

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Química

GABRIEL MARTINS FERNANDES

**ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADAS EM
DISPOSITIVOS DE PAPEL, DISPOSTIVOS MINIATURIZADOS E IMPRESSÃO 3D**

UBERLÂNDIA

2019

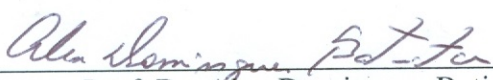
GABRIEL MARTINS FERNANDES

**ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADAS EM
DISPOSITIVOS DE PAPEL, DISPOSITIVOS MINIATURIZADOS E IMPRESSÃO 3D**

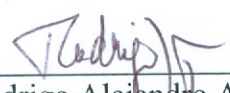
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Alex Domingues
Batista

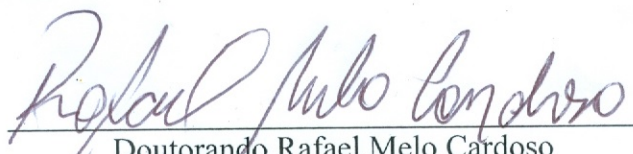
Banca Examinadora



Prof. Dr. Alex Domingues Batista
(Orientador)



Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz
(Examinadora)



Doutorando Rafael Melo Cardoso
(Examinador)

Uberlândia, 22 de outubro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder força e discernimento para concluir todos os desafios. Sem ele jamais teria chegado até aqui

Aos meus pais, Cynthia e Marcelo, por todo apoio, motivação e amor incondicional. Todas as minhas conquistas são graças a vocês

Ao meu Orientador, Prof Dr. Alex Domingues Batista, pela orientação, paciência e confiança durante todos esses anos de convivência, e principalmente por ter proporcionado a melhor experiência que tive profissionalmente ao estagiar no CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura)

Ao Prof. Dr João Flavio da Silveira Petrucí, por toda a instrução e colaboração na execução deste trabalho, e por ter cedido todos os componentes eletrônicos necessários para a execução do mesmo

Aos amigos que ganhei durante a graduação em especial, Gabriel Zuffi, Lucas Bonelli e Raul Marques, com o apoio de vocês foi bem mais tranquilo concluir a graduação.

Aos Amigos Lucas, João Eduardo e Rafael, por todos os conselhos e conversas

Ao meu Amigo Sergio Augusto por ter me auxiliado com edição e formatação deste trabalho

Ao Ítalo Felix, por ter cedido o Whey protein utilizado para verificação do método

Aos Colegas que conheci no CENA, principalmente a Anna Flávia por ter me dado dicas importantíssimas para conclusão deste trabalho

Aos amigos da CEU, em especial ao Diogo, Rafael, Yudi, Renata e Hélio, com certeza vocês fizeram com que eu me sentisse em casa durante o estágio realizado no CENA

A todos os membros e ex-membros do GrISA (Grupo de Instrumentação e Separação Analítica), em especial Josiele, Aline, Weida e Caio por todas as conversas e momentos de descontração

Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, pelo espaço físico concedido

Ao Professor Fábio Rodrigo Piovezani Rocha, por ter aceitado ser o meu orientador durante o período de estágio realizado no CENA e agradecer por todas as dicas e contribuições para minha carreira

As técnicas Sheila e Fatima que foram muito receptivas durante o período de estágio

Ao Professor Boaventura por todas as conversas durante os intervalos no CENA

A CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro

Aos membros da banca, Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz e Doutorando Rafael Melo Cardoso por aceitarem o convite e pelas contribuições para este trabalho

