



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - *CAMPUS I*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA (PGQA)

JÉSSICA DE OLIVEIRA GASPAR

**EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
MICROALGAS NUTRICIONAIS UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS**

SALVADOR - BA

2023

JÉSSICA DE OLIVEIRA GASPAR

**EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
MICROALGAS NUTRICIONAIS UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Química Aplicada da
Universidade do Estado da Bahia - *Campus I*,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Walter Nei Lopes dos
Santos

SALVADOR - BA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Biblioteca Professor **Edivaldo Machado Boaventura - UNEB – Campus I**

G249e Gaspar, Jéssica de Oliveira

Extração e determinação de compostos fenólicos em microalgas nutricionais utilizando imagens digitais/ Jéssica de Oliveira Gaspar. – Salvador, 2023.

48 f. : il.

Orientador: Walter Nei Lopes dos Santos.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada – PGQA. Campus I. 2023.

Contém referências.

1. Microalgas – Processo de imagens – Técnicas digitais. 2. Compostos fenólicos – Fotografia – Técnicas digitais. I. Santos, Walter Nei Lopes dos. II. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. III. Título.

CDD: 579.8

Bibliotecária: Célia Maria da Costa – CRB5/918

JÉSSICA DE OLIVEIRA GASPAR

**EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
MICROALGAS NUTRICIONAIS UTILIZANDO IMAGENS DIGITAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Química Aplicada da
Universidade do Estado da Bahia - *Campus I*,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Química.

Aprovada em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos
Universidade do Estado da Bahia (UNEB)
(Orientador)

Prof. Dr. Madson de Godoi Pererira
Universidade do Estado da Bahia (UNEB)
(Avaliador)

Prof. Dr. Fabio de Souza Dias
Universidade do Estado da Bahia (UNEB)
(Avaliador)

Pelo exemplo de coragem e força. À, minha prima, quem me inspira ser uma pessoa melhor a cada dia. Te dedico este trabalho com amor, Joana Caroline Rabelo Gaspar!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por ter me sustentado, cuidado e nunca me desamparado diante de todas as dificuldades encontradas. Digo sempre, eu sinto o Teu cuidado por mim.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe, meu pai, Lidi e meus irmãos: Cleiton, Jefferson e Laura, por serem a minha base, obrigado pelo amor e carinho em mais esta caminhada.

À minha rede de apoio em Salvador, Suelem, Carol, Luma, Joana e tia Nazinha. Obrigada pelo abrigo, cuidado, gentileza e carinho de sempre. Serei eternamente grata!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos, pelos seus ensinamentos, orientações e supervisão neste trabalho.

Ao meu trio incrível, Caroline Camila, Fabrina Oliveira e Mylena Paiva, por tanta parceria, pelo apoio incondicional, pelos grupos de estudo, pela troca de conhecimento e pela amizade sincera. Sou feliz por esse encontro!

Aos colegas da turma 2021.1 meu eterno agradecimento. Obrigada pelas alegrias, grupos de estudo, toda união e parceria.

Ao grupo de pesquisa e demais colegas de laboratório (Caroline, Jota, Luciano e Isaque) por tornar o dia a dia mais prazeroso e agradável. Em especial à João Honorato e Rafael Costa, por ter me ensinado e me ajudado sempre com tanta disposição. Ganhei eternos amigos!

À Geovani Brandão um agradecimento mais que especial. Muito obrigada pela sua companhia, em todas as semanas durante a fase experimental desse trabalho, pela companhia do almoço, pela parceria na rotina no laboratório, por ter me instruído e me ensinado tanto com tanta gentileza e educação de sempre. Para além deste lugar você estará sempre na minha vida. Você é muito especial, Jou!

À José Tiago Barbosa, pela sua amizade, pelo carinho, pelos ensinamentos, por me encorajar quando eu estive com vontade de desistir e por sempre estar disposto a me ajudar. Obrigada, pelo eterno apoio, desde sempre!

Às minhas amigas de infância (Ingrid Duarte e Thainá Lemos), apesar de distantes, sempre presentes em minha vida, cheias de incentivos e orgulho mais uma vez. Obrigada por serem sempre sensíveis aos meus desabafos.

Aos meus amados amigos da faculdade e do resto da minha vida, Arisa Pinheiro e Gutemberg Silva, por serem meus parceiros em todos os momentos.

Aos professores do PGQA pelos ensinamentos, constantes discussões, contribuições acadêmicas, compreensão e apoio. Em especial à Madson Godoi e Natan Pereira por terem sido tão gentil e empático conosco durante o cumprimento das disciplinas.

Ao Programa de Pós-graduação em Química Aplicada, aos funcionários e a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Neste estudo, foi utilizado um método baseado em colorimetria de imagens digitais para determinação do teor de fenólicos totais em microalgas. A extração dos compostos fenólicos, utilizando como solvente extrator o metanol puro, foi otimizada usando metodologia multivariada e estabelecidas as melhores condições de extração. A reação colorimétrica foi estabelecida de acordo com dados relatados na literatura, utilizando o método Folin-Denis. As imagens digitais das soluções cromogênicas foram capturadas com câmera microscópica HD, armazenadas no formato JPEG e analisadas com base no sistema de cores RBG e a forma de processamento dos dados da imagem foi Sinal analítico = (255 - Red), os limites de detecção e quantificação foram 59,1 e 90 mg 100 g⁻¹, respectivamente. A precisão foi de 1,03% para uma amostra de spirulina. Os ensaios de recuperação com ácido gálico para adição de 2,0, 4,0 e 6,0 µg ml⁻¹ à amostra foram de 98,07%, 105,61% e 101,73%, respectivamente. O método proposto foi aplicado para analisar diferentes amostras de microalgas (spirulina e chlorella formuladas em cápsulas e em pó) e o teor de fenólicos totais variou de 111,68 a 662,15 mg 100 g⁻¹. As comparações foram concordantes mediante a comparação entre as médias. Nesses resultados não houve diferenças significativas daqueles obtidos por espectrofotometria UV-Vis, com nível de confiança de 95%.

Palavras-Chave: Imagem digital. Fenólicos totais. Otimização multivariada.

ABSTRACT

In this study, a method based on colorimetry of digital images was used to determine the total phenolic content in microalgae. The extraction of phenolic compounds, using pure methanol as an extracting solvent, was optimized using multivariate methodology and the best extract conditions were established. The colorimetric reaction was established according to data reported in the literature, using the Folin-Denis method. The digital images of the chromogenic solutions were captured with an HD microscopic camera, stored in JPEG format and analyzed based on the RGB color system, and the image data processing method was analytical signal = (255 - Red), the limits of detection and quantification were 59.1 and 90 mg 100 g⁻¹, respectively. Precision was 1.03% for a spirulina sample. The recovery tests with gallic acid for adding 2.0, 4.0 and 6.0 µg ml⁻¹ to the sample were 98.07%, 105.61% and 101.73%, respectively. The proposed method was applied to analyze different samples of microalgae (spirulina and chlorella formulated in capsules and powder) and the total phenolic content ranged from 111.68 to 662.15 mg 100 g⁻¹. Comparisons were concordant using the *t*-test. There are no significant differences in these results from those obtained by UV-Vis spectrophotometry, with a confidence level of 95%.

Keywords: Digital image. Total phenolics. Multivariate optimization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química de compostos fenólicos.....	13
Figura 2. Reação de substâncias redutoras com reagente de Folin-Denis.....	14
Figura 3. Visão microscópica da spirulina.....	16
Figura 4. Spirulina seca. a) flocos de spirulina. b) spirulina em pó.....	16
Figura 5. Propagação da radiação eletromagnética.....	19
Figura 6. Comprimentos de onda de radiação eletromagnética.....	19
Figura 7. Atenuação de um feixe de radiação por uma solução absorvente.....	20
Figura 8. Representação esquemática do funcionamento do espectrofotômetro.....	21
Figura 9. Diferentes resoluções de uma imagem de acordo com os números de pixel. Quanto maior for os números de pixel maior será a quantidade de informação presente.....	22
Figura 10: Cubo de espaço de cor RGB.....	23
Figura 11: Espaço de cor CMY / CMYK.....	23
Figura 12: Modelo de cores HSI representado no plano triangular. A componente intensidade controla a luminosidade de preto para o branco.....	24
Figura 13: Espaço de cor Lab.....	24
Figura 14: Sistema de aquisição de imagens (vista externa).....	30
Figura 15: Sistema de aquisição de imagens (vista interna). (1) Porta cubeta; (2) Câmera microscópica; (3) Lâmpada de led.....	30
Figura 16: Seleção da região de interesse.....	31
Figura 17: Extração dos dados RGB.....	31
Figura 18: Superfície de resposta do planejamento de misturas.....	35
Figura 19: Gráfico de pareto para o planejamento fatorial.....	35
Figura 20: Superfície de resposta para o planejamento Box Behnken.....	36
Figura 21: Superfície de resposta para o planejamento Box Behnken.....	37
Figura 22: Superfície de resposta para o planejamento Box Behnken.....	37
Figura 23: Imagens digitais das soluções padrão de ácido gálico.....	38
Figura 24: Dados RGB das soluções padrões.....	40
Figura 25: Curva Analítica ($R^2 = 0,9983$) obtida pelo canal R (Red) e a curva Analítica ($R^2 = 0,9992$) obtida com o espectrofotômetro para a determinação de fenólicos totais.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Matriz de planejamento de misturas simplex-centróides. “PC” refere-se ao ponto central.....	32
Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial completo de dois níveis com valores codificados e reais. “PC” refere-se ao ponto central.....	33
Tabela 3: Matriz de planejamento Box Behnken com valores codificados e reais. “PC” refere-se ao ponto central.....	34
Tabela 4: Leitura dos valores médios das soluções padrões de ácido gálico do canal R (Red) adquiridos no software Chemostat.....	38
Tabela 5: Leitura dos valores médios das soluções padrões de ácido gálico do canal G (Green) adquiridos no software Chemostat.....	39
Tabela 6: Leitura dos valores médios das soluções padrões de ácido gálico do canal B (Blue) adquiridos no software Chemostat.....	39
Tabela 7: Curva de calibração para a determinação de fenólicos totais...	40
Tabela 8: Comparativo entre os parâmetros analíticos entre colorimetria de imagem digital e espectrofotometria.....	41
Tabela 9: Resultados obtidos para o teste de recuperação com adição de ácido gálico à amostra com concentrações de 2, 4 e 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$, pelo método proposto e metodologia de referência. “PAD2”, “PAD4” e “PAD6” referem-se às concentrações de 2, 4 e 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. E, “a” refere-se à amostra.	42
Tabela 10: Resultados obtidos para o teste t pareado pelo método proposto e metodologia de referência.....	42
Tabela 11: Resultados obtidos para a determinação de fenólicos totais em amostras de spirulina e chlorella empregando imagens digitais, para $n = 3$ com nível de confiança (95%). “S” refere-se à amostra de spirulina e “C” à amostras de chlorella - “*” refere-se as amostras em pó.....	43

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	12
2.0 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1 Compostos Fenólicos.....	13
3.1.1. Método de identificação e quantificação dos compostos fenólicos.....	14
3.2 Microalgas.	15
3.2.1 Spirulina.....	16
3.2.2 Chlorella.....	17
3.3 O espectro eletromagnético.....	18
3.4 Espectrofotometria de absorção molecular UV-VIS.....	20
3.4.1 Instrumentação analítica para análises na região do UV-VIS.....	21
3.5 Imagem Digital.....	21
3.5.1 Formação da imagem.....	21
3.5.2 Uso de imagens digitais em química analítica.....	26
3.6 Quimiometria.....	27
4.0 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	28
4.1 Instrumentação.....	28
4.2 Amostras e reagentes.....	28
4.3 Preparo das soluções.....	29
4.4 Sistema de aquisição de imagens digitais.....	30
4.5 Realização das análises por imagens digitais.....	31
4.6 Otimização do processo de extração.....	31
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 Resultados do processo de otimização da extração do conteúdo fenólico total.....	35
5.2 Resultados das análises químicas a partir do sistema de cores RGB.....	38
5.3 Parâmetros analíticos do método de análise para determinação de fenólicos totais.....	40
5.4 Determinação de fenólicos totais em amostras de microalgas.....	42
6.0 CONCLUSÃO	43
7.0 PROPOSTAS FUTURAS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1.0 INTRODUÇÃO

As mudanças nos hábitos alimentares vêm se tornando cada vez mais necessárias diante do aumento na utilização de produtos processados e industrializados. Pode-se observar maior procura por alimentos benéficos para a saúde no intuito de aumentar a qualidade de vida. Neste contexto, nota-se o desenvolvimento e a utilização de microalgas cotidianamente na alimentação humana (PLAZA *et al.*, 2009).

