

USO DE ANÁLISE DE IMAGENS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

Vanderlei Inácio de Paula

Centro Universitário Padre Anchieta

vanderleip@anchieta.br

Denis Rafael de Souza Lima

Centro Universitário Padre Anchieta

denis_rsl@yahoo.com.br

RESUMO

O uso de análise de imagens é uma alternativa de análise química que permite a consolidação de conceitos de espectroscopia, apresentando baixo custo e boa reprodutibilidade. O estudo de análise de imagem foi realizado com os corantes vermelho bordeaux (amaranto 95% e azul brilhante 5%), eritrosina, violeta cristal e vermelho congo através de imagens obtidas por uma câmera de um aparelho celular modelo Samsung Galaxy Fit e comparada com espectrofotômetro comercial Smart Spectro. Os resultados para R^2 indicam que o método de análise de imagens reproduz o comportamento linear esperado pela teoria.

Palavras-chave: Análise de imagens, química analítica, sistema de cor RGB, corantes.

ABSTRACT

The use of image analysis is an alternative of chemical analysis that allows consolidation of concepts of spectroscopy, with low cost and good reproducibility. The study of image analysis was performed with bordeaux red (95% amaranth and 5% bright blue), erythrosine, crystal violet and congo red dyes through images obtained by a camera of a mobile device model Samsung Galaxy Fit and compared with a commercial spectrophotometer Smart Spectro. The results for R^2 indicate that the method of image analysis reproduces the linear behavior expected by the theory.

Keywords: Image analysis, analytical chemistry, RGB color system, dyes.

INTRODUÇÃO

A análise química é de suma importância para o desenvolvimento da área química, pois permite identificar e quantificar compostos químicos presentes em amostras. As técnicas instrumentais de análise comumente apresentam maior reprodutibilidade e rapidez dentre os métodos de análise. As medidas que empregam como fonte de estímulo a radiação eletromagnética (luz) são as mais empregadas e os equipamentos são denominados de espectrofotômetros. A maneira mais corriqueira de determinar a quantidade de uma substância é através do uso de métodos espectroscópicos que são classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida na medida, que pode ser luz visível, ultravioleta, ondas de rádio (micro-ondas, ressonância magnética nuclear), radiação infravermelha, raios X (fluorescência de raios X), raios gama, entre outros (CHAGAS, 1997).

As interações entre radiação e matéria são estudadas pela espectroscopia que emprega a teoria de Beer-Lambert, habitualmente conhecida como Lei de Beer, que permite calcular a concentração de uma amostra desconhecida através da construção de curvas de calibração com padrões de concentração conhecidos. A equação da Lei de Beer está representado na expressão (1), onde ϵ é a absorvidade molar, b é o caminho óptico do meio absorvente e c a concentração da espécie absorvente. (SKOOG, 2006).

$$A = \epsilon b c \quad (1)$$

Na quantificação de compostos que possuem cor (cromóforos), como corantes, por exemplo, a técnica mais empregada é a espectrometria nas regiões do visível (VIS), que consiste na incidência de um feixe de luz de intensidade conhecida através de uma amostra e a medição da intensidade de luz resultante, o que possibilita o cálculo da transmitância (T) da mesma, de acordo com a equação (2). Sendo I a intensidade luminosa transmitida pela solução e I_0 a intensidade incidente do feixe, temos:

$$T = I / I_0 \quad (2)$$

A absorbância (A) de uma solução está relacionada à transmitância de forma logarítmica, como mostrado na equação (3).

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

Os valores de absorbância obtidos para cada concentração de uma amostra padrão permite a construção da curva de calibração. Posteriormente, é possível realizar

medidas de uma amostra desconhecida e realizar a correlação com a concentração da espécie em estudo.

Os espectrofotômetros são equipamentos simples, contudo a maior parte das instituições de ensino não possui um acesso adequado a semelhante equipamento. Há vários trabalhos na literatura que apresentam projetos de confecção de espectrofotômetros de baixo custo (SARTORI, 2009). A quantificação de compostos coloridos pode ser realizada através de análise de imagens, pois uma imagem é um resultado de um estímulo luminoso que está associada aos comprimentos de onda refletidos no sensor de um dispositivo eletrônico, tal como câmeras digitais, câmera de celular, *tablets*, scanner (GODINHO, 2008) e outros equipamentos que registrem a luz.

O uso da análise de imagens ainda é pouco difundida para quantificação de compostos químicos. No entanto, nos últimos anos vêm ganhando novos estudos e aplicações, como na análise de complexos amido-iodo (MATHEWS, 2004), determinação de ácido ascórbico (GOMES, 2008), detecção de fraudes em café (CUNHA, 2000), classificação de bebidas como cervejas e refrigerantes (SILVA, 2006; GODINHO, 2008) e no ensino de química (KEHOE, 2013).

Este artigo relata o estudo de análise de amostras de corantes a partir de fotos obtidas com uma câmera de celular (Samsung Galaxy Fit), onde a medição dos valores foi realizada por separação das matrizes dos canais RGB (*red*, *green* e *blue*) da imagem com o *software* ImageJ, seguido da construção de curvas de calibração através de regressão linear e comparação com resultados obtidos em espectrofotômetro de bancada na região do visível.

