



**LÍVIA MARIA BRAGA RESENDE**

**DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIS TOTAIS EM ÓLEOS  
VEGETAIS USANDO COLORIMENTRIA POR IMAGEM  
DIGITAL**

**LAVRAS-MG  
2022**

**LÍVIA MARIA BRAGA RESENDE**

**DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIS TOTAIS EM ÓLEOS VEGETAIS USANDO  
COLORIMETRIA POR IMAGEM DIGITAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Cleiton Antônio Nunes  
Orientador

Profa. Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Resende, Lívia Maria Braga.

Determinação de esteróis totais em óleos vegetais usando  
Colorimetria por Imagem Digital / Lívia Maria Braga Resende. -  
2022.

65 p. : il.

Orientador(a): Cleiton Antônio Nunes.

Coorientador(a): Elisângela Jaqueline Magalhães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. análise colorimétrica. 2. smartphone. 3. compostos bioativos.  
I. Nunes, Cleiton Antônio. II. Magalhães, Elisângela Jaqueline. III.  
Título.

**LÍVIA MARIA BRAGA RESENDE**

**DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIS TOTAIS EM ÓLEOS VEGETAIS USANDO  
COLORIMETRIA POR IMAGEM DIGITAL**

**DETERMINATION OF TOTAL STEROLS IN VEGETABLE OILS USING  
DIGITAL IMAGE COLORIMETRY**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA EM 28 DE JANEIRO DE 2022.

Prof. Dr. Cleiton Antônio Nunes – UFLA

Profa. Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães - UFLA

Prof. Dr. Matheus Puggina de Freitas – UFLA

Profa. Dra. Ana Carla Marques Pinheiro - UFLA

Prof. Dr. Luiz Roberto Marques Albuquerque – UFVJM

Prof. Dr. Cleiton Antônio Nunes  
Orientador

Profa. Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães  
Coorientadora

**LAVRAS-MG**

**2022**

## RESUMO

Os esteróis são componentes presentes em óleos vegetais e estudados principalmente por sua propriedade de inibir a absorção do colesterol. Sua determinação pode ser realizada através de métodos cromatográficos ou baseada na reação colorimétrica de Liebermann-Burchard, seguido de análises por espectrofotometria. Por outro lado, os dispositivos móveis têm se mostrado eficientes na análise colorimétrica, viabilizando o desenvolvimento de métodos portáteis e de menor custo. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de um método para determinação de esteróis totais em óleos vegetais através de sinais analíticos obtidos com uma câmera de smartphone. Para isso, um smartphone Samsung Galaxy J5 com câmera de 13MP foi empregado, sendo as análises realizadas pelo aplicativo Pipette Color Picker, com distância de 25 cm do dispositivo móvel à amostra e iluminação ambiente. Soluções padrão de calibração de colesterol em clorofórmio foram submetidas à reação colorimétrica, conforme o método de Liebermann-Burchard e analisadas pelo método proposto e por espectrofotometria UV-Vis. A qualidade dos ajustes foi avaliada pelos valores de  $R^2$  em diversas escalas de cor, sendo o melhor ajuste obtido utilizando a escala RGB, com  $R^2$  médio de 0,90 para B. A influência da distância do dispositivo à amostra (15 cm e 25 cm), condições de iluminação (ambiente e artificial fluorescente) e aplicativo (Pipette Color Picker e Color Grab) utilizado foram avaliados na predição do valor de esteróis em uma amostra de azeite de oliva. Não foram observados efeitos significativos da variação da iluminação, porém, uma melhor condição de análise, com menor erro relativo, foi observada quando empregado o aplicativo Pipette a 25 cm de distância sob iluminação ambiente, mostrando a importância da padronização das condições de análise. Também foram testadas duas condições de pré-tratamento do sinal analítico, sendo que ao converter o valor obtido de RGB para um valor equivalente à absorbância, foram obtidos melhores resultados de linearidade do método, com  $R^2$  de 0,96 usando o componente de cor B, e erro padrão próximo ao encontrado para o método espectrofotométrico. Os ensaios realizados apresentaram linearidade, limite de detecção, precisão e exatidão satisfatórios. Os valores de desvio padrão relativo obtidos dos ensaios de repetibilidade foram inferiores a 14,0% e menores que 10,1% em termos de precisão intermediária. A recuperação aparente obtida nos ensaios de exatidão realizados mostrou-se na faixa de 91,6 e 107,9%. A precisão e exatidão também avaliadas pelas análises de amostras de óleos vegetais apresentaram resultados compatíveis com os encontrados nos ensaios de validação que empregaram soluções padrão. A variação dos dias de análise, lote de reagentes e preparação de novas soluções estoque e padrão não promoveram interferência nos resultados produzidos e indicaram que o método pode ser considerado robusto. Portanto, dispositivos móveis podem ser utilizados em substituição ao espectrofotômetro na determinação de esteróis em óleos vegetais através da reação de Liebermann-Burchard, permitindo um maior acesso à análise, através de dispositivos amplamente utilizados no dia-a-dia, de fácil mobilidade e custo baixo quando comparado aos métodos instrumentais de análise química.

**Palavras-chave:** Análise colorimétrica. Smartphone. Compostos bioativos.

## ABSTRACT

Sterols are components present in vegetable oils and studied mainly for their property of inhibiting the absorption of cholesterol. Its determination can be performed using chromatographic methods or based on the Liebermann-Buchard colorimetric reaction, followed by spectrophotometric analysis. On the other hand, mobile devices have shown to be efficient in colorimetric analysis, enabling the development of portable and lower cost methods. Thus, the objective of this work was to develop a method for determining total sterols in vegetable oils through analytical signals obtained with a smartphone camera. For this, a Samsung Galaxy J5 smartphone with a 13MP camera was used, and the analyzes were performed using the Pipette Color Picker application, with a distance of 25 cm from the mobile device to the sample, and ambient lighting. Cholesterol calibration standard solutions in chloroform were submitted to colorimetric reaction, according to the Liebermann-Burchard method and analyzed by the proposed method and by UV-Vis spectrophotometry. The quality of the adjustments was evaluated by the  $R^2$  values in different color scales, the best fit being obtained using the RGB scale, with an average  $R^2$  of 0.90 for B. The influence of the distance from the device to the sample (15 cm and 25 cm), lighting conditions (ambient and artificial fluorescent) and application (Pipette Color Picker and Color Grab) used were evaluated to predict the value of sterols in an olive oil sample. No significant effects of lighting variation were observed, however, a better analysis condition, with lower relative error, was observed when using the Pipette application at 25 cm away under ambient lighting, showing the importance of standardization of analysis conditions. Two pre-treatment conditions of the analytical signal were also tested, and when converting the value obtained from RGB to a value equivalent to the absorbance, better results of linearity of the method were obtained, with  $R^2$  of 0.96 using the color component B, and standard error close to that found for the spectrophotometric method. The tests performed showed satisfactory linearity, detection limit, precision and accuracy. The relative standard deviation values obtained from the repeatability tests were less than 14.0% and less than 10.1% in terms of intermediate precision. The apparent recovery obtained in the accuracy tests performed was in the range of 91.6 and 107.9%. The precision and accuracy also evaluated by the analysis of vegetable oil samples showed results compatible with those found in the validation tests that used standard solutions. The variation in the days of analysis, batch of reagents and preparation of new stock and standard solutions without interfering in the results produced indicated that the method can be considered robust. Therefore, mobile devices can be used to replace the spectrophotometer in the determination of sterols in vegetable oils through the Liebermann-Burchard reaction, allowing greater access to the analysis, through devices widely used in everyday life, of easy mobility and low cost when compared to instrumental methods of chemical analysis.

**Keywords:** Colorimetric analysis. Smartphone. Bioactive compounds.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais esteróis encontrados nos óleos e gorduras vegetais .....	14
Figura 2 - Reação de Liebermann-Burchard .....	16
Figura 3 - Soluções padrão de formaldeído para determinação em amostras de alimentos .....	19
Figura 4 - Esquema de determinação de glicose em urina utilizando um smartphone para captura de imagem de sensores colorimétricos .....	21
Figura 5 - Representação gráfica do sistema RGB .....	22
Figura 6 - Representação gráfica do sistema CMY .....	23
Figura 7 - Representação gráfica do sistema HSV .....	24
Figura 8 - Representação gráfica do sistema XYZ .....	25
Figura 9 - Representação gráfica dos modelos $L^*a^*b^*$ e $L^*c^*h^*$ , respectivamente .....	26
Figura 10 - Esquema usado na análise das amostras para determinação dos esteróis totais usando câmera de smartphone .....	35
Tabela 1 - Níveis do planejamento fatorial $2^3$ usado para avaliar o efeito de condições analíticas sobre a acurácia do método baseado em imagens digitais para determinação de esteróis totais em óleos vegetais .....	37
Gráfico 1 - Valores RGB e absorbância em 625 nm para uma solução teste para determinação do teor de esteróis totais .....	41
Figura 11 - Imagens digitais, valores RGB e cor resultante de soluções padrão de calibração para determinação do teor de esteróis totais .....	42
Tabela 2 - Valores médios de $R^2$ obtidos de três curvas analíticas nos sistemas de cor analisados .....	43
Gráfico 2 - Efeito da iluminação, da distância e do aplicativo sobre o erro absoluto do teor de esteróis totais em uma amostra de azeite de oliva empregando o método baseado em imagens digitais em relação ao obtido por espectrofotometria UV-Vis .....	45
Tabela 3 - Resultados obtidos do planejamento fatorial para estabelecimento da condição ótima para determinação de esteróis totais usando imagens digitais .....	46
Tabela 4 - Parâmetros estatísticos obtidos de 3 curvas analíticas na determinação de esteróis por espectrofotometria UV-Vis ( $A_{625nm}$ ) e por imagens digitais com e sem estratégias de transformação dos sinais analíticos .....	48
Gráfico 3 - Curvas analíticas para determinação de esteróis baseadas na absorbância a 625nm, no valor de B e no valor de absorbância de B ( $A_B$ ) .....	49
Tabela 5 - Parâmetros estatísticos da regressão linear das concentrações de esterol em soluções padrão contra os respectivos valores de $A_B$ ou $A_{625nm}$ .....	50
Gráfico 4 - Resíduos da regressão linear das concentrações de esterol em soluções padrão contra os respectivos valores de $A_B$ ou $A_{625nm}$ .....	51
Tabela 6 - Resultados de precisão e exatidão obtidos dos ensaios realizados no mesmo dia e em dias distintos pelo método colorimétrico baseado em imagens digitais em soluções padrão de colesterol em clorofórmio .....	52
Tabela 7 - Precisão e exatidão avaliadas na determinação do teor de esteróis totais em óleos vegetais (n=6) pelo método de imagens digitais, previamente otimizado, em relação ao método espectrofotométrico .....	53
Gráfico 5 - Médias (n=6) dos teores de esteróis totais em amostras de óleos vegetais determinados pelo método baseado em imagens digitais e por espectrofotometria. As barras representam desvio padrão .....	54
Tabela 8 - Média (n=6), desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) obtidos na determinação do teor de esteróis totais em amostras de óleos vegetais determinados pelo método por imagens digitais e por espectrofotometria UV-Vis .....	55

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Qualidade de óleos e gorduras vegetais.....	12
2.2	Esteróis.....	13
2.2.1	Determinação de esteróis.....	15
2.3	Uso de imagens digitais e dispositivos portáteis na análise química.....	17
2.3.1	Sistemas de cor para expressão de imagens digitais.....	21
2.3.2	Uso de Smartphones para análise de óleos vegetais.....	26
2.4	Validação de método analítico.....	27
2.4.1	Linearidade.....	29
2.4.2	Exatidão.....	29
2.4.3	Precisão.....	31
2.4.3.1	Repetibilidade.....	31
2.4.3.2	Reprodutibilidade.....	31
2.4.3.3	Comparação da precisão entre métodos.....	32
2.4.4	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	32
2.4.5	Robustez.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1	Configuração inicial do método proposto.....	35
3.2	Seleção do sinal analítico.....	36
3.3	Otimização das condições de análise.....	36
3.4	Pré-tratamento do sinal analítico.....	37
3.5	Figuras de mérito para validação.....	38
3.5.1	Linearidade.....	38
3.5.2	Exatidão e Precisão.....	38
3.5.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	Configuração inicial método proposto.....	41
4.2	Seleção do sinal analítico.....	42
4.3	Otimização das condições de análise.....	44
4.4	Pré-tratamento do sinal analítico.....	47
4.5	Figuras de mérito para validação.....	50



<b>4.5.1</b>	<b>Linearidade .....</b>	<b>50</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Exatidão e Precisão .....</b>	<b>51</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Limite de Detecção e Limite de Quantificação. ....</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cor é o primeiro atributo avaliado pelos consumidores em um alimento, podendo indicar seu estágio de maturação e, até mesmo, suas condições de conservação, identificando se o mesmo está ou não apropriado para consumo (SOROURADDIN, SAADATI E MIRABI, 2015). Além disso, muitas análises de alimentos são realizadas através de técnicas com produção de cor para quantificação de analitos, o que acontece para óleos vegetais, por exemplo, na quantificação de esteróis, que se dá por análise espectrofotométrica da cor azul-esverdeada produzida pela reação de Lieberman-Burchard (DAKSHA et al., 2010).

Os fitoesteróis (esteróis de origem vegetal) são compostos minoritários presentes em óleos vegetais e são considerados compostos bioativos que trazem maior saudabilidade ao alimento consumido (JORGE, 2010). Com isso, tem crescido muito a procura por óleos vegetais com este componente, presente principalmente em óleos virgens ou extra-virgens, ou seja, extraídos a frio ou prensados e que não foram submetidos a processos de refino. Esse tipo de análise é previsto em legislação no Brasil (BRASIL, 2018) e internacionalmente nos guias de análises do Conselho Internacional Oleícola (2015) e Codex Alimentarius (2001) como um dos parâmetros de qualidade de azeites de oliva comercializados no mercado.

Assim, a análise de esteróis em óleos vegetais é de suma importância, pois pode ajudar a indicar a adulteração de um óleo vegetal virgem pela adição de outro óleo vegetal refinado ou mesmo pelo processo de refino do referido óleo (BRASIL, 2018). Ademais, através da análise de esteróis é possível garantir um nível mínimo de saudabilidade do óleo vegetal, já que esse composto é conhecido por ajudar a diminuir os níveis de colesterol no sangue (SABIR; HAYAT; GARDEZI, 2003).

Os principais métodos utilizados para análise de esteróis são por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas (MS), com diferentes tipos de detectores (ALBERICI et al., 2016; BERASATEGI et al., 2012). Esses métodos são reconhecidos como trabalhosos, demorados e com alto consumo de reagentes, além de requererem várias etapas para preparação da amostra. Um método mais simples utilizado para essa análise é através da espectrofotometria de absorção molecular na região do visível (UV-Vis) (ARAÚJO et al., 2013; DAKSHA et al., 2010). O método espectrofotométrico é capaz de determinar apenas o teor total de esteróis na amostra, enquanto os métodos cromatográficos, principalmente quando acoplados à espectrometria de massas, podem dar informações mais detalhadas sobre as espécies de esteróis presentes.

Apesar de os espectrofotômetros serem equipamentos de fácil operação, seu custo é relativamente elevado, além de não ser um equipamento portátil e de uso facilitado fora de um laboratório. Assim, nos últimos anos vem sendo estudados métodos analíticos baseados em imagens digitais obtidas com scanners, câmeras digitais e smartphones para determinação de analitos e avaliação de propriedades em alimentos através de produção de cor, as quais podem ser eficientemente associadas a softwares ou aplicações móveis. Fan e colaboradores (2021) relatam que esse tipo de análise está se tornando uma metodologia promissora para determinação da concentração de analitos por meio da avaliação das mudanças de cor na imagem digital obtida, sendo uma metodologia rápida e de baixo custo, principalmente para usuários que desejam realizar análises colorimétricas com pouco esforço, baixo custo e independente de localização.

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método baseado em imagens digitais obtidas com smartphone para determinação do teor total de esteróis em óleos vegetais, com o intuito de viabilizar uma metodologia portátil, de baixo custo e eficiente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Qualidade de óleos e gorduras vegetais

Os lipídios, componentes essenciais das estruturas biológicas, são formados por um conjunto de substâncias que tem como principal característica a hidrofobicidade, ou seja, não serem solúveis em água e em muitos casos solúveis em solventes orgânicos, tais como éter etílico, éter de petróleo, hexano, clorofórmio e acetona (FAHY et al., 2005; JORGE, 2009; NELSON; COX, 2011).

Segundo Jorge (2009), os lipídios são frequentemente encontrados na natureza, tanto em animais como em vegetais e podem ser denominados óleos, quando líquidos à temperatura ambiente, ou gorduras, quando sólidos à mesma temperatura (20°C).

O termo lipídios engloba substâncias como os ácidos graxos e seus derivados, triacilgliceróis, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, fosfolipídios, ceras, esteróis, terpenos, entre outros (FAHY et al., 2005; JORGE, 2009).

A classificação geral dos lipídios pode ser resumida da seguinte forma:

- Simples: acilgliceróis (glicerol + ácidos graxos) e ceras (ésteres de ácidos graxos + álcoois de alto peso molecular);
- Compostos: fosfolipídios (glicerol + ácidos graxos + compostos de ácido fosfórico + base nitrogenada), esfingomielinas (esfingosina + ácido graxo + fosfato + colina), cerebrosídeos (esfingosina + ácido graxo + açúcar simples) e gangliosídeos (esfingosina + ácido graxo + carboidrato);
- Derivados: esteróis (colesterol, fitoesteróis), vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), carotenoides.

