

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Construção de dispositivos portáteis para determinação de conservantes e contaminantes em bebidas utilizando impressão 3D, spot tests e tratamento de imagens digitais

Gabriel Martins Fernandes

Uberlândia – MG

Fevereiro de 2022

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Construção de dispositivos portáteis para determinação de conservantes e contaminantes em bebidas utilizando impressão 3D, spot tests e tratamento de imagens digitais

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Aluno: Gabriel Martins Fernandes

Orientador: Prof. Dr. João Flávio da Silveira Petrucci

Área de Concentração: Química Analítica

Uberlândia – MG

Fevereiro de 2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

| | |
|--------------|--|
| F363 2022 | <p data-bbox="416 1247 1121 1447">Fernandes, Gabriel Martins, 1998- Construção de dispositivos portáteis para determinação de conservantes e contaminantes em bebidas utilizando impressão 3D, spot tests e tratamento de imagens digitais [recurso eletrônico] / Gabriel Martins Fernandes. - 2022.</p> <p data-bbox="416 1480 1106 1709">Orientador: João Flávio da Silveira Petrucí. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.162 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p data-bbox="416 1738 1075 1839">1. Química. I. Petrucí, João Flávio da Silveira, 1984-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Química. III. Título.</p> <p data-bbox="1214 1901 1315 1928">CDU: 54</p> |
|--------------|--|

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

| | | | | | |
|------------------------------------|--|-----------------|------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em: | Química | | | | |
| Defesa de: | Dissertação de Mestrado Acadêmico, 338, PPGQUI | | | | |
| Data: | Vinte e três de fevereiro de dois mil e vinte e dois | Hora de início: | 9:00 | Hora de encerramento: | 11:45 |
| Matrícula do Discente: | 12012QMI002 | | | | |
| Nome do Discente: | Gabriel Martins Fernandes | | | | |
| Título do Trabalho: | Construção de dispositivos portáteis para determinação de conservantes e contaminantes em bebidas utilizando impressão 3D, spot tests e tratamento de imagens digitais | | | | |
| Área de concentração: | Química | | | | |
| Linha de pesquisa: | Instrumentação Analítica e Preparo de Amostras | | | | |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Construção de plataformas ópticas portáteis, versáteis e de baixo custo para sensoriamento de vapores e gases em diferentes atmosferas | | | | |

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Conferência Web, link <https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/joao-flavio-da-silveira-petrucci>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Arnaldo Alves Cardoso, da Universidade Estadual Paulista; André Luiz dos Santos, da Universidade Federal de Uberlândia e João Flávio da Silveira Petrucci, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. João Flávio da Silveira Petrucci, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **João Flávio da Silveira Petrucci, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luiz dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Arnaldo Alves Cardoso, Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3325195** e o código CRC **49C0F497**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de Agradecer primeiramente a Deus por ter me ajudado e fortalecido nesses dois últimos anos, que foi um período extremamente desafiador

Agradecer a minha família que é minha base e sempre me apoia nos momentos de necessidade, em especial gostaria de agradecer a minha avó Margarida e minha irmã Anne Gabriele o apoio de vocês nesse período foi muito importante.

Agradecer a minha mãe Cynthia pelo apoio incondicional, que no período mais difícil da minha vida ela acreditou mais no meu sonho do que eu mesmo acreditava, e me incentivou a começar o mestrado com uma frase que me marcou muito “Gabriel você não tem nada a perder indo fazer a prova para ingressar no mestrado”, e o fato de estar finalizando essa dissertação mostra que ela estava certa eu realmente não perdi nada, pelo contrário só estou mais próximo de realizar o meu sonho profissional.

Agradecer ao meu orientador Prof. Dr. João Flávio da Silveira Petrucci, que no momento que eu estava passando por um período complicado foi paciente e compreensivo, e quando viu que eu precisava acordar também chamou para conversar e mostrou que eu precisava voltar a trabalhar e me empenhar mais. Além dos ensinamentos durante o mestrado, tenho como referência de profissional e exemplo de comprometimento com a ciência a ser seguido. E além de Orientador tenho como um amigo.

Agradecer ao Prof. Dr. Alex Domingues Batista, por ter aberto as portas do laboratório no período de iniciação científica e começado a me orientar no mestrado. Agradeço por todos os ensinamentos.

Gostaria de agradecer aos membros do Grupo de Instrumentação e Separações Analíticas (GRISA) por todos os cafés, conversas e momentos de descontração, e pelo apoio durante os trabalhos

Gostaria de agradecer a Diandra e a Weida, por todas as conversas e conselhos durante o mestrado, vocês ajudaram muito nos dias difíceis da pós graduação e vocês podem contar comigo para o que precisarem assim como pude contar com vocês.

Gostaria de agradecer aos amigos(as), Raul, Marília, Tiara, Deborah, Gaveni, Luis, Lara, Diego e Lucas, pelas conversas durante o almoço, os cafés, as partidas de

vôlei e momentos de descontração, isso foi muito importante para deixar o ambiente da pós graduação mais leve.

Gostaria de agradecer aos amigos Lucas, João Eduardo e Rafael, por todas as conversas e conselhos

Gostaria de agradecer aos amigos Rafael, Sthela, Alessandra, André, Arthur, Raquel e Eder, a amizade de vocês foi muito importante para mim nos últimos meses.

Agradecer aos amigos (as), Jafferson, Izac, Renan, Marcos, Janeffer, Renata, Breno, Guilherme e Isabela, gostaria de agradecer a amizade e apoio nos últimos meses

Agradeço a todos os docentes do Instituto de Química (UFU) que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional

Agradecer a Universidade Federal de Uberlândia pela estrutura oferecida

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida

Agradeço aos docentes Prof. Dr. Arnaldo Cardoso (UNESP) e Prof. André Santos (UFU), por aceitarem o convite para compor a banca examinadora.

RESUMO

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas abordagens para métodos colorimétricos foi destaque na área de química analítica. Isso se deve a popularização de dispositivos eletrônicos para aquisição de imagens digitais e sua utilização como promissores substitutos dos espectrofotômetros, equipamento clássico utilizado na colorimetria. A obtenção e utilização de imagens digitais para fins analíticos – aliado ao emprego do papel de filtro como plataforma reacional – possibilita o desenvolvimento de métodos quantitativos de baixo custo, miniaturizados, portáteis e de fácil aplicação. Nesse sentido, o trabalho proposto tem como objetivo o desenvolvimento de dois métodos analíticos de baixo custo para avaliar a presença de contaminantes e conservantes em bebidas relacionados aos parâmetros de qualidade. O primeiro método teve como objetivo a determinação de cobre (II) em amostras de cachaça utilizando uma reação colorimétrica realizada em spot test de papel. A utilização do papel como plataforma reacional possibilitou a utilização direta do reagente Na-DDTC sem a necessidade de extração do produto da reação com solvente orgânico. O método proposto apresentou limite de quantificação de 3 mg L^{-1} , faixa de trabalho entre 3 e 25 mg L^{-1} com $R^2 > 0,99$ e precisão ($n = 10$) de 2,9%. A exatidão do método foi avaliada em termos de recuperação e os resultados encontrados estiveram no intervalo de 90,1 a 109,5 %, mostrando que é possível aplicar o método proposto em amostras de cachaça. O segundo método desenvolvido teve como objetivo a determinação de sulfito em amostras de suco concentrado utilizando extração por volatilização e monitoramento da alteração do pH provocada pela interação entre SO_2 e indicadores ácido-base impregnados em papel de filtro. A técnica de impressão 3D foi utilizada para viabilizar a construção de uma plataforma para realização da etapa de micro extração por difusão gasosa (GDME) e as imagens digitais do sistema analítico foram obtidas aplicando um smartphone (Galaxy S20+). O método apresenta limite de quantificação de 5 mg L^{-1} , faixa de trabalho entre 5 e 90 mg L^{-1} com $R^2 > 0,99$ e precisão ($n = 5$) de 2,2%. A análise de amostras de suco concentrado apresentou valor de recuperação de 106,3 %, mostrando que é possível aplicar o método proposto para realização de medidas de sulfito em amostras de suco concentrado.

Palavras chave: Cobre, Sulfito, Imagens Digitais, Impressão 3D, Spot Tests.

ABSTRACT

In recent years, the development of colorimetric methods has gained attention again. This is due to the popularization of electronic devices for digital images acquisition, these devices are shown to be promising substitutes for the spectrophotometer, classic equipment used for colorimetric measurements. The use of digital images to perform colorimetric measurements enables the development of low-cost methods. To enable the miniaturization and development of portable platforms, it is possible to employ paper-based analytical devices as a reaction platform. The development of analytical methods for food quality control is very important to ensure quality parameters and detect possible contaminants. In this sense, the proposed work aims to develop two low-cost analytical methods to assess the presence of contaminants and ensure quality parameters in beverages. The first method aims to determine copper in sugarcane spirits samples using paper-based analytical devices. The use of paper as a reaction platform made it possible to use the Na-DDTC reagent, which in solution would need an extraction step with the appropriate solvent. The proposed method has a limit of quantification of 3 mg L^{-1} , linear range $3 - 25 \text{ mg L}^{-1}$ with $R^2 > 0.99$, precision ($n = 10$) 2.9%. When the method was applied to sugarcane spirit samples, it presented recovery values from 90.1 to 109.5%, showing that it is possible to apply the proposed method in samples of cachaça. The second method aims to determine sulfite in concentrated juice samples using paper based analytical devices, in addition to using the 3D printing technique to enable the construction of a platform to carry out the gas diffusion micro extraction (GDME) step. digital images to evaluate the colorimetric reaction were obtained by applying a smartphone (Galaxy S20+). The method has a quantification limit of 5 mg L^{-1} , linear range $5 - 90 \text{ mg L}^{-1}$ with $R^2 > 0.99$; precision ($n = 5$) 2.2%. And when applied to analysis of concentrated juice samples, it showed excellent recovery value of 106.9%. Showing that it is possible to apply the proposed method to perform sulfite measurements in concentrated juice samples.

Keywords: Copper, Sulphite, Digital Images, 3D-printing, Spot Test's.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Número de publicações por ano na plataforma Web of Science contendo os termos "colorimetric methods" e "smartphone" | 15 |
| Figura 2. Fluxograma para extração dos parâmetros de cor de um sistema analítico representado por um spot test utilizando o software ImageJ | 17 |
| Figura 3. Exemplo de representação digital de 8 bits de uma cor utilizando o modelo RGB | 18 |
| Figura 4. Representação espacial do espaço de cor HSV | 19 |
| Figura 5. Equações para obtenção dos valores do modelo de cor HSV a partir dos valores de RGB | 20 |
| Figura 6. Procedimento para impressão de spots em papel utilizando o método de impressão com jato de cera: (A) papel de filtro selecionado, (B) papel submetido a impressão, (C) Papel com spot após a etapa de aquecimento | 23 |
| Figura 7. Procedimento para o desenvolvimento de métodos colorimétricos com dispositivos analíticos baseados em papel e detecção a partir do tratamento de imagens digitais..... | 24 |
| Figura 8. Reação de Coordenação entre as espécies Na-DDTC e Cu^{2+} em solução | 31 |
| Figura 9. Avaliação da influência da concentração de Na-DDTC no sinal analítico do modelo de cor RGB..... | 32 |
| Figura 10. Influência do tempo de reação na magnitude do sinal analítico | 33 |
| Figura 11. Influência da concentração de etanol na magnitude do sinal analítico da reação | 34 |
| Figura 12. A) Representação das Imagens digitais obtidas após a reação entre Na-DDTC e cobre (II) e B) Curva analítica obtida para soluções padrão de cobre..... | 36 |
| Figura 13. Reações envolvidas no método de Monier-Williams. (I) Etapa de volatilização e geração de SO_2 . (II) Coleta de SO_2 gasoso por uma solução de peróxido de hidrogênio (III) Titulação da solução de Ácido Sulfúrico formado..... | 42 |
| Figura 14. Representação de um sistema de difusão gasosa. (A) antes do processo de difusão, (B) durante o processo de difusão, (C) Após o processo de difusão..... | 43 |
| Figura 15. Dispositivo desenvolvido e impresso em 3D para permitir a extração e coleta do SO_2 em spot test's de papel | 47 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Fluxograma com as etapas para obtenção e tratamento de imagens digitais. | 48 |
| Figura 17. Mosaico construído para a reação com os frames obtidos após 30 minutos de monitoramento. | 48 |
| Figura 18. Representação do equilíbrio do indicador ácido-base verde de bromocresol | 50 |
| Figura 19. Estrutura dos indicadores ácido base selecionados nesse trabalho; A) Verde de Bromocresol, B) Alaranjado de Metila, C) Azul de Bromotimol e seus respectivos pKas. | 51 |
| Figura 20. A) dispositivo construído com auxílio de impressão 3D para realizar o controle de luminosidade, B) Circuito utilizado para controlar a intensidade luminosa das fitas de LED | 52 |
| Figura 21. Dados obtidos do tratamento de imagens obtidas utilizando o flash do smartphone como fonte de iluminação para aquisição das imagens | 53 |
| Figura 22. Dados obtidos do tratamento de imagens obtidas utilizando o ambiente com iluminação controlada por fonte externa (LED) | 54 |
| Figura 23. Mosaico construído a partir da gravação da reação entre verde de bromocresol e uma solução de Na_2SO_3 50 mg L^{-1} , o frame que apresenta o ponto de saturação após 20 minutos de reação está destacado | 56 |
| Figura 24. Gráfico obtido utilizando os valores de R, G e B para o tratamento da imagem adquirida após a análise de solução de Na_2SO_3 50 mg L^{-1} durante 30 minutos. | 57 |
| Figura 25. Gráfico obtido utilizando a variável matiz (H) da mosaico obtido após após a análise de solução de Na_2SO_3 50 mg L^{-1} durante 30 minutos..... | 58 |
| Figura 26. Sobreposição do espectro de emissão do LED utilizado para controlar a luminosidade do ambiente, com o espectro de absorção do Verde de Bromocresol na cor 1. | 60 |
| Figura 27. Comparação entre o sinal obtido para o canal V, (A) solução de Na_2SO_3 5 mg L^{-1} . (B) solução de Na_2SO_3 90 mg L^{-1} | 61 |
| Figura 28. Mosaico obtido após a avaliação de uma solução de sulfito 90 mg L^{-1} . A) Indicação do ponto de saturação após 10 minutos de reação, B) Indicação do ponto de saturação após conversão da imagem para o espaço de cor HSV | 62 |
| Figura 29. Avaliação do tempo de saturação para o procedimento de determinação com diferentes concentrações de Na_2SO_3 | 63 |

| | |
|--|----|
| Figura 30. Curvas obtidas para cada tempo de saturação obtido após avaliação de diferentes concentrações de Na_2SO_3 | 64 |
| Figura 31. Imagens obtidas após a conversão para o espaço de cor HSV A) Alaranjado de Metila, B) Azul de Bromotimol, C) Verde de Bromocresol..... | 66 |
| Figura 32. Magnitude do sinal analítico calculado em função do parâmetro Luminosidade (V) para os indicadores ácido-base avaliados. | 67 |
| Figura 33. Magnitude do sinal para cada um dos spots de diferentes diâmetros e submetidos a determinação de sulfito..... | 69 |
| Figura 34. Curva obtida para soluções de Na_2SO_3 (5-90 mg L^{-1}) após 10 minutos de reação | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Métodos Analíticos colorimétricos desenvolvidos aplicando dispositivos analíticos baseados em papel e detecção utilizando imagens digitais | 25 |
| Tabela 2. Contaminantes para amostras de cachaça | 28 |
| Tabela 3. Parâmetros analíticos obtidos para o método proposto | 37 |
| Tabela 4. Determinação de cobre em amostras de cachaça | 38 |
| Tabela 5. Métodos que utilizam Na-DDTC para quantificação de Cu^{2+} | 38 |
| Tabela 6. Diferentes agentes de “sulfitação” aplicados na indústria alimentícia e seus respectivos INS (Sistema Internacional de Numeração) | 40 |
| Tabela 7. Parâmetros obtidos para curvas construídas com os sinais de R, G, B e V | 59 |
| Tabela 8. Curvas analíticas obtidas para cada tempo de saturação | 65 |
| Tabela 9. Figuras de Mérito | 70 |
| Tabela 10. Valores obtidos após o ensaio de adição e recuperação | 72 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| 1.1 | Métodos analíticos colorimétricos | 13 |
| 1.2 | Processamento e tratamento de imagens digitais para fins analíticos. | 15 |
| 1.3 | Construção de dispositivos microfluidicos em papel (μ PAD's) para o desenvolvimento de spot test's | 21 |
| 2 | OBJETIVOS | 26 |
| 2.1 | Objetivo geral | 26 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 26 |
| 3 | DISPOSITIVO ANALÍTICO BASEADO EM PAPEL PARA DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DE Cu^{2+} EM AMOSTRAS DE CACHAÇA | 27 |
| 3.1 | Introdução | 27 |
| 3.1.1 | Cachaça | 27 |
| 3.1.2 | Íon cobre (II) em cachaça | 28 |
| 3.1.3 | Materiais e Reagentes | 30 |
| 3.1.4 | Protocolo para análises de cobre | 30 |
| 3.2 | Resultados e Discussões | 30 |
| 3.2.1 | Otimização da reação de Dietilditiocarbamato de sódio com ions cobre em spot tests baseados em papel | 30 |
| 3.2.2 | Otimização da concentração de Na-DDTC e tempo de reação | 31 |
| 3.2.3 | Avaliação do efeito da concentração de etanol para formação do complexo Cu-DDTC | 33 |
| 3.3 | Figuras de mérito | 34 |
| 3.3.1 | Aplicação em amostras de cachaça | 37 |
| 3.4 | Conclusão | 39 |
| 4 | DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM BEBIDAS UTILIZANDO SPOT TESTS EM PAPEL E TRATAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS | 40 |
| 4.1 | Introdução | 40 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.1.1 | Aplicação de sulfito como conservante..... | 40 |
| 4.1.2 | Métodos Analíticos para quantificação de sulfito em amostras de alimentos | 41 |
| 4.1.3 | Micro-extração por difusão gasosa..... | 44 |
| 4.1.4 | Aplicação de Impressão 3D para construção de plataformas miniaturizadas..... | 44 |
| 4.2 | Materiais e métodos..... | 45 |
| 4.2.1 | Reagentes | 45 |
| 4.2.2 | Dispositivo para extração de SO ₂ | 46 |
| 4.2.3 | Captura e processamento de imagens | 47 |
| 4.2.4 | Protocolo de análise de sulfito..... | 48 |
| 4.3 | Resultados e Discussões | 49 |
| 4.3.1 | Princípio do método..... | 49 |
| 4.3.2 | Avaliação da fonte de iluminação para aquisição de imagens digitais .. | 51 |
| 4.3.3 | Escolha do espaço de cor | 54 |
| 4.3.4 | Otimização do tempo de reação..... | 61 |
| 4.3.5 | Avaliação e escolha do indicador Ácido-Base | 65 |
| 4.3.6 | Otimização do diâmetro do spot de papel | 68 |
| 4.3.7 | Figuras de Mérito do método de determinação de sulfito | 69 |
| 4.3.8 | Aplicação em amostras de suco concentrado | 71 |
| 4.4 | Conclusão..... | 72 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 74 |
| 6 | REFERÊNCIAS | 75 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Métodos analíticos colorimétricos

O desenvolvimento de métodos colorimétricos ganhou uma nova abordagem devido a possibilidade de construir sistemas de baixo custo, portáteis e de fácil manuseio por meio da utilização de dispositivos eletrônicos que são capazes de adquirir imagens digitais e a relação da intensidade de cor do sistema analítico com a concentração do analito. Dentre as diversas aplicações, é possível encontrar trabalhos relacionados as áreas de análise ambiental (JAIN *et al.*, 2019), bioanalítica (KANCHI *et al.*, 2018) e análises de alimentos (SHEINI, 2020).

Por definição, métodos colorimétricos têm como princípio a detecção de um analito em função da mudança de cor provocada a partir de uma reação química utilizando um reagente colorimétrico (YU *et al.*, 2019). A mudança de cor é gerada devido a interações intermoleculares entre analito e reagente tais como: Ligações dipolo-dipolo, transferência de carga $\pi-\pi^*$ e interações ácido-base. A diversidade de interações intermoleculares que podem ser exploradas aplicando reações colorimétricas possibilita a análise de uma maior variedade de analitos (LI; ASKIM; SUSLICK, 2019). Portanto, para que um método baseado em reações colorimétricos seja utilizado, é necessário escolher um reagente adequado, a partir da afinidade seletiva do analito pelo reagente. Existem algumas classes de reagentes colorimétricos, tais como: indicadores ácido-base, precipitados metálicos, reagentes solvatocrômicos, indicadores redox, agentes de complexação, entre outros (LI; ASKIM; SUSLICK, 2019)

Reações químicas que produzam mudança de cor podem ser utilizadas tanto de forma qualitativa quanto quantitativa. Métodos qualitativos são utilizados para identificar algum analito de interesse em uma amostra. Um dos pioneiros nessa área foi o Professor Fritz Feigl (ESPINOLA, 2004) que estudou a reatividade de analitos orgânicos (FEIGEL; ANGER, 1973) e analitos inorgânicos (FEIGL; OESPER, 1972) utilizando como substrato reacional o papel de filtro, esses métodos ficaram conhecidos como spot tests em papel. Métodos colorimétricos quantitativos relacionam a intensidade da cor, representada pela quantidade de luz absorvida pela solução contendo o reagente colorimétrico com a concentração do analito. A maneira mais convencional de se medir a quantidade de radiação transmitida ou absorvida por de uma solução é a utilização da técnica de espectrofotometria de absorção no UV-

Vis. Essa técnica espectrométrica clássica se baseia na absorção de luz pela amostra após a incidência de radiação eletromagnética de comprimento de onda adequado. Por definição da lei de Lambert-beer, quanto maior a concentração da espécie absorvedora, maior será a quantidade de luz absorvida. A lei de Lambert-Beer (SWINEHART, 1962) pode ser representada de acordo com a equação 1. Na qual (A) é o valor de absorbância, (ϵ) absorvidade molar, (l) caminho óptico e (c) a concentração do analito.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (1)$$

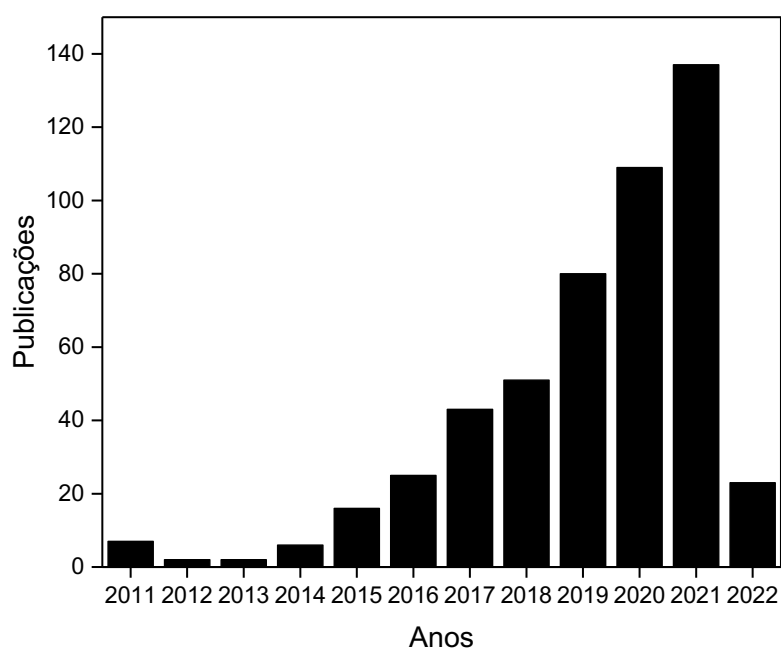
O primeiro espectrofotômetro foi construído em 1911, e tinha como princípio a detecção da luz transmitida a partir do efeito fotoelétrico, e a partir disso a utilização de espectrofotômetros em métodos colorimétricos popularizou-se a partir de 1926 (WILLARD, 1951). Apesar de apresentar boa sensibilidade e robustez, um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis é um equipamento relativamente caro. A partir disso alguns autores propuseram formas miniaturizadas de realizar medidas de absorbância. Dentre muitos autores que se dedicaram a essa construção, BUI e HAUSER, 2015 desenvolveram uma plataforma que possibilita leituras de absorbância utilizando um arranjo de LEDs em diferentes comprimentos de onda e fotodiodos. Recentemente, BARRETO *et al.*, 2021 desenvolveram um tutorial de como construir um fotômetro e fluorímetro utilizando LED e outros dispositivos optoeletrônicos de baixo custo.

