

## DETERMINAÇÃO DE FOSFATO EM REFRIGERANTES UTILIZANDO UM SCANNER DE MESA E ANÁLISE AUTOMATIZADA DE DADOS: UM EXEMPLO DIDÁTICO PARA ENSINO DE QUÍMICA

Heloisa Colzani<sup>a</sup>, Quethelen Elizabeth Araujo Garcez Rodrigues<sup>a</sup>, Claudia Fogaça<sup>b</sup>, Jane Mary Lafayette Neves Gelinski<sup>b</sup>, Edener R. Pereira-Filho<sup>c</sup> e Endler Marcel Borges<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau, Campus 1, Rua Antônio da Veiga, 140, Victor Konder, 89012-900 Blumenau – SC, Brasil

<sup>b</sup>Núcleo Biotecnológico, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Rua Paese, 198, Bairro Universitário-Bloco K, 89560-000 Videira – SC, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luiz (SP 340), km 235, CP 676, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 19/10/2016; aceito em 31/01/2017; publicado na web em 24/03/2017

PHOSPHATE COLORIMETRIC ANALYSIS USING A DESKTOP SCANNER AND AUTOMATED DIGITAL IMAGE ANALYSIS: A DIDACTICAL EXAMPLE TO TEACH COLORIMETRIC ANALYSES. We propose here the quantification of the phosphorus content in cola drinks by molybdenum blue method. Molybdenum blue method was carried out in the wells of a microplate, where method miniaturization represents reduction in reagents required, improved safety, reduced waste stream, and increased sample throughput. The phosphate concentration was determined using scanned images of the microplate. Extraction of RGB values was carried out using ImageJ, the pugling Readplate was used allowing extraction of RGB values of all wells simultaneously. A Microsoft Excel spreadsheet is afforded in Google Drive, it organize data taken from ImageJ to afford calibrations curves and phosphate concentration in cola drinks. Calibration curves were prepared at 500-2500  $\mu\text{g L}^{-1}$  of P with good linearity ( $R > 0.95$ ). Phosphate concentrations in cola drinks determined using digital images method are statistically equivalent to concentrations determined using a spectroscopic method at a 95% confidence interval.

Keywords: RGB; digital image; ImageJ; phosphate.

### INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, vários métodos colorimétricos foram adaptados para microplacas, em especial, na área clínica e em análises ambientais. As vantagens de adaptar os métodos tradicionais são a redução no uso de reagentes e consequente menor geração de resíduos químicos. No entanto, o uso de técnicas de microescala empregando microplacas, em sala de aula, é provavelmente limitada pelo custo elevado (ordem de US\$ 10.000) dos leitores de microplacas.<sup>1</sup>

Normalmente, as imagens digitais utilizam o sistema Red, Green e Blue (RGB) para a definição de cores. Nesse sistema, cada tom de cor é definido por três canais: R (vermelho), G (verde) e B (azul), que variam como índices inteiros entre 0 e 255, onde o 0 corresponde à cor preta e o 255 corresponde ao R ou G ou B puros. Desta forma, no sistema RGB, um tom de cor corresponde a um ponto em um espaço tridimensional formado pelos eixos R, G e B, sendo possível a geração de 16 milhões de cores diferentes ( $256^3$ ).<sup>2</sup>

A absorvância é definida de acordo com a Equação 1. A potência de um feixe (P), transmitida através de uma célula com a solução do analito, é comparada com a potência que atravessa uma célula idêntica contendo somente o solvente ou o branco dos reagentes ( $P_0$ ). De acordo com a lei Beer–Lambert, a absorvância (A) é proporcional a concentração do analito.<sup>1</sup>

$$A = \log\left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (1)$$

Kohl *et al.*<sup>3</sup> desenvolveram uma prática de ensino que mostrou que o princípio da absorvância pode ser facilmente demonstrada utilizando

soluções coloridas e análises de imagens digitais. A prática de ensino consistia em fotografar um conjunto de cubetas contendo corante amarelo em diferentes concentrações e uma cubeta contendo apenas água destilada. Os valores de G foram obtidos para as cubetas que continham o corante amarelo e  $G_0$  foi obtido da cubeta que continha apenas água destilada. Posteriormente, estes valores foram utilizados para determinar a absorvância e preparar curvas analíticas de calibração.

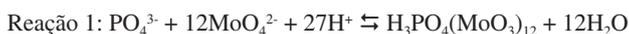
Atualmente, o processamento de imagens digitais tem atraído grande atenção como uma ferramenta analítica para a análise colorimétrica devido a sua versatilidade, compreendendo procedimentos simples, rápidos e de baixo custo. Existem vários exemplos relevantes descritos na literatura, tais como para a determinação de nitrito em alimentos, amostras ambientais e amostras clínicas,<sup>4</sup> na determinação do diclofenaco sódico, dipirona sódica e gluconato de cálcio em drogas injetáveis,<sup>5</sup> análise de chás,<sup>6</sup> quantificação de etanol em bebidas,<sup>7</sup> e quantificação de sulfato em bebidas.<sup>8</sup> Além disso, o uso de imagens digitais pode ser uma alternativa para ensaios clínicos, como demonstrado recentemente para creatinina<sup>9</sup> e determinação de glicose,<sup>10</sup> alanina aminotransferase.<sup>11</sup> Por sua vez, as imagens digitais também podem ser utilizadas para controle de qualidade. Por exemplo, Santos *et al.*,<sup>12,13</sup> utilizaram imagens digitais obtidas com um scanner de mesa para verificar adulterações do leite.

