

Artigo Científico

ANÁLISES COLORIMÉTRICAS EM CASA USANDO UM SMARTPHONE: UMA ESTRATÉGIA PARA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS DE MÉRITO EM TEMPOS DE PANDEMIA

At-home colorimetric analysis using a smartphone: a strategy for analytical figures of merit determination in pandemic times

da Rocha, P. A. M. B.¹, Freitas-Junior, A. S. Q.¹, Mello, A. A.¹, da Luz, E. R.^{1*}

¹Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), 26530-060, Nilópolis, RJ, Brasil.

Submetido em: 22.03.2022; Aceito em: 27.07.2022; Publicado em: 23.12.2022.

*Autor para correspondência: elaine.luz@ifrj.edu.br

Resumo: Durante a pandemia de COVID-19, o presente projeto foi proposto a dois alunos do Curso Técnico em Química do *campus* Nilópolis do IFRJ, que abraçaram a ideia de realizar experimentos em casa, usando a câmera de um *smartphone*, soluções de corantes alimentícios e aplicativos de medição de cores. Embora não tenha sido possível uma comparação estatística com os resultados obtidos com um espectrofotômetro, os experimentos foram direcionados para a verificação da influência das condições experimentais sobre os resultados da análise e para a simulação da validação de um método analítico. Estudos preliminares com corantes azul, verde e vermelho e com os aplicativos ColorMeter, Color Grab e PhotoMetrix PRO levaram a escolha por fazer a determinação dos parâmetros analíticos de mérito para o corante vermelho, usando o canal G (do sistema de cores RGB) do aplicativo PhotoMetrix PRO, com fundo branco e uma iluminação secundária. Curvas analíticas na faixa de 0,80 a 4,0 $\mu\text{cc mL}^{-1}$ (micro colher de chá por mililitro) foram obtidas com R^2 entre 0,9714 e 0,9891 com comportamento homocedástico confirmado pelo teste de Cochran. Os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo teste da percepção visual, sendo 0,32 e 1,1 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, respectivamente. Para os níveis de concentração de 1,2 e 2,4 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, a precisão intermediária entre dias foi de 8,9 e 8,3%, respectivamente. Já os valores de recuperação variaram entre 99 e 120% para o nível de fortificação de 1,2 $\mu\text{cc mL}^{-1}$ e entre 102 e 104% para o nível de fortificação de 2,4 $\mu\text{cc mL}^{-1}$. A metodologia alternativa para a simulação do desenvolvimento e da validação de um método analítico em casa, de acordo com os critérios estabelecidos pelo INMETRO, foi considerada adequada e promissora. Além disso, o experimento relatado pode ser prontamente adaptado para vários objetivos de aprendizagem de química analítica.

Palavras-chave: smartphone; colorimetria; PhotoMetrix; experimentos em casa.

Abstract: During the COVID-19 pandemic, the present project was proposed to two students of the Technical Course in Chemistry of the Nilópolis *campus* of IFRJ, who accepted the idea of conducting at home experiments, using a smartphone camera, food coloring solutions and color measurement apps. Although a statistical comparison with the results obtained with a spectrophotometer was not possible, the experiments were directed to verify the influence of experimental conditions on the results of the analysis and to the simulation of the validation of an analytical method. Preliminary studies with blue, green and red dyes and with the ColorMeter, Color Grab and PhotoMetrix PRO apps led to the choice by determining the analytical parameters of merit for the red dye, using the G channel (of the RGB color system) of the PhotoMetrix PRO application, with white background and secondary lighting. Analytical curves in the range of 0.8 to 4.0 $\mu\text{tp mL}^{-1}$ (micro teaspoon per milliliter) were obtained with R^2 between 0.9714 and 0.9891 with homoscedastic behavior confirmed by Cochran's test. The limits of detection and quantification were determined by the visual perception test, being 0.32 and 1.1 $\mu\text{tp mL}^{-1}$, respectively. For concentration levels of 1.2 and 2.4 $\mu\text{tp mL}^{-1}$, the intermediate accuracy between days was 8.9 and 8.3%, respectively. Recovery values ranged from 99 to 120% for the fortification level of 1.2 $\mu\text{tp mL}^{-1}$ and between 102 and 104% for the fortification level of 2.4 $\mu\text{tp mL}^{-1}$. The alternative methodology for simulating the development and validation of an analytical method at home, according to the criteria established by INMETRO, was considered adequate and promising. In addition, the reported experiment can be readily adapted to various learning goals of analytical chemistry.

Keywords: smartphone; colorimetry; PhotoMetrix; at home experiments.

INTRODUÇÃO

Movidos pela pandemia de COVID-19, as instituições de ensino técnico e superior se esforçavam para fazer a transição para plataformas virtuais de aprendizagem durante o ano de 2020 e para explorá-las da melhor maneira possível em 2021. Ao mesmo tempo, os professores de laboratório de química foram desafiados a desenvolver abordagens inovadoras para levar a aprendizagem de laboratório aos alunos. Como professoras, ensinando Análise Instrumental no IFRJ, aprendemos sobre vários recursos como simulações e demonstrações gravadas em vídeo, mas encontramos poucos exemplos de experimentos de análise quantitativa que pudessem ser realizados em casa. Pensando nisso, o presente projeto foi proposto a dois alunos do Curso Técnico em Química do *campus* Nilópolis do IFRJ, que abraçaram de pronto a ideia de realizar experimentos em casa, usando a câmera digital de um *smartphone*, soluções de corantes alimentícios de concentrações variadas e aplicativos de medição de cores. Os seus resultados são a base deste artigo e evoluíram até a simulação da validação de um método analítico.

Em geral, as análises com *smartphones* são atraentes porque são compactas, portáteis e fáceis de usar e, presumindo que o analista já possua um *smartphone*, são geralmente de baixo custo. Como resultado, os *smartphones* são ferramentas promissoras para uso em análises de campo em regiões remotas e países em desenvolvimento (DESTINO & CUNNINGHAM, 2020). Eles têm encontrado aplicações em diferentes áreas, incluindo monitoramento da qualidade da água, agricultura e sensoriamento químico e biológico.

No entanto, o desenvolvimento de espectrômetros baseados em *smartphones* pode ser uma tarefa desafiadora em cenários da vida real, pois várias condições podem influenciar o processo de avaliação quantitativa, tais como a luz ambiente e a independência do dispositivo. No entanto, diversas abordagens já foram propostas para superar tais desafios e melhorar o desempenho da análise colorimétrica baseada em *smartphones* (KILIÇ *et al.*, 2018).

Os recentes avanços nas tecnologias de aquisição e processamento de imagens, bem como a popularização de equipamentos e aplicações móveis para tais fins têm chamado a atenção da comunidade científica. O uso de imagens digitais tem tido eficácia comprovada em aplicações que antes eram restritas a equipamentos específicos, como colorímetros, espectrofotômetros e fluorímetros. Uma imagem digital é composta por pixels e pode ser definida por uma função bidimensional da intensidade da luz refletida ou emitida por uma cena, definida como uma distribuição de energia luminosa, na qual parte dessa energia é absorvida, parte transmitida e parte refletida, e essas duas últimas partes podem ser capturadas por um dispositivo (HELFER *et al.*, 2017).

A teoria da percepção das cores pelo olho humano é baseada em uma hipótese formulada por Thomas Young em 1801, que afirma que os cones (células fotossensíveis da retina junto com os bastonetes) são subdivididos em três grupos apresentando diferentes picos de sensibilidade situados em torno do vermelho (R), verde (G) e azul (B). Assim, todas as sensações de cores percebidas pelo olho humano são combinações de intensidades de estímulos recebidos por cada um desses tipos de cones. Embora o modelo de cores RGB seja o utilizado com mais frequência, existem outros modelos que podem ser gerados a partir dele, como matiz, saturação e valor (HSV), matiz, saturação e luminosidade (HSL) e matiz, saturação e intensidade (HSI) (GONZALES & WOODS, 2008).