A escolha de corantes como material de análise neste trabalho ocorreu em função desses aditivos de cor serem amplamente aplicados em vários setores industriais tais como: tintas, cosméticos, têxtil, alimentício, plásticos e outros. Entretanto, estima-se que entre 12 a 20% dos corantes utilizados nos processos químicos são perdidos e, conseqüentemente, geram efluentes que possuem como característica uma intensa coloração a qual, em ambientes aquáticos, pode causar interferência nos processos de fotossíntese. Dependendo do corante, em concentração de 1 ppm (mg/L) já é perceptível a coloração em corpos d'água (GUARATINI, 2000).

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo realizado consistiu na análise de amostras dos corantes Vermelho Bordeaux, Eritrosina, Vermelho Congo e Violeta Cristal por análise de imagens e, comparativamente, por espectrofotômetro comercial de bancada na região do visível modelo Smart Spectro (Marca LaMotte).

As soluções foram preparadas utilizando balança analítica para pesagem, vidrarias volumétricas e água deionizada. A partir de uma solução de corante de concentração 1 ppm foram realizadas diluições (0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 ppm) para construção das curvas de calibração. Após o preparo, uma alíquota de 3,5 mL de cada solução-padrão foi acondicionada em cubeta plástica, com caminho ótico de 1 cm, utilizando pipeta automática modelo WCS-1000 (Digipet).

As imagens digitais (fotos) das amostras foram obtidas com uma câmera de celular (modelo Samsung Galaxy Fit), em frente a uma tela LCD de *notebook* exibindo fundo branco uniforme, com as soluções padrão, branco e amostras “desconhecidas” numa mesma imagem, a uma distância de 50 cm da câmera, conforme orientações de Kehoe & Penn (2013), como ilustrado na Figura 2. A Figura 3 mostra um exemplo de imagem obtida para análise, contendo todas as soluções padrão, branco e amostras.

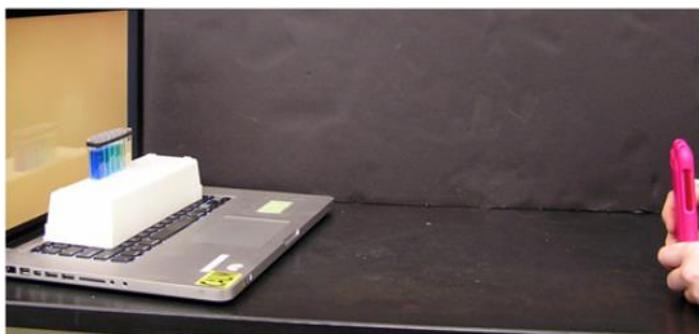


Figura 2: Representação de obtenção das imagens. Fonte: KEHOE & PENN, 2013.

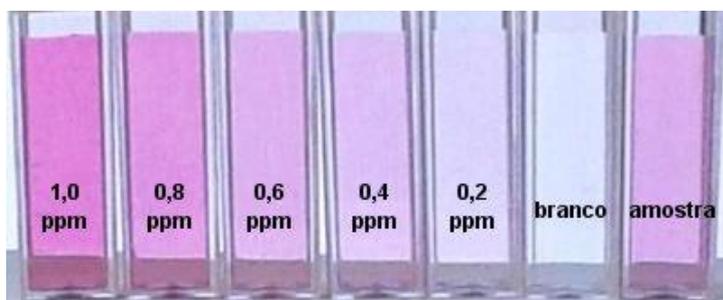


Figura 3: Exemplo de imagem utilizada na análise de concentração do corante Vermelho Bordeaux, obtida com câmera de celular.

Para análise das imagens, foi utilizado o programa *ImageJ* (v.1.47)¹ de código aberto desenvolvido por Wayne Rasband, do *U. S. National Institute of Health* (NIH), em plataforma Java. O programa possui diversas ferramentas de processamento e análise de imagens, como ajuste de brilho e contraste, segmentação e análise, medição de distâncias e ângulos, entre outras (RASBAND, 2014). As imagens obtidas via câmera fotográfica do aparelho celular foram carregadas no programa mencionado, sendo selecionado um retângulo de dimensões 0,9 cm por 2,0 cm no meio da altura de cada cubeta e em seguida aplicado o comando “*Analyze – Histogram*”, para obter os valores médios dos canais RGB (*red, green e blue*) das áreas. A Figura 4 apresenta exemplos de histogramas obtidos com este comando.