RESUMO

As proteínas são componentes muito importantes para a nutrição, elas desempenham algumas funções no corpo humano, por conta disso quando a concentração presente no organismo é baixa pode acarretar vários problemas. Para que isso não ocorra é necessário manter uma dieta balanceada ou fazer suplementação alimentar com produtos ricos em proteínas como por exemplo, o Whey Protein. Entretanto, esse produto não possui uma regulamentação rigorosa e por isso é um alvo frequente de fraudes envolvendo produtos para suplementação. Baseado nisso o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método rápido, fácil e de baixo custo, para o controle de qualidade destes produtos. Com isso optou-se por desenvolver um fotômetro miniaturizado, utilizando componentes eletrônicos de baixo custo e que possibilitem a realização de medidas com baixa variação e sensibilidade adequada. Além do fotômetro miniaturizado foi feita uma proposta utilizando um smartphone e os recursos de uma impressora 3D para construção de uma plataforma que permita o acoplamento de uma fonte de radiação externa para a captura das imagens utilizando o smartphone. Foi desenvolvido um dispositivo analítico em papel para a realização de *spot tests*. Para a quantificação das proteínas foi utilizado o reagente CBB-R250 (Coomassie Brilliant Blue R 250) que interage através de interações eletrostáticas com a proteína, formando um produto de coloração azul. Esse método é conhecido por método de Bradford e tem como vantagem a utilização de pequenos volumes de reagente e possuir poucos interferentes, com isso, aplicando esse método com o fotômetro miniaturizado foi possível obter uma curva de calibração com um coeficiente de correlação linear $R^2 = 0,97083$, com um limite de detecção igual a $0,033 \text{ g L}^{-1}$ e um limite de quantificação de $0,1 \text{ g L}^{-1}$, com um coeficiente de variação de 12,2% e uma faixa linear de 0,1 a 5 g L^{-1} . A amostra avaliada apresentou um erro relativo de 2,1% quando comparado com o valor presente no rótulo. A partir disso é possível concluir que o método pode ser aplicado para quantificação de proteínas e tem potencial de portabilidade pelo uso de uma bateria externa.

Palavras Chave: Fotometria, Miniaturização, Impressão 3D

ABSTRACT

Proteins are very important components for nutrition, they perform some functions in the human body, so when the concentration in the body is low can cause various problems. To avoid this, it is necessary to maintain a balanced diet or to supplement food with protein rich products such as Whey Protein. However, this product does not have strict regulations and is therefore a frequent target of diapers involving supplemental products. Based on this the present work aims to develop a fast, easy and low-cost method for quality control of these products. With this, it was decided to develop a miniaturized photometer, using low cost electronic components that allow measurements with low variation and adequate sensitivity. In addition to the miniaturized photometer, a proposal was made using a smartphone and the resources of a 3D printer to build a platform that allows the coupling of an external radiation source to capture images using the smartphone. A paper analytical device was developed for spot testing. Protein quantification was performed using CBB-R250 (Coomassie Brilliant Blue R 250) reagent, which interacts through electrostatic interactions with the protein to form a blue staining product. This method is known as Bradford method and has the advantage of using small volumes of reagent and having few interferences, so applying this method with the miniaturized photometer it was possible to obtain a calibration curve with a linear correlation coefficient $R^2 = 0.97083$, with a detection limit of 0.033 g L^{-1} and a quantitation limit of 0.1 g L^{-1} , with a coefficient of variation of 12.2% and a linear range of 0.1 to 5 g L^{-1} . The evaluated sample presented a relative error of 2.1% when compared to the present value on the label. From this it is possible to conclude that the method can be applied for protein quantification and has portability potential by using an external battery.