Uma abordagem desenvolvida recentemente para se obter informação quantitativa de métodos colorimétricos é utilizando dispositivos de aquisição de imagens digitais, tais como webcams, smartphones, scanners de mesa, entre outros (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2015). A partir da análise e processamento das imagens digitais obtidas é possível obter informações analíticas relacionadas a cor da amostra analisada e, conseqüentemente, essa finalidade permitiu uma nova abordagem para a aplicação de métodos colorimétricos.

1.2 Processamento e tratamento de imagens digitais para fins analíticos

O número de trabalhos na literatura que reportam o desenvolvimento de métodos colorimétricos utilizando dispositivos para aquisição de imagens digitais como detector cresceu bastante na última década. Para demonstrar isso, a Figura 1 apresenta um gráfico que foi gerado a partir dos dados obtidos utilizando a base de dados web of Science procurando pelos termos “colorimetric methods” e “smartphone”.

Figura 1. Número de publicações por ano na plataforma Web of Science contendo os termos "colorimetric methods" e "smartphone"



Fonte: Web of Science

Como citado anteriormente, a aquisição de imagens digitais pode ser realizada utilizando câmeras digitais, scanners, smartphones, entre outros dispositivos. Para que possa ser utilizado para fins analíticos, a imagem digital deve representar o sistema analítico em estudo, podendo este ser um frasco contendo uma solução, um papel impregnado, um dispositivo micro fluídico, dentre outros. Para realizar a captura de imagem, é necessário transformar a intensidade de luz que incide sobre o detector

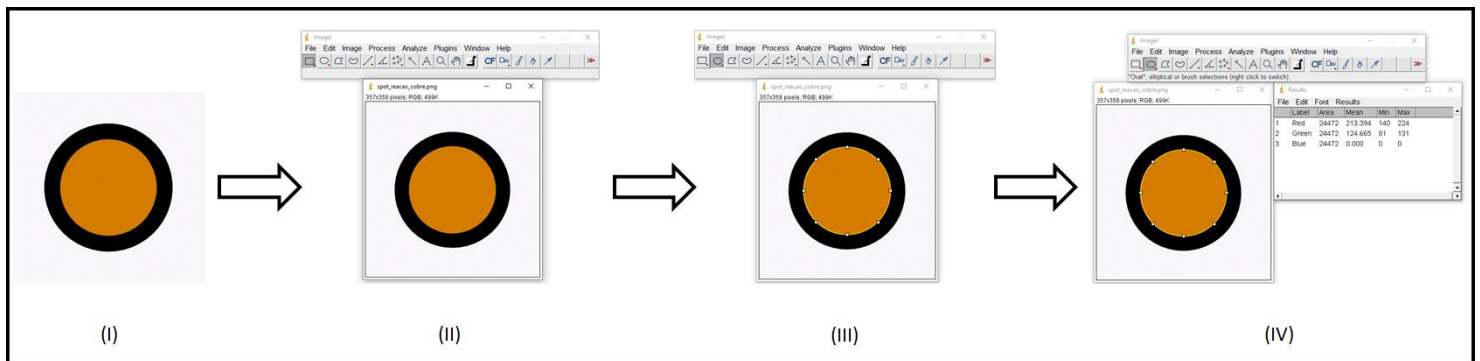
do dispositivo em corrente elétrica. Para isso, geralmente são utilizados sensores CCD (coupled charge devices) e sensores CMOS (complementary metal oxide sensors). Sensores CCD possuem três funções básicas: Coleta, transferência e transformação de carga (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2015). O sensor CCD é composto por um arranjo de pixels (menor unidade de imagem), onde a luz incidente será transferida sequencialmente por cada pixel com o objetivo de ser direcionada para o amplificador. Após a amplificação do sinal ele será direcionado até o processador onde irá ocorrer a conversão do sinal de intensidade de luz em corrente elétrica.(DRIVERS, 2001).

Os sensores CMOS possuem as mesmas funções de um sensor CCD, entretanto, o processo de transformação de luz em corrente elétrica e amplificação do sinal ocorre de forma diferente, nesses sensores a transformação e amplificação do sinal ocorre em cada pixel. Devido a isso, não é necessário um dispositivo separado para transformar e amplificar o sinal. Isso implica que sensores CMOS ocupam uma área menor e geralmente são utilizados em smartphones e dispositivos miniaturizados para obtenção de imagens digitais. Os sensores citados anteriormente conseguem apenas registrar a intensidade de luz que incide sobre cada um dos pixels, não conseguindo diferenciar o comprimento de onda da radiação incidente. Para possibilitar a construção de uma imagem digital colorida, cada pixel presente nos sensores CCD/CMOS apresenta um filtro de Bayern. Esse filtro utiliza o espaço de cor RGB (red, blue e green), que se baseia no funcionamento da visão humana para a construção de imagens coloridas. Esse modelo também é conhecido como “ modelo de Young-Helmholtz”(HELMHOLTZ, 1875).

Após a obtenção da imagem digital referente ao sistema analítico em estudo, é necessário efetuar a extração dos parâmetros de intensidade de cor para posterior utilização como sinal analítico. Para isso alguns softwares ou aplicativos (*apps*) podem ser utilizados, tais como imageJ, ColorGrab, Photometrix, entre outros. Esses programas fornecem informações a respeito da composição da cor que compõe a imagem digital, que é relacionada com o espaço de cor utilizado por aquele dispositivo. Os espaços de cor frequentemente aplicados são RGB (Vermelho(R), Verde(G), Azul(B)), CIE XYZ (Coordenadas de cromaticidade (X e Y), Luminosidade(Z)), HSV (Matiz(H), Saturação(S), Luminosidade(V)) e CIE LAB(Luminosidade(L), Mudança de verde para vermelho(A), Mudança de amarelo para azul(B)). Todos os espaços de cor

são derivados do modelo RGB. A Figura 2 apresenta um fluxograma demonstrando as etapas para obtenção dos parâmetros analíticos utilizando o programa ImageJ. (I) Obtenção da imagem digital do sistema analítico (II) seleção do arquivo da imagem no formato .jpeg .png). (III) definição da região de interesse (ROI). (IV) extração dos valores de intensidade de cor do modelo RGB.

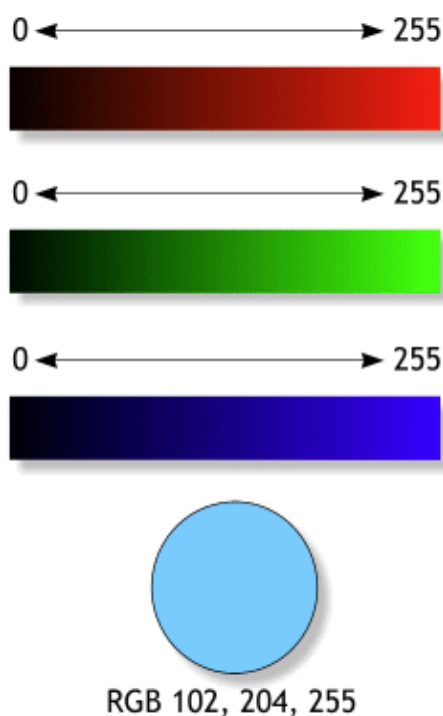
Figura 2. Fluxograma para extração dos parâmetros de cor de um sistema analítico representado por um spot test utilizando o software ImageJ



Fonte: O Autor

Como mencionado, o espaço de cor RGB é o mais aplicado em dispositivos de captura de imagem. Isso ocorre devido a associação do filtro de Bayer a sensores CMOS/CCD o que gera a resposta em função dos canais RGB. Cada um dos canais RGB são representados digitalmente por uma informação digital contendo 8 bits ($2^8 = 256$ informações), no qual o valor 0 significa a ausência total de uma cor e o valor 255 representa a intensidade máxima de uma cor (YUSUFU; MILLS, 2018). A combinação dos 3 canais do modelo RGB pode gerar mais de 16 milhões de tonalidade de cores diferentes. Como exemplo tem-se o vermelho descrito pela combinação (255, 0, 0), verde descrito pela combinação (0, 255, 0) e a cor azul descrita pela combinação (0, 0, 255). A Figura 3 apresenta um esquema do funcionamento do sistema RGB

Figura 3. Exemplo de representação digital de 8 bits de uma cor utilizando o modelo RGB



Fonte: O Autor

É possível encontrar trabalhos na literatura que reportam a combinação entre métodos colorimétricos e a utilização do espaço RGB de uma imagem para fins analíticos (HELPER *et al.*, 2017; LIMA; NASCIMENTO; ROCHA, 2017; VIDAL *et al.*, 2018). Por exemplo, MARINHO *et al.*, 2019 desenvolveram um método para quantificação da porcentagem de etanol em amostras de bebidas destiladas, o método se baseia na descoloração do reagente fenolftaleína à medida que a concentração de etanol aumenta, a descoloração foi monitorada com um smartphone e o sinal analítico foi relacionado com a intensidade do canal G (Verde) do espaço RGB. SOARES *et al.*, 2019 desenvolveram um método para quantificação do teor de metanol em amostras de biodiesel, a concentração de metanol foi monitorada a partir da formação de um complexo violeta após etapa de derivatização aplicando o reagente de schiff. O produto da reação foi monitorado utilizando um smartphone, e o sinal analítico foi relacionado com a intensidade do canal G (Verde) do espaço RGB.

Outro espaço de cor que pode ser utilizado para obtenção de informação analítica é o modelo HSV, que tem como princípio três variáveis: Matiz (H), Luminosidade (V) e Saturação (S). A matiz está relacionada com o comprimento de

Figura 5. Equações para obtenção dos valores do modelo de cor HSV a partir dos valores de RGB

$$\begin{aligned}
 C &= M - m \begin{cases} M = \max(R, G, B) \\ m = \min(R, G, B) \end{cases} \\
 H &= 60^\circ x \begin{cases} \frac{\left(\frac{G-B}{C}\right)}{6}, \text{ se } M = R, \forall C > 0 \\ \frac{\left(\frac{B-R}{C} + 2\right)}{6}, \text{ se } M = G, \forall C > 0 \\ \frac{\left(\frac{R-G}{C} + 4\right)}{6}, \text{ se } M = B, \forall C > 0 \end{cases} \\
 S &= \begin{cases} 0, \text{ se } C = 0 \\ \frac{C}{V}, \forall C > 0 \end{cases} \\
 V &= \max(R, G, B)
 \end{aligned}$$

Fonte: Adaptado de (ZAJC; TKALČIČ, 2003)

A aplicação desse espaço colorimétrico evita a influência da iluminação externa utilizada durante a obtenção da imagem (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2015). Vários trabalhos foram publicados explorando esse espaço de cor em métodos analíticos (ERENAS *et al.*, 2012; SHIN *et al.*, 2017; WANG, Y. *et al.*, 2018). KIM, J. Y.; YEO, 2016, desenvolveram um método para quantificação de *Escherichia Coli* em amostras de água. O método se baseia em uma reação Fenton que foi modificada para obtenção de um produto vermelho após a reação com microrganismos. A reação foi monitorada utilizando um scanner e o sinal analítico foi relacionado com a Matiz (H).

Após a avaliação e seleção de um reagente colorimétrico adequado e os diferentes dispositivos de aquisição de imagem que podem ser utilizados, é importante avaliar qual suporte para que o sistema analítico será aplicado. Na literatura é possível encontrar trabalhos de métodos colorimétricos nos quais utiliza-se uma cubeta como suporte para solução reagente (COUTINHO *et al.*, 2017) ou eppendorfs como uma alternativa de baixo custo (SOARES; ROCHA, 2020). Apesar de serem opções

interessantes, os dois suportes citados anteriormente precisam de volumes na escala de mililitros (mL), e para construção de dispositivos miniaturizados e redução do volume total de amostra, isso passa a ser uma desvantagem. Nesse cenário a utilização de dispositivos analíticos baseado em papel tem chamado atenção pela versatilidade, baixo custo e a possibilidade de se trabalhar na escala de microlitros (μL).

1.3 Construção de dispositivos microfluidicos em papel (μPAD 's) para o desenvolvimento de spot test's

A utilização de papel como substrato para a realização de reações colorimétricas foi bastante explorada por Fritz Feigl, como mencionado na seção anterior. Dispositivos analíticos baseados em diferentes tipos de papel construídos utilizando diferentes configurações têm chamado a atenção devido a possibilidade de desenvolver plataformas analíticas de baixo custo, versáteis, simples e descartáveis utilizando detecção colorimétrica (ALAWSI *et al.*, 2021; NGUYEN; KIM, 2020; RACICOT *et al.*, 2020), fluorométrica (TEENGAM *et al.*, 2021; WANG, C. *et al.*, 2020; WENG; NEETHIRAJAN, 2017) e eletroquímicas (PANRAKSA *et al.*, 2018; RUECHA *et al.*, 2017; SCORDO *et al.*, 2018). Além da versatilidade apresentada, o trabalho publicado pelo grupo do Prof. Whitesides (WHITESIDES, 2006) demonstraram que é possível construir dispositivos microfluídicos em papel para manipulação de fluidos por meio da confecção de barreiras hidrofóbicas. Esses dispositivos ficaram conhecidos como Dispositivos Microfluídicos em Papel (μPAD 's).

Os μPAD 's têm sido aplicados em diversos tipos de problemas analíticos, tais como: (i) análises ambientais: KHATHA *et al.*, 2019 desenvolveram um μPAD para avaliação de cianeto em águas residuais aplicando uma reação colorimétrica com nanopartículas de prata e ouro (Au@Ag NPs), (ii) análises clínicas: (WEAVER *et al.*, 2013) desenvolveram μPAD 's para quantificação de antibióticos beta-lactâmicos e medicamentos anti-tuberculose. O método se baseia na reação com diferentes reagentes colorimétricos com o objetivo de formar um “código de barras colorido”, que apresenta uma resposta para cada um dos analitos avaliados. (iii) controle de qualidade de alimentos, (SALVE *et al.*, 2018), desenvolveram um μPAD para a realizar o controle de qualidade de amostras de leite a partir da quantificação da concentração

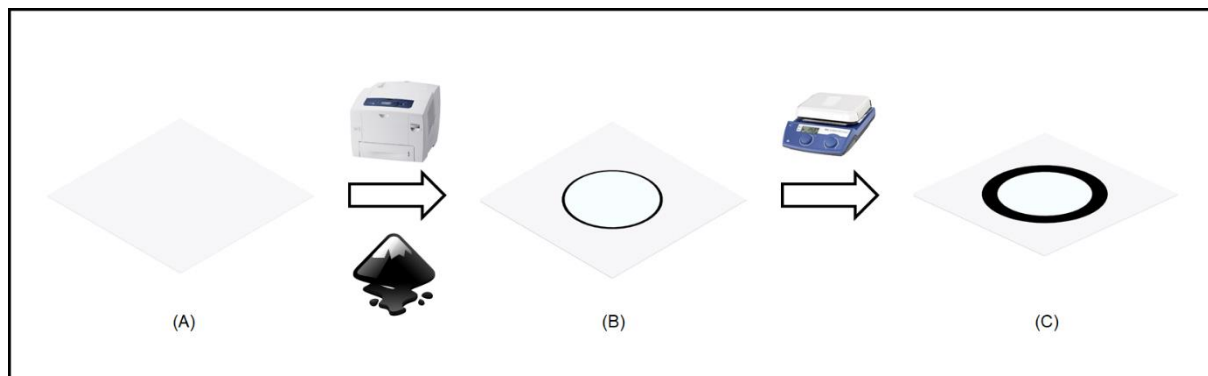
de amido, ureia, sal e detergentes. Todos os quatros analitos foram determinados aplicando reações colorimétricas.

Os μ PAD's podem ser construídos utilizando tipos diferentes de papel(FU; WANG, 2018), sendo os mais utilizados o papel de filtro convencional (GAN *et al.*, 2014), folhas de grafeno (YAO; PING, 2018) e papel cromatográfico (ZHANG *et al.*, 2019). Os dispositivos microfluídicos em papel podem ser fabricados de modo a manipular os fluidos de maneira conveniente e se baseiam na construção de barreiras hidrofóbicas de geometrias adequadas e que tem como objetivo garantir que o volume de amostra percorra a região desejada. O que possibilita que a solução percorra a região desejada é o efeito de capilaridade, que é a capacidade de um fluido se deslocar em tubos extremamente finos. No caso de dispositivos microfluídicos as barreiras hidrofóbicas em uma geometria adequada atuam como um tubo extremamente fino, possibilitando assim que a solução possa percorrer uma região desejada.

As barreiras hidrofóbicas podem ser construídas utilizando diferentes técnicas de fabricação (SRIRAM *et al.*, 2017). Entre elas se destacam a impressão com cera (CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009) a litografia (KAKOTI; SIDDIQUI; GOSWAMI, 2015), a impressão a jato de tinta (MALEKGHASEMI; KAHVECI; DUMAN, 2016), entre outras. Entre as técnicas citadas a impressão com cera tem sido a mais aplicada para a construção de barreiras hidrofóbicas, isso se deve ao fato de ser uma técnica rápida, eficiente e de baixo custo, uma vez que é possível imprimir vários μ PAD's em uma única folha de papel de filtro o que gera uma diminuição considerável nos custos do processo de produção.

Para a fabricação de dispositivos microfluídicos em papel pela técnica de impressão com cera, três etapas são necessárias: (i) design do dispositivo em um software que possibilite desenhar o formato desejado (e.g inkscape, paint, powerpoint). (ii) impressão do desenho sobre a superfície do papel escolhido; (iii) aquecimento entre 180 – 220 °C para que a cera se espalhe de forma adequada no papel, garantindo a criação das barreiras (CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009). A Figura 6 apresenta um fluxograma com as etapas citadas utilizando com exemplo um desenho na forma circular (spot test).

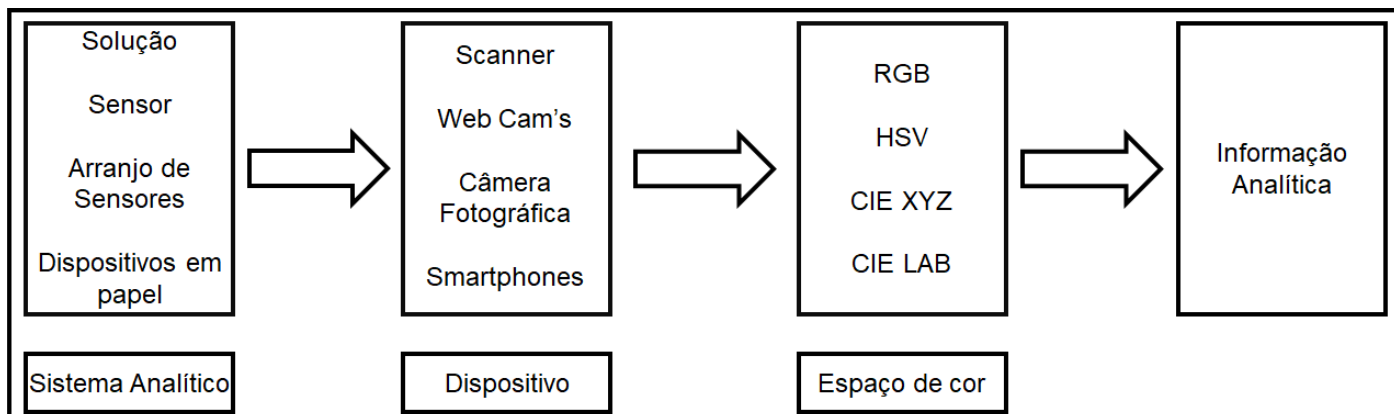
Figura 6. Procedimento para impressão de spots em papel utilizando o método de impressão com jato de cera: (A) papel de filtro selecionado, (B) papel submetido a impressão, (C) Papel com spot após a etapa de aquecimento



Fonte: Adaptado de (CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009)

Dessa forma, o desenvolvimento de métodos analíticos com dispositivos analíticos baseados em papel e quantificação a partir da obtenção e tratamento de imagens digitais deve seguir algumas etapas fundamentais que estão descritas na literatura (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2015): (i) escolha do sistema analítico que será empregado: Geralmente utiliza-se soluções, dispositivos baseados em papel ou outros tipos de substratos sólidos. Ainda, pode-se escolher utilizar um reagente colorimétrico específico ou um arranjo de sensores colorimétricos (ii) o dispositivo utilizado para obtenção de imagens digitais: Os dispositivos mais utilizados são scanners e smartphones, mas também é possível encontrar trabalhos que relatam a aplicação de câmeras digitais e webcams. (III) definição do espaço de cor aplicado para extração dos parâmetros analíticos. Os espaços de cor geralmente aplicados são; RGB, HSV, CIE XYZ e CIE LAB. A escolha do espaço está intimamente ligada com a cor do produto após a reação colorimétrica aplicada. (IV) Após a obtenção dos parâmetros analíticos é possível construir a curva analítica e obter os valores de concentração para o analito que está sendo avaliado. A Figura 7 apresenta um fluxograma com as etapas descritas.

Figura 7. Procedimento para o desenvolvimento de métodos colorimétricos com dispositivos analíticos baseados em papel e detecção a partir do tratamento de imagens digitais



Fonte: Adaptado de (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2015)

A combinação de dispositivos analíticos em papel e tratamento de imagens digitais possibilita o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e de baixo custo. A Tabela 1 apresenta métodos que foram desenvolvidos aplicando reações colorimétricas, dispositivos analíticos baseados em papel e detecção por imagens digitais. É possível notar que os métodos apresentam boa sensibilidade, além disso a aplicação é muito viável por conta da instrumentação de baixo custo aplicada. Destaca-se ainda a variedade de reagentes colorimétricos utilizados.

