

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.

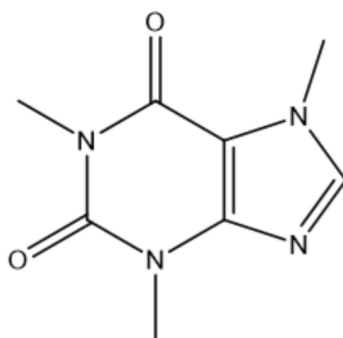


Figura 1 – Estrutura plana da molécula de cafeína.

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.

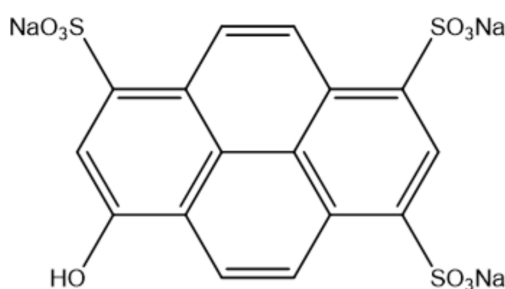


Figura 2 – Estrutura plana da molécula de HPTS.

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 hajam 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.

1.8 Objetivo

O objetivo proposto é a determinação de cafeína em amostras de energético (Red Bull®), esgoto e medicamentos (Doril® e Melhoral®) bem como desenvolver dispositivos poliméricos portáteis e de baixo custo para análises quantitativas.

Capítulo 2

Dispositivo Colorimétrico

Capítulo 2: Dispositivo colorimétrico

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Otimizar as melhores condições experimentais da reação, como pH, volume e a concentração de reagentes/soluções, bem como o tempo que a reação precisa para ocorrer de maneira efetiva.
- ✓ Verificar os produtos gerados pela reação entre cafeína e bromato de potássio.
- ✓ Desenvolver um método comparativo para determinar cafeína usando cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas sequencial (LC-MS/MS).
- ✓ Validar o método proposto e comparar os resultados obtidos com o método referência.
- ✓ Aplicar os métodos desenvolvidos em amostras que contêm cafeína em sua composição, sendo esgoto, medicamentos e bebida energética.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Padrões e reagentes utilizados

As soluções estoque utilizadas no presente estudo foram preparadas a partir de padrões fornecidos pela Sigma-Aldrich®: cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$, massa molar (MM) de $194,19 \text{ g mol}^{-1}$, CAS 58-08-2), bromato de potássio ($KBrO_3$, MM de $167,0 \text{ g mol}^{-1}$, CAS 7758-01-2), ácido clorídrico 37 % (HCl, MM de $36,46 \text{ g mol}^{-1}$, CAS 7647-01-0) e *N-N* Dimetilformamida ($HCON(CH_3)_2$, MM de $73,09 \text{ g mol}^{-1}$, CAS 68-12-2).

Os solventes com grau de pureza HPLC utilizados para análises por LC-MS/MS foram fornecidos pela J. T. Baker Chemicals: metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e ácido fórmico.

As soluções aquosas estoque de cafeína (1000 mg L^{-1}) e $KBrO_3$ (2000 mg L^{-1}) foram semanalmente preparadas, armazenadas em frasco âmbar sob ambiente controlado a temperatura entre 6 e 10°C .

2.2 Condições analíticas da reação

A partir do ensaio de viabilidade da reação colorimétrica para determinação de cafeína em matriz aquosa foi possível otimizar as condições experimentais de concentração e volume de soluções/reagentes, tempo de reação e temperatura de aquecimento. A reação mostrou-se viável à tais condições com formação de um resíduo marrom-avermelhado, com característica similar ao reportado por Karawya. O presente estudo bem como a citação bibliográfica nãoapresentou proposta de elucidação estrutural para os produtos de reação¹⁷.

As reações foram realizadas em placas de toque em porcelana (Unilab, 6 *spot-test* com capacidade para 500 μL) e avaliada para diferentes concentrações de cafeína numa faixa de 3,00 a 1000 mg L^{-1} disposta em cada *spot*. A reação consiste na adição de 100 μL da solução aquosa de cafeína (já disposta no *spot*) e 100 μL de ácido HCl 37,0 %, acrescidos do mesmo volume de solução de KBrO_3 . A placa de porcelana é então disposta em uma mesa de aquecimento (Kasvi, K40-1820H) a 150°C até completa evaporação dos solventes. A placa é removida e aguarda-se seu resfriamento à temperatura ambiente. O solvente DMF (500 μL) é adicionado em cada *spot* e após 15,0 minutos em contato com o produto remanescente da evaporação inicial a placa é novamente submetida ao aquecimento (100°C) para a completa evaporação desse.

2.3 Instrumentação e condições analíticas

2.3.1 O dispositivo colorimétrico (DC) para captura de imagem

A necessidade de controlar a luminosidade recebida pelo *spot-test* durante a etapa de aquisição da imagem usando celular bem como a captura da imagem de cada *spot* com mínima variação da posição foram importantes parâmetros considerados para desenvolvimento e fabricação do dispositivo colorimétrico.

O processo de fabricação do dispositivo tem início pela etapa de modelagem e dimensionamento dos objetos com auxílio de um software modelador 3D, FreeCAD (versão 0.16). Em seguida, o software fatiador de imagem, Slic3r (versão

1.2.9), interpreta os arquivos de extensão .stl gerados na etapa prévia e permite o tratamento estrutural da constituição física do objeto. Na última etapa do processo de fabricação do objeto 3D, o arquivo em código G é então interpretado pelo software executor da impressora (3D Cloner ST printer, Ind. Schumacher Ltda., Brasil), e o objeto físico é obtido de acordo com as especificações previamente estabelecidas nas etapas de modelagem e de fatiamento em camadas. Os softwares utilizados nas etapas de modelagem, fatiamento e impressão dos dispositivos bem como os utilizados na aquisição e tratamento de imagem, são classificados como softwares de código aberto tendo seus respectivos código fonte disponibilizados e licenciados com base em direito autoral³². A escolha do tipo de material utilizado para fabricar os dispositivos foi avaliada de acordo com a finalidade de aplicação de cada seção. O filamento de ácido polilático (PLA, Acccreate™) cinza foi introduzido no bico extrusor da impressora aquecido a 200°C para que o material atinja temperatura suficiente para ser extrudado. A mesa de aquecimento usou temperatura de 65°C garantindo aderência do material em sua superfície. Esses parâmetros são característicos a cada material e devem ser especificados pelo fabricante desses polímeros.

O dispositivo consiste em uma capa retangular (15 x 7,7 x 1,1 cm) para acomodar o celular sempre na mesma posição. Um cilindro está acoplado à essa (2,4 cm de diâmetro e 4,0 cm de comprimento) responsável por permitir a captação da imagem digital e manter a distância focal entre a câmera - *spot* e a radiação da luz do LED sempre constantes. Esse dispositivo está ilustrado na Figura 3.

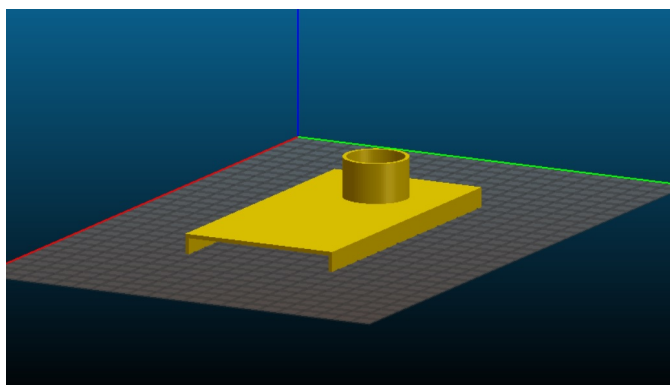


Figura 3 – Representação esquemática do dispositivo colorimétrico (DC) fabricado por impressão 3D.

Fonte: autor, 2018 (FreeCad) Software versão 0.16 (© 2016 – 2018 FreeCad).

2.3.2 Aquisição da imagem

A etapa de aquisição da imagem foi realizada usando celular (Motorola Moto G5 Plus, câmera 12 MP). Para isso, a imagem da área superficial do *spot-test* da placa de toque foi fotografada pelo celular acoplado ao dispositivo proposto, Figura 4.

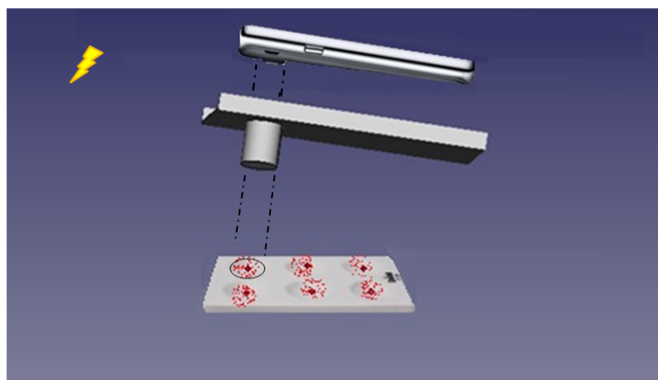


Figura 4 – Representação esquemática da etapa de aquisição da imagem usando dispositivo colorimétrico (DC) acoplado ao celular e a posição de captura da imagem (*spot*) na placa de porcelana.

Fonte: autor, 2018 (FreeCad) Software versão 0.16 (© 2016 – 2018 FreeCad).

As configurações de *flash*, filtros, ajustes de escala e, em especial, o modo de captura que definem a câmera do celular foram manualmente ajustadas. O aplicativo de celular OpenCamera (versão 1.40) é um aplicativo de código aberto desenvolvido para *tablets* e celulares com sistema Android que controla os principais parâmetros considerados nessa etapa e suas respectivas definições, Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros de ajuste do App OpenCamera definidos para aquisição de imagem do produto avermelhado gerado pela reação colorimétrica em placa de porcelana.

Parâmetros	Modo
<i>Flash</i>	Contínuo
Foco	Contínuo
ISO	1600
Auto estabilização	Desativado
Balanco de branco	Daylight
Deteção de rosto	Desativado
Temporizador	Desativado
Modo de cena	Hdr
Efeito de cor	Nenhum
Interval de disparo	Nenhum
Exposição travada	Ativada

Fonte: autor, 2018.

Os parâmetros considerados são fundamentais à resposta analítica obtida a partir da imagem capturada pelo celular. O *flash* contínuo garante que a mesma intensidade luminosa está atingindo o *spot* garantindo homogeneidade na captura da imagem. A escolha da ISO 1600 dentre as opções possíveis garante maior sensibilidade do sensor da câmera a luz, assim, quanto maior o ISO, maior a sensibilidade do sensor a luz. O balanço de branco é uma ferramenta utilizada para compensar a cor da foto através de uma escala de temperatura de cores (quente - fria) na escala Kelvin. A opção Daylight encontra-se na região central da escala na interface de cores azul e amarela, em 5.000 K. O modo de cena alto alcance dinâmico (Hdr) permite que quantidades de luz com diferentes intensidades sejam gravadas pelas lentes da câmera ao capturar a imagem, sendo ideal para fotos com muita ou pouca luz, pois trabalha com sobreposição de imagens.

2.3.3 Processamento da imagem

O software ImageJ (versão 1.50i, National Institutes of Health, USA) tem sido comumente usado para processamento de imagens científicas multidimensionais. A imagem capturada pelo App OpenCamera é agora convertida em um modelo de cores aditivas RGB (*Red*, *Green* e *Blue*), que combina as cores vermelho, verde e azul em um espectro cromático que varia em uma escala de 0 a 255 para cada cor. A mistura então varia em uma escala do preto (0, 0, 0) ao branco (255, 255, 255). A resposta referente a cor obtida (RGB) está diretamente relacionada a cor complementar capturada do objeto fotografado. Os canais fornecem valores numéricos do sinal analítico (Mean), referente a variação na escala cromática.

Para garantir que a mesma região de cada *spot* seja analisada, uma região de interesse óptico (ROI) foi gerada a partir do primeiro *spot* e aplicada aos demais. Esta ferramenta garante que a região e a área a serem analisadas apresentem valores fixos, e consequentemente, que a resposta analítica obtida tenha maior confiabilidade e repetibilidade. Uma região retangular com 4560 unidade de área foi utilizada para delimitar a área fixa de interesse em cada *spot*.

2.3.4 Método referência: LC-MS/MS

Um método referência de análise foi desenvolvido em LC-MS/MS e os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo método de estudo miniaturizado. As curvas analíticas obtidas para cafeína em água ultrapura segundo procedimento da seção 2.2. Os resíduos sólidos, obtido após a reação ocorrer em cada *spot* para ambas condições, foram solubilizados em 300 μL de MeOH e transferido para um *insert* para análise. A partir dessa análise buscou-se elucidar o produto obtido na reação entre cafeína e brometo de potássio em meio ácido. A curva analítica da cafeína foi obtida para concentrações de 3,33 a 333 mg L^{-1} .

Um equipamento de LC da Agilent 1200 Series, composto por amostrador automático 1200 Series, bomba quaternária 1200 e forno para coluna 1200 Series foi utilizado. Para as análises do(s) possível produto(s) da reação colorimétrica e das demais amostras foram injetados 20,0 μL da solução metanólica em uma vazão de 1,00 mL min^{-1} . A amostra foi separada em coluna Phenomenex PFP (150 x 4,60 mm x 5,00 μm), condicionada a 35°C. A fase móvel utilizada foi água ultrapura acidificada e acetonitrila (ACN) ambas contendo 0,100 % de ácido fórmico. A eluição foi feita em modo gradiente tendo a seguinte programação: 0,50 minutos (5,00 % ACN), de 0,50 a 8,00 minutos (5,00 a 100 % ACN), de 8,00 a 10,00 minutos (100 % ACN). As condições iniciais foram reestabelecidas por mais 4,00 minutos e o tempo de análise total foi de 14,0 minutos.

As condições do espectrômetro de massas 3200 QTRAP (quadrupolo – íon trap linear) da AB Sciex (Foster City, CA, USA) contaram com ionização por electrospray (*Turbo Ion Spray*) no modo positivo. Os parâmetros de operação da fonte de ionização contaram com potencial de Ion Spray (IS): 5500 V, Curtain Gas (CUR): 20 psi, Temperatura (TEM): 650°C, Gas (GS 1): 50 psi, Gas 2 (GS 2): 50 psi, *Interface heater*: ON.

Os demais parâmetros de ionização e fragmentação foram ajustados automaticamente através da infusão direta de 0,100 mg L^{-1} da cafeína (composto referência utilizados nas reações investigadas) com *declustering potential* (DP) de 51,0 V, *entrance potential* (EP) de 4,00 V e *cell entrance potential* (CEP) de 10,0 V.

Experimentos de varredura de íons de 120 a 920 Da foram realizados, inicialmente para verificar a presença de possíveis produtos da reação de oxidação da cafeína.

Experimentos de íons fragmentos (MS/MS) para os íons precursores encontrados também foram realizados a fim de monitorá-los no modo *selected reaction monitoring* (SRM). A Tabela 2 ilustra as transições monitoradas para os dois produtos majoritários da reação e da própria cafeína afim de proporcionar maior seletividade e sensibilidade as análises por LC-MS/MS.

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).

Composto	Massa Molar (Da)	Íon precursor > íon fragmento (<i>m/z</i>)	CE (V)	CXP (V)
Cafeína	194	195>138	27,0	4,00
		195>110	31,0	
		195>83	37,0	
		481>241	15,0	
Produto 1	480	241>198	30,0	4,00
		241>170	30,0	
		324>182	30,0	
Produto 2	323	324>125	30,0	4,00

Fonte: autor, 2018.

2.4 Aplicação do método desenvolvido em amostras de energético, esgoto e medicamentos

As condições analíticas e instrumentais estabelecidas previamente foram aplicadas para amostras de bebida energética (Red Bull®), medicamentos que contêm cafeína em sua composição (Melhoral® e Doril®) e esgoto coletado nas proximidades do Campus 2 da USP (22°00'06.5"S 47°55'47.3"W) em área urbana da cidade de São Carlos – São Paulo. As amostras referentes ao Doril® foram intituladas Medicamento 1 e as de Melhoral® de Medicamento 2.

O efeito de interferência de matriz foi avaliado e as amostras foram diluídas para reduzir o comprometimento da resposta analítica em ambos os métodos.

No dispositivo proposto, as concentrações de cafeína nas amostras, foram determinadas usando adição de padrão.

De forma semelhante, para as análises por LC-MS/MS (método referência) as amostras foram diluídas para minimizar o efeito de matriz e submetidas a análise para verificar se suas respectivas concentrações atendiam ao método desenvolvido.

2.4.1 Amostra de bebida energética

A amostra de Red Bull® foi obtida a partir de uma lata de 250 mL contendo 80,0 mg de cafeína, ou seja, em 320 mg L⁻¹ de cafeína, segundo informações fornecidas pelo fabricante. Embora este valor se mostre adequado a faixa avaliada para concentração de cafeína dos métodos referência e proposto, diluições foram realizadas a partir de uma alíquota de 60,0 µL do conteúdo da embalagem referência em 100 mL de água ultrapura para que o efeito de matriz fosse minimizado. A solução estoque obtida em 0,190 mg L⁻¹ de cafeína foi fortificada a partir de diluições da solução estoque de cafeína e as concentrações de 3,00 a 900 mg L⁻¹ foram avaliadas para o método do dispositivo proposto.

2.4.2 Amostra de medicamentos

O medicamento 1 (Doril® – MS: 1.7817.0007, Cosmed Indústria de Cosméticos e Medicamentos S/A) e o medicamento 2 (Melhoral® – MS: 1.7817.0004, The Sydney Ross Co), ambos de uso adulto, foram analisados por apresentarem cafeína em sua composição. Segundo informação de seus respectivos fabricantes, ambos apresentam ácido acetilsalicílico (500 mg) e cafeína (30,0 mg) em suas composições, além de excipientes como amido e corante vermelho de eritrosina nº 3 para o Doril®³¹ e amido, hipromelose e triacetina para o Melhoral®³².

O procedimento para análise da concentração de cafeína nesses fármacos foi adaptado do protocolo determinado pela Farmacopéia Brasileira para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária de comprimidos não revestidos. Com a finalidade de verificar se as unidades apresentam uniformidade de peso foi previamente determinado o peso médio de 5,00 unidades da embalagem (caixa contendo 30,0 comprimidos). A condição de limite de tolerância menor do que duas unidades com relação aos limites especificados para comprimidos não revestidos foi atendida. A medida de peso médio apresentaram limite de variação de ± 10,0 %,

não estando acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas, como exigido. Um comprimido contendo 30,0 mg de cafeína foi macerado e solubilizado em volume mínimo de água ultrapura. A solução foi filtrada em papel qualitativo e o filtrado transferido para um balão volumétrico e completado para 100 mL de água ultrapura, resultando em solução estoque de concentração 300 mg L⁻¹ preparada para cada fármaco. O método portátil foi avaliado para concentrações entre 3,00 a 600 mg L⁻¹ para ambos medicamentos.

2.4.3 Amostra de esgoto

A amostra de esgoto obtida nas proximidades do Campus 2 da USP (22°00'06.5"S 47°55'47.3"W) em área urbana da cidade de São Carlos – São Paulo foi coletada em frascos plásticos de polietileno tereftalato (PET) e armazenada no mesmo em geladeira à temperatura entre 6 e 10°C. As amostras foram analisadas em período máximo de 7 dias após a data de coleta e submetida a análises colorimétricas em método referência e proposto.

Devido a sua complexidade, a amostra de esgoto foi previamente filtrada e fortificada com solução de cafeína em diferentes concentrações para um estudo da viabilidade da reação entre 3,00 a 900 mg L⁻¹ do analito para o método proposto.

2.5 Validação do método propostos em LC-MS/MS dispositivo colorimétrico (DC)

A validação foi feita seguindo a diretiva do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) com base nos documentos necessários para acreditação (DOQ-CGCRE-008 – Rev. 06 – Nov/17)³³. O método desenvolvido acorda ainda com outras agências nacionais de acreditação, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)³⁴ e órgãos internacionais de supervisão da segurança da saúde pública como Food and Drug Administration (FDA)³⁵. Os métodos propostos nesse estudo foram validados segundo parâmetros de precisão (intra e interdias), limite de quantificação, limite de detecção, sensibilidade e linearidade.

O método foi avaliado em matriz aquosa e aplicado às amostras de medicamentos, bebida energética e esgoto para o método referência e proposto.

O LOD de ambos os métodos foi determinado a partir da razão entre o LOQ e um fator 3,30, representando o menor valor de concentração que o analito pode ser detectado por um método analítico com precisão. O LOQ dos métodos analíticos desenvolvidos no presente estudo baseou-se menor concentração do analito em que foi possível quantificar com precisão e exatidão especificados (DPR % inferior a 20,0 %).