Keywords: Photometry, Miniaturization, 3D Printing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Solubilidade de uma β -lactoglobulina em função do pH em diferentes concentrações de NaCl.....	16
Figura 2. Azul de Coomassie (a) G-250 e (b) R-250.....	21
Figura 3. LED.....	30
Figura 4. Gráfico de Tensão x Corrente, para vários LEDs	31
Figura 5. LM317.....	31
Figura 6. Fotodiodo	32
Figura 7. Amplificador Operacional LOG 101	33
Figura 8. Solução Azul Brilhante em diferentes concentrações de HCl	36
Figura 9. Download imageJ.....	38
Figura 10. Interface imageJ	38
Figura 11. Abrindo uma imagem com imageJ	38
Figura 12. Avaliando uma imagem com imageJ utilizando a forma “Quadrado”.	39
Figura 13. Avaliando uma imagem com imageJ utilizando a forma “Elipse”.	39
Figura 14. Adquirindo os dados com imageJ	40
Figura 15. Tabela com os dados obtidos	40
Figura 16. Circuito LED, LM317.....	41
Figura 17. Circuito Fotodiodo.	41
Figura 18. Suporte fotômetro.....	42
Figura 19. Fotômetro miniaturizado.....	42
Figura 20. Estrutura da celulose.	43
Figura 21. Curva de calibração obtida utilizando folha sulfite após a absorção.	44
Figura 22. Curva de calibração obtida utilizando folha sulfite antes da absorção.	44
Figura 23. Curva de Calibração obtida utilizando papel de filtro.	45
Figura 24. Folha após impressão com jato de cera.....	46
Figura 25. Folha após aquecimento.....	46
Figura 26. Curva Analítica obtida utilizando o papel cromatográfico.	47
Figura 27. Estrutura do Azul Brilhante em pH= 0,39.	48
Figura 28. Estrutura do Azul Brilhante em pH= 1,3.	48
Figura 29. Estrutura do Azul Brilhante em pH> 1,3.	48
Figura 30. Estudo do comportamento do azul brilhante em diferentes valores pH.....	49

Figura 31. Espectro de absorbância do azul brilhante em diferentes concentrações de HCl. ..	50
Figura 32. Espectro de absorbância para HCl 1M e o efeito da amostra no reagente.	50
Figura 33. Espectro de absorbância para HCl 2M e o efeito da amostra no reagente.	51
Figura 34. Espectro de absorbância para HCl 4M e o efeito da amostra no reagente.	51
Figura 35. Espectro de absorbância para HCl 6M e o efeito da amostra no reagente.	52
Figura 36. Espectro de absorbância utilizando diferentes concentrações de HCl para o CBB- R250 Hidrofóbico	53
Figura 37. Imagem obtida do reagente com proteína no papel.	53
Figura 38. Curva de calibração para Albumina utilizando smartphone e aplicando as variáveis otimizadas.	54
Figura 39. Curva utilizando o papel como uma plataforma reacional.....	55
Figura 40. LED Vermelho.	56
Figura 41. Fotômetro com LED Vermelho.	56
Figura 42. Curva de calibração obtida utilizando o LED vermelho.	57
Figura 43. LED Laranja.....	57
Figura 44. Circuito LED Laranja.....	58
Figura 45. Curva de calibração obtida utilizando o LED laranja.	58
Figura 46. Suporte para obtenção das imagens utilizando smartphone.....	62
Figura 47. Imagem obtida para a concentração de 20 g L^{-1}	62
Figura 48. Curva analítica obtida para a Caseína.	63
Figura 49. Curva analítica obtida para caseína após aplicação das correções citadas.....	64
Figura 50. Curva Analítica Obtida aplicando o fotômetro miniaturizado	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas presentes no leite e suas proporções.	17
Tabela 2. Comparação entre o LED laranja e o LED vermelho.....	59
Tabela 3. Resultados obtidos aplicando o método proposto em amostras de Whey Protein ...	60
Tabela 4. Resultados obtidos no ensaio de adição e recuperação	61
Tabela 5. Fator de recuperação.....	61
Tabela 6. Parâmetros obtidos.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μPADs Paper Analytical Device