Matiz é o que a maioria das pessoas entende por cor, por exemplo, a distinção entre vermelho e amarelo. Saturação é a quantidade de cor que está presente, por exemplo, a distinção entre vermelho e rosa. Valor, luminosidade ou intensidade é a quantidade de luz, como a distinção entre vermelho escuro e vermelho claro ou entre cinza escuro e cinza claro. O valor é definido como a quantidade máxima de R, G ou B, a intensidade como a média da quantidade de R, G e B e a leveza como a média das quantidades máxima e mínima de R, G ou B (RUSS, 2011).

Em trabalhos recentes, diferentes pesquisadores têm utilizado a análise de imagens como ferramenta analítica em diversos campos do conhecimento, tais como: controle da qualidade de fármacos (CHOODUM *et al.*, 2014; COUTINHO *et al.*, 2017; DA SILVA & BORGES, 2019; DOS SANTOS, S. D. C. *et al.*, 2021), quantificação de metais (FIRDAUS *et al.*, 2014; COLZANI *et al.*, 2017; LOURENÇO *et al.*; 2021); fertilizantes (SOUZA *et al.*, 2019), explosivos (SALLES *et al.*, 2014), controle da qualidade da água (JARUJAMRUS *et al.*, 2018; PLACIDO, 2017; BAUMANN *et al.*, 2019), alimentos (BÖCK, 2018) e combustíveis (SOARES *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2020).

Nos dias atuais, muitos alunos possuem um *smartphone* e tem o hábito de instalar aplicativos gratuitos. Além disso, eles ficam bastante animados com a ideia de usar tais aplicativos durante um experimento num laboratório de química. Embora os resultados não sejam sempre tão precisos quanto os esperados com um espectrofotômetro, os resultados obtidos com a câmera de um *smartphone* são bons o suficiente para diversas aplicações. Outro benefício dessa abordagem é que os alunos podem ver com os olhos o que estão medindo e entender mais facilmente o fenômeno, o que não acontece com um espectrofotômetro (MONTANGERO, 2014). Além disso, em tempos de pandemia, esta ferramenta é mais do que útil e atrativa para que os alunos possam realizar experimentos em casa, usando materiais que possam ser adquiridos facilmente, tais como corantes alimentícios.

Os corantes alimentícios são utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica para melhorar a aparência dos alimentos e dos medicamentos. Podem ser: orgânicos sintéticos, orgânicos naturais, inorgânicos e caramelo. Os corantes não são excipientes essenciais na composição dos medicamentos, pois apenas melhoram o aspecto visual do produto. Assim, quando possível, essas substâncias devem ser evitadas para minimizar o risco do aparecimento de efeitos adversos (ARAUJO & BERIN, 2012).

Os corantes sintéticos são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêutica, pois apresentam um bom comportamento em relação a variações de temperatura, incidência de luz e presença de oxigênio, além de possibilitar uma cor intensa ao produto. No entanto, alguns estudos apontam para indícios de reações adversas devido ao consumo desses aditivos, como o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, reações alérgicas, indução de hiperatividade e mudanças de comportamento em crianças. A sua inocuidade passou a ser questionada com maior intensidade, levando à proibição, em alguns países, do uso desses corantes em alimentos (MORAES *et al.*, 2017).

No Brasil, o Ministério da Saúde permite o uso de 11 corantes artificiais em alimentos e fármacos. As concentrações permitidas são estabelecidas de forma rigorosamente controlada e dependem do corante e do produto ao qual será aplicado. Os corantes sintéticos permitidos pela legislação brasileira são Amarantho, Vermelho de Eritrosina, Vermelho Allura (ou Vermelho 40), Ponceau 4R, Amarelo Crepúsculo, Amarelo Tartrazina, Azul de Indigotina, Azul Brillante, Azorrubina, Verde Rápido e Azul Patente V (BRASIL, 1999).

Dentre os corantes sintéticos podemos destacar como os mais utilizados no Brasil os do tipo Azo e os Trifenilmetanos. A classe de corantes Azo compreende vários compostos que apresentam um anel naftaleno ligado a um segundo anel benzeno por uma ligação azo (N=N). Esse grupo representa os corantes sintéticos mais utilizados em alimentos. Pertencem a essa classe os corantes Vermelho Allura, Amarelo Tartrazina e Amarelo Crepúsculo, apresentados na Figura 1. O grupo de corantes Trifenilmetanos tem estrutura básica de três radicais arila, ligados a um átomo de carbono central. Apresentam, ainda, grupos sulfônicos que lhes conferem alta solubilidade em água. Faz parte desta classe o corante azul brilhante (Figura 1) (MORAES *et al.*, 2017).

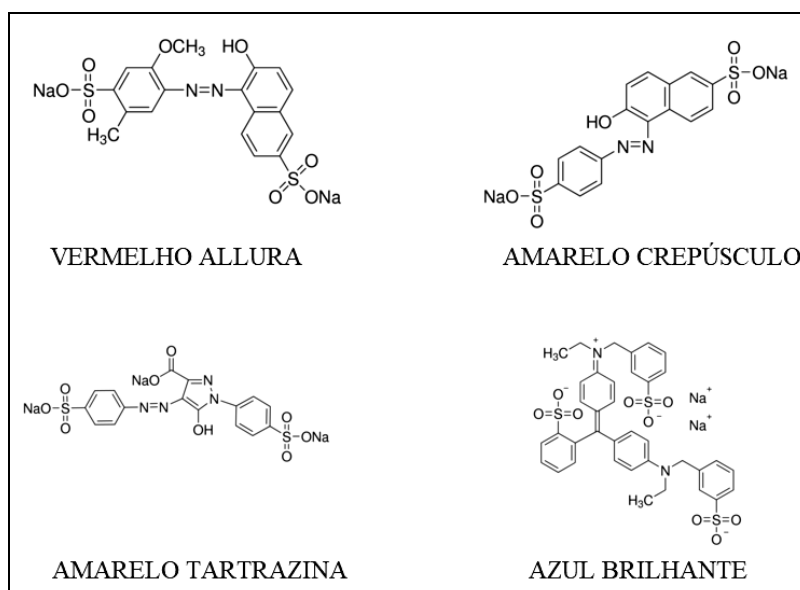


Figura 1. Estrutura química dos Corantes. FONTE: <https://www.sigmaldrich.com/BR/pt>

Os aplicativos gratuitos ColorMeter[®], Color Grab[®] e PhotoMetrix PRO[®], disponíveis para o sistema Android, podem ser usados para medir os parâmetros RGB e/ou HSV. Dessa forma, não seria necessário o uso de um espectrofotômetro para as medidas. O uso da câmera do celular associada a esses aplicativos permite ao analista realizar as medições, diminuindo o custo da metodologia.

O objetivo deste trabalho é avaliar o uso da câmera de um celular associado a um aplicativo de medição de cores para a realização de determinações espectrofotométricas em casa, usando corantes alimentícios e materiais simples. Embora não tenha sido possível uma comparação estatística com os resultados obtidos com um espectrofotômetro, pois todos os experimentos foram realizados em casa, os experimentos foram direcionados para a verificação da influência das condições experimentais sobre os resultados da análise e para a simulação da validação de um método analítico.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudos preliminares

Todos os experimentos foram realizados simultaneamente pelos dois alunos envolvidos no projeto, cada um em sua casa. As análises foram realizadas, preferencialmente, em dias ensolarados para minimizar a interferência da variação da luz ambiente nos resultados obtidos.