A maior parte dos lipídios naturais é composta de 98 a 99% de triacilgliceróis, compostos formados por três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol e cujas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes (GRAMPONE, 1993). Os 1 a 2% restantes, denominados componentes minoritários, incluem traços de mono e diacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, cerídeos, constituintes insaponificáveis, clorofila e produtos de alteração.

Gorduras e óleos são as principais formas de armazenamento de energia em muitos organismos; os fosfolipídios e os esteróis são elementos estruturais de membranas biológicas; e outros lipídios têm funções como de cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, hormônios e agentes emulsificantes (NELSON; COX, 2011).

Sabe-se que óleos e gorduras refinados são tipicamente submetidos a processos físicos e químicos de refinamentos, incluindo a degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização. Com isso, eles sofrem perdas de compostos bioativos desejáveis, como os compostos fenólicos, tocoferóis, fitoesteróis e carotenóides (REDONDO-CUEVAS, 2018).

Por outro lado, tem crescido, nas últimas décadas, a preocupação do consumidor em relação à qualidade dos alimentos, o que fez com que aumentasse, portanto, a busca por alimentos funcionais ou compostos bioativos benéficos à saúde. Muitos compostos bioativos são conhecidos por proporcionar benefícios à saúde, prevenindo, tratando doenças ou proporcionando um melhor funcionamento do organismo. Dessa forma, a busca por óleos com composição especial, ou seja, com presença de compostos bioativos desejáveis como ácidos graxos essenciais, fitoesteróis, compostos fenólicos e pigmentos também vem crescendo, já que a presença desses compostos pode caracterizar esses óleos como alimentos funcionais (JORGE, 2010).

O conteúdo de fitoesteróis encontrado em óleos vegetais é maior que em qualquer outro tipo de alimento. Han, Yang e Feng (2008) relataram que as melhores fontes de fitoesteróis na dieta humana são os óleos vegetais e os cereais. Vários fitoesteróis com estruturas específicas são conhecidos por inibir a deterioração oxidativa de óleos, servindo como potenciais agentes anti-polimerização para óleos de fritura. Além disso, as atividades de hipocolesterolemia de alguns fitoesteróis foram documentadas (AZIZI; GHAVAMI, 2020). Com isso, sempre há a necessidade de maiores investigações sobre a composição química e outras propriedades nutricionais e de saudabilidade de óleos e gorduras.

## **2.2 Esteróis**

O colesterol é um esterol que realiza muitas funções vitais no corpo, como fornecer componentes essenciais às membranas celulares e servir como precursor de ácidos biliares, hormônios esteróides e vitamina D (CHAMPE; HARVEY, 1997). Porém, uma das principais razões de doenças cardíacas é a hipercolesterolemia, ou seja, o aumento da concentração do colesterol no sangue (SABIR; HAYAT; GARDEZI, 2003).

A corrente sanguínea transporta colesterol em partículas chamadas lipoproteínas. Entretanto muito colesterol circulante pode ferir as artérias, especialmente as artérias coronárias que abastecem o coração. Isso leva ao acúmulo de “placa” carregada de colesterol nos revestimentos dos vasos, uma condição chamada aterosclerose. Quando o fluxo sanguíneo para o coração é impedido, o músculo cardíaco fica sem oxigênio, causando dor no peito

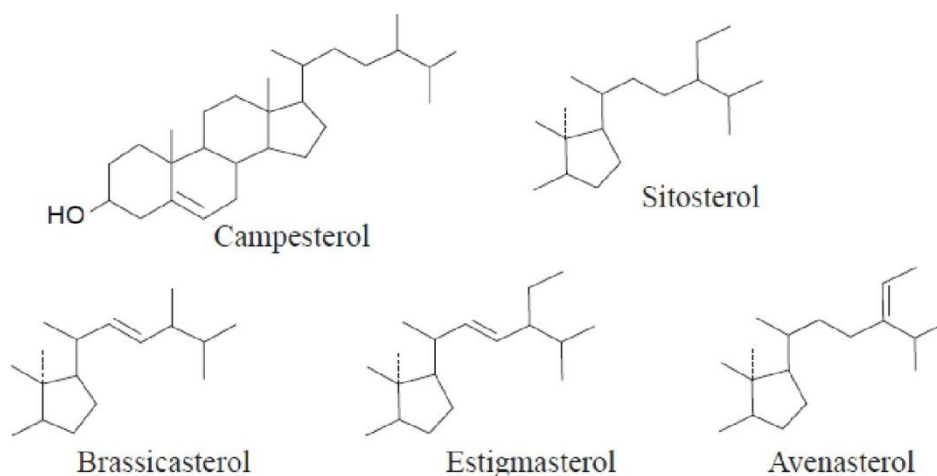
(angina). Se um coágulo de sangue obstruir completamente uma artéria coronária afetada pela aterosclerose, pode ocorrer um ataque cardíaco (infarto do miocárdio) ou morte (LIPPY, 1998).

Os esteróis provenientes de plantas, ou fitoesteróis, são componentes minoritários presentes em óleos e gorduras com estrutura química e funções biológicas similares ao colesterol (PIIRONEN et al., 2000). Devido à essa semelhança, os esteróis vegetais são estudados principalmente por sua propriedade de inibição da absorção do colesterol, além de seus potenciais efeitos anti-câncer, anti-aterosclerose, anti-inflamatório e atividade antioxidante (BERGER; JONES; ABUMWEIS, 2004).

Sabe-se que os fitoesteróis abaixam o nível de colesterol no sangue, assim como a ingestão de gorduras mono e poli-insaturadas (também presentes em óleos vegetais) e, por isso, há a importância em se conhecer os alimentos ricos em esteróis e controlar sua ingestão, buscando limitar a ingestão de alimentos que aumentam o colesterol no sangue e, da mesma forma, equilibrar o consumo daqueles ricos em fitoesteróis (SABIR; HAYAT; GARDEZI, 2003).

Mais de 100 tipos de fitoesteróis foram identificados na natureza, sendo suas distribuições variáveis de acordo com as características de cada planta, condições agrônomicas e ambientais do cultivo, além da extração, refino e armazenagem, quando a fonte são os óleos e gorduras. Os principais fitoesteróis encontrados são o  $\beta$ -sitosterol, campesterol, brassicasterol, avenasterol e estigmasterol, e suas estruturas estão demonstradas na Figura 1 (ALBERICI et al., 2016; AZIZI; GHAVAMI, 2020).

Figura 1 - Principais esteróis encontrados nos óleos e gorduras vegetais.



Fonte: Jorge (2010).

### 2.2.1 Determinação de esteróis

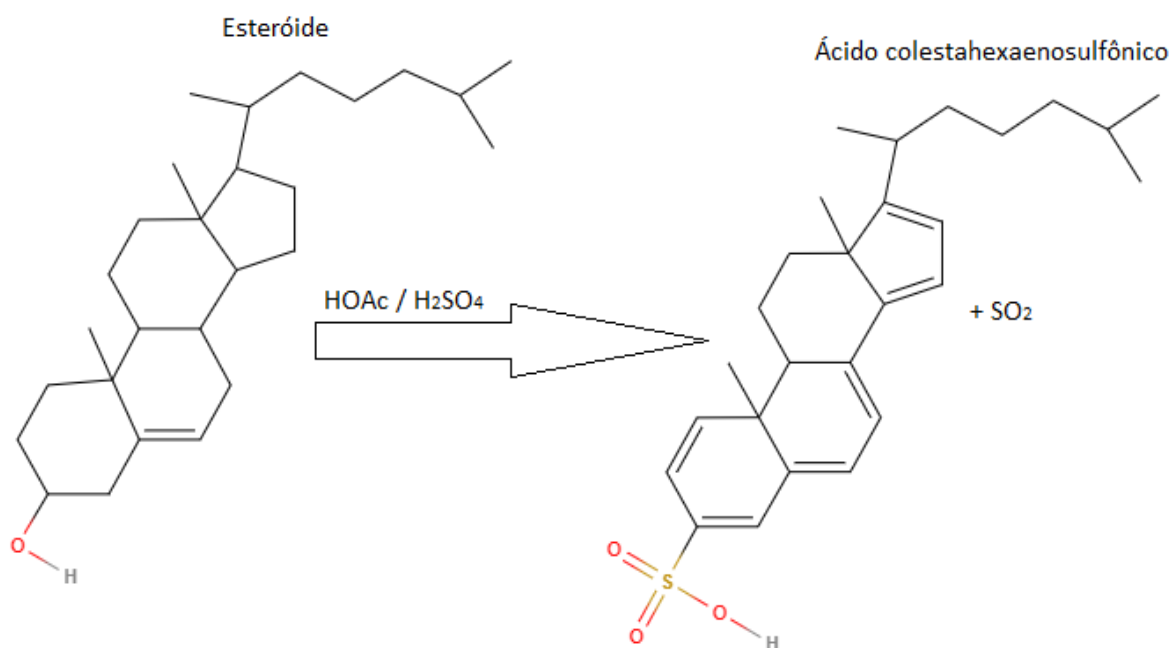
No método comumente usado para a determinação individual dos fitoesteróis, as amostras de lipídios são submetidas à saponificação e extração adicional da fração insaponificável; em seguida a composição de esteróis totais é determinada por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama, identificando cada esterol por comparação com o tempo de retenção dos padrões e quantificando por meio de curvas analíticas (BERASATEGI et al., 2012). Apesar de sua utilidade, o método é reconhecido como trabalhoso, demorado e com consumo de reagentes de custo relativamente elevado.

Abordagens alternativas para a determinação individual de fitoesteróis em alimentos aplicam cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detecção por UV, arranjo de diodos (DAD), índice de refração (RI) ou espalhamento de luz evaporativo (ELSD). Mais recentemente, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com fonte de ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS) foi relatada como adequada para análise de esterolem óleos vegetais (ALBERICI et al., 2016).

Alberici e colaboradores (2016) também relataram que vários protocolos de análise direta por espectrometria de massas (MS), como ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização por eletrospray (ESI) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI), permitem a redução do tempo de análise devido à eliminação da etapa cromatográfica. Mas, devido à sua baixa polaridade, os esteróis são difíceis de ionizar por ESI e MALDI.

Uma determinação mais simples estima o teor de esteróis totais usando a espectrofotometria de absorção molecular na região do visível, baseando-se na reação de Liebermann-Burchard (FIGURA 2), em que as hidroxilas dos esteróis reagem com uma solução de anidrido acético e ácido sulfúrico para produzir um derivado de coloração azul-esverdeada que absorve radiação eletromagnética ao redor de 625 nm. A quantificação é feita por meio de curva analítica usando colesterol como padrão, devido à sua similaridade estrutural (ARAÚJO et al., 2013; DAKSHA et al., 2010).

Figura 2 - Reação de Liebermann-Burchard.



Fonte: Da autora (2022).

Essa metodologia foi utilizada por Sabir, Hayat e Gardezi (2003) na análise de esteróis em óleos e gorduras comestíveis, que relataram que a escolha do método foi porque ele não é apenas específico para o colesterol, mas para qualquer esterol que tenha o grupo C<sub>3</sub>OH e, dessa forma, é capaz de quantificar, de forma total, todos os esteróis presentes na amostra. Bhatnagar e Gopala Krishna (2013) utilizaram a mesma metodologia para avaliar o teor de esteróis no óleo de semente de *Moringa oleifera* Jaffna em comparação com outros óleos vegetais comumente usados na Índia, como óleo de coco, óleo de palma, óleo de farelo de arroz, óleo de semente do níger, óleo de gergelim e óleo de amendoim. Tavakoli e Khodaparast (2013) também utilizaram a metodologia para determinação do teor de esteróis totais do óleo de frutos de *Pistacia khinjuk* cultivados no Irã. Herchi e colaboradores (2015) utilizaram este método para avaliação do conteúdo de esteróis totais em óleos da casca de linhaça com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de novos produtos ricos em ômega-3. Já Souleymane e colaboradores (2016) utilizaram o método para avaliar o conteúdo de esteróis totais de óleos artesanais de semente de algodão e amendoim produzidos e consumidos em Ouagadougou.



### 2.3 Uso de imagens digitais e dispositivos portáteis na análise química

A colorimetria é a técnica utilizada para descrever e quantificar a percepção humana da cor (OHNO, 2000). A colorimetria visual é caracterizada pela medição através da mudança de cor percebida ao olho nu e, por isso, é considerada de grande dificuldade e baixa precisão, enquanto que a colorimetria fotoelétrica utiliza aparatos como colorímetros ou espectrofotômetros, mais precisos na distinção da mudança de cor e determinação da concentração de soluções (CLYDESDALE, 1978).

Muitos métodos colorimétricos quantitativos são utilizados para determinar a concentração de um analito em uma amostra. Isso se tornou possível através da Lei de Lambert Beer, que permite a quantificação de um analito por leitura de absorvância em espectrofotômetro, permitindo a quantificação de diversas espécies químicas (KEHOE; PENN, 2013). Porém, os métodos quantitativos que podem alcançar precisão e exatidão suficientes para a quantificação de analitos por reação colorimétrica podem ser de alto custo dependendo da configuração instrumental e não permitir a portabilidade, o que é importante para análises *in loco*. Dessa forma, têm surgido estudos para a substituição desses equipamentos por scanners e câmeras digitais, incluindo as de dispositivos portáteis como os tablets e telefones celulares.

A Colorimetria por Imagem Digital tem se tornado um tema de pesquisa importante e recorrente devido à sua facilidade de obtenção e compartilhamento de dados, já que é baseado na análise de imagens coletadas por equipamentos de ampla utilização, tendo como vantagem a portabilidade e o custo relativamente baixo de muitos desses equipamentos (FIRDAUS et al., 2014).

Segundo a revisão publicada por Fan e colaboradores (2021), a Colorimetria por Imagem Digital foi muito estudada na última década para a determinação de substâncias em amostras químicas e biológicas, como também para analisar indicadores bioquímicos como glicose e proteínas, pesticidas, antibióticos, compostos naturais, bactérias e vírus.

Em 2006, Mendoza, Dejmek e Aguilera utilizaram valores obtidos nos sistemas de cor RGB e XYZ de imagens obtidas por uma câmera fotográfica Canon PowerShot A70, sob incidência de iluminação paralela fluorescente e com uso de algoritmos adequados para avaliar a cor de amostras de bananas e pimenta malagueta em comparação com um colorímetro de bancada. A robustez do método foi avaliada por mudanças na orientação, resolução e zoom da câmera, porém os resultados mostraram-se significativamente afetados pelas cores de fundo e pela curvatura e brilho da superfície.

Botelho, Assis e Sena (2014) utilizaram imagens obtidas por scanners com obtenção de valores de RGB para quantificar o corante amarelo crepúsculo em refrigerantes e bebidas isotônicas. Sorouraddin, Saadati e Mirabi (2015) também utilizaram valores de RGB obtidos de imagens digitais capturadas pelo mesmo tipo de equipamento para determinação dos corantes alimentares vermelho carmoisina, azul brilhante, amarelo crepúsculo e amarelo quinolina em amostras comerciais alimentícias. Ambos os estudos demonstraram ser uma metodologia viável, rápida, de baixo custo e com bons resultados.

Souza e colaboradores (2014) mostraram a viabilidade da utilização de uma câmera digital convencional, uma câmera de telefone celular, um microscópio óptico e um scanner como dispositivo de captura de imagem de microzonas impressas para quantificar  $\text{Fe}^{2+}$  em amostras farmacêuticas. Os autores relataram boa linearidade do método para sistemas de cor RGB e CMYK e melhor desempenho do método quando utilizado o scanner como dispositivo de obtenção das imagens, com resultados sem diferença estatística em relação aos obtidos pelo método espectrofotométrico.

Por todos os relatos supramencionados, observa-se que são necessárias, portanto, duas etapas principais na análise: obtenção da imagem e quantificação da cor, por software de processamento adequado. Esses softwares têm a função de converter a informação da cor em um sinal digital de um sistema de cor definido, a fim de possibilitar a correlação entre o sinal da imagem e a concentração do analito. O software ou aplicativo utilizado para o processamento da imagem deve ser escolhido pelo analista de acordo com o objetivo do estudo e o sistema de cor utilizado.

De acordo com Wong, Liu e Yu (2014), a quantificação de um analito através de scanners tem se mostrado promissora e a combinação de dispositivo móvel e aplicativo também se mostra como uma opção para análises químicas em locais sem acesso a equipamentos, visto que os aplicativos móveis podem ser utilizados para o processamento das imagens obtidas.

Para fins didáticos, Koesdjojo e equipe (2015) desenvolveram um método simples e direto para construção de um dispositivo microfluídico que pode ser utilizado para vários testes colorimétricos. No experimento realizado, os alunos criaram seus próprios dispositivos microfluídicos com suprimentos de laboratório comuns e determinaram a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  por colorimetria através de imagens digitais obtidas através de câmeras de smartphones e analisadas em sistema de cor RGB em um aplicativo de leitura de cores.

