

Determinação de Digestibilidade em Rações Animais Utilizando Imagens Digitais: Uma Alternativa de Baixo Custo

Determination of Digestibility in Animal Feeds Using Digital Images: A Cost-Effective Alternative

Pedro Augusto de Oliveira Morais,^{a,*} Geisiane Silva Sousa,^a Gabriela Ferreira Matos,^b Marcos Antonio Delmondes Bomfim^a

^aUniversidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências de Chapadinha, BR-222 km 4, Boa vista, CEP 65500-000, Chapadinha-MA, Brasil

^bUniversidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Instituto de Química, Laboratório de Biomicrofluídica, Av. Esperança, CEP 74690-900, Goiânia-GO, Brasil

*E-mail: morais.pedro@ufma.br

Recebido: 18 de Fevereiro de 2024

Aceito: 10 de Julho de 2024

Publicado online: 15 de Julho de 2024

Digestibility analysis is essential for the nutritional evaluation of animal feeds. However, the main methods used to determine this parameter are costly to implement as they require high-value equipment. For instance, spectrophotometry, although widely used, relies on the use of a UV-VIS spectrophotometer, which is not readily available in many laboratories. Faced with this limitation, this study presents a methodology for determining the concentration of the marker TiO₂ in fish feed and feces through digital imaging. After sulfuric digestion and the addition of hydrogen peroxide, digital images were obtained. Subsequently, the average values of the red (R), green (G), and blue (B) color channels were determined and correlated with the marker content. Using the analytical curve, the TiO₂ levels in nine feed and feces samples were determined. According to the t-test, no statistical differences were observed between the results obtained using digital images and spectrophotometric readings. Therefore, digital images can be used for the quantification of this digestibility marker at a reduced cost.

Keywords: Digital images; digestibility analysis; spectrophotometry; imageJ; animal feed.

1. Introdução

A digestibilidade é um dos parâmetros essenciais para avaliação nutricional de alimentos.¹ Geralmente, a digestibilidade é determinada por meio de marcadores internos, presentes nos alimentos, ou por marcadores externos, adicionados ao alimento.² Os marcadores externos devem ser inertes e indigeríveis, mas de fácil determinação analítica. O dióxido de titânio (TiO₂), por exemplo, atende a esses requisitos e é utilizado como marcador de digestibilidade³ em ovelhas,^{4,5} porcos,⁶ equinos⁷ e peixes.^{8,9} Primeiramente, pequenas dosagens de TiO₂ são adicionadas a ração dos animais. Após o consumo e excreção, determina-se os teores desse marcador na ração e nas fezes.³

Previamente a quantificação, as amostras devem ser digeridas utilizando ácido sulfúrico e bloco de digestão.^{3,10} Após a digestão, os teores de dióxido de titânio podem ser determinados por meio da espectrofotometria de absorção atômica,¹¹ espectrômetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)^{12,13} e a espectrofotometria UV-VIS.^{4,5,14,15} A determinação espectrofotométrica é a mais utilizada devido ao menor custo do equipamento. Neste método, após a digestão sulfúrica, adiciona-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O produto da reação entre o TiO₂ e o H₂O₂ ainda não é totalmente definido.^{16,17} Snell e Snell, (1949)¹⁸ sugerem a formação de H₄TiO₅, enquanto, Vogel *et al.* (1989)¹⁹ indicam a formação de [TiO(SO₄)₂]²⁻ ou íon similar, ou [Ti(H₂O₂)]⁴⁺. Segundo Schwarzenbach *et al.*, (1970)²⁰ a coloração do produto dessa reação pode variar de acordo com o pH. Em condições fortemente ácidas, o produto apresenta coloração alaranjada, por volta do pH 3, coloração amarelada e incolor em condições mais básicas.

Embora esses métodos sejam sensíveis e com ampla aplicabilidade, eles exigem o uso de equipamentos de alto custo, encarecendo a análise e impossibilitando a disponibilidade dessas análises para muitos laboratórios. Nessa direção, métodos mais simples e baratos devem ser incentivados. O uso de imagens digitais, por exemplo, é uma alternativa a espectrofotometria na região do visível com mesma qualidade de análise, mas com custo reduzido.^{21,22} Imagens digitais já foram utilizadas na análise de solo,^{23–27} água,^{28–33} bebidas,^{34–40} drogas,^{41–43} combustíveis,⁴³ sangue,⁴⁴ na classificação de bactérias⁴⁵ e na determinação da constante de equilíbrio.^{46,47}

Diante disso, o objetivo deste estudo é quantificar o marcador dióxido de titânio em ração e fezes de peixes para avaliação da digestibilidade por meio de imagens digitais obtidas utilizando

smartphone, um dispositivo acessível. Os resultados dessa metodologia serão comparados com a determinação espectrofotométrica.