Três corantes alimentícios foram adquiridos em comércio local: vermelho (vermelho allura), azul (azul brilhante) e verde (mistura de amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina). Soluções estoque (SE) de cada corante foram preparadas utilizando água potável como solvente, uma colher medidora de cozinha correspondente a ½ colher de chá e um tubo graduado para centrífuga de 50 mL (Figura 2A).

A partir das soluções estoque foram feitas diluições para a confecção das curvas analíticas (Figura 2C), usando os mesmos tubos para centrífuga e uma seringa de plástico de 1 mL (Figura 2A) para medir os volumes das alíquotas. A unidade de concentração das soluções resultantes ficou como $\mu\text{cc mL}^{-1}$ (micro colher de chá por mL). Entre 6 e 9 soluções de cada corante foram preparadas com concentrações variando entre 0,16 e 4,0 $\mu\text{cc mL}^{-1}$.

Para a medição de todas as soluções, um aparato foi montado numa posição fixa na casa de cada aluno para diminuir a interferência da iluminação ambiente, evitar movimentos indesejados durante a captura das imagens, bem como fixar a distância entre a câmera e a solução analisada (Figura 2B). Todas as medidas foram feitas com o mesmo aparelho celular para cada aluno, visto que variações na qualidade da câmera poderiam interferir na sensibilidade do método. Todas as imagens foram capturadas sem *flash*, no modo automático de cada aplicativo, apenas ajustando a abertura para o máximo.

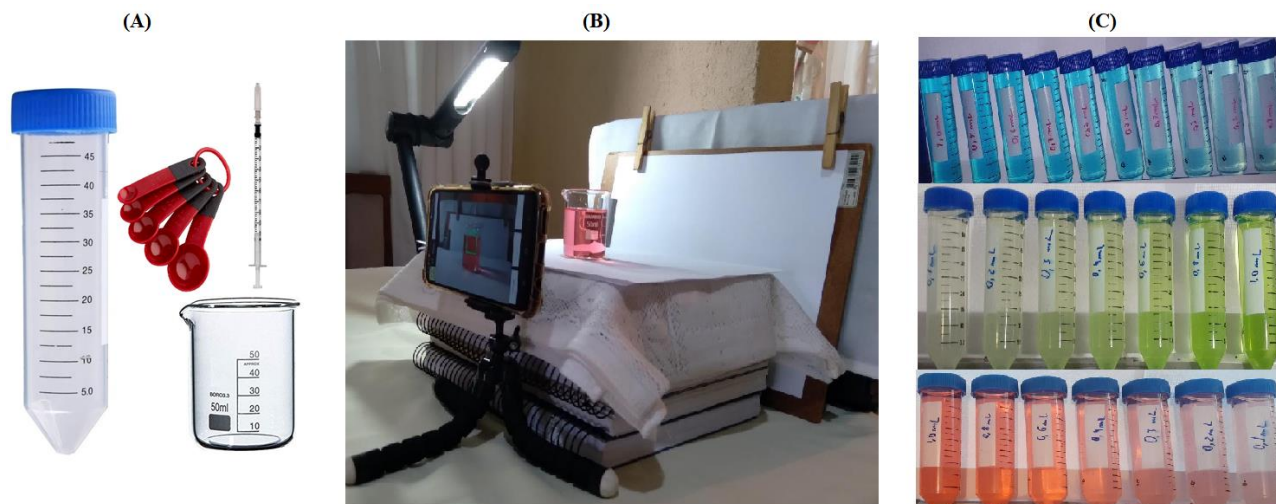


Figura 2. Desenvolvimento do método caseiro. (A) Utensílios usados para o preparo das soluções. (B) Configuração experimental: compartimento de amostra (bécher de 50 mL), *smartphone*, suportes, iluminação e fundo. (C) Fotografias das soluções dos corantes azul, verde e vermelho em vários níveis de concentração preparadas em casa.

Além disso, com o objetivo de melhorar o contraste da coloração das amostras e, conseqüentemente, melhorar a qualidade das imagens, um fundo de papel branco foi utilizado. Em alternativa ao fundo branco, um fundo verde também foi testado para o corante vermelho.

Os experimentos preliminares foram realizados com os três corantes de modo a obter os valores dos parâmetros S e V com o aplicativo Color Grab®, os parâmetros R, G e B com o aplicativo ColorMeter® e os parâmetros S, V, R, G e B com o aplicativo PhotoMetrix PRO®, para testar as potencialidades dos três aplicativos e a sensibilidade para cada cor. Além disso, as medidas foram feitas com e sem a utilização de uma iluminação secundária (luminária de mesa), como mostrado na Figura 2B.

As condições experimentais testadas para cada corante durante os ensaios preliminares estão apresentadas na Tabela 1. Todos os cálculos, tabelas, gráficos e testes estatísticos foram feitos usando o Microsoft® Excel®, em diferentes versões.

Tabela 1. Condições experimentais estudadas durante a etapa preliminar.

Corante	Fundo	Iluminação secundária	Aplicativo
Azul	Branco	Não	Color Grab e ColorMeter
Vermelho	Branco e Verde	Sim	PhotoMetrix PRO
Verde	Branco	Sim	PhotoMetrix PRO

Determinação dos parâmetros analíticos de mérito

No Brasil, um dos órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos é o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO), e o documento “ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS” (DOQ-CGCRE-008) foi utilizado neste trabalho (INMETRO, 2020). Os parâmetros utilizados para a validação foram: sensibilidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária entre dias) e exatidão (recuperação analítica).

Para a validação da metodologia foi utilizado apenas o corante vermelho, o aplicativo PhotoMetrix PRO® no canal RGB e o mesmo aparato apresentado na Figura 2B. As medidas foram realizadas com o fundo branco e uma luminária de mesa como iluminação secundária. Os valores para validação das análises realizadas no PhotoMetrix PRO® foram obtidos diretamente do aplicativo e posteriormente tratados no programa Excel.

A partir da solução estoque do corante vermelho ($0,01 \text{ cc mL}^{-1}$), uma solução de concentração intermediária ($200 \text{ } \mu\text{cc mL}^{-1}$) foi preparada e chamada de solução mãe (SM). A partir da SM foram preparados 50 mL de cada uma das soluções padrão descritas na Tabela 2, em triplicata, usando água potável como solvente. A leitura das soluções da curva analítica e do branco foram realizadas em ordem aleatória.

Tabela 2. Protocolo do preparo das soluções padrão.

	SM (mL) ^(a)	V _{final} (mL)	C ($\mu\text{cc mL}^{-1}$) ^(b)
Branco	0	50	0
Padrão 1	0,20	50	0,80
Padrão 2	0,40	50	1,6
Padrão 3	0,60	50	2,4
Padrão 4	0,80	50	3,2
Padrão 5	1,00	50	4,0

(a) SM = solução mãe $200 \text{ } \mu\text{cc mL}^{-1}$. (b) Para todos os níveis de concentração, $n = 3$.

Para aplicar uma regressão linear simples com as medidas obtidas com o aplicativo *versus* os valores de concentração das soluções padrão é necessário verificar se os erros da regressão linear possuem variância constante, ou seja, comportamento homocedástico. A hipótese de homocedasticidade pode ser verificada tanto pela avaliação visual dos resíduos quanto por meio de testes estatísticos.

Os gráficos dos resíduos foram construídos para verificar se há comportamento aleatório. Resíduo é a diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta de regressão para cada valor de x. Caso se observe alguma tendência no gráfico de resíduos, pode haver indício de que o modelo linear seja inadequado (INMETRO, 2020). Além disso, a análise do gráfico de resíduos permite que seja detectado anomalias no ajuste da curva como amostras atípicas, variância inconstante e correlação entre os erros (LOURENÇO, 2021).

