$ , onde  $n$  é igual a 3, sendo possível representar até 8 diferentes cores, conforme mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1** - Números binários para um sistema de 8 cores, utilizando-se o padrão RGB. A última coluna mostra o correspondente a um número decimal ou índice da cor.

<b>Cor</b>	<b>Número Binário (R)</b>	<b>Número Binário (G)</b>	<b>Número Binário (B)</b>	<b>Índice da Cor</b>
Preto	0	0	0	0
Azul	0	0	1	1
Verde	0	1	0	2
Ciano	0	1	1	3
Vermelho	1	0	0	4
Magenta	1	0	1	5
Amarelo	1	1	0	6
Branco	1	1	1	7

Neste caso, se a mesma imagem empregada anteriormente para o processo monocromático (512 x 512 pontos de imagem), fosse agora digitalizada utilizando um sistema policromático, seriam necessárias 3 matrizes, uma para cada cor básica (RGB). Desta forma, a quantidade de memória necessária para esta imagem seria de 96 Kbytes (32 Kbytes x 3), para as 8 cores possíveis.

Se agora fosse acrescentado mais 1 bit para mudar a intensidade ( I ) das três cores básicas, o número de cores possíveis para uma imagem, de acordo com este sistema binário, seria de  $2^n$ , onde  $n$  é igual a 4, significando 16 diferentes cores, conforme mostrado na Tabela 2. Neste caso, a mesma imagem discutida anteriormente ocuparia uma memória de 128 Kbytes (32 Kbytes x 4).

**Tabela 2** - Números binários para um sistema de 16 cores, utilizando-se o padrão RGB, onde é mostrado as componentes binárias I, R, G e B. A última coluna mostra o correspondente número decimal ou índice da cor.

<b>Cor</b>	<b>Número Binário (I)</b>	<b>Número Binário (R)</b>	<b>Número Binário (G)</b>	<b>Número Binário (B)</b>	<b>Índice da Cor</b>
Preto	0	0	0	0	0
Azul	0	0	0	1	1
Verde	0	0	1	0	2
Ciano	0	0	1	1	3
Vermelho	0	1	0	0	4
Magenta	0	1	0	1	5
Amarelo	0	1	1	0	6
Branco	0	1	1	1	7
Cinza	1	0	0	0	8
Azul Claro	1	0	0	1	9
Verde Claro	1	0	1	0	10
Ciano Claro	1	0	1	1	11
Laranja	1	1	0	0	12
Rosa	1	1	0	1	13
Amarelo Claro	1	1	1	0	14
Branco Claro	1	1	1	1	15

Apesar de 16 cores ser um padrão muito utilizado, este número ainda é pequeno para muitas aplicações, que envolvam processamentos de imagens reais. Seriam então necessários um aumento significativo no número de cores para se reproduzir com fidelidade uma imagem real, o que pode ser obtido trabalhando com diferentes tons das cores básicas. Um dos melhores padrões trabalha com 256 tons para cada uma das cores básicas RGB (padrão de 24 bits). Isto é obtido se cada uma dessas cores for representada por 8 bits ( $2^8$ ), e desta

forma, a imagem anterior de 512 x 512 e 16 cores, que ocupava 96 Kbytes, passaria a ocupar 768 Kbytes.

O número de cores crescerá exponencialmente com o aumento do número de bits que representam uma imagem colorida, aumentando muito desta forma, o espaço de memória, o que torna o processamento da imagem no computador muito lento. Foi então desenvolvido um sistema que permite que um grande número de cores possam ser utilizados sem que haja um aumento muito grande do espaço de memória do computador [2, 4]. Este sistema faz uso de uma tabela de consulta de cor, a qual contém padrões de bits relacionados com as 3 cores básicas. Ela determina também o número máximo de cores que podem ser exibidas na tela simultaneamente.

Para um sistema em que a imagem colorida seja representado por 24 bits, cada uma das 3 cores básicas será representada por 8 bits, possibilitando 256 tons de vermelho, verde e azul. Desta forma, a combinação resultaria em 16.777.216 cores possíveis (256 x 256 x 256). Na maioria dos casos, a Tabela de Consulta de Cores pode armazenar até 256 combinações de cores, sendo que isto é pré-estabelecido segundo um dispositivo denominado adaptador gráfico. Este dispositivo, em associação com o circuito eletrônico que controla o tubo de imagem, racionaliza o número total de cores que podem ser exibidas no monitor de vídeo. Cada cor exibida do monitor é uma combinação de tons de vermelho, verde e azul, de acordo com a Tabela de Consulta de Cores, e seu número total denomina-se *palette*. O adaptador gráfico determina também o tamanho máximo da matriz (em números de pontos da imagem) que será exibida na tela do monitor de vídeo. Portanto o número de cores que podem ser visualizadas simultaneamente dependerá do *palette*.

A Tabela 3 mostra alguns tipos de adaptadores gráficos de vídeo mais empregados e alguns de seus modos de operação, relacionando o tamanho das matrizes de imagem e o número máximo de cores [5].

**Tabela 3** - Tipos de adaptadores gráficos mais utilizados em alguns dos seus modos de operação. A *resolução* representa o tamanho da matriz que pode ser visualizada na tela e o número máximo de cores.

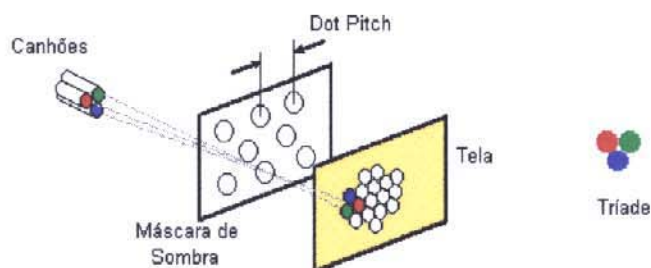
<b>Tipo do Adaptador</b>	<b>Resolução</b>	<b>Número de Cores</b>
CGA	320 x 200	4
EGA	640 x 350	16
VGA	640 x 480	256
IBM8514	1024 x 768	256

Finalmente, a imagem que será exibida no monitor de vídeo é o resultado da transformação da matriz de dados binários em sinais analógicos. Estes sinais, em monitores coloridos, determinam a intensidade de três diferentes feixes de elétrons presentes no tubo de imagem ou tubo de raios catódicos [2]. É importante ressaltar que na exibição de uma imagem colorida no monitor de vídeo, a interface necessita de 3 conversores D/A, um para cada cor básica; diferentemente de uma imagem monocromática, onde apenas 1 conversor é necessário [4].

A formação de cores ocorre pela sensibilização de pontos na tela, a qual é revestida internamente por três diferentes sais de fósforo. Os feixes de elétrons, provenientes de três canhões, excitam estes sais de fósforo, fazendo com que cada tipo de sal emita radiação na região do vermelho, verde e azul [2]. Este arranjo pode ser observado na Figura 3.

Nos modelos de monitores mais utilizados, estes três sais de fósforos são dispostos na superfície interna da tela, em um arranjo triangular. O conjunto formado pelos três pontos é conhecido como *triade* (Figura 3).

Como estes triângulos de pontos (as triades) são extremamente pequenos, um observador não os percebe, tendo a impressão de estar vendo um único ponto. O controle da convergência dos três feixes para um ponto da tela é muito importante, para se ter uma



**Figura 3** - Formação das cores em um tubo de raios catódicos. A tela possui pequenos arranjos triangulares chamados *triades* (em destaque). Observa-se também a definição de *Dot Pitch*, que é a distância entre dois pontos consecutivos na máscara de sombra. Este termo representa a uma medida de qualidade visual de monitores coloridos [2].

imagem nítida. Por este motivo utiliza-se uma placa metálica especial perfurada, chamada de *máscara de sombra* [2]. Os feixes convergentes de elétrons atravessam estes pequenos buracos, centralizando-se em relação à triáde respectiva.

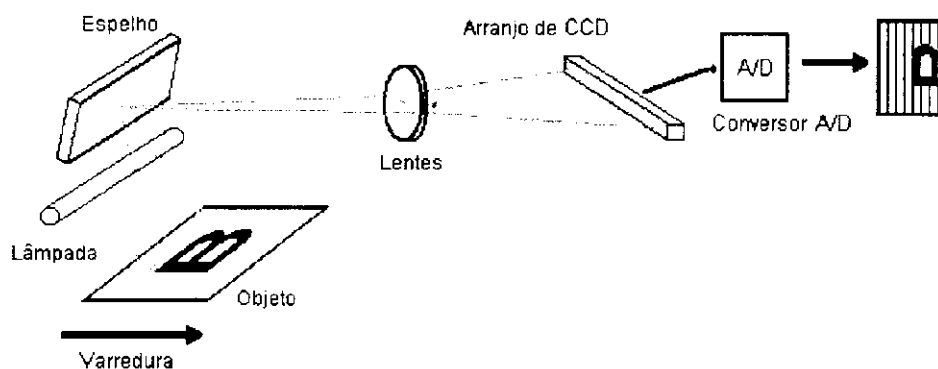
A distância entre dois pontos consecutivos na máscara de sombra é chamada de *Dot Pitch* e caracteriza a qualidade visual dos monitores coloridos. Em monitores comuns seu valor varia de 0,41 a 0,28 mm e nos monitores de alta resolução, em torno de 0,21 mm [2]. Quanto maior a quantidade de orifícios na máscara de sombra, menor será o *Dot Pitch*, maior será a quantidade possível de pontos para a formação da imagem na tela e então, maior a resolução do monitor.

Portanto, a característica da construção dos monitores de vídeo limita a melhor resolução possível da exibição de uma imagem. É possível trabalhar com resoluções menores, daquelas permitidas pelo monitor de vídeo, fazendo que um conjunto de triádes represente um único ponto de imagem. Estes pontos de imagem, também denominados *pixels*, são determinados pelos diferentes modos de operação dos adaptadores gráficos e quando estes modos estão operando na resolução máxima permitida pelo monitor, um pixel é formado por uma triáde.

## 1.2. Digitalização de imagens através de Scanners

Diferentemente das câmeras de vídeo que empregam conjuntos retangulares de detectores tipo CCD, os scanners, de maneira geral, utilizam um único conjunto linear destes detectores, fazendo com que estes dispositivos de aquisição de imagens tenham um menor custo. Consequentemente, a aquisição da imagem feita através de scanner necessita que os seus detectores sejam deslocados sobre o objeto, enquanto que as câmeras de vídeo, a imagem do objeto alcança simultaneamente todos os detectores. Apesar disto, as qualidades das imagens obtidas pelos scanners são comparáveis àquelas obtidas pelas câmeras, podendo, em certos casos, serem até superiores [2].

Basicamente, os scanners possuem uma fonte de luz própria e a radiação emitida por esta fonte, após ser refletida pelo objeto, é direcionada por um conjunto de lentes para um arranjo de detectores, conforme é mostrado na figura 4.



**Figura 4** - Desenho esquemático de um scanner mostrando o processo de aquisição e digitalização da imagem.

A cada passo de deslocamento do scanner sobre o objeto, os dados da imagem obtidos pelo conjunto de detectores são transferidos para uma interface na forma de sinais analógicos. Estes dados são então convertidos em sinais digitais, resultando em um fragmento do objeto, representando uma linha da matriz de dados de sua imagem. Este processo se repete até que toda a imagem do objeto seja adquirida, resultando na digitalização total da imagem, representada por uma matriz  $X$  com  $i$  linhas e  $j$  colunas. Cada



coluna desta matriz foi obtida por um mesmo detector que compõem o arranjo de CCD e cada linha representa a posição do conjunto de detectores no momento de aquisição. Cada elemento  $x(i,j)$  desta matriz corresponde a um elemento da figura ou *pixel*. Os índices  $i$  e  $j$  são utilizados para determinar os endereços de cada pixel da imagem do objeto durante a etapa de sua construção na tela do monitor de vídeo.

Os scanners, de maneira geral, podem digitalizar uma imagem com diferentes resoluções. No processo de aquisição, quanto maior for a resolução, maior será o número de pontos digitalizados por área, consequentemente haverá uma melhor definição da imagem, resultando em um aumento da matriz de dados que representa a imagem. Outro fator que determina o tamanho da matriz no momento da aquisição da imagem é o formato de cor escolhido (monocromático, tons de cinza ou colorido) o qual, como visto anteriormente, determina o número de bits por pixel da matriz. Por exemplo, uma foto de 5 por 4 polegadas, adquirida em 100 dpi<sup>#</sup>, em tons de cinza (8 bits por pixel) terá um tamanho de (500 x 400 x 8) bits ou 1.600.000 bits, o que equivale a 195 Kbytes. Considerando a mesma foto, adquirida agora em 400 dpi e também em tons de cinza, o arquivo que contém a imagem terá 3,12 Mbytes. Observa-se que um aumento da resolução de apenas 4 vezes, implica em um aumento de 16 vezes no espaço de memória.

No mercado existem muitos tipos de scanners, como os manuais, que possuem resolução entre 100 e 400 dpi, podendo operar com imagens coloridas, em tons de cinza ou monocromáticas. Existem também os chamados scanners de mesa, com resolução até 2000 dpi, de custo mais elevado, com os mesmos formatos para as cores, como as discutidas para os scanners manuais.

### 1.2.1. Refletância

A aquisição da imagem de um objeto através de uma câmera de CCD ou de um scanner está relacionado ao processo de interação da luz destes equipamentos com o objeto. Desta forma, estes dispositivos podem ser vistos como uma extensão, via instrumentação,

---

<sup>#</sup> do inglês, *dots per inch* ou pontos por polegada

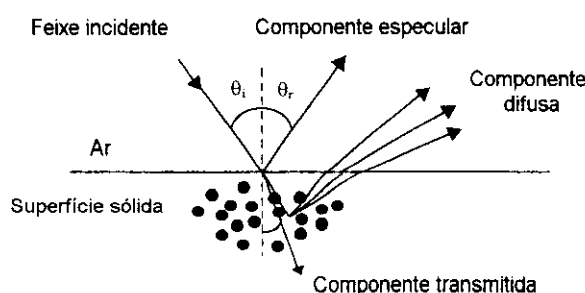
do processo de visão, promovendo uma saída de algum tipo de sinal numérico o qual pode ser tratado matematicamente.

O processo de visão está intimamente relacionado com a forma pela qual a radiação luminosa interage com um objeto, resultando na percepção da cor e forma deste, como consequência do processo de reflexão da radiação incidente sobre o mesmo [7].

Dependendo do material de que é formado o objeto e do meio que o rodeia, vários fenômenos podem ainda ocorrer, e o processo não será tão simples como descrito anteriormente.

A Figura 5 mostra que um feixe de radiação ao alcançar uma interface, formada por dois meios que apresentem diferentes índices de refração, pode ser transmitido ou refletido. A radiação transmitida depende do ângulo da radiação incidente e dos índices de refração dos meios em consideração, sendo que sua direção é definida pela Lei de Snell [6, 7]. A radiação refletida apresenta duas componentes distintas denominadas de reflexão regular ou especular e reflexão difusa. A primeira, apresenta um ângulo de reflexão ( $\theta_r$ ) igual ao ângulo da radiação incidente ( $\theta_i$ ) e a fração da radiação incidente que é refletida, é função dos dois índices de refração, e pode ser calculada através da equação de Fresnel [6, 7].

A refletância difusa se propaga em todas as direções, sendo o resultado do espalhamento da radiação incidente causada por várias partículas presentes na superfície do segundo meio. Este espalhamento é o resultado de fenômenos de reflexão, refração e difração aleatória nestas partículas. Finalmente, a radiação incidente pode ainda ser absorvida pelo material.



**Figura 5** - Esquema mostrando a passagem de um feixe de luz de um meio para outro, com índices de refração diferentes. Os pontos pretos representam partículas presentes na superfície sólida.

Este último fenômeno é largamente explorado em espectroscopia sendo que a Lei de Lambert-Beer relaciona a quantidade de radiação absorvida e a concentração através da expressão:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad (1)$$

Onde,

A, Absorbância;

$\varepsilon$ , Coeficiente de absorvidade molar;

b, Caminho óptico (cm);

C, Concentração da amostra (mol. L<sup>-1</sup>).

Esta relação é o fundamento básico para a espectroscopia de absorção e é comumente aplicada na determinação da concentração de uma espécie de interesse, onde a quantidade medida é a radiação transmitida que passa pela amostra. Apesar de ser menos utilizada, medidas de refletância derivam da mesma lei, sendo possível determinar a concentração de uma espécie medindo-se a quantidade de radiação difusa refletida.

A diferença principal entre as duas técnicas está no fato de que no primeiro caso o caminho óptico é mantido constante, quando se utiliza por exemplo, cubetas durante as medidas. Porém, na espectroscopia de refletância é difícil manter constante ou mesmo conhecer o caminho óptico, o qual é função da estrutura cristalina do material que causa a absorção [6].

Outro fator que deve ser ainda considerado neste tipo de medida, é a reflexão especular, a qual não apresenta fenômeno de absorção e portanto, não transporta qualquer informação sobre a amostra. Por não sofrer absorção, esta radiação pode apresentar uma maior intensidade que a radiação difusa, podendo em certos casos mascará-la e, portanto, deve ser eliminada em medidas espectroscópicas de reflexão. Desta forma, quando se realiza uma medida de refletância tem-se interesse apenas pela radiação difusa [6].

A absorbância de uma substância pode ser relacionada com a transmitância através da relação:

$$A = -\log T \quad (2)$$

Pode-se considerar também a transmitância de um meio absorvente como:

$$T = \frac{I_t}{I_o} = 10^{-A} \quad (3)$$

Onde,

T, Transmitância;

$I_t$ , Intensidade de radiação transmitida;

$I_o$ , Intensidade de radiação incidente;

A, Absorbância.

Quantitativamente, a absorbância está relacionada com a concentração da amostra através da Equação 1, sendo que na prática, o caminho óptico é mantido constante durante as medidas. Desta forma, a construção de uma curva de absorbância versus a concentração de soluções de referência, pode ser utilizada para se encontrar a concentração de uma amostra. Assim, considerando o caminho óptico constante, a concentração da espécie de interesse pode ser relacionada a transmitância por:

$$C = \frac{1}{\varepsilon \cdot b} \cdot \log \frac{1}{T} \quad (4)$$

Agora, se a transmitância de um meio não é possível de ser medida de maneira reprodutível, a radiação refletida pode ser utilizada como uma alternativa para a medida da concentração da amostra [6].

Entretanto, neste caso, o caminho óptico e as características de espalhamento não são conhecidos, sendo necessário manter-se algumas características físicas do meio constantes, tanto para a amostra como para os padrões, tais como tamanho da partícula, forma, densidade. Se isto é possível de ser realizado, a concentração da espécie de interesse é dada por:

$$C \propto \log \frac{1}{R} \quad (5)$$

Onde,

C, Concentração da amostra;

R, Refletância da amostra.

A relação entre a absorção e a refletância, ao contrário da medida de transmitância, não é tão simples. Isto se deve principalmente ao fato de, como discutido anteriormente, a impossibilidade de se poder estabelecer um caminho óptico. Diversas teorias têm sido desenvolvidas, mas a mais aceita foi descrita por Kubelka-Munk [6]. Sua teoria assume que a radiação que passa por um meio, o qual provoca seu espalhamento, é dividida em dois fluxos. Um representa a radiação que passa pelo meio na mesma direção do feixe incidente e o outro representa a radiação espalhada que retorna em direção a superfície iluminada. A quantidade de radiação absorvida é proporcional a uma constante de absorção  $K$  e a quantidade de radiação espalhada é proporcional a uma constante de espalhamento  $S$ . Assim, tanto para o feixe de radiação transmitido como para o espalhado, existe uma perda de intensidade proporcional às duas constantes.

A relação entre a refletância e a concentração, segundo a teoria de Kubelka-Munk, é dada por [8]:

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2 \cdot R_{\infty}} = \frac{K}{S} = \frac{2,303 \cdot a}{S} \cdot C \quad (6)$$

Onde,

$R_{\infty}$ , Refletância da amostra;

$K$ , Coeficiente de absorção da amostra;

$S$ , Coeficiente de espalhamento da amostra;

$a$ , Absortividade do composto absorvente;

$C$ , Concentração da amostra.

