



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

EMELLE KELLY NASCIMENTO DA SILVA

**DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA POR IMAGENS DIGITAIS EM PLACAS
DE *SPOT TESTS* FABRICADAS POR TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO 3D**

Belém – Pará
2018

EMELLE KELLY NASCIMENTO DA SILVA

**DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA POR IMAGENS DIGITAIS EM PLACAS DE
SPOT TESTS FABRICADAS POR TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO 3D**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em
Química da Universidade Federal do Pará –
UFPA, como requisito parcial à obtenção do título
de Bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Vagner Bezerra dos Santos.
Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Neves.

Belém – Pará

2018

EMELLE KELLY NASCIMENTO DA SILVA

**DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA POR IMAGENS DIGITAIS EM PLACAS
DE SPOT TESTS FABRICADAS POR TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO 3D**

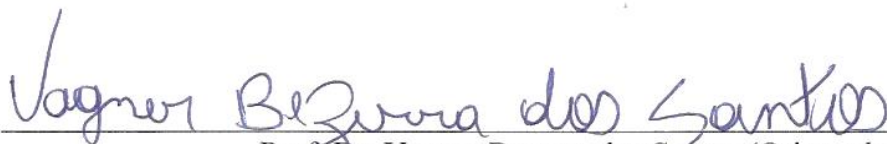
Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado
como requisito parcial para obtenção de grau de
Bacharel em Química Industrial, pela
Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Vagner Bezerra dos Santos

Data da apresentação: 12 de dezembro de 2018

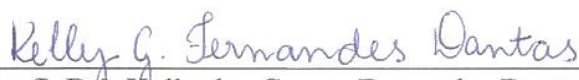
Conceito: Excelente

Banca Examinadora



Prof. Dr. Vagner Bezerra dos Santos (Orientador)

Faculdade de Química - Universidade Federal do Pará



Prof.^a Dr.^a Kelly das Graças Fernandes Dantas (Membro interno)

Faculdade de Química - Universidade Federal do Pará



Prof. Dr. Sanclayton Geraldo Carneiro Moreira (Membro interno)

Faculdade de Física - Universidade Federal do Pará

À todos aqueles que têm sede de conhecimento e buscam incessantemente compreender os fenômenos que regem o universo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pela força, alegria e persistência a mim dada. Sem ele nada seria possível.

Ao Kewin Lima pela grande contribuição ao longo dessa trajetória, obrigada pelo incentivo, pelo gás, pelos momentos bons que me deram ânimo para persistir e me tornar uma pessoa melhor, sou grata pela família concedida (Ester, Claudio, Claudinho, Layse e Patryk).

À minha “May Miga” por estar comigo inseparavelmente todos os dias. Sou grata pela enorme força dada neste último ano de graduação, e pela compreensão nos momentos mais difíceis e pela sua enorme amizade.

Aos meus orientadores Prof. Vagner Bezerra e Prof. Carlos Neves, pela oportunidade de trabalhar de aprender e aplicar o conhecimento a mim passado. Sou grata pelos conselhos, pelas dicas e principalmente paciência. Espero um dia me tornar uma profissional tão capacitada e tão humilde quanto.

A família do Laboratório de Instrumentação e Automação em Análítica Aplicada (LIA³), Igor, Ian, Paulo, Inácio, pela amizade e companheirismo tanto no trabalho quanto na vida pessoal.

Aos professores, Kelly e Heron pela estrutura concedida do GEAAp, que disponibilizaram espaço e auxílio necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Sanclayton, por ter aberto as portas de seu laboratório, pelo auxílio e disponibilidade oferecida para que esse trabalho fosse concluído.

As amigas do GEAAp Bianca, Josélia e Mariane, pelos risos, momentos de descontração, cafés e a união que proporcionaram no grupo.

Aos amigos do curso, Túlio Santos, Augusto Fernando, Tomaz Henrique, Brunna Moura e Ana Paula Luz que foram exemplares amigos e parceiros, que em diversos momentos de dificuldade e tristeza fizeram tudo se tonar melhor.

As minhas amigas Fernanda, Laura e Carol, que me deram força para entrar nesse curso, o qual amo. Agradeço pelo companheirismo e amizade sem igual.

A minha família (Astarta, Fabrício, Astrogilda e Filogomes) que apesar da distância contribuíram para minha chegada até aqui.

“A felicidade não está em fazer o que se
deseja, mas em amar o que realizou.”

(Paulo Viera)

RESUMO

Um método fluorescente baseado em imagens digitais e *spot tests* foi desenvolvido para determinar a quinina em bebidas. Assim, um *smartphone* como detector e uma microplaca produzida em uma impressora 3D para acomodar as soluções padrão e amostras foram usadas. Para adquirir as imagens fluorescentes, foi desenvolvida uma câmara feita de papel reciclável com quatro diodos emissores de luz ultravioleta de ultra brilho (UV-LED) com comprimento de onda máximo de 360 nm. O canal azul (B) apresentou maior sensibilidade e precisão em comparação com outros canais e utilizou modelos matemáticos. A curva analítica linear variou de 0,50 a 4,50 mg L⁻¹ com um coeficiente de correlação de 0,998. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,04 e 0,12 mg L⁻¹, respectivamente. A precisão e exatidão foram avaliadas e um desvio padrão relativo variou de 0,93% a 1,84% e um erro relativo menor que 2% foi obtido. Além disso, os resultados fornecidos pelo dispositivo proposto foram comparados a um espectrofluorímetro convencional empregando o teste *t* pareado que variou entre 0,13 a 0,91, que são menores que o valor tabelado de 2,57 no nível de confiança de 95% para (n = 6). Além disso, os valores de recuperação variaram de 94,0% a 110% e a frequência analítica foi de 10 análises por minuto. Suportado pelos resultados, o método proposto demonstrou ser rápido, preciso, preciso e menos agressivo ao meio ambiente devido ao baixo desperdício gerado e ao uso de microplacas biodegradáveis, quando comparado a um espectrofluorímetro convencional.

Palavras-chave: Imagens digitais, impressora 3D, placas de *spot tests*, fluorescência, quinino.

ABSTRACT

A fluorescent method based on digital images and spot test was developed to determine quinine in beverages. Thus, a smartphone as a detector and a microplate produced in a 3D printer to accommodate the standard solutions and samples were used. To acquire the fluorescent images, a chamber made of recyclable paper with four ultra-brightness ultraviolet light emission diode (UV-LED) with maximum wavelength at 360 nm was developed. The blue channel (B) presented greater sensitivity and precision compared to other channels and used mathematical models. The linear analytical curve ranged of 0.50 to 4.50 mg L⁻¹ with a correlation coefficient of 0.998. The limits of detection and quantification were 0.04 and 0.12 mg L⁻¹, respectively. The precision and the accuracy were evaluated and a relative standard deviation ranged of 0.93% to 1.84% and a relative error lower than 2% were obtained. Moreover the results supplied by the proposed device were compared to a conventional spectrofluorimeter by employing the paired t test and the experimental t test ranged of 0.13 to 0.91, which are less than the tabulated value of 2.57 at the 95% confidence level for ($n = 6$). Additionally, the recovery values ranged of 94.0% to 110% and the analytical frequency was 10 analyzes per minute. Supported by the results, the proposed method demonstrated to be fast, accuracy, precise, and less aggressive to the environmental due to the generated low waste and the use of biodegradable microplates, when it is compared to a conventional spectrofluorimeter.

Keywords: Digital images, 3D printer, spot test plates, fluorescence, quinine.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Ampere
ABS	Acrilonitrila Butadieno Estireno (do Inglês <i>Acrylonitrile butadiene styrene</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	Coefficiente de variação
CYMK	Ciano, Magenta e Amarelo (do inglês <i>Cyan, Magenta, Yellow</i>)
3D	Tridimensional
DAD	Detector de Arranjo de Diodos (do inglês <i>Detector Diode Array</i>)
DIB	Baseado em imagens Digitais (do inglês <i>Digital Image Based</i>)
DMLS	Sinterização Direta de Metal com Laser (do inglês <i>Direct Metal Laser Sintering</i>)
FDM	Modelagem de Deposição Fundida (do inglês <i>Fused Deposition Modeling</i>)
FFF	Fabricação de Filamento Fundido (do inglês <i>Fused Filament Fabrication</i>)
LC-MS	Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa (do inglês <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
LED	Diodo Emissor de Luz (do inglês <i>Light Emission Diode</i>)
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LTCC	Cerâmica Co-queimada a Baixa Temperatura (do inglês <i>Low Temperature Co-fired Ceramic</i>)
PDA	Fotodetector de Arranjo de Diodos (do inglês <i>Photo Diode Array</i>)
PLA	Ácido Polilático (do inglês <i>Polylactic Acid</i>)
QN	Quinino
RGB	Vermelho, Verde, Azul (do inglês <i>Red, Green and Blue</i>)
SLM	Fusão a Laser Seletiva (do inglês <i>Selective Laser Melting</i>)

SLS	Sinterização Seletiva a Laser (do inglês <i>Selective Laser Sintering</i>)
μTAS	Microsistemas para análises totais (do inglês <i>Micro total analytical system</i>)
TPE	Elastômero Termoplástico (do inglês <i>Thermoplastic elastomers</i>)
UV	Ultravioleta
V	Volts
W	Watts