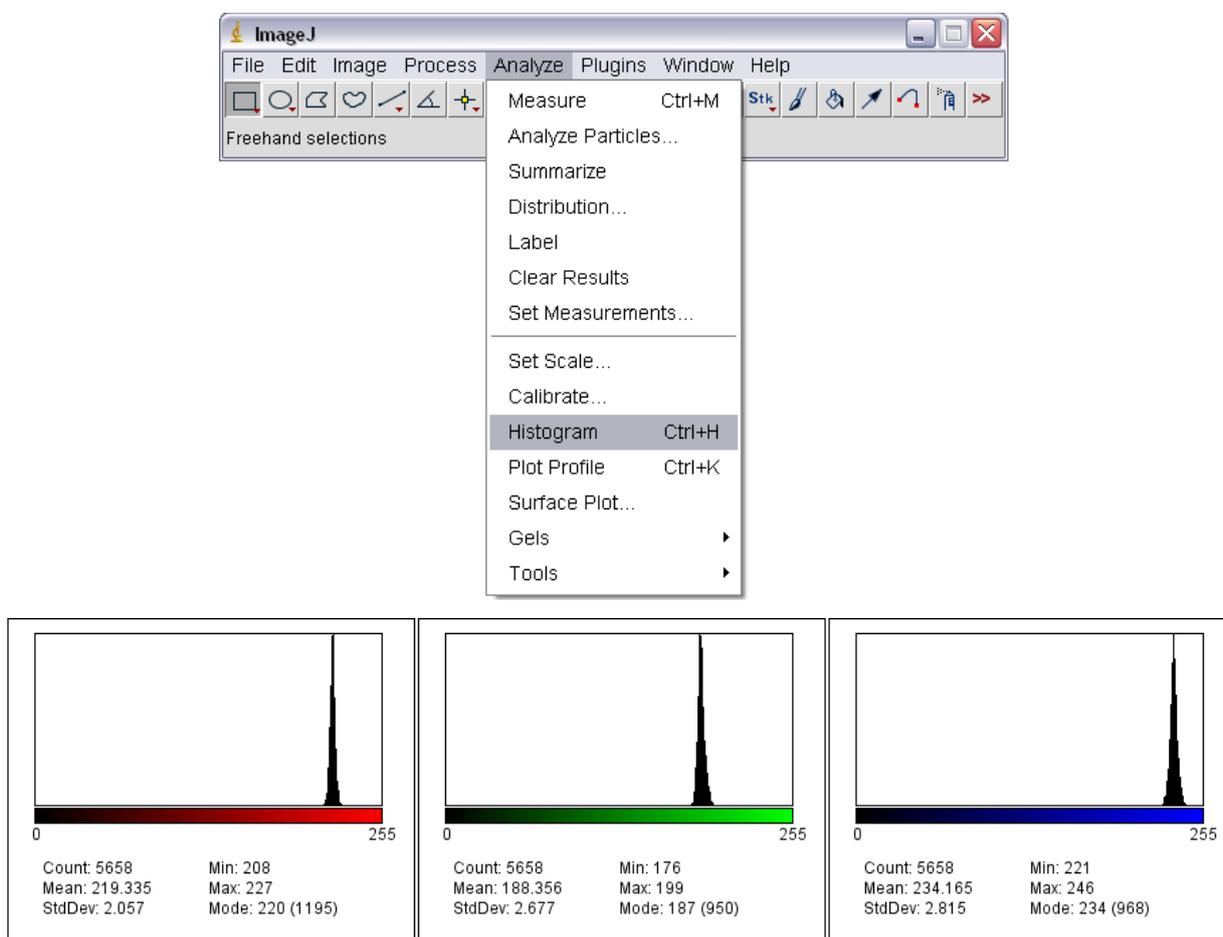


Figura 4: Histogramas dos canais RGB de imagem obtidos com o programa ImageJ

¹ Disponível para download em: <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>

A absorvância (A), que é definida como o logaritmo negativo da transmitância (I/I_0) pode ser calculada a partir da fórmula (4):

$$A = -\log(I_n / I_{\text{branco}}) \quad (4)$$

Onde I_n é o valor médio do canal R, G ou B da amostra e I_{branco} é o valor de R, G ou B do branco, todos obtidos da mesma imagem.

Com estes dados, foi possível calcular os valores de absorvância de cada amostra, plotar a curva de calibração com auxílio do *software Microsoft Excel* e verificar sua linearidade.

Comparativamente, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro UV-Visível modelo Smart Spectro (LaMotte), nos comprimentos de onda correspondentes a maior absorvância, determinado experimentalmente para cada corante ($\lambda_{\text{máx}}$) na faixa de 350 a 710 nm. Foram encontrados valores de absorvância máxima para Vermelho Bordeaux ($\lambda_{\text{máx}} = 520$ nm), Eritrosina ($\lambda_{\text{máx}} = 525$ nm), Vermelho Congo ($\lambda_{\text{máx}} = 510$ nm) e Violeta Cristal ($\lambda_{\text{máx}} = 583$ nm). As figuras 5, 6, 7 e 8 apresentam os espectros UV-VIS dos respectivos corantes obtidos experimentalmente.

