

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

Análise colorimétrica das concentrações de fósforo em alimentos para animais através de imagem em substituição à espectrofotometria

Suellen Sobrinho França Mattos

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ANÁLISE COLORIMÉTRICA DAS CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO
EM ALIMENTOS PARA ANIMAIS ATRAVÉS DE IMAGEM EM
SUBSTITUIÇÃO À ESPECTROFOTOMETRIA**

Suellen Sobrinho França Mattos

Sob a Orientação do Professor
João Paulo Pacheco Rodrigues

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre(a)**, no Curso de
Pós-Graduação em Ciência
Animal, Área de Concentração
Zootecnia

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2024

M435a Mattos, Suellen, 1988-
 Análise colorimétrica das concentrações de fósforo
em alimentos para animais através de imagem em
substituição à espectrofotometria / Suellen Mattos. -
Seropédica, 2024.
 22 f.

 Orientador: João Paulo Pacheco Rodrigues.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal, 2024.

 1. Absorbância. 2. Molibdato. 3. RGB. I. Pacheco
Rodrigues, João Paulo, 1988-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal III. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

SUELLEN SOBRINHO FRANÇA MATTOS

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência Animal**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Concentração em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO, APROVADA EM 29/02/2024

(Assinado digitalmente em 07/03/2024 11:46)

João Paulo Pacheco Rodrigues. Dr. UFRRJ (Orientador)
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DPA (12.28.01.00.00.00.63)
Matrícula: 1057555

(Assinado digitalmente em 07/03/2024 14:53)

Tadeu Eder da Silva. Dr. UVM
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 101.226.736-97

(Assinado digitalmente em 29/04/2024 17:19)

Felipe Dilelis de Resende Sousa. Dr. USP
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 121.212.687-40

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Henrique, sempre foi por você

AGRADECIMENTOS

À força divina que me rege e me guia em todos os momentos não me deixando desistir nunca, me fazendo ver além das dificuldades.

À minha família em especial meus pais Miriam e Carlos Fernando, meus avós Noêmia (em memória) e Valdemar e minha irmã Carina por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me fazendo seguir.

Ao meu filho Henrique que sempre foi minha alegria e meu refúgio.

Ao meu marido Everton por todo amor, paciência, carinho e dedicação que sempre teve por mim.

Às minhas amigas Jéssica, Janisse, Gabriela e Daniela por me compreenderem e me apoiarem nessa jornada.

À toda a equipe do Ruminalab pelo apoio, estudo e prestatividade nessa caminhada.

Aos funcionários do setor de Bovinocultura de Leite/UFRRJ pela parceria e compreensão.

Ao meu Prezado e querido orientador Prof. João Paulo Pacheco Rodrigues pela dedicação, compreensão e amizade.

Ao PGCA pela oportunidade de estudo.

À PROPPG pelo auxílio financeiro através do Edital 09/2023.

RESUMO

MATTOS, Suellen Sobrinho França. **Análise colorimétrica das concentrações de fósforo em alimentos para animais através de imagem em substituição à espectrofotometria.** 2024. 22p Dissertação (Mestrado em Zootecnia, Ciência Animal). Instituto de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

A avaliação das concentrações de fósforo em alimentos para animais é um ponto chave para suprimento nutricional, utilização eficiente de insumos e redução da sua excreção urinária e fecal. Os métodos padrão para a quantificação de fósforo em alimentos são baseados em prévia digestão em ácidos nítrico:perclórico e reações colorimétricas de intensidade de azul, em espectrofotometria a 725nm. A aquisição e operacionalização de um equipamento de espectrofotometria é um desafio, principalmente quando se avalia um alto quantitativo de amostras, o que é comum na avaliação de alimentos para animais. Objetivou-se avaliar o uso de imagens de *smartphone* ou de *scanner* como substituição à espectrofotometria na quantificação de fósforo em soluções minerais de alimentos para animais. Foram avaliadas 48 amostras de alimentos, sendo forragens, ingredientes da alimentação animal e concentrados comerciais, divididas em 3 grupos de 16 amostras. Após digestão ácida e diluições, as soluções minerais tiveram o fósforo dosado por reação colorimétrica do fósforo-molibdato e suas soluções de leitura sistematizadas em microplacas de ELISA com 96 poços, sendo 4 rodadas de análise realizadas de forma subsequente, com amostras e padrões pipetados em quadruplicatas por placa. Foram gerados padrões de 0 a 1,4 a cada 0,2 mg de fósforo na solução de leitura. Os valores de absorbância de cada cubeta foram obtidas em espectrofotômetro de microplacas e imagens de *smartphone* e *scanner* foram obtidas sequencialmente. As imagens foram segmentadas e em cada cubeta foi amostrada um círculo de 10 pixels de diâmetro, sendo obtidos os valores de mínimo, máximo, média, mediana e desvio padrão das camadas vermelho, verde e azul (RGB). Foram realizadas estimativas das concentrações de fósforo utilizando-se a regressão linear entre a absorbância em função das concentrações de fósforo nos padrões e alternativas substituindo a absorbância por cada um dos parâmetros avaliados nas imagens, exceto desvio padrão. Foram calculadas a repetibilidade e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). A absorbância se relacionou negativamente com os parâmetros RGB das imagens, sendo observada maior dispersão nas imagens de *scanner* em comparação ao *smartphone*. Maior desvio padrão entre os pixels foi observado nas imagens de *scanner*. Menores valores de repetibilidade, LOD e LOQ de 19%, 0,003 e 0,010 mg foram observados usando a absorbância como preditor. As imagens obtidas através de um de *smartphone* apresentaram de um modo geral, valores inferiores de repetibilidade, LOD e LOQ em comparação ao *scanner*. Os parâmetros média da camada vermelha e média e mediana da camada verde, em imagens de *smartphone*, apresentaram maior potencial por desempenho próximo, porém inferior ao observado com a absorbância. Conclui-se que imagens de *smartphone* apresentaram potencial superior ao *scanner* como uso em substituição à espectrofotometria para a dosagem de fósforo pelo método colorimétrico de fósforo-molibdato. As camadas vermelho e verde se mostraram com maior potencial preditivo e sensibilidade para limites de detecção e quantificação inferiores ao azul. O aprimoramento de técnicas do uso de *smartphone* para desempenhos equivalentes ao da espectrofotometria pode viabilizar o uso de *smartphones* para dosar fósforo em amostras de alimentos para animais.

Palavras-chave: Absorbância, Molibdato, RGB.

ABSTRACT

MATTOS, Suellen Sobrinho França. **Colorimetric analysis of phosphorus concentrations in animal feed using images to replace spectrophotometry.** 2024. 22p Dissertation (Master Science in Animal Science) Institute of Animal Science, Animal Science Graduate Program, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Evaluation of phosphorus concentrations in feeds is a key point for nutritional supply, efficient use of nutrients, and reduction of urinary and fecal excretion. Standard methods for quantifying phosphorus in feeds are based on prior digestion in nitric:perchloric acids and colorimetric reactions of blue intensity in spectrophotometry at 725nm. The acquisition and operation of a spectrophotometer pose a challenge, especially when analyzing many samples, which is common in the evaluation of animal feeds. The objective was to evaluate the use of smartphone or scanner images as a replacement for spectrophotometry in quantifying phosphorus in mineral solutions of animal feeds. Forty-eight samples of feeds, including forages, animal feed ingredients and commercial concentrates, were evaluated, divided into 3 groups of 16 samples each. After acid digestion and dilutions, the mineral solutions were phosphorus-assayed by the phosphorus-molybdate colorimetric reaction, and their reading solutions systematized in ELISA microplates with 96 wells, with 4 rounds of analysis carried out subsequently, with samples and standards pipetted in quadruplicates per plate. Standards ranged from 0 to 1.4 at each 0.2 ppm of phosphorus in the reading solution. The absorbance values of each cuvette were obtained in a microplate spectrophotometer, and images from a smartphone and scanner were obtained sequentially. The images were segmented, and a 10-pixel diameter circle was sampled in each cuvette, obtaining the minimum, maximum, mean, median, and standard deviation values of the red, green, and blue (RGB) layers. Estimates of phosphorus concentrations were made using linear regression between absorbance as a function of phosphorus concentrations in the standards and alternatives replacing absorbance with each of the parameters evaluated in the images, except standard deviation. Repeatability and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated. Absorbance was negatively related to the RGB parameters of the images, with greater dispersion observed in scanner images compared to smartphones. Greater standard deviation between pixels was observed in scanner images. Lower repeatability values, LOD, and LOQ of 19%, 0.003, and 0.010 ppm were observed using absorbance as a predictor. Prediction using smartphone images had lower repeatability, LOD, and LOQ values compared to the scanner. The mean of the red layer and the mean and median of the green layer in smartphone images showed greater potential by close but inferior performance to that observed with absorbance. It is concluded that smartphone images showed superior potential to the scanner as a replacement for spectrophotometry for phosphorus dosage using the phosphomolybdate colorimetric method. The red and green channels demonstrated higher predictive potential and sensitivity for detection and quantification limits lower than the blue channel. The improvement of techniques using smartphone to achieve equivalent performances to spectrophotometry can enable the use of smartphones to quantify phosphorus concentration in mineral solutions of animal feeds.