As medidas de refletância são feitas na forma de espectros onde, variando-se o comprimento de onda da fonte de luz, avalia-se a porcentagem de refletância da amostra. Através desses gráficos calcula-se o coeficiente de absorção ( $K$ ), para se calcular a concentração da amostra empregando-se a função de Kubelka-Munk. Esta função necessita

a utilização de um padrão de 100% de refletância na realização das medidas [6]. O uso destes padrões é importante para que a função de Kubelka-Munk não venha a fornecer valores negativos de refletância para amostras que tenham absorção próxima de zero [6].

É comum, no entanto, para tornar o cálculo mais simples, definir a concentração como sendo proporcional ao logaritmo do inverso da refletância (equação 5). Esta expressão é de origem empírica e não necessita que o padrão de calibração tenha refletância de 100%.

Medidas de refletância apresentam ainda uma maior faixa dinâmica de aplicabilidade quando comparada com as técnicas de transmissão [7], além da medida não ser destrutiva e, atualmente, vem sendo empregada principalmente na análise de tintas, pigmentos, tecidos, papéis, cerâmicas e outros [9].

### 1.3. Aplicações de Imagens

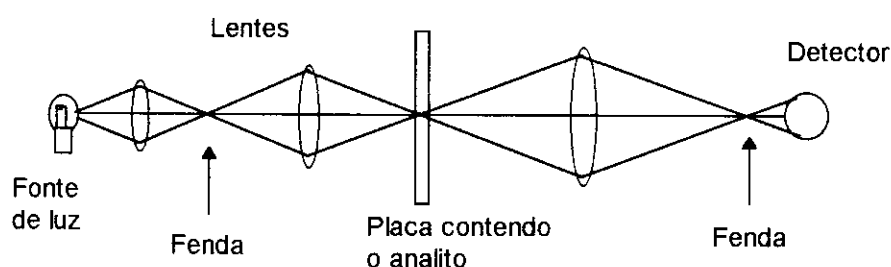
O número de publicações científicas relativas ao uso de imagens para obtenção de dados qualitativos e quantitativos tem aumentado muito nos últimos anos.

A maior quantidade de trabalhos utilizando imagens em química é na área de microscopia [10], sendo as maiores aplicações na análise de superfícies. Existem também muitos trabalhos na área de biologia e bioquímica.

Técnicas cromatográficas planares [11, 12] tais como cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada e técnicas eletroforéticas são largamente usadas em estudos químicos e bioquímicos, sendo que podem ser destacadas suas aplicações nas separações e análises de proteínas e ácidos nucleicos [13]. As técnicas cromatográficas baseiam-se em diferenças de afinidade entre os componentes de duas fases (uma móvel e outra estacionária) resultando em migrações diferenciadas [14], enquanto que nas técnicas

eletroforéticas, a separação dos componentes é feita por um campo elétrico devido às diferenças de carga e/ou polaridade das espécies a serem separadas. Tipicamente, após o devido processamento de uma amostra, por uma das técnicas citadas, adiciona-se à placa, quando necessário, uma substância apropriada para marcar o material separado para uma posterior visualização direta ou faz-se a cópia da mesma através de placas de raios-X (autoradiografia) ou fotografias. Assim, como as próprias placas, as cópias apresentam manchas (agora sempre visíveis) que indicam a localização dos componentes da amostra [13].

O procedimento para uma análise qualitativa destas placas baseia-se na comparação do deslocamento do material analisado sobre a placa com padrões que, em muitos casos, são adicionados na mesma placa onde irá se processar a amostra. Já a análise quantitativa é feita, comumente, utilizando-se um densitômetro, o qual transforma as manchas presentes nas placas ou nos negativos em um registro na forma de picos [13, 15]. Estes equipamentos, baseados em sistemas ópticos, medem a radiação transmitida ou absorvida por um ponto (ou mancha) do analito, sobre algum tipo de suporte [16]. A Figura 6 mostra um desenho esquemático de um densitômetro de transmissão [17]. Estes equipamentos não produzem imagens e são utilizados diretamente sobre o próprio material (placa ou membrana) sobre o qual foi feito a separação da espécie em estudo.



**Figura 6** - Esquema simplificado de funcionamento de um densitômetro de transmissão.

Atualmente, os densitômetros, em combinação com cromatografia planar, são muito utilizados para a quantificação da espécie de interesse através de suas manchas formadas sobre as placas. Alguns exemplos de aplicações são as análises de íons metálicos em plasma sanguíneo [12] e determinação de bromato em pães [12].

Zang-Fa e colaboradores [18] fizeram uma determinação quantitativa de metais de terras raras em areia monazítica, por densitometria, através de formação de complexos coloridos com Dietilexilfosfato (HDEHP) sobre placas de Sílica Gel. A faixa de trabalho foi de 0,015 a 0,60  $\mu\text{g}$  dos metais adicionados sobre as placas. Foi obtido um desvio padrão relativo médio de 3,6% para 18 medidas. Comparando-se este método com o espectrofotométrico, os autores encontraram um erro médio relativo de 2,3%. A análise espectrofotométrica foi realizada através da remoção do material separado e fazendo-se uma pré-concentração apropriada para cada metal.

Franc e Kosikova, [19] fizeram uma determinação qualitativa de vários ânions em misturas orgânicas através da reação com Difenilamina, formando complexos coloridos sobre placas de Silufol. Os autores encontraram um limite de detecção de 0,1  $\mu\text{g}$  e o método apresentou erros relativamente baixos.

Ohzeki e colaboradores [20] utilizaram um densitômetro para determinação de traços de cobalto em vinho branco, através da formação de complexos coloridos com PAN (piridilazonaftol), fixados em um filtro de membrana de nitrato de celulose. A quantidade total do material analisado nesta membrana foi obtida através de pré-concentração do cobalto. A faixa de trabalho foi de 2,5 a 4,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  do metal e os autores obtiveram um desvio padrão médio de 2,5% sobre as medidas.

Trabalhos envolvendo a digitalização de placas de eletroforese em gel, ou de suas cópias, para a separação de proteínas e ácidos nucleicos têm sido desenvolvidos com o uso de sondas contendo diodo emissor de luz (LED) [21] ou LASER [22], como fontes de radiação, medindo-se posteriormente a radiação refletida ou a fluorescência produzida,



respectivamente. Em ambos os casos houve a necessidade de movimentos de translação X-Y, da sonda ou da placa, para que toda ela fosse digitalizada.

Mais recentemente, a digitalização de autoradiografias tem sido obtida com o uso de câmeras comerciais interfaceadas a microcomputadores:

Lott e colaboradores [23] utilizaram uma câmera CCD para adquirir imagens de géis e autoradiografias de proteínas submetidas a eletroforese e também um programa para extrair dados das imagens. O sinal analógico da câmera foi convertido em digital através de uma interface e os dados foram armazenados em um microcomputador marca Apple. Foram calculados valores médios de intensidades de tons de cinza para os diferentes pontos que formaram as imagens digitalizadas. O programa também calcula a intensidade total (integral) de tons de cinza sobre uma área definida pelo usuário. Os resultados foram comparados com densitometria, sendo que as diferenças encontradas foram menores que 5%. Os autores recomendaram um controle rigoroso de iluminação sobre as amostras durante a aquisição das imagens, para que houvesse repetibilidade adequada dos resultados.

Catterick e Russel [24] utilizaram uma câmera CCD com 512 elementos para aquisição de imagens de autoradiografias de fragmentos de DNA submetidos a eletroforese. As imagens foram armazenadas em um microcomputador IBM-PC e foi utilizado um programa escrito em linguagem C para o processamento das imagens. O programa permite a localização automática das manchas sobre as placas, decorrentes do processo de separação dos constituintes do DNA, com uma resolução de até 0,5 mm.

Em outro trabalho, Russel [25] utilizando um equipamento similar ao citado anteriormente porém empregando agora uma câmera CCD com 1024 elementos, concluiu que o aumento no número de detectores da câmera não trouxe qualquer melhora significativa nos resultados obtidos.

Chan e colaboradores [26] utilizaram um programa para contagem de células, utilizando uma câmera CCD para aquisição da imagem. Foi desenvolvido um sistema para digitalização (envolvendo um microcomputador, que continha uma placa para

processamento de imagens) e um programa computacional para análise da imagem. O sistema foi avaliado em contagem de bactérias *E. Coli.*, apresentando erros de até 20% quando comparado com o método de contagem manual.

Fujii e Hashimoto [27] construíram um sequenciador automático de DNA, adaptando uma câmera CCD sobre placas de gel após serem submetidas a separação por eletroforese. A imagem foi formada através da excitação das substâncias fluorescentes presentes na placa, por um LASER de argônio. Foi utilizado um equipamento interfaceado com um microcomputador para análise das intensidades de fluorescência das manchas. Os autores avaliaram o equipamento utilizando uma grande quantidade de amostras de DNA e conseguiram obter um sequenciamento de bases com poucos erros.

Em todos estes trabalhos discutidos anteriormente existe a necessidade da utilização de um tipo de dispositivo eletrônico, que permita a conversão e transferência dos sinais obtidos para o computador. Tal fato é totalmente desnecessário com uso de scanners comerciais, os quais são usados para a digitalização de vários tipos de imagens como figuras de livros, fotografias e outros, para um posterior tratamento da imagem.

Existem trabalhos com fotografias e autoradiografias de géis, nos quais os autores utilizam scanners comerciais para aquisição de imagens e pacotes de software de domínio público.

Parry e colaboradores [28] utilizaram um programa para contagem de células através de imagens digitalizadas com um auxílio de um scanner. Usualmente, este tipo de trabalho é feito de modo visual por um operador sob um microscópio, sendo muito rotineiro e cansativo e, conseqüentemente, sujeito a muitos erros. Os autores compararam contagens feitas por uma pessoa experiente e pelo programa e encontraram um erro relativo de 4,7% entre os dois métodos.

Masters e colaboradores [29] utilizaram um scanner para adquirir imagens de autoradiografias de géis de RNA de ratos. Foi utilizado um programa de domínio público para microcomputadores Macintosh. Este programa permite tanto a seleção de manchas na

imagem como a realização de medidas de intensidade média de tons de cinza, para as mesmas. Os autores construíram curvas de quantidade de RNA em função da intensidade média da cor cinza das manchas. Para uma faixa de 100 a 400 ng de RNA obtiveram uma resposta linear com coeficiente de correlação 0,976 e para uma faixa de 200 a 1000 ng de RNA, a correlação dos dados foi de 0,959. Outros tipos de RNA foram testados para uma faixa de 2 a 10  $\mu$ g com resultados semelhantes.

Rendman e Jacobs [30] desenvolveram um programa para manuseio de imagens utilizando um scanner comercial para a aquisição das mesmas, para amostras semelhantes às citadas anteriormente. O programa desenvolvido permite trabalhar com imagens em tons de cinza e fazer análises quantitativas e também estatísticas dos dados obtidos. Além disso, o programa possui também uma biblioteca de padrões onde podem ser realizadas comparações com a amostra estudada. O programa é específico para microcomputadores da marca Machintosh e as imagens devem possuir o formato PICT, para que possam ser analisadas.

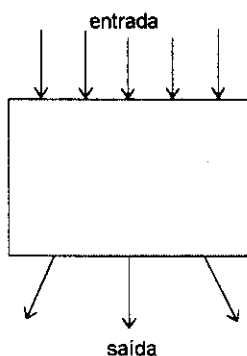
## 1.4. Redes Neurais

Devido ao desenvolvimento dos computadores e a diminuição do seu custo, a automação de métodos de análise têm crescido significativamente nos últimos anos. Aliado a isto, pode-se também destacar o aumento crescente na demanda por análises químicas que associadas à automação de instrumentos, têm contribuído para o aumento do número de dados. Como exemplo, pode-se citar a grande quantidade de dados numéricos gerados no processamento de imagens.

Devido a isso, a utilização de métodos matemáticos e estatísticos modernos e eficientes se faz necessário, para se obter o máximo de informação do conjunto de dados resultantes de uma análise [31].

Recentes avanços em neurofisiologia e novas técnicas experimentais têm proporcionado um aumento sobre o conhecimento da anatomia e funcionamento do cérebro humano. Valendo-se destes novos conhecimentos, modelos matemáticos e algoritmos computacionais têm sido projetados para simular o funcionamento do cérebro humano [32].

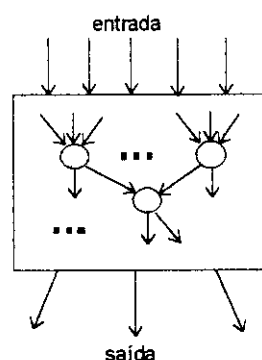
Assim, por definição, redes neurais é o nome dado ao conjunto de métodos matemáticos e algoritmos computacionais desenvolvidos no sentido de simular o processamento de informação e aquisição do conhecimento do cérebro humano [32, 33]. A rede neural pode ser considerada como uma “caixa preta”, que pode aceitar uma série de dados de entrada e produzir uma ou mais saídas, como representado na Figura 7.



**Figura 7** - Representação da rede neural como uma “caixa preta”, mostrando a entrada e a saída de dados.

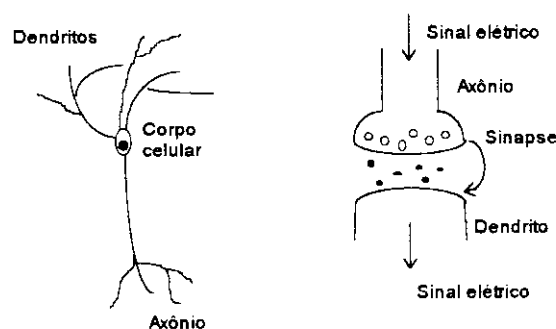
Como as redes neurais podem ser utilizadas para diversas aplicações, os dados de entrada da figura acima poderiam ser de um espectro de um composto, dados clínicos de um paciente ou ainda, dados de uma imagem manchada de um objeto e a saída poderia ser, respectivamente, a estrutura molecular do composto, o diagnóstico para a doença ou a imagem nítida do objeto [32].

Dentro desta “caixa preta”, a rede neural transforma uma entrada de  $m$  variáveis em uma saída de  $n$  variáveis, através das unidades básicas de processamento ou neurônios como mostrado na Figura 8.



**Figura 8** - Representação dos neurônios, os quais são as unidades básicas de processamento em uma rede neural artificial.

A rede neural imita os neurônios humanos, recebendo e enviando sinais. Ela pode aceitar uma série de dados de entrada e produzir a partir destes uma ou mais saídas, através da busca de uma função que descreva o sistema. Esta analogia feita com os neurônios humanos é baseada na transmissão de sinais elétricos. De maneira simplificada, o neurônio humano pode ser entendido como um corpo celular com duas ramificações: dendritos e axônios. A transferência de sinais elétricos é feita através do axônio de um neurônio para os dendritos de um outro neurônio vizinho, em um processo chamado sinapse, como é mostrado na Figura 9.



**Figura 9** - Representações simplificadas de um neurônio biológico e de uma sinapse.

As sinapses representam barreiras que de um certo modo modulam os sinais que passam através delas. Esta modulação representa a força da sinapse. Em um neurônio artificial, a força da sinapse é chamada de peso  $w$ . A Figura 10 mostra uma representação esquemática de uma sinapse em um neurônio artificial.



**Figura 10** - Representação da sinapse de um neurônio artificial.

Como os neurônios possuem um grande número de dendritos, eles podem receber sinais de vários neurônios simultaneamente. O sinal recebido pelo  $i$ -ésimo dendrito de um neurônio será chamado de  $s_i$  com seu respectivo peso  $w_i$ . O sinal total  $Net$ , que entra em um neurônio, será dado pela soma de todos os produtos de  $s_i$  com seus respectivos pesos  $w_i$ :

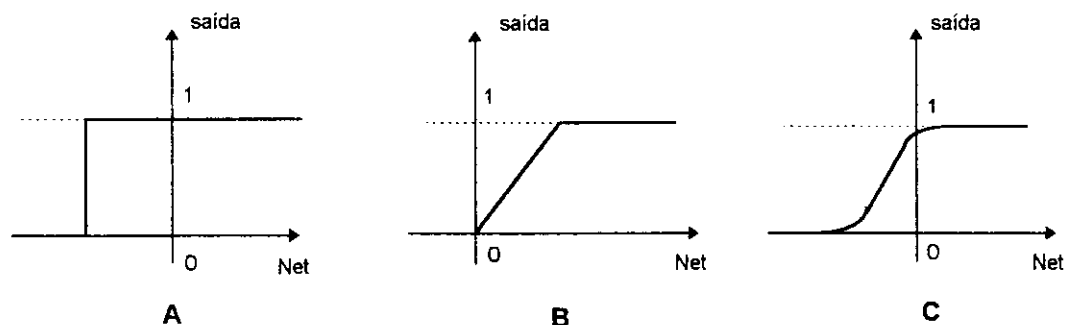
$$Net = w_1s_1 + w_2s_2 + \dots + w_is_i + \dots + w_ms_m$$

O sinal total refere-se apenas a entrada de dados em um neurônio. A saída de um neurônio é uma função da entrada denominada *função de transferência*.

$$saída = f(Net)$$

Estas funções produzem uma transformação não linear no sinal total de entrada, ou seja, o sinal de entrada é transformado de acordo com a característica da função. Assim como nos neurônios biológicos, o sinal de entrada é diferente do sinal de saída [32]. Cada neurônio (ou um conjunto deles) pode ter um tipo diferente de função de transferência.

Existem muitos tipos destas funções e as três mais utilizadas, mostradas na Figura 11, são: a limite, a threshold logic e a sigmoidal. O sinal total de entrada é modificado gerando uma saída com intervalo entre 0 e 1.



**Figura 11** - Funções de transferência usadas em redes neurais: (A) limite, (B) limiar lógico e (C) sigmoidal.

A rede neural artificial pode ser formada por várias camadas de neurônios, sendo que a distribuição deles deve ser otimizada, em função da minimização dos erros. Esta distribuição varia também de acordo com o tipo de rede neural. As camadas de neurônios intermediárias entre a primeira e a última, por convenção, são ditas *camadas escondidas*.

Existem diversos tipos de redes neurais para os mais diversos tipos de dados e aplicações. A rede B.P.E.<sup>#</sup> é um algoritmo para a correção de pesos, com várias camadas. Cerca de 90% das aplicações de redes neurais em química empregam este método [35]. Uma das principais aplicações do B.P.E. é o modelamento de dados não lineares, onde o comportamento matemático entre as variáveis não são representadas por funções de ordem definida.

O emprego de redes neurais artificiais como ferramenta para tratamento de dados é ainda recente e muitos estudos estão sendo feitos para seu aprimoramento. Sua aplicação no tratamento de imagens é ainda pouco explorada e são pequenos os números de trabalhos descritos na literatura que tratam deste tema.

<sup>#</sup> do inglês. *Back Propagation of Error*

Majcen e colaboradores [34] utilizaram uma rede neural B.P.E. para estudar medidas de variações de cor total em tintas submetidas a ensaios que reproduziram intempéries climáticas. As tintas brancas são feitas a partir de óxido de titânio, sendo que este possui contaminantes que provocam mudanças de cor:  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{FeO}$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e  $\text{SO}_3$ . Elaborou-se um conjunto de treinamento em que as entradas eram misturas de tintas com diferentes concentrações conhecidas dos óxidos contaminantes e as saídas, medidas de brilho. As tintas foram avaliadas em superfícies e, então, submetidas a ensaios de simulação de intempéries climáticas. Os autores determinaram que a rede deveria ter 8 entradas, representando as concentrações de cada um dos óxidos contaminantes, uma camada escondida com 6 neurônios e uma saída. Foram realizados 36 experimentos com misturas de tintas, comparando-se os resultados obtidos com os previstos pela rede. As diferenças obtidas estiveram na faixa entre 5 a 10%. Graças a esses resultados, a rede passou a ser usada permanentemente para avaliar a qualidade das tintas produzidas na indústria.

Existe um tipo de rede neural, desenvolvida por J.J. Hopfield, a qual a NASA utiliza para melhorar a qualidade de imagens ligadas a astronomia [32]. Este algoritmo utiliza os pixels da imagem como valores de entrada. A imagem é inicialmente transformada em um vetor, em que cada componente deste vetor representa um pixel da imagem. Cada pixel é, então, associado a um número binário (0 ou 1). Através de equações é feita uma atribuição de pesos aos pixels, estabelecendo-se relações entre eles. A rede é treinada de modo a produzir os vetores de pixels de saída, idênticos aos de entrada. Assim, se a entrada for um vetor correspondente a uma imagem “A”, a saída deve ser exatamente o mesmo vetor correspondente a imagem “A”. A rede de Hopfield pode então, após ser treinada, reconhecer uma imagem mesmo que esta se apresente pouco nítida [32].



## OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um programa computacional para o tratamento de dados provenientes de imagens, objetivando sua aplicação na química analítica.

Avaliar a possibilidade do emprego de um scanner comercial como dispositivo de obtenção das imagens.

Empregar redes neurais artificiais no tratamento de dados provenientes das imagens.

## CAPÍTULO 2

### 2.1. DESCRIÇÃO DO PROGRAMA DESENVOLVIDO

O desenvolvimento do programa para o tratamento de imagens foi feito utilizando-se a linguagem Visual Basic 3.0 da Microsoft. Esta linguagem, além de trabalhar em ambiente Windows, onde também trabalham diversos aplicativos destinados a aquisição e manipulação de imagens, apresenta diversas ferramentas gráficas, tornando mais simples o desenvolvimento do programa.

A Figura 12 mostra a tela principal do programa, contendo como exemplo, na **Janela de Observação**, uma imagem de diversas manchas de misturas de RNA de milho, separadas por eletroforese. A figura mostra também a janela onde estão contidas as **Ferramentas de Trabalho** e o **Painel de Resultados**, sendo que neste último são mostrados os dados principais obtidos de um processo de tratamento da imagem. A **Janela de Observação** contém ainda uma janela de trabalho, a qual é invisível ao usuário e é automaticamente escalonada ao tamanho da imagem adquirida. Esta janela delimita a área de trabalho do usuário segundo o tamanho da imagem e ajusta as coordenadas da mesma para as coordenadas da tela do computador. Isto permite que a imagem seja movimentada livremente pelo usuário através das **Barras de Rolagem**, permitindo a sua análise mesmo nos casos onde a sua dimensão é maior do que aquela apresentada pela **Janela de Observação**.

As **Ferramentas de Trabalho** contém os botões correspondentes as principais operações executadas pelo programa, como pode ser observado mais detalhadamente na Figura 13. O botão nº 1 é utilizado para a escolha, pelo usuário, da área de seleção; o botão nº 2 para reprodução das dimensões da área de seleção; o botão nº 3 para varredura da imagem de fundo (background); o botão nº 4 para varredura da mancha selecionada; o botão nº 5 para aplicação do filtro digital; o botão nº 6 para cancelamento de todas as operações

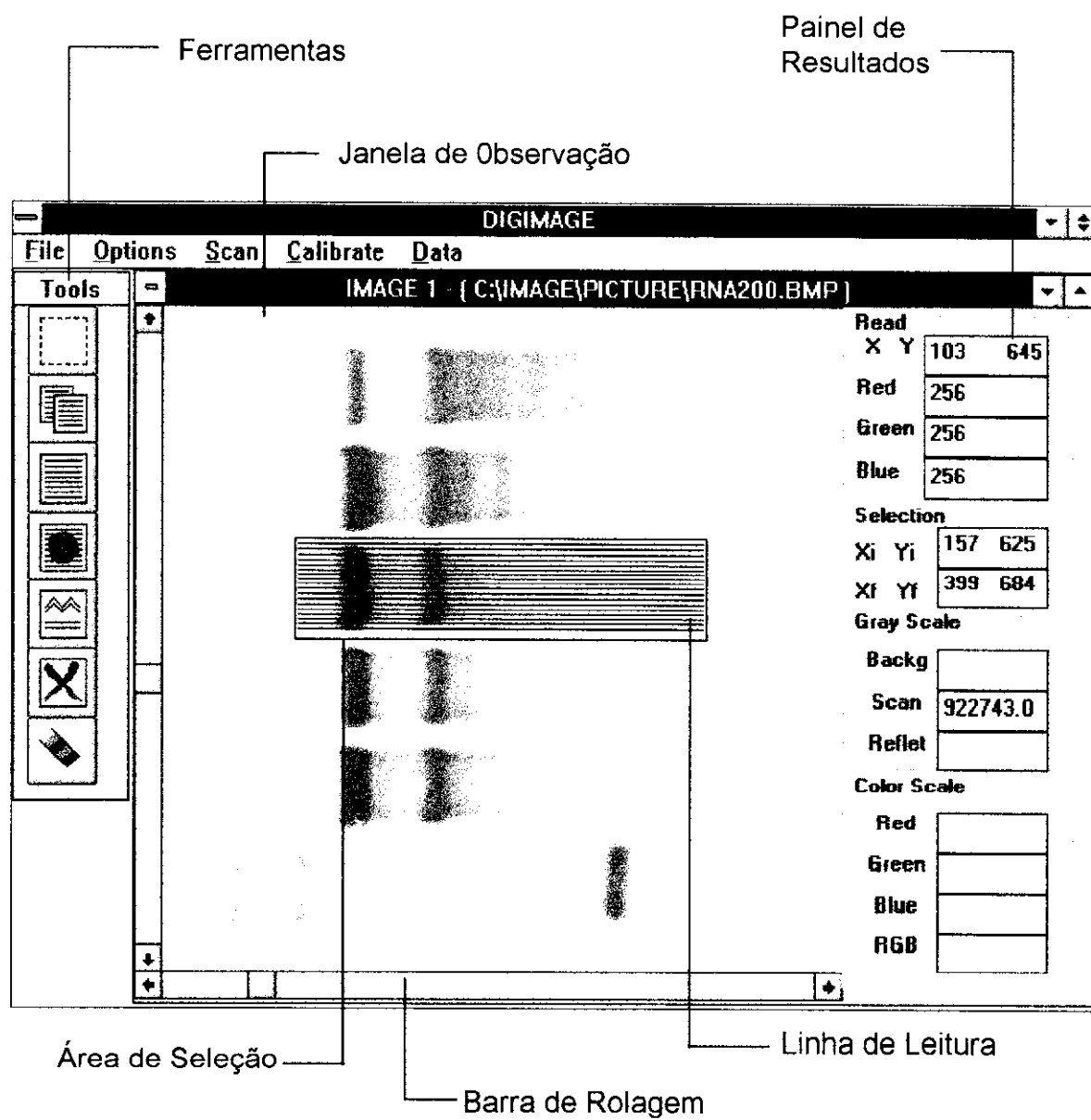
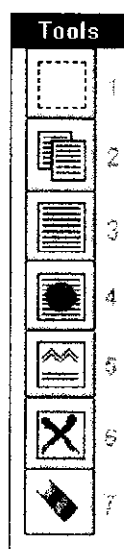


Figura 12 - Janela principal do programa desenvolvido para aquisição de dados de imagens.

em curso e reinicialização do programa e o botão nº 7 para exibição dos valores das componentes de cor R, G e B relativos ao tratamento de imagens dos papéis de pH. Todas essas funções serão discutidas em maior detalhe, posteriormente.

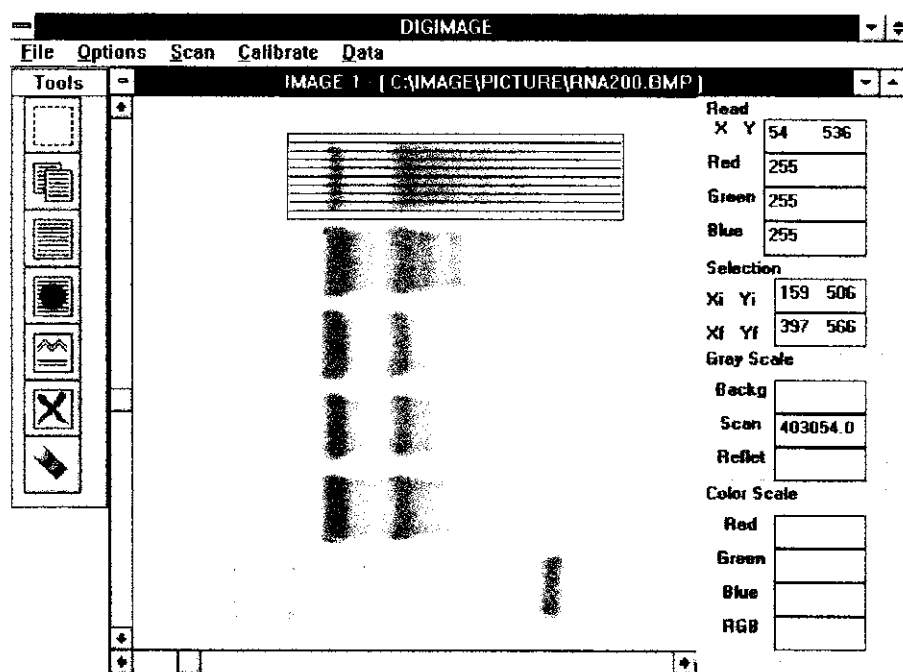
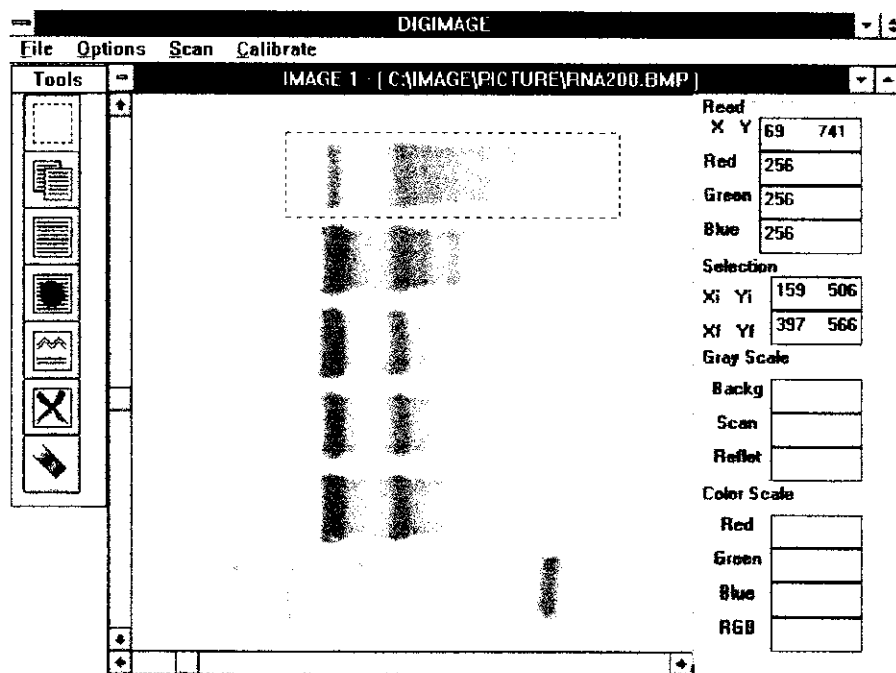


**Figura 13** - Ferramentas de trabalho.

O programa é capaz de manipular imagens em tons de cinza (256 tons) ou coloridas (16,7 milhões de cores), sendo que neste último caso, os dados são também decompostos em seu três elementos básicos vermelho, verde e azul (RGB).

Na Figura 12 também é mostrada a **Área de Seleção**, a qual determina a região da imagem da qual serão extraídos os dados, sendo este processo denominado de *varredura*. Esta área é determinada pelo usuário através do mouse, sendo permitida a seleção de toda a figura ou de uma determinada região da mesma.

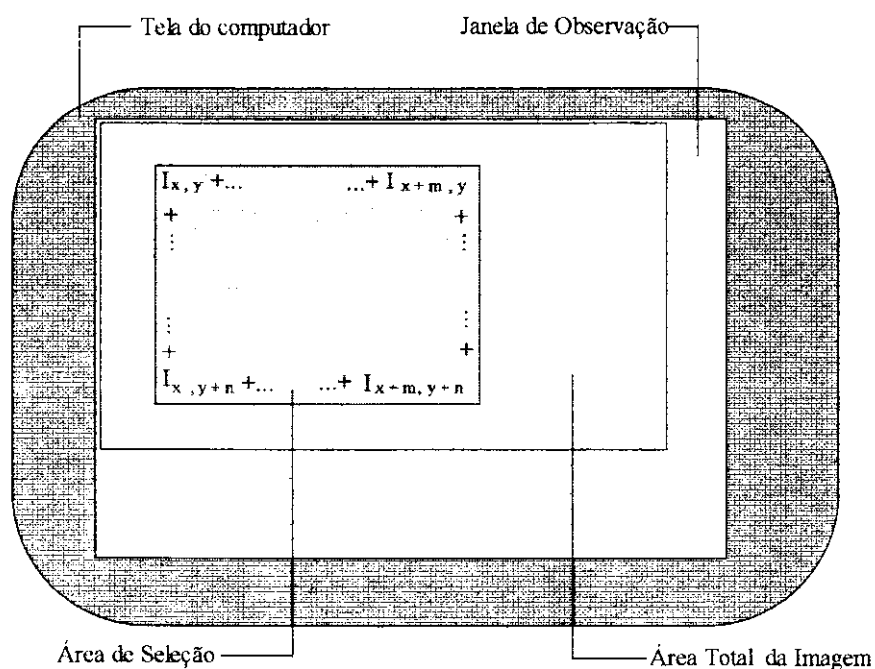
Na Figura 14 é mostrada um exemplo da sequência que o usuário deve seguir para selecionar a região da imagem onde será realizada a varredura. Neste exemplo, após o usuário escolher a parte da imagem de seu interesse, ele determina as dimensões da área de seleção sobre a mancha a ser estudada, como mostrado na parte A da Figura 14, bem como os parâmetros de varredura. Então, é acionado o botão (botão nº 4 na Figura 13) que inicia este processo (parte B da Figura 14).



**Figura 14 - Procedimento de seleção da área da imagem (A) e sua posterior varredura (B).**

A varredura da imagem, mostrada na tela do computador, é automaticamente realizada pelo programa e se baseia na leitura dos pontos de tela (pixels) dentro da região delimitada pela área de seleção. As linhas mostradas na parte B da Figura 14 representam os pontos da imagem onde efetivamente é realizada a varredura. A imagem é então convertida em uma matriz que contém os valores de intensidade de cor de cada ponto da imagem, sendo estes pontos ( $I$ ) indexados a  $x$  e  $y$ . Os índices  $x$  e  $y$  guardam as coordenadas dos pontos que foram efetivamente varridos em relação a área total da imagem, permitindo desta forma que esta região possa ser futuramente identificada.

A Figura 15 mostra um esquema da tela do computador, mostrando a janela de observação, a área de seleção e a área total da imagem. Nesta figura é mostrada também a representação da matriz contendo os pontos da imagem lidos.

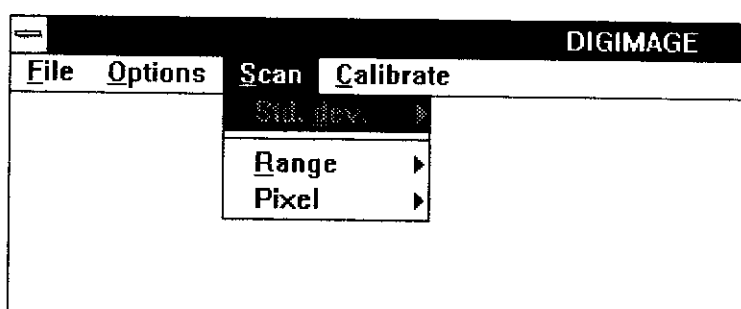


**Figura 15** - Desenho esquemático mostrando a tela do computador, a janela de observação, a área de seleção e a representação da matriz gerada na varredura da imagem pela área de seleção, com  $x$  colunas e  $y$  linhas.

A dimensão da matriz é determinada pelo tamanho da área de seleção e pela resolução de leitura. Esta resolução determina o número de pontos da imagem (pixels) que

efetivamente serão varridos, sendo que é permitido ao usuário sua seleção prévia e independente tanto para a abcissa ( $\Delta x$ ) como para a ordenada ( $\Delta y$ ) da área de seleção. Isto proporciona uma melhor otimização na varredura da imagem, sem que ocorra perda de informações e utilizando um menor espaço da memória RAM do computador.

Estes parâmetros de resolução devem ser escolhidos pelo usuário em uma janela do menu principal do programa, como é mostrado na Figura 16. Nesta figura é mostrado as palavras **Pixel**, que se refere ao número de pontos a serem efetivamente varridos (determinando a resolução da abcissa) e **Range**, que se refere a distância entre as linhas de varredura (determinando a resolução da ordenada). Quanto maior o número de pontos lidos ou quanto menor a distância entre as linhas de varredura, melhor será a resolução da região selecionada para a leitura da imagem. Como consequência, haverá também um aumento da matriz de dados que representa esta imagem e do espaço de memória necessário ao seu armazenamento.

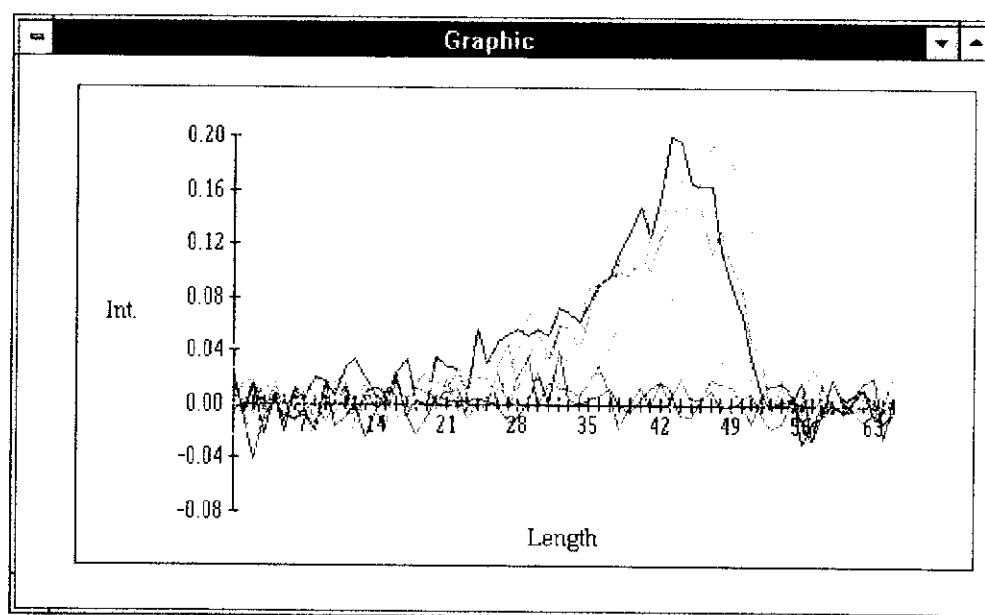


**Figura 16** - Escolha dos parâmetros de resolução no processo de leitura de uma imagem selecionada.

Na utilização de imagens coloridas, provenientes de corantes suportados em papel, como os papéis indicadores de pH, foi criado um botão específico (botão nº 7, Figura 13). Este botão permite ao usuário a seleção simultânea e automática da região formada pelos 4 indicadores contidos em uma única fita de papel de pH. Posteriormente são exibidos os valores médios de R, G e B calculados pelo programa, no painel de resultados. Para outras imagens coloridas, pode-se utilizar tanto o botão para a leitura da imagem de fundo (botão nº 3) como para a varredura da imagem selecionada (botão nº 4). Neste caso, as matrizes de

intensidades de cores geradas, armazenam separadamente as intensidades de cada uma das componentes básicas R, G e B da imagem varrida.

Finalmente, é permitido também ao usuário uma visualização gráfica em duas dimensões da matriz gerada, representando a refletância ou intensidade de cor em relação a distância de varredura, como mostrado na Figura 17. Nesta figura, cada linha corresponde a uma linha de leitura (varredura), sendo o eixo da abcissa referente aos pontos da imagem efetivamente lidos, e a ordenada, a intensidade de cor ou refletância.