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Processo de impressão por modelagem de depósito de material fundido.	17
FIGURA 2 - Diagrama de Jablonski. (A) excitação de $S_0 \rightarrow S_2$. (B) Transição vibracional dentro do mesmo estado eletrônico. (C) conversão interna. (D) excitação de $S_0 \rightarrow S_1$. (E) emissão fluorescente.	18
FIGURA 3 - Diagrama de blocos representativo de um instrumento para fluorescência.	20
FIGURA 4 - Representação gráfica do sistema padrão de cores RGB.	21
FIGURA 5 - Representação ilustrativa dos sistemas de cores RGB e CMYK.	21
FIGURA 6 - Estrutura da molécula de QN.	22
FIGURA 7 - Modelo da placa projetada no programa OpenSCAD 2015, com bordas anguladas.	25
FIGURA 8 - Modelo das cavidades da placa de spot test, feita por composição de um cilindro de 8 mm de altura por 6 mm de diâmetro e um cone de altura de 2 mm, base de 6 mm e topo de 9 mm.	26
FIGURA 9 - Diagrama de blocos do circuito interno da câmara.	27
FIGURA 10 - Câmara com fontes de excitação para detecção fluorimétrica.	27
FIGURA 11 - Ângulo de incidência da (1) fonte de radiação UV em relação à (2) placa 3D.	28
FIGURA 12 - Fotografia da placa de spot test fabricado por impressão 3D em PLA com acabamento.	31
FIGURA 13 - Placa de spot test em relação aos ângulos de incidência da radiação 180° , 135° e 90°	32
FIGURA 14 - Gráfico referente ao estudo da dependência da intensidade fluorescente com pH.	34
FIGURA 15 - Curva analítica para o QN utilizando diferentes modelos matemáticos.	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Comparação entre os métodos reportados em literatura para determinação de QN.....	23
TABELA 2 - Parâmetros analíticos para escolha da melhor configuração dos LEDs. .	33
TABELA 3 - Curva analítica de QN para os diferentes tratamentos matemáticos.	35
TABELA 4 - Estudo de interferentes.	36
TABELA 5 - Teste de recuperação.....	36
TABELA 6 - Resultados obtidos para três amostras comerciais de água tônica.....	37
TABELA 7 – Análise estatística dos dados obtidos entre o canal azul (B) e o Espectroflorímetro.....	37
TABELA 8 – Análise estatística dos dados obtidos entre o Vetor RGB e o Espectroflorímetro.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1.1 Miniaturização de sistemas de análises	16
1.1.2 Tecnologia de impressão 3D	16
1.1.3 Fluorescência Molecular	18
1.1.4 Instrumentação para fluorescência	19
1.1.5 Sistema padrão de cores RGB	20
1.1.6 Imagens digitais em Química Analítica	22
1.1.7 Determinação de quinino (QN)	22
1.2 OBJETIVOS	24
1.2.1 Geral	24
1.2.2 Específicos	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1 INSTRUMENTAL	25
2.1.1 Fabricação da placa de <i>spot-tests</i> por impressão 3D	25
2.1.2 Aparatos e instrumentação	26
2.1.3 Otimização e calibração do sistema	28
2.2 PROCEDIMENTO ANALÍTICO	28
2.2.1 Reagentes e amostra	28
2.2.2 Estudo de pH	29
2.2.3 Estudo de interferentes	29
2.2.4 Adição e Recuperação	29
2.2.5 Detecção fluorimétrica por imagens digitais	29
2.2.6 Tratamento da imagem digital	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 PLACA DE <i>SPOT TEST</i>	31
3.2 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE	32
3.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO	33
3.3.1 Estudo de pH	33
3.3.2 Sinal analítico e tratamento de dados	34
3.3.3 Estudo de interferentes	35
3.3.4 Método de adição e recuperação de analito	36

3.3.5	Determinação fluorimétrica de QN	37
4.	CONCLUSÕES	39
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento na busca por métodos analíticos que visam a rapidez, praticidade, baixo custo, portabilidade voltado em ações mais protecionistas quanto ao meio ambiente buscando a redução da carga de resíduos químicos (SOUZA *et al*, 2104). Nesse sentido, o uso de métodos baseados em análises de imagem digitais tem se destacado por apresentar todas essas vantagens. Avanços foram conseguidos nos últimos anos pela incorporação da tecnologia digital, pelo uso de dispositivos eletrônicos, tais como webcams, câmeras fotográficas, aparelhos celulares com câmera embutida e scanners (BENEDETTI *et al*, 2015). Estes por sua vez são capazes de obter imagens ou vídeos de reações colorimétricas (PESSOA *et al*, 2017) e ou luminescentes (LIN *et al*, 2018). O princípio desse método consiste em detectar a mudança de intensidade de cor refletida ou emitida pelo sistema químico, baseado em um sistema de cores que é responsável por explicar as mais de 16 milhões de cores percebidas pelo olho humano. Há dois sistemas de cores mais comumente usados em química analítica, são eles o modelo RGB (*Red, Green e Blue*) e o CYMK (*Cyan, Magenta, Yellow*). É dado então um valor para cada canal de cor que depende de intensidade, podendo variar de 0 a 255 para um sistema de 8 bits, esses valores são posteriormente correlacionados com concentração do analito de interesse (CAPITAN-VALLVEY *et al*, 2015).

Ainda nesse seguimento de métodos analíticos de baixo custo e sustentáveis, destacam-se os métodos que fazem uso de sistemas micro fabricados (SOUZA *et al*, 2014). O desenvolvimento das tecnologias de fabricação de objetos em microescala tem facilitado a obtenção de aparatos dedicados, confeccionados unicamente a alguns procedimentos que demandam especificidade elevada, com características próprias, como formato, volumes, quantidades de ensaios, tipos de materiais utilizados e entre outras (LIAO *et al*, 2018).

Dentre as técnicas que produzem aparatos miniaturizados, se destacam a fotolitografia (FONSECA *et al*, 2007), microfresagem (de ASSIS, 2013; dos SANTOS *et al*, 2014), cerâmica co-queimada a baixa temperatura (do inglês *Low temperature co-fired ceramic* - LTCC) (LI *et al*, 2014; SUAREZ *et al*, 2010, 2013), tecnologia de impressão 3D (COCOVI-SOLBERG *et al*, 2018) e dispositivos feitos a Laser (do LAGO *et al*, 2014).

A impressão 3D sem dúvidas tem mostrado um enorme potencial no que diz respeito à fabricação de equipamentos científicos personalizados. Diversos trabalhos já

foram desenvolvidos, incluindo dispositivos microfluídicos (GROSS *et al*, 2017), aplicações em Química Analítica (DIAS *et al*, 2016) e eletroquímica (CARDOSO *et al*, 2018).

Neste contexto, é interessante para o Químico Analítico integrar toda a autonomia proporcionada pela tecnologia de impressão 3D com a rapidez, praticidade e baixo custo obtidas de métodos baseados em análises de imagens digitais (DIB, *Digital image Based*) (BENEDETTI *et al*, 2015), para novas aplicações como detecção de fluorescência. Pois se sabe que é um método sensível e seletivo, muito utilizado para análises de substâncias específicas em alimentos (CUNHA *et al*, 2013), produtos farmacêuticos (SOTOMAYOR *et al*, 2008), análises clínicas (TREVISAN *et al*, 2003), química forenses (CHEMELLO, 2007), porém ainda com poucas aplicações de baixo custo.

Baseado em todas as vantagens apresentadas do método DIB e das técnicas de produção de aparatos miniaturizados em química analítica foi proposto neste trabalho a detecção por imagem de fluorescência emitida por amostras contendo quinino presentes numa placa de *spot test* fabricada por tecnologia de impressão 3D.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Miniaturização de sistemas de análises

A utilização de sistemas miniaturizados tem recebido grande atenção na área de Química Analítica, pois apresentam algumas vantagens, tais como: análises químicas rápidas, baixo custo, portabilidade, baixa geração de resíduos e a capacidade de integração de várias etapas analítica em um único dispositivo (SOUZA *et al*, 2014).

Apesar da comunidade científica demonstrar interesse desde 1940 por sistemas miniaturizados, considera-se como primeiro dispositivo analítico miniaturizado, um sistema de cromatografia, o qual foi construído em lamina circular de silício com 5 cm de diâmetro, cujo o objetivo era diminuir a escala dos equipamentos para se obter uma maior eficiência nas separações (TERRY *et al*, 1980). No entanto, devido à inexperiência tecnológica em métodos de separação fez com esse dispositivo não fosse aceito pela comunidade científica (COLTRO *et al*, 2007).

Em 1990, surgem os chamados μ TAS (do inglês *micro total analytical system*) microssistemas para análises totais. Esse novo conceito visava a integração de várias etapas analíticas como o pré-tratamento da amostra, reações químicas, separação analítica e detecção em um único dispositivo que geralmente era um *chip*. Por isso foi nomeado de “*lab-on-a-chip*” que significa laboratório em um chip (MANZ *et al*, 1990). Esses sistemas miniaturizados se tornaram de grande importância para análises emergenciais, para monitoramento de substâncias em determinadas matrizes e para análises clínicas. Sendo assim, um novo conceito “*point-of-care*” foi introduzido (COLTRO *et al*, 2007). Esses conceitos somados a facilidade de confeccionar objetos no modelo e dimensões desejadas, estimularam nas últimas décadas o crescimento maciço dos sistemas de análises em micro-escala como as análises microfluídicas (LIAO *et al*, 2018).

1.1.2 Tecnologia de impressão 3D

A impressão 3D é uma técnica de fabricação aditiva baseada na deposição de materiais de camadas sobre camadas para produção de objetos tridimensionais, que necessita do uso de um software adequado de modelagem 3D (DIAÑEZ *et al*, 2019). Existem uma diversidade de métodos de fabricação de objetos que podem ser classificadas como tecnologia de impressão 3D, onde as principais são a fusão a laser

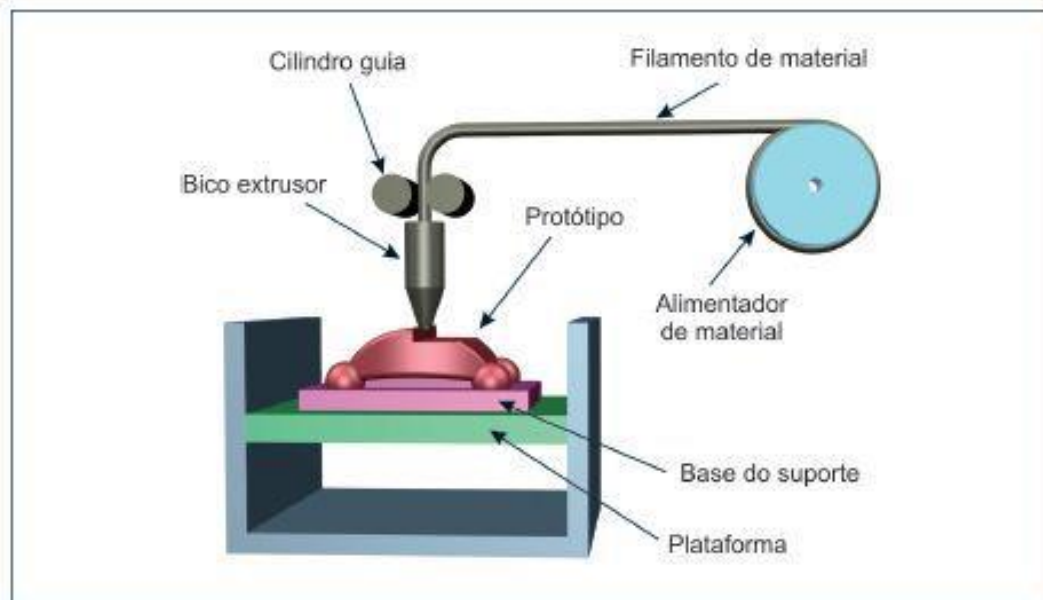
seletiva, sinterização seletiva a laser e a modelagem por deposição fundida, existem outras como estereolitografia e processamento digital de luz (LANSARD, 2018).

