

INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ – *Campus* IRATI
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

JOÃO VÍTOR SZWARC

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
BETACAROTENO E LICOPENO EMPREGANDO IMAGENS DIGITAIS E
APLICATIVO DE *SMARTPHONE***

IRATI

2024

JOÃO VÍTOR SZWARC

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
BETACAROTENO E LICOPENO EMPREGANDO IMAGENS DIGITAIS E
APLICATIVO DE *SMARTPHONE***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Licenciatura em
Química do Instituto Federal do Paraná,
Campus Irati.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Giselle Nathaly
Calaça da Trindade
Coorientadora: Dr.^a Sandra Stets

**IRATI
2024**

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOÃO VÍTOR SZWARC

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
BETACAROTENO E LICOPENO EMPREGANDO IMAGENS DIGITAIS E
APLICATIVO DE *SMARTPHONE*

Trabalho aprovado como requisito parcial
para obtenção do grau de Licenciado em
Química, ao Curso Superior de
Licenciatura em Química, do Instituto
Federal do Paraná, avaliado pela seguinte
banca examinadora:

Giselle Nathaly Calaça da Trindade

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Giselle Nathaly Calaça da Trindade
Instituto Federal do Paraná – Campus Irati

stets

Prof.^a Dr.^a Sandra Stets
Universidade Estadual de Ponta Grossa

FF

Prof. Dr. Felipe Dornelles Silva
Instituto Federal Farroupilha - Campus Frederico Westphalen

Irati, 01 de março de 2024.

RESUMO

O presente trabalho propõe o uso de *smartphones* e do aplicativo PhotoMetrix PRO® para análise colorimétrica dos carotenoides: betacaroteno e licopeno. Imagens digitais são adquiridas e analisadas em relação aos parâmetros de cor RGB, correlacionando diretamente com a concentração dos antioxidantes. Um mini estúdio em MDF, com suporte específico para o *smartphone*, foi projetado e construído para garantir a reprodutibilidade das medidas. Após testes de solubilidade, todas as medidas foram realizadas em DMSO. As análises espectroscópicas indicaram máximas de absorção em 468 nm para o betacaroteno e 487 nm para o licopeno. Curvas analíticas foram obtidas na faixa de concentração de 3,43 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 82,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o betacaroteno, e de 36,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 876,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o licopeno, empregando-se ambos os métodos. Para o betacaroteno obteve-se baixos erros relativos, variando de 1,36 a 5,22% para o método espectrofotométrico, e 0,35% a 4,40% para o método alternativo. Para o licopeno, os erros variam de 1,5 a 4,0% para o método espectrofotométrico, e de 0,1 a 2,9% para o método não convencional. Os valores de desvios padrão relativo, por sua vez, foram inferiores a 5% para ambos os analitos. Os resultados sugerem a viabilidade do método para a quantificação individual desses carotenoides em amostras reais, embora a separação dos analitos para uma quantificação simultânea não tenha sido alcançada.

Palavras-chave: Carotenoides, Colorimetria, PhotoMetrix PRO®, Espectrofotometria.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Fórmula estrutural do betacaroteno. | 11 |
| Figura 2: Fórmula estrutural do licopeno. | 12 |
| Figura 3: Etapas de funcionamento espectrofotômetro. | 13 |
| Figura 4: A) Interface gráfica principal do aplicativo PhotoMetrix PRO® com as opções de análise, B) Interface de configuração. | 15 |
| Figura 5: A) Interface do módulo de Análise Univariada. B) Interface de calibração. C) Interface de opções: enviar por e-mail, visualizar dados e gráficos. | 16 |
| Figura 6: A) Interface do módulo de Análise Multivariada. B) Interface do método análise de componentes Principais. C) Interface de amostragem e (D) Interface de opções: enviar por e-mail, visualizar dados e gráficos. | 17 |
| Figura 7: Modelo de cor RGB. | 19 |
| Figura 8: Imagem em escala de cinza e seu histograma. | 20 |
| Figura 9: Representação gráfica da construção de um novo conjunto de eixos por Análise de Componentes principais. | 23 |
| Figura 10: A) Soluções trabalho de licopeno (A) e betacaroteno (B) em dimetilsulfóxido, nas concentrações de $2,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. | 24 |
| Figura 11: Projeto do mini estúdio em MDF. | 26 |
| Figura 12: Imagens do mini estúdio construído. | 27 |
| Figura 13: Espectros de absorção na região do visível dos padrões de (A) Betacaroteno e (B) Licopeno em solução 50% etanólica. | 29 |
| Figura 14: Espectros de absorção na região do visível dos padrões de (A) betacaroteno e (B) licopeno em DMSO (linha vermelha) e DMSO + água destilada (linha preta). | 31 |
| Figura 15: Formas canônicas do DMSO. | 32 |
| Figura 16: Espectros de absorção na região do visível do padrão de betacaroteno ($58,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) em DMSO. | 33 |
| Figura 17: Curva analítica para quantificação de betacaroteno em 468 nm (absorbância em função da concentração de betacaroteno). | 34 |
| Figura 18: Relação da coloração e concentração das amostras de betacaroteno obtidas por meio do aplicativo PhotoMetrix PRO®. | 35 |
| Figura 19: Curva analítica para quantificação de betacaroteno obtida pelo aplicativo PhotoMetrix PRO®. | 35 |
| Figura 20: Espectros de absorção na região do visível do padrão de licopeno ($667,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) em DMSO. | 37 |
| Figura 21: Curva analítica para determinação de licopeno 487 nm (absorbância em função concentração de licopeno). | 38 |
| Figura 22: Relação da coloração e concentração das amostras de licopeno obtidas | |

| | |
|---|----|
| por meio do aplicativo PhotoMetrix PRO®. | 39 |
| Figura 23: Curva analítica para quantificação de licopeno obtida pelo aplicativo PhotoMetrix PRO®. | 39 |
| Figura 24: Espectros de absorção na região do visível dos padrões de betacaroteno (linha preta) e licopeno (linha vermelha) em DMSO. | 41 |
| Figura 25: Gráfico de <i>scores</i> da PC1 versus PC2 para a PCA criada a partir da matriz cores das amostras de licopeno e betacaroteno. | 42 |
| Figura 26: Gráfico de <i>Loadings</i> da PC1 (26,43%) de RGB, canais individuais, centrado na média. | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Concentrações de licopeno e betacaroteno nas amostras para a análise de componentes principais. | 25 |
| Tabela 2: Teste de solubilidade dos carotenoides em estudo. | 28 |
| Tabela 3: Resultados dos ensaios de recuperação de betacaroteno empregando as curvas analíticas obtidas. | 36 |
| Tabela 4: Resultados dos ensaios de recuperação de licopeno empregando as curvas analíticas obtidas. | 40 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 8 |
| 2. OBJETIVOS | 9 |
| 2.1 Objetivo geral | 9 |
| 2.2 Objetivos específicos | 9 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA | 10 |
| 3.1 Carotenoides | 10 |
| 3.1.1 Betacaroteno | 10 |
| 3.1.2 Licopeno | 11 |
| 3.2 Espectrofotometria UV-VIS | 13 |
| 3.3 Aplicativo PhotoMetrix PRO® | 14 |
| 3.3.1 Modelo RGB | 18 |
| 3.4 Quimiometria | 20 |
| 3.4.1 Análise de componentes principais - PCA | 21 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 4.1 Reagentes | 24 |
| 4.2 Soluções | 24 |
| 4.3 Análise por Espectrofotometria UV-Vis | 26 |
| 4.4 Análise por Imagens digitais e Aplicativo de smartphone | 26 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 5.1 Obtenção das imagens digitais | 27 |
| 5.2 Escolha do solvente para as análises | 27 |
| 5.3 Análise individual do betacaroteno por espectrofotometria UV-Vis | 33 |
| 5.4 Análise individual do betacaroteno pelo aplicativo PhotoMetrix PRO® | 34 |
| 5.5 Quantificação individual de betacaroteno | 36 |
| 5.6 Análise individual do licopeno por espectrofotometria UV-Vis | 37 |
| 5.7 Análise individual do licopeno pelo aplicativo PhotoMetrix PRO® | 38 |
| 5.8 Quantificação individual de licopeno | 40 |
| 5.9 Análise simultânea de betacaroteno e licopeno | 41 |
| 6. CONCLUSÃO | 44 |
| 7. REFERÊNCIAS | 45 |
| ANEXO A | 49 |

1. INTRODUÇÃO

O contínuo avanço tecnológico tem gerado uma profusão de produtos e serviços cada vez mais sofisticados, abarcando desde informática e *softwares* avançados até redes sociais e aplicativos móveis. O surgimento e a evolução dos *smartphones*, impulsionados pela constante inovação na tecnologia digital, não apenas democratizaram o acesso a esses dispositivos, mas também transformaram radicalmente sua utilidade, ultrapassando sua função original como instrumentos de comunicação. Hoje, esses dispositivos se estendem como ferramentas multifuncionais que permeiam diversas esferas da ciência, inclusive na análise química.

A literatura científica tem testemunhado o crescente emprego dos *smartphones* em áreas como análise de alimentos, biossensores e medicina, fazendo uso de diferentes modalidades de detecção, como fluorescência, quimiluminescência, colorimetria e eletroquímica. As análises químicas baseadas em dispositivos de imagem têm se destacado como alternativas eficazes e versáteis na determinação de uma ampla gama de analitos, abrangendo desde moléculas orgânicas até metais, em diversas matrizes (HELFER *et al.*, 2017; KOZAN *et al.*, 2022; PEDROSO e BOROSKI, 2022). Assim, a integração de dispositivos modernos, aliada a métodos quimiométricos, está inaugurando uma nova fase na química analítica.

Nesse contexto, o aplicativo PhotoMetrix® foi desenvolvido com o propósito de oferecer uma ferramenta de análise versátil e gratuita, aplicável a diferentes analitos e amostras, possibilitando análises tanto univariadas quanto multivariadas.

Com base nesse cenário, o presente projeto de pesquisa busca desenvolver um método colorimétrico alternativo para a quantificação de betacaroteno e licopeno, que seja simples, rápido e de baixo custo, utilizando ferramentas comuns do cotidiano, como a câmera de um celular e um aplicativo gratuito. A escolha dessas ferramentas analíticas é motivada não apenas pela autonomia em relação a equipamentos laboratoriais dispendiosos e *softwares* licenciados, mas também pela ampla disponibilidade e facilidade de uso desses dispositivos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho propôs desenvolver um método colorimétrico alternativo, simples e de baixo custo, para a determinação de betacaroteno e de licopeno empregando o aplicativo PhotoMetrix PRO®.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método colorimétrico utilizando um *smartphone* juntamente com o aplicativo de PhotoMetrix PRO® para análise dos carotenoides betacaroteno e licopeno, explorando a correlação direta da concentração com os parâmetros de cor do sistema RGB;
- Avaliar a precisão e reprodutibilidade das medidas obtidas pelo método alternativo proposto e comparar com o método espectroscópico para a quantificação de betacaroteno e licopeno;
- Investigar a viabilidade da aplicação do método alternativo para a quantificação simultânea de betacaroteno e licopeno.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Carotenoides

Carotenoide é uma família de mais de 600 compostos de pigmentos naturalmente abundantes na maioria das frutas e vegetais amarelo-alaranjados. É responsável pela maior parte da cor na natureza, como a coloração vermelha do tomate, a cor laranja amarelada do óleo de palma bruto e a cor alaranjada da cenoura (SARIP *et al.*, 2023).

Estes pigmentos naturais exibem efeitos antioxidantes, anticancerígenos e anti-inflamatórios devido às suas múltiplas ligações duplas conjugadas e insaturadas. Os carotenoides são a principal fonte de vitamina A nos corpos humanos, podendo também reduzir o risco de várias doenças devido às suas propriedades antioxidantes (JING *et al.*, 2022).

O nosso organismo não é capaz de sintetizar carotenoides, sendo estes unicamente obtidos por meio de dieta alimentar, pela ingestão de alguns alimentos, como tomate e seus derivados, e também frutas como mamão, goiaba vermelha, pitanga e melancia (MORITZ e TRAMONTE, 2006).

Alguns estudos têm demonstrado que o consumo de antioxidantes poderia diminuir os danos da radiação sobre a pele. Várias substâncias com ação antioxidantes têm demonstrado esses resultados, a suplementação de betacaroteno e licopeno têm sido empregadas com essa finalidade (WANICK *et al.*, 2011).

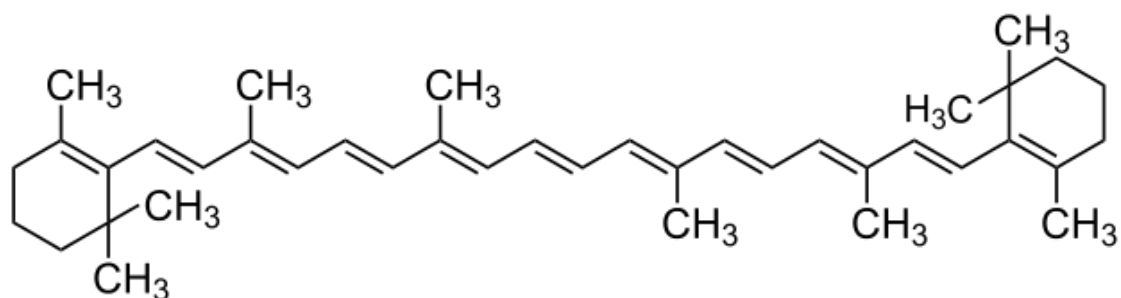
3.1.1 Betacaroteno

O betacaroteno (Figura 1) é o pigmento natural mais abundante do grupo dos carotenoides presente nos alimentos, é encontrado, especialmente, em vegetais e frutas de cor amarelo alaranjada e em vegetais folhosos de cor verde-escura, nestes, a cor natural do carotenoide é mascarada pela clorofila, presente nos cloroplastos (MANGELS *et al.*, 1993).