Muitas espécies de algas têm grande relevância econômica para a sociedade humana, pois elas são utilizadas como alimento, por alguns povos, ou matéria prima pela indústria com aplicações alimentares, farmacêutica, cosmética, tintas, entre outras (PRIYADARSHANI; RATH, 2012). O grande interesse da indústria farmacêutica é devido algumas espécies de microalgas gerarem compostos bioativos como antioxidantes e antibióticos. Ademais, na indústria alimentar, são utilizados como suplementos alimentícios para o consumo humano, pois há altos teores de proteínas, polissacarídeos e vitaminas (HARUN *et al.*, 2010).

Dentre esses bioativos, têm-se os compostos fenólicos, que possuem um ou mais polifenóis, hidroxilas ligadas a um anel benzênico. (MANACH *et al.*, 2004). As microalgas, por sua vez, são fontes de antioxidantes naturais e o método de determinação destes comumente utilizado tem sido espectrofotometria de absorção molecular.

As medidas baseadas na luz ou outras formas de radiação eletromagnética são amplamente empregadas em química analítica (SKOOG *et al.*, 2006, p.670). Contudo, os métodos tidos como convencionais vêm sendo adaptados com a utilização de imagens digitais. Estrategicamente, a colorimetria de imagem digital permite a redução de custos, desenvolvimento de sistemas miniaturizados e automatizados que, para coleta de imagens e a sua digitalização, utilizam alguns instrumentos, como telefones celulares, câmeras digitais, webcams, scanners, etc (COSTA *et al.*, 2023; FAN *et al.*, 2021; PORTO *et al.*, 2019).

Trabalhos foram publicados, artigos científicos, dissertações e teses focando a construção e aplicação de sistemas para aquisição de imagens digitais como alternativa metodológica para análises colorimétricas. Entre essas pesquisas, podemos destacar algumas como Costa *et al.* (2023), Neto *et al.* (2022), Porto *et al.* (2019). O desenvolvimento tecnológico tem proporcionado o acesso e integral da sociedade a novas tecnologias de forma simples, de fácil manuseio e com preços acessíveis. Desse modo, a proposta deste trabalho foi utilizar imagens digitais para determinação de fenólicos totais em microalgas adquiridas nas cidades de Salvador, Catu e Alagoinhas, Bahia, Brasil.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Validar um método analítico para determinação da concentração de compostos fenólicos em algas nutricionais baseado em imagens digitais.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar método de extração a partir de otimização multivariada;
- Determinar concentração compostos fenólicos totais baseado no sistema de cores RGB;

3.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Compostos Fenólicos

Os cuidados com a saúde humana através de uma alimentação saudável impulsionam o consumo de alimentos ricos em nutrientes e em compostos bioativos para melhora na qualidade de vida (PLAZA *et al.*, 2009). Sendo assim, juntamente com uma alimentação equilibrada, o organismo é capaz de neutralizar o excesso de radicais livres através de antioxidantes endógenos e exógenos (BARREIROS, *et.al*, 2006).

O efeito protetor advém do efeito antioxidante de compostos, representados principalmente pelos fenóis, que são subprodutos do metabolismo vegetal (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; GIADA; MANCINI FILHO, 2006) que estão abundantemente presentes em frutas e vegetais ajudando a equilibrar e reduzir o estresse oxidativo e suas consequências (DERNER *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos são compostos com um ou mais grupos hidroxila (polifenólicos) ligados ao anel benzênico. Os fenóis incluem compostos que possuem apenas um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila (**Figura 1**). Os polifenóis, os quais incluem aqueles compostos fenólicos que possuem vários anéis fenólicos em sua estrutura (**Figura 1**) (WATERHOUSE, 2002).

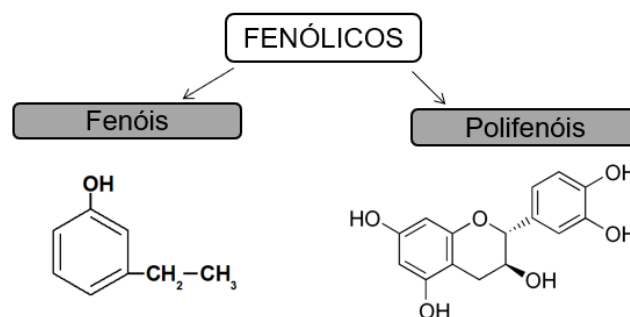


Figura 1: Estrutura química de compostos fenólicos.

Fonte: Adaptada < <https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/fenolis.htm>>

Os dois principais grupos de polifenóis são os ácidos fenólicos e os flavonóides. Os ácidos fenólicos podem ser classificados em ácidos benzóicos e derivados e ácidos cinâmicos e derivados. As subclasses mais importantes de flavonóides são flavonóis, flavononas, flavanonas, isoflavonas e flavonóis (SATO et al., 1996).

A composição dos polifenóis nos alimentos pode variar dependendo do tipo, época de colheita, fatores ambientais, processamento e armazenamento (MANACH et al., 2004). Em plantas, são compostos importantes para o crescimento e reprodução da espécie e atuam também na pigmentação destas. Já nos alimentos são responsáveis pela coloração, sabor e aroma (ANGELO e JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos também apresentam vários efeitos biológicos, como efeitos antioxidantes, mutagênicos, antibacterianos, antiaterosclerose, doenças coronarianas ou anticancerígenos. Seu uso *in vitro* ou *in vivo* e em animais tem sido estudado para minimizar ou eliminar o aparecimento ou progressão de diversas doenças humanas, incluindo câncer, artrite e enfisema, resultantes de dano oxidativo (CHUNG et al., 2011).

3.1.1 Método de identificação e quantificação dos compostos fenólicos

Dentre as metodologias para a qualificação dos antioxidantes, pode-se citar a mais utilizada, simples, conveniente e altamente reprodutível é a de Folin-Ciocalteu ou Folin-Denis (Santos et al., 2017, TOMEI; SALVADOR, 2011). As substâncias presentes no reagente de Folin-Denis são o tungstato de sódio e ácido fosfomolibdico e a reação redox (**Figura 2**) ocorre em pH = 12,44. Por isso, após a adição do reagente adiciona-se uma solução de carbonato de sódio adquirindo-se uma coloração azul e realiza-se a medida de absorvância no comprimento de onda de 760 nm (MARCUCCI et al., 2021; SANTOS et al., 2017).

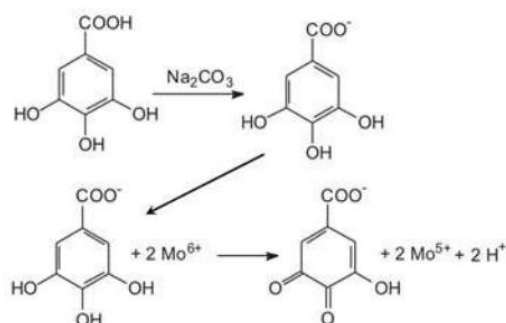


Figura 2: Reação de substâncias redutoras com reagente de Folin-Denis.

Fonte: (PIRES et al., 2017).

3.2 Microalgas

As microalgas são organismos microscópicos (2–200µm) e unicelulares que existem não apenas em ecossistemas aquáticos, mas também em ecossistemas terrestres. Portanto, representam uma enorme variedade de espécies que podem viver nos mais diversos ambientes. A sua classificação tem sido tradicionalmente orientada pela pigmentação, ciclo de vida e estruturas celulares básicas (ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017).

As microalgas podem ser utilizadas para diversos fins comerciais, tais como: tratamento de águas residuais e redução de dióxido de carbono; nutrição humana; alimentação animal e vida aquática; cosméticos; pigmentos como astaxantina, β-caroteno e ficobiliproteínas; produção de isótopos estáveis; biofertilizante; para a síntese de medicamentos antimicrobianos, virais, bacterianos e anticancerígenos (RIZWAN et al., 2018).

Para a produtividade da biomassa das microalgas requerem principalmente três componentes básicos para crescer, incluindo luz solar, água e uma fonte de carbono. Contudo, há outros parâmetros de cultura que podem ser otimizados para alcançar máxima produtividade, como, a temperatura, pH e nutrientes (ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017; RIZWAN et al., 2018).

As microalgas possuem um sistema biológico eficiente, capaz de utilizar a luz solar para produzir substâncias orgânicas. Elas produzem diversos antioxidantes, carotenóides, polímeros enzimáticos, lipídios, corantes naturais, ácidos graxos poliinsaturados, peptídeos, toxinas e esteróis, que são utilizados em diversos produtos industriais (RIZWAN et al., 2018). Também podem produzir vários compostos que podem ser utilizados na indústria farmacêutica e em pigmentos naturais (ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017; RIZWAN et al., 2018)

A biomassa de microalgas fornece proteínas de maior qualidade do que vegetais, arroz e trigo, mas menos do que proteínas animais, como leite e carne. As microalgas produzem esteróis, que são usados no tratamento de doenças cardiovasculares. Elas, também, produzem muitos compostos antioxidantes, o qual têm a capacidade de proteger contra o estresse oxidativo (ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017).

Algumas das principais espécies de microalgas utilizadas na fabricação de produtos comerciais são *Arthrospira* (spirulina), *Chaetoceros*, *Chlorella*, *Dunaliella* e *Isochrysis* (ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017). Dentre estas, pode-se destacar a utilização da spirulina e a *Chlorella* que, geralmente, são mais comercializadas como cápsulas, comprimidos ou em pó elas têm sido exploradas como fontes de várias pesquisas.

3.2.1 Spirulina

A spirulina é uma cianobactéria fotossintética planctônica que forma enormes populações em águas tropicais e subtropicais (incluindo América, México, Ásia e África Central) que, contêm grandes quantidades de sais de pH alcalino, como carbonato e bicarbonato (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017). Ela tem aproximadamente 0,1 mm de diâmetro e geralmente assume a forma de pequenos filamentos verdes torcidos em espirais (**Figura 3**) (SARANRAJ; SIVASAKTHI, 2014).



Figura 3: Visão microscópica da spirulina.
Fonte: (ASGHARI et al., 2016).

A spirulina é uma microalga consumida há décadas por seu alto valor nutricional e benefícios à saúde (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017). Estudos recentes indicam que a Spirulina, uma alga verde-azulada unicelular (**Figura 4**), pode conter vários benefícios à saúde e propriedades medicinais, sendo também capaz de atuar como agente antioxidante e anti-inflamatório (ASGHARI et al., 2016).



Figura 4: Spirulina seca. a) flocos de spirulina. b) spirulina em pó.
Fonte: (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

Hoje, a spirulina é considerada um superalimento. Nela contém quase todos os componentes encontrados em um alimento integral ideal e existe uma quantidade significativa de micro e macronutrientes. Combate o envelhecimento, estresse oxidativo, diabetes, doenças

cardiovasculares, hipertensão, artrite, infertilidade e câncer (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

Sua composição química em peso seco contém 60 e 70% (do peso seco) de proteínas, carboidratos, vitaminas como provitamina A, vitamina C, vitamina E, minerais como ferro, cálcio, cromo, cobre, magnésio, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco. Também contém ácidos graxos essenciais, ácido linolênico (GLA), pigmentos como clorofila, ficocianina e carotenos (ASGHARI et al., 2016; SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

3.2.2 Chlorella

A espécie *Chlorella vulgaris* é uma alga é uma alga verde unicelular de água doce que, pertence à classe Chlorophyceae. Cada célula de Chlorella tem de 2 a 8 μm de espessura e não possui flagelos (RANI; SANDAL; SAHOO, 2018).

Dela pode-se obter pigmentos como: clorofila a e b, β -caroteno e xantofilas e o amido como sua fonte fundamental de reserva energética (RANI; SANDAL; SAHOO, 2018). É rica em fontes de ácido ascórbico, tocoferol, vitaminas, minerais e proteína. Tanto a utilização da biomassa in natura ou dos extratos algais das mais diversas classes, têm demonstrado resultados promissores em diferentes interesses econômicos, como nas indústrias nutracêutica e farmacêutica (RANI; SANDAL; SAHOO, 2018; DANTAS, 2013).