A SLM (fusão a laser seletiva) ou DMLS (sinterização direta de metal) com laser é um processo de fabricação de peças, em que uma fina camada de pó de metal como aço, titânio, níquel ou ligas de alumínio é varrido por um laser que funde o material camada por camada para criar um objeto. Esse tipo de prototipagem rápida tem chamado atenção das indústrias aeroespaciais, automotivas e biomédicas (GRIFFITHS *et al*, 2019).

A SLS (sinterização seletiva a laser) é um tipo de fabricação aditiva semelhante a SLM, em que se usa um laser de alta potência de dióxido de carbono para sinterizar materiais em pó a base de plásticos, cerâmica ou vidro (KITSON *et al*, 2016).

Atualmente a FDM (modelagem por deposição fundida) é um dos tipos de impressão 3D mais difundido. Esse processo de fabricação baseia-se na fusão de um material termoplástico que é ejetado por um bico extrusor, onde o material extrudado é depositado camada por camada que se solidifica em uma plataforma formando um objeto desejado (CARDOSO *et al*, 2018), o funcionamento da FDM está representado na Figura 1.

FIGURA 1- Processo de impressão por modelagem de depósito de material fundido.



FONTE: (CAPATTO, 2017)

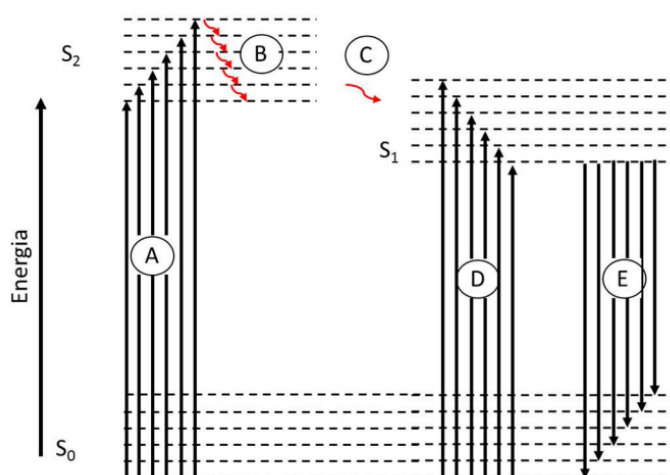
Dependendo das aplicações dadas aos objetos construídos, têm-se uma variedade de insumos que podem ser usados, em que os mais conhecidos são os polímeros:

acrilonitrila butadieno estireno (ABS), ácido polilático (PLA) e elastômero termoplástico (TPE). O ABS e PLA são materiais rígidos e leves que apresentam uma boa resistência e flexibilidade. O fato do PLA ser biodegradável torna esse material menos agressivo ao meio ambiente. Por outro lado, TPE é um material com comportamento semelhante à borracha com propriedades elásticas e flexíveis (CARDOSO *et al*, 2018).

1.1.3 Fluorescência Molecular

A absorção de energia por moléculas pode promover seus elétrons de um estado eletrônico fundamental (S_0) para níveis eletrônicos superiores de energia ($S_1, S_2, \dots S_n$), como é representado no diagrama de Jablonski na Figura 2 para os níveis S_1 e S_2 . Ao retornar ao seu estado fundamental os elétrons naturalmente liberam a energia absorvida (SOTOMAYOR *et al*, 2008). Durante esse processo pode ocorrer dois fenômenos; a relaxação não radioativa (transição vibracional ou conversão interna) ou a emissão de radiação eletromagnética de comprimento de onda característico para as espécies químicas, partindo sempre do menor estado vibracional de um determinado nível eletrônico excitado (S_n). A excitação das moléculas pode ocorrer de várias maneiras, mas a fluorescência ocorre assistida pela absorção de radiação eletromagnética (SKOOG, 2005).

FIGURA 2 - Diagrama de Jablonski. (A) excitação de $S_0 \rightarrow S_2$. (B) Transição vibracional dentro do mesmo estado eletrônico. (C) conversão interna. (D) excitação de $S_0 \rightarrow S_1$. (E) emissão fluorescente.



FONTE: (MOURA, H. S. R. P. 2016)

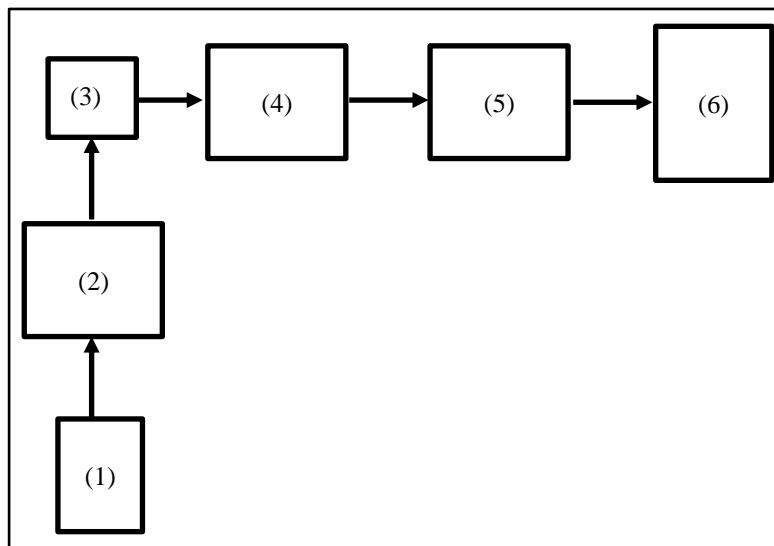
Na espectrofotometria de fluorescência molecular é medida a radiação fluorescente emitida pelas moléculas. Nessa técnica fótons energéticos, como aqueles da radiação ultravioleta (UV), são utilizados como fonte de excitação, com emissão de fótons em maiores comprimentos de onda, com aqueles presentes na região do visível. A relação entre a concentração das substâncias e a potência da fluorescência emitida pode ser representada por uma simples equação ($F = K c$), em que (F) é a intensidade da radiação fluorescente, (K) é uma constante que depende do rendimento quântico, depende também da potência da fonte de excitação, da absorvidade molecular, do volume a ser excitado e (c) é a concentração da espécie (INGLE, JR; CROUCH, 1988). A razão entre a quantidade de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos é chamada de rendimento quântico (ϕ_f), o seu valor máximo é 1, contudo, na prática geralmente é menor do que 1 porque algumas moléculas perdem parte de sua energia por desativação não radiativa (SKOOG, 2005, INGLE, JR; CROUCH, 1988).

A fluorescência de uma molécula depende muito de sua estrutura, nem todas as moléculas que absorvem radiação ultravioleta apresentam fluorescentes detectável. Compostos que contêm anéis aromáticos, insaturações, certos compostos carbonílicos, alicíclicos, estruturas rígidas, presença de heteroátomos doadores de elétrons apresentam potencial à fluorescência (SKOOG, 2005).

1.1.4 Instrumentação para fluorescência

Os instrumentos geralmente usadas para medidas de fluorescência são os fluorímetros e espectrofluorímetros, a diferença entre eles está no seletor de comprimento de onda, enquanto o primeiro tem apenas filtros o segundo tem 2 monocromadores, permitindo que o segundo gere um espectro de absorção e de fluorescência. A configuração típica desses tipos de equipamentos é mostrada na Figura 3. Em que (1) fonte de radiação de alta potência, (2) seletor de comprimento de onda, (3) cubeta para amostra, (4) seletor de comprimento de onda de emissão, (5) detector (6) processador e leitor de saída (SKOOG, 2005).

FIGURA 3 - Diagrama de blocos representativo de um instrumento para fluorescência.



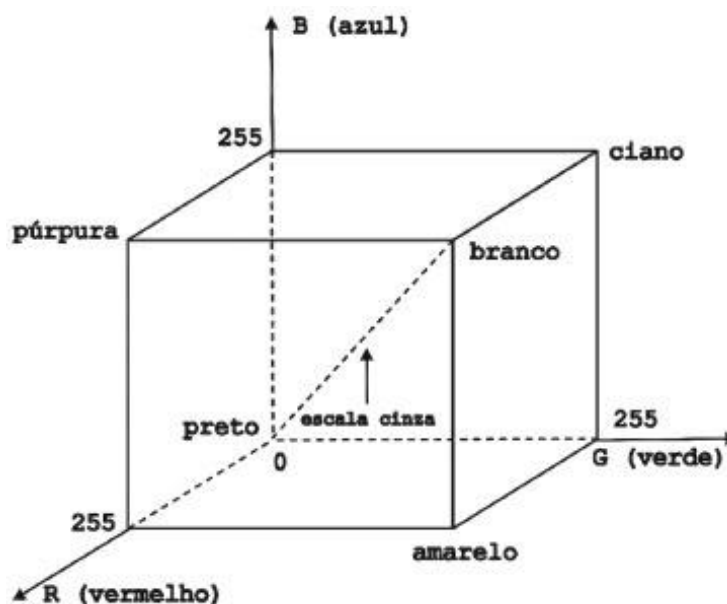
FONTE: (Própria)

1.1.5 Sistema padrão de cores RGB

A cor é o fenômeno visual provocado pela radiação eletromagnética na região do visível que é refletida em uma superfície. Alguns modelos de cores são usados para representar a combinação de vários comprimentos de ondas eletromagnéticas perceptíveis ao olho humano (FILHO, 2015). O espaço de cores RGB é sem dúvida um dos mais conhecidos, ele é baseado na combinação das cores primárias: vermelha (R), verde (G) e azul (B). Essa combinação pode ser feita de várias maneiras, o que permite obter mais de 16,7 milhões de cores diferentes ($2^8 \times 2^8 \times 2^8$) para um sistema de 8 bits. A Figura 4 apresenta o espaço tridimensional das cores, onde são dados valores de 0 a 255, onde 0 representa a ausência de cor e 255 é a intensidade máxima de cada cor ou canal. Esse modelo é muito utilizado em exibição de imagens em sistemas eletrônicos, como televisores, computadores e celulares (BENEDETTI, 2013).