Martinkova e Pohanka (2016) desenvolveram um método utilizando os valores de RGB de imagens obtidas de uma câmera de um smartphone Sony Xperia MT27i para detectar a

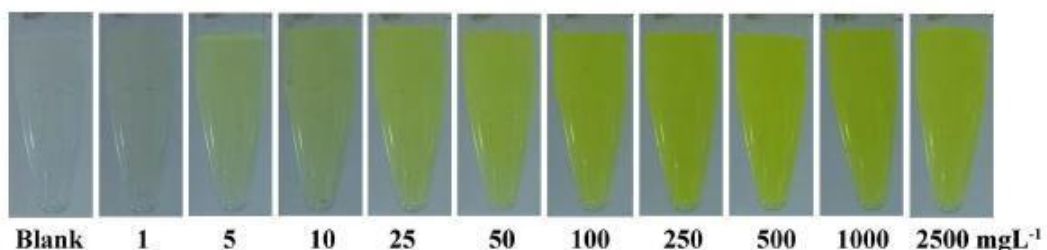
concentração de glicose através da mudança de cor da reação entre enzimas imobilizadas por uma membrana de sol-gel em bolhas (glicose oxidase e peroxidase – enzimas necessárias para determinação colorimétrica de glicose) com substrato glicose e dicloridrato de o-fenilenodiamina (o-PD). O teste se mostrou simples e de baixo custo para análise de níveis de glicose no sangue, com boa correlação da intensidade de cor com a concentração de glicose e baixo limite de detecção (750 mmol/L). Yetisen e colaboradores (2014) desenvolveram um algoritmo de aplicativo de smartphone com repetibilidade entre dispositivos, transformando o smartphone em um leitor para medir pH e quantificar proteína e glicose em testes comerciais colorimétricos de urina, com alta precisão e reprodutibilidade.

Firdaus e colaboradores (2014) utilizaram valores de RGB obtidos por fotos de alta resolução produzidas a partir de câmeras digitais para análise quantitativa de cromo e ferro em amostras aquosas. A precisão do método foi validada por regressão linear simples da cor individual em R, G ou B e por mínimos quadrados parciais usando espectrofotometria UV-visível como método de referência. Os autores obtiveram precisão e exatidão suficientes para a validação do método, obtendo uma metodologia mais rápida, de baixo custo e boa precisão.

Kehoe e Penn (2013) utilizaram metodologia semelhante e mostraram que concentrações de corantes alimentares azuis, bebidas isotônicas de limão e cloreto de ferro III podem ser determinados empregando câmeras digitais e também câmeras de celular. Dados confiáveis foram coletados pela obtenção de imagens digitais de soluções de amostras, padrões e brancos em uma condição de luz uniforme, fornecendo um método fácil para realizar a análise colorimétrica.

Wongniramaikul, Limsakul e Choogum (2018) desenvolveram um sensor de baixo custo com Colorimetria por Imagem Digital através de imagens obtidas pela câmera de um smartphone Iphone 6.0 para detecção de formaldeído em amostra de alimentos através de valores obtidos de RGB das imagens (FIGURA 3), obtendo um método mais limpo, de baixo custo, com boa linearidade, baixo limite de detecção e baixo erro relativo.

Figura 3 - Soluções padrão de formaldeído para determinação em amostras de alimentos.



Fonte: Wongniramaikul, Limsakul e Choogum (2018).

Coutinho e colaboradores (2017) utilizaram imagens obtidas por smartphone de amostras comerciais de vitamina C e padrões de ácido ascórbico para quantificar o princípio ativo através de valores de RGB processados no software GIMP 2.0. O método proposto foi considerado rápido, de baixo custo, simples e portátil, além de fornecer resultados satisfatórios e diferenças não significativas com 95% de confiança entre o teor de ácido ascórbico estimado pelo método de proposto e os valores de referência tabelados.

Phadungcharoen e equipe (2020) desenvolveram um método de análise da concentração do fármaco cloridrato de clorpromazina, onde após extração de pares de íons, formando um complexo de par de íons amarelo, foram obtidos os valores de RGB em aplicativo através de foto obtida por uma câmera de iPhone. O método proposto apresentou boa linearidade e precisão, além de ser rápido, fácil, barato e ecologicamente correto.

Zamora-Garcia e colaboradores (2021) mostraram que é possível estimar a concentração de amônia na água para piscicultura através da utilização da leitura dos componentes RGB obtidos por imagens de câmeras digitais, facilitando a decisão do piscicultor na determinação do tempo correto de reposição da água dos tanques.

Caleb e Alshana (2021) utilizaram um smartphone para detecção de curcumina em amostras de chá e cúrcuma, através do processamento dos valores de RGB das imagens no software ImageJ, e obtiveram boa precisão e exatidão do método.

Mathaweensurn, Maneerat e Choengchan (2017) utilizaram um smartphone Samsung Galaxy S5 e aplicativo disponível no sistema operacional Android “Albumin smart test” para quantificar albumina na urina, onde imagens das amostras foram capturadas pela câmera do smartphone e processadas pelo aplicativo. A reação entre a albumina e éster etílico de tetrabromofenoltaleína (TBPE) na presença de Triton X-100 foi utilizada como princípio de detecção. Os autores obtiveram um método portátil, rápido e de fácil implementação, com alta precisão na determinação da albumina (RSD < 2,5%) e alta exatidão (Recuperação = 98,7% ± 1,6).

Helfer e colaboradores (2017) desenvolveram um aplicativo capaz de quantificar ferro em suplementos vitamínicos através de técnicas de correlação linear simples dos dados de RGB capturados em imagens das amostras. Já Masawat e equipe (2016) construíram um aplicativo para dispositivo iOS para determinação de ferro total em água. O aplicativo registra os componentes de cor armazenando valores de vermelho, verde e azul, além de calcular a matiz, a saturação, brilho e valores de cinza usando a teoria de cores padrão. Os valores obtidos a partir das imagens de soluções alaranjadas de ferro (II) com 1,10-fenatrolina foram coletados e utilizados para avaliar a concentração total de ferro em amostras de água,

utilizando a teoria da distância euclidiana para a determinação de ferro. O colorímetro foi considerado de baixo custo, leve, fácil de operar, rápido, de baixo consumo de amostra e reagentes e baixa geração de resíduos. Além disso, alcançou um limite de quantificação de 0,1 mg/kg e, quando comparado com o método de referência, não apresentou diferença estatística com um nível de confiança de 95%.

Jia et al. (2015) propuseram um método de calibração das cores obtidas por câmera de smartphone para compensar as variações de condições de iluminação, posição de imagem e até mesmo marcas de celulares, através da utilização de fundos pretos e brancos como referências. Eles aplicaram o método proposto à detecção de glicose em urina por um conjunto de sensores colorimétricos. As imagens foram capturadas por uma câmera de smartphone (FIGURA 4) e diferentes concentrações de glicose na urina foram bem discriminadas após uma análise de agrupamento hierárquico (HCA).

Figura 4 - Esquema de determinação de glicose em urina utilizando um smartphone para captura de imagem de sensores colorimétricos.



Fonte: Adaptado de Jia et al. (2015).

Dessa forma, os parâmetros de cor obtidos por fotografias de dispositivos móveis mostram-se promissores para serem utilizados para análises colorimétricas, com maior facilidade e menor custo, quando comparado aos métodos instrumentais clássicos.

### 2.3.1 Sistemas de cor para expressão de imagens digitais

Como observado na literatura, há a possibilidade de utilização de diversos sistemas de cor no processamento das imagens digitais e, diante disso, é importante conhecer os sistemas disponíveis e avaliar o que melhor se aplica à análise realizada.

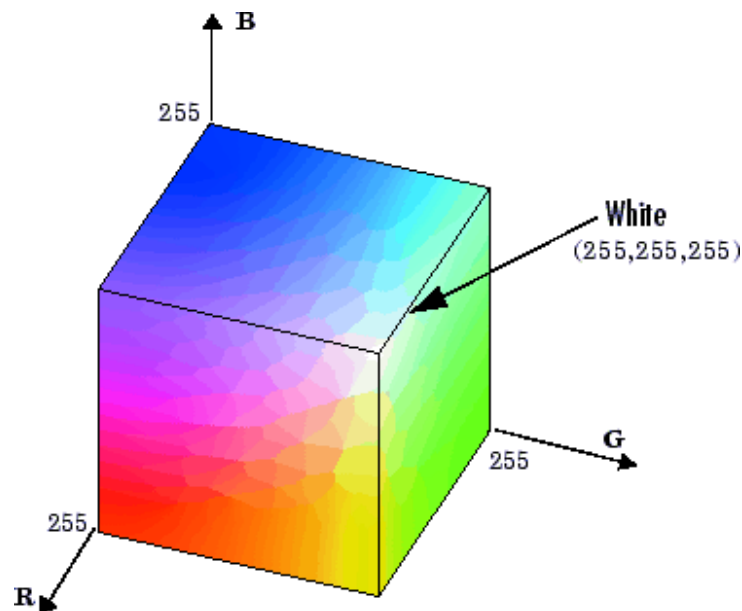
O sistema RGB é um sistema aditivo que usa a luz transmitida para exibir cores. Várias proporções e intensidades das três cores primárias (R-red/vermelho, G-green/verde e B-blue/azul) são usadas para criar ciano, magenta, amarelo e branco. É um sistema amplamente utilizado em telas de televisores e computadores e o modelo se relaciona intimamente com a

maneira como o ser humano percebe a cor na retina. O sistema é dependente do dispositivo, uma vez que seu alcance de cores varia de acordo com a exibição do dispositivo (YAM; PAPADAKIS, 2004).

No sistema RGB, as imagens digitais são geralmente compostas por cores de 24 bits (8 bits R + 8 bits G + 8 bits B). Portanto, os valores de RGB variam de 0 a 255 para cada um dos componentes de cores – vermelho, verde e azul – em uma imagem colorida. Quando os valores dos três componentes são iguais, é produzido um tom de cinza neutro; quando o valor de todos os componentes é 255, é produzido um branco puro; e quando o valor de todos os componentes é 0, o resultado é um preto puro (ADOBE SYSTEM, 2020; FIRDAUS et al., 2014, JIA et al., 2015).

O sistema de cores RGB pode ser representado por um cubo, conforme apresentado na Figura 5, no qual os valores RGB primários estão em três vértices; as cores secundárias (ciano, magenta e amarelo) estão em outros três vértices; o preto está na origem e o branco está no vértice mais distante da origem. Dessa forma, a escala de cinza, ou seja, os pontos de valores RGB iguais estendem-se por uma reta que une o preto ao branco (GONZALEZ; WOODS, 2010; SHU et al., 2016).

Figura 5 - Representação gráfica do sistema RGB.

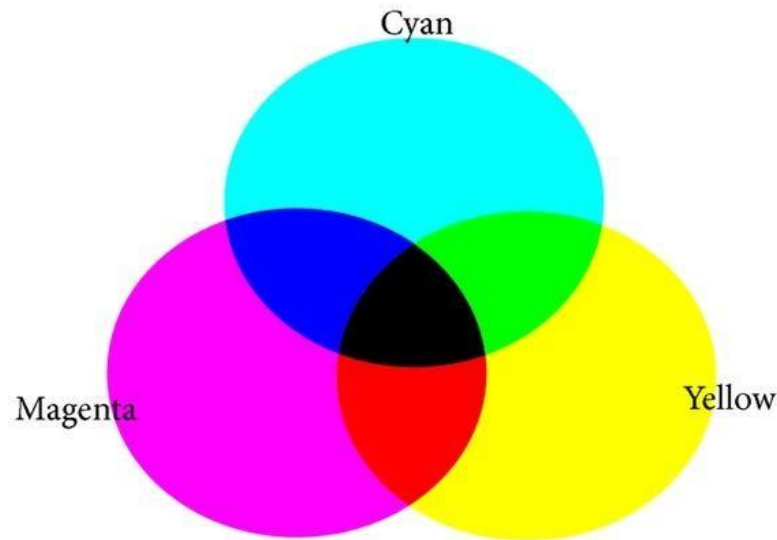


Fonte: Mathworks (2021).

Os sistemas de cor CMY e CMYK são baseados na qualidade de absorção de luz da tinta impressa em papel e, geralmente, é expresso em porcentagem. O CMY é um sistema

dependente do dispositivo, onde três cores de tintas primárias (C - cyan/ciano, M - magenta e Y - yellow/amarelo) são usadas para criar outras cores (YAM; PAPADAKIS, 2004).

Figura 6 - Representação gráfica do sistema CMY.

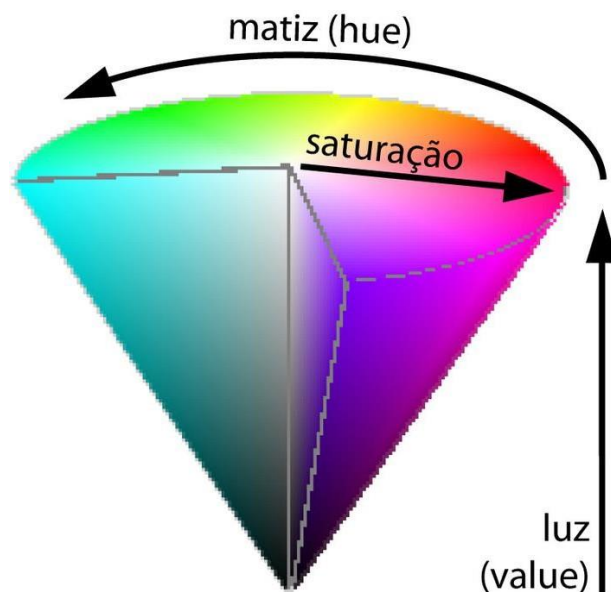


Fonte: Cao et al. (2016).

Na teoria, essas três cores combinadas absorvem toda a luz, produzindo preto. Porém, é produzida uma cor marrom, devido às impurezas das tintas, sendo necessária uma quarta tinta primária, o preto (K), para produzir um preto verdadeiro – dando origem ao sistema CMYK. O branco puro é gerado quando todos os quatro componentes possuem valores de 0% (ADOBE SYSTEM, 2020).

O sistema de cores HSV (hue - matiz, saturation - saturação e value - intensidade) é fundamentalmente diferente do amplamente conhecido sistema de cor RGB, uma vez que separa a intensidade (luminância) das informações de cor (cromaticidade). O sistema pode ser representado tridimensionalmente, onde o eixo vertical central representa a intensidade; o matiz, que representa o tipo de cor, é definido como um ângulo no intervalo 0°-360°, com vermelho em ângulo 0°, verde em 120°, azul em 240° e vermelho novamente em 360°; a saturação é a profundidade ou pureza da cor e é medida como uma distância radial do eixo central com valor entre 0 no centro e 1 na superfície externa, sendo que quanto mais próximo ao 1 a cor percebida muda de um tom de cinza para a forma mais pura da cor representada por seu matiz. Assim, para baixos valores de saturação, a cor se aproxima de cinza especificado pelo nível de intensidade, enquanto que, para altos valores de saturação, a cor pode ser aproximada por seu matiz (SURAL; QIAN; PRAMANIK, 2002).

Figura 7 - Representação gráfica do sistema HSV.

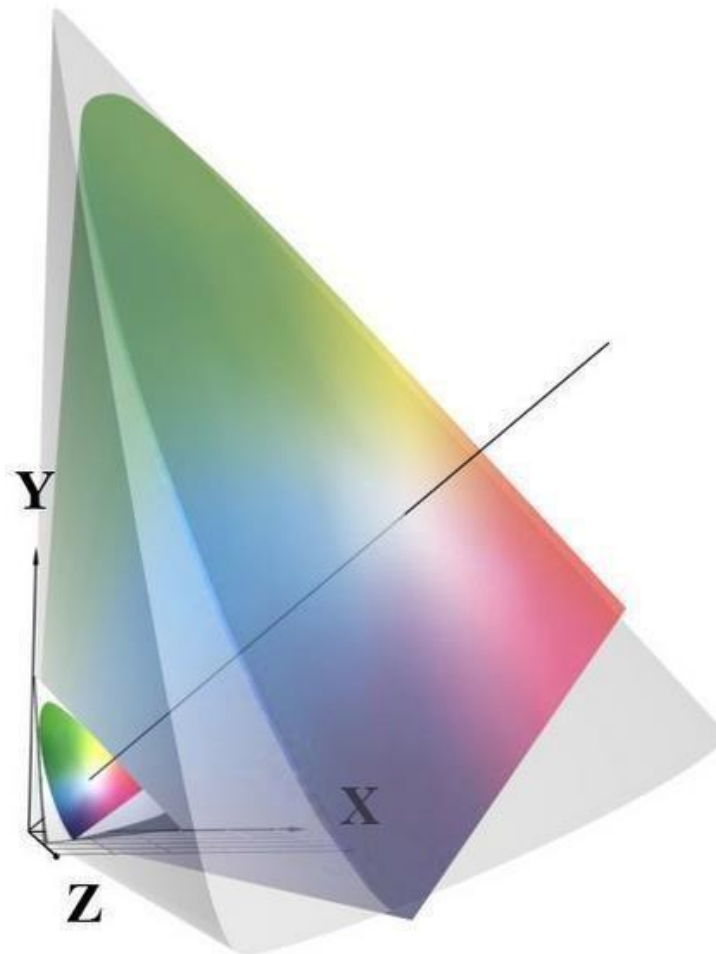


Fonte: Ribeiro e Gomes (2012).

O sistema XYZ foi estabelecido pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE - *Commission Internationale d'Eclairage*) em 1931 como a primeira escala científica para definição de cores aditivas. Assim como o sistema RGB, o sistema XYZ baseia-se na formação das cores a partir do vermelho, verde e azul e são denominados triestímulos nas coordenadas X, Y e Z a partir de um observador. Neste espaço de cor todos os estímulos perceptíveis são descritos por valores positivos de X, Y e Z, e o valor de Y é a luminância (CIE, 1931). Os valores são porcentagens dos componentes de uma mistura aditiva de três cores necessária para obter uma cor e não são característicos absolutos de uma amostra, mas valores relativos que dependem do método usado para determiná-los (POYNTON, 1995).



