

ANÁLISE MULTIVARIADA DE IMAGENS NA QUÍMICA: UM EXPERIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DO pH DE ÁGUAS POTÁVEIS**Deangelis Damasceno^a, Thiago G. Toledo^b, Mariana S. Godinho^b, Cassiano P. da Silva,^c Sérgio B. de Oliveira^d e Anselmo E. de Oliveira^{b,*}**^aInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 76600-000 Cidade de Goiás – GO, Brasil^bInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74001-970 Goiânia – GO, Brasil^cAQUALIT, Rua 203 nº 187 St. Universitário, 74603-030 Goiânia – GO, Brasil^dInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 74055-110 Goiânia – GO, Brasil

Recebido em 10/09/2014; aceito em 23/03/2015; publicado na web em 19/05/2015

MULTIVARIATE IMAGE ANALYSIS IN CHEMISTRY: pH MEASUREMENTS OF DRINKING WATER. A Multivariate Image Analysis (MIA) laboratory activity was proposed estimating pH of drinking water samples from its digital images after adding bromothymol blue as a pH indicator, and using the PLS multivariate calibration method. All computational work was done using GNU Octave free software. The MIA-PLS based approach exemplified with drinking water pH estimates is tailored to meet the needs of both students and researchers. MIA-PLS method was statically equivalent to the reference method using a conventional glass pH electrode. This lab activity combines analytical methodology, computing, and chemometrics.

Keywords: MIA; PLS; drinking water; digital image processing; pH.

INTRODUÇÃO

O uso de imagens digitais está associado à evolução de *hardwares* e *softwares*. Essas imagens podem ser facilmente obtidas por meio de equipamentos eletrônicos que empregam CCD (*Charge-Coupled Device*) ou CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*) como sensores para captura de imagens,¹ e são encontrados em *scanners* e câmeras coloridas contidas em aparelhos celulares e máquinas fotográficas digitais. O processamento dessas imagens digitais é empregado em diversos ramos da ciência como medicina,² biologia,³ geologia,⁴ agricultura,⁵ engenharia⁶ e química,⁷ por exemplo, além de ser aplicado em conjunto com métodos de análise multivariada.⁸⁻¹¹

Geladi e colaboradores¹² introduziram o emprego de imagens multivariadas como sinais analíticos na Química, e a partir da aplicação conjunta das ferramentas de análise multivariada de dados e do processamento de imagens digitais tem-se o que é conhecido por Análise Multivariada de Imagens (MIA).¹³ Essa metodologia acompanha os avanços computacionais e vem ganhando espaço com o uso de algoritmos que possibilitam a manipulação simultânea de uma grande quantidade de dados. Metodologias analíticas que empregam MIA apresentam vantagens como rapidez, baixo custo, pequena geração de resíduos e uma maior facilidade logística quando comparadas às metodologias analíticas convencionais como titulometria e a maioria dos métodos espectroscópicos. Além de todas essas vantagens, acrescenta-se o fato de que análises químicas que empregam MIA são não destrutivas.

Este trabalho tem o propósito de apresentar um experimento, sequencialmente didático e multidisciplinar, empregando MIA como metodologia analítica para que novas pesquisas possam se utilizar da análise de imagens digitais. A metodologia desenvolvida também foi escrita visando o emprego de MIA em cursos de graduação em Química e áreas afins e/ou pós-graduação. Serão apresentados os tratamentos computacionais dos dados multivariados e a obtenção

de informações das imagens digitais por meio de ferramentas computacionais de domínio público com o emprego do *software* GNU Octave.¹⁴ Como exemplo, imagens digitais de águas potáveis serão correlacionadas com valores experimentais de pH por meio de calibração multivariada empregando o algoritmo PLS (*Partial Least Squares*)¹⁵ disponível no *toolbox* Mvartools,¹⁶ que é distribuído gratuitamente sob a GNU *General Public License*.¹⁷ Essa metodologia MIA-PLS é computacionalmente simples de ser implementada, e o experimento proposto combina análise laboratorial experimental, informática e aplicação de métodos quimiométricos.