2. Experimental

2.1. Reagentes

Ácido Sulfúrico P.A. (Quimex, Uberaba-MG), Peróxido de hidrogênio 30 %, Sulfato de potássio, Sulfato de cobre, e Dióxido de Titânio (Isofar, Duque de Caxias-RJ)

2.2. Equipamentos

O picador/triturador forrageiro de marca *Trapp* (Jaraguá do Sul, Brasil) *Trf 400 Super* foi empregado na moagem da soja e do milho. O picador de carne da marca C.A.F. Máquinas (Rio Claro, Brasil), modelo 98 STI, foi aplicado para produção dos pellets da ração. A balança analítica da marca *Shimadzu* (Quioto, Japão), modelo AUY220 foi utilizada para pesagem das amostras. O bloco digestor da marca *Quimis*[®] (Diadema, Brasil) modelo Q327M242 foi utilizado para digestão das amostras. O espectrofotômetro UV-VIS modelo 110S da marca *Bel* (Milano, Itália) foi utilizado para leitura das absorvâncias. As imagens digitais foram obtidas utilizando a câmera do smartphone Zenfone 5 da marca *Asus* (Taipei, Taiwan).

2.3. Amostras

O experimento recebeu aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), com protocolo de nº 23115.012035/2018-37, e foi conduzido no Laboratório de Nutrição e Alimentação de Organismos Aquáticos do Maranhão (LANUMA), localizado no Centro de Ciências de Chapadinha, pertencente à UFMA, no município de Chapadinha, Maranhão.

Foram utilizadas nove amostras neste estudo, sendo seis de fezes de peixes e três de rações. Inicialmente, preparou-se a ração de referência, composta por farelo de soja, milho, óleo de soja, sal, calcário calcítico, fosfato bicálcio, suplementos vitamínicos e minerais. As três amostras de ração foram compostas por 69,9% da ração de referência e, respectivamente, 30% de farinhas de vísceras, sangue e penas, com adição de 0,1% de óxido de titânio (TiO_2) como marcador indigesto.

As composições foram pesadas separadamente em uma balança semi-analítica, conforme as proporções estabelecidas, e combinadas manualmente em um misturador de ração artesanal por 10 minutos. A mistura resultante foi transferida para um recipiente e umedecida com água aquecida a 50 °C, formando uma liga. As rações foram peletizadas com um picador de carne, secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C por 24 horas, e posteriormente trituradas em

um moedor manual para carnes, resultando em pellets de aproximadamente 3 mm de diâmetro.

Foram utilizados 60 tambaquis (*Colossoma macropomum*) na fase de crescimento com peso médio de $198,15 \pm 3,11$ g. As rações foram ofertadas *ad libitum* em sete refeições diárias (08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 15:00, 16:00 e 17:00 horas). Para a coleta das fezes, os peixes foram alojados em seis incubadoras de fibra de vidro com formato cônico e capacidade volumétrica de 220 litros. Cada incubadora estava equipada com sistemas individuais de abastecimento, drenagem e aeração. Após a última refeição do dia, realizava-se a limpeza das paredes das incubadoras e a renovação completa da água. O fundo das incubadoras, revestido com lona de PVC, tinha coletores de polietileno acoplados para armazenar as fezes, protegidos contra fermentação por meio de acondicionamento em caixas térmicas com gelo. As coletas das fezes ocorriam a cada duas horas, com início às 20h e término às 6h. Após cada coleta, as fezes foram levadas para uma estufa de circulação forçada de ar a 65 °C, onde eram mantidas por 72 horas. Em seguida, as amostras eram trituradas e homogeneizadas.

2.4. Preparo da curva analítica

A curva analítica foi preparada utilizando 6 soluções de dióxido de titânio de concentração de: 0,00; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,1 g L⁻¹. Cada ponto da curva foi determinado em uma única réplica. Primeiramente, realizou-se a pesagem do TiO_2 em tubo de digestão. Em seguida, adicionou-se 2 g de mistura catalítica, formada por sulfato de potássio (K_2SO_4) e sulfato de cobre (CuSO_4) na proporção de 10:1, e 5 mL de H_2SO_4 concentrado. Realizou-se a digestão por 2 horas a 400 °C. Após o resfriamento, adicionou-se 10 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em seguida, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume utilizando água destilada. Por último, realizou-se a leitura espectrofotométrica das soluções à 410 nm utilizando cubetas de vidro de caminho óptico de 10 mm. O branco, padrão sem adição de TiO_2 , foi utilizado para zerar o equipamento.

2.5. Determinação do limite de quantificação (LQ) e do limite de detecção (LD)

A partir da curva analítica determinou-se o limite de quantificação (LQ), isto é, a menor concentração do analito (TiO_2) que pode ser quantificada e o limite de detecção (LD), a menor concentração de analito detectável, utilizando, respectivamente, as Equações 1 e 2.^{48,49}

$$\text{LQ} = 10 \cdot \frac{\sigma}{b} \quad (1)$$

$$\text{LD} = 3,3 \cdot \frac{\sigma}{b} \quad (2)$$

onde σ é o desvio padrão residual da linha de regressão e b é o coeficiente angular da curva analítica.