ABS Acrylonitrile Butadiene Styrene

APS Active Pixel Sensor

CBB-R250 Coomassie Brilliant Blue-R250

CBB-AS Coomassie Brilliant Blue-Amonium Sulfate

CCD Charged Coupled Device

CMOS Complementary Metal Oxide Semiconductor

FDM Fused Deposition Material

LED Light Emission Diode

ODR Optic Density Relative

PETG Polyethylene Terephthalate Glycol

PDMS Polidimetilsiloxano

PLA Polylactic acid

PP Polypropylene

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Proteínas	14
1.1.1. Albumina	16
1.1.2. Caseína	17
1.2. Legislação	18
1.2.1. Leite	18
1.2.2. Whey Protein	18
1.3. Método de Kjeldahl	18
1.4. Métodos Espectrofotométricos para Quantificação de Proteína	19
1.4.1. Método de Biureto	19
1.4.2. Método de Lowry	19
1.4.3. Método de Bradford	20
1.4.4. Método de SMITH ou BCA	21
1.4.5. Método de absorção no ultravioleta	22
1.5. Aspectos Gerais Sobre o Papel	22
1.6. Desenvolvimento do Dispositivo Microfluídico	23
1.6.1. Produção dos dispositivos micro fluídicos	23
1.6.2. Design dos dispositivos microfluídicos	24
1.7. Uso de Impressoras 3D para o Desenvolvimento de Instrumentos Analíticos	24
1.8. Aquisição do sinal analítico por smartphone	25
1.8.1. Smartphones	25
1.8.1.1. Sensor CCD	26
1.8.1.2. Sensor CMOS	27
1.8.2. Condições de Iluminação	28
1.8.3. Tratamento das imagens digitais	28

1.8.3.1.	Espaço RGB	28
1.8.4.	Sistema de detecção miniaturizado	30
1.8.4.1.	LED.....	30
1.8.4.2.	Fotodiodo	32
2.	OBJETIVO	34
3.	METODOLOGIA	35
3.1.	Materiais.....	35
3.2.	Reagentes.....	35
3.3.	CBB R-250.....	35
3.3.1.	CBB-1HCl.....	35
3.3.2.	CBB-AS.....	36
3.4.	Solução de Albumina.....	36
3.5.	Solução Albumina e CBB-R250	37
3.6.	Otimização do Papel.....	37
3.7.	Otimização pH	37
3.8.	Otimização da Concentração HCl.....	37
3.9.	Aquisição das imagens	37
3.9.1.	Tratamento de dados pelo <i>imageJ</i>	37
3.9.1.1.	<i>Download do imageJ</i>	37
3.9.1.2.	Abrindo um arquivo de imagem.....	38
3.9.1.3.	Escolha da região analisada	39
3.9.1.4.	Aquisição dos dados	40
3.9.2.	<i>Color Grab</i>	40
3.10.	Fotômetro portátil.....	41
3.10.1.	Circuito LED	41
3.10.2.	Circuito fotodiodo	41
3.10.3.	Suporte LED e fotodiodo	42

3.10.4.	Aquisição dos dados	42
4.	OTIMIZAÇÕES.....	43
4.1.	Otimização do papel	43
4.1.1.	Folha sulfite	43
4.1.2.	Papel de filtro	45
4.1.3.	Papel Cromatográfico.....	45
4.2.	Estudo do pH.....	47
4.3.	Estudo concentração de Ácido Clorídrico.....	49
4.4.	Aplicação dos parâmetros otimizados para leitura com papel	53
4.5.	Estudo do LED utilizado com fotômetro miniaturizado.....	55
4.5.1.	LED vermelho	56
4.5.2.	LED laranja.....	57
4.5.3.	LED laranja x LED vermelho.....	59
5.	AVALIAÇÃO DA AMOSTRA	60
5.1.	Preparo da Amostra	60
5.2.	Leitura da Amostra	60
5.2.1.	Ensaio de Adição e Recuperação	61
5.3.	Características Analíticas	61
6.	CURVA ANALÍTICA CASEÍNA	62
7.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	65
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteínas

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. Elas ocorrem em todas as células e em todas as partes destas. As proteínas também ocorrem em grande variedade; milhares de diferentes tipos, desde peptídeos de tamanho relativamente pequeno até enormes polímeros com pesos moleculares na faixa de milhões, podem ser encontrados em uma única célula. Ainda mais as proteínas também exibem uma grande diversidade de funções biológicas.