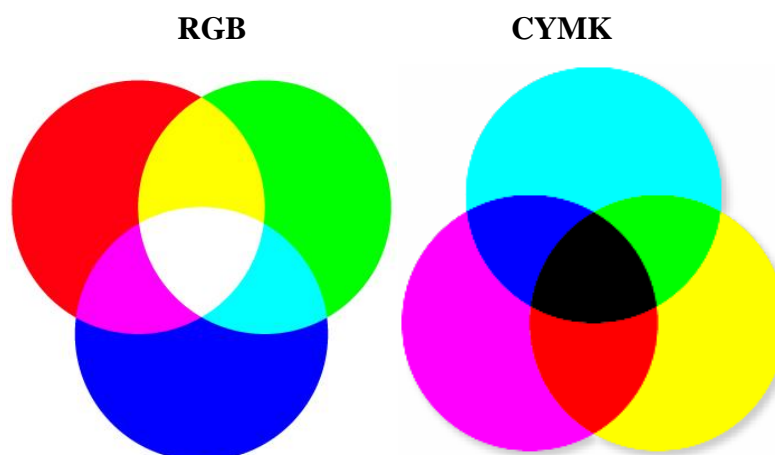
Outro modelo de cor muito usado é o CYMK é baseado no modelo das cores Ciano, Magenta e Amarelo (do inglês *Cyan, Magenta, Yellow*), diferente daquela do modelo RGB, sendo este sistema um modelo subtrativo. Esse modelo é muito utilizado em impressoras para formar a maioria das cores do espectro visível. A Figura 5 mostra que as cores secundárias do padrão de cores RGB são constituídas pelas cores Ciano, Magenta e Amarelo, e assim vice-versa (BENEDETTI, 2013).

FIGURA 4 - Representação gráfica do sistema padrão de cores RGB.



FONTE: (BENEDETTI, L. P. S. 2013)

FIGURA 5 - Representação ilustrativa dos sistemas de cores RGB e CMYK.



FONTE: (BENEDETTI, L. P. S. 2013)

Esses modelos de cores têm sido muito usados em química analítica, para quantificação de analitos em diversas matrizes, como alimentos e bebidas (BENEDETTI *et al*, 2015). Esses métodos fundamentam-se na variação proporcional dos valores de cores que pode tanto ser do modelo de cor RGB ou CMYK. Um exemplo é a determinação de Fe (II) usando o complexante ortofenantrolina, cuja coloração da reação é alaranja, e sua intensidade é proporcional a concentração de sulfito (BENEDETTI, 2013).

1.1.6 Imagens digitais em Química Analítica

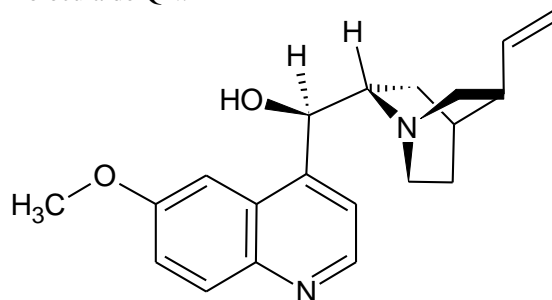
Métodos analíticos baseados em imagens digitais (*Digital Image Based* - DIB) têm sido muito aplicados em diversas áreas da ciência e, sobretudo em química. Avanços foram conseguidos nos últimos anos pela incorporação da tecnologia digital, pelo uso de dispositivos eletrônicos que são capazes de capturar imagens ou obter vídeos de reações colorimétricas (BENEDETTI *et al*, 2015) e ou luminescentes (MOURA *et al*, 2016). Entre os dispositivos mais utilizados têm-se: webcams (LYRA *et al*, 2009), câmeras fotográficas (BENEDETTI *et al*, 2015), aparelhos celulares com câmera embutida (FRANCO *et al*, 2016), scanners (VIDA, *et al*, 2018).

Diversas aplicações envolvendo o método DIB para detecções colorimétricas já foram relatadas em literatura. Pessoa *et al* (2017) desenvolveram um método para detecção de cobre em cachaça utilizando análise de imagens digitais de *Spot Tests*. Vida *et al* (2018) fizeram análises de corantes em matrizes alimentares utilizando um scanner de mesa para aquisição de imagens e posterior quantificação. Araújo *et al*. (2018) propuseram a detecção de adulterantes em *Euterpe oleracea* (Açaí) utilizando imagens digitais combinada à quimiometria.

1.1.7 Determinação de quinino (QN)

É um alcaloide com propriedades antimaláricas, anti-inflamatórias, analgésicas e relaxantes musculares (BULEANDRA *et al*, 2018). É usualmente comercializado em bebidas gaseificadas conhecidas como água tônica. Em grandes doses essa substância pode provocar alguns danos colaterais como: cinchonismo, erupções cutâneas, cardiotoxicidade rara, surdez, hipoglicemia, tontura e cegueira (AMPADU *et al*, 2018), sua estrutura molecular é apresentada na Figura 6.

FIGURA 6 - Estrutura da molécula de QN.



FONTE: (Própria)

A portaria n° 703/96 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece as concentrações entre 45 e 85 mg L⁻¹ de QN em água tônica. Por possuir propriedades fluorescentes o método analítico de referência é a espectrofotometria de fluorescência molecular (ALGAR *et al*, 2004; INFANTE *et al*, 2011). Porém, outros métodos já foram descritos na literatura para a determinação de QN, como, espectrometria de absorção atômica/ método indireto (YEBRA *et al*, 2000), voltametria (LIU *et al*, 2012; BULEANDRA *et al*, 2018), potenciometria (KAMEL *et al*, 2009), cromatografia líquida com espectrometria de massa (LC-MS) (GALLAY *et al*, 2018), cromatografia líquida com detecção de fluorescência UV-Vis (VICTORIA *et al*, 2005), cromatografia gasosa com espectrometria de massa (DAMIEN *et al*, 2006), cromatografia em fluído supercrítico com detector de PDA (MURAUER *et al*, 2018) e eletroforese capilar com detector DAD Detector de Arranjo de Diodos (do inglês *Detector Diode Array*) (XU *et al*, 2018). A Tabela 1 apresenta resumidamente dados obtidos de alguns dos métodos citados.

TABELA 1 - Comparação entre os métodos reportados em literatura para determinação de QN.

Técnica Analítica	Limite de Detecção (mg L⁻¹)	Faixa Linear (mg L⁻¹)	Frequência analítica (análises/min)	Amostra	Referência
Absorção atômica	2,00	5 - 110	2	Água Tônica	Yebra <i>et al</i> , 2000
Fluorimetria	2,30 x 10 ⁻³	0,05 - 100	1	Água Tônica	Infante <i>et al</i> , 2011
Potenciometria	1,2 x 10 ⁻³	16,22 - 324,42	1,17	Água Tônica	Kamel <i>et al</i> , 2009
Eletroforese Capilar (fotométrico)	0,32	1 - 500	0,33	Água Tônica e shampoo	Xu <i>et al</i> , 2018
Voltametria	0,78	0,19 - 39,15	—	Água Tônica	Buleandra <i>et al</i> , 2018
Cromatografia fluida supercrítica / Fluorimétrico	1,4	31,9 - 1020	0,03	Casca da Quina	Murauer <i>et al</i> , 2018

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Fazer detecção fluorimétrica do quinino em amostras comerciais baseada em imagens digitais, utilizando como suporte para as soluções fluorescentes, uma placa de *spot test* fabricada por tecnologia de impressão 3D.

1.2.2 Específicos

- Construir uma placa de *spot test* no modelo, dimensão e cor adequada para determinação fluorimétrica utilizando tecnologia de impressão 3D;
- Estudar e avaliar o potencial do uso de imagens digitais como detector de fluorescência em cavidades impressas;
- Verificar a exatidão, precisão e desempenho analítico da instrumentação proposta para a determinação de QN em amostras comerciais de bebidas e comparar os resultados obtidos com um fluorímetro convencional.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

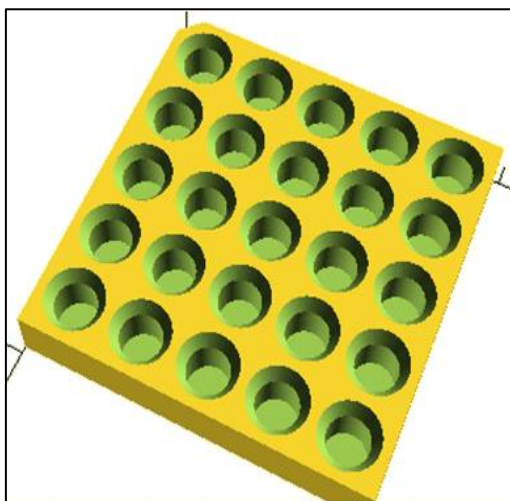
2.1 INSTRUMENTAL

2.1.1 Fabricação da placa de *spot-tests* por impressão 3D

Para a fabricação da placa de *spot test* foi usada uma impressora do tipo RepRap Prusa i3 (personalizada) com bico extrusor de 0,4 mm. A construção do dispositivo foi dividida nas seguintes etapas: desenvolvimento do modelo da placa, impressão e acabamento (suavização da superfície).

A primeira etapa consistiu no desenvolvimento de um modelo de dispositivo desejado. O programa computacional usado foi a versão livre 1.12.0 do OpenSCAD[®] 2015. Sendo assim, foi gerada uma placa com 5 x 5 cavidades, como mostrado na Figura 7.

FIGURA 7 - Modelo da placa projetada no programa OpenSCAD 2015 com bordas anguladas.



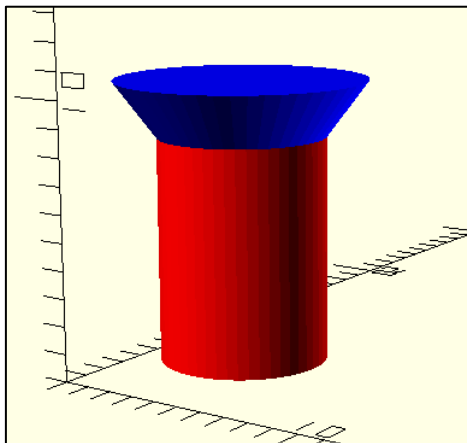
FONTE: (Própria)

As cavidades da placa foram projetadas para ter uma capacidade de 280 μ L, para isso, foi utilizado um cilindro de 8 mm de altura por 6 mm de diâmetro e um cone truncado de altura de 2 mm, base de 6 mm e topo de 9 mm, como mostrado na Figura 8. O fatiamento do objeto foi pela versão 1.2.9 do programa Slic3r.