Os extratos de chlorela têm efeitos benéficos à saúde humana, como antitumorais, antioxidantes, antiinflamatórios e antimicrobianos. Foi demonstrado que a Clorela reduz a pressão arterial e os níveis de colesterol e acelera a cicatrização de feridas. e fortalece o sistema imunológico. Também tem a capacidade de aliviar os sintomas e melhorar o estilo de vida em pessoas com fibromialgia, hipertensão e colite ulcerosa (LIU; CHEN, 2014; RANI; SANDAL; SAHOO, 2018; SAFI et al., 2014).

Devido ao seu alto teor de proteínas e abundância de carotenóides, vitaminas e minerais, a chlorella têm sido substituídas em refeições para os humanos e agora é amplamente utilizado produzido como alimento saudável na Alemanha, China, Japão e vários outros países asiáticos. Ela, também, tem sido utilizada como ingrediente para produtos de cosméticos e alimentícios. Há relatos da utilização de spirulina e chlorela em produtos de cuidados com a pele para o estímulo de colágeno. Em produtos alimentícios relata-se o enriquecimento com a biomassa de chlorela, como por exemplo, em massas de espaguete (RANI; SANDAL; SAHOO, 2018).

A *Chlorella vulgaris* pode ser facilmente cultivada com nutrientes baratos e tem uma taxa de crescimento mais rápida em comparação com culturas energéticas terrestres e alta produtividade de biomassa. Os mais variados benefícios em relação a saúde e as suas aplicações

demonstradas na literatura sugere a capacidade da *Chlorella* ser um super alimento para o futuro (RANI; SANDAL; SAHOO, 2018).

3.3 O espectro eletromagnético

Por muitos séculos, a humanidade considerou a existência de fenômenos como o nascer e o pôr do sol, os relâmpagos e trovões, a tempestade e o arco-íris como manifestações da vontade divina. Entretanto, nesse período existiam aplicações práticas relacionadas à luz e à visão (FORATO, 2015).

Na escola pitagórica, a visão era explicada como a luz que entra no olho, sai dele e atinge os objetos e retorna a eles. Platão argumentou que a visão era atribuída a partir do encontro dos raios que eram emitidos tanto no olho quanto nos objetos luminosos (GOMES, 2017). René Descartes foi um dos filósofos mais influentes do século XVII, que se dedicou ao estudo da luz e dos seus fenômenos. Desenvolveu suas ideias sobre óptica a partir de 1620 e esta recebeu sua primeira versão no livro *Le monde* (MARTINS; SILVA, 2015).

Fazendo experiências com prismas, Boyle mostrou que a causa imediata da cor é a própria luz modificada. Provavelmente inspirado pelos experimentos de Boyle, Newton registrou suas reflexões sobre a luz e aos fenômenos luminosos como reflexão, ondulação e refração com base em experimentos com a luz solar e prismas. Seus experimentos revolucionaram esse tipo de pesquisa e inspiraram estudos ainda mais profundos nos séculos subsequentes (MARTINS; SILVA, 2015).

A radiação eletromagnética provém da energia que passa através espaço em alta velocidade. Pode ser representado como ondas propriedades como comprimento de onda, frequência, velocidade e amplitude ou, como partículas chamadas fótons ou quanta (SKOOG et al., 2006).

A luz visível faz parte de um conjunto de vibrações eletromagnéticas representada como um campo elétrico e magnético perpendiculares entre si, oscilando senoidalmente (**Figura 5**). A amplitude de uma onda é medida da intensidade do campo elétrico ou magnético a partir do eixo x até o ponto máximo da onda. O período, p , é o tempo necessário em segundos para que dois máximos ou mínimos contínuos passem por um ponto fixo determinado no espaço. O número de oscilações que ocorrem por segundo, é chamada de frequência, ν , e é igual a $1/p$. E o comprimento de onda, λ , é a distância entre dois pontos máximos ou mínimos contínuos de uma onda (SKOOG et al., 2006).

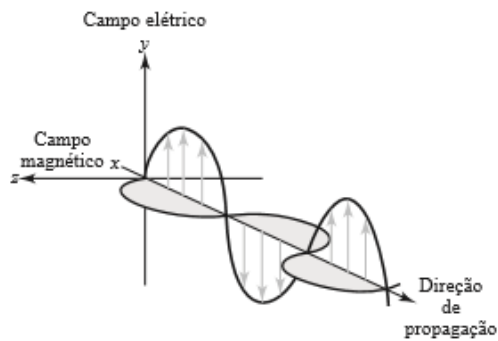


Figura 5. Propagação da radiação eletromagnética.
Fonte: Adaptada de Skoog (2006).

No vácuo, a luz move-se com sua velocidade máxima. Essa velocidade, à qual é dado o símbolo especial c , é igual a $2,99792 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ (SKOOG, 2006, p. 672). Quando a radiação eletromagnética interage com um ambiente contendo matéria, ela se move a uma velocidade menor que c devido à interação da luz e dos elétrons dos átomos ou moléculas do meio (SKOOG et al., 2006).

Segundo Atkins (2012):

Se o comprimento de onda da luz é muito pequeno, um número muito grande de oscilações completas chega ao ponto a cada segundo. Se o comprimento de onda é grande, um número muito menor de oscilações completas chega ao ponto a cada segundo. Um comprimento de onda curto corresponde, por tanto, a uma radiação de alta frequência; um comprimento de onda longo, a uma radiação de baixa frequência (Atkins & Jones, 2012, p.4).

A relação precisa segue a seguinte equação: Comprimento de onda \times frequência = velocidade da luz, ou $\lambda\nu = c$. Comprimentos de onda diferentes correspondem a regiões diferentes do espectro eletromagnético (**Figura 6**), com regiões espectrais que agregam raios γ (gama), os raios X, ultravioleta (UV), visível, infravermelho (IV), micro-ondas e radiofrequência (RF).

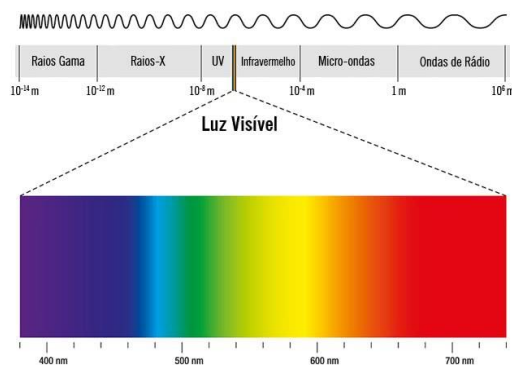


Figura 6. Comprimentos de onda de radiação eletromagnética.
Fonte: <<https://www.todamateria.com.br/espectro-eletromagnetico/>>

3.4 Espectrofotometria de absorção molecular UV-VIS

Os métodos espectroscópicos baseiam-se na medida da interação entre a radiação eletromagnética e os átomos ou as moléculas do analito, ou ainda a produção de radiação pelo analito (SKOOG et al., 2006).

A absorção da energia quantizada causa interações das moléculas com a radiação eletromagnética, gerando transições eletrônicas junto à transições vibracionais e, a partir daí, há produção do sinal analítico (SKOOG et al., 2006). Sendo assim, o que acontece é que a radiação absorvida é proporcional à concentração do analito na amostra. Essa determinação consiste em um gráfico de absorbância em função da concentração e, assim, possibilita a quantificação e/ou identificação do analito. Esta relação é conhecida como lei de Lambert-Beer ou lei de Beer (**Figura 7**).

$$T = P/P_0 \rightarrow \%T = P/P_0 \times 100$$

A espectrofotometria de absorção molecular está baseada na medida da transmitância, T , que é definida como a fração da luz original que passa pela amostra (HARRIS, 2008). Quando a radiação eletromagnética P_0 , que se refere a um feixe de luz, atinge uma amostra em um recipiente transparente b , a radiação eletromagnética que sai do outro lado da amostra é P . Desta forma, se houver absorção de alguma quantidade da radiação pela amostra, teremos que $P < P_0$.

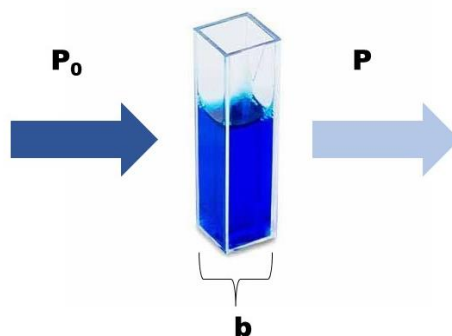


Figura 7. Atenuação de um feixe de radiação por uma solução absorvente.

Fonte: Adaptada <<https://www.lojanetlab.com.br/acessorios/cubeta-de-quartzo-e-vidro/cubeta-descartavel-de-4-5-ml-pacote-com-100-unidades>>

Atualmente, existem diversas técnicas espectroscópicas, em destaque estão aquelas que têm uma maior aplicação, como: Espectrofotometria de Absorção na Região do UV-Visível, Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho Médio com Transformada de Fourier, Espectroscopia de Absorção Atômica, Espectroscopia de Emissão Atômica, Espectroscopia de Fluorescência e Ressonância Magnética Nuclear (VAZ JÚNIOR, 2010).

3.4.1 Instrumentação analítica para análises na região do UV-VIS

Os equipamentos utilizados na espectrofotometria apresentam basicamente os cinco componentes demonstrados na **Figura 8**.

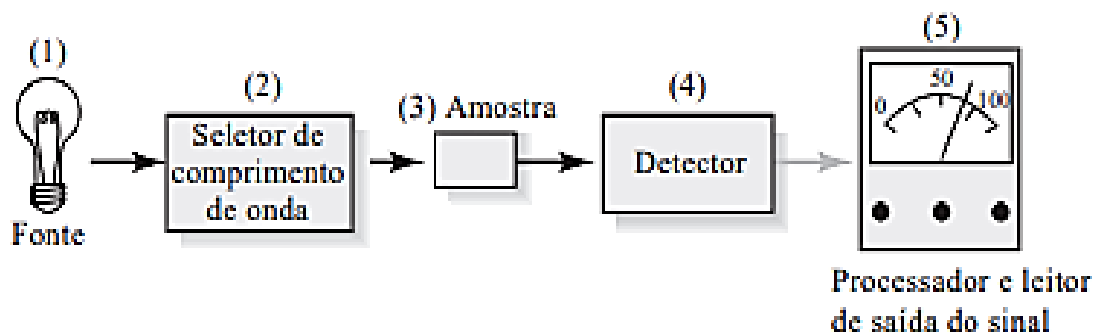


Figura 8. Representação esquemática do funcionamento do espectrofotômetro de feixe simples.

Fonte: Skoog (2006).

(1) **Fonte luminosa:** Uma fonte adequada para realizar medidas espectroscópicas deve produzir um feixe de radiação que seja suficientemente capaz de obter uma medida. Além disso, sua potência deve se manter estável por bons períodos. Utiliza-se lâmpadas de deutério ou hidrogênio e lâmpadas de filamento de tungstênio como fontes de radiação. (2) **Seletor de comprimento de onda:** São utilizados para selecionar um comprimento de onda específico, nos instrumentos podem ter um ou mais dispositivos para delimitar o comprimento de onda que o analito apresente o maior valor de absorvidade. Esses dispositivos melhoram muito a seletividade e sensibilidade de um instrumento. (3) **Amostra:** a solução com analito. (4) **Detector:** um dispositivo que indica a existência de algum fenômeno físico. Nos equipamentos modernos, convertem a quantidade de intensidade da radiação absorvida, em sinais. (5) **Processador e leitor de saída de sinal:** Amplifica o sinal elétrico oriundo de um detector como também efetuar operações matemáticas deste sinal. Geralmente, constituído por um circuito eletrônico e, nos instrumentos modernos, por um computador (SKOOG et al., 2006).

3.5 Imagem Digital

3.5.1 Formação da imagem

Uma imagem digital é uma representação visual de dados, que é armazenada e exibida em formato eletrônico. Ela é composta por uma grade de pixels - Picture Element (elementos de imagem), onde cada pixel é um ponto minúsculo, que contém informações de cor e intensidade luminosa (GONÇALVES, 2015). As imagens digitais podem ser em preto e branco (tons de cinza) ou coloridas. Nas imagens coloridas, cada pixel é composto por três canais de

cor: vermelho, verde e azul (RGB), com intensidades diferentes de cada canal para criar uma ampla gama de cores (GONÇALVES, 2015).