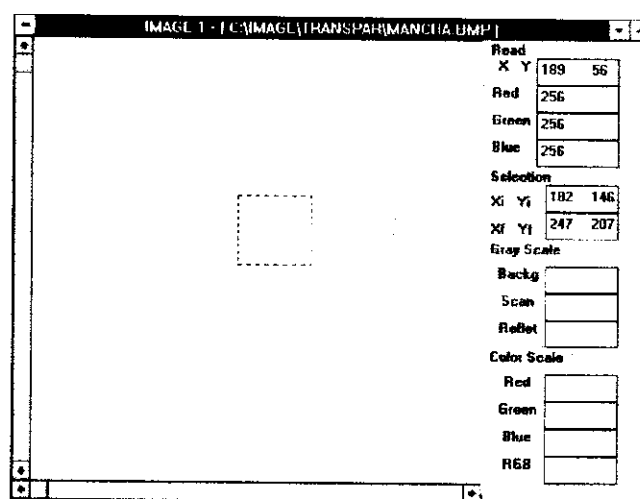


**Figura 17** - Visualização gráfica gerada pelo programa, correspondente a imagem varrida na Figura 18.

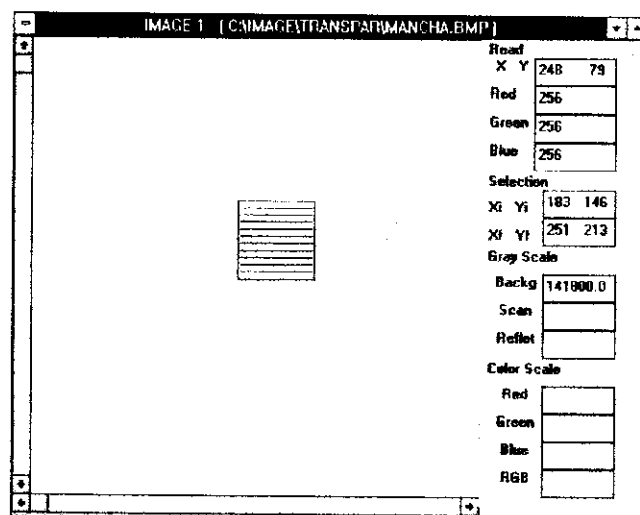
### 2.1.1. Leitura de refletância

O programa permite fazer medidas relativas de refletância. Para tanto, uma área de igual dimensão, utilizada na análise da imagem, é varrida para a região que contém apenas o material suporte, como mostrado na Figura 18 A. Como resultado, é obtido uma matriz contendo os valores de intensidade de cor do suporte empregado.

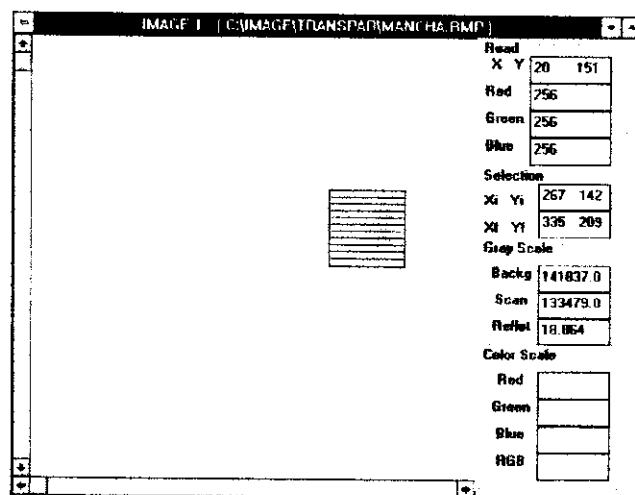




A



B



C

**Figura 18** - Escolha da região do material suporte e da mancha, para o posterior cálculo da refletância.

Posteriormente, é calculado o logaritmo negativo da razão entre cada ponto de leitura da imagem e seu correspondente ponto de leitura da matriz do material suporte (Figura 18B), segundo a equação [6]:

$$R_{x,y} = -\log \frac{I_{x,y}}{b_{x,y}} \quad (7)$$

onde:  $R_{x,y}$ , corresponde ao iésimo valor de refletância.

$I_{x,y}$ , corresponde ao iésimo valor de cor para a imagem da amostra.

$b_{x,y}$ , corresponde ao iésimo valor de cor para a imagem do suporte (background).

A partir desta equação é calculado o valor de refletância do material analisado onde o suporte é considerado como o padrão de referência da medida.

No programa (Figura 18), o usuário escolhe inicialmente a área do material suporte (Figura 18 A) e pressiona o botão nº 3 (Figura 13). Automaticamente é armazenado a matriz de dados referente ao material suporte (Figura 18 B), e em seguida, o usuário escolhe a região que contém a amostra (Figura 18 C) e pressiona o botão nº 4. Após esta operação, é automaticamente calculado o valor de refletância, ponto a ponto, empregando a equação anterior e, finalmente, é mostrado no painel de resultados, o valor da somatória de refletância da amostra selecionada.

Deste modo, este procedimento corrige possíveis distorções da imagem de fundo, causadas pelas diferenças físicas dos materiais suporte empregados como, por exemplo, em processos cromatográficos.

## 2.2. Apresentação dos dados

Após a etapa de varredura de uma imagem pelo programa, suas informações são convertidas em dados numéricos, os quais podem ser armazenados em disco sob a

formatação do tipo ASCII. Este formato foi escolhido pois permite a manipulação destes dados em diversos programas matemáticos e gráficos que trabalham em ambiente Windows.

O próprio programa fornece ainda a possibilidade de visualização dos dados na forma gráfica, apresentando também os resultados finais da integração das áreas das manchas em uma janela do programa denominada **painel de resultados**, mostrado na Figura 19.

O **painel de resultados** é subdividido em janelas, onde são mostrados os dados obtidos após o processo de leitura das imagens. Na janela de leitura **Read** são mostrados tanto a posição instantânea do mouse sobre a imagem, em coordenadas dadas em número de pixels, bem como as intensidades de R, G e B no mesmo ponto. Na janela de seleção **Selection** observa-se as dimensões da **área de seleção**, através das coordenadas iniciais ( $X_i, Y_i$ ) e finais ( $X_f, Y_f$ ). Na janela **Gray Scale** pode-se observar o resultado da integral da região da imagem de fundo (Backg), da mancha selecionada (Scan) e do cálculo da refletância (Reflet). Os valores apresentados para as integrais são adimensionais, pois são derivados da escala inteira de intensidades de cor (0 a 255).

Na leitura de imagens em tons de cinza, a janela **Read** exibe os mesmos valores de intensidade de cor para as componentes R, G e B, em uma única escala que varia entre 0 e 255. Para imagens coloridas, a leitura da cor é decomposta em suas três componentes básicas e processadas independentemente.

A janela **Color Scale** é específica para manchas coloridas e os resultados são apresentados em termos de valor médio das componentes R, G e B, para a área selecionada pelo usuário.

<b>Read</b>	
X Y	365 397
Red	176
Green	176
Blue	176
<b>Selection</b>	
Xi Yi	210 28
Xf Yf	274 90
<b>Gray Scale</b>	
Backg	349420.0
Scan	319185.0
Reflet	79.701
<b>Color Scale</b>	
Red	
Green	
Blue	
RGB	

**Figura 19 - Painei de resultados**

## 2.3. Aquisição das imagens

As aquisições das imagens foram feitas através de um scanner manual, marca Logitech, com resolução máxima de 400 dpi (pontos por polegada). As imagens podem ser adquiridas como monocromáticas, em tons de cinza (256 tons) ou coloridas (16,7 milhões de cores), sendo que apenas imagens destes dois últimos tipos foram empregadas neste trabalho.

As imagens digitalizadas adquiridas podem ser armazenadas em disco ou transferidas diretamente para o programa desenvolvido, para posterior tratamento. Em ambos os casos, as imagens devem possuir formatação do tipo bitmap (BMP), a qual possui a desvantagem de produzir arquivos muito extensos. No entanto, este tipo de formatação foi utilizada devido a limitação do Visual Basic, que só trabalha com imagens deste formato.

A quantidade de memória RAM ou de disco utilizada na manipulação da imagem (ou sua armazenagem) é determinada pela sua dimensão, pela resolução do scanner (selecionada

na etapa de aquisição da imagem) e pelo tipo de imagem adquirida (em tons de cinza ou colorida). De maneira geral, as imagens analisadas neste trabalho apresentam tamanhos variando entre 50 a 1500 Kbytes, sendo que estes tamanhos podem ser previamente calculados [36].

## 2.4. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.4.1. Materiais e instrumentos utilizados

- Microcomputador padrão IBM-PC 486, 66 MHz, 16 Mbytes de memória RAM, monitor Samsung SVGA de Dot Pitch 0,28 mm e placa de vídeo padrão VESA de 2 Mbytes de memória. Foi utilizado o ambiente Windows 3.11, configuração do vídeo de 640 x 480 pixels e 16,8 milhões de cores.

- Scanner manual, marca Logitech, para imagens em cores e tons de cinza, com resolução máxima de 400 dpi.

- Padrões de refletância utilizados foram de 10; 21,7; 40; 59,8; 79,5 e 98,7%, certificados pela Labsphere, segundo as normas do National Institute of Standards.

- Espectrofotômetro contendo um detector com um arranjo linear de 512 diodos.

- Potenciômetro digital da Corning modelo 350.

- Programas computacionais: Microsoft Visual Basic 3.0, MathWorks MatLab versão 4.2c1, Microcal Origin 3.5.

- Espectrômetro de Fluorescência de Raios-X de Energia Dispersiva da Tracor X-Ray Inc., modelo Spectrace 5000. Os parâmetros de aquisição foram os seguintes:

- Voltagem do tubo de raios X: 40 KV;

- Corrente do tubo: 0,20 mA para o mercúrio e 0,15 mA para o chumbo;

- Tempo de irradiação: 100 segundos;

- Tempo de pré-aquecimento do tubo: 5 segundos;

- Filtro: filme de 0,05 mm de Rhódio;

- Atmosfera: ar (pressão atmosférica ambiente);

- Regiões de integração dos picos no espectro: de 9740 a 10180 eV para o mercúrio, e de 10120 a 10860 eV para o chumbo;

- Os papéis cromatográficos foram recortados em forma circular e encaixados em suportes cilíndricos de teflon, de 3 cm de diâmetro.

- Reagentes e solventes: Metanol PA Merck, Etanol Absoluto Merck, Acetona PA Merck, Cloreto de Chumbo PA Vetec, Ditizona PA Merck, Cloreto de Potássio PA Ecibra, Cloreto de Mercúrio PA Synth, Tetracloreto de Carbono PA Merck, Corante Violeta Ácido PA Merck, Ácido Cítrico PA Reagen, Fosfato de Sódio PA Riolab, Borato de Sódio PA Fisher, Hidróxido de Sódio PA Synth.

#### 2.4.2. Cromatografia em papel - Violeta Ácido

A aplicação do programa em estudos quantitativos foi realizado em cromatografia em papel, utilizando o corante Violeta Ácido. Uma solução estoque de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  do corante foi preparada utilizando como solvente uma mistura de etanol/água (10:1 v/v). A partir desta solução foram preparadas 5 soluções com concentrações de 50, 100, 200, 300 e  $400 \text{ mg L}^{-1}$ . Um volume de  $1 \mu\text{L}$  de cada solução foi aplicado com o auxílio de uma microseringa sobre o papel e eluídos por aproximadamente 4 cm, em uma solução de metanol/água (1:1 v/v). Após a eluição e secagem do papel cromatográfico, as respectivas imagens foram adquiridas em tons de cinza com resolução de 100 e 200 dpi.

As corridas cromatográficas foram feitas em béquers de 600 mL utilizando-se vidros de relógio como tampa e fios de cobre encapados para fixar os papéis na forma de um “varal”. O volume da solução de eluição foi de 20 mL. Os papéis cromatográficos usados na eluição tanto dos metais como do corante Violeta Ácido, são do tipo papel de filtro qualitativo.

#### 2.4.3. Cromatografia em papel - Íons mercúrio (II) e chumbo (II)

Foram preparadas soluções aquosas de  $\text{HgCl}_2$  nas concentrações  $500 \text{ mg L}^{-1}$  (solução estoque); 12,5; 25; 50; 100; 125 e  $250 \text{ mg L}^{-1}$  a partir do sal seco, e de  $\text{PbCl}_2$  nas concentrações  $500 \text{ mg L}^{-1}$  (solução estoque); 2,5; 5; 10; 20; 50; 100; 125 e  $250 \text{ mg L}^{-1}$  a partir do sal seco. O reagente revelador utilizado foi a ditizona (difeniltiocarbazona), preparado com concentração 0,016% (m/v) em  $\text{CCl}_4$ .

As soluções dos metais foram aplicadas sobre o papel com um capilar de vidro adaptado em uma microseringa com volume 2  $\mu\text{L}$  e eluídos em solução acetona/água (1:1 v/v) contendo KCl 0,05  $\text{mol L}^{-1}$ . Após a eluição e secagem do papel a solução de ditizona foi pulverizada sobre o papel e, após a evaporação do solvente (aproximadamente 30 min), as imagens foram adquiridas em 16,7 milhões de cores, com resolução de 100 e 200 dpi.

A aplicação da solução de ditizona foi feita com o auxílio de um frasco pulverizador acoplado a uma bomba, para o impulsionamento do ar.

As corridas cromatográficas foram feitas do mesmo modo que no item anterior.

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água desionizada e todo material de vidro empregado foi lavado com solução de  $\text{HNO}_3$  10%.

#### 2.4.4. Indicadores de pH suportados em papel

Foi preparada uma série de 24 soluções tampão para uma faixa de pH entre 1 e 13, como mostrado na Tabela 4, a partir da mistura de soluções de ácido cítrico 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , borato de sódio 0,025  $\text{mol L}^{-1}$ , fosfato de sódio 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  e hidróxido de sódio 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  [37]. Todas as soluções foram aferidas em potenciômetro digital, utilizando um eletrodo de vidro combinado. Cada papel de pH (marca Merck Cat. No. 9535) foi mergulhado na solução tampão e deixado secar por uma hora. Então, foi feita a aquisição da imagem, com resolução de 100 dpi.

As imagens foram adquiridas em 16,7 milhões de cores, em triplicata para cada pH e foram armazenados os valores médios das componentes R, G e B para cada um dos quatro indicadores presentes na fita do papel utilizado.



**Tabela 4** - pHs das soluções tampão utilizadas no estudo das imagens dos papéis de pH da Merck.

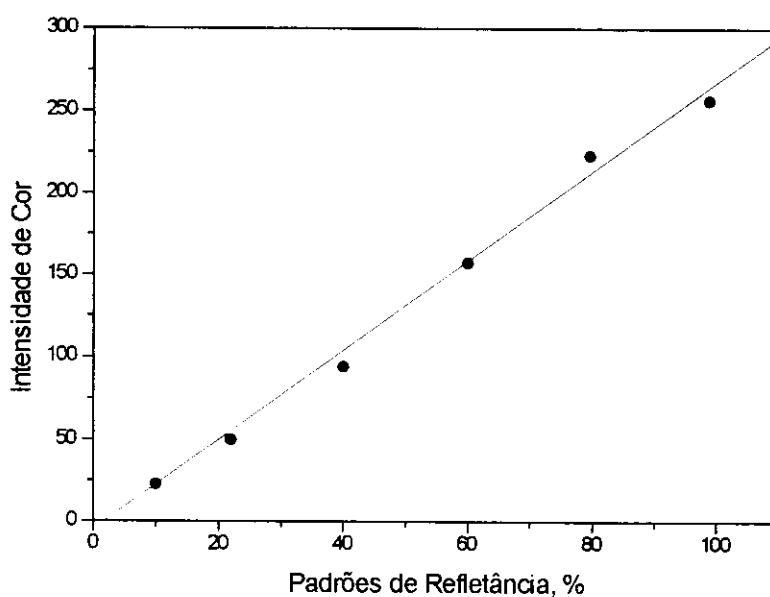
pH	pH	pH
1,085	4,858	8,306
1,117	5,280	9,092
1,823	5,645	9,945
2,312	5,980	10,237
2,795	6,488	10,846
3,195	7,044	11,720
3,590	7,698	12,378
4,058	8,015	12,790

## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Comportamento do Scanner

Estudos preliminares foram realizados para verificar o comportamento de resposta das imagens adquiridas através do scanner. Para tanto, foram obtidas imagens de padrões de refletância certificados, segundo as normas do National Institute of Standards (USA). Estas imagens foram então varridas através do programa desenvolvido e os valores de intensidades de cor (tons de cinza) foram graficados contra os valores de refletância dos padrões, como mostra a Figura 20.

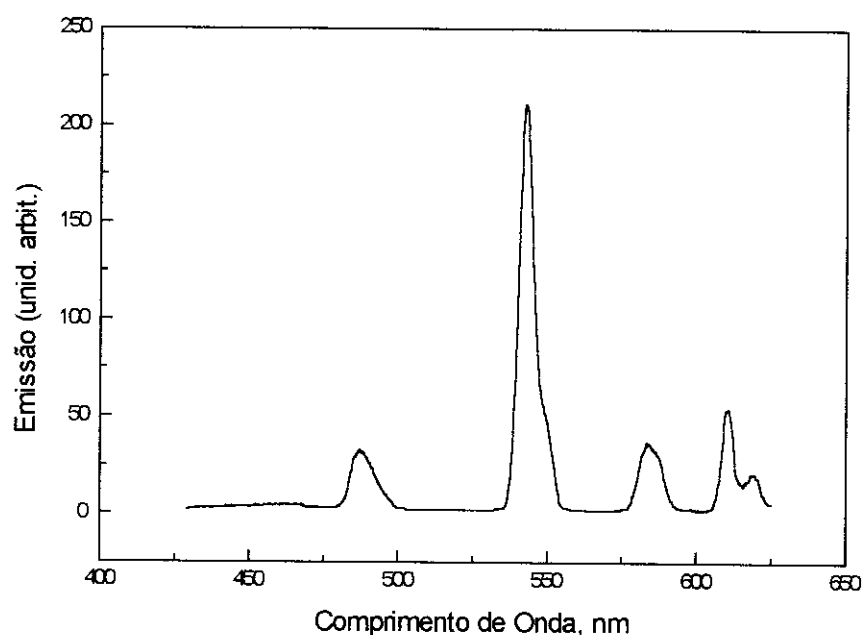


**Figura 20** - Curva dos valores de refletância para padrões certificados em função dos valores de intensidades de cor (tons de cinza) obtidos pelo processo de digitalização de suas imagens. Ajuste de brilho do scanner de 2,5. Equação da reta  $I = -8,98 + 275 P$ , com correlação igual a 0,997. Onde I é a intensidade de cor e P é a refletância dos padrões utilizados.

A existência de um comportamento linear na resposta das leituras das imagens dos padrões em função de sua refletância indica que o processo de digitalização de imagens

pode ser utilizado em análises quantitativas de amostras contendo manchas em tons de cinza, cujos valores de refletância se situem dentro da faixa de 5 a 99 %. A repetibilidade no processo de aquisição das imagens dos padrões de refletância foi avaliada, mostrando um desvio padrão de 0,5% para 6 medidas.

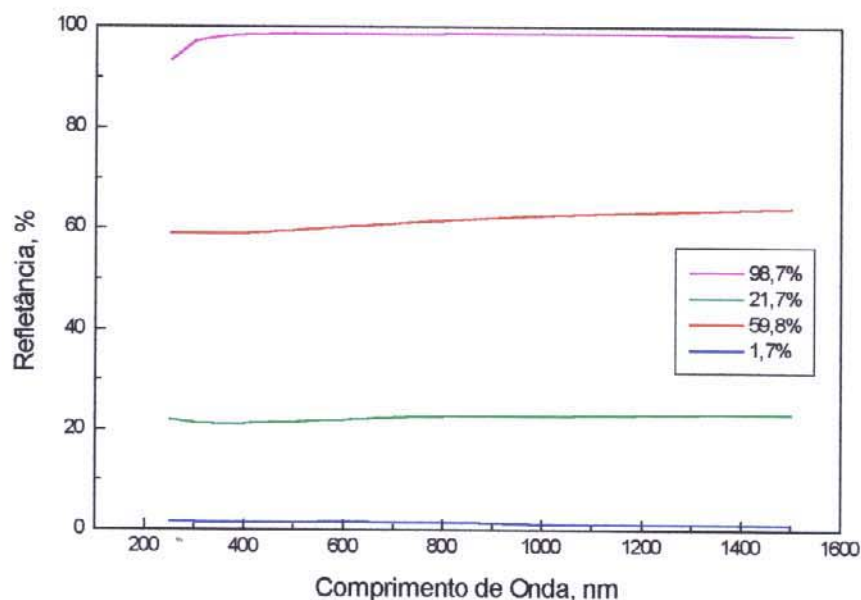
Foi feito também um espectro de emissão da lâmpada do scanner, em um espectrofotômetro sem correção da linha base, como mostrado na Figura 21.