Para a etapa de impressão foi usada a seguinte configuração: 3 camadas sólidas (parede, topo e base), 20% de preenchimento usando padrão retilíneo e velocidade de impressão de 20 mm por minuto e sem resfriamento do filamento extrudado. O filamento usado foi o ácido poliláctico (PLA) de cor preta. Prosseguindo a fabricação,

na terceira etapa foi utilizado o solvente acetato de etila para a suavização da superfície da placa para acabamento da peça, removendo imperfeições e rugas na superfície, para evitar efeito de memória.

FIGURA 8 - Modelo das cavidades da placa de *spot test*, feita por composição de um cilindro de 8 mm de altura por 6 mm de diâmetro e um cone de altura de 2 mm, base de 6 mm e topo de 9 mm.

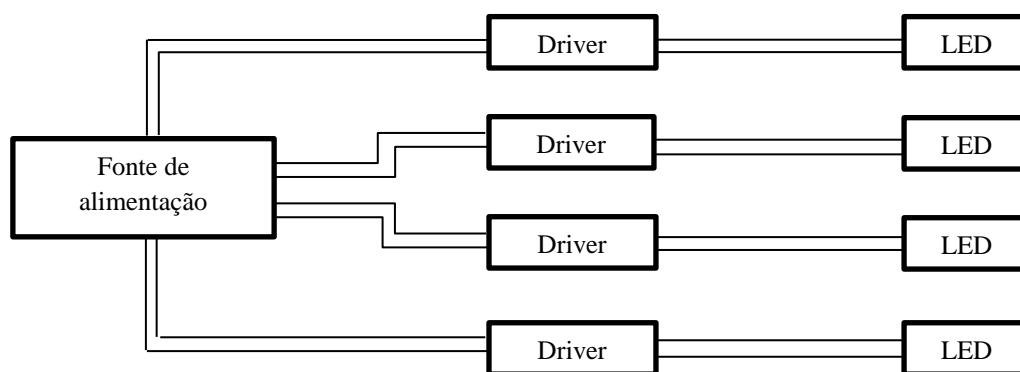


FONTE: (Própria)

2.1.2 Aparatos e instrumentação

Para a excitação das moléculas de quinino (QN) foram usados quatro LEDs UV (*Light Emitting Diode*) com emissão máxima em 365 nm, potência de 10 W (9 unidades internas de aproximadamente 1,1 W cada), com ângulo de abertura de 120 a 140 graus, consumo de 990 mA, alimentado por uma fonte de 10 A. Para o controle da corrente foi utilizado um driver que fornece 10 W de potência, numa tensão nominal de 12 V de entrada e saída com tensão de 9 a 12 V. A Figura 9 mostra um diagrama de blocos do circuito montado.

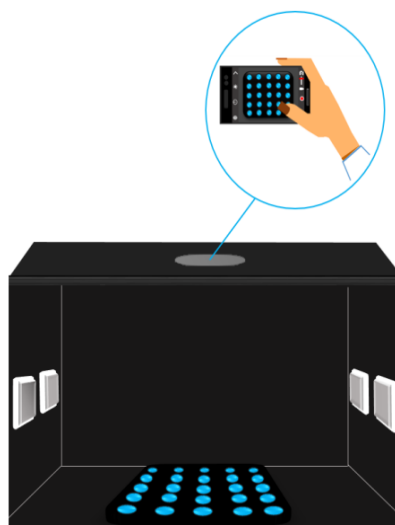
FIGURA 9 - Diagrama de blocos do circuito interno da câmara.



FONTE: (Própria)

A partir da escolha dos componentes, o circuito foi montado e condicionado em uma câmara de dimensões 11 x 7 x 9 (cm), de cor preta e com um orifício na parte superior para a detecção de fluorescência pelo *smartphone* (Lenovo K5 vibe, 13 megapixels), como é representado na Figura 10.

FIGURA 10 - Câmara com fontes de excitação para detecção fluorimétrica.



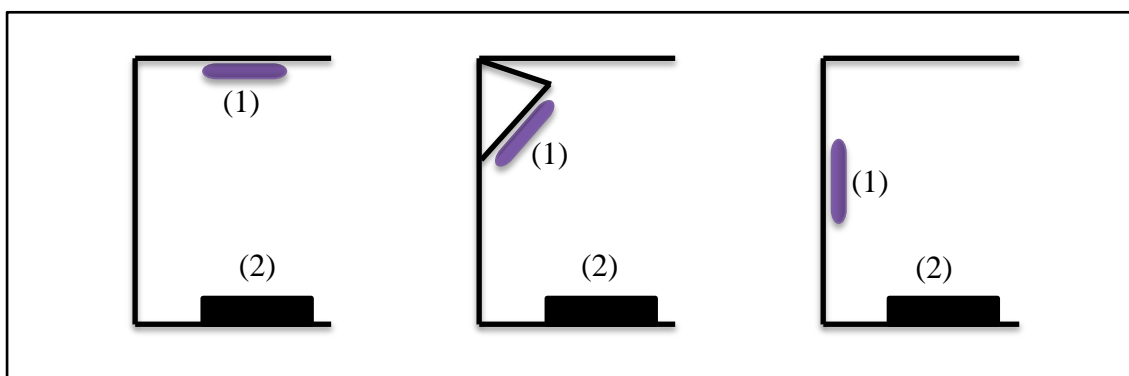
FONTE: (Própria)

Para obter um espectro de fluorescência do quinino foi utilizado um espectrofluorímetro composto por um monocromador da Action Research Corporation (SpectraPro[®] - 300i), larguras da fenda de entrada e saída de 1 mm e velocidade de varredura de 200 nm/min. O espectrofluorímetro é equipado com uma lâmpada de xenônio com potência de 150 W acoplado a um espectrômetro (Ocean Optics inc.) de comunicação via USB, controlado pelo software EspectraPro.

2.1.3 Otimização e calibração do sistema

Com a intenção de verificar a melhor relação linear entre a concentração e a intensidade de fluorescência e obter melhor precisão nas medidas foram estudados diferentes ângulos de posicionamento dos LEDs em relação a placa de *spot test* confeccionada em impressora 3D. Os ângulos de incidência analisados foram 180°, 135° e 90° em relação a placa (2), como mostrado na Figura 11. Logo após, foram analisados e comparados os parâmetros como a sensibilidade, a linearidade e o coeficiente de variação para as três configurações.

FIGURA 11- Ângulo de incidência da (1) fonte de radiação UV em relação à (2) placa 3D.



FONTE: (Própria)

2.2 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

2.2.1 Reagentes e amostra

Para o preparo das soluções padrões e amostras foi usada água ultrapura de (resistividade $> 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida do sistema Sinergy Millipore Milli-Q (EUA). Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e usado sem purificação. O padrão de QN foi obtido da Sigma-Aldrich (EUA) e o ácido sulfúrico da Isofar (Brasil). Foram escolhidas três amostras de águas tônicas (A1, A2 e A3), adquiridas em supermercados da região metropolitana de Belém-PA.

Uma solução padrão estoque de QN 27 mg L^{-1} foi preparada, e posteriormente acidificada e diluída utilizando uma solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ até alcançar o pH 1,2 para preparar cinco padrões de concentrações 0,5, 1,5, 2,5, 3,5, 4,5 mg L^{-1} . As bebidas foram previamente degaseificadas por aquecimento a 45°C usando uma chapa aquecedora. Posteriormente, as amostras foram diluídas na proporção 3 mL para 50 mL de água, e acidificadas usando a solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ até alcançar o

pH 1,2. Soluções com pH menor que 1,2 danifica a placa de PLA confeccionada e evitou-se portanto, tal condição.

2.2.2 Estudo de pH

O efeito do pH foi estudado para os valores 1,2, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 usando solução de ácido sulfúrico, como proposto por Infante e Masini (2011). Para tal, foi utilizado o padrão de QN na concentração de 2,5 mg L⁻¹. Foi considerada a maior intensidade de fluorescência aqueles que apresentaram maiores valores de RGB.

2.2.3 Estudo de interferentes

Um estudo dos potenciais interferentes foi feito para glicose, ácido tartárico e ácido cítrico, que são substâncias presentes nas amostras de água tônica. Uma solução de QN de 2,5 mg L⁻¹ em pH 1,2 foi utilizado. Variaram-se as concentrações dos possíveis interferentes nas seguintes proporções de concentração (Analito: Interferente) 1: 1 e 1: 10. Foi verificado se houve variação na intensidade de fluorescência da solução padrão de QN.

2.2.4 Adição e Recuperação

O método de adição e recuperação de analito foi realizado para verificar os possíveis efeitos de matriz nos resultados. As amostras de bebidas diluídas A1, A2 e A3 foram fortificadas com soluções padrões de QN nas concentrações 0,50, 1,50 e 2,50 mg L⁻¹. Cada amostra fortificada com os padrões foi realizada em triplicata, sendo utilizada 9 cavidades da placa para cada amostra. O cálculo de recuperação está apresentado na Equação 1. Após isso, foi calculado a média e o desvio padrão de recuperação para cada amostra.

$$\text{Rec}(\%) = \frac{\text{Valor Obtido}}{\text{Valor real}} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.5 Detecção fluorimétrica por imagens digitais

Para a detecção de fluorescência todos os poços da placa de *spot tests* foram preenchidos com os padrões em triplicata utilizando a micropipeta (LabMate). Todos os poços da placa foram adicionados com um volume de 280 µL com 5 concentrações

variando entre 0,50 e 4,50 mg L⁻¹. Foram utilizados 6 poços para as amostras de bebidas. A placa foi condicionada no interior da câmara para aquisição da imagem pelo *smartphone*.

2.2.6 Tratamento da imagem digital

As imagens capturadas foram analisadas usando o plug-in ReadPlate do programa livre ImageJ. Obteve-se os valores de cores Red (R), Green (G) e Blue (B) pelo programa. Todos os canais foram analisados e a partir dos dados adquiridos e foram feitos dois tipos de estudos. O primeiro estudo se baseou em valores diretos de RGB subtraídos do branco como apresentados nas equações (2, 3 e 4), onde RGB são os valores de cor adquiridos da emissão do QN e o RGB₀ são os valores de cor da solução sem QN (branco).

$$I_R = (R - R_0) \quad (2)$$

$$I_G = (G - G_0) \quad (3)$$

$$I_B = (B - B_0) \quad (4)$$

O segundo tratamento foi feito utilizando o calculo vetorial dado pela distância euclidiana como é mostrado na equação 5. Nesse tipo de estudo se leva em conta a variação de RGB simultaneamente.

$$[v] = \sqrt{(R - R_0)^2 + (G - G_0)^2 + (B - B_0)^2} \quad (5)$$

Os dados adquiridos foram exportados para planilha do OriginPro[®] 2016, os quais foram usados para traçar uma regressão linear correlacionando os dados de cores obtidos e suas respectivas concentrações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PLACA DE *SPOT TEST*

O filamento de PLA foi escolhido para a impressão das placas de *spot tests*, pois é biodegradável e, portanto, apropriado para os ensaios, pois havia a possibilidade de descarte das mesmas, caso os parâmetros como modelo, volume e resistência física e química não fossem apropriados para os experimentos. O polímero PLA tornou a placa mais leve e mostrou-se adequado para meios com pH entre 1,2 e 5. A Figura 12 mostra a placa feita com 25 cavidades que pôde contemplar etapas, tais como curva analítica, replicatas de amostras e o do branco simultaneamente, aumentando assim a frequência analítica. Suas bordas anguladas ajudaram a diminuir a efeitos da tensão superficial, pois esse efeito geralmente causava um efeito de sombreamento e reflexão na superfície da solução, sendo responsável pelo aumento da imprecisão dos resultados neste estudo.

