

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/10/2019.

Natália da Costa Luchiari

**Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para
determinação de cafeína em águas residuárias a partir
de ensaios colorimétricos e fluorimétricos**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Química

Orientador: Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de
Lima Gomes

Araraquara
2018

L936d Luchiari, Natália da Costa
Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para
determinação de cafeína em águas residuárias a partir de ensaios
colorimétricos e fluorimétricos / Natália da Costa Luchiari. –
Araraquara : [s.n.], 2018
109 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

1. Cafeína. 2. Colorimetria. 3. Fluorimetria. 4. Impressora
tridimensional. 5. Equipamento eletrônico em miniatura.
I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para determinação de cafeína em águas residuárias a partir de ensaios colorimétricos e fluorimétricos"

AUTORA: NATÁLIA DA COSTA LUCHIARI

ORIENTADOR: PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof^a. Dr^a. MARIA VALNICE BOLDRIN
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof^a. Dr^a. ENY MARIA VIEIRA
Departamento de Química e Física Molecular / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 16 de outubro de 2018

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Natália da Costa Luchiari

Nome em citações bibliográficas: LUCHIARI, N. C.; Natália Lucchiari;
LUCCHIARI, N.; LUCHIARI, Natália da Costa.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara. Rua Francisco Degni, 55. Jardim Quitandinha, 14800060 - Araraquara, SP–Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2008 – 2015 Bacharela em Química Tecnológica, pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

2013 – 2014 Graduação sandwich na Budapest University of Technology and Economics, BUTE, Hungria.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2018 Escola SENAI “Henrique Lupo” de Araraquara

Curso de Formação Inicial e Continuada – Aperfeiçoamento Profissional –
Microcontrolador Arduíno – 40h.

2017 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

Estágio e Docência em Química Analítica Quantitativa (Teórica) – 60h.

Estágio e Docência voluntário em Química Analítica Quantitativa
(Experimental) – 60h.

2013 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

Estágio para elaboração de trabalho de conclusão de curso (TCC) – 240h.

2009 Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

Monitoria em Química Experimental Geral – 180h.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2018 Escola Técnica Estadual – ETEC

2018 Universidade Federal de Goiás – UFG

Estágio Grupo de Métodos Eletroforéticos.

2016 – atualmente Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. Mestrado em Química

2015 – 2016 Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

Iniciação Científica voluntária: Grupo de Química Teórica em Mecânica Quântica não-linear – QuiTeo.

2015 – 2016 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

Iniciação Científica (bolsista): Laboratório de Eletroquímica e Eletroanalítica – IQ.

2014 Budapest University of Technology and Economics – BUTE.

Estágio (em “Bioorganic Chemistry Group”)

2013 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

Estágio voluntário: Laboratório de Eletroquímica e Eletroanalítica – IQ.

2009 – 2013 Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

Iniciação Científica (bolsista CNPq): Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

MARTINS, G. S.; LUCHIARI, N. da C.; LAMARCA, R. S.; SILVA, B. F. da.; GOMES, P. C. F. L. Removal of sulfamethoxazol and trimethoprim using horizontal-flow anaerobic immobilized bioreactor. **Scientia Chromatographica**, v. 9, n. 4, p. 253-264, 2017.

CARDOSO, J. C.; LUCCHIARI, N. da C.; ZANONI, M. V. B. Bubble annular photoelectrocatalytic reactor with TiO₂ nanotubes arrays applied in the textile wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, p. 1177-1184, 2015.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1. VII Workshop de Microfluídica, 2017
 2. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012.
 3. IX Semana da Química- UFSCar, 2012.
 4. Workshop de Biocatálise e de Biotransformação, 2012.
 5. XX Congresso de Iniciação Científica, 2012.
 6. 18º Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Interior Paulista, 2011.
 7. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.
 8. 3rd Brazilian Conference on Natural Products, XXIX RESEM and VII SFL., 2011.
 9. XIX Congresso de Iniciação Científica da UFSCar - 9ª Jornada Científica e Tecnológica, 2011.
 10. XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFScar, 2011.
 11. XVII Congresso de Iniciação Científica da UFSCar - 8ª Jornada Científica e Tecnológica, 2009.
-

Dedicatória

Dedico não só essa dissertação, mas toda a minha jornada acadêmica ainda em curso, aos meus pais Sueli e Claudemir por não medirem esforços para que esse caminho se tornasse mais leve e prazeroso através de constantes demonstrações de afeto e por sempre incentivarem meus sonhos. À minha irmã Isabela à quem tenho o prazer de ter como parceira de profissão e pra vida. Aos meus avós, Pedro e Iolanda (*in memoriam*) que por circunstâncias da idade tem me ensinado diariamente o significado da palavra superação em todos os segmentos da vida.

Ao arquiteto do Universo, aos que me regem, me guiam e protegem.

Agradecimentos

Minha gratidão ao Prof. Dr. Paulo Clairmont, orientador exímio no exercer de sua profissão como professor e pesquisador. Agradeço aos valiosos ensinamentos, pela oportunidade de desenvolvermos esse trabalho e pela amizade.

Aos amigos do nosso grupo de Pesquisa pela parceria, aprendizado e momentos compartilhados: Rafa, Gabi, Flavinha, Andressa, Mateus e Pietro. À Gabrielen e ao César pela preciosa colaboração e envolvimento direto nas etapas de desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Bianca Ferreira da Silva por quem tenho profunda admiração pessoal e profissional, pelos preciosos ensinamentos transmitidos. Por ter sido a grande incentivadora para que esse título fosse alcançado me apresentando ao Prof. Paulo e sua inovadora linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Wendell Coltro pelo convite de conhecer seu grupo de pesquisa na Universidade Federal de Goiás, pioneiro em microfluidica e microfabricação de dispositivos. Acresço meus agradecimentos à todo o grupo de pesquisa pela receptividade, ensinamentos e à oportunidade de conhecer o admirável trabalho que desenvolvem na UFG.

Ao corpo docente da Unesp, principalmente aos professores do Departamento de Química Analítica sempre muito receptivos à colaborações. Prof. Dr. Arnaldo Cardoso, Prof. Dra. Raquel Nogueira, Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro, por disporem seus laboratórios às nossas necessidades. Estendo os agradecimentos aos integrantes de seus respectivos grupos de pesquisa, colegas de trabalho com quem tenho tido o prazer de aprender diariamente.

Aos amigos, Armando Sambataro pelas prazerosas discussões que contribuíram emocional e profissionalmente para a conclusão desse trabalho. Tímea Pálinkas pela amizade e incentivo a cada etapa desse trabalho. André Marcomini pela sólida amizade, pelos momentos de discussão profissional e principalmente pelas boas risadas. Marina Sá pela amizade e incentivo a minha jornada acadêmica. Às amigas Heloísa F. Pallini e Monize Pavan pela amizade que se estende desde a graduação e que se faz presente nessa etapa.

Aos amigos do IQ-Unesp pelas valiosas discussões e por tornarem o dia-a-dia mais prazeroso (com café): Bi, ThailaMigaSuaLoka, JP, AC, Jef, Josiel, Kallyni, Alisson, Iovan, Chico. Ao João Carlos (River Black) pela amizade e parceria, pela prontidão em me auxiliar a cada dificuldade do presente trabalho. Ao Albertinho pelo apoio. À Bel pela amizade e auxílio nas etapas finais desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro e ao Prof. Dr. Arnaldo Sarti por terem aceitado o convite de serem banca do Exame de Qualificação e contribuírem com valiosa discussão.