**Figura 21** - Espectro de emissão da lâmpada do scanner.

Pode-se observar que a lâmpada possui maior intensidade de emissão na região do azul, verde e vermelho, sendo que destas, a região espectral de maior intensidade é a verde. Em função disto foi também realizado um estudo, digitalizando-se imagens de quatro padrões de refletância utilizados na construção da curva mostrada na Figura 20, adquirindo-se as mesmas como imagens coloridas e então verificando-se separadamente as intensidades das componentes R, G e B. Verificou-se que para esta situação, a intensidade de resposta para estas cores básicas é semelhante. Este resultado indica que mesmo a lâmpada possuindo diferentes intensidades de emissão em determinadas faixas espectrais,

o detector do scanner é calibrado para produzir respostas proporcionais a cada uma das componentes R, G e B. Esta observação está baseada no fato de que os padrões de refletância empregados nas medidas, possuem comportamento de resposta semelhante para uma larga faixa do espectro, como pode ser observado na Figura 22.



**Figura 22** - Refletância de quatro padrões em função do comprimento de onda, empregados na aquisição de imagens coloridas.

Foi também verificado que imagens obtidas através do scanner apresentavam comportamento de resposta diferente, dependendo do posicionamento do objeto em relação a área de digitalização do instrumento, que possui comprimento de 10,5 cm. Isto foi feito através da digitalização de diferentes objetos que apresentaram uma distribuição homogênea de cor ao longo de toda a área útil de digitalização do scanner. As imagens obtidas foram varridas empregando o programa desenvolvido, e os resultados mostraram que regiões da imagem situadas nos extremos da área útil de digitalização do scanner, apresentavam intensidades de cor menores do que aquelas localizadas na sua parte central.

Dois fatores podem influenciar este comportamento: a diferença de resposta dos elementos de CCD do detector e a falta de uma iluminação homogênea ao longo de todo o objeto digitalizado. Detectores que são formados por arranjos de sensores são passíveis de

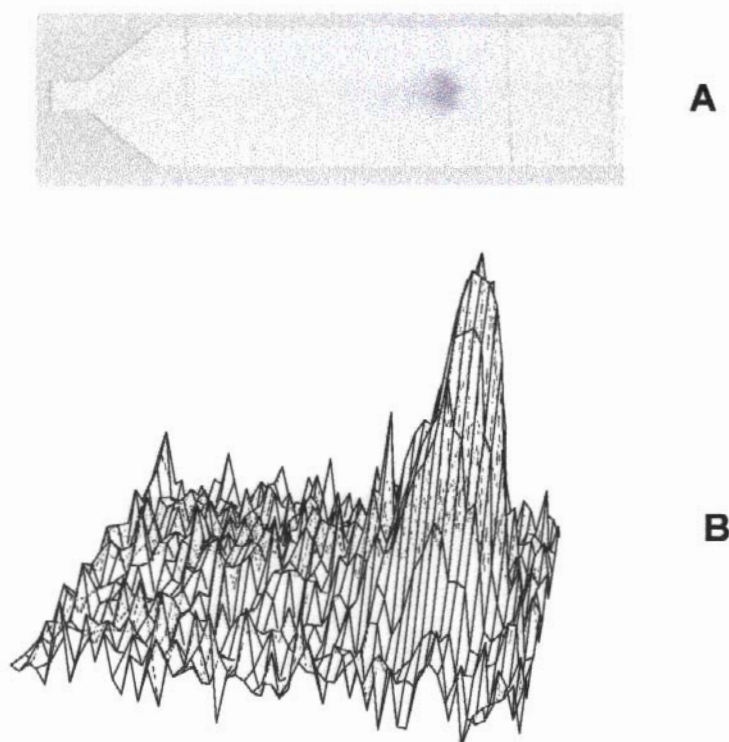
apresentarem diferenças de resposta para cada sensor [3]. A falta de uma iluminação homogênea durante a etapa de aquisição de uma imagem é também citada como fonte de erro no tratamento de imagens [23].

No início, após o processo de calibração do equipamento, segundo recomendação do fabricante, esta diferença era pequena ou inexistente. Com o aumento da vida útil do instrumento, esta diferença foi aumentando, mesmo realizando-se a calibração. Em função disto, optou-se por fazer a aquisição de uma imagem sempre em uma mesma posição, segundo a área útil de digitalização do scanner. Foi escolhido então a área central do instrumento, pois nesta os sensores apresentam uma intensidade de resposta muito semelhante. De qualquer forma, no caso de haver uma imagem que necessite o uso da área total de digitalização do scanner, pode-se utilizar um fator de correção na geração da matriz de dados, para normalizar as respostas dos sensores.

### 3.2. Repetibilidade de aquisição das imagens

A repetibilidade no processo de aquisição das imagens foi avaliada fazendo uso de manchas do corante Violeta Ácido formadas sobre papel cromatográfico. Para tanto, foi adicionado em diferentes papéis, 1  $\mu\text{L}$  de solução contendo 50 e 400  $\text{mg L}^{-1}$  do corante, o que representa uma adição de 50 e 400 ng do corante, respectivamente. As amostras foram eluídas em solução água/metanol (1:1 v/v) e, após a secagem, foram adquiridas 6 imagens de cada papel, com o auxílio do scanner, utilizando-se imagens em tons de cinza e resolução de 100 dpi.

A figura 23A mostra uma imagem obtida a partir do papel cromatográfico contendo a mancha formada pelo corante, referente a solução de 400  $\text{mg L}^{-1}$ .



**Figura 23** - Imagem de uma mancha de corante Violeta Ácido de 400  $\text{mg L}^{-1}$  eluído em papel cromatográfico (A) e visualização do gráfico da superfície da mesma mancha varrida pelo programa desenvolvido(B).

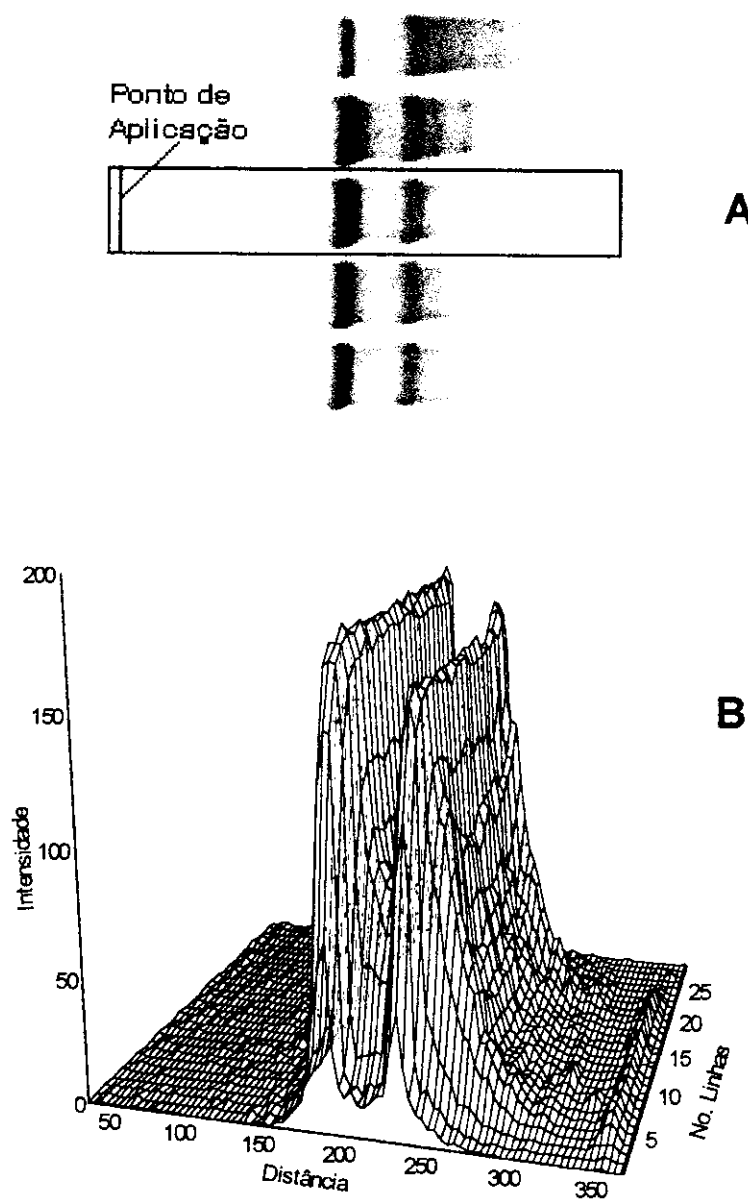
As imagens foram varridas com o uso do programa desenvolvido e foram calculadas as integrais das áreas formadas pelas manchas do corante eluído em cada papel. A figura 23B mostra um gráfico em 3 dimensões construído a partir da matriz de dados obtida no processo de varredura da imagem.

Para ambas concentrações foi observado que o processo de aquisição da imagem, empregando o scanner, apresenta um desvio padrão de 1,2%. Este resultado foi similar ao encontrado para manchas formadas sobre o papel, sem que o processo de eluição do corante tivesse sido empregado. Neste caso, as manchas apresentaram a forma aproximada de um círculo, enquanto que no caso do corante eluído, as manchas apresentaram formas irregulares (Figura 23A). Este resultado mostra que o desvio padrão encontrado no processo de aquisição da imagem não é causado pela dispersão da mancha.

É possível que este desvio seja decorrente da heterogeneidade do papel cromatográfico, empregado nas medidas, resultando em um espalhamento de luz diferente para cada aquisição de uma nova imagem.

Para verificar este fato, foi empregado uma fotografia de uma placa de eletroforese onde foram separadas 5 diferentes misturas de RNA de milho conforme é mostrado na Figura 24A. A fotografia foi escolhida por se tratar de um meio mais homogêneo e portanto, causar um menor espalhamento de luz quando comparado ao papel utilizado no processo cromatográfico.

Seis diferentes imagens da fotografia da placa de eletroforese foram obtidas, e cada uma das 5 manchas presentes nesta fotografia foram digitalizadas. A Figura 24B mostra a superfície em 3 dimensões obtidas a partir da matriz de dados resultante do processo de varredura das manchas. O resultado médio da integração total de cada mancha e os desvios padrão relativos são mostrados na Tabela 5. Os resultados mostram que os desvios no processo de aquisição e varredura das imagens para a fotografia é melhor que 0,5%.



**Figura 24** - Imagem de uma mistura de RNA de milho separada por eletroforese (A). Representação gráfica em 3 dimensões, construída a partir da varredura da imagem, marcada na Figura pela área de seleção (B).



Os dados obtidos para imagens formadas em um meio heterogêneo (papel cromatográfico) mostraram um maior desvio padrão, quando comparados a um meio mais homogêneo (fotografia), indicando que o espalhamento de luz pode influenciar no processo de aquisição de imagens.

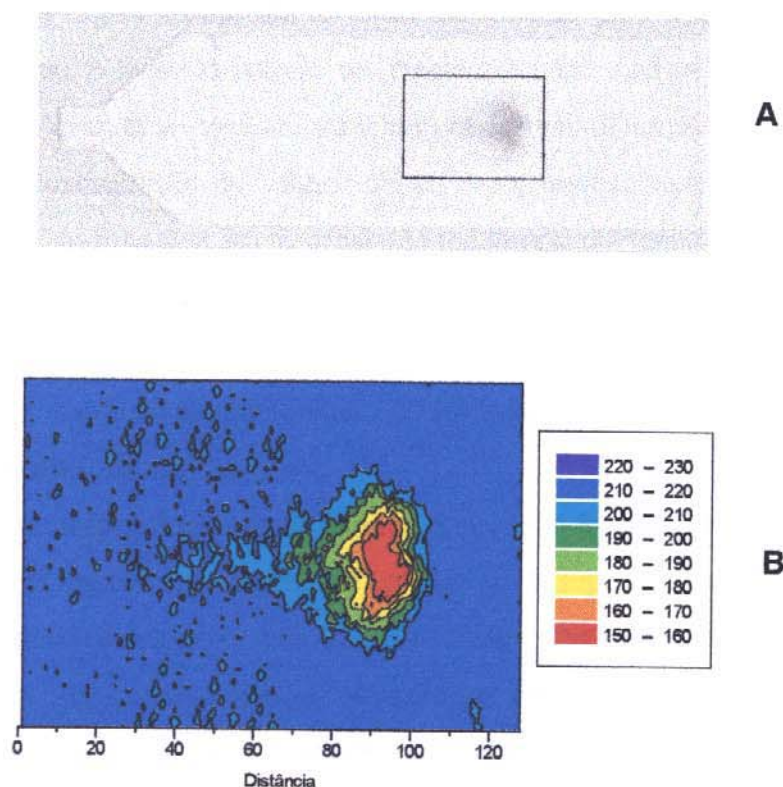
**Tabela 5** - Resultado médio da integração de área para 6 diferentes aquisições de uma mesma imagem fotográfica de uma placa de eletroforese, contendo 5 manchas, referente à separação de uma mistura de RNA de milho mostrada na Figura 24A. Na tabela, são mostrados também os desvios padrão relativos ( $S_r$ ) para cada uma das manchas. As unidades são arbitrárias.

Nº da Mancha	Integração da Área	Sr(%)
1	102978	0,4
2	98774	0,3
3	73976	0,5
4	77564	0,2
5	70543	0,5

Este fato pode ser verificado pela comparação dos gráficos em 3 dimensões construídos a partir dos dados de varredura do papel cromatográfico e da fotografia da placa de eletroforese (Figuras 23B e 24B). Observa-se que no primeiro caso, os dados apresentam maiores distorções causadas pelo espalhamento de luz, os quais podem ser interpretados como ruídos, que influenciam os cálculos de integração da mancha e, portanto, a precisão dos resultados.

### 3.3. Cromatografia em papel - Violeta Ácido

A aplicação e avaliação do programa desenvolvido em medidas quantitativas, foi inicialmente realizado, empregando imagens decorrentes de processo cromatográfico, utilizando o corante Violeta Ácido como analito, papel de filtro qualitativo como material suporte e solução água/metanol (1:1 v/v) como fase móvel. As soluções do analito e o procedimento cromatográfico empregados neste estudo foram previamente descritos na parte experimental.



**Figura 25** - Gráfico da superfície de contorno (B) de uma mancha do corante Violeta Ácido de concentração  $400 \text{ mg L}^{-1}$ , com aplicação de  $1 \text{ }\mu\text{L}$  da solução (ou  $400 \text{ ng}$  de massa) sobre o papel, visto na parte superior (A). A legenda representa a intensidade de tons de cinza, em função das cores empregadas na construção do gráfico.

A Figura 25A mostra uma imagem obtida em tons de cinza e com resolução de 100 dpi para um papel cromatográfico contendo uma mancha formada pelo corante violeta ácido após a eluição de  $1 \text{ }\mu\text{L}$  de uma solução de  $400 \text{ mg L}^{-1}$ . Nesta figura é possível observar também a área de seleção, que determina a região da imagem efetivamente varrida. Junto

desta figura é mostrado um gráfico da superfície de contorno construído a partir dos dados obtidos, após o processo de varredura da imagem. Este gráfico foi construído empregando diferentes cores para facilitar a visualização da distribuição das intensidades de tons de cinza, causada pela dispersão da mancha do corante sobre o papel após o processo de eluição. A legenda mostra as faixas de intensidades de tons de cinza em função das cores empregadas na construção deste gráfico.

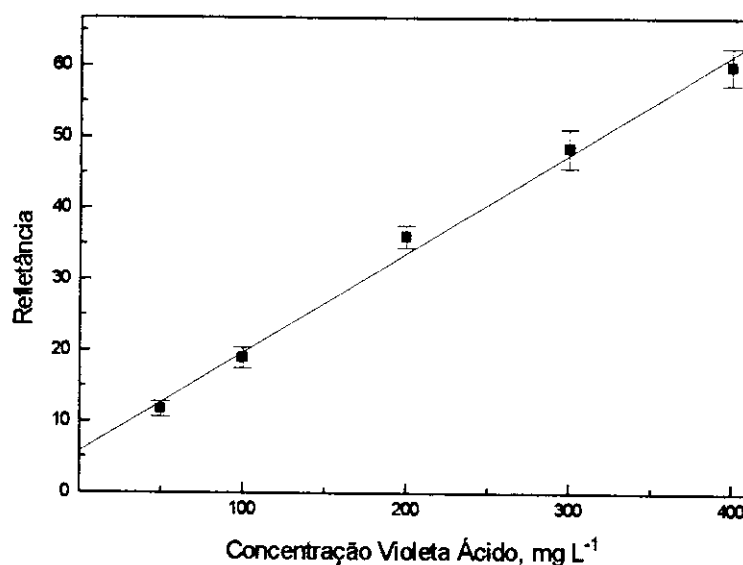
Nesta figura pode ser também verificado que, após o processo de eluição, a mancha formada apresenta uma distribuição irregular sobre o papel. Tal fato, dificulta a determinação de uma região apropriada ao redor da mancha, para a leitura dos dados da imagem, de forma que, os mesmos possam ser empregados em medidas quantitativas. Esta dificuldade aumenta, quando se compara manchas obtidas em diferentes eluições, para uma solução de mesma concentração do corante. Neste caso, mesmo mantendo-se as mesmas condições de eluição, os formatos das manchas são totalmente diferentes.

Devido a este perfil de distribuição da mancha sobre o papel optou-se por varrer toda a área da mancha e posteriormente integrar esses dados. Este procedimento de leitura assegura que toda a massa do analito, contido no material suporte, faça parte da medida independente do formato da mancha.

Um fato importante, observado na Figura 25, é que se fazendo a varredura de toda área da mancha e, em seguida, construindo-se um gráfico da superfície de contorno, pode-se visualizar o comportamento e interação do analito em relação a fase móvel e estacionária e, mesmo não sendo objeto de estudo deste trabalho, tal informação pode ser empregada em estudos futuros para a seleção da melhor fase estacionária e móvel na separação de substâncias em processos cromatográficos planares, com auxílio de computadores.

Para avaliar o comportamento do programa desenvolvido, e das imagens obtidas através do scanner, frente à variação de massa do analito, foi preparada uma série de papéis cromatográficos sobre os quais foram adicionados 1  $\mu$ L de solução de diferentes concentrações do corante, resultando em uma massa adicionada sobre o papel na faixa de 50 a 400 ng do analito.

Após a eluição e secagem do papel cromatográfico, as respectivas imagens foram digitalizadas e uma curva de calibração foi construída, a partir das concentrações das soluções, em função do valor de refletância da área total da mancha (equação 7, página 37). Esta curva de calibração é mostrada na Figura 26, onde cada ponto do gráfico é o resultado de uma média de 3 diferentes corridas cromatográficas para uma mesma concentração e as barras indicam a estimativa do desvio padrão.



**Figura 26** - Curva de calibração para corante violeta ácido em cromatografia em papel. Volume aplicado 1  $\mu\text{L}$ , fase móvel solução de metanol/água (1:1 v/v). Dimensão da área de seleção da imagem que será efetivamente digitalizada proporcional ao tamanho da mancha. Equação da reta  $R = 5,68 + 0,139 C$ , onde  $R$  é a refletância e  $C$  a concentração do corante. Correlação igual a 0,998.