2.6. Determinação dos teores de TiO₂

Utilizando balança analítica, pesou-se 0,5 g das amostras em tubo de vidro com diâmetro de 2,5 cm e capacidade para 98 mL. Em seguida, adicionou-se a mistura catalítica e 5 mL de H₂SO₄ concentrado. De forma similar a curva analítica, as amostras foram digeridas por 2 horas. Após o resfriamento e adição de 10 mL de peróxido de hidrogênio, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL, completado com água destilada. Por último, realizou-se a leitura espectrofotométrica das soluções à 410 nm.

2.7. Obtenção das imagens digitais

Após a leitura espectrofotométrica, 2 mL de cada amostra e solução da curva analítica foram transferidas para uma placa Elisa de 24 poços de material transparente. O branco foi transferido para o primeiro poço, A1, e as soluções da curva analítica (0,02 a 0,1 g L⁻¹) foram transferidas para os poços A2 a A6. As nove amostras em duplicata foram transferidas para os poços B1 até D6. Após o preenchimento, a placa Elisa foi disposta em uma placa de vidro transparente de espessura de 3 mm. Em seguida, utilizando a câmera do smartphone, imagens digitais foram obtidas à uma distância de 15 cm da região inferior da placa Elisa. Essa distância foi otimizada para garantir que a imagem capturada incluísse toda a placa em uma única captura, eliminando a necessidade de múltiplas imagens para a mesma placa. As imagens foram obtidas com resolução de 72 pontos por polegada, dpi (*dots per inch*) e em formato *Joint Photographics Experts Group* (.jpeg), como ilustrado na Figura 1.

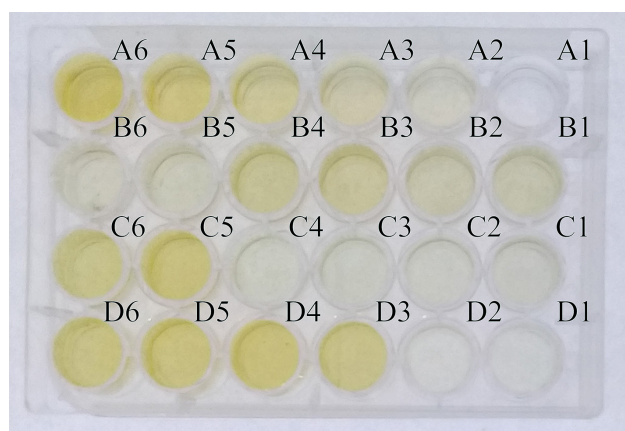


Figura 1. Imagem da placa Elisa contendo a curva analítica (A1 – A6) e as nove amostras (B1 – D6)

2.8. Determinação da concentração de TiO₂ utilizando imagens digitais

Após a coleta das imagens, o software de livre acesso ImageJ⁵⁰ foi utilizado para a extração dos valores médios de cada canal das cores vermelho, verde e azul (RGB – *Red, Green e Blue*). Por meio da função *ReadPlate*,⁵¹ um plugin desse software, todos os valores médios de cada canal de

cada poço foram obtidos simultaneamente. Apenas uma sub-região circular, localizada no centro de cada poço da placa, foi utilizada, com um diâmetro de 50 pixels. Os valores médios de cada canal de cor das imagens, da curva analítica e das amostras, foram normalizados utilizando as Equações 3, 4 e 5.

$$\bar{R} = \frac{R}{\sqrt{R^2 + G^2 + B^2}} \quad (3)$$

$$\bar{G} = \frac{G}{\sqrt{R^2 + G^2 + B^2}} \quad (4)$$

$$\bar{B} = \frac{B}{\sqrt{R^2 + G^2 + B^2}} \quad (5)$$

onde, R, G e B correspondem, respectivamente, aos valores médios dos canais de cores vermelho, verde e azul e correspondem respectivamente, aos valores médios normalizados dos canais de cores vermelho, verde e azul. A normalização garante que os valores de R, G e B estejam confinados ao intervalo de 0 a 1.

Em seguida, os valores normalizados dos três canais de cores foram convertidos para absorvância (A) utilizando as Equações 6, 7 e 8.

$$A = -\log_{10} \frac{\bar{R}}{R_0} \quad (6)$$

$$A = -\log_{10} \frac{\bar{G}}{G_0} \quad (7)$$

$$A = -\log_{10} \frac{\bar{B}}{B_0} \quad (8)$$

onde, R₀, G₀ e B₀ correspondem, respectivamente, ao valor médio normalizado dos canais vermelho, verde e azul do branco, solução sem adição de TiO₂. Todas essas operações matemáticas foram realizadas no software Microsoft Excel®. Em seguida, as absorvâncias foram correlacionadas com as concentrações de TiO₂ gerando um modelo linear conforme Equação 9.

$$y = bx + a \quad (9)$$

onde **b** corresponde ao coeficiente angular e **a** o coeficiente linear.