Aos funcionários do IQ pelo suporte e prontidão. À seção de pós-graduação, Wennia, Cíntia, Paula, Célia, Robson pelo auxílio dado em todos os momentos. Aos funcionários da Biblioteca, à Valéria pela atenção e discussões para normatização desse trabalho.

Ao INCT-DATREM, à PROPE, CNPq, FAPESP e à CAPES pelo financiamento concedido para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura plana da molécula de cafeína.	24
Figura 2 – Estrutura plana da molécula de HPTS.	28
Figura 3 – Representação esquemática do dispositivo colorimétrico (DC) fabricado por impressão 3D.	34
Figura 4 – Representação esquemática da etapa de aquisição da imagem usando dispositivo colorimétrico (DC) acoplado ao celular e a posição de captura da imagem (<i>spot</i>) na placa de porcelana.	35
Figura 5 – Placa de porcelana com resíduo sólido avermelhado obtido após a reação entre cafeína (75 mg L^{-1}) e KBrO_3 em meio ácido ($\text{HCl } 37 \%$) ocorrer.	41
Figura 6 – Cromatograma de íons totais (TIC): (a) referente ao padrão de cafeína ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$) seguido do seu respectivo cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 195 e espectro de massas com tempo de retenção de 4,67 minutos da cafeína padrão e (b) TIC e XIC do produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína e KBrO_3 em meio ácido ($\text{HCl } 37 \%$).	43
Figura 7 – (a) cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 241 seguido do respectivo espectro de massas com tempo de retenção de 4,15 minutos e (b) XIC de m/z 324 e respectivo espectro de massas com tempo de retenção de 4,74 minutos.	44
Figura 8 – Espectros de massas dos íons fragmentos de m/z (a) 324, (b) 241 e (c) 481.	45
Figura 9 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para padrão de cafeína, com varredura das transições de transições $195>138$, $195>110$ e $195>83$.	46
Figura 10 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para o produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína e KBrO_3 em meio ácido ($\text{HCl } 37 \%$).	47
Figura 11 – Curva analítica obtida para o produto 1 da reação entre a cafeína e KBrO_3 em meio ácido ($\text{HCl } 37 \%$), por LC-MS/MS.	47
Figura 12 – Curva analítica obtida para o produto 2 da reação entre a cafeína e KBrO_3 em meio ácido ($\text{HCl } 37 \%$), por LC-MS/MS.	49
Figura 13 – Representação esquemática da disposição dos <i>spot-tests</i> na placa de porcelana.	49
Figura 14 – Curva analítica da área da banda de cafeína em função da concentração de cafeína entre $3,33$ e 333 mg L^{-1} , por LC-MS/MS.	50
Figura 15 – Curva analítica da densidade óptica (D.O.) em função da concentração de cafeína entre 100 e 500 mg L^{-1} , em água ultrapura, por celular.	52

Figura 16 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para (a) amostra do branco de energético e (b) para amostra do produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína (contida na amostra de energético) e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %).

58

Figura 17 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para (a) amostra do branco de medicamento 1 e (b) para amostra do produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína (contida na amostra de medicamento 1) e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %).

59

Figura 18 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para (a) amostra do branco de medicamento 2 e (b) para amostra do produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína (contida na amostra de medicamento 2) e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %).

60

Figura 19 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para (a) amostra do branco de esgoto e (b) para amostra do produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína (contida na amostra de esgoto) e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %).

62

Figura 20 – Curvas analíticas da D.O. em função da concentração de cafeína para método colorimétrico em amostras de (a) energético entre 100 a 500 mg L^{-1} , (b) esgoto entre 100 a 500 mg L^{-1} , (c) medicamento 1 entre 100 a 300 mg L^{-1} e (d) medicamento 2 entre 100 a 500 mg L^{-1} , por celular.

63

Figura 21 – Efeito de matriz avaliado pela relação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas das amostras de energético, esgoto e medicamento 1 em comparação com a curva da água ultrapura.

66

Figura 22 – Representação esquemática do dispositivo fluorométrico (DF) e local para inserção do (a) *insert* contendo a amostra, (b) fibra óptica e (c) fonte luminosa LED azul.

74

Figura 23 – Componentes do sistema dispositivo fluorimétrico (DF): (a) *insert*, (b) fibra óptica e (c) LED.

75

Figura 24 – Representação esquemática do circuito do dispositivo fluorimétrico (DF) e seus componentes: (a) *insert*, (b) fibra óptica, (c) LED, (d) microcontrolador arduino nano, (e) potenciômetro, (f) resistor, (g) cabo OTG e (h) celular.

76

Figura 25 – Representação esquemática do sistema de aquisição da imagem usando o dispositivo fluorimétrico (DF) acoplado ao celular.

77

Figura 26 – Espectro de emissão em 460 nm obtidos pelo espectrofluorímetro RF-1501 para (a) solução de cafeína em (a) água ultrapura e (b) em esgoto *lab-made*.

83

Figura 27 – Avaliação do tempo ideal de reação entre a cafeína (300 mg L ⁻¹) e a solução tampão de fosfato (0,100 mol L ⁻¹ , pH 6,30 e 0,600 µmol L ⁻¹ de HPTS) a 25 °C, em espectrofluorímetro RF-1501.	84
Figura 28 – Curva analítica da razão de fluorescência (IF ₀ /IF) em função da concentração da solução aquosa de cafeína entre 100 a 700 mg L ⁻¹ , em espectrofluorímetro RF-1501.	85
Figura 29 – Curva analítica da razão de fluorescência (IF ₀ /IF) em função da concentração da solução de cafeína em <i>lab-made</i> , entre 60 a 1300 mg L ⁻¹ , em espectrofluorímetro RF-1501.	86
Figura 30 – Aquisição da imagem da reação fluorimétrica entre a solução aquosa de cafeína 100 mg L ⁻¹ e a solução tampão de fosfato (0,100 mol L ⁻¹ , pH 6,30 e 100 µmol L ⁻¹ de HPTS) a 25 °C, adquirida pelo celular.	88
Figura 31 – Curva analítica da densidade óptica (D.O.) em função da concentração da solução aquosa de cafeína entre 100 a 600 mg L ⁻¹ , por celular.	88
Figura 32 – Curva analítica da densidade óptica (D.O.) em função da concentração da solução I de cafeína em <i>lab-made</i> , entre 100 a 600 mg L ⁻¹ , por celular.	89
Figura 33 – Curvas analíticas da razão de fluorescência (IF ₀ /IF) em função da concentração de cafeína (100 a 600 mg L ⁻¹) em amostras de (a) energético e (b) esgoto, em espectrofluorímetro RF-1501.	94
Figura 34 – Curvas analíticas da D.O. em função da concentração de cafeína para método fluorimétrico em amostras de (a) energético entre 100 a 600 mg L ⁻¹ , (b) esgoto entre 100 a 300 mg L ⁻¹ , (c) medicamento 1 entre 100 a 600 mg L ⁻¹ e (d) medicamento 2 entre 100 a 600 mg L ⁻¹ , por celular.	95
Figura 35 – Efeito de matriz avaliado pela relação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas das amostras de energético, esgoto e medicamentos 1 e 2 em comparação com a curva da (a) água ultrapura e (b) do <i>lab-made</i> .	98

