

Artigo

Determinação de Vitamina C em Suplementos Alimentares Utilizando Métodos Volumétricos e Espectrofotometria de Absorção Molecular

da Silva, R. S.;^a Pedroso, A. V.;^a de Jesus, P. C.;^{a,#} Gelinski, J. M. L. N.;^b Borges, E. M.^{a,b,*}

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (1), 155-179. Data de publicação na Web: 28 de janeiro de 2019

<http://rvq.sbq.org.br>

Quantitation of Vitamin C in Supplements Using Titrimetric, Molecular Absorption Spectroscopy and Digital Images

Abstract: In this research, it was presented a laboratory class where titrimetric and colorimetric methods were used to determine vitamin C levels in supplement pills. In the first part, vitamin C levels were measured in supplement pills using three titrimetric methods, back titration with sodium thiosulphate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), direct titrations with potassium iodate (KIO_3) and iodide (I_2). Results obtained with titrimetric methods were equivalent at 95 % confidence interval, methods were compared using one-way ANOVA). In the second part, a quick and low-cost colorimetric method was carried out. It was successfully used to measure vitamin C levels in supplement pills. It consists in reduction of the complex Fe^{3+} and 1,10-phenanthroline by vitamin C to form a reddish-orange colored complex that was measured at 510 nm. The colorimetric method was also carried out using digital images obtained with a flatbed scanner. RGB values were extracted from digital images using ImageJ's plugin ReadPlate in a simple and easy manner. The t paired test had shown that both methods were equivalent at 95 % confidence interval.

Keywords: Vitamin C; titration; ImageJ; laboratory practice.; spectrophotometry.

Resumo

Nesta prática de ensino, a massa de vitamina C presente em suplementos alimentares foi determinada por meio de volumetria de oxido-redução e espectroscopia de absorção molecular na região do visível. Na primeira parte, a vitamina C foi determinada por volumetria, titulação de retorno com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) e titulação direta com iodato de potássio (KIO_3) e iodo (I_2). A Análise de Variância (ANOVA) de fator único mostrou que os resultados obtidos com ambos os métodos são estatisticamente equivalentes com um nível de confiança de 95 %. Na segunda parte, a massa de vitamina C nos comprimidos foi determinada por meio de um método colorimétrico rápido e de baixo custo, no qual o complexo formado entre o Fe^{3+} e a fenantrolina foi reduzido pela vitamina C resultando em um complexo de coloração vermelho-alaranjado com forte absorção em 510 nm. A determinação colorimétrica da vitamina C também foi realizada utilizando imagens digitais obtidas com um scanner de mesa. Os valores de RGB foram extraídos de uma maneira simples e rápida utilizando o plugin ReadPlate do ImageJ. O teste t, duas amostras em par para a média, mostrou que ambos os métodos foram equivalentes com um nível de confiança de 95 %.

Palavras-chave: Vitamina C; titulação; ImageJ; prática de laboratório; espectrofotometria.

*,# Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química, Campus 1, Rua Antônio da Veiga, 140, Victor Konder, CEP 89012-900 Blumenau-SC, Brasil.

✉ * marcelborgesb@gmail.com, embsouza@furb.br # pcj@furb.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20190012](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190012)

Determinação de Vitamina C em Suplementos Alimentares Utilizando Métodos Volumétricos e Espectrofotometria de Absorção Molecular

Rodrigo Sens da Silva,^a André Vinícius Pedroso,^a Paulo Cesar de Jesus,^{a,#}
Jane Mary Lafayette Neves Gelinski,^b Endler Marcel Borges^{a,b,*}

^a Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Química, Campus 1, Rua Antônio da Veiga, 140, Victor Konder, 89012-900 Blumenau-SC, Brasil.

^b Núcleo Biotecnológico, Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC, Rua Paese, 198, Bairro Universitário-Bloco K, 89560-000 Videira-SC, Brasil.

* marcelborgesb@gmail.com; embsouza@furb.br; # pcj@furb.br

Recebido em 25 de junho de 2018. Aceito para publicação em 30 de novembro de 2018

1. Introdução
2. Parte Experimental
3. Resultados e Discussões
4. Conclusões

1. Introdução

A vitamina C ou ácido ascórbico (Figura 1), é uma vitamina solúvel em água que desempenha um papel fundamental na proteção do corpo contra infecções e doenças. Como a vitamina C não é sintetizada pelo corpo humano, ela é obtida através dos alimentos - principalmente frutas e legumes. O consumo diário de vitamina C por uma pessoa adulta é de aproximadamente 70 mg.¹ Quando há deficiência de vitamina C na alimentação, ocorre o escorbuto, uma doença

que assombrou os marujos na época do descobrimento do novo mundo.² A vitamina C está presente na maioria das frutas cítricas.²

A determinação de vitamina C por titulação é descrita na literatura em diversas práticas de ensino.²⁻⁶ Por exemplo, a determinação de vitamina C em sucos por titulação direta com iodato de potássio² ou com iodo,³ enquanto já foi sugerido o emprego da vitamina C⁴ para padronizar soluções de iodo em práticas de ensino, em substituição ao tiosulfato de sódio, Na₂S₂O₃.

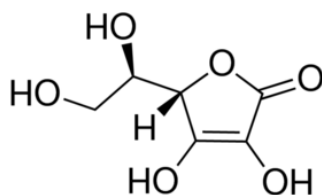


Figura 1. Estrutura Química da Vitamina C ou Ácido Ascórbico. Fonte: Site Sigma Aldrich, 2018

Dentre os métodos analíticos para a determinação da vitamina C, a titulação é uma das técnicas mais comuns, por exemplo, o Instituto Adolfo Lutz recomenda a titulação de

vitamina C com iodato de potássio, KIO_3 . Quando a concentração de vitamina C é baixa, a titulação é feita com 2,6-diclorofenol indofenol (Figura 2).⁷

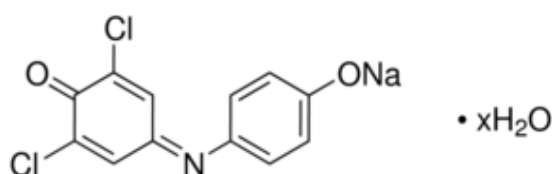


Figura 2. Estrutura química do 2,6-diclorofenol indofenol. Fonte: Site Sigma Aldrich, 2018.

Além da titulação, a determinação de vitamina C também é realizada por técnicas instrumentais como coulometria,⁸ polarografia,⁹ potenciometria,¹⁰ eletroforese capilar¹¹ e cromatografia líquida.^{12,13} Uma revisão detalhada destas técnicas de 1970 a 1988 pode ser encontrada nas revisões de Arya *et al.*^{14,15}

Dentre as técnicas instrumentais, a espectroscopia de absorção molecular na região do visível, também chamada de colorimétrica, é uma das técnicas mais utilizadas devido a sua rapidez, simplicidade e baixo custo.^{16,17}

Dentre os métodos colorimétricos, os principais métodos envolvem a redução do

2,6-diclorofenol indofenol pela vitamina C.^{7,15} Um dos métodos mais utilizados é o método da fenantrolina, no qual o Fe^{3+} é complexado pela 1,10-fenantrolina (Figura 3) formando o complexo $\text{Fe}(\text{Phen})_3^{3+}$, este complexo é reduzido pela vitamina C a $\text{Fe}(\text{Phen})_3^{2+}$, que possui uma coloração vermelho-alaranjado com forte absorção em 510 nm.^{6,18} Outro método colorimétrico muito utilizado é o método da neocupruína (Figura 4), no qual o $\text{Cu}(\text{Neo})_2^{2+}$ é reduzido a $\text{Cu}(\text{Neo})_2^{2+}$, que apresenta coloração amarelo-alaranjado.¹⁹ O método da fenantrolina foi o método utilizado neste experimento didático devido ao baixo custo dos reagentes empregados e de sua simplicidade.

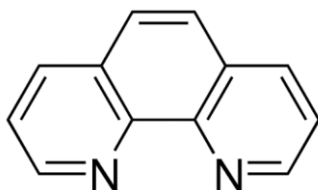


Figura 3. Estrutura química da 1,10-fenantrolina, Phen. Fonte: Site Sigma Aldrich, 2018

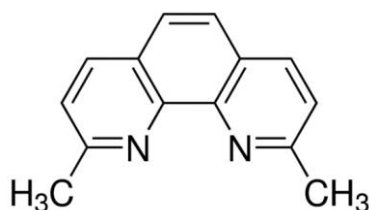


Figura 4. Estrutura da neocupruína, Neo. Fonte: Site Sigma Aldrich, 2018

A quantificação de vitamina C em suplementos alimentares utilizando imagens digitais obtidas com um scanner de mesa já foi descrita na literatura.²⁰ Neste caso, foi utilizado o método do azul da Prússia.

Atualmente, muitos métodos quantitativos foram propostos utilizando imagens digitais obtidas com *smartphones* e scanners,²² bem como, inúmeras práticas de ensino.²²⁻⁴⁰

Normalmente, a extração dos valores de RGB é realizada com os *softwares* Matlab,^{27,28} r-project,^{34,35} Octave²⁶. No entanto, poucos alunos apresentam familiaridade com estes *softwares*. A extração dos valores de RGB das imagens digitais utilizando softwares, como, por exemplo, o Adobe Photoshop e ImageJ^{20,24,33} são simples, mas extrair os valores de RGB manualmente de todas as imagens é um trabalho tedioso e demorado. Portanto, neste experimento, todos os valores de RGB são extraídos automaticamente das imagens utilizando o Plugin ReadPlate do ImageJ,^{38,39,40} posteriormente, os valores de RGB são exportados para uma planilha do Microsoft Excel.

