

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS

Izaura Ceolin dos Santos

**USO DE IMAGENS DIGITAIS E SMARTPHONE PARA DETERMINAÇÃO
DE EUGENOL EM ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-INDIA
(*SYZYGIUM AROMATICUM*)**

Santa Maria, RS
2023

Izaura Ceolin dos Santos

**USO DE IMAGENS DIGITAIS E SMARTPHONE PARA DETERMINAÇÃO
DE EUGENOL EM ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-INDIA
(*SYZYGIUM AROMATICUM*)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientador: Dr. Juliano Smanioto Barin

Santa Maria, RS
2023

dos Santos, Izaura Ceolin
USO DE IMAGENS DIGITAIS E SMARTPHONE PARA
DETERMINAÇÃO DE EUGENOL EM ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA
INDIA / Izaura Ceolin dos Santos.- 2023.
86 p.; 30 cm

Orientador: Juliano Smanioto Barin
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2023

1. Métodos colorimétricos de quantificação 2. Uso de
imagens digitais 3. Determinação de eugenol 4. Óleo
essencial de cravo-da-india I. Smanioto Barin, Juliano
II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFEM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, IZAURA CEOLIN DOS SANTOS, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Izaura Ceolin dos Santos

**USO DE IMAGENS DIGITAIS E SMARTPHONE PARA DETERMINAÇÃO
DE EUGENOL EM ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-INDIA (*SYZYGIUM
AROMATICUM*)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 17 de março de 2023:

Juliano Smanioto Barin, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Sandro Rogério Giacomelli, Dr. (URI/FW)

Rodrigo Cordeiro Bolzan, Dr. (UFSM)

Fábio Andrei Duarte, Dr. (UFSM)

Mônica Voss, Dra. (Università degli Studi di Torino)

Santa Maria, RS
2023

Dedico este trabalho a Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), ao Núcleo de Tecnologia dos Alimentos (NTA), bem como à Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Câmpus de Frederico Westphalen, pela parceria e disponibilidade dos laboratórios na execução deste trabalho.

Agradeço de modo especial ao meu orientador, Professor Doutor Juliano Smanioto Barin, que me acolheu, na Universidade Federal de Santa Maria, como aluna, não só pelas orientações e ensinamentos profissionais, mas também pela dedicação e sinceridade constante, digna da minha total admiração profissional e pessoal. Obrigada pelos saberes compartilhados, atenção, paciência, compreensão e rigorosidade que muito me ensinou.

Aos professores doutores Sandro Rogério Giacomelli, Rodrigo Bolzan, Roger Wagner, pelas valiosas contribuições no parecer de qualificação, que me propiciaram aprofundar a produção desta tese e, de maneira especial, à colega e amiga Doutora Mônica Voss que, além de participar significativamente da qualificação, contribuiu expressivamente durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas colegas e amigas Sandra K. Schlesner, Débora Piovesan de Moraes, Tananda Natielli da Rosa por toda amizade, apoio e colaboração exaustiva para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família e de modo especial ao meu esposo, Daniel, pelo apoio, paciência nos momentos de inquietações, ausência, cansaço, sendo meu alicerce, ouvindo-me, entendendo-me, colaborando nesta caminhada. Obrigada por estar sempre orando por mim nos momentos mais difíceis, por trazer-me calma e serenidade. Ao meu pequeno filho Théó, que chegou em minha vida durante a caminhada do doutorado, impulsionando-me a escrever o melhor capítulo desta trajetória, ser mãe, e permitindo compreender o real sentido da felicidade diária.

Finalizo dedicando este trabalho à Deus, pela vida que me deste, pela oportunidade de realizar este doutorado, pela saúde, pelo dom da perseverança, pela constante companhia em todos os momentos e pelo espírito de luta que me impulsionou até aqui. “Os que esperam no Senhor renovarão suas forças, subirão com asas e não se cansarão, caminharão e não se fatigarão” (Isaías 40:31).

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os
seus planos serão bem-sucedidos.
(Provérbios 16)

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE EUGENOL EM ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA COM SMARTPHONE

AUTORA: Izaura Ceolin dos Santos
ORIENTADOR: Juliano Smanioto Barin

No presente estudo, alternativas inovadoras e rápidas para a determinação de constituintes majoritários presentes em amostras de cravo-da-índia foram desenvolvidas com o auxílio de imagens digitais. Os experimentos foram realizados, inicialmente, por meio da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e, posteriormente, por Colorimetria empregando smartphone. Otimizou-se, previamente, para CCD os tipos de eluentes, iluminação, softwares, métodos de revelação, detecção, bem como a influência de volume nas amostras. Foi projetado um sistema portátil para a aquisição das imagens baseado no uso de smartphone e posterior ensaios de quantificação por meio do aplicativo Photometrix e outros softwares livres como ImageJ e qTLC. Respostas não precisas foram encontradas devido às dificuldades de reprodutibilidade das análises, inviabilizando a quantificação de eugenol. Assim, a Colorimetria associada ao uso de imagens digitais com smartphone foi usada para determinação de eugenol no óleo de cravo-da-índia. O smartphone, juntamente ao aplicativo Photometrix, foi empregado para avaliação da reação colorimétrica do eugenol com o reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados apresentaram concordância frente aos métodos tradicionais de análise como Cromatografia Gasosa e Espectrofotometria, variando de 97% a 101% para as cinco amostras testadas. O método desenvolvido permitiu a análise de diversas amostras em um curto período de tempo. Destaca-se, ainda, a portabilidade e a fácil operação, podendo ser útil para aplicações em campo e locais de acesso restrito.

Palavras-chave: Colorimetria. Imagens digitais. Determinação de eugenol. Óleo essencial de cravo-da-índia.

ABSTRACT

DETERMINATION OF EUGENOL IN CLOVE ESSENTIAL OIL USING A SMARTPHONE

AUTHOR: Izaura Ceolin dos Santos

ADVISOR: Juliano Smanioto Barin

In this study, innovative and fast alternatives for determining the major constituents of clove essential oil were developed with digital images. The experiments were initially carried out using thin-layer chromatography (TLC) and, later, by colorimetry using a smartphone. The types of eluents, lighting, software, development methods, detection, and the influence of volume on the samples were previously optimized for TLC. A portable system was designed to acquire images based on the use of a smartphone, with subsequent quantification tests being made using the Photometrix app and other free software such as Image J and qTLC. The results were inaccurate due to the lack of reproducibility in analyses. Thus, colorimetry associated with the use of digital images in a smartphone was used for the determination of eugenol in clove oil. The Photometrix app was used to evaluate the colorimetric reaction between the eugenol and the Folin-Ciocalteu reagent. The results were in agreement with those obtained through traditional methodologies, such as gas chromatography and spectrophotometry, ranging from 97% to 101% for the five samples tested. The developed method allowed the analysis of several samples in a short period of time. Portability and ease of operation are also noteworthy, making it useful in the field and in places with restricted access.

Keywords: Colorimetry. Digital images. Eugenol determination. Clove essential oil.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 01 – Compostos majoritários presentes no cravo-da-índia | 32 |
| Figura 02 – Relação entre eluentes e a afinidade da amostra na placa cromatográfica | 27 |
| Figura 3 – Sistema de aquisição de imagens em pesquisas com Cromatografia em Camada Delgada entre os anos de 2004-2023 | 31 |
| Figura 4 – Softwares usados para processamento de imagens em Cromatografia em Camada Delgada no período de 2004 a 2023 | 33 |
| Figura 05 – Reação de síntese do acetato de eugenila | 46 |
| Figura 06 – Ensaios qualitativos de fase móvel e revelador químico realizados com padrões e amostra de cravo-da-índia em mg/m L por diferentes solventes: acetato de etila, álcool etílico, dicloro metano, hexano | 48 |
| Figura 07 – Soluções eluentes testados x índice de retenção da amostra | 49 |
| Figura 08 – Concentrações de solução de referência de eugenol (25, 50, 75, 100, 150, 200mg/mL) e extratos de cravo-da-índia (A1 e A2 na concentração de 50 mg/mL) reveladas em câmara de UV 254 nm | 50 |
| Figura 09 – Características qualitativas de compostos presentes no cravo-da-índia (eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno), após eluídas com 90% hexano e 10% acetato de etila e reveladas com solução de ácido sulfúrico e 10% metanol | 51 |
| Figura 10 – Representação de mistura, diluída em 50 mg/m L, de padrões dos compostos majoritários, cariofileno, óxido de cariofileno e eugenol presentes no cravo-da-índia após revelação química com solução de ácido sulfúrico e 10% metanol | 52 |
| Figura 11 – Comparativo das imagens das placas cromatográficas com amostra de padrão de eugenol em diferentes concentrações (25, 50, 75, 100, 150, 200 mg/mL) antes da revelação (A), revelação química solução de ácido sulfúrico e 10% metanol (B) e revelação física por UV (C) | 52 |
| Figura 12 – Resultados obtidos pelo Photometrix de aplicação das amostras nas curvas construídas pelo Photometrix com curvas de 25 mg/mL a 200mg/mL | 54 |
| Figura 13 – Curvas de calibração dos padrões de eugenol (A), cariofileno(B) e óxido de cariofileno(C) obtidas pelo software qTLC, reveladas com ácido sulfúrico e 10% metanol .. | 55 |
| Figura 14 – Linearidade das curvas de calibração do eugenol para amostra de cravo-da-índia [A1(vermelho), A2(preto), A3(verde), A4(azul)] avaliada | 56 |
| Figura 15 – Análise de eugenol em diferentes tempos de extrações para as amostras de cravo-da-índia [A1, A2, A3 e A4] observadas por método físico e químico | 58 |

Figura 16 – Desvio padrão associado ao número de gotas inseridas na placa cromatográfica 59

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 01 – Avaliação de sistemas eluentes com solventes orgânicos | 41 |
| Tabela 2 – Resultados de média e desvio padrão obtidos pela aplicação das amostras na curva de calibração obtida pelo software qTLC para o padrão de eugenol, por método físico e químico de revelação em diferentes tempos de extração de óleo | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|---|
| ANOVA | <i>Analysis of Variance</i> |
| AOAC | <i>Official Methods of Analysis of Association of Official Agricultural Chemists</i> |
| APPs | Aplicativos para dispositivos móveis |
| BMP | Windows Bitmap |
| C | Celsius |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| GC | Cromatografia gasosa, <i>do inglês gas chromatography</i>) |
| CG/EM | Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas |
| CIE XYZ | Primeiras ligações quantitativas definidas entre distribuições de comprimentos de onda no espectro eletromagnético visível e cores fisiologicamente percebidas na visão de cores humana |
| cm | Centímetro |
| CMYK | Ciano (<i>Cyan</i>), Magenta (<i>Magenta</i>), Amarelo (<i>Yellow</i>) e Preto (<i>Black</i>) |
| DIC | <i>Digital Image Colorimetry</i> |
| DICOM | <i>Digital Imaging and Communications in Medicine</i> |
| g | Gramas |
| GC-FID | <i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i> |
| GIF | <i>Graphics Interchange Format</i> |
| HCA | <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| HSV/HSL | <i>Hue saturation e value/Hue, Saturation e Lightness</i> |
| JPEG | <i>Joint Photographic Experts Group</i> |
| LED | <i>Light Emitter Diode</i> |
| m | Metro |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| nm | Nanômetro |
| PCA | <i>Principal Component Analysis</i> |
| pH | Potencial hidrogeniônico |

| | |
|----------------|--|
| PLS | <i>Partial Least Squares Regression</i> |
| qTLC | <i>Quantify chemical compounds via thin layer chromatography</i> |
| R ² | Coeficiente de determinação |
| Rf | Fator/índice de retenção da amostra |
| RGB | Vermelho (<i>Red</i>), Verde (<i>Green</i>) Azul (<i>Blue</i>) |
| RMSEC | <i>Calibration Mean Squared Error</i> |
| RMSECV | <i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i> |
| ROI | <i>Region of Interest</i> |
| TIFF | <i>Tag Image File;</i> |
| TPT | Teor de polifenóis totais |
| UNISC | Universidade de Santa Cruz do Sul |
| USB | <i>Universal Serial Bus</i> |
| UV | <i>Ultraviolet radiation</i> |
| UVC | <i>Ultraviolet radiation C</i> |
| v | Volts |
| w | Watt |
| µm | Micrometro |
| µL | Microlitro |
| psi | Pressão resultante da força de uma libra-força aplicada a uma área de uma polegada quadrada. |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 20 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 21 |
| 3.1 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (<i>SYZYGIUM AROMATICUM</i>)..... | 21 |
| 3.2 ANÁLISE DE ÓLEO ESSENCIAL POR MEIO DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA..... | 22 |
| 3.3 ASPECTOS GERAIS DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) | 23 |
| 3.3.1 Procedimento geral de separação dos compostos em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 24 |
| 3.3.2 Escolha do solvente para Cromatografia em Camada Delgada | 25 |
| 3.3.3 Reveladores físicos | 26 |
| 3.3.4 Reveladores químicos | 27 |
| 3.3.5 Métodos quantitativos em cromatografia em camada delgada | 27 |
| 3.4 USO DE IMAGENS DIGITAIS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS SEPARADOS POR CCD..... | 29 |
| 3.5 USO DE IMAGENS DIGITAIS PARA ANÁLISE COLORIMÉTRICA COM SMARTPHONE | 32 |
| 3.6 APLICAÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS PARA ANÁLISE DE ÓLEO ESSENCIAL | 36 |
| 3.7 SOFTWARES UTILIZADOS PARA PROCESSAMENTO DE IMAGENS..... | 37 |
| CAPÍTULO 1 | 39 |
| 4 METODOLOGIA UTILIZADA PARA CCD | 39 |
| 4.1 ANÁLISES PRÉVIAS DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA | 39 |
| 4.1.1 Reagentes e Amostras utilizadas para CCD | 39 |
| 4.1.2 Método de extração do óleo essencial para CCD | 39 |
| 4.1.3 Parâmetros avaliados acerca da CCD | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA | 41 |
| 4.3 ANÁLISES DAS AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM DIFERENTES SOFTWARES..... | 42 |
| 4.3.1 Processamento das imagens com o software qTLC..... | 43 |
| 4.3.2 Processamento das imagens com o software ImageJ..... | 43 |
| 4.4 OTIMIZAÇÃO DE TEMPO DE LEITURA PARA AMOSTRAS PADRÕES..... | 43 |
| 4.5 ANÁLISE DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS..... | 44 |
| 4.6 AVALIAÇÃO DE VOLUME: TESTE DO NÚMERO DE GOTAS..... | 44 |
| 4.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ... | 44 |
| 4.8 ANÁLISES EXTRAS: SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA | 45 |
| 5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS | 47 |
| 5.1 ENSAIOS PRÉVIOS Da fase móvel, revelador químico e físico para CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA..... | 47 |
| 5.2 AVALIAÇÃO DA FASE MÓVEL PARA VERIFICAR A SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS EM CCD..... | 48 |
| 5.3 ESTUDOS DE REVELAÇÃO DOS COMPOSTOS (MÉTODO QUÍMICO E FÍSICO) | 49 |
| 5.3.1 Revelação pelo método físico (UV) | 49 |
| 5.3.2 Revelação pelo método químico..... | 50 |
| 5.4 ESTUDOS DO USO DE SOFTWARES (PHOTOMETRIX, qTLC, IMAGE J) PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DOS COMPOSTOS SEPARADOS..... | 52 |
| 5.5 ESTUDOS DE CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DURANTE A EXTRAÇÃO (TESTES COM DIFERENTES TEMPOS DE DESTILAÇÃO e ANÁLISE CINÉTICA) | 57 |
| 5.6 AVALIAÇÃO DO VOLUME DE AMOSTRAS EM CCD | 58 |
| 5.7 ANÁLISE CROMATOGRAFIA GASOSA..... | 59 |
| 5.8 SÍNTESE DO ACETATO DE EUGENILA..... | 59 |
| 6 CAPÍTULO 2 | 60 |
| 7 DISCUSSÃO GERAL..... | 66 |
| 8 CONCLUSÃO | 69 |
| REFERÊNCIAS..... | 70 |

| | |
|--|-----------|
| APÊNDICES | 76 |
| APÊNDICE 1: TABELA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 77 |
| APÊNDICE 2 – RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS TEMPOS DE LEITURA DE 0 MINUTO A 210 MINUTOS PARA A APLICAÇÃO DA AMOSTRA DE ANÁLISE PRÉVIA A1 | 88 |

1 INTRODUÇÃO

A constante preocupação das indústrias farmacêuticas, químicas e de alimentos com relação à padronização da qualidade de óleos essenciais requer o desenvolvimento de tecnologias e métodos analíticos inovadores, que possam atender às demandas de forma rápida, fácil e, preferencialmente, de baixo custo. A qualidade do óleo depende de seus marcadores químicos, como eugenol, cariofileno, óxido de cariofileno que geram efeitos singulares provenientes de misturas complexas voláteis e impactos sensoriais significativos (HAWRYŁ *et al.*, 2015).

Pesquisas demonstram a eficiência dos óleos essenciais na melhoria e promoção do bem-estar, alívio nos sintomas de doenças relacionadas ao sistema digestivo, fortalecimento das defesas do corpo, além de ser uma opção natural na composição de cosméticos e produtos farmacológicos, contribuindo para saúde e qualidade de vida. Destaca-se, neste estudo, devido a suas propriedades químicas singulares, o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). Este apresenta, como composto majoritário, o eugenol, que gera significativas ações terapêuticas e fisiológicas ao organismo humano (RADÜNZ, 2017).

Na avaliação das características de óleos essenciais, a qualidade e a pureza são fatores significativos para os efeitos terapêuticos e fisiológicos ao organismo humano. Para isso, é fundamental a utilização de técnicas de quantificação satisfatórias que, normalmente, dependem de métodos mais dispendiosos, como a Cromatografia Gasosa (GC) (BACCAN; GODINHO; BARONE, 2005). A GC é bastante usada para análises quantitativas da composição de óleos essenciais, pois combina capacidade de resolução com velocidade e sensibilidade adequadas. No entanto, por ser um método oneroso, demorado, apresenta difusão limitada, requerer estrutura laboratorial específica e treinamento adequado dos analistas. Os laboratórios que precisam reduzir custos e não são bem equipados com instrumentação analítica avançada, encontram muitas vantagens na Cromatografia em Camada Delgada (CCD), assim como em métodos colorimétricos, por consumirem pouco volume de solventes e reagentes, além da possibilidade de aplicação em condições operacionais simples e de fácil entendimento por analistas.

Nesse viés, avanços contemporâneos e inovações, por meio de estratégias mais econômicas e ágeis, visam aumentar a eficiência dos métodos de análises de compostos químicos específicos. Novas tecnologias para aquisição de imagens, tal como a popularização de equipamentos e aplicativos móveis para esta finalidade, têm despertado interesse da comunidade científica em função da possibilidade de captura de informações antes restritas a

equipamentos específicos, intensificando o uso de imagens digitais para fins analíticos (BOCK, 2020). Dessa maneira, observa-se um grande interesse na investigação de imagens associadas às ferramentas de métodos univariados e multivariados de análises qualitativas e quantitativas de compostos químicos embarcadas em dispositivos amplamente disponíveis e de baixo custo, como smartphones (COSTA, 2022).

As alterações de cor registradas com dispositivos de imagem geram interesse na análise química tendo em vista sua simplicidade de uso e fácil adaptação a dispositivos portáteis (SANTOS, 2022). Desta forma, a CCD e a colorimetria podem ser utilizadas de modo mais amplo e assertivo se acopladas ao uso de smartphones por possuírem, no mesmo dispositivo, os sistemas de captura e processamento de imagens que possibilitam análises rápidas, de forma prática, eficiente e com ampla disseminação nos meios de ensino, pesquisa e produção (TEIXEIRA *et al.*, 2021).

Com a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias, vários métodos na literatura foram propostos para análise de diversos compostos, usando imagens digitais com smartphones, demonstrando ser uma ferramenta analítica rápida, de fácil manuseio com baixo custo e portabilidade. Neste contexto, a elaboração de métodos capazes de suprir essas necessidades pode ser considerado um desafio para análises de rotina e o presente trabalho propõe o desenvolvimento de método alternativo, que visa a determinação de eugenol em óleo essencial de cravo-da-índia com smartphone. Para tanto, foram realizados ensaios com propostas distintas, avaliando as melhores condições experimentais de cada uma.

No primeiro ensaio, o método proposto foi a utilização de CCD para determinação de constituintes presentes em óleo essencial de cravo-da-índia. Esta técnica, comparada a outras Cromatografias, é de fácil execução e fornece resultados rápidos, com baixo custo e versatilidade. Contudo, revela algumas desvantagens, como degradação de compostos lábeis, em razão da grande superfície de exposição, difícil quantificação e reprodutibilidade (BACCAN; GODINHO; BARONE, 2005).

Para elucidação dos compostos, realizou-se a revelação física e química e posterior leitura com smartphone. Vários critérios foram otimizados, como: forma de obtenção do óleo essencial, número de gotas aplicadas na placa cromatográfica, tamanho do tubo capilar, tempo de reação, iluminação padronizada na leitura com o smartphone e a linearidade das curvas obtidas. Estes critérios foram comparados com os métodos já usados e relatados na literatura (PAVIA, 2009). A partir dos ensaios empregados, diagnosticando inconsistências e resultados pouco precisos, devido às dificuldades de reprodutibilidade e conseqüente validação, sugeriu-se um segundo estudo de pesquisa.

Neste segundo estudo, propôs-se um método utilizando smartphone para capturar e tratar imagens oriundas da reação colorimétrica do eugenol com o reagente de Folin-Ciocalteu. O smartphone foi utilizado para estimar a intensidade de cor (valores de vermelho, verde e azul) da reação, atuando como uma ferramenta analítica eficaz.

Os procedimentos propostos exploraram as características de cor acoplada ao uso de imagem digital para fins analíticos. Segundo Santos *et al.* (2019), as imagens devem ser coletadas e armazenadas em um sistema capaz de gerenciar cores primárias. Em seguida, os dados precisam ser processados, usando algoritmos matemáticos, baseados em sistemas como RGB (vermelho (*red*), verde (*green*) e azul (*blue*)). Tais sistemas foram avaliados previamente, com base na sensibilidade às cores primárias, que representam as reações colorimétricas em estudo.

Nesse cenário, na presente pesquisa, foi proposto o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos que visam o controle de qualidade de óleos essenciais por meio da utilização de smartphone, de forma rápida, acessível e precisa.

Para melhor compreensão dos temas abordados este documento está dividido em dois capítulos, sendo que, no **Capítulo 1**, traz-se uma revisão da literatura, ensaios iniciais acerca da detecção e quantificação de compostos através da CCD e Colorimetria com o uso de imagens digitais, bem como a metodologia desenvolvida.