A resolução de uma imagem é definida pelo seu tamanho, determinada pelo número de pixels na largura e altura da grade. Quando existe um maior número de pixels concentrados numa imagem, maior informação, ou detalhe, consegue-se tirar desta imagem (**Figura 9**), ou seja, quanto maior a resolução, mais detalhes a imagem pode conter, maior será a o seu tamanho e a qualidade visual da mesma (CARDOSO, 2014, p.17).



Figura 9. Diferentes resoluções de uma imagem de acordo com os números de pixel. Quanto maior for os números de pixel maior será a quantidade de informação presente.

Fonte: Cardoso (2014).

Dispositivos digitais fazem a leitura da cor e converte as informações em valores numéricos (LEÃO, 2005). Os modelos mais utilizados para representação das cores são: RGB (red, green and blue), CMY (*cyan, magenta and yellow*) e CMYK (variante do modelo CMY, onde k denota *Black*), HSI (*hue, saturation, intensity*) e Lab (Luminosidade, a e b) (FAN et al., 2021; KELDA; KAUR; KAUR, 2014).

Em tese, Leão afirma que:

Em uma imagem RGB cada pixel independente tem uma cor resultante de uma mistura de vermelho, azul e verde. Cada uma destas cores tem um valor numérico em uma escala de 0 a 255 níveis de brilho - em uma imagem de 8 bits por canal - onde os três canais juntos resultarão numa imagem com 24 bits. A cor de um pixel pode, então, ser descrita como, por exemplo: R: 32 G: 56 B: 74 (LEÃO, 2005, p.65).

Os modelos de cores RGB, CMY, CMYK, HSI e Lab desempenham papéis fundamentais em várias aplicações, desde exibição de cores em telas até impressão precisa de materiais gráficos e análise de cores em design e ciência.

O modelo de cor RGB (*Red, Green e Blue*) - modelo aditivo usado em dispositivos eletrônicos, as cores são criadas combinando intensidades de vermelho, verde e azul, amplamente utilizado em telas de computador e TVs. Esse modelo é frequentemente

visualizado por um cubo unitário. Cada cor (*Red*, *Green*, e *Blue*) é atribuído a um dos três eixos de coordenadas ortogonais no espaço 3D (**Figura 10**) (FAN et al., 2021; FAZENDA, 2009).

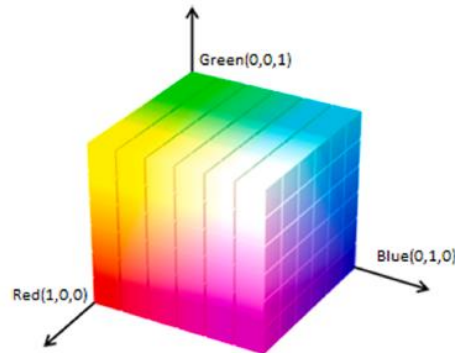


Figura 10: Cubo de espaço de cor RGB
Fonte: FAN et al (2021).

Em cada eixo perpendicular do cubo, as cores mudam em cada ponto definido pelos três números, que se referem a cada componente, R, G e B. Na origem do cubo, a cor preta está localizada em preta (0, 0, 0) e, no lado oposto, está localizada a cor branca (1, 1, 1). Todos esses componentes possuem faixas de cores de 0 a 256 (FAN et al., 2021).

O modelo CMY ou CMYK (**Figura 11**) é contrário ao modelo de cores aditivo RGB, pois baseia-se nas cores primárias subtrativas. CMYK é comumente utilizado em impressão, as cores primárias desse modelo são: *cyan* (C), *magenta* (M), *yellow* (Y), a combinação completa dessas cores resulta em preto e *key* (K). As cores primárias desse modelo são: *cyan* (C), *magenta* (M), *yellow* (Y) e *key* (K). Essas cores são resultado das combinações das cores primárias aditivas RGB. Sendo assim, o branco será (0, 0, 0) e o preto (1, 1, 1) (FAN et al., 2021; FAZENDA, 2009).

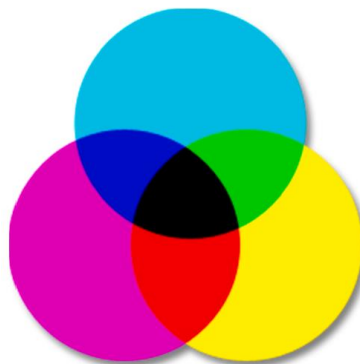


Figura 11: Espaço de cor CMY / CMYK.
Fonte: FAN et al (2021).

O modelo HSI (*Hue*, *Saturation*, *Intensity*) (**Figura 12**) descreve cores em termos de matiz, saturação e intensidade. A matiz (H) representa a cor dominante, a tonalidade (como

vermelho azul ou amarelo) e varia de 0 a 360°. A saturação (S) é a intensidade da cor, ou seja, as variações nos tons das cores e varia de 0 a 100%, em que 0 representa sem coloração (cinza) e 100 a maior intensidade da cor. A intensidade (I) é a luminosidade, também varia de 0 a 100%. Sendo que o 0 representa o preto, ou seja, o menor nível de luz/brilho e 100 o máximo de brilho. Esse sistema é útil em aplicações perceptuais e de design (FAN et al., 2021; TKALEIE; TASIE, 2003).

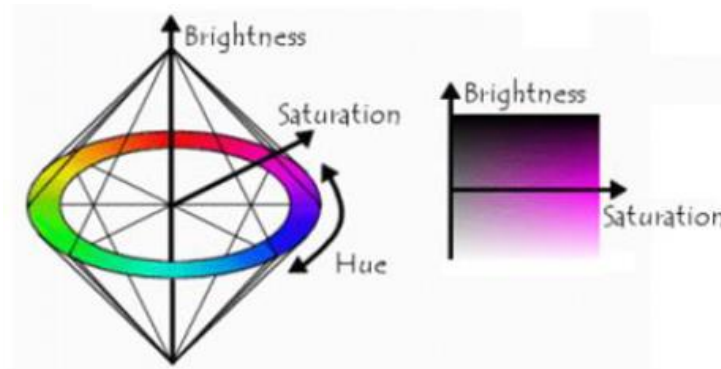


Figura 12: Modelo de cores HSI representado no plano triangular. A componente intensidade controla a luminosidade de preto para o branco.

Fonte: CARDOSO, 2014.

O modelo Lab (*Luminance a, b*) (**Figura 13**) geralmente é utilizado para determinar a cor em alimentos, pois as suas superfícies não transmitem uma cor uniforme. Ele representa a cor nos componentes L, a^* e b^* . O componente L indica o brilho ou luminosidade e varia de 0 a 100. Onde 0 representa preto e 100 para branco. Os componentes a^* e b^* são cromáticas e variam de -120 a +120. Em que, $+a$ significa vermelho e $-a$ significa verde. E, $+b$ representa a cor amarelo e $-b$ a cor azul (CARDOSO, 2014; FAN et al., 2021).

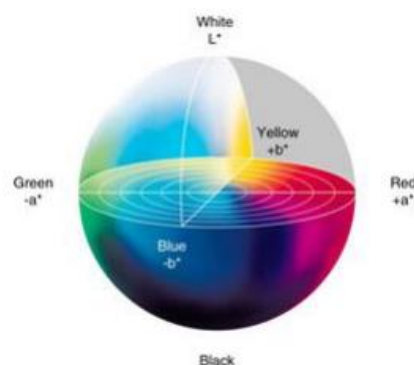


Figura 13: Espaço de cor Lab.

Fonte: < <https://blogdaleart.wordpress.com/2014/09/04/lab-color-o-espaco-de-cor/> >

A imagem pode resultar de uma captura do mundo real através de dispositivos de entrada como scanners ou câmeras digitais, ou podem ser sintetizadas em um computador através de

softwares de desenho ou captura de tela. Após a digitalização, as imagens podem ser manipuladas através de softwares de edição de imagens, os quais não produzem estrutura semântica. Formatos de arquivo como JPEG, PNG, GIF e TIFF são comuns para armazenar imagens digitais. Cada formato tem suas próprias características, como compressão de dados, transparência e suporte a animações (OLIVEIRA; LUCENA, 2012).

A imagem digital baseada em várias arquiteturas e tecnologias para capturar e reproduzir cores com precisão, como espaços de cores, ferramentas para captura de imagem, condições de iluminação e APPs de quantificação de cores e APPs DIC (GONZALEZ; WOODS; COSTA, 2010). Para adquirir uma imagem, se faz necessário apenas dois elementos fundamentais: o dispositivo que registre a imagem (hardware) e iluminação (CARDOSO, 2014).

Para o registro de uma imagem através de uma câmera, é necessário um sensor transdutor de imagem. São comercializados dois tipos de arquiteturas e tecnologias: CCD (*charge-coupled device* em inglês, ou seja, dispositivo de carga acoplada), e CMOS (*complementary metal-oxide semiconductor* em inglês, ou seja, semicondutor complementar de óxido metal), sensores mais comuns de imagem para capturar a luz incidente, que convertem a luz em sinais elétricos, que podem ser processados digitalmente (LYRA, 2008).

Os sensores monitoram a radiação que atinge a lente da câmera, sua tarefa é focar os raios de luz na matriz fotossensível do sensor e, então, o sinal luminoso é convertido em um sinal elétrico e, então, convertido para números binários (CARDOSO, 2014). Para capturar informações de cores, os sensores de imagem em smartphones, geralmente, têm matrizes de filtros de cores, como o filtro Bayer. Este arranjo de cores permite que o sensor capture informações de RGB (vermelho, verde e azul), que são as cores primárias usadas para reproduzir todas as outras cores na tela. O modelo RGB utiliza, como base, a teoria tricromática, no qual todas as cores podem ser obtidas a partir da combinação de três cores primárias (FAZENDA, 2009).

Para quantificar os dados do analito, relacionando-os às imagens digitais, são utilizados alguns softwares. Os softwares de análise de imagens normalmente utilizados pelos pesquisadores incluem “Adobe Photoshop CC, Matlab, Pantone Studio, Digital Colorimeter, ImageJ, Color Pilot, outros customizados pelos fabricantes” (FAN et al., 2021) e PhotoMetrix (BÖCK et al., 2020).

Por ser uma metodologia relativamente simples e de baixo custo, análises colorimétricas por imagens digitais vêm ganhando espaço nos estudos científicos das mais diversas áreas, como destaca Bock e colaboradores (2020) “podemos perceber que esses dispositivos são

explorados em diversas áreas, como na detecção de doenças e indicadores de doenças no campo da medicina, imunoenensaio, controle de qualidade do meio ambiente, análise forense, controle e qualidade de bebidas e alimentos, avaliação da qualidade de produtos farmacêuticos” (BÖCK et al., 2020) e Fan e colaboradores (2021) “metais, metais pesados, herbicidas, pesticidas, antibiótico, indicadores bioquímicos, compostos naturais e bactérias/vírus” (FAN et al., 2021).

3.5.2 Uso de imagens digitais em química analítica

Nos dias de hoje, a técnica de processamento de imagens digitais é cada vez mais importante devido à sua capacidade de execução de análises rápidas, baixo custo, não destrutiva e, quando combinada com os dispositivos mecânicos e instrumentais, substitui esforços humanos no desempenho de um dado processo (CARDOSO, 2014, p. 24-25). Em química analítica, o uso de imagens digitais já vem sendo aplicado e há diversos trabalhos publicados.

Costa e colaboradores (2023) utilizaram imagens digitais capturadas com câmera microscópica HD para determinar o teor de fenólicos totais em amostras de frutas (maçã, goiaba, manga, abacaxi e morango). Eles fizeram um estudo a partir de métodos multivariados para determinar as condições ótimas e a forma de processamento dos dados. A partir do sistema de cores RGB, o canal R foi escolhido e o sinal estabelecido em $(S=255-R)$. Os limites de detecção e quantificação foram de 39 e 57 mg GAE 100 g⁻¹, respectivamente. A precisão, estimada como desvio padrão relativo, foi de 1,4% para uma amostra de polpa de goiaba. O teor de fenólicos totais variaram de 245 a 703 mg GAE 100 g⁻¹ a partir da utilização do método proposto e esses resultados não diferiram significativamente daqueles obtidos por espectrofotometria UV-Vis, com nível de confiança de 95% (COSTA et al., 2023).