Figura 8 - Representação gráfica do sistema XYZ.



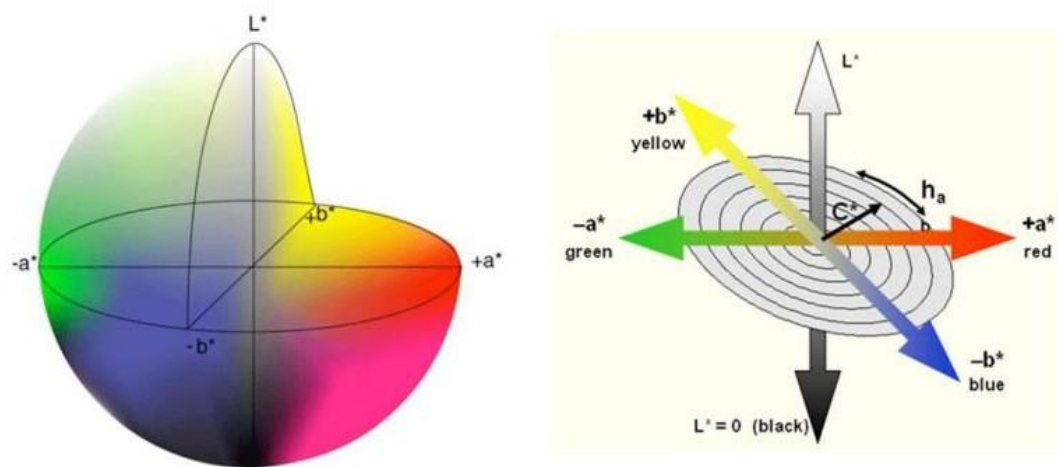
Fonte: Carrein et al. (2015).

O sistema  $L^*a^*b^*$  é um padrão internacional para medição de cores desenvolvido pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE) em 1976. A cor  $L^*a^*b^*$  é descrita em coordenadas cartesianas e consiste em um componente de luminância ou luminosidade ( $L^*$ ) - variando de 0 (preto) a 100 (branco) - juntamente com dois componentes cromáticos - variando de -120 a +120: o componente  $a^*$  (que varia de verde se negativo a vermelho se positivo) e o componente  $b^*$  (que varia de azul se negativo a amarelo se positivo) (LEÃO; SOUZA; ARAÚJO, 2006; YAM; PAPADAKIS, 2004). O sistema CIE  $L^*a^*b^*$  é independente do dispositivo e tem base na percepção humana da cor, onde seus valores numéricos descrevem todas as cores vistas por uma pessoa com visão normal (ADOBE SYSTEM, 2020). Usualmente, é um sistema de cor utilizado na caracterização da cor de alimentos.

O sistema de cores CIE  $L^*C^*h^*$  é um sistema em que as coordenadas  $L$

(luminosidade),  $c$  (croma) e  $h$  (matiz) são cilíndricas e correspondem às três dimensões de cores. O matiz é associado ao comprimento de onda dominante de uma cor e varia de  $0^\circ$  a  $360^\circ$ , onde  $0^\circ$  representa vermelho e  $90^\circ$  representa amarelo,  $180^\circ$  representa verde e  $270^\circ$  representa azul. O valor de luminosidade representa a quantidade de branco (100) ou preto (0) de uma cor. O croma descreve a quantidade de matiz ou saturação de uma determinada cor e é medido em uma escala de 0 a 40, com 0 representando o nível mais baixo de saturação e 40 o mais alto (WROLSTAD; SMITH, 2017).

Figura 9 - Representação gráfica dos modelos  $L^*a^*b^*$  e  $L^*c^*h^*$ , respectivamente.



Fonte: Moghaddam et al. (2013).

### 2.3.2 Uso de Smartphones para análise de óleos vegetais

Na última década diversos autores mostraram ser possível a utilização de smartphones para análise de amostras de óleos vegetais.

Para avaliar a confiabilidade de azeites de oliva, Dhande e Sushir (2018) desenvolveram um algoritmo de processamento de imagens capaz de estimar a adulteração de um azeite de oliva com óleo de soja através de uma captura de foto por smartphone através da segmentação baseada em cores utilizando-se o sistema de cor  $L^*a^*b^*$ . Já Hakonen e Beves (2018) utilizaram uma lanterna LED de 405 nm e uma câmera de smartphone para autenticação de um óleo comestível através da identificação de compostos fluorescentes intrínsecos como as clorofilas e os polifenóis. Utilizando-se o parâmetro hue (matiz) do sistema de cor HSV, foram autenticados vinte e quatro diferentes óleos comestíveis de nove tipos e quinze marcas, distinguindo as nove amostras de azeite extravirgem dos outros óleos utilizados. Mai e Le (2020) construíram um espectrofotômetro portátil baseado em smartphone

com sensibilidade e acurácia adequados, em que as imagens capturadas pelo smartphone foram convertidas em gráficos de distribuição de intensidade *versus* comprimento de onda para medir as variações na intensidade fluorescente de misturas de azeite de oliva extravirgem e óleo de arroz em diferentes porcentagens.

Visando avaliar a qualidade dos óleos vegetais, Vucane e colaboradores (2020) utilizaram um smartphone e o aplicativo Color Picker, além de um algoritmo de correspondência de imagem para o sistema de cor RGB, para análise da atividade antioxidante de óleos vegetais pelo método DPPH. O objetivo do estudo foi determinar a atividade antioxidante usando colorimetria baseada em imagens obtidas pelo smartphone de onze diferentes amostras, utilizando-se o método espectrofotômetro como comparação. Os autores obtiveram resultados sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) quando comparados ao método espectrofotométrico usando valores de RG. Peamaroon, Jakmunee e Moonrunsee (2021) desenvolveram um método colorimétrico baseado em câmera de smartphone para a determinação do índice de iodo de óleos vegetais, propriedade química do óleo referente ao grau de insaturação. Normalmente, o índice de iodo pode ser determinado usando o método padrão de Wijs, através de titulometria. Os autores utilizaram uma pequena quantidade de reagente Wijs para halogenação dos sítios insaturados das amostras, sendo que o reagente que não reagiu é transformado em iodo e posteriormente reage com a solução de amido para formar um complexo de cor azul. Um aplicativo de download gratuito (Color Picker ou Color Grab) foi usado para medir a intensidade da cor azul, através da leitura no sistema de cor RGB.

Carvalho e Nunes (2021) utilizaram regressão linear múltipla (MLR) e máquina de vetores de suporte de mínimos quadrados (LS-SVM) para calibrar teores de clorofilas e carotenóides de azeites de oliva e de abacate a partir de imagens digitais das amostras obtidas com smartphone. Resultados obtidos por espectrofotometria foram usados como referência. Os autores também desenvolveram uma metodologia de transferência de calibração, com o objetivo de diminuir erros causados por mudanças de câmeras e iluminação. Eles obtiveram um modelo com boa precisão sob diferentes condições de iluminação e com diferentes modelos de smartphone para análise de clorofilas e carotenóides em óleos vegetais.

## **2.4 Validação de método analítico**

A validação de método é um estudo experimental e documentado que consiste em definir e avaliar um procedimento analítico e confirmar que o método em consideração possui recursos consistentes com o que a aplicação exige, obtendo resultados analíticos com nível de

incerteza aceitável, ou seja, que sejam confiáveis. Para isso é necessário avaliar o desempenho e adequação do método à aplicação proposta e que a validação seja realizada sobre o procedimento analítico exatamente da forma que o mesmo será executado na rotina (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; EURACHEM, 2014; MAPA, 2015).

A validação é necessária para demonstrar que o método analítico atende aos critérios estabelecidos para diferentes características de desempenho, com um mínimo de confiança dos resultados apresentados. Também é importante ressaltar que o estudo de validação fornece aos analistas um conhecimento sólido e uma experiência dos detalhes práticos da execução do método, incluindo a conscientização de quaisquer etapas críticas do processo (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; EURACHEM, 2014).

Na prática, a validação do método é feita avaliando uma série de características de desempenho do método, como precisão, veracidade, seletividade/especificidade, linearidade, faixa de operação, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação, sensibilidade, robustez e aplicabilidade, sendo os resultados obtidos são avaliados através dos métodos estatísticos (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; EURACHEM, 2014).

Os requisitos e diretrizes de validação de métodos são bem descritos por diversos órgãos reguladores, agências de padronização e grupos de trabalho ou comitês e podem ser especificados de acordo com o setor específico. Os guias internacionais mais utilizados são Eurachem, IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), ISO (Organização Internacional de Padronização) e AOAC Internacional (Associação de Químicos Analíticos Oficiais) (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

Taverniers e colaboradores (2004) ainda explicam que as versões do guia Eurachem são publicadas com diretrizes sobre qualidade em laboratório no geral, validação de métodos e testes de proficiência, enquanto que os guias desenvolvidos pela IUPAC, ISO e AOAC Internacional tratam de estruturas de validação e padronização para química analítica. Diretrizes específicas para métodos farmacêuticos e biotecnológicos são descritos pela FDA (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos), Farmacopéia dos Estados Unidos e ICH (Conferência Internacional de Harmonização) e a Comissão Internacional do Codex Alimentarius trata de métodos de análise e amostragem, com critérios para avaliar a aceitabilidade de métodos de análise de alimentos.

### 2.4.1 Linearidade

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito (INMETRO, 2020).

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado, denominada faixa de trabalho. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro dela, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito. A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual é possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas (INMETRO, 2020). Para avaliação da linearidade, inicialmente deve ser definida a faixa de trabalho através do próprio método normalizado ou pelo analista, com base na faixa de concentração do analito que se espera encontrar ou avaliar (MAPA, 2015).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito, onde os resíduos devem ser representados graficamente e observado se há comportamento aleatório. Se o gráfico de resíduos indicar alguma tendência pode indicar que o modelo linear seja inadequado (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; INMETRO, 2020).

Outra forma de indicar a linearidade de um método é o cálculo a partir da equação da regressão linear e pelo coeficiente de correlação linear ( $R$ ), frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. (INMETRO, 2020). Como os desvios da linearidade são muitas vezes difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; INMETRO, 2020).

### 2.4.2 Exatidão

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão é normalmente estudada como dois componentes: veracidade e recuperação. (EURACHEM, 2014). A veracidade da medição é uma expressão de quão próxima a média de um número infinito de resultados está de um valor de referência e, como não é possível fazer um número

infinito de medições, a veracidade não pode ser medida, porém pode ser feita uma avaliação prática (bias) comparando-se a média dos resultados do método avaliado com um valor de referência adequado (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; EURACHEM, 2014).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são uso de materiais de referência certificados, participação em comparações obtidos com outro método e realização de ensaios de recuperação e pode ser necessária uma combinação de diferentes abordagens (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020).

Ao utilizar um material de referência na determinação da veracidade prática, a média da concentração e o desvio padrão de uma série de medições replicadas são determinados pelo método candidato e os resultados comparados com o valor atribuído do método de referência (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004).

Na ausência de materiais de referência adequados, podem ser utilizados estudos de recuperação para uma indicação do nível de veracidade. É necessário avaliar a eficiência do método para detectar todo o analito presente na amostra. Como geralmente não se sabe quanto do analito está presente em uma amostra, é necessário avaliar a eficiência do método em extraí-lo da matriz da amostra e, uma maneira de fazer essa avaliação é através do enriquecimento de amostras com o analito em várias concentrações, extrair as porções de teste enriquecidas e medir a concentração do analito (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; EURACHEM, 2014).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (spike). As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações sendo, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Porém, os analitos podem estar presentes em uma variedade de formas na amostra e, às vezes, apenas algumas formas são de interesse do analista, assim, o método pode ser intencionalmente projetado para determinar apenas uma forma particular de análise. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (EURACHEM, 2014; BIOPHARMACEUTICS, 2018; INMETRO, 2020).

Também é possível avaliar a exatidão de um método comparando os resultados do método candidato com os obtidos de um método alternativo, sendo este um método de referência ou um método atualmente em uso rotineiro no laboratório. Dessa forma, o método alternativo é utilizado como forma de obter um valor de referência aceito para a medição

realizada, geralmente com resultados com menor incerteza que o método candidato. O objetivo é demonstrar que os resultados obtidos por ambos métodos fornecem resultados equivalentes (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; EURACHEM, 2014).

### **2.4.3 Precisão**

A precisão é o termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade e a reprodutibilidade (EURACHEM, 2014; MAPA, 2015; INMETRO, 2020).

A precisão é geralmente demonstrada como desvio padrão ou desvio padrão relativo. Tanto a repetibilidade quanto a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e devem ser determinadas em diferentes níveis de concentração e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020).

#### **2.4.3.1 Repetibilidade**

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, sob as mesmas condições de medição (condições de repetibilidade), ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo (EURACHEM, 2014; MAPA, 2015; INMETRO, 2020).

Ela pode ser expressa quantitativamente considerando-se a característica de dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição a branco em várias concentrações na faixa de trabalho (MAPA, 2015; INMETRO, 2020). Sugere-se entre 6 e 15 repetições para o cálculo do desvio padrão para cada concentração, chamado desvio padrão de repetibilidade (INMETRO, 2020).

#### **2.4.3.2 Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de medição. A precisão sob condições de reprodutibilidade, em que os resultados dos ensaios são obtidos com o mesmo método,

variando-se laboratórios, operadores ou equipamentos é denominada “precisão intermediária” (EURACHEM, 2014; MAPA, 2015; INMETRO, 2020).

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar, podendo ser: variação de analistas, variação de equipamentos, variação de tempo, entre outros. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório (EURACHEM, 2014; MAPA, 2015; INMETRO, 2020).

Para determinar a precisão intermediária de um método, efetuam-se “n” medições em replicata ou em ensaio único sobre a amostra, nas condições pré-definidas. Se necessário, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outros níveis de concentração. Na maioria dos casos, o valor de precisão intermediária é expresso em função do nível de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados dispersos. A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificar a existência de valores dispersos (INMETRO, 2020).

#### **2.4.3.3 Comparação da precisão entre métodos**

Quando se pretende avaliar se dois métodos (A e B) tem diferenças significativas entre si, em termos de precisão, pode-se recorrer ao teste F, que se baseia no cálculo da razão entre as variâncias dos dois métodos. O valor obtido é comparado com o valor tabelado de F. Se F calculado  $\leq$  ao F tabelado, os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si (INMETRO, 2020).

#### **2.4.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação**

Para medições em baixas concentrações pode ser necessário estabelecer um valor do resultado que seja considerado para indicar um nível de analito que seja significativamente diferente de zero, conhecido como “valor crítico” ou “limite de decisão” (EURACHEM, 2014). Também é importante conhecer a concentração mais baixa do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada pelo método, em um nível de confiança especificado, ou seja, o “limite de detecção” (LOD) ou “valor mínimo detectável” (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; EURACHEM, 2014; MAPA, 2015) e estabelecer o nível mais baixo em que o desempenho é aceitável para uma aplicação típica, ou seja, a menor quantidade de analito determinada com precisão e exatidão adequados, conceito



normalmente referido como o limite de quantificação (LOQ) (EURACHEM, 2014; MAPA, 2015; BIOPHARMACEUTICS, 2018).

O guia da Eurachem (2014) ressalta que, para estimar LOD e LOQ, as amostras utilizadas devem ser amostras em branco, ou seja, matrizes que não contêm analito detectável, ou amostras de teste com concentrações de analito próximas ou abaixo do LOD esperado. Quando amostras em branco ou amostras de teste em baixas concentrações não estão disponíveis, geralmente podem ser usados brancos de reagentes.

Para a validação de um método o LOD e o LOQ são mais comumente determinados e são normalmente calculados multiplicando um desvio padrão por um fator adequado (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; EURACHEM, 2014). É importante que este desvio padrão seja representativo da precisão obtida para amostras de teste típicas e que sejam feitas medições em replicatas suficientes para fornecer uma estimativa confiável (EURACHEM, 2014).

Em muitos procedimentos de medição, a média de réplicas é relatada no uso rotineiro do método, onde cada réplica é obtida seguindo todo o procedimento de medição. Neste caso, o desvio padrão dos resultados únicos  $S_0$  deve ser corrigido dividindo-se pela raiz quadrada de  $n$ , que é o número médio de réplicas em uso de rotina. (EURACHEM, 2014). Para cálculo do LOD, o desvio padrão corrigido  $S_0'$  deve ser multiplicado pelo fator 3 e para cálculo do LOQ o desvio padrão corrigido  $S_0'$  deve ser multiplicado pelo fator multiplicador  $k_Q$ , usualmente igual a 10 (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; EURACHEM, 2014).

A importância da determinação do limite de detecção e os problemas associados a essa determinação advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de zero para um quando seu limiar é ultrapassado. Os problemas têm sido investigados estatisticamente e diversos critérios de decisão têm sido propostos (INMETRO, 2020).

#### **2.4.5 Robustez**

A robustez de um procedimento analítico é a medida de sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas, mas deliberadas, variações nos parâmetros do método, ou seja, expressa a sensibilidade do método frente a essas variações (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020). Para avaliação da robustez podem ser variados os dias de análise, analistas, instrumentos utilizados, materiais de preparação da amostra, as substâncias a analisar, as condições de armazenamento, as condições ambientais e/ou de preparação da amostra em que o método pode ser aplicado, entre outros (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE,

2004; MAPA, 2015).