Por meio da curva analítica, determinou-se os teores de TiO₂ em cada uma das amostras.

3. Resultados e Discussão

A reação entre o dióxido de titânio e o peróxido de hidrogênio promove a alteração da coloração das soluções para amarelo de acordo com a concentração do TiO₂.

Embora a metodologia espectrofotométrica seja bastante empregada na determinação da digestibilidade, seu uso depende do espectrofotômetro. Alternativamente, imagens digitais também podem ser utilizadas. A Figura 2 apresenta as curvas analíticas obtidas utilizando os valores médios normalizados dos canais de cores R, G e B, assim como para as absorvâncias determinadas no espectrofotômetro à 410 nm.

As curvas analíticas foram analisadas observando o valor de R^2 assim como por meio da análise de variância (ANOVA) da regressão. Nesse teste, quanto maior o valor de F mais significativo será a relação entre as duas variáveis.⁵² Conforme a Figura 2, as médias normalizadas do canal vermelho proporcionaram o maior valor de R^2 : 0,9940. Por meio da ANOVA da regressão, o valor de F calculado para a relação entre a concentração de TiO_2 e a absorvância à 410 nm é de 325,3. Já os valores de F para as médias dos canais de cores vermelho, verde e azul foram, respectivamente, 498,2; 318,6 e 336,2. Dessa forma, devido ao maior valor de F e ao maior valor de R^2 , a curva analítica construída utilizando o canal vermelho foi utilizada para determinação das concentrações de TiO_2 nas amostras. O LD e o LQ para essa curva analítica foram, respectivamente, 0,008 e 0,025 g L^{-1} . Para a curva analítica determinada em 410 nm, os valores de LD e LQ foram de 0,009 e 0,028 g L^{-1} , respectivamente.

Os gráficos de resíduo permitem a detecção de possíveis falhas de ajuste nas curvas analíticas.⁵³ As Figuras 3a-d, apresentam os resíduos para as curvas analíticas obtidas com os valores de absorvâncias calculados a partir das médias dos canais: R, G e B, e com a leitura espectrofotométrica à 410 nm, respectivamente.

De acordo com a Figura 3, os gráficos de resíduos apresentam distribuição uniforme, homocedastidade, e ausência de amostras atípicas. Essas características indicam que as curvas analíticas estão bem ajustadas.⁵³

A Tabela 1 apresenta as concentrações médias de TiO_2 obtidas para cada amostra utilizando a curva analítica baseada no canal vermelho em comparação com o uso da curva espectrofotométrica.

De acordo com a Tabela 1, as concentrações de TiO_2 para as amostras 5 e 9 para ambos os métodos ficaram abaixo do limite de quantificação. Os resultados obtidos para a espectrofotometria em 410 nm e utilizando imagens digitais, Tabela 1, foram comparados utilizando o teste t pareado a um nível de confiança de 95%. Segundo a Tabela 1, os valores de t calculados para as nove amostras são menores que o valor de t crítico bicaudal: 12,71. Portanto, não há diferença significativa entre os valores médios determinados pelos dois métodos.

Embora com ampla aplicabilidade, a metodologia espectrofotométrica apresenta um custo relativamente alto de implementação, o que limita a disponibilidade dessa análise em laboratórios com recursos limitados. Por outro lado, o uso de imagens digitais pode viabilizar com mesma significância estatística essa mesma análise a um custo bem menor. Nesse sentido é possível democratizar essa análise a um número maior de solicitantes.

4. Conclusões

Neste estudo, imagens digitais foram utilizadas para determinação da concentração do TiO_2 utilizado como marcador de digestibilidade em ração animal. Os resultados obtidos por meio do uso de imagens foram comparados com a metodologia de maior aplicabilidade, a espectrofotométrica. Segundo o teste-t, não foram observadas diferenças estatísticas a um nível de confiança de 95% entre os dois métodos. O uso de imagens permite uma diminuição dos custos da análise devido a substituição da