As funções biológicas do betacaroteno consistem em propriedade essenciais para o bem-estar dos organismos, o que inclui a transferência de energia na

fotossíntese, transferência de energia para fotoproteção, e a conversão metabólica a retinóides em animais com ingestão inadequada de vitamina A pré-formada (KRINSKY, 1994).

Figura 1: Fórmula estrutural do betacaroteno.



Fonte: <https://www.google.com/>

A conversão metabólica do betacaroteno a vitamina A é quimicamente possível devido a sua estrutura molecular que contém anéis beta ionona não substituídos, ligado à cadeia lateral poliênica (rica em ligações duplas conjugadas). Sendo assim, o carotenoide pode, teoricamente, gerar duas moléculas de vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

A quantificação de Betacaroteno em diferentes matrizes vem sendo realizada principalmente por métodos cromatográficos que possuem custos elevados, e por métodos espectroscópicos (SPEEK, TEMALILWA, SCHRIJVER, 1986; SCHIERLE *et al.*, 2004; BISWAS, SAHOO, CHATLI, 2011; HAGOS *et al.*, 2022)

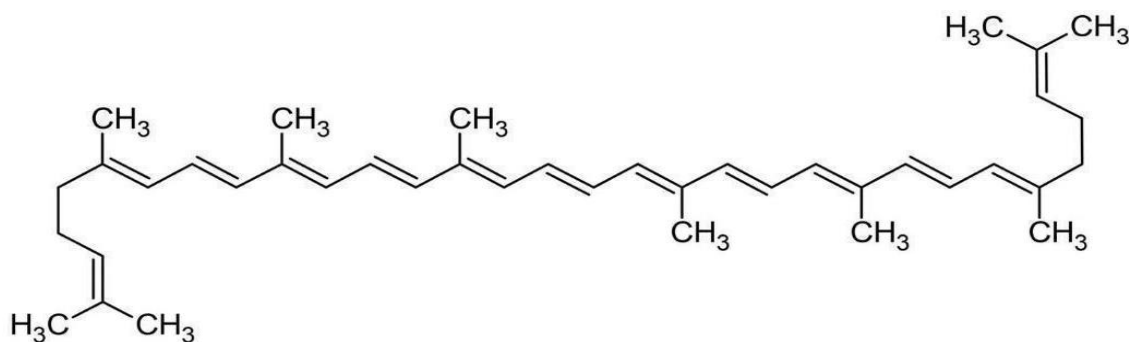
3.1.2 Licopeno

O licopeno (Figura 2) é um dos 600 pigmentos carotenoides encontrados na natureza e um dos 25 encontrados no plasma e tecidos humanos, conhecido por conferir coloração vermelha a diversos alimentos, como tomate, melancia, mamão e goiaba. É um hidrocarboneto de cadeia linear com treze ligações duplas, sendo onze carbono-carbono conjugadas e duas não-conjugadas. Sua estrutura é responsável pela coloração vermelho-alaranjada de frutas e vegetais nas quais está presente.

Esse pigmento carotenoide não tem atividade de provitamina A, mas tem um

efeito protetor direto contra radicais livres, sendo considerado um potente antioxidante protetor da camada celular por reação com os radicais peróxidos e com o oxigênio molecular (MORITZ e TRAMONTE, 2006).

Figura 2: Fórmula estrutural do licopeno.



Fonte: <https://www.google.com/>

Devido ao seu alto potencial antioxidante, o maior entre os vários carotenoides, o licopeno pode ser utilizado para prevenir a oxidação em alimentos ou para a formulação de alimentos funcionais, farmacêuticos ou cosméticos, ou na forma de um corante vermelho intenso (SILVA, 2016).

Por sua estrutura química, o licopeno se destaca como um dos melhores captadores biológicos de radicais livres, destacando-se como um dos antioxidantes mais eficientes. Estudos apontam que o licopeno protege moléculas de lipídios, lipoproteínas de baixa densidade, proteínas e DNA contra os ataques dos radicais (SHAMI e MOREIRA, 2004). Diferentes estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado que dietas ricas em licopeno reduzem os riscos de desenvolvimento de câncer de próstata e ovário e uma menor incidência de doenças degenerativas crônicas e cardiovasculares (CARVALHO *et al.*, 2006).

A quantificação de licopeno em diferentes matrizes vem sendo realizada principalmente por métodos cromatográficos e espectrofotométricos (FISH, PERKINS-VEAZIE, COLLINS, 2002; MÜLLER *et al.*, 2008; KAKUBARI *et al.*, 2020; ASADUZZAMAN, 2022).

3.2 Espectrofotometria UV-VIS

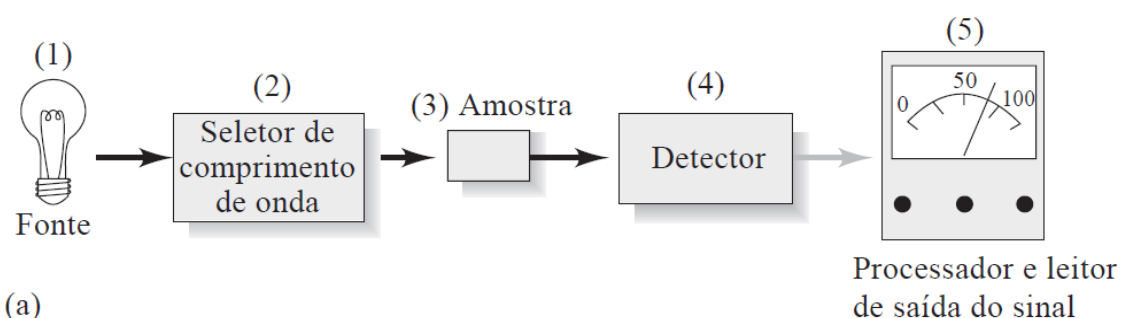
A absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta (UV) (100-400 nm) e visível (Vis) (400-800 nm) por parte das moléculas, átomos ou íons está associada às transições eletrônicas. Elas ocorrem quando, na interação da radiação eletromagnética com o meio absorvente, um elétron é promovido a um estado eletrônico de baixa energia para outro de alta energia (SINESTERRA, 2016).

A quantidade de luz absorvida durante a transmissão de um feixe de radiação monocromática através de um meio absorvente é influenciada pela concentração, pelo coeficiente de absorção molecular e pelo percurso óptico da radiação. A análise da variação dessa absorção em relação à concentração possibilita a determinação quantitativa de diversas substâncias químicas (SKOOG *et al.*, 2006).

Muitos instrumentos espectroscópicos para o uso de regiões UV/visível apresentam cinco componentes sendo: (1) uma fonte estável de energia radiante; (2) um seletor de comprimento de onda que isola uma região limitada do espectro para a medida; (3) um ou mais recipientes para a amostra; (4) um detector de radiação, o qual converte a energia radiante para um sinal elétrico mensurável e (5) uma unidade de processamento e de leitura do sinal, sendo geralmente construída por um circuito eletrônico e, nos instrumentos modernos (SKOOG *et al.*, 2006).

A Figura 3 mostra as etapas do funcionamento do espectrofotômetro.

Figura 3: Etapas de funcionamento espectrofotômetro.



Fonte: SKOOG *et al.*, 2006.

Os instrumentos espectroscópicos para as regiões do UV e visível são geralmente equipados com monocromador ou um filtro para isolar a banda de

comprimento de onda desejada de forma que somente essa banda de interesse é detectada e medida. Para a obtenção da informação espectroscópica, a potência radiante transmitida, fluorescente ou emitida deve ser detectada de alguma forma e convertida em uma quantidade mensurável, sendo utilizado um detector onde indicará a existência dos fenômenos físicos (SKOOG *et al.*, 2006).

3.3 Aplicativo PhotoMetrix PRO®

O avanço significativo da tecnologia nas últimas décadas tornou imprescindível que diversas áreas do conhecimento acompanhassem e se adaptassem a esse novo ciclo. Neste contexto, novos aplicativos vêm sendo desenvolvidos e empregados na realização de análises de dados por meio de imagens capturadas pela câmera do *smartphone*, sendo estas imagens digitais empregadas como ferramentas de controle de qualidade no desenvolvimento de novas metodologias analíticas.

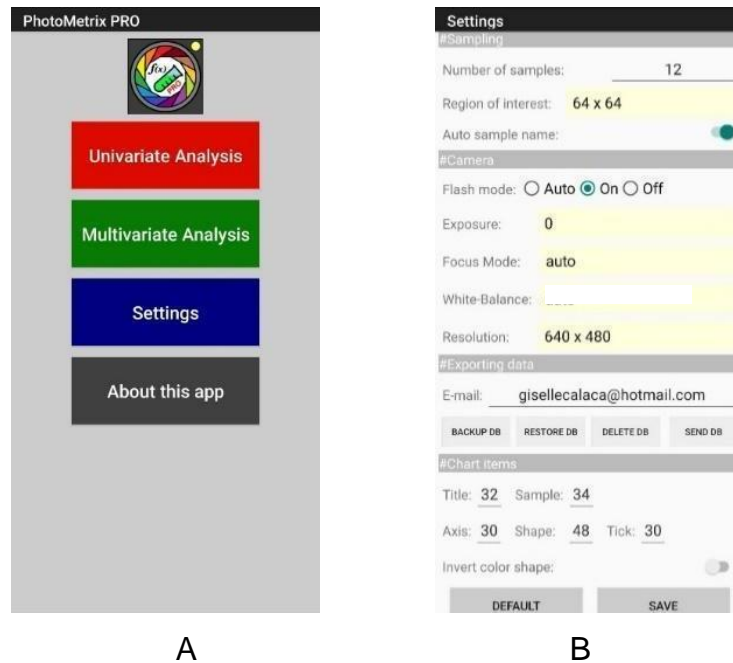
O aplicativo Photometrix® foi desenvolvido em 2016 pelo pesquisador brasileiro Gilson Augusto Helfer, para ser utilizado em sistemas como *Android*, *Windows Phone* e *iOS*, com o objetivo de oferecer uma ferramenta para análise química a partir da decomposição de imagens digitais adquiridas por câmeras de *smartphones* e processadas dentro de um mesmo dispositivo. O inglês foi utilizado como idioma padrão de informação, dentro das interfaces e nas mensagens com o usuário.

O aplicativo permite realizar a decomposição da imagem de duas maneiras. Uma baseada no modelo de adição de cores primárias vermelho (R, *red*), verde (G, *green*) e azul (B, *blue*), onde é realizado o histograma baseado no modelo RGB. Outra forma da decomposição independente de canais RGB e modelos de cores RGB derivados, como matiz, saturação e valor (HSV); matiz, saturação e luminosidade (HSL); e matiz, saturação e brilho (IHS) (HELPER *et al.*, 2017).

A tela inicial do aplicativo possui opções de Análise Univariada, Análise Multivariada, configurações e informações gerais do aplicativo (Figura 4A). Em configurações (Figura 4B), o usuário do aplicativo pode definir o número de amostras, o tamanho de região de interesse, podendo ser de 32 x 32, 48 x 48, 64 x 64 ou 96 x

96 pixels, a definição de amostras, o uso de *flash* e o endereço de e-mail para receber os dados de análise coletados pelo aplicativo (HELPER *et al.*, 2017).