Para examinar os efeitos de diferentes fatores pode ser aplicado um planejamento fatorial, combinando mudanças nas condições e realizando um conjunto de experimentos que permitem determinar quais fatores têm uma influência significativa ou mesmo crítica nos resultados obtidos (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004). Quando as variações das condições de análise não afetarem significativamente os resultados obtidos, o método é considerado robusto para as condições avaliadas, ou seja, indica a confiabilidade do método durante o uso normal (EURACHEM, 2014; MAPA, 2015; INMETRO, 2020). Vale ressaltar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

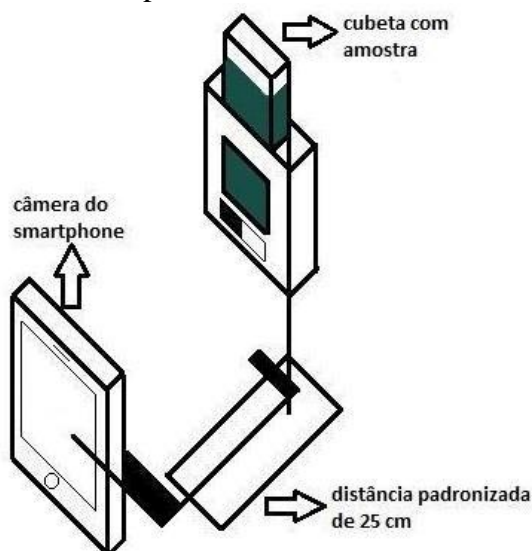
#### 3.1 Configuração inicial do método proposto

O método proposto empregou um smartphone Samsung Galaxy J5, constituído por uma câmera de 13MP, com resolução 4128x3096 pixels, flash led, distância focal de 28mm, com foco automático e estabilização digital. Inicialmente foi usado o aplicativo Pipette Color Picker, disponível no sistema operacional Android, para obtenção das informações colorimétricas.

Os testes iniciais foram realizados em condições de iluminação ambiente, sem incidência de iluminação solar, artificial ou flash, sendo as soluções padrão inseridas em uma cubeta de vidro fixadas em estrutura metálica montada com garras. Foi usada uma distância de 25 cm entre o dispositivo e a posição da amostra (FIGURA 10). Tais condições foram definidas por meio de testes preliminares.

Soluções padrão na faixa de 10 a 210 mg L<sup>-1</sup> colesterol (Sigma Life Science Cholesterol, ≥ 92.5%), para construção da curva analítica, foram preparadas em clorofórmio e sequencialmente submetidas à reação de Lieberman–Burchard (ARAUJO et al. 2013; SABIR; HAYAT; GARDEZI, 2003). O preparo do reagente Lieberman–Burchard consistiu em submeter 10 mL de anidrido acético a um de banho de gelo por 30 minutos, seguido de adição de 1 mL de ácido sulfúrico (ADU et al., 2019). Antes das análises, 0,8 mL do reagente de Lieberman–Burchard foi adicionado a um determinado volume de solução estoque a 1800 mg L<sup>-1</sup> de colesterol e o volume foi completado com clorofórmio para 4 mL.

Figura 10 - Esquema usado na análise das amostras para determinação dos esteróis totais usando câmera de smartphone.



Fonte: Da autora (2022).

Após análise nestas condições, os valores de RGB foram obtidos para todas as soluções padrão usando o aplicativo Pipette Color Picker. Para efeito de comparação, as mesmas soluções foram também analisadas por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis a 625nm.

Para avaliar o tempo de estabilidade das soluções padrão de colesterol, uma solução teste na concentração de 60 mg L<sup>-1</sup> foi previamente preparada e analisada a cada minuto, durante 60 minutos, tanto pelo método proposto quanto por espectrofotometria de absorção molecular UV- Vis.

### 3.2 Seleção do sinal analítico

Após avaliar a viabilidade do método usando o sistema de cor RGB, também foram testados os sistemas de cor CMY, HSV, XYZ, L\*a\*b\* e L\*C\*h\* das soluções padrão de colesterol de diferentes concentrações. Os dados foram obtidos pela conversão dos valores de RGB para os sistemas de cor supracitados usando ferramentas disponíveis no site “Colormine” (<http://colormine.org/>), e submetidos à análise por regressão linear, com consequente obtenção do coeficiente de determinação, R<sup>2</sup>.

### 3.3 Otimização das condições de análise

Depois de demonstrada a viabilidade do método, outras condições de análise foram testadas a fim de avaliar a influência da distância entre a câmera e a amostra, do aplicativo usado para capturar informações de cor das imagens e do tipo de iluminação sobre o nível de erro do método baseado em imagens digitais em relação ao método espectrofotométrico. Para isso, foram utilizados o mesmo dispositivo móvel, com variação da distância - 15 e 25 cm, do aplicativo - Pipette Color Picker e Color Grab (ambos disponíveis no sistema operacional Android), e das condições de iluminação - ambiente (sem incidência de iluminação solar, artificial e/ou flash) e em local escuro com incidência apenas de luz artificial fluorescente de 11W. Nesta etapa foi utilizada uma amostra de azeite de oliva da variedade Arbequina (EPAMIG).

Foi utilizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, conforme Tabela 1. A resposta avaliada foi o erro relativo (%) entre o teor de esteróis totais determinado pelo método baseado em imagens digitais e o obtido por espectrofotometria UV-Vis. A significância dos efeitos foi avaliada com 95% de confiança e os resultados obtidos foram usados para estabelecer as melhores condições analíticas. Os cálculos e gráficos foram feitos no programa Chemoface

versão 1.65 (NUNES et al., 2012).

Tabela 1 - Níveis do planejamento fatorial  $2^3$  usado para avaliar o efeito de condições analíticas sobre a acurácia do método baseado em imagens digitais para determinação de esteróis totais em óleos vegetais.

Nível	-1	+1
Iluminação	Artificial	Ambiente
Distância	15	25
Aplicativo	Pipette	Color Grab

Fonte: Da autora (2021).

### 3.4 Pré-tratamento do sinal analítico

Dois tipos de transformação de dados foram avaliados como alternativas para correção de efeitos adversos, tais como variação de iluminação e posição da amostra, durante a obtenção das imagens. Para isso, um adesivo de cor preta e outro de cor branca foram posicionados próximo ao recipiente das amostras para obtenção de imagens digitais com perfil RGB. Os valores de RGB foram então transformados por meio das equações 1 (KUNTZLEMAN; JACOBSON, 2016) e 2 (HONG; CHANG, 2014):

$$A_v = -\log \frac{V_{amostra}}{V_{branco}} \quad (1)$$

$$V_{corr} = \frac{256}{V_{branco} - V_{preto}} \times (V_{amostra} - V_{preto}) \quad (2)$$

onde “V” é o valor RGB.

De acordo com os autores, a equação 1 é utilizada como forma de medir a absorbância, ou seja, a quantidade de luz absorvida pela solução e, por isso, é baseada na Lei de Lambert Beer, que permite a determinação da concentração de um analito através da análise de absorbância.

Já na equação 2, os valores RGB obtidos da captura da imagem do adesivo preto e do adesivo branco são definidos como referências. Os valores para vermelho (R), verde (G) e azul (B) das referências de preto e de branco são usados para corrigir os valores originais de RGB. Assim, todos os sinais de detecção são ajustados em relação a cada valor RGB dos sinais de referência.

### 3.5 Figuras de mérito para validação

Alguns ensaios de validação foram realizados para avaliar a eficiência do método baseado em imagens digitais para determinação de esteróis totais em óleos vegetais. Linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram as figuras de mérito selecionadas para a validação do método proposto.

As amostras empregadas nos ensaios de validação consistiram em soluções padrão de colesterol em clorofórmio, azeites de abacate das variedades Hass e Breda (EPAMIG) e azeites de oliva da variedade Koroneiki (EPAMIG), cultivados na microrregião da Serra da Mantiqueira – MG, bem como óleo de amêndoa de macaúba e de amêndoa de jerivá colhidos na região de Lavras – MG e extraídos no próprio laboratório usando uma prensa de parafuso (Yoda Home Up). Todos os óleos utilizados foram armazenados em frasco de vidro âmbar, refrigerados (4°C) e protegidos da luz até a condução dos experimentos.

#### 3.5.1 Linearidade

Para obter a equação da regressão linear, uma curva analítica foi construída com cinco níveis de concentração e 3 replicatas por nível, correspondendo a 10, 60, 110, 160 e 210 mg.L<sup>-1</sup> de colesterol em clorofórmio. Todas as soluções foram preparadas separadamente e as análises foram realizadas de forma randomizada. A qualidade do ajuste e a significância do modelo de regressão foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) considerando nível de significância de 95%.

#### 3.5.2 Exatidão e Precisão

Soluções de colesterol em clorofórmio, em três níveis de concentração (10, 110 e 210 mg L<sup>-1</sup>), foram preparadas e submetidas à reação de Liebermann-Burchard para determinação da precisão e da exatidão. A repetibilidade (n = 6) foi avaliada no mesmo dia pelo mesmo analista (resultados intraensaios). A reprodutibilidade ou precisão intermediária (n = 3), expressa como desvio padrão relativo (DPR, %), foi avaliada nas mesmas condições, em três dias, totalizando 9 replicatas (resultados interensaios). A exatidão foi determinada pelos dados obtidos dos mesmos ensaios realizados para avaliar a precisão. Após a interpolação do sinal analítico na curva analítica, as recuperações aparentes (%) foram calculadas comparando a concentração média de colesterol obtida após análise com o nível de concentração na solução padrão. Já a veracidade (b) foi determinada pela equação:

$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 \quad (3)$$

onde  $\bar{x}$  é a concentração média e  $x_{ref}$  é a concentração nominal da solução padrão empregada nos ensaios de validação.

Adicionalmente, para verificar a performance do método incluindo amostras de óleos, optou-se por avaliar a exatidão comparando os resultados obtidos das análises de 5 amostras de óleos pelo método baseado em imagens digitais com os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico.

As amostras empregadas consistiram nos seguintes óleos: Abacate Hass, Abacate Breda, Macaúba, Oliva e Jerivá, já descritas anteriormente. Foram consideradas duplicatas para cada amostra usando três curvas analíticas distintas, totalizando seis observações por amostra. As médias do teor de esteróis totais, determinados pelo método baseado em imagens digitais e por espectrofotometria, também foram comparadas por meio de Teste-T usando a ferramenta “Teste-T: duas amostras em par para médias” do Microsoft Excel com 95% de confiança.

A precisão também foi avaliada pelos resultados obtidos dos ensaios com amostras de óleos, cujo desvio padrão relativo foi obtido das médias dos teores de esteróis totais determinados pelo método baseado em imagens digitais e por espectrofotometria. As variâncias dos dois métodos foram ainda comparadas pelo Teste-F usando a ferramenta “Teste-F: duas amostras para variâncias” do Microsoft Excel com 95% de confiança. Foram consideradas duplicatas para cada amostra usando três curvas de calibração distintas, totalizando seis observações por amostra.

### 3.5.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LOD) é definido como a concentração mais baixa do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LOQ) pode ser definido como o menor nível em que o desempenho é aceitável para uma aplicação típica (EURACHEM, 2014).

De acordo com o guia de validação empregado (EURACHEM, 2014), amostras em branco funcionam bem para métodos onde um sinal mensurável é obtido para um branco, como em espectrofotometria e espectroscopia atômica, podendo inferir que funciona bem para o método proposto. Entretanto, quando amostras em branco ou amostras de teste em baixo nível de concentração não estão disponíveis para o cálculo do LOD, como no caso de amostras de óleos, brancos de reagentes muitas vezes podem ser usados (EURACHEM,

2014). Diante disso, para determinar experimentalmente o LOD, uma cubeta contendo clorofórmio, como branco reagente, foi analisada em replicata (6 repetições) pelo método proposto, obtendo-se as respostas do sinal analítico. O LOD foi determinado a partir do desvio padrão, expresso em unidades de concentração, de acordo com a equação:

$$\text{LOD} = 3 \times S_0' \quad (4)$$

sendo  $S_0$  o desvio padrão estimado de  $n$  resultados na concentração zero e  $S_0'$ , ou seja,

$S_0 / \sqrt{n}$ , o desvio padrão usado para calcular LOD.

O LOQ estimado através da utilização das soluções padrão foi calculado pela equação:

$$\text{LOQ} = 10 \times S_0' \quad (5)$$



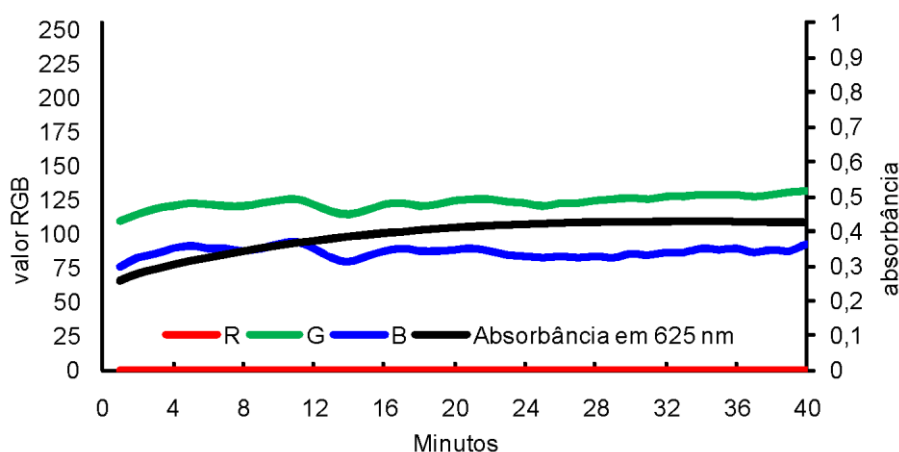
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Configuração inicial do método proposto

A determinação de esteróis totais por espectrofotometria é baseada na reação de Liebermann-Burchard, a qual não é imediata e ocorre ao longo de alguns minutos. Para verificar a estabilidade da cor da mistura reacional, uma solução de colesterol a  $60 \text{ mg L}^{-1}$  teve seus parâmetros de cor RGB, bem como a absorbância a 625 nm, adquiridos a cada minuto durante 60 minutos. Os valores de RGB obtidos ao longo do tempo estão presentes no Gráfico 1. Observa-se que há uma tendência de estabilidade na resposta RGB entre 25 e 40 minutos, indicando um intervalo seguro para as análises das amostras.

Embora outros autores (ARAÚJO et al., 2013; ANDIMA et al., 2018; ADMASSIE, EMAN E ENDALEW, 2021; DAKSHA et al., 2010) tenham relatado o início das análises por espectrofotometria UV-Vis em tempos menores de reação, após a adição do reagente de Liebermann-Burchard, pode-se observar pelo Gráfico 1 que tal comportamento foi semelhante tanto para os resultados obtidos por espectrofotometria UV-Vis quanto pelo método proposto, no que se refere aos componentes G e B. A resposta obtida para o componente R apresentou valores próximos de zero para a amostra analisada durante todo o tempo avaliado, o que pode ser explicado pela coloração azul-esverdeada que é exibida pelo meio reacional, com absorção na região do vermelho ( $\sim 625 \text{ nm}$ ) e reflexão na região do verde e do azul. Baseado nos resultados obtidos estabeleceu-se que as amostras deveriam permanecer em repouso por 25 minutos após o preparo para então dar prosseguimento à análise das mesmas.

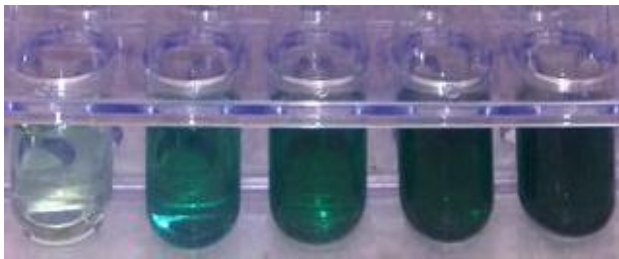

Gráfico 1 - Valores RGB e absorbância em 625 nm para uma solução teste para determinação do teor de esteróis totais.



Fonte: Da autora (2021).

A primeira etapa que deve ser considerada ao propor um método para determinação de um analito é verificar se há um sinal analítico que varie proporcionalmente à sua concentração. Para isso, curvas analíticas usando as concentrações 10, 60, 110, 160 e 210 mg L<sup>-1</sup> de colesterol foram construídas. Após 25 minutos de reação, as imagens digitais das soluções foram adquiridas para obtenção dos valores de RGB. A Figura 11 mostra as características de um conjunto de soluções padrão de calibração, cuja intensidade da cor aumenta com o aumento da concentração, com diminuição gradativa dos valores de G e B, ou seja, assim como esperado, foi observado um comportamento de variação dos valores obtidos conforme aumento da concentração do analito.

Figura 11 - Imagens digitais, valores RGB e cor resultante de soluções padrão de calibração para determinação do teor de esteróis totais.

mg.L <sup>-1</sup>	10	60	110	160	210
Imagem					
R	112	31	24	24	27
G	125	98	78	51	42
B	144	100	71	50	46
Cor					

Fonte: Da autora (2021).

Ao realizar a regressão linear do conjunto de dados para os componentes R, G e B, os coeficientes de determinação obtidos foram 0,53, 0,98 e 0,92, respectivamente. Esses resultados associados às características visuais das soluções de calibração indicam o potencial de uso quantitativo do método proposto, principalmente usando os componentes G e B.