Tabela 1. Métodos Analíticos colorimétricos desenvolvidos aplicando dispositivos analíticos baseados em papel e detecção utilizando imagens digitais

| Analito | Reagente Colorimétrico | Dispositivo de detecção | Limite de detecção | Amostra | Referências |
|------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------|--|
| Lactoferrina | (5-Br-PADAP) | Scanner | 110 µg mL ⁻¹ | Soluções Padrão | (KUDO <i>et al.</i> , 2020) |
| Cr ⁶⁺ | DPC | Smartphone | 0,30 µM | Água | (ZHAI <i>et al.</i> , 2020) |
| Ketamina | HRP/TMB | Smartphone | 0,03 µg L ⁻¹ | Saliva | (CHEN <i>et al.</i> , 2019) |
| Fe ³⁺ | SCN ⁻ | Smartphone | 0,26 mg L ⁻¹ | Água | (BALASUBRAMANIAN <i>et al.</i> , 2021) |
| Dopamina | FeCl ₂ /Fenantrolina | Smartphone | 0,37 µM | Sangue Humano | (LIU, C. <i>et al.</i> , 2019) |
| SO ₂ | Indicador Ácido-Base | Smartphone | 20 mg L ⁻¹ | Melão e Abacaxi | (LIU, C. C. <i>et al.</i> , 2017) |
| Ca ²⁺ | Negro de Eriocromo | Scanner | 8,3 mg L ⁻¹ | Água | (OSTAD; HAJINIA; HEIDARI, 2017) |
| Mg ²⁺ | Negro de Eriocromo | Scanner | 1,0 mg L ⁻¹ | Água | (OSTAD; HAJINIA; HEIDARI, 2017) |
| As | Nano Partículas de Ouro | Scanner | 10 µg L ⁻¹ | Água | (CHOWDURY <i>et al.</i> , 2017) |
| Aldeídos | MBTH/Fe ³⁺ | Scanner | 6,1 µM | Saliva | (RAMDZAN <i>et al.</i> , 2016) |

5-Br-PADAP: 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol, MBTH: 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi o desenvolvimento de métodos analíticos colorimétricos portáteis e de baixo custo utilizando dispositivos analíticos baseados em papel e tratamento de imagens digitais para quantificação de contaminantes e conservantes para o controle de qualidade de bebidas.

2.2 Objetivos específicos

a) Desenvolvimento de um dispositivo analítico baseado em papel para determinação de Cu^{2+} em amostras de cachaça, utilizando reação colorimétrica e scanner para obtenção de imagens digitais.

b) Desenvolvimento de um método analítico colorimétrico para determinação de sulfito em amostras de suco, aplicando o processo de extração por difusão gasosa que será realizado em uma plataforma construída utilizando impressora 3D, para posterior detecção utilizando um smartphone para obtenção de imagens digitais.

3 DISPOSITIVO ANALÍTICO BASEADO EM PAPEL PARA DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DE Cu^{2+} EM AMOSTRAS DE CACHAÇA

3.1 Introdução

3.1.1 Cachaça

A cachaça é um produto obtido a partir da fermentação alcoólica do caldo de cana de açúcar e produzido no Brasil, com graduação alcoólica entre 38-48% (BORTOLETTO; ALCARDE, 2015). A cachaça é a bebida destilada mais consumida em território nacional e a quarta no mundo, sendo um produto muito significativo para a economia brasileira. Segundo o ministério da economia, o Brasil exportou 5.575.461 de litros em 2020, gerando US\$ 9.522.400,00 de dólares

A produção de cachaça pode ser conduzida de forma artesanal ou industrial, com diferenças relacionadas à quantidade de levedo utilizada e à coluna de destilação (SERAFIM; LANÇAS, 2019). No processo artesanal, o levedo “natural” não é suficiente para completar o processo de fermentação, sendo necessário efetuar a etapa “pé de cuba”. Durante essa etapa, “pó de arroz”, “farinha de milho” ou “semente de soja” são adicionados ao caldo de cana para garantir a quantidade de microrganismos necessários para finalizar o processo de fermentação, o que pode alterar as propriedades organolépticas do produto (SERAFIM; LANÇAS, 2019).

A cachaça produzida em escala industrial utiliza levedo modificado, que garante que haverá quantidade suficiente de microrganismos para finalizar o processo de fermentação, não sendo necessária a etapa “pé de cuba”. Outra diferença crucial é relativa ao sistema de destilação aplicado; enquanto processos artesanais utilizam alambiques de cobre, processos industriais utilizam colunas de destilação de aço inoxidável.

Diferentemente da cachaça artesanal, a cachaça produzida industrialmente não é submetida ao processo de envelhecimento em tonéis de madeira. O processo de envelhecimento aumenta o valor agregado das cachaças, conferindo características organolépticas específicas, inerentes à madeira utilizada no tonel selecionado. Essas características são principalmente devidas à degradação da lignina, que gera compostos de baixa massa molecular que afetam diretamente na composição química da cachaça (SILVELLO, 2021).

O controle de qualidade da cachaça é muito importante para assegurar que o produto está apropriado para o consumo. A Tabela 2 apresenta quais os possíveis

contaminantes que podem ser encontrados em amostras de cachaça e a concentração permitida de cada um deles.

Tabela 2. Contaminantes para amostras de cachaça

| Contaminante | Limite Legal |
|----------------------------------|---------------------|
| Álcool metílico ^a | 20 |
| Carbamato de etila ^b | 150 |
| Acroleína ^a | 5 |
| Álcool sec-butílico ^a | 10 |
| Álcool n-butílico ^a | 3 |
| Cobre (Cu) ^c | 5 |
| Chumbo (Pb) ^c | 0,2 |
| Arsênio (As) ^c | 0,1 |

Concentrações expressas em: a. mg/100 mL(álcool anidro), b. µg/L, c. mg/L

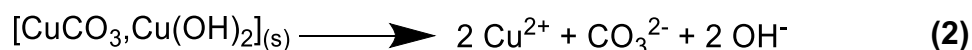
3.1.2 Íon cobre (II) em cachaça

A presença de cobre no organismo é essencial, uma vez que desempenha funções catalíticas e estruturais (KIM, B. E.; NEVITT; THIELE, 2008). Por conta da variedade de funções que o cobre desempenha, é muito importante que ele seja ingerido diariamente, sendo a quantidade recomendada de 2 a 5 mg por dia. Apesar do cobre ser essencial para o metabolismo humano, pode ser tóxico quando ingerido em concentrações elevadas.

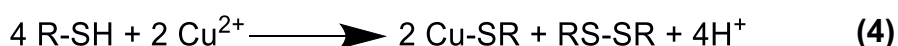
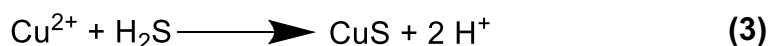
A intoxicação por cobre pode ocorrer de diferentes maneiras. Uma delas é a partir da doença de Wilson que gera um acúmulo de cobre no organismo, uma vez que não é excretado regularmente (BARBOSA *et al.*, 2009). Os sintomas incluem inchaço, fadiga, dor abdominal e movimentos descontrolados. Além disso, pode levar a quadros neurodegenerativos como doença de Alzheimer, Parkinson e doenças de Prion. Além da doença de Wilson, a intoxicação pode ocorrer através da ingestão de cachaças com altas concentrações de cobre.

A presença de íon cobre (II) em amostras de cachaça está relacionada a utilização de destiladores de cobre. Isso é resultado do processo de oxidação sofrido pelo metal durante o contato com o ar úmido rico em gás carbônico (GARBIN; BOGUSZ JUNIOR; MONTANO, 2005). Como produto dessa reação tem-se o Carbonato de Cobre alcalino ($[CuCO_3, Cu(OH)_2]_{(s)}$), popularmente chamado de

“Azinhavre”. O “Azinhavre” formado é dissolvido pelos vapores ácidos promovendo assim a solubilização de cobre em cachaça. A equação 2 apresenta a solubilização do azinhavre em cachaça (PINHEIRO; LEAL; ARAÚJO, 2003).



A presença de cobre(II) em cachaça em uma concentração que respeita os limites estipulados pela legislação, aumenta o valor agregado do produto final. O íon cúprico gerado a partir do azinhavre possibilita a oxidação do gás sulfídrico e das mercaptanas a sulfetos de cobre e dissulfetos, como mostrado nas equações 3 e 4.



Os produtos formados pelas reações 3 e 4 apresentam baixa solubilidade, assim minimizando a presença de derivados de enxofre será minimizada (BOZA; HORII, 2000). A presença de derivados de enxofre altera as propriedades organolépticas gerando odores desagradáveis na cachaça, o que causa uma diminuição no valor agregado do produto final (ISIQUE; CARDELLO; FARIA, 1998).

Para garantir que a concentração de cobre presente em amostras de cachaça esteja de acordo com os valores estipulados pela legislação, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) definiu como metodologia oficial a utilização da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica de Chama (FAAS). Apesar da alta sensibilidade, é uma técnica onerosa, que necessita de mão de obra especializada e não possibilita a realização de análises *in situ*. A partir do exposto, o desenvolvimento de métodos alternativos de baixo custo que possibilitem a realização de análises *“in situ”* são fundamentais.

A partir do exposto, a presente seção tem como objetivo demonstrar o desenvolvimento de um método rápido, barato e portátil a partir da aplicação de um dispositivo analítico baseado em papel. A quantificação será realizada a partir da intensidade de cor obtida pela formação do produto da reação entre Cu^{2+} e Dietilditiocarbamato de sódio (Na-DDTC).

3.1.3 *Materiais e Reagentes*

Os reagentes e padrões dietilditiocarbamato de sódio (Na-DDTC), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e etanol com grau de pureza para HPLC foram obtidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Soluções estoque 0,1 % de Na-DDTC e 1000 mg L^{-1} de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foram preparadas diariamente diluindo-se a massa adequada em água destilada. Papel de filtro (Whatman 41, Whatman, Millipore USA) foi utilizado para construção do dispositivo analítico em papel na forma de spot test. Amostras de cachaça foram adquiridas em supermercados locais. O design do dispositivo analítico em papel foi feito utilizando o software Inkscape, no qual o círculo referente ao spot test possui 15 mm de diâmetro e 1 mm de largura. A impressão foi realizada utilizando uma impressora com jato de cera (ColorQube 8580). Após a impressão o papel foi aquecido à $150 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 minutos utilizando uma chapa de aquecimento (GT-CAD5L).

3.1.4 *Protocolo para análises de cobre*

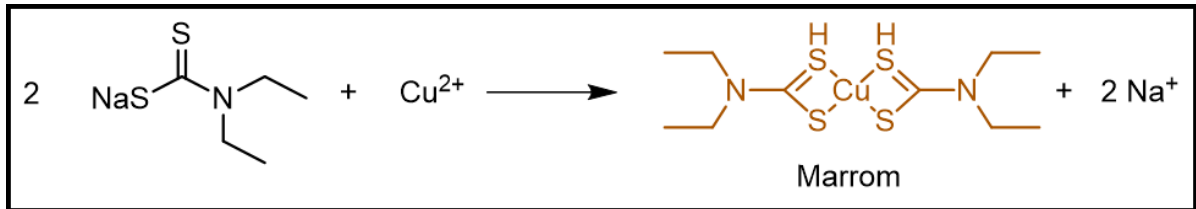
Uma alíquota de $20 \text{ } \mu\text{L}$ de amostra foi adicionada ao spot test de papel, seguido da adição de $40 \text{ } \mu\text{L}$ do reagente Na-DDTC. Após a adição da amostra e do reagente, esperou-se 5 minutos até que o papel de filtro estivesse seco para garantir que a intensidade máxima de cor da reação tenha sido obtida e não houvesse influência da umidade na aquisição da imagem. As imagens digitais foram adquiridas utilizando um scanner de mesa (HP Deskjet G4050) com resolução de 600 dpi. Parâmetros RGB foram extraídos utilizando o software ImageJ.

3.2 **Resultados e Discussões**

3.2.1 *Otimização da reação de Dietilditiocarbamato de sódio com ions cobre em spot tests baseados em papel*

A reação colorimétrica escolhida para quantificação de cobre em amostras de cachaça se baseia na formação de um complexo marrom entre íons Cu^{2+} e Na-DDTC. A estequiometria da reação é 1:2 com uma faixa de pH reacional ótima entre 4 e 11. O DDTC se coordena com o cobre através das duas moléculas de enxofre para formar um complexo estável com um anel de quatro membros. A Figura 8 apresenta a coordenação entre Cu^{2+} e DDTC.

Figura 8. Reação de Coordenação entre as espécies Na-DDTC e Cu^{2+} em solução



Fonte: O Autor

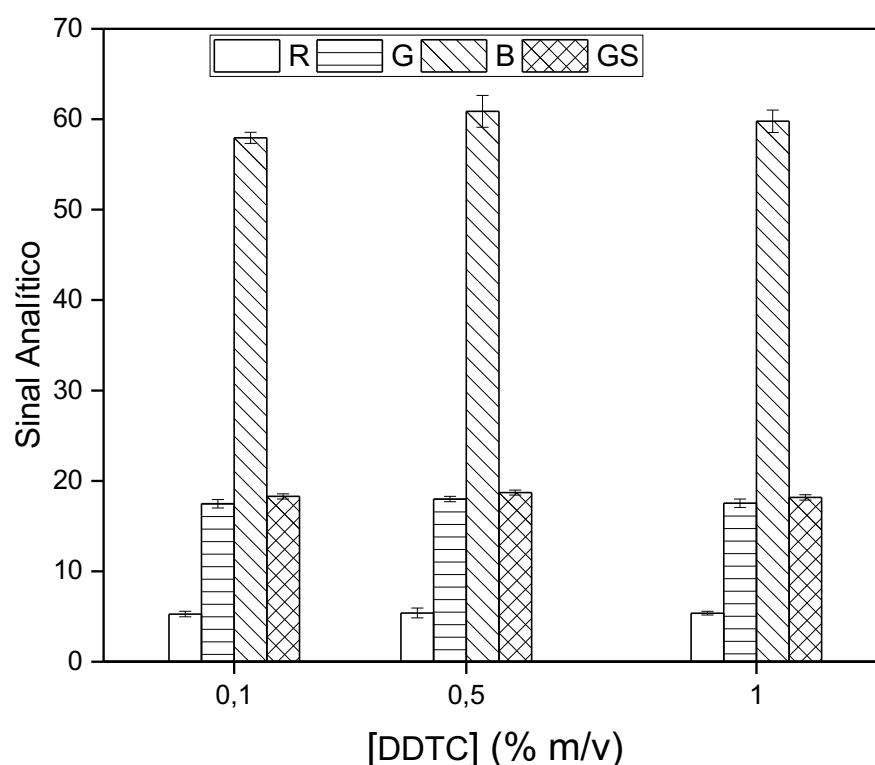
A principal desvantagem no desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos explorando a reação entre Cu^{2+} e Na-DDTC é a baixa solubilidade em água do produto formado. Devido a isso, faz-se necessário uma etapa de extração com o devido solvente orgânico antes de realizar a análise utilizando um espectrofotômetro convencional. A necessidade de uma etapa de extração torna o método pouco atrativo devido aos impactos ambientais gerados por conta do descarte de solventes orgânicos. Nesse cenário, o desenvolvimento de um dispositivo analítico baseado em papel que possibilita realizar a detecção colorimétrica do produto formado pela reação Cu^{2+} /Na-DDTC sem executar a etapa de extração é interessante.

3.2.2 Otimização da concentração de Na-DDTC e tempo de reação

Inicialmente, avaliou-se a influência da concentração de Na-DDTC para formação do complexo com Cu^{2+} , bem como a influência do tempo necessário para a formação completa do complexo. Para o primeiro experimento, foram adicionados 40 μL de soluções de Na-DDTC de diferentes concentrações aos dispositivos analíticos de papel impregnados com 20 μL de uma solução 25 mg L^{-1} de Cu^{2+} . Após a secagem, as imagens digitais foram obtidas utilizando um scanner de mesa com resolução de 600 dpi. Os parâmetros RGB foram extraídos com o auxílio do software imageJ. A Figura 9 apresenta o gráfico obtido para cada uma das concentrações de Na-DDTC estudada. O sinal analítico (S) foi definido como $|(S_{\text{REAÇÃO}} - S_{\text{BRANCO}})|$. O canal B foi o que apresentou maior influência na cor gerada pelo produto da reação, quando comparado com os canais R e G. A maior influência do canal B está relacionada com comprimento de onda absorvido pelo produto formado que é 436

nm (MARCZENKO; BALCERZAK, 2000) que está situada na faixa do azul entre 430 e 490 nm. Soluções com maior concentração de Na-DDTC não apresentaram influência sobre o sinal analítico.

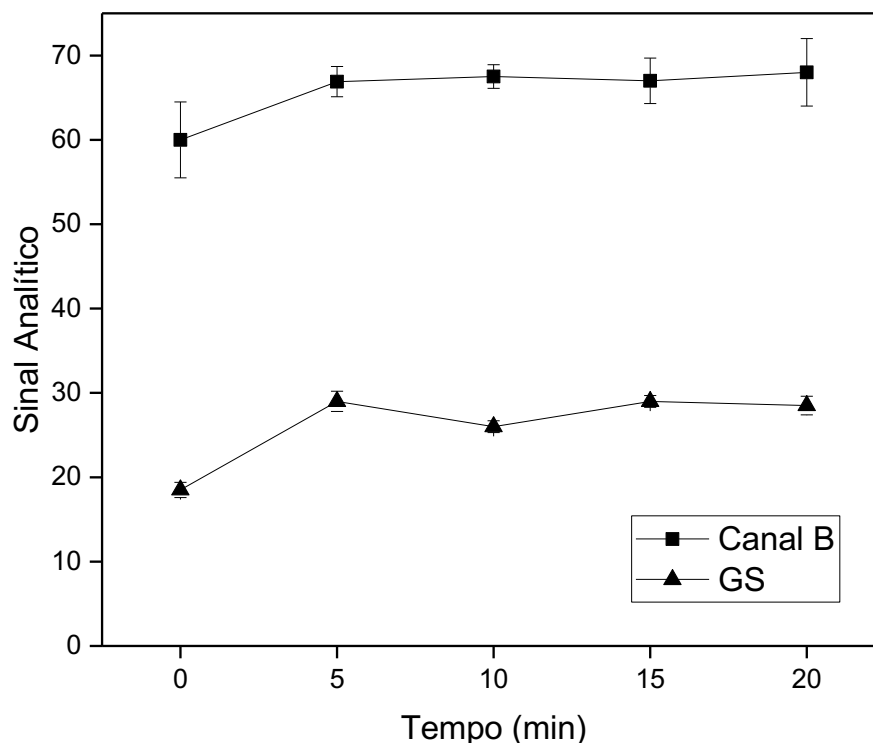
Figura 9. Avaliação da influência da concentração de Na-DDTC no sinal analítico do modelo de cor RGB



Fonte: O Autor

Portanto a avaliação do tempo de reação foi realizada adicionando 40 μL de Na-DDTC 0,1% em um dispositivo analítico de papel impregnado com 20 μL de Cu^{2+} 25 mg L^{-1} . As imagens digitais foram obtidas a cada 5 minutos e os parâmetros RGB foram extraídos. A Figura 10 apresenta a variação do sinal analítico em função do tempo relacionado ao canal B e o canal GS (*Grayscale*, Escala de Cinza). É possível notar que após 5 minutos o sinal analítico não apresenta variações significativas, com isso o tempo ótimo de reação escolhido foi 5 minutos.

Figura 10. Influência do tempo de reação na magnitude do sinal analítico



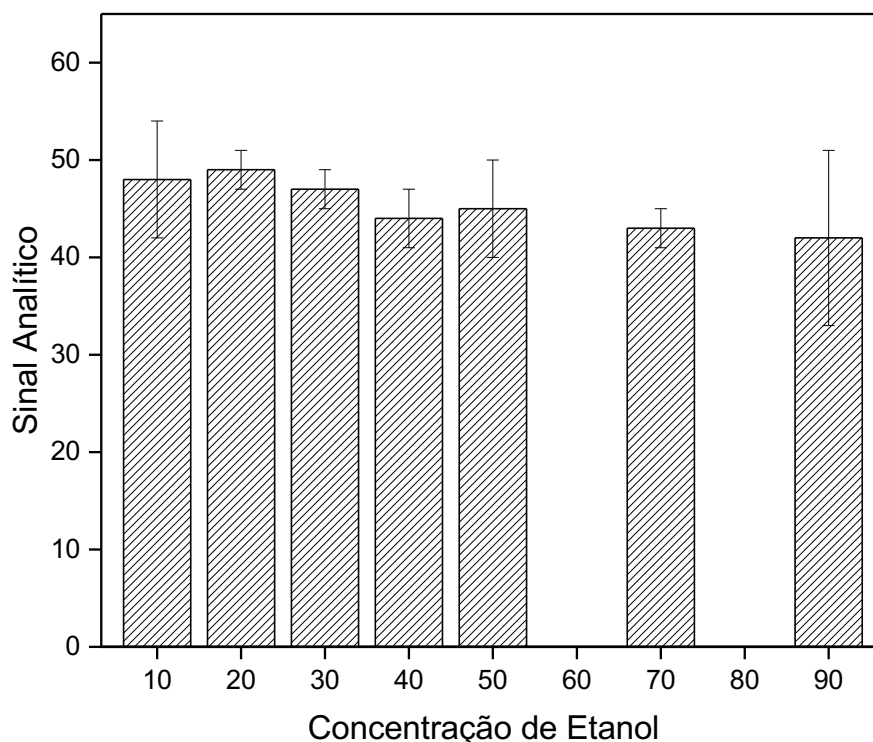
Fonte: O Autor

3.2.3 Avaliação do efeito da concentração de etanol para formação do complexo Cu-DDTC

Amostras de cachaça apresentam um teor alcóolico de 40% sendo assim essencial avaliar a formação do complexo Cu-DDTC próximo a essas condições para evitar possíveis efeitos de matriz. Além disso, a solubilidade do complexo é maior em soluções alcóolicas, o que pode causar alterações na intensidade de cor do complexo formado, o que influencia diretamente o sinal analítico. Com isso, a linearidade da curva analítica poderia ser comprometida.

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração de etanol na formação do complexo Cu-DDTC, 40 μL de Na-DDTC 0,1% foi adicionado ao dispositivo analítico em papel impregnado com 20 μL de Cu^{2+} 25 mg L^{-1} preparado em diferentes concentrações de etanol entre 20 a 90%. A avaliação de cada uma das concentrações de etanol foi realizada em triplicata.

Figura 11. Influência da concentração de etanol na magnitude do sinal (B) analítico da reação



Fonte: O Autor

A partir da avaliação da Figura 11, nota-se que como esperado o sinal analítico é influenciado pela porcentagem de etanol utilizado na preparação da solução de cobre. Portanto, com o objetivo de evitar desvios na linearidade e reduzir possíveis efeitos de matriz, as soluções padrão de cobre foram preparadas em uma solução de etanol 40%. Essa concentração foi escolhida para que as soluções padrão sejam compatíveis com a amostra real, uma vez que amostras de cachaça apresentam um teor alcóolico de 40%.