METODOLOGIA**Imagens digitais**

Imagens digitais monocromáticas, 2D, ou coloridas, 3D, são aproximações de imagens reais e são obtidas com a utilização de dispositivos de captura de imagens como CCD e CMOS. A cor de uma imagem pode ser definida como a percepção humana à combinação de dois ou mais comprimentos de onda do espectro eletromagnético na região da luz visível que refletem em uma superfície.¹⁸ Essas combinações são representadas por espaços de cores como RGB (*Red, Green, Blue*), HSI (*Hue, Saturation, Intensity*), CIELab (*Commission Internationale de l'Éclairage L*a*b**) – ver, por exemplo, Russ.¹⁹ O espaço de cores mais comum e usado em TVs e câmeras é o RGB.²⁰ Geometricamente, os canais R, G e B podem ser visualizados em um cubo de cores, Figura 1, no qual os eixos representam essas três cores primárias. Ou seja, a cor do pixel – o termo *pixel* é uma abreviação de *picture element* – é obtida pela combinação das cores vermelha, verde e azul (imagem *True colour*). Dessa forma, cada ponto no cubo da Figura 1 representa uma cor do pixel. Como os índices em cada eixo variam de 0 a 255, 16.777.216 cores são possíveis (i.e., 256×256×256)²¹ – esse número dá uma ideia da sensibilidade na diferenciação de cores em uma imagem digital para o emprego, por exemplo, em reconhecimento de padrões. Uma imagem RGB é, então, um arranjo tridimensional dessas cores primárias, conforme representado na Figura 2.

*e-mail: elcana@ufg.br

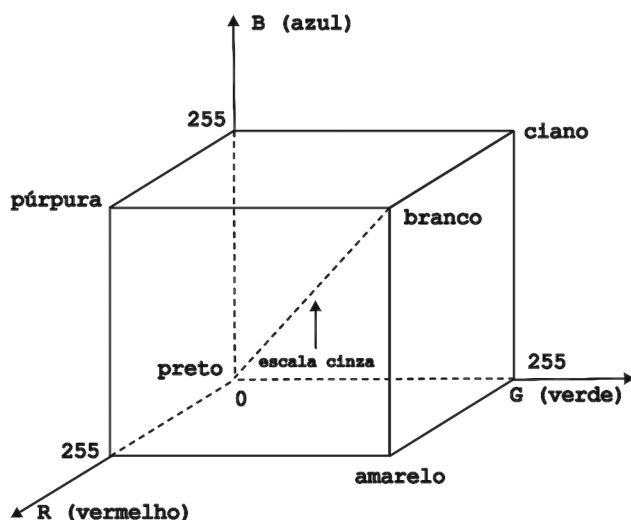


Figura 1. Cubo de cores RGB

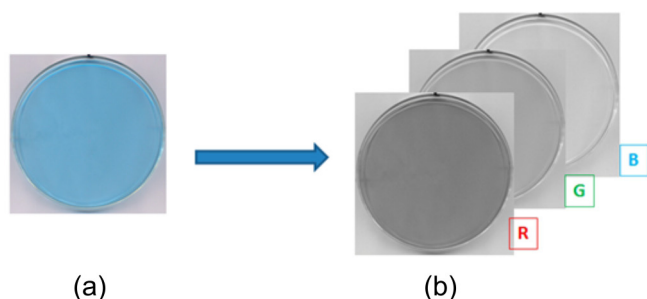


Figura 2. Decomposição de uma imagem RGB (a) nos canais de cores monocromáticas (b)

Calibração multivariada

PLS é um método de calibração multivariada de 1ª ordem em que as variáveis dependentes e as independentes são transformadas em variáveis latentes (LV) e, em seguida, correlacionadas entre si. O modelo final resulta do ajuste com os menores erros de calibração e previsão possíveis. Como no presente trabalho será construído um modelo de calibração PLS para correlacionar a matriz \mathbf{X} que contém os histogramas de cores das imagens com o vetor \mathbf{y} que contém os valores de pH, essa modelagem é feita de acordo com os modelos de regressão^{15,22}

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T \quad (1)$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{U}\mathbf{q}^T + \mathbf{e} \quad (2)$$

nas quais \mathbf{T} e \mathbf{U} são as matrizes dos escores de \mathbf{X} e \mathbf{y} , respectivamente, \mathbf{P} e \mathbf{q} são os pesos e \mathbf{E} e \mathbf{e} os resíduos. As colunas de \mathbf{T} (que são as LV) e \mathbf{U} fornecem uma nova representação de \mathbf{X} e \mathbf{y} em um espaço ortogonal. Os escores de \mathbf{X} e \mathbf{y} são correlacionados entre si pela relação linear interna $\hat{\mathbf{u}}_h = b_h \hat{\mathbf{t}}_h$, em que h é o número de LV empregadas no modelo.