Além disso, para verificar a hipótese de igualdade das variâncias foi utilizado o teste de Cochran, que é aplicado apenas quando todos os desvios padrão são obtidos a partir de um mesmo número de resultados em condições de repetibilidade (MILLER, 2010). O teste de Cochran compara a maior variância com as demais, calculando-se $C_{\text{calculado}}$ (Equação 1) e comparando-se com C_{tabelado} .

$$C_{\text{calculado}} = \frac{s_{\text{máx}}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$C_{\text{calculado}}$ = valor calculado da estatística do Teste de Cochran;

$s_{\text{máx}}^2$ = maior variância;

s_i^2 = variância amostral;

k = número de níveis do fator;

n = número de medidas em cada nível do fator.

Caso o valor de $C_{\text{calculado}}$ seja inferior ao valor de C_{tabelado} , as variâncias podem ser consideradas homogêneas conforme o aumento da concentração. Esse resultado indica que ao longo da faixa de concentração estudada o modelo tem um comportamento homocedástico e as curvas de calibração podem ser determinadas através de regressão linear simples.

O limite de detecção foi determinado através do teste de avaliação visual que se baseia na percepção da resposta da concentração do analito ou da propriedade observada. O limite de detecção é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas do analito e pela definição de um nível mínimo em que o analito pode ser detectado com confiança. Normalmente são realizadas sucessivas diluições até se encontrar a menor concentração que pode ser diferenciado do branco (INMETRO, 2020).

Para isso, preparou-se várias soluções com concentrações variando entre 0,080 e 0,80 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, a partir da SM cinco vezes diluída. A análise com o PhotoMetrix PRO gera uma tabela de cores que pode ser utilizada para essa comparação visual entre as cores das soluções testadas e o branco. O limite de detecção foi determinado como a concentração da primeira solução a diferir visualmente do branco. Já o limite de quantificação foi determinado a partir do limite de detecção, por meio da Equação 2 (INMETRO, 2020):

$$LD = LQ / 3,3 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

LD = limite de detecção;

LQ = limite de quantificação.

A avaliação da precisão foi feita através da repetibilidade e da precisão intermediária entre dias. A repetibilidade foi determinada em três níveis de concentração, 1,2, 2,4 e 4,0 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, com seis repetições para cada nível (n = 6). A repetibilidade foi estimada pelo desvio padrão relativo (Equação 3).

$$DPR\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

DPR% = desvio padrão relativo;

s = desvio padrão;

\bar{x} = média obtida a partir de 6 réplicas de amostras.

Já a precisão intermediária entre dias foi avaliada em dois níveis de concentração, 1,2 e 2,4 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, com seis repetições para cada nível ($n = 6$), em dois dias diferentes. A precisão intermediária foi calculada por meio da Equação 4 (INMETRO, 2020).

$$Spi_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

Equação 4

Onde:

Spi = precisão intermediária;

$t = 2$ dias diferentes;

$n = 6$ ensaios efetuados por amostra;

$j = \text{n}^\circ$ da amostra, $j = 1$ a 2 ;

$k = \text{n}^\circ$ do ensaio da amostra j , $k = 1$ a 6 ;

y_{jk} = valor do resultado k para a amostra j ;

\bar{y}_j = média aritmética dos resultados da amostra j .

A estimativa da exatidão foi feita através de ensaios de recuperação. A recuperação de um analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três níveis de concentração (baixa, média e alta) da faixa de uso do método (INMETRO, 2020).

Uma pesquisa foi realizada para encontrar um produto farmacêutico que tivesse em sua composição apenas o corante vermelho allura e fosse acessível economicamente. Um medicamento genérico “Paracetamol Bebê” sabor cereja 100 mg/mL foi escolhido como amostra, uma vez que atendia aos requisitos citados acima. As soluções utilizadas nos ensaios de recuperação foram feitas em triplicata e estão apresentadas na Tabela 3. A recuperação foi calculada segundo a Equação 5.

$$Rec\% = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Equação 5

Onde:

Rec% = recuperação;

C_1 = Concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 = Concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

Tabela 3. Protocolo do preparo das soluções utilizadas nos ensaios de recuperação.

$V_{\text{medicamento}}$ (mL)	SM (mL) ^(a)	V_{final} (mL)	$C_{\text{fortificação}}$ ($\mu\text{cc mL}^{-1}$) ^(b)
1	0	50	0,0
1	0,20	50	0,8
1	0,30	50	1,2
1	0,40	50	1,6
1	0,60	50	2,4

(a) SM = solução mãe 200 $\mu\text{cc mL}^{-1}$. (b) Para todos os níveis de concentração, $n = 3$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos preliminares

O objetivo desta etapa do trabalho, além de proporcionar treinamento aos estudantes, era verificar a influência das condições experimentais, avaliar qual parâmetro medido fornecia maior sensibilidade para cada um dos corantes analisados e se as médias fornecidas pelos três aplicativos testados eram equivalentes. Não foi realizado nenhum planejamento experimental e nenhum teste estatístico nesta etapa. Foram avaliadas apenas as curvas analíticas em termos de sensibilidade, através do coeficiente angular da reta, e de linearidade, através do coeficiente de determinação (R^2).

Parte dos resultados obtidos nesta etapa estão apresentados nas Figuras 3 a 6. Nas figuras 3 e 4, relativas aos resultados para o corante azul obtidos com os aplicativos ColorMeter e Color Grab, respectivamente, podemos observar lado a lado os resultados obtidos pelos dois alunos envolvidos no projeto e percebemos diferenças significativas em termos de sensibilidade e linearidade, que podemos relacionar à qualidade da câmera digital utilizada e à diferença na habilidade dos estudantes no preparo das soluções. No entanto, percebemos que as curvas analíticas obedecem a um mesmo perfil nos dois casos.

Para o corante azul, o parâmetro que apresentou maior sensibilidade foi o vermelho (R), indicando ser esta a cor mais absorvida. A cor é uma propriedade importante de uma substância e a cor da matéria está relacionada à sua capacidade de absorção ou reflexão da luz. Soluções e objetos coloridos contêm uma ou mais substâncias que absorvem parte da luz visível. Desse modo, a luz que emerge (transmitida ou refletida) por um material qualquer possui o conjunto de todos os comprimentos de onda que foram menos absorvidos por ele, determinando assim a sua cor (ARAÚJO, 2021). A cor vista pelo olho humano é dita como sendo a cor complementar daquela que é absorvida, conforme mostrado na Figura 7 (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016). Também para o corante azul os parâmetros S e V forneceram resultados inferiores no quesito linearidade.

Nas Figuras 5 e 6 observamos os resultados preliminares para os corantes verde e vermelho, respectivamente, obtidos com o aplicativo PhotoMetrix PRO. A partir daqui uma luminária de mesa passou a ser utilizada como iluminação secundária o que levou a uma melhora significativa na linearidade, principalmente dos parâmetros S e V.

Para o corante vermelho a curva analítica também foi obtida usando um fundo verde no lugar do fundo branco. No entanto, os resultados obtidos foram inferiores tanto em termos de sensibilidade quanto em termos de linearidade.