3.3 Figuras de mérito

Com o objetivo de obter a correlação entre o sinal analítico e a concentração de cobre, a imagem digital do dispositivo analítico baseado em papel com o complexo de Cu-DDTC foi tratada de acordo com as etapas descritas a seguir. (i) a região circular que apresenta o complexo de cobre foi selecionada para extração dos

parâmetros RGB; (ii) os valores de R, G e B para cada concentração de cobre foram ordenados em três colunas diferentes e transformados em um valor único relacionado com a intensidade da escala de cinza (GS) aplicando os valores de R, G e B na equação 5. (iii) para corrigir o efeito de brilho gerado pela fonte de iluminação, foi utilizado a densidade óptica relativa (ODR) de acordo com a equação 6, na qual (GS) é a escala de cinza da amostra e (GS_B) a escala de cinza do branco que corresponde ao papel sem adição de cobre.

$$GS = 0,299R + 0,587G + 0,114B \quad (5)$$

$$ODR = -\log_{10} \frac{GS}{GS_B} \quad (6)$$

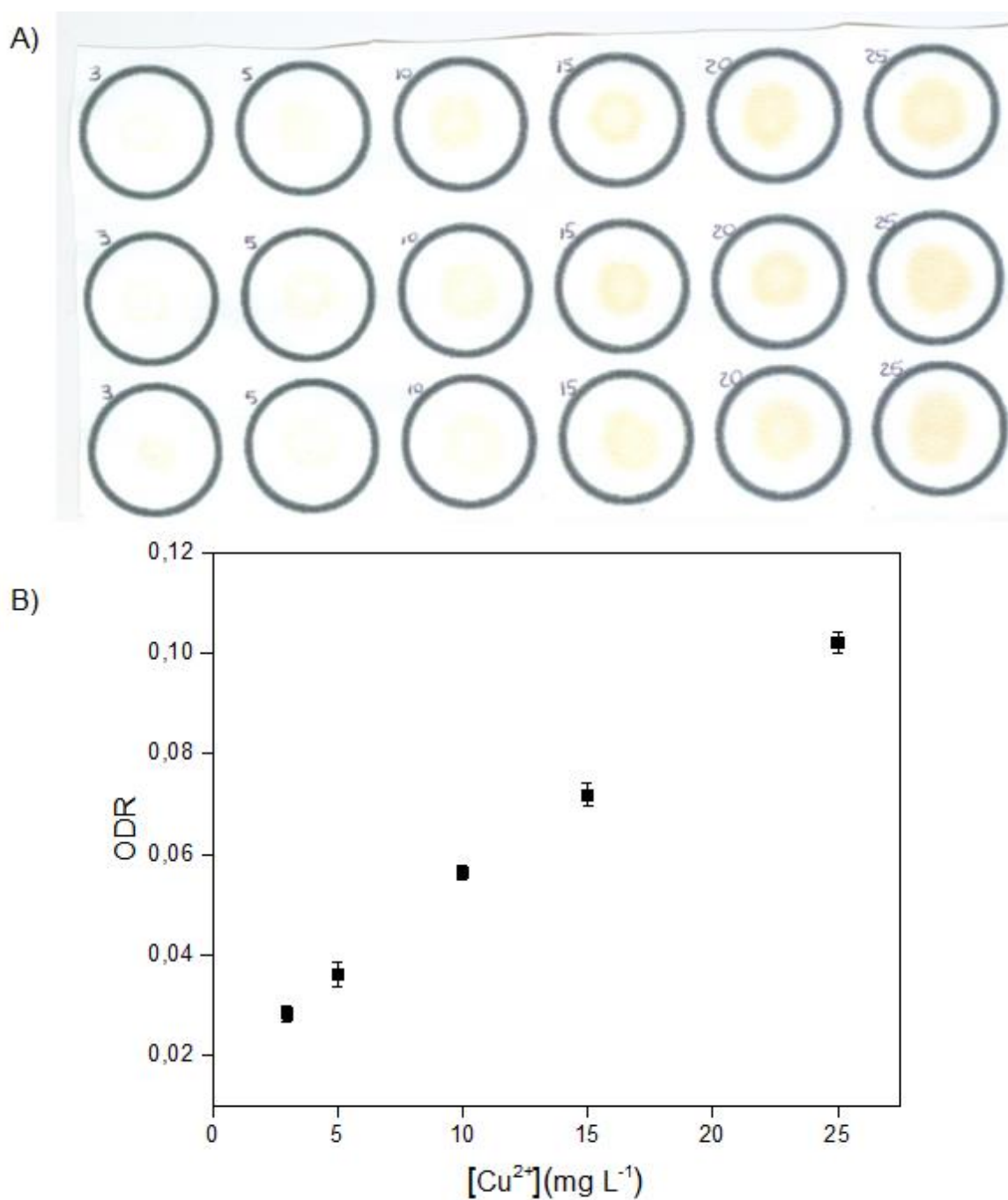
O desempenho analítico do método proposto foi avaliada em termos de linearidade, construindo a curva analítica com sinal analítico (ODR) em função da concentração de Cu²⁺. Cada concentração de Cu²⁺ foi avaliada em triplicata. Apesar da magnitude do sinal analítico ser maior para o canal B como apresentado na Figura 9, uma melhor linearidade foi obtida utilizando a relação ODR. Foi possível obter uma faixa linear de 3 a 25 mg L⁻¹, com a relação ODR = 0,0033[Cu²⁺] + 0,020 e coeficiente de correlação (R²) > 0,99. A Figura 12 apresenta a curva analítica obtida. O limite de quantificação foi obtido experimentalmente a partir de avaliação da menor concentração de Cu²⁺ que gerava uma resposta linear, com isso foi obtido um valor de 5 mg L⁻¹. O limite de detecção foi calculado de forma teórica aplicando a equação 7, com isso foi obtido um valor de 1,6 mg L⁻¹.

$$\text{Limite de detecção} = \frac{\text{Limite de quantificação}}{3} \quad (7)$$

A precisão do método foi determinada avaliando o coeficiente de variação (n=10) para uma solução de Cu²⁺ 5 mg L⁻¹ e foi obtido um valor de 2,9%. A exatidão do método proposto foi avaliada a partir da fortificação de amostras de cachaça com soluções padrão de Cu²⁺ em três níveis de concentração (5, 15 e 25 mg L⁻¹). Os valores de recuperação foram calculados de acordo com porcentagem encontrada após a comparação dos valores de concentração obtidos para as soluções fortificadas e a amostra que estava sendo avaliada. Foram encontrados valores

satisfatórios de recuperação em uma faixa de 90 à 109%. As figuras de mérito são apresentadas na Tabela 3.

Figura 12. A) Representação das Imagens digitais obtidas após a reação entre Na-DDTC e cobre (II) e B) Curva analítica obtida para soluções padrão de cobre



Fonte: O Autor

Tabela 3. Parâmetros analíticos obtidos para o método proposto

| Parâmetro | Valor |
|-----------------------------------|--|
| Limite de Detecção | 1,6 mg L ⁻¹ |
| Limite de Quantificação | 5 mg L ⁻¹ |
| Faixa Linear | 5 – 25 mg L ⁻¹ |
| Coefficiente de Correlação | 0,9952 |
| Equação | ODR = 0,0033 [Cu ²⁺] + 0,020 |
| Precisão (n = 10) | 2,9% |
| Recuperação 5 mg L ⁻¹ | 109,1 ± 9,8 |
| Recuperação 15 mg L ⁻¹ | 103,5 ± 9,7 |
| Recuperação 25 mg L ⁻¹ | 90,1 ± 3,5 |

3.3.1 Aplicação em amostras de cachaça

O método desenvolvido foi aplicado para determinação de Cu²⁺ em amostras de cachaça. Vale ressaltar que de acordo com o a ANVISA a concentração de Cu²⁺ não pode ser maior que 5 mg L⁻¹. Portanto foi preparado uma amostra fortificada com 5 mg L⁻¹ para avaliar se o método é capaz de avaliar amostras que apresentam uma concentração maior que a permitida. Os resultados obtidos foram comparados com a metodologia oficial que utiliza a técnica de FAAS.

Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que a amostra fortificada apresentou um ótimo resultado, uma vez que o valor encontrado é coerente com a concentração que foi adicionada. Além disso, aplicando o teste t pareado os dois métodos não apresentaram diferenças significativas em um nível de confiança de 95%. Portanto, a metodologia proposta baseada na reação colorimétrica entre Cu²⁺ e Na-DDTC realizada em um dispositivo analítico baseado em papel e aplicando tratamento de imagens digitais mostrou-se como uma excelente alternativa para monitorar a concentração de cobre em amostras de cachaça.

Tabela 4. Determinação de cobre (II) em amostras de cachaça

| Amostras de Cachaça | [Cu ²⁺] (mg L ⁻¹) | |
|-----------------------------------|---|-----------------|
| | Método proposto | FAAS |
| Amostra 1 | <LD | 0,9800 ± 0,0025 |
| Amostra 2 (5 mg L ⁻¹) | 5,18 ± 0,49 | 4,93 ± 0,20 |

Fonte: O Autor

A performance do método proposto foi comparada com outros métodos que também utilizam a reação entre Cu²⁺ e Na-DDTC. De acordo com a, Na-DDTC é majoritariamente aplicado para extração e pré-concentração para análise instrumental, o que resulta em etapas adicionais para realização do método analítico.

Tabela 5. Métodos que utilizam Na-DDTC para quantificação de Cu²⁺ em diferentes matrizes

| Sistema Analítico | Faixa Linear (mg L ⁻¹) | Uso de Na-DDTC | Amostra | REF |
|--|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| SPE – HPLC | 0.005 – 0.4 | Extração e pré-concentração | Água | (WANG, L. <i>et al.</i> , 2016) |
| UV-VIS spectrophotometry | 0.20 – 12 | Cu-DDTC absorbance measurement | Amostras Ambientais, biológicas e alimentos | (UDDIN; ABDUS SALAM; HOSSAIN, 2013) |
| MALDI-TOFMS | 0.16 – 2.6 | Extração e pré-concentração | Tequila | (GARCIA <i>et al.</i> , 2018) |
| DLLME – UV-VIS spectrophotometry | 0.0003 – 0.001 | Pré-concentração | Água | (ARVAND <i>et al.</i> , 2014) |
| USAEME (ICP-OES) | 0.001 – 1 | Pré-concentração | Água | (SERESHTI; BAKHTIARI; KHOJEH, 2011) |
| Dispositivo Analítico Baseado em Papel | 3 – 25 | Cu-DDTC método com imagens digitais | Cachaça | Método Proposto |

SPE: Soli-phase extraction; DLLME: Dispersive liquid-liquid microextraction; USAME: Ultrasound-assisted microextraction

3.4 Conclusão

Nesta etapa do trabalho foi desenvolvido um método portátil e de baixo custo que possibilite realizar o controle de qualidade de amostras de cachaça em função da determinação de cobre (II). O método proposto se baseia na reação colorimétrica entre Cu^{2+} e Na-DDTC realizada em um dispositivo analítico baseado em papel. A principal vantagem de utilizar o dispositivo em papel é a exclusão da etapa de extração, assim possibilitando a análise direta do complexo formado. Além disso, a utilização de imagens digitais para etapa de detecção torna o método mais atrativo uma vez que, ele passa a ser mais acessível quando comparado ao método oficial. Os resultados obtidos mostram que o método desenvolvido consegue quantificar concentrações de Cu^{2+} dentro da faixa estipulada pelo órgão regulamentador.

4 DETERMINAÇÃO DE CONSERVANTES EM BEBIDAS UTILIZANDO SPOT TESTS EM PAPEL E TRATAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS

4.1 Introdução

4.1.1 Aplicação de sulfito como conservante

A indústria de alimentos evoluiu de forma significativa principalmente em relação a tecnologias para melhorar a conservação de alimentos, que antes precisavam ser consumidos rapidamente pois o processo de oxidação e deterioração acontecia em poucos dias. Uma estratégia para combater esse problema é a adição de substâncias químicas antioxidantes e conservantes nos alimentos, sendo que um dos principais é a aplicação dos “sulfitos” ou “agentes de sulfitação” (TAVARES ARAÚJO *et al.*, 2005).

Sulfitos são os conservantes mais utilizados em alimentos devido a quantidade de funções que eles podem desempenhar. Eles atuam como agente antimicrobiano, antioxidante, de branqueamento e além disso evitam o processo de escurecimento enzimático e não enzimático (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986). Geralmente, esse conservante é aplicado na forma de dióxido de enxofre (SO₂), bissulfito de potássio, sulfito de sódio, entre outros. A Tabela 6 apresenta os derivados de sulfito que são aplicados na indústria de alimentos segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Tabela 6. Diferentes agentes de “sulfitação” aplicados na indústria alimentícia e seus respectivos INS (Sistema Internacional de Numeração)

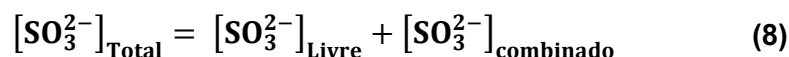
| INS | Nomenclatura | |
|---------|----------------------------|---|
| INS 220 | Dióxido de Enxofre | SO ₂ |
| INS 221 | Sulfito de Sódio | Na ₂ SO ₃ , Na ₂ SO ₃ · 7H ₂ O |
| INS 222 | Bissulfito de sódio | NaHSO ₃ |
| INS 223 | Metabissulfito de sódio | Na ₂ S ₂ O ₅ |
| INS 224 | Metabissulfito de potássio | K ₂ S ₂ O ₅ |

Fonte: Adaptado de (RUIZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2009)

No geral, o uso de sulfito e seus derivados é comum e não apresenta nenhum risco para a saúde. Entretanto, se for consumido em excesso pode gerar alguns efeitos colaterais, sendo os mais comuns efeitos asmáticos e alérgicos. Tais como

dificuldade de respirar, respiração ofegante, urticárias e desconforto gastrointestinal (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986). Com isso, foi estabelecido que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) é 0,7 mg/kg peso corpóreo segundo a (RESOLUÇÃO Nº 41, DE 10 DE AGOSTO DE 2019) publicada pelo ministério da saúde. Além disso, o sulfito adicionado degrada a tiamina (Vitamina B1), o que afeta o valor nutricional dos alimentos.

Dentro desse contexto, a ANVISA estipula como limite máximo de sulfito livre (também expresso como SO₂ residual) em alimentos tais como sucos, néctares, polpas de fruta, sucos tropicais e água de coco, a concentração de 50 mg L⁻¹, com exceção do suco de caju que tem como limite máximo 200 mg L⁻¹. A diferença entre sulfito livre e sulfito total está relacionada com a forma que o sulfito está presente em solução. O sulfito livre faz referência ao sulfito presente na forma de resíduos de ácido sulfuroso, ou sulfito inorgânico dissociado. Sulfito total é a soma da concentração sulfito livre e sulfito combinado, como mostrado na Equação 8. Sulfito combinado está relacionado com espécies de sulfito ligado a composto carbonílicos ou presente na forma de hidroxí sulfonato.

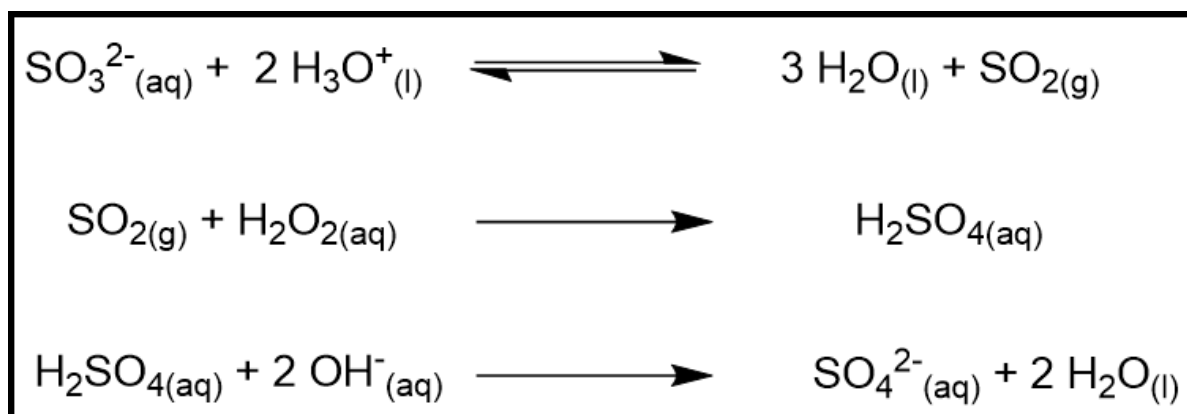


4.1.2 Métodos Analíticos para quantificação de sulfito em amostras de alimentos

Para que a legislação estabelecida seja obedecida, é fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação dos conservantes de sulfito nos diversos tipos de alimentos regulados. O método oficial para determinação de sulfito em bebidas é o de Monier-Williams (1928). O procedimento de análise se baseia nas seguintes etapas: (i) extração do analito por meio de acidificação da amostra em refluxo durante 2 horas para geração de SO₂, (ii) aplicação de um fluxo de nitrogênio na amostra para garantir um fluxo constante de SO₂ através do condensador, o SO₂ gerado será coletado por uma solução de peróxido de hidrogênio tendo como produto ácido sulfúrico; (iii) titulação da solução de ácido sulfúrico obtida com hidróxido de sódio utilizando como indicador vermelho de metila ou azul de bromofenol. Utilizando esse procedimento, o sulfito é quantificado

indiretamente. As reações que ocorrem em cada uma das etapas descritas anteriormente são apresentadas na Figura 13.

Figura 13. Reações envolvidas no método de Monier-Williams. (I) Etapa de volatilização e geração de SO₂. (II) Coleta de SO₂ gasoso por uma solução de peróxido de hidrogênio (III) Titulação da solução de Ácido Sulfúrico formado



Fonte: Adaptado de (PISOSCHI *et al.*, 2020)

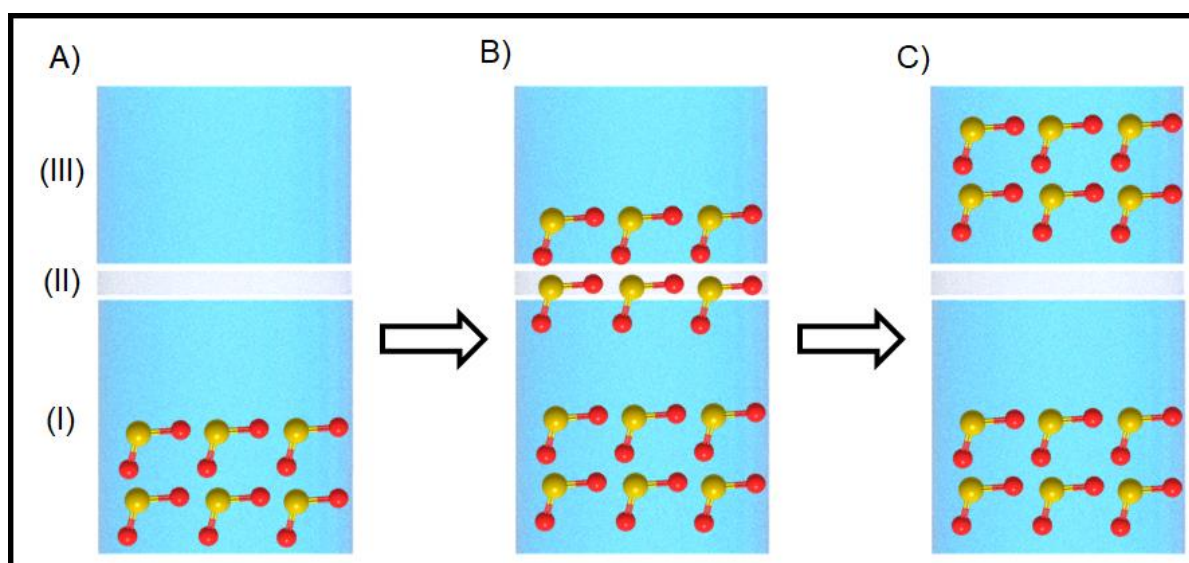
O método de Monier-Williams é robusto, apresenta poucos interferentes e possui um limite de detecção abaixo de 10 ppm (HILLERY *et al.*, 1989). Apesar de apresentar poucos interferentes, o método é suscetível a erros analíticos por conta da etapa de transferência dos vapores ácidos em condições de refluxo para o frasco de titulação, podendo resultar em valores superestimados de sulfito. Além disso, por se tratar de um processo de destilação, o método se torna laborioso e consome muito tempo com cada análise podendo levar até 2 horas para ser completa.

Como alternativa ao método de Monier-Williams, alguns trabalhos foram desenvolvidos utilizando o procedimento de extração por volatilização do sulfito e coleta sem a necessidade de bombas para criação de fluxo de ar, e aplicando outros modos de detecção. Um exemplo é a técnica de análise em fluxo (FIA) acoplada a uma cela de difusão gasosa para coleta do SO₂ gasoso. A detecção do produto da reação entre um reagente acceptor e o SO₂ foi realizada aplicando métodos fotométricos (SULLIVAN *et al.*, 1990), eletroquímicos (THANH; DECNOP-WEEVER; KOK, 1994) e quimioluminescentes (LIN; HOBO, 1996). Por exemplo, DECNOP-WEEVER; KRAAK, 1997 efetuaram a determinação de sulfito a partir da reação do indicador verde de bromocresol com SO₂ coletado. O produto da reação foi monitorado em 620 nm utilizando um espectrofotômetro de absorção UV-Vis. MELO

et al., 2003 utilizaram um método espectrofotométrico baseado na reação do indicador verde de malaquita com SO_2 e a absorbância foi monitorada em 620 nm. Para realizar a coleta do gás SO_2 gerado, os dois métodos utilizam um sistema de difusão gasosa.

A extração por volatilização baseado no fenômeno de difusão gasosa tem como base a geração de espécies voláteis na solução doadora (ou seja, na solução da amostra), a difusão das moléculas na fase gasosa por meio de uma membrana porosa, e a coleta por uma solução aceptora contendo um reagente adequado. A membrana polimérica porosa utilizada, geralmente de PTFE, tem como objetivo separar fisicamente as soluções aceptoras e doadoras e de controlar o fluxo de difusão das espécies em fase gasosa geradas na solução doadora. A segunda lei de Fick governa esse fenômeno de difusão, onde o fluxo de difusão é função da concentração do analito em fase gasosa e do caminho de difusão. Métodos colorimétricos utilizam reagentes como propriedades ópticas presentes na solução aceptora. A Figura 14 apresenta a representação de um sistema de difusão gasosa, no qual (I) descreve a solução doadora, (II) Membrana de PTFE e (III) solução aceptora.

Figura 14. Representação de um sistema de difusão gasosa. (A) antes do processo de difusão, (B) durante o processo de difusão, (C) Após o processo de difusão.