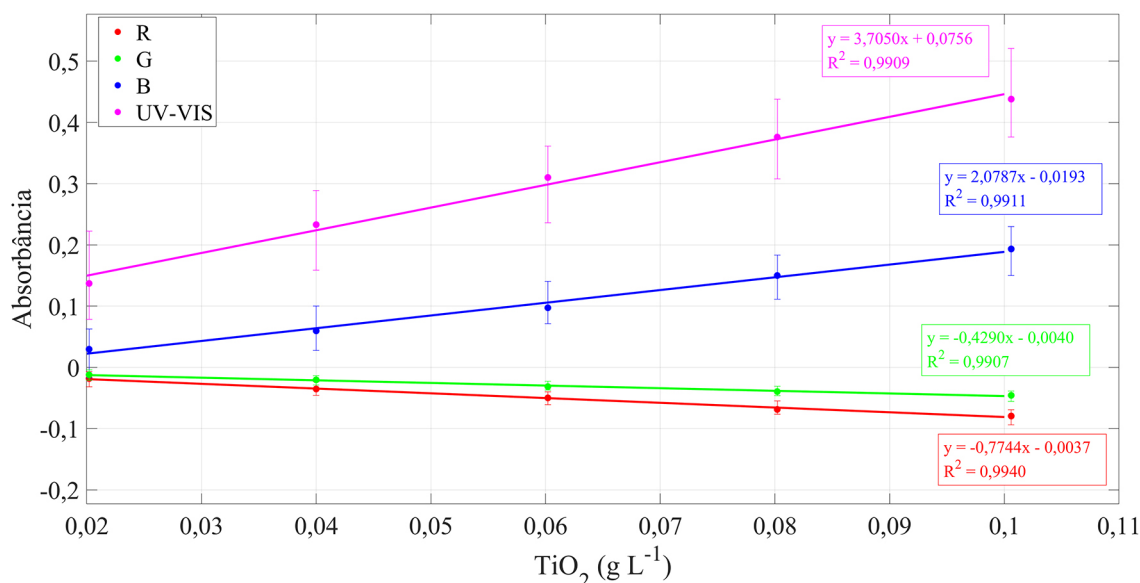


Figura 2. Curvas analíticas obtidas com a leitura espectrofotométrica à 410 nm e com os valores de absorvâncias calculados a partir das médias dos canais: R, G e B

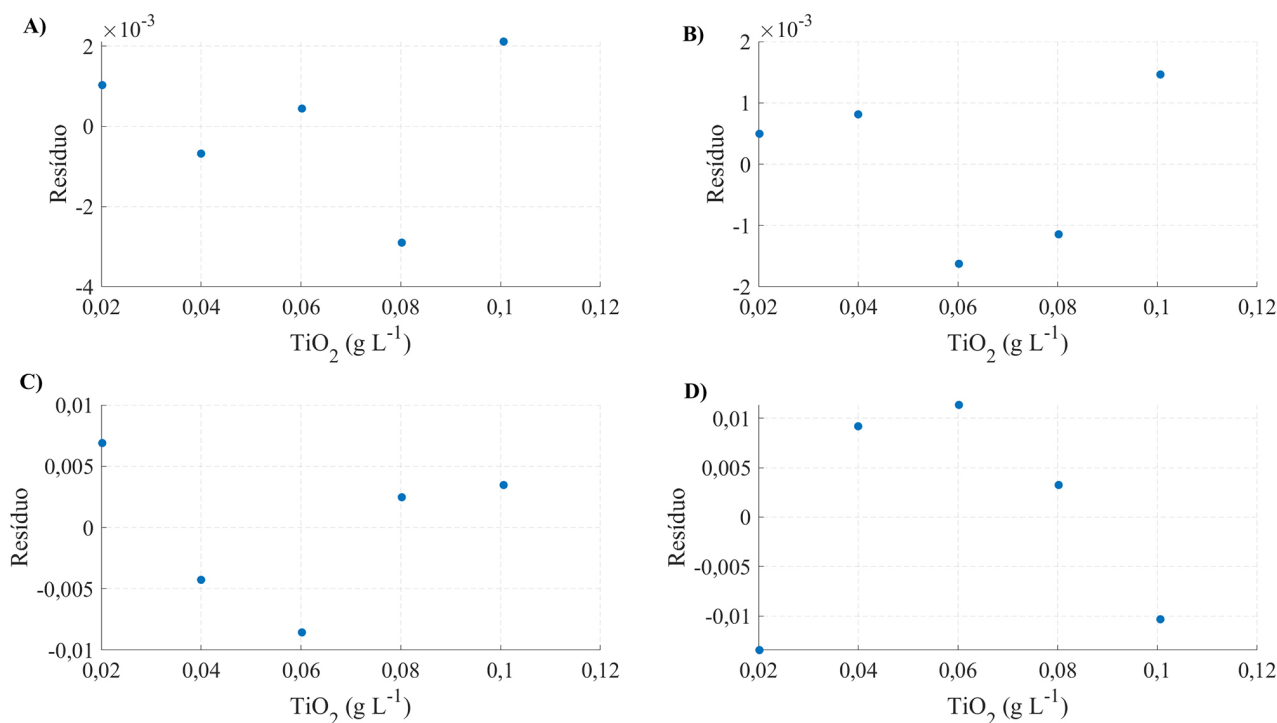


Figura 3. Gráficos de resíduos para as curvas analíticas obtidas com valores de absorvância: A) a partir da média do canal R; B) a partir da média do canal G; C) a partir da média do canal B; e D) a partir da leitura espectrofotométrica a 410 nm

Tabela 1. Concentração de TiO_2 (g L^{-1}) determinadas por meio da espectrofotometria em 410 nm e por meio da absorvância calculada a partir do canal vermelho.