A linearidade foi avaliada fortificando as amostras de interesse em concentrações crescentes desse analito para uma faixa de 3,33 a 333 mg L⁻¹ no método referência e de 3,00 a 900 mg L⁻¹ para o método proposto. As análises das amostras por adição de padrão foram realizadas em triplicatas e a média dos valores obtidos como resposta analítica. A faixa linear de 3,33 a 333 mg L⁻¹ no método referência, de 100 a 500 mg L⁻¹ para o dispositivo em água e a amostras de energético e esgoto e de 100 a 300 mg L⁻¹ para os medicamentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Considerações sobre a reação colorimétrica

A ordem de adição dos reagentes à placa de porcelana foi adotada colocando-se primeiramente solução de cafeína, seguida da adição de ácido clorídrico 37 % e adição de solução de KBrO₃, todos em volumes iguais de 100 µL. A placa de porcelana foi disposta sobre a mesa de aquecimento a 150°C e a medida que a reação ocorria foi observada a formação de um resíduo sólido avermelhado, como apresentado na Figura 5.



Figura 5 – Placa de porcelana com resíduo sólido avermelhado obtido após a reação entre cafeína (75 mg L⁻¹) e KBrO₃ em meio ácido (HCl 37 %) ocorrer.

Fonte: autor, 2018.

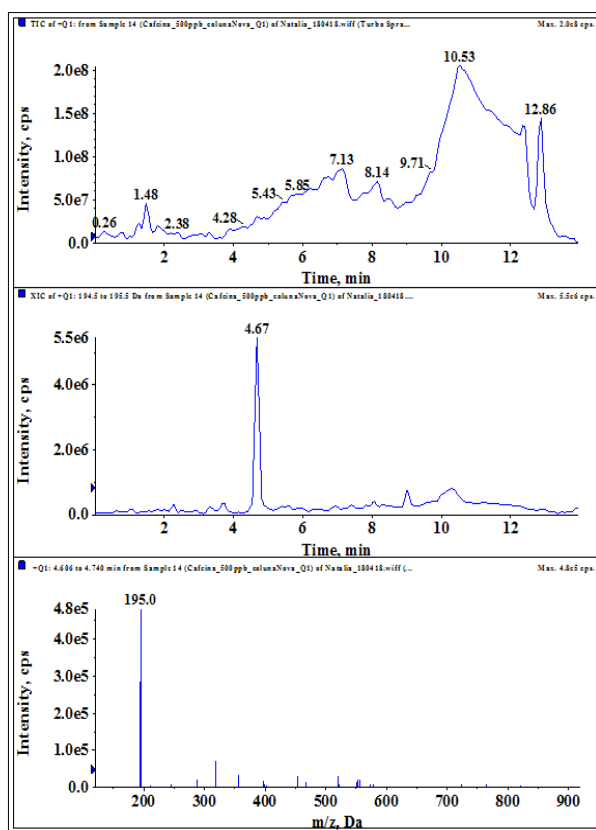
A intensidade da cor vermelha foi proporcional a concentração de cafeína presente no meio para reagir, sendo essa relação observada pelos valores de intensidade de sinal obtidos via celular e pelo LC-MS/MS. Essa variação é muito pouco perceptível ao olho humano. Embora a temperatura da mesa tenha sido programada e a placa de porcelana tenha dissipação homogênea do calor por todos os *spots* pôde-se observar variação de temperatura entre as regiões da mesa de aquecimento.

3.2 Desenvolvimento do método referência – LC-MS/MS

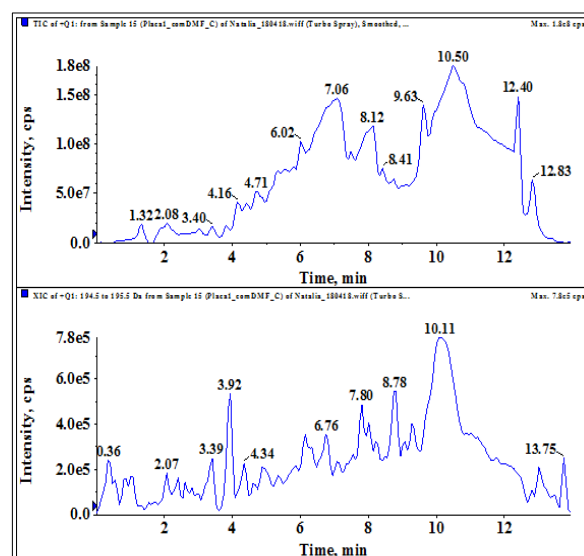
O método de referência utilizado para comparação dos resultados com aquele proposto via celular foi o espectrométrico. Não foi possível utilizar um espectrofotômetro como técnica comparativa, uma vez que ao ressuspender o resíduo avermelhado para análise em cubeta, este perdeu coloração e tal técnica foi incapaz de gerar resposta analítica. A cafeína foi avaliada em concentração de 1,00 mg L⁻¹. A massa molar da cafeína é 194,19 g mol⁻¹ sendo possível avaliar o consumo desse analito a partir dos íons com relação m/z 195 ([M+H]⁺) para análises em modo positivo e m/z 193 ([M-H]⁻) em modo negativo de ionização. As análises em modo negativo não apresentaram sinais.

A cafeína foi analisada usando LC-MS/MS, o íon m/z 195, referente a molécula de cafeína ionizada no modo positivo, foi detectado no tempo de retenção (t_R) de 4,67 minutos (como ilustrado na Figura 6). As amostras obtidas em placa de porcelana após a reação colorimétrica foram submetidas ao experimento de varredura de íons para a verificação de cafeína remanescente e possíveis produtos.

Os cromatogramas obtidos para a amostra padrão de cafeína bem como para a amostra pós reação são apresentados de maneira comparativa pela Figura 6.



(a)



(b)

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 (HCl 37 %).

Fonte: autor, 2018 (Analyst) Software versão 1.4 (© 2018 Analyst).

Esse procedimento de análise permitiu avaliar se a reação ocorreu de maneira efetiva sob as condições propostas, pois nenhuma banda cromatográfica referente a m/z 195 foi detectada em 4,67 minutos para a amostra pós reação. O mapeamento dos íons dos possíveis produtos formados também pôde ser avaliado.

O XIC da amostra reacional Figura 6 (b), não apresentou nenhuma banda referente a relação m/z 195 no tempo de retenção de 4,67 minutos, o que indica que a cafeína foi totalmente consumida na reação.

Os íons presentes na faixa de 120 a 920 Da foram adquiridos gerando espectros de massas de cada banda cromatográfica. Os íons que geraram bandas cromatográficas de maior intensidade nos experimentos de XIC foram selecionados

como possíveis produtos da reação. A Figura 7 ilustra os principais íons selecionados para o estudo, m/z 241 e 324.

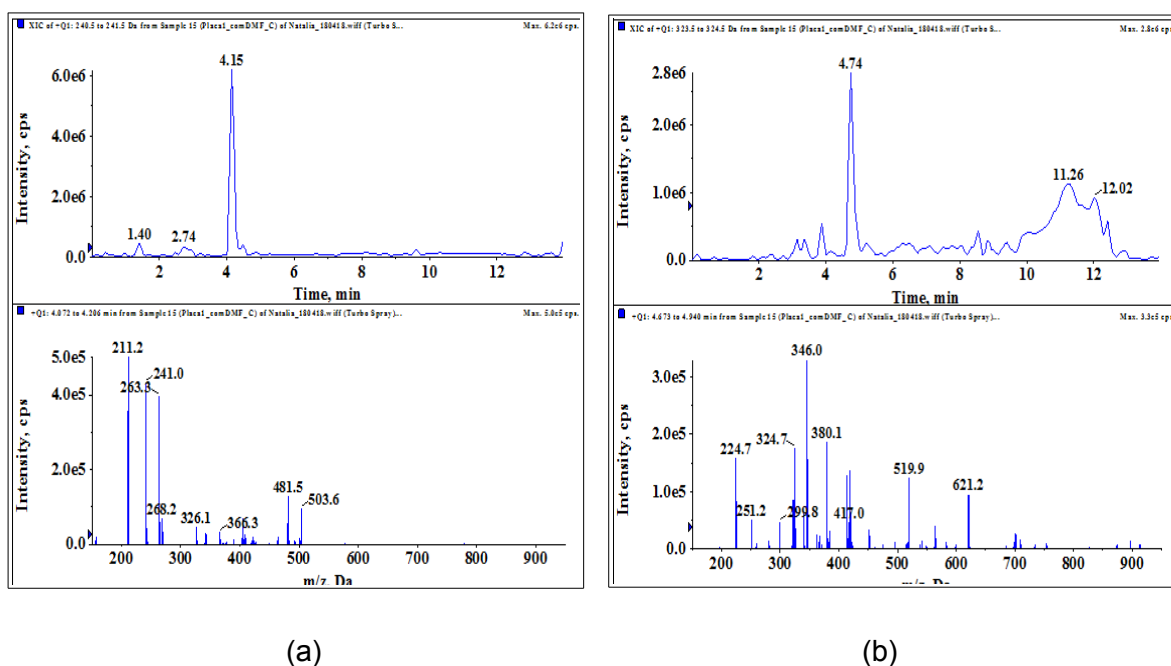


Figura 7 – (a) cromatograma de íon extraído (XIC) de m/z 241 seguido do respectivo espectro de massas com tempo de retenção de 4,15 minutos e (b) XIC de m/z 324 e respectivo espectro de massas com tempo de retenção de 4,74 minutos.

Fonte: autor, (Analyst) Software versão 1.4 (© 2018 Analyst).

O íons de m/z 241 e 324 foram observados nas amostras submetida à reação, porém não foram observados no padrão de cafeína e muito menos no branco (reagentes na ausência da cafeína), indicando que tais íons são provenientes da reação entre reagentes e cafeína e não um interferente. Observou-se ainda a presença do íon m/z 481, que pode ser um íon precursor de m/z 241, ou um dímero, pois ambos os íons quando extraídos apresentam o mesmo tempo de retenção.

Experimentos de íons fragmentos foram realizados para os novos íons encontrados e os espectros de massas de íons fragmentos para cada um dos íons selecionados foi obtido, Figura 8. O comportamento de fragmentação desses íons foi avaliado usando de experimentos de íons fragmentos com diferentes energias de colisão (CE), para proporcionar informações para o desenvolvimento do método de monitoramento de reações selecionadas (SRM). Os experimentos de SRM conferem sensibilidade e seletividade para análises de diversos compostos simultâneos de maneira inequívoca, com confiabilidade analítica.

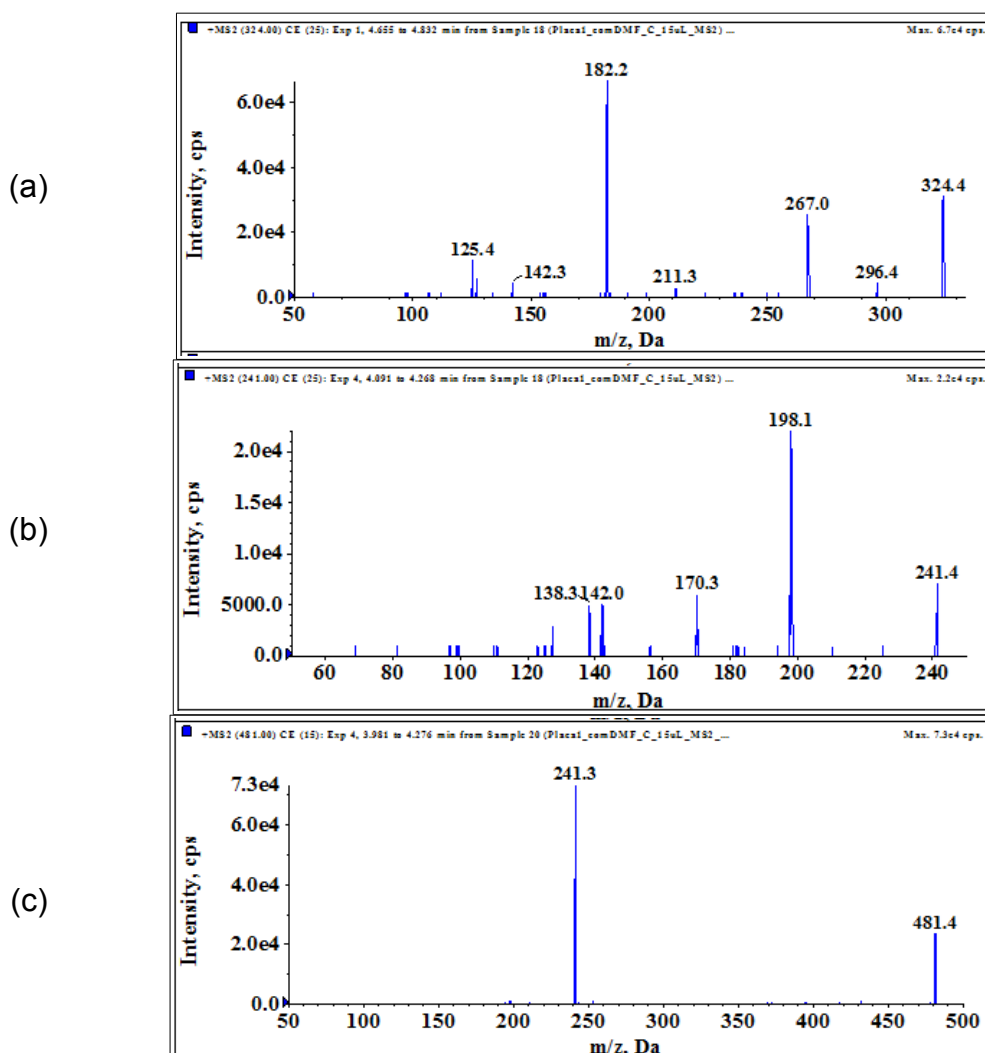


Figura 8 – Espectros de massas dos íons fragmentos de m/z (a) 324, (b) 241 e (c) 481.

Fonte: autor, (Analyst) Software versão 1.4 (© 2018 Analyst).

Como esperado, pôde-se comprovar que o íon m/z 481 é um precursor do íon de m/z 241, já que m/z 241 é um íon fragmento do íon m/z 481, sendo que ambos os íons referem-se ao mesmo composto com tempo de retenção de 4,15 minutos.

A Tabela 3 resume as informações dos íons precursor e fragmentos obtidos para os possíveis produtos encontrados após reação e para o padrão de cafeína, por LC-MS/MS.

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.

Compostos	Massa Molar (Da)	Íon Precursor (m/z)	Íons fragmentos (m/z)
Cafeína	194	195	138, 110, 83
Produto 1	480	481	241, 198, 170
Produto 2	323	324	267, 182, 125

Fonte: autor, 2018.

A partir dos espectros de íons fragmentos foi desenvolvido um método no modo SRM para verificar a presença desses produtos nos demais experimentos realizados (como apresentado na Tabela 2, seção 2.3.4).

O padrão de cafeína foi analisado por experimento de SRM, para a varredura das transições referentes à cafeína (3 transições), Figura 9.

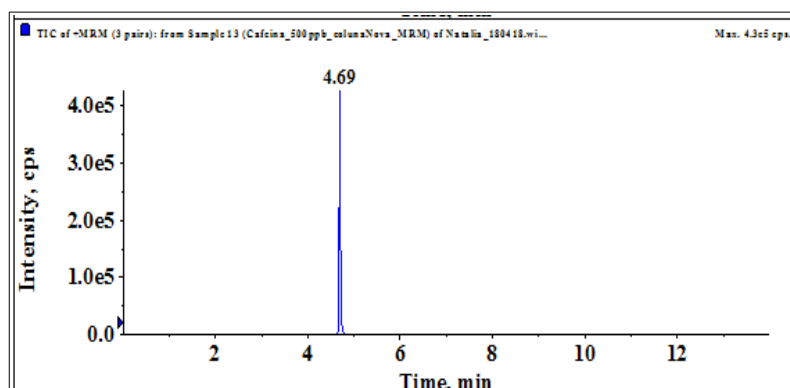


Figura 9 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para padrão de cafeína, com varredura das transições de transições 195>138, 195>110 e 195>83.

Fonte: autor, (Analyst) Software versão 1.4 (© 2018 Analyst).

O tempo de retenção obtido em 4,69 é característico da cafeína nas condições determinadas pelo método de análise proposto. As amostras obtidas após a reação também foram analisadas no modo SRM, sendo observados produto 1 (3 transições) e do produto 2 (2 transições), como apresentado a Figura 10.

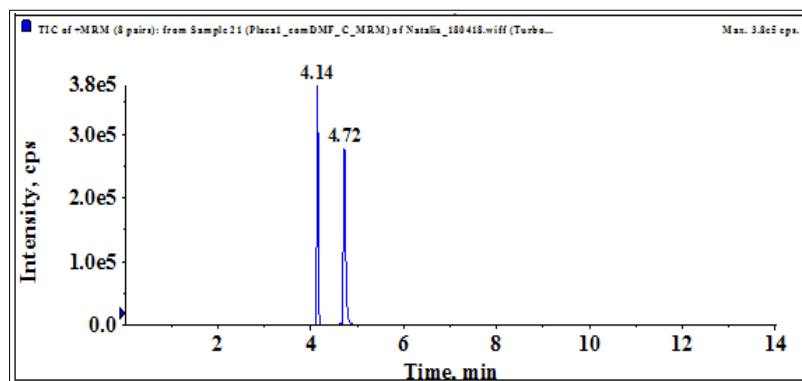


Figura 10 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para o produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %).

Fonte: autor, (Analyst) Software versão 1.4 (© 2018 Analyst).

O sinal obtido para o tempo de retenção de 4,14 minutos é referente as transições do produto 1 ($481>241$, $241>198$ e $241>170$). O produto 2 apresentou resposta analítica para as transições $324>182$ e $324>125$ com tempo de retenção em 4,72 minutos.

As transições da cafeína $195>138$, $195>110$ e $195>83$ não apresentaram sinal analítico no cromatograma, uma vez que reagiu completamente, de modo que nenhuma banda cromatográfica foi observada. A Figura 11 apresenta a relação da área obtida em função da concentração de cafeína para o produto 1.

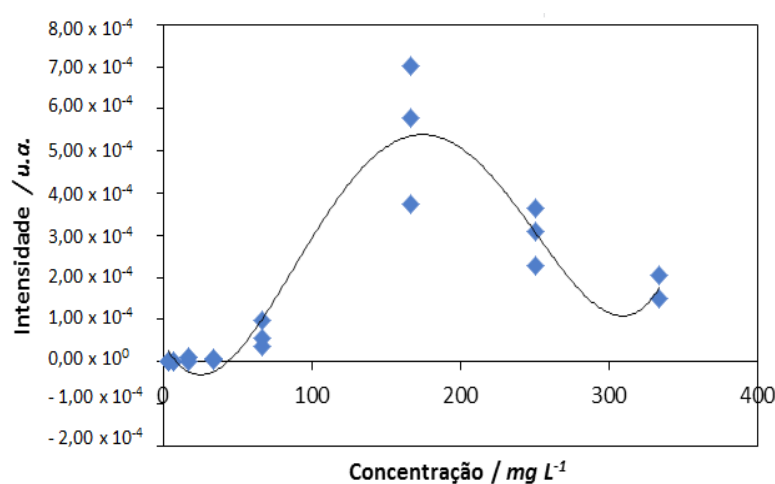


Figura 11 – Curva analítica obtida para o produto 1 da reação entre a cafeína e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %), por LC-MS/MS.

Fonte: autor, 2018.

A Equação 1 mostra que o ajuste dos pontos dessa curva é melhor representado por uma equação polinomial do 4º grau, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,908 indicando possível ajuste dos valores obtidos ao método proposto.

Equação 1 $y = 1,00 \times 10^{-4}x^4 - 8,31 \times 10^{-2}x^3 + 16,172 \times 10^{-1}x^2 - 659,8x + 4,56 \times 10^{-3}$

A curva analítica obtida para o produto 1 é descrita por uma distribuição Gaussiana, onde o número de espécies apresenta queda após determinado tempo de reação. O perfil obtido sugere que a formação desse produto não está relacionada de forma direta com a concentração de cafeína, mas sim com uma possível reação paralela. Talvez o produto 2 só seja formado depois que uma quantidade razoável do produto 1 já tenha sido formada para então deslocar o equilíbrio químico para a formação do produto 2.

O estudo dos parâmetros cinéticos da reação e a eficiência da reação proposta em reagir cafeína presente em amostras de composição complexa, sob as condições experimentais previamente estabelecidas, devem ser realizados com o objetivo de conhecer melhor seu mecanismo. Experimentos mais aprimorados de espectrometria de massas e até mesmo o isolamento desses produtos devem ser realizados para uma proposta mais conclusiva sobre a reação.

De maneira análoga, a relação da área obtida por cada banda cromatográfica em função da concentração de cafeína foi obtida para avaliar o perfil de formação do produto 2, Figura 12.