Em seguida, no **Capítulo 2**, disserta-se, em forma de artigo publicado em periódico científico, a respeito da adaptação do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu para a determinação de eugenol em óleo essencial de cravo-da-índia e posterior análise com smartphone.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinação de eugenol em óleo essencial de cravo-da-índia com smartphone.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar, por meio da atividade experimental, a eficácia do uso de imagens digitais na quantificação de compostos presentes no cravo-da-índia em Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

- Avaliar diferentes condições experimentais de introdução das amostras, separação e revelação dos compostos, avaliar a influência da luminosidade na aquisição das imagens e o uso de diferentes softwares para seu processamento; identificar e comparar os compostos majoritários presentes em quatro espécies de cravo-da-índia por meio da CCD e o uso de imagens digitais;

- Adaptar o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu para determinar o teor de eugenol em óleo essencial de cravo-da-índia com o uso do smartphone, comparando os resultados obtidos no espectrofotômetro e Cromatografia Gasosa (CG).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*SYZYGIUM AROMATICUM*)

A busca por substâncias antibacterianas e antioxidantes naturais tem sido alvo de diversos estudos científicos. Óleos essenciais são matérias-primas utilizadas pelas indústrias de alimentos, de perfumaria, de química e de produtos de limpeza. Também conhecidos como óleos voláteis ou etéreos, são compostos naturais, complexos, oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas e formados majoritariamente por terpenos. Apresentam intenso odor e podem ser obtidos de folhas, flores e frutos, sendo usados em medicamentos e alimentos. A composição química destes pode ser influenciada por diversos fatores como clima, solo dos locais de cultivo das plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

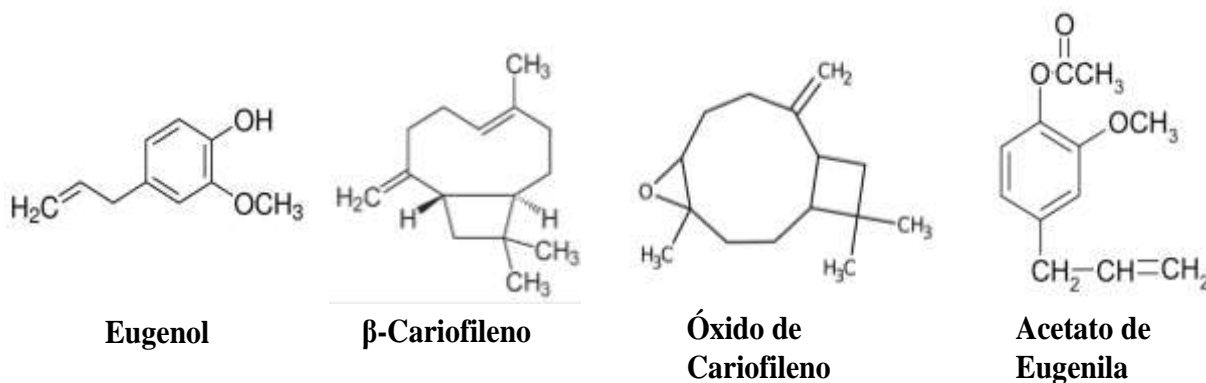
O mercado de óleos essenciais, no Brasil e no mundo, na última década, gerou grande movimentação econômica com tendência de crescimento. O Brasil se destaca no mercado global de óleos essenciais e, dentre os principais óleos comercializados globalmente, destaca-se o óleo de cravo-da-índia (*Syzygium Aromaticum*). A substituição de materiais sintéticos por produtos naturais tem sido uma tendência constante e influenciada de maneira direta pelas demandas dos consumidores. Com o grande potencial existente no país, pesquisas mais extensas e rigorosas ainda precisam ser desenvolvidas no intuito de superar obstáculos relacionados à pureza, como legislação, garantia de qualidade e segurança, para que o mercado seja conquistado (BIZZO, 2022).

O consumo de óleos essenciais é composto, basicamente, pela demanda do mercado de aromas, sabores e fragrâncias (GOMES *et al.*, 2018). Dentre as plantas investigadas, o *Syzygium aromaticum*, popularmente conhecido como cravo-da-índia, destaca-se quanto ao potencial anticarcinogênico ou quimiopreventivo, antioxidante e anti-inflamatório. Desde a antiguidade, é utilizado como condimento, aromatizante para conservas, adorno para pratos selecionados, antisséptico, elemento básico para a elaboração de perfumes e como incenso aromático. Estas propriedades devem-se aos constituintes químicos que caracterizam essa especiaria. Dentre eles, sobressai o eugenol, o óxido de cariofileno, o cariofileno e o acetato de eugenila, que se encontram em maior concentração no óleo do cravo (RADÜNZ, 2017). Suas estruturas estão representadas na Figura 1.

O eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) composto majoritário abundante no cravo-da-índia, é um composto fenólico, com uso muito ativo em matrizes alimentares e tem sido sugerido como

substituto de aditivos sintéticos dadas às suas características antioxidantes e antimicrobianas (RADÜNZ, 2017).

Figura 01 – Compostos majoritários presentes no cravo-da-índia



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

3.2 ANÁLISE DE ÓLEO ESSENCIAL POR MEIO DA CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA

A identificação e a quantificação de marcadores químicos são importantes para se assegurar a autenticidade e a qualidade das matérias-primas. Óleos essenciais possuem suas especificidades devido aos seus princípios ativos, que geram sua característica singular. A quantificação e a identificação dos constituintes de óleos essenciais, como o cravo-da-índia, geralmente, são feitas por CG, que possui algumas limitações quanto ao custo-benefício e simplicidade do uso, pois requer mão de obra especializada com atividade restrita a nível laboratorial, dificultando sua aplicação em campo (NADEEM *et al.*, 2022).

A CCD é uma alternativa simples, rápida e de baixo custo, que pode ser utilizada para avaliação de um analito específico, sendo o método de escolha para separação de analitos quando se requer dados qualitativos em curto espaço de tempo. Ademais, é uma técnica analítica bastante conhecida e empregada em laboratórios do mundo todo.

Nessa perspectiva, alguns trabalhos são abordados, como Sritharan, Jacob e Balasubramaniam (1994), que descreveram a utilização da CCD para avaliar os principais constituintes químicos de óleos essenciais da folha, caule, casca e da raiz da canela do gênero *Cinnamomum* encontrado no Sri Lanka. Hassan *et al.* (2018) efetuaram o controle de qualidade do açafrão e a avaliação de possível adulteração por meio de análise de imagem por cromatografia de camada delgada e métodos quimiométricos. Botelho e Araújo (2022)

abordaram a análise por CCD do óleo essencial extraído da canela comercial. Silva (2006) desenvolveu um estudo analítico dos óleos essenciais extraídos das resinas das espécies *Protium spp.* A análise dos óleos essenciais extraídos ocorreu por GC acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM). Estes óleos foram submetidos à CCD para o isolamento de frações, contendo os componentes a serem identificados.

Nessa linha, ainda, Jesionek *et al.* (2013) caracterizaram o uso de CCD para a triagem de propriedades antimicrobianas de extratos de plantas. Os principais compostos voláteis de três plantas medicinais pertencentes à família *Lamiaceae* foram avaliados quanto às suas propriedades biológicas. O sistema cromatográfico aplicado foi sílica gel eluída com tolueno e acetato de etila. Cromatografia em Camada Delgada foi usada para detecção da atividade antibacteriana de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* dos extratos vegetais e óleos essenciais. Outrossim, Behravan *et al.* (2007) detalharam o método bioautográfico para investigar as atividades antibacterianas de óleos essenciais de *Zataria multiflora*, *Carum copticum* e *Thymus vulgaris*. Os óleos essenciais de todas as plantas exibiram atividade contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Como eluente, foi utilizado éter de petróleo clorofórmio (50:50 como sistema solvente); 22 componentes foram identificados no óleo essencial de *Carum copticum*.

3.3 ASPECTOS GERAIS DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O processo de separação desta técnica está fundamentado no fenômeno de adsorção de substâncias na fase estacionária ou adsorvente, sendo que o composto tem uma maior ou menor adsorção, dependendo das forças de interação, como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. É utilizada, com frequência, para avaliar a quantidade e o número de componentes de uma mistura, como, por exemplo, no processo de determinação de solventes apropriados para uso em cromatografia em coluna, ou mesmo para avaliar a eficiência e o progresso de uma reação química (BACCAN; GODINHO; BARONE, 2005).

É uma técnica na qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: estacionária e móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte rígido com grande área superficial. Geralmente, emprega-se sílica e alumina. A sílica é mais indicada na separação de compostos lipofílicos como aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos graxos, aminoácidos, alcaloides, terpenoides e esteroides, usando o mecanismo de adsorção. Já a alumina (Al_2O_3) é comumente empregada na separação de compostos de caráter ácido-básico pelo fato de poder ser preparada com característica ácida, neutra e alcalina, sendo

bastante útil na separação de substâncias que apresentam variações dessas características (COLLINS *et al.*, 1995).

Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (SILVA NETO; FONSECA; BRAGA, 2016). Além disso, as placas cromatográficas devem ser inertes aos reagentes e solventes, resistentes à temperatura e uniformes para evitar a degradação dos compostos.

A presença das hidroxilas na superfície da placa de sílica permite maior interação e adsorção de compostos mais polares, de modo que os compostos apolares migram facilmente, eluindo significativamente por meio do solvente. As placas de sílica gel disponíveis comercialmente são mais uniformes e homogêneas, melhorando a separação dos constituintes (SILVA; RIBEIRO; BOGES, 2009).

3.3.1 Procedimento geral de separação dos compostos em Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As soluções a serem analisadas em CCD devem ser previamente dissolvidas em um solvente volátil. A aplicação da solução sobre a placa cromatográfica deve ser efetuada a aproximadamente 0,5 centímetros (cm) da base inferior, normalmente realizada com um tubo capilar com aplicação uniforme. Para aplicação de mais de uma amostra, é necessário tomar cuidado com a distância entre os pontos a fim de evitar a sobreposição das amostras. Após a aplicação da(s) amostra(s), a placa de CCD precisa ser introduzida em uma cuba de vidro contendo o solvente apropriado (eluente ou fase móvel) (COLLINS *et al.*, 1995).

A altura do solvente na cuba não pode ultrapassar a linha de aplicação da(s) amostra(s) a(s) qual(ais) o eluente arrastará, carecendo que a cuba fique saturada com vapores de mesma constituição da fase móvel. Para isso, normalmente, é necessário que as paredes laterais internas da cuba sejam recobertas com papel filtro. Este papel ficará, em contato com o eluente, mantendo-se umedecido. Uma vez introduzida a placa na cuba, o solvente ascenderá, por fenômeno de capilaridade, até a extremidade superior. Ao ascender, a fase móvel arrastará preferencialmente os compostos menos adsorvidos na fase estacionária, separando-os dos compostos mais adsorvidos (SILVA; RIBEIRO; BOGES, 2009).

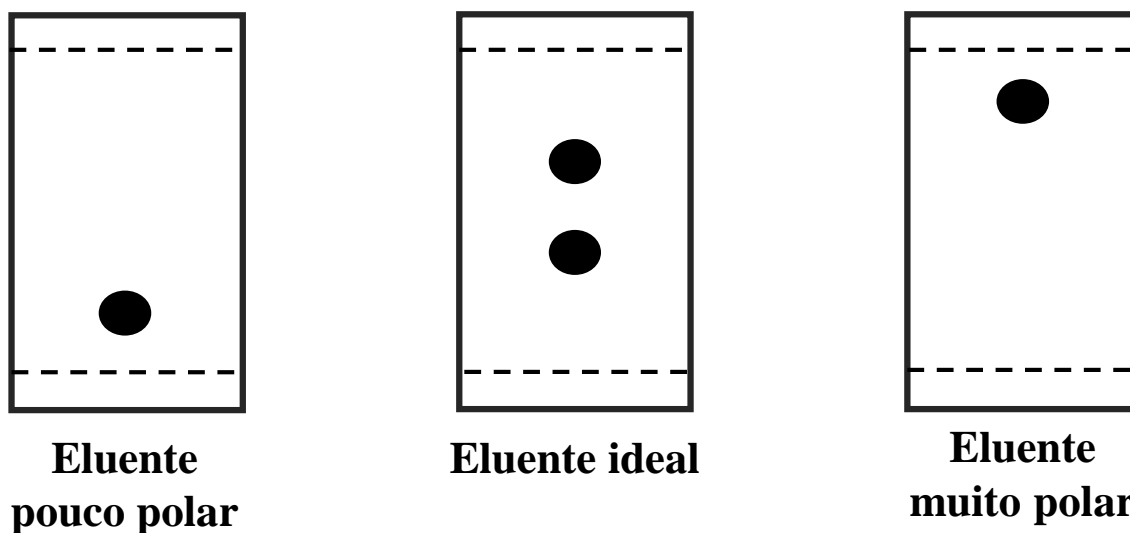
3.3.2 Escolha do solvente para Cromatografia em Camada Delgada

A escolha do solvente adequado para se conseguir uma determinada separação em CCD é um parâmetro crítico e deve ser avaliado atentamente. Muitas vezes, um único solvente é capaz de separar todos os componentes da mistura, porém, melhores resultados são obtidos com misturas de solventes, pois se obtém uma polaridade modificada em relação à polaridade original dos componentes da mistura (COLLINS, 1995).

Com a expansão do solvente, os compostos são separados na placa através da migração diferencial, onde são formadas manchas com aspecto de anéis concêntricos. Pela aparência dos anéis pode-se fazer uma avaliação do solvente. As fases estacionárias mais utilizadas (sílica gel e alumina) são extremamente polares e, portanto, adsorverão fortemente os compostos mais polares. Usualmente, deseja-se que a mancha referente a um composto atinja uma altura referente a $2/3$ da placa de CCD. Quando se tem uma amostra desconhecida ou uma mistura, deve-se tomar cuidado para não utilizar solventes com baixa polaridade, que dificultam a remoção dos compostos da origem, parecendo um composto único (MARQUES; BORGES, 2007).

Salienta-se que é inviável utilizar solventes muito polares, pois carregam os compostos em uma mancha única, sem fracionamento. O solvente ideal permite a visualização dos componentes de uma mistura, sendo que, na maioria dos casos, deve-se realizar a combinação de solventes para obter-se o resultado ideal. (MARQUES; BORGES, 2007). É possível observar, na Figura 2, a relação entre eluentes e a afinidade da amostra na placa cromatográfica que varia conforme as semelhanças de polaridades.

Figura 02 – Relação entre eluentes e a afinidade da amostra na placa cromatográfica



Fonte: Elaborada pela autora com base em dados da pesquisa (2023).

3.3.3 Reveladores físicos

Os reveladores utilizados na CCD podem ser classificados como físicos e químicos, sendo utilizados para identificar as manchas correspondentes aos compostos presentes na(s) amostra(s) (PAVIA *et al.*, 2009). Tratando-se de reveladores físicos, o revelador mais utilizado é a radiação ultravioleta (UV).

Para utilizar este método de revelação, devem ser misturados, ao adsorvente utilizado, compostos fluorescentes em proporção de aproximadamente 1% em relação à quantidade total presente na fase móvel. Além disso, há disponível comercialmente, placas de CCD contendo o adsorvente já misturado com substâncias fluorescentes. A placa contendo estas substâncias absorverá luz na região do ultravioleta (254nm) e emitirá luz em comprimento de onda visível a olho nu. Essa emissão tem uma coloração esverdeada e brilhante característica e os compostos que absorverem a radiação são identificados como manchas escuras na placa. A radiação UV é um método não destrutivo de revelação. Isso quer dizer que, após a revelação, a placa cromatográfica pode ser avaliada por outro método, caso seja necessário (MORAES; REZENDE, 2002).

3.3.4 Reveladores químicos

Os reveladores químicos são considerados métodos destrutivos de revelação. Esses métodos consistem, normalmente, na oxidação de compostos orgânicos sobre a superfície da placa, utilizando oxidantes fortes e temperaturas elevadas. O procedimento geral compreende mergulhar a placa cromatográfica em uma solução aquosa, alcóolica ou solução ácida e retirar o excesso. A solução reveladora pode, também, ser borrifada sobre a placa. Em ambos os casos, após a exposição da placa cromatográfica à solução reveladora, ela é aquecida com auxílio de uma chapa de aquecimento para elucidação dos compostos. Dessa maneira, as substâncias orgânicas são oxidadas e reveladas como pontos coloridos. Os reveladores são escolhidos consoante os tipos de analitos examinados. Aqui, enfatizam-se alguns tipos de reveladores: anisaldeído, vanilina, ácido sulfúrico com metanol, ácido fosfomolibdico, permanganato de potássio, entre outros (SILVA; RIBEIRO; BOGES, 2009).

3.3.5 Métodos quantitativos em cromatografia em camada delgada

Vários trabalhos empregam a CCD com diferentes métodos de quantificação dos compostos separados, habitualmente envolvendo densitometria na região do UV, visível, medidas de fluorescência e, até mesmo, GC, ou métodos espectrométricos (SAPONAR, 2020). Apesar de sua grande eficácia, são ferramentas dispendiosas, com reagentes caros o que se torna, muitas vezes, inviável para a pesquisa em indústrias e laboratórios em geral. Essas técnicas se destacam em várias aplicações importantes a nível industrial, também em investigações periciais, como estudos de componentes em extratos orgânicos, estudos de reações químicas quanto à presença de intermediários estáveis, análise da pureza de compostos, análise de medicamentos, alimentos, avaliação da eficiência de processos de destilação e cristalização, investigação de casos de envenenamento e ingestão de drogas por atletas, análises de riscos de pesticidas, análise de metabólitos secundário etc. (PAVIA, 2009). São processos de análise química instrumental de valor elevado, mas que geram resultados de separação de compostos químicos de amostras complexas com rapidez, boa capacidade de separação e resolução, alta sensibilidade, precisão e eficácia (BACCAN; GODINHO; BARONE, 2005).

Quanto ao procedimento de determinação dos compostos, ressalta-se que os recentes avanços nas tecnologias para aquisição de imagens, bem como a popularização de equipamentos e aplicativos móveis para essa finalidade têm despertado interesse da

comunidade científica acerca do uso de imagens digitais na captura de informações antes restritas a equipamentos específicos (AZEVEDO; LETA; CONCI, 2008). Dessa forma, constata-se um grande interesse na investigação de imagem associada às ferramentas de métodos univariados e multivariados de análise em avaliações qualitativas e quantitativas de compostos químicos.

Várias pesquisas se aplicam nesta proposta. Hojeong *et al.* (2016) caracterizaram a autenticidade do medicamento paracetamol, amodiaquina e nevirapina, utilizando a CCD com a imagem de um telefone celular. Os resultados equiparam-se aos adquiridos por equipamentos mais onerosos, como GC.

Olech *et al.* (2012) investigaram a atividade antirradicalar de material vegetal de quatro antioxidantes – quercetina, ácido gálico, ácido protocatecuico e trolox. Esse método combina a separação cromatográfica de compostos polares, presente em extratos vegetais, com a análise de dados via software de processamento de imagens. Por sua vez, Kerr, West e Hartwell (2016) fizeram uma análise de creatinina urinária, usando coloração de iodo. As concentrações de creatinina urinária foram determinadas por análise de imagem digital, coletadas pelo uso da câmera digital de um smartphone, e os resultados foram quantificados por software Photometrix.

Nesse sentido, cita-se, também, Soponar (2008), que determinou quantitativamente alguns corantes alimentares em sucos concentrados através de processamento digital de imagens, utilizando software ImageJ. Azeem, Madbouly e El-Shahatd (2019) relatam o desenvolvimento de um método simples, portátil e ecologicamente correto para a determinação rápida de nitrito em produtos cárneos processados com o uso de imagens digitais. A quantificação de nitrito foi obtida usando o software ImageJ, contendo o modelo de cores RGB.

Cordeiro e Valderrama (2021) utilizaram imagens digitais multivariadas para a determinação de parâmetros de qualidade da farinha de trigo. Filgueiras (2021) quantificou nitrito em amostras de alimentos e água, com ensaio de Griess, usando imagens digitais adquiridas por meio de um scanner de mesa. Já Sangsin, Srivilai e Tongraung (2021) criaram um método simples, portátil e de baixo custo para detecção rápida de cromo (Cr^{3+}) por meio de um smartphone com o aplicativo Photometrix.

Nesse contexto, percebe-se a preocupação com a minimização nos custos de análises, favorecendo as possibilidades de investigações científicas. Avaliando as pesquisas exploradas, nota-se na literatura a ausência de trabalhos envolvendo a CCD para separação e avaliação da

composição de óleos essenciais, empregando imagens digitais obtidas por smartphones, sendo, portanto, uma alternativa conveniente de pesquisa.

3.4 USO DE IMAGENS DIGITAIS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS SEPARADOS POR CCD

O conceito de imagem remete ao comportamento primitivo do ser humano, associado sempre a aspectos relativos à percepção e sensação visual. Uma imagem é uma representação da interação e reflexão entre luz e matéria e pode ser reproduzida levando como parâmetro principal a simulação da visão humana (PASSARETTI FILHO, 2015).

Tecnologias emergentes e novos olhares para a quantificação de compostos em óleos essenciais são necessários, pois o uso de imagens vem se intensificado em pesquisas diversas (COSTA *et al.*, 2021). Segundo Wood (2000), o processamento de imagens digitais abrange uma ampla escala de hardware, software e fundamentos teóricos. Essas imagens podem ser facilmente obtidas através de equipamentos eletrônicos que empregam sensores para captura de imagens.

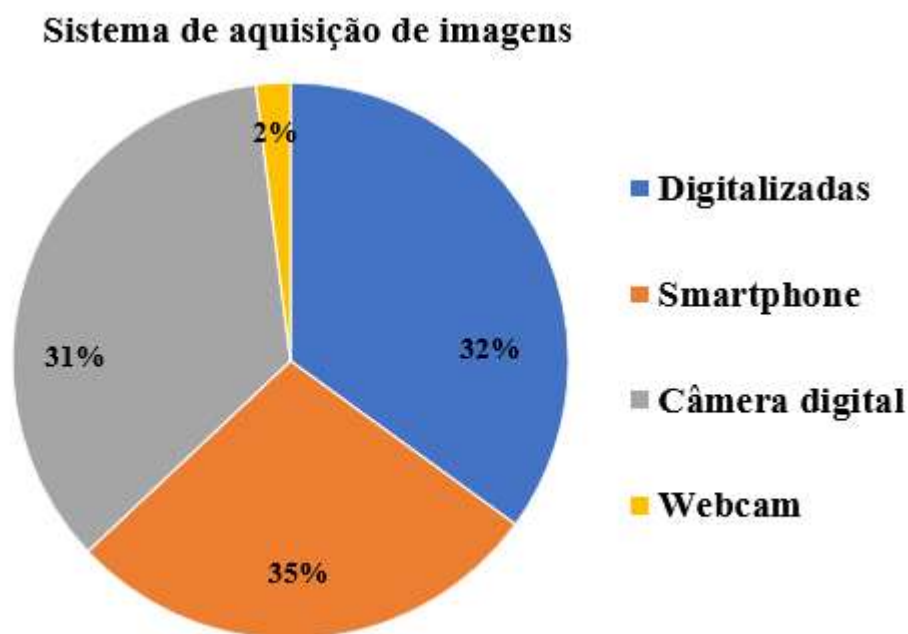
Com o advento de câmeras digitais, o uso de imagens ganha impulso e torna-se promissor como instrumento de avaliação quantitativa em vários setores, havendo um aumento significativo no nível de interesse no processamento, especialmente em dispositivos como smartphones. No entanto, diante das limitações da CCD, sobretudo com relação à avaliação quantitativa, esta pesquisa realizou um levantamento bibliográfico entre 2004 e 2023 acerca do uso de imagens digitais para tal propósito. Pesquisa esta obtida pela plataforma do *google acadêmico*, *Portal da Capes* e *SciELO*. Neste viés, foram avaliados 51 trabalhos publicados e, dentre todas as amostras analisadas, as matrizes de alimentos sobressaem-se nas pesquisas efetuadas, seguidas dos extratos de plantas, medicamentos, matrizes agrícolas, pesticidas, drogas, urina humana e soro humano, como demonstrado no Apêndice 1.

Dos 51 trabalhos avaliados a respeito do uso de imagens digitais em CCD, 31% empregaram imagens obtidas por meio da câmera digital, 35% com o uso de smartphones, 32% digitalizadas com scanners e apenas 2% através de *webcam*. Constata-se, conforme Figura 3 as porcentagens referentes aos sistemas de aquisição de imagens: Destaca-se que os trabalhos de anos anteriores contemplam, em maior escala, o uso do scanner e de câmeras digitais, sendo que as pesquisas mais recentes fazem uso do telefone celular (smartphones),

possivelmente pela facilidade de aquisição das imagens e praticidade no processamento de dados no mesmo aparelho.

Dentre os trabalhos encontrados, cita-se o estudo de Milanez (2013), que apresenta um método simples e de baixo custo, baseado na utilização de imagens digitais e técnicas de reconhecimento de padrões para a classificação de óleos vegetais comestíveis com relação à soja, à canola, ao girassol e ao milho, assim como ao estado de conservação. Para isso, imagens das amostras de óleos vegetais foram obtidas a partir de uma *webcam* e, em seguida, foram decompostas em histogramas, contendo as distribuições dos níveis de cores permitidos a um pixel. Ainda se realça os estudos de França (2020), que fez a aplicação de imagens digitais e técnicas quimiométricas para detecção de adulteração em mel.