Amostra	$[\text{TiO}_2]$ (g L^{-1}) Espectrofotometria 410 nm	$[\text{TiO}_2]$ (g L^{-1}) Canal R	t-calculado
1	< LQ	$0,027 \pm 1,61 \times 10^{-5}$	-
2	$0,056 \pm 3,49 \times 10^{-6}$	$0,074 \pm 3,50 \times 10^{-5}$	3,29
3	$0,033 \pm 3,21 \times 10^{-6}$	$0,049 \pm 5,54 \times 10^{-5}$	3,89
4	$0,074 \pm 1,51 \times 10^{-4}$	$0,088 \pm 7,70 \times 10^{-5}$	0,95
5	< LQ	< LQ	-
6	< LQ	$0,027 \pm 2,10 \times 10^{-5}$	-
7	$0,078 \pm 2,50 \times 10^{-5}$	$0,091 \pm 3,64 \times 10^{-8}$	3,58
8	$0,079 \pm 1,08 \times 10^{-4}$	$0,097 \pm 1,10 \times 10^{-4}$	1,16
9	< LQ	< LQ	-

leitura espectrofotométrica que depende de um dispositivo caro e pouco acessível a muitos laboratórios e usuários.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (código de financiamento 001) pelo apoio financeiro e a Fundação de Amparo à Pesquisa ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - MA (FAPEMA) pela concessão de bolsa.

Referências Bibliográficas

- Silva, S. S. de; Anderson, T. A.; *Fish nutrition in aquaculture*, Chapman & Hall: London, 1994.
- Andriquetto, J. M.; *Nutrição animal: bases e fundamentos*, Nobel: São Paulo, 2002.
- Titgemeyer, E. C.; Armendariz, C. K.; Bindel, D. J.; Greenwood, R. H.; Löest, C. A.; Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science* **2001**, 79, 1059. [Crossref]
- Myers, W. D.; Ludden, P. A.; Nayigihugu, V.; Hess, B. W.; Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal Science* **2004**, 82, 179. [Crossref]
- Peres, M. T. P.; Batista, R.; Twardowski, T. de S.; Ribeiro Filho, H. M. N.; Monteiro, A. L. G.; Titanium dioxide (TiO_2) as a marker to estimate fecal output in sheep. *Ciência Rural* **2019**, 49, e20190190. [Crossref]
- Jagger, S.; Wiseman, J.; Cole, D. J. A.; Craigon, J.; Evaluation of inert markers for the determination of ileal and faecal apparent