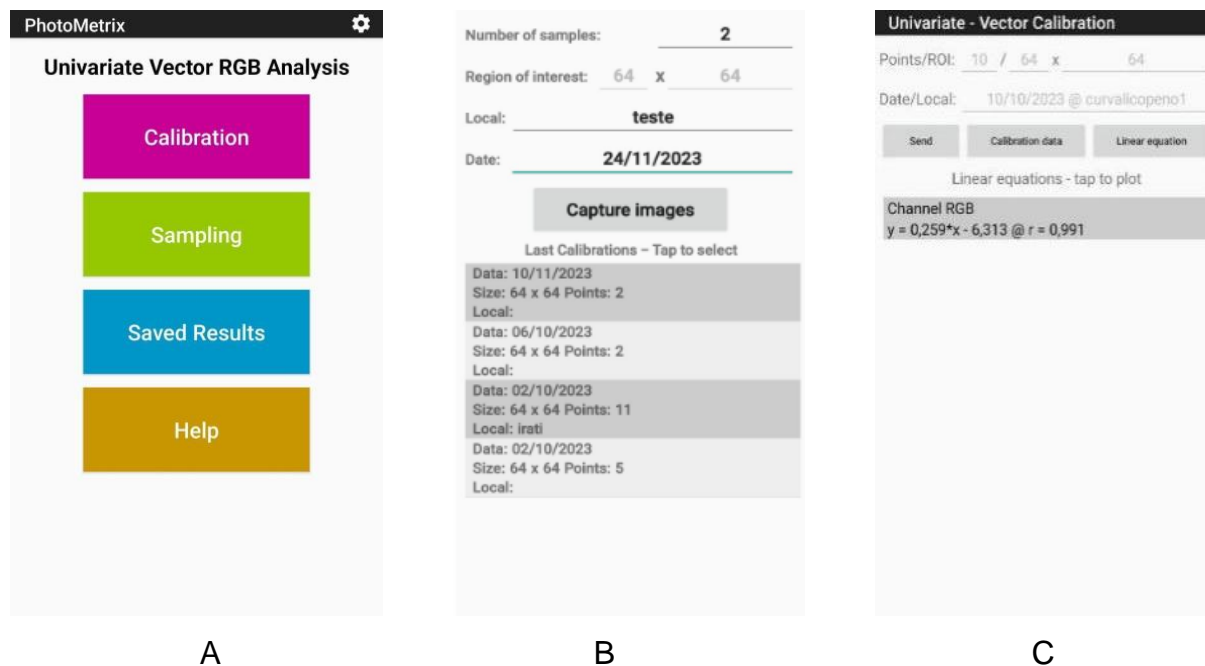
Figura 4: A) Interface gráfica principal do aplicativo PhotoMetrix PRO® com as opções de análise, B) Interface de configuração.



Fonte: Aplicativo PhotoMetrix PRO®.

Dentro da interface de Análise Univariada, após a escolha entre Múltiplos Canais ou Vetor RGB, o aplicativo permite que o usuário possa realizar a calibração, amostragem, pesquisa de análises salvas, e o acesso aos tutoriais de ajuda em vídeo (Figura 5A). O aplicativo pode realizar tanto a calibração (Figura 5B) quanto a previsão por meio da imagem capturada. Após a amostragem, os dados e resultados são previstos de acordo com calibração e são selecionados de acordo com a equação para cada canal de cor (Figura 5C) (HELPER *et al.*, 2017).

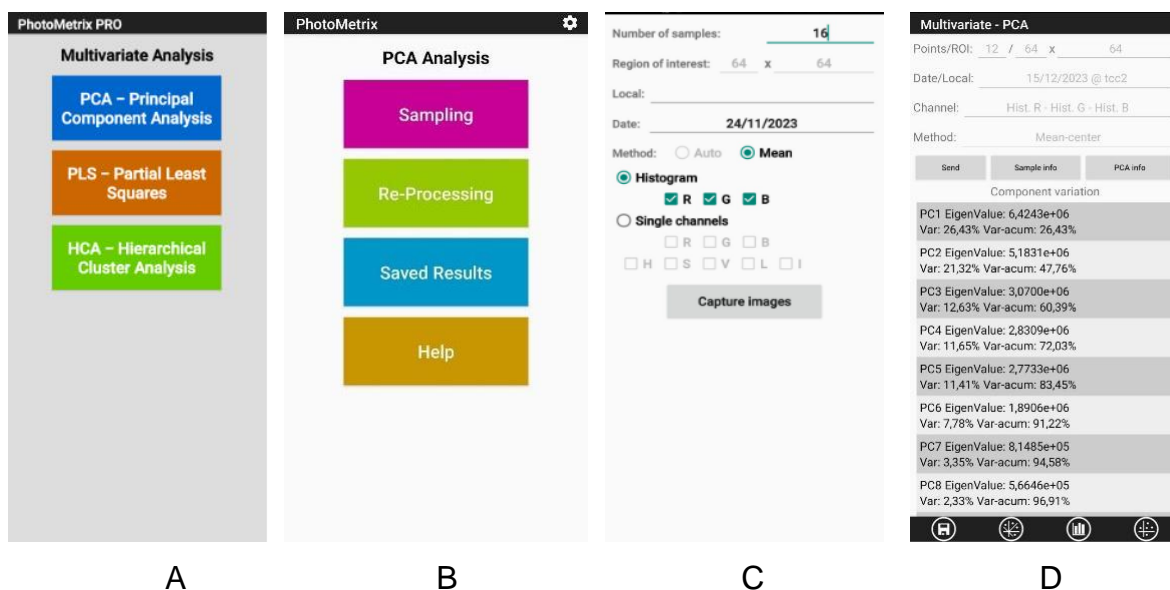
Figura 5: A) Interface do módulo de Análise Univariada. B) Interface de calibração. C) Interface de opções: enviar por e-mail, visualizar dados e gráficos.



Fonte: Aplicativo PhotoMetrix PRO®.

O módulo de Análise Multivariada, permite a análise nos métodos análise de componentes Principais (PCA), quadrados mínimos parciais (PLS) e análise de agrupamentos hierárquico (HCA) (Figura 6A). Dentro da interface PCA, o aplicativo permite que o usuário possa realizar a amostragem, reprocessamento da calibração, e o salvamento dos resultados (Figura 6B). No módulo amostragem, pode ser realizada as configurações como a escolha do formato do gráfico, podendo ser por histograma ou canais simples, a quantidade de amostras que será realizada a coleta e a captura das amostras (Figura 6 C). As imagens obtidas pela câmera, podem ser analisadas através de seus histogramas ou mesmo pela combinação de canais de cores selecionados individualmente, tendo a autoescala e dados centrados na média como opções de pré-processamento. Em seguida, é realizada a decomposição em valores singulares da matriz de dados, gerando uma variação dos resultados das componentes principais, além de gráficos de *scores* e *loadings* (Figura 6D) (HELPER *et al.*, 2017).

Figura 6: A) Interface do módulo de Análise Multivariada. B) Interface do método análise de componentes Principais. C) Interface de amostragem e (D) Interface de opções: enviar por e-mail, visualizar dados e gráficos.



Fonte: Aplicativo PhotoMetrix PRO®.

O aplicativo Photometrix® tem sido amplamente empregado em uma variedade de análises em diversas matrizes.

Pappis e colaboradores (2019) determinaram a concentração de fluoreto e fósforo em águas tratadas e naturais por meio de um aplicativo de *smartphone*. As determinações foram feitas utilizando a abordagem espectrofotométrica convencional, empregando o reagente 2-(4-sulfafenilazo)-1,8-dihidroxi-3,6-naftaleno dissulfonato (SPADNS) para medidas de fluoreto e reação azul de molibdênio para medidas de fósforo e, em seguida, o aplicativo PhotoMetrix® para comparação dos resultados obtidos pelos dois procedimentos. As curvas analíticas foram construídas analisando três amostras em triplicata. Os coeficientes de determinação (R^2) de fósforo e fluoreto para o método convencional e para o método utilizando o aplicativo foram 0,990 e 0,998, e 0,999 e 0,999, respectivamente. Os resultados médios obtidos pelo aplicativo foram de 99,2% (fósforo) e 100% (fluoreto), bastante satisfatórios em relação ao método de referência. Não foram identificadas diferenças significativas entre os dois métodos de quantificação ($p > 0,05$, teste t pareado). Portanto, os autores relataram que os resultados demonstraram a eficiência desta nova ferramenta analítica, que permite análises rápidas e precisas das concentrações de fluoreto e fósforo em campo, bem como em escala industrial.

Saqueti e colaboradores (2021) realizaram a quantificação de ferro em amostras de pólen e suplemento vitamínico usando o aplicativo PhotoMetrix®. O pólen foi preparado com digestão em frasco aberto e 1,10-fenantrolina para complexação com o ferro. Testes determinaram parâmetros ideais para aquisição de imagens, incluindo o uso de um Moto G segunda geração, caixa branca para iluminação e luz branca de um segundo *smartphone*. A leitura de ferro no suplemento vitamínico foi eficiente, com concentração de $41,7 \pm 0,1$ mg/comprimido e erro de 4,17% em comparação com o rótulo. O limite de quantificação usando o PhotoMetrix® foi calculado como $200 \mu\text{g g}^{-1}$. No entanto, a determinação da concentração de ferro no pólen pelo aplicativo não foi possível, sendo necessária a utilização do ICP-MS, que indicou uma concentração de $63 \mu\text{g g}^{-1}$. Assim, não foi possível realizar a determinação da concentração de ferro nas amostras de pólen por meio do aplicativo.

Lourenço e colaboradores (2021) empregaram o aplicativo PhotoMetrix® em uma prática de colorimetria para determinação de íons ferro usando tiocianato, sendo essa uma reação monitorada por espectrofotometria na região visível. O método foi adaptado para um laboratório de química sustentável, com volumes reduzidos de reagentes para minimizar resíduos e custos. O método alternativo apresentou bons resultados, com um R^2 de 0,999, limites de detecção e quantificação de 0,34 e 0,98 mg L^{-1} , respectivamente, e valores de DPR inferiores a 6,0%. A determinação de ferro foi realizada em amostras de água de torneira, lâmina de barbear e suplemento alimentar. Os níveis de ferro foram satisfatórios em comparação com resultados obtidos por espectrofotometria na região visível. Este método adaptado mostra potencial para ser aplicado em ambientes educacionais com recursos limitados, proporcionando uma abordagem mais acessível e sustentável para o ensino de química prática.

3.3.1 Modelo RGB

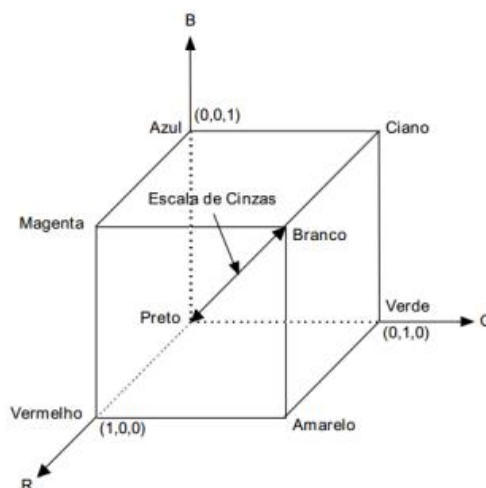
O mais comum sistema utilizado em tudo que há imagens, é o RGB, onde em tal espaço de cores, apresenta um pixel que é definido pelos valores de intensidade vermelho (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*) na região visível do espectro eletromagnético (ANTONELLI *et al.*, 2004).

A Comissão Internacional de Iluminação (CIE) (do francês *Commission*

Internationale de L'Eclairage do francês), em 1931, atribuiu os seguintes comprimentos de onda para as cores primárias: azul = 435,8 nm, verde = 546,1 nm, vermelho = 700 nm (MARQUES FILHO e VIEIRA NETO, 1999).

O modelo RGB vem sendo baseado em um sistema de coordenadas cartesianas, que pode ser visto como um cubo de três vértices, sendo as cores primárias, outros três com as cores secundárias, o vértice junto à origem é o preto, e o mais afastado da origem corresponde à cor branca, conforme a Figura 7. Em tal modelo, a escala de cinza estende através de uma linha que sai da origem (preto) até o vértice mais distante dela (branco). Por conveniência, geralmente assume-se que os valores máximos de R, G e B estão normalizados na faixa de 0 a 1 (GONZALEZ e WOODS, 2008).

Figura 7: Modelo de cor RGB.

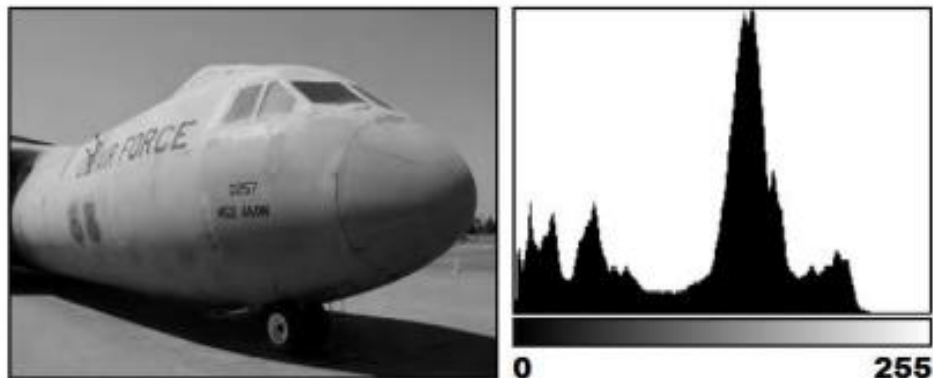


Fonte: GONZALEZ e WOODS, 2008.

Para Pedrini e Schwartz (2008) o histograma de uma imagem corresponde à distribuição dos níveis de cinza na mesma, os quais podem ser representados por um gráfico indicando o número de pixels na imagem para cada nível de cinza. Estes valores são normalmente representados por um gráfico de barras ou de distribuição de frequência. Através da visualização do histograma de uma imagem obtém-se uma indicação de sua qualidade quanto ao nível de contraste e quanto ao brilho médio pelo número de vezes que o nível de cinza aparece na imagem. A Figura 8 demonstra uma imagem em escala e seu histograma. Neste caso há uma baixa exposição de luz

branca e o gráfico tende a esquerda. (BURGER e BURCE, 2009).

Figura 8: Imagem em escala de cinza e seu histograma.



Fonte. BURGER e BURCE, 2009.