As proteínas são polímeros resultantes da desidratação de aminoácidos, e cada resíduo de aminoácido liga-se ao seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente. (O termo “resíduo” reflete a perda dos elementos químicos da água quando um aminoácido é unido a outro.) Todos os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas são α -aminoácidos. Eles têm um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono α). Diferem entre si por suas cadeias laterais ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica e influenciam a solubilidade do aminoácido em água (VOET, DONALD VOET, 2010).

Além disso apresentam as seguintes funções: catalisadores biológicos, componentes estruturais das células, determinam a identidade biológica das espécies, hormônios e transporte de nutrientes. Cada proteína tem sua função determinada a partir da sequência de aminoácidos que a constituem por isso diferentes proteínas possuem diferentes funções.

Um fator crucial para se trabalhar com proteínas é a avaliação da solubilidade que está relacionada com as interações hidrofóbicas e iônicas. Interações hidrofóbicas promovem interações proteína-proteína que podem diminuir a solubilidade da proteína, já as interações iônicas promovem as interações água-proteína que pode aumentar a solubilidade. Resíduos iônicos podem introduzir dois tipos de forças repulsivas entre proteínas e moléculas em solução. O primeiro envolve repulsão eletrostática que pode gerar carga líquida positiva ou negativa, a outra força repulsiva é gerada pela esfera de hidratação entorno dos grupos iônicos.

Baseado na solubilidade as proteínas são classificadas em quatro categorias (OWEN R. FENNEMA, 1996)

- Albuminas que são solúveis em água com pH = 6,6 (ex. ovoalbumina e α -lactoalbuminas)
- Globulinas são solúveis em soluções salinas diluídas com pH = 7,0 (ex. glicina, faseolinas e β -lactoglobulinas)

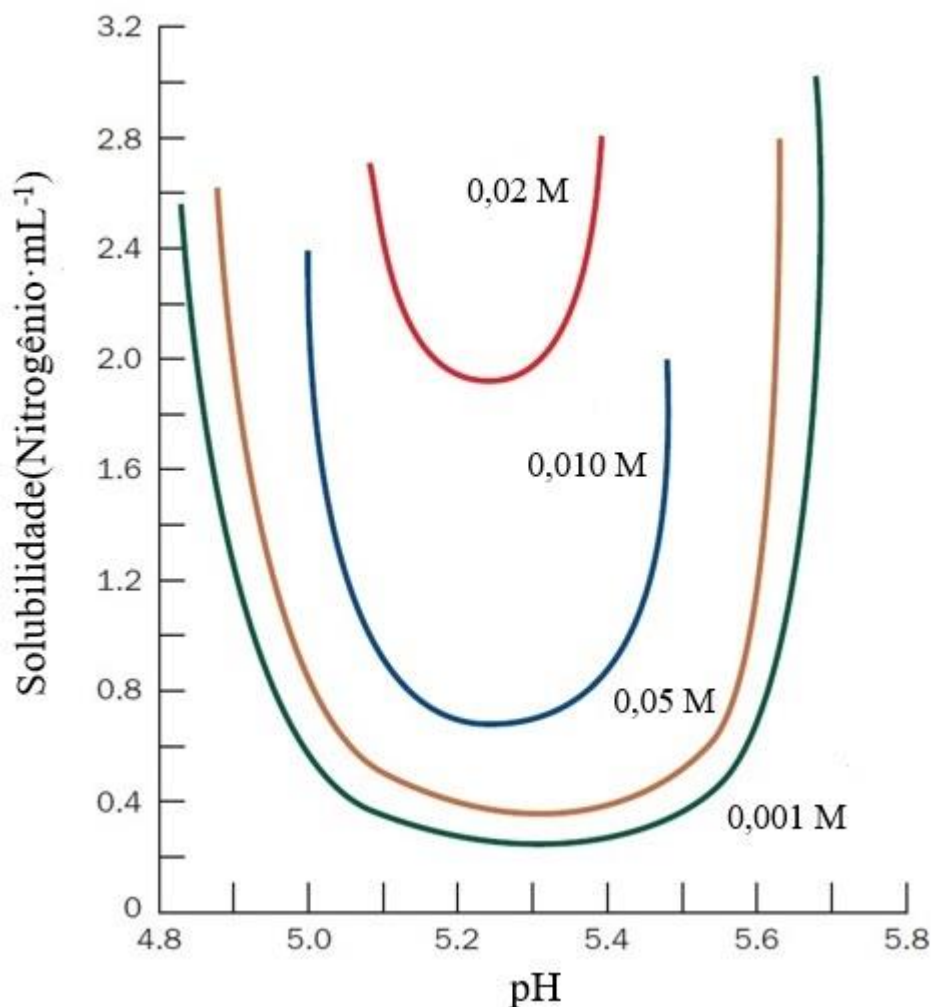
- Gluteínas são solúveis apenas em soluções ácidas (pH = 2) e soluções alcalinas (pH = 12) (ex. gluteínas do trigo)
- Prolaminas são solúveis em soluções de etanol 70% (ex. Zein e Gliadina)