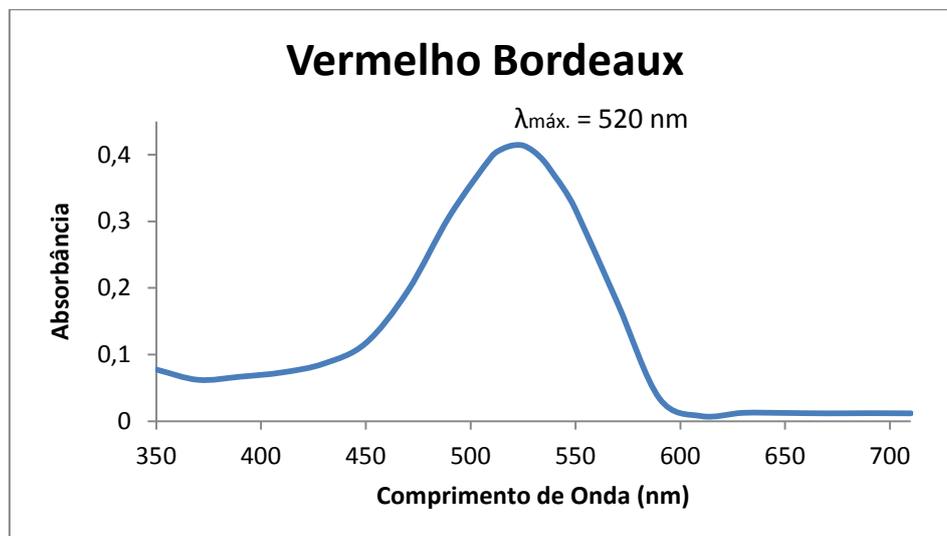


Figura 5: Espectro UV-VIS do corante Vermelho Bordeaux

Segundo Silva (2008), o vermelho *bordeaux* é composto por uma mistura dos corantes amaranto (95%) e azul brilhante FCF (5%). É muito utilizado na indústria alimentícia (cereais, balas, laticínios, geleias, gelados, recheios, xaropes e preparados líquidos). No espectro da figura 5, observa-se a banda característica do amaranto ($\lambda = 520$ nm).

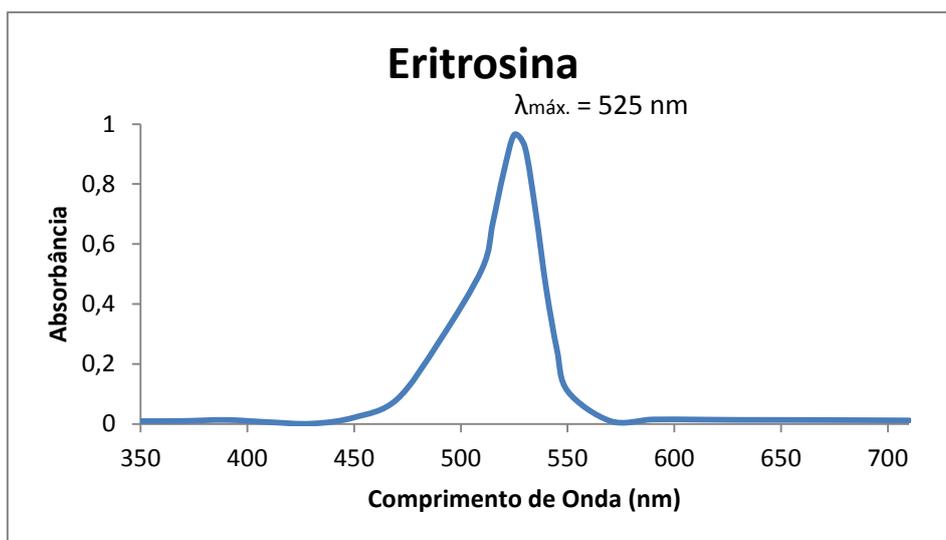


Figura 6: Espectro UV-VIS do corante Eritrosina

O corante eritrosina é usado principalmente para alimentos (pós, laticínios, refrescos, geleias) e tintas de impressão. Apresentou banda de absorção característica ($\lambda = 525$ nm), condizente com valores da literatura (PRADO & GODOY, 2003).

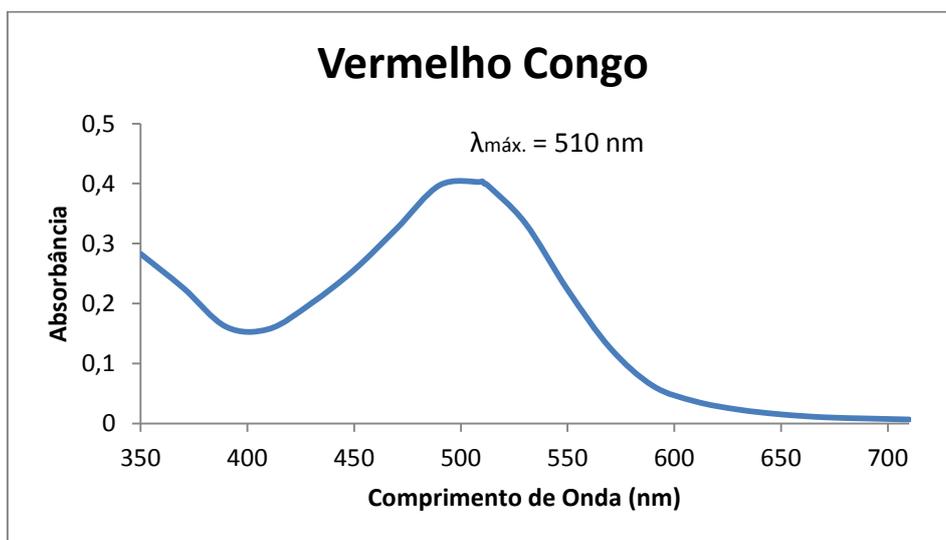


Figura 7: Espectro UV-Vis do corante Vermelho Congo

O corante vermelho Congo é usado principalmente em bioquímica e histologia, para coloração biológica microscópica e formulação de meios de cultura. Apresentou banda de absorção característica ($\lambda = 510$ nm).