O objetivo didático deste experimento foi quantificar a massa de vitamina C presente em suplementos alimentares através de métodos clássicos (volumetria de óxido-redução) e métodos instrumentais (espectrofotometria e imagens digitais). Na primeira parte deste experimento, a vitamina C foi determinada em suplementos alimentares através de titulação direta com iodo e iodato de potássio, KIO_3 , e titulação de retorno com tiosulfato de sódio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Os resultados obtidos com os três métodos volumétricos foram comparados utilizando a ANOVA de fator único. Na segunda parte, a vitamina C foi determinada

por um método colorimétrico utilizando um espectrofotômetro e imagens digitais adquiridas com um scanner de mesa. Os resultados obtidos com os dois métodos foram comparados com o teste t, para duas amostras em par para média.

Este experimento foi realizado com alunos do curso química e engenharia química da Universidade Regional de Blumenau (Furb) no segundo semestre de 2016 e 2017. A primeira parte da prática necessitou de 150 minutos e a segunda parte necessitou de 150 minutos. Em universidades onde um espectrofotômetro não está disponível, a segunda parte desta prática de ensino pode ser realizada utilizando apenas imagens digitais e ambos os métodos podem ser comparados utilizando testes estatísticos.

2. Parte Experimental

2.1. Equipamentos

As medidas de absorvância foram mensuradas em um espectrofotômetro Shimadzu modelo 1800 (Japão). As imagens digitais foram obtidas utilizando um *scanner* Canon LIDE 120. Todas as soluções foram preparadas em água deionizada obtida com deionizador Permutation da E.J. Kringer & Cia LTDA (Curitiba, Paraná).

2.2. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram: 1,10-Fenantrolina, $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$, 99,5 % (198,22 g/mol), sulfato de ferro heptahidratado, $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7H_2O$, (399,88 g/mol), iodo, I_2 , 99,8 %, (253,81 g mol⁻¹) amido solúvel, iodeto de potássio, KI, 99,5 %, (166 g mol⁻¹) da Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro). Tiosulfato de sódio pentahidratado, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 99,5-101 %, (158,11 g mol⁻¹) e H_2SO_4 , 85 %, (98 g mol⁻¹) da Dinâmica (Diadema, São Paulo). Iodato de potássio, KIO_3 , 99,95 % (214 g mol⁻¹) da Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos),

2.3. Soluções

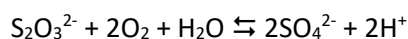
Na primeira parte deste experimento, a vitamina C foi determinada em suplementos alimentares através de titulação direta e de retorno. A primeira parte desta prática de ensino, necessitou de soluções de I_2 0,005 mol L⁻¹, KIO_3 0,01 mol L⁻¹, $Na_2S_2O_3$ 0,03 mol L⁻¹ e H_2SO_4 2 mol L⁻¹.

2.4. Preparo das soluções de amido e ácido sulfúrico

A solução de amido foi preparada dissolvendo 2 g de amido em 250 mL de água deionizada e a solução de H_2SO_4 foi preparada pela adição de 60 mL de ácido sulfúrico concentrado em 500 mL de água deionizada, posteriormente o volume foi completado para 1 L.

2.5. Preparo de uma solução de tiosulfato de sódio

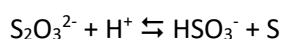
Em geral, considera-se a ação de microrganismos a principal causa da instabilidade das soluções de tiosulfato de sódio. Aparentemente, existem no ar diferentes bactérias, que consomem enxofre e são capazes de removê-lo do tiosulfato para formar sulfito. Adicionalmente, o tiosulfato é oxidado pelo ar a sulfato (Reação 1). Soluções perfeitamente estéreis de tiosulfato são consideradas como bastante estáveis.



Reação 1

Soluções de tiosulfato não devem ser ácidas, porque o tiosulfato de se

desproporciona em soluções ácidas (Reação 2)



Reação 2

A atividade bacteriana é menor quando o pH da solução se situa entre 9 e 10 e aumentada com a luz e a elevação da temperatura. Por esta razão, as soluções de tiosulfato devem ser guardadas em frascos âmbar. Uma maneira de obter soluções de tiosulfato de sódio estáveis é preparar a solução com carbonato de sódio (Na_2CO_3) 0,1 g L⁻¹ e bórax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) 2 g L⁻¹. O carbonato e o bórax ajudam a manter o pH da solução entre 9 e 10. As concentrações de carbonato de sódio e bórax não devem ser maiores que 0,1 g L⁻¹ e 2 g L⁻¹, pois em

concentrações maiores que estas a degradação do tiosulfato de sódio é acelerada. Outra possibilidade para evitar a degradação do tiosulfato de sódio é adicionar clorofórmio 1 mL L⁻¹.

Neste experimento, as soluções de tiosulfato de sódio foram preparadas apenas pela dissolução do sal em água deionizada e armazenadas em frasco âmbar e descartadas após 5 dias.

2.6. Preparo das amostras dos comprimidos de vitamina C

Suplemento alimentares de vitamina C, na forma de comprimidos, adquiridos em farmácias de Blumenau foram analisados neste experimento. Os comprimidos utilizados neste experimento foram identificados como A, B e C, os comprimidos A e B são descritos pelo fabricante como contendo 1 g de vitamina C por comprimido contem 0,5 g de vitamina C.

Para o método espectrofotométrico, a Figura 5 mostra de forma esquemática o preparo da amostra de um comprimido de

vitamina C. Um comprimido contendo 1 g de vitamina C foi dissolvido em um becker, após a dissolução do comprimido, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 500,00 mL (balão A) e o volume completado até o menisco, posteriormente, 1 mL da solução do balão A foi transferida para um balão volumétrico de 250,00 mL (Balão B) e 1 mL da solução do balão B foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 1 mL da solução colorimétrica.

Para o comprimido C, o balão A (Figura 5) utilizado foi de 250 mL, garantindo que todas as soluções analisadas teriam a mesma concentração.

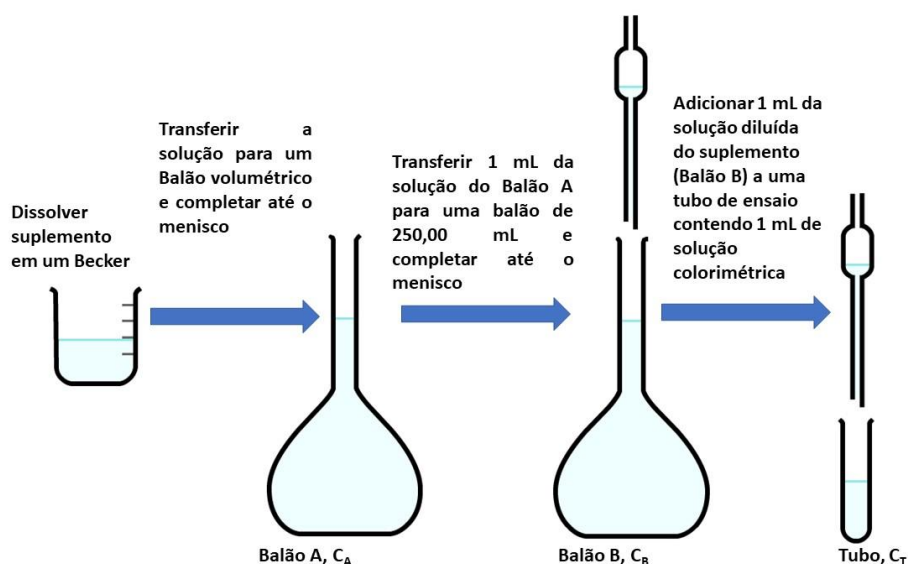


Figura 5. Representação esquemática do preparo das amostras dos comprimidos (A, B e C) de vitamina C para análise (Figura desenhada na web Page <https://chemix.org>)

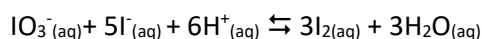
Para as titulações de óxido-redução, a solução do balão A (Figura 5) foi titulada sem qualquer diluição, somente a solução do comprimido A foi titulada.