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros de ajuste do App OpenCamera definidos para aquisição de imagem do produto avermelhado gerado pela reação colorimétrica em placa de porcelana.	35
Tabela 2 – Massa molar, íon precursor, íon fragmento, energia de colisão e potencial de saída de célula referentes à cafeína e os produtos 1 e 2 obtidos na reação colorimétrica para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM).	38
Tabela 3 – Massa molar, íon precursor e íons fragmentos referentes à cafeína e aos produtos 1 e 2 obtidos na reação colorimétrica monitorados por LC-MS/MS.	46
Tabela 4 – Figuras de mérito obtidas para a cafeína em água ultrapura, por LC-MS/MS.	51
Tabela 5 – Figuras de mérito obtidas para a cafeína em água ultrapura, pelo método desenvolvido em dispositivo colorimétrico (DC), por celular.	53
Tabela 6 – Figuras de mérito obtidas para a cafeína em água ultrapura pelos métodos desenvolvidos em LC-MS/MS e dispositivo colorimétrico (DC).	54
Tabela 7 – Comparação das vantagens e limitações das técnicas de análise por LC-MS/MS e o dispositivo colorimétrico (DC), segundo parâmetros de consumo de amostra, consumo de solvente orgânico, resíduos, efeito de matriz, preparo de amostra, tempo de análise, portabilidade e custo estimado do equipamento / dispositivo.	55
Tabela 8 – Figuras de mérito obtidas para cafeína em água ultrapura pelos métodos desenvolvidos em LC-MS/MS e dispositivo colorimétrico (DC), das matrizes aquosas de energético, esgoto e medicamento 1.	64
Tabela 9 – Comparação entre as concentrações experimentais intradia e interdía em 300 mg L ⁻¹ de cafeína, obtidas a partir da fortificação das amostras de energético, esgoto e medicamento 1 e que utilizam suas respectivas curvas analíticas como modelo.	67
Tabela 10 – Comparação dos principais parâmetros analíticos de faixa linear, LOD, tipo de analito e suporte utilizado pelo presente estudo colorimétrico e trabalhos análogos encontrados na literatura.	68
Tabela 11 – Componentes do esgoto <i>lab-made</i> e suas respectivas concentrações.	73

Tabela 12 – Parâmetros analíticos do RF-1501 para análise das amostras da reação de resposta fluorimétrica entre a cafeína e a solução tampão de fosfato (0,100 mol L ⁻¹ , pH 6,30 e 0,600 μmol L ⁻¹ de HPTS).	78
Tabela 13 – Figuras de mérito obtidas para a reação de resposta fluorimétrica entre a solução de cafeína (em água entre 100 a 700 mg L ⁻¹ e em <i>lab-made</i> entre 60 a 1300 mg L ⁻¹) e a solução tampão de fosfato (0,100 mol L ⁻¹ , pH 6,30 e 0,600 μmol L ⁻¹ de HPTS), em espectrofluorímetro RF-1501.	87
Tabela 14 – Figuras de mérito obtidas para a reação de resposta fluorimétrica entre a solução de cafeína (em água e <i>lab-made</i> ambas entre 100 a 600 mg L ⁻¹) e a solução tampão de fosfato (0,100 mol L ⁻¹ , pH 6,30 e 100 μmol L ⁻¹ de HPTS), por celular.	90
Tabela 15 – Figuras de mérito obtidas para a cafeína em água ultrapura e esgoto <i>lab-made</i> , pelos métodos desenvolvidos em fluorímetro (F) e dispositivo fluorimétrico (DF).	91
Tabela 16 – Comparação das vantagens e limitações das técnicas de análise por espectrofluorímetro (F) e o dispositivo fluorimétrico (DF), segundo parâmetros de consumo de amostra, consumo de solvente orgânico, resíduos, efeito de matriz, preparo de amostra, tempo de análise, portabilidade e custo estimado do equipamento / dispositivo.	92
Tabela 17 – Figuras de mérito obtidas para cafeína em matrizes de energético (entre 100 a 600 mg L ⁻¹ para F e DF) e esgoto (entre 100 a 600 mg L ⁻¹ para F e entre 100 a 300 mg L ⁻¹ DF), pelos métodos desenvolvidos em espectrofluorímetro (F) e dispositivo fluorimétrico (DF).	96
Tabela 18 – Efeito de matriz avaliado em valor percentual para amostras de energético (entre 100 a 600 mg L ⁻¹ de cafeína), esgoto (entre 100 a 300 mg L ⁻¹ de cafeína) e medicamentos 1 e 2 (entre 100 a 600 mg L ⁻¹ de cafeína) utilizando como modelo as curvas analíticas da água ultrapura e do esgoto <i>lab-made</i> .	97
Tabela 19 – Concentrações experimentais intradia obtidas a partir da fortificação das amostras de energético, esgoto e medicamentos 1 e 2 em 300 mg L ⁻¹ de cafeína, utilizando suas respectivas curvas analíticas, obtidas por dispositivo fluorimétrico (DF), como modelo analítico.	99
Tabela 20 – Concentrações experimentais intradia obtidas a partir da fortificação das amostras de energético, esgoto e medicamentos 1 e 2 em 300 mg L ⁻¹ de cafeína, utilizando suas respectivas curvas analíticas, obtidas pelo espectrofluorímetro RF-1501, como modelo analítico.	99
Tabela 21 – Comparação dos principais parâmetros analíticos de faixa linear, LOD, tipo de analito e suporte utilizado pelo presente estudo fluorimétrico e trabalhos análogos encontrados na literatura.	100

Lista de Equações

Equação 1 – Equação que descreve a curva analítica obtida para o produto 1 da reação entre a cafeína e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %), por LC-MS/MS.	48
Equação 2 – Equação que descreve a curva analítica obtida para o produto 2 da reação entre a cafeína e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %), por LC-MS/MS.	49
Equação 3 – Equação que descreve a curva analítica da reação colorimétrica obtida para a cefeína em água ultrapura, por LC-MS/MS.	50
Equação 4 – Relação logarítmica da densidade óptica (D.O.)	52
Equação 5 – Equação que descreve a curva analítica do dispositivo colorimétrico (DC) obtida para a cefeína em água ultrapura, por celular.	52
Equação 6 – Equação para determinação do efeito de matriz	65
Equação 7 – Equação modelo da razão de fluorescência (Stern-Volmer)	81
Equação 8 – Equação que descreve a curva analítica da reação fluorimétrica obtida para a cefeína em água ultrapura, em espectrofluorímetro RF-1501.	85
Equação 9 – Equação que descreve a curva analítica da reação fluorimétrica obtida para a cefeína em esgoto <i>lab-made</i> , em espectrofluorímetro RF-1501.	86
Equação 10 – Equação que descreve a curva analítica do dispositivo fluorimétrico (DF) obtida para a cefeína em água ultrapura, por celular.	89
Equação 11 – Equação que descreve a curva analítica do dispositivo fluorimétrico (DF) obtida para a cefeína em <i>lab-made</i> , por celular.	89

Lista de Abreviaturas

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

App – Aplicativo móvel

CE – *Collision energy*

CEP – *Cell entrance potential*

CUR – *Curtain gas*

CXP – *Cell exit potential*

Da – *Dalton*

DC – Dispositivo colorimétrico

DF – Dispositivo fluorimétrico

DMF – *N-N*-dimetilformamida

D.O. – Densidade óptica

DOQ-CGCRE – Definições de Termos Utilizados nos Documentos Relacionados à
Acreditação de Laboratórios, Produtores de Materiais de
Referência e Provedores de Ensaios de Proficiência.