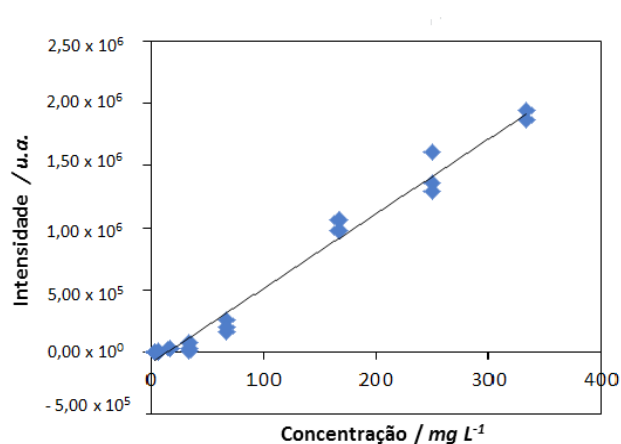


Figura 12 – Curva analítica obtida para o produto 2 da reação entre a cafeína e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %), por LC-MS/MS.

Fonte: autor, 2018.

A Equação 2 descreve a relação de linearidade para o produto 2 com R^2 de 0,978.

Equação 2

$$y = 6,0 \times 10^{-3}x - 8,35 \times 10^{-4}$$

O produto 2 apresentou uma relação linear e inversa com a concentração de cafeína inicialmente presente na amostra. A medida que a cafeína é consumida durante a reação, o produto 2 é formado e sua concentração aumenta com o passar do tempo.

As amostras obtidas após a reação ocorrer em placa de porcelana foram analisadas para os *spots* nomeados de A a F, como ilustrado na Figura 13.

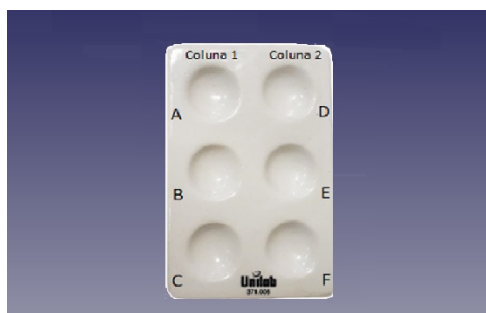


Figura 13 – Representação esquemática da disposição dos *spot-tests* na placa de porcelana.

Fonte: autor, 2018.

Embora a placa de porcelana tenha sido disposta sobre a região central da mesa de aquecimento foi possível observar que a evaporação dos reagentes não ocorreu de maneira uniforme por toda sua extensão. O efeito da variação de temperatura sobre o andamento da reação foi significativo e as concentrações dos produtos 1 e 2 obtidas em cada *spot* apresentaram variação.

O monitoramento da presença de cafeína bem como dos produtos 1 e 2 foram fundamentais para que os experimentos fossem realizados de maneira mais seletiva e sensível permitindo a verificação do consumo de cafeína e da formação desses produtos também nas amostras de bebida energética, medicamentos e esgoto.

3.2.1 Validação do método referência – LC-MS/MS

A curva analítica do método de referência foi obtida para concentrações de cafeína entre 3,33 e 333 mg L⁻¹ em água ultrapura, Figura 14.

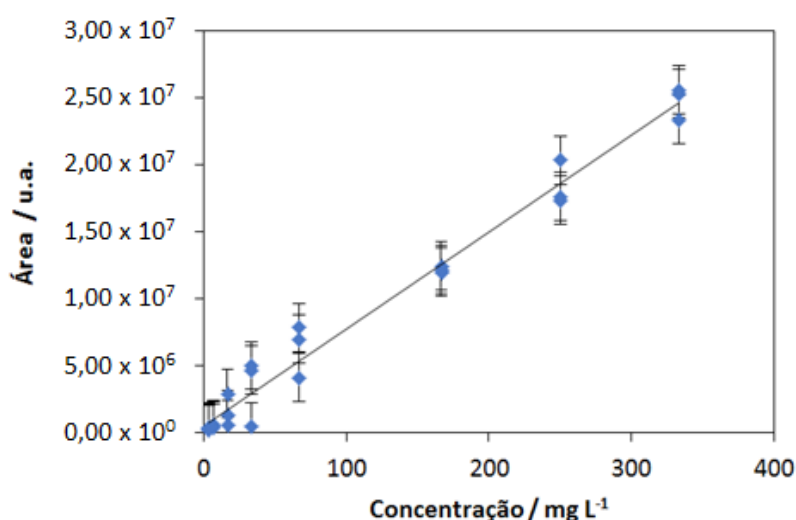


Figura 14 – Curva analítica da área da banda de cafeína em função da concentração de cafeína entre 3,33 e 333 mg L⁻¹, por LC-MS/MS.

Fonte: autor, 2018.

A Equação 3 descreve a linearidade obtida com R² de 0,979.

Equação 3

$$y = 7,25 \times 10^{-4}x + 5,26 \times 10^{-5}$$

As figuras de mérito obtidas para o método de referência são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Figuras de mérito obtidas para a cafeína em água ultrapura, por LC-MS/MS.

Parâmetros analíticos	Valores obtidos
Faixa linear (mg L ⁻¹)	3,33 – 333
LOQ (mg L ⁻¹)	3,33
LOD (mg L ⁻¹)	1,00
DPR intradia (%)	0,750 – 22,3
Sensibilidade	$7,25 \times 10^{-4}$
Coeficiente linear	$5,26 \times 10^{-5}$
R ²	0,979
Tempo de análise (minutos)	14,0

Fonte: autor, 2018

O método de referência teve precisão intradia avaliada a partir do desvio padrão relativo (DPR) de 0,750 a 22,3 %. Esse valor pode ser justificado pela limitação experimental da reação proposta com relação a variação de temperatura da mesa de aquecimento, em que concentrações variadas dos produtos 1 e 2 são formadas.

O LOQ do método analítico desenvolvido foi obtido em 3,33 mg L⁻¹ baseado na percepção da resposta colorimétrica obtida após a reação. Embora a técnica espectrométrica seja sensível o suficiente para detectar valores abaixo de 3,33 mg L⁻¹, valores menores de concentração não forneceram resposta colorimétrica precisas e exatas após a reação em placa de porcelana. O LOD foi de 1,00 mg L⁻¹. Os valores obtidos mostraram ajuste ao método segundo a tabela ANOVA com R² 0,98 para o método de referência proposto.

O tratamento estatístico dos dados obtidos permitiu avaliar os métodos segundo a variância do grupo de dados considerado através do Teste F com F experimental (0,229) menor que o valor de F tabelado (2,45). O modelo utilizado foi considerado confiável para previsões e sem falta de ajuste.

3.3 Desenvolvimento do método de estudo – Dispositivo colorimétrico (DC)

Os dados de intensidade de sinal (I) obtidos a partir da etapa de tratamento de imagens foram convertidos em densidade óptica (D.O.). A densidade óptica (D.O.) foi calculada para cada valor de concentração de cafeína pela relação negativa do logaritmo da razão entre o valor médio das triplicatas referentes a intensidade de sinal (I) e a intensidade de sinal do branco analítico (I_0), Equação 4.

Equação 4

$$D.O. = -\log (I/I_0)$$

Os valores obtidos foram relacionados com a concentração de cafeína de 100 a 500 mg L⁻¹ em água, Figura 15.

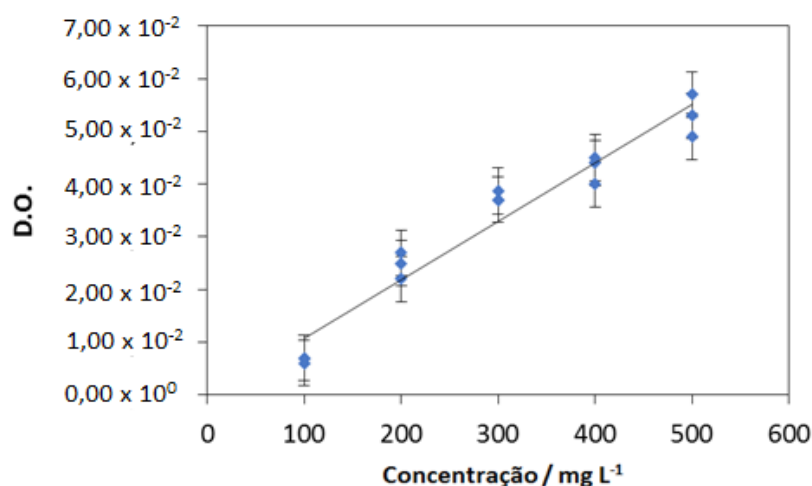


Figura 15 – Curva analítica da densidade óptica (D.O.) em função da concentração de cafeína entre 100 e 500 mg L⁻¹, em água ultrapura, por celular.

Fonte: autor, 2018.

A relação apresentou linearidade com R² 0,945 como descrito pela Equação 5.

Equação 5

$$y = 1,00 \times 10^{-4} x + 3,00 \times 10^{-4}$$

A Tabela 5 apresenta os parâmetros analíticos obtidos a partir do método desenvolvido no dispositivo colorimétrico.

Tabela 5 – Figuras de mérito obtidas para a cafeína em água ultrapura, pelo método desenvolvido em dispositivo colorimétrico (DC), por celular.

Parâmetros analíticos	Valores obtidos
Faixa linear (mg L ⁻¹)	100 – 500
LOQ (mg L ⁻¹)	100
LOD (mg L ⁻¹)	30,0
DPR intradia (%)	0,0800 – 0,760
Sensibilidade	1,00 x 10 ⁻⁴
Coeficiente linear	3,00 x 10 ⁻⁴
R ²	0,945
Tempo de análise (minutos)	20,0

Fonte: autor, 2018.

O método proposto para dispositivo teve o valor de LOQ determinado em 100 mg L⁻¹ por ser o menor valor de concentração de cafeína que se obteve resposta colorimétrica após a reação ocorrer com variação de intensidade de sinal significativa com relação ao branco analítico. A partir desse valor, o LOD foi de 30,0 mg L⁻¹. A precisão intradia obtida foi menor do que 1,00 %. O método proposto para cafeína em água no dispositivo colorimétrico apresentou ajuste de valores com R² igual 0,945 sendo o modelo confiável para previsões e sem falta de ajuste, segundo ANOVA. A variância do grupo de dados considerado através do Teste F com F experimental (0,209) menor que o valor de F tabelado (2,45).

3.4 Comparação entre o método de LC-MS/MS e o dispositivo colorimétrico (DF) proposto.

As figuras de mérito obtidas para ambos os métodos permitiram comparar os parâmetros de LOQ, LOD, precisão, sensibilidade, o tempo e o custo estimado de análise Tabela 6.

Tabela 6 – Figuras de mérito obtidas para a cafeína em água ultrapura pelos métodos desenvolvidos em LC-MS/MS e dispositivo colorimétrico (DC).

Parâmetros analíticos	LC-MS/MS	DC
Faixa linear (mg L ⁻¹)	3,33 – 333	100 – 500
LOQ (mg L ⁻¹)	3,33	100
LOD (mg L ⁻¹)	1,00	30,0
DPR intradia (%)	0,750 – 22,3	0,0800 – 0,760
Sensibilidade	7,25 x 10 ⁻⁴	1,00 x 10 ⁻⁴
Coeficiente linear	5,26 x 10 ⁻⁵	3,00 x 10 ⁻⁴
R ²	0,979	0,945
Tempo de análise (minutos)	14,0	20,0

Fonte: autor, 2018.

O método proposto em dispositivo colorimétrico apresentou valores de LOQ e LOD com variação significativa dos obtidos pelo método de referência. A resposta analítica colorimétrica obtida após a reação ocorrer permitiu observar coloração avermelhada no *spot* para concentração de cafeína a partir de em 3,00 mg L⁻¹, visível ao olho humano. Esse produto, porém, apresentou coloração pouco intensa para avaliação visual e para o sistema óptico de detecção do celular, de modo a não fornecer variação de intensidade de sinal significativa com relação ao branco analítico. O dispositivo não conta com sistema óptico refinado, sendo a câmera do celular a principal ferramenta óptica que o compõe. Assim, enquanto o LOQ obtido para o método desenvolvido em LC-MS/MS foi considerado 3,33 mg L⁻¹ e o LOD 1,00 mg L⁻¹, o dispositivo apresentou LOQ 100 mg L⁻¹ e LOD 30,0 mg L⁻¹.

A faixa de trabalho do dispositivo apresentou linearidade para valores de concentração de 100 a 500 mg L⁻¹ do analito. Considerando os trabalhos de Soni e colaboradores, e ainda de Soare e colaboradores, o presente estudo apresenta uma faixa de concentração relativamente ampla e confere vantagem ao método aqui proposto, uma vez que estudos envolvendo aquisição de imagem, apresentam perda de linearidade, ou seja, faixas lineares estreitas em virtude da limitação de apresentar um sistema óptico simplificado^{36, 37}.

A precisão dos métodos foi avaliada pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR) e os valores obtidos para medidas intradia do LC-MS/MS foram próximos a 20 % enquanto que para o dispositivo proposto foi menor a 1,00 %. Análises por LC-MS/MS de cada *spot-test* mostraram que os produtos formados apresentaram

intensidade de coloração proporcional a concentração de cafeína consumida na reação.

Ambos os métodos apresentaram R^2 maior a 0,945 indicando possível ajuste dos dados obtidos aos respectivos modelos propostos.

O tratamento estatístico, ANOVA, realizado para ambos os métodos mostrou que os modelos utilizados foram considerados confiáveis para previsões e sem falta de ajuste.

Além dos parâmetros mensuráveis obtidos a partir da validação dos métodos analíticos desenvolvidos foi possível avaliar as vantagens e limitações de cada técnica utilizada. A Tabela 7 apresenta fatores que abrangem a portabilidade da técnica, os princípios da Química Verde e ainda o custo financeiro das análises. O maior número de sinais positivos (+) implica em maior vantagem, sendo 1 positivo o conceito mínimo e 4 o máximo da escala.

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.

Parâmetros	LC-MS/MS	DC
Consumo de amostra	++++	+
Consumo de solvente orgânico	+	++++
Resíduos	+	++++
Efeito de matriz	+	++++
Preparo de amostra	+	+++
Tempo de análise	+	++++
Custo estimado da análise	+	++++
Portabilidade	+	++
Custo estimado do equipamento / dispositivo	+	++++

Fonte: autor, 2018.

O método miniaturizado conta com toda a quantidade de amostra gerada pela reação, em placa de porcelana, para obtenção do valor numérico do sinal analítico. Essa quantidade poderia ter sua escala reduzida ainda mais, e ainda assim detectada pelo método proposto, porém há uma limitação para captação do sinal. O

LC-MS/MS apresenta vantagem a essa limitação experimental, uma vez que mesmo que a coloração não seja perceptível ao olho humano, o detector dessa técnica é capaz de detectar até a ordem de nanogramas de concentração de analito e não baseada na intensidade de cor obtida pela reação.

O consumo de solvente orgânico necessário para realizar a análise no LC-MS/MS é significativo por manter fluxo durante os 14,0 minutos de análise da amostra. O dispositivo dispensa essa etapa por contar com análise do resíduo avermelhado da reação no próprio *spot* e ainda sem necessidade de solubilização para tal. A geração de resíduos é proporcional ao volume de solvente gasto na etapa de análise, sendo uma vantagem para o dispositivo proposto tanto do ponto de vista da Química Verde quanto financeiro.

O efeito de matriz e a etapa de preparo de amostras foram fundamentais para realizar as análises e em geral, é uma limitação dessa técnica de referência. O dispositivo mostrou-se tão sensível ao efeito de matriz quanto a técnica de referência sendo possível realizar análises de amostras em matrizes complexas sem comprometer ou interferir na resposta analítica de maneira significativa.

A técnica de LC-MS/MS é bastante dependente da etapa prévia de preparo de amostras para garantir que os possíveis interferentes presentes na matriz sejam eliminados. Já o dispositivo proposto é capaz de realizar análises de maneira menos cautelosa, sendo sua principal limitação amostras que já apresentam coloração antes de serem submetidas a reação. Essas necessitam de etapas prévias de tratamento e estratégias para aquisição da imagem.

O tempo de análise foi considerado como aquele necessário para adquirir informações sobre a amostra, para posterior interpretação desta. No LC-MS/MS esse tempo foi de 14,0 minutos, enquanto que para o método portátil é de alguns segundos até que a amostra seja fotografada.

Considerando o gasto de solvente, energia elétrica por tempo de trabalho do equipamento, gás e o custo de um profissional qualificado, no caso do LC-MS/MS, para realizar uma análise de 14,0 minutos todos os itens supracitados são fundamentais. O dispositivo proposto dispensa o uso de solventes e de um profissional qualificado, sendo uma técnica acessível. O tempo de análise é de segundos até que a imagem seja adquirida ocorre usando celular, um equipamento eletrônico de uso comum por toda a população, com gasto reduzido de energia elétrica.

Embora etapa de aquecimento da reação seja uma limitação experimental para a portabilidade de ambos os métodos, a portabilidade do LC-MS/MS é pouco viável. Em contra partida, otimizações em um dispositivo miniaturizado podem ser promissoras para a etapa de aquecimento, possibilitando que todo o sistema seja portátil. As etapas desenvolvidas até o presente momento não conferem total portabilidade ao dispositivo proposto.

O equipamento de LC-MS/MS utilizado para análises de referência nesse estudo foi estimado em R\$ 250.000,00, sendo pouco viável financeiramente sua aquisição. Em contra partida, o dispositivo colorimétrico proposto apresenta custo de fabricação estimado em R\$ 5,00. Esse valor não contabiliza o custo do aparelho celular, por ser uma tecnologia já bastante disseminada, atualmente.

A validação e a comparação feita entre as técnicas utilizadas foram baseadas em resultados obtidos para a cafeína em água ultrapura. Os métodos foram desenvolvidos e otimizados sendo possível avaliar a aplicabilidade deles em amostras contendo cafeína em sua composição.

3.5 Aplicação dos métodos desenvolvidos pra reação colorimétrica em amostras de energético, esgoto e medicamentos.

3.5.1 Amostra de energético

A amostra de energético foi submetida a reação nas condições descritas na seção 2.2, mas apresentou coloração preta após a reação inviabilizando a análise do resíduo. A complexidade da matriz dada pela presença de açúcares pode justificar tal comportamento, inviabilizando a análise da amostra bruta. A amostra foi então diluída para $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ em água ultrapura e a reação foi repetida resultando no resíduo avermelhado esperado, com coloração pouco intensa. Após essa etapa comum aos métodos de referência e proposto, o resíduo foi solubilizado em 300 μL de MeOH e analisado com o método desenvolvido em LC-MS/MS. O branco, amostra de energético com os reagentes substituídos por água ultrapura também foi submetido as condições de reação e analisados. A Figura 16 apresenta os

cromatogramas de íons totais no modo SRM para (a) amostra do branco de energético e para amostra do produto de reação com esse.

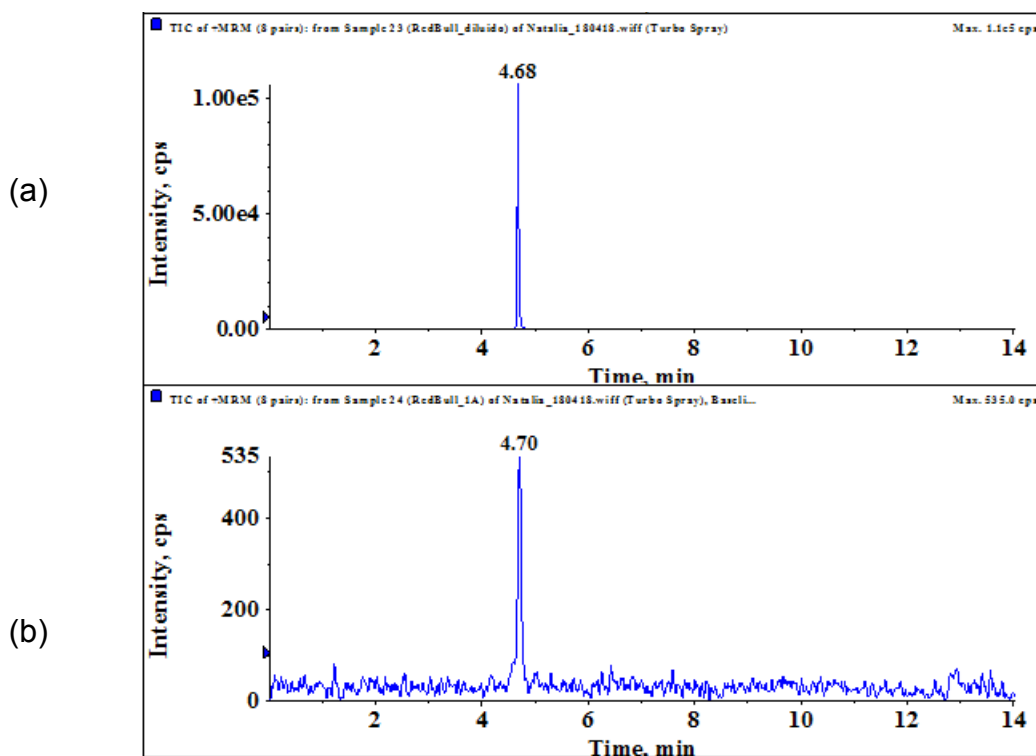


Figura 16 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para (a) amostra do branco de energético e (b) para amostra do produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína (contida na amostra de energético) e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %).

Fonte: autor, (Analyst) Software versão 1.4 (© 2018 Analyst).