Figura 03 – Sistema de aquisição de imagens em pesquisas com Cromatografia em Camada Delgada entre os anos de 2004-2023



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

De acordo com Milanez (2013), o primeiro passo no processo é a aquisição da imagem, podendo ser realizada por diferentes ferramentas, que possuem um sensor para imageamento e a capacidade de digitalizar o sinal produzido. Após a obtenção de uma imagem, é necessário o processamento. O uso de programas específicos é imprescindível para facilitar a extração e análise dos dados. Essa etapa do procedimento envolve, em geral, o uso de aplicativos ou softwares dedicados.

Uma imagem digital é a representação de uma imagem bidimensional, usando números binários codificados, de modo a permitir seu armazenamento, transferência, impressão ou reprodução e processamento por meios eletrônicos. O uso de imagens digitais possibilita simplificar e acelerar alguns processos de monitoramento dispendiosos e que levam muito tempo ou requerem aparelhos complexos para a execução, tornando-se uma ferramenta para análises químicas amplamente explorada nos últimos anos e uma alternativa em várias áreas da ciência, tecnologia, setor produtivo e industrial (DAMASCENO *et al.*, 2015).

O processamento de uma imagem envolve várias operações, que podem ser aplicadas para sua qualificação, como técnicas de compressão, restauração, melhoramento, quantificação, acabamento e reconhecimento. Nesse sentido, muitos programas computacionais estão disponíveis, tanto comercialmente, como gratuitamente. Pode-se dizer que análises, num estágio inicial de desenvolvimento técnico, exigem maior manipulação até a obtenção de informações numéricas, principalmente quando ainda não há um programa computacional e diagnósticos específicos. A maior conversão envolve, por exemplo, transformação de formato, edição, análise em programas comuns e digitação de dados. Por outro lado, quando programas específicos e adequados estão disponíveis, a manipulação e operações envolvidas são reduzidas, podendo, a capacidade de extração de dados, ser ampliada (ELICIERI *et al.*, 2012).

O tipo de software para processamento das imagens pode variar de acordo com a forma que a imagem é adquirida, seja digitalizada, por câmera digital, smartphone e, no que lhe concerne, o usuário pode avaliar o programa mais apropriado para seu tipo de análise. É importante destacar que uma imagem com pouca qualidade possivelmente causará dificuldades de processamento e retorno, por meio do software, das informações esperadas.

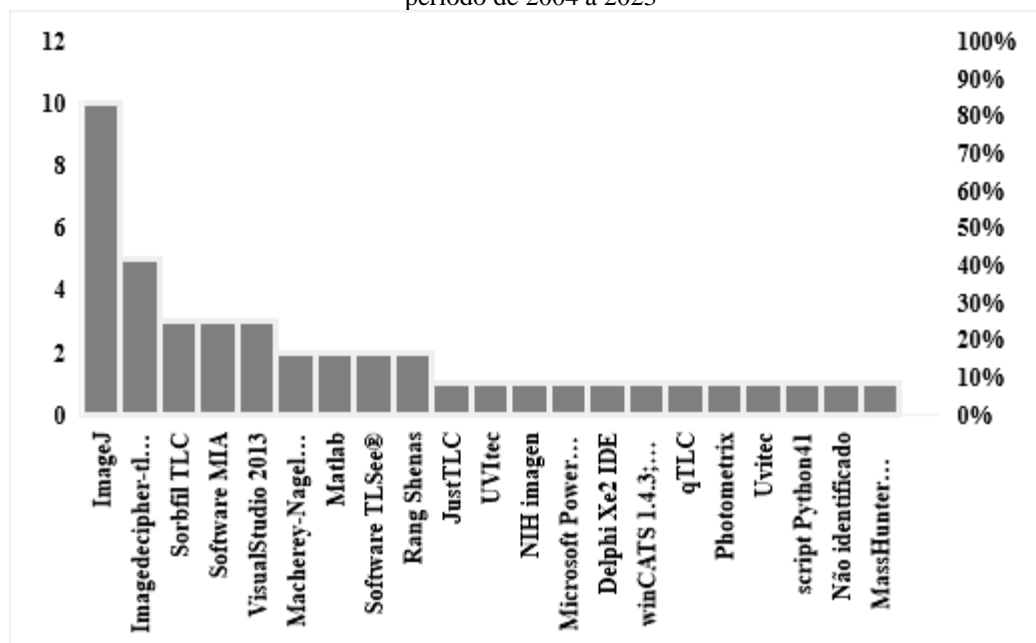
A partir do levantamento literário de pesquisas científicas feitas entre 2004 até 2023 também se evidenciou a existência de softwares para análises por CCD em diferentes tipos de amostras. É possível referenciar alguns programas que se acentuaram nas pesquisas neste período e contemplam diferentes analitos, conforme a Figura 4.

Para a compilação dos dados, neste trabalho, testou-se, preliminarmente, o tratamento das imagens obtidas pela CCD mediante diferentes softwares citados na literatura. Compararam-se as informações adquiridas entre os diferentes sistemas operacionais, verificando-se a sua eficácia e os resultados alcançados, efetuando sua equivalência com aporte da literatura. Dentre estes, o que se demonstrou mais adequado para o processo de tratamento de dados foi o software qTLC (*a webapp to quantify chemical compounds via thin*

layer chromatography), programa on-line na internet, livre, prático, ágil e eficaz, específico para quantificar compostos químicos por meio de CCD. Alguns resultados significativos também foram alcançados com o software ImageJ e Photometrix, sendo o ImageJ um dos mais utilizados nessa perspectiva.

A figura 4 apresenta os softwares usados para o processamento de imagens em CCD no período investigado nesta pesquisa

Figura 04 – Softwares usados para processamento de imagens em Cromatografia em Camada Delgada no período de 2004 a 2023



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Face ao exposto nesta seção, considera-se essencial entender como acontece o uso das imagens na análise colorimétrica com smartphone.

3.5 USO DE IMAGENS DIGITAIS PARA ANÁLISE COLORIMÉTRICA COM SMARTPHONE

Avaliando as características químicas do óleo de cravo-da-índia quanto à presença de polifenóis, e buscando metodologias específicas para purificação de compostos químicos majoritários em óleos essenciais, que o método espectrofotométrico comumente utilizado para determinar o teor de polifenóis totais (TPT) é o Folin-Ciocalteu. Este envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras em concomitante formação de um complexo

de coloração azul, cuja intensidade aumenta linearmente no comprimento de onda a 760 nm, baseando-se na interação das substâncias redutoras com o reagente de Folin-Ciocalteu. É capaz de avaliar a quantidade de substância analisada necessária para inibir a oxidação do reativo, ou seja, a aptidão redutora total da amostra e não apenas os níveis de compostos fenólicos (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

Colorimetria é a ciência e a tecnologia usada para quantificar e descrever fisicamente a percepção da cor humana. A colorimetria de imagem digital (DIC, do inglês *Digital Image Colorimetry*) no smartphone é considerada uma metodologia de análise versátil para avaliar as alterações de cor durante uma reação colorimétrica por meio do uso de imagens digitais obtida por câmera embutida ou acoplada (FAN *et al.*, 2021).

Segundo Fan *et al.* (2021), a DIC tornou-se um tópico de pesquisa significativo. DIC refere-se a um método de análise colorimétrica apoiado na digitalização de imagens coletadas por algumas ferramentas de aquisição de imagem, como telefones celulares, câmeras digitais, *webcams*, scanners e outros. A leveza e a portabilidade dos smartphones e câmeras digitais fazem uso desses dois produtos em DIC e excedem em muito o de *webcams* e scanners. Comparados com câmeras digitais, smartphones são amplamente utilizados como ferramentas de aquisição de imagem em DIC devido ao seu rápido aumento no uso, melhora notável de funções da câmera e o emprego generalizado de aplicativos móveis (APPs). Essa metodologia provou ser um método de fácil operação, rápido e econômico. No procedimento de DIC, existem várias etapas, incluindo duas necessárias, aquisição de imagem com smartphone e quantificação de cores, usando software específico de processamento de imagem.

Os principais estudos de colorimetria de imagem digital incluem espaços, ferramentas para captura de imagem, condições de iluminação e aplicativos de quantificação de cores. Para tornar os resultados da análise precisos e adequados, são selecionados, primeiro, de acordo com diferentes situações. Os espaços de cores (gama) frequentemente usados representam todas as cores que podem exibir e ser de diferentes tipos, como RGB, CMYK HSV/HSL (FAN *et al.*, 2021).

Ensaio colorimétrico associado ao uso de imagens digitais vem se realçando em diversas pesquisas por facilitar as análises e gerar custos menos onerosos. O ensaio colorimétrico que usa o reagente Folin-Ciocalteu é um método espectrofotométrico simples e a composição química deste reagente inclui o ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolíbico, que são reduzidos a partir dos extratos ou substâncias testadas e que, originalmente, possuem coloração amarela. Um meio com potencial hidrogeniônico (pH) alcalino propicia que substâncias redutoras, como as substâncias fenólicas, dissociem um próton, levando à

formação do ânion fenolato. Este ânion é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu, formando óxido de tungstênio e óxido de molibdênio. Estes óxidos possuem coloração azul, que é detectável na banda do espectro de 760 nm, oportunizando a quantificação dessas substâncias através da Espectrofotometria (GENOVESE *et al.*, 2003; IKAWA *et al.*, 2003; HUANG; OU; PRIOR, 2005). Assim, a coloração final da reação é tanto mais azul quanto maior a quantidade de substâncias redutoras ou substâncias fenólicas. Entretanto, o reagente de Folin-Ciocalteu não é específico para grupos fenólicos, sofrendo interferências de outras substâncias redutoras presentes na amostra, como ácido ascórbico, proteínas e açúcares redutores (IKAWA *et al.*, 2003).

Atualmente, o ensaio de Folin-Ciocalteu é um dos mais aceitos e utilizados para avaliar a atividade indireta do potencial antioxidante de uma amostra, usando como princípio medir o poder redutor em extratos vegetais. A espectrofotometria é comumente empregada para avaliação dos extratos, em que cada composto químico absorve, transmite ou reflete luz ao longo de um determinado intervalo de comprimento de onda. A Espectrofotometria pode ser usada para identificar e quantificar substâncias químicas a partir da medição da absorção de luz que passa através da amostra. (KARAKAYA, 2004).

Para Böck *et al.* (2020), a disponibilidade de aplicativos móveis permite que eles sejam explorados para funções além da tradicional comunicação. Vários artigos relatam o crescente avanço do uso de smartphones em diversas áreas, como análise de alimentos, medicina e biossensores, utilizando diferentes formas de detecção (fluorescente, quimioluminescente, colorimétrica e eletroquímico). Neste ínterim, o autor salienta que reações em sistemas abertos com smartphones expostos diretamente a reagentes ou vapores de solventes pode reduzir a vida útil desses equipamentos (BÖCK *et al.*, 2020).

Zhang *et al.* (2022) realizaram a detecção colorimétrica de íons uranila em água, usando nanopartículas de ouro funcionalizadas com ácido, utilizando smartphone para a leitura, a fim de estimar a intensidade das cores (vermelho, verde e azul). Este método mostra boa viabilidade para detecção em solução aquosa. Costa *et al.* (2021) determinaram adulterantes em amostra de leite cru. Para isso, propuseram o uso de uma câmera endoscópica *Universal Serial Bus* (USB) acoplada a uma câmara fechada com iluminação controlada. Um orifício foi fornecido para propiciar a introdução de frascos descartáveis fechados e um aplicativo Android gratuito (Photometrix UVC) foi desenvolvido para chegar a uma solução completa para análise, chegando-se a uma boa linearidade e melhor capacidade de quantificação (COSTA *et al.*, 2021).

Holkem *et al.* (2021) elaboraram um método verde para determinação de sal em petróleo, usando colorimetria digital baseada em imagem em um dispositivo portátil. O modelo foi construído usando o aplicativo gratuito Photometrix UVC. Vários parâmetros experimentais foram otimizados. Segundo o autor, o método é fácil e ecologicamente correto. Outras vantagens importantes: baixo custo, possibilidade de portabilidade e alto rendimento em comparação com os métodos padrão.

Nesta perspectiva, Ballesteros, Caleja-Ballesteros e Vilhena (2021) descreveram um método a partir de imagem digital para detecção de ferro, usando extrato de chá verde (*Camellia sinensis*) como reagente colorimétrico natural. Também Gotmare e Tambe (2021) propuseram um aplicativo de smartphone fundamentado em algoritmos para quantificar o conteúdo de peróxido em tiras de teste colorimétricas. As imagens da tira foram tiradas de cinco smartphones diferentes, baseados em Android, sob sete condições de iluminação diferentes, para treinar classificadores binários e multiclasse e extrair o modelo de aprendizagem.

Kilic *et al.* (2018) desenvolveram uma plataforma econômica e promissora para aplicação no monitoramento da qualidade da água a partir do uso de câmera embutida para capturar imagem com smartphone e calcular a concentração de solução. Esta plataforma foi testada em quatro diferentes ensaios colorimétricos de qualidade da água com vários níveis de concentração. Kong *et al.* (2020) produziram um espectrômetro de alta sensibilidade e ultraportátil, para smartphone, a fim de realizar análise colorimétrica de alta sensibilidade e baixo custo, no intuito de detectar ácido ascórbico em frutas. O método demonstrou-se preciso e satisfatório.

Estudos sobre o uso de imagens digitais abrangem, também, a área de educação. Lourenço *et al.* (2021) utilizaram, para determinar ferro pela reação com tiocianato, o aplicativo Photometrix PRO gratuito e disponível para smartphones, associado à prática de Colorimetria. A intenção do trabalho foi auxiliar o professor a compreender o universo do estudante, fazendo com que o ensino da química se torne mais interessante, prazeroso e possibilite a inserção na prática dos conteúdos trabalhados.

Lumbarque *et al.* (2019) fizeram a determinação total de ferro dissolvido e peróxido de hidrogênio, usando o aplicativo Photometrix PRO: uma ferramenta de análise colorimétrica portátil para controlar condições importantes no processo foto-fenton solar. Neste estudo, uma nova metodologia empregando o aplicativo Photometrix PRO foi validada para monitoramento rápido de ferro total dissolvido e concentrações de peróxido de hidrogênio, e testada no processo foto-fenton solar. Ocorreu uma comparação equivalente

entre os resultados obtidos, usando um método espectrofotométrico de referência e o Photometrix PRO, aplicação que utiliza um dispositivo portátil. Ambos os métodos foram validados em termos de linearidade, sensibilidade, precisão, robustez e efeitos de matriz.

Oliveira *et al.* (2020) criaram um novo método para determinar a acidez titulável total de laranja, limão e maracujá, com base em um teste pontual obtido a partir de imagens digitais e utilizando antocianinas como indicador biodegradável. As reações colorimétricas aconteceram por titulação ácido-base em microescala, empregando antocianina com microplaca para teste pontual, com detecção por imagem digital. Para melhorar a precisão dos resultados, uma câmera baseada em um difusor foi desenvolvida para controlar a iluminação fornecida pelos diodos emissores de luz, e acoplada a um smartphone para aquisição de imagens digitais adequadas.

Masawat, Harfield e Namwong (2015) relataram a utilização de um colorímetro de imagem digital baseado em iPhone para quantificar resíduos como tetraciclina no leite bovino. Os resultados apontaram desempenho analítico satisfatório, comparável ao do espectrofotômetro. Pappis *et al.* (2019) demonstraram o uso de uma ferramenta de análise colorimétrica, utilizando um smartphone e o aplicativo chamado Photometrix para determinar a concentração de íons de flúor e fósforo em águas tratadas e naturais.

Wang *et al.* (2020) certificaram a viabilidade de um sistema simples, abordagem sensível e econômica para detecção de nitrito em alimentos, por meio da colorimetria de imagem digital integrada com um smartphone. Ainda, Zhang *et al.* (2022) evidenciaram a determinação colorimétrica de íons uranila em água, usando vinilfosfônico em nanopartículas de ouro funcionalizadas com ácido baseadas em smartphone. O método analítico exibiu alta seletividade e sensibilidade para a determinação de íons uranila em amostras de água.

Shahvar, Shamsaei e Saraji (2020) descreveram a utilização de um sensor colorimétrico simples, de baixo custo e portátil, para smartphone, visando rápida determinação do teor de água em etanol. O método alicerçou-se na mudança de cor do cloreto de cobalto (II) em solução etanólica, seguida de sensoriamento e processamento dos dados com sensor colorimétrico em um smartphone capaz de gerar o processamento de dados.

3.6 APLICAÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS PARA ANÁLISE DE ÓLEO ESSENCIAL

Em escala industrial, qualidade pode estar associada à garantia de competitividade e melhorias na cadeia produtiva (SILVA; RIBEIRO; BOGES, 2009). Do ponto de vista do consumidor, verificar a autenticidade e a qualidade dos produtos comercializados envolve

aspectos econômicos e relacionados à saúde. De fato, a escolha de um produto é essencialmente motivada pelo seu valor e pelas propriedades benéficas relacionadas ao mesmo. As técnicas baseadas em imagens digitais têm-se revelado uma boa alternativa para as análises de controle de qualidade (MILANEZ, 2013). Sabendo-se que a qualidade do óleo essencial é evidenciada pela característica de seus constituintes majoritários, tornam-se indispensáveis análises neste viés.

Após minucioso levantamento bibliográfico, percebe-se a dificuldade de encontrar pesquisas ressaltando a aplicação de imagens digitais para análise de óleos essenciais. Dentre estas, Hawrył *et al.* (2015) explicaram a utilização de CCD, juntamente com análise de parâmetros quimiométricos, para avaliar a composição de óleos essenciais de menta. Os eluentes usados foram acetato de etila/tolueno (5/95; v/v) e posterior acetato de etila/n-heptano (15/85; v/v). Os cromatogramas de camada foram digitalizados densitometricamente no comprimento de onda de 254 nm. As imagens digitais foram processadas por uso do software livre ImageJ.

A avaliação dos estudos publicados na literatura leva a inferir que a proposta deste manuscrito é significativa para facilitar e minimizar custos relacionados a análises químicas da composição de óleos essenciais. Não foram encontrados outros trabalhos com uso de imagens digitais e smartphone para determinação de eugenol em óleo essencial do cravo-da-índia, o que demonstra a novidade trazida na presente investigação.

3.7 SOFTWARES UTILIZADOS PARA PROCESSAMENTO DE IMAGENS

Dentre os softwares para processamento das imagens utilizados em pesquisas literárias, destacam-se o software qTLC, Image J e Photometrix, objetos deste estudo.

O software qTLC, criado pelo grupo AdReNa, da UCL Chemical Engineering, é um programa livre on-line, prático, rápido e eficaz. É empregado principalmente para quantificar compostos-alvo em cromatografia em camada delgada. Permite fazer coleta de imagens com facilidade e analisá-las, usando uma interface simples, baseada em navegador. O aplicativo da web já foi testado por usuários em todo o mundo (FHIONNLAOICH *et al.*, 2018).

O ImageJ, considerado “uma ferramenta para a comunidade científica”, é um programa de computador de domínio público, destinado a processamento de imagens. Desenvolvido por Wayne Rasband, no *National Institute of Mental Health*, Estados Unidos, em linguagem Java. Possibilita a exibição, edição, análise e processamento, além da facilidade em salvar e imprimir imagens. Com ele, também é possível fazer a leitura de vários

formatos de imagens como *Tagged Image File Format* (TIFF), *Graphics Interchange Format* (GIF), *Joint Photographic Experts Group* (JPEG) e *Windows Bitmap* (BMP). Suporta a técnica de empilhamento de imagens, isto é, uma série de imagens que compartilham uma única janela para animações. Além disso, a leitura de um arquivo de imagem pode ser feita paralelamente a outras operações. Em razão de sua grande adaptabilidade, encontram-se, atualmente, na internet, diversas variações do ImageJ sendo utilizadas para os mais variados propósitos, adotando características únicas e muito úteis para processamento de imagem (RASBAND, 2021).

O aplicativo Photometrix foi criado pelo grupo de pesquisa em Quimiometria da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Rio Grande do Sul, Brasil. Este aplicativo foi desenvolvido especialmente para smartphone, viabilizando a captura e análise de imagens digitais através de modelos matemáticos univariados e multivariados, tais como análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*), análise de agrupamento hierárquico (HCA, do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*) e regressão pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS, do inglês, *Partial Least Squares*). As imagens podem ser capturadas por meio da câmera do próprio dispositivo (Photometrix PRO), ou através de uma câmera USB conectada ao smartphone (Photometrix UVC), resultando em uma análise versátil, acessível e rápida. Os dados da imagem são convertidos em histogramas vermelho, verde e azul (RGB). O aplicativo está disponível gratuitamente na Google Play (Android) ou App Store (IOS) (HELFER, 2017).

4 METODOLOGIA UTILIZADA PARA CCD

Foram desenvolvidos dois trabalhos: o primeiro consiste na utilização da CCD para a separação dos compostos e o uso de imagens digitais para a quantificação. Já no segundo trabalho foi desenvolvido um novo método de quantificação de eugenol por reação colorimétrica, sendo que a quantificação foi realizada pelo uso de smartphone. A fim de validar a eficácia do método cromatográfico, descrito neste capítulo, utilizou-se três compostos majoritários do cravo-da-índia: eugenol 99% de pureza, cariofileno 80% de pureza e óxido de cariofileno 95% pureza. Todos estes reagentes foram fabricados por “Sigma Aldrich” na Indonésia.

4.1 ANÁLISES PRÉVIAS DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

4.1.1 Reagentes e Amostras utilizadas para CCD

As análises prévias foram realizadas na concentração de 200 mg/mL, de soluções de referência dos três compostos majoritários do cravo-da-índia, eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno.

Posteriormente as análises prévias também foram realizadas com amostras de cravos-da-índia adquiridos em comércio local de Caiçara-RS. Para as amostras, foram usadas soluções na concentração de 100 mg/mL dos extratos de cravo-da-índia de uma amostra (A1), obtidos com diferentes solventes orgânicos: álcool etílico (99,8%, Dinâmica, São Paulo, Brasil), acetato de etila 88,1%, (99,8%, Dinâmica, São Paulo, Brasil) diclorometano (84,93%, Dinâmica, São Paulo, Brasil) e hexano (98% Dinâmica, São Paulo, Brasil).

4.1.2 Método de extração do óleo essencial para CCD

As amostras de cravo-da-índia foram submetidas ao processo de extração por Soxhlet, com diferentes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol. Na sequência, foram submetidas a rota-evaporador e obtido o extrato bruto. Após este ser seco, pesaram-se 100 mg de cada amostra foram diluídas em 1 mL de solução 1:1 de clorofórmio e metanol, desenvolvendo, após às diluições com solução de 50% clorofórmio e 50% metanol, em

concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 mg/mL, semelhante ao realizado com as soluções dos padrões, aplicando-se, logo depois, o método cromatográfico. Este procedimento permitiu comparar a presença dos compostos nas amostras de cravos-da-índia com os respectivos padrões, observando-se a veracidade em termos de comportamento de cada um, localização na placa cromatográfica e intensidade de cor.

As soluções de referência e os extratos foram diluídos, objetivando aumentar a nitidez das manchas na placa cromatográfica. Foram pesadas 200 mg de cada padrão (eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno), colocou-se cada um em frasco âmbar, diluindo-os em 1 mL de solução 1:1 de clorofórmio e metanol. A partir dessa solução inicial, foram feitas as diluições em 50% clorofórmio e 50% metanol para as soluções de referência, que seguiram as concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100 e 150 mg/mL. Para os extratos das amostras, as diluições com solução de em 50% clorofórmio e 50% metanol partiram de 100 mg/mL e seguiram as concentrações de 50, 25, 12,5 mg/mL.

A introdução das amostras foi realizada manualmente, com tubo capilar de 75 milímetros (mm) de comprimento e 1,0 mm de diâmetro interno, em cromatofolhas de alumínio CCD de sílica gel 60 F₂₅₄, com espessura de 0,20 mm, nas dimensões de 1,5 x 6 cm, (Macherey-Nagel, Alemanha). Após a aplicação das soluções nas placas, iniciaram-se os testes de eluentes e reveladores.