DP – *Declustering potential*

DPR – Desvio padrão relativo

EP – *Entrance potential*

Energético – Red Bull®

FDA – Food and Drug Administration

GS – *gas*

HPTS – 8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate

ICH – International Council for Harmonisation of Technical Requirements for
Pharmaceuticals for Human Use.

Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IS – *ion spray*

KBrO₃ – Bromato de potássio

LC – *Liquid chromatography*

LED – *Light emitting diode*
LOC – *lab-on-a-chip*
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
Medicamento 1 – Doril®
Medicamento 2 – Melhoral®
MeOH – Metanol
MS/MS – Espectrômetro de massas sequencial
PFP – *Pentafluorophenyl*
PLA – Ácido polilático
PMMA – Metacrilato de metilo
PPCPs – *Pharmaceuticals and Personal Care Products*
PS – Poliestireno
PET – polietileno tereftalato
PTZ – *Pentilenotetrazol*
μPADs – Dispositivos microfluídicos a base de papel
QTRAP – *Quadrupole ion trap linear*
 R^2 – *Coeficiente de determinação*
RGB – *Red, Green e Blue*
ROI – Região de interesse óptico
SRM – *Selected reaction monitoring*
TEM – Temperatura
TIQ – Cromatograma de íons totais
UV-VIS – Região do espectro do ultravioleta e visível
XIQ – Cromatograma de íon extraído

RESUMO

O elevado consumo de produtos que apresentam cafeína em suas composições tem contribuído significativamente para as alarmantes concentrações desse fármaco em esgoto em níveis de concentração que variam de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1} . O desenvolvimento de dispositivos portáteis por prototipagem 3D que em conjunto à reações colorimétricas e fluorimétricas sejam capazes de determinar a presença de cafeína em amostras de águas residuárias é uma proposta inovadora e promissora para análises rápidas e de baixo custo. A técnica de aquisição de imagem usando celular utilizada visando a portabilidade e a acessibilidade do dispositivo miniaturizado, permitiu a digitalização da resposta analítica com auxílio do App OpenCamera. As imagens capturadas foram processadas no software ImageJ para obtenção da intensidade de sinal analítico. Os métodos propostos e de referência (LC-MS/MS e fluorímetro) foram validados segundo diretivas nacionais e internacionais de acreditação e aplicados em amostras de energético, esgoto e medicamentos. O método colorimétrico apresentou linearidade de 100 a 500 mg L^{-1} de cafeína com LOQ de 100 mg L^{-1} e LOD de 30,0 mg L^{-1} para valores de precisão entre 0,0800 e 0,760 %. O efeito de matriz foi avaliado para ambas amostras em água ultrapura e o método foi capaz de determinar cafeína em amostras de medicamentos com precisão. O método fluorimétrico apresentou valores de precisão intradia entre 0,890 e 2,05 % e interdia entre 0,830 e 1,98 % para faixa linear de 100 e 600 mg L^{-1} de cafeína com LOQ de 100 mg L^{-1} e LOD de 30,0 mg L^{-1} e R^2 0,900. O efeito de matriz foi inferior a 100% para amostras de energético e esgoto, sendo aplicável a tais matrizes com precisão e exatidão. A faixa de trabalho obtida para ambos os métodos miniaturizados é relativamente ampla, sendo uma importante vantagem analítica para os dispositivos propostos comparados a outros métodos similares descritos na literatura científica. Os dispositivos propostos apresentaram características importantes como custo reduzido, volumes diminutos de reagentes e amostra, análises rápidas, possibilidade de total portabilidade e aplicabilidade em matrizes complexas.

Palavras – chave: Cafeína. Colorimétrica. Fluorimétrica. Impressora 3D. Dispositivo.

ABSTRACT

The high consumption of caffeine-containing products in their own compositions has contributed significantly to the alarming concentrations of this drug in wastewater at concentration levels ranging from $\mu\text{g L}^{-1}$ to mg L^{-1} . Portable 3D prototyping devices have worked together with colorimetric and fluorimetric reactions being able to determine the presence of caffeine in wastewater samples. It is an innovative and promising option for fast and low cost analyzes. The image acquisition technique has been used smartphones supporting the portability and accessibility in miniaturized devices. OpenCamera App was used to capture images that were processed in the ImageJ software to obtain the analytical signal strength. The proposed and reference methods (LC-MS / MS and fluorimeter) were validated according to the national and international accreditation directives and applied in samples of energy, domestic sewage and medicines. The colorimetric method showed linearity from 100 to 500 mg L^{-1} of caffeine with LOQ of 100 mg L^{-1} and LOD of 30.0 mg L^{-1} for precision values between 0.0800 and 0.760 %. The matrix effect was evaluated for both samples in ultrapure water and the method was able to accurately determine caffeine in drug samples. The fluorimetric method presented values of intraday precision between 0.890 and 2.05 % and between 0.830 and 1.98% for linear range of 100 and 600 mg L^{-1} of caffeine with LOQ of 100 mg L^{-1} and LOD of 30.0 mg L^{-1} and R^2 0.900. The matrix effect was less than 100 % for energy and domestic sewage samples, applied to such matrices with precision and accuracy. The working range obtained for both miniaturized methods is relatively broad. It is an important analytical advantage for the proposed devices compared to other similar methods described in the scientific literature. The proposed devices presented important characteristics such as reduced cost, small volumes of reagents and samples, rapid analyzes, possibility of total portability and applicability in complex matrices.

Keywords: Caffeine. Colorimetric. Fluorimetric. 3D printer. Device.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Cafeína: propriedades e resposta analítica	24
1.2 Contextualização da problemática ambiental	24
1.3 A ocorrência de cafeína no ambiente	26
1.4 Os efeitos da cafeína nos organismos	27
1.5 Reações colorimétrica e fluorimétrica	27
1.6 Microsistemas como uma alternativa analítica: Impressão 3D	28
1.7 Resposta analítica a partir do celular	29
1.8 Objetivo	30

Capítulo 2 – O dispositivo colorimétrico

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
2 MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.1 Padrões e reagentes utilizados	32
2.2 Condições analíticas da reação	33
2.3 Instrumentação e condições analíticas	33
2.3.1 O dispositivo colorimétrico (DC) para captura de imagem	33
2.3.2 Aquisição da imagem	34
2.3.3 Processamento da imagem	36
2.3.4 Método referência: LC-MS/MS	37
2.4 Aplicação do método desenvolvido em amostras de energético, esgoto e medicamentos	38
2.4.1 Amostra de bebida energética	39
2.4.2 Amostra de medicamentos	39
2.4.3 Amostra de esgoto	40