2.7. Titulação utilizando KIO₃ como titulante

Neste procedimento o iodato de potássio, KIO₃, foi colocado na bureta e utilizado para titular a amostra de vitamina C. 20,00 mL da solução de vitamina C foi adicionada a um Erlenmeyer, com 10 mL de solução de H₂SO₄ 2 mol L⁻¹, 300 mg de KI e 1 mL (20 gotas) uma solução de amido, 50 mL água deionizada podem ser adicionados para dar volume à solução, onde o volume de água não afeta a reação. Neste procedimento, é necessário, apenas, que o ácido sulfúrico e o iodeto de

potássio estejam em excesso. Veja o vídeo na referência 41. Neste procedimento, o KI deve estar em excesso, portanto, não é necessário pesar o KI e uma ponta de espátula poderá ser adicionada.²⁻⁵

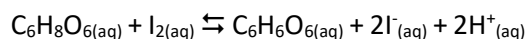
Quando o iodato (IO_3^-) é adicionado a uma solução ácida de iodeto (I^-), ocorre uma reação de oxidação-redução; onde o iodato é reduzido para formar iodo (I_2) e o iodeto é oxidado a iodo de acordo com a Reação 3.²



Reação 3

Quando uma solução de vitamina C é titulada com KIO_3 , em meio ácido, na presença de amido e em excesso de KI, o KIO_3 gera I_2 (Reação 3) que reage com a vitamina C, conforme é mostrado na Reação 4, quando

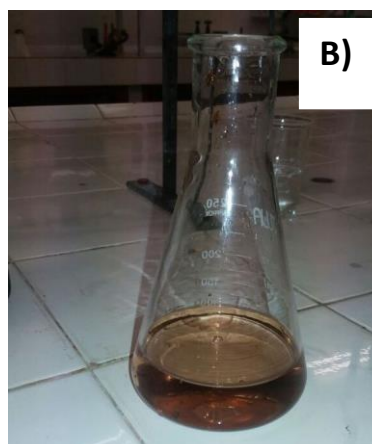
toda a vitamina C é consumida, o iodato gera iodo que se liga com o amido para dar uma solução de coloração marrom-violácea como é mostrado na Figura 6.^{2,4}



Reação 4



A)

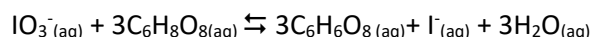


B)

Figura 6. Solução de vitamina C titulada com KIO_3 , A) antes do ponto de equivalência (solução incolor) B) no ponto de equivalência (solução marrom-violácea)

De acordo com a Reação 3, 1 mol de KIO_3 gera 3 mol de I_2 . Portanto, combinando a

Reação 3 e a Reação 4, obtemos a Reação 5.^{2,3,4}



Reação 5

De acordo com a Reação 5, a concentração de vitamina C pode ser calculada utilizando a Equação 1, onde C_{KIO_3} é a concentração da

solução de KIO_3 , V_{KIO_3} é o volume de KIO_3 gasto na titulação e $V_{\text{vitamina C}}$ é o volume da solução de vitamina C que foi titulado.

$$C_{\text{vitamina C}} = (3 \times C_{\text{KIO}_3} \times V_{\text{KIO}_3}) / V_{\text{vitamina C}}$$

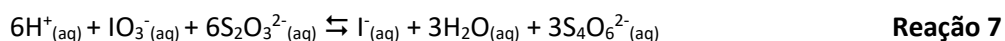
Equação 1

2.8. Padronização do tiosulfato de sódio

O tiosulfato de sódio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, não é um padrão primário e foi padronizado antes de ser utilizado. Para padronizar o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ adicionou-se 10,00 mL de KIO_3 a um Erlenmeyer, 10,00 mL de $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 2 mol L^{-1} e 300 mg de KI. Esta solução foi titulada até ficar incolor com a solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, para facilitar a visualização do ponto final foi necessário adicionar a solução 1 mL de amido (indicador), quando a solução apresentou

uma coloração amarelo pálido. Veja o vídeo da referência 42.

Combinando a Reação 3 com a Reação 6 chegamos a Reação 7. Da Reação 7 observamos que 1 mol de KIO_3 reage com 6 mol de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ e que a concentração de tiosulfato de sódio, $C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$, poderá ser calculada utilizando a Equação 2, onde C_{KIO_3} é a concentração da solução de KIO_3 , V_{KIO_3} é o volume de KIO_3 adicionado ao Erlenmeyer e $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ é o volume gasto de tiosulfato de sódio na titulação.



$$C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = (6 \times C_{\text{KIO}_3} \times V_{\text{KIO}_3}) / V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \quad \text{Equação 2}$$

2.9. Determinação da vitamina C utilizando retro titulação com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

De acordo com a Reação 3, o iodo pode ser gerado pela oxidação do iodeto de potássio com o iodato de potássio em meio ácido. Desta forma, um excesso de iodo é gerado pela adição 10,00 mL de KIO_3 0,01 mol L^{-1} a um Erlenmeyer que continha uma ponta de espátula de KI e 10 ml de H_2SO_4 2 mol L^{-1} , como é ilustrado na Figura 7A. Uma parte do iodo formado foi consumida pela adição de 10 mL da solução de vitamina C (Figura 7B). O excesso de iodo foi titulado com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Inicialmente, a solução tem uma coloração marrom escura (Figura 7B) e deverá ser titulada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ até ficar incolor (Figura 7E). Para a visualização do ponto final foi

necessário adicionar uma solução de amido (indicador) quando a solução tiver uma coloração amarelo pálido (Figura 7C), quando a solução de amido for adicionada, a solução adquire uma coloração marrom (Figura 7D). O amido não deverá ser adicionado antes, porque, em excesso de iodo, o amido será oxidado pelo iodo, interferindo no ponto final da titulação. Veja o vídeo da referência 43.

Para visualizar o ponto final, deve-se iniciar a titulação sem o indicador (solução de amido), até o aparecimento de uma coloração amarela (indica que tem pouco iodo). Quando a solução estiver amarelo clara, deve-se acrescentar à solução de amido e continuar a titulação, lentamente, gota a gota até o desaparecimento da coloração violácea, proveniente do complexo formado.

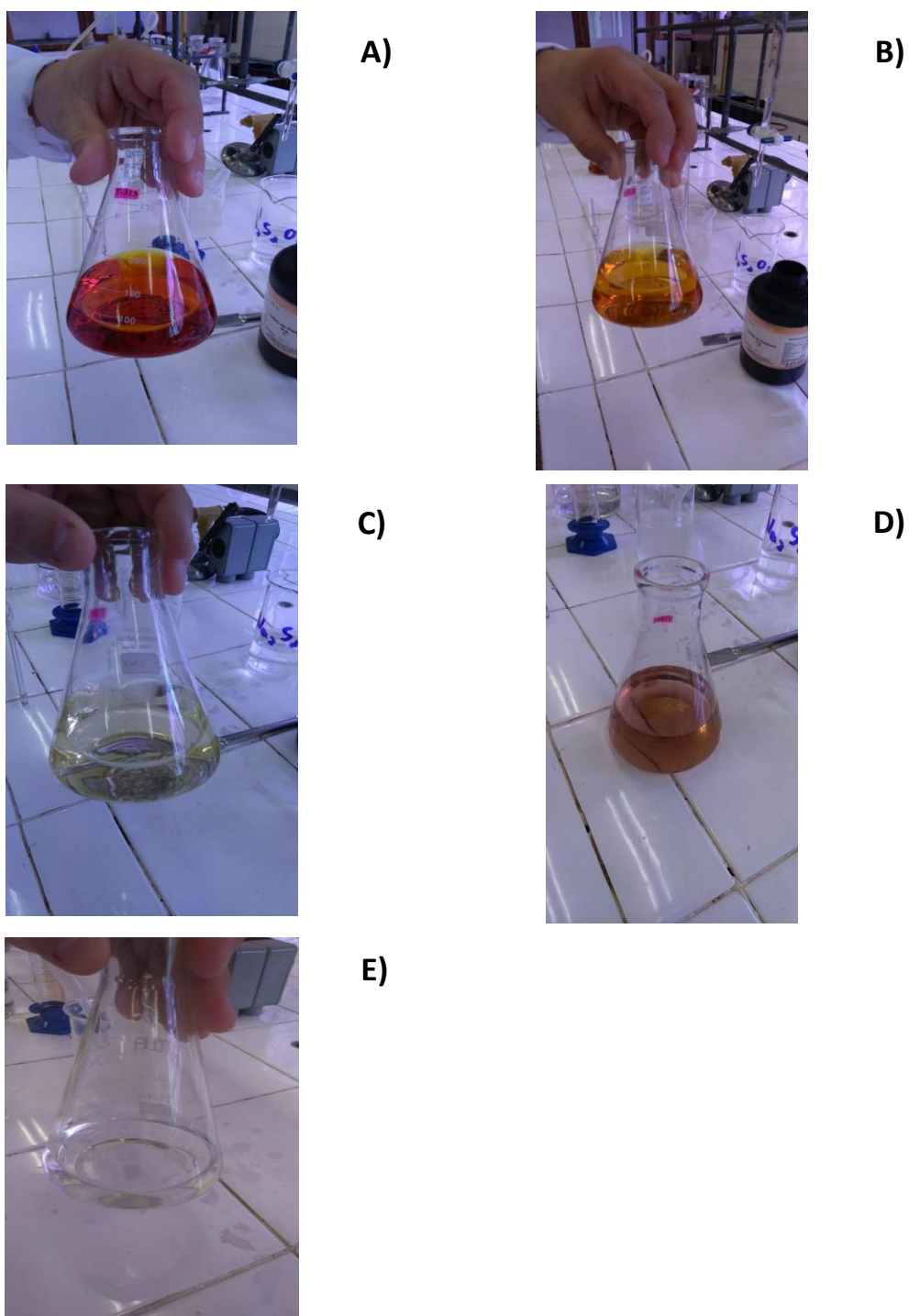


Figura 7. Titulação de retorno com tiosulfato de sódio A) após a adição de KIO_3 a solução ácida de KI . B) Após a adição de vitamina C. C) Antes da adição do indicador (solução de amido). D) Logo após a adição da solução de amido. E) No ponto de equivalência

O indicador usado na iodometria é uma suspensão de amido que em presença de iodo adquire uma coloração azul intensa. Esta cor é devida à adsorção de íons triiodeto (I_3^-) pelas moléculas do amido.²⁻⁴

O amido é uma substância polimérica constituída por dois polissacarídeos estruturalmente diferentes: amilose e amilopectina, cujas proporções variam de acordo com a fonte do amido.²⁻⁴

A fração ativa, a amilose, é um polímero do açúcar α -D-glicose que tem a forma de uma hélice na qual podem se fixar longas cadeias de I_2 combinado com I^- . A amilose e a

amilopectina podem sofrer reações de complexação, com formação de compostos coloridos, conforme é descrito na Reação 8 e Reação 9, respectivamente.