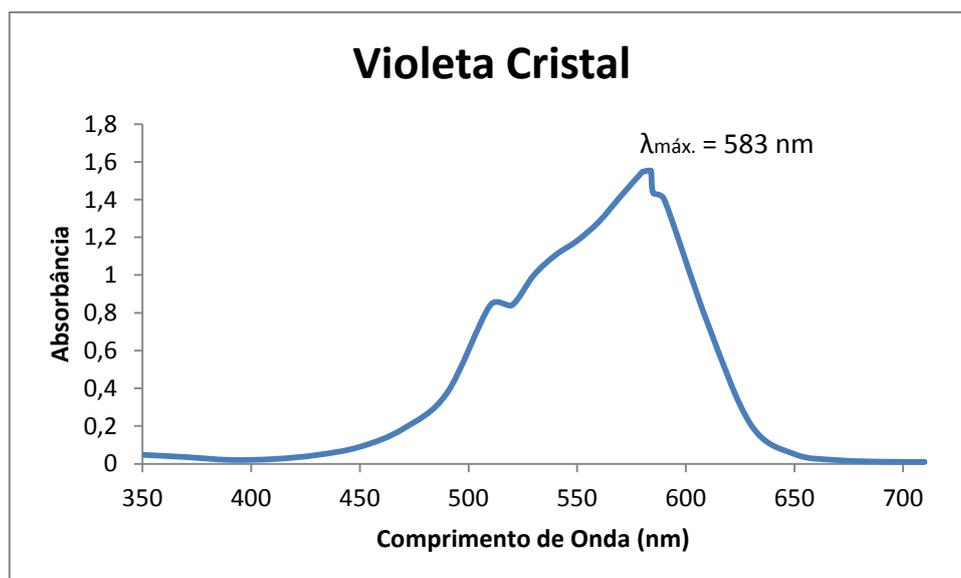


Figura 8: Espectro UV-VIS do corante Violeta Cristal

O corante violeta cristal (ou violeta de metila) tem larga aplicação no tingimento têxtil, tintas de impressão e em medicina, nos testes de coloração de Gram para classificar bactérias. Apresentou banda de absorção característica ($\lambda = 583 \text{ nm}$).

Os corantes estudados apresentam estruturas químicas conhecidas pelos grupos orgânicos, o grupo monoazo está presente em Amarantho e Vermelho Congo, o grupo xanteno é presente na Eritrosina e o grupo cromóforo do trifenilmetano constitui os corantes Azul Brillhante e Violeta Cristal. As estruturas estão representadas na figura 9.

Os dados de absorbância obtidos permitiram a construção das curvas de calibração e a realização de um comparativo com o método de análise por imagens.