2.5 Validação do método propostos em LC-MS/MS dispositivo colorimétrico (DC)	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 Considerações sobre a reação colorimétrica	41
3.2 Desenvolvimento do método referência – LC-MS/MS	42
3.2.1 Validação do método referência – LC-MS/MS	50
3.3 Desenvolvimento do método de estudo – Dispositivo colorimétrico (DC)	52
3.4 Comparação entre o método de LC-MS/MS e o dispositivo colorimétrico (DC) proposto.	53
3.5 Aplicação dos métodos desenvolvidos para reação colorimétrica em amostras de energético, esgoto e medicamentos.	57
3.5.1 Amostra de energético	57
3.5.2 Amostra de medicamentos	59
3.5.3 Amostra de esgoto	61
3.5.4 Comparação entre os resultados obtidos para amostras de energético, esgoto e medicamentos.	63
3.6 Comparação dos resultados obtidos no presente estudo colorimétrico com aqueles apresentados na literatura.	67
4. CONCLUSÃO	69

Capítulo 3 – O dispositivo fluorimétrico

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	71
2 MATERIAIS E MÉTODOS	71
2.1 Padrões e reagentes utilizados	71
2.2 Preparo das soluções	72
2.3 A reação entre a cafeína e o HPTS	73
2.4 Instrumentação e condições analíticas	74
2.4.1 O dispositivo fluorimétrico (DF) portátil proposto	74
2.4.2 Aquisição da imagem	77
2.4.3 Processamento da imagem	77
2.4.4 Método referência: Espectrofluorímetro	78

2.5 Aplicação do método desenvolvido em amostras de energético, esgoto e medicamentos.	78
2.5.1 Amostra de bebida energética	79
2.5.2 Amostra de medicamentos	80
2.5.3 Amostra de esgoto	80
2.6 Validação dos métodos propostos	80
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1 Considerações sobre a reação fluorimétrica	81
3.2 Desenvolvimento do método referência – Shimadzu RF–1501	82
3.2.1 Avaliação da intensidade de fluorescência em água ultrapura e esgoto <i>lab-made</i>	82
3.2.2 Avaliação do tempo de reação	84
3.2.3 Validação do método de referência em água e <i>lab-made</i>	84
3.3 Desenvolvimento do método de estudo – Dispositivo fluorimétrico (DF)	87
3.4 Comparação entre o método espectrofluorimétrico (F) Shimadzu RF–1501 e o dispositivo fluorimétrico (DF) proposto.	90
3.5 Aplicação dos métodos desenvolvidos para reação fluorimétrica em amostras de energético, esgoto e medicamentos.	93
3.5.1 Amostra de energético	93
3.5.2 Amostra de medicamento	94
3.5.3 Amostra de esgoto	94
3.6 Comparação dos resultados obtidos no presente estudo fluorimétrico com aqueles apresentados na literatura.	100
4. CONCLUSÃO	101
Capítulo 4 - Conclusão Geral e Perspectivas	
Conclusão	104
Perspectivas	104
REFERÊNCIAS	106

PREFÁCIO

A presente dissertação aborda o uso de reações colorimétrica e fluorimétrica para determinação de cafeína em águas residuárias. A utilização de dispositivos miniaturizados e impressos a partir da técnica de prototipagem rápida foi uma alternativa inovadora aplicada ao método proposto, visando garantir a portabilidade dos dispositivos propostos nesse estudo.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica dos aspectos ambientais que motivaram a realização do presente estudo e o desenvolvimento de dispositivos de resposta analítica rápida, de baixo custo e portáteis para análises remotas .

O Capítulo 2 apresenta o procedimento realizado e os resultados obtidos no estudo da resposta colorimétrica para cafeína em águas residuárias, bebida energética e medicamentos que contêm cafeína em sua composição.

O Capítulo 3 descreve o procedimento experimental que envolve a reação fluorimétrica bem como a técnica de fabricação do dispositivo impresso com tecnologia 3D para suportar a reação. Os resultados obtidos a partir da reação fluorimétrica para detecção de cafeína em águas residuárias, bebida energética e medicamentos que contêm cafeína em sua composição também são apresentados.

Por fim, o Capítulo 4 apresenta uma conclusão geral sobre o trabalho.

Capítulo 1

Introdução Geral

Capítulo 1: Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cafeína: propriedades e resposta analítica

A cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$) é um composto orgânico da família dos alcalóides, de função orgânica amida e que pertence à classe de compostos das metil-xantinas, conforme demonstrado na Figura 1.

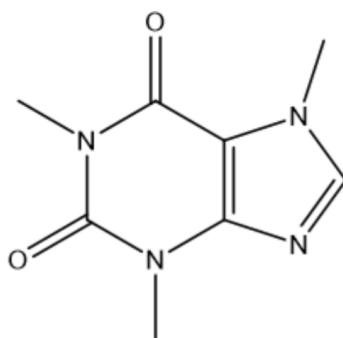


Figura 1 – Estrutura plana da molécula de cafeína.

Fonte: autor, 2018 (ACD/Labs) Software versão 11.2 (© 1994 – 2018 ACD/Labs).

Possui duplas conjugadas e grupos carbonila interagindo com a radiação na região do ultravioleta, que permite monitoramento desse analito por resposta colorimétrica perceptível ao olho humano e a equipamentos de captura de imagem sem elevada sensibilidade óptica. Técnicas espectrofotométricas e cromatográficas podem ser utilizadas para a determinação da cafeína em soluções, porém essas técnicas exigem a aquisição de equipamentos de alto valor monetário, encarecendo a análise desse elemento.

1.2 Contextualização da problemática ambiental

As atividades industriais atreladas ao crescimento populacional e ao consumo exacerbado de produtos têm efeito direto sobre a dinâmica natural dos ecossistemas. O comprometimento da biota bem como a degradação do meio dada pela exploração de fontes naturais ou pelo lançamento de contaminantes orgânicos e inorgânicos podem atingir concentrações capazes de desequilibrar o meio

ambiente e comprometer a saúde humana¹. Os dejetos humanos são a principal fonte de disseminação de compostos no ambiente por conter uma ampla variedade de compostos em sua constituição. A grande variedade de poluentes e a escassez de informações sobre os processos de transformação e de degradação desses compostos têm motivado o monitoramento desses emergentes nos ambientes aquático, terrestre, marinho e atmosférico visando fornecer importantes informações de como essas substâncias podem modificar o ecossistema estudado.

1.3 A ocorrência de cafeína no ambiente

Nesse contexto, a cafeína é classificada como um contaminante emergente, isto é um composto com potencial toxicidade aos organismos vivos e com estudos de cinética de degradação pouco explorados. Sua presença em ampla variedade de produtos culmina com a sua ocorrência em águas residuárias, comprometendo principalmente os ecossistemas aquáticos. A indústria alimentícia representa bem esse cenário com sua diversificada produção de consumíveis que apresentam cafeína em sua composição, como o chocolate (*Theobroma cacao*) que contém cafeína do cacau, matéria-prima de sua produção; na erva-mate (*Ilex paraguariensis*); em refrigerantes à base de cola (semente das árvores do gênero *Cola sp.*); no guaraná (*Paullinia cupana*) dentre outros². O segmento farmacêutico de cosméticos igualmente oferece produtos que atendem desde ingeríveis, como supressores de apetite, energéticos, aspirina até cremes anticoagulante e anticelulite que contêm cafeína em sua composição³. As principais fontes de despejo de cafeína no ambiente são a excreção humana e a lavagem dos utensílios domésticos.