O TIC da amostra do branco do energético apresentou sinal em tempo de retenção de 4,68 minutos, como previamente atribuído a presença de cafeína na amostra.

A amostra de energético não apresentou cafeína em sua composição após a reação ocorrer, mas sim a presença do íon m/z 324 como único produto de reação no tempo de retenção de 4,70 minutos (banda referente as transições do produto 2). A reação foi realizada em triplicata com valor de concentração obtido pelo método de referência de $0,720 \text{ mg L}^{-1}$, sendo inferior ao LOQ de $3,33 \text{ mg L}^{-1}$ considerado para o método inicialmente proposto.

A determinação de cafeína em amostra de energético foi feita por LC-MS/MS nas condições previamente propostas, mas mostrou-se inviável por falta de confiabilidade no modelo proposto, pois concentração encontrada pelo equipamento

para amostra diluída à $0,190 \text{ mg L}^{-1}$ de cafeína estava abaixo da faixa linear inicialmente proposta pelo método desenvolvido para cafeína em água, isto é, de $3,33$ a 333 mg L^{-1} de cafeína. Por esse motivo, a amostra de energético teve de ser fortificada para se adequar as condições do método previamente proposto.

3.5.2 Amostra de medicamentos

O método desenvolvido foi aplicado às amostras de medicamentos 1 e 2. A reação ocorreu a partir de soluções independentes de cada medicamento em concentrações de 300 mg L^{-1} . Após a reação, o resíduo avermelhado também pôde ser observado, sendo solubilizado em $300 \mu\text{L}$ de MeOH e analisado com o método desenvolvido em LC-MS/MS. O branco, amostra de cada medicamento com os reagentes substituídos por água ultrapura, também foram submetidos as condições análogas e foram analisados.

A Figura 17 apresenta o TIC no modo SRM para as amostras do branco e da amostra do medicamento 1 após a reação.

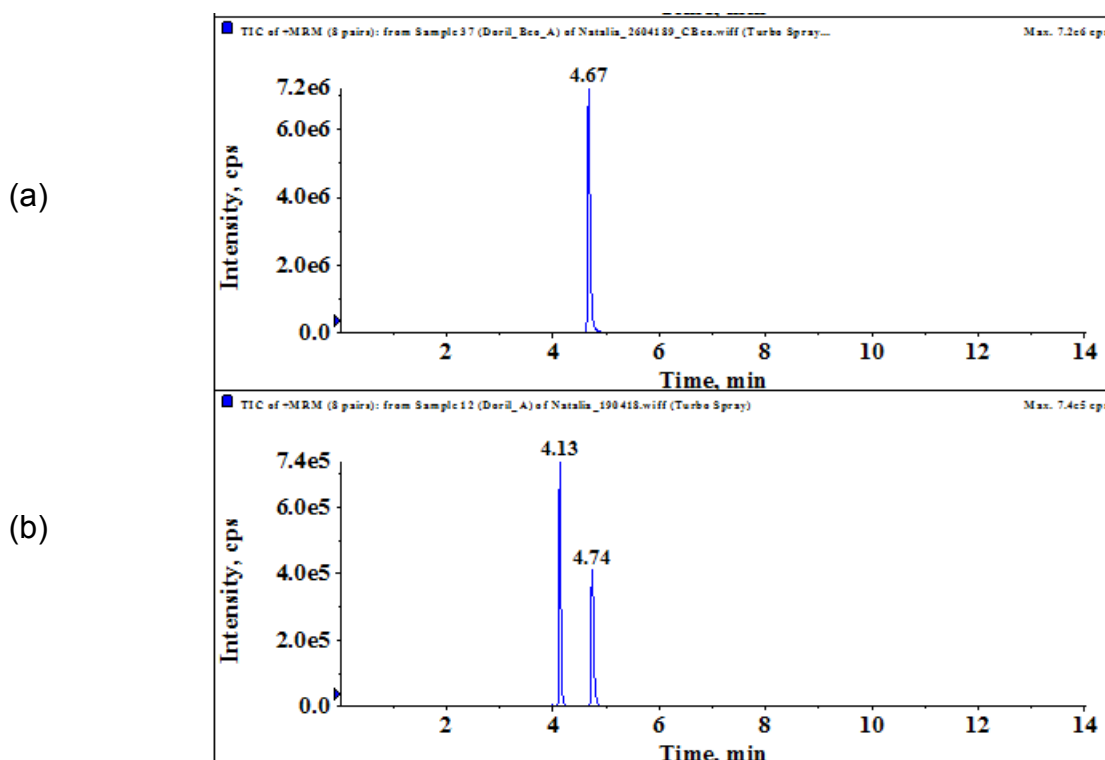


Figura 17 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para (a) amostra do branco de medicamento 1 e (b) para amostra do produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína (contida nas amostra de medicamento 1) e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %).

Fonte: autor, (Analyst) Software versão 1.4 (© 2018 Analyst).

O TIC referente ao branco do medicamento 1 apresentou uma banda cromatográfica em 4,67 minutos (referente as transições da cafeína), indicando presença de cafeína na amostra. A amostra do produto de reação desse mesmo medicamento não apresentou cafeína em sua composição, mas sim a presença dos produtos 1 e 2, caracterizados pelas bandas em 4,13 minutos e 4,74 minutos, respectivamente.

De maneira análoga, as amostras do medicamento 2 foram analisadas e os dados obtidos são apresentados pela Figura 18.

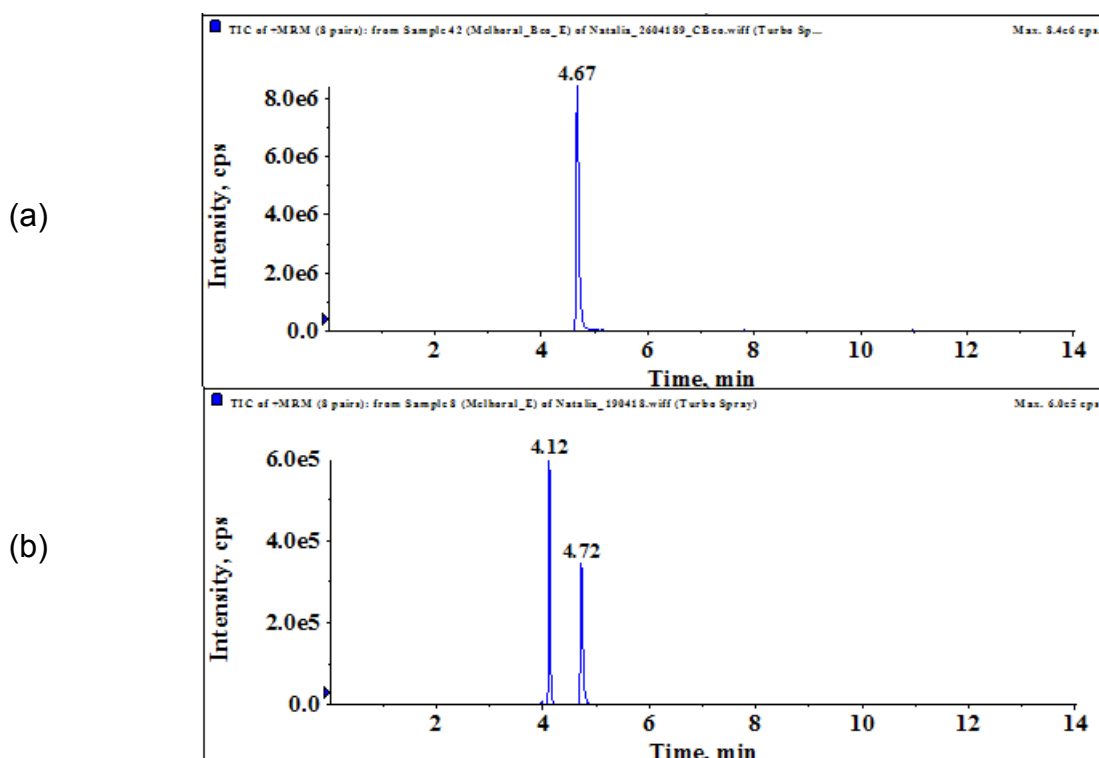


Figura 18 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para (a) amostra do branco de medicamento 2 e (b) para amostra do produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína (contida na amostra de medicamento 2) e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %).

Fonte: autor, (Analyst) Software versão 1.4 (© 2018 Analyst).

O TIC do branco do medicamento 2 apresentou uma banda cromatográfica em 4,67 minutos, referente a presença de cafeína. A amostra do produto de reação desse mesmo medicamento não apresentou cafeína em sua composição, sendo esta totalmente consumida. A presença das bandas em 4,12 e 4,72 minutos referentes aos produtos 1 e 2, respectivamente, foram observadas.

A reação ocorreu de maneira efetiva e para concentração de 300 mg L^{-1} de cada medicamento. Os valores médios de concentração obtidos pelo LC-MS/MS

para os brancos analíticos desses compostos foram de 188,43 mg L⁻¹ para o medicamento 1 e de 254,13 para o medicamento 2. O excipientes presentes nos comprimidos, bem como seus respectivos ativos podem reagir com os reagentes (KBrO₃ e HCl 37 %), reduzindo a presença do produto monitorado por LC-MS/MS. A variação que ocorreu no aquecimento foi um limitante principalmente ao aplicar o método em amostras com composição complexa. Apesar disso, a determinação de cafeína em amostra de medicamentos por LC-MS/MS nas condições previamente propostas mostrou confiabilidade no modelo proposto para faixa linear de trabalho de 3,33 a 333 mg L⁻¹.

3.5.3 Amostra de esgoto

O método desenvolvido foi aplicado em amostra de esgoto contendo cafeína. Após a reação, o resíduo avermelhado também pôde ser observado, sendo solubilizado em 300 µL de MeOH e analisado com o método desenvolvido em LC-MS/MS. O branco, amostra do esgoto com os reagentes substituídos por água ultrapura, também foram submetidos as condições análogas. Os TIC no modo SRM para amostra do branco de esgoto e para amostra do esgoto após a reação encontram-se apresentados na Figura 19.

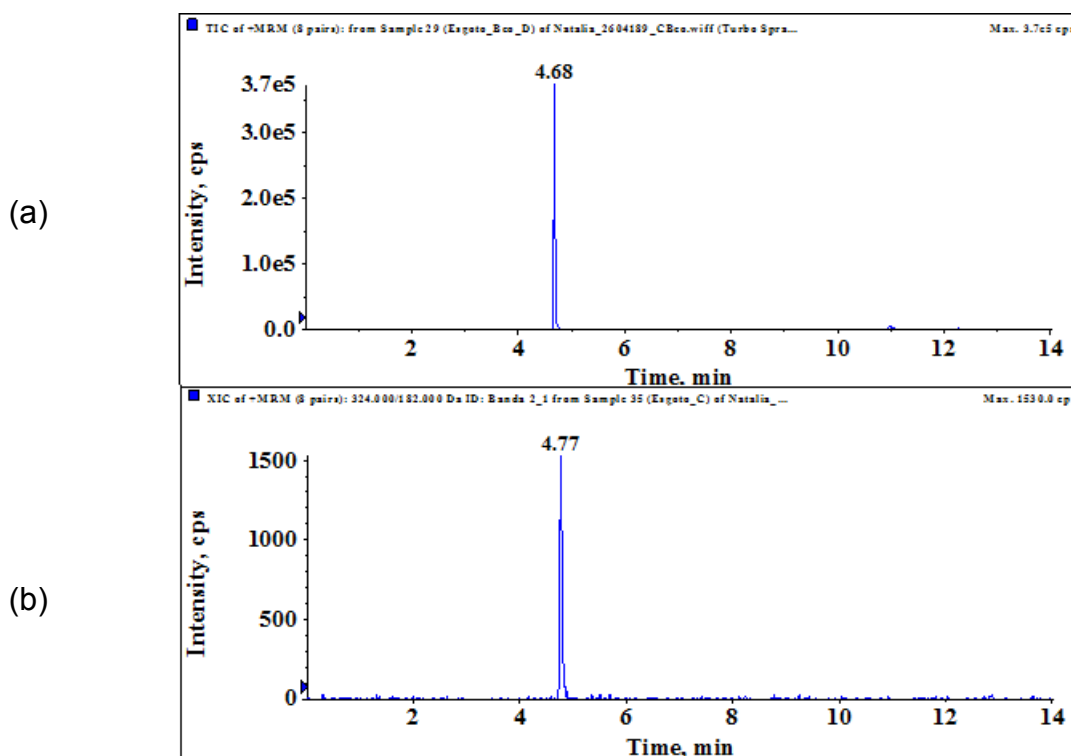


Figura 19 – Cromatograma de íons totais (TIC) para experimentos de monitoramento de reação selecionada (SRM) para (a) amostra do branco de esgoto e (b) para amostra do produto avermelhado obtido pela reação entre a cafeína (contida na amostra de esgoto) e KBrO_3 em meio ácido (HCl 37 %).

Fonte: autor, (Analyst) Software versão 1.4 (© 2018 Analyst).

O cromatograma de íons totais referente ao branco da amostra de esgoto apresentou banda cromatográfica em 4,68 minutos, indicando presença de cafeína na amostra, uma vez que a banda em questão trata-se das transições da cafeína.

A amostra do esgoto após a reação indicou ausência de cafeína, e uma banda em 4,77 minutos referente ao produto 2.

A concentração de cafeína no esgoto bruto é desconhecida, mas análises do branco analítico da amostra por LC-MS/MS apresentaram valor médio de $4,83 \text{ mg L}^{-1}$ do analito. Assim, a determinação de cafeína em amostra de esgoto por LC-MS/MS nas condições previamente propostas mostrou confiabilidade no modelo proposto para faixa linear de trabalho considerada.

3.5.4 Comparação entre os resultados obtidos para amostras de energético, esgoto e medicamentos.

A partir da curva analítica da D.O. da cafeína em água ultrapura, secção 3.3, foi possível otimizar as condições de análise para aplicar o método de estudo proposto às amostras de energético, medicamentos e esgoto obtendo curvas analíticas referentes cada amostra e avaliar as figuras de mérito do método utilizado.

As soluções diluídas de cada amostra foram preparada em $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de cafeína, e fortificadas com solução de cafeína para obtenção das respectivas curvas analíticas no dispositivo para uma faixa linear de 100 a 500 mg L^{-1} . O medicamento 1 também foi avaliado para tal faixa de concentração, mas apresentou linearidade entre 100 a 300 mg L^{-1} .

A Figura 20 apresenta as curvas analíticas da D.O. obtidas para presença de cafeína em tais amostras pelo método de estudo a partir do dispositivo proposto.

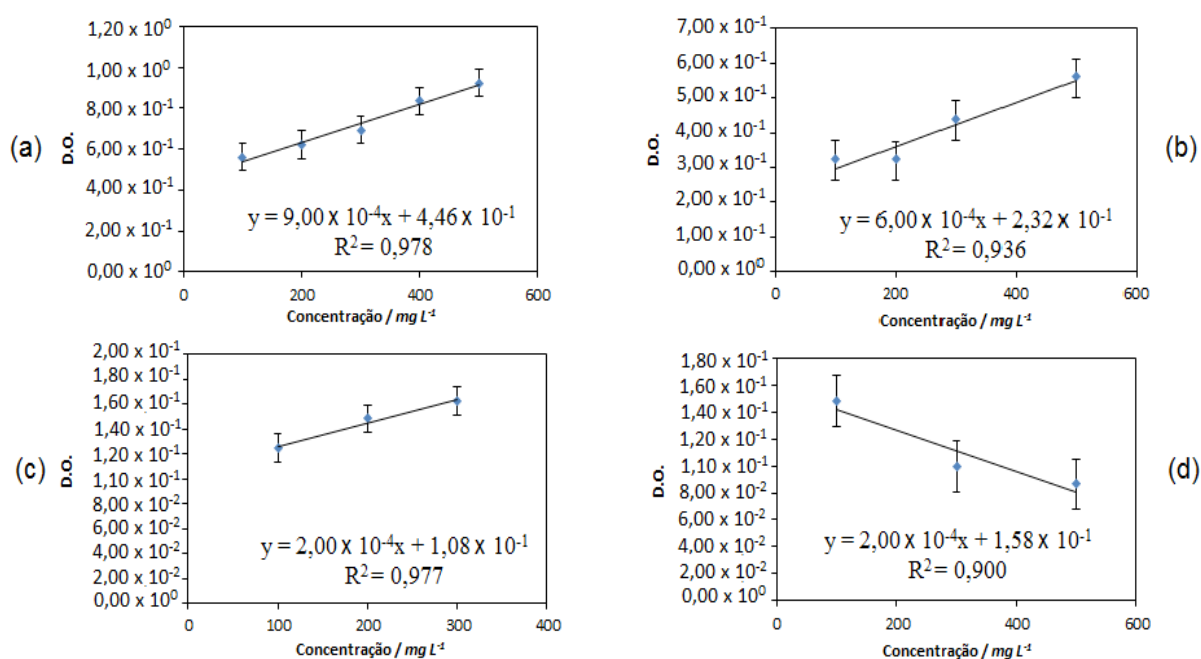


Figura 20 – Curvas analíticas da D.O. em função da concentração de cafeína para método colorimétrico em amostras de (a) energético entre 100 a 500 mg L^{-1} , (b) esgoto entre 100 a 500 mg L^{-1} , (c) medicamento 1 entre 100 a 300 mg L^{-1} e (d) medicamento 2 entre 100 a 500 mg L^{-1} , por celular.

Fonte: autor, 2018.

Os dados obtidos para as amostras de energético, esgoto e medicamento 1 mostraram possível linearidade ao método proposto com valores de R^2 maiores a 0,936 para uma faixa linear de 100 a 500 mg L^{-1} para o energético e o esgoto.

A relação linear obtida para o medicamento 1 apresenta apenas 3 pontos realizados em triplicatas em uma faixa de 100 a 300 mg L⁻¹ para o medicamento 1. Embora o número mínimo de 5 pontos seja exigido pelas diretrizes consideradas nas etapas de validação do presente trabalho, a elevada sensibilidade do método proposto e a ampla faixa linear obtida impossibilitam acréscimos de mais pontos. A variação da D.O. para valores de concentração entre os pontos apresentados não permitem variação significativa e pontos abaixo de 100 ou acima de 300 mg L⁻¹ implicam em perda de linearidade.

O método proposto para o medicamento 2 indicou comportamento não coerente com o método proposto. Mesmo usando uma faixa de trabalho mais estreita ou com menor número de pontos, esse problema pôde ser atribuído a limitação do próprio método proposto frente a complexidade da matriz analisada composta por excipientes (amido, hipromelose e triacetina) que são possíveis interferentes nessa análise.

A resposta analítica de cor vermelha, obtida após a reação ocorrer, foi observada para concentração mínima de cafeína em 100 mg L⁻¹ com variação de intensidade de sinal (D.O.) significativa com relação ao branco analítico. O LOQ obtido para os respectivos métodos de amostras estudadas foi de 100 mg L⁻¹ e o LOD 30,0 mg L⁻¹.

A Tabela 8 apresenta as figuras de mérito obtidas para o método aplicado à determinação de cafeína em matrizes aquosa, de energético, esgoto e medicamento 1 para o método referência e para o dispositivo.

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.

Parâmetros	Água ultrapura		Energético	Esgoto	Med 1
	LC-MS/MS	DC	DC	DC	DC
Faixa linear (mg L ⁻¹)	3,33 – 333	100 – 500	100 – 500	100 – 500	100 – 300
LOQ (mg L ⁻¹)	3,33	100	100	100	100
LOD (mg L ⁻¹)	1,00	30,0	30,0	30,0	30,0
DPR intradia (%)	0,750 – 22,3	0,0800 – 0,760	3,13 – 10,4	1,24 – 7,24	1,16 – 4,56
Sensibilidade	7,25 x 10 ⁻⁴	1,00 x 10 ⁻⁴	9,00 x 10 ⁻⁴	6,00 x 10 ⁻⁴	2,00 x 10 ⁻⁴
Coefficiente linear	5,26 x 10 ⁻⁵	3,00 x 10 ⁻⁴	4,46 x 10 ⁻¹	2,32 x 10 ⁻¹	1,08 x 10 ⁻¹
R ²	0,979	0,945	0,978	0,936	0,977

Fonte: autor, 2018.

O LOQ e LOD obtidos para o método referência em água foram em aproximadamente 30 vezes menores do que aqueles obtidos para o método proposto para dispositivo em água e também para as amostras. Ainda que hajam limitações a serem reavaliadas, dentre as quatro amostras consideradas, 75,0 % sugerem ajuste ao método desenvolvido para o dispositivo, com valores de R^2 maiores a 0,936 assim como obtido para o método referência. A precisão obtida para as amostras foi próxima a 10,0 %.

Não foi possível usar a curva analítica da água ultrapura para determinação da concentração da cafeína presente nas amostras em virtude do efeito de matriz presente nas amostras ser significativo. O efeito de matriz foi avaliado para a curva analítica do solvente puro (nesse caso, água ultrapura) com relação a cada matriz estudada pela relação entre os coeficientes angulares obtidos por elas, como descrito por Pinho e colaboradores³⁸. O cálculo para determinar o efeito matriz é apresentado pela Equação 6.