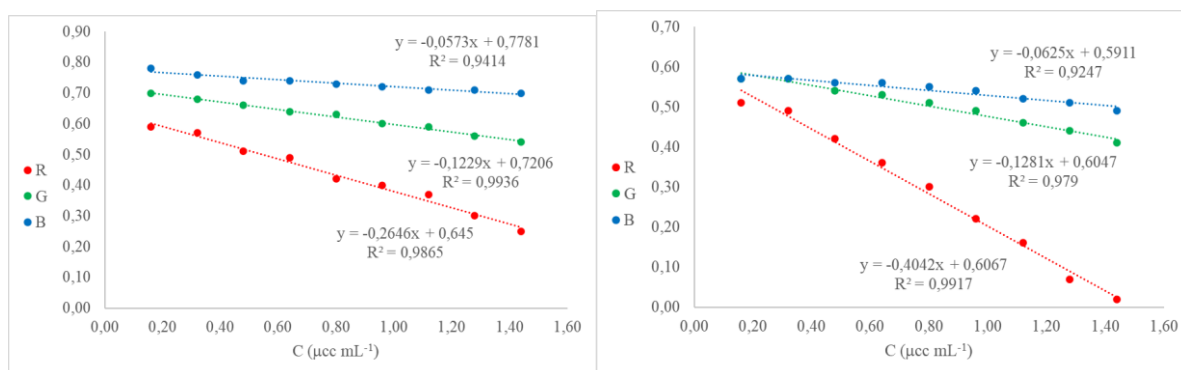


Figura 3. Curvas analíticas preliminares para o corante azul na faixa de concentração entre 0,16 e 1,4 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, obtidas pelos alunos Anderson (esquerda) e Pedro (direita) com os parâmetros R, G e B medidos com o aplicativo ColorMeter, utilizando um fundo branco sem iluminação secundária.

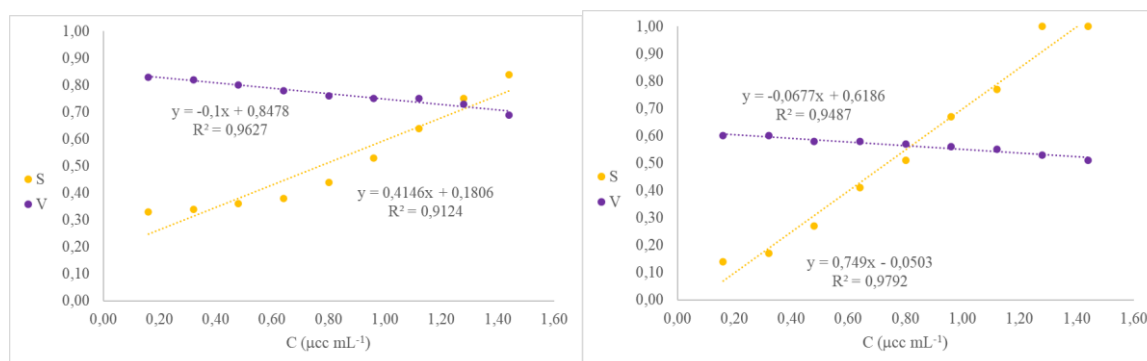


Figura 4. Curvas analíticas para o corante azul na faixa de concentração entre 0,16 e 1,4 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, obtidas pelos alunos Anderson (esquerda) e Pedro (direita) com os parâmetros S e V medidos com o aplicativo Color Grab, utilizando um fundo branco sem iluminação secundária.

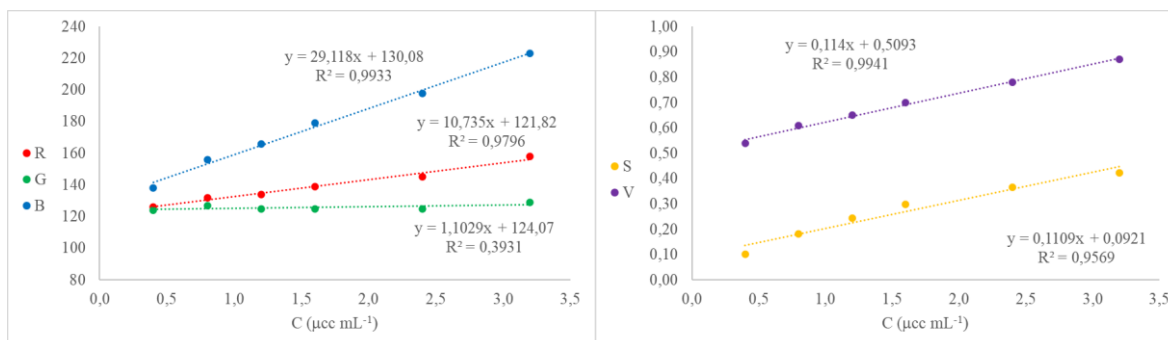


Figura 5. Curvas analíticas para o corante verde na faixa de concentração entre 0,40 e 3,2 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, obtidas pelo aluno Pedro com os parâmetros R, G e B (esquerda) e S e V (direita) medidos com o aplicativo PhotoMetrix PRO, utilizando um fundo branco e uma luminária de mesa como iluminação secundária.

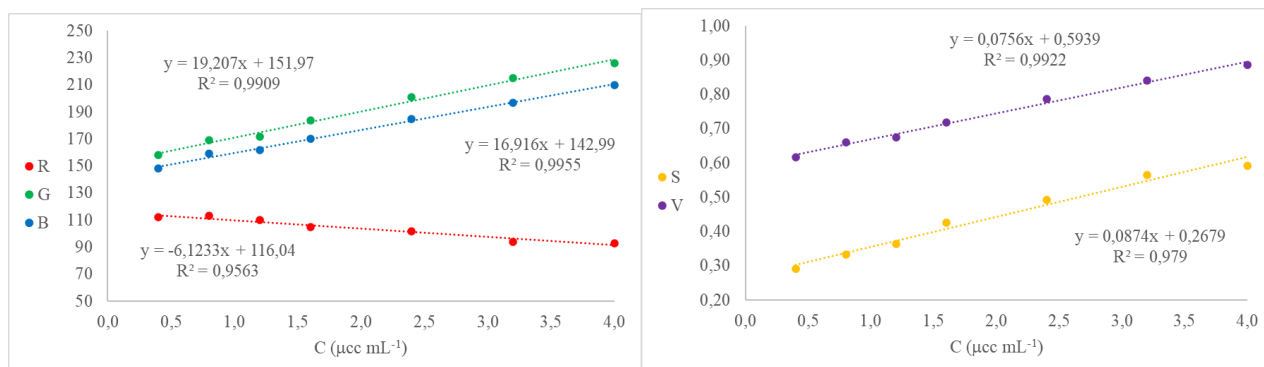


Figura 6. Curvas analíticas para o corante vermelho na faixa de concentração entre 0,40 e 4,0 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, obtidas pelo aluno Anderson com os parâmetros R, G e B (esquerda) e S e V (direita) medidos com o aplicativo PhotoMetrix PRO, utilizando um fundo branco e uma luminária de mesa como iluminação secundária.