Amilose (β -amilose) + $I_3^- \rightleftharpoons$ complexo de cor azul intensa

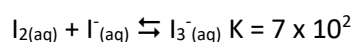
Reação 8

Amilopectina (α -amilose) + $I_3^- \rightleftharpoons$ complexo de cor Vermelho violáceo

Reação 9

O amido não é muito estável em solução sendo degradado por vários microorganismos. Um dos produtos de degradação, a glicose, é um agente redutor. Assim, uma solução de amido “velha” contendo alguma glicose pode causar um erro apreciável na titulação. Tais erros são evitados usando sempre soluções de amido recentemente preparadas.

Neste ponto, é importante ressaltar que o I_2 tem baixa solubilidade em água, no entanto, em excesso de I^- o íon I_3^- é formado (Reação 10), onde o I_3^- é solúvel em água devido à carga negativa. Desta forma, o excesso de iodeto de potássio na solução é essencial para que o iodo formado fique dissolvido na solução e caso não haja iodeto de potássio em excesso, o iodo formado se precipitará.⁴⁶



Reação 10:

O iodo em excesso que não reagiu com a vitamina C é titulado com $Na_2S_2O_3$ de acordo com a Reação 6.

onde $n_{I_2^R}$ é o número de mols de I_2 que reagiu com a vitamina C, $n_{I_2^I}$ é o número de mols de I_2 gerados, inicialmente, pela oxidação do iodeto com o iodato, $n_{I_2^N}$ é o número de mols de I_2 que não reagiram com a vitamina C.

Desta forma, a concentração de vitamina C pode ser determinada utilizando a Equação 3,

$$n_{I_2^R} = n_{I_2^I} - n_{I_2^N}$$

Equação 3

Da Reação 3 é sabido que cada 1 mol de KIO_3 gera 3 mol de I_2 , da Reação 6 é sabido que cada um 1 mol de iodo reage com 2 mol de $Na_2S_2O_3$, da Reação 4, sabemos que cada 1 mol de iodo reage com 1 mol de vitamina C, portanto, a Equação 3 pode ser reescrita como

é mostrado na Equação 4, onde $n_{\text{vitamina C}}$ é o número de mol de vitamina C, $C_{Na_2S_2O_3}$ é a concentração do tiossulfato de sódio e $V_{Na_2S_2O_3}$ é o volume gasto de tiossulfato de sódio na titulação.

$$n_{\text{vitamina C}} = n_{I_2^R} = (3 \times C_{KIO_3} \times V_{KIO_3}) - (C_{Na_2S_2O_3} \times V_{Na_2S_2O_3})/2$$

Equação 4

Para calcular a concentração de vitamina C na solução, basta dividir o número de mols de vitamina C, encontrados com a Equação 4 pelo volume da solução que foi titulada, neste caso, 10,00 mL. Repare que na Equação 4 se

os volumes utilizados nos cálculos forem em mL $n_{\text{vitamina C}}$ será em mmol, dividindo este valor pelo volume de vitamina C em mL, a resposta fica em mol L⁻¹.

2.10. Padronização de uma solução de iodo com tiosulfato de sódio

O iodo deverá ser padronizado antes da titulação da vitamina C. A padronização do iodo pode ser realizada utilizando o tiosulfato de sódio, que foi previamente padronizado. A

padronização foi realizada, titulando 10,00 mL de tiosulfato de sódio na presença de 20 gotas de solução de amido (1 mL) com iodo. Como é descrito na Reação 6, cada 1 mol de iodo reage com 2 mol de tiosulfato de sódio, portanto, a concentração do iodo poderá ser calculada utilizando a Equação 5.

$$C_{I_2} = (C_{Na_2S_2O_3} \times V_{Na_2S_2O_3}) / 2 \times V_{I_2}$$

Equação 5

A padronização da solução de iodo foi calculada adicionando 10 mL de tiosulfato de sódio a um Erlenmeyer com 20 gotas de amido

(1 mL), e titulando até uma coloração roxo-azulada como a que é mostrada na Figura 7 (Veja o vídeo da referência 45).²⁻⁴



A)



B)

Figura 7. Ponto final da titulação de uma solução de tiosulfato com iodo. A) no início da titulação B) no ponto de equivalência

2.11. Determinação da concentração de Vitamina C utilizando titulação com iodo

A determinação da concentração de vitamina C na solução também pode ser feita por titulação direta com iodo. Neste caso, 10,00 mL de vitamina C foram adicionados a um Erlenmeyer, juntamente com algumas 20 gotas de amido (indicador), 50 mL de água deionizada podem ser adicionados para dar volume a solução, neste caso, o volume de água adicionado não afeta o resultado. O iodo

reage com a vitamina C (Reação 4), se reduzindo a iodeto. Quando toda vitamina C for titulada pelo iodo, o iodo, que sai da bureta, vai se ligar ao amido (Reação 8 e Reação 9). Veja o vídeo na referência 44.²⁻⁴

A concentração de vitamina C foi calculada utilizando a Equação 6, uma vez que, 1 mol de vitamina C reage com 1 mol de iodo, como é descrito na Reação 4, onde C_{I_2} é a concentração de iodo e V_{I_2} é o volume da solução de iodo gasta na titulação.

$$C_{\text{vitamina C}} = (C_{I_2} \times V_{I_2}) / V_{\text{vitamina C}}$$

Equação 6

2.12. Determinação de vitamina C em comprimidos utilizando espectrofotometria de absorção molecular

A solução colorimétrica foi preparada pela dissolução de 100 mg de fenantrolina ($C_{12}H_8N_2$ MF 180,21 g mol⁻¹) e 50 mg de sulfato de ferro heptahidratado ($Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7H_2O$, 399.88 g mol⁻¹) em becker com 70 mL de água deionizada, em seguida 1 mL de HCl 37 % foi adicionado e a solução transferida para um balão

volumétrico de 100,00 mL e o volume completado até o menisco.

A solução de trabalho de vitamina C utilizada para a obtenção da curva analítica foi preparada pela dissolução de uma solução estoque de vitamina C. A solução estoque foi preparada pela dissolução de 400 mg de vitamina C em 100 mL de água deionizada.

A concentração da solução de trabalho foi expressa em mg L⁻¹ e calculada de acordo com a Equação 7, onde $m_{vitamina\ C}$ é a massa de vitamina C em mg e V é o volume em L (0,1 L)

$$C_{estoque} = \frac{m_{vitamina\ C}}{V} \quad \text{Equação 7}$$

A solução de trabalho foi preparada pela dissolução de 1 mL da solução de estoque em um balão volumétrico de 250 mL. A concentração da solução estoque foi calculada utilizando a Equação 8, onde $C_{estoque}$ foi calculada com a Equação 7, $V_{estoque}$ é volume

da solução transferido para o balão volumétrico (1 mL) e V é o volume do balão volumétrico (250 mL). Desta forma, a concentração da solução de trabalho foi expressa em mg L⁻¹

$$C_{trabalho} = \frac{C_{estoque}V_{estoque}}{V} \quad \text{Equação 8}$$

No método descrito no presente trabalho, optou-se por preparar a solução estoque pela dissolução de 400 mg de vitamina C em um balão volumétrico de 100 mL, ou seja, uma solução de estoque de 4000 mg L⁻¹. A diluição de 1 mL da solução estoque em um balão volumétrico de 250 mL resulta em uma solução de trabalho com concentração de 16 mg L⁻¹.

2.13. Método colorimétrico

A curva analítica foi preparada como apresentado na Tabela 1. Desta forma, a curva analítica foi preparada para concentrações de vitamina C de 1,6 a 6,4 mg L⁻¹.

Tabela 1. Volumes de solução de trabalho, solução colorimétrica e água deionizada utilizadas para preparar a curva analítica

Solução	Concentração (mg L ⁻¹)	Solução de trabalho (mL)	Solução colorimétrica (mL)	Água deionizada (mL)
branco	0	0,0	1	1,0
1	1,64	0,2	1	0,8
2	3,28	0,4	1	0,6
3	4,92	0,6	1	0,4
4	6,56	0,8	1	0,2

As soluções dos comprimidos de vitamina C (seção 0) têm concentração aproximada de 2000 mg L⁻¹. Para que as mesmas tenham concentrações dentro da curva analítica, as soluções foram diluídas 250 vezes para desenvolver concentrações próximas de 8 mg L⁻¹, como 1 mL desta solução foi misturada com 1 mL da solução colorimétrica, as soluções analisadas tiveram concentrações de aproximadamente 4 mg L⁻¹

A análise das soluções dos comprimidos foi feita pela mistura de 1 mL das soluções diluídas dos comprimidos com 1 mL da solução colorimétrica. Posteriormente, a absorbância das soluções foi mensurada a 510 nm. O espectrofotômetro utilizou como branco uma mistura de 1 mL da solução colorimétrica com 1 mL de água deionizada.

2.14. Obtenção das imagens digitais

As imagens foram obtidas colocando as placas de 96 micropoços em um scanner Canon Lide 120. As imagens foram obtidas com 600 dpi no formato *Joint Photographics Experts Group* (JPEG). As opções de correção automática da imagem pelo *software* foram desabilitadas.

2.15. Extração dos valores de RGB

Os valores de RGB foram extraídos das imagens utilizando o *freeware* ImageJ.³⁸⁻⁴⁷ Os valores de cada canal (RGB) de todos os poços da placa de 96 micropoços foram extraídos simultaneamente utilizando o *plugin* "ReadPlate" do ImageJ.