Recentemente, Christodouleas *et al.*<sup>14</sup> mostraram que um scanner de mesa pode substituir um leitor de microplacas, fazendo a quantificação de diversos corantes e leituras de placas de teste ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

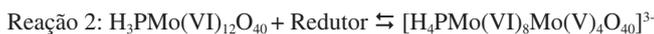
No intuito de associar o cotidiano do aluno de graduação com as práticas de laboratório, foi proposta a determinação da concentração de fosfato em refrigerantes utilizando o método do azul de molibdênio.<sup>15,16</sup>

\*e-mail: marcelborgesb@gmail.com

O método do azul de molibdênio consiste na formação de um complexo entre o ânion fosfato com um composto de molibdato em solução ácida (Reação 1).



O complexo fosfato molibdênio hexavalente incolor é reduzido a uma forma pentavalente azul por um agente redutor (ácido ascórbico) em meio ácido (Reação 2).



A intensidade da cor azul é medida espectrofotometricamente a 600, 650 e 800 nm.<sup>17</sup>

Cola é uma bebida carbonatada doce (denominada *refrigerante* ou *gasosa*), e normalmente contém corante de caramelo, cafeína, mistura de baunilha, canela e sabores cítricos. O nome vem da castanha de cola que originalmente é usada para obter a cafeína.<sup>18</sup>

Bebidas de cola são bastante consumidas e populares entre os estudantes. Muita atenção está sendo dada para possíveis consequências do consumo excessivo para a saúde humana. Estudos vem sendo feitos para avaliar o efeito destas bebidas na erosão dentária,<sup>15</sup> na ingestão de altos níveis de cafeína que podem causar hipertensão, reações alérgicas e distúrbios gastrointestinais.<sup>19,20</sup> Além disso, estas bebidas podem acarretar efeitos adversos no metabolismo do cálcio devido ao seu alto teor de ácido fosfórico, que combinado com a baixa ingestão de cálcio na dieta pode aumentar o risco de doenças ósseas.<sup>21,22</sup>

Desta forma, o presente estudo utiliza o método do azul de molibdênio para determinar a concentração de fosfato em refrigerantes a base de cola. As reações são feitas diretamente nos poços das microplacas de cultura celular (resultando em baixo consumo de reagentes) e a concentração de fosfato é determinada utilizando imagens digitais. Os valores de RGB foram extraídos simultaneamente de todos os poços utilizando um *plugin* do programa ImageJ.<sup>23,24</sup>

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes

No desenvolvimento da parte experimental foram utilizados os seguintes reagentes: Tartarato de antimônio e potássio,  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KO}_7\text{Sb}_{1/2}\text{H}_2\text{O}$ , 99,8%, fosfato de potássio monobásico anidro,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 99%, molibdato de amônio,  $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 81%, ácido L(+) Ascórbico,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , 99%. Todos os reagentes são da marca Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

### Equipamentos

As imagens foram obtidas com um scanner HP Scanjet G2710 e o *software* do scanner era o HP Scanning. A concentração de fosfato também foi determinada utilizando-se um leitor de microplacas Tecan Infinite 200 PRO (TECAN, Suíça).

### Soluções

Para a aquisição das imagens foram preparadas as soluções listadas a seguir:

- A: 15 ml de ácido sulfúrico concentrado em 100 mL de água deionizada.
- B: 0,3 g de tartarato de antimônio e potássio em 100 mL de água deionizada.
- C: 1,2 g de molibdato de amônio em 100 mL de água deionizada.
- D: 1,76 g de ácido ascórbico em 100 mL de água deionizada.

Para a preparação do reagente misto as soluções A a D foram misturadas nas seguintes proporções e ordem: 5 mL da solução A + 1 mL da solução B + 5 mL da solução C + 5 mL da solução D.

Solução estoque de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 220 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  diluído em 1 L de água deionizada que representa 50 mg  $\text{L}^{-1}$  de P (fósforo). Por exemplo, 220 mg  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  representam 1,62 mmol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , visto que, a massa molecular do  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  é 136,09 g  $\text{mol}^{-1}$  (220 mg  $\text{L}^{-1}/136,09 \text{ g mol}^{-1} = 1,62 \text{ mmol L}^{-1}$ ), como a massa molecular do fósforo (P) é de 30,97 g  $\text{mol}^{-1}$ , a concentração de P na solução em mg é 1,62 mmol  $\text{L}^{-1} \times 30,97 \text{ g mol}^{-1} = 50 \text{ mg L}^{-1}$

Na preparação das soluções padrões para estabelecer as curvas de calibração foi empregada uma solução de trabalho: 5 mL da solução estoque de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 100 mL de água deionizada (2,5 mg  $\text{L}^{-1}$  de P).

### CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração foi preparada colocando 2, 4, 6, 8 mL da solução de trabalho de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em balões de 10 mL, com o auxílio de uma bureta de 25 mL, e completando o volume até o menisco com água deionizada. O último ponto da curva de calibração era a própria solução de trabalho. A concentração de fosfato foi expressa como  $\mu\text{g L}^{-1}$  de fósforo. A concentração de cada ponto da curva foi calculada utilizando a Equação 2, em que a concentração de solução de trabalho (2,5 mg  $\text{L}^{-1}$ ) é  $C_2$ ,  $V_2$  é o volume da solução de trabalho adicionado ao balão volumétrico de 10 mL e  $V_1$  é 10 mL. Portanto, a concentração de cada ponto da curva analítica foi de 500, 1000, 1500, 2000 e 2500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

$$C_1 = C_2 V_2 / V_1 \quad (2)$$

### Preparo das soluções de refrigerante.

Devido à elevada concentração de fosfato nos refrigerantes, estes foram diluídos da seguinte forma: 1 mL de refrigerante foi diluído em um balão de 100 mL (100 vezes diluída) e 1 mL de refrigerante foi diluído em um balão de 50 mL (50 vezes diluída).

Os refrigerantes utilizados foram Pepsi, Coca Zero, Coca-Cola e Guaraná Antártica Black.