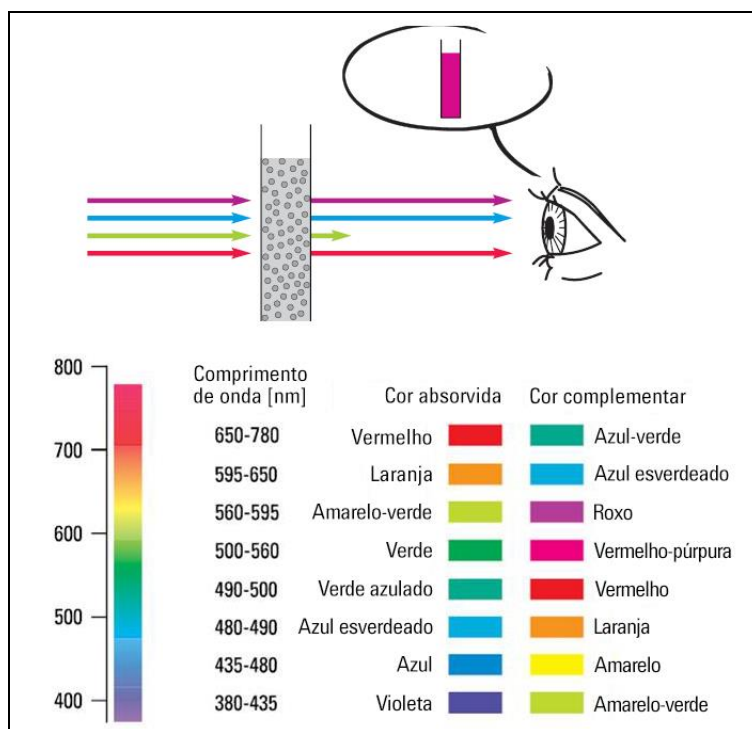


Figura 7. Transmissão e cor (acima). Absorvância e cores complementares (abaixo).

FONTE: AGILENT TECHNOLOGIES, 2016.

Assim como foi observado para o corante azul, observamos para o corante verde, que na verdade é uma mistura dos corantes amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina, que o parâmetro que forneceu maior sensibilidade foi o B (azul), correspondendo a cor mais intensamente absorvida pelos corantes amarelos. O mesmo ocorreu para o corante vermelho que apresentou maior sensibilidade para o parâmetro G (verde).

A Figura 8 apresenta os espectros de absorção de alguns corantes alimentícios obtidos por CAMPOS (2014) com os quais podemos confirmar o que foi apresentado na **Figura 7**. Segundo os resultados obtidos por Campos, o máximo de absorção do corante azul brilhante (628 nm) está na região do laranja; os máximos de absorção dos corantes amarelo crepúsculo e amarelo tartrazina (482 e 426 nm, respectivamente) estão na região do azul; e o máximo de absorção do corante vermelho 40 (510 nm) está na região do verde.

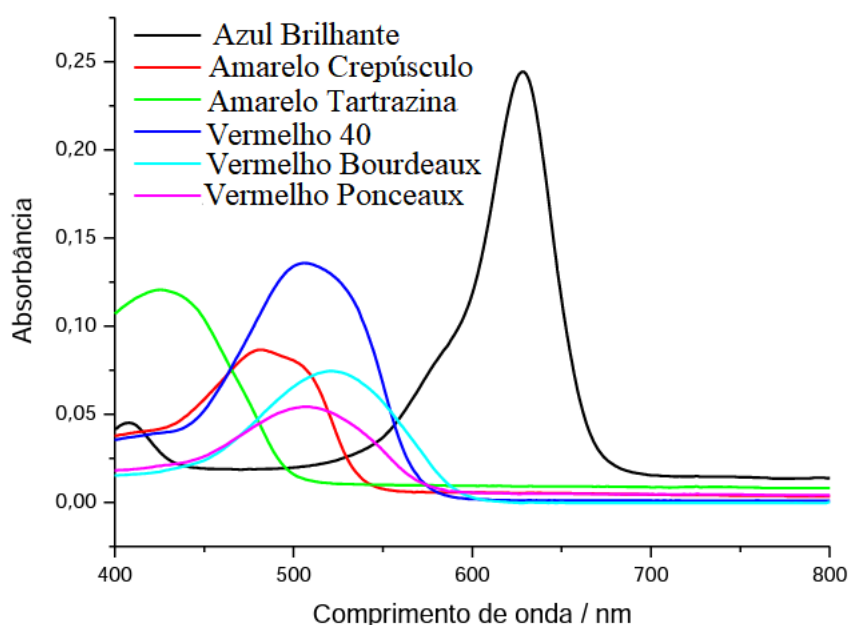


Figura 8. Espectros de absorção molecular de alguns corantes na região do visível.

FONTE: Adaptado de CAMPOS, 2014.

Sobre os aplicativos testados, embora os três forneçam medidas equivalentes do ponto de vista quantitativo, o aplicativo PhotoMetrix PRO mostrou-se o mais interessante para esta aplicação, pois foi programado para realizar análises colorimétricas na área da química analítica, diferentemente do ColorMeter e do Color Grab. Por isso, apresentou algumas vantagens no decorrer do projeto, tais como fornecer os resultados dos parâmetros de maneira mais rápida, enviar os resultados por e-mail e gerar os gráficos das curvas analíticas. Além disso, uma funcionalidade que acabou sendo bastante útil é que ele gera uma tabela com a diferenciação das cores da curva analítica analisada, ajudando na determinação do limite de detecção na etapa de validação do método.

Com base no que foi discutido até aqui, optou-se por fazer a determinação dos parâmetros analíticos de mérito para o corante vermelho, usando o canal RGB do aplicativo PhotoMetrix PRO, com fundo branco e iluminação secundária. Tal escolha está baseada na qualidade dos resultados obtidos para esse corante nessas condições e pelas funcionalidades adicionais do aplicativo escolhido. No entanto, apenas os resultados obtidos com as medidas de G, que representa a cor mais absorvida pelo corante, serão apresentadas neste artigo.

Determinação dos parâmetros analíticos de mérito

Validar um método analítico é um processo demorado que requer muitos experimentos e cálculos estatísticos, além de, em muitos casos, implicar em custos elevados. Utilizar as medidas obtidas com um aparelho celular e materiais alternativos para a simulação de experimentos em espectrofotometria e validação de métodos analíticos garante uma gama de possibilidades em termos de experiência, aprendizado e construção de conhecimento.

O objetivo da validação é demonstrar que um determinado método analítico proposto é adequado ao que se propõe. Um método é considerado validado quando é avaliado segundo uma série de parâmetros estabelecidos, tais como linearidade, precisão e exatidão, e apresenta o desempenho esperado.

Linearidade

A Figura 9 mostra as curvas analíticas na faixa de 0,80 a 4,0 $\mu\text{cc mL}^{-1}$ obtidas para o método proposto pelos alunos Pedro e Anderson, e seus respectivos gráficos de resíduos. Ambos os estudantes obtiveram curvas analíticas com boa linearidade, com valores de R^2 maiores que 0,97. Além disso, os gráficos de resíduos apresentaram um comportamento aleatório e com baixa dispersão.

Os valores de $C_{\text{calculado}}$ para as duas curvas apresentadas foram inferiores ao valor de C_{tabelado} , mostrando variâncias homogêneas conforme o aumento da concentração. Esse resultado indica que ao longo da faixa de concentração estudada o modelo tem um comportamento homocedástico. Como o teste mostrou que as variâncias são estatisticamente equivalentes, as curvas de calibração puderam ser determinadas através de regressão linear simples.