Os valores estimados para as respostas são, então, obtidos por

$$\hat{\mathbf{y}} = \sum_n b_h \hat{\mathbf{t}}_h \mathbf{q}_h^T \quad (3)$$

Os melhores modelos são gerados quando os valores de \mathbf{T} e \mathbf{U} são continuamente modificados, de modo que se possa encontrar a maior covariância entre \mathbf{X} e \mathbf{y} , tornando o modelo PLS um método de calibração iterativo. Essa modificação é normalmente feita com a manipulação de informações contidas na matriz de dados independentes

através da adição, ou retirada, de LV. O algoritmo NIPALS²³ é um dos mais empregados para resolver o processo iterativo do PLS, como no *toolbox* Mvartools. Desse modo, os valores previstos para as variáveis observadas (como pH) podem ser estimados a partir da matriz de dados \mathbf{X} contendo, por exemplo, os histogramas de cores das imagens digitais.

A interpretação dos métodos quimiométricos depende do pré-processamento dos dados originais e essa etapa é realizada antes da aplicação do método PLS. Existem vários métodos de pré-processamento como centrar os dados na média, correção matemática de ruídos espectrais ou normalização dos dados originais, por exemplo. O *toolbox* Mvartools contém algumas dessas rotinas.

Após o pré-processamento dos dados e aplicação do método PLS, parâmetros como RMSEC (*Root Mean Square Error of Calibration*), RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*), coeficiente de correlação de Pearson ao quadrado (r^2) e RPD (*Residual Prediction Deviation*), dentre outros, são calculados para aferir a qualidade dos modelos de regressão obtidos.²⁴ RMSEC e RMSEP, por exemplo, são calculados a partir do RMSE:²²

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{1}{z} \sum_{i=1}^z (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (5)$$

com z previsões, y_i o valor medido e \hat{y}_i o valor previsto pelo modelo. Quando os dados referem-se ao conjunto de calibração, a equação (5) retorna o RMSEC. De modo similar, essa equação fornece o RMSEP quando são empregados os dados do conjunto de previsão. Já o RPD é obtido pela razão entre os desvios padrão dos valores de referência, s_y , e o erro padrão de previsão (SEP), *i.e.*, $\text{RPD} = s_y / \text{SEP}$,²⁵ e SEP calculado com base nas equações (6) e (7):²²

$$\text{SEP} = \sqrt{\frac{1}{z-1} \sum_{i=1}^z (y_i - \hat{y}_i - \text{bias})^2} \quad (6)$$

onde

$$\text{bias} = \frac{1}{z} \sum_{i=1}^z (y_i - \hat{y}_i) \quad (7)$$

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e reagentes

Dezessete soluções tampões com pH entre 5,00 e 9,02 foram preparadas com H_3PO_4 (Sigma-Aldrich, 85%), NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, 98%) e Na_2HPO_4 (Sigma Life Science, 98%). O pH de cada solução foi ajustado com adição de H_3PO_4 concentrado, ou de NaOH (Sigma-Aldrich, 98%) 0,10 mol L⁻¹, e o valor final foi aferido com pHmetro PHTEK PHS-3B, conforme a norma SMWW 4500.²⁶ Azul de Bromotimol (Merck, 89%) foi utilizado como indicador ácido-base. Sua estrutura planar²⁷ é apresentada na Figura 3, com pKa = 7,1 e faixa de viragem: cor amarela (pH < 6,0); cor verde (6,0 ≤ pH ≤ 7,6); e cor azul (pH > 7,6).