#### 4.2 Seleção do sinal analítico

Os valores obtidos das análises de soluções padrão pelo sistema de cor RGB foram convertidos usando ferramentas disponíveis no site “Colormine” (<http://colormine.org/>) para outros sistemas de cor, sendo eles: CMY, HSV, XYZ, L\*a\*b\* e L\*C\*h\*. O valor de R<sup>2</sup> entre o valor de cada parâmetro de cor e as respectivas concentrações do analito foi determinado

em triplicata (por meio de três curvas analíticas) para cada um dos sistemas de cor supracitados, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios de  $R^2$  obtidos de três curvas analíticas nos sistemas de cor analisados.

Componente de cor $R^2$	R	G	B
	0,67	0,89	0,90
Componente de cor $R^2$	C	M	Y
	0,68	0,89	0,88
Componente de cor $R^2$	H	S	V
	0,34	0,68	0,89
Componente de cor $R^2$	X	Y	Z
	0,72	0,77	0,75
Componente de cor $R^2$	L	A	B
	0,89	0,43	0,56
Componente de cor $R^2$	L	C	H
	0,89	0,5	0,43

Fonte: Da autora (2021).

Maiores valores de  $R^2$  foram obtidos para as curvas analíticas baseadas nos componentes G e B (TABELA 2), indicando uma boa correlação linear entre os valores desses componentes de cor e as concentrações das soluções padrão de colesterol. Era esperado que esses componentes do sistema de cor RGB apresentassem melhor linearidade, visto que a cor produzida na análise de esteróis é característica por ser uma coloração azul-esverdeada, conforme Figura 11. Para efeito de comparação, as análises realizadas por espectrofotometria UV-Vis produziram  $R^2$  médio de 0,98.

Os valores médios de  $R^2$ , obtidos pelo sistema de cor CMY, foram inferiores a 0,9 para os componentes M e Y (TABELA 2) e a 0,7 para C. Isso demonstra melhor ajuste dos resultados obtidos pelas cores magenta e amarelo, que são complementares das cores verde e azul respectivamente, aquelas que descrevem a coloração gerada na análise de esteróis, justificando a melhor linearidade desses componentes.

No sistema de cor HSV, apenas a componente V produziu curva analítica com  $R^2$  médio próximo de 0,9, sendo que o V descreve a intensidade ou luminância da cor produzida. O resultado obtido indica uma linearidade relacionada à intensidade da cor produzida pela curva analítica, que vai do azul-esverdeado mais claro (maior V), quando em menores concentrações de esteróis, para o azul-esverdeado mais escuro (menor V), quando em maiores concentrações de esteróis.

Para o sistema de cor XYZ, nenhum dos componentes teve linearidade satisfatória, o

que indica que o sistema não correlacionou linearmente à cor produzida com as concentrações dos padrões.

Considerando os sistemas de cor  $L^*a^*b^*$  e  $L^*C^*h^*$  foi obtido  $R^2$  próximo de 0,9 apenas para a componente L, que descreve a luminosidade da cor produzida. Assim como para o sistema HSV, esse resultado condiz com a intensidade da cor produzida na curva analítica, mais clara para padrão menos concentrado, e mais escura para padrão mais concentrado. Os demais componentes desses sistemas não correlacionaram linearmente as cores das soluções padrão com suas respectivas concentrações.

Levando em consideração a correlação linear entre os valores das componentes dos diferentes sistemas cor e as concentrações das soluções padrão, componentes dos sistemas de cor RGB ou CMY foram os que apresentaram maior potencial para serem usados como sinal analítico para calibração. Diante disso, optou-se por utilizar o sistema RGB, já que é um sistema mais comum nas aplicações para tratamento de dados de imagens digitais.

### **4.3 Otimização das condições de análise**

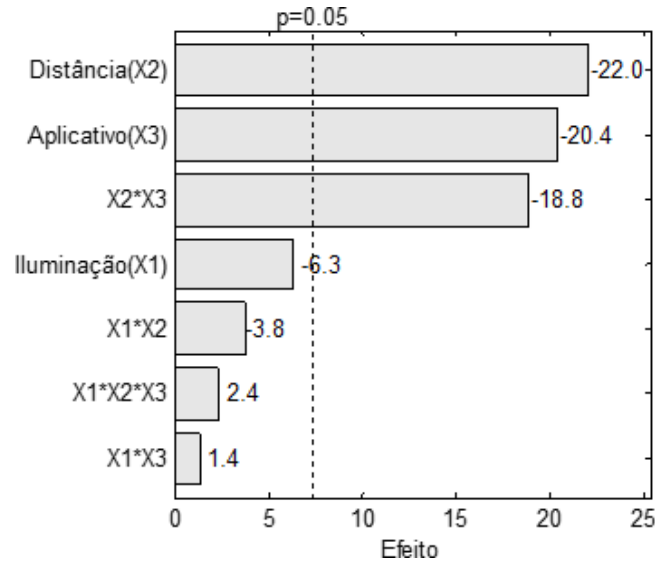
Para estabelecer a melhor condição para determinação de esteróis em óleos vegetais através de imagens digitais foi avaliada, através de um planejamento fatorial  $2^3$ , a influência da distância entre a câmera e a amostra, do aplicativo usado para capturar informações de cor das imagens e do tipo de iluminação. O mesmo smartphone foi utilizado para coletar imagens em todo o processo de análise para minimizar erros instrumentais. A resposta considerada para análise do planejamento fatorial foi o erro relativo entre os teores de esteróis totais determinados em uma amostra de azeite de oliva por espectrofotometria e pelo método baseado em imagens digitais. Nesta etapa, o sinal analítico consistiu dos valores da componente G, uma vez que sua curva analítica apresentou menor soma de quadrados de resíduos, embora o valor de  $R^2$  para esse componente tenha sido ligeiramente inferior ao modelo baseado em B.

O Gráfico 2 mostra o efeito estatístico das variáveis avaliadas sobre o erro absoluto obtido da comparação entre o teor de esteróis totais determinado em uma amostra de azeite de oliva pelo método proposto e pelo método de referência.

Conforme a literatura, era esperado que a interferência dos valores obtidos pelas imagens digitais fosse proveniente principalmente das condições de iluminação e da distância entre a câmera e a amostra, já que, conforme Fan et al. (2021), diferentes condições de iluminação e distância afetam diretamente a qualidade da imagem obtida e consequentemente

os resultados da análise. Entretanto, embora numericamente diferente de zero, o efeito da iluminação não foi significativo, o que nos leva a inferir sobre a robustez do método, mesmo sob efeito da luz ambiente (sem incidência de luz solar).

Gráfico 2 - Efeito da iluminação, da distância e do aplicativo sobre o erro absoluto do teor de esteróis totais em uma amostra de azeite de oliva empregando o método baseado em imagens digitais em relação ao obtido por espectrofotometria UV-Vis.



Fonte: Da autora (2021).

Ao analisar os aplicativos utilizados, observa-se que o aplicativo Pipette Color Picker considera uma maior área para capturar a imagem digital quando comparado ao aplicativo Color Grab. Isso faz com que o aplicativo Pipette tenha maior amplitude ao considerar os valores médios obtidos, onde qualquer interferência de sombra ou foco pode fazer diferença na imagem capturada. Dessa forma, acredita-se que por ser considerada uma maior área de interesse, o aplicativo Pipette produziu melhores resultados.

Os valores obtidos para esteróis totais na amostra de azeite de oliva nas diferentes condições experimentais, bem como os respectivos erros relativos, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados obtidos do planejamento fatorial para estabelecimento da condição ótima para determinação de esteróis totais usando imagens digitais.

Iluminação	Distância	Aplicativo	Esteróis totais (mg/kg)*	Erro relativo (%)**
Artificial	15 cm	Pipette	374.7	19.3
Artificial	15 cm	Color Grab	372.6	18.7
Artificial	25 cm	Pipette	383.8	22.2
Artificial	25 cm	Color Grab	248.7	-20.8
Ambiente	15 cm	Pipette	369.6	17.7
Ambiente	15 cm	Color Grab	361.6	15.2
Ambiente	25 cm	Pipette	340.4	8.4
Ambiente	25 cm	Color Grab	229.0	-27.1

\* determinado pelo modelo proposto baseado na componente *G*.

\*\* em relação ao teor de esteróis totais de 314,0 mg/kg determinado por espectrofotometria UV-Vis.

Fonte: Da autora (2021).

A condição com menor erro relativo (8,4%) foi aquela que utilizou iluminação ambiente, 25 cm de distância entre câmera e amostra e aplicativo Pipette. A validade de tal resultado foi reforçada pelas condições de análise com maior erro relativo obtido quando o aplicativo Color Grab foi empregado, com 25 cm de distância, tanto em condições de iluminação artificial quanto ambiente. Possivelmente, isso ocorreu devido à pequena área de captura do aplicativo nessa distância. Também foram obtidas altas porcentagens de erro relativo quando utilizado o aplicativo Pipette em condições de iluminação artificial.

Embora sejam observadas menores porcentagens de erro relativo em condições de iluminação ambiente (TABELA 3), conforme previamente descrito, a variação do tipo de iluminação isoladamente não afetou significativamente o nível de erro do método, ao contrário da distância e do tipo de aplicativo. Alguns autores relatam ser desnecessário o uso de equipamentos para padronizar as condições de iluminação utilizadas durante a aquisição de dados de imagem, desde que realizada apropriada correção de fundo e que a medição não seja realizada sob incidência de luz solar direta (NELIS et al., 2020; HONG; CHANG, 2014). Porém, Fan e colaboradores (2021) ressaltam que, idealmente, o analito e padrões devem ser fotografados sempre sob as mesmas condições de iluminação, o que foi feito neste experimento. Dessa forma, diante dos cuidados para padronização das condições analíticas que foram observados durante a condução deste experimento, era esperado que a variação de condições de iluminação não afetasse significativamente o resultado produzido pela análise.

No Gráfico 2 observa-se que, em média, ao passar a distância de 15 para 25 cm, o erro relativo diminuiu 22%. Cabe enfatizar que, operacionalmente, quando se analisa a distância da amostra ao dispositivo, percebe-se uma maior dificuldade em conseguir um foco adequado

da imagem com 15 cm de distância. Por esse motivo, definiu-se por realizar as análises subsequentes com 25 cm de distância.

Conforme observado no Gráfico 2, o aplicativo também influenciou o erro do método, mas houve um efeito de interação antagônico significativo entre a distância e o aplicativo, já que ao utilizar o aplicativo Color Grab os melhores resultados foram obtidos com 15 cm. Dessa forma, isso reafirma que, com uma distância de 25 cm entre a câmera e a amostra usando o aplicativo Pipette, a análise apresenta menores erros na predição do valor de esteróis.

Não são encontrados muitos relatos na literatura de comparação de resultados obtidos entre aplicativos utilizados e entre distâncias da câmera ao analito, sendo que, na maioria das vezes, as publicações sobre o tema apenas relatam a padronização de ambas as condições.

#### **4.4 Pré-tratamento do sinal analítico**

É relatado que algumas transformações aplicadas aos valores de RGB podem melhorar a qualidade de modelos preditivos, uma vez que tais transformações são capazes de corrigir desvios causados por variações nas condições analíticas, como, por exemplo, variações decorrentes de iluminação (HONG; CHANG, 2014; KUNTZLEMAN; JACOBSON, 2016).

Em uma das transformações mais comuns, os valores de RGB originais são convertidos em valores equivalentes à absorbância com base nos valores RGB da imagem de um branco (Equação 1). Ao avaliar o valor de absorbância considera-se o sinal da intensidade de luz incidente que passa pela cubeta com a amostra e o sinal da intensidade de luz incidente que passa pela cubeta com branco (sem amostra). Assim, temos o valor de intensidade de luz que realmente é absorvida pela cor produzida pela amostra (KUNTZLEMAN; JACOBSON, 2016).

Outro tipo de transformação (HONG; CHANG, 2014) reescala os valores de RGB originais com base em valores RGB da imagem de uma referência branca e uma preta (Equação 2). Essas duas transformações foram aplicadas aos valores de RGB para construção das curvas analíticas, cujos valores de  $R^2$  e soma de quadrados dos resíduos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros estatísticos obtidos de 3 curvas analíticas na determinação de esteróis por espectrofotometria UV-Vis ( $A_{625\text{nm}}$ ) e por imagens digitais com e sem estratégias de transformação dos sinais analíticos.

	$R^2$	Soma dos Quadrados dos Resíduos
$A_{625\text{nm}}$	0,99	249
R	0,67	11853
G	0,89	2933
B	0,90	3595
$A_R$	0,34	57125
$A_G$	0,95	1092
$A_B$	0,96	300
$R_{\text{corr}}$	0,67	11853
$G_{\text{corr}}$	0,89	8510
$B_{\text{corr}}$	0,90	2635

Fonte: Da autora (2021).

A transformação das componentes RGB baseada no cálculo de absorvância promoveu melhorias nas curvas analíticas obtidas pelos componentes G e B, as quais apresentaram maiores valores de  $R^2$  e menores resíduos ao usar as variáveis transformadas. Já a transformação baseada no reescalamento usando referências de preto e branco não convergiu em melhorias de ajuste das curvas analíticas.

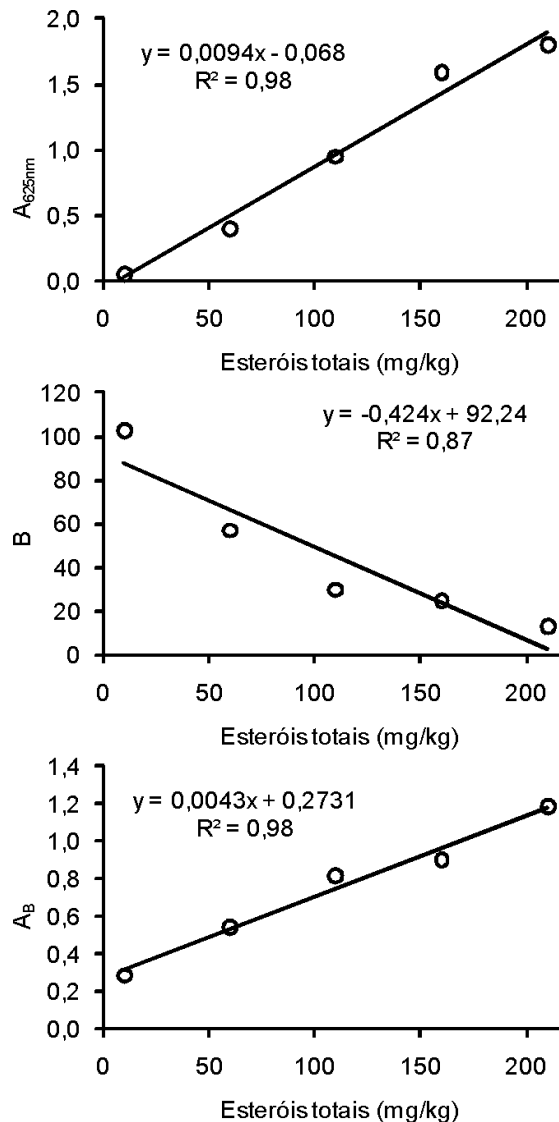
Especialmente a curva obtida a partir de B teve uma melhoria considerável, elevando o valor de  $R^2$  de 0,90 para 0,96, o que é mais próximo ao  $R^2$  de 0,99 obtido por espectrofotometria. Além disso, houve uma considerável diminuição na soma dos quadrados dos resíduos, passando de 3595 para 300, um valor próximo a 249 obtido para a curva do método espectrofotométrico. Este efeito pode ser observado no Gráfico 3, que mostra as curvas analíticas, as equações da reta e os valores de  $R^2$  obtidos para uma das três repetições das curvas analíticas.

Embora os autores que propuseram a utilização da Equação 1 como forma de transformação do componente de cor não tenham demonstrado a comparação de uma abordagem com transformação com outra sem transformação, Paristiowaki e colaboradores (2021) utilizaram a transformação proposta e obtiveram uma melhora no coeficiente de determinação de um método para determinação de nitrito em soluções padrão, passando de 0,9037, considerando o valor de G, para 0,9882, considerando a absorvância de G calculada conforme a equação 1, mostrando o efeito positivo da transformação aplicada na linearidade do método. Já a transformação de cor proposta por HONG e CHANG (2014), na equação 2, foi utilizada pelos autores para padronizar os resultados de imagens obtidas de tiras de análise rápida de urina mesmo em condições de iluminação diferentes (luz interna fluorescente, luz



solar externa e luz interna de baixa intensidade). Após a aplicação da equação, os sinais analíticos obtidos produziram resultados de cor muito similares, tendo sido eficiente para o propósito aplicado. Isso pode indicar que o método não foi eficaz para a análise realizada devido à influência da iluminação não ter sido significativa nos resultados produzidos, conforme apresentado anteriormente no gráfico 2.

Gráfico 3 – Exemplo de curvas analíticas para determinação de esteróis baseadas na absorbância a 625nm, no valor de B e no valor de absorbância de B ( $A_B$ ).



Fonte: Da autora (2021).

Tendo em vista os fatos apresentados, a transformação das componentes de cor RGB, sobretudo a B, para gerar valor equivalente à absorbância ( $A_B$ ), produziu modelo com melhor qualidade quando comparado ao modelo sem a transformação, com qualidade equivalente ao obtido pelo método espectrofotométrico. Logo, este foi o melhor sinal analítico encontrado

para a determinação de esteróis totais em óleos vegetais usando Colorimetria por Imagem Digital.