Honorato Neto e colaboradores (2022) desenvolveram e otimizaram um sistema que permite a captação de imagens através de um sistema simples construído por tubos de policloreto de vinila (PVC), um microscópio digital e uma minibomba peristáltica, para detecção de uréia em amostras de leite em ultra-alta temperatura (UHT). Os sistemas de cores vermelho, verde e azul (RGB) e matiz, saturação e valor (HSV) foram estudados, com o canal de saturação do sistema de cores HSV selecionado como o sinal analítico. Os resultados foram comparados com os obtidos pela técnica do infravermelho médio e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas a um nível de confiança de 95%. O método proposto foi aplicado em oito amostras de leite UHT, que apresentaram teores de uréia variando de 187 a 386 mg L⁻¹ (SANTOS NETO et al., 2022).

Porto e colaboradores (2019) apresentaram um procedimento, utilizando colorimetria de imagens digitais para a determinação de ácido ascórbico em sucos naturais de frutas (limão,

laranja, uva, caju, limão, abacaxi, tangerina e manga). A região de interesse (ROI) foi determinada e a partir do sistema de cores RGB e utilizaram o canal B, pois foi o que obteve maior sensibilidade. Realizaram a otimização do sistema a partir de análise multivariada e o experimento demonstrou que não houve diferença significativa entre as inclinações obtidas nas curvas de calibração nas condições estudadas. Ao utilizar as condições otimizadas, obtiveram limites de detecção e quantificação de 0,005 e 0,015mg L⁻¹ e a precisão expressa como o desvio padrão relativo de 1,2% para suco de limão com concentração de ácido ascórbico de 24,8mg / 100 g. E, as concentrações variaram de 4,5 a 182,5 mg 100 g⁻¹ (PORTO et al., 2019).

3.6 Quimiometria

A quimiometria é uma área de química que se concentra na aplicação de métodos estatísticos e matemáticos para analisar dados químicos e resolver problemas complexos relacionados à química. Ela é usada para extrair informações úteis de conjuntos de dados químicos, muitas vezes complexos e multidimensionais, e tomar decisões informadas (FERREIRA, 2015). A utilização da quimiometria tem sido facilitado devido aos avanços da informática e eletrônica no desenvolvimento de programas computacionais o que tem permitido a resolução de problemas nas universidades e na indústria (FERREIRA, 2015).

Aplicada a muitas áreas da química, a quimiometria fornece ferramentas para uma compreensão significativa dos dados e pode ser usada para análises quantitativas ou qualitativas, dependendo dos interesses de pesquisa (GONÇALVES, 2015). A ferramentas ganham cada vez mais destaque no contexto da química analítica, tais como: 1) Planejamento de experimentos; 2) Análise multivariada; 3) Calibração multivariada (FERREIRA, 2015, p.17).

A Análise Multivariada, é a análise de dados que envolvem múltiplas variáveis ao mesmo tempo. Ajuda a identificar padrões, tendências e relações complexas nos dados. Técnicas multivariadas incluem análise de componentes principais, análise de agrupamento, análise discriminante, entre outras (FERREIRA, 2015; NOVAES et al., 2017). Dentre elas, pode-se destacar o planejamento de misturas que envolve a execução de experimentos e combinação de diferentes componentes em proporções variáveis para otimizar uma resposta desejada. É frequentemente usado em formulação de produtos, como na indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica (NOVAES et al., 2017).

O Planejamento Fatorial é uma abordagem experimental que envolve a variação simultânea de várias variáveis independentes (fatores) para estudar seu efeito nas variáveis dependentes (respostas). O planejamento fatorial ajuda a entender quais fatores são mais

influentes e como eles interagem (VICENTINI et al., 2011). A avaliação dos resultados de um planejamento fatorial pode ser realizado de diversas formas, como: cálculo de interpretação dos efeitos, gráficos de pareto e gráfico das médias marginais (FERREIRA, 2015).

O Box-Behnken, por sua vez, é um tipo específico de planejamento de experimento que é útil quando o número de fatores a serem estudados é moderado e quando se deseja evitar a necessidade de executar todos os possíveis experimentos. Ele usa uma combinação de valores em níveis intermediários entre os valores extremos dos fatores para estimar suas respostas (FERREIRA et al., 2007).

Essas técnicas e métodos são essenciais na pesquisa e na indústria química, pois permitem a otimização de processos, o desenvolvimento de produtos de alta qualidade e a tomada de decisões informadas com base em dados experimentais (CANDIOTI et al., 2014).

4.0 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Instrumentação

Balança analítica da Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo AUX220, foi usada para medir a massa das amostras de microalgas e reagentes. No processo de extração, foi usada uma mesa agitadora modelo Q225M da Quimis (Diadema, SP, Brasil) e, no processo de pré-concentração dos extratos, um evaporador rotativo modelo 550 da Fisatom (São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado. Sistema de purificação de água modelo Master P&D da Gehaka (São Paulo, SP, Brasil) foi empregado para obter água ultrapura com resistividade de 18,2 M Ω cm. Um espectrofotômetro de absorção molecular UV/Vis modelo SP-22 da Biospectro (Curitiba, PR, Brasil) foi empregado para realizar a determinação espectrofotométrica convencional.

4.2 Amostras e reagentes

Os reagentes utilizados foram: ácido clorídrico 37% (m/m) da Synth (São Paulo, SP, Brasil), etanol, metanol e carbonato de sódio anidro da Êxodo Científica (São Paulo, SP, Brasil), ácido fosfórico, ácido fosfomolibídico e tungstato de sódio dihidratado da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido gálico usado como padrão analítico foi obtido da SigmaAldrich (Saint Louis, MO, EUA). Água ultrapura do sistema de purificação Gehaka Master P&D (São Paulo, Brasil). Amostras de spirulina e chlorella de diversas marcas foram obtidas em diversos estabelecimentos nas cidades de Alagoinhas, Catu e Salvador, Bahia, Brasil. Elas foram adquiridas de forma homogênea em pó e foram armazenadas em dessecador a vácuo.

4.3 Preparo das soluções

Solução estoque de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico

Mediu-se a massa de 10 mg de ácido gálico e dissolveu-se em um béquer de 10 mL com um pouco de água ultra pura e, em seguida, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 10 mL completando seu volume.

Síntese do reagente Folin-Denis

Para o reagente Folin-Denis mediu-se a massa de 5 g de tungstato de sódio e 1 g de ácido fosfomolibdico, solubilizando-as em 38 mL de água ultra pura e 2,5 mL de ácido fosfórico. A mistura foi refluxada por 2h, depois resfriada e diluída por 50 mL em um balão volumétrico (MAGALHÃES et al., 2020).

Solução de carbonato de sódio a 7,5% (m/v)

Mediu-se a massa de 7,5g de carbonato de sódio e dissolveu-se em um béquer de 100 mL com um pouco de água ultra pura e, em seguida, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou o seu volume.

Solução do branco

Em um tubo falcon de 15 mL, com o auxílio de uma micropipeta, adicionou-se 0,2 mL de folin-denis, 0,6 mL de carbonato de sódio e, por fim, adicionou-se 4,2 mL de água ultra pura até completar um volume final de 5 mL.

Preparo das soluções padrões de ácido gálico

Foram preparados 5 mL de cada solução padrão, a partir de diluições da solução estoque de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As alíquotas tomadas foram de 10 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL e 50 μL para as respectivas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico. Em seguida, as soluções ficaram em repouso no escuro por 2h.

Conteúdo fenólico da amostra

Uma alíquota de 25 μL de cada extrato foram retiradas, com o auxílio de uma micropipeta, e transferida para tubo falcon 15 mL. Foram adicionados 4,175 mL de água ultra pura e 0,2 mL de folin-denis. Após 5 min, adicionou-se 0,6 mL de carbonato de sódio, agitando-se ao final. Em seguida, as soluções ficaram em repouso no escuro por 2h (SILVA SAUTHIER et al., 2019).

4.4 Sistema de aquisição de imagens digitais

O sistema para aquisição de imagem (COSTA et al., 2023), conforme **Figura 14**, é composto por uma caixa de madeira de cor branca, medindo 21 x 25 x 30 cm. Suas paredes internas foram cobertas com folha de papel de ofício branco e para iluminar as soluções foi acoplada na tampa da caixa (internamente) uma lâmpada de *led*.

Uma câmera microscópica HD para android (China), com resolução de 1280 x 720 pixels, foi fixada em uma das paredes internas da caixa em frente ao suporte da cubeta instalado em sua base.



Figura 14: Sistema de aquisição de imagens (vista externa).

Fonte: Autoria própria.

Conforme apresentado na **Figura 15**, o sistema desenvolvido só comporta uma cubeta, e, a cada fotografia, só é possível se obter imagem por vez, sendo este o número máximo de amostras que pode ser analisada no sistema de aquisição desenvolvido. Foram estabelecidos, para a aquisição das imagens digitais, uma distância de 8,0 cm entre a câmera e a cubeta e 11165 cm³ para o volume interno da caixa fotográfica.



Figura 15: Sistema de aquisição de imagens (vista interna). (1) Porta cubeta; (2) Câmera microscópica; (3) Lâmpada de *led*.

Fonte: Autoria própria.

4.5 Realização das análises por imagens digitais

Nesta etapa, a cubeta era posicionada no sistema e as imagens das soluções foram capturadas com a câmera microscópica e armazenadas no formato JPEG. Usando-se o aplicativo *Chemostat*, a região de interesse foi determinada (**Figura 16**) e a imagem cortada em um valor padrão de 40 x 40 pixels. Os valores dos canais RGB de cada imagem foram extraídos (**Figura 17**) e registrados.

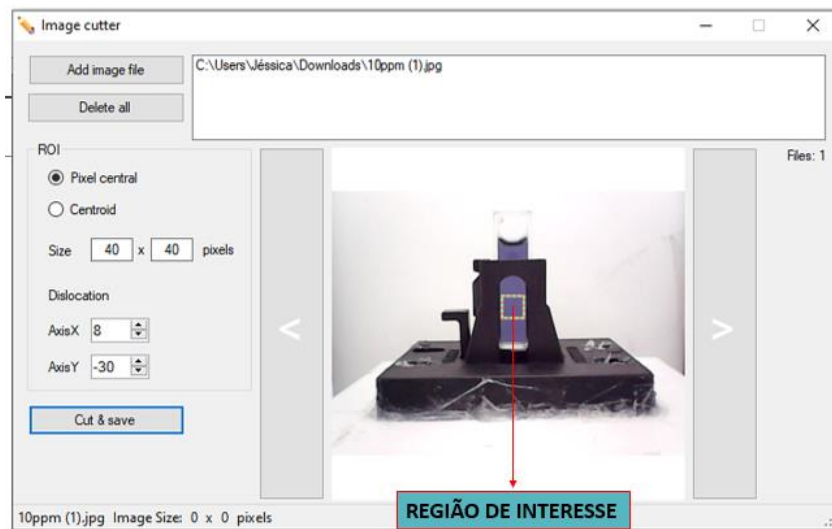


Figura 16: Seleção da região de interesse.

Fonte: Autoria própria.

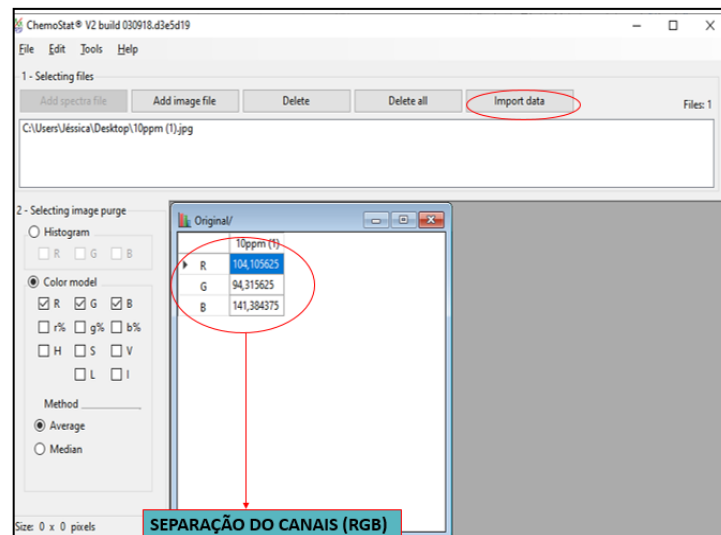


Figura 17: Extração dos dados RGB.

Fonte: Autoria própria.