Equação 6

$$\%efeito\ matriz = \frac{(\delta_{matriz} - \delta_{solvente})}{\delta_{solvente}} \times 100$$

Onde δ é o coeficiente angular da curva de calibração.

O efeito de matriz foi superior a 100 % para as amostras de energético e esgoto, sendo menos pronunciada para este. O medicamento 1 apresentou 100 % de efeito de matriz, sendo o menor valor obtido.

O efeito de matriz observado nas amostras de energético, esgoto e do medicamento 1 aplicadas ao método proposto foi significativo, embora as amostras tenham sido consideravelmente diluídas para a análise. O medicamento 1 apresentou melhor resultado ainda que para efeito de matriz em 100 %, de modo que a medida que a complexidade da amostras aumenta o erro é acentuado. A elevada concentração de açúcares na amostra de energético é uma consideração relevante que justifica os maiores valores de efeito matriz observados nesse estudo.

Assim, a curva proveniente de cada matriz foi utilizada para os cálculos, a fim de melhorar a precisão e exatidão.

A Figura 21 apresenta a curva analítica de cada matriz considerada e no solvente para melhor visualização da resposta ao efeito matriz observado.

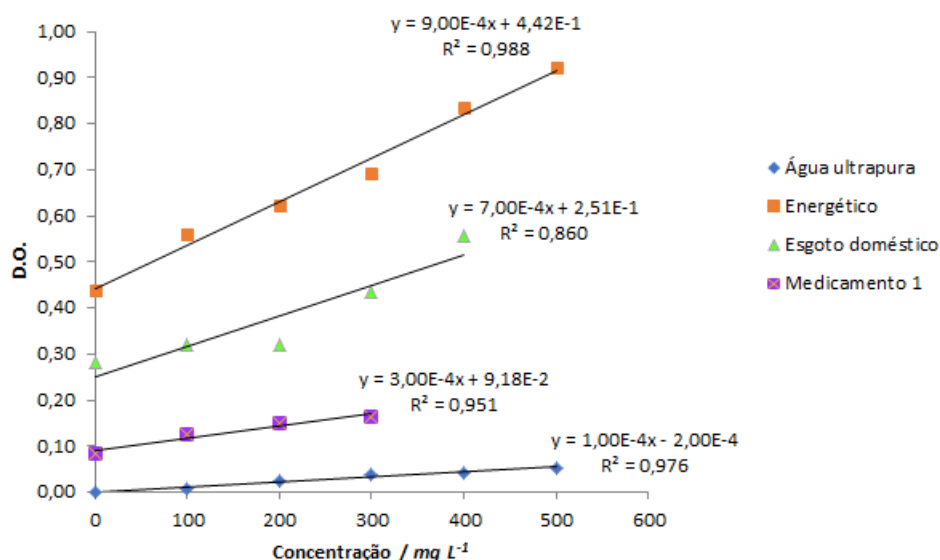


Figura 21 – Efeito de matriz avaliado pela relação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas das amostras de energético, esgoto e medicamento 1 em comparação com a curva da água ultrapura.

Fonte: autor, 2018.

A disposição das curvas analíticas referentes as amostras de energético e esgoto aplicadas ao método desenvolvido para dispositivo em água ultrapura mostrou que há efeito de matriz pronunciado para amostras consideradas. A amostra do medicamento 1, que apresentou menor efeito de matriz, tem seus valores de concentração experimental ($C_{\text{exp } 300}$) mais próximos do valor de concentração teórico ($C_{\text{teórico}}$), como esperado.

A utilização da curva analítica obtida para o medicamento 1 é uma alternativa analítica que pode ser adotada como modelo para determinação de cafeína nessa mesma matriz. O mesmo pode ser adotado para as respectivas amostras de energético e esgoto.

A partir de valores de D.O. obtidos em análise interdita e utilizando as respectivas curvas analíticas de cada matriz, como modelo analítico obteve-se uma resposta analítica em concordância ao esperado, Tabela 9.

Tabela 9 – Comparação entre as concentrações experimentais intradia e interdia 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.

Matriz	Curva analítica	R ²	C ₃₀₀ (mg L ⁻¹) intradia	C ₃₀₀ (mg L ⁻¹) interdia
Energético	$y = 9,00 \times 10^{-4} x + 4,46 \times 10^{-1}$	0,978	324 + 0,0125	235 - 0,260
Esgoto	$y = 6,00 \times 10^{-4} x + 2,32 \times 10^{-1}$	0,936	362 + 0,190	381 + 0,250
Medicamento 1	$y = 2,00 \times 10^{-4} x + 1,08 \times 10^{-1}$	0,977	277 - 0,800	302 + 0,00600

Fonte: autor, 2018.

A concentração de 300 mg L⁻¹ de cafeína foi considerada para comparação entre as concentrações obtidas intradia e interdia. A concentração teórica (C_{teórica}) do energético é de 320 mg L⁻¹, a concentração obtida para do energético foi de 324 mg L⁻¹ com erro relativo de + 1,25 % para medidas intradia e de 235 mg L⁻¹ com erro relativo de - 26,0 %.

A concentração de cafeína determinada no esgoto foi de 4,83 mg L⁻¹ determinado por LC-MS/MS, sendo fortificado para obter uma C_{teórica} estimada em 305 mg L⁻¹. A concentração obtida para C₃₀₀ do energético foi de 362 mg L⁻¹ com erro relativo de + 16,0 % para medidas intradia e de 381 mg L⁻¹ com erro relativo de + 25,0 % para interdia.

O medicamento 1 teve valor de C_{teórico} de 300 mg L⁻¹, sendo obtidos C₃₀₀ de 277 mg L⁻¹ com erro relativo de - 8,00 % para medidas intradia e de 302 mg L⁻¹ com erro relativo inferior a 1,00 % ao interdia.

3.6 Comparação dos resultados obtidos no presente estudo colorimétrico com aqueles apresentados na literatura

Em pesquisa realizada na base de dados multidisciplinares Scopus até a data de 30/07/2018 foram encontrados artigos que usam reação colorimétrica como alternativa analítica para determinação de analitos por aquisição de imagem. O modo de busca foi selecionado para “título, abstract e palavras chave” e as palavras “caffeine, colorimetric, smartphone” foram pesquisadas não sendo encontrados artigos no resultado dessa busca. Isso faz do presente estudo de determinação de cafeína em matrizes aquosas utilizando colorimetria como resposta analítica via celular um trabalho inovador e inédito, nessas condições.

A aplicação de colorimetria para desenvolvimento de testes rápidos e de baixo custo na determinação de analitos tem se tornado um atrativo às análises químicas. Deng e colaboradores usaram resposta colorimétrica para detecção de cafeína em amostras de alimentos, utilizando nanopartículas de prata (AgNPs) e polímeros moleculares magnéticos impressos (MMPIs)³⁹. Recentemente, Zhang e colaboradores desenvolveram um dispositivo para determinação de nitrito a base de papel com aplicabilidade em ambiente, alimentos e sistema fisiológico³⁷. O método conta com reação de resposta colorimétrica para esse analito e detecção de sinal via celular⁴⁰. A Tabela 10 apresenta uma comparação entre os principais parâmetros analíticos obtidos no presente estudo com relação aqueles encontrados na literatura.

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.

Parâmetros analíticos	Deng e colaboradores	Zhang e colaboradores	Presente estudo
Faixa linear (mg L ⁻¹)	0 – 5,00	0 – 1,00	100 – 500
LOD (mg L ⁻¹)	> 5,00	7,30 x 10 ⁻²	30,0
Analito	Cafeína	Nitrito	Cafeína
Suporte	AgNPs e MMPIs	Papel	Placa de porcelana

Fonte: autor, 2018.

Em comparação com a estreita faixa linear obtida para nitrito, a partir da literatura, pode-se atribuir vantagem ao método apresentado para cafeína. A faixa linear obtida para cafeína é relativamente ampla conferindo vantagem analítica ao método, embora o valor de LOD em 30,0 mg L⁻¹ ainda seja significativo.

A determinação de nitritos por reação colorimétrica é bem consolidada em comparação aquelas conhecidas à compostos orgânicos, como a cafeína. Na literatura há poucos relatos de reações colorimétricas para compostos orgânicos, dentre eles, destacando fármacos sendo esta uma importante vantagem analítica do método proposto ao dispositivo miniaturizado.

O método colorimétrico desenvolvido e validado nesse estudo apresentou precisão ao modelo adotado para determinação de cafeína em amostras complexas, atendendo as diretrizes nacionais e internacionais de validação. Embora limitações quanto a influência da variação da temperatura na coloração e também na concentração dos dois produtos majoritários formados tenham sido observadas, a

resposta analítica obtida após a etapa de aquisição da imagem não foi significativamente comprometida em termos de repetibilidade.

4. CONCLUSÃO

A utilização de reações envolvendo resposta colorimétrica tem sido uma alternativa analítica praticada com aplicações à diversos compostos. A vasta quantidade de compostos orgânicos relatada também dificulta estudos mais detalhados dessas possibilidade reacionais, não sendo uma tarefa simples e rápida encontrar uma reação que forneça a resposta analítica desejada.

O uso do LC-MS/MS como método de referência permitiu observar a formação dos produtos majoritários da reação colorimétrica, de modo que a utilização dessa técnica mostrou-se interessante do ponto de vista do estudo da reação utilizada em função da relação concentração de cafeína. A utilização dessa técnica permite o estudo da cinética da reação e de sua eficiência ao reagir cafeína presente em amostras de com composição complexa, sob as condições experimentais previamente estabelecidas.

O dispositivo miniaturizado proposto mostrou-se, então, uma alternativa analítica de baixo custo e com resposta rápida com precisão e exatidão. Sua aplicabilidade não se limita apenas a determinação de cafeína em um único tipo de amostras, mas também pode ser aplicada a diferentes matrizes.

O dispositivo desenvolvido pode ser viável para aplicação em amostras aquosas aplicadas em estudos de ecotoxicidade, usando o zebrafish, sendo um método rápido e de baixo custo.

Como alternativa para análise de matrizes complexas pelo método colorimétrico proposto, a etapa de preparo de amostra e pré-concentração deve ser considerada com a finalidade de melhorar ainda mais a precisão e exatidão do método proposto.

Capítulo 3

Dispositivo Fluorimétrico

Capítulo 3: Reação Fluorimétrica

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Otimizar os parâmetros reacionais (pH, volume de soluções, concentração de fluoróforo, tempo de reação, luminosidade, etc.) para que as melhores condições resultassem em uma resposta analítica.
- ✓ Propor e avaliar os tipos de materiais poliméricos a serem utilizados para a fabricação dos dispositivos impressos pela técnica de manufatura 3D.
- ✓ Ajustar as melhores condições do celular para garantir confiabilidade dos dados analíticos obtidos a partir das imagens adquiridas e tratadas.
- ✓ Validar o método no dispositivo portátil e no espectrofluorímetro como referência.
- ✓ Aplicar os métodos desenvolvidos em amostras que contêm cafeína em sua composição, como esgoto, medicamentos e bebidas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Padrões e reagentes utilizados

Os padrões de cafeína (MM 194,19 g mol⁻¹, CAS 58-08-2) e HPTS (MM 524,39 g mol⁻¹, CAS 6358-69-6) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. A partir do padrão de cafeína foram preparadas soluções estoque na concentração de 2000 mg L⁻¹ em água. Em concordância com o objetivo desse estudo, em determinar cafeína em matriz de águas residuárias, foi preparada uma solução que mimetiza a composição do esgoto sanitário (*lab-made*), cujos componentes (celulose, sacarose, amido, extrato de carne, bicarbonato de sódio e os sais NaCl, MgCl₂ e CaCl₂ foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. O surfactante utilizado na composição do *lab-made* foi um detergente comercial marca Ypê® neutro e óleo de soja marca Soya®. De maneira análoga ao procedimento descrito, a partir do padrão de cafeína foram preparadas soluções estoque de cafeína na concentração de 2000 mg L⁻¹ em *lab-*

made. A solução estoque de HPTS $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada adicionando uma massa do padrão à solução tampão de fosfato de potássio $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,3. A solução tampão foi preparada a partir de soluções aquosas $1,00 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4 , MM 136,09 g mol^{-1} , CAS 7778-77-0, Sigma-Aldrich®) e dibásico ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, MM 174,18 g mol^{-1} , CAS 7758-11-4, Sigma-Aldrich®). A partir da solução estoque, soluções diluídas em tampão foram obtidas nas concentrações de 50,0 e $0,300 \mu\text{mol L}^{-1}$ e utilizadas para reagir com a amostra de cafeína. As soluções de trabalho em água foram preparadas semanalmente e armazenadas em frasco âmbar e estocadas entre 6 e 10°C .

As soluções em *lab-made* foram preparadas para uso imediato devido a sua rápida degradação por hidrólise do amido.

As soluções estoque dos padrões utilizados nesse estudo foram preparadas com água Milli-Q (Synthesis MILLIPORE). As pesagens foram feitas com auxílio de uma balança analítica devidamente calibrada (Shimadzu, AUX220).

2.2 Preparo das soluções

As soluções de cafeína estoque foram preparadas na concentração de 2000 mg L^{-1} em água ultrapura e também em meio *lab-made*. A partir dessas soluções foram preparadas soluções diluídas de acordo com a necessidade analítica. Para análises realizadas no espectrofluorímetro, as diluições foram feitas na própria cubeta de análise com auxílio de pipetas automáticas visando sempre minimizar os possíveis erros experimentais.

O preparo da água residuária *lab-made* apresenta sua composição detalhada na Tabela 11. As concentrações referentes a cada composto foram adaptadas de Martins e colaboradores⁴¹.

Tabela 11 – Componentes do esgoto *lab-made* e suas respectivas concentrações.

Componentes	Concentração
Celulose*	47,0 mg L ⁻¹
Sacarose*	98,0 mg L ⁻¹
Amido*	149 mg L ⁻¹
Extrato de carne*	262 mg L ⁻¹
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)*	370 mg L ⁻¹
Solução de sais (NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂)*	1,00 mL L ⁻¹
Surfactante	1,00 mL L ⁻¹
Óleo de soja	79,0 µL L ⁻¹

Fonte: adaptado de Martins e colaboradores⁴¹

As soluções de surfactante e de sais foram previamente preparadas. O surfactante foisolubilizado em meio aquoso sob aquecimento brando e agitação manual. Os sais de NaCl, MgCl₂ e CaCl₂ foram pesados e solubilizados em água ultrapura. Os demais componentes descritos na Tabela 11 foram pesados e solubilizados em água corrente. O extrato de carne foi previamente submetido a aquecimento brando e manualmente agitado para sua completa solubilização em volume suficiente de água corrente.

A solução estoque tampão de fosfato de potássio 0,100 mol L⁻¹, pH 6,3 e 100 µmol L⁻¹ de HPTS foi preparada a partir das soluções aquosas 1,00 mol L⁻¹ de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e dibásico (K₂HPO₄ · 3H₂O) e o pH de 6,30 foi aferido com auxílio de um pHmetro (Gehaka, PG 1800) previamente calibrado. Essa solução foi utilizada para análises realizadas pelo dispositivo portátil proposto nesse estudo.

As análises realizadas no método fluorimétrico de referência no Shimadzu RF-1501 exigiram o preparo de soluções diluídas à concentração de 0,600 µmol L⁻¹ de HPTS em tampão de fosfato, preparadas a partir de alíquota de 600 µL da solução estoque para um volume de 100 mL de solução tampão sem HPTS.

2.3 A reação entre cafeína e o HPTS

O corante fluorescente HPTS 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 complexo com propriedades fluorescentes e de possível detecção na região do UV-VIS, segundo Rochat e colaboradores¹⁹. Em uma avaliação prévia, a viabilidade da reação foi estudada com base em uma resposta analítica visual proveniente da

interação entre volumes iguais da solução aquosa de cafeína 1000 mg L^{-1} e da solução tampão de HPTS $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ tendo como suporte um *spot-test* de uma placa de PLA impresso em manufatura 3D. O sistema foi irradiado por uma fonte RGB de cor azul provida de comprimento de onda em torno de 460 nm , ideal para excitar a espécie fluorófora (HPTS) presente no meio. Em minutos foi possível observar variação na intensidade de fluorescência emitida pelas gotas de cada *spot* do suporte reacional, sendo um fator motivacional para seguir o estudo com base nessa reação.

2.4 Instrumentação e condições analíticas

2.4.1 O dispositivo fluorimétrico (DF) portátil proposto

O sistema portátil para análise de cafeína em matrizes aquosas foi desenvolvido e impresso em impressora 3D para análises das reações de decaimento de fluorescência em volumes reduzidos de amostra. A estrutura externa do corpo do dispositivo foi impressa em PLA preto. A estrutura externa do dispositivo composta por duas seções cúbicas com dimensões $(45,0 \times 50,0 \times 50,0) \text{ mm}$ cada: seção superior possui um orifício circular ($30,0 \text{ mm}$ de diâmetro) que se ajusta fixamente ao celular e direciona a região de interesse a ser capturada na imagem. A seção inferior aloja o suporte da cubeta e sustenta a fibra óptica e a fonte luminosa de LED. A Figura 22 apresenta de maneira representativa o dispositivo portátil proposto e uma visão interior da seção inferior.

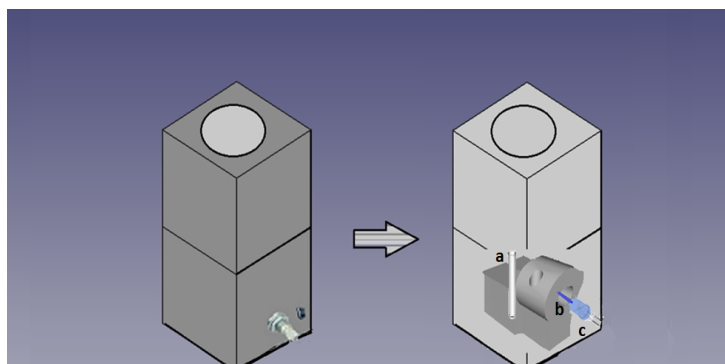


Figura 22 – Representação esquemática do dispositivo fluorimétrico (DF) e local para inserção do (a) *insert* contendo a amostra, (b) fibra óptica e (c) fonte luminosa LED azul.

Fonte: autor, (FreeCad) Software versão 0.16 (© 2016 – 2018 FreeCad)

Um *insert* foi utilizado como cubeta analítica para esse sistema. Uma fibra óptica nas dimensões (1,00 × 20,0) mm foi utilizada para direcionar a luz gerada pela fonte de diodo emissor de luz (LED) azul até a parede da cubeta. O núcleo da fibra é composto por metacrilato de metilo (PMMA) com índice de refração de 1,49 e poliestireno (PS) com 1,59.

Esses polímeros conferem flexibilidade e robustez ao material e excelente transmissão de dados por toda extensão da fibra a um baixo custo. O feixe de luz foi transmitido pelo núcleo da fibra e direcionando ao *insert* e ao penetrar pelo vidro se estendeu por todo caminho óptico desse, contendo a amostra reacional. O LED azul de alto brilho (OVLGB0CxB9, OPTEK Technology) apresenta banda espectral de emissão relativamente estreita de 468 a 470 nm, que varia com a temperatura do ambiente. As análises foram realizadas a temperatura em torno de 25 °C e portanto o λ_{EM} do LED foi de aproximadamente 470 nm. A Figura 23 apresenta os componentes do dispositivo.

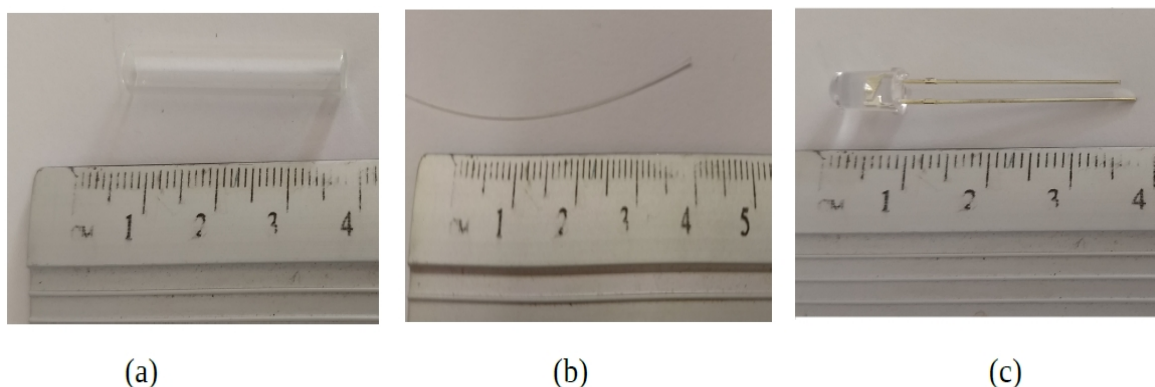


Figura 23 – Componentes do sistema dispositivo fluorimétrico (DF): (a) *insert*, (b) fibra óptica e (c) LED.

Fonte: autor, 2018.