Essa substância está presente no ambiente em concentrações com níveis que variam de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1} , de acordo com as atividades antropogênicas e a região de coleta de amostra⁴⁻⁶. No Brasil pode-se citar estudos recentes em que concentrações de contaminantes emergentes, dentre eles a cafeína, foram detectadas em águas residuárias. Segundo Sodré e colaboradores, estudos realizados na cidade de Campinas, localizada no Estado de São Paulo, indicaram a presença de cafeína com valores médios de $13,1 \mu\text{g L}^{-1}$, encontrada em cinco dos seis pontos amostrais na extensão da bacia do rio Atibaia⁷. Esse valor médio está em concordância com os níveis encontrados em matrizes similares em outras regiões do mundo, como com os teores determinados em amostras de esgoto bruto

de países mais desenvolvidos, tal como a Noruega⁸. Ambos os estudos apresentaram valores médios de cafeína dentro da faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1} como esperado, porém em comparação com dados obtidos em estudos realizados em outras regiões do mundo, pode-se observar valores de detecção na ordem de mg L^{-1} , como no caso de um estudo desenvolvido no Canadá⁹, em que a concentração de cafeína em esgoto sanitário apresentaram uma faixa de concentração de 20,0 a 300 mg L^{-1} .

Sua presença em água potável não é desejável, mas por ser comumente encontrada, ela vem sendo utilizada como um biomarcador que indica a presença de outras substâncias químicas nocivas à saúde humana. Assim, a cafeína enquadra-se na classificação de *Pharmaceuticals and Personal Care Products* (PPCPs), sendo um potencial indicador de contaminação antropogênica¹⁰.

Na natureza, essa substância é encontrada em cerca de 60 espécies de plantas sendo as principais fontes de obtenção a semente do café (*Coffea arabica*) e a folha de chá-preto (*Camellia sinensis*). A cafeína tem sua funcionalidade na natureza como um praguicida natural, capaz de proteger as espécies de plantas que a produz de ataques de insetos, pois atua como inibidor de atividades enzimáticas do sistema nervoso do organismo e, por fim, causa a morte do mesmo¹¹. Estudos realizados por Hollingsworth, Armstrong e Campbell avaliaram o potencial da cafeína como praguicida para lesmas e caracóis em culturas de alimentos, sendo uma alternativa natural como repelente¹².

A cafeína está presente em diferentes concentrações em produtos alimentícios, como bebidas energéticas, refrigerantes, chás e cafés. A concentração estimada de cafeína em um copo de leite com chocolate é de 21,2 mg L^{-1} . Em refrigerantes como a Coca-Cola® clássica e a Coca-Cola® Cherry esses valores são de 96,0 mg L^{-1} , segundo o fabricante. Os energéticos também apresentam valores expressivos de cafeína, porém similares dentre as marcas consideradas, como a bebida energética Monster e a Electric Monkey Wild com 33,8 mg L^{-1} . A franquia de cafés Starbucks™ oferece café clássico com 35,9 mg L^{-1} e refrescos com 10,6 mg L^{-1} de cafeína¹³. A presença desse composto em produtos cosméticos também ocorre em ampla aplicabilidade, como por exemplo em cremes anticelulite disponíveis por variadas marcas no mercado.

1.4 Os efeitos da cafeína nos organismos

Os efeitos biológicos da exposição de organismos a essa substância pode causar comprometimento do desenvolvimento de algumas espécies. Os organismos aquáticos tem se mostrado mais sensíveis a exposição de cafeína, porém já é relatado na literatura, o comprometimento da saúde humana pela ingestão excessiva dessa substância, tendo como principal consequência quadros de convulsão e epilepsia¹⁴. O modelo de organismo utilizado para esse amplo estudo tem sido o peixe-zebra, ou zebrafish (*Danio rerio*) que vem apresentando quadros de epilepsia recorrente de convulsões quando expostos a elevadas concentrações de cafeína. O uso do zebrafish como modelo animal é atribuído a fatores como manutenção de baixo custo, embriões altamente resistentes à manipulações experimentais que dispensam protocolos invasivos, boa capacidade de absorver compostos adicionados à água e ainda, uma estrutura embrionária transparente que permite a visualização dos processos do desenvolvimento nos seus diferentes estágios¹⁵. Com a finalidade de avaliar o impacto causado pelos elevados índices de concentração de cafeína em águas residuárias estão sendo desenvolvidos estudos em larvas de peixe zebra nas fases iniciais de seu desenvolvimento para caracterização comportamental. O estudo permite avaliar a capacidade locomotora do animal através de uma dada distância percorrida e sua velocidade média, uma vez que esse animal apresenta os sistemas sensitivo, motor e endócrino bastante desenvolvidos, de modo a apresentarem excelente resposta sensíveis as alterações ambientais e manipulações farmacológicas¹⁶.

1.5 Reações colorimétrica e fluorimétrica

Reações colorimétrica e fluorimétrica são alternativas analíticas rápidas e de baixo custo para determinação de analitos e mostram-se promissoras para desenvolvimento de métodos eficazes de análise e portáteis. A reação considerada para o ensaio colorimétrico é descrita na literatura por Karawya, Diab e Swelem envolvendo cafeína, HCl 37 % e KBrO₃, como uma alternativa para indicar e determinar a presença de cafeína, pois resulta em um composto provido de intensa coloração na região do visível¹⁷. Outra alternativa é o desenvolvimento de métodos

envolvendo reações fluorimétricas ou de decaimento de fluorescência que apresentam significativa seletividade e sensibilidade. A interação eletrônica relatada por Taylor e colaboradores sugere que a cafeína e o fluoróforo HPTS formem um produto de transferência de cargas¹⁸. Esse produto formado a partir da interação entre a cafeína e um corante fluorescente também foi citado por Rochat e colaboradores¹⁹. O corante fluorescente 8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate (HPTS), estrutura presente na Figura 2, ao reagir com a cafeína em solução tampão de fosfato (0,100 mol L⁻¹, pH 6,30 e 50,0 μmol L⁻¹ de HPTS) resulta em um composto entre o HPTS e a cafeína, com propriedades fluorescentes na região do ultravioleta visível (UV-VIS)¹⁹.

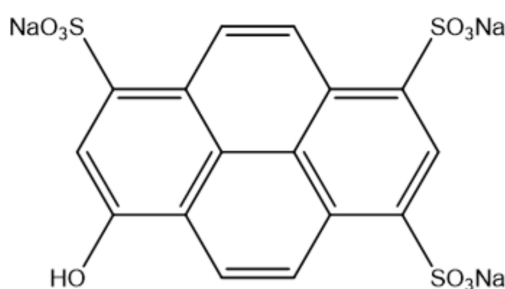


Figura 2 – Estrutura plana da molécula de HPTS.

Fonte: autor, 2018 (ACD/Labs) Software versão 11.2 (© 1994 – 2018 ACD/Labs).