Palavras-chave: Absorbance, Molybdate, RGB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplificação do espectro em função dos comprimentos de onda (fonte).....	3
Figura 2. Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro (fonte).....	4
Figura 3. Representação visual do esquema de cores RGB (Monolito nimbus, 2024).	6
Figura 4. Esquema de distribuição das amostras em placas de ELISA, com padrões (ppm) em azul e amostras indicadas com “S” e sua respectiva numeração dentro de cada grupo.	9
Figura 5. Esquema representativo das etapas de leitura da absorbância em espectrofotômetro e informações de Vermelho, Verde e Azul (RGB) extraídas em imagens obtidas por smartphone ou scanner.	10
Figura 6. Relação entre mínimo (mín), máximo (máx), média (med), mediana (md) obtido nas camadas RGB em imagens de smartphone ou scanner com absorbância (eixo x) em leituras das soluções padrão de 0 a 1,4 ppm de fósforo.....	13
Figura 7. Desvio padrão entre pixels dentro da área amostrada de acordo com a camada RGB para imagens obtidas com smartphone (barras limpas) ou scanner (barras hachuradas) para os níveis de padrões de fósforo avaliados.	14

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Fósforo	2
2.2 Espectroscopia	2
2.3 Visão Computacional e Análise de Imagens na Agricultura	4
2.3.1 Conceito de visão computacional e aplicações	4
2.3.2 Bases das imagens digitais	5
2.3.3 RGB.....	6
2.3.4 Aplicações colorimétricas com análise de imagens.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Amostras.....	8
3.2 Preparo de soluções minerais	8
3.3 Reação colorimétrica.....	9
3.4 Leituras.....	9
3.4.1 Absorbância	10
3.4.2 Imagens.....	10
3.4.2.1 <i>Smartphone</i>	10
3.4.2.2 <i>Scanner</i>	10
3.4.2.3 Extração de dados.....	11
3.5 Processamento de Dados	11
3.6 Cálculos e Análises estatísticas	11
3.6.1 Quantificação de fósforo nas soluções de leitura	11
3.6.2 Repetibilidade e limite de detecção	11
4 RESULTADOS	13
5 DISCUSSÃO	16
6 CONCLUSÕES.....	18
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ANEXOS.....	22

1 INTRODUÇÃO

A avaliação das concentrações de fósforo em alimentos para animais é um ponto chave tanto para suprimento das exigências nutricionais, quanto para a utilização sustentável de insumos e redução da excreção urinária e fecal de fósforo (Suttle, 2022). O fósforo é o segundo mineral mais abundante no organismo dos animais, sendo que cerca de 80% encontram-se nos ossos e dentes (Geraseev et. al. 2001). Também apresenta importantes funções fisiológicas e bioquímicas e é fundamental na atividade dos microrganismos do trato gastrointestinal.

Os métodos padrão para a quantificação de fósforo em alimentos para animais são baseados em prévio isolamento da fração mineral da amostra com seguinte quantificação do mineral por métodos oficiais diversos. Dentre os métodos, pode-se destacar aqueles adaptados e derivados do método espectrofotométrico baseado no azul de molibdênio, descrito por Fiske e Subbarow (1925). Outros métodos mais modernos, sensíveis e precisos como plasma acoplado indutivamente (ICP) com espectrometria de emissão ótica (ICP-OES) ou com espectrometria de emissão atômica (ICP-AES) são encontrados, no entanto de maior custo de aquisição e custeio, se tornando inacessíveis a diversos laboratórios. Apesar de relativamente mais acessíveis que métodos ICP, os métodos espectrofotométricos derivados de Fiske e Subbarow (1925) podem ainda ser adaptados para a utilização de tecnologias recentes de avaliação de imagens e visão computacional. A avaliação tradicional, além de requerer a disponibilidade de um espectrofotômetro demanda naturalmente, pessoal treinado, instalações elétricas padronizadas e espaço dedicado ao equipamento. Sendo assim há uma demanda por alternativas mais viáveis economicamente aliando-se a praticidade de aquisição e uso de um aparelho de smartphone.

Portanto objetivou-se com esse trabalho avaliar o potencial da quantificação de fósforo em alimentos para animais através de imagens obtidas com *smartphone* ou *scanner*, em comparação com a tradicional espectrofotometria.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fósforo

O fósforo é um mineral essencial para o desenvolvimento dos animais, desempenhando um papel crucial em funções biológicas, como formação óssea, regulação do pH, produção de energia (como componente do ATP) e propriedades de DNA e RNA (NASEM, 2021). É essencial para o funcionamento do organismo como um todo. Outra principal ação do fósforo é auxiliar na regulação do pH do sangue e na manutenção do equilíbrio eletrolítico, sendo fundamental para o funcionamento adequado do sistema nervoso e dos músculos. (Tokarnia, et al., 2000). Vellasco et.al (2016) resalta a importância do mineral na relação cálcio:fósforo para a formação da casca do ovo nas aves, deposição na gema, além de manter a homeostase iônica e repor eventuais perdas teciduais. Já na aquicultura a deficiência de fósforo leva a um crescimento e eficiência alimentar baixa (Thang et.al., 2018), no entanto, a suplementação descontrolada estimula a produção de compostos tóxicos afetando o ecossistema como um todo. Ou seja, estimar a concentração desse componente na dieta de qualquer espécie animal é central para a eficiência dos sistemas de produção.

O fósforo pode ser obtido de fontes orgânicas e inorgânicas. No grupo das fontes orgânicas encontramos as fontes vegetais, como por exemplo, pastagens, milho, soja e fontes animais como farinha de carne, farinha de sangue ou farinha de ossos. O grupo de fontes inorgânicas inclui minerais como as apatitas, que produzem fosfatos.

O uso de fontes animais de fósforo na pecuária (exceto farinha de ossos calcinada) é proibido porque pode causar encefalopatia espongiiforme bovina, mais conhecida como doença da vaca louca. Para aves e suínos, devemos ter atenção ao fornecimento de grãos. Embora sejam fonte de fósforo, ele é na forma de fitato. Essas espécies necessitam de uma enzima chamada fitase para digerir e assimilar, que não é produzida naturalmente, e a alternativa é fornecer fósforo inorgânico a esses animais para uma melhor absorção (Ren, et al., 2023). Mais importante que a percentagem no alimento ou o preço por quilograma da fonte de fósforo, é a sua biodisponibilidade, essa interferência busca melhor rendimento e produção. (Petersen, et al., 2011)

Um fator relevante quanto ao uso racional do fósforo são os contaminantes presentes em fontes inorgânicas trazendo sintomas como ossos fracos, mineralização, fraturas, anomalias dentárias, claudicação, perda de apetite e redução da disponibilidade e absorção de fósforo. (Ren et al., 2023). Dos três tipos de rochas utilizadas para extração de fosfato: rochas ígneas, metamórficas e sedimentares, as primeiras são as mais puras.

O fósforo é um recurso natural limitado e não renovável. As previsões indicam que a oferta econômica de P poderá ficar gravemente esgotada nos próximos 300 anos (Cordell e White, 2011). Melhorar a aquisição de P através da escolha de alimentos que proporcione melhor aproveitamento animal é essencial para o seu manejo sustentável.

2.2 Espectroscopia

Métodos colorimétricos são frequentemente usados para determinar a concentração de fósforo em amostras de alimentos. Esses métodos geralmente envolvem a formação de um

complexo colorido entre o fósforo na amostra e um reagente específico. A intensidade da cor formada está diretamente relacionada à concentração de fósforo na amostra e pode ser medida através de um espectrofotômetro determinando um comprimento de onda como mostra Fiske e Subarrow (1925).

A espectrofotometria é uma técnica analítica instrumental baseada na interação da luz com a matéria. Na Figura 1, é mostrado a parte correspondente à faixa do UV-Vis no espectro eletromagnético. A sua leitura é obtida separando os espectros incidentes ou detectando e registrando a troca de energia (atrás dos picos de ressonância) quando estes são separados através de átomos ou moléculas. Esses fenômenos são possíveis devido à emissão de radiação, radiação eletromagnética ou absorção ou difusão de partículas como os elétrons que chamamos de onda ou banda. A região ultravioleta do espectro eletromagnético está tipicamente entre 200 e 400 nm e a região visível entre 400 e 750 nm (Canassa et al., 2018). A espectrofotometria ou fotometria envolve a variação da intensidade dessas trocas de energia em um dispositivo num determinado comprimento de onda fixo.

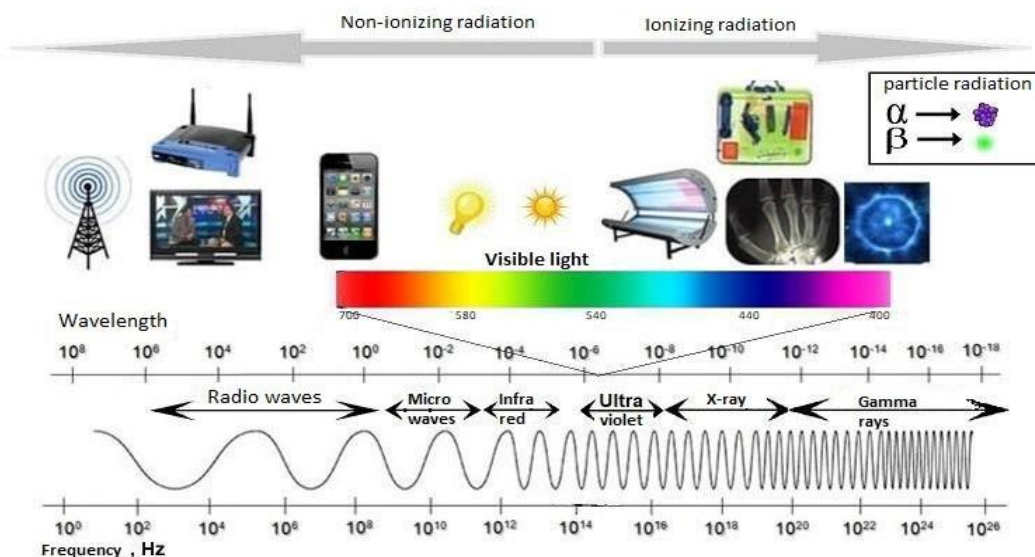


Figura 1. Exemplificação do espectro em função dos comprimentos de onda ([fonte](#)).