3.4 Quimiometria

A quimiometria não é uma disciplina da matemática, mas sim da química, isto é, os problemas que se propõe a resolver são de interesse e originados na química, ainda que as ferramentas de trabalho provenham principalmente da matemática, estatística e computação (FERREIRA, *et al.* 1999). Para Kowalski,

As ferramentas quimiométricas são veículos que podem auxiliar os químicos a se moverem mais eficientemente na direção do maior conhecimento. (apud FERREIRA, *et al.* p. 1)

A definição original de quimiometria é da *Internacional Chemometrics Society*: “A quimiometria é a aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas à química”. Desta forma, ela mostra-se uma ferramenta essencial na química analítica, mas que não está presa a essa área, pois possui natureza interdisciplinar e tem mercado em indústrias químicas, farmacêuticas, alimentícias, além de possuir um crescimento ao uso de outros campos, como por exemplo a medicina (SILVA, 2018).

Devido à interdisciplinaridade da quimiometria, uma nova definição foi proposta recentemente por Chrétien: “Quimiometria é a administração e processamento de informações da natureza química.” Sendo que hoje a quimiometria é uma intersecção de três grandes áreas.

Segundo *apud* HELPER *et al.* (2014), a quimiometria é frequentemente utilizada para maximizar as informações de um conjunto de dados, discretos ou instrumentais, extraídos de matrizes multivariadas, como por exemplo, informações provenientes da espectroscopia.

Outra abordagem da quimiometria é baseada na análise multivariada de imagens a partir de uma imagem digital de uma dada cena, pela extração dos elementos de figura, chamado pixels, onde cada pixel é caracterizado por uma série de variáveis espectrais, ou também chamados de cena (GELADI e KOWALSKI, 1986).

Dentro das diversas subáreas da quimiometria destaca-se o planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. Na área de planejamento de experimentos busca-se encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas. Na calibração multivariada, busca-se estabelecer a correlação entre uma série de dados das amostras como uma determinada propriedade (por exemplo a concentração), no reconhecimento de padrões, a partir de uma vasta gama de informações, pretende-se encontrar similaridade nos agrupamentos das amostras a detectar tendências nos dados (FERREIRA *et al.*, 2012).

De maneira geral, metodologias multivariadas permitem explorar toda a informação fornecida pela técnica instrumental, favorecendo o desenvolvimento de modelos de calibração confiáveis, mesmo em situações de extrema complexidade de sinal (CORDEIRO *et al.*, 2008).

3.4.1 Análise de componentes principais - PCA

A Análise de componentes Principais (PCA) - do inglês *Principal Component Analysis* - é um método analítico estatístico amplamente utilizado em quimiometria, possui como objetivo reduzir o número de dimensões de um conjunto de dados, sem a perda de informações relevantes, obtendo assim, uma quantidade menor de novas variáveis, facilitando a interpretação dos resultados. Esta forma de análise pode propiciar, através de gráficos, a distinção da existência de padrões de similaridade, que podem ou não ocorrer, em conjunto de dados nas amostras analisadas (LOPES, *et al.*, 2010)

O método é baseado na decomposição de variáveis independentes de um conjunto de calibração (X), em um sistema de eixos (componente principais), representando as amostras em um menor número de dimensões, sem que haja a perda de informação analítica relevante. As novas coordenadas das amostras denominadas *scores* (T), enquanto o peso com que cada variável original contribui para formar as componentes principais chamados de *loading* (CHRISTIE, 1995)

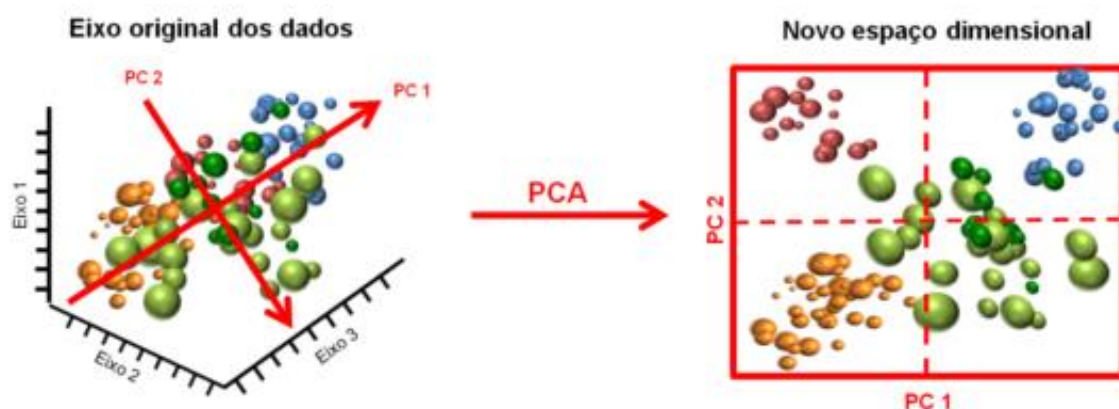
O cálculo que é utilizado na PCA baseia-se na decomposição de uma determinada matriz X , em um produto de duas outras matrizes T e P , conforme mostra na equação

$$X = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + \dots + t_d p_d^T + E = TP^T + E$$

Sendo X a matriz principal, com n linhas e m colunas, T é uma matriz de *scores* com n linhas e d colunas, P^T é a matriz de *loadings* com m colunas e d linhas, e, E é a matriz resíduo, que contém as informações que não são relevantes para a análise.

Em particular, o PCA permite identificar as principais direções em que ocorre a variância dos dados. Na Figura 9, toma-se como exemplo, as esferas coloridas representam um conjunto de dados distribuídos no espaço, definido pelas variáveis originais X , Y , e Z . No processamento por PCA, calculam-se novos eixos, denominados componentes principais, sempre com a intenção de representar a maior parte da variância presente no conjunto de dados. Assim o primeiro componente principal (PC1) se projeta na direção da maior variância, enquanto a segunda (PC2), sendo ortogonal, complementa a representação da variância, sendo projetada em outra direção (STETS, 2015).

Figura 9: Representação gráfica da construção de um novo conjunto de eixos por Análise de Componentes principais.



Fonte. STETS, 2015.

Em geral, um pequeno número de componentes principais pode representar toda a variância descrita por um grande conjunto de variáveis originais. Isso simplifica a visualização dos dados e facilita a identificação de padrões e agrupamentos significativos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

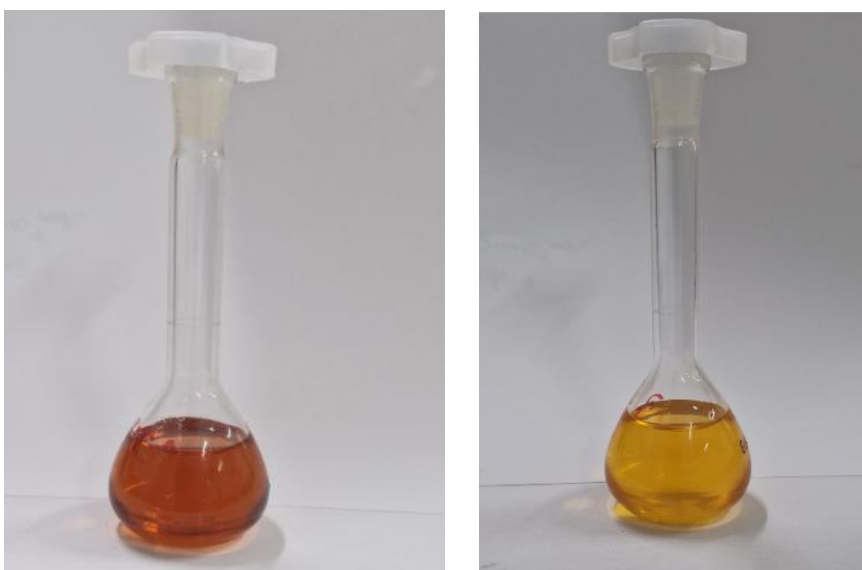
4.1 Reagentes

Os padrões de licopeno (Fator de correção: 8,71) e betacaroteno (Fator de correção: 9,97) utilizados neste estudo foram adquiridos em uma farmácia de manipulação na cidade de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. O fornecedor dos padrões é a SM Empreendimentos Farmacêuticos Ltda. Os demais reagentes utilizados: etanol, acetona, hexano, clorofórmio, benzeno e dimetilsulfóxido (DMSO) foram de grau analítico PA.

4.2 Soluções

As soluções de trabalho de licopeno (MM: 536,89 g mol⁻¹) e betacaroteno (MM: 536,88 g mol⁻¹) nas concentrações de 2,2x10⁻³ mol L⁻¹ e 2,1x10⁻⁴ mol L⁻¹, respectivamente, foram preparadas em balão volumétrico de 25,0 mL com dimetilsulfóxido (Figura 10).

Figura 10: A) Soluções trabalho de licopeno (A) e betacaroteno (B) em dimetilsulfóxido, nas concentrações de 2,2 x 10⁻³ mol L⁻¹ e 2,1 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, respectivamente.



A

B

Fonte: O autor.

Para obtenção das curvas analíticas individuais do licopeno e do betacaroteno, foram realizadas diluições a partir da solução trabalho, em dimetilsulfóxido, nas faixas de concentração de 36,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 876 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e 3,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 82,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, tais concentrações foram escolhidas pela realização de testes preliminares, de modo que a absorbância obtida estivesse entre 0,1 e 2,0. Os gráficos da curva de calibração foram obtidos representando a absorbância em função da concentração do padrão.

O conjunto de calibração para análise da mistura dos carotenoides por PLS constituiu-se por 16 misturas dos analitos de interesse, dentro da faixa de concentração de 36,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 876 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Licopeno e 3,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 82,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Betacaroteno. Esse planejamento experimental foi construído de forma a compreender a faixa linear de absorbância para ambos os compostos, nas proporções rotineiramente comercializadas em suplementos alimentícios.

O conjunto para análise multivariada por PCA foi composto por 12 amostras, das quais, seis apresentavam diferentes concentrações de licopeno e as outras seis, diferentes concentrações de betacaroteno (Tabela 1). Todas as amostras estavam dentro da faixa linear de absorbância das curvas de calibração dos compostos.

Tabela 1: Concentrações de licopeno e betacaroteno nas amostras para a análise de componentes principais.

| Amostra | Licopeno | | Amostra | Betacaroteno |
|----------------|------------------------------|--|----------------|-----------------------------|
| I1 | 36,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | | b1 | 13,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ |
| I2 | 73,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | | b2 | 27,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ |
| I3 | 146,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | | b3 | 41,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ |
| I4 | 292,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | | b4 | 54,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ |
| I5 | 584,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | | b5 | 68,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ |
| I6 | 876,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | | b6 | 82,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ |

Fonte: O autor.

4.3 Análise por Espectrofotometria UV-Vis

As análises espectrofotométricas na região do visível foram realizadas em um espectrofotômetro Nova (NI 1800 UV) ou Varian Cary 50 utilizando cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico, sendo os espectros de absorção na região do visível, adquiridos entre 400 e 800 nm.

4.4 Análise por Imagens digitais e Aplicativo de smartphone

As análises por imagens digitais e aplicativo de smartphone foram realizadas utilizando o aplicativo PhotoMetrix® PRO (versão 1.1.7) e um celular Samsung Galaxy S21 FE (Android 13).

Para registrar as imagens captadas pelo aplicativo sem a interferência em oscilações de luz, apoio das amostras ou do *smartphone*, um mini estúdio (Figura 11) em MDF (*Medium-Density Fiberboard*, fibras de média densidade) foi projetado. O mini estúdio possui aproximadamente 13 cm de comprimento, 16 cm de altura e 14 cm de profundidade, tendo como volume total de 3000 cm³, possuindo amplo espaço para acomodar as amostras e o celular. A caixa foi projetada e marcada no material MDF, e o corte realizado com uma máquina a laser. Para o celular foi idealizada uma estrutura de encaixe na caixa, com os locais certos das câmeras e do *flash*, para o celular aderir ao suporte uma capinha para celular foi acoplada no local destinado.

Figura 11: Projeto do mini estúdio em MDF.



Fonte: O autor.

As dimensões detalhadas são apresentadas no Anexo A.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das imagens digitais

O aplicativo PhotoMetrix PRO® faz a análise das imagens digitais obtidas através de parâmetros como a coloração, matiz, intensidade e saturação. Desta forma, é necessário obter-se uma instrumentação na qual a aquisição das imagens tenha a menor quantidade de interferências devido a iluminação, sombras, má posição das amostras nas análises ou do *smartphone*, de forma a assegurar a reprodutibilidade das imagens obtidas. Para tal, um pequeno estúdio de MDF com um suporte destinado ao celular foi projetado, confeccionado e testado, conforme mostra a Figura 12.

Figura 12: Imagens do mini estúdio construído.



Fonte: O autor.

Para melhor captura das cores das imagens, revestiu-se o interior da caixa com papel branco, com a aplicação do papel notou-se uma menor interferência do dispositivo na coloração final do analito. Testes relacionados a utilização do *flash* também foram realizados e optou-se pela utilização do mesmo em todas as análises. Ademais, após testes experimentais, a posição da cubeta também foi testada e fixada.