4.6 Otimização do processo de extração

Para otimização deste processo de extração, empregou-se métodos baseados na análise experimental multivariada e, para demonstração dos resultados, foi utilizado o software STATISTICA versão 7.0. Utilizou-se a amostra de spirulina e a resposta avaliada foi o teor

total de compostos fenólicos, utilizando imagens digitais. Inicialmente, efetuou-se o planejamento de misturas (simplex-centróides) (MAGALHÃES et al., 2020) (**Tabela 1**) para determinar a composição do solvente extrator, avaliando os seguintes solventes: água, metanol e etanol. A massa da amostra foi fixada em 0,5 g e foi determinado 15 mL como volume total de solvente.

Tabela 1: Matriz de planejamento de misturas simplex-centróides. “PC” refere-se ao ponto central.

Exp.	Vol. Metanol (ml)	Vol. Etanol (ml)	Vol. Água (ml)
1	15	0	0
2	0	15	0
3	0	0	15
4	7,5	7,5	0
5	7,5	0	7,5
6	0	7,5	7,5
7	10	2,5	2,5
8	2,5	10	2,5
9	2,5	2,5	10
10 (PC)	5	5	5

Fonte: Autoria própria.

Em seguida, o planejamento fatorial completo em dois níveis (2^3) (**Tabela 2**) foi aplicado para avaliar os seguintes fatores: volume do solvente (15, 30 e 45 ml), tempo de agitação (30, 60 e 90 min) e rotação (100, 250 e 400 rpm) no processo de extração.

Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial completo de dois níveis com valores codificados e reais. “PC” refere-se ao ponto central.

Exp.	Vol. Solvente (ml)	Tempo de agitação (min)	Rotação (rpm)
1	- (15)	- (30)	- (100)
2	+ (45)	- (30)	- (100)
3	- (15)	+ (90)	- (100)
4	+ (45)	+ (90)	- (100)
5	- (15)	- (30)	+ (400)
6	+ (45)	- (30)	+ (400)
7	- (15)	+ (90)	+ (400)
8	+ (45)	+ (90)	+ (400)
9 (PC)	0 (30)	0 (60)	0 (250)
10 (PC)	0 (30)	0 (60)	0 (250)
11 (PC)	0 (30)	0 (60)	0 (250)

Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados obtidos aplicou-se o planejamento Box Behnken (**Tabela 3**) para determinação das melhores condições de extração e os mesmos fatores foram estudados: volume do solvente (20, 35 e 50 ml), tempo de agitação (60, 90 e 120 min) e rotação (150, 300 e 450 rpm). As análises de todos os experimentos envolvidos nos planejamentos experimentais foram realizadas aleatoriamente, em triplicatas e a capacidade de extração foi avaliada a partir de sucessivas extrações.

Tabela 3: Matriz de planejamento Box Behnken com valores codificados e reais. “PC” refere-se ao ponto central.

Exp.	Vol. Solvente (ml)	Tempo de agitação (min)	Rotação (rpm)
1	- (20)	- (60)	0 (300)
2	+ (50)	- (60)	0 (300)
3	- (20)	+ (120)	0 (300)
4	+ (50)	+ (120)	0 (300)
5	- (20)	0 (90)	- (150)
6	+ (50)	0 (90)	- (150)
7	- (20)	0 (90)	+ (450)
8	+ (50)	0 (90)	+ (450)
9	0 (35)	- (60)	- (150)
10	0 (35)	+ (120)	- (150)
11	0 (35)	- (60)	+ (450)
12	0 (35)	+ (120)	+ (450)
13 (PC)	0 (35)	0 (90)	0 (300)
14 (PC)	0 (35)	0 (90)	0 (300)
15 (PC)	0 (35)	0 (90)	0 (300)

Fonte: Autoria própria.

As suspensões resultantes de todos os extratos foram filtradas e esses filtrados transferidos para balões de fundo redondo, sendo, depois, concentrados em um evaporador rotativo a 60 °C e 40 rpm. O material residual foi solubilizado com 1,5 mL de metanol (SILVA SAUTHIER et al., 2019).

Logo após, foi avaliada a capacidade de extração do método em duas etapas. Portanto, após a primeira filtração (primeira etapa de extração), a massa da amostra foi coletada e submetida novamente ao processo de extração (segunda etapa).

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Otimização da extração do conteúdo fenólico total

O planejamento das misturas simplex-centróides indicou que, dentre os solventes testados, a condição máxima de extração foi obtida com metanol puro (**Figura 18**). Desta forma, esta condição foi estabelecida para o solvente extrator.

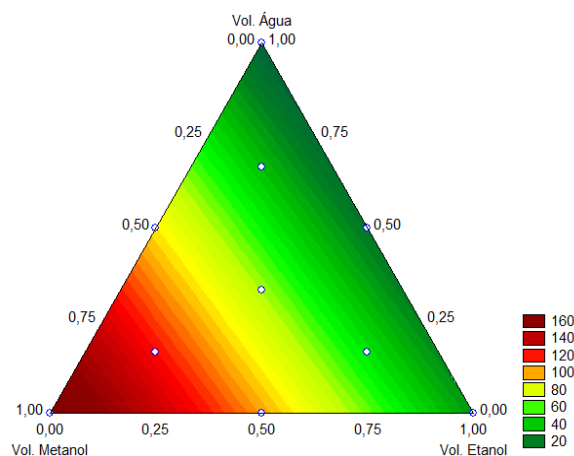


Figura 18: Superfície de resposta do planejamento de misturas.
Fonte: Autoria própria.

O planejamento fatorial de dois níveis (2^3), demonstrado no gráfico de Pareto (**Figura 19**), apontou que todos os fatores (volume do solvente, tempo de agitação e rotação) foram estatisticamente significativos para o processo de extração, assim como a interação entre volume do solvente com a rotação e o tempo de agitação.

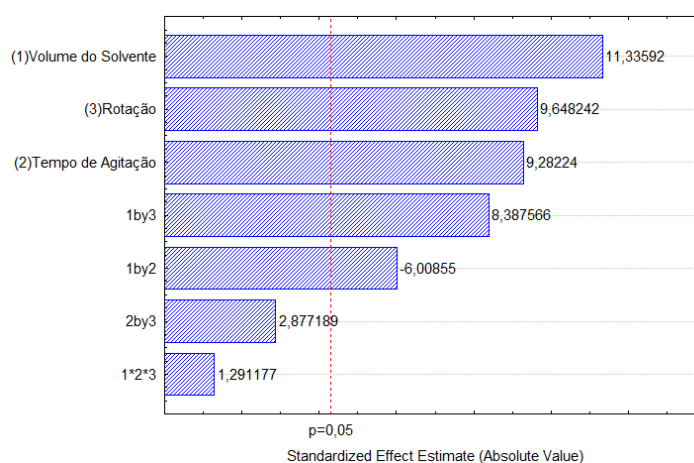


Figura 19: Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial.
Fonte: Autoria própria.

O planejamento fatorial indicou que os valores dos efeitos do volume do solvente, rotação e tempo de agitação foram significativos e positivos. Sendo assim, percebe-se que há o

aumento da resposta, saindo do nível inferior para o superior. Da mesma forma, os efeitos das interações entre os fatores estudados também foram significativos. Por isso, todas as variáveis foram estudadas na etapa de otimização e o domínio experimental foi modificado para determinação das condições ideais para extração, utilizando, posteriormente, o planejamento Box Behnken.

Os dados do planejamento Box Behnken foram processados, utilizando os valores reais, gerando o modelo quadrático: $\text{Teor de fenólicos} = 215,508 + 2,388 * (\text{volume do solvente}) - 21,700 * (\text{tempo de agitação}) - 14,813 * (\text{rotação}) + 10,710 * (\text{volume do solvente})^2 + 5,473 * (\text{tempo de agitação})^2 + 7,785 * (\text{rotação})^2 + 4,300 * (\text{volume do solvente}) * (\text{tempo de agitação}) + 1,825 * (\text{volume do solvente}) * (\text{rotação}) - 14,600 * (\text{tempo de agitação}) * (\text{rotação})$. Sendo, o termo independente e tempo de agitação linear significativos, de acordo com a análise de variância (ANOVA), ao nível de confiança de 95%.

Nas **Figuras 20, 21 e 22** é representado o modelo pelas superfícies de resposta em que condições máximas são observadas. Os valores críticos são 34,3 mL, 60,3 min e 297,9 rpm e estes valores foram aproximados nas atividades experimentais para 35 mL, 60 min e 300 rpm. A análise de variância (ANOVA) não mostrou falta de ajuste, regressão significativa, baixo erro puro e resíduos. Portanto, o mesmo descreve bem a área de estudo.

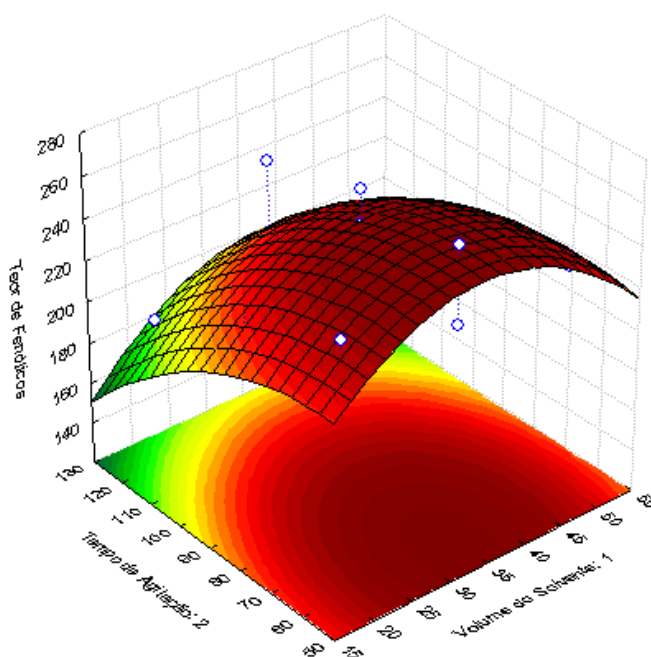


Figura 20: Superfície de resposta para o planejamento Box Behnken.
Fonte: Autoria própria.

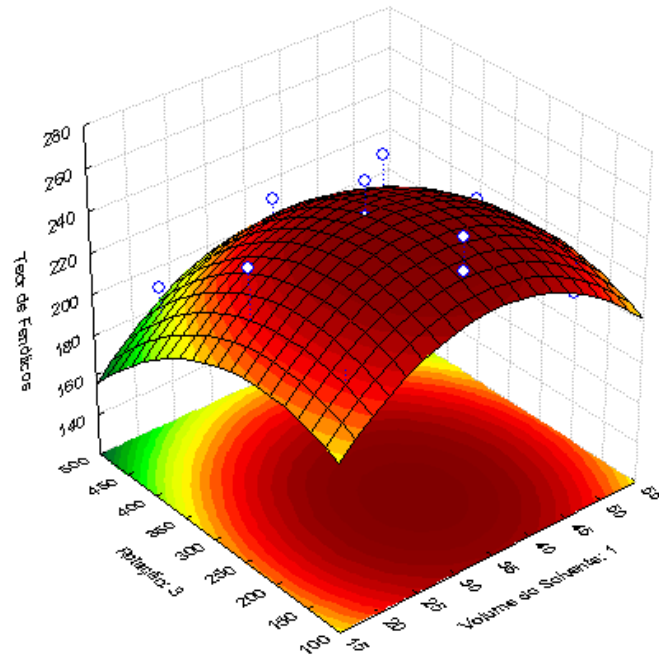


Figura 21: Superfície de resposta para o planejamento Box Behnken.
Fonte: Autoria própria.

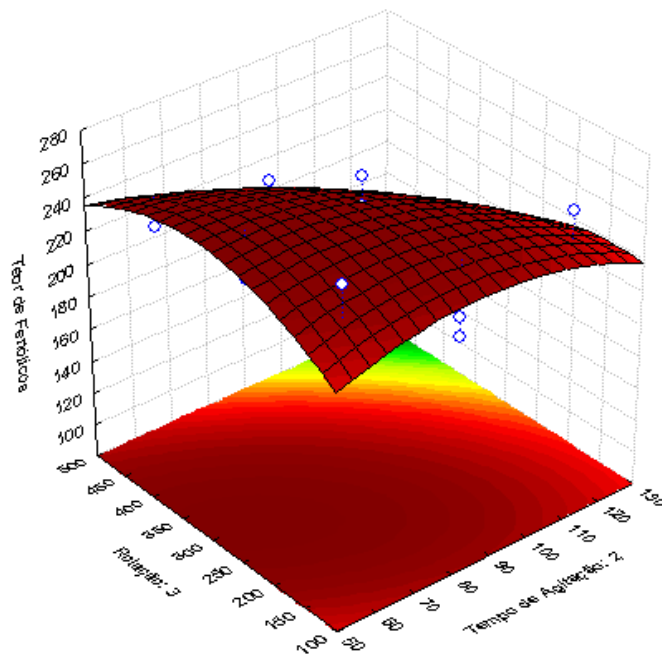


Figura 22: Superfície de resposta para o planejamento Box Behnken.
Fonte: Autoria própria.