De acordo com a lei de *Lambert-Berr* representada pela Equação 1. Nela é obtida a relação entre a absorvância (A) e concentração (Lima, 2013):

$$A = \epsilon lc, \quad [1]$$

onde l é a distância percorrida pela radiação no meio, c é a concentração molar de substância absorvente no meio e ϵ é coeficiente de absorção molar da substância estudada.

Portanto, a absorvância é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente c e ao caminho óptico l do meio absorvente, onde ϵ é chamado de absortividade (Skoog et al., 2006).

Equipamentos capazes de medir dados de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda são chamadas de espectrofotômetros. Simplificadamente representada na Figura 2. Composto por cinco peças: Uma fonte luminosa; um monocromador (seletor de comprimento de onda que isola uma região limitada do espectro para a medida); um recipiente para a amostra (cubeta); um detector de radiação, o qual converte a energia radiante para um

sinal elétrico mensurável; e uma unidade de processamento e leitura de sinal (geralmente constituída de um circuito eletrônico) (Skoog et al., 2006).

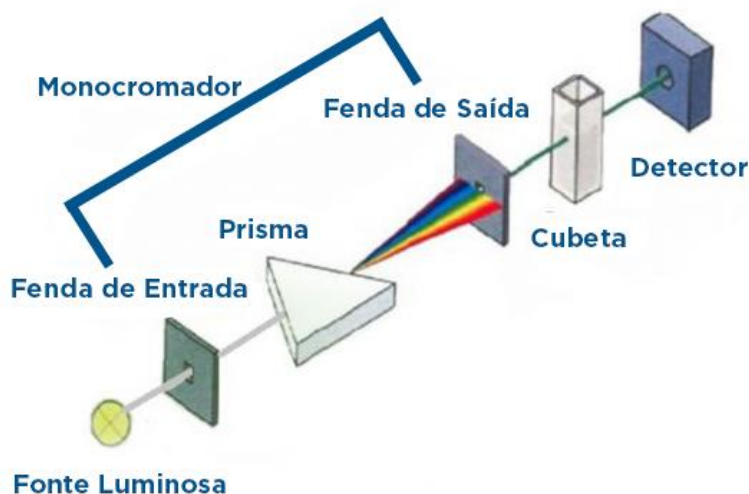


Figura 2. Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro ([fonte](#)).

Para a determinação de fósforo em alimentos para animais, utiliza-se usualmente reações colorimétricas para leitura em espectrofotômetro. Este método envolve a reação entre o fósforo na amostra em meio ácido para formar um complexo azul onde o fósforo é adicionado de molibdato de amônio produzindo amônio fosfomolibdato e então reduzido quando adicionado ácido ascórbico (Fiske e Subbarow, 1925). A partir dessa solução é formado óxidos coloidais equivalentes à concentração de fósforo na solução desenvolvendo a cor azul. A quantificação do fósforo na amostra se dá pela intensidade da cor (Detmann, et al. 2021). Gomes e Oliveira (2011) discute o uso do ácido ascórbico explorando sua utilização como agente redutor na determinação colorimétrica de fósforo, uma vez que a velocidade da redução pode ser influenciada assim como a estabilidade da cor. Essa estabilidade se dá pelo uso no carbonato de bismuto. Dessa forma o tempo para avaliação e quantificação na amostra deve ser pré-estabelecido de acordo com o método adotado.

2.3 Visão Computacional e Análise de Imagens na Agricultura

2.3.1 Conceito de visão computacional e aplicações

A visão computacional (VC) é um campo da ciência que se concentra na capacidade dos sistemas computacionais de adquirir, processar e interpretar informações visuais de maneira semelhantes aos humanos (Backes et al, 2016). Na agricultura, a tecnologia associada a avaliação colorimétrica é usada para avaliar a saúde das plantas e do solo (Kaufman e Vilas Boas, 2019). Na zootecnia a VC vem avançando como forma de auxiliar identificação de parâmetros e métricas como no trabalho de Song et al. (2018) e Salau et al., (2017) onde avaliam profundidade do úbere e peso corporal de vacas leiteiras. Esses sistemas também podem ser usados para definir parâmetros de insensibilização de suínos a partir da identificação da massa do animal (Severo e Weizenmann, 2020). Assim como monitoramento de aves afim de promover o bem-estar animal evitando o estresse da manipulação constante (Saltoratto, et. al.

2013). Quando se busca análise de alimentos a partir de visão computacional encontra-se pouco trabalhos voltados para essa área. Rasmussen e Moeslund (2019) utilizaram imagens para avaliar a qualidade dos grãos em silagem de milho, assim como Ali et al. (2020) utiliza imagens térmicas para detectar qualidades e possíveis patógenos em produtos agrícolas.

Os dados de entrada para visão computacional são uma imagem e o resultado é uma interpretação parcial ou completa da imagem. Também pode-se objetivar simular a capacidade humana de reconhecer imagens usando uma série de técnicas computacionais, desde o processamento de imagens até a criação de modelos matemáticos (Galvão et al, 2018). Esta área de pesquisa envolve diversas etapas incluindo aquisição de imagens, pré-processamento, segmentação, extração de características e reconhecimento de padrões (Galvão et al, 2018).

Para o desenvolvimento de aplicações de visão computacional, a realização de estudos que provem aplicações e perspectivas de processamento de imagens por sistemas computacionais automatizados é essencial. Provas de conceito são esses estudos, com a finalidade de demonstrar a aplicabilidade e direcionar perspectivas de aprimoramento do desenvolvimento de tecnologias.

2.3.2 Bases das imagens digitais

Segundo Gonzalez e Woods (2009), imagem digital refere-se à representação visual de um objeto em gráficos, ou seja, a estrutura em um nível que permite a detecção da intensidade e profundidade dos sinais de luz refletidos ou emitidos em uma imagem real – objeto real. Assim, é definida como uma função bidimensional $f(x,y)$, onde x e y são coordenadas planas, e a amplitude de f em qualquer par de coordenadas (x,y) é chamada de intensidade ou escala de cinza da imagem num ponto determinado.

Dentre as vantagens do uso de imagens digitais em análises científicas podemos citar o baixo custo, a facilidade da operação, rapidez e a possibilidade de análise in-situ. Entre os trabalhos encontrados na literatura, destacam-se as aplicações na determinação de fosfatos em refrigerante (Colzani et al., 2017), na indicação do momento de colheita de frutos (Costa et al., 2018), determinação de etanol em cervejas (Curbani et al., 2019), na quantificação de nitrato em água (Fabris et al., 2020), na disponibilidade de nitrogênio em pastagens (Mancin, 2021), no controle de qualidade de alimentos (Moreira et al., 2022; Baesso et al., 2023; Maroubi e Melchert, 2023), entre outras. Porém o emprego de imagem para quantificação de fósforo em alimentos destinados a nutrição animal ainda é subutilizado. Devendo ser mais explorado por laboratórios e empresas comerciais visto a facilidade e precisão encontrada em outras áreas.

Sendo assim, uma imagem digital pode ser representada por uma matriz bidimensional de m linhas e n coluna, onde cada posição contém um valor discreto chamado de pixel. Pixel é definido como o menor componente de uma imagem digital que juntos formam uma imagem completa. Em geral, quanto mais pixels uma imagem digital tiver, maior será sua resolução (Siqueira, 2022). Os pixels podem conter três valores, representando alternadamente os níveis de vermelho, verde, azul e cinza (Peterson, 2005). Os dados de pixel da imagem são codificados em formato binário, de modo que os pixels transportam informações ou sinais de acordo com o número de bits por pixel que descreve a radiometria da imagem (Tian, 2022). O valor da luminosidade (pixel) ou escala de cinza depende do tipo de dispositivo de armazenamento e do computador utilizado. A faixa de valores varia de 0 a 255 níveis de cinza, o que está além da capacidade do olho humano. Dados contendo 256 valores podem ser armazenados em registros ou bytes de 8 bits (combinações de 2^8 bits), essas codificações de 2^8 são suficientes para todas as aplicações de fotogrametria digital e são um índice importante para qualquer câmera digital

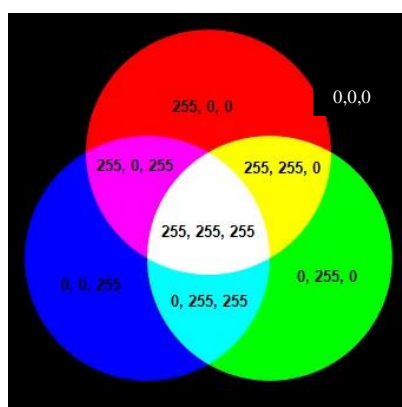
embutida em *smartphone* chamada profundidade de pixel (bits/pixel). A profundidade de pixel determina a capacidade de uma câmera ou sensor de imagem distinguir certos níveis ou tons de cinza (Peterson, 2005).