Fonte: O Autor

4.1.3 *Micro-extração por difusão gasosa*

Como citado anteriormente, o sistema de difusão gasosa é uma ferramenta poderosa aplicada em problemas analíticos que envolvem a determinação de espécies volatilizáveis em amostras complexas. Em 2010, PACHECO *et al.* fizeram uma proposta de acoplar o sistema de difusão gasosa a uma etapa de micro-extração. Dessa forma, foi possível desenvolver sistemas de extração utilizando baixos volumes de solução aceptora (entre 500 e 1000 μ L) (BRANDÃO, PEDRO F. *et al.*, 2017; BRANDÃO, PEDRO FRANCISCO; RAMOS; RODRIGUES, 2018; CUSTODIO-MENDOZA *et al.*, 2020). Esse novo sistema recebeu o nome de GDME “Gas Difusion Micro-Extraction” e ele vem sendo aplicado em vários trabalhos que buscam desenvolver métodos miniaturizados. LAMARCA *et al.*, 2019 desenvolveram um método para determinação de formaldeído em amostras de cosmético aplicando a técnica de GDME. A solução aceptora utilizada foi preparada com o reagente acetilacetona, e a cor do produto formado foi monitorada utilizando um smartphone.

Outra possibilidade que vem sendo explorada na literatura é a possibilidade de acoplar o sistema de GDME a um dispositivo impresso em impressora 3D. LEAL; BATISTA; PETRUCI, 2021 desenvolveram um método para quantificação de sulfeto em amostras de água por meio da estratégia de extração por volatilização, difusão gasosa e captura do analito utilizando o reagente luminescente acetato de fluoresceína de mercúrio. O sistema de GDME foi construído utilizando uma impressora 3D e a detecção foi realizada utilizando um smartphone. O volume de reagente utilizado como solução aceptora foi de 750 μ L.

4.1.4 *Aplicação de Impressão 3D para construção de plataformas miniaturizadas*

Nos últimos anos, a impressão 3D tem se mostrado como uma técnica extremamente viável para ser aplicada na química analítica, sendo utilizada em áreas como eletroquímica, na impressão de sensores eletroquímicos de baixo custo, (SCHMIDT; KING; KARIUKI, 2018) ou para fabricação de dispositivos, como por exemplo a construção de fotômetros miniaturizados utilizando LEDs (BARRETO *et al.*, 2021; BUI; HAUSER, 2015). O princípio da técnica de impressão 3D está pautado na extrusão de um material termoplástico aquecido a temperatura de fusão e que é depositado em camadas que posteriormente serão fixadas após o resfriamento. Os

filamentos termoplásticos mais utilizados são o ABS (Acrilonitrila Butadieno Estireno) e o PLA (Ácido Polilático) (CARDOSO *et al.*, 2020). Geralmente o ABS é utilizado para impressão de peças que demandam uma maior resistência à algum tipo de tensão mecânica, além disso esse material é passível de modificação o que permite que a superfície seja modificada com grafeno permitindo assim a produção de um filamento condutor para aplicações eletroquímicas.

Pensando em um dispositivo para acoplamento da etapa de micro-extração por difusão gasosa, a utilização do ABS é importante já que ele apresenta uma maior resistência ao ataque de soluções ácidas. E pensando na portabilidade do método. o ABS pode conferir uma maior resistência ao impacto, minimizando o risco de o dispositivo sofrer algum tipo de avaria. Outro fator que favorece a utilização de dispositivos impressos em 3D é a maior facilidade em fabricar plataformas para integrar diferentes instrumentos, como por exemplo de detecção colorimétrica (e.g. smartphone). A fabricação de uma plataforma integrada com um smartphone permite a obtenção de imagens digitais do sistema analítico em “tempo real” e que posteriormente serão tratadas para extrair e avaliar os parâmetros analíticos necessários (JOÃO *et al.*, 2019).

A partir do exposto, a presente seção desta dissertação tem como objetivo construir uma plataforma impressa em 3D para determinação de sulfito em amostras de suco concentrado. O método analítico de determinação se baseia na micro-extração por difusão gasosa, captura do SO₂ gerado por um indicador ácido-base impregnado em um dispositivo analítico baseado em papel seguido por quantificação colorimétrica utilizando smartphone.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Reagentes

Os reagentes e padrões de sulfito de sódio, ácido fosfórico 85%, verde de bromocresol, alaranjado de metila e azul de bromotimol foram obtidos de Synth (Brasil), NEON (São Paulo, Brasil) e Dinâmica (Brasil), respectivamente. A solução estoque de sulfito de sódio com concentração 1000 mg L⁻¹ foi preparada diariamente diluindo-se a massa apropriada em água destilada.

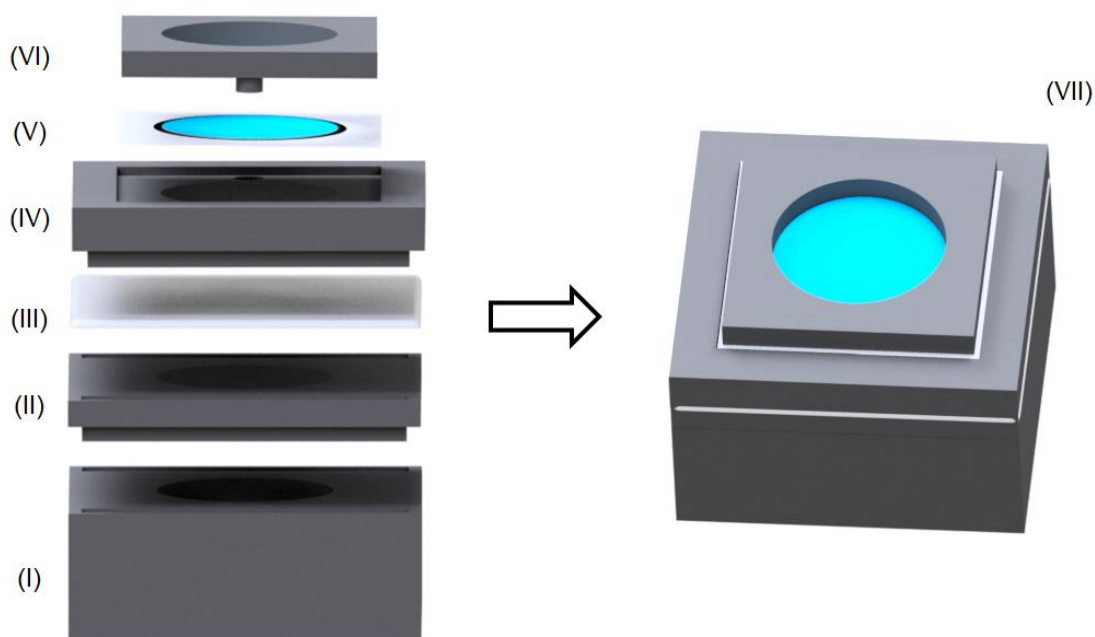
As soluções estoque de verde de bromocresol, alaranjado de metila e azul de bromotimol foram preparadas com uma concentração de 1000 mg L⁻¹ e foram

diluídas para 125 mg L^{-1} utilizando o volume adequado de água destilada. A solução de 2 mol L^{-1} de ácido fosfórico foi preparada por diluição apropriada em água destilada. Papel de filtro (Whatman 41, Whatman, Millipore USA) foi utilizado para construção do dispositivo analítico em papel na forma de spot test. Amostras de suco de uva concentrado foram adquiridas em supermercados locais

4.2.2 Dispositivo para extração de SO_2

O dispositivo para geração e extração de SO_2 foi projetado no software Autodesk Inventor e construído utilizando uma impressora 3D (GTMAX core A1). O modelo 3D está apresentado na Figura 15 e possui as seguintes medidas: (I) Recipiente para a solução doadora que possui 40,00 mm de largura; 40,00 mm de comprimento e 15,00 mm de altura e um furo com diâmetro interno de 20,00 mm e 10,00 mm de altura. (II) O suporte para membrana de PTFE com 40,00 mm de largura; 40,00 mm de comprimento; 3,00 mm de altura e um furo com diâmetro interno de 20,00 mm e 3,00 mm de profundidade. (III) Membrana de PTFE. (IV) O Suporte para o dispositivo analítico baseado em papel possui 40,00 mm de largura; 40,00 mm de comprimento, 5,00 mm de altura e um furo com diâmetro interno de 20,00 e 5,00 mm de profundidade. (V) Dispositivo analítico baseado em papel com spot de 20,00 mm. (VI) Acoplamento do dispositivo analítico baseado em papel, possui 30,00 mm de largura; 30,00 mm de comprimento, 3,00 mm de altura e um furo com diâmetro interno de 20,00 mm e 3,00 mm de profundidade. (VII) Dispositivo pronto para uso. Todas as medidas de dimensão foram obtidas utilizando um paquímetro digital (MTX 3161119) com precisão de 0,01 mm.

Figura 15. Dispositivo desenvolvido e impresso em 3D para permitir a extração e coleta do SO₂ em spot test's de papel



Fonte: O Autor

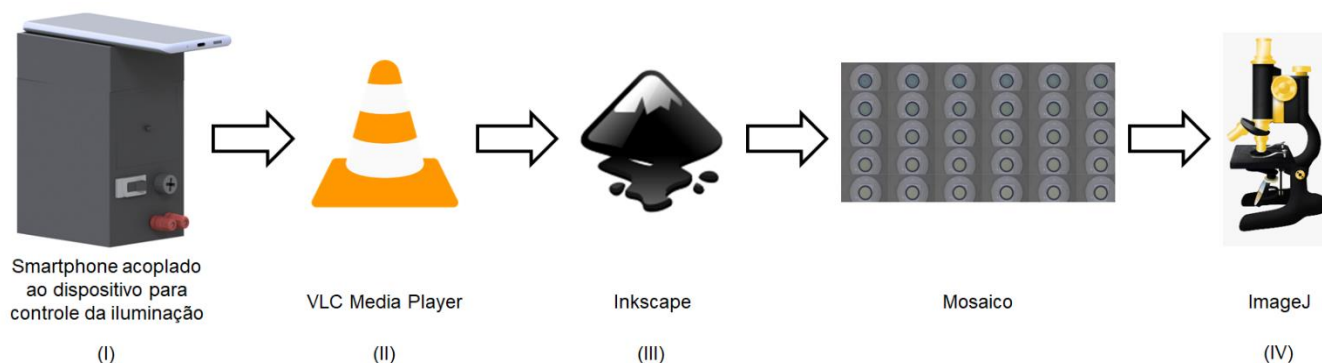
O dispositivo foi construído para possibilitar a geração de SO₂ a partir da amostra contendo sulfito e difusão gasosa de SO₂ através da membrana de PTFE e entrar em contato com dispositivo analítico baseado em papel impregnado com uma solução de indicador ácido-base. O material escolhido para realizar a impressão foi o ABS (Acrilonitrila Butadieno Estireno) por conferir uma maior resistência e não se degradar em contato com H₃PO₄ (Ácido Fosfórico).

4.2.3 Captura e processamento de imagens

A reação colorimétrica entre o SO₂ e o indicador ácido-base foi filmada durante 30 minutos utilizando um smartphone. A partir disso, as seguintes etapas foram seguidas para construção de um mosaico com os frames obtidos para cada minuto de reação e posterior tratamento para extração dos parâmetros analíticos. (I) Monitoramento da reação entre SO₂ e verde de bromocresol durante 30 minutos em um ambiente com a luminosidade controlada. (II) Obtenção dos frames de cada minuto da reação utilizando o software VLC media player. (III) Construção de um mosaico utilizando a software Inkscape, a partir dos frames obtidos para 30 minutos de reação. (IV) extração dos parâmetros analíticos, Vermelho (R), Verde (G), Azul (B), Matiz (H), Saturação (S) e Luminosidade (V), todos eles serão obtidos utilizando

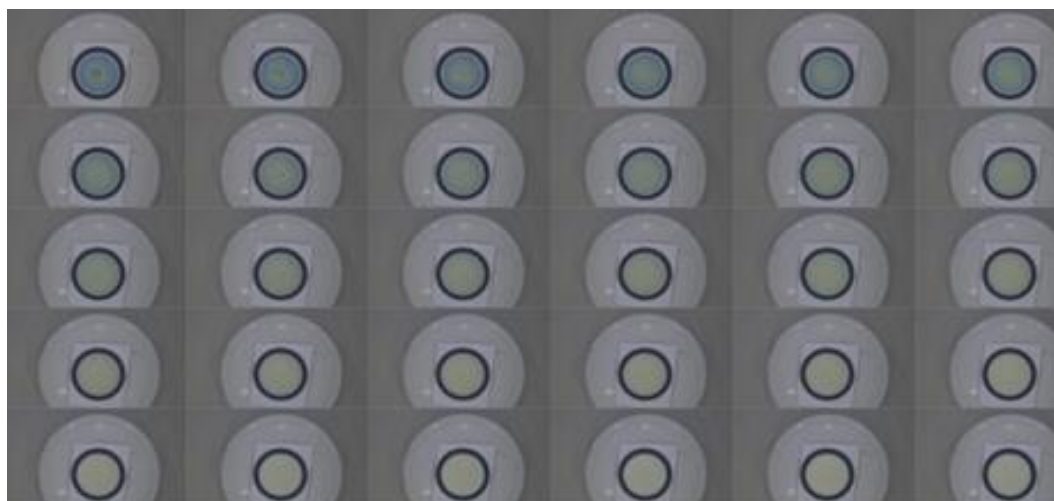
o software ImageJ. A Figura 16 apresenta um fluxograma com as etapas descritas anteriormente, e a Figura 17 apresenta o mosaico construído para a reação monitorado durante 30 minutos

Figura 16. Fluxograma com as etapas para obtenção e tratamento de imagens digitais.



Fonte: O Autor

Figura 17. Mosaico construído para a reação com os frames obtidos após 30 minutos de monitoramento.



Fonte: O Autor

4.2.4 Protocolo de análise de sulfito

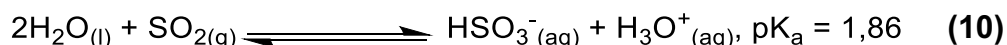
O procedimento de determinação de sulfito em amostras de suco foi realizado da seguinte maneira: Inicialmente, 30 μL do indicador ácido-base verde de bromocresol foi adicionado ao papel com spot circular com diâmetro de 20 mm. Uma alíquota de 1,00 mL da amostra foi adicionada ao local de amostra do dispositivo apresentado na Figura 15. Posteriormente, foi adicionado 1,00 mL de ácido fosfórico

2 mol L⁻¹ e após essa adição o dispositivo é rapidamente fechado e inserido na câmara com luminosidade controlada. A reação é monitorada por vídeo utilizando um smartphone (Galaxy S20 plus) fixo na parte superior do dispositivo. Após 30 minutos a gravação foi encerrada e a imagem construída foi processada utilizando o software ImageJ.

4.3 Resultados e Discussões

4.3.1 Princípio do método

O método colorimétrico tem como princípio a reação proposta por (DECNOP-WEEVER; KRAAK, 1997), no qual o SO₂ gerado é coletado por uma solução aceptora contendo o indicador ácido-base verde de bromocresol. A solubilização do SO₂ na solução aceptora provoca uma alteração do pH do meio resultando no deslocamento de equilíbrio do indicador e, conseqüentemente, na mudança de cor do mesmo. A Equação 10 apresenta o equilíbrio do SO₂ após contato com água.



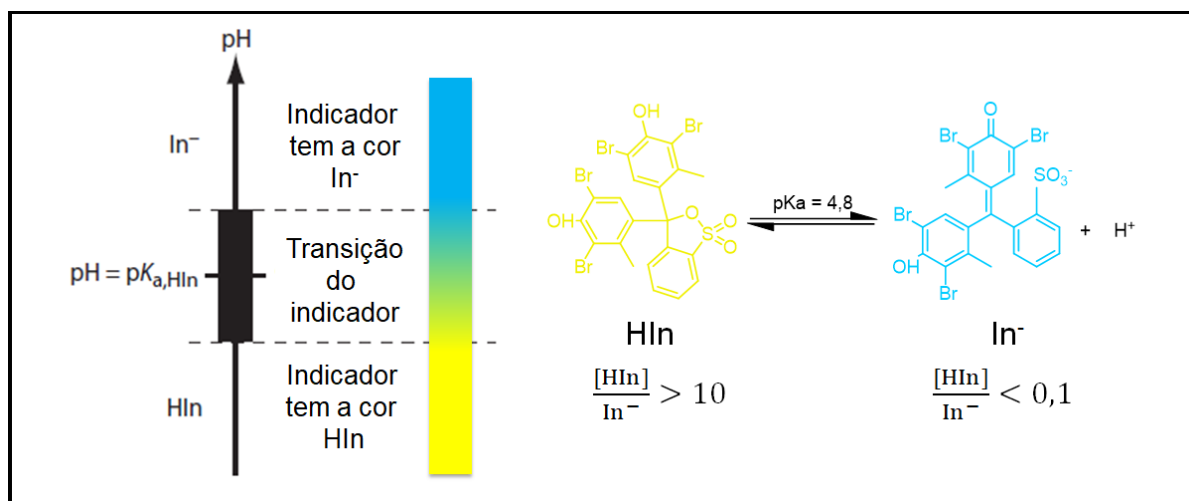
A partir da reação (10) espera-se que o pH do meio diminua a medida que a concentração de SO₂ aumenta, uma vez que o equilíbrio será deslocado no sentido dos produtos. O ácido sulforoso gerado ao entrar em contato com a atmosfera rica em oxigênio pode ser oxidado a ácido sulfúrico como apresentado na Equação (11) o que influencia diretamente no pH do meio (KOBAL DE OLIVEIRA ALVES CARDOSO; MAURA TOREZAN SILINGARDI; ALVES CARDOSO, 2020)



O princípio de funcionamento dos indicadores ácido-base está relacionado ao equilíbrio de um ácido fraco (HIn) e sua base conjugada (In⁻) e, dependendo do pH, uma das espécies será predominante. Essa relação entre a concentração do ácido fraco e da base conjugada ([HIn]/[In⁻]) é que definirá qual será a cor predominante da solução contendo o indicador. Via de regra, se essa relação for superior ou igual a 10, haverá a predominância da cor ácida. Caso seja inferior a 0,1 a cor básica será majoritária como mostrado na Figura 18 utilizando o indicador verde

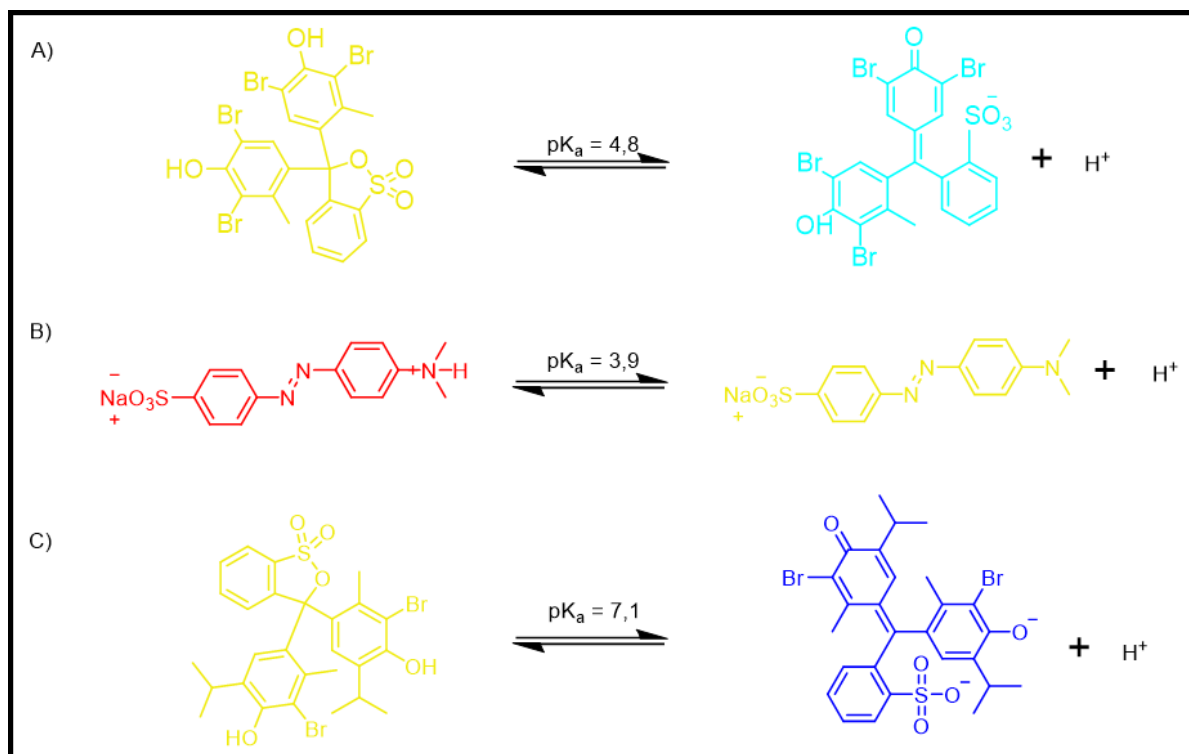
de bromocresol como exemplo. O intervalo entre essas duas razões de concentrações é conhecido como faixa de viragem do indicador. A Figura 19 apresenta a estrutura de alguns indicadores ácido-base que foram avaliados no método proposto. É importante notar que os indicadores escolhidos possuem diferentes pKas, o que vai influenciar diretamente na rapidez da mudança de cor provocada pelo SO₂ coletado e, conseqüentemente, na sensibilidade do método de quantificação.

Figura 18. Representação do equilíbrio do indicador ácido-base verde de bromocresol



Fonte: O Autor

Figura 19. Estrutura dos indicadores ácido base selecionados nesse trabalho; A) Verde de Bromocresol, B) Alaranjado de Metila, C) Azul de Bromotimol e seus respectivos pK_as.



Fonte: O Autor

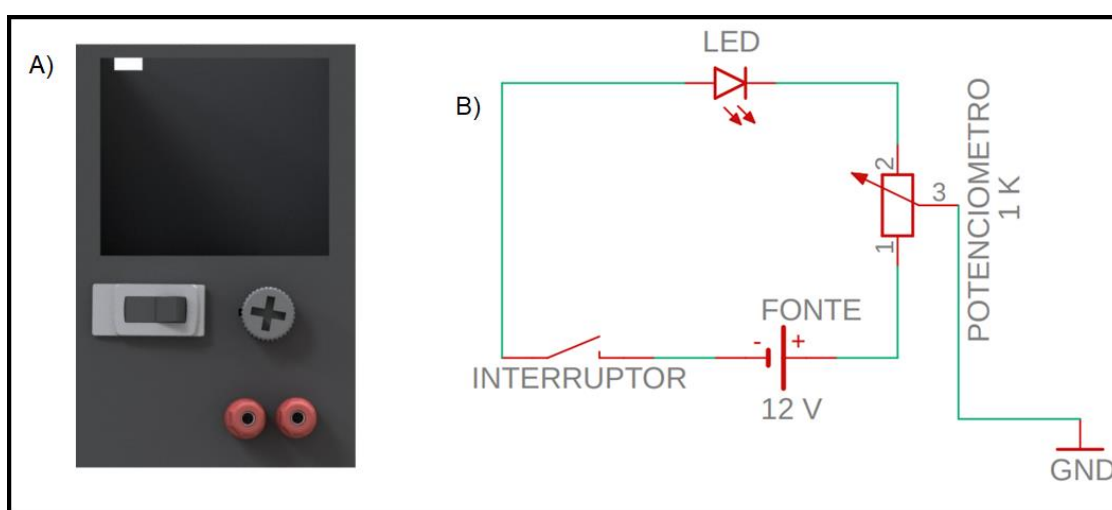
4.3.2 Avaliação da fonte de iluminação para aquisição de imagens digitais

Uma variável muito importante para a utilização da técnica de tratamento de imagens digitais para fins analíticos é a iluminação do ambiente no momento da obtenção da imagem, visto que medidas realizadas com a influência da iluminação ambiente podem apresentar grandes variações na cor adquirida. CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2015 discutem a respeito da necessidade de se construir um ambiente controlado para aquisição de imagens por meio da utilização de uma fonte de iluminação externa constante.