A Tabela 2 mostra a disposição das soluções da curva analítica e das amostras sobre uma placa de 96 micropoços, na qual, os suplementos de vitamina C foram analisado por 9 grupos de estudantes, A1-C3, 1-4 são as soluções preparadas para obter a curva analítica (Tabela 1), observe que a placa de 96 micropoços tem 12 colunas numeradas de 1 a 12 e 8 linhas numeradas de A até H. A Figura 8 mostra a disposição das amostras sobre a placa de 96 micropoços conforme a distribuição apresentada na Tabela 2. Cabe ressaltar que cada amostra foi preparada uma única vez e colocada em quatro micropoços.

Tabela 2. Distribuição das soluções da curva analítica e das amostras do suplemento alimentar, em uma placa de 96 micropoços

Linhas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Colunas												
A	branco	1	2	3	4							
B	branco	1	2	3	4							
C	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3			
D	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3			
E	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3			
F	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3			
G	branco	1	2	3	4							
H	branco	1	2	3	4							

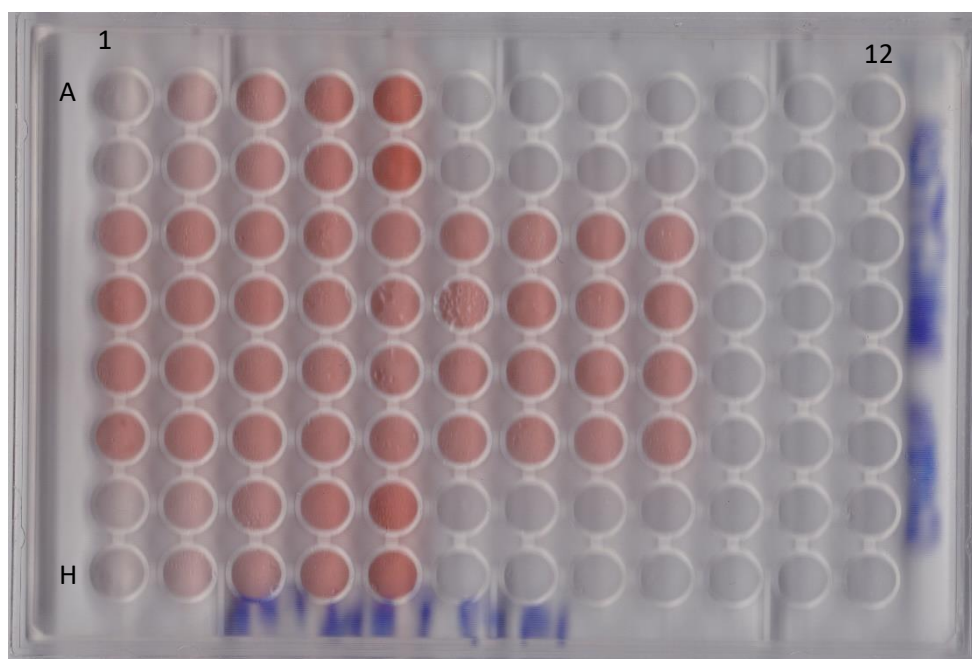


Figura 8. Disposição das soluções da curva analítica nas laterais (posições A1/B1/G1/H1 a A5/B5/G5/H5) de uma placa de 96 micropoços e amostras dispostas no centro da placa (posições C1/D1/E1/F1 a C9/D9/E9/F9)

Uma descrição detalhada de como extrair os valores de RGB, simultaneamente, de todos os poços de uma placa de 96 micropoços pode ser encontrada no trabalho de Colzani *et al.*³⁹

Depois de extrair os valores de RGB e exportar os dados para o Microsoft Excel 365,

os valores de R (Red), G (Green) e B (Blue) podem ser exportados para uma planilha do Microsoft Excel, disponível em um link Google drive.⁴⁸

Os valores de R, G e B foram normalizados conforme com a Equação 9, Equação 10 e

Equação 11, respectivamente. Posteriormente os valores normalizados de R, G e B foram linearizados utilizando a Equação 12, Equação 13 e Equação 14,

respectivamente, onde R_0 , G_0 e B_0 são os valores de R, G e B mensurados no branco, poços A1, B1, G1 e H1 (Veja Figura 8).

$$\bar{R} = (R)/\sqrt{R^2 + G^2 + B^2} \quad \text{Equação 9}$$

$$\bar{G} = (G)/\sqrt{R^2 + G^2 + B^2} \quad \text{Equação 10}$$

$$\bar{B} = (B)/\sqrt{R^2 + G^2 + B^2} \quad \text{Equação 11}$$

$$A_R = -\log_{10}(\bar{R}/\bar{R}_0) \quad \text{Equação 12}$$

$$A_G = -\log_{10}(\bar{G}/\bar{G}_0) \quad \text{Equação 13}$$

$$A_B = -\log_{10}(\bar{B}/\bar{B}_0) \quad \text{Equação 14}$$

Na planilha do Microsoft Excel 365, as concentrações de vitamina C (mg L^{-1}) nas soluções, é dada na coluna AR e a massa (mg) de vitamina C nos comprimidos, é calculada na coluna AS. Os gráficos da adição de padrão são mostrados entre as colunas AZ e BE.

2.16. ANOVA fator único

A Análise de Variância (ANOVA) de fator único foi utilizada para determinar se há diferença entre três ou mais conjuntos de dados. Quando o valor calculado de F ($F_{\text{calculado}}$) é menor que o valor crítico de F ($F_{\text{crítico}}$), $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ concluímos que os resultados obtidos são equivalentes considerando o nível de confiança

estabelecido. A ANOVA de fator único foi realizada para um nível de confiança de 95 % ($\alpha = 0,05$).

A Anova de fator único foi realizada através da ferramenta Análise de dados do Microsoft Excel. Para utilizar esta ferramenta basta clicar em “Dados”, “Análise de dados” e em “ANOVA: fator único”. A Figura 9 mostra fazer a ANOVA de fator único utilizando o Microsoft Excel. Em intervalo de entrada, devem ser selecionadas as células que contém os resultados. Em agrupar por, devemos escolher se desejamos diferenciar os dados pelas colunas ou pelas linhas, neste caso, devemos selecionar “Colunas”. Alfa é o nível de significância, por exemplo, um nível de confiança de 95 % ($\alpha = 0,05$).

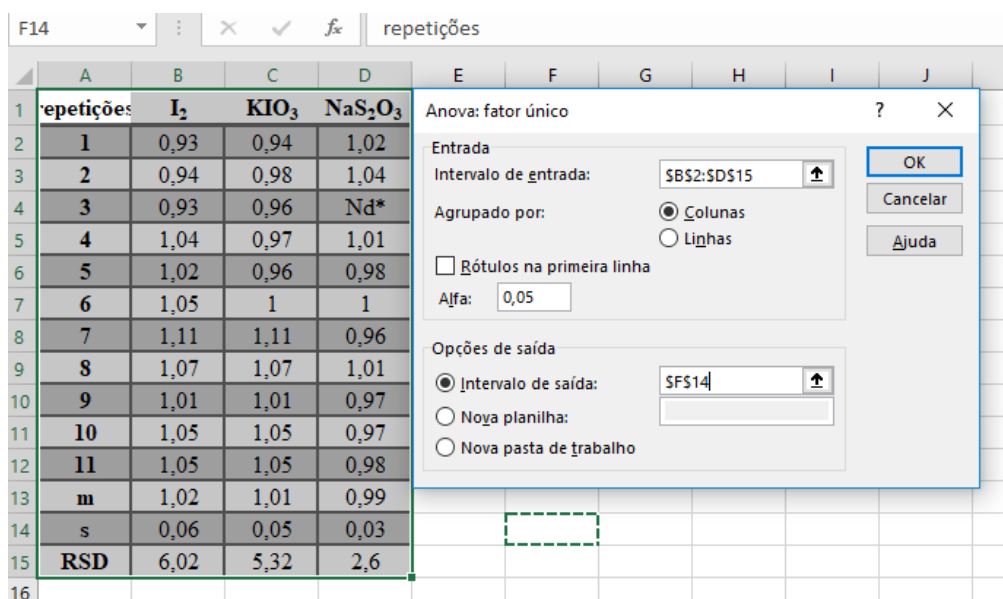


Figura 9. Ilustração de como realizar a ANOVA de fator único utilizando a ferramenta “análise de dados” do Microsoft Excel

A ferramenta “ANOVA: fator único” do Microsoft Excel retorna os seguintes fatores: Soma dos quadrados (SQ) e Média dos Quadrado (MQ) entre os grupos. Soma dos quadrados (SQ) e Média dos Quadrado (MQ) dentro dos grupos.

A SQ entre os grupos é calculada com a Equação 15, na qual m é a média ponderada

entre os três grupos, m₁ é média do grupo 1, m_n é a média do grupo n, N₁ é o número de observações no grupo 1 e N_n é o número de observações no grupo n. A MQ entre os grupos é determinada com a Equação 16, na qual, l é o número de grupos, neste caso, l = 3.

$$SQ \text{ entre os grupos} = N_1(m_1 - m)^2 + N_2(m_2 - m)^2 \dots N_n(m_n - m)^2 \tag{Equação 15}$$

$$MQ \text{ entre os grupos} = \frac{SQ \text{ entre os grupos}}{l - 1} \tag{Equação 16}$$

A SQ dentro dos grupos foi calculada com a Equação 17, a MQ dentro dos grupos foi calculada com a Equação 18, na qual N é o número de observações, neste caso, N = 32 e l = 3.