FIGURA 12 - Fotografia da placa de *spot test* fabricado por impressão 3D em PLA com acabamento.



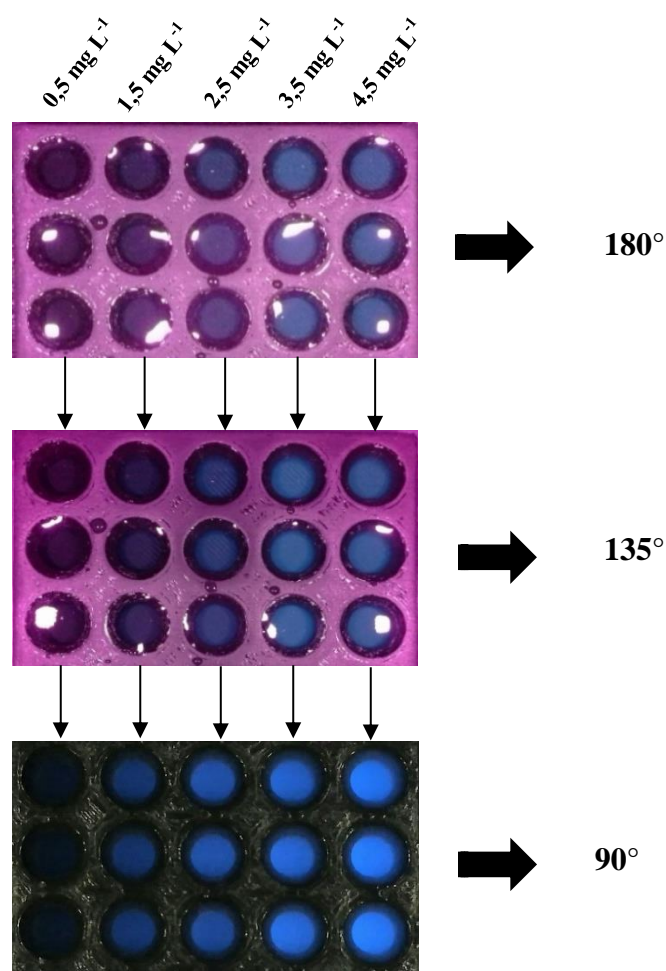
FONTE: (Própria)

Todas as vantagens citadas são frutos da versatilidade fornecida pela tecnologia de impressão 3D, pois com essa ferramenta foi possível confeccionar um dispositivo com as características desejadas para a análise em questão, o que seria dificultado se fosse utilizado às placas comercialmente vendidas de modelos já estabelecidos sem a possibilidade de modificação para sistemas específicos de análises. Também o material é leve, não apresenta vazamentos, e sem efeito de contaminação após o uso.

3.2 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA DE ANÁLISE

Foi feita uma avaliação preliminar utilizando uma curva analítica em relação ao canal azul (B) para estabelecer a posição mais adequada para os LED's em relação à placa de *spot test*. Os ângulos de incidência da radiação de excitação estudados foram 180°, 135° e 90°. A Figura 13 apresenta as imagens capturadas para cada configuração dos LEDs em relação a placa com os valores de concentração do QN variando de 0,5 a 4,5 mg L⁻¹.

FIGURA 13 - Placa de *spot test* em relação aos ângulos de incidência da radiação 180°, 135° e 90°



A partir disso foram comparados parâmetros analíticos da curva, tais como sensibilidade, linearidade e o coeficiente de variação para as três imagens mostradas Figura 13, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Parâmetros analíticos para escolha da melhor configuração dos LEDs.

Ângulo	Sensibilidade (sinal/mg L ⁻¹)	R ²	CV(%)
180°	14,18	0,727	29,75
135°	19,22	0,820	22,28
90°	58,03	0,998	2,60

As configurações correspondentes aos ângulos 180° e 135° apresentaram baixas sensibilidades de calibração, baixa precisão e um baixo coeficiente de correlação quando comparadas com os resultados obtidos na configuração com ângulo de 90°. Isso se deve ao fato da radiação incidente ter causado efeitos indesejados de reflexão e sombreamento nas superfícies de cada cavidade da placa, interferindo nos valores de RGB (sinal analítico). Sendo assim, configuração de 90° mais adequada para as análises seguintes.

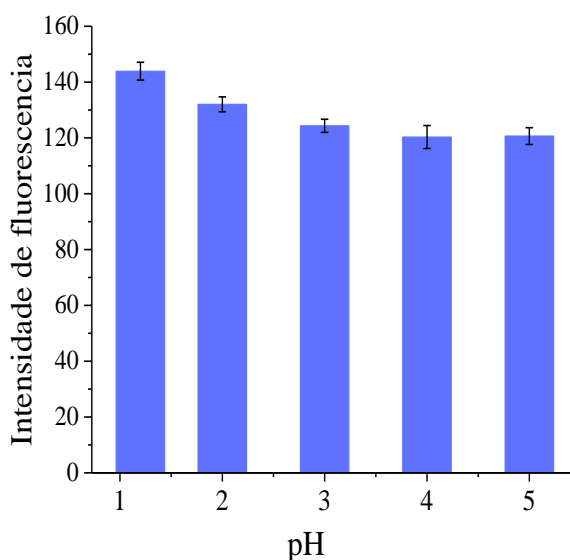
3.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

3.3.1 Estudo de pH

O estudo de pH está apresentado na Figura 14, mostrando que as intensidades de fluorescência variam em função do pH do meio. Essa variação ocorre devido a presença de dois átomos de nitrogênio nos anéis da molécula, onde esses heteroátomos atuam como bases de Lewis que podem sofrer protonação em meios ácidos, como o empregado aqui.

Pode ser observado na Figura 14 que a intensidade da fluorescência cresce com a diminuição do pH do meio. Portanto, o pH 1,2 foi selecionado para todas as análises.

FIGURA 14 - Estudo da dependência da intensidade fluorescente com pH.

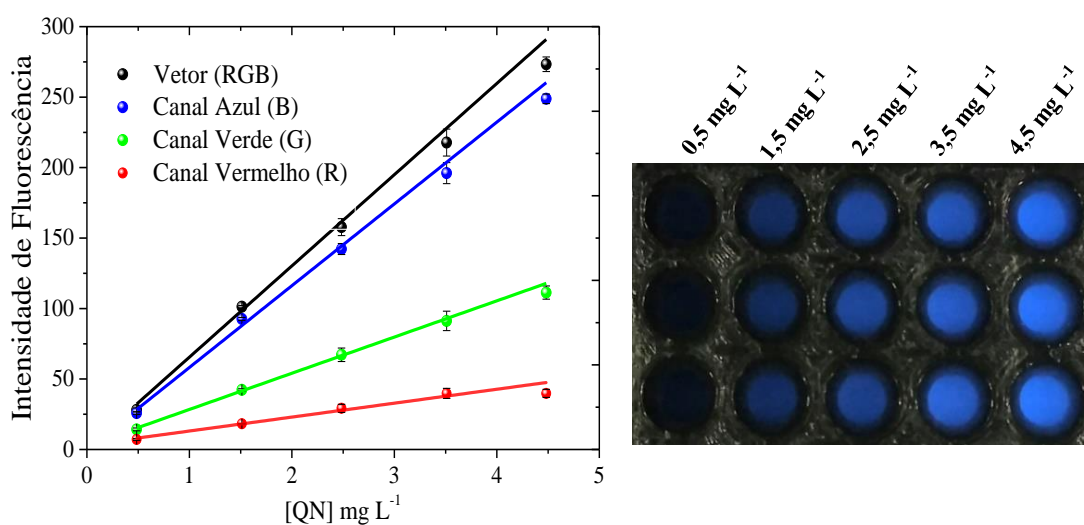


FONTE: (Própria)

3.3.2 Sinal analítico e tratamento de dados

Foram feitos dois estudos matemáticos para o sinal analítico, onde no primeiro foi utilizado os valores dos canais do vermelho (R), azul (B) e verde (G), como mostrado nas equações 2, 3 e 4. No segundo estudo foi utilizada a distância euclidiana (cálculo vetorial) como é mostrado na equação 5. A Figura 15 mostra as curvas analíticas de QN obtidas utilizando diferentes recursos matemáticos

FIGURA 15 - Curva analítica para o QN utilizando diferentes modelos matemáticos.



FONTE: (Própria)

Como pode ser observado na Tabela 3, os canais (G) e (R) apresentaram baixas sensibilidades de calibração com coeficientes de correlação 0,997 e 0,942, respectivamente. O canal (B) apresentou sensibilidade de calibração seis vezes maior, em uma faixa linear de 0,50 a 4,50 mg L⁻¹ e R² = 0,998, indicando boa linearidade e sensibilidade. Por outro lado, o vetor apresentou maior sensibilidade em relação a todos os canais, com sensibilidade de calibração de 64,74 (sinal/mg L⁻¹) e R² 0,990 como esperado, pois computa todos os dados do sistema RGB.

As pequenas barras de erro relacionadas aos pontos apresentados na curva analítica indicam uma boa repetitividade das medidas, expressas por coeficientes de variação que não excederam 3,8%.

TABELA 3 - Curva analítica de QN para os diferentes tratamentos matemáticos.

Parâmetros	R	G	B	Vetor
R ²	0,942	0,997	0,998	0,990
Sensibilidade (sinal/mg L ⁻¹)	9,88	25,69	58,03	64,74
CV (%)	8,95	6,13	2,60	3,36

A equação de regressão linear obtida pelo canal (B) foi $I_B = (58,03 \pm 0,72) * [QN] + (0,14 \pm 1,03)$. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando as expressões $3 \times \sigma / m$ e $10 \times \sigma / m$, onde σ é o desvio do branco e m é o coeficiente angular da equação da reta. Sendo assim os valores de LD e LQ foram 0,04 e 0,12 mg L⁻¹, respectivamente. Por outro lado, para o vetor a equação obtida foi $[v] = (64,74 \pm 1,06) * [QN] + (0,76 \pm 1,56)$, cujos LD e LQ foram 0,03 e 0,10 mg L⁻¹, respectivamente.