### Método do Azul de molibdênio.

Duzentos  $\mu\text{L}$  de cada amostra de refrigerante diluída foram colocadas em 4 poços da microplaca. Na Figura 1, linhas de E a H e colunas 1 a 5 correspondem aos poços da microplaca que contém as soluções da curva de calibração. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de cada solução de refrigerante foram adicionados a 4 poços da placa, na Figura 1, linhas A a D e colunas 4 a 11. Cada refrigerante foi preparado com duas diluições, 1:50 e 1:100. Por fim, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  do reagente misto a cada poço da placa. Após 15 minutos, foram realizadas as leituras em 650 nm no leitor de microplacas. Posteriormente, as placas foram colocadas em um scanner e as imagens obtidas em 300 pontos por polegada (*dots per inch*, dpi).

### Obtenção das imagens digitais

As imagens foram obtidas colocando as microplacas em um scanner HP Scanjet G2710, cobertas com um fundo branco, por exemplo, folha branca de EVA (etil, vinil e acetato). As imagens foram obtidas com 300 dpi no formato *Joint Photographics Experts Group* (JPEG). As opções de correção automática da imagem pelo *software* foram desabilitadas e o *software* do scanner era o HP Scanning.



Figura 1. Imagem obtida com scanner de mesa da microplaca frente a um fundo branco

### Obtenção dos valores de RGB

Os valores de RGB foram extraídos das imagens utilizando o software ImageJ, software de uso livre.<sup>23</sup>

Os valores de cada canal (RGB) de todos os poços da microplaca pode ser extraído simultaneamente utilizando o plugin “ReadPlate” do ImageJ.

Por exemplo, para obter os valores R na Figura 1, no ImageJ, clique em *Plugins* e depois em *ReadPlate*. Ao clicar em *ReadPlate*, a janela *Measureme...* aparecerá. Na janela *Measureme...* (Figura 2), basta selecionar o canal (*Channel*) que se deseja extrair. Ao selecionar o canal e clicar em *OK*, a janela *Grid Parameters* aparecerá (Figura 3).

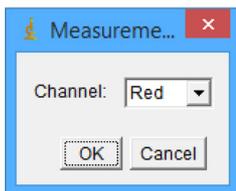


Figura 2. Janela *Measureme...*. Seleção da canal que se deseja extrair de uma micro placa

Na janela *Grid Parameters* (Figura 3), em *Number of columns*, seleciona-se o número de colunas da placa, sendo permitidas no máximo 12 colunas. Em *Number of Rows*, seleciona-se o número de linhas, sendo permitidas no máximo 8 linhas (de A até H).

Em *Center of Well A1:X* e *Center of Well A1:Y*, são colocadas as coordenadas em X e Y do primeiro poço A1 (Figura 1). Em *Center of Well H12:X* e *Center of Well H12:Y* são colocadas as coordenadas em X e Y do último poço H12 (Figura 1).

No imageJ, as coordenadas dos poços A1 e H12 podem ser determinadas posicionando o cursor sobre a micro placa.

*Circle size* é o diâmetro do círculo, na placa da onde são extraídos os valores de RGB. Neste trabalho utilizou-se 20 pixel.

Na janela *Grid Parameters*, após clicar em *OK*, aparecerá uma janela chamada “*Results*” contendo (Figura 4), na seguinte ordem, as informações: nome, área, mediana, mínimo, máximo, linha, coluna. Na janela *Results*, clique “*Ctrl + A*” para selecionar todos os valores, em seguida clique em “*Ctrl + C*” para copiar estes valores e para colar estes valores no Microsoft Excel, clique em “*Ctrl + V*”.

Depois de extrair os valores de RGB e exportar os dados para o Microsoft Excel, os valores de R, G e B podem ser exportados para a Tabela 1S, do Microsoft Excel, disponível em um link Google drive.<sup>25</sup> Na Planilha do Microsoft Excel, os valores de R, G e B foram copiados para as planilhas 1, 2 e 3 respectivamente. Nestas planilhas, a média

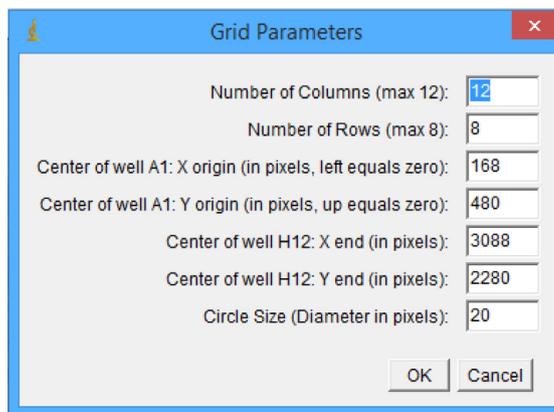


Figura 3. Janela *Grid Parameters*. Seleção das coordenadas dos poços da microplaca

File	Edit	Font	Results					
Label	Area	Mean	Min	Max	Row	Column	Absorbance	
1	Figura 1.jpg	316	61.649	49	70	A	1	0.617
2	Figura 1.jpg	316	67.304	58	76	A	2	0.579
3	Figura 1.jpg	316	157.918	140	180	A	3	0.208
4	Figura 1.jpg	316	73.915	46	97	A	4	0.538
5	Figura 1.jpg	316	49.883	38	59	A	5	0.709
6	Figura 1.jpg	316	80.835	73	90	A	6	0.499
7	Figura 1.jpg	316	75.044	67	84	A	7	0.531

Figura 4. Janela *results*. Janela que mostra os valores de RGB para cada poço da microplaca

dos valores está na coluna D, os valores das médias de R, G e B foram exportados para as colunas A, B e C, respectivamente, da planilha 4.