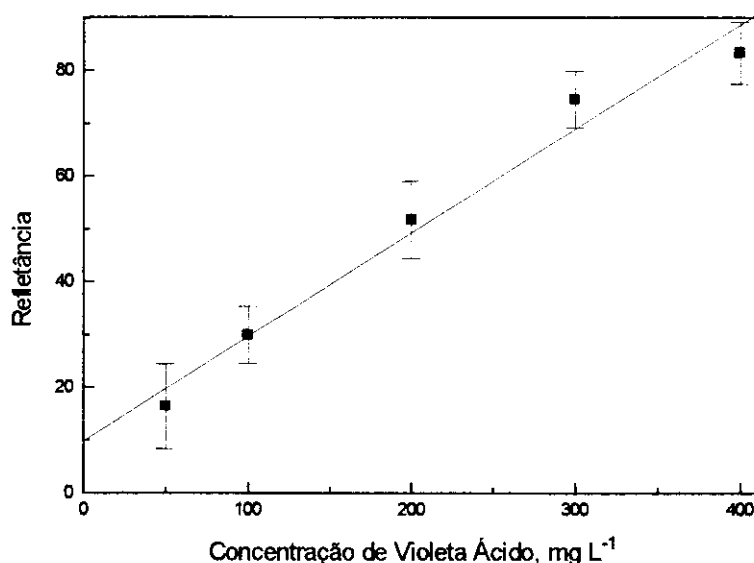
Foi observado que dois fatores afetam a precisão das medidas. O primeiro, diz respeito ao volume da solução aplicado, sendo este relacionado com a habilidade do operador em transferir volumes semelhantes com auxílio da microsseringa. O segundo fator está relacionado a dimensão da área selecionada para a digitalização da mancha e, neste caso, a precisão diminui com o aumento da área de seleção. O motivo para este comportamento é explicado em função da rugosidade do papel utilizado no processo

cromatográfico (como citado anteriormente), o qual, devido às suas imperfeições, proporciona diferenças de sinais, em consequência ao espalhamento de luz.

Através do cálculo da razão entre as intensidades de cor da área que contém a mancha e da área de mesma dimensão do material suporte, é encontrado a refletância correspondente, a qual somando todos os pontos da matriz de dados obtida, corresponderá a integração da área definida. Este procedimento garante que as diferenças físicas do material suporte empregado no processo cromatográfico, bem como distorções da imagem obtida pelo scanner, possam ser corrigidos. Normalmente, os materiais suportes empregados em cromatografia planar, apresentam uma superfície muito heterogênea, provocando um grande espalhamento de luz em todas as direções, o que dificulta esta correção, mas de maneira geral, é possível através deste procedimento, a comparação dos dados de manchas obtidas em diferentes partes ou mesmo lotes de um material suporte.

Foi verificado que a dimensão da área de varredura influencia a precisão das medidas. Quando a área de seleção possui dimensões próximas a da mancha, a precisão das medidas se situa em média, na ordem de 5 %. Nos casos, onde a área de seleção é aproximadamente 4 vezes maior que o tamanho da mancha, esta precisão diminui para cerca de 12 %.

A Figura 27 mostra a curva de calibração para o corante Violeta Ácido, construída a partir das mesmas imagens utilizadas na construção da curva de calibração mostrada na Figura 26. Neste caso, no entanto, a área de seleção utilizada é aproximadamente 4 vezes maior que as áreas das manchas. Como pode ser observado ocorre uma diminuição na precisão das medidas.



**Figura 27** - Curva de calibração para corante violeta ácido em cromatografia em papel. Volume aplicado 1  $\mu$ L, fase móvel solução de metanol/água (1:1 v/v). Dimensão da área de seleção aproximadamente 4 vezes maior que o tamanho da mancha. Equação da reta  $R = 9,87 + 0,197 C$ , correlação igual a 0,98, onde R é a refletância e C, a concentração do corante.

### 3.3.1. Emprego de filtros digitais

Esta dependência entre a dimensão da área de seleção e a precisão da medida dificulta o procedimento de varredura das manchas, uma vez que o usuário deve selecionar áreas de varredura de dimensão próxima ao tamanho da mancha e, ainda que esta dimensão seja igual para todas as amostras analisadas (replicatas). Isto exige do analista uma maior atenção durante o processo de varredura, podendo levá-lo à fadiga, se o número de amostras for muito grande.

Para tentar minimizar este problema o programa desenvolvido possui uma botão, mostrado anteriormente (botão nº 2, figura 13), que memoriza a dimensão da área de seleção e posteriormente utiliza esta mesma dimensão em todos os procedimentos de digitalização para uma série de análises. No entanto, foi verificado, que devido à distribuição irregular da mancha que foi eluída em um procedimento cromatográfico, existem casos onde a área previamente selecionada não pode ser novamente utilizada.

Este procedimento, torna-se inviável, principalmente, na construção de curvas de calibração, uma vez que, neste caso, diferentes massas do analito são adicionados ao material suporte, gerando manchas com dimensões totalmente distintas.

Para diminuir ou mesmo eliminar o efeito da dependência da dimensão da área de seleção e a precisão da medida, foram inicialmente aplicados filtros digitais com médias móveis, comumente aplicados no tratamento de dados provenientes de medidas espectrofotométricas [40]. Estes filtros, no entanto, trouxeram pouca ou nenhuma vantagem quando aplicados aos dados das imagens digitalizadas. Desta forma, foi necessário desenvolver um procedimento matemático apropriado para o tratamento dos dados provenientes das imagens, na tentativa de minimizar os efeitos discutidos anteriormente.

Este procedimento envolve inicialmente a leitura das intensidades de cor de uma área previamente selecionada, a qual deve conter apenas o material suporte empregado no processo cromatográfico. De posse destes dados, o programa automaticamente calcula o valor médio e o desvio padrão dos dados obtidos. Posteriormente, estes dados são aplicados à matriz de dados da imagem que contém a mancha do analito da seguinte forma:

se **leitura**  $\geq$  (média + desvio padrão)  $\rightarrow$  **resultado** = leitura - (média + desvio padrão)

se **leitura**  $<$  (média + desvio padrão)  $\rightarrow$  **resultado** = 0

onde **leitura** representa os dados de intensidade de cor da imagem varrida contendo a mancha do analito analisado.

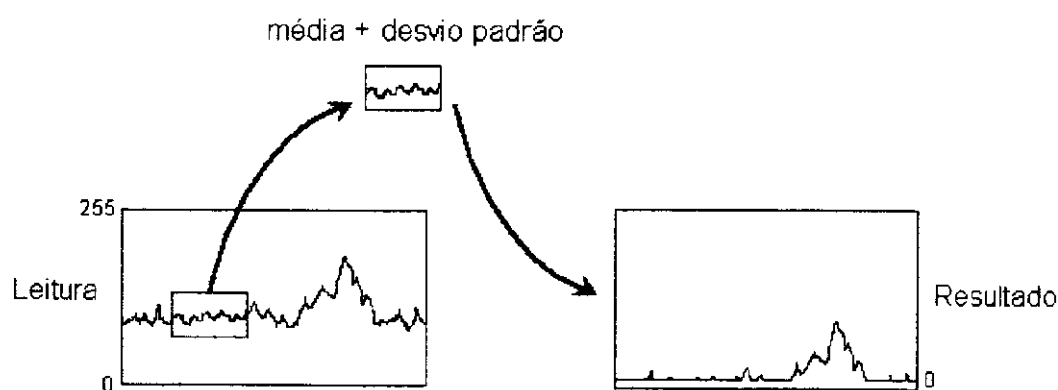
Segundo esta comparação, os dados de intensidade de cor que possuem valores menores que a média mais o desvio padrão são normalizados para o valor zero, enquanto que os dados de intensidades de cor que apresentam valores maiores que a média mais o desvio padrão têm seu valores diminuído desta mesma grandeza.

Desta forma, todos os dados da matriz que representa a imagem são normalizados em relação ao valor médio da intensidade de cor do material suporte e o seu respectivo desvio padrão, sendo que este último valor pode ser interpretado como o espalhamento da

radiação incidente sobre este meio de forma aleatória, produzindo o ruído verificado na varredura da imagem do papel cromatográfico (Figura 23B), influenciando desta forma, a precisão da medida.

Outra forma, de interpretar este procedimento de tratamento dos dados, é visualizá-lo como sendo um ponto de corte, onde a partir de certa intensidade de cor os dados obtidos são desconsiderados da medida. Este procedimento tem sido empregado no tratamento de dados de imagens [4, 26], porém quando este ponto é escolhido livremente pelo usuário este valor dependerá da sua habilidade e experiência. No procedimento desenvolvido neste trabalho, no entanto, o ponto de corte é calculado automaticamente pelo programa, tornando desnecessário o conhecimento prévio do tipo de dado que será tratado.

Esta ferramenta introduzida no programa é denominada de *filtro digital*. A Figura 28 mostra um desenho esquemático de como o filtro atua sobre os dados obtidos da imagem. Observa-se nesta figura que, o ruído causado pelo espalhamento de radiação sobre o material suporte, é praticamente eliminado, modificando a linha base, de forma a facilitar o cálculo da integral da região de interesse.



**Figura 28** - Desenho esquemático de funcionamento do filtro digital, onde no primeiro quadro é mostrado a **leitura** dos dados de intensidade de cor, e no segundo quadro, o **resultado**, que representa a normalização dos dados da leitura.



Ao utilizar o filtro digital é permitido ao usuário variar o ponto de corte, selecionando-se 1 ou mais valores de desvios padrão que serão somados ao valor médio calculado. Isto é feito através da seleção prévia de um “fator” que pode variar entre 1 a 5 unidades. Desta forma, ao se selecionar o fator igual a 1, o ponto de corte será definido pela soma da média mais 1 desvio padrão; se o fator for igual a 2, o ponto de corte será definido pela soma da média mais 2 vezes o desvio padrão, e assim por diante.

Estudos foram realizados para avaliar a eficiência do uso dos filtros digitais no tratamento dos dados obtidos a partir da varredura de imagens. Para tanto, foram utilizadas as mesmas imagens referentes à construção da curva de calibração mostrada na Figura 27. Os dados foram tratados com o emprego do filtro digital utilizando-se fatores de 1 a 3. A Tabela 6 mostra os valores encontrados das estimativas do desvio padrão relativo para o resultado, em triplicata, de integração da intensidade de cor formadas pelas manchas do corante Violeta Ácido. Nesta tabela são também mostrados os valores da estimativa do desvio padrão relativo para os mesmos resultado sem a aplicação do filtro digital.

Em todos os casos, as dimensões da área de seleção empregadas neste estudo são exatamente iguais e aproximadamente 4 vezes maiores do que a área da mancha formada pelo corante.

**Tabela 6** - Estimativa do desvio padrão relativo em função dos fatores utilizados no filtro. Os resultados foram obtidos em triplicata.

Conc. (mg L <sup>-1</sup> )	Sem filtro (%)	Fator 1 (%)	Fator 2 (%)	Fator 3 (%)
50	14	3,7	5,9	9,8
100	12	7,5	9,9	11
200	8,3	6,6	6,9	7,4
300	13	6,6	4,6	4,2
400	15	10	9,1	9,5

Como pode ser verificado por estes dados, o uso do filtro digital aumenta a precisão da medida, quando comparada à precisão obtida para os dados sem este tipo de tratamento. Pode-se também verificar que o aumento do valor do fator do filtro digital, em média, não causa um aumento da precisão. Finalmente, a utilização de apenas 1 desvio padrão no ponto

de corte torna a precisão obtida próxima ao valor encontrado para o caso onde a dimensão da área de seleção é proporcional a área da mancha (Figura 26).

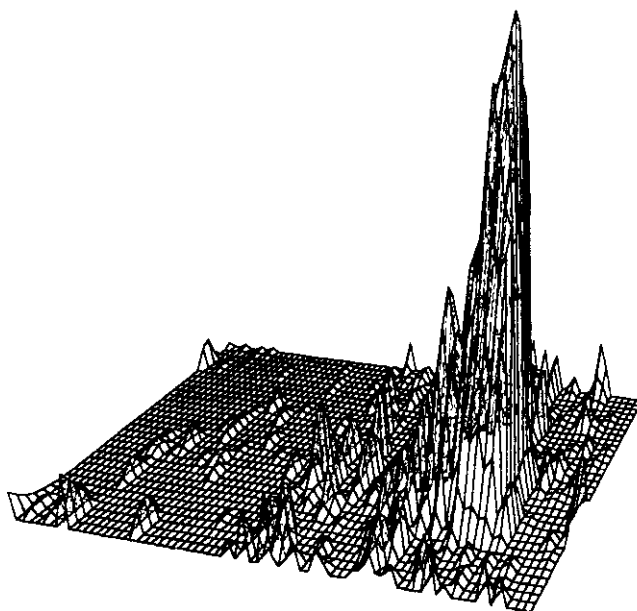
Baseado nestas observações, fica evidente que o emprego do filtro digital, que utiliza apenas um desvio padrão no cálculo do ponto de corte, é suficiente para minimizar o efeito da dependência da dimensão da área de seleção sobre a precisão da medida. Além disso, pode ainda ser verificado que quando 2 ou 3 desvios padrão são empregados no cálculo do ponto de corte, existe uma tendência, em média, de diminuir a precisão da medida.

Este último fato, pode ser explicado comparando-se os resultados encontrados para a solução de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , mostrado na Tabela 6. Neste caso, em particular, observa-se que a precisão da medida diminui com o incremento do fator, ou seja, com o aumento do ponto de corte. Foi verificado, que as manchas apresentavam formas distintas e os dados obtidos a partir destas manchas apresentavam certas particularidades. Nos casos onde as manchas apresentavam uma grande distribuição de área sobre o material suporte, os valores de máximos de intensidade de cor eram menores que aqueles encontrados para as manchas que possuíam uma forma mais compacta (menor dispersão). Deste modo, com o aumento do ponto de corte, parte dos dados que representam a intensidade da cor da mancha dispersa são desconsiderados no cálculo final, resultando na diminuição da precisão da medida. Esta observação é importante, pois mostra que o uso do filtro digital possui certas limitações, sendo recomendado o seu uso empregando 1 desvio padrão (fator = 1). No caso, do aumento deste valor é necessário que o usuário avalie se este aumento não irá causar distorções no tratamento dos dados.

A figura 29 mostra o gráfico em 3 dimensões construído com os mesmos dados empregados na construção da Figura 23B, após a aplicação do filtro digital, utilizando-se o fator igual a 1. Como pode ser observado, nesta figura, após a aplicação do filtro, a linha base, determinada pela intensidade de cor do material suporte, apresenta um menor ruído.

Por fim, os resultados encontrados mostraram a possibilidade do emprego do programa desenvolvido e das imagem obtidas através do scanner na quantificação de substâncias que formam manchas visíveis, tais como a do corante empregado. Neste caso, foi encontrado que o limite de detecção para o corante do violeta ácido, considerando 3

vezes o desvio padrão do ruído, é de 25 ng. Isto representa a aplicação de 1  $\mu\text{L}$  de uma solução de 25  $\text{mg L}^{-1}$  sobre o material suporte.



**Figura 29** - Representação gráfica da imagem mostrada na Figura 23B após a aplicação do filtro digital, fator 1.

### 3.4. Cromatografia em papel - Íons mercúrio (II) e chumbo (II)

O programa desenvolvido bem como as imagens obtidas através do scanner foram também avaliados em cromatografia de papel, na quantificação de espécies que não formam imagens visíveis, tornando-se necessário o uso de um agente revelador.

Para este estudo, diferentes metais foram testados, tais como Co, Fe, Cu, Sn, Zn, Ni, Mn, Cr, Cd, Pb e Hg, empregando-se solução água/acetona como fase móvel.

Dois agentes reveladores, tiocianato de amônio e ditizona, foram testados devido à propriedade destes compostos de formar complexos coloridos com uma grande variedade de metais [41]. Entre estes dois compostos, a ditizona foi a que apresentou uma melhor nitidez e estabilidade na formação da cor dos complexos, sendo este agente revelador o escolhido para os estudos.

Verificou-se visualmente que os íons  $Pb^{+2}$  e  $Hg^{+2}$  foram os que apresentaram manchas mais nítidas e distintas, após aplicação do revelador sobre o papel, em relação aos outros metais. Desta forma estes metais foram selecionados para a aquisição e tratamento das imagens.

As imagens dos papéis foram então adquiridas em tons de cinza, sendo que neste caso, as manchas dos complexos mostraram-se pouco nítidas, não havendo um bom contraste entre elas e o suporte. Desta forma, optou-se pela aquisição das imagens coloridas, o que permitiu uma melhor visualização das manchas, nas imagens digitalizadas. Neste caso também, foi observado que quando as imagens eram adquiridas em 200 dpi, havia uma melhor nitidez, do que aquelas adquiridas em 100 dpi, para a definição das áreas de seleção ao redor das manchas de menores concentrações.

Uma vez escolhido os metais, a próxima etapa foi estudar a sua separação sobre o suporte. Baseado na literatura [42], diferentes soluções de eluição foram testadas, sendo que a solução que apresentou melhores resultados para a separação dos metais foi uma mistura de acetona/ água (1:1 v/v) contendo  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.

Assim como para as imagens do corante, foi feito também um estudo da reprodutibilidade na aquisição de uma mesma imagem do complexo Metal-Ditizona. A

estimativa do desvio padrão de 6 aquisições de um mesmo papel ( $25 \text{ mg L}^{-1}$  de mercúrio) apresentou uma variação de 1,2%. Este valor foi obtido calculando-se a intensidade de cor sobre a mancha, em cada imagem.

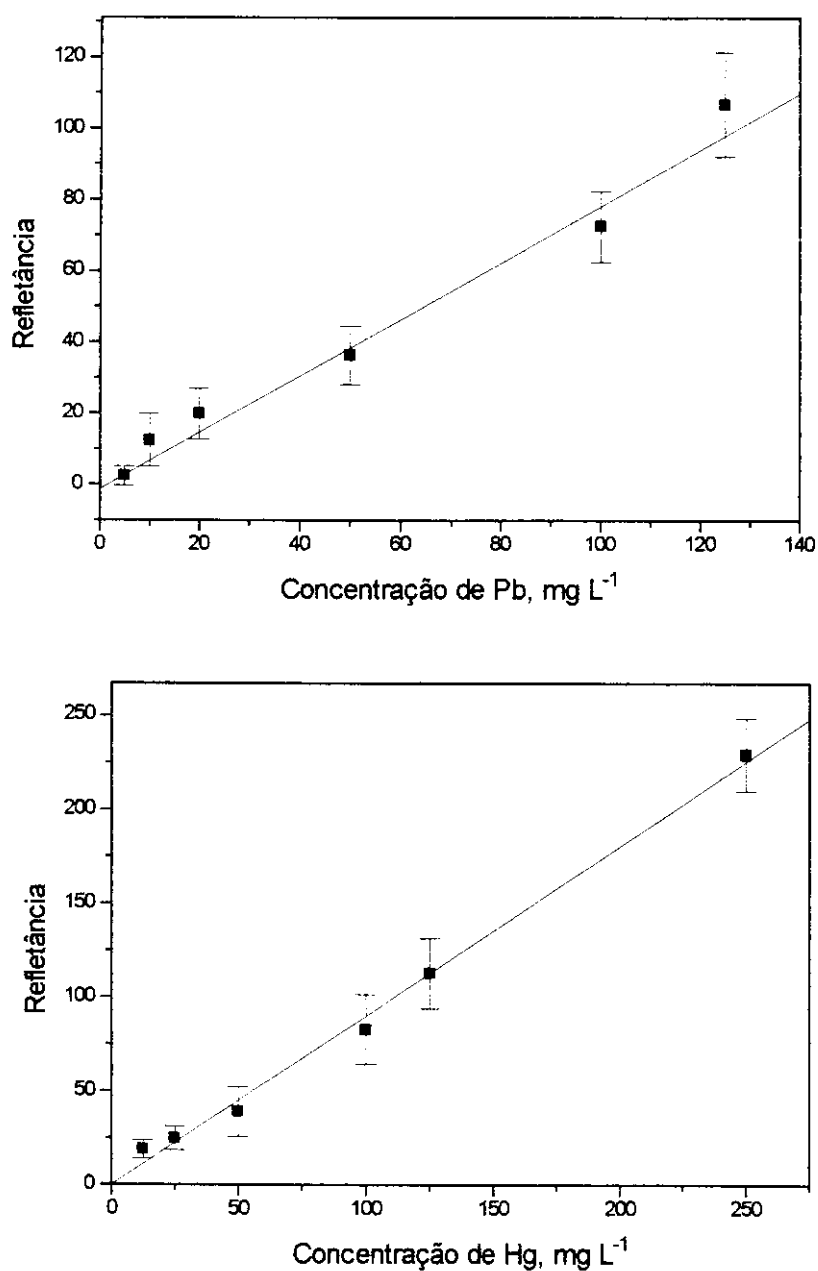
Assim como no método para o corante Violeta Ácido, foram construídas curvas de calibração para os íons  $\text{Pb}^{+2}$  e  $\text{Hg}^{+2}$ , mostradas na Figura 30, de concentração versus refletância total da mancha, tomando-se a área de seleção do suporte próxima a mancha. Cada ponto das curvas mostradas na Figura 30, corresponde a uma média de 3 diferentes corridas cromatográficas para uma mesma concentração e as barras indicam a estimativa do desvio padrão.