2.3.3 RGB

A teoria das cores estudadas por diversos estudiosos como Platão, Pitágoras, Aristóteles e artista como Leonardo da Vinci ao longo dos anos e mais precisamente pelo físico Isaac Newton (1642-1727) mostra que todas as cores podem ser criadas a partir de três cores primárias. Essas três cores podem ser combinadas ativamente, ou seja, combinando luzes tricolores e serem analisadas pelo modelo RGB (R, vermelho; G, verde; B, azul).

O modelo RGB mostra que todas as cores podem ser criadas combinando diferentes intensidades de luz vermelha, verde e azul. Este modelo é usado para criar cores para LED, LCD, plasma, displays inteligentes etc. Além disso, os sistemas de captura de imagem utilizam este modelo para codificar a imagem em uma matriz de dados digital.

Os valores de intensidade das cores RGB criam um espaço matemático denominado espaço de cores. Os valores de intensidade variam de 0% a 100%, mas dependendo do software ou aplicativo utilizado para ajustar as cores da tela, esses valores podem ser representados como números de 0 a 1 ou como números inteiros de 0 a 255 (Barreiros e Magne, 2015), podendo produzir um amplo espectro de cores diferentes e 256 variações de intensidade de cor (Firdaus, 2019) como mostra a Figura 3.



Este esquema de cores pressupõe que o modelo pode ter 16.777.216 cores diferentes
Figura 3. Representação visual do esquema de cores RGB.

(256^3 ou 2^{24}). Por exemplo, a combinação RGB: R = 0, G = 0 e B = 0 indica preto puro, enquanto R = 255, G = 255 e B = 255 dá branco puro (Firdaus, 2019). Este sistema oferece combinações únicas de valores R, G e B que produzem uma grande variedade de cores, intensidades e tonalidades de luz.

2.3.4 Aplicações colorimétricas com análise de imagens

Equipamentos eletrônicos de obtenção de imagens tem sido cada vez mais utilizados como possíveis substitutos a técnicas colorimétricas padrão. Por exemplo, Vargas-Muñoz et al. (2023) avaliou amônia e sulfeto em digestores anaeróbicos e em águas residuais e Santos et al. (2023) quantificou eugenol no óleo essencial de cravo, ambos propondo o uso de *smartphones* para obtenção da imagem e estimativas da concentração dos analitos. Já com o uso de *scanner* portátil, verifica-se a aplicação para dosagem de etanol em bebidas alcoólicas (Curbai et al.,

2020; Filgueiras et al., 2022), nitrito em alimentos e água (Filgueiras et al., 2021) e fosfato em bebidas (Colzani et al., 2017).

Estudos aliando processamento de imagem com métodos colorimétricos tradicionais na ciência animal, como fósforo, nitrogênio amoniacal e titânio (Detmann et al., 2021), com matrizes de alimentos para animais ainda são inexistentes. Especificamente para o fósforo com reação de fósforo-molibdato, obtenção e avaliações com uso de smartphones têm sido desenvolvidas para análise de solo e água (Yang et al., 2007; Moonrungssee et al., 2015; Souza et al., 2023). No entanto, nenhum desses estudos avaliou o uso de microplacas ELISA, havendo limitações quanto a escalabilidade na realização de um quantitativo maior de amostras e replicatas. Além disso, não havendo avaliações do método de fósforo-molibdato com imagens de scanner, como já demonstrado aplicável para outras análises colorimétricas (Uhlíkova et al., 2023).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram avaliadas 48 amostras de alimentos para animais, sendo: i) 16 forrageiras coletadas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: mandioca (*Manihot esculenta*), 2 amostras distintas de feno de Tifton-85 (*Cynodon dactylon*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), capim massai (*Panicum maximum* cv. Massai), capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), capim tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia), sorgo (*Sorghum bicolor*), silagem de milho (*Zea mays*), humidícula llanero (*Brachiaria humidicola* cv. Llanero), milheto (*Pennisetum glaucum*), capim calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.), capim Mulato (*Brachiaria hibrida* cv. Mulato), capim Tamani (*Panicum maximum* Jacq.), capim Mombaça (*Panicum maximum* cv. Mombaça); ii) 16 ingredientes utilizados em concentrados para animais: 2 amostras distintas de farelo de trigo (*Triticum aestivum* L.), milho moído (*Zea mays*), 2 amostras distintas de farelo de soja (*Glycine max* L.), farelo de milho (*Zea mays*), caroço de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), amendoim com casca (*Arachis hypogaea* L.), semente de linhaça (*Linum usitatissimum*), semente de girassol sem casca (*Helianthus annuus*), farinha de salmão (*Salmo salar*), farinha de carne e ossos, farelo de arroz (*Oryza sativa*), polpa de beterraba (*Beta vulgaris* L.), cevada (*Hordeum vulgare*); iii) 16 misturas minerais ou rações comerciais que foram: ração para felinos (Begacat premium, Danes Alimentos, Apucarana, Paraná), ração gato (Golden, Premier pet, Dourado, SP), ração equino (Horse- Super Premium Equilise, CN Bom Jardim, RJ), ração equino (Cria Avemel 12 CN Bom Jardim, RJ), ração comercial de felinos, ração canina (raça pequena Tibii, Campinas, SP), ração bovino (Lactação farelada 24%, Ideal, Rio Pomba/MG), ração bovino (Lactos Guabi, Campinas, SP), ração Lactage Novilhas (Lactos Guabi, Campinas, SP), ração peletizada bezerro (Ideal Rio Pomba/MG), núcleo bovinos em lactação (UFRRJ, Seropédica/ RJ), fosfato bicálcico, suplemento mineral bovino (Tecfos 80, Zootec, Rondonópolis MS), ração comercial codorna, ração trinca ferro (extrusado natural com frutas, Sellecta, Passo Fundo, RS).

As amostras de forragem foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h. As demais com teores de matéria seca superior a 88%, como concentrados e alimentos comerciais, foram processadas sem secagem parcial. Após esse procedimento, todas as amostras foram moídas em moinho de facas a 1mm e armazenadas em potes de polietileno.

3.2 Preparo de soluções minerais

Em todos os procedimentos foi utilizado um único lote de água destilada oriundo de um destilador tipo pilsen 10L (Marte Científica, Santa Rita do Sapucaí, MG).

A digestão ácida e preparo de soluções minerais foi realizada conforme descrito por Palma et al., 2015. De forma breve, as soluções minerais foram obtidas em digestão ácida com 5mL de ácidos nítrico (65%. P.A., CAS 7697-37-2, Neon) e perclórico (70% CAS 7601-090-3, Sigma-Aldrich) na proporção 4:1 v/v, a 200°C até ficarem translúcidas e sem produção de vapor marrom. Após digestão, os resíduos foram filtrados em papel filtro quantitativo faixa preta papel filtro quantitativo 9 cm ø, MN 640 w cód. 202 009, Macherey-Nagel (Düren, Alemanha) e diluídos em balões volumétricos de 50mL, completados com água destilada. A solução mineral foi armazenada em frascos de polietileno e mantidos sob refrigeração (2-4°C).

3.3 Reação colorimétrica

A quantificação de fósforo nas soluções minerais se deu com base no método colorimétrico fósforo-molibdato, descrito inicialmente por Fiske E Subbarow (1925), com técnica descrita por Detmann et al., 2021. A solução ácida de molibdato foi composta por 20g/L de molibdato de amônio (P.A, CAS 12054-85-2, Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba, SP, Brasil), 1g/L de carbonato de bismuto (P.A, CAS 5892-10-4, Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba, SP, Brasil) e 253,9 g/L de ácido sulfúrico (P.A, CAS 7664-93-4, Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba, SP, Brasil). Para cada rodada analítica foi preparada uma solução de 40g/L de ácido ascórbico (CAS 50-81-7, Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba, SP, Brasil), utilizada em até 60 minutos após preparo. Uma solução stock de 4,39 g/L de fosfato de potássio monobásico (P.A., CAS 7778-77-0, Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba, SP, Brasil) foi utilizada, sendo diluída em 1:100 v/v para confecção da solução padrão.

Durante dois dias foram realizadas 4 rodadas com 3 placas em cada, em sequência direta, com os mesmos operadores e aparatos, sendo uma placa por rodada para cada grupo de amostras. Em cada rodada, por placa, soluções de leitura de todos os padrões e 16 amostras dos grupos i, ii e iii, foram avaliadas. As soluções de leitura foram preparadas em balões de 50mL, previamente adicionados de 5mL de solução ácida de molibdato, 2mL de solução de ácido ascórbico (40g/L) e completados em aproximadamente 50% com água destilada. Para os padrões 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14 mg de P, foram pipetados 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 mL de solução padrão, respectivamente. Para cada amostra, foram pipetados 1mL de solução mineral. Após completar o volume dos balões e aproximadamente 5 minutos de reação, 0,3mL de solução de leitura foi transferida para microplacas ELISA com 96 poços de fundo chato (Figura 4). Após o preparo de cada placa, procedeu-se com as leituras colorimétricas em até 30 minutos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,00	0,14	S1	S7	S5	S3	0,00	0,14	S9	S15	S13	S11
B	0,02	0,12	S2	S8	S6	S4	0,02	0,12	S10	S16	S14	S12
C	0,04	0,10	S3	S1	S7	S5	0,04	0,10	S11	S9	S15	S13
D	0,06	0,08	S4	S2	S8	S6	0,06	0,08	S12	S10	S16	S14
E	0,08	0,06	S5	S3	S1	S7	0,08	0,06	S13	S11	S9	S15
F	0,10	0,04	S6	S4	S2	S8	0,10	0,04	S14	S12	S10	S16
G	0,12	0,02	S7	S5	S3	S1	0,12	0,02	S15	S13	S11	S9
H	0,14	0,00	S8	S6	S4	S2	0,14	0,00	S16	S14	S12	S10

Figura 4. Esquema de distribuição das amostras em placas de ELISA, com padrões (ppm) em azul e amostras indicadas com “S” e sua respectiva numeração dentro de cada grupo.