4.1.3 Parâmetros avaliados acerca da CCD

Para obter-se separação adequada representada pelo valor de índice (ou fator) de retenção da amostra (Rf), que é um parâmetro físico da substância que avalia o equilíbrio entre solvente e fase estacionária, testaram-se previamente sistemas eluentes, de acordo com o grau de polaridade. Realizou-se avaliação de solventes orgânicos em diferentes concentrações, conforme observado na tabela 1:

Tabela 01 – Avaliação de sistemas eluentes com solventes orgânicos

| | |
|---|--|
| 1 | Diclorometano 84,9% de pureza |
| 2 | Hexano 98% de pureza |
| 3 | Soluções de 50% diclorometano e hexano 50% |
| 4 | Solução de clorofórmio 50% e metanol 50% |
| 5 | Solução de hexano 90% e acetato de etila 10% |

| | |
|---|---|
| 6 | Solução de hexano 95% e acetato de etila 5% |
| 7 | Solução de hexano 75% e diclorometano 25% |

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Segundo Collins *et al.* (1995) um eluente capaz de separar uniformemente de forma homogênea os analitos presentes na solução aplicada na placa cromatográfica, é usado para comparar e ajudar a identificar compostos. Este é calculado pela medida da distância percorrida pela amostra e pela distância percorrida pelo solvente, para comprovar a eficácia do eluente.

Ainda, paralelamente, foram testados sistemas reveladores para detecção de compostos químicos, conforme descrito por Collins *et al.* (1995). Desse modo, foram avaliados como reveladores soluções de 90% ácido sulfúrico (95,08% de pureza) + 10% metanol (99,9% de pureza), anisaldeído (97,6%) e vanilina sulfúrica (96,4%), todos produzidos por Dinâmica, em São Paulo, no Brasil.

O desenvolvimento da curva de calibração pelo aplicativo Phomometrix em smartphone caracterizou os resultados desta avaliação.

4.2 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Após ensaios prévios, realizou-se a avaliação de quatro amostras distintas de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), designadas por A1, A2, A3 e A4. Estas amostras foram adquiridas no comércio local da cidade de Caiçara-RS. Os óleos essenciais foram obtidos a partir de 100 gramas de cravo-da-índia e 500 mL de água por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2005), totalizando 4 horas de extração. O condensador do sistema de extração foi acoplado a um banho ultratermostático (5°C) para resfriamento. Após a extração, coletou-se o óleo essencial, secou-se com sulfato de sódio anidro e armazenou-se em frasco hermeticamente fechado, sob congelamento -18°C em freezer, para posterior análise.

Em seguimento à extração, estes óleos foram diluídos em 1mL de solução de 50% clorofórmio e 50% metanol na concentração de 100 mg/mL e comparados com soluções de referência de eugenol, a fim de obter uma curva de calibração. O perfil químico do óleo essencial de cravo-da-índia foi analisado por CDD, com cromatofolhas de alumínio CCD de

sílica gel 60 F₂₅₄, com espessura de 0,20 mm, nas dimensões de 1,5 x 6 cm, (Macherey-Nagel, na Alemanha).

Na continuidade, prepararam-se, novamente, soluções dos padrões dos compostos majoritários de cravo-da-índia a serem aplicadas nas placas cromatográficas, visando diminuir a concentração e melhorar a visualização das manchas nas placas cromatográficas. Alíquotas próximas à 0,001mL a 0,0015mL das diferentes concentrações dos padrões foram empregadas nas placas com tubo capilar. Este procedimento também foi aplicado às amostras extraídas de óleo essencial em diferentes tempos de extração, variando de 30 minutos de extração até 180 minutos, em um intervalo de tempo de 30 minutos de cada amostra, para fazer um comparativo qualitativo e quantitativo entre as amostras e os padrões. Após a cautelosa aplicação das amostras nas placas de CCD, elas foram eluídas em duplicata, em solução de 90% hexano e 10% acetato de etila em béquer de 500 mL.

Seguinte a eluição, placas de CCD foram reveladas fisicamente em câmera UV (365 nm e 254 nm) UVC Germicida/ Boittonne), registraram-se imagens dentro de uma caixa fechada (15 cm x 20 cm), com lâmpadas de *Light Emitter Diode* (LED) brancas (Cordão de LED Fio de Fada Branco; voltagem: 220, 20 LEDs, 6,1w de potência), utilizando-se a câmera do telefone celular smartphone Samsung Galaxy J7 Prime. Após a revelação física e coleta das imagens, foi feita a revelação química em capela de exaustão, borrifando-se com solução reveladora de 90% de ácido sulfúrico + 10% metanol.

Os dados de área das manchas cromatográficas representativos das amostras analisadas foram tratados pelo software qTLC e ImageJ. Alguns testes para este tipo de análise química, também foram testados pelo software livre de análise de imagens digitais Photometrix, que usa modelos matemáticos univariados e multivariados.

4.3 ANÁLISES DAS AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM DIFERENTES SOFTWARES

Para a análise das amostras, após a revelação da placa cromatográfica, desenvolveu-se a curva de calibração a partir das áreas de soluções de referência de diferentes concentrações, variando de 25 a 200 mg/mL.

As áreas de cada mancha foram obtidas via softwares qTLC e ImageJ, com o intuito de comparação de dados e validação do método.

4.3.1 Processamento das imagens com o software qTLC

O qTLC é uma plataforma educacional livre para a análises químicas. Após aberto, deve ser feita a seleção da imagem a ser tratada, bem como o processo de aperfeiçoamento da cor, ajustes de brilho, nitidez necessária e, conseqüentemente, a determinação de área. Os dados de área fornecidos pelo software são coletados e anexados no programa de computador “Excel”, a fim de dar seqüência na determinação quantitativa, pela determinação de curvas de calibração, cálculos de média e desvio padrão.

4.3.2 Processamento das imagens com o software ImageJ

O processamento de imagem pelo software ImageJ pode ser trabalhado como aplicativo no computador ou de forma remota. Para o tratamento da imagem, deve-se buscar a aba “*File Open*”, escolher a imagem desejada e, depois, para melhor resolução de brilho e cor, optar-se pela opção “*Edit Invert*”, selecionando com a ferramenta adequada as áreas das manchas provenientes das amostras evidenciadas nas placas cromatográficas. Posteriormente, a definição dos valores de áreas segue a otimização pelo programa Excel, que possibilitará o desenvolvimento de curva de calibração, assim como valores de médias e desvio padrão das amostras.

4.4 OTIMIZAÇÃO DE TEMPO DE LEITURA PARA AMOSTRAS PADRÕES

Para avaliar a implicação da modificação das cores das manchas das placas com o transcorrer do tempo, foram realizados ensaios prévios relacionados às aplicações de soluções dos padrões de cravo-da-índia eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno nas placas cromatográficas. Foram coletadas fotos pelo smartphone em determinados períodos de tempo 0, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos decorridos após a aplicação das soluções, otimizando o melhor tempo de leitura. Este procedimento, realizado ainda nas análises prévias foi empregado para os padrões de eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno, aplicado a uma amostra A1, tratado pelo aplicativo Photometrix, objeto de estudo inicial.

4.5 ANÁLISE DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

No intuito de quantificar os compostos presentes no óleo essencial em diferentes concentrações, desenvolveu-se a avaliação cinética, observando-se, em tempos diferentes, a quantidade de óleo extraído a cada 30 minutos durante as 4 horas de extração. Quatro amostras de cravo distintas (A1, A2, A3 e A4) foram avaliadas com relação à presença apenas de eugenol, por meio da aplicação na placa cromatográfica, seguida de coleta e interpretação da imagem em diferentes tempos (30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos). Dessa maneira, alíquotas de 1 mL foram coletadas em tempos definidos.

4.6 AVALIAÇÃO DE VOLUME: TESTE DO NÚMERO DE GOTAS

Estudos relacionados à introdução da amostra foram necessários, com a finalidade de aferir variações na área das amostras evidenciadas qualitativamente. Para tanto, utilizou-se tubo capilar de 75 mm de comprimento, 1,0 mm de diâmetro interno e inserida uma gota da solução do padrão de eugenol, preparados em diferentes concentrações.

As concentrações do padrão de eugenol partiram de 200 mg do padrão, pesadas em balança analítica e diluídas em 1mL de solução 1:1 clorofórmio metanol, seguidas das diluições em 50% clorofórmio e metanol, gerando concentrações entre 25 e 200 mg/mL, em placas distintas.

Inseriu-se a solução na placa cromatográfica, com tubo capilar de 75 mm de comprimento e 1,0 mm de diâmetro interno. O procedimento foi realizado em duplicata, com aplicação uma, duas, três e quatro gotas, em placas distintas para o padrão de eugenol e, após, fez-se a aquisição da imagem com smartphone Samsung Galaxy J7 Prime. A análise quantitativa das imagens, estimando qual o número de gotas geraria menor desvio dos resultados, se deu por ambos os softwares – qTLC e ImageJ – a fim de propiciar um comparativo das áreas.

4.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

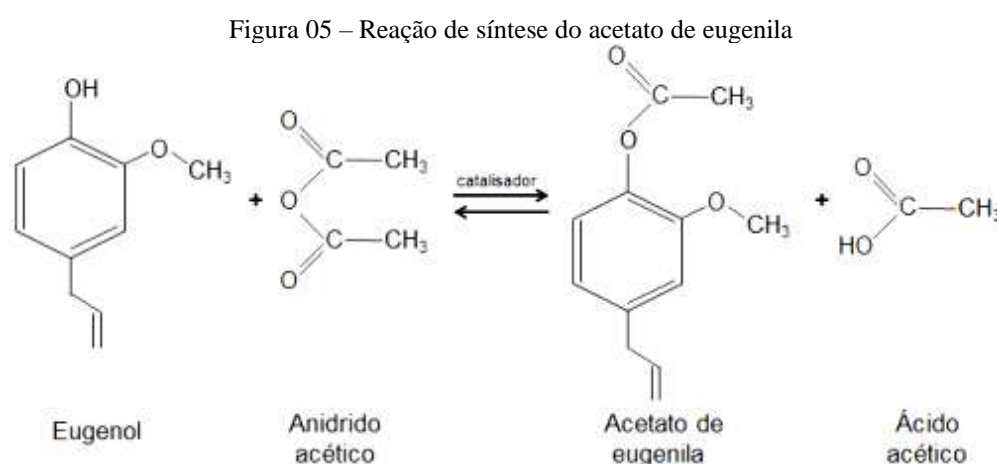
Para quantificação do eugenol, foi utilizado um cromatógrafo a gás, equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID – Varian Star 3400CX, Palo Alto, CA, EUA) utilizando coluna capilar de sílica fundida BPX5 (25 m × 0.22 mm × 0.25 µm, SGE, Australia). A injeção foi feita com 1 µL de amostra diluída em hexano (1:100 v/v), a qual foi

introduzida no injetor a 230°C, em modo *split* 1:50. Para a separação de compostos, utilizou-se um programa de aquecimento, iniciando em 45°C, durante 2 minutos, aumentando para 70°C, sob rampa de 10°C min⁻¹. Posteriormente, foi aplicada rampa de 3°C min⁻¹ até atingir 200°C, em que permaneceu por 5 minutos. O gás de arraste usado foi hidrogênio em vazão inicial de 2 mL min⁻¹ e pressão constante de 15 psi. A temperatura do detector foi mantida a 250°C. A concentração do eugenol no óleo essencial foi determinada a partir de uma curva de calibração.

4.8 ANÁLISES EXTRAS: SÍNTESE DE ACETATO DE EUGENILA

Além do eugenol, óxido de cariofileno e cariofileno, um dos compostos significativos presentes no cravo-da-índia é um éster aromático conhecido como acetato de eugenila. Possui propriedades flavorizantes, antioxidantes e antimicrobianas, mas está presente em pequenas quantidades (1 a 10%) no óleo essencial (SALTOLIN, 2019).

Devido à dificuldade da obtenção deste padrão para possíveis análises concomitantes aos demais constituintes presentes no cravo-da-índia, realizou-se ensaio da síntese de acetato de eugenila. Saltolin (2019) destaca que sua obtenção ocorre a partir da acetilação direta do eugenol com anidrido acético na presença de catalisadores. A Figura 5 traz a representação da reação de síntese do acetato de eugenila:



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A metodologia empregada para a obtenção do éster seguiu o procedimento descrito por Saltolin (2019). Pesou-se de 1g de eugenol, 1g de anidrido acético, 15mL de dicloro

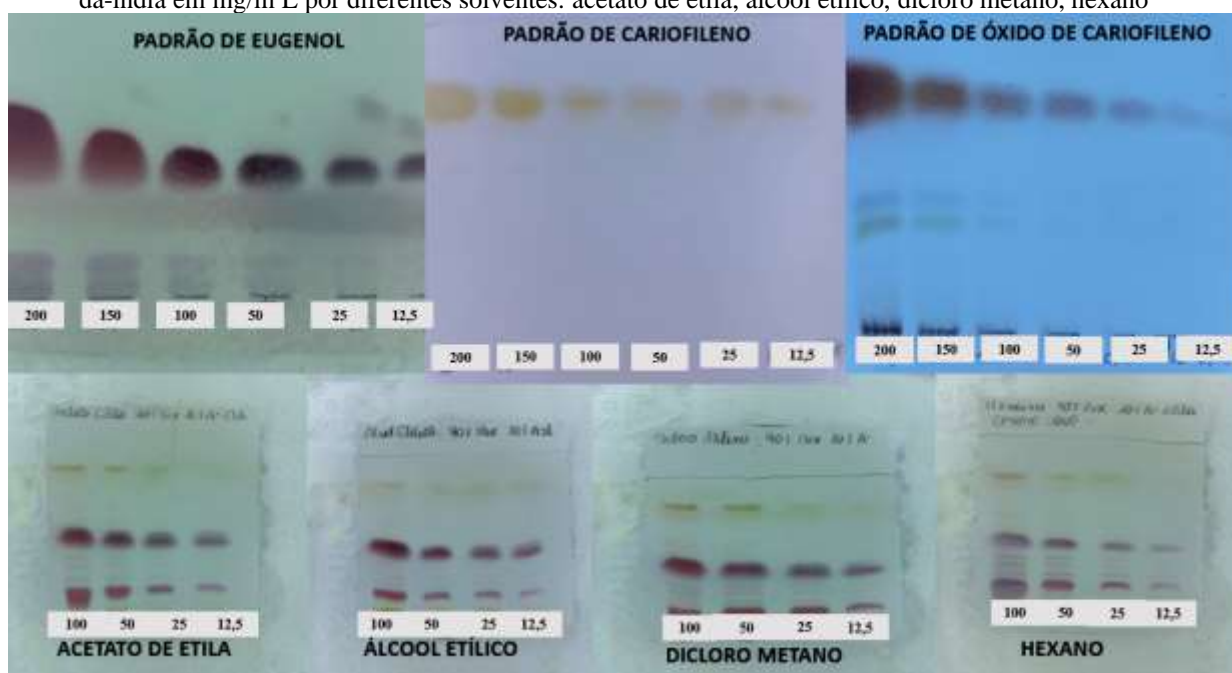
metano e 0,5g de catalisador acetato de sódio. Após o início do refluxo, adicionaram-se 2mL da base orgânica trietilamina. Colocou-se a solução em um balão de 80 mL com condensador. Passada uma hora de refluxo e agitação, avaliou-se a presença do éster na placa cromatográfica. Este ensaio foi realizado cinco vezes, tentando minimizar possíveis interferentes a cada ensaio. No entanto, os resultados não foram satisfatórios, ou seja, não foi identificada a presença do éster na placa cromatográfica.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 ENSAIOS PRÉVIOS DA FASE MÓVEL, REVELADOR QUÍMICO E FÍSICO PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Os ensaios prévios foram realizados com o objetivo de testar eluentes e reveladores adequados nas análises de amostras de cravo-da-índia. Cabe ressaltar que, neste primeiro momento, parâmetros como captura das imagens, distância smartphone/placa, luminosidade, padronização da aplicação da amostra e diâmetro das placas não foram otimizados. Alguns resultados qualitativos estão evidenciados na Figura 6.

Figura 06 – Ensaio qualitativo de fase móvel e revelador químico realizados com padrões e amostra de cravo-da-índia em mg/mL por diferentes solventes: acetato de etila, álcool etílico, dicloro metano, hexano



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Observam-se, na Figura 4, as áreas das amostras obtidas em diferentes concentrações aplicadas, sendo viável evidenciar que nas amostras dos óleos extraídos foi possível revelar, pela CCD, os constituintes majoritários presentes no cravo-da-índia destacados na literatura: eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno.

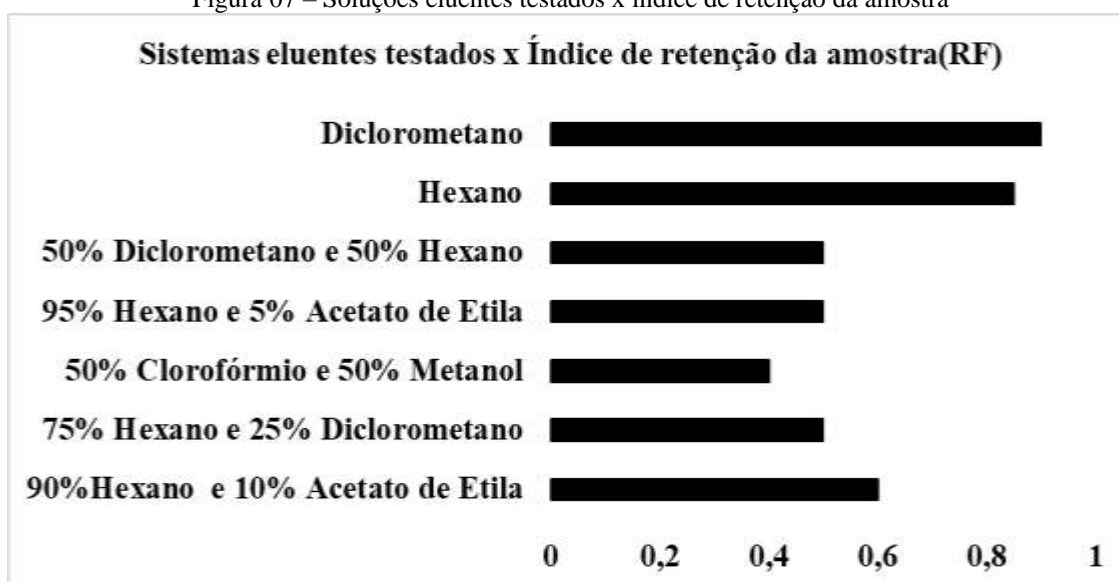
Estes estudos foram realizados a fim de comprovar a eficácia do eluente 90% hexano e 10% acetato de etila e do revelador químico ácido sulfúrico e 10% metanol neste método de

análise. Os critérios utilizados para determinação do eluente e revelador químico estão descritos subsequentemente, nos itens 5.2 e 5.3.

5.2 AVALIAÇÃO DA FASE MÓVEL PARA VERIFICAR A SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS EM CCD

Avaliou-se a composição da fase móvel, realizando-se testes de diferentes concentrações de solventes orgânicos, de acordo com o grau de polaridade. Para esta determinação, levou-se em consideração o parâmetro mais importante a ser considerado em CCD, que é o fator de retenção (R_f), o qual é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. Segundo Collins *et al.* (1993), os valores ideais para R_f estão entre 0,4 e 0,6. Apesar da grande maioria dos solventes usados apresentar proximidades nos resultados, definiu-se como eluente mais satisfatório a solução 90% hexano e 10% acetato de etila, representando $R_f = 0,6$, considerado o mais adequado para este método. A figura 07 representa os eluentes avaliados experimentalmente e o índice de retenção obtido.

Figura 07 – Soluções eluentes testados x índice de retenção da amostra



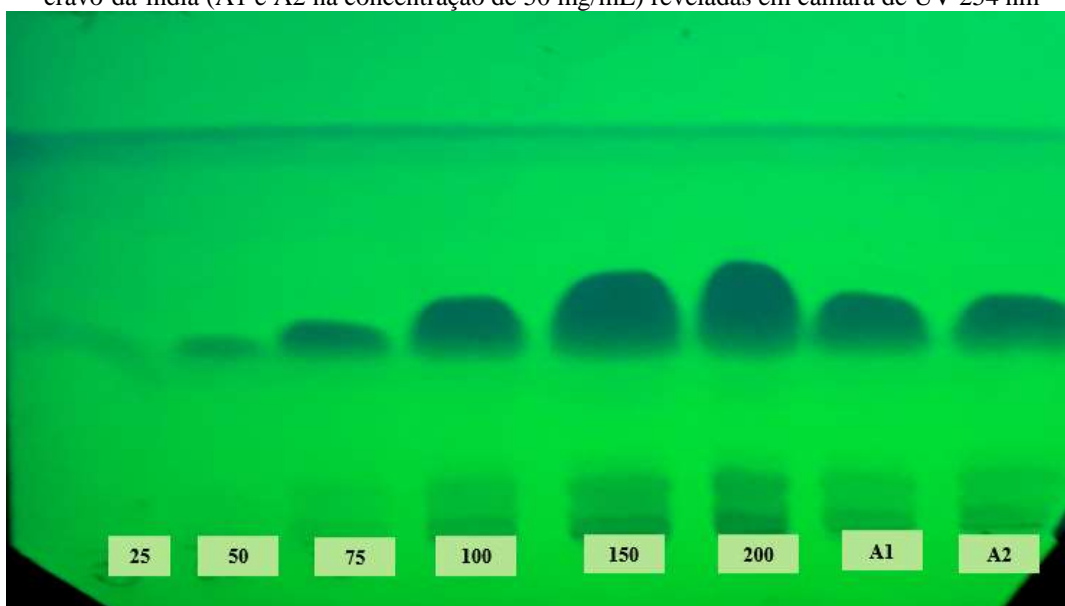
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.3 ESTUDOS DE REVELAÇÃO DOS COMPOSTOS (MÉTODO QUÍMICO E FÍSICO)

5.3.1 Revelação pelo método físico (UV)

Para avaliar a melhor forma de revelação das amostras contidas nas placas cromatográficas, inicialmente, analisou-se o potencial do método físico por meio da luz ultravioleta de comprimento de onda 254 nm. Parte dos adsorventes utilizados em CCD contêm uma substância fluorescente que apresenta coloração esverdeada quando irradiado com luz UV (254-nm). A visualização em câmara de UV de substâncias não fluorescentes em placas, contendo indicador (GF₂₅₄), é detectada pelo efeito de extinção (*quench*) de fluorescência. Nesse caso, a substância é visualizada como uma mancha escura contra um fundo fluorescente esverdeado (indicador). Em conformidade com Alvarenga, Saliba e Milagres (2005), a fluorescência é um fenômeno em que a molécula absorve um fóton de alta energia e reemite um fóton de baixa energia (maior comprimento de onda). Normalmente, o fóton absorvido está no ultravioleta e a luz emitida está na região do visível (ALVARENGA; SALIBA; MILAGRES, 2005). Neste experimento, a posição dos compostos presentes na placa cromatográfica, bem como a intensidade das cores devido às diferentes diluições aplicadas, foram verificadas, como mostra a Figura 8.