As áreas de seleção utilizadas para a construção das curvas de calibração destes metais foram proporcionais ao tamanho das manchas, sendo que o mercúrio apresentou maior eluição e dispersão, nas condições utilizadas. Neste caso, as manchas distribuíram-se sobre o papel acompanhando a frente do solvente. As manchas produzidas pelo íon chumbo permaneceram praticamente imóveis, nas condições empregadas. Para se visualizar melhor esta informação, é mostrado um exemplo de eluição destes metais na Figura 31.

As curvas de refletância mostradas na Figura 30, apresentaram desvios relativos médios de 17 % para as medidas de refletância das manchas de chumbo, e de 25 % para as de mercúrio. Quando se compara estes resultados com o desvio médio de 6,3 % encontrado para o corante Violeta Ácido, observa-se que neste caso, ocorre uma diminuição na precisão dos resultados.

Foram feitos estudos que mostram que esta diminuição na precisão é devido a não uniformidade da aplicação da ditizona, somada à heterogeneidade da superfície do papel, sendo que este último fator já foi previamente discutido.

Este fato foi comprovado através de medidas da intensidade de cor do suporte para o conjunto dos papéis empregados na construção da curva de calibração da Figura 30. Observou-se um desvio de até 15% nas medidas de intensidade de cor do suporte para 18 diferentes papéis. Este resultado mostra que a diminuição da precisão das medidas de refletância é causada principalmente pela falta de homogeneidade na aplicação do agente revelador.



**Figura 30** - Curvas de calibração para íons chumbo e mercúrio em cromatografia de papel, com correção de intensidade de cor do suporte. Volume aplicado de 2  $\mu\text{L}$ . Fase móvel de acetona/água (1:1 v/v) contendo 0,05  $\text{mols L}^{-1}$  de KCl. Manchas varridas com refletância. Dimensão da área de seleção proporcional a mancha. Equação da reta para chumbo:  $R = -0,0163 + 0,801 C$ , correlação de 0,989. Equação da reta para mercúrio:  $R = 1,62 \cdot 10^{-6} + 0,901 C$ , correlação de 0,997; onde R representa a refletância e C, a concentração dos íons metálicos.

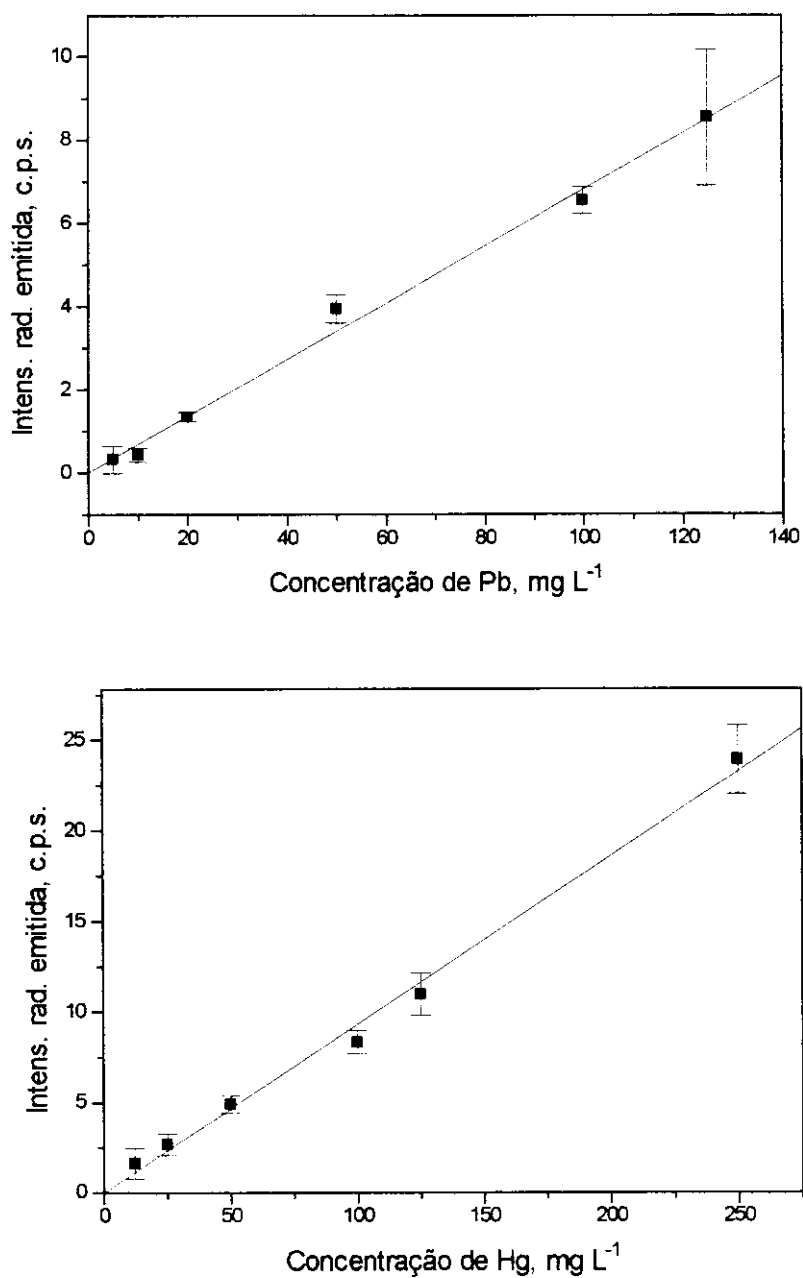


**Figura 31** - Aspecto das manchas dos metais eluídos após a aplicação da Ditizona. A mancha produzida pelo chumbo praticamente permaneceu imóvel, enquanto que o mercúrio apresentou uma maior mobilidade, dispersando-se sobre o papel. O aspecto das manchas é semelhante para todas as concentrações.

Foi realizado também, um estudo da variação da reprodutibilidade do cálculo de refletância para uma mesma imagem de uma mancha. Tomou-se a área de seleção sobre o suporte em diversas regiões do papel, mantendo-se fixa a região da leitura da mancha. Foi utilizada uma mancha de mercúrio de concentração igual a  $25 \text{ mg L}^{-1}$ . O resultado mostrou uma variação de 16% ( $n = 9$ ), indicando que a falta de homogeneidade na aplicação do agente revelador, ocorre também para um único papel.

Em função destes números e também para comprovação dos resultados obtidos pelo programa desenvolvido, o mesmo conjunto de papéis cromatográficos utilizados para a construção das curvas de calibração da Figura 30, foi submetido à análise por Fluorescência de Raio-X. As curvas de calibração obtidas por esta técnica para cada metal são mostradas na Figura 32.

Os desvios relativos médios encontrados para este método foram de 4,2% para as intensidades de radiação emitidas pelo chumbo e de 6,3% para as de mercúrio. As estimativas de desvio padrão e os erros relativos são menores para as replicatas, empregando o método da fluorescência de raio-X em relação ao método da refletância calculada pelo tratamento da imagem. O método da fluorescência é mais preciso, pois os raios-X atravessam o papel, quantificando toda a massa difundida do elemento para o qual o equipamento foi ajustado; enquanto que no método da refletância, os dados obtidos da imagem são afetados pelo suporte e pelo revelador.



**Figura 32** - Curvas de calibração para os íons chumbo e mercúrio em papel por análise por Fluorescência de Raio-X, com correção de branco. Volume de solução aplicado ao papel de 2  $\mu$ L. Equação da reta para chumbo:  $I = 8,80 \cdot 10^{-4} + 0,0680 C$ , correlação de 0,996. Equação da reta para mercúrio:  $I = 2,53 \cdot 10^{-3} + 0,0931 C$ , correlação de 0,997; onde I representa a intensidade de radiação emitida e C a concentração dos íons.



A quantificação dos metais, empregando-se o método da fluorescência, não é afetada pelo suporte, pela aplicação do agente revelador, ou pela dispersão das manchas, então os desvios dos resultados obtidos deste método, podem ser explicados em termos da imprecisão na adição do volume das soluções dos metais ao papel.

A não uniformidade da aplicação da solução de ditizona fez com que a variação de intensidade de cor do suporte fosse mais acentuada, além das próprias características do papel, já discutidas. Este problema de aplicação do revelador, ocorre basicamente em função do papel de filtro utilizado, que é bastante poroso e absorve rapidamente qualquer líquido, e também ao solvente altamente volátil ( $\text{CCl}_4$ ), o qual permitia que ocorressem diferentes concentrações de ditizona em diferentes pontos do papel.

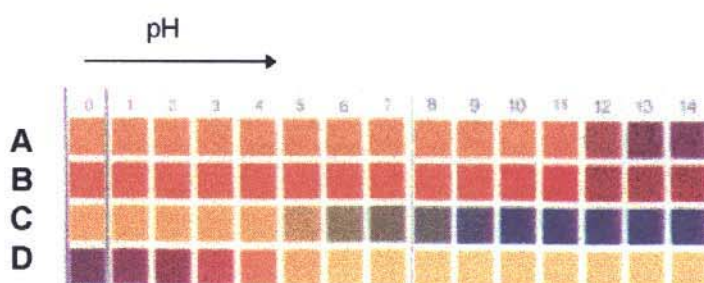
Pode-se concluir que a aplicação de um agente revelador em análises cromatográficas planares, contribui para a diminuição na precisão dos resultados, basicamente em função da sua distribuição heterogênea, quando comparado com o uso do analitos que produzem manchas visíveis.

As regiões selecionadas para a medidas do suporte, no cálculo da refletância, foram sempre escolhidas à esquerda das manchas, onde o suporte sofreu os mesmos tratamentos que os metais aplicados (eluição e aplicação de ditizona). Foram feitos testes em que a escolha da região ficava acima da faixa da frente do solvente, e embora houvesse também a presença de ditizona nesta região, esta estava distribuída de maneira ainda mais heterogênea, causando então, uma maior dispersão dos resultados.

Os limites de detecção encontrados no método da refletância para os metais foram de: 40 ng de mercúrio, e de 1,2 ng de chumbo aplicados sobre o papel, considerando 3 vezes o desvio padrão do ruído. Isto representa a aplicação de 2  $\mu\text{L}$  de uma solução de 20  $\text{mg L}^{-1}$  para o mercúrio, e de 590  $\mu\text{g L}^{-1}$  de chumbo, sobre o material suporte, respectivamente. Estes valores foram obtidos a partir das curvas de calibração de cada metal e, portanto, considerando a baixa precisão do método, é possível melhorar este resultado, se houver um controle mais rigoroso da aplicação do agente revelador.

### 3.5. Indicadores de pH suportados em papel

O programa desenvolvido foi também aplicado no tratamento de imagens provenientes de indicadores suportados em papel. Neste caso, foi empregado papel de pH universal Merck (Cat. No. 9535). Cada fita deste material é constituído de 4 diferentes tipos de indicadores sendo que cada um apresenta um comportamento diferente para uma determinada faixa de pH, como mostra a Figura 33. Esta figura é uma cópia do padrão de cor, fornecido pelo fabricante, mostrando a mudança de cor para cada indicador em função do pH. Os indicadores foram denominados de A, B, C, e D (Figura 33) para facilitar as discussões futuras.



**Figura 33-** Padrão mostrando a mudança de cor para os 4 indicadores em função do pH.

Visualmente, pode ser verificado que o indicador denominado de A sofre alteração de cor apenas para a faixa de pH entre 10 e 14; o indicador B apresenta uma variação entre 9 e 12; o indicador C uma variação de cor entre 4 e 9; e finalmente o indicador D apresenta variação de cor para a faixa de pH entre 0 e 5. Cada indicador cobre especificamente uma faixa de pH e a combinação de cor dos 4 indicadores é utilizada para a medida de pH para a faixa de 0 a 14. Como é conhecido, na prática, após a fita ser mergulhada em uma solução, o analista compara a cor dos 4 indicadores com o valor padrão de maneira a encontrar o valor do pH desta solução, com resolução de 1 unidade de pH.

Para avaliar o comportamento das imagens adquiridas pelo scanner e tratadas pelo programa desenvolvido, inicialmente foi avaliado a repetibilidade no processo de aquisição

das imagens de uma única fita. Neste caso, o processo de aquisição de 6 imagens de uma fita apresentou um desvio padrão relativo de 0,6% para os quatros indicadores.

A reprodutibilidade no cálculo das intensidades médias de cor para 6 diferentes fitas sem uso apresentou um desvio padrão relativo de 2,1 % para o indicador A; 1,7 % para o indicador B; 1,0 % para o indicador C e 1,6 % para o indicador D, considerando-se a leitura da componente R em todas as fitas, devido a maior variação de resposta desta componente (Figura 34-1).

Finalmente, a reprodutibilidade para 6 diferentes fitas mergulhadas em uma solução de pH 4,19 mostrou um desvio padrão relativo de 11 % para o indicador A; 7,5 % para o indicador B; 7,8 % para o indicador C e 2,9 % para o indicador D. Enquanto que para 6 diferentes fitas mergulhadas em pH 9,53 o desvio padrão relativo foi de 5,4 % para o indicador A; 1,8 % para os indicadores B e C, e 5,4 % para o indicador D. Estes resultados foram obtidos após os papéis secarem por volta de uma hora. Quando estes mesmos papéis foram varridos pelo programa, após terem sido secos por mais de três horas, os desvios aproximam-se dos valores dos papéis sem uso.

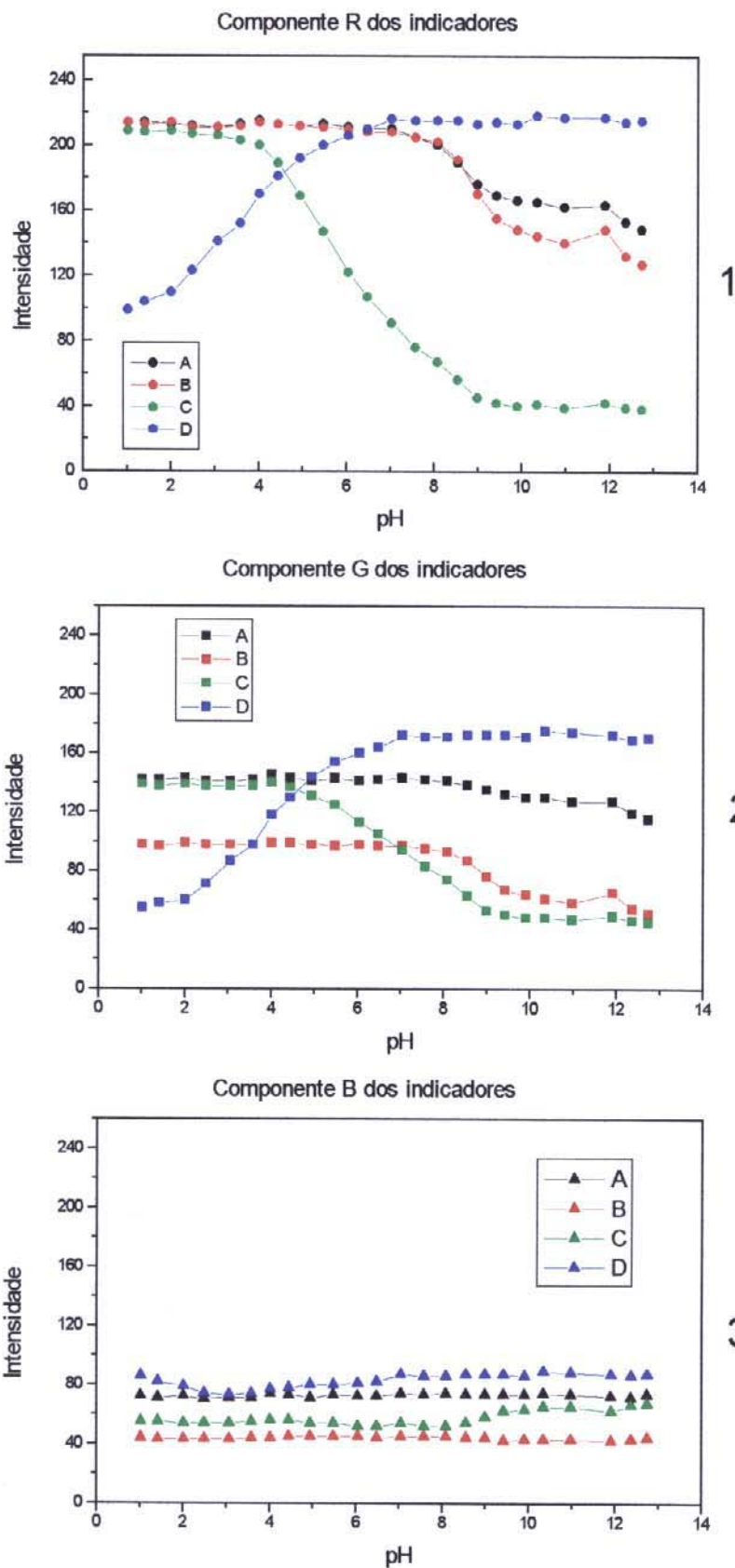
O programa desenvolvido, bem como as imagens adquiridas através do scanner, também foram avaliadas frente à variação de cor dos indicadores em função da variação do pH. Para tanto, diferentes fitas foram mergulhadas em soluções cujo o valor pH variam entre 1 e 13. Após a secagem das fitas, foram então adquiridas imagens coloridas com resolução de 100 dpi. Estas imagens foram então varridas com auxílio do programa desenvolvido e para cada indicador (A, B, C e D) foram armazenados os dados de intensidade média das cores básicas (RGB). A Figura 34 mostra as curvas de intensidade de cor em função do pH de cada indicador. Para facilitar a comparação dos dados obtidos, as curvas foram separados de acordo com cada uma das componentes de cor básica. Desta forma, a Figura 34-1 mostra as curvas de cada indicador em função do pH para a componente Vermelha (R), a Figura 34-2 mostra as curvas para a componente verde (G) e a Figura 34-3 as curvas para a componente azul (B).

das imagens de uma única fita. Neste caso, o processo de aquisição de 6 imagens de uma fita apresentou um desvio padrão relativo de 0,6% para os quatros indicadores.

A reprodutibilidade no cálculo das intensidades médias de cor para 6 diferentes fitas sem uso apresentou um desvio padrão relativo de 2,1 % para o indicador A; 1,7 % para o indicador B; 1,0 % para o indicador C e 1,6 % para o indicador D, considerando-se a leitura da componente R em todas as fitas, devido a maior variação de resposta desta componente (Figura 34-1).

Finalmente, a reprodutibilidade para 6 diferentes fitas mergulhadas em uma solução de pH 4,19 mostrou um desvio padrão relativo de 11 % para o indicador A; 7,5 % para o indicador B; 7,8 % para o indicador C e 2,9 % para o indicador D. Enquanto que para 6 diferentes fitas mergulhadas em pH 9,53 o desvio padrão relativo foi de 5,4 % para o indicador A; 1,8 % para os indicadores B e C, e 5,4 % para o indicador D. Estes resultados foram obtidos após os papéis secarem por volta de uma hora. Quando estes mesmos papéis foram varridos pelo programa, após terem sido secos por mais de três horas, os desvios aproximam-se dos valores dos papéis sem uso.

O programa desenvolvido, bem como as imagens adquiridas através do scanner, também foram avaliadas frente à variação de cor dos indicadores em função da variação do pH. Para tanto, diferentes fitas foram mergulhadas em soluções cujo o valor pH variam entre 1 e 13. Após a secagem das fitas, foram então adquiridas imagens coloridas com resolução de 100 dpi. Estas imagens foram então varridas com auxílio do programa desenvolvido e para cada indicador (A, B, C e D) foram armazenados os dados de intensidade média das cores básicas (RGB). A Figura 34 mostra as curvas de intensidade de cor em função do pH de cada indicador. Para facilitar a comparação dos dados obtidos, as curvas foram separados de acordo com cada uma das componentes de cor básica. Desta forma, a Figura 34-1 mostra as curvas de cada indicador em função do pH para a componente Vermelha (R), a Figura 34-2 mostra as curvas para a componente verde (G) e a Figura 34-3 as curvas para a componente azul (B).