3.4 Leituras

Após preparadas, foram realizadas leituras de absorbâncias e obtenção de imagens das mesmas, conforme esquema (Figura 5) e detalhes descritos a seguir.

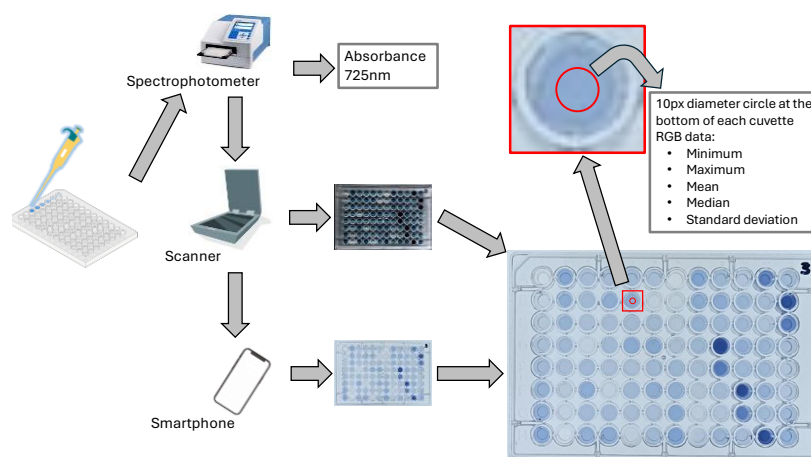


Figura 5. Esquema representativo das etapas de leitura da absorbância em espectrofotômetro e informações de Vermelho, Verde e Azul (RGB) extraídas em imagens obtidas por *smartphone* ou *scanner*.

3.4.1 Absorbância

Adotado analiticamente como método padrão de estimativa de fósforo nas soluções de leitura, os valores de absorbância a 725nm foram obtidos em espectrofotômetro. Para um adequado comparativo com as imagens obtidas em microplacas, no presente estudo, utilizou-se um espectrofotômetro de microplacas (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos).

3.4.2 Imagens

3.4.2.1 Smartphone

Para uma padronização das imagens obtidas na avaliação do potencial uso de imagens de *smartphone* na leitura das placas (Christodouleas et al., 2015), foi confeccionada uma *dark box* de papelão com 42 cm de altura, 35 cm de profundidade e 39 cm de largura. Foi feito um orifício de 2×2 cm no centro superior, para acoplar a câmera do *smartphone*. A fonte de luz utilizada foi uma luminária de LED branco a 6500K com potência de 24W (AVANT, São Paulo, SP), com 30x30 cm de largura e 3cm de altura, centralizada no fundo da *dark box*. Esta *dark box* foi utilizada a fim de impedir que luzes externas influenciassem as imagens que seriam capturadas alterando a qualidade obtida. As placas foram colocadas no centro da fonte luminosa e as imagens obtidas com um *smartphone* Galaxy A54 (Samsung Eletronic, Seul, Coreia do Sul), com configurações de imagens padrão automáticas. Para a obtenção de cada imagem o foco automático foi utilizado no centro da placa. A distância entre a lente da câmera e o topo da fonte de luz foi de 40cm. As imagens foram obtidas em formato JPEG e 4032×3024 pixels.

3.4.2.2 Scanner

A placa foi colocada no *scanner* de modo que o feixe de luz se deslocou paralelamente ao lado mais longo da placa. Foi utilizado um *scanner* de impressora multifuncional (L375, Epson, Tóquio, Japão). Não foram aplicadas correções de brilho, contraste etc., adotando-se as configurações padrão do equipamento. As imagens foram obtidas a 600dpi e salvas em formato JPEG com dimensões de 3498×4962 pixels.

3.4.2.3 Extração de dados

Todo o processamento a seguir foi realizado utilizando-se o software ImageJ (versão 1.54f). Das imagens obtidas, todas as placas foram segmentadas manualmente na dimensão de 515×553 pixels. Após segmentação, um círculo de 10pixels de diâmetro foi selecionado em cada cubeta cada cubeta, sendo obtidas as medidas de mínimo, máximo, média, mediana e variância das camadas três camadas RGB (Figura 5).

3.5 Processamento de Dados

Para limpeza dos dados, adotou-se a seguinte sequência. Os dados de uma placa do grupo ii foram descartados por acidente durante o manuseio. Como o valor máximo de absorbância observado nos padrões foi de 0,658, todos os valores superiores observados nas amostras foram excluídos.

3.6 Cálculos e Análises estatísticas

3.6.1 Quantificação de fósforo nas soluções de leitura

Em cada placa, foram estimados parâmetros da curva de calibração utilizando-se o PROC REG do SAS (9.4), segundo a equação:

$$M_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \times P_i + \varepsilon_{ij} \quad [2]$$

Onde M_{ij} é a absorbância medida a 725nm ou outros parâmetros (média, mínima, máximo e mediana) obtidos a partir das análises de imagem; P_i é a concentração de fósforo nas i-ésimas replicatas nos j-ésimos padrões (0; 0,2; 0,2; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4ppm); β_0 e β_1 são intercepto e regressor, respectivamente e ε_{ij} é o erro entre replicatas.

A estimativa da concentração de fósforo em cada solução de leitura se deu através da equação:

$$[\widehat{P}]_i = \frac{L_i - \hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \quad [3]$$

Onde $[\widehat{P}]_i$ é a concentração de fósforo estimada para a solução de leitura da i-ésima amostra; L_i é a leitura obtida para a i-ésima amostra; $\hat{\beta}_0$ e $\hat{\beta}_1$ são parâmetros estimados para através dos padrões descritos na equação [2].

3.6.2 Repetibilidade e limite de detecção

Para cada um dos parâmetros utilizados (absorbância, e parâmetros obtidos do RGB), um modelo aleatório com as estimativas de concentração de fósforo obtidas nas amostras:

$$[P]_{ij} = \mu + A_i + \varepsilon_{ij} \quad [4]$$

onde $[P]_{ij}$ é o teor de fósforo estimado na replicata j da amostra i , μ é a constante geral, A_i é o efeito aleatório da i -ésima amostra, e ε_{ij} é o erro aleatório entre replicatas. As variâncias amostral ($\hat{\sigma}_a^2$) e residual ($\hat{\sigma}_r^2$) foram estimadas pela máxima verossimilhança restrita.

A repetibilidade padronizada em função da média de fósforo foi calculada como:

$$\text{Repetibilidade (\%)} = 100 \times \frac{\hat{\sigma}_r^2}{\bar{P}} \quad [5]$$

onde $\hat{\sigma}_r^2$ é a variância residual obtida na equação [4] e \bar{P} é a média de concentração de fósforo nas amostras, para cada método de estimativa.

O limite de detecção (LOD) foi calculado segundo a equação (Manika e Ayele, 2022):

$$LOD = 3.3 \times \frac{s_{P0}}{\hat{\beta}_1} \quad [6]$$

onde s_{P0} é o desvio padrão nas alíquotas branco e $\hat{\beta}_1$ é o regressor da curva de calibração, obtido na equação [2].

O limite de quantificação (LOQ) foi calculado como:

$$LOQ = 10 \times \frac{s_{P0}}{\hat{\beta}_1} \quad [7]$$

onde s_{P0} é o desvio padrão nas alíquotas branco e $\hat{\beta}_1$ é o regressor da curva de calibração, obtido na equação [2]. (Manika e Ayele, 2022)

4 RESULTADOS

Na Figura 6, relacionou-se a absorvância com os parâmetros obtidos em cada uma das camadas RGB. Independentemente da forma de aquisição da imagem, a absorvância se relacionou negativamente com todas as camadas RGB, e a variação entre os padrões foi menor nas imagens de *smartphone*. Para o vermelho nas imagens de *scanner*, nota-se um padrão não linear entre todos os parâmetros com a absorvância.