O LED foi conectado a um sistema de microcontrolador Arduino Nano (Atmega 328, Arduino, USA). Um resistor regulável (potenciômetro) de 100 k Ω que divide a tensão do sistema foi utilizado para controle da intensidade de radiação do sistema. O circuito contou com uma resistência de 100 Ω . O sistema foi alimentado por um cabo OTG que conecta o arduino ao celular Motorola Moto G5 Plus, câmera 12 MP, de modo que a própria bateria do celular é utilizada como fonte de energia. A Figura 24 apresenta o circuito do dispositivo com seus respectivos componentes.

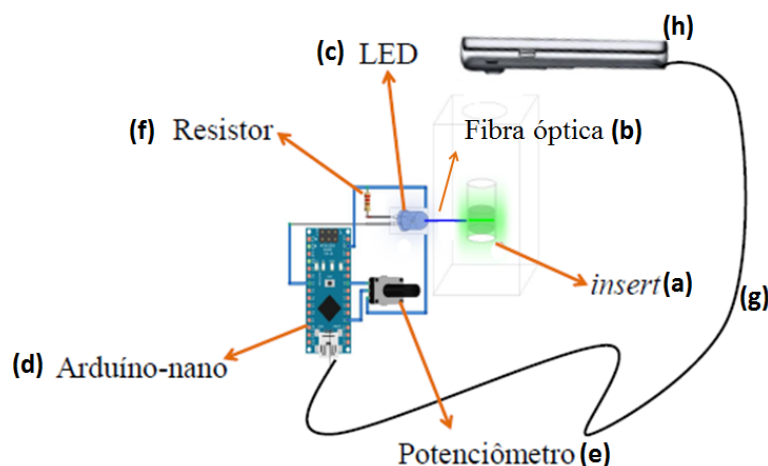


Figura 24 – Representação esquemática do circuito do dispositivo fluorimétrico (DF) e seus componentes: (a) *insert*, (b) fibra óptica, (c) LED, (d) microcontrolador arduino nano, (e) potenciômetro, (f) resistor, (g) cabo OTG e (h) celular.

Fonte: Cedida por Juliano Passaretti Filho e adaptada, 2018

O celular foi disposto paralelamente ao feixe de excitação do dispositivo para que o ângulo formado entre a captura da imagem em relação ao feixe luminoso que atravessa a cubeta fosse de 90° . O fenômeno de decaimento de fluorescência ocorre em todas as direções, porém é melhor observada quando medida perpendicularmente ao feixe incidente por minimizar as contribuições do espalhamento da radiação em amostras aquosas.

A partir do protocolo proposto para o método de referência, que será exposto em seção 2.4.4, foram feitas adaptações para transpor as limitações analíticas intrínsecas da redução de escala do sistema analítico. Os volumes das soluções foram reduzidos a $50,0 \mu\text{L}$ de solução de cafeína e o mesmo para a solução tampão com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ do fluoróforo, totalizando $100 \mu\text{L}$ finais. A reação passou a ocorrer em um *insert* (ID 24701, SUPELCO, Sigma-Aldrich®) de fundo plano, com capacidade máxima para $300 \mu\text{L}$ nas dimensões de $(5,00 \times 31,0) \text{ mm}$, fabricado em vidro e poliuretano. O tempo de reação foi mantido em 4,00 minutos.

2.4.2 Aquisição da imagem

A etapa de aquisição da imagem foi realizada usando celular Motorola Moto G5 Plus, câmera 12 MP. Para isso, a imagem da região circular superficial da amostra dentro do *insert* foi capturada para posterior tratamento da imagem. A Figura 25 apresenta uma representação esquemática da forma como foi feita a aquisição da imagem.

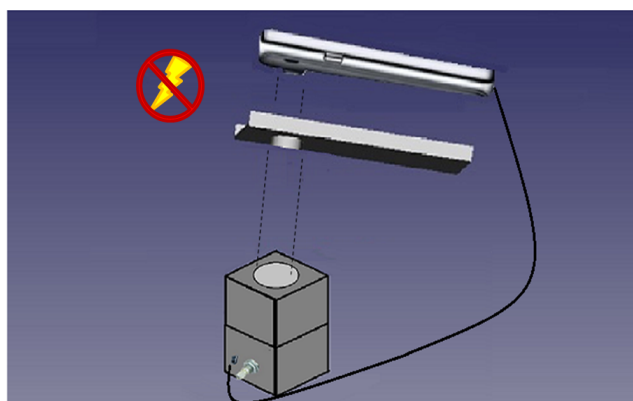


Figura 25 – Representação esquemática do sistema de aquisição da imagem usando o dispositivo fluorimétrico (DF) acoplado ao celular.

Fonte: autor, (FreeCad) Software versão 0.16 (© 2016 – 2018 FreeCad)

As configurações de *flash*, filtros, ajustes de escala e em especial o modo de captura que definem a câmera do celular foram manualmente ajustadas. O aplicativo de celular OpenCamera (versão 1.40) também foi utilizado nessa etapa e os parâmetros ajustados são descritos pela Tabela 1, exceto o *flash* que foi alterado para desligado.

2.4.3 Processamento da imagem

Essa etapa foi realizada de maneira análoga ao descrito para a reação colorimétrica. O software ImageJ (versão 1.50i, National Institutes of Health, USA) foi utilizado e a imagem capturada pelo OpenCamera é agora convertida em um sistema de cores luminosas RGB (*Red*, *Green* e *Blue*). O procedimento é análogo ao já descrito pelo método colorimétrico na seção 2.3.3 do Capítulo 2.

2.4.4 Método referência: Espectrofluorímetro

Um método de referência foi desenvolvido em um espectrofluorímetro (RF-1501, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). O volume de 1500 μL de solução contendo cafeína em distintas concentrações reagiram com o mesmo volume da solução tampão de 0,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do fluoróforo. A solução reacional foi homogeneizada e a reação ocorreu na própria cubeta analítica de quartzo (Kasvi, faces polidas, 45,0 $\times$ 12,5 $\times$ 12,5 mm e 1,25 mm de espessura de parede) em um volume total de 3000 μL . A Tabela 12 apresenta os parâmetros de operação do equipamento.

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 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HPTS).

Parâmetros analíticos	Definição
Aquisição dados	Quantitativo
Faixa de varredura	480 - 700 nm
$\lambda_{\text{Emissão}}$	509 nm
$\lambda_{\text{Excitação}}$	460 nm
Fenda excitação	10 nm
Fenda emissão	10 nm
Sensibilidade	Alta

Fonte: autor, 2018.

As análises em método de referência foram analisadas para concentrações de cafeína em água ultrapura de 100 a 700 mg L^{-1} e em *lab-made* de 60 a 1300 mg L^{-1} . Inicialmente as análises foram realizadas no modo *spectrum* para $\lambda_{\text{emissão}}$ de 460 nm fornecendo informações importantes sobre o perfil analítico da relação entre intensidade de fluorescência (IF) e o comprimento de onda (λ) de 480 a 650 nm.

2.5 Aplicação do método desenvolvido em amostras de energético, esgoto e medicamentos

As condições analíticas e instrumentais estabelecidas previamente foram aplicadas para amostras de bebida energética (Red Bull®), medicamentos que contêm cafeína em sua composição (medicamento 1: Doril® e medicamento 2:

Melhoral®) e esgoto. O efeito de interferência de matriz foi avaliado e as amostras foram diluídas para reduzir o comprometimento da resposta analítica para o método de referência e portátil.

As concentrações de cafeína nas amostras diluídas estavam abaixo do limite de quantificação (LOQ 100 mg L⁻¹) em água e (LOQ 60 mg L⁻¹) *lab-made* dos métodos de referência do dispositivo proposto (LOQ 100 mg L⁻¹ para água e *lab-made*), de modo que foi necessário a fortificação das amostras a partir das soluções estoque previamente preparadas. A fortificação da amostra foi feita na cubeta dentro do volume de 1500 µL de amostra no fluorímetro e dentro do *insert* para 50,0 µL de amostra no dispositivo fluorimétrico portátil proposto.

2.5.1 Amostra de bebida energética

Determinadas as condições de análise do espectrofluorímetro Shimadzu-1501, seção 2.4.4 uma avaliação prévia da sua resposta analítica em tais condições foi realizada a partir de uma alíquota do energético na concentração de 320 mg L⁻¹, como fornecido pelo fabricante. A intensidade de fluorescência (IF) referente a alíquota do energético sem diluição não se enquadrou na faixa linear de trabalho do equipamento, de modo que a amostra foi diluída em água ultrapura até que se adequasse a confiabilidade do equipamento.

A reação entre as amostras diluídas do energético (100 a 1200 mg L⁻¹) e a solução tampão de HPTS em 0,300 µmol L⁻¹ ocorreu em volumes iguais de 1500 µL cada em uma cubeta de quartzo. A resposta fluorimétrica foi obtida após 4,00 minutos a partir da mistura para que a reação tivesse tempo de ocorrer.

O procedimento análogo foi realizado para o dispositivo portátil proposto em que a concentração ideal da amostra do energético foi ajustada à faixa linear do dispositivo através de diluições do conteúdo referência descrito na embalagem. A reação entre as amostras diluídas de energético (100 a 600 mg L⁻¹) e a solução tampão de HPTS em 100 µmol L⁻¹ ocorreu em volumes iguais de 50,0 µL cada em um *insert*.

2.5.2 Amostra de medicamentos

As informações fornecidas pelos seus respectivos bulários e o procedimento de solubilização dos comprimidos foram realizados de maneira análoga ao descrito na seção 2.4.2 do Capítulo 2, para o método colorimétrico.

O espectrofluorímetro Shimadzu-1501 foi condicionado como descrito na seção 2.4.4 e uma avaliação prévia da sua resposta analítica em tais condições foi realizada a partir de uma alíquota de 3000 μL da solução estoque de 300 mg L^{-1} de concentração de cafeína em cada medicamento.

O método portátil foi avaliado para concentrações entre 100 a 600 mg L^{-1} de cafeína, sendo necessário o preparo de uma solução diluída em 1,00 mg L^{-1} e fortificação dessa por cafeína.

2.5.3 Amostra de esgoto

O procedimento de coleta, armazenamento e análise da amostra de esgoto coletada na região urbana da cidade de São Carlos – SP foi análogo ao descrito pela seção 2.4.3 do Capítulo 2 para análises colorimétricas.

Devido a sua complexidade, a amostra de esgoto foi previamente filtrada e uma solução diluída para 0,018 mg L^{-1} foi preparada para minimizar o efeito de matriz. Essa solução foi fortificada com solução de cafeína em diferentes concentrações para um estudo da viabilidade da reação entre 100 e 600 mg L^{-1} do analito para o método proposto.

2.6 Validação dos métodos propostos

A validação foi feita seguindo a diretiva do Instituto nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), com base nos documentos necessários para acreditação (DOQ-CGCRE-008 – Rev, 06 – Nov/17). Os métodos propostos nesse estudo foram validados segundo parâmetros de precisão, limite de quantificação, limite de detecção, sensibilidade e linearidade. Esses parâmetros foram previamente descritos na seção 2.5 do Capítulo 2 para o método colorimétrico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Considerações sobre a reação fluorimétrica

O modelo cinético de Stern-Volmer^{42,43} é utilizado para descrever o processo de supressão dinâmica da luminescência ao considerar que esse processo depende da colisão mútua entre a molécula excitada M^* (HPTS) e a supressora Q (cafeína), Reação 1.

Reação 1 – Esquema de reação representativo entre a molécula excitada e o supressor.



O efeito observado é a redução da intensidade de emissão luminescente (IF) em relação à intensidade de fluorescência obtida pela ausência de cafeína (IF_0). A Equação 7 descreve as condições descritas para o modelo de Stern-Volmer desconsiderando a resolução temporal. O coeficiente angular é a constante de Stern-Volmer (K_{SV}).

Equação 7

$$IF_0/IF = 1 + K_{sv}[Q]$$

A relação linear entre razão de fluorescência (IF_0/IF) em função da concentração de cafeína mostrou-se adequada a característica do modelo de Stern-Volmer, como será apresentado. O sinal analítico é dado pela razão intensidade do sinal da amostra pelo sinal do branco. Esse sinal correlaciona com a concentração de cafeína que permite extrair informações importantes do método desenvolvido, como linearidade, precisão, sensibilidade, LOQ, LOD dentre outros. A resposta analítica numérica obtida a partir do processamento da imagem do sistema de estudo miniaturizado permitiu a avaliação do método de maneira análoga aos dados obtidos convencionalmente por um equipamento referência. Assim, foi possível comparar tais parâmetros característicos de cada método e avaliar o desempenho do dispositivo proposto.

A medida que a concentração de cafeína aumenta ocorre redução da fluorescência (IF), isto é, um efeito de decaimento (*quenching*) de fluorescência. O mecanismo de efeito de supressão de sinal pode descrever um *quenching* estático. Um *quenching* dinâmico é caracterizado por rearranjos moleculares, processos de transferência de carga e de transferência de energia, isto é, quando ocorre transferência de energia não radiativa da espécie excitada para outras moléculas ou ainda pelo contato entre supressor e espécie excitada. A supressão estática de luminescência apresenta formação de complexo no estado fundamental do fluoróforo, onde há formação de um complexo não fluorescente entre supressor e fluoróforo no estado fundamental. A formação do produto reacional está sendo investigada por técnicas espectrométricas, mas resultados preliminares indicam que a reação entre a espécie fluorófora e a cafeína esteja formando um complexo de transferência de cargas. Essa hipótese está em concordância com resultados relatados por Rochat e colaboradores, o que caracteriza o processo de *quenching* de fluorescência dinâmico do presente estudo¹⁹.

3.2 Desenvolvimento do método referência – Shimadzu RF-1501

3.2.1 Avaliação da intensidade de fluorescência em água ultrapura e esgoto *lab-made*

A técnica de espectrofluorimetria foi utilizada para desenvolvimento de um método de referência para o presente estudo. O espectrofluorímetro Shimadzu RF-1501 foi utilizado para analisar amostras contendo concentrações de cafeína em água ultrapura obtendo-se linearidade para faixa de concentração de 100 a 700 mg L⁻¹. Inicialmente as análises foram realizadas no modo *spectrum* para $\lambda_{\text{emissão}}$ de 460 nm fornecendo informações importantes sobre o perfil analítico da relação entre intensidade de fluorescência (IF) e o comprimento de onda (λ) de 480 a 650 nm.

Uma vez determinado o perfil analítico para a reação em água ultrapura, estudos envolvendo esgoto *lab-made* foram realizados já que o método tem por finalidade ser aplicado em amostras de esgoto. A solução de cafeína em esgoto *lab-made* foi adicionada a cubeta e a reação ocorreu nas mesmas condições estabelecidas previamente.

A interferência de matriz foi avaliada de maneira comparativa entre os espectros de emissão em 460 nm para ambas as condições em concentrações de 0, 100, 220, 530 e 700 mg L⁻¹ de cafeína, como apresentado pela Figura 26. As condições experimentais, as concentrações de cafeína avaliadas bem como os parâmetros de operação do equipamento foram constantes em ambos os experimentos.

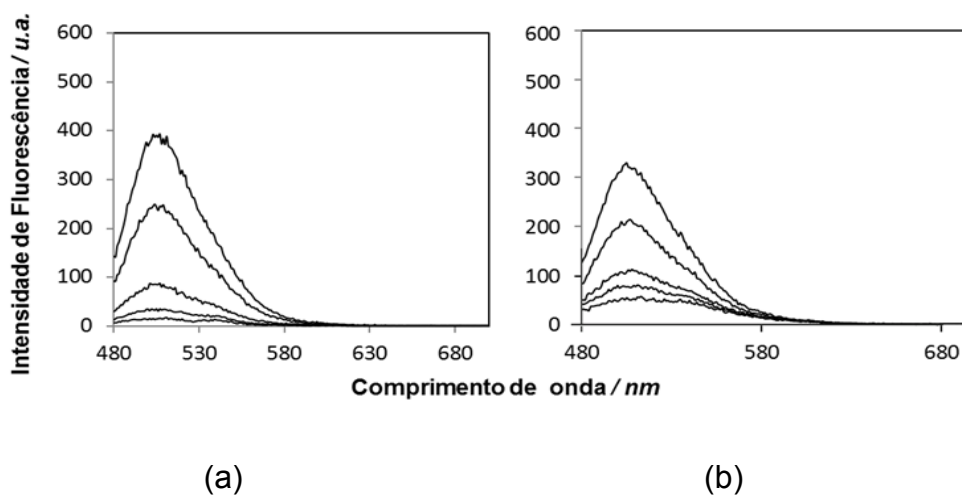


Figura 26 – Espectro de emissão em 460 nm obtidos pelo espectrofluorímetro RF-1501 para (a) solução de cafeína em (a) água ultrapura e (b) em esgoto *lab-made*.

Fonte: autor, 2018

Pôde-se observar que em esgoto *lab-made* houve supressão do sinal analítico em comparação com o perfil da água ultrapura. O perfil analítico é o mesmo em ambas situações, e para minimizar possível efeito de matriz da amostra de esgoto, o método foi desenvolvido em esgoto *lab-made*. O espectro de excitação para 460 nm apresentou maior sinal de emissão em 509 nm. A intensidade de fluorescência (IF) máxima foi observada próxima a valores de 400 u.a. para amostra de água ultrapura e 350 u.a. para amostra de esgoto *lab-made*, em 509 nm. A interação entre o HPTS e a cafeína foi expressiva, sendo observado decréscimo da intensidade de fluorescência a medida que a concentração de cafeína presente na amostra foi aumentada. O fluoróforo em questão mostrou-se uma alternativa potencial para a quantificação de cafeína em matriz aquosa a partir do decaimento de fluorescência a medida que o produto da reação é formado.

O método desenvolvido em água ultrapura foi considerado para aplicação de amostras de energético e medicamentos, enquanto que o método em *lab-made* foi

considerado para aplicação da amostra de esgoto coletado em região urbana, minimizando possível efeito de matriz da amostra.

3.2.2 Avaliação do tempo de reação

O tempo de reação foi avaliado em intervalos de 2,00 minutos numa escala de 0 a 10,0 minutos. A Figura 27 apresenta o resultado obtido entre a relação a razão de fluorescência (IF_0/IF) o tempo de reação em minutos.

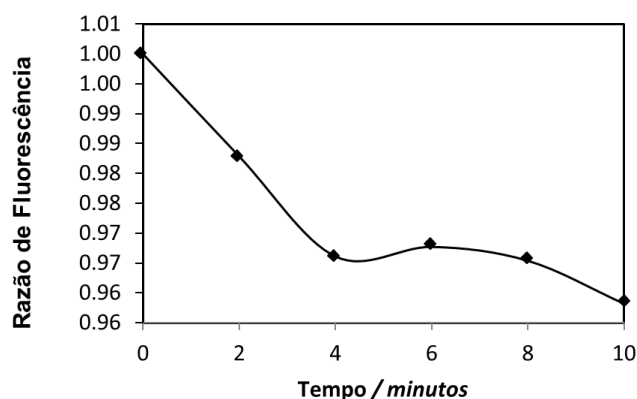


Figura 27 – Avaliação do tempo ideal de reação entre a cafeína (300 mg L^{-1}) e a solução tampão de fosfato ($0,100 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,30 e $0,600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de HPTS) a 25°C , em espectrofluorímetro RF-1501.

Fonte: autor, 2018.

A razão de fluorescência decresce linearmente de 1,00 a 4,00 minutos. A partir de 6,00 minutos a razão continua a diminuir, contudo de forma menos expressiva. O tempo reacional foi adotado como 4,00 minutos.

3.2.3 Validação do método de referência em água e *lab-made*

As condições operacionais do equipamento foram definidas como descrito na Tabela 12 da seção 2.4.4. Os valores de intensidade de fluorescência do branco da amostra (IF_0) e a intensidade de fluorescência (IF) de cada amostra contendo cafeína foram obtidos a partir da leitura feita pelo equipamento. A razão (IF_0/IF) foi determinada para cada concentração de cafeína avaliada e disposta em uma relação linear para valores de concentração de cafeína, Figura 28.

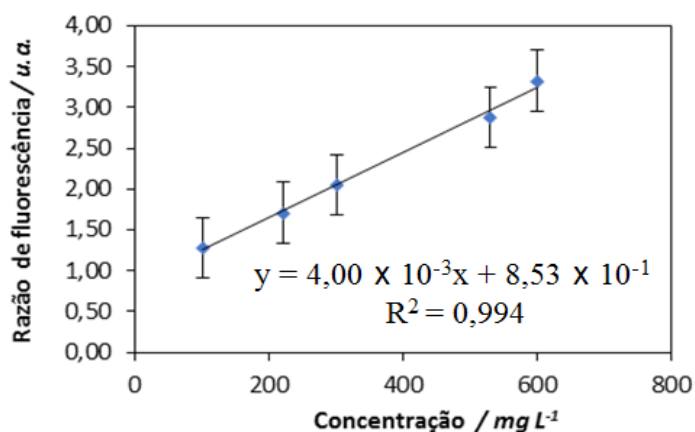


Figura 28 – Curva analítica da razão de fluorescência (IF_0/IF) em função da concentração da solução aquosa de cafeína entre 100 a 700 mg L⁻¹, em espectrofluorímetro RF-1501.