5.2 Escolha do solvente para as análises

O betacaroteno e o licopeno são lipossolúveis, o que significa que suas

solubilidades são significativamente maiores em solventes orgânicos não polares em comparação com solventes polares, devido a presença de longas cadeias de hidrocarbonetos conjugados em suas estruturas moleculares.

De acordo com a literatura o betacaroteno é solúvel em solventes orgânicos como hexano, clorofórmio, etanol, acetona, acetato de etila e diclorometano (TRÊS, *et al.*, 2007; STUTZ, BRESGEN, ECKL, 2015). Enquanto, o licopeno é solúvel em clorofórmio, benzeno, hexano, acetona, éter de petróleo e dissulfeto de carbono (ASADUZZAMAN, 2022).

Com intuito de ajustar o melhor solvente para as análises individuais e, posteriormente, simultânea dos analitos, testou-se a capacidade de formar uma solução translúcida dos padrões de licopeno e betacaroteno empregando os solventes disponíveis. Os resultados observados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Teste de solubilidade dos carotenoides em estudo.

| Solvente | Licopeno | Betacaroteno |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Água destilada | Pouco translúcida | Pouco translúcida |
| Benzeno | Solução turva | Solução turva |
| Clorofórmio | Solução turva | Solução turva |
| Acetona | Solução turva | Solução translúcida |
| Acetona + água destilada (1:1) | Parcialmente translúcida | Solução translúcida |
| Etanol | Solução turva | Parcialmente translúcida |
| Etanol + água destilada (1:1) | Solução translúcida | Solução translúcida |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) | Solução translúcida | Solução translúcida |
| DMSO + água destilada (1:1) | Solução translúcida | Solução translúcida |

Fonte: O autor.

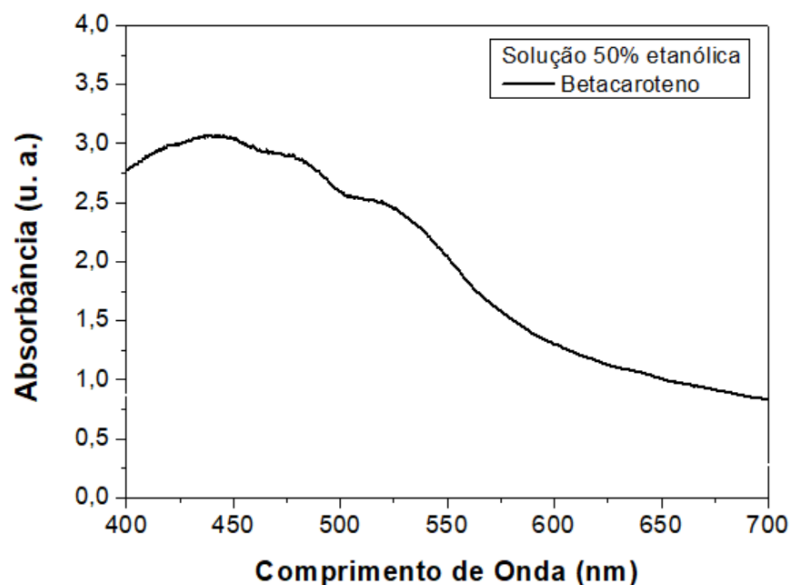
Observou-se que o padrão de betacaroteno demonstrou certa solubilidade na maior parte dos solventes testados, por outro lado, o licopeno mostrou-se predominantemente insolúvel na maioria dos testes. A baixa solubilidade dos compostos, mesmo em solventes descritos na literatura, provavelmente está

relacionada à baixa pureza dos padrões obtidos para o desenvolvimento do projeto.

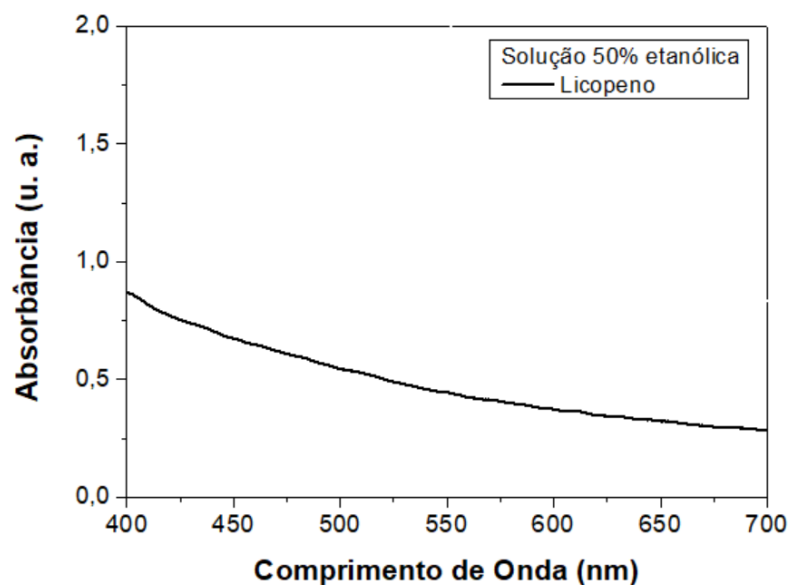
Objetivando a quantificação simultânea dos antioxidantes em estudo, apenas o solvente DMSO, e as misturas: etanol e água destilada, ou DMSO e água destilada, poderiam ser empregados nas análises.

Portanto, inicialmente, com o intuito de empregar como solvente a mistura etanol e água no desenvolvimento do projeto, os espectros de absorção na região do visível (400 a 700 nm) do betacaroteno (Figura 13A) e do licopeno (Figura 13B) em solução 50% etanólica foram obtidos.

Figura 13: Espectros de absorção na região do visível dos padrões de (A) Betacaroteno e (B) Licopeno em solução 50% etanólica.



A



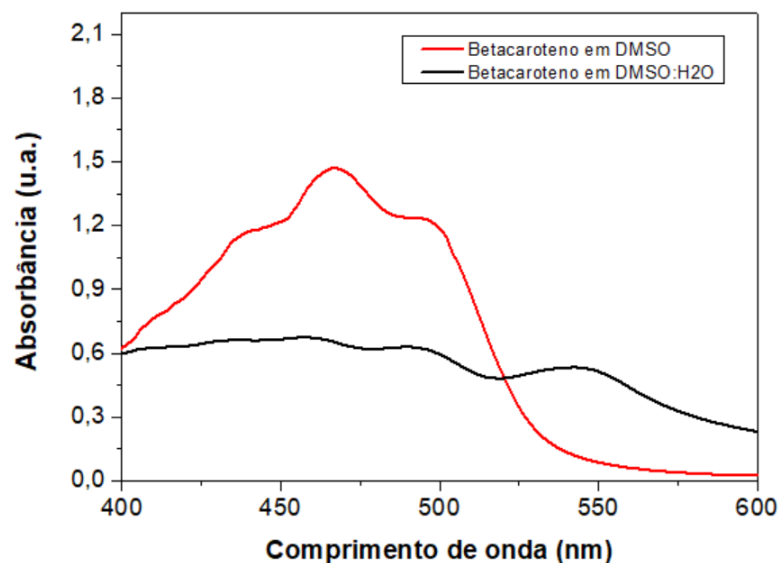
B

Fonte: O autor.

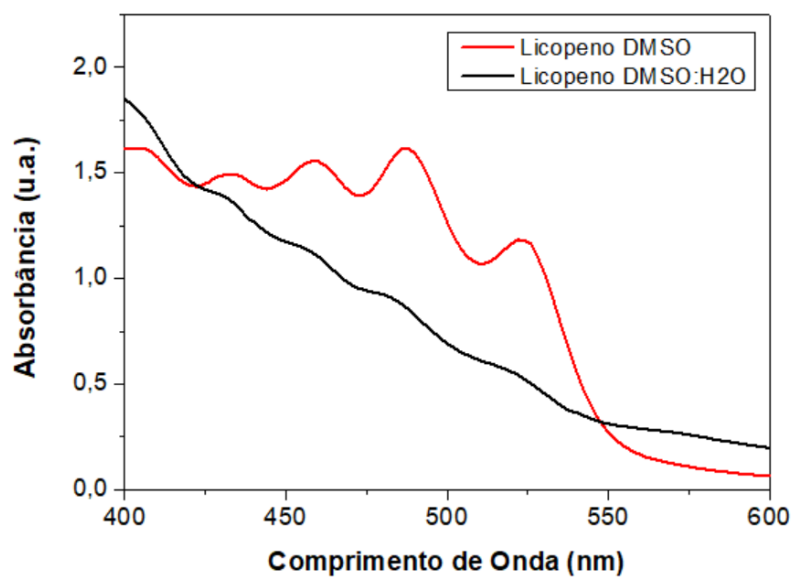
Na Figura 13, foi possível observar que as bandas de absorção do betacaroteno estão pouco definidas. No caso do licopeno, não foram identificadas bandas de absorção que pudessem ser empregadas para a obtenção da curva analítica pelo método espectrofotométrico. Portanto, esta mistura de solventes não foi selecionada para o desenvolvimento do trabalho.

Na sequência, os espectros de absorção na região do visível (400 a 600 nm) do betacaroteno e do licopeno em DMSO e, na mistura DMSO e água destilada, foram obtidos e são apresentados na Figura 14.

Figura 14: Espectros de absorção na região do visível dos padrões de (A) betacaroteno e (B) licopeno em DMSO (linha vermelha) e DMSO + água destilada (linha preta).



A



B

Fonte: O autor.

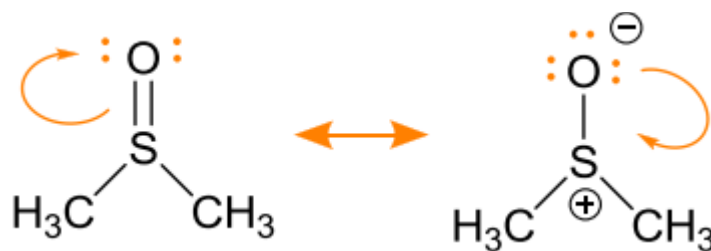
Nesta figura, foi possível observar que, para ambos os carotenoides, na mistura de DMSO e água destilada (linha preta), as bandas de absorção estão pouco definidas, além de apresentarem baixa absorbância em comparação com os espectros obtidos exclusivamente em DMSO. Assim, optou-se por prosseguir com as análises utilizando dimetilsulfóxido como solvente.

A seleção adequada do solvente na espectroscopia UV-Vis desempenha um

papel crucial. O primeiro critério fundamental é que o solvente, além de dissolver o soluto, não apresenta absorção na região de absorção do analito. Um segundo critério relevante é o impacto do solvente na estrutura fina de uma banda de absorção. Solventes apolares, por não estabelecerem ligações de hidrogênio com o soluto, tendem a produzir espectros semelhantes aos espectros de estado gasoso, com bandas de absorção distintamente finas. Em contrapartida, solventes polares, devido às ligações de hidrogênio formadas com o soluto, podem sobrepor a estrutura fina com bandas de absorção mais largas (PAVIA *et al.*, 2010).

O DMSO é reconhecidamente um ótimo solvente para ser utilizado na solubilização de solutos de difícil solubilização, isso se deve ao fato de que a magnitude da constante dielétrica de um solvente está positivamente correlacionada à sua eficácia em diluir solutos típicos. O dimetilsulfóxido (DMSO) é notável entre os solventes dipolares apróticos pois apresenta a maior constante dielétrica entre os solventes mais comuns e acessíveis em um laboratório químico, fato atribuído à alta predominância da forma canônica dipolar, conforme mostrado na Figura 15 (CARDOSO, 2011).

Figura 15: Formas canônicas do DMSO.



Fonte: CARDOSO, 2011.

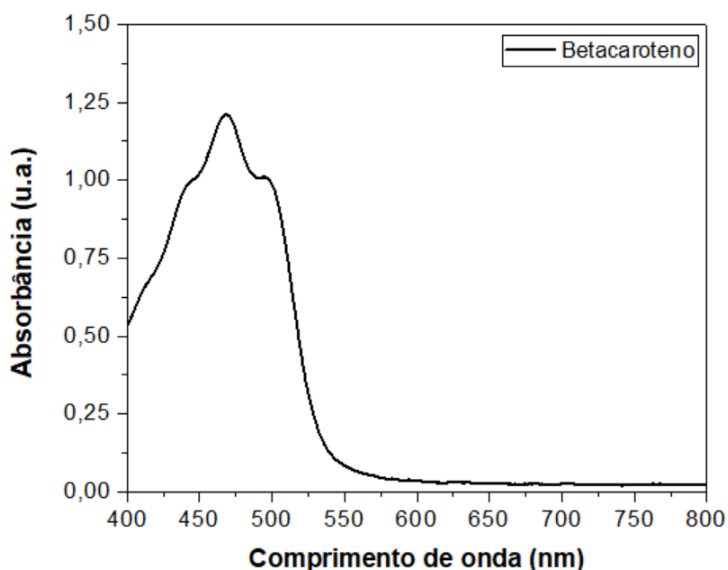
Ao realizar a análise via espectroscopia UV-Vis, a seleção cuidadosa do solvente desempenha um papel preciso. É fundamental que o solvente escolhido não apresente absorção na região de absorção do analito e que não afete significativamente a estrutura fina da banda de absorção. No entanto, é importante ressaltar que, devido à baixa pureza dos padrões utilizados e à falta de informações sobre a composição dos interferentes, a escolha do solvente torna-se ainda mais desafiadora. Nesse contexto, o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) surge como uma

opção viável, dado que é um solvente versátil capaz de dissolver uma ampla variedade de compostos que podem estar presentes nos padrões. Além disso, o DMSO não forma ligações de hidrogênio, mesmo quando os compostos possuem grupos que possibilitam esse tipo de interação intermolecular. É essencial garantir que a solução resultante seja translúcida, para a técnica de espectrofotometria UV-Vis, pois depende da absorção de luz pela amostra e, a presença de sólidos não solubilizados completamente bloqueiam a passagem do feixe de luz, gerando um erro muito grande pois a absorbância medida será resultado de uma barreira física criada pelas partículas não dissolvidas e não pelo processo de transição eletrônica. Embora esse detalhe não seja imprescindível para outros métodos de análise, a técnica UV-Vis desempenha um papel fundamental na validação da metodologia, tornando a obtenção de uma solução homogênea e translúcida fundamental para esse trabalho.