Obtenção das imagens digitais

Alíquotas de 20 μL das soluções tampões e das amostras de águas potáveis obtidas para validação externa foram transferidas para uma microplaca de poliestireno de alta transparência (placa para cultura celular). Em seguida, foram adicionados 4 μL de uma solução indicadora de azul de bromotimol 0,10%.²⁸ Essa placa foi colocada no centro de um *scanner* de mesa (HP 2400) e o *software* Scanitto Pro,²⁹ versão 2.7.15.198, foi utilizado para configurar o

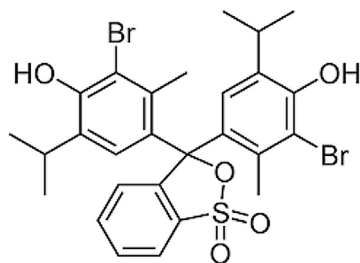


Figura 3. Estrutura molecular plana do azul de bromotimol

scanner para a obtenção das imagens no espaço RGB, formato BMP (Bitmap Image File) e resolução de 300 dpi. Foram feitas quatro leituras no scanner e, das quatro imagens geradas, a primeira foi descartada. Uma imagem da placa com as soluções após adição do indicador consta da Figura 4a.

Processamento das imagens digitais

O processamento das imagens digitais foi realizado com o software GNU Octave, versão 3.6.2, usando o toolbox Image,³⁰ versão 2.2.1. O toolbox Mvartools¹⁵ foi empregado na calibração multivariada. Todos os comandos apresentados neste trabalho foram executados no GNU Octave e seguem o critério da didaticidade em decorrência das múltiplas formas de programação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 17 soluções tampões foram diferenciadas pela adição do indicador azul de bromotimol, cujas cores variaram conforme a mudança no pH: cor amarela, em meio ácido, passando pela cor verde e cor azul, em meio básico, conforme Figura 4. A posição A12 na placa de cultura dessa figura, ou poço A12, contém uma solução tampão de pH=5,00 e apresenta cor amarela. Em pH=9,02, a solução é azul, como no poço A10.

Após a obtenção das triplicatas das imagens digitais da placa contendo as 26 amostras (Figura 4a), regiões de interesse dessas imagens foram selecionadas conforme a Figura 4b, gerando novas imagens. Essas novas imagens foram decompostas em imagens monocromáticas, 2D, dos canais R, G e B, como ilustrado na Figura 2. Para cada imagem digital monocromática, um histograma da ocorrência dos índices (ou intensidades) dos canais R, G e B foi obtido (histograma de cores), cujo processo é representado na Figura 5. Após o cálculo dos histogramas médios de cores, obtém-se a matriz **X** de dados, de dimensão 26×768, que contém as informações das imagens digitais. Todo esse processo é resumido no esquema da Figura 6.

Esses histogramas são obtidos em função dos 256 índices de cor monocromática para cada canal. Em seguida, um vetor de coordenadas 1 a 768 é criado como justaposição desses três canais: o canal R é