Figura 08 – Concentrações de solução de referência de eugenol (25, 50, 75, 100, 150, 200mg/mL) e extratos de cravo-da-índia (A1 e A2 na concentração de 50 mg/mL) reveladas em câmara de UV 254 nm



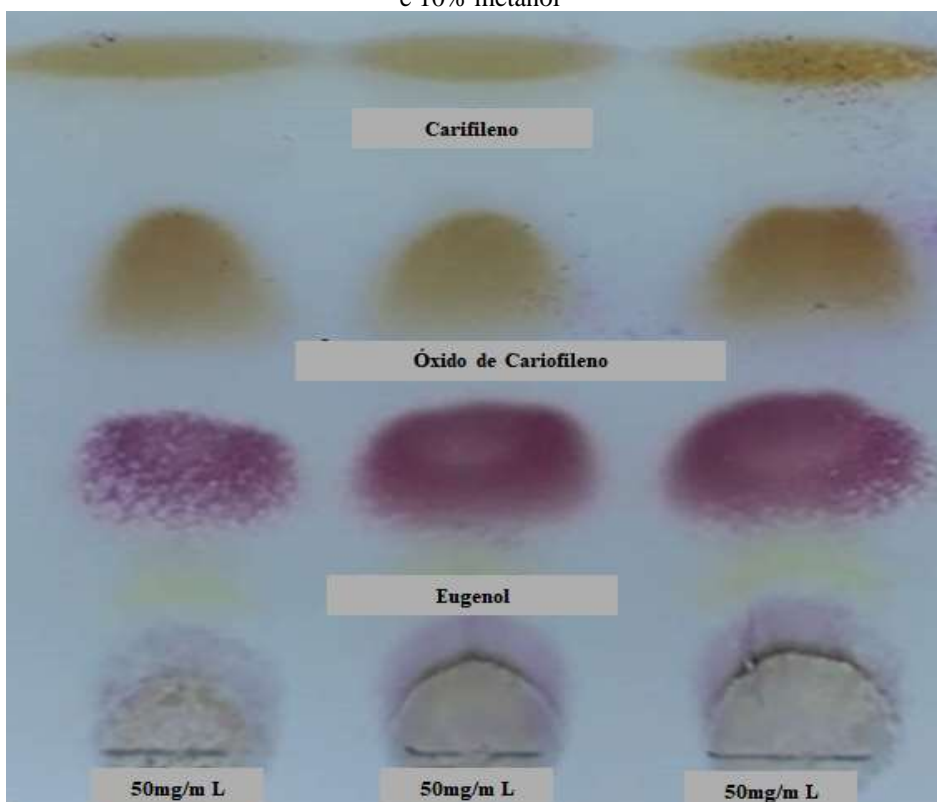
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Como método qualitativo, percebe-se a significativa resolução do eluente enquanto carreador do eugenol aplicado na placa cromatográfica. A imagem obtida também representa nitidamente o comportamento das diferentes diluições do padrão de eugenol, revelando que há relação com as áreas das manchas, logo, indicando a possibilidade de efetuar-se uma análise quantitativa.

5.3.2 Revelação pelo método químico

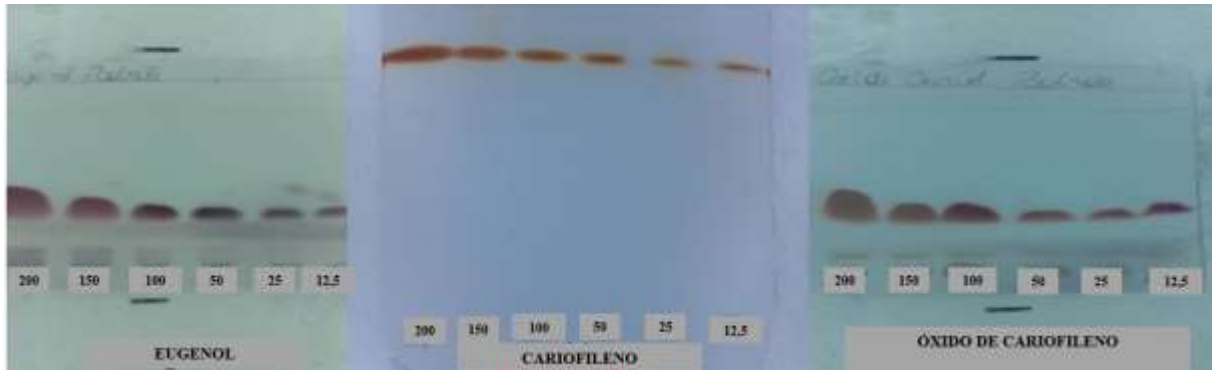
Para a análise qualitativa dos compostos presentes, desenvolveram-se testes que apontaram placas com diferentes reagentes químicos habitualmente utilizados em CCD, como anisaldeído, vanilina sulfúrica e ácido sulfúrico + 10% metanol. Como resultado da revelação, definiu-se como reagente adequado a solução de ácido sulfúrico + 10% metanol, haja vista as características mais evidentes e definidas das amostras nas placas cromatográficas. Observam-se, nas figuras abaixo (Figura 9, Figura 10, Figura 11), características dos padrões majoritários presentes no cravo-da-índia, os quais foram diluídos utilizando eluente 90% hexano e 10% acetato de etila e revelados com ácido sulfúrico + 10% metanol.

Figura 09 – Características qualitativas de compostos presentes no cravo-da-índia (eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno), após eluídas com 90% hexano e 10% acetato de etila e reveladas com solução de ácido sulfúrico e 10% metanol



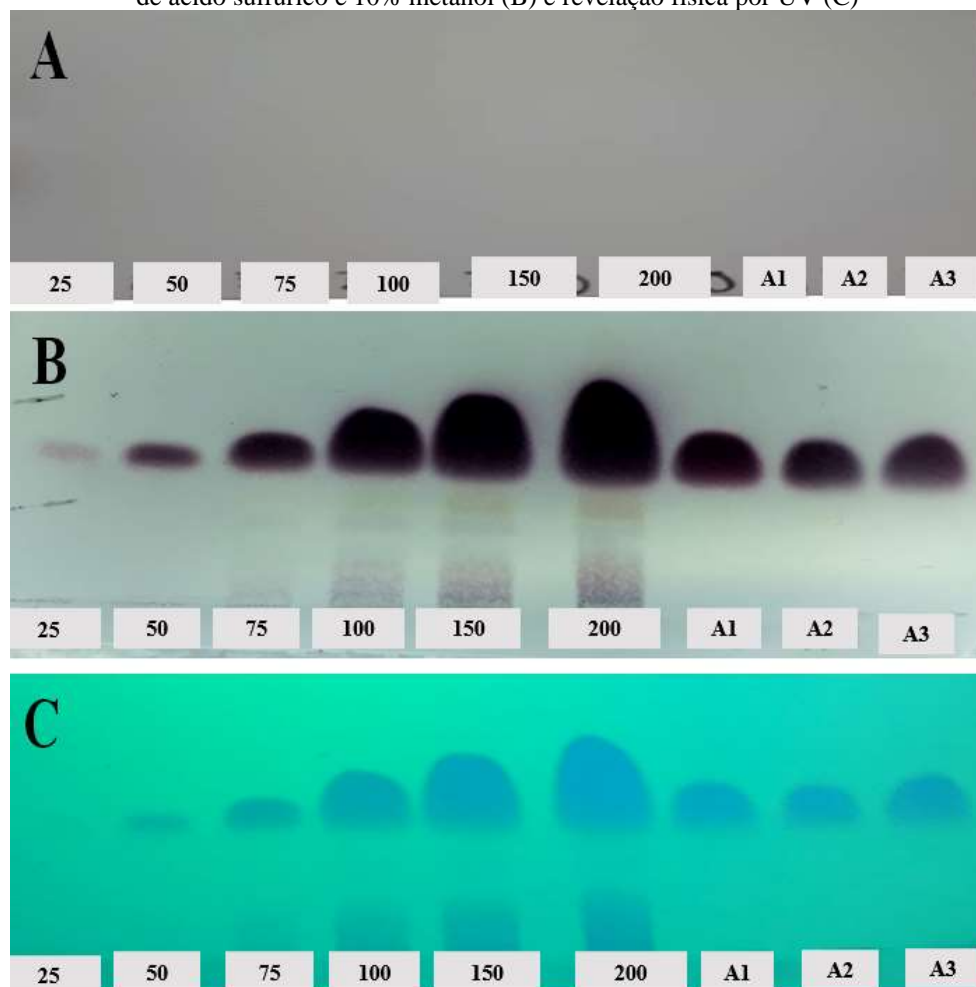
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 10 – Representação de mistura, diluída em 50 mg/m L, de padrões dos compostos majoritários, cariofileno, óxido de cariofileno e eugenol presentes no cravo-da-índia após revelação química com solução de ácido sulfúrico e 10% metanol



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 11 – Comparativo das imagens das placas cromatográficas com amostra de padrão de eugenol em diferentes concentrações (25, 50, 75, 100, 150, 200 mg/mL) antes da revelação (A), revelação química solução de ácido sulfúrico e 10% metanol (B) e revelação física por UV (C)



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na figura 12, nota-se que, na imagem A, mesmo que a amostra esteja inserida na placa, os compostos não ficam claramente visíveis devido ao constituinte eugenol ser incolor, necessitando de um revelador específico. Depois da utilização de reveladores, tanto físicos (imagem C) como químicos (imagem B), constata-se com nitidez a posição, comportamento e a intensidade das cores, dadas as diferentes concentrações (25, 50, 75, 100, 150, 200 mg/mL) das amostras, comprovando a necessidade dos métodos de revelação para identificação qualitativa dos compostos presentes. Esta característica apresentada difere de compostos orgânicos que apresentam pigmentos em suas estruturas como carotenoides e clorofilas, os quais, na grande maioria das vezes, tornam-se métodos de revelação dispensáveis em razão da coloração intensa.

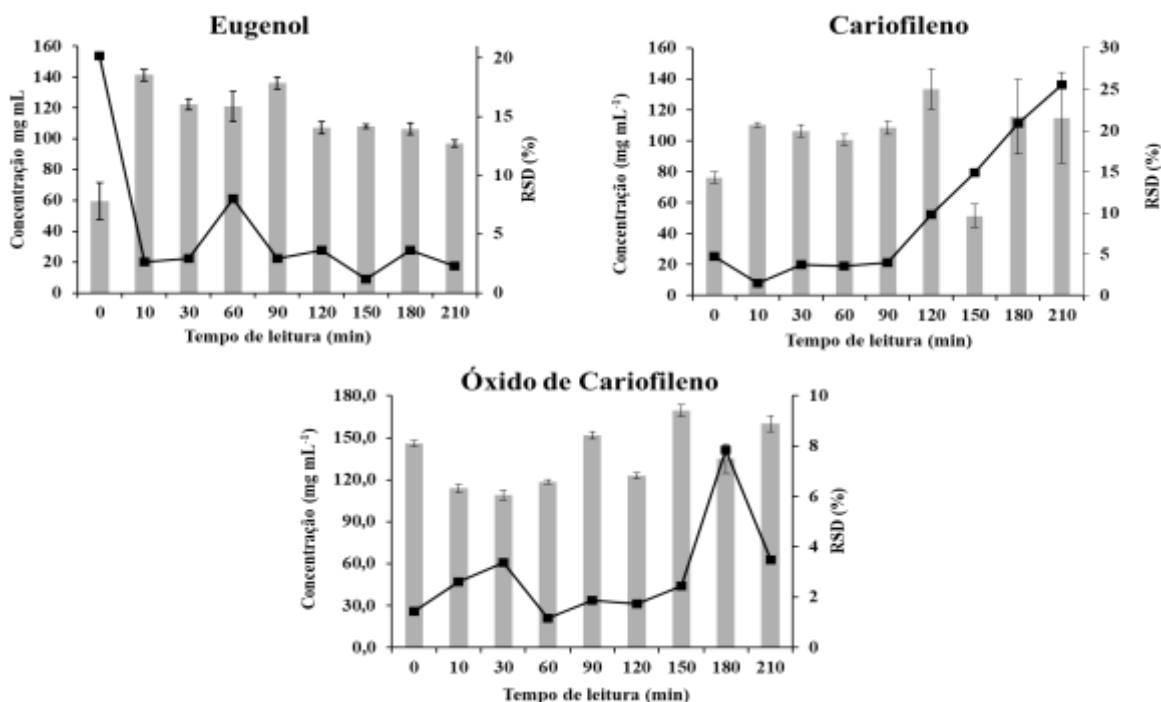
5.4 ESTUDOS DO USO DE SOFTWARES (PHOTOMETRIX, qTLC, IMAGE J) PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DOS COMPOSTOS SEPARADOS

Para avaliar quantitativamente a concentração das amostras analisadas (A1, A2, A3 e A4), primeiramente gerou-se a curva de calibração reproduzida a partir da análise das placas cromatográficas dos padrões de eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno.

Os ensaios prévios foram realizados com o software ImageJ e qTLC, desenvolvendo-se, também, alguns ensaios pelo Photometrix, com ênfase para a leitura das placas em diferentes tempos (0, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 minutos) após a revelação, para avaliar se houve mudança das tonalidades das cores ao passar do tempo. Os resultados obtidos pelo Photometrix, os valores de média e o desvio padrão para a amostra A1 estão representados nas Figuras 9.

Os dados estatísticos obtidos pelo aplicativo Photometrix a partir das curvas de calibração para os padrões de eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno, representados na figura 13, demonstram que os resultados obtidos têm grande variabilidade. Isso se deve ao fato de que apenas uma região no centro da mancha é usada pelo software e não a área de toda a mancha. Portanto, pequenas variações no posicionamento da ferramenta para captura do ROI (região de interesse, do inglês *region of interest*) de 64 pixel, levam a variações dos resultados, especialmente para concentrações menores. Com base na análise do tempo pelo aplicativo Photometrix, percebe-se que o tempo de leitura com menor coeficiente de variação foi o tempo de 10 minutos para todos os padrões. Estes dados podem ser melhores representados na tabela no apêndice 2.

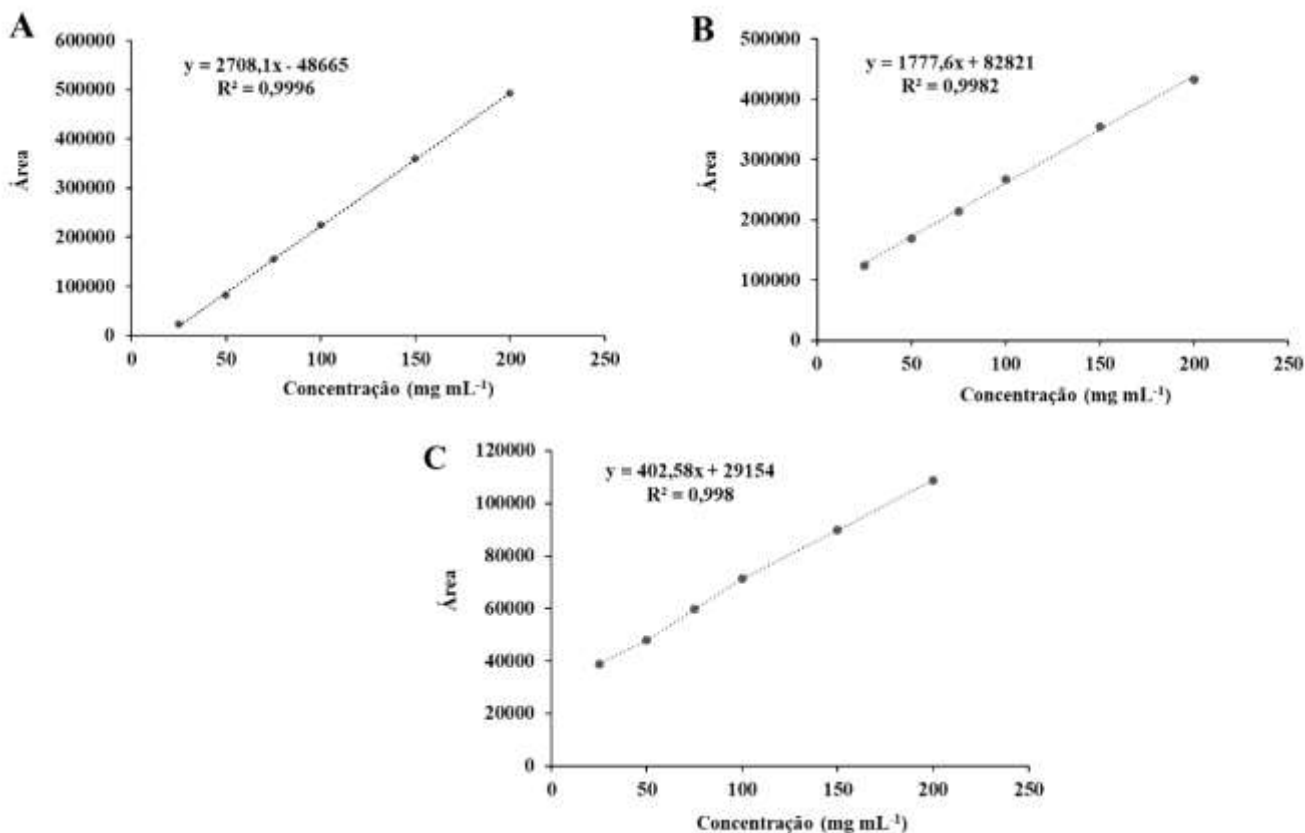
Figura 12 – Resultados obtidos pelo Photometrix de aplicação das amostras nas curvas construídas pelo Photometrix com curvas de 25 mg/mL a 200mg/mL



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Para validação da técnica, optou-se pelo software qTLC que, diferentemente do Photometrix, que usa a intensidade de cor das manchas, emprega valores de áreas. A partir de diferentes concentrações das soluções de referência de eugenol reveladas pelos métodos físico e químico, diferentes curvas de calibração foram obtidas e usadas para a avaliação das áreas das amostras de óleos de cravos conseguidas por destilação. As curvas de calibração construídas pelo software qTLC utilizadas para análise das amostras de diferentes espécies de cravo estão representadas na Figura 14.

Figura 13 – Curvas de calibração dos padrões de eugenol (A), cariofileno(B) e óxido de cariofileno(C) obtidas pelo software qTLC, reveladas com ácido sulfúrico e 10% metanol

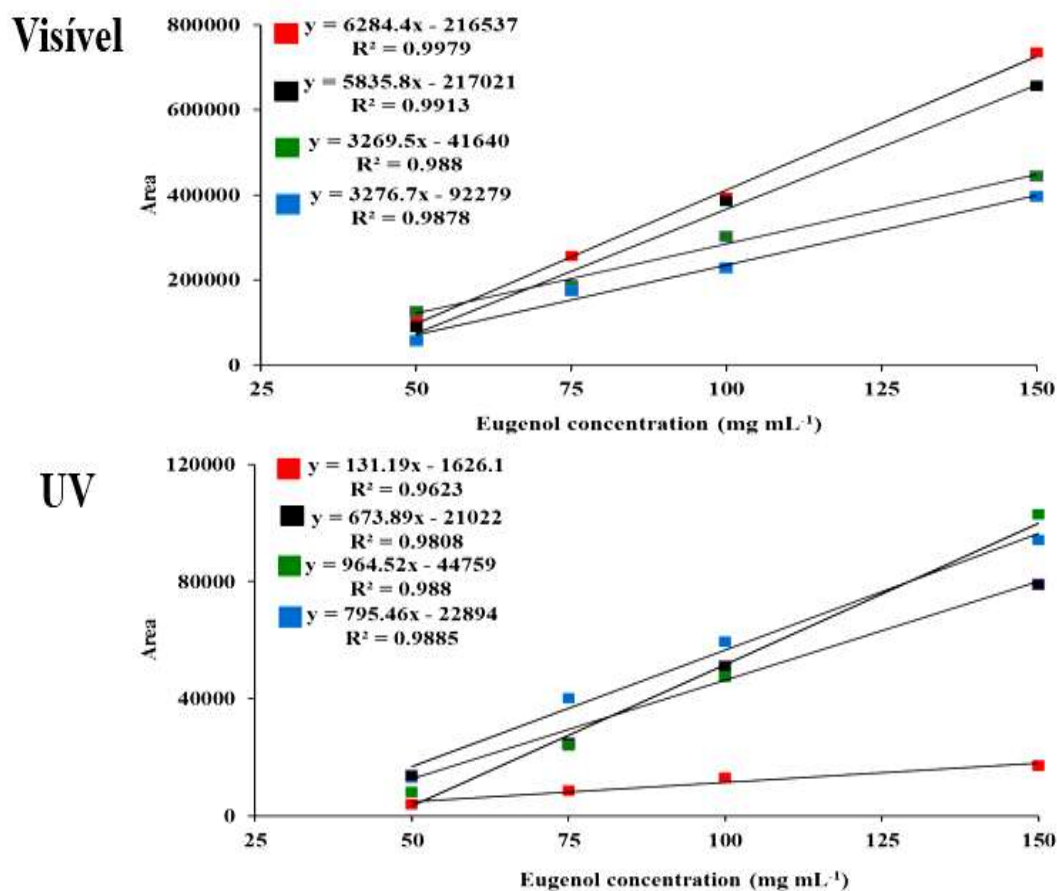


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Cada amostra de óleo de cravo-da-índia obtida por destilação (A1, A2, A3 e A4) foi avaliada em diferentes tempos de leitura da placa. As mesmas análises foram realizadas para as revelações por métodos químicos (ácido sulfúrico e 10% metanol) e físicos (UV). Contudo, para cada amostra, somente foi verificada a presença do composto majoritário eugenol.

A linearidade das curvas de calibração para eugenol e as equações de reta alcançadas pelas quatro amostras de cravo-da-índia avaliadas que foram otimizadas pelo software qTLC obtidas com os dados dos três canais RGB, por método químico e físico, estão representadas na Figura 15. Cabe salientar que, para quantificação de eugenol nas amostras de óleos essenciais, uma placa cromatográfica contendo as soluções de referência e replicatas da amostra foi utilizada, ou seja, cada amostra avaliada tinha sua própria curva de calibração. Tal procedimento foi adotado com vistas à diminuição da variabilidade dos resultados.

Figura 14 – Linearidade das curvas de calibração do eugenol para amostra de cravo-da-índia [A1(vermelho), A2(preto), A3(verde), A4(azul)] avaliada



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Como pode ser observado na Figura 15, a relação entre a resposta analítica RGB e a concentração de eugenol. Todos os gráficos são lineares com base na inspeção visual. Uma vez produzido calibração linear, a sensibilidade de calibração, calculada como a inclinação da equação de linha, foi escolhida como o fator determinante na escolha da melhor resposta analítica. Entre os espaços de cores, o valor G deu a maior sensibilidade de calibração ($G > R > B$). Os dados do canal verde apresentaram maior sensibilidade e por isso foram processados para obtenção dos sinais analíticos. Os resultados de média e desvio padrão obtidos pela aplicação da amostra na curva de calibração obtidas pelo software qTLC para o padrão de eugenol estão representados na tabela 2.

Tabela 2 – Resultados de média e desvio padrão obtidos pela aplicação das amostras na curva de calibração obtida pelo software qTLC para o padrão de eugenol, por método físico e químico de revelação em diferentes tempos de extração de óleo

| | Curva de Calibração Visível | | | | Curva de Calibração UV | | | |
|------------------|-----------------------------|--------------|-----------|------------|------------------------|--------------|-----------|------------|
| | Tempo(min) | Média | SD | RSD | Tempo(min) | Média | SD | RSD |
| Amostra 1 | 30 | 108,1 | 8,6 | 7,96 | 30 | 167,51 | 11,47 | 6,85 |
| | 60 | 135,0 | 1,1 | 0,80 | 60 | 135,7 | 16,15 | 11,9 |
| | 90 | 107,0 | 13,6 | 12,75 | 90 | 107,52 | 21,66 | 20,14 |
| | 120 | 86,4 | 0,6 | 0,65 | 120 | 99,39 | 13,03 | 13,11 |
| | 150 | 77,5 | 32,6 | 42,09 | 150 | 95,90 | 5,99 | 6,25 |
| | 180 | 85,2 | 1,7 | 2,02 | 180 | 84,11 | 1,02 | 1,21 |
| Amostra 2 | Tempo(min) | Média | SD | RSD | Tempo(min) | Média | SD | RSD |
| | 30 | 57,18 | 1,84 | 3,21 | 30 | 47,9 | 13,3 | 27,76 |
| | 60 | 60,85 | 1,54 | 2,53 | 60 | 63,5 | 5,1 | 8,06 |
| | 90 | 106,71 | 10,82 | 10,14 | 90 | 43,5 | 0,6 | 1,32 |
| | 120 | 74,21 | 1,53 | 2,06 | 120 | 79,1 | 4,6 | 5,87 |
| | 150 | 71,85 | 4,67 | 6,50 | 150 | 75,9 | 4,2 | 5,52 |
| Amostra 3 | 180 | 72,71 | 5,94 | 8,17 | 180 | 87,7 | 3,0 | 3,45 |
| | Tempo(min) | Média | SD | RSD | Tempo(min) | Média | SD | RSD |
| | 30 | 160,2 | 14,10 | 8,80 | 30 | 100,8 | 33,94 | 28,69 |
| | 60 | 81,97 | 8,76 | 10,69 | 60 | 71,86 | 3,30 | 4,59 |
| | 90 | 129,99 | 9,38 | 7,22 | 90 | 83,68 | 8,45 | 10,10 |
| | 120 | 84,95 | 15,57 | 18,33 | 120 | 92,89 | 7,977 | 8,58 |
| Amostra 4 | 150 | 98,85 | 6,97 | 7,05 | 150 | 82,88 | 5,49 | 6,62 |
| | 180 | 98,97 | 7,26 | 7,33 | 180 | 76,39 | 6,18 | 8,09 |
| | Tempo(min) | Média | SD | RSD | Tempo(min) | Média | SD | RSD |
| | 30 | 66,52 | 3,23 | 4,86 | 30 | 26,78 | 0,96 | 3,58 |
| | 60 | 36,48 | 9,16 | 25,12 | 60 | 90,34 | 9,57 | 10,59 |
| | 90 | 60,13 | 0,06 | 0,10 | 90 | 68,48 | 3,61 | 5,27 |
| | 120 | 96,12 | 2,21 | 2,30 | 120 | 68,64 | 3,30 | 4,81 |
| | 150 | 116,69 | 0,19 | 0,16 | 150 | 98,54 | 1,54 | 1,57 |
| | 180 | 63,56 | 3,26 | 5,13 | 180 | 94,34 | 2,39 | 2,54 |

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Na amostra A1, as imagens reveladas no visível apresentam menores desvios padrões que as reveladas pelo método físico, sendo que o tempo que apresentou menor desvio padrão foi 120 minutos no visível, e no método ultravioleta o que teve menor desvio foi no tempo de 180 minutos.