## 4.5 Figuras de mérito para validação

### 4.5.1 Linearidade

Alguns parâmetros relacionados à linearidade foram previamente apresentados na Tabela 4 e Gráfico 2, tais como o  $R^2$  e a soma de quadrados dos resíduos, os quais indicaram que o método proposto (usando  $A_B$  como resposta analítica) teve linearidade equivalente à do método espectrofotométrico. Adicionalmente, a análise de variância da curva analítica com cinco níveis de concentração e 3 repetições por nível foi realizada para os sinais analíticos obtidos na condição ótima do método proposto e também do método de referência (espectrofotométrico). Os parâmetros da análise de variância das curvas analíticas de ambos os métodos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros estatísticos da regressão linear das concentrações de esterol em soluções padrão contra os respectivos valores de  $A_B$  ou  $A_{625nm}$ .

	$A_B$	$A_{625nm}$
$R^2$	0.96	0.99
$R^2$ ajustado	0.95	0.98
Erro padrão	17.42	10.78
F	87.51	221.96
p	0.003	0.001

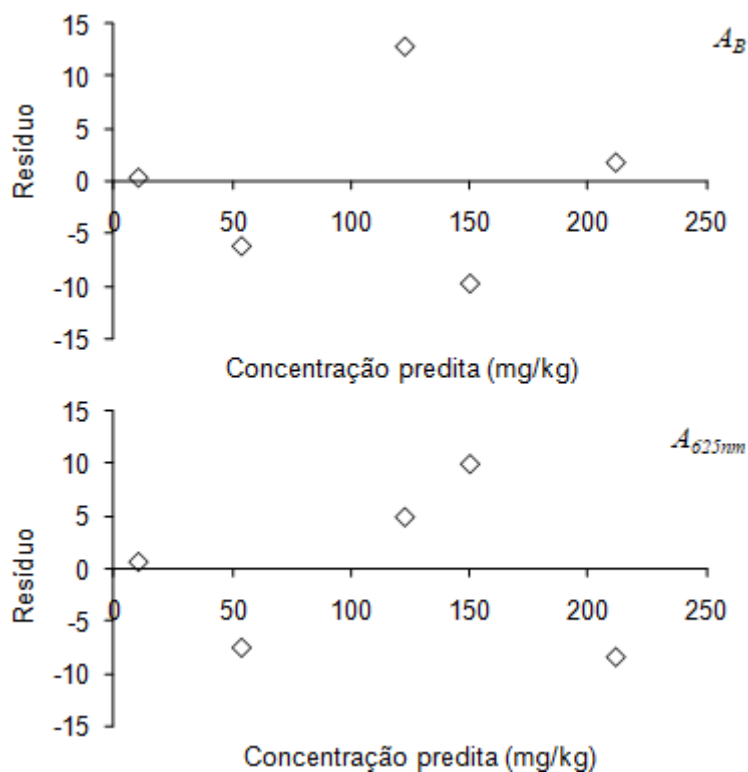
Fonte: Da autora (2021).

Observa-se na Tabela 5 que o valor do coeficiente de determinação para a metodologia testada foi aceitável, já que se encontra próximo a 1, valor em que o modelo da regressão explica apropriadamente a variabilidade dos dados de resposta (CHICCO; WARRENS; JURMAN, 2021) e próximo àquele obtido para a metodologia padrão utilizada (espectrofotometria UV-Vis). O erro padrão encontrado para ambos os métodos também foi considerado próximo. Além disso, ambas as regressões foram significativas ( $p < 0,05$ ) e o  $R^2$  ajustado diferiu do  $R^2$  em apenas 0,01.

No gráfico 4 é possível observar que os resíduos não demonstraram seguir um padrão, ou seja, não indicaram um outro tipo de relação entre a concentração predita e o resíduo

obtido, ou ainda, alguma dependência entre os resíduos.

Gráfico 4 - Resíduos da regressão linear das concentrações de esterol em soluções padrão contra os respectivos valores de  $A_B$  ou  $A_{625nm}$ .



Fonte: Da autora (2021).

#### 4.5.2 Exatidão e Precisão

Os ensaios de validação realizados no mesmo dia ( $n=6$ ) em dias distintos ( $n=9$ ), para avaliar a precisão e a exatidão do método proposto, produziram resultados de recuperação aparente entre 95,1 e 107,9%, precisão em termos de repetibilidade (intraensaio) entre 7,3 e 18,8%, precisão intermediária (interensaio) entre 6,4 e 25,2% e veracidade, termos de erro relativo, entre -8,4 e 25,8% (TABELA 6).

Tabela 6 - Resultados de precisão e exatidão obtidos dos ensaios realizados no mesmo dia e em dias distintos pelo método colorimétrico baseado em imagens digitais em soluções padrão de colesterol em clorofórmio.

Resultados Intraensaios				
Conc. Nominal (mg L <sup>-1</sup> )	Conc. Medida (mg L <sup>-1</sup> )	Precisão		Exatidão
		Desvio padrão relativo (%)	Erro relativo (%)	Recuperação aparente (%)
10	10,8	18,8	+7,9	107,9
110	117,0	7,3	+6,3	106,3
210	192,4	14,0	-8,4	91,6

Resultados Interensaios				
Conc. Nominal (mg L <sup>-1</sup> )	Conc. Medida (mg L <sup>-1</sup> )	Precisão		Exatidão
		Desvio padrão relativo (%)	Erro relativo (%)	Recuperação aparente (%)
10	12,6	25,2	+25,8	125,8
110	115,9	6,4	+5,3	105,3
210	199,6	10,1	-4,9	95,1

Fonte: Da autora (2021).

Critérios de aceitação para recuperação e também para o desvio padrão relativo (DPR), obtido sob condições de repetibilidade e de precisão intermediária podem ser estabelecidos pelos laboratórios para os métodos analíticos empregados na rotina, seguindo as orientações normativas da legislação aplicável às áreas de atividades (INMETRO, 2020). No que se refere aos métodos analíticos que empregam dispositivos móveis para obtenção de imagens digitais com perfil RGB, não foi encontrada legislação com tais critérios estabelecidos. Entretanto, a AOAC, através do *Peer Verified Program*, propõe seus próprios níveis de aceitabilidade, em função do nível de concentração do analito (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004). Ao nível de partes por milhão, a precisão aceitável em termos de repetibilidade e de precisão intermediária deve ter DPR entre 5,3 e 11% e a recuperação aparente,  $\geq 80\%$  e  $\leq 110\%$  (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004; BIOPHARMACEUTICS, 2018). Pela orientação do INMETRO (2020) sobre validação de métodos analíticos, que aplicam as últimas edições da EURACHEM e AOAC, aceitam como

critério a faixa de DPR de 5 a 11% para os ensaios de repetibilidade, e de 8 a 16% para a precisão intermediária. Portanto, os resultados obtidos dos ensaios de precisão e exatidão estão de acordo com parte dos critérios supracitados e também com os critérios de aceitação, geralmente recomendados para métodos analíticos instrumentais, como os cromatográficos, em que a precisão aceitável deve ser  $\leq 15\%$ , exceto no LOQ (20%) e recuperação aparente  $\geq 85\%$  e  $\leq 115\%$ , exceto no LOQ ( $\geq 80\%$  e  $\leq 120\%$ ) (BIOPHARMACEUTICS, 2018). Entretanto, pode-se observar na Tabela 6 que, para os experimentos interensaios (precisão intermediária), os valores obtidos no menor nível de concentração ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) extrapolaram os critérios supramencionados. É natural que maiores variações sejam, geralmente, obtidas em menores concentrações do analito na amostra (TAVERNIERS; DE LOOSE; BOCKSTAELE, 2004). Entretanto, acredita-se que a padronização das condições de iluminação e a instabilidade da reação colorimétrica de Liebermann-Burchard, os principais fatores que influenciam na precisão e exatidão do método, tenham efeito mais acentuado na determinação de baixas concentrações do analito quando comparado aos maiores níveis de concentração nesse tipo de análise quantitativa.

Recuperações de amostras brancas enriquecidas ou de soluções padrão, conforme avaliado nos primeiros ensaios de validação, geralmente oferecem resultados melhores do que aqueles obtidos das análises de amostras de rotina em que o analito está mais fortemente ligado à matriz (EURACHEM, 2014). Levando isso em consideração, uma comparação de métodos incluindo a análise de 5 amostras de óleos foi realizada, cujos resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7. O erro absoluto e o erro relativo, bem como a exatidão do método proposto, foram calculados para os teores de esteróis totais determinados pelo método baseado em imagens digitais tendo o método espectrofotométrico como referência.

Tabela 7 - Precisão e exatidão avaliadas na determinação do teor de esteróis totais em óleos vegetais (n=6) pelo método de imagens digitais, previamente otimizado, em relação ao método espectrofotométrico.

Óleo	Erro absoluto (mg/kg)	Erro relativo (%)	Exatidão (%)
Abacate Hass	19,1	1,8	98,2
Abacate Breda	12,8	1,1	98,9
Macaúba	17,3	5,2	105,2
Oliva	27,9	19,9	119,9
Jerivá	0,4	0,2	99,8

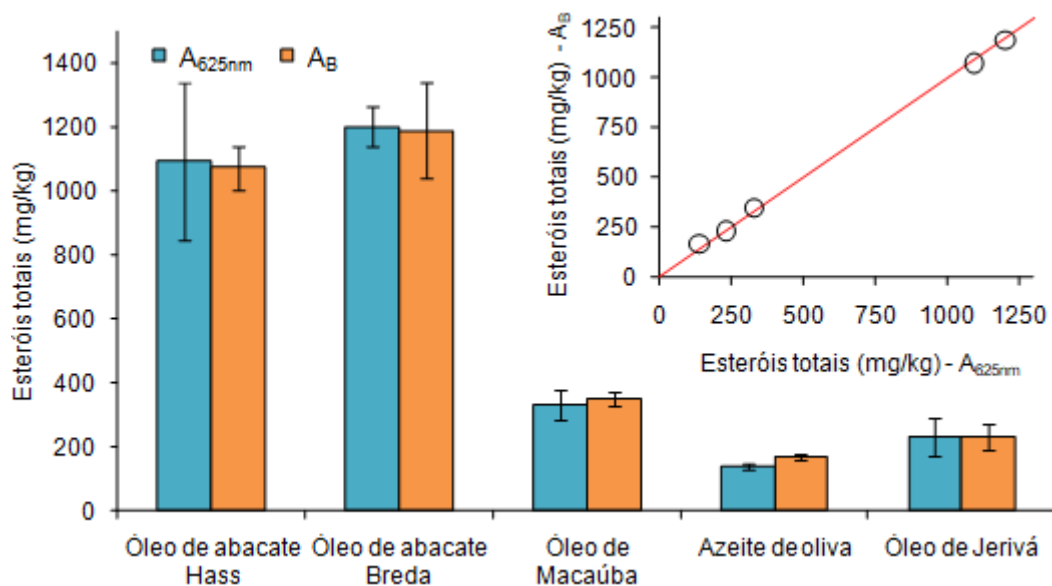
Fonte: Da autora (2021).

A exatidão do método proposto, em termos de recuperação variou entre 98,2 e 119,9%

para todas as amostras analisadas, ou seja, atendeu os critérios estabelecidos pela EURACHEM (2014). As amostras que apresentaram melhor exatidão na sua determinação, valores próximos de 100%, também apresentaram menores valores de erro relativo. Além disso, obteve-se erro absoluto médio, erro relativo médio e recuperação média para os cinco óleos analisados de 15,5 mg/kg, 5,6% e 104,4% respectivamente. Vucane e colaboradores (2020) também obtiveram valores de exatidão próximos a 100% para a metodologia de análise da atividade antioxidante de óleos vegetais pelo método DPPH baseada em Colorimetria por Imagem Digital.

As médias dos teores de esteróis totais determinados em amostras de cinco óleos vegetais pelo método baseado em imagens digitais e por espectrofotometria foram comparadas, conforme apresentado no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Médias (n=6) dos teores de esteróis totais em amostras de óleos vegetais determinados pelo método baseado em imagens digitais e por espectrofotometria. As barras representam desvio padrão.



Fonte: Da autora (2021).

Os teores de esteróis totais obtidos com o método proposto foram próximos daqueles obtidos com o método espectrofotométrico. Através do Teste-t com 95% de confiança, confirmou-se que não houve diferença significativa entre os valores determinados por espectrofotometria e usando Colorimetria por Imagem Digital.

Vucane e colaboradores (2020) utilizaram valores de RG obtidos no aplicativo Color Picker para análise da atividade antioxidante de óleos vegetais por DPPH e não observaram diferença estatística com 95% de confiança entre a metodologia usando a Colorimetria por

Imagem Digital e o método espectrofotométrico. Peamaroon, Jakmune e Moonrungee (2021) também não verificaram diferença significativa entre um método baseado no valor de B (de RGB) e o método titulométrico para determinação do índice de iodo. Assim, é possível verificar que o uso de smartphones são promissores para análises colorimétricas de óleos vegetais, reduzindo custos e tornando as análises de mais fácil acesso aos produtores.

Conforme previamente mencionado, a precisão também foi estimada como desvio padrão relativo (DPR) dos dados obtidos das análises em replicatas de cinco amostras de óleos vegetais (TABELA 8). Nesta abordagem, os valores de desvio padrão relativo obtidos para as análises dos óleos vegetais, com exceção do Abacate Hass e Jerivá, usando o método baseado em imagens digitais foram inferiores ao maior desvio padrão relativo obtido nos ensaios de precisão que empregaram soluções padrão (TABELA 6), estando, portanto, de acordo com a estimativa de precisão previamente avaliada.

Peamaroon, Jakmune e Moonrungee (2021) obtiveram desvios padrão relativos entre 3.1 e 10.7% na determinação do índice de iodo em óleos vegetais usando um método baseado no valor de B (de RGB). Já Vucane e colaboradores (2020) obtiveram desvio padrão relativo de 0,1% para a metodologia de análise de atividade antioxidante de óleos vegetais utilizando-se espectrofotometria UV-Vis e entre 0,6 a 0,7% para o método baseado em Colorimetria por Imagem Digital. Os valores de desvio padrão relativo encontrados na metodologia aplicada neste trabalho são maiores que os encontrados pelos autores citados acima, o que pode ser justificado pelas dificuldades em produzir a reação colorimétrica de Liebermann-Burchard, que envolve banho de gelo, tempo de reação controlada e reagentes de alta volatilidade.

Tabela 8 - Média (n=6), desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) obtidos na determinação do teor de esteróis totais em amostras de óleos vegetais determinados pelo método por imagens digitais e por espectrofotometria UV-Vis.

Óleo	$A_{625nm}$			$A_B$		
	Esteróis totais (mg/kg)	DP	DPR	Esteróis totais (mg/kg)	DP	DPR
Abacate Hass	1093.3	244.7#	22.4	1074.2	68.9#	6.4
Abacate Breda	1202.6	63.6#	5.3	1189.8	152.1#	12.8
Macaúba	332.5	47.9#	14.4	349.8	19.9#	5.7
Oliva	140.1	10.1*	7.2	168.0	10.7*	6.4
Jerivá	232.7	57.9*	24.9	232.3	40.0*	17.2

# variâncias não equivalentes segundo Teste-F com 95% de confiança.

\* variâncias equivalentes segundo Teste-F com 95% de confiança.

Fonte: Da autora (2021).

Não houve diferença significativa entre as variâncias dos teores de esteróis totais determinados pelos dois métodos quando comparadas pelo Teste-F a 95% de confiança para as amostras de azeite de oliva e óleo de jervá, as quais têm teores mais baixos de esteróis. Para as amostras de azeites de abacate e óleo de macaúba, houve diferença significativa. Nesses casos, apenas para o azeite de Abacate Breda, amostra com maior teor de esteróis totais, os desvios padrão e desvios padrão relativos são maiores usando imagens digitais com modelo baseado em  $A_B$ , quando comparado ao método espectrofotométrico. Isso sugere uma tendência do método baseado em Colorimetria por Imagem Digital ser mais preciso ou tão preciso quando o método espectrofotométrico em determinações envolvendo teores de esteróis mais baixos.

#### 4.5.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção estimado para o método baseado em imagens digitais foi de  $6,49 \text{ mg L}^{-1}$  e pode ser considerado aceitável com base no teor de esteróis determinados nas amostras analisadas. O limite de quantificação estimado de  $34,82 \text{ mg L}^{-1}$  foi superior ao primeiro nível de concentração das curvas analíticas construídas nesse estudo ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Entretanto, esse nível de concentração apresentou precisão e exatidão adequados nos ensaios de repetibilidade. Além disso, é importante ressaltar que os limites estimados foram inferiores aos teores de esteróis totais encontrados em todos os óleos vegetais analisados nesse estudo. Dessa forma, embora não seja recomendado para a análise de óleos com quantidades muito baixas de esteróis em sua composição, considerados os limites de detecção e de quantificação, o método utilizado é considerado promissor para a análise de esteróis em óleos vegetais, visto que o método proposto não se aplica à análise de rotina de esteróis à nível de traço em amostras de óleos.

Cabe enfatizar que artigos de revisão recentes sobre a utilização de smartphones para análises químicas e análises de alimentos mostraram um número muito baixo de publicações com evidências de validação dos métodos utilizados (FAN et al, 2021; NELIS et al., 2020). Nelis e colaboradores (2020) constataram que de 56 artigos por eles citados apenas dois incluíram todos os parâmetros-chave para a validação da performance analítica, o que pode estar relacionado com a dificuldade de padronização das condições analíticas.

Embora a robustez não tenha sido avaliada como uma figura de mérito neste estudo, mas considerando que mudanças podem ocorrer durante o desenvolvimento e a aplicação de um método na rotina, os ensaios de validação do método foram realizados em condições que poderiam influenciar a resposta analítica. Diante disso, variações como uso de solvente de



lotes distintos, realização de experimentos em diferentes dias e preparação de novas soluções padrão estoque, como também de soluções de calibração, foram algumas das condições analíticas que variaram e serviram para avaliar o comportamento do método em condições reais de laboratório. Assim, os resultados dos ensaios de validação mostraram evidências de que o método desenvolvido atende aos critérios de desempenho exigidos e pode ser considerado robusto.