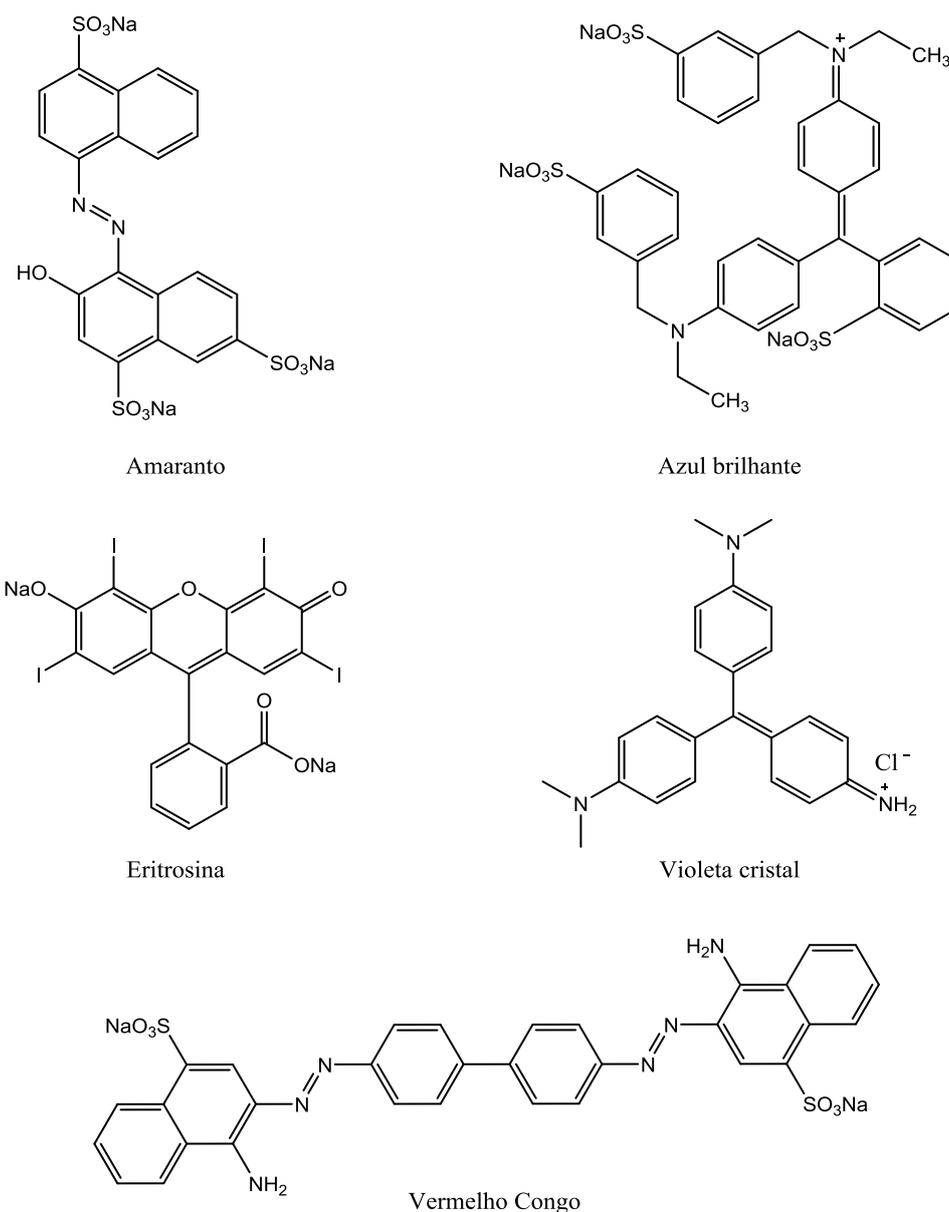


Figura 9: Estrutura química dos corantes avaliados: Vermelho Bordeaux (composição de 95% Amaranto e 5% Azul Brilhante), Eritrosina, Violeta Cristal e Vermelho Congo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de absorvância quantificados por análise de imagens foram tratados com o *software* ImageJ, plotados na forma de curvas de calibração (regressão linear) e comparados aos valores obtidos em espectrofotômetro comercial na região do visível. Todas as curvas obtidas por análise de imagens apresentaram coeficiente de correlação (R^2) acima de 0,98. O canal RGB utilizado para construção das curvas para análise de

imagens foi o *Green*, pois apresentou melhores resultados devido ao fato de ser a cor complementar mais próxima à dos corantes estudados.

A metodologia de análise de imagem teve sua performance comparada frente a um espectrofotômetro modelo Smart Spectro (Marca LaMotte) utilizando cubeta de 1 cm de caminho óptico. O espectrofotômetro e o estudo de análise de imagens apresentaram resposta linear na faixa da concentração estudada (0 a 1 ppm), conforme pode ser verificado através das figuras 10, 11, 12 e 13. A curva de calibração para o Vermelho Bordeaux realizado via espectrofotômetro apresentou uma equação de reta $f(x) = 0,4264x - 0,0137$ com coeficiente de correlação igual a 0,9965, enquanto a mesma curva de calibração via análise de imagens apresentou a equação de reta $f(x) = 0,1381x - 0,0061$ com coeficiente de correlação igual a 0,9863. A determinação da absorvância por espectrofotometria de absorção molecular (espectrofotômetro) apresentou coeficiente angular superiores aos obtidos por análise de imagens, na ordem de 3 vezes, o que reflete um comportamento esperado considerando a monocromaticidade do feixe de radiação estudado.

As equações de reta e coeficiente de correlação das curvas de calibração dos corantes Vermelho Bourdeaux, Eritrosina, Vermelho Congo e Violeta cristal estão apresentados na tabela 1.

As vantagens do uso da análise de imagens em soluções coloridas estão associadas à possibilidade de ampliar o universo de compreensão do funcionamento intrínseco de uma análise e do equipamento de espectrofotometria. Porém, a obtenção da imagem a ser analisada deve conter todas as amostras a serem avaliadas a fim de minimizar as variáveis ambientais que podem interferir na composição da imagem, tais como brilho, iluminação e sombra.