Na planilha 4, os valores de R, G e B de cada poço são rearranjados de maneira a fornecer as curvas analíticas e a concentração de fosfato em cada um dos refrigerantes utilizando as equações (3-5). As equações de 3 a 6 são as absorvâncias para cada um dos canais RGB, a Equação 6 é a distância euclidiana.

$$A = -\log\left(\frac{R}{R_0}\right) = A \quad (3)$$

$$A = -\log\left(\frac{G}{G_0}\right) = A \quad (4)$$

$$A = -\log\left(\frac{B}{B_0}\right) = A \quad (5)$$

$$[v] = \sqrt{(R - R_0)^2 + (G - G_0)^2 + (B - B_0)^2} \quad (6)$$

Na planilha 4, os valores extraídos de R, G e B são transferidos para as colunas R, S, T e U, a média (m) dos valores dos quatro poços que contém a curva de calibração são colocados na coluna N, o desvio padrão (s) destes quatro valores na coluna O e o intervalo de confiança na coluna Q, o intervalo de confiança foi calculado com a Equação 7, em que n é o número de poços (n=4), t é o valor do t de Student, em um intervalo de confiança de 95% para três graus de liberdade (t=3,18), e s é o desvio padrão dos valores de RGB em cada poço. Como é ilustrado na Figura 5.

$$m \pm \frac{ts}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

Nas colunas H-V, a curva analítica obtida com a Equação 3 está

K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	
	$\mu\text{g/L}$		m	s	Desvio padrão relativo	intervalo de confiança					
	500	0.0401	131	5		4	7.7	123.8	134.1	133.4	132.9
	1000	0.1790	95	7		8	11.6	86.1	92.6	99.6	102.4
	1500	0.2835	75	6		8	9.9	74.8	69.4	71.6	83.5
	2000	0.5012	45	6		14	9.9	42.5	40.1	44.4	54.3
	2501	0.6815	30	10		33	15.9	16.3	30.8	32.2	40.4
			144	7		5	6.0	134.1	142.7	138.6	154.2
							0.0	136.2	144.8	148.0	151.3

Figura 5. Tabela 1S disponível no Google Drive, utilizada para converter os valores de RGB extraídos da Figura 1 nas curvas analíticas de calibração

entre as linhas 2 a 7. A curva analítica obtida com a equação 4 está entre as linhas 27 a 33. A curva analítica obtida com a equação 5 está entre as linhas 51 a 57. A curva analítica obtida com a equação 6 está entre as linhas 74 a 79. A absorvância e  $[v]$  de cada amostra de refrigerante, assim como suas respectivas concentrações que foram determinadas utilizando-se as Equações 1 a 4 estão entre as colunas G a Q e linhas 118 a 129, 132 a 142, 145 a 155 e 158 a 168, respectivamente. A concentração de fósforo em cada refrigerante, determinada com as equações de 1 a 4, estão nas colunas H a L, respectivamente, nas linhas 174 a 181.

A Figura 6 mostra como a concentração de P é calculada em cada um dos refrigerantes. A coluna F mostra que estas são as concentrações calculadas com a equação 3, utilizando os valores de R. Na coluna G estão os nomes das amostras. Na coluna H estão os fatores de diluição de cada refrigerante. Na coluna J estão as absorvâncias de cada um dos refrigerantes utilizando-se a equação 3. Na coluna K está representada a concentração de P ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Na coluna L as concentrações determinadas para cada refrigerante após multiplicação por seus respectivos fatores de diluição, por exemplo, um refrigerante que foi diluído 100 vezes, teve a sua concentração determinada na coluna K e este valor foi multiplicado por 100 na coluna L. Na Linha 119, P é o coeficiente angular da equação 3 e Q é o coeficiente linear da equação 1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem práticas de ensino descritas na literatura que utilizaram imagens digitais para realizar determinações colorimétricas<sup>25-27</sup> e de pH.<sup>28,29</sup> Nestas práticas de ensino, os valores de RGB foram extraídos utilizando softwares como r-Project<sup>25,27</sup> Octave e Matlab.<sup>28,29</sup>

Quando este experimento foi testado com alunos de graduação em engenharia química, no segundo semestre de 2016, poucos estavam acostumados com este tipo de software, especialmente nos dois primeiros anos de graduação, e se mostram desconfortáveis em trabalhar com os mesmos. Além disto, com estes softwares é necessário recortar as imagens de onde deseja-se extrair os valores de RGB, o que pode

ser um procedimento demorado, visto que teríamos de recortar 52 poços separadamente e salvar cada um com um nome específico.

Inicialmente, neste trabalho, os valores de RGB foram extraídos utilizando o r-project, para tanto, pequenos quadrados de 80x80 eram recortados de cada poço da placa e salvos em uma pasta. Posteriormente, os valores de RGB eram extraídos utilizando o r-project.

Devido à dificuldade relatada pelos alunos, foi implementada uma nova metodologia para extrair os valores de RGB das imagens digitais. A alternativa encontrada foi o plugin ReadPlate no ImageJ, que permitiu que os valores de RGB fossem extraídos diretamente das imagens das microplacas em menos de cinco minutos. Importar os valores R, G e B para a Tabela 1S, disponível no Google drive,<sup>25</sup> permitiu uma fácil organização dos dados e uma visualização imediata das curvas de calibração, bem como a determinação das concentrações de fosfato nos refrigerantes.