1.6 Microssistemas como uma alternativa analítica: Impressão 3D

O desenvolvimento de microssistemas impressos com tecnologia de impressão 3D são uma tendência às análises químicas devido a fácil implementação e ao aumento da frequência analítica que favorecem um método mais acessível e de fácil execução. A redução da quantidade de amostra, reagentes utilizados e do tempo de análise, bem como dos resíduos gerados, e suas respectivas toxicidades^{20,21}. Estudos de microssistemas tiveram seu início na década de 90 com o desenvolvimento de microdispositivos analíticos capazes de realizar um maior número de análises concomitantes em um único sistema que disponha de uma quantidade reduzida de amostra, sem que haja comprometimento da sensibilidade, precisão, estabilidade e reprodutibilidade das análises²². Esse revolucionário segmento da instrumentação analítica é denominado *lab-on-a-chip* (LOC), e consiste na miniaturização e na integração de várias etapas analíticas laboratoriais usando um sistema miniaturizado como um *microchip*. A necessidade de uma técnica

simples para análise, que atenda aos princípios da Química Verde e que permita o desenvolvimento de métodos analíticos, motivou o uso de *spot-tests* miniaturizados. Embora o manuseio de volumes muito reduzidos – da ordem de 10^{-9} a 10^{-6} L – aumente a incidência de erro analítico durante a análise, a obtenção de uma resposta analítica dispondo de microvolumes de amostra é um ganho, principalmente quando a amostra apresenta volumes reduzidos. Além dessa vantagem, o descarte desses microssistemas é facilitado bem como o menor volume de resíduos químicos²³. A possibilidade de realizar análises “*in loco*” a partir de dispositivos portáteis conferem inúmeras vantagens ao analista. Os dispositivos microfluídicos a base de papel (μ PADs) juntamente aos dispositivos impressos por tecnologia 3D são uma tendência de acessível fabricação^{24,25}. A técnica de impressão 3D tem sido amplamente utilizada para fabricação dos mais variados objetos e aplicabilidades. Trata-se de uma técnica de prototipagem rápida do tipo aditiva, isto é, a fabricação de objetos em escala real em um curto período de tempo a partir de um processo de adição de material por camadas²⁶. A disponibilidade de filamentos poliméricos como uma alternativa ao vidro, até então amplamente utilizado para aplicações analíticas, caracteriza essa técnica como economicamente vantajosa. Os filamentos poliméricos estão disponíveis em uma gama de opções, e podem ser escolhidos para fabricação de um dispositivo miniaturizado segundo as propriedades químicas, mecânicas e elétricas²⁷. O interesse por sistemas miniaturizados é uma tendência as mais variadas finalidades analíticas e estende-se a diversas aplicabilidades e análises ambientais. O uso de μ PADs e dispositivos 3D para análises colorimétricas e de fluorescência com análise de imagens são ideais para análises rápidas, embora ainda haja limitações e desafios.

1.7 Resposta analítica a partir do celular

A colorimetria relaciona de forma direta a intensidade de cor obtida como resposta analítica em função da concentração do analito. O dispositivo é submetido a uma etapa de aquisição de imagem por uma câmera fotográfica ou scanner²⁸. A necessidade de obter uma imagem de cada *spot* sem variação na posição de captura dessa garante uma resposta analítica confiável e confere precisão ao método, de modo que esse cuidado foi considerado na etapa de aquisição da imagem. Em uma etapa subsequente, o tratamento da imagem é feito com auxílio de

um software gráfico, ImageJ. Uma região de interesse (ROI) foi delimitada por um retângulo na região vertical do *spot*, garantindo que maior homogeneidade da imagem fosse considerada. A imagem capturada pelo celular é submetida a um modelo cromáticos de cores chamado RGB (*Red*, *Green* and *Blue*) que passa a expressar a imagem original em função das possibilidades de combinação das cores vermelho, verde e azul. A partir desses 3 canais de cores é possível observar em qual deles a variação de D.O. é mais acentuada para então utilizá-lo como canal de referência e obter os valores numéricos de sinal analítico.

As reações fluorimétricas tem sua intensidade de cor medida de maneira análoga. Uma importante limitação da técnica miniaturizada é a possível contaminação do sinal analítico de fluorescência, pelo fenômeno de espalhamento de radiação e por fluorescência de fundo. A disposição da fonte luminosa incidente na amostra deve ser perpendicular ao equipamento (celular, câmera etc) utilizado para aquisição da imagem da resposta analítica ou mesmo usar filtros para barrar a radiação usada para excitar o analito presente na amostra²⁹. Após a etapa de aquisição da imagem com as respectivas peculiaridades para cada tipo de reação, segue a etapa de processamento da imagem³⁰. A utilização de equipamentos celulares tem se mostrado uma forte tendência para análises usando *spot-tests* para os mais variados tipos de reações químicas. A praticidade da aquisição da resposta analítica, e posterior, tratamento da imagem são uma excelente combinação aos fatores de custo e vantagens analíticas.

Capítulo 4

Conclusão geral e perspectivas

CONCLUSÃO GERAL

Os métodos de referência (LC-MS/MS) e para o dispositivo colorimétrico portátil desenvolvidos permitiram determinar cafeína em amostras comerciais de energético, medicamentos e esgoto. A resposta analítica por fluorescência também foi uma alternativa para determinação de cafeína em amostras complexas, em que o método de referência foi desenvolvido em um espectrofluorímetro para comparação de dados com o dispositivo fluorimétrico portátil proposto.

Os métodos miniaturizados propostos mostraram-se alternativas promissoras para determinação de cafeína em matrizes aquosas por serem alternativas de baixo custo, com resposta analítica rápida e por ser acessível, não sendo necessário um analista especializado para manuseio do dispositivo. A portabilidade que permitiu análises “*in loco*” é mais uma importante vantagem desses dispositivos que atendem aos níveis de concentração de cafeína na ordem de mg L^{-1} , tipicamente encontrado em alimentos e medicamentos. As análises ainda atendem ao princípio da Química Verde fazendo uso de volumes reduzidos de amostra, reagentes e resíduos na ordem de μL .

REFERÊNCIAS

- 1 JAMES, J. E. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously. **Psychosom. Med.**, v. 66, n. 1, p. 63-71, 2004.
- 2 BARONE, J. J.; ROBERTS, H. R. Caffeine consumption. **Food Chem. Toxicol.**, v. 34, n. 1, p. 119-129, 1996.
- 3 FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, n. 7/8, p. 857-872, 2004.
- 4 GOMES, P. C. F. L.; TOMITA, I. N.; SANTOS NETO, A. J.; ZAIAT, M. Rapid determination of 12 antibiotics and caffeine in sewage and bioreactor effluent by online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 407, n. 29, p. 8787-8801, 2015.
- 5 SENTA, I.; GRACIA-LOR, E.; BORSOTTI, A.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. **Water Res.**, v. 74, p. 23-33, 2015.
- 6 QI, W.; SINGER, H.; BERG, M.; MÜLLER, B.; PERNET-COUDRIER, B.; LIU, H.; QU, J. Elimination of polar micropollutants and anthropogenic markers by wastewater treatment in Beijing, China. **Chemosphere**, v. 119, p. 1054-1061, 2015.
- 7 SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). **J. Brazilian Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, n. 2, p. 187-196, 2007.
- 8 WEIGEL, S.; BERGER, U.; JENSEN, E.; KALLENBORN, R.; THORESEN, H.; HÜHNERFUSS, H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. **Chemosphere**, v. 56, n. 6, p. 583-592, 2004.
- 9 ROGERS, I. K. G. M.; BIRTWELL, I. H. Organic extractables in municipal waste water, Vancouver, British Columbia. **Water Pollut. Res. J. Canada**, v. 21, p. 187-204, 1986.
- 10 SEILER, R. L.; ZAUGG, S. D.; THOMAS, J. M.; HOWCROFT, D. L. Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells. **Groundwater**, v. 37, n. 3, p. 405-410, 1999.
- 11 NATHANSON, J. A. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. **Science**, v. 226, n. 4671, p. 184-187, 1984.