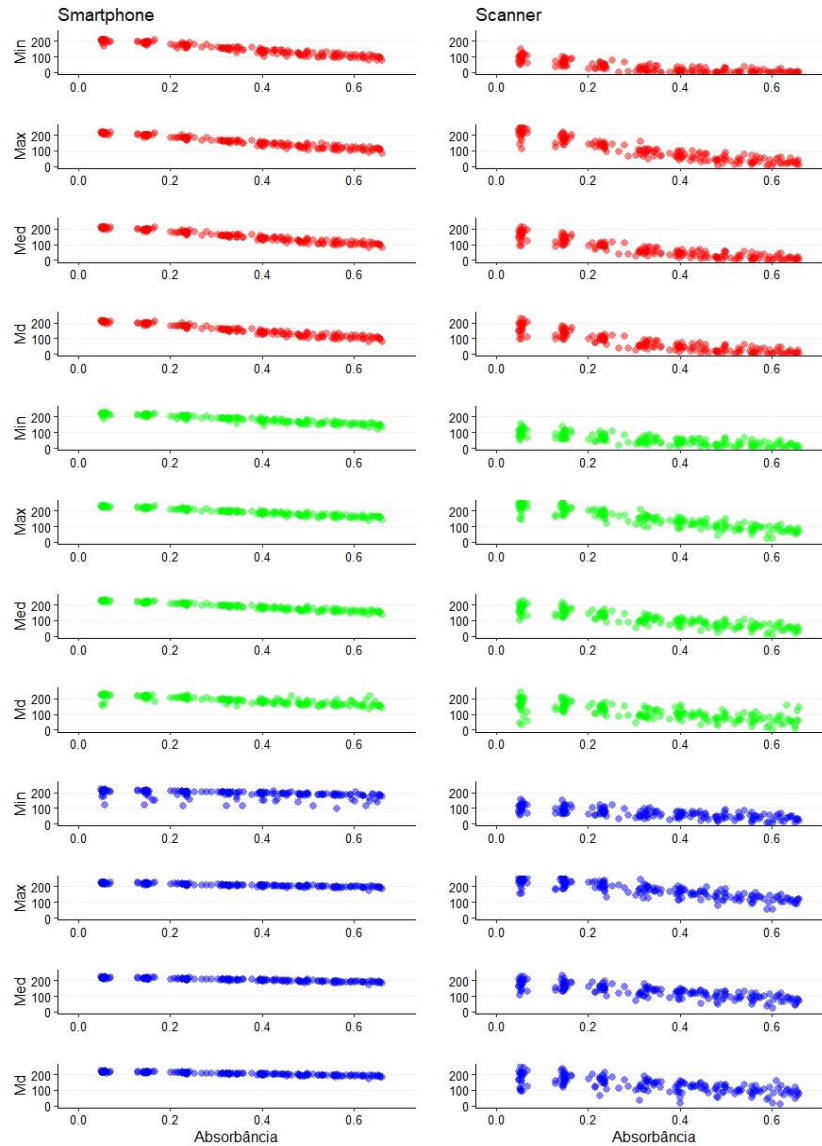


Figura 6. Relação entre mínimo (mín), máximo (máx), média (med), mediana (md) obtido nas camadas RGB em imagens de *smartphone* ou *scanner* com absorvância (eixo x) em leituras das soluções padrão de 0 a 1,4 ppm de fósforo.

O desvio padrão entre os pixels dentro do círculo amostral descrito na Figura 5 é exposto na Figura 7. Observa-se como o desvio padrão entre pixels é superior nas imagens obtidas através de *scanner*, para todas as camadas RGB, com diminuição gradual para os maiores níveis de fósforo nos padrões.

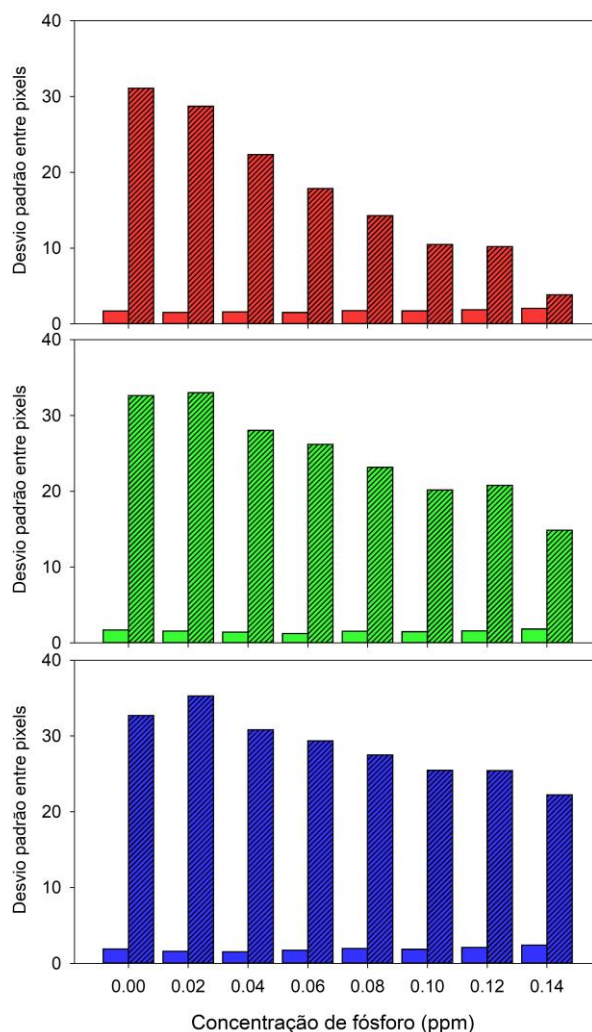


Figura 7. Desvio padrão entre pixels dentro da área amostrada de acordo com a camada RGB para imagens obtidas com *smartphone* (barras limpas) ou *scanner* (barras hachuradas) para os níveis de padrões de fósforo avaliados.

As estimativas da concentração de fósforo nas amostras a partir das curvas padrão utilizando-se a absorbância e parâmetros extraídos nas imagens encontram-se na Tabela 1. Observa-se menores valores de repetibilidade, LOD e LOQ de 19%, 0,003 e 0,010 ppm, usando-se a absorbância como preditor. Comparando-se as estimativas obtidas com as informações das imagens, observa-se menores valores de repetibilidade, LOD e LOQ para imagens de *smartphone*, com valores mínimos de repetibilidade utilizando-se a média de vermelho como preditor, sendo de 24%, 0,010 e 0,030 ppm, respectivamente. Apesar de apresentar repetibilidade superior de 27%, a camada verde nas imagens de *smartphone* apresentou LOD e LOQ de inferior à média de vermelho, de 0,008 e 0,023 ppm tanto para a média quanto para a mediana.

Tabela 1. Estimativas da média de fósforo na solução de leitura (\hat{P} ; ppm), variâncias entre amostras ($\hat{\sigma}_a^2$) e residual ($\hat{\sigma}_r^2$), repetibilidade (Rep), limite de detecção (LOD; ppm) e limite de quantificação (LOQ; ppm) utilizando-se regressão linear com base na absorbância (725nm) ou métricas de cores vermelho (R), verde (G) e azul (B) em amostras de alimentos para animais.

Imagem	Preditor	\hat{P}	EP	P-valor	$\hat{\sigma}_a^2$	EP	P-valor	$\hat{\sigma}_r^2$	EP	P-valor	Rep	LOD	LOQ
	Absorbância	0.067	0.0035	<.001	0.000496	0.000105	<.001	0.000163	0.000011	<.001	19%	0.003	0.010
Smartphone	Média R	0.064	0.0032	<.001	0.000424	0.000089	<.001	0.000243	0.000016	<.001	24%	0.010	0.030
	Mínimo R	0.063	0.0032	<.001	0.000400	0.000087	<.001	0.000310	0.000021	<.001	28%	0.023	0.070
	Máximo R	0.062	0.0033	<.001	0.000434	0.000094	<.001	0.000350	0.000024	<.001	30%	0.011	0.033
	Mediana R	0.078	0.0072	<.001	0.000872	0.000462	0.059	0.014710	0.000988	<.001	156%	0.095	0.287
	Média G	0.059	0.0032	<.001	0.000418	0.000088	<.001	0.000249	0.000017	<.001	27%	0.008	0.023
	Mínimo G	0.058	0.0031	<.001	0.000383	0.000086	<.001	0.000426	0.000029	<.001	36%	0.034	0.103
	Máximo G	0.059	0.0033	<.001	0.000444	0.000093	<.001	0.000240	0.000016	<.001	26%	0.012	0.037
	Mediana G	0.059	0.0032	<.001	0.000415	0.000088	<.001	0.000251	0.000017	<.001	27%	0.008	0.023
	Média B	0.061	0.0031	<.001	0.000374	0.000084	<.001	0.000405	0.000027	<.001	33%	0.036	0.110
	Mínimo B	0.057	0.0035	<.001	0.000375	0.000116	0.001	0.001622	0.000110	<.001	71%	0.090	0.273
	Máximo B	0.064	0.0033	<.001	0.000444	0.000093	<.001	0.000246	0.000017	<.001	24%	0.041	0.123
	Mediana B	0.061	0.0031	<.001	0.000369	0.000084	<.001	0.000429	0.000029	<.001	34%	0.035	0.107
Scanner	Média R	0.106	0.0046	<.001	0.000797	0.000190	<.001	0.001333	0.000087	<.001	34%	0.087	0.263
	Mínimo R	0.131	0.0052	<.001	0.000926	0.000250	<.001	0.002822	0.000184	<.001	41%	0.163	0.493
	Máximo R	0.096	0.0040	<.001	0.000599	0.000138	<.001	0.000835	0.000054	<.001	30%	0.063	0.190
	Mediana R	0.108	0.0050	<.001	0.000904	0.000219	<.001	0.001713	0.000112	<.001	38%	0.091	0.277
	Média G	0.085	0.0051	<.001	0.000957	0.000237	<.001	0.002075	0.000135	<.001	54%	0.085	0.257
	Mínimo G	0.091	0.0058	<.001	0.001159	0.000306	<.001	0.003264	0.000213	<.001	63%	0.135	0.410
	Máximo G	0.080	0.0043	<.001	0.000706	0.000164	<.001	0.001136	0.000074	<.001	42%	0.067	0.203
	Mediana G	0.086	0.0054	<.001	0.001043	0.000264	<.001	0.002538	0.000166	<.001	59%	0.089	0.270
	Média B	0.079	0.0059	<.001	0.001175	0.000311	<.001	0.003505	0.000229	<.001	75%	0.098	0.297
	Mínimo B	0.081	0.0061	<.001	0.001193	0.000336	<.001	0.004368	0.000285	<.001	82%	0.147	0.447
	Máximo B	-0.013	0.0248	0.613	0.017900	0.005708	0.002	0.097950	0.006383	<.001	-	0.176	0.533
	Mediana B	0.080	0.0063	<.001	0.001301	0.000356	<.001	0.004348	0.000284	<.001	82%	0.105	0.317

5 DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou avaliar o potencial da quantificação de fósforo em alimentos para animais através de imagens obtidas com *smartphone* ou *scanner*, em comparação com a tradicional espectrofotometria. De um modo geral, os resultados obtidos indicam que as imagens de celular possuem maior potencial de uso, com as camadas vermelho e verde demonstrado potencial superior ao azul.