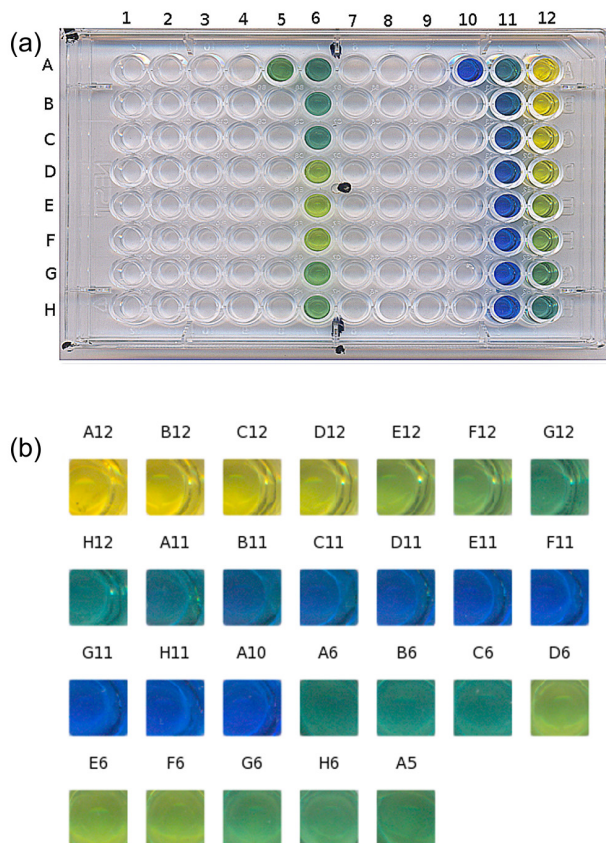


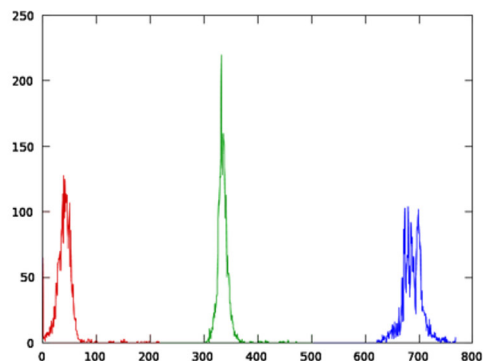
Figura 4. (a) Placa de cultura contendo as amostras das 17 soluções tampões de pH entre 9,02 e 5,00, após adição de azul de bromotimol, usadas na construção do modelo PLS (colunas 10 a 12) e as 9 amostras de validação externa (colunas 5 e 6); (b) Imagens das 26 regiões selecionadas (uma para cada amostra)

projetado entre 1 e 256, o canal G entre 257 e 512 e o canal B entre 513 e 768. Assim, histogramas de cores médios são obtidos a partir das triplicatas das imagens digitais coloridas. Filtros podem ser aplicados às imagens, e os 27 histogramas de cores médios gerados são visualizados na Figura 7.

Percebe-se, na Figura 7, que essa representação gráfica da matriz de dados que resulta desse processamento das imagens digitais traz semelhança com espectros de amostras comumente analisadas em laboratórios, *i.e.* um conjunto de variáveis relacionadas à cor de uma amostra e que apresentam diferentes intensidades. A matriz **X** de dados pode, então, ser correlacionada com a(s) propriedade(s) físico-química(s), ou qualquer outra característica de interesse. Neste trabalho serão empregadas imagens digitais no espaço RGB



Figura 5. Processo de obtenção da matriz dos histogramas de cores



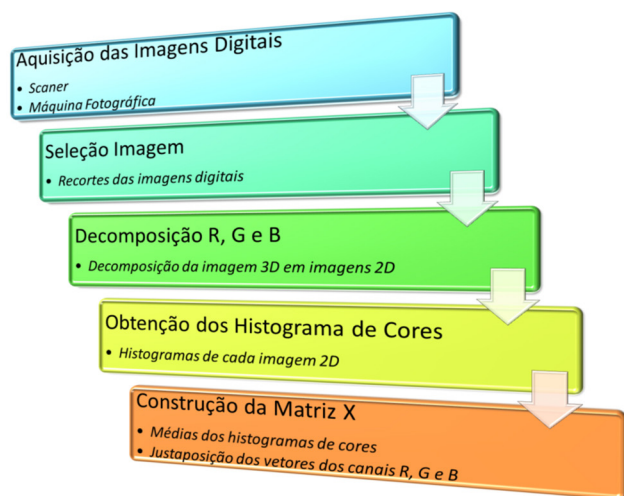


Figura 6. Esquema de construção da matriz X que contém as informações das imagens digitais

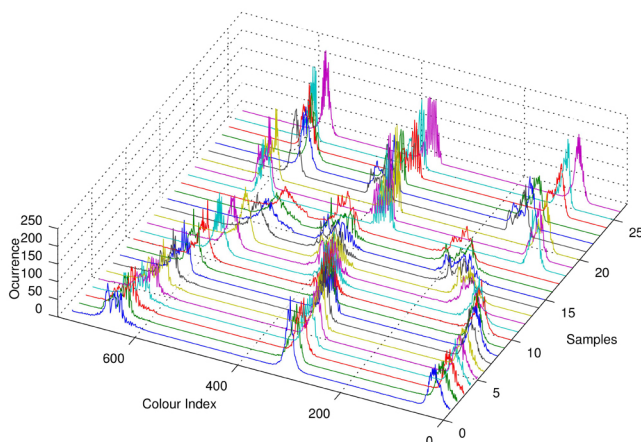


Figura 7. Histogramas médios de cor RGB das imagens digitais para as 26 amostras usadas na determinação do pH

de amostras de água potável, coloridas por adição de indicador, para determinação do pH. O modelo de calibração das imagens em função do pH será estabelecido por PLS.