A capacidade de extração do método foi avaliada em etapas sucessivas. Os resultados obtidos na primeira etapa foram responsáveis por extrair 85% dos compostos fenólicos e a segunda por extrair 15%, indicando que uma única etapa de extração é eficiente para o método proposto.

5.2 Análises a partir do sistema de cores RGB

Para a validação do método de extração de teor de fenólicos totais, os parâmetros analíticos foram avaliados, utilizando imagens digitais a partir do sinal analítico gerado pelo canal R (Red), utilizando a expressão ($S = 255 - R$) (COSTA et al., 2023; PORTO et al., 2019) e uma curva analítica de ácido gálico na faixa de $0 - 10 \mu\text{g L}^{-1}$.

A **Figura 23** mostra as imagens digitais das soluções padrões de ácido gálico utilizadas.

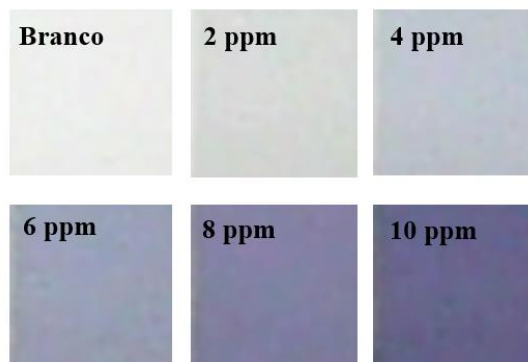


Figura 23: Imagens digitais das soluções padrão de ácido gálico.

Fonte: Autoria própria.

A partir da utilização do sistema proposto, foram obtidos os valores dos canais R, G e B, utilizando o *software Chemostat*, que estão apresentados nas **Tabelas 4, 5 e 6** como, também, os valores do coeficiente de correlação linear e a equação da reta, obtidas a partir da regressão linear efetuadas nas soluções padrões de ácido gálico.

Tabela 4: Leitura dos valores médios das soluções padrões de ácido gálico do canal R (Red) adquiridos no *software Chemostat*.

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Sinal = 255- R	R ²	Equação da Reta
0	19,0		
2	41,3		
4	66,6	0,9970	$y = 13,393x + 16,652$
6	100,7		
8	124,1		
10	150,0		

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5: Leitura dos valores médios das soluções padrões de ácido gálico do canal G (Green) adquiridos no *software Chemostat*.

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Sinal = 255 - G	R ²	Equação da Reta
0	17,5		
2	36,7		
4	60,3	0,9923	$y = 14,041x + 11,21$
6	95,5		
8	123,6		
10	154,9		

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6: Leitura dos valores médios das soluções padrões de ácido gálico do canal B (Blue) adquiridos no *software Chemostat*.

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Sinal = 255 - B	R ²	Equação da Reta
0	20,5		
2	34,6		
4	50,7	0,9924	$y = 9,7829x + 16,286$
6	74,3		
8	94,0		
10	117,1		

Fonte: Autoria própria.

Na **Tabela 6** estão os dados correspondentes ao canal B (Blue). Contudo, a solução de ácido gálico tem uma coloração azulada e, conforme há o aumento da concentração, essa cor se intensifica. Logo, o canal B fornece os dados obtidos para a coloração em que se é emitida (azul) e não dados em que se refere a absorção da radiação. Assim, as informações do mesmo não são de interesse para este estudo.

Nas **Tabelas 4 e 5** observa-se coeficientes de correlação linear elevados nos canais R (Red) e G (Green). Os mesmos demonstram maior sensibilidade na absorção da radiação, (o que já é esperado devido a coloração azul da solução formada pelo complexo tungstato-molibdênio), e, conseqüentemente para determinação do conteúdo fenólico total, o qual é de interesse neste trabalho. Contudo, de acordo com trabalhos anteriores, os valores obtidos para o canal R (Red) foram selecionados para o desenvolvimento e aplicação do método proposto (COSTA et al., 2023) e os mesmos serão utilizados neste estudo.

Na **Figura 24**, estão representadas, graficamente, as curvas de calibração das soluções padrão obtidas a partir dos dados RGB.

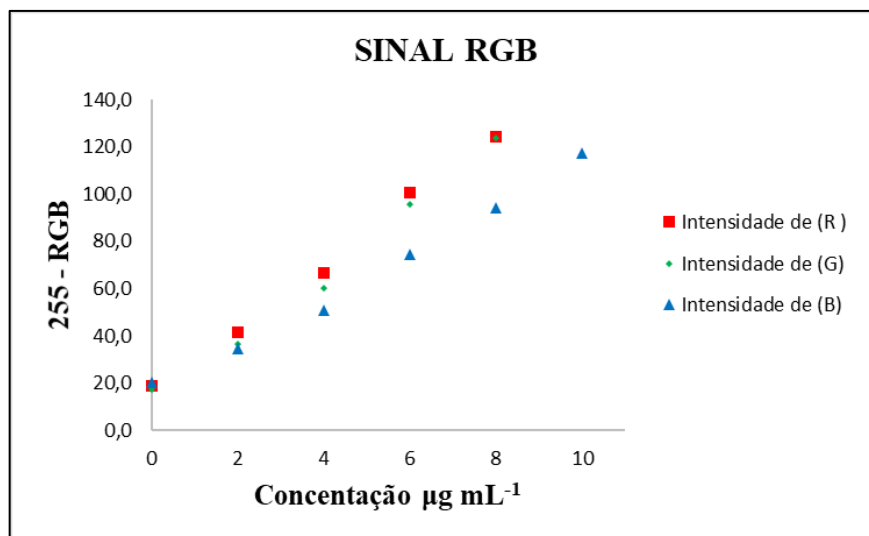


Figura 24: Dados RGB das soluções padrões.
Fonte: Autoria própria.

5.3 Parâmetros analíticos do método de análise para determinação de fenólicos totais

Foram utilizados alguns parâmetros analíticos para validar o método proposto. Sendo eles, curva de calibração, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Curvas de calibração foram construídas com cinco soluções padrões de ácido gálico na faixa de 2,0 a 10,0 µg mL⁻¹. Os valores obtidos para os três canais RGB, após o processamento das imagens, são descritos na **Tabela 7**. Os dados obtidos para o canal R (Red) foram tratados e processados pela seguinte expressão ($\text{Sinal} = 255 - R$), o mesmo apresentou maior sensibilidade conforme demonstrado por (COSTA et al., 2023). E, sob essa condição, foi obtida a relação linear entre o sinal analítico e a concentração de ácido gálico.

Tabela 7: Curva de calibração para a determinação de fenólicos totais.

Concentração (µg mL ⁻¹)	Canal R	Canal G	Canal B	Sinal = 255-R
0	236	238	234	19,0
2	214	218	220	41,3
4	188	195	204	66,6
6	154	160	181	100,7
8	131	131	161	124,1
10	105	100	138	150,0

Fonte: Autoria própria.

Na **Tabela 8** são expressas a inclinação da curva de calibração e seu respectivo coeficiente de determinação (R^2). Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir das informações da curva de calibração com nível de confiança de 95%, seguindo as recomendações da IUPAC 2002 (IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada; Ribeiro, Fabiana Alves de Lima; Ferreira, Márcia Miguel Castro; Morano, Sandra Campilongo; Silva, Lucimara Rodrigues da; Schneider, 2008). A precisão do método proposto foi expressa como desvio padrão relativo (RSD%) e foi determinada usando uma amostra de spirulina que continha $111,68 \pm 2,85$ mg/100g, empregando o método proposto.

Tabela 8: Comparativo entre os parâmetros analíticos entre colorimetria de imagem digital e espectrofotometria.

Parâmetro	255-R	Espectrofotometria
Inclinação da curva de calibração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	13,893	0,0933
Coefficiente da curva de determinação (R^2)	0,9970	0,9992
Limite de detecção (mg/100g)	59,1	39,8
Limite de quantificação (mg/100g)	90	59,5
Desvio padrão relativo (RSD%)	1,03	0,01

Fonte: Autoria própria.

O valor mínimo aceito para o coeficiente de determinação R^2 é de 0,990, conforme disposto no § 3º do art. 27 da RESOLUÇÃO da ANVISA (BRASIL, 2017). Foram obtidos altos valores do coeficiente de determinação. Sendo assim, observa-se uma boa resposta do equipamento empregado pela metodologia proposta de 0,9983. Os valores de RSD% foram obtidos de 10 extratos de spirulina. Destaca-se o valor do método proposto de 1,03. Considerando-se aceitável quando relacionado ao nível de concentração do analito na amostra, de acordo com os critérios sugeridos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), de até 11% (AOAC, 2005).

Na **Figura 25** está representada, graficamente, a comparação das curvas analíticas construídas a partir de regressão linear das concentrações das soluções padrão de ácido gálico entre o canal R (Red) com o espectrofotômetro utilizado.

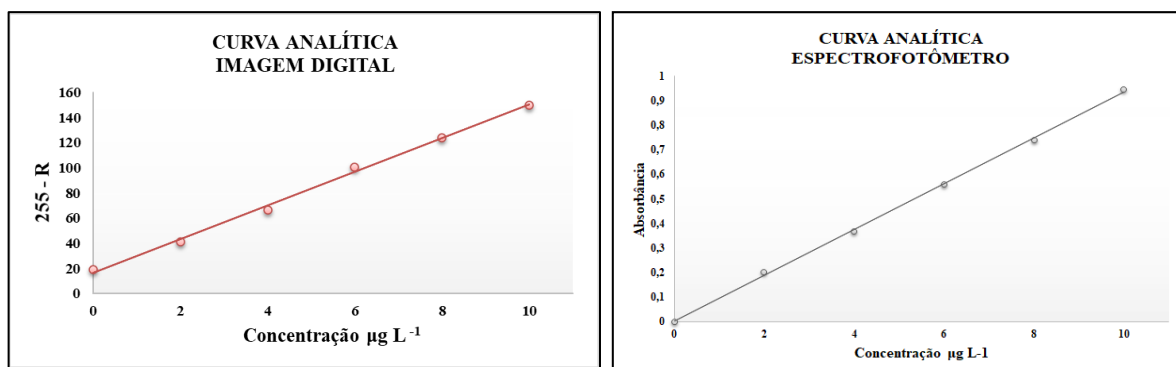


Figura 25: Curva Analítica ($R^2 = 0,9983$) obtida pelo canal R (Red) e a curva Analítica ($R^2 = 0,9992$) obtida com o espectrofotômetro para a determinação de fenólicos totais.

Fonte: Autoria própria.

5.4 Determinação de fenólicos totais em amostras de microalgas

Nas **Tabelas 9 e 10**, são encontrados os resultados obtidos para avaliar a exatidão do método de colorimetria de imagem digital em uma amostra de spirulina. Foi realizado teste de recuperação e realizada comparação entre as médias ao nível de 95% de confiança para comparação entre os resultados obtidos com método de referência por espectrofotometria de absorção molecular. Foram realizados ensaios de recuperação com adição de ácido gálico como padrão em três níveis de concentração e spirulina como amostra de referência. Para adição de 2,0, 4,0 e 6,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido gálico à amostra foram obtidos valores de recuperação de 98,07% \pm 0,75, 105,61% \pm 0,87 e 101,73% \pm 0,87, respectivamente.

Para a comparação entre as médias, de acordo com os resultados obtidos, não houve diferenças significativas entre os teores de fenólicos totais obtidos por ambas as metodologias, ao nível de confiança de 95%. Foi encontrado valor de 3,59 para t calculado, o qual foi menor que o t tabelado de 4,303.

Tabela 9: Resultados obtidos para o teste de recuperação com adição de ácido gálico à amostra com concentrações de 2, 4 e 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$, pelo método proposto e metodologia de referência. “PAD2”, “PAD4” e “PAD6” referem-se às concentrações de 2, 4 e 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. E, “A” refere-se à amostra.