Esses resultados podem ser explicados a partir da teoria das cores descrita por Isaac Newton em 1672 onde a percepção da cor do objeto é a parte do espectro de luz que ele reflete. Para enxergarmos uma certa cor em um objeto este deve estar iluminado (Ribeiro, J.L.P., 2017). Logo a luz da fonte atinge o objeto por completo e então a cor é refletida, captada pelos olhos humanos e transformada em imagem no cérebro (Dartnall; Bowmaker; Mollon, 1983). Como, por exemplo, um objeto azul, que absorve todos demais espectros da luz e reflete apenas o azul.

A análise do fósforo em molibdato é tradicionalmente conhecida pelas colorações de azul aos espectros de luz visível, no entanto para análise de imagem provavelmente o vermelho e verde se destacam como canais mais sensíveis. Quando a luz branca incide na placa é refletida como azul, ou seja, todo o pigmento vermelho e verde é absorvido e a luz azul refletida. Dessa forma, a absorbância do fósforo vai ser demonstrada através dos valores espectrais do vermelho e do verde com mais precisão. Conceituando a reflexão seletiva (Henrique, et al., 2019). Esta característica de absorção e reflexão de luz por um objeto é influenciado pelo tipo de material do qual ele é produzido.

É importante mencionar a recomendação de repetibilidade inferior a 15% para métodos quantitativos avaliando elementos entre 0,1 e 1 ppm (Regulation, C. C., 2009), que compreende as concentrações de fósforo estudadas no presente estudo. Considerando-se o valor de 19% observado para a absorbância como preditora, indica-se que fatores aleatórios presentes no estudo devem ser mais bem controlados. No entanto, isso não impede a inferência sobre o potencial dos métodos baseados em imagens, de modo que esses estariam ainda mais susceptíveis a fatores aleatórios do que a absorbância.

Para o método linear baseado na lei de Lambert-beer, utilizado no presente estudo, a linearidade entre a concentração do analito e do preditor é uma premissa essencial, o que pode explicar parcialmente os maiores valores de repetibilidade, LOD e LOQ com imagens de *scanner*. A perda de linearidade observada na Figura 6, principalmente para o vermelho nas imagens de *scanner*, indica saturação dessa camada e perda de capacidade preditiva. Esse resultado é importante pois claramente a camada vermelha foi a que demonstrou maior potencial nas imagens de *smartphone*. Ademais, o elevado desvio padrão entre pixels nas imagens de *scanner* deve estar associada à interação entre a fonte de luz do equipamento e componentes estruturais da placa ELISA. É visualmente perceptível uma linha no sentido da fonte de luz em todas as poças da placa (ANEXO B), as quais também são visíveis no estudo de Filgueiras et al. (2021). Para contornar tal interação acessórios que facilitam a difusão da luz podem ser adicionados, como uma fina camada de etileno acetato de vinila (EVA) branco empregada por Colzani et al, 2017. A inclusão de preditores como máximo, mínimo e mediana, além da tradicional média buscou avaliar se a possível heterogeneidade entre pixels poderia ser contornada pela utilização dos mesmos. Considerando-se que a heterogeneidade entre os pixels foi mais evidente nos dados de *scanner*, e nas camadas vermelho e verde o máximo foi o parâmetro de melhor capacidade preditiva. Há indícios de que o uso do máximo minimiza o efeito de heterogeneidade, no entanto em um nível insuficiente para alcance de desempenho potencialmente satisfatório como a média nas imagens de *smartphone*.

Apesar de fatores como luz ambiente, posição da amostra e distância do foco poderem afetar a precisão da análise colorimétrica (Vargas-Muñoz, et al. 2023), essas foram minimamente padronizadas através do uso de uma simples *dark box*. No entanto, a partir do presente estudo, há claramente espaço para melhorias nos aparatos, cabendo aprimoramentos principalmente na identificação de distâncias ótimas para obtenção da imagem, quanto de temperatura e potência da fonte de luz acoplada a placa de ELISA. Apesar dos valores de RGB poderem ser afetados pela resolução das imagens esse efeito é pouco significativo (Souza et al., 2023), o que indica que alterações em parâmetros da câmera do *smartphone* não deve receber foco para aprimoramento. No entanto, ressalva-se que toda e qualquer adaptação para melhoria de desempenho da imagem deve primar pela independência de modelo dos equipamentos *smartphones* e simplicidade de instrumentação dos aparatos em laboratório, cabendo pesquisas verificando esses efeitos.

A quantificação de LOD e LOQ são importantes para determinar a sensibilidade dos métodos. Os valores de LOD são importantes para diferenciação do analito em relação ao branco, enquanto os valores de LOQ remetem a um limite mínimo de concentração do analito na solução de leitura que pode ser confiavelmente detectado (Ambruster e Pry, 2008). Nesse sentido, os valores observados nas camadas vermelho e verde, baixos e próximos à absorbância indicam bom desempenho dessas. Considerando-se que os valores observados de LOQ na camada verde próximos de 0,023 ppm são relativamente baixos face as concentrações das soluções minerais, esses podem ser considerados aceitáveis.

Como já demonstrado pelos resultados do presente estudo, a avaliação colorimétrica de fósforo-molibdato com imagens de *smartphone* é possível e viável. Associados aos testes já mencionados, duas outras linhas devem ser levantadas. Primeiramente a extração de mais informações das imagens por combinações e tratamentos matemáticos do RGB associada à otimização por técnicas de análises multivariada, como realizado por Souza et al. (2023) pode ser um aprimoramento chave. Secundariamente, a automação de processos como a detecção das cubetas, segmentação e extração de informações através de algoritmos podem amplificar a aplicabilidade do conceito aqui proposto.

6 CONCLUSÕES

Imagens de *smartphone* apresentaram potencial superior em relação ao *scanner* como uso em substituição à espectrofotometria, sendo um resultado promissor pois é um equipamento de fácil acesso e de alta popularidade. Para essa forma de aquisição de imagem, as camadas vermelho e verde se mostraram com maior potencial preditivo e sensibilidade para limites de detecção e quantificação inferiores. Fazem-se necessários ainda, estudos para o aprimoramento de técnicas que permitam igualar o desempenho do uso de *smartphone* ao de espectroscopia, o que é evidentemente possível, dada a simplicidade dos aparatos utilizados no presente trabalho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