5.3 Análise individual do betacaroteno por espectrofotometria UV-Vis

A análise espectrofotométrica na região do visível (400 a 800 nm) de $58,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de betacaroteno em dimetilsulfóxido, revelou uma banda de máxima absorção no comprimento de onda 468 nm, como é mostrada na Figura 16.

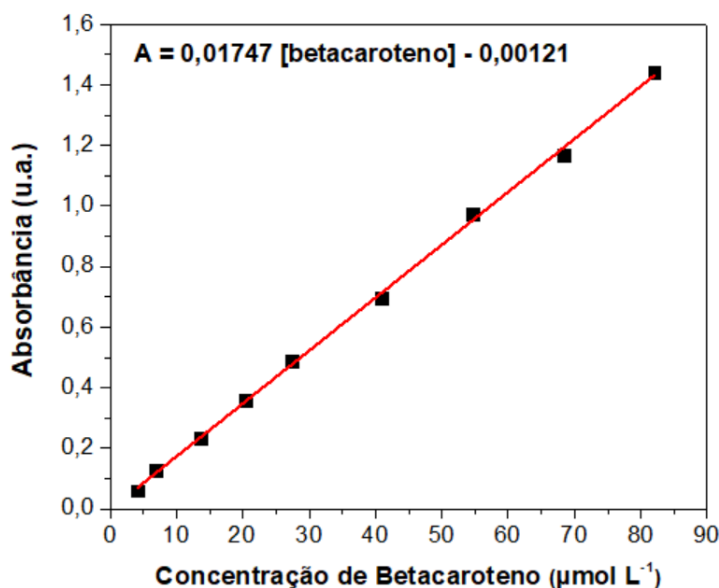
Figura 16: Espectros de absorção na região do visível do padrão de betacaroteno ($58,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) em DMSO.



Fonte: O autor.

O comprimento de onda de máxima absorção (468 nm) foi empregado para a construção da curva analítica (Figura 17), sendo a lei de Beer obedecida nos limites de concentração entre $3,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $82,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, indicando uma ampla faixa linear. A equação da reta obtida foi: $A = 0,01747 [\text{betacaroteno}] - 0,00121$, com coeficiente de correlação igual a 0,999.

Figura 17: Curva analítica para quantificação de betacaroteno em 468 nm (absorbância em função da concentração de betacaroteno).



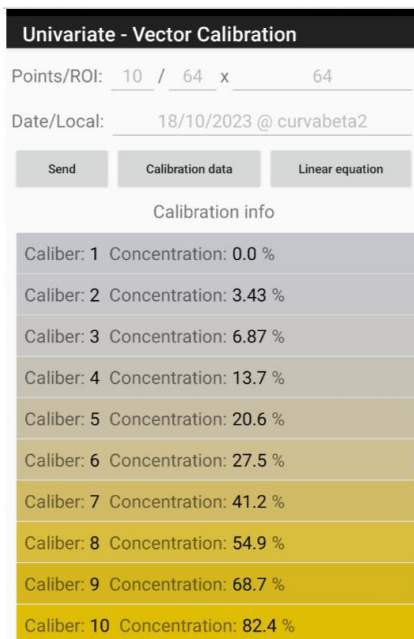
Fonte: O autor.

5.4 Análise individual do betacaroteno pelo aplicativo PhotoMetrix PRO®

Na mesma faixa de concentração de betacaroteno empregada no método espectrofotométrico, também foi obtida a curva de calibração via aplicativo (de $3,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $82,4 \mu\text{mol L}^{-1}$). Nas configurações iniciais, o tamanho de região de interesse de 64×64 pixels, e o uso do *flash* foram selecionados. Para análise univariada, selecionou-se vetor RGB.

A Figura 18 exibe a coloração do branco, bem como de cada amostra em diferentes concentrações de betacaroteno, conforme capturado pelas imagens do aplicativo.

Figura 18: Relação da coloração e concentração das amostras de betacaroteno obtidas por meio do aplicativo PhotoMetrix PRO®.

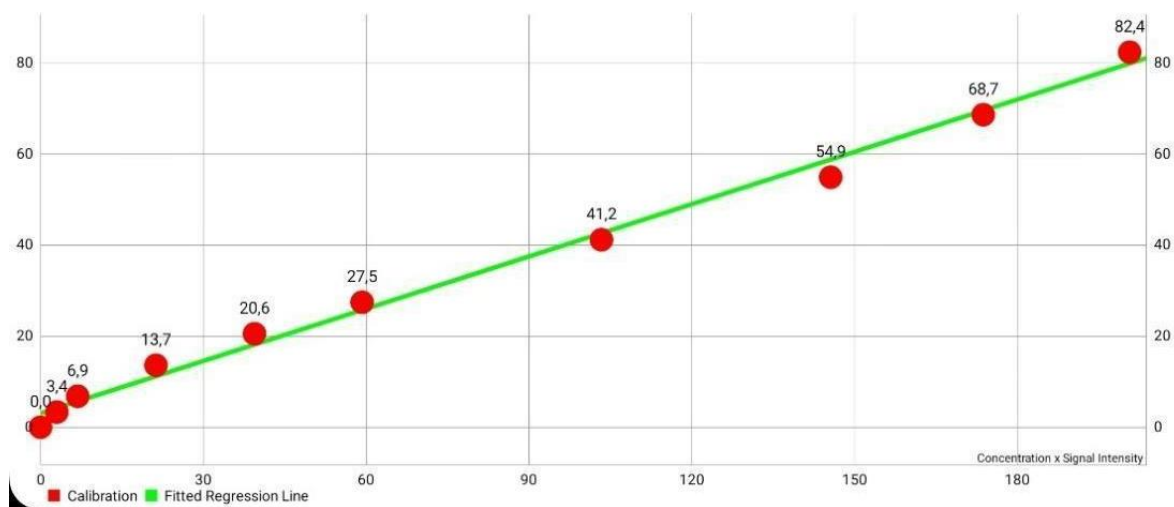


Fonte: Aplicativo PhotoMetrix PRO®.

A curva analítica construída para quantificação de betacaroteno por meio do aplicativo PhotoMetrix PRO® é apresentada na Figura 19.

A equação da reta obtida foi: $Y = 2,612 [\text{betacaroteno}] - 8,112$, com coeficiente de correlação igual a 0,997.

Figura 19: Curva analítica para quantificação de betacaroteno obtida pelo aplicativo PhotoMetrix PRO®.



Fonte: Aplicativo PhotoMetrix PRO®.

5.5 Quantificação individual de betacaroteno

A fim de avaliar a viabilidade da utilização do método alternativo em comparação ao método espectrofotométrico, quantificou-se betacaroteno em DMSO, pelo método de calibração externa, que consiste em soluções analíticas de concentrações diferentes e crescentes previamente preparadas e analisadas, utilizando as equações das retas obtidas nas curvas analíticas.

Os resultados obtidos para as determinações em diferentes concentrações são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados dos ensaios de recuperação de betacaroteno empregando as curvas analíticas obtidas.

| | | Espectrofotometria UV-Vis | | PhotoMetrix PRO® | |
|--------------------------------|--|---|--------------------------|---|--------------------------|
| Amostra | Valor teórico ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Valor Previsto ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Erro relativo (%) | Valor Previsto ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Erro relativo (%) |
| 01 | 5,15 | 5,22 | 1,36 | 4,94 | -4,08 |
| 02 | 11,59 | 11,12 | -4,06 | 11,08 | -4,40 |
| 03 | 25,75 | 25,19 | -2,17 | 25,84 | 0,35 |
| 04 | 51,50 | 52,27 | 1,50 | 50,98 | -1,01 |
| 05 | 77,25 | 73,22 | -5,22 | 75,27 | -2,56 |
| Recuperação média (n=5) | | 98,28% | | 97,66% | |
| DPR (recuperação) | | 3,12 % | | 2,07% | |

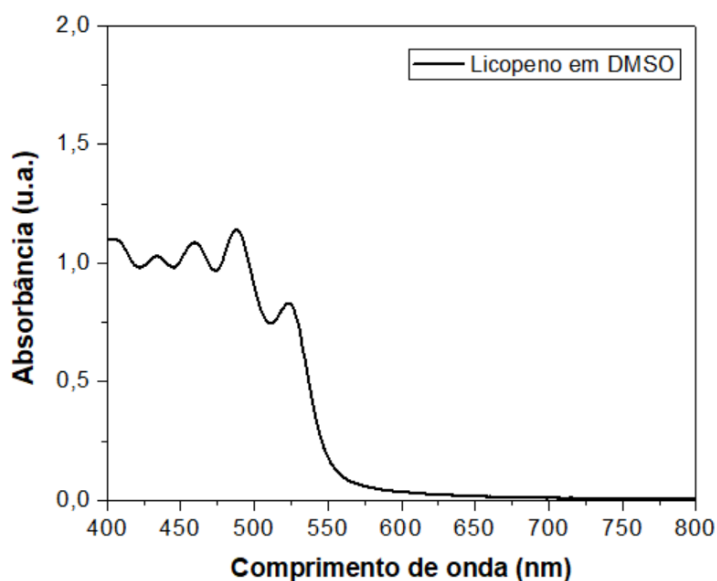
Fonte: O autor.

Conforme pode ser observado na Tabela 3, foram encontrados baixos valores de erro relativo, que variaram de 1,36 a 5,22% para o método espectrofotométrico e de 0,35 a 4,40% para o método colorimétrico alternativo. Os valores dos desvios padrão relativo, por sua vez, foram inferiores a 5% para ambos os métodos empregados, o que evidencia a boa precisão dos métodos na determinação na quantificação de betacaroteno em misturas sintéticas, sugerindo que este procedimento possa ser aplicado em amostras reais.

5.6 Análise individual do licopeno por espectrofotometria UV-Vis

A análise espectrométrica na região do visível (400 a 800 nm) de $667,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de licopeno em dimetilsulfóxido, mostrou uma banda máxima absorção no comprimento de onda de 487 nm, como mostra a Figura 20.

Figura 20: Espectros de absorção na região do visível do padrão de licopeno ($667,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) em DMSO.

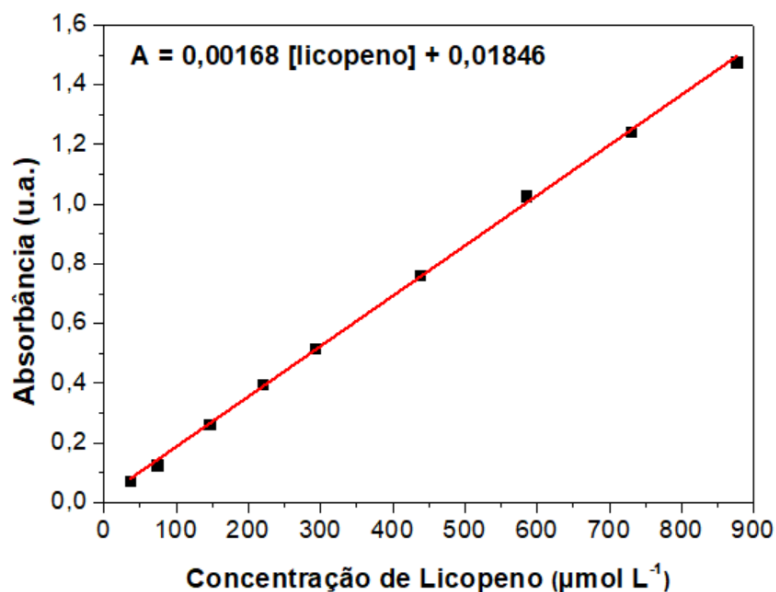


Fonte: O autor.

O comprimento de onda de máxima absorção (487 nm) foi empregado para a construção da curva analítica (Figura 21), sendo a lei de Beer obedecida nos limites de concentração entre $36,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $876,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, indicando uma ampla faixa linear.

A equação da reta obtida foi: $A = 0,00168 [\text{licopeno}] + 0,01846$, com coeficiente de correlação igual a 0,999.

Figura 21: Curva analítica para determinação de licopeno 487 nm (absorbância em função concentração de licopeno).



Fonte: O autor.