O valor de F foi calculado de acordo com a Equação 19.

$$SQ \text{ dentro dos grupos} = (N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2 \dots + (N_n - 1)s_n^2 \tag{Equação 17}$$

$$MQ \text{ dentro dos grupos} = SQ \text{ dentro dos grupos} / N - l \tag{Equação 18}$$

$$F = (MQ \text{ entre os grupos}) / (MQ \text{ dentro dos grupos}) \tag{Equação 19}$$

2.17. Teste t para duas amostras em par para médias

O teste t para duas amostras em par para médias é utilizado para comparar métodos, este teste foi realizado utilizando a Equação 20, na qual Δm é a diferença entre os resultados obtidos com cada método, Δs é o

desvio padrão das diferenças e n é o número de observações. O teste t para duas amostras em par para médias também pode ser realizado com o Microsoft Excel, clicando em “Dados”, “Análise de dados” e “teste t para duas amostras em par para médias”. O teste t para duas amostras em par para a média foi realizado em um intervalo de confiança de 95 %.

$$t = \frac{\Delta m \times \sqrt{n}}{\Delta s}$$

Equação 20

2.18. Curvas analíticas

Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO, a quantificação requer que se conheça a relação entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é

obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é dada da Equação 21. Onde a é o coeficiente linear, b é o coeficiente angular, x é a concentração de vitamina C em mg L^{-1} e y é a absorbância.⁵¹

$$y = a + bx$$

Equação 21

As equações das curvas analíticas foram obtidas através da opção do Microsoft Excel, bem como, os coeficientes de determinação, R^2 .

Para determinar a massa de vitamina C nos comprimidos, veja Figura 5, basta utilizar a Equação 22, onde C_T é a concentração em mg L^{-1} obtida com a curva analítica V é o volume do balão volumétrico (Balão A; 0,500 L) e F é o fator de diluição. Como a solução dos comprimidos foi diluída 250 vezes (Balão B; Figura 5), e a amostra foi misturada com 1 mL da solução colorimétrica (C_T) o valor de F é 500.

2.19. Determinação da massa de vitamina C nos comprimidos através da absorbâncias e imagens digitais

$$m = C_T \times V_A \times F$$

Equação 22

3. Resultados e Discussões

3.1. Determinação da concentração de vitamina C utilizando volumetria de óxido-redução

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos por acadêmicos do quarto semestre do curso de química noturno da Universidade Regional de Blumenau, no segundo semestre de 2016.

Os acadêmicos determinaram a massa de vitamina C em um suplemento alimentar utilizando três métodos volumétricos: titulação direta com iodo, titulação direta com

iodato e titulação de retorno com tiosulfato de sódio. A prática de ensino foi realizada em 150 minutos com 14 alunos trabalhando em duplas.

É interessante que os alunos possam observar se existe diferença entre os resultados obtidos com cada um dos métodos

volumétricos utilizados. Para tanto, foi necessário utilizar a ANOVA de fator único, conforme descrito no item 0.

A ANOVA de fator único foi utilizada para determinar se há diferença entre três conjuntos de dados representados na Tabela 3.

Tabela 3. Massa de vitamina C, em g, presente em um comprimido determinada por titulação, I₂ titulação direta com iodo, KIO₃ titulação direta com iodato de potássio e titulação de retorno com tiosulfato de sódio

Repetições	I ₂	KIO ₃	NaS ₂ O ₃
1	0,93	0,94	1,02
2	0,94	0,98	1,04
3	0,93	0,96	Nd*
4	1,04	0,97	1,01
5	1,02	0,96	0,98
6	1,05	1,00	1,00
7	1,11	1,11	0,96
8	1,07	1,07	1,01
9	1,01	1,01	0,97
10	1,05	1,05	0,97
11	1,05	1,05	0,98
m	1,02	1,01	0,99
s	0,06	0,05	0,03
RSD	6,02	5,32	2,60

* nd não determinado; m é média, s é o desvio padrão, RSD é o desvio padrão relativo

Desta forma, a média ponderada é calculada como: $m = (1,018 + 1,009 + 0,994)/3 = 1,007$. A SQ entre os grupos foi calculada com a Equação 15 (SQ entre os grupos = $11 \times (1,018 - 1,007)^2 + 11 \times (1,009 - 1,007)^2 + 11 \times (0,994 - 1,007)^2 = 0,0031$) e a MQ entre os grupos foi calculada com a Equação 16 (MQ entre os grupos = $0,00311/(3-1) = 0,00155$)

A SQ dentro dos grupos foi calculada com a Equação 17 (SQ dentro dos grupos = $(11-1) \times 0,06^2 + (11-1) \times 0,05^2 + (10-1) \times 0,03^2 = 0,07$). A MQ dentro dos grupos foi calculada Equação 18 (A MQ dentro dos grupos = $(0,07)/(33-3) = 0,0025$). Por fim, o valor de F foi calculado utilizando a Equação 19 ($F = (0,00155/0,0025) = 0,6$)

Quando o valor de F calculado (0,63) é menor que o valor de F crítico (3,33), em um nível de confiança de 95 %, conclui-se que não existe diferença significativa entre os grupos neste nível de confiança.

A Tabela 4 mostra os resultados para a ANOVA de fator único obtidos com o Microsoft Excel. Durante a execução do experimento os alunos indicaram que preferem utilizar o Microsoft Excel do que realizar os cálculos descritos na seção Equação 18.

Adicionalmente, utilizando tabelas estatísticas, quando $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, em um nível de confiança de 95 %, podemos assegurar que de 100 resultados obtidos com os três métodos, mais de 5 resultados serão

iguais. Utilizando o Microsoft Excel na Tabela 4, obtemos o valor-P, teste valor de 0,54 representa que de cada 100 resultados, 54 serão iguais.

Na Tabela 4 são mostrados o número de observações obtidas com cada método.

Tabela 4. Anova de Fator único obtida com o Microsoft Excel para os dados na Tabela 3

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Coluna 1	11	11,2	1,02	3,64E-03		
Coluna 2	11	11,1	1,01	2,93E-03		
Coluna 3	10	9,94	0,99	6,71E-04		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F calculado</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,003105	2	0,0016	0,6	0,54	3,33
Dentro dos grupos	0,071695	29	0,0025			
Total	0,0748	31				

SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; gl: graus de liberdade

3.2. Determinação de vitamina C utilizando a absorvância mensurada a 510 nm e os valores de RGB extraídos das imagens digitais

A Figura 10 mostra o modelo linear para a curva analítica, absorvância mensurada a 510 nm vs concentração de vitamina C (mg L^{-1}). A Figura 11 mostra os modelos lineares obtidos para as curvas analíticas obtidas fazendo os valores normalizados de R, G e B em função da concentração de vitamina C (mg L^{-1}). Na Figura 11, os valores A são representados pela Equação 14, Equação 15 e Equação 16.

O objetivo deste experimento foi determinar a massa de vitamina C nos suplementos alimentares, observando a Figura 5 fica evidente que a concentração determinada com a curva analítica (Equação

21), é a concentração no tubo de ensaio, C_T . A concentração no balão volumétrico B é $C_B = C_T \times F_1$, onde F_1 é o fator de diluição, como a solução foi diluída 2 vezes, 1 mL da solução do balão B mais 1 mL de solução colorimétrica, $F_1 = 2$. A concentração no balão volumétrico A é $C_A = C_B \times F_2$, onde F_2 é o fator de diluição, como a solução foi diluída 250 vezes, 1 mL da solução do Balão volumétrico A diluída para 250 mL do balão B, $F_2 = 250$. Portanto, $C_A = C_T \times F_1 \times F_2$, onde $F_1 \times F_2 = 250 \times 2 = 500$ e a concentração no balão volumétrico A pode ser representada como $C_A = C_T \times 500$.

Por exemplo, para um comprimido do suplemento alimentar, se a concentração de vitamina C determinada através da Equação 21 é $4,1 \text{ mg L}^{-1}$, C_T na Figura 5, a massa de vitamina C em um comprimido foi determinada pela Equação 22, $4,1 \text{ mg L}^{-1} \times 500 \times 0,5 \text{ L} = 2025 \text{ mg}$.