Diante disso, vários trabalhos desenvolvem ambientes que possibilitem o controle da intensidade luminosa no momento da obtenção da imagem e, pensando nisso, foi construído o dispositivo representado na Figura 20. Para verificar o efeito da iluminação no sinal analítico extraído da imagem digital obtida, foram comparados experimentos de aquisição da imagem utilizando como fonte luminosa (i) o flash do celular e (ii) uma fita de LED contendo 6 LEDs distribuídos homogeneamente com

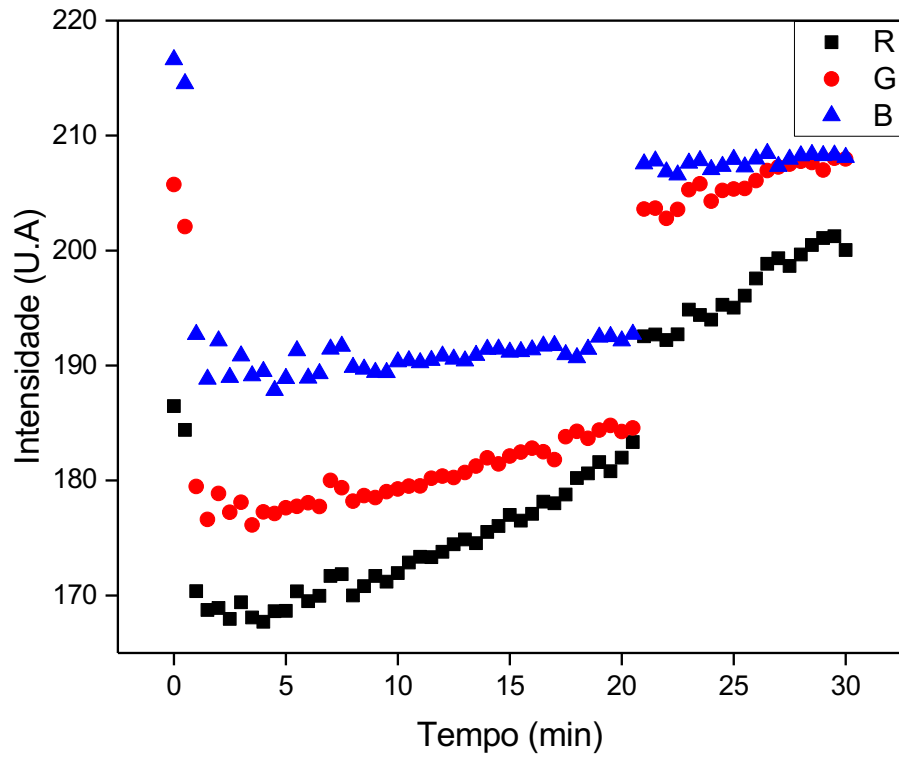
potência de 0,70 W e controlados por uma fonte externa de 12 V e 20 mA. As Figuras 21 e 22 representam os valores dos canais vermelho (R), verde (G) e azul (B) em função do tempo para a determinação de sulfito de sódio com concentração 50 mg L⁻¹ que foi submetida ao protocolo de análise descrito no item 4.2.4, utilizando os procedimentos i e ii, respectivamente.

Figura 20. A) dispositivo construído com auxílio de impressão 3D para realizar o controle de luminosidade, B) Circuito utilizado para controlar a intensidade luminosa das fitas de LED



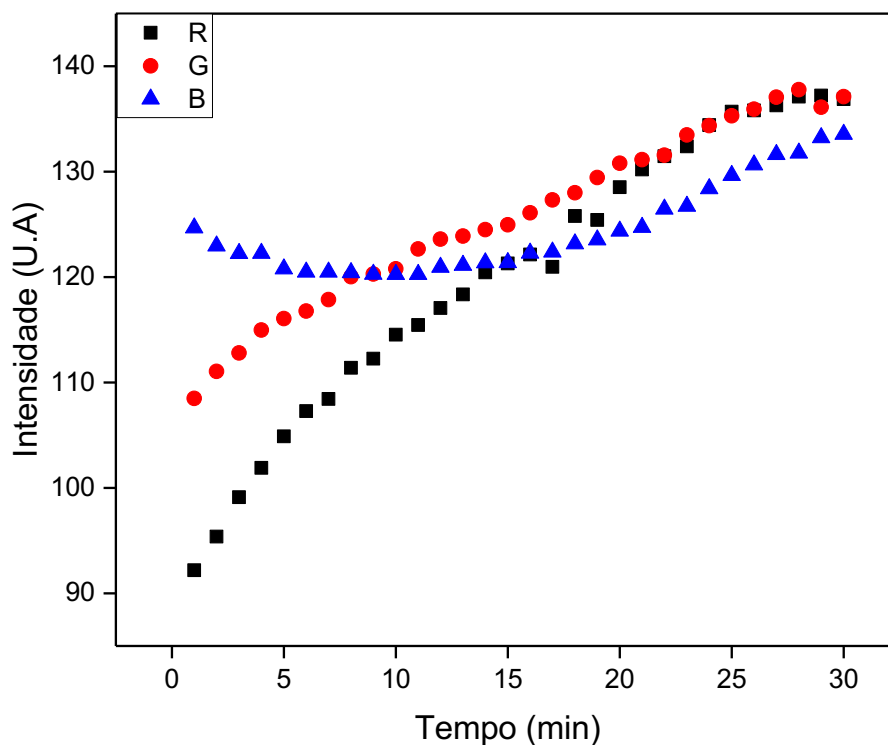
Fonte: O Autor

Figura 21. Dados obtidos do tratamento de imagens obtidas utilizando o flash do smartphone como fonte de iluminação para aquisição das imagens



Fonte: O Autor

Figura 22. Dados obtidos do tratamento de imagens obtidas utilizando o ambiente com iluminação controlada por fonte externa (LED)



Fonte: O Autor

A partir dos resultados obtidos, é possível verificar que a utilização do flash pode gerar alguns desvios aleatórios na intensidade dos canais RGB durante o tempo avaliado. É possível observar na Figura 21 que uma variação nos valores dos canais RGB ocorre a partir de 22 minutos. Uma possível explicação é a variação da intensidade do flash do smartphone, que é ajustada automaticamente pelo aparelho. O monitoramento dos canais RGB apresentado na Figura 22 não apresenta esse ponto no qual os valores sofrem uma grande variação e a razão disso pode estar relacionada com o uso de uma fonte de iluminação externa que garante que a intensidade luminosa seja a mesma durante todo o monitoramento da reação.

4.3.3 Escolha do espaço de cor

A escolha do espaço de cor é importante visto que a informação analítica que será relacionada com a concentração do analito está diretamente ligada aos canais

do espaço de cor. O espaço RGB é o mais utilizado devido a simplicidade, e a maioria dos dispositivos de aquisição de imagem utilizam filtros RGB. Entretanto, esse modelo possui algumas desvantagens como a dependência do dispositivo de aquisição de imagens utilizado, já que cada um deles possui um tipo de filtro RGB e também uma pré-configuração das condições de aquisição de imagens de fábrica. LEAL; BATISTA; PETRUCI, 2021 demonstraram essa variação construindo diferentes curvas analíticas utilizando uma mesma solução e diferentes smartphones. Foi verificado significativas variações no coeficiente angular e coeficiente de correlação das curvas analíticas obtidas em função do aparelho utilizado. Outro fator que influencia nos resultados obtidos é a iluminação como mostrado no tópico anterior.

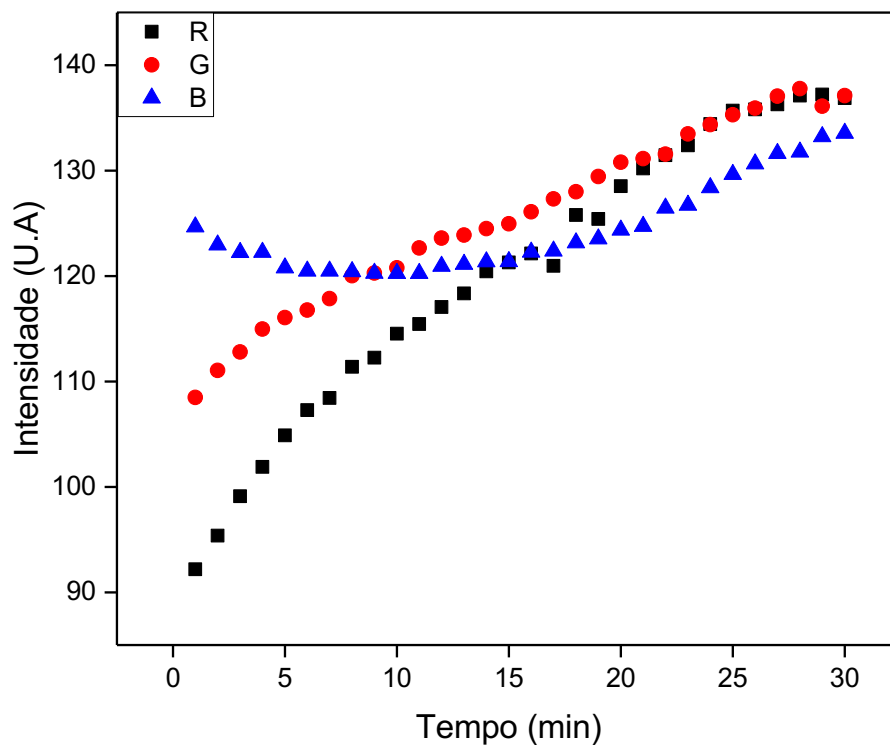
Avaliando a Figura 23, percebe-se que a mudança de cor do indicador ácido-base em função do tempo ocorre até que não seja mais visível a mudança de cor. Isso ocorre devido ao deslocamento do equilíbrio para a presença majoritária de uma das espécies, o que é característico dos indicadores ácido-base. Entretanto, os resultados obtidos após a extração dos parâmetros analíticos em termos de RGB não descrevem o ponto de saturação que é definido como o momento em que ocorre a estabilização do sinal analítico, ou seja, a estabilidade da cor formada. Nesse ponto de saturação, a coleta de SO_2 não provoca mais alteração na intensidade de cor e, portanto, não pode ser utilizada para quantificação. A Figura 24 apresenta o gráfico construído com os valores de R, G e B.

Figura 23. Mosaico construído a partir da gravação da reação entre verde de bromocresol e uma solução de Na_2SO_3 50 mg L^{-1} , o frame que apresenta o ponto de saturação após 20 minutos de reação está destacado



Fonte: O Autor

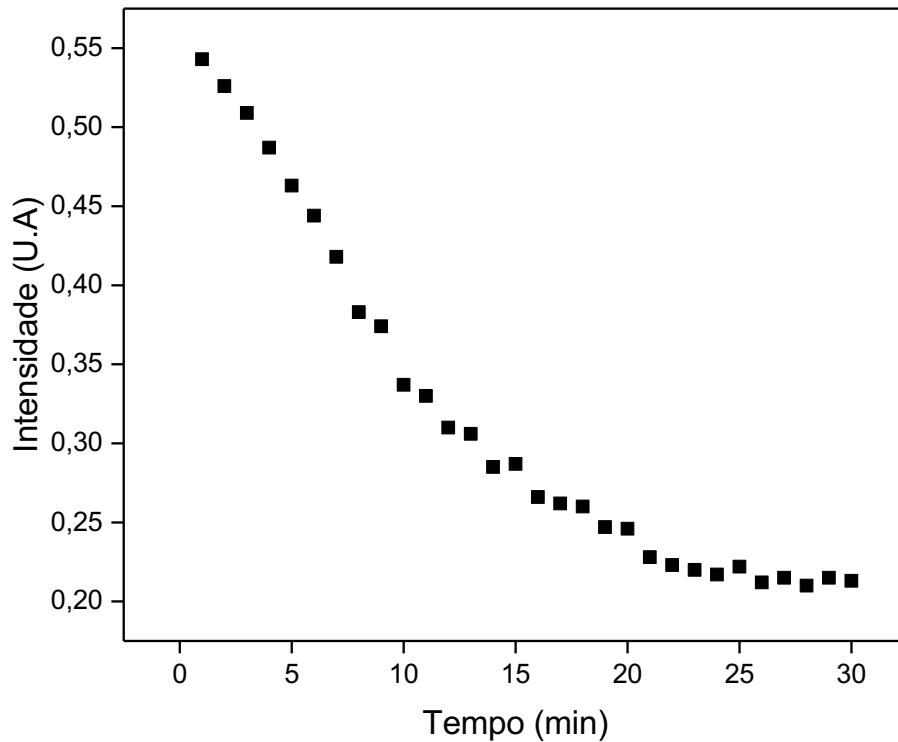
Figura 24. Gráfico obtido utilizando os valores de R, G e B para o tratamento da imagem adquirida após a análise de solução de Na_2SO_3 50 mg L^{-1} durante 30 minutos.



Fonte: O Autor

Para tentar encontrar o ponto de saturação, o modelo de cor RGB foi convertido para o modelo HSV. Esse espaço possibilita a representação das três cores primárias (Vermelho, Verde e Azul) como uma única variável conhecida como matiz (H). Além disso, é possível representar o sinal analítico como a intensidade da luminosidade (V) (MIN *et al.*, 2019). A Figura 25 apresenta o gráfico construído com os valores de (V) extraídos da imagem da solução de sulfito 50 mg L^{-1} . É possível notar que a partir de 20 minutos o gráfico atinge o ponto de saturação, o que coerente com o descrito pela Figura 23.

Figura 25. Gráfico obtido utilizando a variável matiz (H) da mosaico obtido após após a análise de solução de Na_2SO_3 50 mg L^{-1} durante 30 minutos.



Fonte: O Autor

Além dessa avaliação, foram construídas curvas analíticas variando a concentração de sulfito na faixa de 5 a 75 mg L^{-1} utilizando os diferentes canais dos modelos RGB e HSV. A Tabela 7 apresenta os parâmetros obtidos para curvas construídas utilizando as imagens obtidas após 10 minutos da adição do ácido fosfórico. A partir da análise da tabela é possível concluir que o espaço colorimétrico que representa uma melhor relação entre sinal analítico e concentração de sulfito é o espaço de cor HSV, representado pelo canal V.

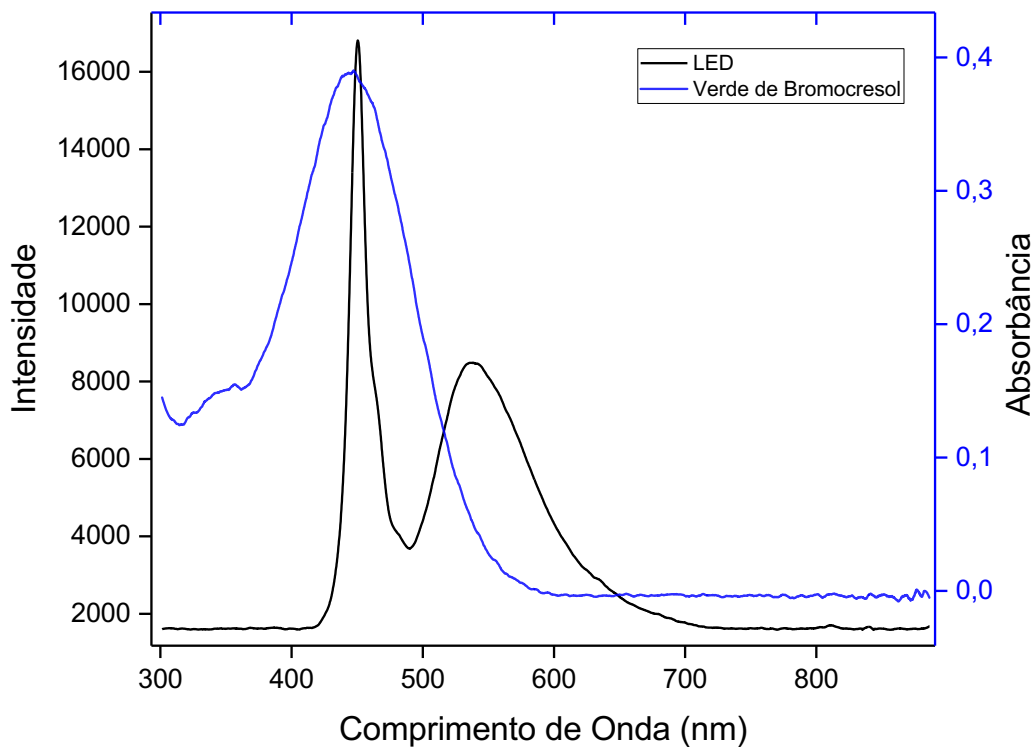
Tabela 7. Parâmetros obtidos para curvas construídas com os sinais de R, G, B e V para concentrações de sulfito na faixa de 5 a 90 mg L⁻¹

| Sinal | Coefficiente Angular | Coefficiente Linear | R² |
|--------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------|
| R | 0,1903 | 103,8647 | 0,8899 |
| G | 0,0818 | 117,6662 | 0,7498 |
| B | -0,1354 | 122,5215 | 0,9119 |
| V | -0,0034 | 0,5352 | 0,9907 |

Fonte: O Autor

Uma maneira de explicar a maior influência do canal V sobre o sinal obtido da reação é a partir da sobreposição do espectro do LED utilizado para controlar a iluminação e o espectro de absorção obtido para o Verde de Bromocresol na cor ácida. Os espectros estão apresentados na Figura 26.

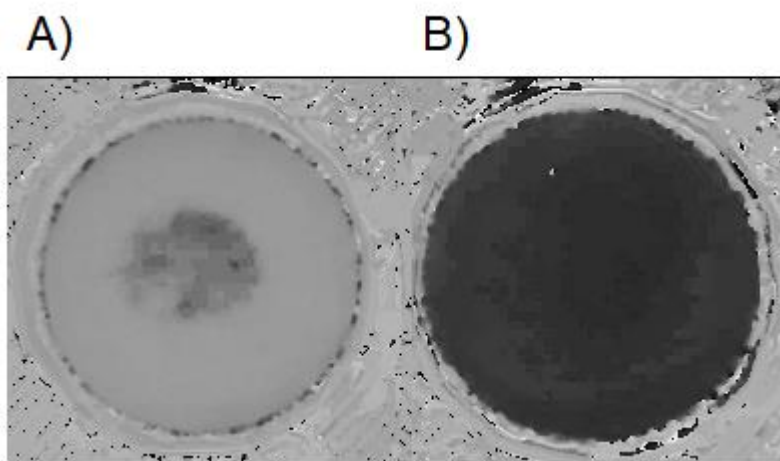
Figura 26. Sobreposição do espectro de emissão do LED utilizado para controlar a luminosidade do ambiente, com o espectro de absorção do Verde de Bromocresol na cor 1.



Fonte: O autor

A partir dos espectros apresentados na Figura 26, é possível notar que o comprimento de onda máximo de emissão do LED coincide com o comprimento de onda máximo de absorção da solução de verde de bromocresol, o que mostra que a maior parte da radiação que incide sobre a solução será absorvida. Isso se relaciona diretamente com o canal V, à medida que o produto da cor 1 é formado a luminosidade refletida pelo spot test diminui, e por conta é possível relacionar a concentração com o canal V do espaço HSV. A Figura 27 apresenta a comparação entre as reações com verde de bromocresol com uma solução de sulfito 5 mg L^{-1} e uma solução de sulfito 90 mg L^{-1} monitoradas durante 10 minutos.

Figura 27. Comparação entre o sinal obtido para o canal V, (A) solução de Na_2SO_3 5 mg L^{-1} . (B) solução de Na_2SO_3 90 mg L^{-1}



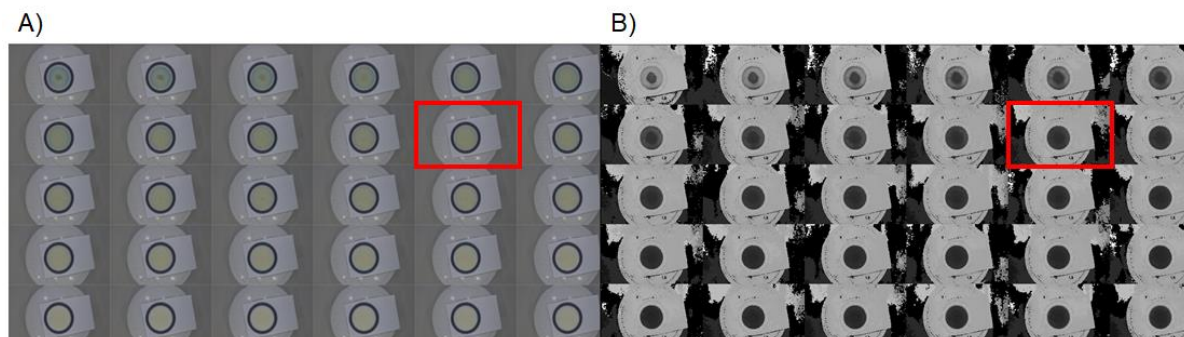
Fonte: O Autor

Como esperado a intensidade luminosa refletida pela solução de verde de bromocresol após reação com sulfito de sódio 90 mg L^{-1} , e menor quando comparado a solução de sulfito de sódio 5 mg L^{-1}

4.3.4 Otimização do tempo de reação

Após a definição do indicador ácido-base e o espaço de cor adequado, é importante avaliar o tempo necessário para que a reação possa atingir o ponto de saturação. Essa variável é importante já que cada concentração de Na_2SO_3 vai gerar uma quantidade diferente de mols de SO_2 e isso vai influenciar diretamente na velocidade em que a reação atinge o ponto de saturação. Conseqüentemente, será possível avaliar qual o tempo necessário para a análise em função da concentração de sulfito na amostra. Para avaliar o tempo de difusão e coleta, foram preparadas soluções de sulfito de sódio na faixa de 5 a 90 mg L^{-1} . As soluções foram submetidas ao protocolo descrito no item 4.2.4, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 28.