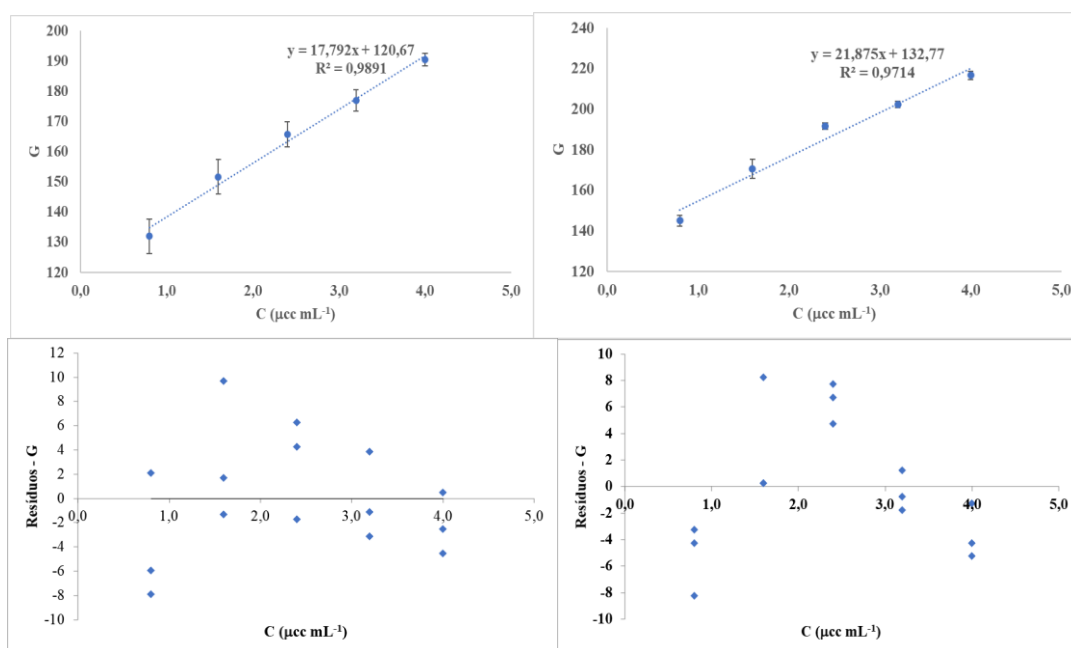


Figura 9. Curvas analíticas para o corante vermelho na faixa de concentração de 0,80 a 4,0 $\mu\text{cc mL}^{-1}$ empregando os valores do parâmetro G obtidas pelos analistas Anderson (esquerda) e Pedro (direita) com o aplicativo PhotoMetrix PRO e seus respectivos gráficos de resíduos.

Limites de detecção e quantificação

O aplicativo PhotoMetrix PRO fornece uma escala de cores das soluções analisadas (Figura 10). A partir disso foi possível determinar os limites de detecção e de quantificação pelo teste da percepção visual. Observa-se na Figura 10 que apenas a partir da solução de concentração 0,32 $\mu\text{cc mL}^{-1}$ foi possível discriminar entre a cor da solução e a cor do branco. Com base nessa observação o LD foi considerado igual a 0,32 $\mu\text{cc mL}^{-1}$ e o LQ igual a 1,1 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, de acordo com a Equação 2.

Caliber: 1 Concentration:	Soluções padrão	C ($\mu\text{cc mL}^{-1}$)
Caliber: 2 Concentration:	Caliber: 1 Concentration:	0,080
Caliber: 3 Concentration:	Caliber: 2 Concentration:	0,16
Caliber: 4 Concentration:	Caliber: 3 Concentration:	0,24
Caliber: 5 Concentration:	Caliber: 4 Concentration:	0,32
Branco	Caliber: 5 Concentration:	0,40
	Caliber: 6 Concentration:	0,48
	Caliber: 7 Concentration:	0,56
	Caliber: 8 Concentration:	0,64
	Caliber: 9 Concentration:	0,72
	Caliber: 10 Concentration:	0,80

Figura 10. Representação da coloração obtida da análise de 5 replicatas do branco (esquerda), e das cores obtidas com soluções padrão com concentração variando entre 0,080 e 0,80 $\mu\text{cc mL}^{-1}$.

Repetibilidade e precisão intermediária

A Tabela 2 apresenta os dados de repetibilidade e precisão intermediária entre dias obtidos pelos dois estudantes. Nota-se que para ambos os analistas os maiores desvios padrão relativos foram obtidos na concentração de 1,2 $\mu\text{cc mL}^{-1}$, que está bem próxima do limite de quantificação (1,1 $\mu\text{cc mL}^{-1}$). Além disso, para esse nível de concentração houve uma diferença significativa entre as repetibilidades obtidas pelos dois estudantes. No entanto, considerando que o material utilizado para o preparo das soluções está longe de ser considerado de precisão, podemos afirmar que os resultados obtidos foram satisfatórios, com a precisão intermediária entre dias variando entre 8,3 e 8,9%.

Tabela 2. Resultados obtidos pelos dois analistas para repetibilidade e precisão intermediária entre dias.

C ($\mu\text{cc mL}^{-1}$)	DPR% ^(a)		DPR% (Spi) ^(b)	
	Anderson	Pedro	Anderson	Pedro
1,2	16	7,7	--	8,9
2,4	5,0	5,1	8,3	--
4,0	2,9	3,4	--	--

(a) $n = 6$; (b) $n = 6$ e $t = 2$.

Exatidão

Antes de iniciar os ensaios de recuperação, foi necessário testar uma diluição do medicamento de tal modo que a coloração observada estivesse dentro da faixa linear de trabalho estabelecida ($1,1$ a $4,0 \mu\text{cc mL}^{-1}$). A diluição do medicamento foi feita de uma alíquota de $1,0 \text{ mL}$ para um volume final de 50 mL e a solução resultante está apresentada na Figura 11, junto com as soluções de medicamento com fortificação de $0,80$, $1,6$ e $2,4 \mu\text{cc mL}^{-1}$, respectivamente.

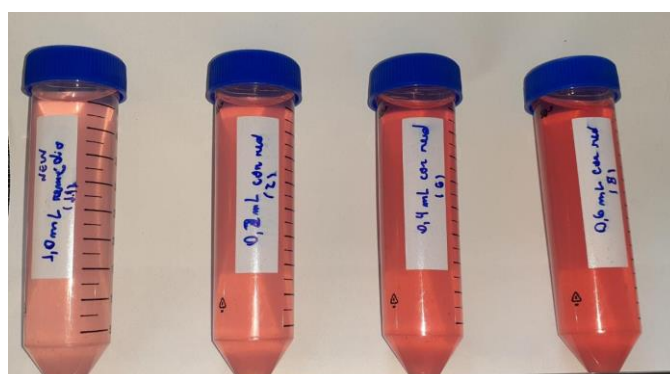


Figura 11. Solução do medicamento não fortificada (esquerda) e soluções do medicamento fortificadas nos níveis de concentração $0,80$, $1,6$ e $2,4 \mu\text{cc mL}^{-1}$.

Os resultados dos ensaios de recuperação estão apresentados na Tabela 3, onde podemos observar que o aluno Anderson obteve valores de recuperação variando entre 99 e 103% para os três níveis de fortificação testados, o que caracterizaria uma excelente exatidão para o método. Por outro lado, o aluno Pedro obteve valores mais altos, entre 104 e 121% . Uma estratégia que poderia ser adotada para verificar os resultados de recuperação do método seria aumentar a concentração da amostra não fortificada para que ela não fique tão próxima do limite de quantificação. Ainda assim, os resultados foram considerados satisfatórios devido à natureza do método avaliado.

Tabela 3. Resultados obtidos pelos dois analistas para os ensaios de recuperação.

Anderson			Pedro		
C _{fortificação} ($\mu\text{cc mL}^{-1}$)	C _{determinada} ($\mu\text{cc mL}^{-1}$)	Rec%*	C _{determinada} ($\mu\text{cc mL}^{-1}$)	Rec%*	
0	1,2	--	1,1	--	
0,80	--	--	2,0	121	
1,2	2,3	99	2,5	120	
1,6	2,8	103	2,8	111	
2,4	3,6	102	3,6	104	

*n = 3.