Para obter um modelo PLS para determinação do pH é necessário criar o vetor coluna que contém os valores medidos de pH de acordo com a ordem dos poços da Figura 4a (A12,B12,C12,D12,E12,F12,G12,H12,A11,B11,C11,D11,E11,F11,G11,H11 e A10):

```
> y=[9.02;8.72;8.5;8.2;8.;7.71;7.52;7.25;7.;6.7;6.5;6.2;6.06;5.7;5.5;5.2;5.];
```

Em seguida, os dados foram subdivididos entre 11 amostras no conjunto de calibração (X_c e y_c) e 6 amostras no conjunto de previsão (X_p e y_p). As amostras do conjunto de calibração incluem os dois extremos da faixa de pH, além de serem igualmente espaçadas:

```
> Xc = [X(1,:);X(4:5,:);X(7:8,:);X(10:11,:);X(13:14,:);X(16:17,:)];
> yc = [y(1,:);y(4:5,:);y(7:8,:);y(10:11,:);y(13:14,:);y(16:17,:)];
> Xp = [X(2:3,:);X(6,:);X(9,:);X(12,:);X(15,:)];
> yp = [y(2:3,:);y(6,:);y(9,:);y(12,:);y(15,:)];
```

e os comandos refletem as linhas/amostras da matriz X (1 a 17: calibração e previsão; 18 a 26: validação externa). Em seguida, os dois conjuntos para calibração e previsão foram centrados na média

(pré-processamento) para diminuir a dispersão dos sinais com baixa intensidade:

```
>[Xcm,xm]=mvcenter(Xc);
>[ycm,ym]=mvcenter(yc);
```

em que X_{cm} e y_{cm} são os dados dos conjuntos de calibração centrados na média. Após essa etapa, determina-se o número ótimo de LV a serem utilizadas no modelo:

```
> [press,cumpress,rmsecv,rmsec,pred,B3d] = mvcrossval(Xcm,ycm,
,'plsnipl',6,'full',[],2);
```

Esse comando gera duas curvas que representam os valores de RMSEC e RMSECV em função das LV, conforme a Figura 8. Observa-se que a partir de LV=4 os valores de RMSECV são praticamente constantes. Uma opção do pacote Mvartools para a escolha do número ótimo de LV é o emprego do algoritmo *mvoptlv*, que testa as similaridades entre as variâncias totais acumuladas com as LV:

```
> optlv=mvoptlv(rmsevcv)
```

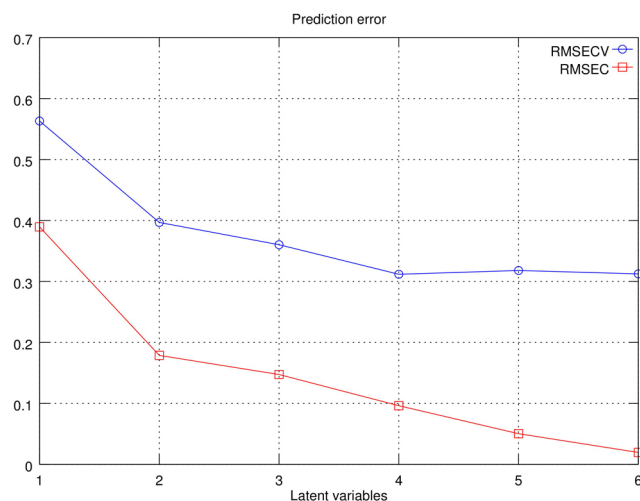


Figura 8. Gráfico de RMSEC (□) e RMSECV (○) versus LV

O resultado para o conjunto de calibração das imagens foi $optlv = 4$.

De posse dessas informações, os parâmetros do modelo PLS para correlacionar os valores de pH com os histogramas de cores médios são obtidos com o comando *mvplsnipl*:

```
>[B,P,q,W,T,U,inner,Xres,yres] = mvplsnipl(Xcm,ycm,4);
```

em que, considerando o número de LV, B contém os coeficientes de regressão; P e q são os pesos e T e U são os escores de X_{cm} e y_{cm} ; W os coeficientes dos pesos, respectivamente; $inner$ é um vetor de correlação entre T e U ; X_{res} e y_{res} são os resíduos do modelo e 4 é o número ótimo de LV encontrado para o modelo das imagens.