## 5 CONCLUSÃO

A determinação colorimétrica do teor de esteróis totais em óleos vegetais utilizando Colorimetria por Imagem Digital usando smartphone mostrou-se viável. Os resultados obtidos para amostras reais por meio deste método não se diferiram estatisticamente daqueles obtidos pelo método espectrofotométrico.

As condições de iluminação não afetaram significativamente os resultados produzidos pelas análises, uma vez que a curva analítica é construída nas mesmas condições em que as amostras são analisadas. Já o aplicativo e a distância entre a câmera e a solução de análise afetaram os resultados produzidos. Os melhores resultados obtidos ao usar o aplicativo Pipette sugerem que aplicativos com maior área de captura da cor na região de interesse devem produzir respostas analíticas com interferências minimizadas. Usar uma distância adequada entre a câmera e o recipiente com a amostra, de modo a garantir o ajuste de foco, também se mostrou fundamental. Portanto, é indispensável padronizar dispositivo, aplicativo e distância de captura das imagens digitais, a fim de minimizar os erros de análise.

Os resultados obtidos pelos ensaios realizados mostraram que o mesmo tem potencial para ser implementado em análises de rotina, levando a resultados com exatidão e precisão adequados.

A reação de Lieberman-Burchard usada neste trabalho é uma reação que requer atenção e execução minuciosa por parte do analista, visto que pequenos descuidos e imprecisões procedimentais podem prejudicar significativamente os resultados obtidos. Apesar disso, este trabalho mostrou que é possível usar imagens digitais obtidas com smartphone para análise colorimétrica de esteróis, dispensando o uso de um espectrofotômetro.

## REFERÊNCIAS

- ADMASSIE, Z. G.; EMAN, J. A.; ENDALEW, S. A. Determination of cholesterol and fatty acid content of commercially sold edible vegetable oils around Dire Dawa, Adama and Addis Ababa, Ethiopia. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v. 10, n. 2, p. 44-56, 2021.
- ADOBE SYSTEM. About Color. 2020. Disponível em: <https://helpx.adobe.com/in/illustrator/using/color.html>. Acesso em: 1 outubro 2020.
- ADU, J. K. et al. Validation of a Simple and Robust Liebermann–Burchard Colorimetric Method for the Assay of Cholesterol in Selected Milk Products in Ghana. **International Journal of Food Science**, Nova Iorque, v. 2019, p. 9045938, 2019.
- ALBERICI, R. M. et al. Rapid fingerprinting of sterols and related compounds in vegetable and animal oils and phytosterol enriched- margarines by transmission mode direct analysis in real time mass spectrometry. **Food Chemistry**, Berlim, v. 211, p. 661-668, 2016.
- ANDIMA, M. et al. Evaluation of  $\beta$ -Sitosterol Loaded PLGA and PEG-PLA Nanoparticles for Effective Treatment of Breast Cancer: Preparation, Physicochemical Characterization, and Antitumor Activity. **Pharmaceutics**, Londres, v. 10, n. 4, p. 232-249, 2018.
- ARAÚJO, L. B. D. C. et al. Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmacognosia**, Curitiba, v. 23, n. 5, p. 736-742, 2013.
- AZIZI, M.; GHAVAMI, A. The Effects of Refining Operations on Quality and Quantity of Sterols in Canola, Soyabean and Sunflower Seed Oils. **Journal of Food Biosciences and Technology**, Teerã, v. 10, n. 2, p. 11-18, 2020.
- BERASATEGI, I. et al. Stability of avocado oil during heating: Comparative study to olive oil. **Food chemistry**, Berlim, v. 132, n. 1, p. 439-446, 2012.
- BERGER, A.; JONES, P. J. H.; ABUMWEIS, S. S. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. **Lipids in Health and Disease**, Londres, v. 3, n. 5, p. 1-19, 2004.
- BHATNAGAR, A. S.; GOPALA KRISHNA, A. G. Natural antioxidants of the Jaffna variety of *Moringa Oleifera* seed oil of Indian origin as compared to other vegetable oils. **Grasas Y Aceites**, Sevilla, v. 64, n. 5, p. 537-545, 2013.
- BIOPHARMACEUTICS. **Bioanalytical Method Validation**: Guidance for Industry. Silver Spring: FDA, 2018.
- BOTELHO, B. G.; ASSIS, L. P. de; SENA, M. M. Development and analytical validation of a simple multivariate calibration method using digital scanner images for sunset yellow determination in soft beverages. **Food Chemistry**, Berlim, v. 159, p. 175-180, 2014.

BRASIL. Instrução Normativa MAPA (Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) nº 24, de 18 de junho de 2018. Altera o Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva, Brasília, 20 jun. 2018. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/20105945-instrucao-normativa-n-24-18-6-2018.pdf>. Acesso em 11 fev. 2022.

CALEB, J.; ALSHANA, U. Supramolecular solvent-liquid-liquid microextraction followed by smartphone digital image colorimetry for the determination of curcumin in food samples. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, Amsterdam, v. 21, p. 100424, 2021.

CAO, J. et al. Subsurface Geobody Imaging Using CMY Color Blending with Seismic Attributes. **Journal of Electrical and Computer Engineering**, v. 2016, p. 9181254, 2016.

CARREIN, G. et al. **An Introduction to Color for Medical Imaging**. In: White Paper. Barco: Courtrai, 2015. 20 p.

CARVALHO, T. C. L. de; NUNES, C. A. Smartphone-based method for the determination of chlorophyll and carotenoid contents in olive and avocado oils: An approach with calibration transfer. **Journal of Food Composition and Analysis**, São Diego, v. 104, p. 104164, 2021.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Artes Médicas Ltda, 1997. 446 p.

CHICCO, D.; WARRENS, M. J.; JURMAN, G. The coefficient of determination R-squared is more informative than SMAPE, MAE, MAPE, MSE and RMSE in regression analysis evaluation. **Peer Journal Computer Science**, San Diego, v. 7, p. e623, 2021.

CIE. **Commission Internationale de l'Éclairage Proceedings**. Cambridge: Cambridge University Press, 1931.

CLYDESDALE, F. M. Colorimetry--methodology and applications. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 10, n. 3, p. 243-301, 1978.

CONSELHO INTERNACIONAL OLEÍCOLA. Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. 2019. Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-T.15-NC.-No-3-Rev.-13-2019-Eng.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2022.

COUTINHO, M. S. et al. Colorimetric Determination of Ascorbic Acid Based on Its Interfering Effect in the Enzymatic Analysis of Glucose: An Approach Using Smartphone Image Analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 28, n. 12, p. 2500-2505, 2017.

DAKSHA, A. et al. Estimation of sterols content in edible oil and ghee samples. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Bangalore, v. 5, n. 1, p. 135-137, 2010.

DHANDE, N. S.; SUSHIR, R. D. Detection and Estimation of Adulteration in Oil Sample Using Digital Image Processing. **International Journal of Scientific Research in Science and Technology**, Gujarat, v. 4, n. 2, p. 244-250, 2018.

EUROCHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2 ed. Teddington: Eurochem, 2014.

FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, Rockville, v. 46, p. 839-861, 2005.

FAN, Y. et al. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171, p. 108829, 2021.

FIRDAUS, M. F. et al. Determination of Chromium and Iron using digital image-based colorimetry. **Procedia Environmental Sciences**, Amsterdam, v. 20, p. 298-304, 2014.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento digital de imagens**. 3ª ed. São Paulo: Pearson, 2010. 624 p.

GRAMPONE, M. A. Propriedades dos óleos vegetais modificados por hidrogenação, interesterificação e fracionamento. **Óleos & Grãos**, v. 15, p. 5-9, 1993.

HAKONEN, A.; BEVES, J. E. Hue parameter fluorescence identification of edible oils with a smartphone. **ACS Sensors**, Washington, v. 3, n. 10, p. 2061-2065, 2018.

HAN, J. H.; YANG, Y. X.; FENG, M. Y. Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. **Biomedical and Environmental Sciences**, Beijing, v. 21, n. 6, p. 449-453, 2008.

HELPER, G. A. et al. PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 328-335, 2017.

HERCHI, W. et al. Influence of harvest year in the physicochemical properties and antioxidant activity of flaxseed hull oils from Tunisia. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 35, n. 1, p. 175-182, 2015.

HONG, J. I.; CHANG, B. Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analytesensing arrays. **Lab on a Chip**, Cambridge, v. 14, p. 1725-1732. 2014.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008**. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev. 9. Brasília, 2020. Disponível em:

<https://app.sogi.com.br/Manager/texto/arquivo/exibir/arquivo?eyJ0eXAiOiJKV1QiLCJhbGciOiJIUzI1NiJ9AFFIjAvMTM4ODM3NS9TR19SZXF1aXNpdG9fTG9nYWxfVG94dG8vMC8wL0RPU1DZ2NyZS04XzA5LnBkZi8wLzAiAFFBcMYdNmecpDn0m0Dj4vzJmVtMjZMAYtW6mtkIi0C7fk>. Acesso em: 1 out. 2021.

JIA, M. et al. The calibration of cellphone camera-based colorimetric sensor array and its application in the determination of glucose in urine. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 74, p. 1029-1037, 2015.

JORGE, N. **Química e tecnologia de óleos vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2009. 165p.

JORGE, N. **Matérias graxas alimentícias**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2010. 139 p.

KEHOE, E.; PENN, R. L. Introducing colorimetric analysis with camera phones and digital cameras: an activity for high school or general chemistry. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 90, p. 1191-1195, 2013.

KOESDJOJO, M. T. et al. Cost Effective Paper-Based Colorimetric Microfluidic Devices and Mobile Phone Camera Readers for the Classroom. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 92, n. 4, p. 737–741, 2015.

KUNTZLEMAN, T. S.; JACOBSON, E. C. Teaching Beer's Law and Absorption Spectrophotometry with a Smart Phone: A Substantially Simplified Protocol. **Journal of chemical education**, Easton, v. 93, n. 7, p. 1249–1252, 2016.

LEÃO, A. C.; SOUZA, L. A. C.; ARAÚJO, A. A. Gerenciamento de cores – ferramenta fundamental para a documentação de bens culturais. **Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação**, Olinda, v. 1, n. 4, p. 215-220, 2006.

LIPPY, P. Atherosclerosis. *In*: FAUCI, A. S.; BRAUNWALD, E. (Eds.). **Harrison's Principle of Internal Medicine**. 14. ed. New York: MC Graw-Hill, 1998. p. 25-35.

MAI, H. H.; LE, T. T. Testing edible oil authenticity by using smartphone based spectrometer. **Computer Optics**, Samara, v. 44, n. 2, p. 189-194, 2020.

MARTINKOVA, P.; POHANKA, M. Colorimetric sensor based on bubble wrap and camera phone for glucose determination. **Journal of Applied Biomedicine**, Breslávia, v. 14, n. 4, p. 315-319, 2016.

MASAWAT, P. et al. Green Determination of Total Iron in Water by Digital Image Colorimetry. **Analytical Letters**, Filadélfia, v. 50, n. 1, p. 173-185, 2016.

MATHAWEESANSURN, A.; MANEERAT, N.; CHOENGCHAN, N. A mobile phone-based analyzer for quantitative determination of urinary albumin using self-calibration approach, **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausana, v. 242, p. 476-483, 2017.

MATHWORKS. Reduce the Number of Colors in an Image. 2021. Disponível em: <https://www.mathworks.com/help/images/reduce-the-number-of-colors-in-an-image.html>. Acesso em: 1 setembro 2021.

MENDOZA, F.; DEJMEKB, P.; AGUILERA, J.M. Calibrated color measurements of agricultural foods using image analysis. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.41, p. 285-295, 2006.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); **Manual de Garantia da Qualidade Analítica**: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos. Brasília: MAPA/ACS, 2015. 51p.

- MOGHADDAM, R. F. et al. A maximal-information color to Gray conversion method for document images: Toward an optimal grayscale representation for document image binarization. **Computer Science/ArXiv**, Londres, abs/1306.6058, p. 1-36, 2013.
- NELIS, J. L.D. et al. Smartphone-based optical assays in the food safety field. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdã, v. 129, p. 115934, 2020.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 11, p. 2003-2010, 2012.
- OHNO, Y. CIE fundamentals for color measurements, NIP & Digital Fabrication Conference, *In: International Conference on Digital Printing Technologies*, 2000, São Diego. **Proceedings** [...]. São Diego: NIP & Digital Fabrication Conference, 2000, p. 540-545.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Codex Alimentarius**: Standard for olive oils and olive pomace oils. CXC 33-1981. 2001.
- PARISTIOWATI, M. et al. RGB-Color Meter on smartphones as a simple spectrophotometer: An alternative method of teaching spectrophotometry at the vocational high school of chemical analysts. **Journal of Physics: Conference Series**, Bristol, v. 1869, p. 012064, 2021.
- PEAMAROON, N.; JAKMUNEE, J.; MOONRUNGSEE, N. A Simple Colorimetric Procedure for the Determination of Iodine Value of Vegetable Oils Using a Smartphone Camera. **Journal of analysis and testing**, Cingapura, v. 5, p. 379-386, 2021.
- PHADUNGCHAROEN, N. et al. Ion pair extraction coupled with digital image colorimetry as a rapid and green platform for pharmaceutical analysis: An example of chlorpromazine hydrochloride tablet assay. **Talanta**, Amsterdam, v. 219, p. 121271, 2020.
- PIIRONEN, V. et al. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 80, p. 939-966, 2000.
- POYNTON, C. A. A Guided Tour of Colour Space. *In: New Foundation for Video Technology: The SMPTE Advanced Television and Electronic Imaging Conference*, 1995, São Francisco. **Proceedings** [...]. São Francisco: IEEE, 1995, p. 167-180.
- REDONDO-CUEVAS, L. et al. Revealing the relationship between vegetable oil composition and oxidative stability: a multifactorial approach. **Journal of Food Composition and Analysis**, São Diego, v. 66, p. 221-229, 2018.
- RIBEIRO, M.; GOMES, A. Adaptação de Cor para Dicromatas na Visualização de Imagens. *In: 20º Encontro Português de Computação Gráfica - EPCG*, 2012, Viana do Castelo. **Atas** [...]. Viana do Castelo: Instituto Politécnico, 2012, p. 99-102.
- SABIR, S. M.; HAYAT, I.; GARDEZI, S. D. A. Estimation os sterols in edible fats and oils. **Pakistan Journal of Nutrition**, Façalabade, v. 2, n. 3, p. 178-181, 2003.

- SHU, J. et al. Statistical colour models: an automated digital image analysis method for quantification of histological biomarkers. **BioMedical Engineering OnLine**, Londres, v. 15, p. 46, 2016.
- SOROURADDIN, M. H.; SAADATI, M.; MIRABI, F. Simultaneous determination of some common food dyes in commercial products by digital image analysis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 447-452, 2015.
- SOULEYMANE, Z. et al. Physicochemical quality of artisanal oils produced in Ouagadougou: case of four small companies of cottonseed oils and crude groundnut oils taken in the markets. **Journal of Advances in Biotechnology**, Amritsar, v. 6, n. 2, p. 890-900, 2016.
- SOUZA, F. R. de et al. Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 7, p. 1171-1176, 2014.
- SURAL, S.; QIAN, G.; PRAMANIK, S. Segmentation and histogram generation using the HSV color space for image retrieval. *In*: International Conference on Image Processing IEEE/ICIP, 2002, Nova Iorque. **Proceedings** [...]. Nova Iorque: IEEE, 2002, p. 589-592.
- TAVAKOLI, J.; KHODAPARAST, M. H. H. Chemical properties of the oil from *Pistacia khinjuk* fruits growing wild in Iran. **Chemistry of Natural Compounds**, Nova Iorque, v. 49, n.3, p. 546-550, 2013.
- TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 535-552, 2004.
- VUCANE, S. et al. Smartphone-Based Colorimetric Determination of DPPH Free Radical Scavenging Activity in Vegetable Oil. *In*: 26th Annual International Scientific Conference "Research for Rural Development 2020", 2020, Jelgava. **Proceedings** [...]. Jelgava: Latvia University, v. 35, p. 106-111, 2020.
- WONG, J. X. H.; LIU, F. S. F.; YU, H. Z. Mobile app-based quantitative scanometric analysis. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 24, p. 11966-11971, 2014.
- WONGNIRAMAİKUL, W.; LIMSAKUL, W.; CHOODUM, A. A biodegradable colorimetric film for rapid low-cost field determination of formaldehyde contamination by digital image colorimetry. **Food Chemistry**, Berlim, v. 249, p. 154-161, 2018.
- WROLSTAD R. E.; SMITH D. E. Color Analysis. *In*: NIELSEN, S. (org.) **Food Analysis**. 5. ed. Basingstoke: Springer, 2017. p. 545-555.
- YAM, K. L.; PAPADAKIS, S. E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, Londres, v. 61, p. 137-142, 2004.



YETISEN, A. K. et al. A smartphone algorithm with inter-phone repeatability for the analysis of colorimetric tests. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausana, v. 196, p. 156-160, 2014.

ZAMORA-GARCIA, I. et al. Mobile digital colorimetry for the determination of ammonia in aquaculture applications. **Computers and Electronics in Agriculture**, Amsterdam, v. 181, p. 105960, 2021.