Por terem apresentado as melhores respostas analíticas tanto o canal azul (B) quanto o vetor foram usados para a quantificação das amostras A1, A2 e A3 e comparados com os resultados obtidos empregando um espectroflorímetro.

3.3.3 Estudo de interferentes

Alguns potenciais interferentes para a análise de QN em amostras de água tônica comerciais foram avaliados na seguinte proporção analito/interferente: 1:1; 1:10. Pode ser observado na Tabela 4 que ácido cítrico, ácido tartárico e glicose na proporção 1:1

não apresentaram interferência apreciável, sendo que os maiores valores encontrados ocorreram para as proporções 1:10. Contudo, os percentuais de interferência apresentaram resultados pouco relevantes. Portanto, não provocam erros significativos para as análises. Logo, não foi preciso eliminar essas substâncias presente nas amostras.

TABELA 4 - Estudo de interferentes com percentuais de interferência expressos como erro relativo (%).

Analito: Interferente	Glicose (%)	Ácido Tartárico (%)	Ácido Cítrico (%)
1: 1	0,15	0,64	1,00
1: 10	0,22	1,13	1,28

3.3.4 Método de adição e recuperação de analito

Com o objetivo de verificar os efeitos de matriz na determinação do analito, foram adicionadas concentrações padrões de 0,50; 1,50 e 2,50 e mg L⁻¹ de QN nas amostras de bebidas. A Tabela 5 mostra que o percentual de recuperação para as amostras variou de 94% a 110%, com média de 102%. Os resultados indicam um efeito insignificante da matriz sobre a quantificação de QN por fluorescência.

TABELA 5 - Teste de recuperação.

Amostras	Adicionado (mg L⁻¹)	Encontrado (mg L⁻¹)	Recuperado (%)
A1	0,50	0,47 ± 0,01	94,0
	1,50	1,66 ± 0,05	110
	2,50	2,70 ± 0,07	108
A2	0,50	0,48 ± 0,02	96,0
	1,50	1,51 ± 0,04	101
	2,50	2,60 ± 0,08	104
A3	0,50	0,51 ± 0,01	102
	1,50	1,46 ± 0,04	97,3
	2,50	2,55 ± 0,01	102

3.3.5 Determinação fluorimétrica de QN

Como apresentado no tópico 3.2.2 o canal azul (B) e o vetor apresentaram as melhores respostas em relação a concentração do analito. Por isso, essas duas formas de uso dos dados foram empregadas para as quantificações das amostras e comparados com os resultados obtidos utilizando um espectrofluorímetro. A Tabela 6 mostra os valores encontrados pelo espectrofluorímetro e pelo equipamento DIB utilizando o canal (B) e o cálculo vetorial.

TABELA 6 - Resultados obtidos para três amostras comerciais de água tônica, expressando a concentração de QN (C_{QN}) acompanhado do coeficiente de variação, que é uma estimativa do desvio padrão relativo.

Amostras	Espectrofluorímetro $C_{QN} \pm CV$ ($mg L^{-1}$)	DIB $C_{QN} \pm CV$ ($mg L^{-1}$)	
		Azul (B)	Vetor
A1	66,04 \pm 0,66	65,99 \pm 0,19	66,75 \pm 2,09
A2	39,35 \pm 0,36	39,42 \pm 0,10	40,21 \pm 0,69
A3	45,20 \pm 0,71	45,30 \pm 0,51	45,51 \pm 0,71

Pode ser observado que os valores obtidos entre os dois instrumentos estão bem próximos, logo uma análise mais aprofundada foi feita para validar estatisticamente os dados obtidos pelo equipamento DIB. As Tabelas 7 e 8 apresentam as comparações entre os resultados referentes a (Canal Azul / Espectrofluorímetro) e (Vetor / Espectrofluorímetro), respectivamente, obtidos a um nível de confiança de 95%.

TABELA 7 – Análise estatística dos dados obtidos entre o canal azul (B) e o Espectrofluorímetro.

Amostras	Espectrofluorímetro		Equipamento DIB (Canal Azul B)		Erro Relativo (%)	Teste t
	$C_{QN} \pm CV$ ($mg L^{-1}$)	CV%	$C_{QN} \pm CV$ ($mg L^{-1}$)	CV%		
A1	65,99 \pm 0,19	1,01	66,04 \pm 0,66	0,30	0,18	0,13
A2	39,42 \pm 0,10	0,93	39,35 \pm 0,36	0,25	- 0,08	0,33
A3	45,30 \pm 0,51	1,83	45,20 \pm 0,71	1,13	0,22	0,12

TABELA 8 – Análise estatística dos dados obtidos entre o Vetor RGB e o Espectrofluorímetro.

Amostras	Espectrofluorímetro		Equipamento DIB (Vetor RGB)		Erro Relativo (%)	Teste t
	$C_{QN} \pm CV$	CV%	$C_{QN} \pm CV$	CV%		
	(mg L ⁻¹)		(mg L ⁻¹)			
A1	65,99 ± 0,19	0,30	66,75 ± 2,09	3,14	1,07	0,21
A2	39,42 ± 0,10	0,25	40,21 ± 0,69	1,73	2,18	0,78
A3	45,30 ± 0,51	1,13	45,51 ± 0,71	1,57	0,69	0,27

Como pode ser observado nas Tabelas 7 e 8, tanto o canal azul quanto o vetor apresentaram valores de QN satisfatórios em relação ao equipamento comercial. Comparando os valores de erro relativo encontrados para o canal azul (B) e o vetor, observa-se que os menores valores ocorreram para o canal azul em que o maior valor de erro relativo foi de 0,22%. Mesmo assim, ambos apresentam ótima exatidão em relação ao espectrofluorímetro, tomado como referência.

Usando o cálculo vetorial, uma boa precisão das medidas foi obtida, de modo que, o maior valor de coeficiente de variação foi de 3,14%.

Os resultados obtidos pelos dois equipamentos foram estatisticamente comparados usando o teste *t* pareado com um nível de confiança de 95%. O maior valor de *t*(calculado) foi 0,78, bem inferior ao *t*(crítico) 2,57 para $n = 6$, como apresentado nas Tabelas 7 e 8. Portanto, não há diferença entre os dados obtidos a um nível de confiança de 95%. Assim, ambos os equipamentos fornecem resultados satisfatórios para a determinação de QN em amostras de água tônica.

Em comparação com o instrumento de referência foram observados alguns ganhos, tais como aumento da frequência analítica (10 análises min⁻¹ contra 2 análises min⁻¹), diminuição dos volumes de reagentes gastos, e conseqüentemente baixa geração de resíduos (280 µL contra 4000 µL por análise), maior sensibilidade de calibração (55 contra 40 (sinal/mg L⁻¹)). Baixo consumo de energia e portabilidade são outras características do método DIB, sendo estas características importantes para métodos considerados de Química Verde. Soma-se a estas características a redução dos custos de cada equipamento, onde aproximadamente 250,00 reais foram utilizados para confeccionar o dispositivo DIB fora um smartphone básico (500,00 reais), contra um espectrofluorímetro de 80.000,00 reais.

4. CONCLUSÕES

Com o uso da impressora 3D, foi possível fazer uma placa de *spot test* com reduzidas dimensões, e cor adequada para os testes fluorimétricos. O número de cavidades no dispositivo permitiu aumento da frequência analítica (10 análises min^{-1}), além da maior autonomia no processo. Com o modelo angulado das bordas das cavidades da placa 3D erros de precisão foram reduzidos drasticamente. A quantidade de reagente foi reduzida em 93% em comparação com o volume utilizado na cubeta tradicionalmente utilizada no espectrofluorímetro.

O método baseado em análise de imagem digital foi capaz de detectar e quantificar QN com boa precisão e exatidão, mostrando um bom desempenho com figuras de méritos comparáveis com o equipamento convencional. A construção do equipamento foi de baixo custo totalizando aproximadamente R\$ 750,00, valor 100 (vezes) menor que o valor de um espectrofluorímetro comercial usado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.; MARINHO, W.; GOMES, A. A. A Fast and Inexpensive Chemometric-Assisted Method to Identify Adulteration in Acai (*Euterpe oleracea*) Using Digital Images. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 1920 - 1926, 2018.

ALGAR, S. O.; MARTOS, N. R.; DÍAZ, A. M. Fluorimetric Flow-Through Sensing of Quinine and Quinidine. **Microchimica Acta**, v. 147, p. 211 - 217, 2004.

AMPADU, H. H.; DODOO, A. N. O. BOSOMPRAH, S.; AKAKPO, S.; HUGO, P.; GARDARSDOTTIR, H.; LEUFKENS, H. G. M.; KAJUNGU, D.; ASANTE, K. P. Safety Experience During Real-World Use of Injectable Artesunate in Public Health Facilities in Ghana and Uganda: Outcomes of a Modified Cohort Event Monitoring Study (CEMISA). **Drug Saf**, n. 41, p. 871 - 880, 2018.

BENEDETTI, L. P. S.; DOS SANTOS, V. B. SILVA, T. A.; BENEDETTI-FILHO, E.; MARTINS, V. L.; FATIBELLO-FILHO, O. A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages. **Analytical Methods**, v. 18, p. 7568 - 7573, 2015.

BENEDETTI, S. P. L. **Determinação em situ de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de spot tests**. Universidade de São Carlos. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) Centro de Ciências e tecnologia Departamento de Química. São Carlos.

BULEANDRA, M.; RABINCA, A. A.; CHEREGI, M. C.; CIUCU, A. A. Rapid voltammetric method for quinine determination in soft drinks. **Food Chemistry**, v. 253, p. 1 - 4, 2018.

CARDOSO, R. M.; MENDONÇA, D. M.H.; SILVA, W.P.; SILVA, M. N. T.; NOSSOL, E.; DA SILVA, R. A. B.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 1033, p. 49 - 57, 2018.

CAPATTO, T. **Maior velocidade em impressoras 3D de FDM**. Disponível em: <mpressao3dprinter.com.br/blog/2017/04/06/maior-velocidade-em-impressoras-3d-de-fdm/>. Acesso em: 21 de nov, 2018.