**Figura 34** - Variação de pH em relação a intensidade de cor para cada uma das componentes RGB, para o indicador universal Merck.

A comparação destas curvas revelam que, para a componente azul, os quatro indicadores possuem pouca ou nenhuma variação de cor, enquanto que as componente verde e vermelha apresentam maiores variações de intensidade de cor. Entre estas duas componentes, é ainda possível verificar, que a componente vermelha é a que apresenta a maior variação das intensidades de cor.

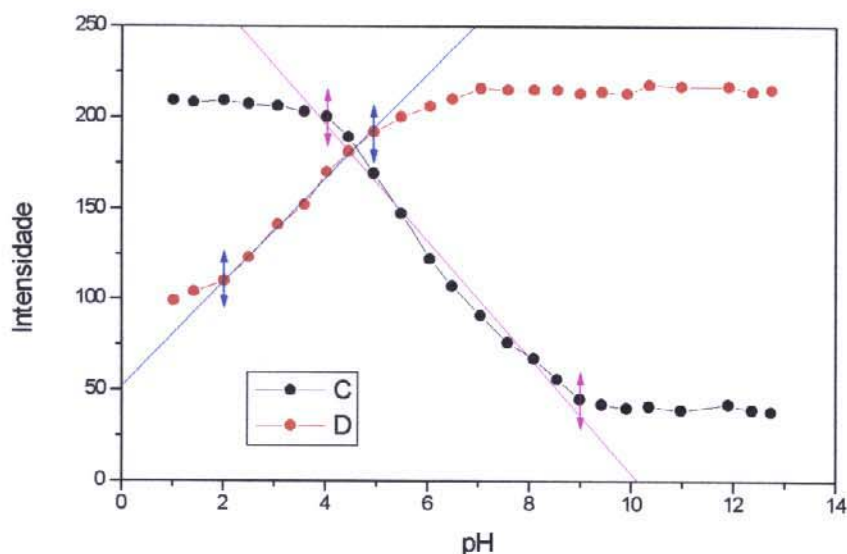
Considerando agora, somente as curvas de cada indicador construídas a partir dos dados obtidos para a componente vermelha, observa-se que os indicadores A e B possuem uma diminuição dos valores de intensidade de cor em função do aumento do valor de pH, sendo que a maior variação é observada entre pH 8 e 10 e entre pH 8 e 9, respectivamente. Em ambos os casos, existe ainda uma tendência de diminuição deste valor para a faixa entre 9 e 14 e entre 10 e 14, respectivamente, porém de maneira bem menos acentuada. O indicador C também apresenta uma tendência à diminuir a intensidade de cor em função do aumento de pH porém neste caso, este valor diminui de forma mais acentuada para uma faixa de pH entre 4 e 9, enquanto que para os demais valores de pH, as intensidades de cor são praticamente constantes. O indicador D é o único que apresenta um comportamento diferente dos demais. Neste caso, a sua intensidade de cor aumenta com o aumento do valor do pH. Isto ocorre para uma faixa de pH entre 1 e 7 sendo que para os demais valores de pH a intensidade de cor é praticamente constante.

No caso dos indicadores C e D, ainda para a componente vermelha, foi encontrado um comportamento linear de resposta da intensidade de cor em função da variação de pH, para valores compreendidos entre pH 4 e 9, e entre 2 e 5, respectivamente. A equação da reta para o indicador C é dada por  $I = 323,9 - 31,98 \text{ pH}$ , com coeficiente de correlação de 0,992, enquanto que para o indicador D a equação da reta é igual a  $I = 52,25 + 28,59 \text{ pH}$ , com coeficiente de correlação igual a 0,998, onde I representa a intensidade de cor. A Figura 35 mostra estas duas retas construídas para cada um destes indicadores.

Observa-se que, em média, tem-se uma variação de 30 unidades de cor para cada unidade de pH. Isto mostra que empregando os mesmos indicadores, que visualmente



podem oferecer uma resolução de 1 unidade de pH, o tratamento da imagem destes indicadores pode oferecer agora uma resolução de aproximadamente 0,03 unidades de pH.



**Figura 35** - Regiões que apresentaram comportamento linear de resposta de intensidade de cor, em função do pH. Para a faixa entre 2 e 5 para o indicador D e entre 4 e 9 para o indicador C.

Porém, considerando somente estes dois indicadores, os dados obtidos após o tratamento de suas imagem, poderiam ser aplicados somente para uma faixa total de pH entre 2 e 9. Se, no entanto, fossem agora também utilizados os dados obtidos para os outros dois indicadores, considerando apenas a componente vermelha, esta faixa de aplicabilidade do método poderia ser ampliada. Porém, nestes dois casos, a resposta para a intensidade de cor não obedece a um comportamento linear, dificultando a utilização dos dados de maneira tão simples como aquelas empregada para os indicadores C e D. Isto torna-se ainda mais difícil, se todos os dados obtidos para cada uma das 3 componentes de cor e para os 4 indicadores fossem empregados para a determinação do pH de uma solução.

Na tentativa de ampliar a aplicabilidade do método para uma maior faixa de pH foi empregado rede neural artificial, para o tratamento dos dados. Neste caso, foi utilizado

um tipo de rede denominada retropropagação de erros (B.P.E.), a qual vem sendo amplamente empregada em muitos trabalhos [32, 34].

A B.P.E. é um algoritmo para a correção de pesos, com várias camadas. Para este tipo de rede deve-se ter um conjunto de dados de entrada e de saída conhecidos. A partir destes dados alimenta-se a rede com uma entrada conhecida, compara-se a saída obtida com o valor esperado, conforme explicado anteriormente. Em seguida inicia-se o processo de correção dos pesos, caso seja necessário, da última até a primeira camada. Esta etapa é conhecida como treinamento da rede neural.

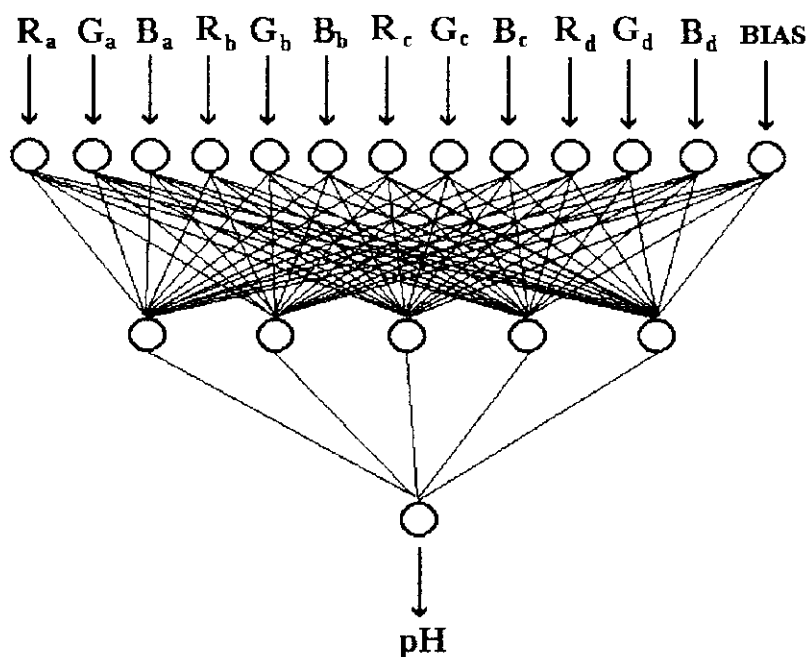
**Tabela 7** - pHs das soluções tampão utilizadas no conjunto de treinamento, para a rede neural BPE.

pH	pH
1,117	7,044
1,823	7,698
2,795	8,015
3,195	9,092
4,058	10,237
4,858	10,846
5,645	11,720
5,980	12,790

Foi utilizado como conjunto de treinamento, os pHs das soluções tampão, mostrados na Tabela 7. Os dados de entrada referem-se às intensidades das componentes R, G e B (Figura 36), e da saída aos pHs dos tampões utilizados.

Cada valor de pH foi correlacionado pela combinação das cores dos quatro indicadores presentes na fita e seus correspondentes valores de R, G e B, perfazendo um total de 13 valores de entrada (4 conjuntos de 3 componentes de cor, mais o BIAS que é um valor gerado randomicamente pelo software da rede neural). A arquitetura da rede utilizada neste trabalho é mostrada na Figura 36.





**Figura 36** - Arquitetura da rede neural B.P.E. utilizada no processo de tratamento das imagens geradas pelos papéis de pH.  $R_a, G_a$ , e  $B_a$  representam as intensidades de cor para o indicador A, e assim sucessivamente.

Foram realizadas 10000 interações considerando um erro mínimo de 0,00001 unidades de pH na etapa de treinamento. Todos os parâmetros da rede foram ajustados de modo a minimizar os erros relativos. Como funções de transferência entre as duas camadas, foi utilizada a função sigmoideal na 1ª camada e linear na 2ª camada. Foram testados de 2 a 7 neurônios na camada escondida, sendo que o número ideal encontrado foi 5.

Após o treinamento da rede neural, esta foi aplicada para a determinação do pH de 8 diferentes papéis mergulhados em tampões de pH conhecido. A Tabela 8 mostra os resultados desta aplicação. Pode-se observar que empregando-se a rede neural proposta para este trabalho, os erros relativos encontrados para o valor previsto em relação ao valor real é melhor que 4,63 %. Além disso, o emprego da rede neural possibilitou ampliar a aplicabilidade do método proposto para uma faixa compreendida entre 1 a 12,5 unidades de pH.

**Tabela 8 - Resultados da aplicação da rede neural para um conjunto de 8 dados**

<b>pH real</b>	<b>pH previsto</b>	<b>erro relativo (%)</b>
1,08	1,05	2,8
2,31	2,38	3,0
3,59	3,64	1,4
5,28	5,22	1,1
6,49	6,51	0,4
8,31	7,94	4,6
9,44	9,30	1,5
12,38	12,65	2,2

A utilização de rede neural artificial mostrou-se uma ferramenta útil para o tratamento de imagens onde, como neste exemplo, é esperado uma grande complexidade na correlação dos dados, de forma a poder extrair resultados que possam ser aplicados em análises químicas, principalmente visando determinações quantitativas.

## CAPÍTULO 4

### 4.1. CONCLUSÃO

Este trabalho mostra que imagens digitalizadas contêm informações, as quais podem ser utilizadas em análises químicas quantitativas.

O uso de scanner comercial na obtenção das imagens mostra-se como uma ferramenta simples e de baixo custo, quando comparados aos métodos tradicionais (câmeras CCD, microdensitômetros). A repetibilidade no processo de aquisição de imagem apresentou um desvio padrão de 0,5%, quando se adquire imagens com suporte homogêneo (fotografia); e 1,2 %, quando se adquire imagens com suporte heterogêneo (papel).

O programa desenvolvido é capaz de manipular imagens em tons de cinza e coloridas, distinguindo mínimas variações de tonalidade. Em ambos os casos os dados obtidos fornecem informações que podem ser aplicadas em estudos quantitativos.

Correções de fundo (background) são necessárias, em alguns casos, para evitar as diferenças de tonalidade do material suporte empregado no processo de obtenção das imagens, seja pela natureza deste ou devido a aplicação de reveladores. O uso de um ditizona mostrou, para este caso, que esta afeta a intensidade de cor do suporte, de modo a diminuir a precisão dos resultados.

O emprego de procedimentos matemáticos (filtro digital) melhora a precisão dos resultados nos casos onde o material suporte causa espalhamento da luz refletida, independente da área de seleção empregada na escolha da região de interesse. A estimativa do desvio padrão relativo encontrado para 3 medidas foi em média de 12% (sem filtro) e de 6,4% empregando filtro digital, para uma área de seleção 4 vezes maior que a dimensão da mancha formada pelo corante.

A curva de calibração de corridas cromatográficas em papel, do corante Violeta Ácido apresentou uma faixa linear de resposta de 50 a 400 mg L<sup>-1</sup> com aplicação de 1 µL de solução ao papel. Para o chumbo, a faixa linear foi de 5 a 125 mg L<sup>-1</sup> e para o mercúrio foi de 12,5 a 250 mg L<sup>-1</sup>, com aplicação de 2 µL de solução ao papel. Em termos de sensibilidade para detecção da amostra, isto representa uma faixa de: 50 a 400 ng de massa de corante sobre o papel; de 10 a 250 ng de massa de chumbo sobre o papel e de 25 a 500 ng de massa de mercúrio sobre o papel. Os limites de detecção encontrados foram de 25 ng, para o corante Violeta Ácido; 1,2 ng para o chumbo e 40 ng de mercúrio, considerando 3 vezes o desvio padrão do ruído.

A utilização de imagens em aplicações de cromatografia de papel, mostrou que esta possui algumas restrições. Ela poderá ser empregada em situações quando: (1) houver contraste suficiente entre o a cor da espécie em estudo e o suporte; (2) não houver grande dispersão da espécie de interesse sobre o suporte, de modo a dificultar a localização dos limites de cores ou contraste da espécie sobre o mesmo; ou ainda (3) quando as separações entre os complexos de duas espécies distintas, sobre o suporte, permitam que se estabeleçam áreas de seleção sem interferências entre ambos. Todas estas implicações são relativas ao emprego da cromatografia em papel e mostram limitações que são, por elas próprias, características da cromatografia planar.

O emprego de redes neurais para o tratamento de dados de imagens coloridas de indicadores suportados em papel mostrou-se eficiente para estabelecer relações entre intensidade de cor e pH, apresentando erros pequenos. Para uma faixa de pH de 1 a 12, o erro relativo encontrado foi melhor que 4,6 %. A rede neural mostra-se bastante útil em situações em que há grande complexidade na correlação dos dados.

A aplicação de imagens podem ser feita em situações onde preservar a integridade da amostra seja importante; em substituição, por exemplo, a algumas aplicações de microdensitometria, podendo fornecer resultados mais rápidos. Pode ser utilizada também em situações em que é necessário realizar medidas em campo, sem o uso imediato de

instrumentos. Desta forma, quando possível, a imagem de uma respectiva análise pode ser armazenada em uma fotografia, por exemplo, para seu posterior tratamento.

Para aumentar a sensibilidade do método do uso de imagens, é possível fazer uma pré-concentração do analito utilizando, por exemplo, uma membrana em que se filtra uma solução do mesmo, utilizando um agente complexante para formação de cor [20], para sua posterior correlação com concentração.

Finalmente, este trabalho mostrou que é possível extrair informações tanto qualitativas como quantitativas de imagens digitalizadas. O seu uso abre a perspectiva para novas aplicações associadas a química analítica.

## CAPÍTULO 5

### 5.1. Referências Bibliográficas

1. Pratt, W.K., "Digital Image Processing", John Wiley & Sons Inc., 2<sup>nd</sup> ed., 1991, New York.
2. Venetianer, T., "Desmistificando a Computação Gráfica", Mc Graw Hill, 1<sup>a</sup> ed., 1988, São Paulo.
3. Busch K. W. and Busch M.A., "Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis", John Wiley & Sons Inc., 1<sup>st</sup> ed., 1990, New York.
4. Low, A., "Introductory Computer Vision and Image Processing", Mc Graw Hill Inc, 1<sup>st</sup> ed., 1991, London.
5. Norton, P., "Desvendando o PC e PS/2", Campus, 3<sup>a</sup> ed., 1991, Rio de Janeiro.
6. Willians, P. and Norris, K., "Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries", American Association of Cereal Chemists Inc., 1<sup>st</sup> ed., 1987, New York.
7. Wolfbeis, O.S., "Fiber Optic, Chemical Sensors and Biosensors", vol. 1, CRC Press Inc., 1<sup>st</sup> ed., 1991, New York.
8. Krivácsy, Z. and Hlavay, J., *Talanta*, **1994**, 41(7), 1143-1149.
9. Wendlandt, W. WM. and Hecht, H. G., "Reflectance Spectroscopy", Interscience Publishers, Chemical Analysis series, Vol. 21, 1<sup>st</sup> ed., 1966, New York.
10. Geladi, P., Bengtsson, E., Esbensen, K. and Grahn, H., *Trends Anal. Chem.*, **1992**, 11(1), 41-53.
11. Sherma, J., *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 69R-81R.
12. Sherma, J., *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 371R-381R.
13. Rickwood, D. and Hames, B. D., "Gel Electrophoresis of Nucleic Acids. A Pratical Approach", Irl Press, 2<sup>nd</sup> ed., 1990, Oxford.

14. Collins, C. H. e Braga, G. L., "Introdução a Métodos Cromatográficos", Editora da Unicamp, 1<sup>a</sup> Ed., 1988, Campinas
15. Popovic, M., Perisic-Janjic, N., *Chromatographia*, **1988**, 434, 222-227.
16. Skoog, D. A. and Leary, J. J., "Principles of Intrumental Analysis", Sanders College Publishing, 4<sup>th</sup> ed., 1992, New York.
17. Willard, H. H., Merrit Jr, L. L. and Dean, J. A., "Metodos Instrumentales de Analisis", Compania Editorial Continental, 4<sup>a</sup> ed., 1972, México.
18. Zhang-Fa, H., Xi-Pin, J., Chao-Sheng, H., *Talanta*, **1986**, 33, 455.
19. Franc, J., Kosikova, E., *J. Chromatogr.*, **1980**, 187, 462-465.
20. Ohzeki, K., Toki, C., Ishida, R. and Saitoh, T., *Analyst*, **1987**, 112, 1689-1695.
21. Sutherland, J. C., Monteleone, D. C., Trunk, J. and Ciarrocchi, G., *Anal. Biochem.*, **1984**, 139, 390-399.
22. Quesada, M. A., Rye, H. S., Gingrich, J. C. Glazer, A. N. and Mathies, R. A., *Bio Techniques*, **1991**, 10, 616-625.
23. Lott, J. T., Yang, J., Ye, J. and Wallace, D. C., *Cabios*, **1985**, 4, 249-252.
24. Catterick, T. and Russel, J. R., *Lab. Microcom.*, **1990**, 9, 105-108.
25. Russel, J. R., *Electrophoresis*, **1991**, 12, 676-677.
26. Chan, M.K., Kwok, K.C., Shuen, Y.M. and Koo, K.L., *Lab. Microcom.*, **1991**, 10(3) 95-101.
27. Fuji, H. and Hashimoto, M., *Analytical Sciences*, **1993**, 9, 303-307.
28. Parry, R.L., Chin, T.W. and Donahoe, P.K., *BioTechniques*, **1991**, 10(6), 772-774.
29. Masters, D.B., Griggs C.T. and Berde, C.B., *BioTechniques*, **1992**, 12(6), 902-911.
30. Rendman, T. and Jacobs, T., *BioTechniques*, **1991**, 10, 790-794.
31. Wang, Z., Hwang, J.N. and Kovalski, B.R., *Anal. Chem.*, **1995**, 67(9), 1497.
32. Zuppan, J. and Gasteiger, J., "Neural Networks for Chemists", VCH, 1<sup>st</sup> ed., 1993, New York.
33. Zuppan, J. and Gasteiger, J., *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 248, 30.
34. Majcen, N., Kanduc, K.R., Novic, M. and Zuppan, J., *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2154-2161.

35. Wythoff, J.B., *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, **1993**, 18(2), 115.
36. User's Guide of ScanMan<sup>®</sup> Software, Logitech Inc., 1993.
37. Perrin, D.D. and Dempsey, B., "Buffers for pH and Metal Ion Control", Chapman and Hall Ltd, 1<sup>st</sup> ed., 1983, New York.
38. Bertrand, D., Devaux, M. F. and Robert, P., *Trends Anal. Chem.*, **1991**, 10(8), 237-243.
39. Lin, Y. and Srinivasan, R., "Digital Image Processing Applications", Proceedings series, SPIE - International Society for Optical Engineering, vol. 1075, 1989, Los Angeles.
40. O' Haver T. C., *J. Chem. Ed.*, **1991**, 68, A147.
41. Stary J., "The Solvent Extraction of Metal Chelates", Pergamon Press, 1<sup>st</sup> ed., 1964, Los Angeles.
42. Mikes, O. and Chalmers, R.A., "Chromatographics Methods", Van Nostrand Reinhold Company, 2<sup>nd</sup> ed., 1970, New York.