Vermelho Bordeaux

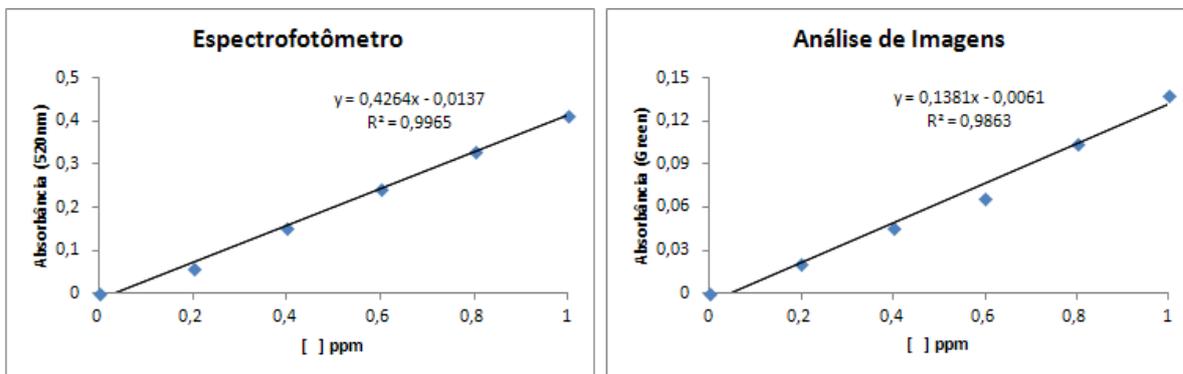


Figura 10: Gráficos de absorvância versus concentração para a amostra de corante Vermelho Bordeaux utilizando espectrofotômetro (esquerda) e análise de imagens (direita).

Eritrosina

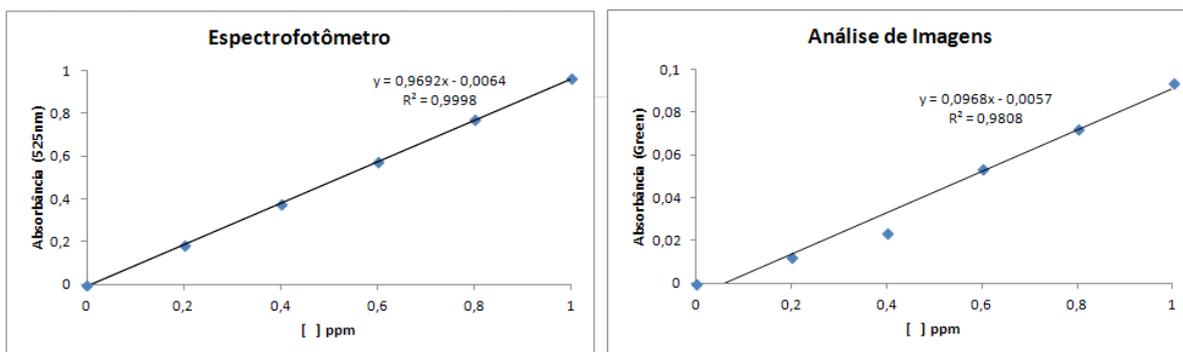


Figura 11: Gráficos de absorvância versus concentração para a amostra de corante Eritrosina utilizando espectrofotômetro (esquerda) e análise de imagens (direita).

Vermelho Congo

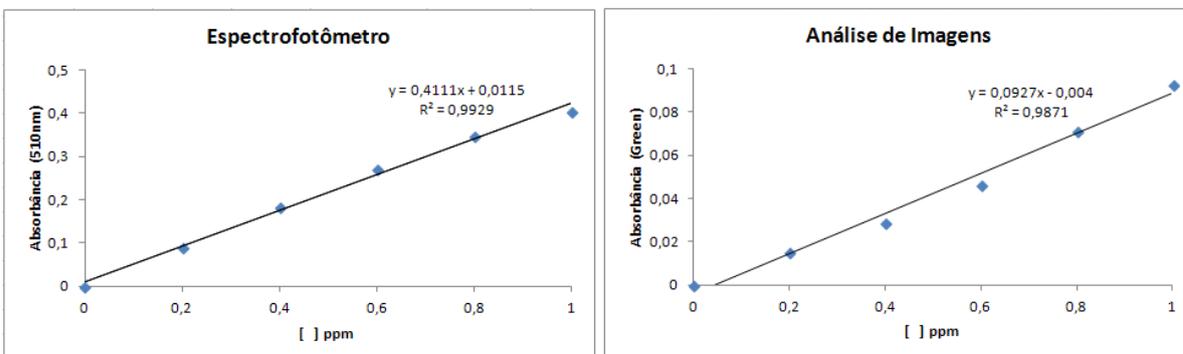


Figura 12: Gráficos de absorvância versus concentração para a amostra de corante Vermelho Congo utilizando espectrofotômetro (esquerda) e análise de imagens (direita).

Violeta Cristal

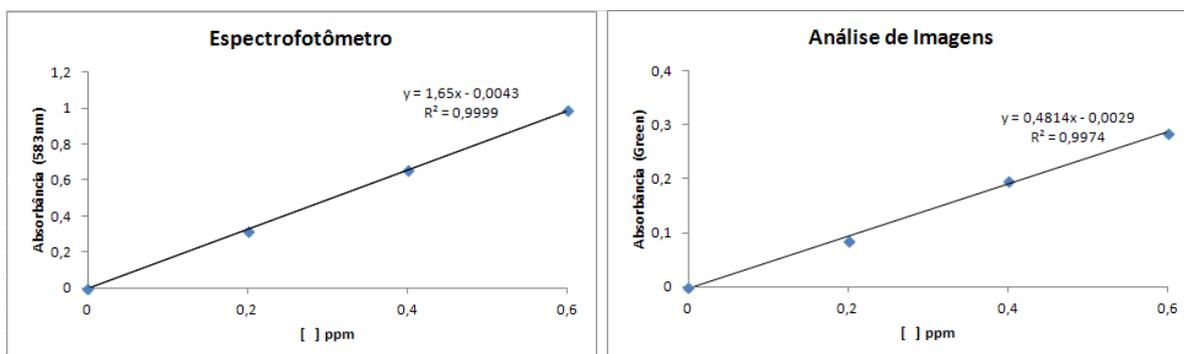


Figura 13: Gráficos de absorvância versus concentração para a amostra de corante Violeta Cristal utilizando espectrofotômetro (esquerda) e análise de imagens (direita).