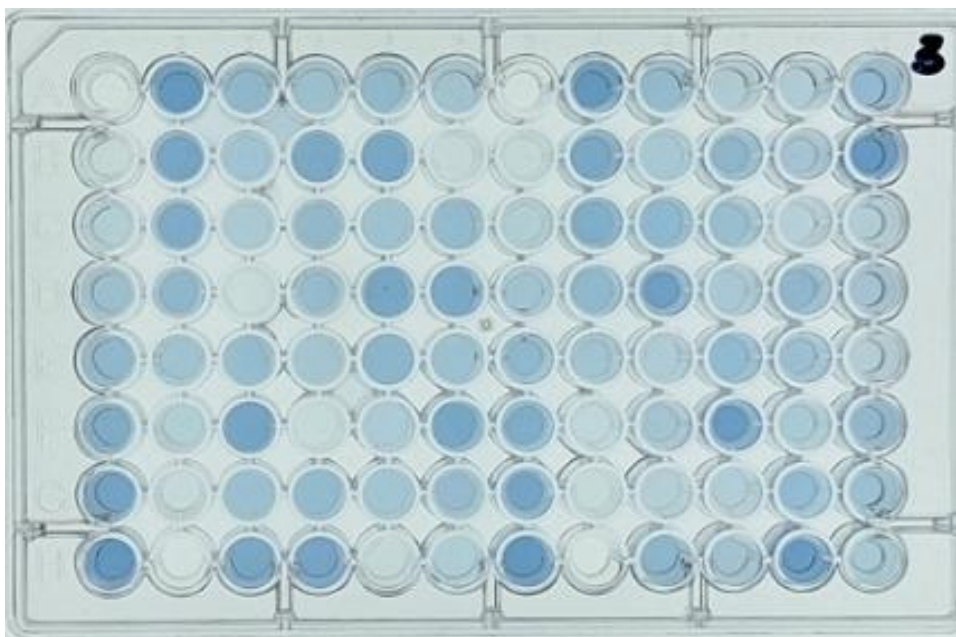
- ALI, Qurban et al. Research advances and applications of biosensing technology for the diagnosis of pathogens in sustainable agriculture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 9002-9019, 2021.
- ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 29 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S49-52, ago. 2008.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO). **Official Publication**. Atlanta, 2021.
- BACKES, André Ricardo; JUNIOR, Sá; DE MESQUITA, Jarbas Joaci. **Introdução à visão computacional usando Matlab**. Alta Books Editora, 2016.
- BAESSO, Murilo M. et al. DEEP LEARNING-BASED MODEL FOR CLASSIFICATION OF BEAN NITROGEN STATUS USING DIGITAL CANOPY IMAGING. **Engenharia Agrícola**, v. 43, p. e20230068, 2023.
- BARREIROS, José; MAGNE, Nicolás. Open-source multispectral camera array for vegetation analysis. In: **2015 CHILEAN Conference on Electrical, Electronics Engineering, Information and Communication Technologies (CHILECON)**. IEEE, 2015. p. 879-884
- CANASSA, Thalita A.; LAMONATO, Anna Luisa; RIBEIRO, Allan Victor. Utilização da lei de Lambert-Beer para determinação da concentração de soluções. **Journal of Experimental Techniques and Instrumentation**, v. 1, n. 2, 2018.
- CHRISTODOULEAS, Dionysios C. et al. Broadly available imaging devices enable high-quality low-cost photometry. **Analytical chemistry**, v. 87, n. 18, p. 9170-9178, 2015.
- COLZANI, Heloisa et al. Phosphate colorimetric analysis using a desktop scanner and automated digital image analysis: a didactical example to teach colorimetric analyses. **Quim. Nova**, v. 40, p. 833-839, 2017.
- COSTA, Anderson G. et al. Classification of macaw palm fruits from colorimetric properties for determining the harvest moment. **Engenharia Agrícola**, v. 38, p. 634-641, 2018.
- CURBANI, Luana; GELINSKI, Jane Mary Lafayette Neves; BORGES, Endler Marcel. Determination of ethanol in beers using a flatbed scanner and automated digital image analysis. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 249-259, 2020.
- DARTNALL, Herbert JA; BOWMAKER, James K.; MOLLON, John Dixon. Human visual pigments: microspectrophotometric results from the eyes of seven persons. **Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences**, v. 220, n. 1218, p. 115-130, 1983.
- DETMANN, E. et al. **Métodos para Análise de Alimentos**. 2. ed. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2021, 350 P. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(07\)60059-0](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(07)60059-0)
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento Digital de Imagens**. 3 edição ed. [s.l.] Pearson Universidades, 2009.
- FABRIS, B. T.; JOÃO, J. J.; BORGES, E. M. Quantificação de nitrito em água utilizando um scanner de mesa. **Revista Virtual de Química**, v. 12, p. 569-582, 2020.
- FILGUEIRAS, Matheus Fernandes; DE OLIVEIRA LIMA, Bianca; BORGES, Endler Marcel. A high-throughput, cheap, and green method for determination of ethanol in cachaça and vodka using 96-well-plate images. **Talanta**, v. 241, p. 123229, 2022.
- FIRDAUS, M. Lutfi et al. Smartphone-based digital image colorimetry for non-enzymatic detection of glucose using gold nanoparticles. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 35, p. 100472, 2022.
- FISKE, Cyrus H.; SUBBAROW, Yellapragada. The colorimetric determination of phosphorus. **J. biol. Chem**, v. 66, n. 2, p. 375-400, 1925.
- GALVÃO, Geferson Flávio Porto et al. Visão computacional para detecção de doenças fúngicas na agricultura. **ÚNICA Cadernos Acadêmicos**, v. 2, n. 1, 2018.

- GERASEEV, Luciana Castro et al. Composição corporal e exigências nutricionais de cálcio e fósforo de cordeiros Santa Inês em crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 815-822, 2001.
- GOMES, José Carlos; OLIVEIRA, Gustavo Fonseca. Análises físico-químicas de alimentos. **UFV**, 303p, 2011.
- GOMES, Marcos S. et al. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, v. 31, p. 1577-1581, 2008.
- HENRIQUE, Franciele Renata et al. Luz à primeira vista: um programa de atividades para o ensino de óptica a partir de cores. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 41, 2019.
- KAUFMAN, Dora; VILAS BOAS, Lenilson Lemos. Visão computacional na agricultura: APIs de detecção e reconhecimento de doenças das plantas. **TECCOGS: Revista Digital de Tecnologias Cognitivas**, n. 20, p. 96-112, 2019.
- LIMA, Luís Spencer. Lei de lambert-beer. **Revista de Ciência Elementar**, v. 1, n. 1, 2013.doi.org/10.24927/rce2013.047
- MANCIN, Wellington Renato et al. The use of computer vision to classify Xaraés grass according to nutritional status in nitrogen. **Revista Ciência Agronômica**, v. 53, 2021.
- MAROUBO, Laís A.; MELCHERT, Wanessa R. Development of an Environmentally Friendly Extraction Method Using Smartphone-Based Digital Images for the Determination of Total Sulfonamides in Meat Samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, p. 846-856, 2023.
- MOONRUNGSEE, Nuntaporn.; PENCHAREE, Somkid.; JAKMUNEE, Jaroon. Colorimetric analyzer based on mobile phone camera for determination of available phosphorus in soil. **Talanta**, v. 136, p. 204–209, 2015.
- MOREIRA, Isabella Brandão et al. Separation of coriander seeds by red, green and blue image processing. **Ciência Rural**, v. 52, p. e20210384, 2022.
- NASEM. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition**. Whashington, DC.: National Academies Press, 2021
- O'BRIEN, Bettina; UMA, V. Concepts and Applications. **Artificial Intelligence (AI): Recent Trends and Applications**, p. 111–130, 2021.
- OLIVEIRA, Carlos et al. Avaliação dos níveis de fósforo sérico e ósseo em búfalas (*Bubalus bubalis*) antes e após suplementação com mistura mineral seletiva. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 43, p. e07130, 2023.
- PALMA, M. N. N., et al. Evaluation of Acid Digestion Procedures to Estimate Mineral Contents in Materials from Animal Trials. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 11, p. 1624, 2015.
- PETERSON, R. C.; WOLFFSOHN, J. S. The effect of digital image resolution and compression on anterior eye imaging. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 89, n. 7, p. 828, 2005.
- RASMUSSEN, Christoffer Bogelund; MOESLUND, Thomas B. Maize silage kernel fragment estimation using deep learning-based object recognition in non-separated kernel/stover rgb images. **Sensors**, v. 19, n. 16, p. 3506, 2019.
- REGULATION, CEC Commision. No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. **Official Journal of the European Union**, p. 1-130, 2009.
- REN, Y. et al. Effect of replacing dicalcium phosphate with mono-dicalcium phosphate to supplement phosphorus on laying performance, phosphorus-calcium metabolism and bone metabolism of aged laying hens. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 2 jun. 2023.
- RIBEIRO, Jair Lúcio Prados. “Sobre as cores” de Isaac Newton-uma tradução comentada. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 39, 2017.

- SALAU, Jennifer et al. A multi-Kinect cow scanning system: Calculating linear traits from manually marked recordings of Holstein-Friesian dairy cows. **Biosystems Engineering**, v. 157, p. 92-98, 2017.
- SALTORATTO, Alyne Yumi Kodama et al. MSConitoramento de avicultura a partir de técnicas de visão computacional. In: **Colloquium Exactarum**. ISSN: 2178-8332. 2013. p. 47-66.
- SANTOS, Izaura Ceolin dos et al. Método rápido e de baixo custo empregando smartphone para a determinação de eugenol em óleo essencial de cravo. **Ciência Rural**, v. 53, p. e20220498, 2023.
- SCHNEIDER, Caroline A.; RASBAND, Wayne S.; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.
- SEVERO, André M.; WEIZENMANN, Guilherme de S. Identificação da Massa de Suínos Utilizando Visão Computacional para Ajuste dos Parâmetros de Insensibilização. In: **Congresso Brasileiro de Automática-CBA**. 2020.
- SIQUEIRA, Dirceu Pereira; VIEIRA, Ana Elisa Silva Fernandes. OS LIMITES À RECONSTRUÇÃO DIGITAL DA IMAGEM NA SOCIEDADE TECNOLÓGICA. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 17, n. 3, p. e67299-e67299, 2022.
- SKOOG, D. A., et al., **Fundamentos de Química Analítica**, 8a Ed., São Paulo:Thomson, 2006.
- SONG, HuaiBo et al. Detection of dairy cow lameness based on fitting line slope feature of head and neck outline. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v. 34, n. 15, p. 190-199, 2018.
- SUTTLE, Neville F. Phosphorus. En **Mineral nutrition of livestock**. 5ª Edition, Cabi, p.128-169, 2022.
- THANG, Ho Viet et al. Nature of stable single atom Pt catalysts dispersed on anatase TiO₂. **Journal of Catalysis**, v. 367, p. 104-114, 2018.
- TIAN, Chunwei et al. A heterogeneous group CNN for image super-resolution. **IEEE transactions on neural networks and learning systems**, 2022.
- TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P.V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 20(3):127-138, 2000.
- TOKARNIA, Carlos Hubinger et al. **Deficiências Minerais em Animais de Produção**, Rio de Janeiro: Ed. Helianthus. 191p. 2010
- UHLIKOVA, Natalie et al. Use of scanners for colorimetric analysis of microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs): A practical guide. **Microchemical Journal**, v. 191, p. 108879, 2023.
- VARGAS-MUÑOZ, M. A. et al. Paper sensor-based method using a portable 3D-printed platform and smartphone-assisted colorimetric detection for ammonia and sulfide monitoring in anaerobic digesters and wastewater. **Microchemical Journal**, v. 188, p. 108469, 2023.
- VELLASCO, Cassia Rampini et al. Níveis de cálcio e relação cálcio: fósforo em rações para poedeiras leves de 24 a 40 semanas de idade. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, p. 206-216, 2016.
- YANG, C.-X. et al. Determination of Total Phosphorus in Water Sample by Digital Imaging Colorimetry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 850–853, jun. 2007.

ANEXOS

A- Imagem obtida de um *smartphone*



B - Imagem obtida por *scanner*