- digestibility values in the pig. *British Journal of Nutrition* **1992**, *68*, 729. [[Crossref](#)]
7. Schaafstra, F. J. W. C.; van Doorn, D. A.; Schonewille, J. T.; Roelfsema, E.; Westermann, C. M.; Dansen, O.; Jacobs, M.; Lee, J.-Y.; Spronck, E. A.; Blok, M. C.; Hendriks, W. H.; Effect of exercise on apparent total tract digestibility of nutrients and faecal recovery of ADL and TiO₂ in ponies. *Animal* **2018**, *12*, 2505. [[Crossref](#)]
 8. Weatherup, R. N.; McCracken, K. J.; Comparison of estimates of digestibility of two diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbium), using two markers and two methods of faeces collection. *Aquaculture Research* **1998**, *29*, 527. [[Crossref](#)]
 9. Lied, E.; Julshamn, K.; Braekkan, O. R.; Determination of Protein Digestibility in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) with Internal and External Indicators. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **1982**, *39*, 854. [[Crossref](#)]
 10. FDA; Summary of color additives for use in the United States in foods, drugs, cosmetics, and medical devices. *Silver Spring, Maryland: US Department of Health and Human Services* **2017**. [[Link](#)]
 11. Kavanagh, S.; Lynch, P. B.; O'Mara, F.; Caffrey, P. J.; A comparison of total collection and marker technique for the measurement of apparent digestibility of diets for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology* **2001**, *89*, 49. [[Crossref](#)]
 12. Silva S, J. C.; Correa L, G. A.; Mayorga M, O. L.; Duran C, E. N.; Portilla P, D.; Diaz T, F. A.; Granja-Salcedo, Y. T.; Valencia E, D. M.; Effect of marker dosage frequency and spot fecal sampling frequency in the prediction accuracy of fecal output using chromic oxide and titanium dioxide in grazing BON steers. *Tropical Animal Health and Production* **2021**, *53*, 448. [[Crossref](#)]
 13. Santos, E. J. Dos; Santos, M. P. Dos; Herrmann, A. B.; Sturgeon, R. E.; Rapid determination of Ti in TiO₂ by ICP OES. *Analytical Methods* **2016**, *8*, 6463. [[Crossref](#)]
 14. Schaafstra, F. J. W. C.; van Doorn, D. A.; Schonewille, J. T.; van Riet, M. M. J.; Visser, P.; Blok, M. C.; Hendriks, W. H.; Evaluation of methodological aspects of digestibility measurements in ponies fed different haylage to concentrate ratios. *Animal* **2017**, *11*, 1922. [[Crossref](#)]
 15. Schaafstra, F. J. W. C.; van Doorn, D. A.; Schonewille, J. T.; van den Boom, R.; Verschuur, M.; Blok, M. C.; Hendriks, W. H.; Evaluation of titanium dioxide and chromic oxide as digestibility markers in ponies fed alfalfa hay in relation to marker dosing frequency. *Animal* **2019**, *13*, 702. [[Crossref](#)]
 16. Short, F. J.; Gorton, P.; Wiseman, J.; Boorman, K. N.; Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Animal feed science and technology* **1996**, *59*, 215. [[Crossref](#)]
 17. Véber, M.; Csányi, L. J.; Study of the formation of the peroxotitanium (IV) complex. **1977**. [[Link](#)]
 18. Snell, F. D.; Snell, C. T.; Em *Colorimetric Methods of Analysis*; 3a. ed, D. Van Nostrand Co: Nova York, 1949.
 19. Vogel, A. I.; Jeffery, G. H.; *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis* Wiley: Nova York, 1989.
 20. Schwarzenbach, G.; Muehlebach, J.; Mueller, K.; Peroxo complexes of titanium. *Inorganic Chemistry* **1970**, *9*, 2381. [[Crossref](#)]
 21. Christodouleas, D. C.; Nemiroski, A.; Kumar, A. A.; Whitesides, G. M.; Broadly Available Imaging Devices Enable High-Quality Low-Cost Photometry. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 9170. [[Crossref](#)]
 22. Capitán-Vallvey, L. F.; López-Ruiz, N.; Martínez-Olmos, A.; Erenas, M. M.; Palma, A. J.; Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *899*, 23. [[Crossref](#)]
 23. Morais, P. A. O.; Souza, D. M.; Carvalho, M. T. M.; Madari, B. E.; Oliveira, A. E.; Predicting soil texture using image analysis. *Microchemical Journal* **2019**, *146*, 455. [[Crossref](#)]
 24. Morais, P. A. O.; Souza, D. M.; Madari, B. E.; Oliveira, A. E.; Avaliando a Fertilidade do Solo com Imagens Digitais. *Revista Processos Químicos* **2020**, *14*, 9. [[Crossref](#)]
 25. Morais, P. A. O.; Souza, D. M.; Madari, B. E.; Oliveira, A. E.; A computer-assisted soil texture analysis using digitally scanned images. *Computers and Electronics in Agriculture* **2020**, *174*, 105435. [[Crossref](#)]
 26. Morais, P. A. O.; Souza, D. M.; Madari, B. E.; Multivariate analysis of images in spectrophotometric methods: Quantification of soil organic matter. *European Journal of Chemistry* **2021**, *12*, 377. [[Crossref](#)]
 27. Oliveira, L. F.; Canevari, N. T.; Jesus, A. M. D.; Pereira-Filho, E. R.; Use of digital images and principal component analysis for the identification of Cr (VI) levels in soil samples. *Revista Virtual de Química* **2013**, *5*, 169. [[Crossref](#)]
 28. Sumriddetchkajorn, S.; Chaitavon, K.; Intaravanne, Y.; Mobile-platform based colorimeter for monitoring chlorine concentration in water. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2014**, *191*, 561. [[Crossref](#)]
 29. Damasceno, D.; Toledo, T. G.; Godinho, M. S.; Silva, C. P.; Oliveira, S. B.; Oliveira, A. E.; Análise multivariada de imagens na química: Um experimento para determinação do pH de águas potáveis. *Química Nova* **2015**, *38*, 836. [[Crossref](#)]
 30. Damasceno, D.; Toledo, T. G.; Soares, A. S.; Oliveira, S. B.; Oliveira, A. E.; CompVis: a novel method for drinking water alkalinity and total hardness analyses. *Analytical Methods* **2016**, *8*, 7832. [[Crossref](#)]
 31. Fabris, B. T.; João, J. J.; Borges, E. M.; Nitrite quantification in water using a flatbed scanner. *Revista Virtual de Química* **2020**, *12*, 569. [[Crossref](#)]
 32. Santos, J. L. O.; Leite, O. D.; Vieira, A. D. M.; Jesus, D. S.; Kamogawa, M. Y.; Use of a digital image in flow analysis: Determination of nitrite and nitrate in natural waters. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2016**, *27*, 70. [[Crossref](#)]
 33. Pena-Pereira, F.; Villar-Blanco, L.; Lavilla, I.; Bendicho, C.; Test for arsenic speciation in waters based on a paper-based analytical device with scanometric detection. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1011*, 1. [[Crossref](#)]
 34. Dos Santos Benedetti, L. P.; Dos Santos, V. B.; Silva, T. A.; Benedetti-Filho, E.; Martins, V. L.; Fatibello-Filho, O.; A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages. *Analytical Methods* **2015**, *7*, 7568. [[Crossref](#)]
 35. Colzani, H.; Rodrigues, Q. E. A. G.; Fogaça, C.; Gelinski, J. M. L. N.; Pereira-Filho, E. R.; Borges, E. M.; Determinação de fosfato em refrigerantes utilizando um scanner de mesa e análise