Teste de Recuperação (%)						
Spirulina	A+PAD2	IC	A+PAD4	IC	A+PAD6	IC
Espectrofotometria	100,06	0,01	96,72	0	98,61	0,01
Imagem	98,07	0,75	105,61	0,87	101,73	0,87

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10: Resultados obtidos para a comparação entre as médias pelo método proposto e metodologia de referência.

Teste t pareado				
Spirulina	Média	IC	t calculado	t tabelado
Espectrofotometria	99,47	0,02	3,59	4,303
Imagem	111,68	2,85		

Fonte: Autoria própria.

A **Tabela 11** demonstra os resultados do teor de fenólicos totais em amostras de spirulina e chlorela, em pó e capsulas expressos em intervalo de confiança ao nível de 95% pelo método proposto.

Tabela 11: Resultados obtidos para a determinação de fenólicos totais em amostras de spirulina e chlorella empregando imagens digitais, para n = 3 com nível de confiança (95%). “S” refere-se à amostra de spirulina e “C” à amostras de chlorella - “*” refere-se as amostras em pó.

Amostra	Conteúdo fenólico total (mg 100g ⁻¹)
S.0 *	111,68 ± 2,85
S.1*	190,66 ± 22,62
S.2	154,92 ± 39,44
S.3	166,94 ± 43,67
S.4	188,69 ± 28,5
C.1	662,15 ± 45,11
C.2	208,83 ± 18,29
C.3	222,84 ± 26,43
C.4	184,13 ± 26,64

Fonte: Autoria própria.

O teor de fenólicos variaram de 111,68 ± 2,85 a 662,15 ± 45,11 mg 100g⁻¹ como pode ser visto na tabela acima. Alguns destes valores (S.2 154,92 e C.4 184,13) foram próximos com aqueles reportados por (TOLPEZNIKAITE et al., 2021), que encontram valores na faixa de 159,7 e 170,4 para amostra de spirulina e chlorella, respectivamente.

6.0 CONCLUSÕES

Foi utilizado um sistema desenvolvido com materiais acessíveis e de baixo custo para aquisição de imagens e a utilização do sistema de cores RGB como sinal analítico. Em seguida, foram realizadas a otimização de extração dos fenólicos totais por análise multivariada e validação dos resultados obtidos.

Foi possível investigar e obter as condições ideais de extração a partir de análise multivariada, obtendo uma boa capacidade de extração de 85% na primeira etapa. A validação da metodologia proposta com o método convencional por espectrofotometria apresentou parâmetros analíticos adequados para determinação do teor de fenólicos totais em amostras comerciais de spirulina e chlorella. A partir da forma de processamento $S = 255 - R$, foi obtido a curva analítica, determinado limites de detecção e quantificação, bem como precisão e exatidão. Como resultados, observou-se coeficiente de correlação linear de 0,9983, limites de detecção e quantificação de 59,1 e 90,0 mg/100g.

O desvio padrão relativo foi baixo, de 1,03 % e para a comparação entre as médias foram encontrados valores de 3,59. Os ensaios de recuperação com ácido gálico para adição de 2, 4 e 6 µg mL⁻¹ à amostra foram de 98,07% ± 0,75, 105,61% ± 0,87 e 101,73% ± 0,87,

respectivamente. Todos os resultados apresentados foram com nível de confiança de 95%, em que não houve diferença estatisticamente significativa.

Assim, conclui-se que o uso de imagem digital se mostra uma alternativa eficaz e precisa para determinação de fenólicos totais em microalgas, visto que existem concordâncias com o método de espectrofotometria convencional e com valores reportados na literatura, demonstrando a possibilidade de utilização do método, que possui vantagens de ser uma técnica de baixo custo e de fácil implementação.

7.0 PROPOSTAS FUTURAS

Como propostas futuras para este trabalho é considerada a otimização do tempo da reação colorimétrica utilizando imagem digital, bem como o processo de pré-concentração. Em relação à automação do sistema confeccionado, novas configurações para o registro de imagens digitais podem ser avaliadas com o intuito de melhorar a performance analítica, permitindo, por exemplo, um maior número de registro de imagens para que sejam realizadas análises num menor tempo. E, também, a redução do tamanho do sistema e a utilização de um *smartphone* para aquisição das imagens, pois facilita a mobilidade do sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos: Uma Breve Revisão**. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Association of Official Analysis Chemists International**, 2005.

ASGHARI, A. et al. **A Review on Antioxidant Properties of Spirulina**. Journal of Applied Biotechnology Reports. v.3, n. 1, p. 345-351, 2016. Disponível em: <https://www.biotechrep.ir/article_69007_cf87ec6a3acc0e69c330b2086d8ecdd0.pdf>. Acesso em: 3 dezembro. 2023.

ATKINS, P. W.; JONES, L.; **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. Quimica nova, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BÖCK, F. C. et al. **PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones**. Journal of chemometrics, v. 34, n. 12, 2020.

BRASIL. **Guia para tratamento estatístico da validação analítica**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 10, p. 1–19, 2017.

CANDIOTI, L. V. et al. **Using the desirability function in analytical methods development**. Talanta, v. 124, p. 123–138, 2014.

CARDOSO, D. E. B. F. **Aplicação de imagem digital ao Controlo da Qualidade.** Dissertação (Mestrado em Química) Universidade de Coimbra. FCTUC, Portugal, 2014.

CHUNG, I.-M. et al. **Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste.** Food chemistry, v. 127, n. 3, p. 960–967, 2011.

COSTA, R. C. et al. **A method based on digital image colorimetry for determination of total phenolic content in fruits.** Food analytical methods, 2023.

DANTAS, D. M.; DE, M. **Atividades biológicas das preparações obtidas das Clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

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

FAZENDA, J. M. R. **Tintas & Vernizes: Ciência e Tecnologia.** Associação Brasileira dos Fabricantes de Tintas. 4ª edição. Editora Blucher, 2009.

FERREIRA, S. L. C. et al. **Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods.** Analytica chimica acta, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às Técnicas de Planejamento de Experimentos.** 1ª Edição. Salvador-Ba: Vento Lesta, 2015.

FORATO, T. C. DE M. **A natureza da ciência como saber escolar: um estudo de caso a partir da história da luz.** Tese. Educação. Universidade de São Paulo, 2015.

GERMAN, J. B. et al. **Wine phenolics and targets of chronic disease.** In: ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society, 1997. p. 196–214.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. **Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana.** Publ. UEPG Ciências Biológicas e Saúde, v. 12, n. 4, 2006.

GOMES, E. C. **Ondas eletromagnéticas : possibilidades da aplicação no ensino médio a partir das relações CTS.** 2017.

GONÇALVES, M. I. **Aplicações de Imagens Digitais e Análise Multivariada para Classificação e Determinação de Parâmetros de Qualidade em Plumas de Algodão.** p. 1–119, 2015.

GONZALEZ, R. C. et al. **Processamento de imagens digitais.** Editora Blucher: 1ª edição, 2000.

HARRIS, D. A.; **Química Analítica Quantitativa.** 7ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HARUN, R. et al. **Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 1037–1047, 2010.

IUPAC | **União Internacional de Química Pura e Aplicada.** Disponível em: <<https://iupac.org/project/2002-031-1-500/>>. Acesso em: 15 agosto 2023.

KELDA, H. K.; KAUR, P.; KAUR, H. **A Review : Color Models in Image Processing.** 2014

LEÃO, A. C.; **Gerenciamento de Cores para Imagens Digitais.** Escola de Belas Artes – UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2005. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/JSSS-7XGFG3/1/dissertacao_alexandre_leao.pdf>

LIU, J.; CHEN, F. **Biology and industrial applications of Chlorella: Advances and prospects.** In: *Microalgae Biotechnology*. Cham: Springer International Publishing, p. 1–35, 2014.

LYRA, W. S. et al. **Accessible methodologies for quantification of flavonoids and total phenols in propolis.** *Revista Virtual de Química*, p. 61–73, 2008.

MANACH, C. et al. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *The American journal of clinical nutrition*, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MARCUCCI, M. C. et al. **Accessible methodologies for quantification of flavonoids and total phenols in propolis.** *Revista Virtual de Química*, v. 13, n. 1, p. 61–73, 2021.

MAGALHÃES, B. E. A. et al. **Determination of phenolic composition of oilseed whole flours by HPLC-DAD with evaluation using chemometric analyses.** *Microchemical journal, devoted to the application of microtechniques in all branches of science*, v. 155, n. 104683, p. 104683, 2020.

MARTINS, R. DE A.; SILVA, C. C. **As pesquisas de Newton sobre a luz: Uma visão histórica.** *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 37, n. 4, p. 4202-1-4202–32, 2015.

NOVAES, C. G. **Optimization of analytical methods using response surface methodology part i: Process variables.** *Revista Virtual de Química*, p. 1184–1215, 2017.

ODJADJARE, E. C.; MUTANDA, T.; OLANIRAN, A. O. **Potential biotechnological application of microalgae: a critical review.** *Critical reviews in biotechnology*, v. 37, n. 1, p. 37–52, 2017.

OLIVEIRA, R. B. DE; LUCENA, W. M. **O uso da internet e das mídias digitais como ferramentas de estratégia de marketing.** 2012.

PLAZA, M. et al. **Innovative natural functional ingredients from microalgae.** *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n. 16, p. 7159–7170, 2009.

PORTO, I. S. A. et al. **Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry.** *Microchemical journal, devoted to the application of microtechniques in all branches of science*, v. 149, n. 104031, p. 104031, 2019.

PRIYADARSHAMI, I.; RATH, B. **Commercial and industrial applications of micro algae - A review.** J. Algal Biomass Utiln, v. 3 (4), p. 89-100, 2012.

RANI, K.; SANDAL, N.; SAHOO, P. K. **A comprehensive review on chlorella-its composition, health benefits, market and regulatory scenario.** The pharma innovation, v. 7, n. 7, p. 584–589, 2018.

RIBEIRO, F. A. DE L. et al. **Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados.** Quimica nova, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. **Structure-Antioxidant Activity Relationships Of Flavonoids And Phenolic Acids. Structure-Antioxidant Activity Relationships Of Flavonoids And Phenolic Acids.** Free Radical Biology & Medicin, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIZWAN, M. et al. **Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 92, p. 394–404, 2018.

SAFI, C. et al. **Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 35, p. 265–278, 2014.

SANTOS NETO, J. H. et al. **A new and accessible instrumentation to determine urea in UHT milk using digital image analysis.** Food chemistry, v. 381, n. 132221, p. 132221, 2022.

SANTOS, W. N. L. DOS et al. **Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (Psidium guajava L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA).** Microchemical Journal, v. 133, p. 583–592, 2017.

SARANRAJ, P.; SIVASAKTHI, S. **Spirulina platensis – food for future: a review.** Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology, v. 4, p. 26-33, 2014. Disponível em: <https://www.ajpst.com/File_Folder/26-33.pdf>. Acesso em: 3 dezembro 2023.

SATO, M. et al. **Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 44, n. 1, p. 37–41, 1996.

SILVA SAUTHIER, M. C. et al. **Screening of Mangifera indica L. functional content using PCA and neural networks (ANN).** Food chemistry, v. 273, p. 115–123, 2019.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** 8ª ed. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. **Spirulina – From growth to nutritional product: A review.** Trends in food science & technology, v. 69, p. 157–171, 2017.

TKALEIE, M.; TASIE, J. F. **Colour spaces: perceptual, historical and applicational background.** The IEEE Region 8 EUROCON. Computer as a Tool, p. 304–308, 2003.

TOLPEZNIKAITE, E. et al. **Characterization of macro- and microalgae extracts bioactive compounds and micro- and macroelements transition from algae to extract.** Foods (Basel, Switzerland), v. 10, n. 9, p. 2226, 2021.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. **Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais.** p. 1963-1967, 2011. Disponível em: <https://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/saude/epg/EPG00322_01C.pdf>. Acesso em: 7 dezembro. 2023.

VAZ JÚNIOR, S. **Análise Química Instrumental e sua Aplicação em Controle de Qualidade de Biocombustíveis.** Circular Técnica. 2010. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25397/1/CIT-03.pdf>>

VICENTINI, F. C. **Planejamento fatorial e superfície de resposta: Otimização de um método voltamétrico para a determinação de Ag(I) empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono.** Quimica Nova, n. 5, p. 825–830, 2011.