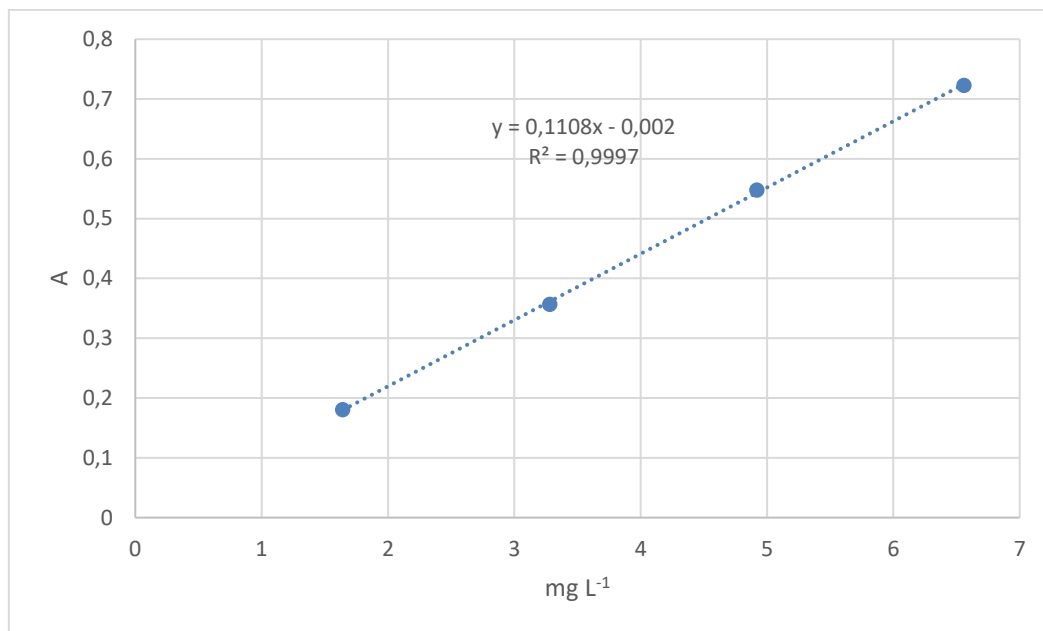


Figura 10. Modelo linear obtido para a curva analítica (Absorbância a 510 nm vs concentração, mg.L-1)

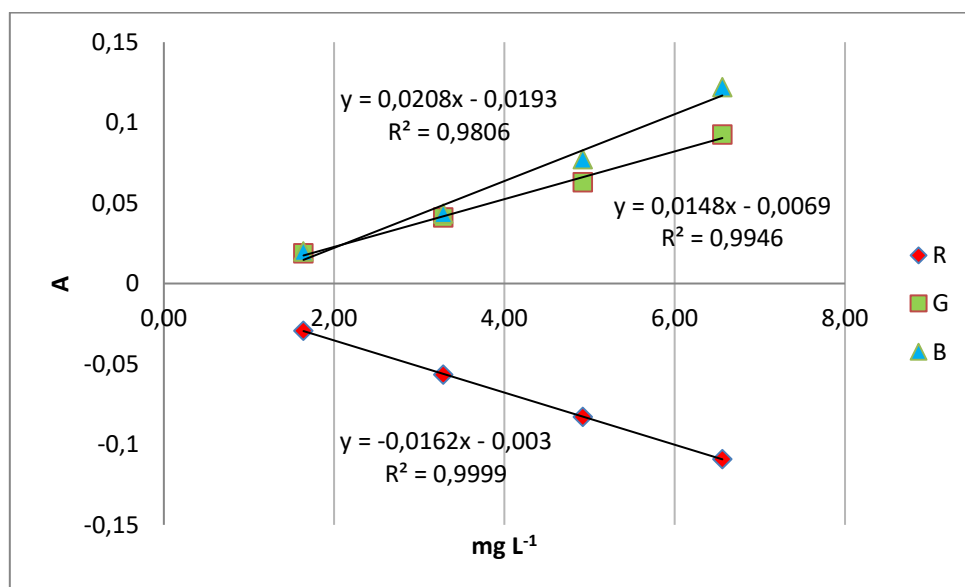


Figura 11. Modelos lineares obtidos para a curva analítica obtidas dos valores normalizados de RGB vs concentração. \bar{R} vs mg L-1, \bar{G} vs mg L-1 e \bar{B} vs mg L-1

Quando o aluno obtém o modelo linear da curva analítica, resta perguntar, o modelo linear proposto é satisfatório? A linearidade da curva analítica poderá ser determinada utilizando o coeficiente de determinação, R^2 , onde quanto mais próximo de 1 o valor R^2 melhor a qualidade da regressão.

O INMETRO recomenda um valor de R^2 acima de 0,90.⁵¹ Observando a Figura 10 e Figura 11, todas as equações das curvas analíticas apresentam R^2 maior que 0,98.

Uma vez que ambos os métodos apresentaram boa linearidade ($R^2 > 0,98$), a

massa de vitamina C em cada um dos comprimidos foi determinada utilizando a absorção mensurada a 510 nm e os valores de B extraídos das imagens digitais (Tabela 5).

A Tabela 5 mostra os valores obtidos com o espectrofotômetro e as imagens digitais. O teste t, duas amostras em par para médias, mostra que o valor de t calculado é de 1,65, enquanto o valor de t crítico, em um intervalo

de confiança de 95 % é de 1,85, indicando que os dois métodos fornecem resultados equivalentes. O valor de t foi calculado utilizando a Equação 20. Portanto, podemos assumir que o método que emprega imagens digitais fornece resultados equivalentes aos obtidos com um espectrofotômetro, visto que $t \text{ calculado} < t \text{ crítico}$, e ambos os métodos podem ser utilizados para determinar a massa de vitamina C nos comprimidos.

Tabela 5. Massas de vitamina C, em mg, determinadas em três suplementos alimentares

Amostra	Scanner	UV (510 nm)	Δ
A	1046	995	51
A	1086	982	105
A	1086	986	100
B	1044	1004	40
B	1003	991	12
B	954	997	-43
C	463	456	7
C	459	458	0
C	446	467	-21
Δm			28
Δs			51

Δ é a diferença entre os valores obtidos com o espectrofotômetro e as imagens digitais. Δm é a média das diferenças e Δs é o desvio padrão entre as diferenças.

4. Conclusões

A análise de materiais presentes no cotidiano dos alunos, como comprimidos de vitamina C, realça a importância da química na vida, bem como, introduz os conceitos básicos da espectrofotometria e da titulação de óxido-redução.⁵² Adicionalmente, o baixo custo dos materiais e reagentes empregados neste experimento permitem seu uso em qualquer escola.

Na primeira parte desta prática de ensino, os alunos têm a oportunidade de utilizar três métodos volumétricos (volumetria direta com iodo e iodato de potássio e volumetria de retorno com tiosulfato de sódio) para determinar a massa de vitamina C em suplementos alimentares. Os alunos

demonstram entender o princípio do teste estatístico ANOVA de fator único, ao comparar os três métodos utilizando este teste estatístico. Os alunos demonstram que a melhor opção para realizar este teste é o Microsoft Excel. Adicionalmente, a ANOVA de fator único permitiu que os alunos observassem que os três métodos estudados fornecem resultados equivalentes em um nível de confiança de 95 %.

Na segunda parte, a concentração de vitamina C foi determinada utilizando um espectrofotômetro e imagens digitais, obtidas com um scanner de mesa. A comparação de ambos os métodos através do teste t para duas amostras em par para médias permitiu que os alunos observassem como dois métodos podem ser comparados. Portanto, os alunos têm a oportunidade de utilizar técnicas

clássicas (métodos volumétricos) e instrumentais (espectrofotometria), bem como, utilizar métodos estatísticos para comparar resultados.

Quando a concentração de vitamina C for determinada utilizando imagens digitais, recomenda-se utilizar concentrações entre 1,6 a 6,6 mg L⁻¹ e que se utilize os valores do azul (Equação 14) para determinar a massa de vitamina C nos suplementos alimentares.

Adicionalmente, o uso de imagens digitais para fins quantitativos é um tópico de crescente interesse. A utilização do plugin ReadPlate do imageJ e de tabelas do Microsoft Excel permite com que os valores de RGB sejam extraídos de uma maneira simples e rápida, fornecendo as massas de vitamina nos suplementos alimentares e gerando as curvas analíticas.

Agradecimentos

Os autores agradecem as bolsas e auxílio financeiro da FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo 402226/2016-0) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). A Magnor Ronieri pelos vídeos que ajudam a ilustrar os procedimentos.

Referências Bibliográficas

- ¹ Abdelmageed, O. H.; Khashaba, P. Y.; Askal, H. F.; Saleh, G. A.; Refaat, I. H. Selective spectrophotometric determination of ascorbic acid in drugs and foods. *Talanta* **1995**, *42*, 573-579. [CrossRef]
- ² Sigmann, S. B.; Wheeler, D. E. Quantitative determination of citric and ascorbic acid in powdered drink mixes: A high school or general chemistry experiment. *Journal of Chemical Education* **2004**, *81*, 1479. [CrossRef]
- ³ Sowa, S.; Kondo, A. E. Sailing on the "C": A Vitamin Titration with a Twist. *Journal of Chemical Education* **2003**, *80*, 550. [CrossRef]
- ⁴ Silva, C. R., Simoni, J. A., Collins, C. H., & Volpe, P. L. Ascorbic acid as a standard for iodometric titrations. An analytical experiment for general chemistry. *Journal of Chemical Education* **1999**, *76*, 1421. [CrossRef]
- ⁵ King, D.; Friend, J.; Kariuki, J. Measuring vitamin C content of commercial orange juice using a pencil lead electrode. *Journal of Chemical Education* **2010**, *87*, 507. [CrossRef]
- ⁶ Adem, S. M.; Leung, S. H.; Elles, L. M. S., Shaver, L. A. A Laboratory Experiment for Rapid Determination of the Stability of Vitamin C. *Journal of Chemical Education* **2016**, *93*, 1766. [CrossRef]
- ⁷ Zenebon, O.; Pascuet, N. S.; Tiglia, P.; *Métodos físico-químicos para a análise de alimentos*, Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, Brasil, 2008. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf>. Acesso em: 15 outubro 2017.
- ⁸ Mercado, J. B. P.; Coombs, E. M.; De Jesus, J. P.; Bretz, S. L.; Danielson, N. D. Iodine Coulometry of Various Reducing Agents Including Thiols with Online Photocell Detection Coupled to a Multifunctional Chemical Analysis Station To Eliminate Student End Point Detection by Eye. *Journal of Chemical Education* **2018**, *95*, 777. [CrossRef]
- ⁹ Bertotti, M.; Vaz, J. M.; Telles, R. Ascorbic Acid Determination in Natural Orange Juice: As a Teaching Tool of Coulometry and Polarography. *Journal of Chemical Education* **1995**, *72*, 445. [CrossRef]
- ¹⁰ King, D.; Friend, J.; Kariuki, J. Measuring vitamin C content of commercial orange juice using a pencil lead electrode. *Journal of Chemical Education* **2010**, *87*, 507. [CrossRef]
- ¹¹ Tortajada-Genaro, L. A. Determination of L-ascorbic acid in tomato by capillary electrophoresis. *Journal of Chemical Education* **2012**, *89*, 1194. [CrossRef]