Para validar o modelo PLS, são estimados os valores de pH para as amostras dos conjuntos de calibração, y_{ce} , e previsão, y_{pe} :

```
> [yce,t,Xcr] = mvfullpredict(Xc,W,P,inner,4,q,ym,xm);
> [ype,t,Xpr] = mvfullpredict(Xp,W,P,inner,4,q,ym,xm);
```

O gráfico dos valores de pH estimados pelo modelo MIA-PLS versus os medidos experimentalmente para os conjuntos de calibração e previsão, Figura 9, pode ser obtido:

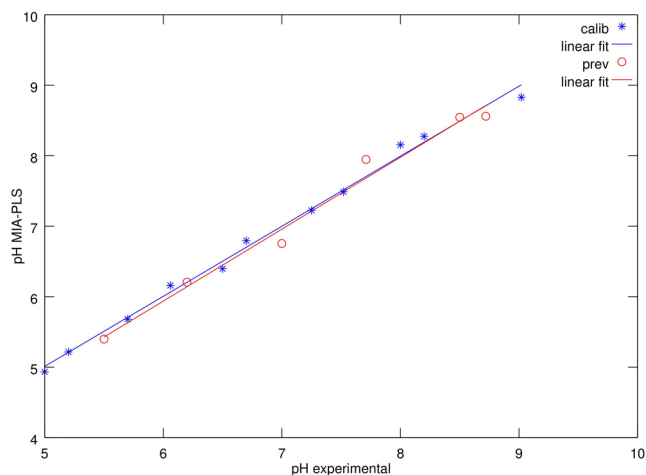


Figura 9. Gráfico da correlação entre os valores de pH previstos pelo modelo MIA-PLS e os valores determinados experimentalmente para os conjuntos de calibração (*) e previsão (o)

```
> pc=polyfit(ye,yce,1);
> plot(ye,yce,'3*',yc,polyval(pc,yc),'3')
> hold on
> pp=polyfit(yp,ype,1);
> plot(yp,ype,'1o',yp,polyval(pp,yp),'1')
> legend('calib','linear fit','prev','linear fit')
> xlabel("pH experimental"); ylabel("pH MIA-PLS");
```

Nota-se uma boa concordância entre os valores experimentais e os valores previstos pelo modelo, com um r^2 de 0,9902 para a correlação entre todos esses valores. Os valores de RMSEC, RMSECV, RMSEP e r^2 para calibração e previsão são, respectivamente, 0,10, 0,31, 0,16, 0,9939 e 0,9834. O RPD, que é uma estimativa da capacidade preditiva de um modelo de calibração,²⁵ foi igual a 7,5. Esse valor qualifica o modelo MIA-PLS desenvolvido como adequado para o monitoramento do pH de águas potáveis ($6,5 > \text{RPD} > 8,0$).³¹

Para finalizar, o modelo MIA-PLS obtido foi utilizado para estimar os pHs de amostras de águas coletadas em triplicatas (Figura 4, colunas 5 e 6) e em três pontos diferentes do Instituto de Química/UFG. As leituras das imagens foram feitas em triplicatas conforme os poços A6-B6-C6, D6-E6-F6 e G6-H6-A5 (Figura 4a). Com base nos resultados obtidos, Tabela 1, conclui-se que não há diferença significativa (testes t e t pareado, $P=0,05$) entre as médias dos pHs medidos com pHmetro e os estimados com MIA-PLS. Além disso, esses dois métodos apresentam a mesma precisão para as amostras 2 e 3 (teste F , $P=0,05$), sendo MIA-PLS mais preciso para a amostra 1 ($P=0,0004$). Ou seja, para medidas de pH de águas potáveis o método MIA-PLS é analiticamente equivalente à metodologia convencional.

Tabela 1. Resultados da validação externa do modelo MIA-PLS

Amostras	Imagens ^b	pH ^a	
		pHmetro	MIA-PLS
1 (torneira)	A7-C7	6,50±0,14	6,71±0,00
2 (mineral)	D7-F7	6,07±0,03	6,06±0,01
3 (bebedouro)	G7-A8	6,25±0,05	6,24±0,06

^amédia±desvio padrão; ^bsimbologia dos poços conforme Figura 4.