Na mostra A2, o tempo com menor desvio padrão foi de 120 minutos para o visível e, para o ultravioleta foi de 90 minutos. Por sua vez, na amostra A3, o tempo com menor desvio padrão foi de 150 minutos no visível e, no ultravioleta, 60 minutos. Por fim, na amostra A4, as variações apresentadas pelos diferentes métodos de revelação foram próximas. O tempo com menor desvio padrão foi de 90 minutos e, no ultravioleta, 30 minutos.

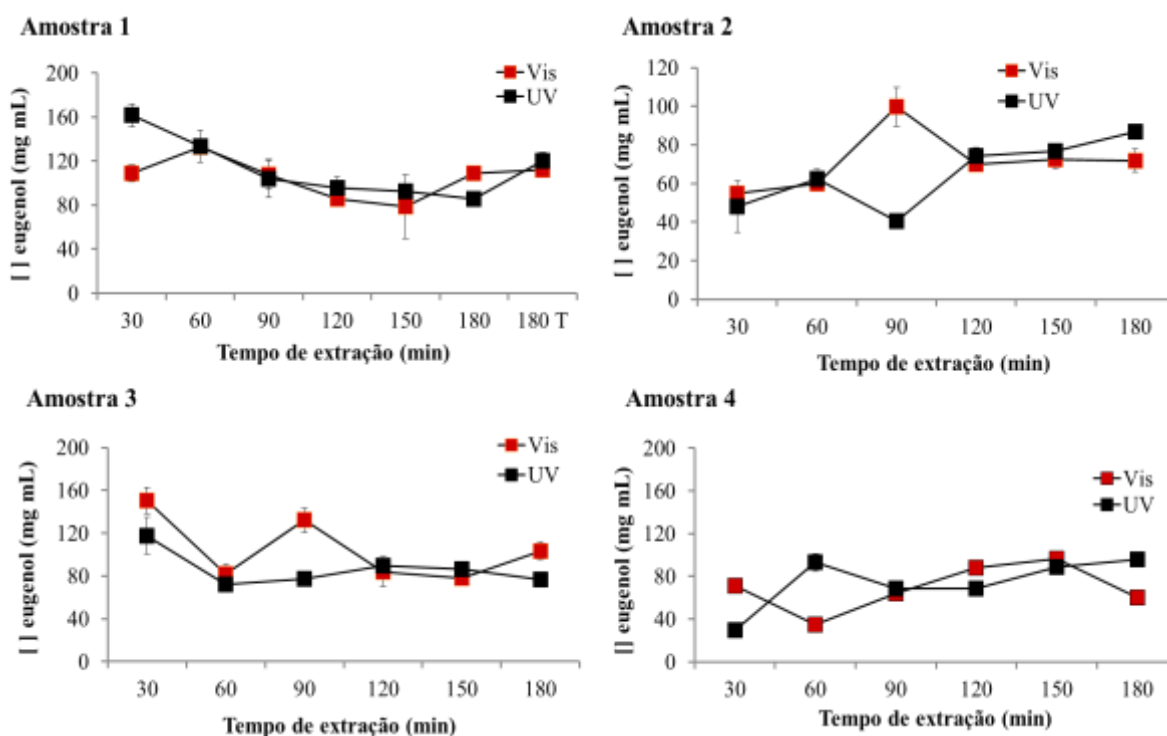
Observa-se que, entre os métodos físicos e químicos, há significativas variações nos valores de média e desvio padrão, todavia, estas são similares. Isto deve-se ao fato de várias interferências como tipo de amostra e possíveis variações na aquisição da imagem realizada

manualmente, otimização de resultados e, especialmente, a não padronização da aplicação da amostra que foi realizada após o desenvolvimento deste procedimento.

5.5 ESTUDOS DE CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DURANTE A EXTRAÇÃO (TESTES COM DIFERENTES TEMPOS DE DESTILAÇÃO E ANÁLISE CINÉTICA)

Para os resultados de análise cinética, foi utilizado apenas o constituinte majoritário do cravo-da-índia, eugenol, nas quatro amostras avaliadas. Os resultados das análises cinéticas estão caracterizados na figura 16, que demonstra a relação dos tempos de extrações para as diferentes amostras de cravo-da-índia (A1, A2, A3 e A4) nos intervalos de tempo de 30 minutos a 180 minutos finais. As placas foram reveladas pelo método físico (UV) e químico de revelação (ácido sulfúrico e 10% metanol) e os resultados estão evidenciados na figura 16.

Figura 15 – Análise de eugenol em diferentes tempos de extrações para as amostras de cravo-da-índia [A1, A2, A3 e A4] observadas por método físico e químico



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Analisando a figura 16, é possível perceber, nas amostras A1 e A3, nos primeiros 30 minutos, a maior concentração de eugenol (120 mg/mL a 160mg/mL), que foi decaindo com o passar do tempo de extração, tendo um leve crescimento ao final do processo. Já, na amostra

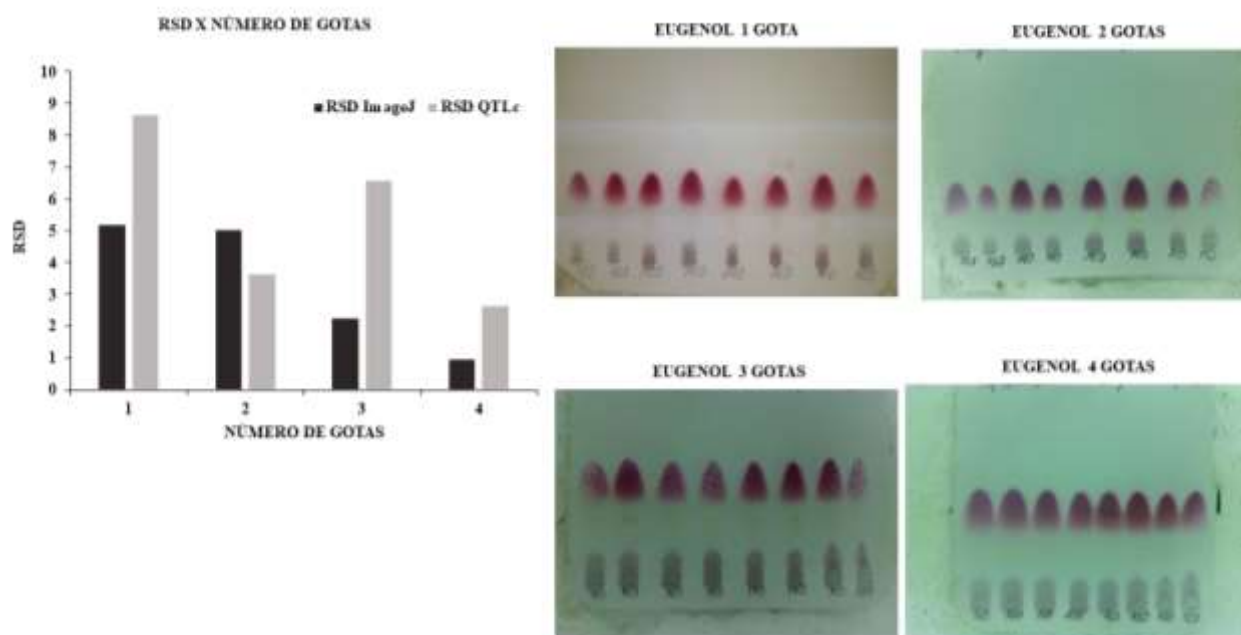
A2, o tempo de maior concentração de eugenol foi o de 180 minutos, representado pelos dois métodos de revelação, sendo que o ultravioleta caracteriza também uma concentração significativa de 100mg/mL aos 90 minutos. Para a amostra A4, os tempos em destaque foram de 60 e 180 minutos, em que as concentrações foram semelhantes, em torno de 90mg/mL. Esta divergência deve-se às diferentes marcas empregadas, as quais denotam qualidades variáveis, o que pode explicar seus valores econômicos adquiridos, além da ausência de controle da luminosidade no ambiente onde a extração foi realizada.

5.6 AVALIAÇÃO DO VOLUME DE AMOSTRAS EM CCD

Para aferir possíveis variações de área observadas, tanto qualitativamente como quantitativamente, foi realizado o teste do número de gotas para o padrão de eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno. Para os três padrões, foi aplicada uma gota do capilar e construída a curva de calibração. Para o padrão de eugenol, reproduziu-se, em placas diferentes, uma gota, duas gotas, três gotas e quatro gotas, na concentração de 100mg/mL da solução estoque.

Os testes realizados a fim de padronizar a introdução da amostra e aferir possíveis variações nos valores de áreas obtidos, após a análise quantitativa pelos diferentes softwares, podem ser visualizados na Figura 17.

Figura 16 – Desvio padrão associado ao número de gotas inseridas na placa cromatográfica



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A partir dos valores evidenciados, identifica-se que, qualitativamente, o aumento do número de gotas reduz os desvios das medidas, ou seja, a aplicação de quatro gotas na placa cromatográfica gerou padronização das cores e, quantitativamente, um menor desvio padrão, por ambos os softwares utilizados, ressaltando a uniformidade e a homogeneidade de área na aplicação de quatro gotas.

5.7 ANÁLISE CROMATOGRAFIA GASOSA

Para comprovação do método descrito, os resultados foram comparados por análise de Cromatografia Gasosa (CG), método padrão para quantificação de óleo essencial. As recuperações obtidas apresentaram grande variação, entre 58% e 147%. Este resultado explica-se devido a ausência de padronização da introdução de amostras realizadas nos experimentos iniciais. Posteriormente, as análises foram refeitas e, similarmente, houve variabilidade, dificuldade na reprodução dos resultados e baixa precisão, demonstrando que o método da CCD com uso de smartphone para quantificação de óleo essencial de cravo-da-índia não seria possível de ser aplicado, sendo proposto o método descrito no **Capítulo 2** deste manuscrito.

5.8 SÍNTESE DO ACETATO DE EUGENILA

Os ensaios da síntese do acetato de eugenila foram realizados por cinco vezes, tentando minimizar possíveis interferências a cada experimento. Dificuldades na identificação da presença do éster na placa cromatográfica foram encontradas sem, portanto, resultados eficazes para este ensaio.

CAPÍTULO 2

Neste capítulo disserta-se, em forma de artigo científico, a adaptação do método colorimétrico baseado na reação do reagente Folin-Ciocalteu para determinação de eugenol em óleo essencial de cravo-da-índia, empregando o aplicativo Photometrix em smartphone.



Smartphone-based rapid and low-cost method for the determination of eugenol content of clove essential oil

Izaura Ceolin dos Santos^{1,2} Sandra Kunde Schlesner¹ Débora Piovesan de Moraes¹
Daniele de Freitas Ferreira¹ Mônica Voss¹ Sandro Rogério Giacomelli² Juliano Smanloto Barin^{1*}

¹Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: juliano@ufsm.br. *Corresponding author.

²Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões (URI), Frederico Westphalen, RS, Brasil.

ABSTRACT: The determination of eugenol in clove essential oil was performed using a smartphone-operated device, which was used for image capture and processing. The colorimetric reaction with the Folin-Ciocalteu reagent was used, and the lighting conditions were evaluated to capture images directly in 2 mL disposable vessels. The free application PhotoMetrix UVC was used for partial least squares regression calibration with suitable values (R^2 greater than 0.99). The accuracy of the proposed method was compared with traditional methods, such as gas chromatography (GC) and spectrophotometry, and it can be observed that there were no significant differences (Student's t-test ($P > 0.05$), with agreements from 97% to 101%. The smartphone method allowed the evaluation of several samples in a few minutes, with simple analysis steps and easy interpretation of the results. The miniaturized scale allowed the use of small amounts of reagents with minimal waste generation. Therefore, the proposed method can be easily operated in the field and allows the evaluation of the quality of clove essential oil in places of restricted access without the need for a laboratory structure and specialized analysts.

Key words: smartphone, clove, eugenol, digital images.

Método rápido e de baixo custo empregando smartphone para a determinação de eugenol em óleo essencial de cravo

RESUMO: A determinação de eugenol em óleo essencial de cravo-da-índia foi realizada utilizando um dispositivo operado com smartphone para captura e processamento de imagens. Para tal desenvolvimento foi utilizada a reação colorimétrica com o reagente de Folin-Ciocalteu. Foram avaliadas diferentes condições de iluminação para a captura das imagens diretamente em frascos descartáveis de 2 mL. O aplicativo livre PhotoMetrix UVC foi usado para a calibração por regressão de mínimos quadrados parciais com valores adequados (R^2 maior que 0.99). A exatidão do método proposto foi comparada com métodos tradicionais, tais como cromatografia gasosa (CG) e espectrofotometria, sem diferenças significativas (teste t de Student ($P > 0,05$) e com concordâncias entre 97% e 101%. O método com smartphone permitiu a avaliação de várias amostras em poucos minutos, com etapas de análise simples e com fácil interpretação dos resultados. A escala miniaturizada permitiu o uso de pequenas quantidades de reagentes e mínima geração de resíduos. Portanto, o método proposto pode ser facilmente operado em campo e permite avaliar a qualidade de óleo essencial de cravo-da-índia em locais de acesso restrito, sem a necessidade de estrutura laboratorial e analistas especializados.

Palavras-chave: smartphone, cravo-da-índia, eugenol, imagens digitais.

INTRODUCTION

Clove (*Syzygium aromaticum*, L.) is used since antiquity as a condiment and flavoring, as well as for the elaboration of perfumes and aromatic incenses. Eugenol is the main component of clove essential oil, but β -caryophyllene and smaller amounts of other components can be found. It is a phenolic compound that has been suggested as a substitute for synthetic additives due to its antioxidant and antimicrobial characteristics (CHAIEB et al., 2007).

The determination of eugenol content in clove essential oil is usually performed by gas chromatography (GC), a very selective technique widely used in laboratories (CHAIEB et al., 2007). However, GC is time-consuming, requires specific knowledge for operation, and presents a high cost and a dedicated laboratory structure, which impairs its use for analysis in the field (NADEEM et al., 2022).

The search for the portability of analytical methods has been increased to allow simple and fast analysis using low-cost devices that the analyst



can efficiently operate. (NADEEM et al., 2022) The popularization of smartphones increased the scientific community's interest due to the possibility of using sensors coupled (or those embedded in the hardware, as cameras) to these devices, which overcomes the need for specific equipment for chemical analysis (AZEVEDO et al., 2008; COSTA et al., 2021; HOLKEM et al., 2021; SCHLESNER et al., 2022). For the colorimetric methods based on smartphones, digital images or videos must be collected, stored, and processed using mathematical algorithms based on color spaces such as RGB (red, green, and blue) (SANTOS et al., 2019). Lighting conditions and camera position are critical to ensure suitable results in digital image-based methods (DIB). COSTA et al. (2021) proposed a USB endoscopic camera coupled to a closed 3D printed camera under controlled lighting to standardize the experimental conditions in DIB. A hole was provided to allow the introduction of closed disposable vessels, and a free Android application (PhotoMetrix UVC) was developed for a complete analysis solution to obtain good results for different colorimetric analysis (COSTA et al., 2021; HOLKEM et al., 2021; SCHLESNER et al., 2022). Despite the valuable results, no examples of colorimetric analysis in smartphones were found for the quality control of essential oils by the use of such devices.

Therefore, a novel analytical method was developed for the fast and low-cost determination of eugenol in clove essential oils. A field-portable device operated on a smartphone was enough to provide the analysis out of laboratory facilities. The Folin-Ciocalteu reagent was used, and the reaction time and illumination conditions were evaluated. The results obtained with the proposed method were compared with conventional methods, such as spectrophotometry and gas chromatography.

MATERIALS AND METHODS

Samples and reagents

Six samples of clove (*Syzygium aromaticum*, L.) were obtained in the local market of Caiçara-RS, Brazil. The essential oils were extracted from 100 g of clove and 500 mL of ultrapure water (Direct-Q 3 UV, 18.2 MΩcm, Millipore Corp., USA) by hydrodistillation in a Clevenger apparatus for 4 h, according to Brazilian Pharmacopoeia (BRAZIL, 2005). After extraction, the essential oil was collected, dried with anhydrous sodium sulfate (99.5% P.A., Vetec, Brazil), and stored at -18 °C until analysis. Eugenol (99% P.A., Sigma-Aldrich, Germany) was used to prepare analytical curves in methanol (99.8%,

P.A., Sigma-Aldrich, Germany). For the colorimetric assay, 2N Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Germany) and sodium carbonate (99.5% P.A., Sigma-Aldrich, Germany) solutions were used, as well as methanol. The reaction was also evaluated for other compounds reported in the essential oil as β-caryophyllene (≥ 80% P.A., Sigma-Aldrich, Germany), eugenyl acetate (98% P.A., Sigma-Aldrich, Germany), and caryophyllene oxide (95% P.A., Sigma-Aldrich, Germany).

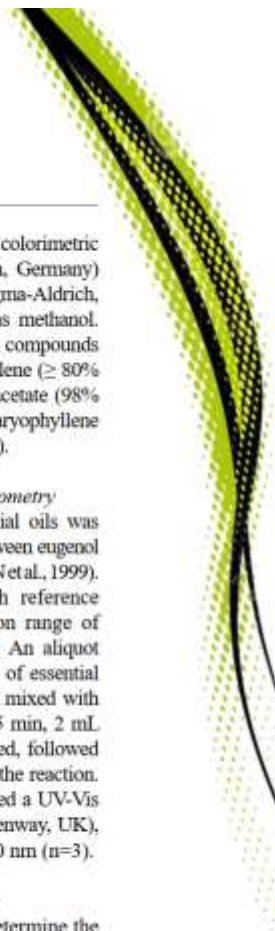
Determination of eugenol by spectrophotometry

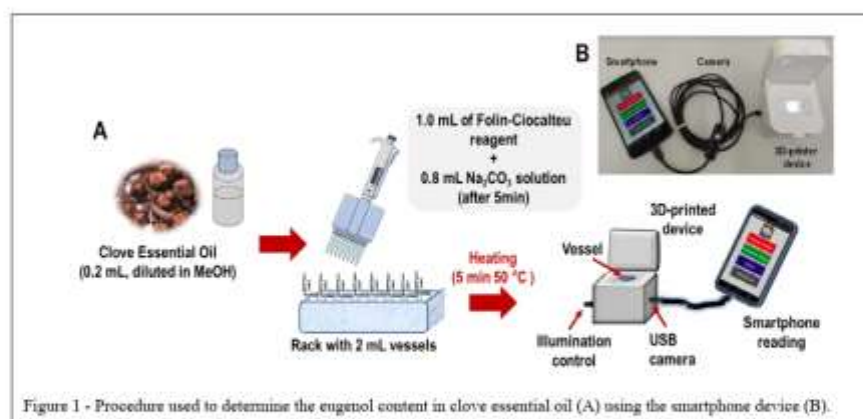
The eugenol content of essential oils was determined by the colorimetric reaction between eugenol and the Folin-Ciocalteu reagent (SINGLETON et al., 1999). Calibration curves were constructed with reference solutions of eugenol in the concentration range of 10 to 110 µg/mL prepared in methanol. An aliquot of 0.5 mL of sample (diluted for 0.05 mg of essential oil per mL of methanol) or standards was mixed with 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent. After 5 min, 2 mL of sodium carbonate 7.5% (w/v) was added, followed by heating at 50 °C for 5 min to complete the reaction. For analysis by spectrophotometry was used a UV-Vis spectrophotometer (JENWAY UV- 6300 Jenway, UK), and the absorbances were measured at 760 nm (n=3).

Determination of eugenol by smartphone

The colorimetric reaction to determine the eugenol content in clove essential oil was the same used for the spectrophotometry method, as shown in figure 1. For reading in the smartphone (Galaxi J7 prime model), an endoscopic camera (SmartCam, Intelligent Endoscope model, 640 × 480 pixels) was used. The camera was adapted inside a 3D-printed chamber containing a white LED lamp as proposed by COSTA et al. (2021). A hole in the center of the piece was used to introduce a transparent polypropylene vessel (Eppendorf-type, 2 mL, Cralplast, Brazil). Images with a region of interest (ROI) of 64 × 64 pixels were captured and processed with the free application Photometrix UVC version 1.0.7 (GHELPER.NET Inc.), available in the Google Play store. The PLS regression multivariate calibration mode was selected in the applicative, using RGB histogram values (SCHLESNER et al., 2022).

The reaction time was evaluated from 0 to 7 min, and lighting from 19 to 1040 lux. The concentration of eugenol was determined from an analytical curve prepared with eugenol reference solutions from 10 to 110 µg/mL in methanol. All samples were analyzed in triplicate (n=3). The selectivity of the reaction for eugenol was evaluated using reference solutions of beta-caryophyllene,





caryophyllene oxide, and eugenyl acetate in the range of 10 to 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Changes of color were not observed in such concentrations (not shown); and therefore, eugenol was the unique compound that generated colored solutions through the reaction with the Folin-Ciocalteu reagent.

Gas chromatography analysis

For quantification of eugenol by gas chromatography, equipment with a flame ionization detector (GC-FID - Varian Star 3400CX, Palo Alto, CA, USA) was used with a BPX5 fused silica capillary column (25 m \times 0.22 mm \times 0.25 μm , SGE, Australia). The injection of 1 μL of sample diluted in hexane (1:100 v/v) was introduced into the injector at 230 $^{\circ}\text{C}$ in 1:50 split mode. For the separation of compounds, a heating program was used, starting at 45 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, increasing to 70 $^{\circ}\text{C}$ under a ramp of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Subsequently, a ramp of 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ was applied until it reached 200 $^{\circ}\text{C}$, remaining for 5 min. The gas used was hydrogen at an initial flow rate of 2 mL/min and constant pressure of 15 psi. The temperature of the detector was maintained at 250 $^{\circ}\text{C}$. The concentration of eugenol in the essential oil was determined from a calibration curve ($n=3$).

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of operational parameters in the smartphone-based method

The reaction time was evaluated under heating at 50 $^{\circ}\text{C}$ (data not shown), and 5 min provided results without a difference from the standard method (SINGLETON et al., 1999), which is performed by

120 min without heating. Thus, 5 min at 50 $^{\circ}\text{C}$ was used for further experiments.