Kohl et al.<sup>3</sup> demonstram que uma solução contendo um corante amarelo (Bio-Tek ELx808) é amarela porque o complexo absorve o azul da radiação branca que penetra no frasco e transmite o componente amarelo de forma inalterada. Assim, em uma determinação colorimétrica de corante amarelo, o máximo de variação na absorvância, com a concentração, ocorre com a radiação azul. A variação da absorvância com a radiação amarela é desprezível e a radiação empregada em uma análise colorimétrica deve ser a cor complementar da solução do analito. Desta forma, os valores de R e G extraídos de soluções com diferentes concentrações de corante amarelo se mostraram praticamente constantes, enquanto os valores B apresentaram variações significativas em função da concentração do corante.<sup>3</sup>

Neste estudo, o fosfato é determinado como um complexo de coloração azul, ou seja, este absorve a radiação amarela da luz branca e transmite o componente azul. Por esta razão, os métodos analíticos descritos na literatura fazem a leitura da absorvância em 650, 660 e 880 nm.<sup>17</sup>

No sistema RGB, vermelho, verde e azul representam a luz nas regiões de 600-700 nm, 500-600 nm e 400-500 nm, respectivamente. Portanto, devido à coloração azul do complexo, espera-se que os

	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
117												
118												
119											0.000320926	-0.14444734
120											2.31235E-05	0.03835515
121											0.984664221	0.03657020
122		pepsi	100	79.65825	0.25633	1249	124883					
123		pepsi	50	24.4375	0.76951	2848	142393					
124		coca Zero	100	92.46825	0.19157	1047	104703					
125		coca Zero	50	58.7745	0.38837	1660	83013					
126		coca	100	67.364	0.32914	1476	147568					
127		coca	50	14.32925	1.00134	3570	178513					
128		black	100	73.93525	0.28871	1350	134972					
129		black	50	11.754	1.08738	3838	191917					

Figura 6. Cálculo da concentração de P ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em cada refrigerante

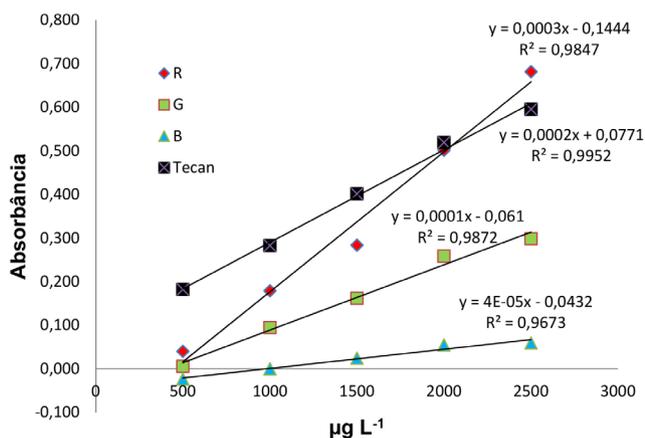
valores B extraídos das imagens digitais variem pouco, em função da concentração de fosfato, e que os valores de R e G diminuam em função do aumento da concentração de fosfato.

O comportamento esperado foi observado na prática. A Tabela 1 mostra os valores de RGB para cada um dos pontos da curva analítica, como se esperava, os valores R apresentam a maior variação em função da concentração de fosfato, os valores de G variaram menos em função da concentração de fosfato que os valores de R, enquanto os valores de B variaram pouco em função da concentração de fosfato.

**Tabela 1.** Valores de RGB para cada um dos pontos curva analítica, média  $\pm$  desvio padrão. O desvio padrão foi calculado para os quatro valores de cada poço (n=4)

Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$ de P	R	G	B
500	131 $\pm$ 4,9	134 $\pm$ 4,7	144 $\pm$ 7,7
1000	95 $\pm$ 7,3	110 $\pm$ 5,3	136 $\pm$ 3,1
1500	75 $\pm$ 6,2	94 $\pm$ 3,9	129 $\pm$ 2,0
2000	45 $\pm$ 6,2	75 $\pm$ 3,9	120 $\pm$ 2,5
2501	30 $\pm$ 10,0	69 $\pm$ 6,0	119 $\pm$ 2,8

As curvas analíticas obtidas utilizando as equações 3 a 6 são mostradas na Figura 7, todas as curvas analíticas se mostraram lineares com um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) maior que 0.96. Devido à pequena variação de B em função da concentração de fosfato, o coeficiente angular da Equação 5 foi pequeno ( $4 \times 10^{-5}$ ). Por sua vez,



**Figura 7.** Concentração de fósforo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) vs Absorbância. R: Equação 3; G: Equação 4 e B: Equação 5.

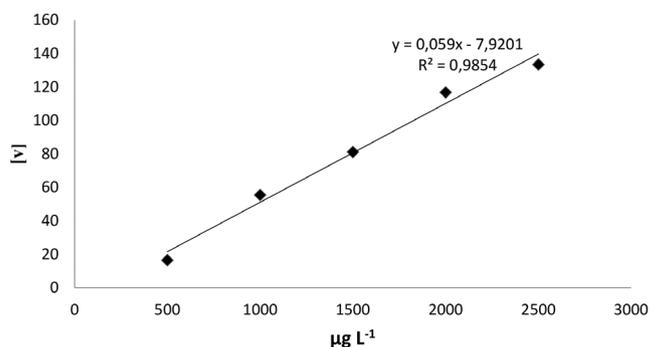
**Tabela 2.** Concentração de fosfato em refrigerante, concentração determinada como  $\mu\text{g de P L}^{-1}$ . análises feitas utilizando um leitor de microplacas em 650 nm (650) n=8, concentrações de fosfato determinadas utilizando as imagens digitais e as Equação 3 (R), Equação 4 (G) e Equação 6 ([v]).n = 7

	650	R	G	[v]
Pepsi 100	146927 $\pm$ 17291	133826 $\pm$ 21315	133475 $\pm$ 35777	133475 $\pm$ 35777
Pepsi 50	129631 $\pm$ 13660	130038 $\pm$ 17921	123247 $\pm$ 25240	123247 $\pm$ 25240
Coca Zero 100	125952 $\pm$ 25998	112497 $\pm$ 27633	105558 $\pm$ 43310	105558 $\pm$ 43310
Coca Zero 50	114048 $\pm$ 19376	93614 $\pm$ 24017	93507 $\pm$ 29527	93507 $\pm$ 29527
Coca 100	180561 $\pm$ 14565	157117 $\pm$ 29997	157206 $\pm$ 43673	157206 $\pm$ 43673
Coca 50	144687 $\pm$ 12934	139019 $\pm$ 30634	127930 $\pm$ 32679	127930 $\pm$ 32679
Black 100	183754 $\pm$ 12882	157451 $\pm$ 40086	163093 $\pm$ 51779	163093 $\pm$ 51779
Black 50	142768 $\pm$ 16281	131655 $\pm$ 42857	120089 $\pm$ 39123	120089 $\pm$ 39123

como os valores de R variam mais que os valores de G em função da concentração de fosfato, a Equação 3 tem um coeficiente angular ( $3 \times 10^{-4}$ ) três vezes maior que a Equação 4 ( $1 \times 10^{-4}$ ).