CONCLUSÃO

Imagens digitais podem ser empregadas como amostras de valor analítico devido à facilidade em obtenção e de análise de grande

quantidade de dados, além de ser uma técnica rápida, de baixo custo e de baixa produção de resíduos. Nesse trabalho foram apresentadas, de modo didático, as linhas gerais para a utilização de imagens digitais em metodologias analíticas associadas ao modelo de calibração multivariada PLS, empregando um software de domínio público (GNU Octave). O modelo MIA-PLS gerado a partir de imagens digitais de soluções aquosas, coloridas com a adição de um indicador, para determinar o pH da água potável mostrou-se analiticamente equivalente à metodologia convencional da medida com um pHmetro.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Denilson Rabelo (IQ-UFG) pela sugestão do trabalho e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

- Fernandez-Oliveras, A.; Pozo, A. M.; Rubino, M.; *Opt. Rev.* **2013**, *20*, 41.
- Klimowicz, A.; Bose, P.; Nakoneshny, S. C.; Dean, M.; Huang, L.; Chandarana, S.; Magliocco, A. M.; Matthews, T. W.; Brockton, N. T.; Dort, J. C.; *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 2166.
- Kozłowski, C.; Jeet, S.; Beyer, J.; Guerrero, S.; Lesch, J.; Wang, X.; DeVoss, J.; Diehl, L.; *Dis. Models & Mech.* **2013**, *6*, 855.
- Oren, A. H.; Onal, O.; Ozden, G.; Kaya, A.; *Eng. Geol. (Amsterdam, Neth.)* **2006**, *85*, 239.
- Williams, K.; Munkvold, J.; Sorrells, M.; *Euphytica* **2013**, *190*, 99.
- Vazquez, M.A.; Galan, E.; Ortiz, P.; Ortiz, R.; *Constr. Build. Mater.* **2013**, *45*, 95.
- de Souza, F. R.; Alves, G. L.; Coltro, W. K. T.; *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9002.
- Godinho, M. S.; Pereira, R. P.; Ribeiro, K. O.; Schmidt, F.; de Oliveira, S. B.; de Oliveira, A. E.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1485.
- Silva, T. C. O.; Godinho, M. S.; de Oliveira, A. E.; *Lat. Am. Appl. Res.* **2001**, *41*, 141.
- Godinho, M. S.; de Oliveira, A. E.; Sena, M. M.; *Microchem. J.* **2010**, *96*, 42.
- Lopez-Molinero, A.; Cubero, V. T.; Irigoyen, R. D.; Piazuolo, D. S.; *Talanta* **2013**, *103*, 236.
- Geladi, P.; Wold, S.; Esbensen, K. H.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, *191*, 473.
- Prats-Montalbán, J. M.; de Juan, A.; Ferrer, A.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2011**, *107*, 1.
- <http://www.gnu.org/software/octave>, acessada em Abril 2015.
- Geladi, P.; Kowalski, B. R.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, *185*, 1.
- <http://www.bitjungle.com/mvartools>, acessada em Abril 2015.
- <http://www.gnu.org/copyleft/gpl.html>, acessada em Abril 2015.
- Atkins, P.; Jones, L.; *Princípios de Química*; 3ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2006.
- Russ, J. C.; *The Image Processing Handbook*, 6ª ed., CRC Press: Boca Raton, 2011.
- Gonzalez, R. C.; Woods, R. E. *Digital Image Processing*. Prentice Hall: New Jersey, 1992.
- Sridhar, S.; *Digital Image Processing*, Oxford University Press: New Delhi, 2013.
- Varmuza, K.; Filzmoser, P. *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*, CRC Press: Boca Raton, 2009.
- Wold, H.; *Em Perspectives in Probability and Statistics*; Gani, J., ed.; Academic Press: London, 1975, p. 520-540.
- Godinho, M. S.; Blanco, M. R.; Gambarra Neto, F. F.; Lião, L. M.; Sena, M. M.; Tauler, R.; de Oliveira, A. E.; *Talanta* **2014**, *129*, 143.
- Igné, B.; Hurburgh Jr., C. H.; *J. Chemom.* **2010**, *24*, 75.
- American Public Health Association (APHA), Water Works Association (AWWA), Water Environmental Federation (WEF); *Standard methods*

- for the examination of water and wastewater*, 18th ed., APHA-WEF: Washington, 1992.
27. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bromothymol_blue, acessada em Abril 2015.
28. Morita, T.; *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. Padronização, Preparação e Purificação*, Edgard Blücher: São Paulo, 1998.
29. <http://www.scanitto.com>, acessada em Abril 2015.
30. <http://octave.sourceforge.net/image/index.html>, acessada em Abril 2015.
31. Williams, P.; Norris, K.; *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, American Association of Cereal Chemists: St. Paul, 2001.