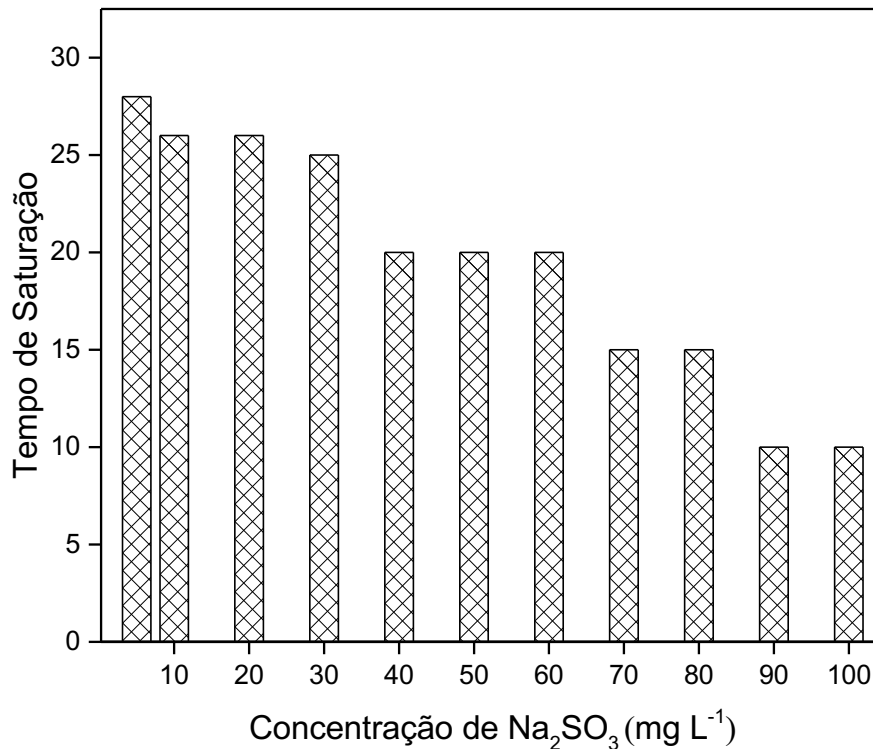
Figura 28. Mosaico obtido após a avaliação de uma solução de sulfito 90 mg L⁻¹. A) Indicação do ponto de saturação após 10 minutos de reação, B) Indicação do ponto de saturação após conversão da imagem para o espaço de cor HSV



Fonte: O Autor

Para exemplificar o momento em que o ponto de saturação é atingido, a Figura 28 apresenta a imagem construída seguindo o fluxograma descrito na Figura 16, para a concentração de sulfito 90 mg L⁻¹. Como cada concentração possui um tempo de saturação diferente é importante fixar qual será o melhor intervalo de análise. O tempo necessário para atingir o ponto de saturação para cada concentração está apresentado na Figura 29. A curva analítica deve ser construída utilizando o intervalo que será definido a partir da avaliação das curvas analíticas descritas na Figura 30.

Figura 29. Avaliação do tempo de saturação para o procedimento de determinação com diferentes concentrações de Na₂SO₃



Fonte: O Autor

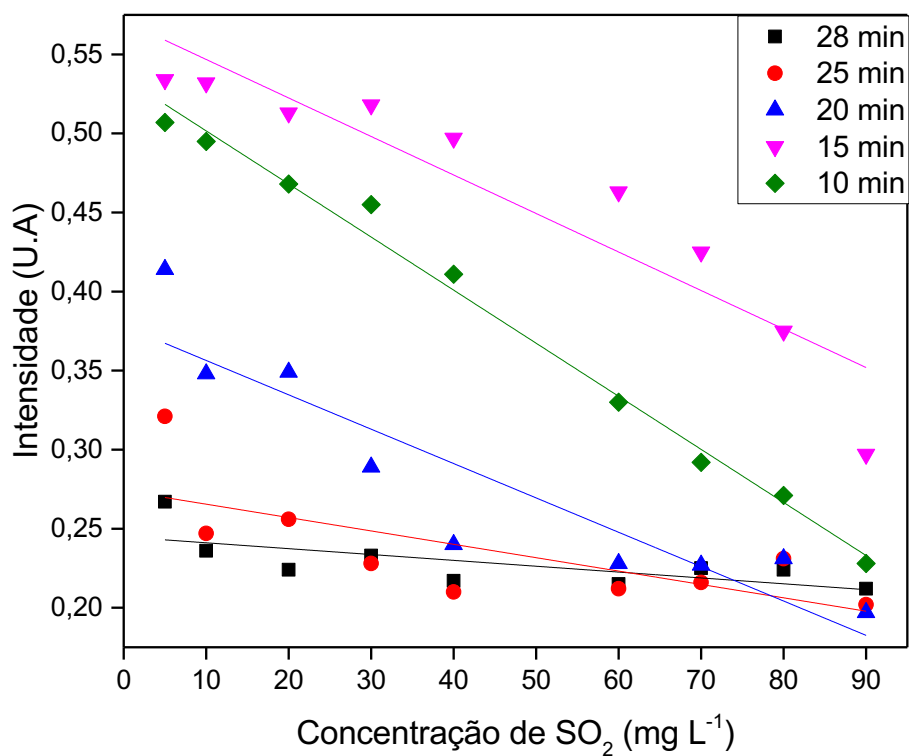
É possível notar que a medida que a concentração de sulfito aumenta, o tempo necessário para atingir o ponto de saturação diminui, como esperado. Durante a etapa de micro extração por difusão gasosa, o processo de difusão ocorre de forma estacionária o que possibilita relacionar o fluxo gerado com a primeira Lei de Fick que está descrita na Equação 12.

$$J(x, t) = -D \frac{dC}{dx}(x, t) \quad (12)$$

A primeira lei de Fick descreve que o fluxo de qualquer espécie na direção perpendicular que difunde por unidade de tempo é proporcional ao gradiente de concentração da espécie (BARROZO ASSIS VICENTE BENEDETTI, 2016). Isso fica evidente a partir da análise da figura 27, já que cada concentração gerou um fluxo

diferente de SO₂. Para estabelecer qual o tempo adequado para a volatilização e coleta, foi feita uma comparação entre as curvas obtidas para o tempo de saturação de cada uma das concentrações dentro do intervalo de 5 a 90 mg L⁻¹. O gráfico apresentado na Figura 30 foi construído e os parâmetros e as curvas obtidas são apresentadas na Tabela 8.

Figura 30. Curvas analíticas obtidas para cada tempo de saturação obtido após avaliação de diferentes concentrações de Na₂SO₃



Fonte: O Autor

Tabela 8. Curvas analíticas obtidas para cada tempo de saturação

| Tempo (min) | Coefficiente Angular | Coefficiente Linear | R ² |
|-------------|----------------------------|---------------------|----------------|
| 10 | -0,0033 | 0,5352 | 0,9907 |
| 15 | -0,0024 | 0,5711 | 0,8698 |
| 20 | -0,0022 | 0,3781 | 0,8409 |
| 25 | -8,4615 x 10 ⁻⁴ | 0,2739 | 0,5247 |
| 28 | -3,7051 x 10 ⁻⁴ | 0,2447 | 0,4874 |

Fonte: O Autor

A partir da análise dos parâmetros obtidos é possível concluir que o melhor tempo de análise é 10 minutos. Isso ocorre pois nesse intervalo de monitoramento da intensidade de cor apenas os pontos 80 mg L⁻¹ e 90 mg L⁻¹ atingiram o ponto de saturação, o que permite diferencia-los dos outros pontos da curva. É importante ressaltar que esse tempo foi adequado para essa faixa de trabalho escolhida. Caso a faixa de concentração de sulfito utilizada fosse maior, um menor tempo de volatilização e coleta seria adequado e, conseqüentemente, caso uma faixa menor de concentração fosse utilizada, resultaria em um tempo maior.

Além disso, à medida que o intervalo de monitoramento aumenta ocorre uma perda de linearidade, uma vez que as outras concentrações da curva atingem o ponto de saturação. Como exemplo tem-se o intervalo de 28 minutos no qual todos os pontos já atingiram a saturação e por conseqüência não é possível diferenciar as concentrações resultando em um valor de linearidade inadequado.

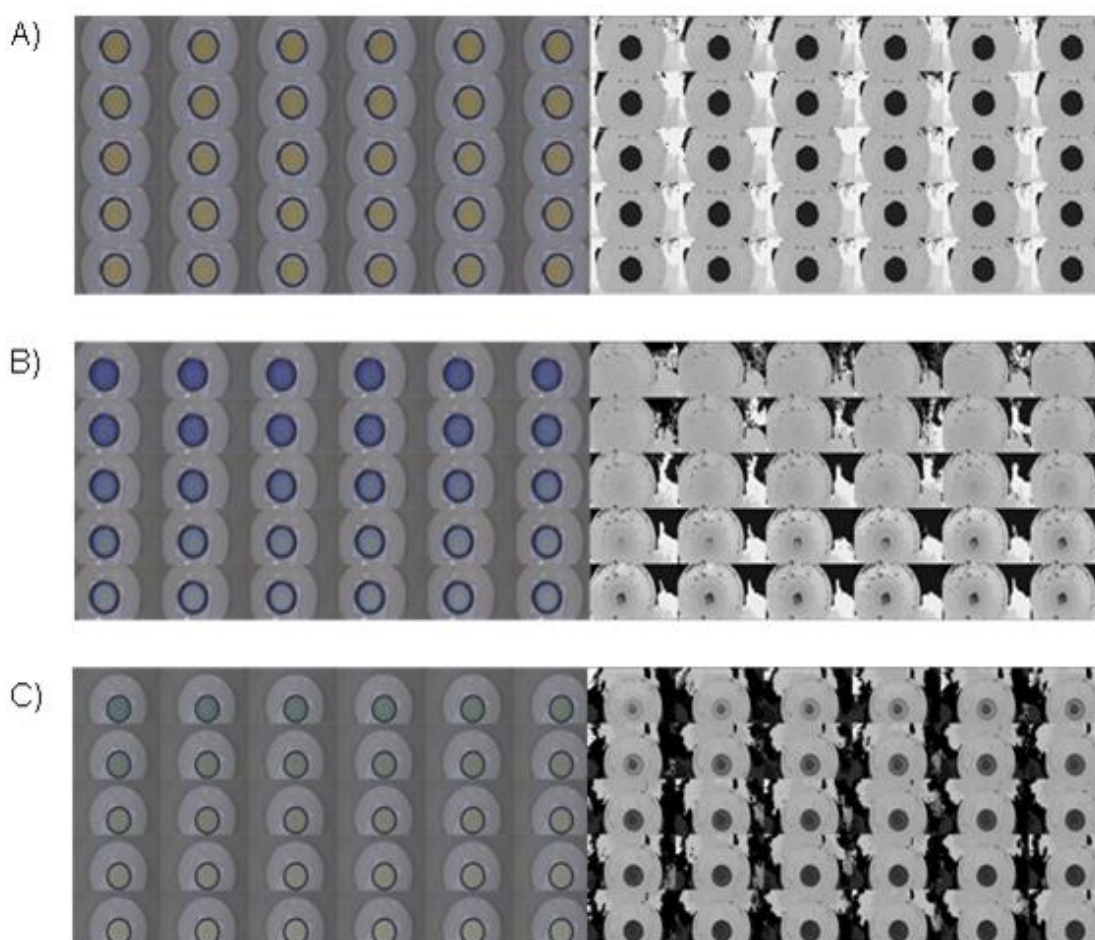
4.3.5 Avaliação e escolha do indicador Ácido-Base

Três indicadores ácido-base foram avaliados para serem utilizados nesse método: Verde de bromocresol, Alaranjado de Metila e Azul de Bromotimol. Foi preparada uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ de cada um dos indicadores, para isso pesou-se a respectiva massa e dilui-se na quantidade adequada de água destilada. Soluções de concentração de 125 mg L⁻¹ foram preparadas diariamente diluindo o volume adequado em água destilada.

Os indicadores foram avaliados com o objetivo de otimizar a sensibilidade e o tempo de resposta do método, uma vez que a escolha do indicador que possui a faixa de viragem adequada permitirá que a mudança de cor seja atingida com uma

menor quantidade de sulfito. Após o monitoramento da mudança de cor do papel impregnado com cada um dos indicadores, os valores de HSV foram extraídos e o indicador escolhido foi aquele que apresentou um sinal com maior magnitude. A concentração de sulfito utilizada foi de 50 mg L^{-1} . Figura 31 apresenta as imagens obtidas após a extração dos valores de HSV.

Figura 31. Imagens obtidas após a conversão para o espaço de cor HSV A) Alaranjado de Metila, B) Azul de Bromotimol, C) Verde de Bromocresol



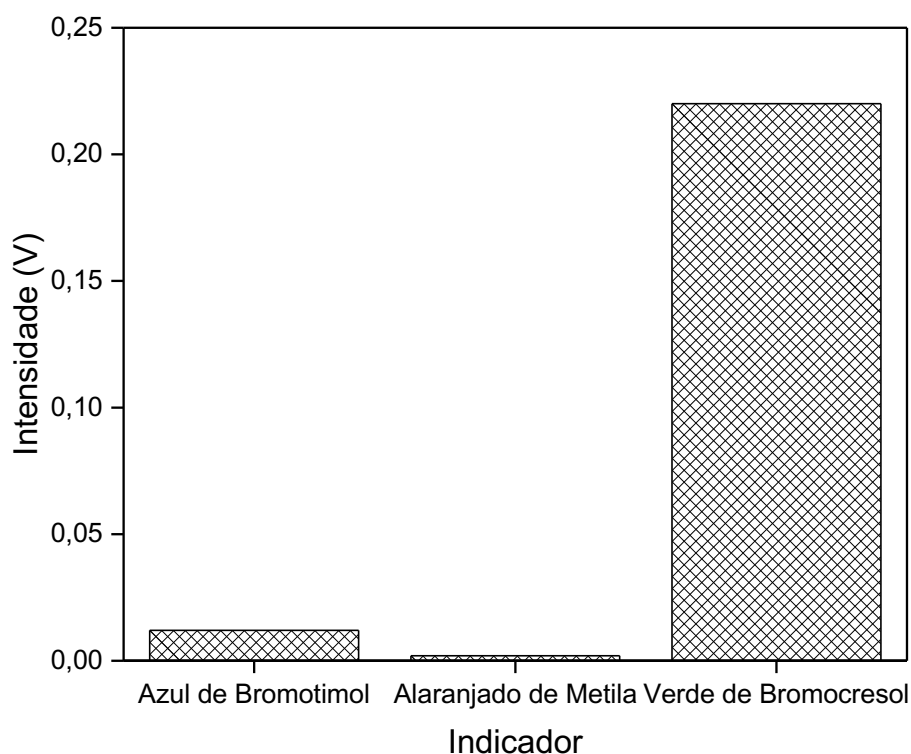
Fonte: O Autor

O canal do modelo de cor HSV escolhido para realizar a avaliação das imagens foi a luminosidade (V) e foi realizado o cálculo da magnitude do sinal obtido com cada um dos indicadores, como mostrado na equação abaixo. A escolha do parâmetro V está relacionado com a mudança de tonalidade gerada através da reação de sulfito com verde de bromocresol (azul para amarelo). Para o cálculo da

magnitude do sinal utilizando a Equação 13, foi considerado um tempo de 10 minutos de análise após a adição do ácido fosfórico.

$$\Delta = V_{\text{final}} - V_{\text{inicial}} \quad (13)$$

Figura 32. Magnitude do sinal analítico calculado em função do parâmetro Luminosidade (V) para os indicadores ácido-base avaliados.



Fonte: O Autor

A partir da análise do gráfico apresentado na Figura 32, é possível concluir que o indicador que proporcionou a maior magnitude foi o verde de bromocresol. Para explicar essa diferença na sensibilidade, é necessária a discussão a respeito dos pKas dos indicadores e os deslocamentos dos equilíbrios causados pela interação com SO₂ proveniente da solução de amostra.

Quando o spot de papel é impregnado com 30 µL de uma solução de verde de bromocresol, que possui pKa de 4,6 e faixa de viragem de 5,4 a 3,6, o reagente apresenta a coloração caracterizada pela maior concentração da base conjugada do indicador, ou seja, o equilíbrio está deslocado para a formação dos produtos. Isso

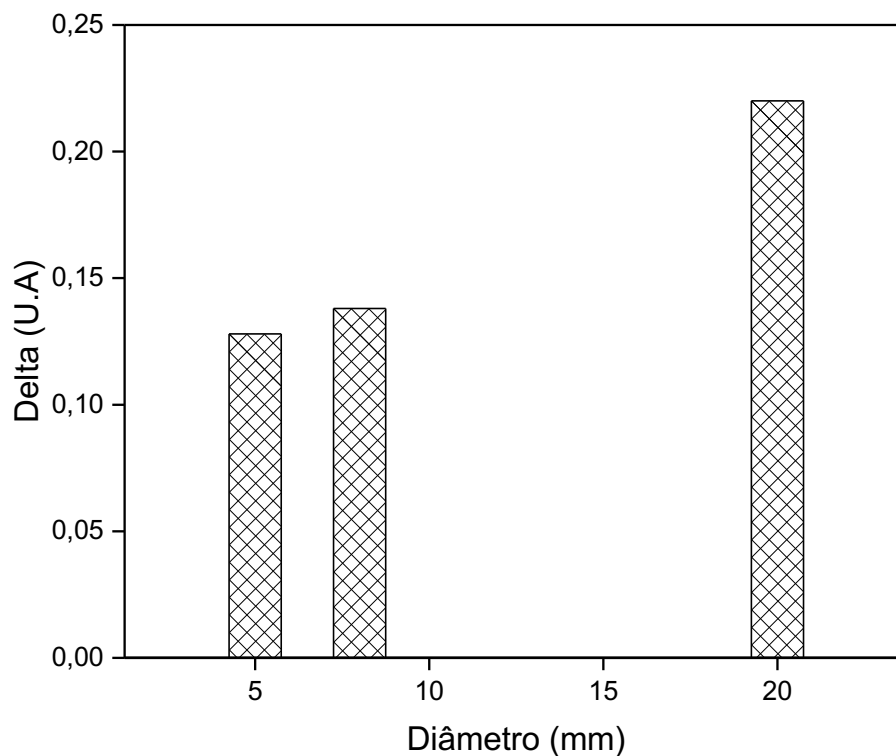
acontece pois o pH da água destilada utilizada para seu preparo está na faixa de 6-5,5. Como essa região é muito próxima da faixa de viragem do indicador, pequenas quantidades de SO_2 provocam o deslocamento do equilíbrio para a forma ácida do indicador, portanto, provocando a mudança de cor notada na reação como foi mostrado na Figura 23. Já o alaranjado de metila ($\text{pK}_a = 3,1$) necessita de uma quantidade maior de SO_2 para provocar a mudança de cor, resultando em uma menor sensibilidade no método utilizando esse indicador. O azul de bromotimol ($\text{pK}_a = 7,1$) possui uma faixa de viragem de 7,6 a 6,0, devido a isso é possível notar uma variação na coloração após a reação. A magnitude do sinal é menor que a do verde de bromocresol, pois 30 minutos não foram suficientes para atingir o ponto de saturação da reação, o que mostra que o azul de bromotimol necessita de uma maior quantidade de SO_2 .

4.3.6 Otimização do diâmetro do spot de papel

Após a escolha do indicador ácido-base adequado para monitorar a presença de SO_2 a partir da variação de pH, partiu-se para avaliação do diâmetro do spot test utilizado para impregnação do indicador e seu efeito na mudança de cor provocada pelo SO_2 . Conseqüentemente, diferentes diâmetros de spot resultam em volumes diferentes da solução do indicador. Nessa etapa, a avaliação foi realizada utilizando como parâmetro a magnitude do sinal obtido para cada um dos diâmetros de spots.

Foram avaliados os spots de diâmetros de 5 mm, 8 mm e 20 mm que foram desenhados no software Inkscape® e impressos utilizando uma impressora de jato de cera (Xerox ColorQube 8570). A magnitude foi avaliada para a concentração de sulfito de 50 mg L^{-1} , e o procedimento foi realizado segundo protocolo para análise apresentado no item 2.4. As imagens foram obtidas após 10 minutos da adição do ácido.

Figura 33. Magnitude do sinal para cada um dos spots de diferentes diâmetros e submetidos a determinação de sulfito



Fonte: O Autor

A partir da análise gráfico apresentado na Figura 33, fica evidente que o spot que proporcionou maior sensibilidade foi o de 20 mm de diâmetro. Isso é coerente já que um maior volume de indicador pode ser utilizado, proporcionando assim uma maior diferença na intensidade do sinal com pequenas variações da concentração de Na_2SO_3 .

4.3.7 Figuras de Mérito do método de determinação de sulfito

A performance analítica do método foi avaliada utilizando os parâmetros previamente otimizados. Foi construída uma curva analítica relacionando diferentes concentrações de sulfito e o valor de luminosidade (V) obtido a partir do tratamento das imagens digitais. A relação linear foi obtida na faixa de 5 a 90 mg L^{-1} de Na_2SO_3 . A precisão do método foi determinada como o coeficiente de variação de 5 medidas consecutivas da reação na concentração de 40 mg L^{-1} de Na_2SO_3 . O limite de

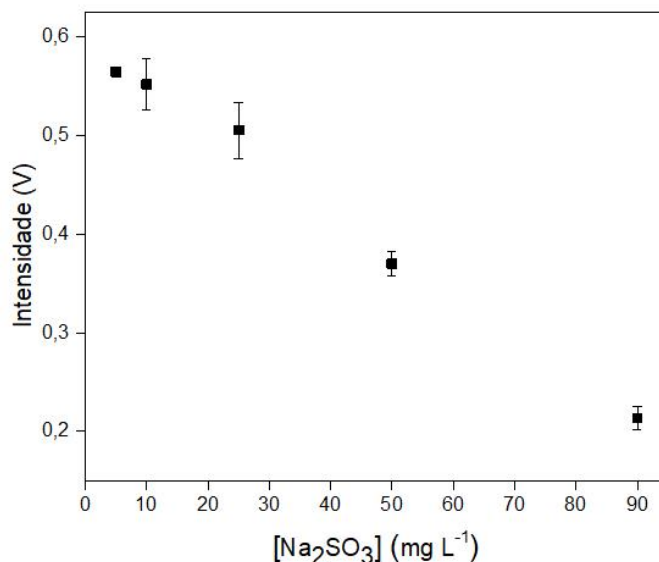
quantificação foi obtido experimentalmente a partir da avaliação da menor concentração de Na₂SO₃ que gerava uma resposta linear, com isso foi obtido um valor de 5 mg L⁻¹. O limite de detecção foi calculado de forma teórica aplicando a equação 7, e foi obtido um valor de 1,6 mg L⁻¹. A tabela 5 apresenta as figuras de mérito obtidas e a Figura 34 contém a curva obtida com aplicação das variáveis otimizadas. O tempo de exposição do papel impregnado com o corante foi de 10 minutos.