A curva analítica obtida com o leitor de microplacas (Tecan) apresentou maior linearidade que as curvas obtidas com os valores de RGB extraídos das imagens digitais e um coeficiente angular ( $2 \times 10^{-4}$ ) menor que o coeficiente angular obtido com a equação 3.

A curva analítica obtida com a Equação 6 se mostrou linear (Figura 8). A equação 6 foi utilizada, porque os valores de R, G e B variaram em função da concentração de fosfato. Desta forma, esta equação leva em consideração os valores dos três canais. Por exemplo, Moraes *et al.*<sup>27</sup> determinaram a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$ , em um estudo da taxa de corrosão do ferro na água do mar, utilizando imagens digitais. Neste estudo, a absorbância foi calculada levando em conta a variação dos canais G e B. Em razão do complexo vermelho, formado entre o  $\text{Fe}^{2+}$  e a fenantrolina, apresentar pouca variação no canal R em função da concentração, os canais G e B apresentaram variações apreciáveis em função da concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  na solução.



**Figura 8.** Curva de calibração obtida com a Equação 6 [v] vs concentração de fosfato

Oito microplacas foram preparadas e analisadas em 650 nm, com um leitor de microplacas. Posteriormente, sete destas microplacas foram colocadas em um scanner frente a um fundo branco e as imagens obtidas em 300 dpi no formato JPEG. Na Tabela 2 está apresentado a média e o desvio padrão (m $\pm$ s), as concentrações obtidas com as Equação 3, Equação 4 e Equação 6 apresentaram valores próximos dos obtidos com o leitor de microplacas. A Equação 5 não foi utilizada, porque apresenta um coeficiente angular muito pequeno (Figura 7). As amostras de refrigerante nomeadas como 50 significam que o refrigerante foi diluído na proporção 1:50, enquanto a nomeação 100 significam que o refrigerante foi diluído na proporção 1:100.

Utilizando um leitor de microplacas, o desvio padrão relativo da concentração de fosfato nos refrigerantes foi de 12% em média,

enquanto o desvio padrão relativo obtido com as imagens digitais ficou entre 23% e 30%. Por sua vez, o desvio padrão relativo obtido com a Equação 3 e Equação 4 foi de 23% e o desvio padrão relativo obtido com a Equação 6 foi de 30%. Portanto, optou-se por fazer a determinação da concentração de fosfato nos refrigerantes utilizando-se a Equação 3.

Na execução da prática com alunos, os mesmos deverão escolher qual equação é mais adequada. Repare que na Tabela 2 o desvio padrão obtido com a Equação 4 é muito próximo do desvio padrão obtido com a Equação 6.

As concentrações obtidas com o leitor de microplacas ( $n = 8$ ) e com a equação 3 ( $n = 7$ ) foram comparadas, inicialmente, utilizando o teste F para comparar as variâncias. Os valores de F obtidos para os refrigerantes estão mostrados na Tabela 3. Como é mostrado na Tabela 3, as variâncias obtidas com o leitor de microplacas e com a Equação 3, em um intervalo de confiança de 95, não podem ser presumidas equivalentes para os refrigerantes: Guaraná Black 100 e Guaraná Black 50, visto que o valor de F crítico para 7 e 6 graus de liberdade foi de 4,2.

**Tabela 3.** Variância ( $s^2$ ), F calculado, t de Student calculado, 650 representa os valores obtidos com o leitor de micro placas a 650 nm e R representa os valores obtidos com a Equação 3. O valor tabelado para F, considerando um intervalo de confiança de 95%, com 7 e 6 graus de liberdade é 4,2. O valor tabelado de t para 13 graus de liberdade é de 2,16

	$s^2$ 650	$s^2$ R	F	t
Pepsi 100	2,99E+08	4,54E+08	1,54	1,54
Pepsi 50	1,87E+08	3,21E+08	1,19	1,19
Coca Zero 100	6,76E+08	7,64E+08	1,55	1,55
Coca Zero 50	3,75E+08	5,77E+08	1,25	1,25
Coca 100	2,12E+08	9,00E+08	4,18	1,07
Coca 50	1,67E+08	9,38E+08	3,65	3,65
Black 100	1,66E+08	1,61E+09	5,41*	0,72
Black 50	2,65E+08	1,84E+09	4,83*	0,77

O teste t presumindo variâncias equivalentes mostrou que a Coca-Cola 50 apresenta concentração de fosfato diferente da obtida com o leitor de microplacas, porque o valor crítico de t, em um intervalo de confiança de 95% para 13 graus de liberdade, é 2,16. O teste t presumindo variâncias distintas para a concentração de fosfato no Guaraná Black 100 e Guaraná Black 50 mostra que não há diferença significativa entre os resultados obtidos com a Equação 3 e o leitor de microplacas, visto que o valor de t calculado é menor que o valor de t crítico. Desta forma, as concentrações de fosfato nos refrigerantes determinadas com a Equação 3 não diferem dos valores obtidos com um leitor de microplacas, em um intervalo de confiança de 95%, exceto para a Coca-Cola 50.