12 HOLLINGSWORTH, R. G.; ARMSTRONG, J. W.; CAMPBELL, E. Pest control: caffeine as a repellent for slugs and snails. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 915-916, 2002.

13 Disponível em: <<https://www.caffeineinformer.com/the-caffeine-database>>. Acesso em: 22 out. 2018.

14 BERGHMANS, S.; HUNT, J.; ROACH, A.; GOLDSMITH, P. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. **Epilepsy Res.**, v. 75, n. 1, p. 18-28, 2007.

15 GILMOUR, D. T.; MAISCHEIN, H. M.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C. Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. **Neuron**, v. 34, n. 4, p. 577-588, 2002.

16 CACHAT, J.; STEWART, A.; UTTERBACK, E.; HART, P.; GAIKWAD, S.; WONG, K.; KYZAR, E.; WU, N.; KULUEFF, A. V. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. **PLoS One**, v. 6, n. 3, 2011.

17 KARAWYA, N. Z.; DIAB, M. S.; SWELEM, A. M. Colorimetric assay of caffeine in crude drugs and in pharmaceutical preparations. **Anal. Lett.**, v. 17, n. 1, p. 77-88, 1984.

18 TAYLOR, P.; SIERING, C.; BEERMANN, B.; WALDVOGEL, S. R.; MÜNSTER, W. W.; INSTITUT, O. Supramolecular approach for sensing caffeine by fluorescence. **Supramolecular Chem.**, p. 37-41, 2015.

19 ROCHAT, S.; STEINMANN, S. N.; CORMINBOEUF, C.; SEVERIN, K. Fluorescence sensing of caffeine in water with polysulfonated pyrenes. **Chem. Commun.**, v. 47, p. 10584-1586, 2011.

20 ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 301-312, 2010.

21 LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. E.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. da C. Green chemistry - os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

22 EHRFELD, W. Electrochemistry and microsystems. **Electrochim. Acta**, v. 48, n. 20/22, p. 2857-2868, 2003.

23 SOUZA, J. C. de; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. A simple and green analytical method for determination of copper (II) in whisky and sugarcane spirit by diffuse reflectance spectroscopy. **Anal. Methods**, v. 8, n. 8, p. 1867-1875, 2016.

24 ZHAO, W. V. D. B. .A lab on a paper. **Lab Chip**, v. 8, p. 1988-1997, 2008.

- 25 DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. A low-cost, simple and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. **Analyst**, v. 136, n. 1, p. 77-82, 2011.
- 26 KALPAKJIAN, S. **Manufacturing engineering and technology**. 7th ed. New Jersey: Pearson, 2013.
- 27 TANIKELLA, N.; WITTBRODT, B.; PEARCE, J. Tensile strength of commercial polymer materials for fused filament fabrication 3-D printing. **Addit. Manuf.**, v. 47, p. 40-47, 2017.
- 28 SHISHKIN, Y. L.; DMITRIENKO, S. G.; MEDVEDEVA, O. M.; BADAKOVA, S. A.; PYATKOVA, L. N. Use of a scanner and digital image-processing software for the quantification of adsorbed substances. **J. Anal. Chem.**, v. 59, n. 2, p. 102-106, 2004.
- 29 KIM, H.; JUNG, Y.; DOH, I. J.; LOZANO-MAHECHA, R. A.; APPELEGATE, B.; BAE, E. Smartphone-based low light detection for bioluminescence application. **Sci. Rep.**, v. 7, 2017. doi:10.1038/srep40203.
- 30 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S. W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G. M. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Anal. Chem.**, v. 80, n. 10, p. 3699-3707, 2008.
- 31 DORIL: comprimidos. Responsável técnico Fernanco C. Oliveira. Barueri: Cosmed Indústria de Cosméticos e Medicamentos S.A. 2015, Bula de remédio. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=2371042015&pIdAnexo=2517900>. Acesso em: 18 ago. 2018.
- 32 MELHORAL: comprimidos. Responsável técnico Fernanco C. Oliveira. Barueri: Cosmed Indústria de Cosméticos e Medicamentos S.A. 2015, Bula de remédio. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5736002015&pIdAnexo=2710704>. Acesso em: 18 ago. 2018.
- 33 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, de novembro de 2017**.
- 34 AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA (ANVISA). **Guia para métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**.
- 35 U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bioanalytical Method Validation – Guidance for industry**. Rockville, 2018.
- 36 SONI, A.; KUMARSURANA, R.; JHA, S. K. Smartphone based optical biosensor for the detection of urea in saliva. **Sens. Actuators, B**, v. 269, p. 346-353, 2018.

- 37 SOARES, S.; LIMA, M. J. A.; ROCHA, F. R. P. A spot test for iodine value determination in biodiesel based on digital images exploiting a smartphone. **Microchem. J.**, v. 133, p. 195-199, 2017.
- 38 PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Matrix effect in pesticide quantification by gas chromatography. **Quím. Nova**, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.
- 39 DENG, H.; WANG, B.; Wu, M.; DENG, B.; Xie, L.; Guo, Y. Rapidly colorimetric detection of caffeine in beverages by silver nanoparticle sensors coupled with magnetic molecularly imprinted polymeric microspheres. **Int J Food Sci Tech.**, 2018.
- 40 ZHANG, X.; YI-ZHEN, S.; FANG, F.; WU, Z. Sensitive paper-based analytical device for fast colorimetric detection of nitrite with smartphone. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 41, p. 2665–2669, 2018.
- 41 MARTINS, G. S.; LUCHIARI, N. da C.; LAMARCA, R. S.; SILVA, B. F. da; GOMES, P. C. F. L. Removal of sulfamethoxazol and trimethoprim using horizontal-flow anaerobic immobilized bioreactor. **Scientia Chromatographica**, v. 9, n. 4, p. 253-264, 2017.
- 42 TURRO, N. J. **Modern Molecular Photochemistry**. Sausalito: University Science Books, 1991.
- 43 DEMAS, J. N. **Excited state lifetime measurements**. New York: Academic Press, 1983.
- 44 McCracken, K. E.; SCOTT, V. A.; REYNOLDS, K. A.; YOON, J. Y. Multimodal imaging and lighting bias correction for improved μ pAD-based water quality monitoring via smartphones. **Sci. Rep.**, v. 6, 2016. doi:10.1038/srep27529.
- 45 McCracken, K. E.; TAT, T.; PAZ, V.; YOON, J. Y. Smartphone-based fluorescence detection of bisphenol A from water samples. **RSC Adv.**, v. 7, p. 9237–9243, 2017.
-