CAPITAN-VALLVEY, L. F.; LOPEZ-RUIZ, N.; MARTÍNEZ-OLMOS, A.; ERENAS, M. M.; PALMA, A.J. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 899, p. 23 - 56, 2015.

CHEMELLO, E. Ciência Forense: Manchas sangue. **Química virtual**. 2007.

COCOVI-SOLBERG, D. J.; WORSFOLD, P. J.; MIRO, M. Opportunities for 3D printed millifluidic platforms incorporating on-line sample handling and separation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 13 - 22, 2018.

COLTRO, W. K. T.; PICCIN, E.; EMANUEL C. DE JESUS D. P.; da SILVA, J. A. F. da SILVA, H. D. T.; do LAGO, C. L. Microsistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p.1986 - 2000, 2007.

CUNHA A. F.; LAGE, A. D.; PEREIRA e ARAÚJO M. M.; SANTOS R. D. P.; RESENDE G. M.; CERQUEIRA M. M. O. P. Avaliação da qualidade microbiológica de bebida láctea e creme de leite UAT por ATP-Bioluminescência. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.2, p.595 - 600, 2013.

DAMIEN, R.; DAVAL, S.; SOUWEINE, B.; DETEIX, P.; ESCHALIER, A.; COUDORÉ, F. Rapid gas chromatography/mass spectrometry quinine determination in plasma after automated solid-phase extraction. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, v. 200, p. 2528 - 2532, 2006.

de ASSIS, C. L. F.; **Microfresamento de aços com grãos ultrafinos**. 2013. 101f. Tese de doutorado. Departamento de Engenharia Mecânica. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2013.

DIAS, A. A.; CARDOSO, T. M. G.; CARDOSO, R. M.; DUARTE, LUCAS C. R.; MUNOZ, A.A.; RICHTER, E. M., COLTRO, W. K. T. Paper-based enzymatic reactors for batch injection analysis of glucose on 3D printed cell coupled with amperometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 226, p. 196 - 203, 2016.

DIAÑEZ, I.; GALLEGOS, C.; FUENTE, E. B.; MARTÍNEZ, I.; VALENCIA, C.; SÁNCHEZ, M. C.; DIAZ, M. J.; FRANCO, J.M. 3D printing in situ gelification of κ -carrageenan solutions: Effect of printing variables on the rheological response. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 321 - 330. 2019.

do LAGO, C. L.; FRANCISCO, K. J. M.; DANIEL, D.; VIDAL, D. T. R.; dos SANTOS, V. B. A capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry approach for the determination of monoalkyl carbonates. **RSC Advances**, v. 4, p. 19674 - 19679, 2014.

dos SANTOS, V. B. ; FAVA, E. L.; PESSOA-NETO, O. D.; BIANCHI, S. R.; FARIA, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. A versatile and robust electrochemical flow cell with a boron-doped diamond electrode for simultaneous determination of Zn^{2+} and Pb^{2+} ions in water samples. **Analytical Methods**, v. 6, n. 8526 - 8534, 2014.

FILHO, J. P.; **Análise de imagens digitais para fins analíticos: Aplicações ambientais e tecnológicas**. 2015. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual Paulista. Araraquara.

FONSECA, A.; JUNIOR, I. M. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; FERREIRA, L. O. S. Construction and evaluation of a flow injection micro-analyser based on urethane-acrylate resin. **Analytica Chimica Acta**, v. 603, p. 159 - 166, 2007.

FRANCO, M. O. K., SUAREZ, W. T., DOS SANTOS, V. B. Digital Image Method Smartphone-Based for Furfural Determination in Sugarcane Spirits. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 508 - 515, 2016.

GALLAY, J.; PROD'HOMC, S.; MERCIER, T.; BARDINET, C.; SPAGGIARI, D.; POTHINA, E.; BUCLINC, T.; GENTONA, B.; DECOSTERD, L. A. LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of seven antimalarials and two active metabolites in dried blood spots for applications in field trials: **Analytical and clinical validation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 154, p. 263 - 277, 2018.

GRIFFITHS, V.; SCANLAN, J. P.; ERES, M. H.; MARTINEZ-SYKORA, A.; CHINCHAPATNAM, P. Cost-driven build orientation and bin packing of parts in Selective Laser Melting (SLM). **European Journal of Operational Research**, v. 273, p. 334 - 352, 2019.

INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. Development of a Fluorimetric Sequential Injection Analysis (SIA) Methodology for Determination of Quinine. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 10, p. 1888 - 1893, 2011.

INGLE JR, J. D.; CROUCH, S. R.; **Spectrochemical Analysis**, Prentice Hall, Englewood Cliffs: New Jersey, 1988.

GROSS, B.; LOCKWOOD, S. Y.; SPENCE, D.M. Recent Advances in Analytical Chemistry by 3D Printing. **Analytical Chemistry**, v. 89, p. 57 - 70, 2017.

KAMEL, A. H.; SAYOUR, H. E. M. Flow-Through Assay of Quinine Using Solid Contact Potentiometric Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers. **Electroanalysis**, v. 24, p. 2701-2708, 2009.

KITSON, P. J.; GLATZEL, S.; CHEN, W.; LIN, C.; SONG, Y.; CRONIN, L. 3D printing of versatile reactionware for chemical synthesis. **Nature Protocols**, v. 11, n. 5, 2016.

LANSARD, M. **Categorias de tecnologias de impressão 3D**. Disponível em: <<https://www.aniwaa.com/3d-printing-technologies/>>. Acesso em 21 nov. 2018.

LIAO, Z.; WANG, J.; ZHANG, P.; ZHANG, Y.; MIAO, Y.; GAOD, S.; DENG, Y. GENGA, L. Recent advances in microfluidic chip integrated electronic biosensors for multiplexed detection. **Biossensores e Bioeletrônica**, v.121, p.272 - 280, 2018.

LI, L.; JIN, Y.; DONG, H.; YU, S.; XU, D. Structures, phase transformations, and dielectric properties of $\text{Bi}_2(\text{Zn}_{1-x}\text{Mg}_x)_{2/3}\text{Nb}_{4/3}\text{O}_7$ pyrochlore ceramics as temperature stable LTCC material. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 604, p. 31 - 35, 2014.

LIN, B.; YU, Y.; CAO, Y.; GUO, M.; ZHU, D.; DAI, J.; ZHENG, M. Point-of-care testing for streptomycin based on aptamer recognizing and digital image colorimetry by smartphone. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 100, p. 482 - 489, 2018.

LYRA, W S.; DOS SANTOS, V. B.; DIONÍZIO, A. G. G.; MARTINS, V. L.; ALMEIDA, L. F.; GAIÃO, E. N.; DINIZ, P. H. G. D.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U. Digital image-based flameemission spectrometry. **Talanta**, v. 77, p. 1584 - 1589, 2009.

LIU, L.; TAN, X.; FANG, X. SUN, Y.; LEI, F.; HUANG, Z.; Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer Film Prepared with Functional Abietic-Type Acids as Cross-Linker for the Determination of Quinine. **Electroanalysis**, v. 7, p. 1647-1654, 2012.

MOURA, H. S. R. P. **Uso de imagens digitais para detecção de luminescência em sistemas microfluídicos de análise**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.

MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: a Novel Concept for Chemical Sensing. **Sensors and Actuators**, p. 244 - 248, 1990.

MURAUER, A.; GANZERA, M.; Quantitative determination of major alkaloids in Cinchona bark by Supercritical Fluid Chromatography. **Jornal de Cromatografia A**. 1554 117 - 122. 2018.

PASANEN, T.P.; GASTROWA, G. V.; HEIKKINEN, I.T.S.; VÄHÄNISSI, V.; SAVINA, H.; PEARCE, J.M. Compatibility of 3-D printed devices in cleanroom environments for semiconductor processing. **Materials Science in Semiconductor Processing**. v. 89, p. 59 - 67, 2019.

PESSOA, K. D.; SUAREZ, W. T.; DOS REIS, M. F.; FRANCO, M. O. K.; MOREIRA, R. P. L.; DOS SANTOS, V. B. A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, n. 310 - 316, 2017.

SOUZA, F. R.; JUNIOR, G. F. D.; GARCIA, P. T. COLTRO, W. K. T.; Avaliação de dispositivos de captura de imagens digitais para detecção colorimétrica em microzonas impressas. **Química Nova**, v.37, n.7, p.1171 - 1176, 2014.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; COUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, 2005.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DIAS, I. L. T.; LANZA, M. R. V.; MOREIRA, A. B.; KUBOTA, L. T. Aplicações e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**. v.31 n.7, p. 1755 - 1774, 2008.

SUAREZ, W. T.; PESSOA-NETO, O. D.; DOS SANTOS, V. B.; DE ARAUJO N. A. R.; FARIA, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; PUYOL, M.; ALONSO, J. A compact miniaturized continuous flow system for the determination of urea content in milk. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 1525 - 1533, 2010.

SUAREZ, W. T. PESSOA-NETO, O. D.; DOS SANTOS, V. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; FARIA, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; CHAMARRO, J. A. A Compact Miniaturized Flow System Based on Low-Temperature Co-fired Ceramic Technology Coupled to LED Mini-photometer for Determination of Dipyrone in Pharmaceutical Formulations. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, n. 5, p. 847 - 855, 2013.

TERRY, S. C.; JERMAN, J. H.; ANGELL, J. B. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. **IEEE Trans. Electron Devices**, ed. 26, 1979.

TREVISAN, M. G. **Aplicação de Métodos Quimiométricos de Ordem Superior e Fluorescência Molecular na Análise em Matrizes Biológicas**. 2003. 101f. Dissertação de mestrado- Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2003.

VIDA, M.; GARCIA-ARRONA, R.; BORDAGARAY, A.; OSTRÁ, M.; ALBIZU, G. Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis. **Talanta**, n. 184, p. 58 - 64, 2018.

VICTORIA F. SAMANIDOU, V. F.; EVAGGELOPOULOU, E. N.; PAPADOYANNIS, I. N. Simultaneous determination of quinine and chloroquine anti-malarial agents in pharmaceuticals and biological fluids by HPLC and fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 21 - 28, 2005.

XU, L.; ZHAO, W.; CHANG, R. ZHANG, G.; ZHANG, H.; CHEN, A.; Separation and determination of cinchona alkaloids by ligand-exchange capillary electrophoresis using a Cu (II)-l-lysine complex as selector. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 15, p. 1477 - 1483, 2018.

YEBRA, M.C.; CESPON, R.M. Automatic determination of quinine by atomic absorption spectrometry. **Revista Microchemical**, n. 65, p. 81 - 86, 2000.