5.7 Análise individual do licopeno pelo aplicativo PhotoMetrix PRO®

A curva de calibração por meio do aplicativo foi obtida na mesma faixa de concentração de licopeno empregada no método espectrofotométrico, ou seja, de 34,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 876,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nas configurações, optou-se pelo tamanho da região de interesse de 64 x 64 pixels, o uso do *flash* e vetor RGB para análise univariada.

A Figura 22 exibe a coloração do branco, bem como de cada amostra em diferentes concentrações de licopeno, conforme capturado pelas imagens do aplicativo.

Figura 22: Relação da coloração e concentração das amostras de licopeno obtidas por meio do aplicativo PhotoMetrix PRO®.

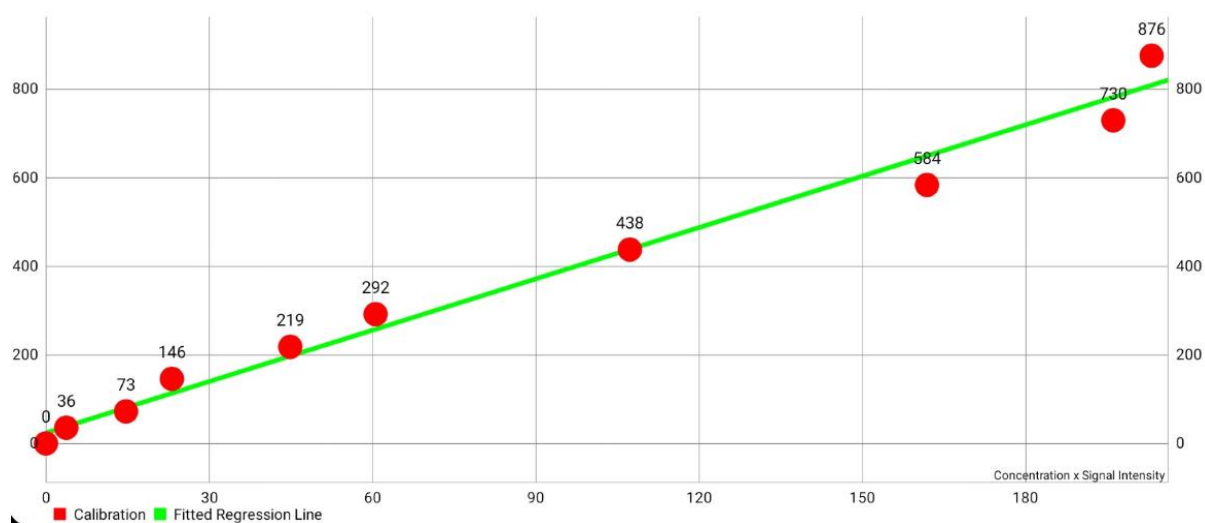
| Univariate - Vector Calibration | |
|--|-----------------------------|
| Points/ROI: | 10 / 64 x 64 |
| Date/Local: | 10/10/2023 @ curvalicopeno1 |
| <input type="button" value="Send"/> <input type="button" value="Calibration data"/> <input type="button" value="Linear equation"/> | |
| Calibration info | |
| Caliber: 1 | Concentration: 0.0 % |
| Caliber: 2 | Concentration: 36.5 % |
| Caliber: 3 | Concentration: 73.0 % |
| Caliber: 4 | Concentration: 146.0 % |
| Caliber: 5 | Concentration: 219.0 % |
| Caliber: 6 | Concentration: 292.0 % |
| Caliber: 7 | Concentration: 438.0 % |
| Caliber: 8 | Concentration: 584.0 % |
| Caliber: 9 | Concentration: 730.0 % |
| Caliber: 10 | Concentration: 876.0 % |

Fonte: Aplicativo PhotoMetrix PRO®.

A curva analítica construída para a quantificação de licopeno via aplicativo PhotoMetrix PRO® é apresentada na Figura 23.

A equação da reta obtida foi: $A = 0,00168 [\text{licopeno}] + 0,01846$, com coeficiente de correlação igual a 0,991.

Figura 23: Curva analítica para quantificação de licopeno obtida pelo aplicativo PhotoMetrix PRO®.



Fonte: Aplicativo PhotoMetrix PRO®.

5.8 Quantificação individual de licopeno

A fim de avaliar a confiabilidade da utilização do método analítico em comparação com o método espectrofotométrico, quantificou-se licopeno em solvente, utilizando as equações das retas obtidas nas curvas analíticas.

Os resultados obtidos para as determinações em diferentes concentrações são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados dos ensaios de recuperação de licopeno empregando as curvas analíticas obtidas.

| | | Espectrofotometria UV-Vis | | PhotoMetrix PRO® | |
|--------------------------------|--|---|-------------------|---|-------------------|
| Amostra | Valor teórico ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Valor Previsto ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Erro relativo (%) | Valor Previsto ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | Erro relativo (%) |
| 01 | 136,9 | 139,0 | 1,5 | 137,1 | 0,1 |
| 02 | 273,7 | 262,8 | -4,0 | 280,8 | 2,6 |
| 03 | 410,6 | 402,1 | -2,1 | 422,5 | 2,9 |
| 04 | 547,5 | 537,8 | -1,8 | 547,1 | -0,1 |
| 05 | 657,0 | 642,6 | -2,2 | 675,7 | 2,8 |
| Recuperação média (n=5) | | 98,30% | | 101,68% | |
| DPR (recuperação) | | 2,03% | | 1,49% | |

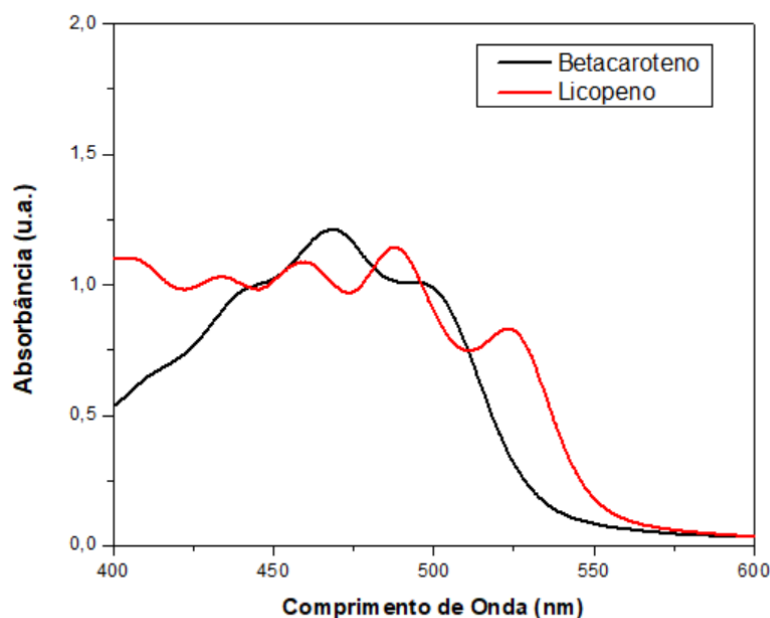
Fonte: O autor.

Como pode ser observado na Tabela 4, foram encontrados valores baixos de erros relativos, que variam de 1,5 a 4,0% para o método espectrofotométrico e de 0,1 a 2,9% para o método colorimétrico não convencional. Os valores dos desvios padrão relativo (DPR), por sua vez, foram inferiores a 5% para os ambos os métodos empregados, o que mostra uma boa precisão dos métodos na determinação da quantificação de licopeno em misturas sintéticas, sugerindo a aplicabilidade deste método em amostras reais.

5.9 Análise simultânea de betacaroteno e licopeno

Devido à grande sobreposição espectral dos sinais analíticos das espécies de interesse (Figura 24), a quantificação simultânea de betacaroteno e licopeno não seria possível pelo método univariado. Provavelmente, os valores previstos seriam maiores que os valores reais, já que os sinais analíticos (absorbância ou vetor RGB) que seriam utilizados para as determinações seriam a soma dos sinais de ambos os analitos. Para estes casos, a análise multivariada torna-se uma alternativa viável.

Figura 24: Espectros de absorção na região do visível dos padrões de betacaroteno (linha preta) e licopeno (linha vermelha) em DMSO.



Fonte: O autor.

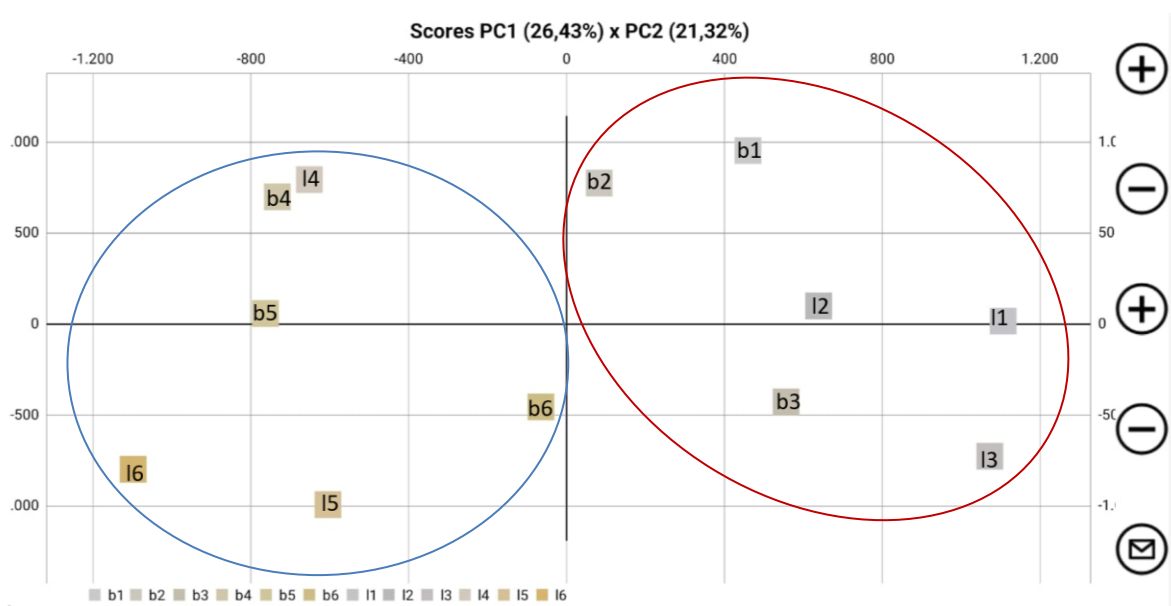
A metodologia de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) foi testada com um conjunto de calibração composto por imagens digitais de 16 misturas dos analitos, na faixa de concentração de $3,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $82,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $36,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $876 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o betacaroteno e licopeno, respectivamente. Entretanto, na fase de calibração, o aplicativo empregado permite a entrada de um único valor de concentração, desta forma, a quantificação simultânea via PLS não foi alcançada.

Posteriormente a Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada com

intuito de diferenciar as amostras dos carotenoides. O conjunto de amostras foi composto por 12 soluções com diferentes concentrações de licopeno e betacaroteno (Tabela 1).

O gráfico de scores para a PCA, criada a partir da matriz das amostras de licopeno e betacaroteno, apresentado na Figura 25, foi gerado no próprio aplicativo. Este gráfico apresenta a disposição espacial das amostras em relação aos seus respectivos agrupamentos. Amostras que possuem menor variância (variação ou diferença) entre si estarão mais próximas, enquanto as amostras que possuem maior variância estarão mais espaçadas.

Figura 25: Gráfico de scores da PC1 versus PC2 para a PCA criada a partir da matriz cores das amostras de licopeno e betacaroteno.



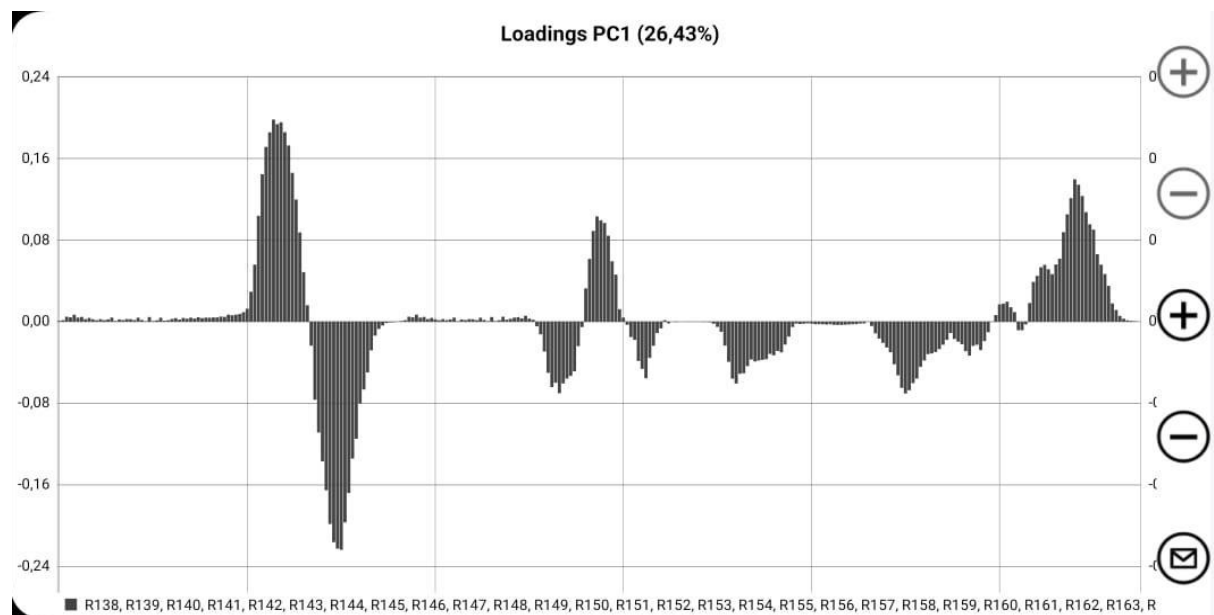
Fonte: Aplicativo PhotoMetrix PRO®, adaptado pelo autor.