The illumination was evaluated at different intensities (from 19 to 1040 lux, Figure 2), and influenced the response at the different color channels. For higher light intensities, saturation was observed mainly for the lower concentrations of eugenol. However, a suitable variation for the RGB channels was observed under 75 lux for the different concentrations of eugenol. Therefore, 75 lux was chosen for the subsequent experiments.

Results from the PLS models to determine eugenol in clove essential oil are summarized in table 1. The regression models were developed with 24 samples for calibration. The most suitable results concerning calibration (RMSEC) and cross-validation (RMSECV) errors were obtained with 3 factors, presenting values less than 0.011 and 0.033 mg/mL, respectively.

Determination of eugenol in clove essential oil

According to Figure 3A, a suitable correlation between the measured values errors and predicted values for eugenol content in the development of the calibration model (reference solutions from 10 to 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The coefficient of determination (R^2 Cal) for all models was higher than 0.99, and no significant differences (ANOVA, $P > 0.05$) among the measured and predicted values were identified.

The determination of eugenol in clove essential oil using a smartphone-based method presented the agreement to the GC and spectrophotometric methods ranging from 97% to 101% (Figure 3B), without a statistical difference (Student's t -test, $P > 0.05$). Therefore, using a low-cost device, the proposed method can be considered

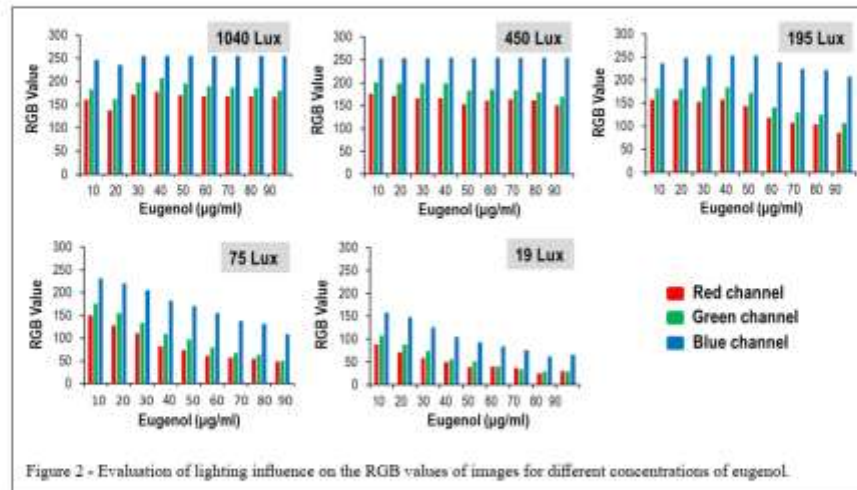


Figure 2 - Evaluation of lighting influence on the RGB values of images for different concentrations of eugenol.

for rapid field-portable analysis. The miniaturization and the low amount of reagents (and residues generated) were relevant features to consider the method environmentally friendly. In addition, only simple sample preparation steps were required, and all data treatment could be performed on the smartphone, which allowed the use of the method by non-specialized analysts.

CONCLUSION

The proposed smartphone-based method allowed the colorimetric determination of eugenol in

clove essential oils in an easy-to-use way. Comparable results (agreements ranging from 97% to 101%) were obtained with spectrophotometric and GC methods. In addition to simplicity and low cost, the proposed method was not influenced by ambient lighting and the distance to the camera as commonly found in the colorimetric methods using smartphones. It is important to mention that the analytical steps can be performed in a few minutes, and a straightforward interpretation of data can be obtained using application in the smartphone. In addition, the portability and the evaluation of clove essential oil in hard-to-reach locations were important features of the proposed

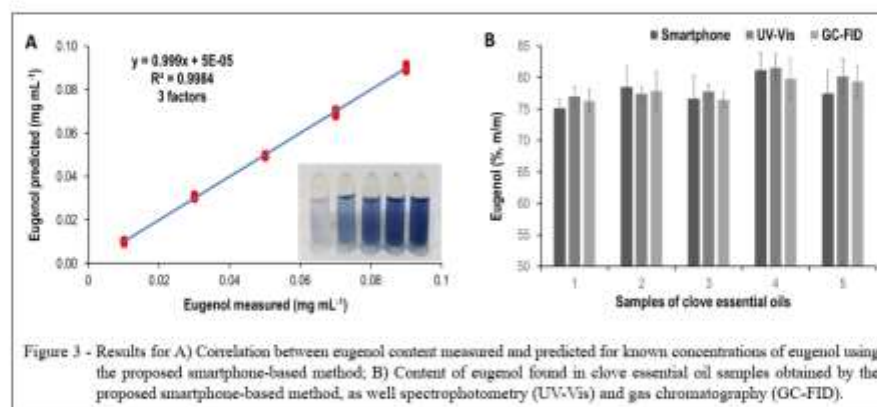


Figure 3 - Results for A) Correlation between eugenol content measured and predicted for known concentrations of eugenol using the proposed smartphone-based method; B) Content of eugenol found in clove essential oil samples obtained by the proposed smartphone-based method, as well as spectrophotometry (UV-Vis) and gas chromatography (GC-FID).

Table 1 - Partial least squares regression results for the smartphone-based method for determining eugenol in clove essential oil.

| Parameter | Values |
|---------------------|-----------------|
| Calibration samples | 24 |
| Samples prediction | 12 |
| Number of factors | 3 |
| Slope | 0.999 |
| Offset | 0.00005 |
| R ² Cal | 0.9984 |
| RMSEC (mg/mL) | 0.011203 |
| RMSECV (mg/mL) | 0.032607 |
| Bias (mg/mL) | 0.0069 - 0.0119 |
| RMSEP (mg/mL) | 0.0156 - 0.0351 |

method because no laboratory facility and specialized equipment were required.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 309513/2019-7) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, grant number 21/2551-0002097-0) for supporting this study. It was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil - Finance code 001.

DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors contributed equally for the conception and writing of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved of the final version.

REFERENCES

- AZEVEDO, E. et al. **Computer graphics: theory and practice.**: Elsevier Publishing House, 2008.
- BRAZIL. **Brazilian Pharmacopoeia**, v. 2., 6. Ed. Brasília/DF: ANVISA: National Health Surveillance Agency, 2022.
- CHAIIB, K.; et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzgium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. **Phytotherapy Research**, v.21, n.6, Jun. 2007. Available from: <<https://doi.org/10.1002/ptr.2124>>. Accessed: Jun. 30, 2022.
- COSTA, A.; et al. PhotoMetrix UVC: A new smartphone-based device for digital image colorimetric analysis using PLS regression. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.32, n.3, Mar. 2021. Available from: <<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200199>>. Accessed: May, 30, 2022. doi: 10.21577/0103-5053.20200199.
- HOLKEM, A. P.; et al. A green and high throughput method for salt determination in crude oil using digital image-based colorimetry in a portable device. **Fuel**, v.289, Apr. 2021. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119941>>. Accessed: May, 30, 2022. doi: 10.1016/j.fuel.2020.119941.
- NADEEM, F. et al. Improved spectrophotometric method for fast and accurate quantitative determination of menthol in essential oils. **Food Analytical Methods**, v.15, p.1575-1580, Jan. 2022. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s12161-021-02202-1>>. Accessed: May, 30, 2022. doi: 10.1007/s12161-021-02202-1.
- SANTOS, V. B.; et al. Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruit. **Food Chemistry**, v.285, p.340-346, Jul. 2019. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.167>>. Accessed: May, 30, 2022. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.167.
- SCHLESNER, S. K., et al. Smartphone-based miniaturized, green and rapid methods for the colorimetric determination of sugar in soft drinks. **Green Analytical Chemistry**, v.1, Apr. 2022. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.greac.2022.100003>>. Accessed: May, 30, 2022. doi: 10.1016/j.greac.2022.100003.
- SINGLETON, V. L.; et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)>. Accessed: May, 30, 2022. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.

7 DISCUSSÃO GERAL

No Capítulo 1, foram apresentados os resultados obtidos acerca da técnica da CCD associada ao uso de smartphone para a determinação da composição de óleo essencial de cravo-da-índia. Avaliou-se a viabilidade da quantificação da composição do óleo essencial através do uso de imagens digitais associada a CCD. Eluentes com diferentes polaridades foram testados, bem como reveladores adequados nas análises de amostras de cravo-da-índia, comprovando a eficácia do eluente 90% hexano e 10% acetato de etila e do revelador químico ácido sulfúrico e 10% metanol. Como método físico, utilizou-se câmara de UV 254 nm. Estes resultados demonstraram-se relevantes em relação aos critérios da CCD.

Outro parâmetro otimizado foi a utilização de softwares para a quantificação dos compostos separados. Ensaiou-se o tratamento de imagens pelo aplicativo Photometrix, qTLC, ImageJ, após a revelação da placa cromatográfica, para avaliar possíveis mudanças das tonalidades das cores ao passar do tempo. Os resultados obtidos pelo Photometrix apresentaram grande variabilidade e baixa precisão. Isso caracteriza-se, pois apenas uma região no centro da mancha é usada pelo software e não a área de toda a mancha, implicando no resultado insatisfatório. Assim, pequenas variações no posicionamento da ferramenta para captura do ROI levam a variações dos resultados, especialmente para concentrações menores. Para validação da técnica, optou-se pelo Software qTLC que, diferentemente do Photometrix (que usa a intensidade de cor das manchas), emprega valores de áreas.

Outro parâmetro avaliado foi a mudança de coloração da placa cromatográfica a partir do tempo após a revelação química, sendo que o tempo de leitura que apresentou menor coeficiente de variação foi de 10 minutos para todos os padrões. Desse modo, com base em diferentes concentrações das soluções de referência de eugenol reveladas pelos métodos físicos e químico, diferentes curvas de calibração foram obtidas e usadas para a avaliação das áreas das amostras de óleos de cravo-da-índia conseguidas por destilação. Para quantificação de eugenol nas amostras de óleos essenciais, uma placa cromatográfica contendo as soluções de referência e replicatas das amostras foi usada, isto é, cada amostra avaliada tinha sua própria curva de calibração. Tal procedimento foi adotado, visando à diminuição da variabilidade dos resultados. Nesse viés, comparando-se os métodos de análises físicos e químicos, há mínimas variações nos valores de média e desvio padrão, uma vez que existem possíveis interferências como tipo de amostra e variações na aquisição da imagem realizada manualmente.

Na avaliação da cinética de extração, foi aferido apenas o constituinte majoritário do cravo-da-índia, eugenol, em quatro amostras. Observaram-se divergências de tempos na obtenção dos óleos devido às diferentes marcas utilizadas, oriundas de qualidades variáveis.

Na tentativa de elucidar a fonte da variação dos resultados, realizou-se um estudo quanto à introdução de amostras (teste do número de gotas) para o padrão de eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno. Evidenciou-se que, qualitativamente, o aumento do número de gotas reduz os desvios das medidas, ou seja, a aplicação de quatro gotas na placa cromatográfica gerou padronização das cores e, quantitativamente, um menor desvio padrão, por ambos os softwares utilizados, evidenciando uniformidade e homogeneidade de área.

Para comprovação do método alternativo descrito, os resultados foram comparados por análise GC, o que apresentou variabilidade entre 58% e 147% devido ausência de padronização da introdução de amostras realizadas nos experimentos iniciais. Posteriormente, as análises foram refeitas e, similarmente, houve variabilidade e baixa precisão. Por conseguinte, novo ensaio foi desenvolvido, na tentativa de verificação de outro composto significativo presente no cravo-da-índia, além do eugenol, cariofileno e óxido de cariofileno, o éster aromático, conhecido como acetato de eugenila. A partir da análise realizada, não foi identificada a presença do éster na placa cromatográfica.

Conforme demonstrado, constatou-se uma grande variação nos resultados, com problemas na repetitividade dos ensaios, possivelmente causada pela variação na introdução das amostras nas placas cromatográficas. Assim, buscou-se uma nova proposta de quantificação de eugenol no óleo essencial de cravo-da índia. O novo ensaio foi descrito no Capítulo 2, em forma de artigo científico.

Avaliando pesquisas literárias, muitos estudos de quantificação usando imagens digitais com Colorimetria foram evidenciados. Além disso, destaca-se o procedimento descrito por Schlesner (2022), que propôs métodos miniaturizados, verdes e rápidos, baseados em smartphones, para a determinação Colorimétrica do teor total de açúcar em refrigerantes. Nesse sentido, utilizou-se a mesma câmara impressa em 3D equipada com USB acoplada ao smartphone para aquisição das imagens. O aplicativo Photometrix UVC, disponível gratuitamente, foi usado para controlar o dispositivo e processar imagens.

Nesse horizonte, dado que o óleo de cravo-da-índia apresenta presença de polifenóis, e realçando que o método espectrofotométrico comumente utilizado para determinar o teor de polifenóis totais (CFT) é o Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), realizaram-se ensaios nesta perspectiva. Atualmente, o ensaio de Folin-Ciocalteu é um dos mais aceitos e utilizados para a determinação de compostos fenólicos

totais, que normalmente pode ser relacionado com o potencial antioxidante de uma amostra, e que emprega medições com o uso da Espectrofotometria na região do visível (KARAKAYA, 2004).

Como comentado, para a determinação de eugenol em óleo de cravo-da-índia foi utilizado um dispositivo operado com smartphone para captura e processamento de imagens, semelhante ao usado por Schlesner (2022) Parâmetros operacionais no método baseado em smartphone foram avaliados. Quanto ao tempo de reação, 5 minutos com aquecimento de 50°C forneceram resultados concordantes com o método padrão (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) que, tradicionalmente, emprega-se por 120 minutos sem aquecimento. A iluminação foi avaliada em diferentes intensidades, a intensidade de 75 lux foi escolhida para os experimentos subsequentes.

Os modelos de regressão foram desenvolvidos com 24 amostras para calibração. Os resultados mais adequados quanto aos erros de calibração (RMSEC) e validação cruzada (RMSECV) foram obtidos com três fatores, apresentando valores inferiores a 0,011 e 0,033 mg/mL, respectivamente. Obteve-se uma correlação adequada entre os erros dos valores medidos e os valores previstos para o teor de eugenol no desenvolvimento do modelo de calibração (soluções de referência de 10 a 110 µg/ml).

O aplicativo livre Photometrix UVC foi usado para a calibração por regressão de mínimos quadrados parciais com valores adequados (R^2 maior que 0.99) e não foram identificadas diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) entre os valores medidos e previstos. A exatidão do método proposto foi comparada com métodos tradicionais, tais como CG e Espectrofotometria, sem diferenças significativas (teste t de Student ($P > 0,05$)) e com concordâncias entre 97% e 101%. O método com smartphone permitiu a avaliação de várias amostras em poucos minutos, com etapas de análise simples e com fácil interpretação dos resultados. A escala miniaturizada possibilitou o uso de pequenas quantidades de reagentes e mínima geração de resíduos.

Portanto, usando um dispositivo de baixo custo, o método proposto pôde ser considerado útil para análise portátil de campo. A miniaturização e a baixa quantidade de reagentes (e resíduos gerados) foram características relevantes para considerar o método ecologicamente correto, versátil e robusto. Além disso, foram necessárias apenas etapas simples de preparo da amostra, e todo o tratamento dos dados feitos no smartphone, o que oportuniza a utilização do método por analistas não especializados.

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho, apresentaram-se duas metodologias baseadas na utilização de imagens digitais com smartphone para quantificação de óleo essencial de cravo-da-índia. Uma técnica aplicando a CCD e outra aplicando a Colorimetria. Para a CCD, um sistema portátil foi projetado para aquisição das imagens, alicerçado no uso de smartphone para a coleta das imagens e o processamento dela ocorreu com o software qTLC, devido a sua maior precisão. Diversas condições experimentais foram avaliadas, como a introdução das amostras, separação, revelação dos compostos, influência da luminosidade na aquisição das imagens, efetividade e comparação do uso de diferentes softwares para seu processamento, porém, os resultados não compactuaram aos da CG, método tradicional de análise. Assim, esta técnica não se mostrou viável em função da dificuldade de exatidão na reprodutibilidade dos resultados.

Por outro lado, a análise Colorimétrica com utilização de smartphone para coleta das imagens pode ser usada no desenvolvimento de métodos de investigação simples, rápidos e de baixo custo para a determinação de constituintes presentes em óleos essenciais, com auxílio do aplicativo Photometrix. Nesse sistema, foram considerados todos os elementos necessários para garantir o padrão de qualidade das imagens registradas que, satisfatoriamente, possibilitaram a extração das informações das cores das amostras. Os resultados obtidos pela utilização do aplicativo Photometrix no smartphone foram comparados aos do espectrofotômetro e CG, com excelentes concordâncias.

O método de análise via aplicativo Photometrix em smartphone permitiu a determinação Colorimétrica do eugenol em óleos essenciais de cravo-da-índia de uso acessível e prático. É importante mencionar que as etapas analíticas podem ser realizadas em poucos minutos, com interpretação direta dos dados por meio do aplicativo. Ademais, nenhuma instalação de laboratório e equipamentos especializados foram necessários, propiciando a portabilidade na avaliação do óleo essencial de cravo-da-índia em locais de difícil acesso. A metodologia demonstrou-se segura e prática. Dessa maneira, este estudo apresentou uma inovação significativa, de baixo custo, que viabiliza e simplifica análises básicas laboratoriais relacionadas à quantificação de compostos em óleo essencial de cravo-da-índia.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, E.S.; SALIBA, W.A.; MILAGRES, B.G. Montagem de câmara com lâmpada de ultravioleta de baixo custo. **Revista Química Nova**. São Paulo/SP, v. 28, n 5, out. 2005.

AMELIA, B.; *et al.* GC-MS analysis of clove (*Syzygium aromaticum*) bud essential oil from Java and Manado. **AIP Conference Proceedings**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.4991186>. Acesso em: 10 jul. 2017.

AZEEM, S.M.A.; MADBOULY, M.D.; EL-SHAHATD, M.F. Determination of Nitrite in Processed Meat Using Digital Image Method and Powdered Reagent. **Journal of Food Composition and Analysis**, Reino Unido, v. 81, p. 28-36, ago. 2019.

AZEVEDO, E.; LETA, F.R; CONCI, A. **Computação gráfica: teoria e prática**. 2. ed. Rio de Janeiro/RJ: Editora Elsevier, 2008.

BACCAN, A.J.C.; GODINHO, O.E.S.; BARONE, J.S. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. 3. ed. São Paulo/SP: Editora Edgard Blücher, 2005.

BALLESTEROS, J.I.; CALEJA-BALLESTEROS, H.J.R.; VILHENA, M.C. Digital image-based method for iron detection using green tea (*Camellia sinensis*) extract as natural colorimetric reagent. **Microchemical Journal**. Valência/Espanha, v. 160, parte A, jan. 2021.

BEHRAVAN, J.; *et al.* Evaluation of Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Zataria multiflora*, *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* by a Thin Layer Chromatography Bioautography Method. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. Índia, v. 10, n. 3, p. 259-264, 2007.

BIZZO, Humberto Rb,*, e Claudia M. Rezende o mercado de óleos essenciais no brasil e no mundo na última década a Embrapa Agroindústria de Alimentos, *Quim. Nova*, Vol. 45, No. 8, 949-958, 2022 <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170889> *e-mail: humberto.bizzo@embrapa.br

BÖCK, F.C.; *et al.* PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones. **Journal of Chemometrics**. Reino Unido, v. 34, n. 12, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cem.3251>. Acesso em: 30 maio 2022.

BOTELHO. A.B.; ARAÚJO, R.M. Análise cromatográfica do óleo essencial extraído da canela comercial. **Revista Científica Multidisciplinar**. Jundiaí/SP, v. 3, n. 6, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.47820/recima21.v3i6.1511>. Acesso em: 12 maio 2022.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. v. 2. Brasília/DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2005.

COLLINS, C.H.; *et al.* **Introdução a métodos cromatográficos**, 6. ed. Campinas/SP: Editora da Unicamp, 1995.

CORDEIRO, L.D.; VALDERRAMA, P. Digital images and multivariate calibration in the determination of rheological and quality parameters of wheat flour. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**. Campinas/SP, v. 8, n. 32, p. 62-77, 2021. Disponível em: [10.30744/brjac.2179-3425.AR-09-2021](https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.AR-09-2021). Acesso em: 30 maio 2022.

COSTA, A.; *et al.* PhotoMetrix UVC: A New Smartphone-Based Device for Digital Image Colorimetric Analysis Using PLS Regression. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas/SP, v. 32, n. 3, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200199>. Acesso em: 30 maio 2022.

DAMASCENO, D.; *et al.* Análise Multivariada de imagens na química: um experiment para determinação do pH de águas potáveis. **Revista Química Nova**. São Paulo/SP, v. 38, n. 6, jul. 2015.

ELICIERI, K.W.; *et al.* Biological imaging software tools. **Nature Methods**. Nova Iorque, v. 9, n. 7, p. 697-710, 2012.

FAN, Y.; *et al.* Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, Perugia/Itália, v. 171, n. 108829, 2021.

FHIONNLAOICH, S.I.; *et al.* Toolkit to Quantify Target Compounds in Thin-layer Chromatography Experiments Niamh Mac. **Journal Chemical Education**. Washington/DC, v. 95, n. 12, p. 2191-2196, 2018.

FILGUEIRAS, M.F.; JESUS, P.C.; BORGES, E.M. Quantification of Nitrite in Food and Water Samples Using the Griess Assay and Digital Images Acquired Using a Desktop Scanne. **Journal of Chemical Education**, Washington/DC, v. 98, n. 10, p. 3303-3311, set. 2021.

FRANÇA, V.F. **Aplicação de imagens digitais e técnicas quimiométricas para detecção de adulteração em mel**. 2020, 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química). Universidade Federal da Paraíba, Areia/PR, 2020.

GENOVESE, M.I.; *et al.* Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo/SP, v. 39, supl. 3, p. 167-169, 2003.

GOMES, P.R.B.; *et al.* Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciências Farmacêuticas**. Bogotá, v. 47, n. 1, jan./abr. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v47n1.70657>. Acesso em: 30 maio 2022.

GOTMARE, S.; TAMBE, E. Gc-fid method development and method validation of eugenol in clove oil extracted by hydrodistillation. **International Journal of Advanced Research**, maio, 2021.

HASSAN, S.; *et al.* Controle de qualidade do açafrão e avaliação do potencial de adulteração por meio de cromatografia em camada delgada-análise de imagens e métodos quimiométricos. **Revista Controle Alimentar**, São Paulo/SP, v. 90, p. 48-57, ago. 2018.

HAWRYŁ, M.R.Ś.; *et al.* Micro Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography and chemometric analysis of essential oils from selected *Mentha* species and its application in herbal fingerprinting. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. País de Gales, v. 38, n. 20, 2015.

HELPER, G.A. Photometrix: an application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. **Revista da Sociedade Brasileira de Química**. São Paulo/SP, v. 28, fev. 2017.

HOJEONG, Y; *et al.* Caracterização da autenticidade do medicamento usando imagem de cromatografia de camada fina com um telefone celular. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Geórgia, v. 125, p. 85-93, jun. 2016.

HOLKEM, A.P.; *et al.* A green and high throughput method for salt determination in crude oil using digital image-based colorimetry in a portable device. **Journal Fuel**, v. 289, Abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119941>. Acesso em: 30 maio 2022.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington/DC, v. 53, p. 1841-1856, mar. 2005.

IKAWA, M.; *et al.* Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington/DC, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

JESIONEK, W.E.G.; *et al.* Thin-layer chromatography — Direct bioautography for the screening of antimicrobial properties of plant extracts. **Journal of Planar Chromatography**, Budapeste, Hungria, v. 26, n. 2, abr. 2013.

JONES, H.G.; VAUGHAN, R.A. **Remote sensing of vegetation: Principles, techniques, and applications**. Oxford: University Press, 2010.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition Latest Journal's**, Edimburgo/Escócia, v. 44, p. 453- 464, 2004.

KERR, E; WEST, C.; HARTWELL, S.K. Quantitative TLC-Image Analysis of Urinary Creatinine Using Iodine Staining and RGB Values. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 4, p. 639-46, abr. 2016. Disponível em: <https://experts.illinois.edu/en/publications/characterization-of-drug-authenticity-using-thin-layer-chromatogr>. Acesso em: 10 ago. 2020.