- automatizada de dados: um exemplo didático para ensino de química. *Química Nova* **2017**, *40*, 833. [[Crossref](#)]
36. Curbani, L.; Gelinski, J. M. L. N.; Borges, E. M.; Determination of Ethanol in Beers Using a Flatbed Scanner and Automated Digital Image Analysis. *Food Analytical Methods* **2020**, *13*, 249. [[Crossref](#)]
37. Vyviurska, O.; Khvalbota, L.; Koljančić, N.; Špánik, I.; Gomes, A. A.; Wine age prediction using digital images and multivariate calibration. *Microchemical Journal* **2023**, *190*, 108738. [[Crossref](#)]
38. Borin, A.; Ferrão, M. F.; Mello, C.; Cordi, L.; Pataca, L. C. M.; Durán, N.; Poppi, R. J.; Quantification of Lactobacillus in fermented milk by multivariate image analysis with least-squares support-vector machines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *387*, 1105. [[Crossref](#)]
39. Da Silva Lyra, W.; Almeida, L. F. De; Da Silva Cunha, F. A.; Gonçalves Dias Diniz, P. H.; Martins, V. L.; Ugulino De Araujo, M. C.; Determination of sodium and calcium in powder milk using digital image-based flame emission spectrometry. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 1044. [[Crossref](#)]
40. Diniz, P. H. G. D.; Dantas, H. V.; Melo, K. D. T.; Barbosa, M. F.; Harding, D. P.; Nascimento, E. C. L.; Pistonesi, M. F.; Band, B. S. F.; Araújo, M. C. U.; Using a simple digital camera and SPA-LDA modeling to screen teas. *Analytical Methods* **2012**, *4*, 2648. [[Crossref](#)]
41. Marcelo, M. C. A.; Mariotti, K. C.; Ortiz, R. S.; Ferrão, M. F.; Anzanello, M. J.; Scott test evaluation by multivariate image analysis in cocaine samples. *Microchemical Journal* **2016**, *127*, 87. [[Crossref](#)]
42. de Souza, D. M.; de Moura Messias, P. J.; Silva Santos, I. da; Ramalho, E. D.; Ferrari Júnior, E.; de Oliveira Morais, P. A.; Scott test associated with multivariate image analysis: A more selective alternative for cocaine research in forensic laboratories. *Forensic Science International* **2022**, *335*, 111277. [[Crossref](#)]
43. Dantas, H. V.; Barbosa, M. F.; Pereira, A.; Pontes, M. J. C. C.; Moreira, P. N. T. T.; Araújo, M. C. U. U.; An inexpensive NIR LED Webcam photometer for detection of adulterations in hydrated ethyl alcohol fuel. *Microchemical Journal* **2017**, *135*, 148. [[Crossref](#)]
44. Thanakiatkrai, P.; Yaodam, A.; Kitpipit, T.; Age estimation of bloodstains using smartphones and digital image analysis. *Forensic Science International* **2013**, *233*, 288. [[Crossref](#)]
45. Almeida, V. E.; Da Costa, G. B.; De Sousa Fernandes, D. D.; Gonçalves Dias Diniz, P. H.; Brandão, D.; De Medeiros, A. C. D.; Vêras, G.; Using color histograms and SPA-LDA to classify bacteria. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406*, 5989. [[Crossref](#)]
46. Ledesma, C. M.; Gelinski, J. M. L. N.; Borges, E. M.; Equilibrium constant determination using digital images. *Revista Virtual de Química* **2019**, *11*, 555. [[Crossref](#)]
47. de Morais, C. de L. M.; Silva, S. R. B.; Vieira, D. S.; Lima, K. M. G.; Integrating a Smartphone and Molecular Modeling for Determining the Binding Constant and Stoichiometry Ratio of the Iron(II)–Phenanthroline Complex: An Activity for Analytical and Physical Chemistry Laboratories. *Journal of Chemical Education* **2016**, *93*, 1760. [[Crossref](#)]
48. Shrivastava, A.; Gupta, V.; Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* **2011**, *2*, 21. [[Crossref](#)]
49. Brasil; Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 166, de 24 de Julho de 2017. *Ministério da Saúde* **2017**, *2017*, 1. [[Link](#)]
50. Rasband, W.; ImageJ. [[Link](#)]
51. Readplate. [[Link](#)]
52. Pimentel, M. F.; Barros-Neto, B. de; Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. *Química Nova* **1995**, *19*, 10. [[Link](#)]