No gráfico de RGB, canais individuais, dados centrados na média, a porcentagem de variância explicada pela PC1 é de 26,43%, e pela PC2 é de 21,32% (Figura 25). É possível observar que no lado negativo da PC1 estão as amostras com maiores concentrações de licopeno (l4, l5 e l6) e betacaroteno (b4, b5 e b6), enquanto, no lado positivo da PC1 as amostras com menores concentrações dos analitos (l1, l2, l3, b1, b2 e b3). Desta forma, é possível constatar que PC1 é importante para separar as amostras mais concentradas, das menos concentradas. Por meio da análise de

componentes principais, infelizmente, não foi possível observar separação adequada entre as amostras de licopeno e as amostras de betacaroteno nas faixas de concentração estudadas.

O gráfico de *loadings* que mostra a importância das variáveis originais na construção da PCA, é apresentado na Figura 26.

Figura 26: Gráfico de *Loadings* da PC1 (26,43%) de RGB, canais individuais, centrado na média.



Fonte: Aplicativo PhotoMetrix PRO®.

Neste gráfico observa-se os *loadings* da PC1, que demonstra o quanto cada canal de cor contribuiu para a geração do gráfico de scores, portanto, o R (*red*) foi o canal que mais contribuiu para diferenciar as amostras por gradiente de tonalidade.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que o método colorimétrico não convencional utilizando *smartphone* e o aplicativo PhotoMetrix PRO® mostrou-se uma alternativa eficiente e acessível para análise quantitativa individual dos carotenoides betacaroteno e licopeno em dimetilsulfóxido.

Os resultados obtidos pelo método alternativo foram comparados ao método espectrofotométrico convencionalmente empregado, com bons resultados, indicando a viabilidade de aplicação em amostras reais.

A severa interferência espectral observada para os carotenoides em estudo, impossibilita a quantificação simultânea dos analitos sem manipulação matemática dos dados. Desta forma, análise de componentes principais (PCA) foi testada, entretanto, não foi observada adequada separação entre as amostras de betacaroteno e licopeno nas diferentes concentrações.

É importante ressaltar que esses resultados deste trabalho são preliminares e necessitam de estudos adicionais em trabalhos futuros.

7. REFERÊNCIAS

- ANTONELLI, A; COCCHI, M; FAVA, P; FOCA, G; FRANCHINI, G.C; MANZINI, D; ULRICI, A. Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelet-based classification algorithm, **Analytica Chimica Acta**. v:515, p: 3-13, 2004.
- ASADUZZAMAN, Lycopene - A Review: Chemistry, Source, Health Role, Extraction, Applications, **Annual Research & Review in Biology**, v. 37, p. 87-101, 2022.
- BISWAS, A.K., SAHOO, J., CHATLI, M.K. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of b-carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. **LWT - Food Science and Technology**. V. 44,nº. 8,p. 1809-1813, 2011.
- CALAÇA, N. G. Desenvolvimento de metodologia espectrofotométrica multivariada para o controle de qualidade da associação ácido kójico e hidroquinona em dermocosméticos. 2010. Dissertação Mestrado (Química Aplicada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2010.
- CALAÇA, N. G. Desenvolvimento de métodos voltamétricos utilizando planejamento fatorial para determinação simultâneas de associações farmacêuticas e cosméticas. 2015. Tese Doutorado (Química Aplicada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2015.
- CARDOSO, M. F. C; Dimetilsulfóxido. **Revista Virtual de Química**; v. 3 nº4; p. 344-352; 2011. DOI: 10.5935/1984-6835.20110038
- CARVALHO, P. G. B; MACHADO, C. M. C; MORETTI, C. L; FONSECA, M.E.N. Hortaliças como alimentos funcionais. *Horticultura Brasileira* 24: 397-404, 2006.
- CHRISTIE, O. H. J. Introduction to multivariate methodology, an alternative way? **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 29, p. 177-188, 1995.
- CORDEIRO, G. A., PERATA-ZAMORA P., NAGATA, N., PONTAROLLO, R.; Determinação de misturas de sulfametoxazol e trimetoprima por espectroscopia eletrônica multivariada; **Química Nova**; v. 31; nº 2; p. 254-260; 2008.
- COSTA, A. B. PhotoMetrix: An application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1-8, 2016.
- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, 1999.
- FERREIRA, M. M. *Quimiometria I: calibração multivariada*. Departamento de Físico-Química - Instituto de Química - **Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP** - 13081-970 - Campinas - SP. 1999.
- FISH, W. W.; PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. K. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 309-317, 2002.
- GELADI, P., KOWALSKI, B.R. Partial Least Square Regression: a tutorial, *Anal. Chim. Acta*. nº185, p.1-17, 1986.

- GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E., *Processamento Digital de Imagens*. 3.ed., **Editora Pearson Education - Br.** São Paulo, 2011.
- HAGOS, MULU; REDI-ABSHIRO, M., CHANDRAVANSI, B. S., YAYA, E. E. Development of Analytical Methods for Determination of β -Carotene in Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Flesh, Peel, and Seed Powder Samples. **Int J Anal Chem.** Feb 11, 9363692, 2022.
- HELPER, G. A.; MAGNUS, V. S.; BÖCK, F. C.; TEICHMANN, A.; FERRÃO, M. F.; PhotoMetrix: An application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 28, No. 2, 328-335, 2017.
- JING, Y. *et al.* Advances in the synthesis of three typical tetraterpenoids including β -carotene, lycopene and astaxanthin. **Biotechnology Advances**, v. 61, 108033, 2022.
- JOSEPH SCHIERLE, BERND PIETSCH, ALAN CERESA, CHRISTIAN FIZET, EDWARD H. WAYSEK. Method for the Determination of β -Carotene in Supplements and Raw Materials by Reversed-Phase Liquid Chromatography: Single Laboratory Validation. **JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL**, v. 87, nº. 5, 2004.
- KAKUBARI, S. SAKAIDA, K. ASANO, M. ARAMAKI, Y. ITO, H. YASUI, A. Determination of lycopene concentration in fresh tomatoes by spectrophotometry: A collaborative study. **J AOAC Int.** nov 1; 103(6):1619-1624, 2020.
- KOZAN, L.; BUENO, F.; GARCIA, R.; BENETII, C. N.; TIBURTIUS, E. R.L. Determinação de fenóis totais utilizando o aplicativo Photometrix PRO. **SBQ-Sul** 2022.
- KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, London, v.66, nº.5, p.1003-1010, 1994.
- LOPES, R. E. C.; SANTOS, I. P.; SOARES, F. L. F.; PEREIRA, E. F.; BRAGA, J. W. B. Aplicação da Análise por Componentes Principais (PCA) na identificação de marcas de canetas esferográficas - uma introdução à quimiometria. **XV Encontro Nacional de Ensino de Química (XV ENEQ)**, 2010.
- LOURENÇO, E. C; PAULA, S.; SETTI, G. O.; TOCI, A.T.; PADILHA, J.C.; SILVA, E.M. BOROSKI, M. Determinação do teor de ferro utilizando o aplicativo Photometrix Pro: a tecnologia a favor do Ensino de Química. **Rev. Virtual Quim**, 2021, nº13, p.192-206.
- MANGELS, A.R., HOLDEN, J.M., BEECHER, G.R., FORMAN, M.R., LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v.93, nº.3, p.284-296, 1993.
- MARQUES FILHO, O.; VIEIRA NETO, H. *Processamento Digital de Imagens*, Rio de Janeiro: **Brasport**, 1999. ISBN 8574520098.
- MORELLATO, S. A. Modelos de Regressão PLS com Erros Heteroscedásticos. 2010. Dissertação (estatística) UFSCar, São Carlos, São Paulo.
- MORITZ e TRAMONTE, Biodisponibilidade do licopeno. **Rev. Nutr.**, Campinas, 19(2):265-273, mar./abr., 2006.

- MULLER, A. PIETSCH, B. FACCIN, N. SCHIERLE, J. WAYSEK, E. H. Method for the determination of lycopene in supplements and raw material by reversed-phase liquid chromatography: single laboratory validation. **J AOAC Int.** Nov-Dec: nº91. p.1284-1297, 2008.
- NAGATA, N., BUENO, M. I. M.S., PERALTA-ZAMORA, P. G.; Métodos Matemáticos para correção de Interferências Espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de Raios-X. **Química Nova**, v. 24, nº 4, p. 531-539, 2001.
- PAPPIS, C.; LIBRELOTTO, M.; BAUMANN, L.; PARCKERT, A. B.; SANTOS, R. O.; TEIXEIRA, I. D.; HELFER, G. A.; LOBO, E. A.; DA COSTA, A. B. Point-of-use Determination of Fluoride and Phosphorus in Water through a Smartphone using the PhotoMetrix **App. Br. J. Anal. Chem.**, 6 (25) pp 58-66, 2019.
- PAVIA, D. L.; LAMPAM, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. A.; *Introduction to Spectroscopy*, vol. 3, nº4.; Cengage Learning: Washington, USA, 2010.
- PEDRINI, H.; SCHWARTZ, W. R. *Análise de imagens digitais - princípios, algoritmos e aplicações*. São Paulo: Thomson Learning, 2008.
- PEDROSO, Q, D.; BOROSKI, M. Estudo da atividade antioxidante em suco de uva utilizando aplicativo de smartphone. SBQ-Sul, 2022.
- RODRIGUES, O, M. SANTOS, N.L; EÇA, R. M; ALVES, A. S; GONÇALVES, S, D; OLIVIERA, T; MORAES, S. A; SILVA, M.D. Desenvolvimento de um sistema colorimétrico usando o aplicativo de Photometrix PRO para determinação de ferro (III) em amostras de água. 62º Congresso Brasileiro de Química. Disponível em: https://www.abq.org.br/cbq/trabalhos_aceitos_detalhes,24625.html
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin a carotenoids in prepared, processed, and stored foods*. Arlington: John Snow, 1997.
- SAQUETTI, A. P. Uso do aplicativo photometrix para determinação de ferro em amostras de pólen e suplemento vitamínico. Universidade de Santa Catarina. Acessado em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/223634/TCC%20II%20Ana%20-%20final.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- SARIP, M. S. M. *et al.* β -carotene enrichment in crude palm oil using subcritical water extraction and its relationship with the solubility. **Food Chemistry Advances**, v. 2, 100245, 2023.
- SHAMI, N, J, I, E; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como reagente antioxidante. Departamento de nutrição, Santa Catarina. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732004000200009>
- SILVA, D.I.O. Espectrometria UV-VIS e quimiometria para determinação N,N Dietil-3-Metilbenzamida em repelentes. SBQ-Sul, 2022.
- SILVA, I. C. da S. Determinação da concentração de licopeno em polpa de melancia. **Fundação Educacional do Município de Assis –FEMA – Assis**, 2016.
- SILVA, J. L., *et al.* Avaliação do uso do PhotoMetrix como ferramenta de detecção em medida espectrofotométrica de lítio em solução aquosa. **CONAPESC 2018**.

- SILVA, T; OLIVEIRA, S; SOARES, F; NAGATA, N. Emprego de imagens digitais associadas a análise multivariada para identificação da presença de sacarose em erva-mate. SBQ-Sul, 2022.
- SINESTERRA, M. J. Aplicação de Poli(anilina-co-3-aminobenzóico) e octadecil-trimetóxi-seliano como revestimentos protetores de ligas de alumínio. 2016. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade de São Paulo Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2016.
- SKOOG, Douglas. A.; WEST, Donald. M.; HOLLER, F. James; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica. 8ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006.
- SPEEK A. J. , TEMALILWA, C. R., SCHRIJVER, J. Determination of β -carotene content and vitamin A activity of vegetables by high-performance liquid chromatography and spectrophotometry. **Food Chemistry**, nº19, v.1, p.65-74, 1986.
- STETS, S. Estratégias para análise de poluentes em matrizes ambientais utilizando ferramentas quimiométricas. 2015, 238 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- STUTZ, H.; BRESGEN, N.; ECKL P. M. Analytical tools for the analysis of β -carotene and its degradation products. **Free Radic Res.** nº49. p. 650-80, 2015.
- TRÊS, M. V; FRANCHESCHI, E; BORGES, G. R; DARIVA, C; CORAZZA, F. C; OLIVEIRA, J. V; CORAZZAL, M. L. Influência da temperatura na solubilidade de betacaroteno em solventes orgânicos à pressão ambiente. **Food Science Technol** nº27 v.4, 2007.

ANEXO A