Fonte: autor, 2018.

A Equação 8 apresenta o sinal analítico da razão de fluorescência em relação a concentração de cafeína com coeficiente de determinação R^2 de 0,994.

Equação 8

$$y = 4,00 \times 10^{-3}x + 8,53 \times 10^{-1}$$

A razão de fluorescência (IF_0/IF) fornece a resposta analítica linear em relação as concentrações de cafeína para uma faixa linear de 100 a 700 mg L⁻¹ no método desenvolvido em água ultrapura. O LOQ do método foi de 100 mg L⁻¹ para cafeína e a partir desse valor sobre 3,33 foi determinado o LOD do método em 30,0 mg L⁻¹ de cafeína. A precisão intradia foi expressa pelo DPR entre 0,660 e 1,56 % e os valores interdia variaram entre 1,12 a 2,36 %.

De maneira análoga, o método desenvolvido em esgoto *lab-made* apresentou *quenching* de fluorescência para a relação entre a intensidade de fluorescência e a concentração de cafeína. A razão (IF_0/IF) foi determinada em função da concentração de cafeína em *lab-made*, Figura 29.

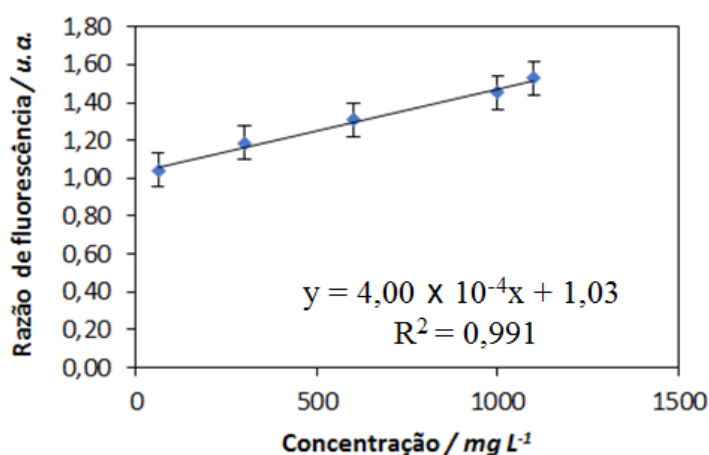


Figura 29 – Curva analítica da razão de fluorescência (IF_0/IF) em função da concentração da solução de cafeína em *lab-made*, entre 60 a 1300 mg L⁻¹, em espectrofluorímetro RF-1501.

Fonte: autor, 2018.

A Equação 9 apresenta o sinal analítico da razão de fluorescência em relação a concentração de cafeína, para R^2 de 0,991.

Equação 9

$$y = 4,00 \times 10^{-4}x + 1,03$$

A razão de fluorescência (IF_0/IF) fornece a resposta analítica linear em relação as concentrações de cafeína a partir da concentração de 60,0 mg L⁻¹, com faixa linear de 60 a 1300 mg L⁻¹. O LOQ do método foi de 60,0 mg L⁻¹ para cafeína. A partir desse valor sobre 3,33 foi determinado o LOD do método em 18,0 mg L⁻¹ de cafeína. O método apresentou precisão intradia entre 0,550 e 6,22 % e interdia entre 0,300 a 4,02 %.

As figuras de mérito do método desenvolvido em água ultrapura e *lab-made* para espectrofluorímetro são apresentadas na Tabela 13.

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 *lab-made* 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.

Parâmetros analíticos	Água ultrapura	Esgoto <i>lab-made</i>
Faixa linear (mg L ⁻¹)	100 – 700	60 – 1300
LOQ (mg L ⁻¹)	100	60
LOD (mg L ⁻¹)	30,0	18,0
DPR intradia (%)	0,660 – 1,56	0,550 – 6,22
DPR interdia (%)	1,12 – 2,36	0,300 – 4,02
Sensibilidade	4,00 × 10 ⁻³	4,00 × 10 ⁻⁴
Coeficiente linear	8,53 × 10 ⁻¹	1,03
R ²	0,994	0,991
Tempo da reação (minutos)	4,00	4,00

Fonte: autor, 2018.

O método desenvolvido no esgoto *lab-made* permitiu trabalhar com a faixa linearidade mais ampla do que o mesmo desenvolvido em água ultrapura, tendo ainda alguma vantagem sobre esse por apresentar LOQ de 60 mg L⁻¹ e LOD de 18,0 mg L⁻¹, isto é, valores menores do que obtidos para a água. A sensibilidade também apresentou vantagem com relação ao método em água, em uma ordem de grandeza a mais.

A princípio, o método desenvolvido em água foi considerado para aplicação de amostras de energético e medicamentos enquanto que o método em *lab-made* foi considerado para análises em esgoto, evitando possível efeito de matriz.

3.3 Desenvolvimento do método de estudo – Dispositivo fluorimétrico (DF)

A imagem capturada pela câmera do celular (amostra no *insert* dentro do dispositivo) apresentou coloração de fluorescência verde. A Figura 30 apresenta uma dessas imagens.

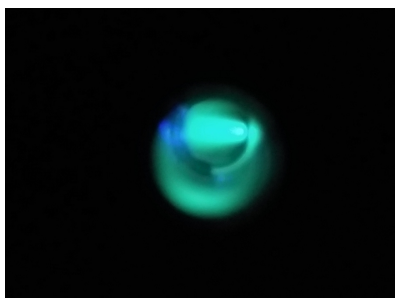


Figura 30 – Aquisição da imagem da reação fluorimétrica entre a solução aquosa de cafeína 100 mg L^{-1} e a solução tampão de fosfato ($0,100 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,30 e $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de HPTS) a 25°C , adquirida pelo celular.

Fonte: autor, 2018

A partir da etapa de tratamento da imagem foram obtidos valores de intensidade de sinal da região de interesse. O canal vermelho (R) do modelo de cores RGB foi escolhido por apresentar variação significativa da intensidade de sinal em função das concentrações de cafeína, numa relação linear decrescente entre 100 e 600 mg L^{-1} em água ultrapura e também para *lab-made*. De fato a variação do canal de cores vermelho é coerente ao dado de imagem obtido (verde), uma vez essas cores são complementares, pelo círculo cromático. A densidade óptica (D.O.) foi determinada pela relação negativa do logaritmo da razão entre o valor médio das triplicatas referentes a intensidade de sinal do canal R e a intensidade de sinal do branco do mesmo canal, Equação 4, seção 3.3 do Capítulo 2. A relação linear obtida entre os valores de (D.O.) e as concentrações de cafeína em água ultrapura é apresentada pela curva analítica, Figura 31.

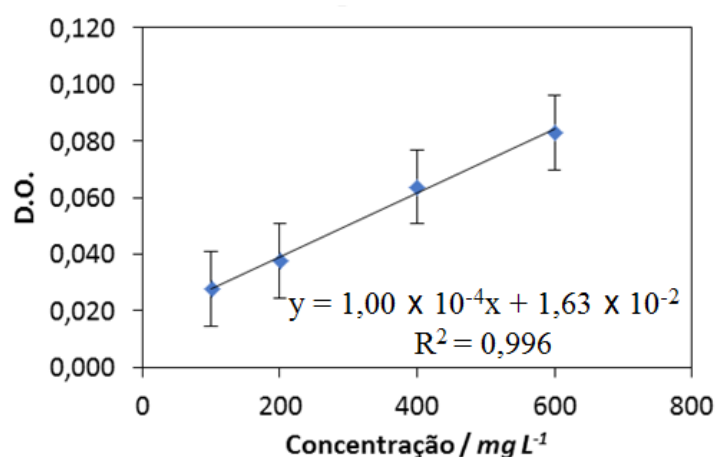


Figura 31 – Curva analítica da densidade óptica (D.O.) em função da concentração da solução aquosa de cafeína entre 100 a 600 mg L^{-1} , por celular.

Fonte: autor, 2018

A Equação 10 apresenta o sinal analítico da densidade óptica em relação a concentração de cafeína, para R^2 de 0,996.

Equação 10

$$y = 1,00 \times 10^{-4} x + 1,63 \times 10^{-2}$$

De maneira análoga, a relação linear obtida entre os valores de D.O. e as concentrações de cafeína em amostras de esgoto *lab-made* é representada pela curva analítica na Figura 32.

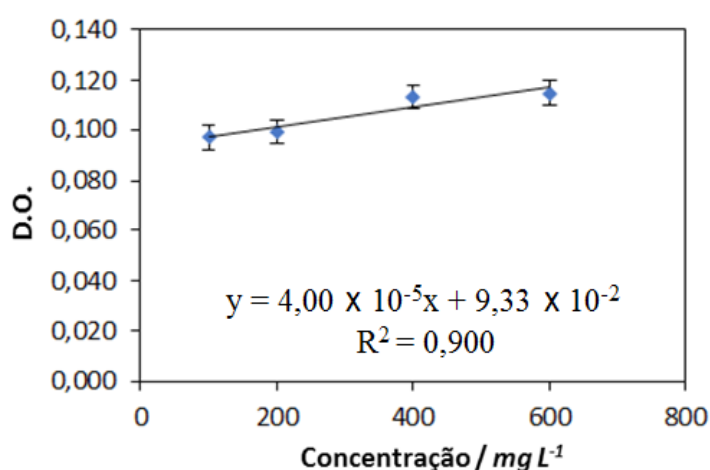


Figura 32 – Curva analítica da densidade óptica (D.O.) em função da concentração da solução I de cafeína em *lab-made*, entre 100 a 600 mg L⁻¹, por celular.

Fonte: autor, 2018.

A Equação 11 mostra que existe uma relação linear para concentrações de cafeína de 100 a 600 mgL⁻¹ com ajuste de pontos expresso pelo coeficiente de determinação de 0,900.

Equação 11

$$y = 4,00 \times 10^{-5} x + 9,33 \times 10^{-2}$$

A D.O. fornece a resposta analítica para o método proposto em dispositivo portátil em uma relação de linearidade em uma faixa de trabalho de 100 a 600 mg L⁻¹ tanto em água ultrapura quanto em esgoto *lab-made*. Os valores de LOQ e LOD para ambos os métodos foram o mesmo sendo de 100 mg L⁻¹ e LOD de 30,0 mg L⁻¹.

O método aplicado em água ultrapura apresentou precisão intradia entre 0,100 e 0,610 % e interdia entre 0,340 a 0,670 %. O método em *lab-made* apresentou precisão intradia entre 0,890 e 2,05 % e interdia entre 0,830 e 1,98 %.

As figuras de mérito dos métodos desenvolvidos em água ultrapura e *lab-made* para o dispositivo fluorimétrico portátil são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 – Figuras de mérito obtidas para a reação de resposta fluorimétrica entre a solução de cafeína (em água e *lab-made* 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.

Parâmetros analíticos	Água ultrapura	Esgoto <i>lab-made</i>
Faixa linear (mg L ⁻¹)	100 – 600	100 – 600
LOQ (mg L ⁻¹)	100	100
LOD (mg L ⁻¹)	30,0	30,0
DPR intradia (%)	0,100 – 0,610	0,890 – 2,05
DPR interdia (%)	0,340 – 0,670	0,830 – 1,98
Sensibilidade	$1,00 \times 10^{-4}$	$4,00 \times 10^{-5}$
Coefficiente linear	$1,63 \times 10^{-2}$	$9,33 \times 10^{-2}$
R ²	0,996	0,900
Tempo da reação (minutos)	4,00	4,00

Fonte: autor, 2018.

3.4 Comparação entre o método espectrofluorimétrico (F) Shimadzu RF–1501 e o dispositivo fluorimétrico (DF) proposto.

As figuras de mérito obtidas para ambos os métodos permitiram comparar os parâmetros de LOQ, LOD, precisão, sensibilidade, o tempo e o custo de análise entre eles, Tabela 15.

Tabela 15 – Figuras de mérito obtidas para a cafeína em água ultrapura e esgoto *lab-made*, pelos métodos desenvolvidos em fluorímetro (F) e dispositivo fluorimétrico (DF).

Parâmetros	F		DF	
	Água ultrapura	<i>Lab-made</i>	Água ultrapura	<i>Lab-made</i>
Faixa linear (mg L ⁻¹)	100 – 700	60 – 1300	100 – 600	100 – 600
LOQ (mg L ⁻¹)	100	60	100	100
LOD (mg L ⁻¹)	30,0	18,0	30,0	30,0
DPR intradia (%)	0,660 – 1,56	0,550 – 6,22	0,100 – 0,610	0,890 – 2,05
DPR interdia (%)	1,12 – 2,36	0,300 – 4,02	0,340 – 0,670	0,830 – 1,98
Sensibilidade	$4,00 \times 10^{-3}$	$4,00 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-4}$	$4,00 \times 10^{-5}$
Coeficiente linear	$8,53 \times 10^{-1}$	1,03	$1,63 \times 10^{-2}$	$9,33 \times 10^{-2}$
R ²	0,994	0,991	0,996	0,900
Tempo da reação (minutos)	4,00	4,00	4,00	4,00

Fonte: autor, 2018.

Os valores de LOQ de 100 mg L⁻¹ e LOD 30,0 mg L⁻¹ do DF em água e *lab-made* não apresentaram variação dos obtidos pelo método de referência em água, sendo esta variação acentuada para o método referência em *lab-made* (LOQ 60,0 mg L⁻¹ e LOD 18,0 mg L⁻¹). O valor de R² foi superior a 0,900 para ambos os métodos.

A faixa de trabalho do DF em água e *lab-made* foi obtida entre 100 a 600 mg L⁻¹ do analito, sendo similar aquela obtida pelo fluorímetro em água. Estudos envolvendo aquisição de imagem apresentam perda de linearidade para faixas maiores que 100 unidades de concentração, contudo para o método proposto não houve perda de linearidade, demonstrando uma vantagem do DF aqui proposto^{33,34}. A partir das curvas analíticas apresentadas nessa mesma seção 3.2.3 pôde-se observar perda de intensidade de sinal a partir da concentração de 800 mg L⁻¹ para água ultrapura e 1400 mg L⁻¹ para *lab-made*.

A precisão dos métodos foi avaliada pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR) intradia e interdia e os valores obtidos foram inferiores a 10,0 %.

A Tabela 16 apresenta em uma avaliação comparativa os principais parâmetros qualitativos (portabilidade da técnica, consumo de amostra, reagente e

geração de resíduos, estimativa do custo financeiro) das análises para os métodos analíticos desenvolvidos no presente estudo de acordo com as vantagens e limitações de cada técnica utilizada. O maior número de sinais positivos (+) implica em maior vantagem, sendo 1 positivo o conceito mínimo e 4 o máximo da escala.

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.

Parâmetros	Fluorímetro	DF
Consumo de amostra	+	++++
Consumo de reagente	+	++++
Resíduos	+	++++
Efeito de matriz	++	+++
Preparo de amostra	+++	++
Tempo de análise	+	++++
Custo estimado da análise	++	+++
Portabilidade	+	++++
Custo estimado do equipamento / dispositivo	+	++++

Fonte: autor, 2018.

O consumo de amostra e reagente é 3 vezes menor para o DF, o que também implica na redução de custo da análise e viabiliza, ainda, a análise onde o volume de amostras é um limitante.

A técnica fluorimétrica é bastante dependente da etapa prévia de preparo de amostras para garantir uma resposta analítica minimizando os possíveis interferentes presentes na matriz, bem como particulados. O fluorímetro é mais sensível a tais condições frente ao maior volume de amostra e caminho óptico.

O tempo de análise foi considerado como aquele necessário para adquirir informações (leitura) sobre a amostra para posterior interpretação desta. No fluorímetro esse tempo foi de 1,00 minuto, enquanto que para o método portátil é de alguns segundos até que a amostra seja fotografada.

O DF proposto dispensa um profissional qualificado para utilizá-lo, sendo uma técnica acessível, enquanto que o fluorímetro exige treinamento prévio de como operá-lo. Além disso, o tempo de análise de segundos até que a imagem seja

adquirida pelo celular, dispositivo acessível e de uso comum, com consumo diminuto de energia elétrica.

A portabilidade do DF proposto é uma promissora vantagem à técnica miniaturizada de análise, que permite realizar análises “*in loco*” e obter uma resposta analítica em tempo real. O equipamento fluorimétrico de referência não apresenta qualquer portabilidade sendo essa uma potencial vantagem do DF portátil proposto.

O equipamento utilizado para análises de referência nesse estudo, Fluorímetro Shimadzu RF-1501, não é mais comercializado, sendo sua nova versão o RF-6000. O valor estimado desse equipamento é de R\$ 50.000,00 sendo pouco viável sua aquisição. O dispositivo fluorimétrico proposto apresenta custo de fabricação estimado em R\$ 30,00. Esse valor não contabiliza o custo do aparelho celular, por ser uma tecnologia já bastante disseminada, atualmente.

A validação e a comparação feita entre as técnicas fluorimétricas utilizadas foram baseadas em resultados obtidos para a cafeína em água ultrapura e esgoto *lab-made*. Uma vez que os métodos foram desenvolvidos e otimizados, foi possível avaliar a aplicabilidade deles em amostras contendo cafeína em sua composição.

3.5 Aplicação dos métodos desenvolvidos para reação fluorimétrica em amostras de energético, esgoto e medicamentos.

3.5.1 Amostra de energético

A intensidade de fluorescência referente a alíquota do energético sem diluição, amostra referência, não apresentou precisão no Shimadzu RF-1501, de modo que a amostra foi diluída em água ultrapura até que se adequasse a tal condição ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$). As amostras foram fortificadas com cafeína e mostraram linearidade de 100 a 1200 mg L^{-1} para o método de referência, porém uma faixa menor (100 a 600 mg L^{-1}) foi considerada uma vez que essa faixa atende a curva proposta em água. De modo análogo, as fortificações também foram feitas para o método portátil em uma faixa linear de 100 a 600 mg L^{-1} .

3.5.2 Amostra de medicamentos

O método desenvolvido no espectrofluorímetro foi aplicado aos medicamentos 1 e 2 em concentrações de 300 mg L^{-1} , porém não foi possível obter qualquer intensidade de sinal como resposta analítica, sendo a técnica referência utilizada inadequada para as amostras consideradas. O método portátil mostrou-se adequado para quantificação de cafeína em medicamentos para uma faixa linear de 100 a 600 mg L^{-1} .

3.5.3 Amostra de esgoto

Amostra de esgoto foi inicialmente filtrada e então diluída para $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ minimizando o efeito de matriz observado em análise prévia. Fortificações entre 100 e 1200 mg L^{-1} foram feitas a partir de alíquotas de uma solução de padrão de cafeína em água e a amostra foi submetida a análise fluorimétrica, enquanto que para o método portátil a faixa linear avaliada foi de 100 a 300 mg L^{-1} para amostra de esgoto e de 100 a 600 mg L^{-1} para as demais amostras.

As amostras de energético, medicamentos e esgoto foram validadas por um espectrofluorímetro, porém não foi possível determinar cafeína nas amostras de medicamentos consideradas, houve perda de precisão e exatidão. A Figura 33 apresenta as curvas analíticas da cafeína para método referência em amostras de energético e esgoto.

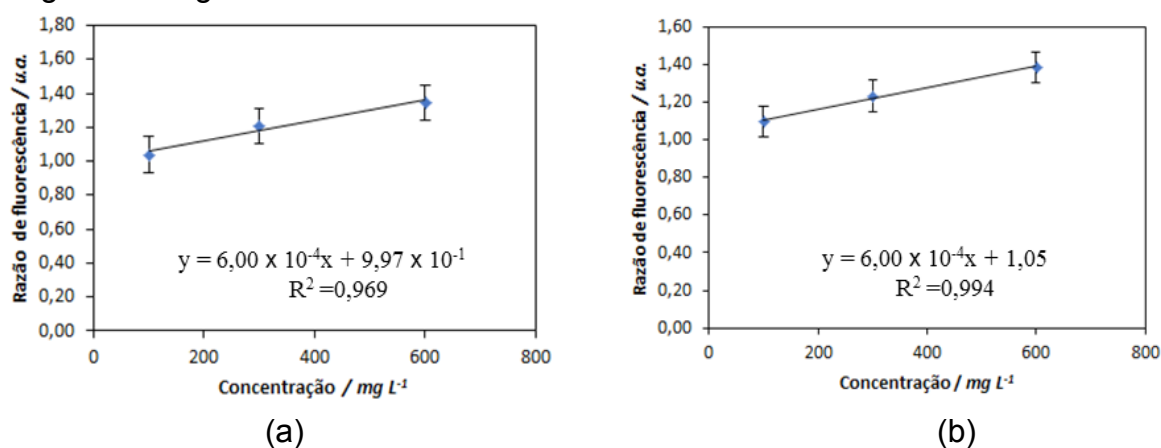


Figura 33 – Curvas analíticas da razão de fluorescência (IF_0/IF) em função da concentração de cafeína (100 a 600 mg L^{-1}) em amostras de (a) energético e (b) esgoto, em espectrofluorímetro RF-1501. Fonte: autor, 2018.