**Tabela 4.** Média (m), desvio padrão (s), variância ( $s^2$ ). F e t calculados para a comparação dos valores obtidos com o leitor de microplacas a 650 nm com equação 4 (G) e com a equação 6 [v]

	G			[v]		
	$s^2$	F	t	$s^2$	F	t
Pepsi 100	1.28E+09	4.34*	0.91	9.85E+08	3.34	0.21
Pepsi 50	6.37E+08	2.35	0.59	1.49E+08	0.55	1.72
Coca Zero 100	1.88E+09	3.80	1.17	1.83E+09	3.71	0.18
Coca Zero 50	8.72E+08	1.89	1.56	5.40E+08	1.17	1.72
Coca 100	1.91E+09	8.87*	1.35	1.22E+09	5.67*	0.27
Coca 50	1.07E+09	4.15	1.29	4.81E+08	1.87	2.74
Black 100	2.68E+09	9.02*	1.01	2.30E+09	7.74*	0.14
Black 50	1.53E+09	4.02	1.45	9.78E+08	2.57	2.06

A Tabela 4 compara os valores obtidos com o leitor de microplacas com a Equação 4 e Equação 6. A comparação das concentrações de fosfato obtidas com um leitor de microplacas e com os valores obtidos com a Equação 4 são mostradas na Tabela 4. O teste F mostra que as variâncias das concentrações de fosfato obtidas com a equação 4 são diferentes das variâncias obtidas com o leitor de microplacas para Pepsi 100, Coca-Cola 100 e Black 100.

O teste t presumindo variâncias equivalentes mostrou que não há diferença significativa entre os resultados obtidos com a Equação 4 e o leitor de microplacas, porque os valores de t calculados foram menores que o valor de t crítico (2,16).

O teste t presumindo variâncias diferentes também mostrou que não há diferença significativa entre os resultados obtidos com a Equação 4 e o leitor de microplacas, sendo que o t crítico ficou em torno de 2,36.

A comparação das concentrações de fosfato obtidas com um leitor de microplacas e com os valores obtidos com a Equação 6 são mostradas na Tabela 4. O teste F mostra que as variâncias das concentrações de fosfato obtidas com a Equação 3 são diferentes das variâncias obtidas com o leitor de microplacas para Coca-Cola 100 e Black 100.

O teste t presumindo variâncias equivalentes mostrou que há diferença significativa entre os resultados obtidos com a Equação 6 e o leitor de microplacas para a Coca-Cola 50, já que o valor de t calculado (2,74) foi maior que o valor do t crítico (2,16).

O teste t presumindo variâncias diferentes mostrou que não há diferença significativa entre os resultados obtidos com a Equação 6 e o leitor de microplacas, sendo que o t crítico ficou em torno de 2,36.

Na Tabela 4, o teste t mostrou que as concentrações de fosfato obtidas com as Equação 3 e Equação 6 não apresentaram diferença significativa dos valores obtidos com o leitor de microplacas, exceto para Coca-Cola 50. Utilizando a Equação 6, não se observou diferença significativa com os valores obtidos com o leitor de microplacas para nenhum dos refrigerantes, embora esta equação forneça valores de desvio padrão maiores que os obtidos com as outras equações. Isto indica que o método que utiliza imagens digitais fornece resultados similares aos obtidos com um leitor de microplacas.

É interessante que os alunos comparem os resultados obtidos com as imagens digitais (equações 3 a 6) com os resultados obtidos com um equipamento, como, por exemplo, um leitor de microplacas como foi feito neste trabalho. Provavelmente muitas instituições não tenham um leitor de microplacas, neste caso, os alunos podem fazer a quantificação de fosfato nos refrigerantes utilizando apenas as imagens digitais, e comparar os resultados obtidos com ambas as equações, bem como observar qual das equações fornece melhores resultados.

No desenvolvimento de um método analítico é interessante que o desvio padrão seja o menor possível. Desta forma, os alunos podem observar qual equação fornece o menor desvio padrão para cada refrigerante.

De um ponto de vista didático é interessante que o aluno compare as concentrações de fosfato nos refrigerantes utilizando diluições de 1:50 e 1:100.

Em todos os refrigerantes, tanto com as imagens digitais (Equação 3, Equação 4 e Equação 6) como no leitor de microplacas, as concentrações obtidas com uma diluição de 1:50 foram menores que as concentrações obtidas com uma diluição de 1:100 (Tabela 2). Isto indica que uma maior diluição dos refrigerantes diminuí o efeito da matriz.

De maneira didática é interessante que os alunos utilizem as diluições (1:50 e 1:100) para observar o efeito do corante presente nos refrigerantes a base de cola. Quando este experimento foi realizado, as concentrações de fosfato obtidas utilizando as duas diluições foram comparadas utilizando-se o teste F para comparar as variâncias e o teste t para comparar as médias dos resultados.

Podemos comparar a variância da concentração de fosfato nos refrigerantes utilizando o teste F, com base nas variâncias obtidas com a Equação 3 (Tabela 2 e Tabela 3). Os valores de F calculados para a Pepsi, Coca Zero, Coca-Cola e Guaraná Black são 1,41, 1,32, 1,04 e 1,14, respectivamente. Portanto, assumimos que não existe diferença significativa entre as variâncias obtidas com cada uma das diluições, visto que o valor de F tabelado, em um intervalo de confiança de 95%, é de 3,78.

Uma vez que variâncias equivalentes foram presumidas do teste F, o teste t presumindo variâncias equivalentes foi utilizado para determinar os valores de t para Pepsi, Coca Zero, Coca-Cola e Guaraná Black de 0,36, 1,36, 1,11 e 1,16, respectivamente. Portanto, assumiu-se que não existe diferença significativa entre as concentrações determinadas com as diluições de 1:50 e 1:100, em um intervalo de confiança de 95%.

## CONCLUSÃO

A prática de ensino proposta introduz diversos conceitos primordiais ao ensino de ciências exatas e engenharias, como o uso de imagens digitais, a extração dos valores de RGB utilizando o *plugin* ReadPlate, exportação dos dados para o Microsoft Excel, construção de curvas analíticas, comparação de resultados utilizando testes estatísticos e introdução aos conceitos de espectrofotometria.