CONCLUSÃO

Relatamos aqui uma metodologia alternativa para a simulação do desenvolvimento e da validação de um método analítico, de acordo com os critérios estabelecidos pelo INMETRO, empregando a câmera de um *smartphone* e o aplicativo PhotoMetrix PRO®. Todos os experimentos foram realizados em casa e proporcionou aos alunos aprendizado e experiência significativos, pois, como uma tarefa baseada em investigação, os alunos foram forçados a pensar criticamente e a se envolver com todas as etapas do projeto, incluindo o planejamento, o preparo das soluções, as análises, o tratamento dos dados obtidos e a avaliação dos resultados.

Os experimentos descritos são acessíveis para a maioria dos alunos, exigindo poucos recursos além de uma câmera de *smartphone* e de um computador, enquanto reforça os objetivos de aprendizagem comuns cobertos em experimentos de desenvolvimento de métodos de análise em laboratório. Além disso, o experimento relatado pode ser prontamente adaptado para vários objetivos de aprendizagem de química analítica, dentre os quais podemos citar como exemplo o planejamento de experimentos.

Em uma próxima etapa do projeto pretende-se comparar os resultados obtidos em casa usando um *smartphone*, com resultados obtidos no laboratório com um espectrofotômetro, e os dados, as discussões e a conclusão oriundos desta comparação serão apresentados em um futuro trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao IFRJ *campus* Nilópolis pelo financiamento da pesquisa e às famílias dos alunos envolvidos no projeto pela compreensão e apoio durante a execução do projeto.

REFERÊNCIAS

- AGILENT TECHNOLOGIES. Princípios da Espectroscopia Molecular: Hardware. Academic & Institutional Research, 7 de março de 2016. Disponível em: https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/5991-6592_Agilent_Mol%20Spectroscopy_Hardware_PTBR.pptx. Acessado em 15 de março de 2022.
- ARAUJO ACF; BORIN MF. Influência de excipientes farmacêuticos em reações adversas a medicamentos. **Brasília Med.** 49(4), 267-278, 2012.
- ARAÚJO HC. *et al.* Análise Instrumental: Uma Abordagem Prática [E-book]. 1st ed. Rio de Janeiro: LTC; 2021. 400 p. ISBN: 9788521637295.. E-book (400 p.).

- BAUMANN L; LIBRELOTTO M; PAPPIS C; SANTOS RB; SANTOS RO; HELFER GA; LOBO EA; COSTA AB. Uso do aplicativo PhotoMetrix no monitoramento da concentração de flúor em sistemas alternativos de abastecimento de água. **Águas Subterrâneas**, **33** (2), 2019.
- BÖCK FC, HELFER GA., DA COSTA AB *et al.* Rapid Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded in Smartphone. **Food Anal. Methods** **11**, 1951–1957, 2018.
- BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária, Resolução no387, 05 de agosto de 1999. Aprova o "Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 5: Balas, Confeitos, Bombons, C. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de agosto de 1999, Brasília, DF, 1999.
- CAMPOS RPC. Desenvolvimento e Validação de Método de Quantificação de Corantes em amostras de Suco Artificial em Pó. [Tese de Doutorado]. Natal: Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2014. 168 f. Doutorado em Química.
- COLZANI H; SCOLARO AMT; GELINSKI JMLN; BORGES EM. Determinação de Manganês em Pilhas Utilizando um Scanner. **Rev. Virtual Quím.** **9** (4), 1672-1685, 2017.
- CHOODUM *et al.* Real time quantitative colourimetric test for methamphetamine detection using digital and mobile phone technology. **Forensic Science International** **235**, 8–13, 2014.
- COUTINHO MS *et al.* Colorimetric Determination of Ascorbic Acid Based on Its Interfering Effect in the Enzymatic Analysis of Glucose: An Approach Using Smartphone Image Analysis. **J. Braz. Chem. Soc.** **28** (12), 2500-2505, 2017.
- DA SILVA RS; BORGES EM. Quantitative Analysis Using a Flatbed Scanner: Aspirin Quantification in Pharmaceutical Tablets. **J. Chem. Educ.**, **96**, 1519–1526, 2019.
- DESTINO JF; CUNNINGHAM K. At-Home Colorimetric and Absorbance-Based Analyses: An Opportunity for Inquiry-Based, Laboratory-Style Learning. **J. Chem. Educ.** **2020** **97** (9), 2960-2966.
- DOS SANTOS SDC. *et al.* Determinação colorimétrica do teor de ferro em formulações farmacêuticas utilizando a câmera de um smartphone associada a aplicativos de medição de cores. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, **13**, 197-207, 2021.
- FIRDAUS MF *et al.* Determination of Chromium and Iron Using Digital Image-based Colorimetry. **Procedia Environmental Sciences**, **20**, 298 – 304, 2014.
- GONZALEZ RC; WOODS RE. Digital Image Processing; **Prentice Hall**: New Jersey, 2008, p. 954.
- HELFER GA *et al.* PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices. **J. Braz. Chem. Soc.** **28** (2), 328-335, 2017.
- INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**, DOQ-CGCRE-008, 9ª revisão, 2020.
- JARUJAMRUS P *et al.* Use of a Smartphone as a Colorimetric Analyzer in Paper-based Devices for Sensitive and Selective Determination of Mercury in Water Samples. **Analytical Science**. **34**(1), 75-81, 2018.
- KILIÇ, by V, HORZUM N; SOLMAZ ME. From Sophisticated Analysis to Colorimetric Determination: Smartphone Spectrometers and Colorimetry. **IntechOpen**. Open access peer-reviewed chapter. Published: November 22nd 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/64498>.
- LOURENÇO EC *et al.* Determinação do Teor de Ferro Utilizando o Aplicativo PhotoMetrix PRO®: a Tecnologia a favor do Ensino de Química. **Rev. Virtual Quím.** **13** (1), 2021.
- MONTANGERO M. Determining the Amount of Copper (II) Ions in a Solution Using a Smartphone. **J. Chem. Educ.** **92**, 1759-1762, 2015.
- MILLER JN; MILLER JC. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 6th ed., Pearson: Harlow, 2010.
- MORAES, ARF. *et al.* Sustentabilidade em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Corantes e medidas colorimétricas em alimentos. 127-154. UFV – *Campus* Paranaíba. Rio Paranaíba – MG, 2017.
- PLACIDO KM. Avaliação do uso de imagens digitais obtidas por smartphones para determinação de amônia total em águas [Trabalho de Conclusão de Curso]. Brasília: Instituto de Química, Universidade de Brasília; 2017. 34 s. Graduação em Química Tecnológica.
- RUSS JC *et al.* The Image Processing Handbook. 6th ed. Boca Raton: CRC Press; 2011. 972 p. ISBN: 1-4398-4045-0.
- SALLES MO; MELONI GN; DE ARAUJO WR; PAIXÃO TRLC. Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach. **Analytical Methods** **6**, 2047-2052, 2014.

SOUZA DM. *et al.* Uso do aplicativo Photometrix® para determinação de fosfato em fertilizantes: um recurso didático para o ensino de química analítica. 24º Seminário Internacional de Educação, Tecnologia e Sociedade: Ensino Híbrido; 2019; Online [Internet]. Taquara (RS): Núcleo de Educação On-line, FACCAT; 2019 [cited 2021 Aug 2]. 13 p. Available from: <https://seer.faccat.br/index.php/redin/article/view/1560>.

SOARES S; LIMA MJA; ROCHA FRPA. Spot Test for Iodine Value Determination in Biodiesel Based on Digital Images Exploiting a Smartphone. **Microchemical Journal**. **133**, 195-199, 2017.

SOARES S; NUNES LC; MATTOS WM; ROCHA FRP. Spot test exploiting smartphone-based digital images for determination of biodiesel in diesel blends. **Microchemical Journal**. **152** (1), 2020.



©Publicação de acesso livre, sob licença e condições de Creative Commons Attribution (CC BY NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).