Tabela 9. Figuras de Mérito do método desenvolvido para determinação de sulfito

| Parâmetro | Valor |
|----------------------------|--|
| Faixa Linear | 5 – 90 mg L ⁻¹ |
| Coefficiente de correlação | 0,9988 |
| Equação Analítica | $V = -0,0041[\text{Na}_2\text{SO}_3] + 0,5852$ |
| Tempo de Análise | 10 minutos |
| Limite de Quantificação | 5,0 mg L ⁻¹ |
| Limite de Detecção | 1,6 mg L ⁻¹ |
| Repetibilidade (n =5) | 2,2 % |

Fonte: O Autor

Figura 34. Curva obtida para soluções de Na_2SO_3 (5-90 mg L^{-1}) após 10 minutos de reação



Fonte: O Autor

4.3.8 Aplicação em amostras de suco concentrado

O método desenvolvido foi aplicado na determinação de sulfito em amostras de suco concentrado. Vale ressaltar que o limite estabelecido pela agência nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é de 50 mg L^{-1} . Inicialmente, foi avaliada a exatidão em termos de recuperação, com objetivo de avaliar a eficiência do processo de extração. Para isso uma amostra de suco de uva concentrado foi fortificada com 50 mg L^{-1} de Na_2SO_3 , e o resultado obtido foi comparado com o método oficial de Monier-Williams. O cálculo para obter os valores de recuperação foi realizado aplicando a equação 14. Na qual $C_{\text{experimental}}$ é o valor obtido após análise da amostra fortificada e $C_{\text{teórico}}$ o valor de concentração esperado após a análise da amostra fortificada.

$$\text{Rec}(\%) = \frac{C_{\text{experimental}}}{C_{\text{teórica}}} \times 100 \quad (14)$$

Os resultados obtidos para o método proposto e para o método oficial estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores obtidos após o ensaio de adição e recuperação

| Amostra | Método Proposto | | Método Oficial |
|--------------------------------------|---|-------------|---|
| | Concentração de Na ₂ SO ₃ (mg L ⁻¹) | Recuperação | Concentração de Na ₂ SO ₃ (mg L ⁻¹) |
| Suco de Uva | 16,9 (± 1,1) | - | 19,2 mg L ⁻¹ |
| Suco de Uva (50 mg L ⁻¹) | 70,6 (± 2,9) | 105,5 % | - |

Fonte: O Autor

A partir dos dados apresentados na Tabela 10 é possível notar que o método proposto apresentou valores satisfatórios quando aplicado na amostra, e a partir da informação de adição e recuperação é possível notar que o método proposto funciona na faixa estipulada pela legislação.

4.4 Conclusão

Neste capítulo da dissertação foi descrito o desenvolvimento de um método portátil, rápido e de baixo custo para determinação de sulfito em amostras de suco concentrado. A aplicação da técnica de impressão 3D possibilitou a construção de uma plataforma miniaturizada para aplicar a técnica de micro-extração por difusão gasosa (GDME). O dispositivo analítico baseado em papel no formato de spot test foi aplicado como suporte para a solução aceptora para coleta do SO₂ gerado. A mudança de cor provocada pela presença de indicadores ácido-base foram utilizadas como sinal analítico utilizando tratamento de imagens digitais. Uma das vantagens do método descrito é a aplicação de pequenos volumes de amostra e reagente, principalmente o volume de solução aceptora que no método proposto foi utilizado apenas 30 µL. Além disso, a aplicação de dispositivos analíticos em papel facilita a miniaturização já que possibilita a realização da etapa de detecção e

extração simultaneamente. Os resultados obtidos demonstraram que é possível aplicar o método proposto para realizar o controle de qualidade de sucos concentrados no local.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho de mestrado foram desenvolvidos dois métodos analíticos de baixo custo aplicando reações colorimétricas realizadas em dispositivos analíticos baseado em papel no formato de spot test's. Os dois métodos se mostraram como excelentes alternativas aos respectivos métodos oficiais. A aplicação do tratamento de imagens digitais tem se mostrado uma excelente alternativa para o monitoramento de reações colorimétricas, já que possibilita a construção de plataformas miniaturizadas e de baixo custo. Além disso, a utilização de dispositivos analíticos baseados em papel tem possibilitado a realização de reações colorimétricas aplicando micro volumes o que minimiza o volume de reagentes que precisa ser empregado possibilitando o desenvolvimento de métodos ambientalmente amigáveis, uma vez que o volume de reagentes descartados será minimizado consideravelmente. E como citado anteriormente, os métodos que foram desenvolvidos durante o trabalho de mestrado possibilitam a realização do controle de qualidade e a detecção de contaminantes em bebidas, com as vantagens de possibilitar a realização de análises *in-situ*, apresentarem fácil manuseio e baixa custo para construção para as plataformas aplicadas em cada uma das metodologias. A aplicação de dispositivos analíticos baseados em papel se mostrou muito viável e pode ser facilmente adaptada para outros analitos, basta planejar a reação colorimétrica adequada, possibilitando assim a construção de plataformas de baixo custo.

6 REFERÊNCIAS

ALAWSI, T. *et al.* Smartphone-based colorimetric sensor application for measuring biochemical material concentration. *Sensing and Bio-Sensing Research*, v. 32, n. February, p. 100404, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2021.100404>>.

ARVAND, M. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction of Fe(II) and Cu(II) with diethyldithiocarbamate and their simultaneous spectrophotometric determination using mean centering of ratio spectra. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 69, n. 3, p. 243–247, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1134/S1061934814030022>>

BALASUBRAMANIAN, S. *et al.* Digital colorimetric analysis for estimation of iron in water with smartphone-assisted microfluidic paper-based analytical devices. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 00, n. 00, p. 1–18, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1893711>>.

BARBOSA, E. R. *et al.* Wilson's disease: A case report and a historical review. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 67, n. 2 B, p. 539–543, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0004-282X2009000300036>>

BARRETO, D. *et al.* PERFORMING RELIABLE ABSORBANCE AND FLUORESCENCE MEASUREMENTS WITH LOW BUDGET – A TUTORIAL FOR BEGINNERS. *Química Nova*, v. 44, n. 9, p. 1184–1191, 2021a. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9311&nomeArquivo=NT2021-0009.pdf>.

BARROZO ASSIS VICENTE BENEDETTI, S. Compreensão Matemática Da Difusão No Contexto Eletroquímico. *Quim. Nova*, v. 39, n. 3, p. 356–370, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150179>>.

BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Assessment of chemical quality of Brazilian sugar cane spirits and cachaças. *Food Control*, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.030>>

BOZA, Y.; HORII, J. Influência Do Grau Alcoólico E Da Acidez Do Destilado Sobre O Teor De Cobre Na Aguardente De Cana. *Boletim do Centro de Pesquisa de*

Processamento de Alimentos, v. 18, n. 1, 2000. Disponível em:
<<https://doi.org/10.5380/cep.v18i1.1127>>

BRANDÃO, PEDRO F. *et al.* Gas-diffusion microextraction coupled with spectrophotometry for the determination of formaldehyde in cork agglomerates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 409, n. 11, p. 2885–2892, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0233-x>>

BRANDÃO, PEDRO FRANCISCO; RAMOS, R. M.; RODRIGUES, J. A. GDME-based methodology for the determination of free formaldehyde in cosmetics and hygiene products containing formaldehyde releasers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 410, n. 26, p. 6873–6880, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1287-0>>

BUI, D. A.; HAUSER, P. C. Analytical devices based on light-emitting diodes - A review of the state-of-the-art. *Analytica Chimica Acta*, v. 853, n. 1, p. 46–58, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.044>>

CAPITÁN-VALLVEY, L. F. *et al.* Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*, v. 899, p. 23–56, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009>>

CARDOSO, R. M. *et al.* Additive-manufactured (3D-printed) electrochemical sensors: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1118, p. 73–91, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.028>>

CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 16, p. 7091–7095, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ac901071p>>

CHEN, C. *et al.* Sensors and Actuators B : Chemical Fast analysis of ketamine using a colorimetric immunosorbent assay on a paper-based analytical device. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, v. 282, n. November 2018, p. 251–258, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.071>>.

CHOWDURY, M. A. *et al.* Paper-Based Microfluidic Device with a Gold Nanosensor

to Detect Arsenic Contamination of Groundwater in Bangladesh. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/mi8030071>>

COUTINHO, M. S. *et al.* Colorimetric determination of ascorbic acid based on its interfering effect in the enzymatic analysis of glucose: An approach using smartphone image analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 12, p. 2500–2505, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170086>>

CUSTODIO-MENDOZA, J. A. *et al.* Determination of malondialdehyde, acrolein and four other products of lipid peroxidation in edible oils by Gas-Diffusion Microextraction combined with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1627, p. 461397, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461397>>.

DECNOP-WEEVER, L. G.; KRAAK, J. C. Determination of sulphite in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing spectrophotometric pH-detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 337, n. 2, p. 125–131, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)00421-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(96)00421-7)>

DRIVERS, R. CCD vs . CMOS : Choosing an imager means considering not only the chip , but. n. January, 2001.

ERENAS, M. M. *et al.* Use of digital reflection devices for measurement using hue-based optical sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 174, p. 10–17, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.07.100>>.

ESPINOLA, A. Fritz Feigl: sua obra e novos campos tecno-científicos por ela originados. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 169–176, fev. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000100029&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

FEIGEL, F.; ANGER, V. *Spot Tests in Organic Analysis*. Elsevier Inc., 1973. Disponível em: <<https://doi.org/10.1149/1.2403827>>

FEIGL, F.; OESPER, R. E. *Spot Tests in Inorganic Analysis*. Elsevier Inc., 1972.

FU, L.; WANG, Y. AC. *Trends in Analytical Chemistry*, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.018>>.

GAN, W. *et al.* A filter paper-based microdevice for low-cost, rapid, and automated DNA extraction and amplification from diverse sample types. *Lab on a Chip*, v. 14, n. 19, p. 3719–3728, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C4LC00686K>>

GARBIN, R.; BOGUSZ JUNIOR, S.; MONTANO, M. A. Níveis de cobre em amostras de cachaça produzidas na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 35, n. 6, p. 1436–1440, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000600033>>

GARCIA, M. M. *et al.* Determination of copper and lead in tequila by conventional matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and partial least squares regression. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 32, n. 24, p. 2174–2184, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/rcm.8297>>

HELPER, G. A. *et al.* PhotoMetrix: An application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 2, p. 328–335, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160182>>

HELMHOLTZ, H. Zur Theorie der anomalen Dispersion. *Annalen der Physik und Chemie*, v. 230, n. 4, p. 582–596, 1875. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/andp.18752300406>>.

HILLERY, B. R. *et al.* Optimized Monier-Williams method for determination of sulfites in foods: collaborative study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, v. 72, n. 3, p. 470–475, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jaoac/72.3.470>>

ISIQUE, W. D.; CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Teores De Enxofre E Aceitabilidade De Aguardentes De Cana Brasileiras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 3, p. 356–359, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0101-20611998000300019>>

JAIN, R. *et al.* Advances in Imaging-Assisted Sensing Techniques for Heavy Metals

in Water: Trends, Challenges, and Opportunities. *Trends in Analytical Chemistry*, p. 115758, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115758>>.

JOÃO, A. F. *et al.* Iron (III) determination in bioethanol fuel using a smartphone-based device. *Microchemical Journal*, v. 146, n. October 2018, p. 1134–1139, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.053>>.

KAKOTI, A.; SIDDIQUI, M. F.; GOSWAMI, P. A low cost design and fabrication method for developing a leak proof paper based microfluidic device with customized test zone. *Biomicrofluidics*, v. 9, n. 2, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.4918641>>

KANCHI, S. *et al.* Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 102, n. November, p. 136–149, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.021>>.

KHATHA, P. *et al.* Distance-based paper device combined with headspace extraction for determination of cyanide. *Sensors (Switzerland)*, v. 19, n. 10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/s19102340>>

KIM, B. E.; NEVITT, T.; THIELE, D. J. *Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. Nature Chemical Biology*. 2008 Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nchembio.72>>

KIM, J. Y.; YEO, M. K. A fabricated microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) for in situ rapid colorimetric detection of microorganisms in environmental water samples. *Molecular and Cellular Toxicology*, v. 12, n. 1, p. 101–109, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13273-016-0013-2>>

KOBAL DE OLIVEIRA ALVES CARDOSO, R.; MAURA TOREZAN SILINGARDI, H.; ALVES CARDOSO, A. Gases ácidos na atmosfera: fontes, transporte, deposição e suas consequências para o ambiente. *Química Nova na escola*, v. 42, n. 4, p. 382–385, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.21577/0104-8899.20160222>>

KUDO, H. *et al.* Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Colorimetric Detection of Lactoferrin. 2020.

LAMARCA, R. S. *et al.* Determination of formaldehyde in cosmetic products using gas-diffusion microextraction coupled with a smartphone reader. *Analytical Methods*, v. 11, n. 29, p. 3697–3705, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C9AY00720B>>

LEAL, V. G.; BATISTA, A. D.; PETRUCI, J. F. DA S. 3D-printed and fully portable fluorescent-based platform for sulfide determination in waters combining vapor generation extraction and digital images treatment. *Talanta*, v. 222, n. April 2020, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121558>>

LI, Z.; ASKIM, J. R.; SUSLICK, K. S. The Optoelectronic Nose: Colorimetric and Fluorometric Sensor Arrays. *Chemical Reviews*, v. 119, n. 1, p. 231–292, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00226>>

LIMA, M. J. A.; NASCIMENTO, C. F.; ROCHA, F. R. P. Feasible photometric measurements in liquid-liquid extraction by exploiting smartphone-based digital images. *Analytical Methods*, v. 9, n. 14, p. 2220–2225, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C7AY00388A>>

LIN, J. M.; HOBBO, T. Flow-injection analysis with chemiluminescent detection of sulphite using Na₂CO₃-NaHCO₃-Cu²⁺ system. *Analytica Chimica Acta*, v. 323, n. 1–3, p. 69–74, 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0003-2670\(95\)00611-7](https://doi.org/10.1016/0003-2670(95)00611-7)>

LIU, C. *et al.* A colorimetric assay system for dopamine using microfluidic paper-based analytical devices. *Talanta*, v. 194, n. February 2018, p. 171–176, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.039>>.

LIU, C. C. *et al.* Rapid integrated microfluidic paper-based system for sulfur dioxide detection. *Chemical Engineering Journal*, v. 316, p. 790–796, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.023>>.

MADEIRA, L. M. C. G. Tratamento de Cor em Pós-Produção Televisiva: O Caso da Produtora de Conteúdos SP Televisão. *Dissertação de Mestrado em Audiovisual e Multimédia do Instituto Politécnico de Lisboa*, 2012.

MALEKGHASEMI, S.; KAHVECI, E.; DUMAN, M. Rapid and alternative fabrication

method for microfluidic paper based analytical devices. *Talanta*, v. 159, p. 401–411, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.040>>.

MARCZENKO, Z.; BALCERZAK, M. (Analytical Spectroscopy Library 10) Zygmunt Marczenko and Maria Balcerzak (Eds.) - Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis-Elsevier Science (2000).pdf. v. 10, p. 518, 2000.

MARINHO, O. R. *et al.* A greener, fast, and cost-effective smartphone-based digital image procedure for quantification of ethanol in distilled beverages. *Microchemical Journal*, v. 147, n. November 2018, p. 437–443, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.054>>.

MELO, D. *et al.* Spectrophotometric flow-injection determination of sulphite in white wines involving gas diffusion through a concentric tubular membrane. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 3, p. 375–379, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000300006>>

MIN, K. P. *et al.* A G-fresnel optical device and image processing based miniature spectrometer for mechanoluminescence sensor applications. *Sensors (Switzerland)*, v. 19, n. 16, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/s19163528>>

NGUYEN, Q. H.; KIM, M. IL. Nanomaterial-mediated paper-based biosensors for colorimetric pathogen detection. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 132, p. 116038, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116038>>.

OSTAD, M. A.; HAJINIA, A.; HEIDARI, T. A novel direct and cost effective method for fabricating paper-based micro fluidic device by commercial eye pencil and its application for determining simultaneous calcium and magnesium. *Microchemical Journal*, v. 133, p. 545–550, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.031>>.

PACHECO, J. G. *et al.* Gas-diffusion microextraction. *Journal of Separation Science*, v. 33, n. 20, p. 3207–3212, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jssc.201000351>>

PANRAKSA, Y. *et al.* Paper-based amperometric sensor for determination of acetylcholinesterase using screen-printed graphene electrode. *Talanta*, v. 178, n. September 2017, p. 1017–1023, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.096>>.

PINHEIRO, P. C.; LEAL, M. C.; ARAÚJO, D. A. DE. Origem, produção e composição química da cachaça. *Química Nova na Escola*, v. 18, p. 3–8, 2003.

PISOSCHI, A. M. *et al.* Analytical methods applied to the assay of sulfur-containing preserving agents. *Microchemical Journal*, v. 155, n. February, p. 104681, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104681>>.

RACICOT, J. M. *et al.* Phosphate Detection in Seawater. p. 1–11, 2020.

RAMDZAN, A. N. *et al.* Development of a microfluidic paper-based analytical device for the determination of salivary aldehydes. *Analytica Chimica Acta*, v. 919, p. 47–54, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.030>>

RUECHA, N. *et al.* Fully Inkjet-Printed Paper-Based Potentiometric Ion-Sensing Devices. *Analytical Chemistry*, v. 89, n. 19, p. 10608–10616, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03177>>

RUIZ-CAPILLAS, C.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: A review. *Food Chemistry*, v. 112, n. 2, p. 487–493, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.085>>

SALVE, M. *et al.* Quantifying colorimetric assays in μ PAD for milk adulterants detection using colorimetric android application. *Micro and Nano Letters*, v. 13, n. 11, p. 1520–1524, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1049/mnl.2018.5334>>

SCHMIDT, B.; KING, D.; KARIUKI, J. Designing and Using 3D-Printed Components That Allow Students to Fabricate Low-Cost, Adaptable, Disposable, and Reliable Ag/AgCl Reference Electrodes. *Journal of Chemical Education*, v. 95, n. 11, p. 2076–2080, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00512>>

SCORDO, G. *et al.* A reagent-free paper-based sensor embedded in a 3D printing

device for cholinesterase activity measurement in serum. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 258, p. 1015–1021, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.134>>.

SERAFIM, F. A. T.; LANÇAS, F. M. *Sugarcane Spirits (Cachaça) Quality Assurance and Traceability: An Analytical Perspective*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815260-7.00011-0>>.

SERESHTI, H.; BAKHTIARI, S.; KHOJEH, V. Simultaneous determination of aluminum, copper, iron and zinc in *Oscillatoria*, *Juncus littoralis* tissues and wetland water samples by ultrasound-assisted emulsification-microextraction combined with ICP-OES. *Analytical Methods*, v. 3, n. 12, p. 2936–2942, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c1ay05456b>>

SHEINI, A. Colorimetric aggregation assay based on array of gold and silver nanoparticles for simultaneous analysis of aflatoxins , ochratoxin and zearalenone by using chemometric analysis and paper based analytical devices. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00604-020-4147-5>>

SHIN, J. *et al.* Smart Forensic Phone: Colorimetric analysis of a bloodstain for age estimation using a smartphone. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 243, p. 221–225, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.142>>.

SILVELLO, G. C. *Development of an electronic nose for characterizing the level of maturation of cachaça*. 2021. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-10092021-154905/>>.

SOARES, S. *et al.* A novel spot test based on digital images for determination of methanol in biodiesel. *Talanta*, v. 195, p. 229–235, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.028>>.

SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Green volumetric procedure for determining biodiesel content in diesel blends or mixtures with vegetable oils exploiting solubility differences in an ethanol:water medium. *Fuel*, v. 276, n. January, p. 118042, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118042>>.

SRIRAM, G. *et al.* Paper-based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: A review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 93, p. 212–227, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2017.06.005>>.

SULLIVAN, J. J. *et al.* Determination of free (pH 2.2) sulfite in wines by flow injection analysis: collaborative study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, v. 73, n. 2, p. 223–226, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jaoac/73.2.223>>

SWINEHART, D. F. The Beer-Lambert law. *Journal of Chemical Education*, v. 39, n. 7, p. 333–335, 1962. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ed039p333>>

TAVARES ARAÚJO, C. S. *et al.* Determination of sulphite and acetic acid in foods by gas permeation flow injection analysis. *Food Chemistry*, v. 92, n. 4, p. 765–770, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.032>>

TAYLOR, S. L.; HIGLEY, N. A.; BUSH, R. K. Sulfites in foods: Uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Advances in Food Research*, v. 30, n. C, p. 1–76, 1986. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60347-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60347-X)>

TEENGAM, P. *et al.* Fluorescent paper-based DNA sensor using pyrrolidinyl peptide nucleic acids for hepatitis C virus detection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 189, n. May, p. 113381, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113381>>.

THANH, N. T. K.; DECNOP-WEEVER, L. G.; KOK, W. T. Determination of sulphite in wine by flow injection analysis with indirect electrochemical detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v. 349, n. 6, p. 469–472, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00322936>>

UDDIN, M. N.; ABDUS SALAM, M.; HOSSAIN, M. A. Spectrophotometric measurement of Cu(DDTC)₂ for the simultaneous determination of zinc and copper. *Chemosphere*, v. 90, n. 2, p. 366–373, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.07.029>>.

VIDAL, E. *et al.* Micropaper-based analytical device (μPAD) for the simultaneous

determination of nitrite and fluoride using a smartphone. *Microchemical Journal*, v. 143, n. August, p. 467–473, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.08.042>>.

WANG, C. *et al.* A smartphone-integrated paper sensing system for fluorescent and colorimetric dual-channel detection of foodborne pathogenic bacteria. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 412, n. 3, p. 611–620, 2020. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s00216-019-02208-z>>

WANG, L. *et al.* Simultaneous determination of copper, cobalt, and mercury ions in water samples by solid-phase extraction using carbon nanotube sponges as adsorbent after chelating with sodium diethyldithiocarbamate prior to high performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 408, n. 16, p. 4445–4453, 2016. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s00216-016-9542-8>>

WANG, Y. *et al.* Quantification of combined color and shade changes in colorimetry and image analysis: Water pH measurement as an example. *Analytical Methods*, v. 10, n. 25, p. 3059–3065, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C8AY00984H>>

WEAVER, A. A. *et al.* Paper analytical devices for fast field screening of beta lactam antibiotics and antituberculosis pharmaceuticals. *Analytical Chemistry*, v. 85, n. 13, p. 6453–6460, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ac400989p>>

WENG, X.; NEETHIRAJAN, S. Aptamer-based fluorometric determination of norovirus using a paper-based microfluidic device. *Microchimica Acta*, v. 184, n. 11, p. 4545–4552, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00604-017-2467-x>>

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. v. 442, n. July, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature05058>>

WILLARD, H. H. From Buret and Balance to Spectrometer and Titrimeter (Fisher Award Address). *Analytical Chemistry*, v. 23, n. 12, p. 1726–1729, 1951. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ac60060a002>>

YAO, Y.; PING, J. Recent advances in graphene-based freestanding paper-like

materials for sensing applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 105, p. 75–88, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.014>>.

YU, J. *et al.* Light-Controlled Configurable Colorimetric Sensing Array. *Analytical Chemistry*, v. 91, n. 10, p. 6632–6637, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00549>>

YUSUFU, D.; MILLS, A. Spectrophotometric and Digital Colour Colourimetric (DCC) analysis of colour-based indicators. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 273, n. July, p. 1187–1194, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.131>>.

ZAJC, B.; TKALČIČ, M. IEEE Region 8 EUROCON 2003: Computer as a Tool - Proceedings. *IEEE Region 8 EUROCON 2003: Computer as a Tool - Proceedings*, v. B, n. September, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1109/EURCON.2003.1247974>>

ZHAI, H. *et al.* Talanta Colorimetric speciation of Cr on paper-based analytical devices based on field amplified stacking. *Talanta*, v. 210, n. December 2019, p. 120635, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120635>>.

ZHANG, H. *et al.* Inkjet printed microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) for glucose colorimetric detection in artificial urine. *Biomedical Microdevices*. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10544-019-0388-7>>