As curvas analíticas da razão de fluorescência (IF_0/IF) referentes ao espectrofluorímetro para amostras de energético e esgoto foram obtidas atendendo a relação linear crescente previamente observada para análises em água e *lab-made*. Os valores de LOQ foram obtidos para 100 mg L^{-1} para as amostras de energético, esgoto e em água, sendo apenas as análises realizadas em *lab-made* com LOQ de $60,0 \text{ mg L}^{-1}$. As amostras analisadas apresentaram possível linearidade, com ajuste dos dados do método desenvolvido em espectrofluorímetro, com valores de R^2 maiores do que 0,969.

Em uma avaliação comparativa as curvas analíticas de D.O. para cafeína para método portátil foram obtidas para amostras de energético, esgoto, medicamentos (medicamento 1 e 2), como apresentado pela Figura 34.

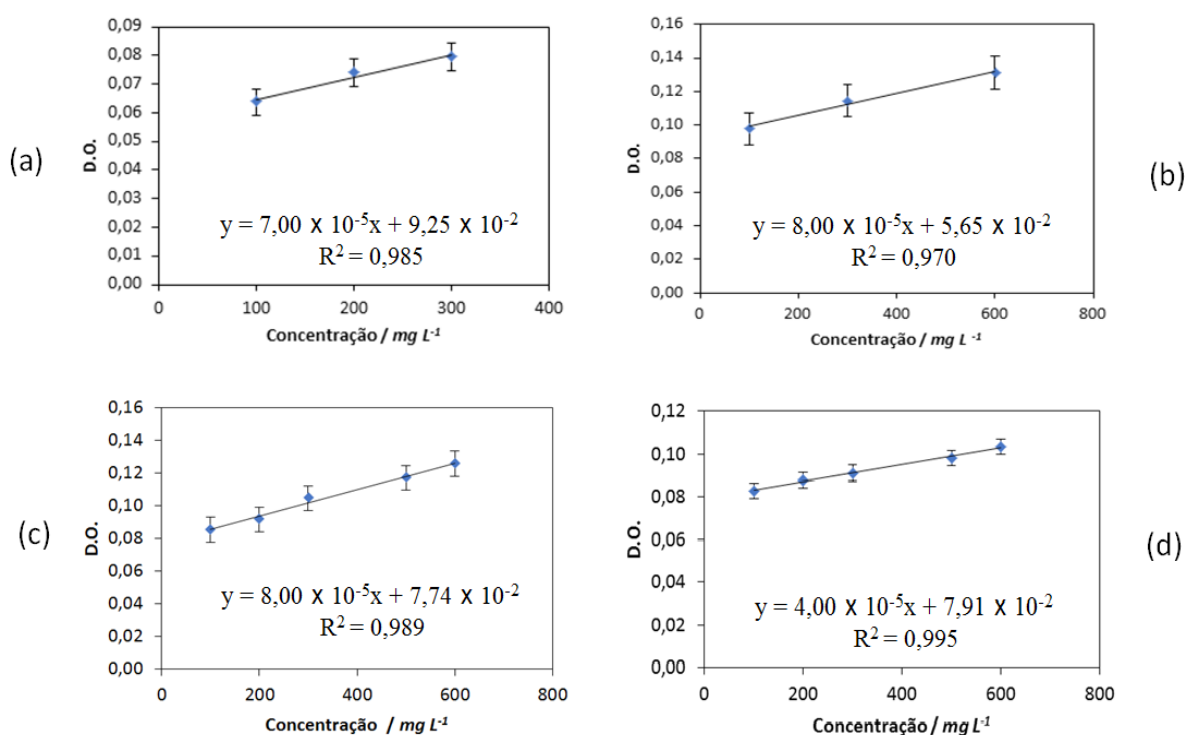


Figura 34 – Curvas analíticas da D.O. em função da concentração de cafeína para método fluorimétrico em amostras de (a) energético entre 100 a 300 mg L^{-1} , (b) esgoto entre 100 a 600 mg L^{-1} , (c) medicamento 1 entre 100 a 600 mg L^{-1} e (d) medicamento 2 entre 100 a 600 mg L^{-1} , por celular.

Fonte: autor, 2018

As curvas analíticas obtidas pelo método desenvolvido para o dispositivo portátil apresentaram comportamento linear análogo ao observado no método de referência. Os valores obtidos para as amostras de energético, esgoto, medicamento 1 e 2 mostraram possível linearidade, com ajuste ao método proposto com valores

de R^2 superior a 0,970. O LOQ obtido para os respectivos métodos de amostras estudadas foi de 100 mg L⁻¹ e o LOD 30,0 mg L⁻¹.

O dispositivo portátil foi capaz de determinar cafeína nas amostras de medicamentos com precisão e exatidão.

A Tabela 17 apresenta as figuras de mérito obtidas para o método aplicado à determinação de cafeína em matrizes aquosa de energético e esgoto para o método referência e para o dispositivo fluorimétrico.

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).

Parâmetros analíticos	Energético		Esgoto	
	F	DF	F	DF
Faixa linear (mg L ⁻¹)	100 – 600	100 – 300	100 – 600	100 – 600
LOQ (mg L ⁻¹)	100	100	100	100
LOD (mg L ⁻¹)	30,0	30,0	30,0	30,0
DPR intradia (%)	0,340 – 1,61	1,07 – 1,73	0,450 – 2,31	0,173 – 0,572
Sensibilidade	$6,00 \times 10^{-4}$	$7,00 \times 10^{-5}$	$6,00 \times 10^{-4}$	$8,00 \times 10^{-5}$
Coeficiente linear	$9,97 \times 10^{-1}$	$9,20 \times 10^{-2}$	1,05	$5,65 \times 10^{-2}$
R^2	0,969	0,985	0,994	0,970

Fonte: autor, 2018.

Os valores de LOQ e LOD obtidos para o método referência e para o dispositivo proposto considerando as amostras da Tabela 17 foram os mesmos, de 100 mg L⁻¹. As amostras consideradas sugerem ajuste ao método desenvolvido para o DF, com valores de R^2 superiores a 0,970 assim como obtido para o método referência. A precisão intradia obtida para as amostras foi inferior a 5,00 %.

Apesar das amostras consideradas serem complexas, e embora diluídas a 1,00 mg L⁻¹ de cafeína para serem analisadas e o efeito de matriz ainda foi significativo. O cálculo para determinar o efeito matriz é apresentado pela Equação 6, secção 3.5.4, Capítulo 2.

O valor percentual do efeito matriz para as amostras de energético e esgoto com relação as curvas analíticas da água ultrapura e do *lab-made* são apresentados pela Tabela 18.

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 *lab-made*.

Matriz	Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	Efeito matriz (%) - água ultrapura	Efeito matriz (%) - <i>lab-made</i>
Energético	100 – 600	-30,0	75,0
Esgoto	100 – 300	-20,0	100
Medicamento 1	100 – 600	-20,0	100
Medicamento 2	100 – 600	-60,0	-
Curva analítica da água ultrapura: $y = 1,00 \times 10^{-4}x + 1,63 \times 10^{-2}$ com R ² 0,996			
Curva analítica do <i>lab-made</i> : $y = 4,00 \times 10^{-5}x + 9,33 \times 10^{-2}$ com R ² 0,900			

Fonte: autor, 2018.

Os valores percentuais de efeito matriz na curva analítica da água ultrapura mostraram supressão do sinal analítico entre 20,0 a 60,0 % para as amostras estudadas. Esse comportamento pode ser atribuído a complexidade do *lab-made*, o que confere alguma similaridade as matrizes consideradas. O efeito observado em *lab-made* apresentou valores promissores e menores que 100 %, principalmente para as amostras de energético e para o medicamento 2.

A Figura 35 apresenta a curva analítica de cada matriz considerada em água para melhor visualização da resposta ao efeito matriz observado.

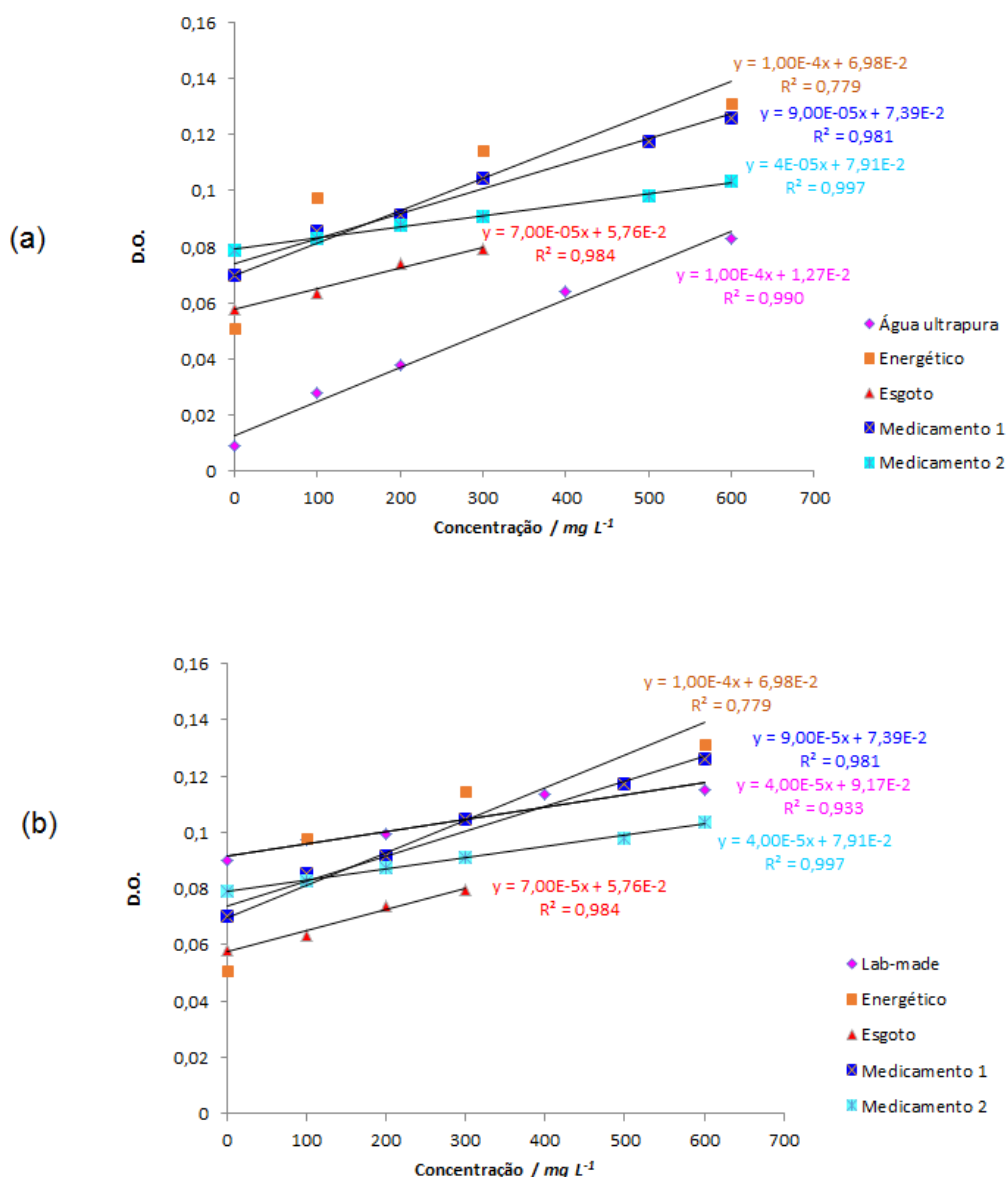


Figura 35 – Efeito de matriz avaliado pela relação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas das amostras de energético, esgoto e medicamentos 1 e 2 em comparação com a curva da (a) água ultrapura e (b) do *lab-made*.

Fonte: autor, 2018.

O efeito de matriz mostrou-se pronunciado tanto em água ultrapura quanto em *lab-made*, sendo de maior compatibilidade para amostras aplicadas na curva do *lab-made*.

A utilização da curva analítica obtida no esgoto *lab-made* para determinação da concentração de cafeína nas amostras apresentou precisão e efeito de matriz insignificante.

A Tabela 19 apresenta a faixa de concentração de cafeína em que as amostras estudadas apresentaram linearidade bem como suas respectivas curvas analíticas e coeficientes de determinação.

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.

Matriz	Curva analítica	R ²	C ₃₀₀ (mg L ⁻¹)
Energético	$y = 7,00 \times 10^{-5}x + 9,25 \times 10^{-2}$	0,985	328 + 0,025
Esgoto	$y = 8,00 \times 10^{-5}x + 5,65 \times 10^{-2}$	0,970	219 - 0,28
Medicamento 1	$y = 8,00 \times 10^{-5}x + 7,74 \times 10^{-2}$	0,989	345 + 0,15
Medicamento 2	$y = 4,00 \times 10^{-5}x + 7,91 \times 10^{-2}$	0,995	322 + 0,073

Fonte: autor, 2018.

Os valores de D.O. obtidos para concentrações de cafeína apresentaram erro relativo inferior a 15,0 % para amostras de energético e medicamentos em suas respectivas curvas analíticas, sendo que esses modelos podem ser utilizados para determinação de cafeína em amostras com precisão e exatidão.

A curva obtida para o esgoto apresentou linearidade para concentrações entre 100 a 300 mg L⁻¹, mas ainda não pode ser considerado um modelo analítico adequado a proposta em questão.

Com relação ao método de referência, os valores de concentração obtidos para amostras fortificadas de energético e esgoto são apresentados na Tabela 20 junto ao erro relativo obtido.

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.

Matriz	Curva analítica matriz	R ²	C ₃₀₀ (mg L ⁻¹)
Energético	$y = 6,00 \times 10^{-4}x + 1,01$	0,955	333 + 0,04
Esgoto	$y = 6,00 \times 10^{-4}x + 1,02$	0,985	350 + 0,15

Fonte: autor, 2018.

O método de referência desenvolvido em espectrofluorímetro apresentou precisão para concentrações de cafeína avaliadas em 300 mg L⁻¹. O energético apresentou erro relativo de 4,00 % a mais enquanto que a amostra de esgoto obteve acréscimo de 15,0 %.

3.6 Comparação dos resultados obtidos no presente estudo fluorimétrico com aqueles apresentados na literatura

Em pesquisa realizada na base de dados multidisciplinares Scopus até a data de 13/07/2018 foram encontrados apenas um artigo que envolvesse a determinação de cafeína por aquisição de imagem. O modo de busca foi selecionado para “título, abstract e palavras chave” e as palavras “caffeine, smartphone” foram pesquisadas. O artigo intitulado “Multimodal imaging and lighting bias correction for improved μ PAD-based water quality monitoring via smartphones” e publicado em 2016 pela Scientific Reports foi apresentado como resultado da pesquisa. Os autores Katherine E. McCracken e colaboradores abordam a reação fluorimétrica também adotada no presente estudo com fluoróforo HPTS na presença de cafeína com aquisição de imagem usando celular, porém utilizando suporte de papel para a reação ocorrer⁴⁴. O software de tratamento de imagem, ImageJ também foi utilizado pelos autores e como resposta do sinal analítico obtido em função da concentração de cafeína.

Os mesmos autores também apresentam uma proposta de resposta fluorimétrica usando HPTS para outro analito, o bisfenol A (BPA), estradiol e nonilfenol como uma promissora alternativa analítica portátil e de baixo custo. O uso do celular para aquisição da imagem bem como o software ImageJ também foram ferramentas utilizadas no desenvolvimento do trabalho⁴⁵.

A Tabela 21 apresenta parâmetros comparativos entre o método apresentado pela literatura e o presente estudo.

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.

Parâmetros	McCracken e colaboradores	McCracken e colaboradores	Presente estudo
Faixa linear (mg L ⁻¹)	100 – 400	$2,20 \times 10^{-3}$ – 27,2	100 – 600
LOD (mg L ⁻¹)	100	-	30,0
Suporte	Papel	Cubeta	Insert
Aplicação	Monitoramento em água	Monitoramento em água	Monitoramento em água

Fonte: autor, 2018.

A faixa linear obtida nesse estudo apresenta vantagem em comparação com trabalhos que usam o celular como alternativa analítica, uma vez que essa faixa geralmente é estreita (menor que 100 unidades) ou apresenta um número mínimo de pontos com variação de sinal pouco significativa. Em comparação ao trabalho citado, o presente estudo apresentou acréscimo de 200 unidades em sua faixa linear, sendo uma significativa vantagem a técnica e método utilizados na quantificação de cafeína. O LOD obtido também é uma vantagem relevante ao método de estudo, por ser menor que o obtido na literatura em aproximadamente três vezes.

4. CONCLUSÃO

O método fluorimétrico foi desenvolvido em fluorímetro, para comparação dos valores obtidos pelo método proposto em dispositivo portátil, apresentou precisão intradia menor que 2,00 % para água ultrapura e próxima a 6,00 % para esgoto *lab-made*. Os valores de precisão interdia para ambos os meios mostraram-se inferiores a 5,00 % e o método apresentou preciso e exato ao modelo adotado para determinação de cafeína em amostras complexas.

O dispositivo proposto mostrou-se uma alternativa analítica promissora com valores de precisão intradia e interdia inferiores a 0,600 % e 2,00 %, respectivamente, para água ultrapura. A precisão obtida em *lab-made* foi inferior a 2,00 % para medidas intra e interdia, conferindo precisão em concordância com as diretrizes nacionais e internacionais de validação.

O método fluorimétrico de referência apresentou limitações para a amostra de esgoto, inviabilizando a comparação e validação do método desenvolvido em DF para tais amostras. As curvas analíticas obtidas para tal amostra em DF apenas permite concluir que o método proposto apresentou linearidade entre 100 a 300 mg L⁻¹ de cafeína. O efeito de matriz para amostras de energético e medicamentos apresentou valores inferiores a 100 % quando aplicado em *lab-made*, como esperado frente a complexidade das amostras avaliadas.

A ampla faixa de linearidade obtida para amostras de energético e medicamentos, entre 100 a 600 mg L⁻¹ é uma importante vantagem analítica para o DF proposto quando se utiliza celulares na aquisição de dados, pois essa técnica geralmente apresenta faixas de trabalho limitadas a 100 unidades de concentração.

O DF foi capaz de determinar cafeína em amostras complexa, mas com ressalva para aplicação de amostras de esgoto.

A portabilidade desse dispositivo também é uma importante vantagem da técnica proposta, sendo uma alternativa analítica de baixo custo e com resposta rápida sem perder precisão e exatidão na determinação.

Sua aplicabilidade torna-se ampla a determinação de cafeína em matrizes complexas, bem como outros analitos que respondam com variação de intensidade de fluorescência em usando HPTS, visando um método rápido, barato e de baixo custo, como o DF proposto nesse estudo. A utilização de reações envolvendo resposta fluorométricas tem sido uma alternativa analítica restrita a alguns compostos. Sua aplicação à compostos orgânicos é pouco explorada quanto ao seu mecanismo, cinética e seletividade pouco relatadas na literatura científica.

Como alternativa para análise de matrizes complexas pelo método fluorométrico cabe conhecer a natureza da amostra a ser analisada e as propriedades dos seus principais componentes, na tentativa de evitar interferência na determinação, e ainda garantir que a reação ocorra de maneira eficiente com o analito de interesse. A etapa de preparo de amostra e pré-concentração deve ser considerada para reduzir efeito de matriz e interferência na reação de *quenching* de fluorescência.

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 .

PERSPECTIVAS

O dispositivo portátil colorimétrico mostrou-se inovador embora desafios experimentais devam ser otimizados, como o controle da temperatura e a proposta de um dispositivo que possibilite a portabilidade do sistema, incluindo a etapa reacional e não apenas a etapa de aquisição da imagem. A otimização do parâmetro temperatura será reavaliada melhorando a resposta analítica obtida e aumentando a confiabilidade do método. Com relação ao efeito de matriz observado, a utilização das respectivas curvas analíticas das matrizes de energético e esgoto são uma alternativa a serem adotadas como método de referência para aplicação de tais amostras na determinação de cafeína.

O objetivo desse estudo referente a portabilidade do sistema analítico foi atingido pelo dispositivo fluorimétrico. As otimizações necessárias cabem às melhoras no desenho do dispositivo e na portabilidade da resposta analítica gerada

após etapa de aquisição da imagem, sendo possível obter o resultado diretamente pelo celular e *“in loco”* ao invés de usar um computador com software para tratamento da imagem.

Os métodos analíticos desenvolvidos e validados poderão ser adaptados e aplicados às análises de outros compostos presentes no ambiente, como fármacos, hormônios e outros contaminantes emergentes. A determinação da presença desses compostos no local de análise seria uma alternativa promissora as estações de tratamento de água e esgoto para avaliar a qualidade do efluente lançado no ambiente, e até mesmo, a qualidade da água para consumo. A aplicação desses dispositivos na avaliação de tecnologias aplicadas para a remoção de cafeína e demais uma compostos também é uma aplicação futura desses dispositivos, de maneira rápida e confiável.

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.; HOWCROF, 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.
-