- ¹² Odriozola-Serrano, I.; Hernández-Jover, T.; Martín-Belloso, O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry* **2007**, *105*, 1151. [[CrossRef](#)]
- ¹³ Nováková, L.; Solich, P.; Solichová, D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27*, 942. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Arya, S. P.; Mahajan, M.; Jain, P. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *417*, 1. [[CrossRef](#)]
- ¹⁵ Arya, S. P.; Mahajan, M.; Jain, P. Photometric methods for the determination of vitamin C. *Analytical Sciences* **1998**, *14*, 889. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ González-Jiménez, M.; Arenas-Valgañón, J.; Céspedes-Camacho, I. F.; García-Prieto, J. C.; Calle, E.; Casado, J. Detection of Nitrite in Water Using Minoxidil as a Reagent. *Journal of Chemical Education* **1998**, *90*, 1053. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Wyllie, G. R. Spectroscopic Determination of Triclosan Concentration in a Series of Antibacterial Soaps: A First-Year Undergraduate Laboratory Experiment. *Journal of Chemical Education* **2014**, *92*, 153. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Berker, K. I.; Güçlü, K.; Tor, I.; Apak, R. Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* **2007**, *72*, 11575. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Güçlü, K.; Sözgen, K.; Tütem, E.; Özyürek, M.; Apak, R. Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. *Talanta* **2005**, *65*, 1226. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ 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. *Química Nova* **2008**, *31*, 1577. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Nóbrega, J. A.; Lopes, G. S.; Flow-injection spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical products with the Prussian Blue reaction *Talanta* **1996**, *43*, 971. [[CrossRef](#)]
- ²² Capitán-Vallvey, L. F.; López-Ruiz, N.; Martínez-Olmos, A.; Erenas, M. M.; Palma, A. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *899*, 23. [[CrossRef](#)]
- ²³ Campos, A. R.; Knutson, C. M.; Knutson, T. R.; Mozzetti, A. R.; Haynes, C. L.; Penn, R. L.; Quantifying Gold Nanoparticle Concentration in a Dietary Supplement Using Smartphone Colorimetry and Google Applications *Journal of Chemical Education* **2015**, *93*, 318. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Kohl, S. K.; Landmark, J. D.; Stickle, D. F. Demonstration of Absorbance Using Digital Color Image Analysis and Colored Solutions *Journal of Chemical Education* **2006**, *83*, 644. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Kuntzleman, T. S.; Jacobson, E. C. Teaching Beer's Law and Absorption Spectrophotometry with a Smart Phone: A Substantially Simplified Protocol *Journal of Chemical Education* **2016**, *93*, 1249. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Damasceno, D.; Toledob, T. G.; Godinho, M. S.; da Silva, C. P.; de Oliveira, S. B.; de Oliveira, A. E. Análise multivariada de imagens na química: um experimento para determinação do pH de águas potáveis. *Química Nova* **2015**, *38*, 836. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Byoung-Yong, C. Smartphone-based Chemistry Instrumentation: Digitization of Colorimetric Measurements *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2012**, *33*, 549. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Koenig, M. H.; Yi, E. P.; Sandridge, M. J.; Mathew, A. S.; Demas, J. N. J. "Open-Box" Approach to Measuring Fluorescence Quenching Using an iPad Screen and Digital SLR Camera *Journal of Chemical Education* **2014**, *92*, 310. [[CrossRef](#)]

- ²⁹ Blatchly, R. A.; Delen, Z.; O'Hara, P. B. J. Making Sense of Olive Oil: Simple Experiments To Connect Sensory Observations with the Underlying Chemistry *Journal of Chemical Education* **2014**, *91*, 1623. [CrossRef]
- ³⁰ Kehoe, E.; Penn, R. L. Introducing Colorimetric Analysis with Camera Phones and Digital Cameras: An Activity for High School or General Chemistry *Journal of Chemical Education* **2013**, *90*, 1191. [CrossRef]
- ³¹ Koesdjojo, M. T.; Pengpumkiat, S.; Wu, Y.; Boonloed, A.; Huynh, D.; Remcho, T. P.; Remcho, V. T. Cost Effective Paper-Based Colorimetric Microfluidic Devices and Mobile Phone Camera Readers for the Classroom. *Journal of Chemical Education* **2015**, *92*, 737. [CrossRef]
- ³² Knutson, T. R.; Knutson, C. M.; Mozzetti, A. R.; Campos, A. R.; Haynes, C. L.; Penn, R. L. A Fresh Look at the Crystal Violet Lab with Handheld Camera Colorimetry *Journal of Chemical Education* **2015**, *92*, 1692. [CrossRef]
- ³³ Rice, N. P.; de Beer, M. P.; Williamson, M. E.; A Simple Educational Method for the Measurement of Liquid Binary Diffusivities *Journal of Chemical Education* **2014**, *91*, 1185. [CrossRef]
- ³⁴ Moraes, E. P.; da Silva, N. S.; de Morais, C. D. L.; Neves, L. S. D.; Lima, K. M. D. J. Integrating Mobile Phones into Science Teaching To Help Students Develop a Procedure To Evaluate the Corrosion Rate of Iron in Simulated Seawater. *Journal of Chemical Education* **2014**, *91*, 1958. [CrossRef]
- ³⁵ Moraes, E. P.; Confessor, M. R.; Gasparotto, L. H. S. Integrating Mobile Phones into Science Teaching To Help Students Develop a Procedure To Evaluate the Corrosion Rate of Iron in Simulated Seawater *Journal of Chemical Education* **2015**, *92*, 1696. [CrossRef]
- ³⁶ Montangero, M. J. Determining the Amount of Copper(II) Ions in a Solution Using a Smartphone *Journal of Chemical Education* **2015**, *92*, 1759. [CrossRef]
- ³⁷ Grasse, E. K.; Torcasio, M. H.; Smith, A. W. Teaching UV-Vis Spectroscopy with a 3D-Printable Smartphone Spectrophotometer. *Journal of Chemical Education* **2016**, *93*, 146. [CrossRef]
- ³⁸ Soldat, D. J.; Barak, P.; Lepore, B. Microscale Colorimetric Analysis Using a Desktop Scanner and Automated Digital Image Analysis. *Journal of Chemical Education* **2009**, *86*, 617. [CrossRef]
- ³⁹ Colzani, H.; Rodrigues, Q. E. A. G.; Fogaça, C.; Gelinski, J. M. L. N.; Pereira-Filho, E. R.; Borges, E. M. Phosphate Colorimetric Analysis using a desktop Scanner and automated digital image: A didactical example to teach colorimetric analysis. *Química Nova* **2017**, *40*, 833. [CrossRef]
- ⁴⁰ Volmer, D. A.; Curbani, L.; Parker, T. A.; Garcia, J.; Schultz, L. D.; Borges, E. M. Determination of Titratable Acidity in Wine Using Potentiometric, Conductometric, and Photometric Methods. *Journal of Chemical Education* **2017**, *94*, 1296. [CrossRef]
- ⁴¹ Vídeo Youtube. Disponível em: <https://youtu.be/VE9hy_Xr1bU> Acesso em: 21 outubro 2018.
- ⁴² Vídeo Youtube. Disponível em: <<https://youtu.be/sClMKyICv-w>> Acesso em: 21 outubro 2018.
- ⁴³ Vídeo Youtube. Disponível em: <<https://youtu.be/KkDnTeTx2kg>> Acesso em: 21 outubro 2018.
- ⁴⁴ Vídeo Youtube. Disponível em: <<https://youtu.be/YnNGOF5sC1s>>. Acesso em: 21 outubro 2018.
- ⁴⁵ Vídeo Youtube. Disponível em: <<https://youtu.be/Pjql8ykl4Lo>> Acesso em: 21 outubro 2018.
- ⁴⁶ Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 7a. ed., LCT: Rio de Janeiro, 2011
- ⁴⁷ <<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>> Acesso em: 2 junho 2018
- ⁴⁸ <<https://drive.google.com/open?id=1oD8sR1RtT1RMLUPF3OuTvAtrZ8JN9mPO>>. Acesso 2 junho 2018.
- ⁴⁹ Barrows, R. D. Quantitative comparison of three standardization methods using a one-way ANOVA for multiple mean comparisons.

Journal of chemical education **2007**, *84*, 839. [\[CrossRef\]](#)

⁵⁰ Bularzik, J. The Penny Experiment Revisited: An Illustration of Significant Figures, Accuracy, Precision, and Data Analysis. *Journal of Chemical Education* **2007**, *84*, 1456. [\[CrossRef\]](#)

⁵¹ Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validation for

chromatographic and electrophoretic methods. *Química Nova* **2004**, *27*, 771. [\[CrossRef\]](#)

⁵² Ramos, L. A.; Cavalheiro, C. C. S.; Cavalheiro, E. T. G. Determination of nitrite in water using a flower extract. *Química Nova* **2006**, *29*, 1114. [\[CrossRef\]](#)