Tabela 1: Equações das curvas de calibração e coeficientes de correlação (r).

Corante		Equação de reta	Coeficiente de correlação
Vermelho Boudeaux	E	$f(x) = 0,4264x - 0,0137$	0,9965
	AI	$f(x) = 0,1381x - 0,0061$	0,9863
Eritrosina	E	$f(x) = 0,9692x - 0,0064$	0,9998
	AI	$f(x) = 0,0968x - 0,0057$	0,9808
Vermelho congo	E	$f(x) = 0,4111x - 0,0115$	0,9929
	AI	$f(x) = 0,0927x - 0,004$	0,9871
Violeta Cristal	E	$f(x) = 1,650x - 0,0137$	0,9999
	AI	$f(x) = 0,4814x - 0,0029$	0,9974

* Intervalo das medidas 0 a 1 ppm (mg/L). E = espectrofotômetro comercial Smart Spectro. AI = análise de imagens.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que o método de análise de imagens pode ser considerado uma alternativa plausível para a realização de análises colorimétricas, pelo baixo custo envolvido, rapidez, confiabilidade e facilidade de execução.

Através da comparação com o método espectrofotométrico verificou-se que a análise de imagens pode ser aplicada para quantificação analítica. Além disso, também permite a execução de diversas análises simultaneamente, desde que todas as amostras componham a mesma imagem que as soluções padrão.

Pode ser largamente aplicado em análises ambientais e de campo, na quantificação de espécies presentes em água e efluentes, em métodos baseados em reações químicas desde que seja possível a formação de cor pelos reativos em análise, tais como: determinação de cloretos, fósforo, níquel, cromo, nitrato e demanda química de oxigênio.

Esse experimento pode ser adotado em diversos cursos de análise química instrumental e possibilita uma discussão mais ampla sobre espectrofotometria de absorção molecular, considerando-se a fonte de radiação e tratamento de dados estatísticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAGAS, A. P.; As ferramentas do químico. *Quím. Nova na Escola*. n. 5, p. 18-20, **1997**.

CUNHA, S. A. R.; **SANO, E. E.;** **ASSAD, E. D.;** **RODRIGUES, H.R.;** **CORRÊA, T. B. S.;** Detecção de fraudes em café torrado e moído por análise de imagem. In: Anais do Congresso e Mostra de Agroinformática, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, **2000**.

GODINHO, M. S.; **PEREIRA, R. O.;** **RIBEIRO, K. O.;** **SCHIMIDT, F.;** **OLIVEIRA, A. E.;** **OLIVEIRA, S. B.;** Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA). *Quím. Nova*, v. 31, n. 6, p. 1485-1489, **2008**.

GOMES, M. S.; **TREVIZAN, L. C.;** **NÓBREGA, J. A.;** **KAMOGAWA, M. Y.;** Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. *Quím. Nova*, v. 31, n. 6, p. 1577-1581, **2008**.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B.; Corantes têxteis. *Quím. Nova*, v. 23, n. 1, p. 71-78, **2000**.

KEHOE, E.; PENN, R. L.; Introducing Colorimetric Analysis with Camera Phones and Digital Cameras: An Activity for High School or General Chemistry. *J. Chem. Educ.*, 90 (9), pp 1191–1195, **2013**.

MATHEWS, K. R.; LANDMARK, J. D.; STICKLE, D. F. J.; Quantitative assay for starch by colorimetry using a desktop scanner. *J. Chem. Educ.* 81, p.702–704, **2004**.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T.; Corantes artificiais em alimentos. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v.14, n.2, p. 237-250, **2003**.

RASBAND, W.S., *ImageJ*, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2014. Disponível em: < <http://imagej.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 15 de Janeiro de **2014**.

SARTORI, P. H. S.; LORETO, L. S.; Medidor de Fluorescência Caseiro. *Quím. Nova na Escola*, v. 31, n. 2, p. 150-154, **2009**.

SILVA, T. C. O.; OLIVEIRA, A, E.; Análise de imagens para classificação de amostras de cervejas através de Análise de Componentes Principais (ACP). In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. Anais eletrônicos do III Seminário de Pós-Graduação da UFG[CD-ROM], Goiânia: UFG, **2006**.

SILVA, C. P.; MARMITT, S.; HAETINGER, C.; STULP, S.; Avaliação da degradação do corante vermelho bordeaux através de processo fotoquímico. *Eng. Sanit. Ambient.* vol.13, n.1, pp. 73-77, **2008**.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER F. J.; CROUCH, S. R.; Fundamentos de Química Analítica. Tradução da 8ª edição Norte-Americana, São Paulo: Thomson Learning, **2006**.