O uso do *plugin* ReadPlate no ImageJ permite que os valores de RGB sejam extraídos de uma microplaca de 96 poços em menos de 5 minutos. Por sua vez, a exportação dos dados do ImageJ para a tabela 1S do Microsoft Excel permite que as curvas analíticas e a determinação da concentração de fosfato em cada refrigerante sejam determinadas imediatamente, após a aquisição das imagens digitais.

Os resultados obtidos com a equação 1 são equivalentes aos resultados obtidos com um leitor de microplacas, em um intervalo de confiança de 95%, com exceção da Coca-Cola 50. Adicionalmente, a Equação 2 apresentou linearidade satisfatória ( $R^2 = 0,98$ ) e coeficiente angular maior que o obtido com um leitor de microplacas.

A prática de ensino proposta é simples e de baixo custo, em que se utiliza 50  $\mu$ L de reagente misto por poço, o que significa um gasto de 2,6 mL por microplaca. É importante ressaltar que a maioria dos métodos colorimétricos está sendo adaptada para microplacas para reduzir o uso de solventes e também o volume de resíduos.

A prática pode ser realizada utilizando-se apenas um scanner de mesa ou, quando um leitor de microplacas estiver disponível, os dois podem ser utilizados e os resultados comparados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as bolsas e auxílio financeiro da FAPESC (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Santa Catarina), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

## REFERÊNCIAS

- Soldat, D. J.; Barak, P.; Lepore, B. J.; *J. Chem. Educ.* **2009**, *86*, 617.
- Gomes, M. S.; Trevizan, L. C.; Nóbrega, J. A.; Kamogawa, M. Y.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1577.
- Kohl, S. K.; Landmark, J. D.; Stickle, D. F.; *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 644.
- Cardoso, T. M. G.; Garcia, P. T.; Coltro, W. K. T.; *Anal. Methods* **2015**, *7*, 7311.
- da Silva Lyra, W.; Sanches, F. A. C.; da Silva Cunha, F. A.; Diniz, P. H. G. D.; Lemos, S. G.; da Silva, E. C.; de Araujo, M. C. U.; *Anal. Methods* **2011**, *3*, 1975.
- Diniz, P. H.; Dantas, H. V.; Melo, K. D.; Barbosa, M. F.; Harding, D. P.; Nascimento, E. C.; Araújo, M. C.; *Anal. Methods* **2012**, *4*, 2648.
- dos Santos Benedetti, L. P.; dos Santos, V. B.; Silva, T. A.; Benedetti Filho, E.; Martins, V. L.; Fatibello-Filho, O.; *Anal. Methods* **2015**, *7*, 4138.
- dos Santos Benedetti, L. P.; dos Santos, V. B.; Silva, T. A.; Benedetti-Filho, E.; Martins, V. L.; Fatibello-Filho, O.; *Anal. Methods* **2015**, *7*, 7568.
- de Morais, C. D. L. M.; de Lima, K. M. G.; *Anal. Methods* **2015**, *7*, 6904.
- Xia, M. L.; Wang, L.; Yang, Z. X.; Chen, H. Z.; *Anal. Methods* **2015**, *7*, 6654.
- Fu, Q.; Wu, Z.; Li, X.; Yao, C.; Yu, S.; Xiao, W.; Tang, Y.; *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *81*, 524.
- Santos, P. M.; Wentzell, P. D.; Pereira-Filho, E. R.; *Food Anal. Methods* **2012**, *5*, 89.
- dos Santos, P. M.; Pereira-Filho, E. R.; *Anal. Methods* **2013**, *5*, 3669.
- Christodouleas, D. C.; Nemiroski, A.; Kumar, A. A.; Whitesides, G. M.; *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9170.
- Lozano-Calero, D.; Martín-Palomeque, P.; Madueño-Loriguillo, S.; *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, 1173.
- Murphy, J.; *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 420.
- Nagul, E. A.; McKelvie, I. D.; Worsfold, P.; Kolev, S. D. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *890*, 60.
- [https://pt.wikipedia.org/wiki/Bebida\\_de\\_cola](https://pt.wikipedia.org/wiki/Bebida_de_cola). Acessada em fevereiro de 2017.
- Caballero, T.; García, A. C.; Pascual, C.; Díaz, J. M.; Ojeda, A.; *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* **1993**, *3*, 160.
- Hadas, H. I.; Hiller, N.; Guberman, D.; *Am. J. Gastroenterol.* **1993**, *88*, 127.
- Wyshak, G.; Frisch, R. E.; *Journal of Adolescent Health* **1994**, *15*, 210.
- Hernandez, A.; Stampfer, M. J.; Ravnkar, V. A.; Willet, W. C.; Schiff, I.; Francis, M.; Longscope, C.; Mckinlay, S. M. *Epidemiology* **1993**, *42*, 128.
- <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acessada em fevereiro de 2017.
- <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/readplate/index.html>. Acessada em fevereiro de 2017.
- <https://drive.google.com/open?id=0B1vZRL3RwwcxNHQzZjdBMkpaS-zQ>. Acessada em fevereiro de 2017.
- Moraes, E. P.; da Silva, N. S.; de Morais, C. D. L.; Neves, L. S. D.; Lima, K. M. D.; *J. Chem. Educ.* **2014**, *91*, 1958.
- Moraes, E. P.; Confessor, M. R.; Gasparotto, L. H. S.; *J. Chem. Educ.* **2015**, *92*, 1696.
- Damaseno, D.; Toledob, T. G.; Godinho, M. S.; da Silva, C. P.; de Oliveira, S. B.; de Oliveira, A. E.; *Quim. Nova* **2015**, *38*, 836.
- Byoung-Yong, C.; *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 549.