KILIC, G.A.; *et al.* Single-Image-Referenced Colorimetric Water Quality Detection Using a Smartphone Volkan. **Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 5, p. 5531-5536, maio, 2021.

KONG, L.; *et al.* A novel smartphone-based CD-spectrometer for high sensitive and cost-effective colorimetric detection of ascorbic acid. **Analytica Chimica Acta**. Holanda, v. 1093, p. 150-159, jan. 2020.

LOURENÇO, E.; *et al.* Determinação do Teor de Ferro Utilizando o Aplicativo PhotoMetrix PRO®: a Tecnologia a favor do Ensino de Química. **Revista Virtual de Química**. Niterói/RJ, v. 13, n. 1, p. 192-206, 2021.

LUMBARQUE, E.; *et al.* Total dissolved iron and hydrogen peroxide determination using the PhotoMetrixPRO application: A portable colorimetric analysis tool for controlling important conditions in the solar photo-Fenton process. **Journal of Hazardous Materials**. Missouri/EUA, v. 378, n. 120740, out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.06.017>. Acesso em: 30 maio 2022.

MARQUES, J.A.; BORGES, C.P.F. **Práticas de Química Orgânica**. Campinas/SP: Editora Átomo, 2007.

MASAWAT, P.; HARFIELD, A.; NAMWONG, A. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk. **Food Chemistry**, Norwich/Reino Unido, v. 184, p. 23-29, 2015

MILANEZ, K.D.T.M. **Classificação de óleos vegetais comestíveis usando imagens digitais e técnicas de reconhecimento de padrões**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PA, 2013.

MORAES, S.L.; REZENDE, M.O.O. Análise de resíduos de pesticidas em tomates por cromatografia em camada delgada. **Revista Química Nova**. São Paulo/SP, v. 25, n. 2, p. 196-202, 2002.

NADEEM, F.; *et al.* Improved Spectrophotometric Method for Fast and Accurate Quantitative Determination of Menthol in Essential Oils. **Food Analytical Methods**, Espanha, v. 15, p. 1575-1580, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02202-1>. Acesso em: 30 maio 2022.

OLECH, M., *et al.* Investigation of antiradical activity of plant material by thin-layer chromatography with image processing. **Food Chemistry**, Norwich/Reino Unido, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26434330/>. Acesso em: 10 out. 2020.

OLIVEIRA, L.M.A.; *et al.* An environment-friendly spot test method with digital imaging for the micro-titration of citric fruits **Talanta**. Bruxelas/Bélgica, v. 206, n. 120219, jan. 2020.

PAPPIS, M.L.; *et al.* Point-of-use Determination of Fluoride and Phosphorus in Water through a Smartphone using the PhotoMetrix® App Cristiane. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**. Campinas/SP, v. 6, n. 25, p. 2179-3425, 2019.

PASSARETTI FILHO, J. **Análise de imagens digitais para fins analíticos**: Aplicações ambientais e tecnológicas. 2015, 163f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, São Paulo/SP, 2015

PAVIA, D.; *et al.* **Química Orgânica Experimental**: Técnicas em escala pequena. 2. ed. Porto Alegre/RS: Editora Bookman, 2009.

RADÜNZ, M. **Óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, L.)**: extração, encapsulação, potencial antimicrobiano e antioxidante. 2017, 148f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, 2017.

RASBAND, W. **ImageJ documentation**, 2021. Disponível em: www.rsb.info.nih.gov. Acesso em: 13 maio 2021.

RICKER, M.D. Pixels, bits, and guis: The fundamentals of digital imagery and their application by plant pathologists **Plant Disease**. St. Paul/EUA, v. 88, n. 3, p. 228-241. 2004.

SAKAMOTO, T.; *et al.* Detecting seasonal changes in crop community structure using day and night digital images. **Photogrammetric engineering and remote sensing**, Luisiana/EUA, v. 76, n. 6, p. 713-726, 2010.

SALTOLIN, L. **Síntese enzimática do acetato de eugenila a partir do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)**. 2019. 81 f. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo/PR, 2019.

SANGSIN, S.; SRIVILAI, P.; TONGRAUNG, P. Colorimetric detection of Cr³⁺ in dietary supplements using a smartphone based on EDTA and tannic acid-modified silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. Cracóvia/Polônia, v. 246, n. 119050, fev. 2021.

SANTOS, V.B.; *et al.* Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruit. **Food Chemistry**, Norwich/Reino Unido, v. 285, p. 340-346, jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.167>. Acesso em: 30 maio 2022.

SCHLESNER, S.K.; *et al.* Smartphone-based miniaturized, green, and rapid methods for the colorimetric determination of sugar in soft drinks. **Green Analytical Chemistry**, Ontário/Canadá, v. 1, abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.greeac.2022.100003>. Acesso em: 30 maio 2022.

SHAHVAR, A.; SHAMSAEI, D.; SARAJI, M. A portable smartphone-based colorimetric sensor for rapid determination of water content in etanol. **Measurement**, Perugia/Itália, v. 150, n. 107068, jan. 2020.

SILVA NETO, G. F.; FONSECA, A.; BRAGA, J.W.B. Classificação De Águas Minerais Baseada Em Imagens Digitais Obtidas Por Smartphones. **Revista Química Nova**. São Paulo/SP, v. 39, n. 7, ago. 2016.

SILVA, É. **Estudos dos óleos essenciais extraídos de resinas de espécies Protium spp.** 2006, 159f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Química Analítica). Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2006.

SILVA, R.S.; RIBEIRO, C.M.R.; BOGES, M.N. Óleo Essencial de Limão no Ensino da Cromatografia em Camada Delgada. **Revista Química Nova**. São Paulo/SP, v. 32, n. 8, p. 2234-2237, 2009.

Singleton V. & Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144–158.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1). Acesso em: 30 maio 2022.

SOPONAR, F.A.C. Quantitative determination of some food dyes using digital processing of images obtained by thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography B**. Iowa/EUA, v. 1188, n. 2, p. 295-300, abr. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26434330/>. Acesso em: 15 nov. 2020.

SRITHARAN, R.; JACOB, V.J.; BALASUBRAMANIAM, S. Thin Layer Chromatographic Analysis of Essential Oils from Cinnamomum Species. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 2, n. 2, p. 49-63, out. 1994.

TEIXEIRA, J.; *et al.* A química verde na análise farmacêutica: desenvolvimento de um método para quantificação de nitazoxanida em formas farmacêuticas utilizando imagens digitais. In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIPAMPA: Pesquisa e Inovação. 13. 2021. **Anais:[...]**, [S.l.], v. 13, n. 3, 2021.

WANG, H.; *et al.* Quantitative Detection of Nitrite in Food Samples Based on Digital Image Colourimetry by Smartphone. **Chemistry Select**, v. 5, n. 32, p. 9952-9956, ago. 2020. Disponível em: doi.org/10.1002/slct.202002406. acesso em: 10 nov. 2020.

WOOD, R. **Processamento de Imagens Digitais**. 1. ed. São Paulo/SP: Editora Blucher, 2000.

ZHANG, L.; *et al.* Colorimetric detection for uranyl ions in water using vinylphosphonic acid functionalized gold nanoparticles based on smartphone. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. Cracóvia/Polônia, v. 15, n. 269, mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120748>. Acesso em: 30 maio 2022.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: TABELA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| TABELA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | | | | | |
|---|---|----------------------------------|-------------------------------|--|---|
| AMOSTRAS | ANALITOS | TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO | SISTEMA DE CAPTURA DE IMAGENS | SOFTWARE | CARACTERÍSTICA DO SOFTWARE |
| Alimentos | Corantes alimentares | <i>Planar chromatography</i> | Digitalizadas | MS Excel 97 e StatSoft Statistica 5.0. | Software para análise estatística. |
| Açafrão | Isolamento de Curcumina no açafrão | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | ImageJ | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Alimentos e Ervas | Determinação de composição de fosfolipídios | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | NIH imagen | Programa de processamento de imagens de domínio público |
| Aminoácidos | leucina (Leu) e isoleucina (Ile). | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | MIA-TLC | Programa capaz de produzir imagens bidimensionais e tridimensionais cromatogramas das soluções. A capacidade do método MIA-TLC proposto para determinação simultânea dos componentes de co-eluição. |
| Amostras Ambientais hidrocarbonetos aromáticos policíclicos | Antraceno, fluoranteno, pireno, benzo fluoranteno , benzopireno e perileno. | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | Não identificado | |

| | | | | | |
|--|---|----------------------------------|---------------|---|--|
| Amostras ilícitas de drogas | Fenacetina, benzocaína, levamisol | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | MATLAB juntamente com Software caseiro desenvolvido pelos autores(não identificado) | As imagens TLC de amostras de cocaína e adulterantes foram carregadas no MATLAB 165 R2012b (MathWorks, EUA) e o histograma de cores RGB (vermelho-verde-azul). Cada ponto no TLC foi adquirido usando um software caseiro desenvolvido por nós. |
| Análise da Reação entre morfina e permanganato de potássio ácido | Morfina | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | Rang Shenan | Aplicativo local (Rang Shenan) para Android. Depois de abrir a imagem salva, o software medido s intensidades de cores vermelho, verde e azul da área cortada. Os dados foram transferidos para uma planilha do Excel 2016. |
| Árvores de folha | Amostras de resinas vegetais | HPTLC | Digitalizadas | ImageJ | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Batatas doces | Antocianinas e derivados do ácido cafeoilquinóico | HPTLC | Digitalizadas | XLStat | É um complemento de análise de dados Excel poderoso e flexível que permite aos usuários analisar, personalizar e compartilhar resultados dentro do Microsoft Excel. |
| Calêndula | ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina nos extratos vegetais | <i>thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | VideoScan Digital Image Evaluation | O programa é rápido e fácil de usar. Recursos flexíveis, como comparação de perfis de faixas de vários cromatogramas, avaliação de faixas com distância variável, faixas distorcidas. Os cromatogramas podem |

| | | | | | |
|---|--|----------------------------------|---------------|---|--|
| | | | | | ser avaliados a qualquer momento, mesmo anos após a captura. A avaliação quantitativa (opção) pode ser realizada via área do pico e/ou altura do pico. |
| Catecolamina e antioxidantes de referência. | Monitoramento de tempo da atividade de eliminação de radicais. | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | ImageDecipher TLC | Software de análise de imagem para detecção e avaliação quantitativa de compostos fluorescentes, com boa linearidade e sensibilidade. |
| Compostos orgânicos sem cromóforos | Reagentes de coloração | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | JustTLC | JustTLC é a nova geração de software de análise de TLC que oferece a possibilidade de executar experimentos de química usando apenas placas de TLC. Fornece a precisão da medição adequada para triagem de alto rendimento ou investigações analíticas e resultados confiáveis em minutos. |
| Comprimidos farmacêuticos | Catecol (carbidopa e levodopa) | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | Imagedecipher-tlc, videodensitômetro sorbfil tlc e just tlc | JustTLC é a nova geração de software de análise de TLC que oferece a possibilidade de executar experimentos de química usando apenas placas de TLC. Fornece a precisão da medição adequada para triagem de alto rendimento ou investigações analíticas e resultados confiáveis em minutos. |
| Comprimidos farmacêuticos | Acetaminofeno(ACM), cafeína (CAF) e ácido | <i>Thin-layer chromatography</i> | Webcam | VisualStudio 2013 | Software livre permite a criação do próprio aplicativo para análise. |

| | | | | | |
|---|---|----------------------------------|----------------|---|---|
| | acetilsalicílico (ASA) | | | | |
| Corantes | corante Sudan IV | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | qTLC | O qTLC inclui ativos importantes, como código aberto, online, gratuito. |
| Corantes alimentares | Tartrazina, azorubina e amarelo do sol | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | Software Macherey-Nagel TLC Scanner | |
| Determinação de medicamentos no plasma | Fármaco Lamotrigina | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | imageJ | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Extratos aquosos de composto de lodo de esgoto | Ácidos graxos voláteis individuais | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | ImageJ | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Extratos de flores de rosas/(Rosa rugosa Thunb) | Quercetina, ácido gálico, ácido protocatecúico e Trolox | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | ImageJ | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Flores Crocus sativus,(açafão) | Marcadores do açafão e adulterantes. | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | MATLAB | Pode ser utilizado partir de qualquer navegador padrão, com acesso à Internet - basta fazer login. |
| Folhas de Bambu | Atividade antioxidante de extratos das folhas | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | ChemPattern 2 Professional Version (um tipo de impressão digital) | Processamento de impressão digital de cromatografia. |
| Fosfolipídios | Esfingomielina | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | Software TLSee® e Image J | Foi utilizado o programa ImageJ (NIMH, EUA) para processamento de cores de imagens digitais e o software TLSee® (AlfaTech, Itália) foi utilizado para análise |

| | | | | | |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|----------------|----------------------|--|
| | | | | | quantitativa de imagens digitais. |
| Matrizes agrícolas e formulações comerciais | Pesticida botânico azadirachtina | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | UVItec | O software Uvitec-1D é fácil de usar e sofisticado o suficiente para permitir otimização ultra-precisa ao capturar a imagem. Com, por exemplo, uma visualização em 3D ao vivo para configurar o tempo de exposição e controlar a saturação e garantir que todas as bandas sejam quantificáveis |
| Matrizes alimentares (arroz, trigo, milho, sorgo, amendoim e girassol) | Ergosterol e Quitina | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | Uvitec | Faz o download da imagem pela conexão de rede fácil de compartilhar. Só precisa ser instalado em uma rede local, permitindo acesso rápido e fácil à imagem já armazenada na enorme memória interna do sistema. Fornece um conjunto abrangente de ferramentas de aquisição, aprimoramento e análise de imagens. |
| Medicamentos | Paracetamol, Amodiaquina, Nevirapina | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | winCATS 1.4.3; CAMAG | A captura de dados e os cálculos obtidos das placas escaneadas foram realizados com o software gerenciador de cromatografia planar fornecido pelo instrumento (winCATS 1.4.3; CAMAG). Software de análise automatizada de imagens que determina a localização central e a densidade |

| | | | | | |
|--|---|----------------------------------|-------------------------------|--|--|
| | | | | | dos pontos escuros, podendo ser usado para determinar se um medicamento foi diluído ou substituído. |
| Medicamentos | Morfina | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | Rang Shenan | A análise da imagem foi realizada por um aplicativo local (Rang Shenan) para Android. Os dados foram transferidos para uma planilha do Excel 2016. |
| Medicamentos | Nevirapina, Amodiaquina Paracetamol | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | TLC Scanner 3; CAMAG | Permite que os usuários analisem diretamente as zonas das placas TLC e HPTLC por Espectrometria de Massa. Uma confirmação da substância pode ser obtida em menos de um minuto. |
| Medicamentos à base de Plantas Medicinais | Blumea balsamifera e Vitex negundo. | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | ImageJ | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Medicamentos farmacêuticos | Catecolaminas | HPTLC | Digitalizadas | ImageDecipher-TLC, videodensitômetro Sorbfil TLC e Just TLC) | Software de análise de imagem para detecção e avaliação quantitativa de compostos fluorescentes, com boa linearidade e sensibilidade. |
| Menta | Óleos essenciais | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | ImageJ | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Monitoramento quantitativo de reações orgânicas e estudo | Hidrólise alcalina de PB e redução de derivados de benzaldeído Hidrólise | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmara de desenvolvimento TLC | Software MIA | Programa capaz de produzir imagens bidimensionais e tridimensionais cromatogramas das soluções. A capacidade |

| | | | | | |
|---|--|----------------------------------|----------------|--------------|---|
| cinético | alcalina de PB e redução de derivados de benzaldeído | | | | do método MIA-TLC proposto para determinação simultânea dos componentes de co-eluição. |
| Pesticidas | Tiofanato de metila | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | TLSee | TLSee é um pacote de software avançado que analisa placas de Cromatografia em Camada Fina (TLC). As análises quantitativas podem ser realizadas com este software e com os recursos de aquisição de imagens de uma câmera digital ou scanner de mesa. |
| Plantas medicinais | B. balsamifera e V.een V. negundo | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | ImageJ | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Plantas medicinais | Blumea balsamifera e Vitex negundo. | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | ImageJ | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Produtos de emagrecimento à base de plantas | cloridrato de sibutramina | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | Sorbfil TLC | Destina-se à avaliação quantitativa em Cromatografia em Camada Fina (TLC). Avalia áreas pontuais nas trilhas em uma imagem de placa de TLC com a construção de um cromatograma (curva analógica). |
| Produtos farmaceuticos | Nicotinamida/ Vanilina | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | TLC Analyzer | Software de processamento de imagem gratuito |
| Produtos farmacêuticos diferentes | Paracetamol e cafeína | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | Sorbfil TLC | Destina-se à avaliação quantitativa em Cromatografia em Camada Fina (TLC). Avalia áreas pontuais nas trilhas em uma |

| | | | | | |
|---|---|----------------------------------|----------------|-------------------------------------|---|
| | | | | | imagem de placa de TLC com a construção de um cromatograma (curva analógica). |
| Própolis chinesa e de goma de álamo | Quercetina (S1), kaempferol (S2), galangina (S3) e crisina | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | Delphi Xe2 IDE | |
| Própolis de diferentes localizações geográficas no Egito. | Resíduo seco de amostras de própolis | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | ImageJ | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Sangue | Alcalóides (estricnina e brucina) | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | Image J | Software livre de domínio público, destinado a processamento de imagens |
| Soro humano | Proteínas (albumina, imunoglobulina e anidrase carbônica) | <i>Eletroforese em gel</i> | Smartphone | Photometrix | Captura e analisa imagens digitais através de modelos matemáticos univariados e multivariados. As imagens podem ser capturadas através da câmera do próprio dispositivo. O aplicativo está disponível gratuitamente na Google Play (Android) ou App Store (IOS) |
| Sucos concentrados secos. | Corantes alimentares Tartrazina, Azorubina e Sunset amarelo | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | Software Macherey-Nagel TLC Scanner | O software para digital processamento (software Macherey-Nagel TLC Scanner) [20] foi desenvolvido por Wieczorrek (Macherey-Nagel). |
| Sucos de maçã e laranja | Malatão e Fentião | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | TLSee® | O TLSee é um pacote de software avançado que analisa placas de Cromatografia em Camada Fina (TLC). As análises |

| | | | | | |
|------------------|--|----------------------------------|----------------|---|--|
| | | | | | quantitativas podem ser realizadas com este software e com os recursos de aquisição de imagens de uma câmera digital ou scanner de mesa. |
| Tintas de caneta | Pigmentos de caracterização de tintas distintas | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | Matlab | Pode ser utilizado partir de qualquer navegador padrão, com acesso à Internet - basta fazer login. |
| Urina | Creatinina urinária | <i>Thin-layer chromatography</i> | Digitalizadas | Microsoft Power Point | A placa TLC manchada foi impressada entre duas folhas de plástico transparente durante a digitalização. Os valores RGB decada ponto foi analisado usando o programa Microsoft Paint. |
| Urina humana | Metabólitos ácidos da catecolamina (incluindo ácido homovanílico, ácido vanililmandélico, ácido 3,4-di-hidroxi mandélico e ácido 3,4-di-hidroxi fenilacético | <i>Thin-layer chromatography</i> | Câmera digital | ImageDecipher-TLC, versão 2.0 (BioDit Technology) | Utilizados para a detecção e quantificação de manchas cromatográficas |
| Alimentos | Determinação de cafeína em bebidas, alimentos e medicamentos utilizando o smartphone e software para computador | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | Image J | O smartphone foi utilizado para captura das manchas nas placas de CCD |

| | | | | | |
|---------------------------------|--|----------------------------------|------------|--|--|
| | | | | | |
| Matrizes de leite em laticínios | Combinando Cromatografia de Camada Fina de alto desempenho com miniespectrômetro-sonda de fibra óptica acoplada ao smartphone para análise no local: quantificação de lactose em várias matrizes | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | Software CaryWinUV da Agilent Technologies | Este método combina o uso de HPTLC para separação de açúcares com novos dispositivos analíticos como miniespectrofotômetro com fibra ótica acoplado a um smartphone. Para medir a lactose foi utilizada uma reação colorimétrica. |
| Medicamentos | Um aplicativo de smartphone de código aberto para a avaliação quantitativa de análises cromatográficas de camada fina na triagem de qualidade de medicamentos | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | software de código aberto General Public License (GPL) | Foi projetada uma caixa de madeira produzida localmente que garante a fotografia TLC sob condições padronizadas e protegida da luz ambiente. A fotografia e a análise de imagens foram realizadas com um smartphone Android de baixo custo, usando aplicativo disponível gratuitamente como software de código aberto General Public License (GPL) |
| Acetato de medroxiprogesterona | Cromatografia quantitativa em camada delgada para a determinação de acetato de medroxiprogesterona | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | software de código aberto General Public License (GPL) | |

| | | | | | |
|--------|--|----------------------------------|------------|--|--|
| | usando um smartphone e análise de imagem de código aberto | | | | |
| Drogas | Smartphone como um detector portátil para determinação cromatográfica de camada fina de algumas drogas do trato gastrointestinal | <i>Thin-layer chromatography</i> | Smartphone | Software gratuito Color Picker versão 5.0.6 | Neste trabalho, desenvolvemos um método de TLC simples e sensível utilizando uma câmera de dispositivo acoplado a carga (CCD) de smartphone não apenas para verificar e quantificar algumas drogas do trato gastrointestinal, como cloridrato de loperamida (LOP) e bisacodil (BIS), mas também para detectar paracetamol (ACT) como um medicamento falsificado. |

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

APÊNDICE 2 – RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS TEMPOS DE LEITURA DE 0 MINUTO A 210 MINUTOS PARA A APLICAÇÃO DA AMOSTRA DE ANÁLISE PRÉVIA A1

| EUGENOL | | | | | CARIOFILENO | | | | | ÓXIDO DE CARIOFILENO | | | | |
|---------|-------|------|------|-------|-------------|-------|------|------|-------|----------------------|-------|------|-----|-------|
| TEMPO | MÉDIA | SD | RSD | RMSEP | TEMPO | MÉDIA | SD | RSD | RMSEP | TEMPO | MÉDIA | SD | RSD | RMSEP |
| 0 | 59,5 | 12,0 | 20,2 | 41,93 | 0 | 76,2 | 3,6 | 4,7 | 24,02 | 0 | 145,8 | 2,1 | 1,4 | 45,82 |
| 10 | 141,2 | 3,7 | 2,6 | 44,28 | 10 | 110,3 | 1,6 | 1,4 | 10,39 | 10 | 113,8 | 3,0 | 2,6 | 14,09 |
| 30 | 122,1 | 3,6 | 2,9 | 23,8 | 30 | 106,4 | 4,0 | 3,7 | 7,35 | 30 | 108,9 | 3,7 | 3,4 | 9,52 |
| 60 | 120,9 | 9,7 | 8,0 | 20,83 | 60 | 100,5 | 3,5 | 3,5 | 3,2 | 60 | 118,5 | 1,4 | 1,2 | 18,56 |
| 90 | 136,2 | 4,0 | 2,9 | 36,44 | 90 | 108,5 | 4,3 | 3,9 | 9,30 | 90 | 151,7 | 2,8 | 1,9 | 51,78 |
| 120 | 107,0 | 3,9 | 3,6 | 7,38 | 120 | 133,3 | 13,1 | 9,8 | 35,32 | 120 | 122,6 | 2,1 | 1,7 | 22,73 |
| 150 | 108,1 | 1,3 | 1,2 | 8,92 | 150 | 51,3 | 7,6 | 14,8 | 49,19 | 150 | 169,3 | 4,1 | 2,4 | 69,37 |
| 180 | 106,4 | 3,8 | 3,6 | 6,60 | 180 | 115,6 | 24,1 | 20,9 | 26,61 | 180 | 134,9 | 10,6 | 7,8 | 36,22 |
| 210 | 97,0 | 2,2 | 2,3 | 3,27 | 210 | 114,9 | 29,3 | 25,5 | 30,65 | 210 | 160,1 | 5,6 | 3,5 | 58,38 |

Fonte: Elaborada pela autora (2023).