Quando a solubilidade é plotada em função do pH, a maioria das proteínas presentes em alimentos apresenta uma curva em U como representado na Figura 1. A solubilidade mínima ocorre quando o pH isoeletrico das proteínas é atingido, a maioria das proteínas presente nos alimentos são ácidas, com isso elas apresentam solubilidade com pH entre 4 e 5 e solubilidade máxima em pH alcalino. O fato de a solubilidade mínima ser próximo do pH isoeletrico se deve à falta de repulsões eletrostáticas que promove a agregação e precipitação através de interações hidrofóbicas. Entretanto, algumas proteínas alimentares como a β -lactoglobulina e a albumina do soro são mais solúveis quando o pH isoeletrico é atingido, isso acontece porque essas proteínas possuem uma maior proporção superficial de resíduos hidrofílicos do que grupos não polares. Com isso, caso a hidrofobicidade e a repulsão de hidratação surgindo dos resíduos carregados sejam maiores que as interações hidrofóbicas proteína-proteína, a proteína continuará sendo solúvel no ponto isoeletrico.

Além do pH, a força iônica também pode afetar a solubilidade das proteínas. Quando a força iônica é pequena ($<0,5$), os íons neutralizam as cargas presentes na superfície da proteína, essa alteração na carga pode afetar a solubilidade de duas maneiras dependendo das características superficiais da proteína. A solubilidade irá diminuir para proteínas que contém muitos grupos não polares e aumentará para as que não possuem esses grupos.

Quando a força iônica é maior que 1, os sais apresentam efeitos específicos de cada íon para a solubilidade das proteínas, quando a concentração dos sais aumenta até $\mu=1$; sulfato e fluoreto diminuem a solubilidade das proteínas (efeito *salting out*) ao contrário dos perclorados e do tiocianato que aumentam a solubilidade (efeito *salting in*) quando a força iônica é constante a efetividade de cada íon segue a série de Hofmeister.(OWEN R. FENNEMA, 1996).

Figura 1. Solubilidade de uma β -lactoglobulina em função do pH em diferentes concentrações de NaCl.



Fonte: Adaptado de (VOET, DONALD VOET, 2010).

1.1.1. Albumina

Albuminas são proteínas globulares, nas quais os diferentes segmentos de uma cadeia polipeptídica enovelam-se uns sobre os outros. Esse enovelamento gera uma forma compacta em relação aos polipeptídios em uma conformação totalmente estendida. O enovelamento também gera a diversidade estrutural necessária para que as proteínas executem um grande conjunto de funções biológicas. As proteínas globulares incluem as enzimas, as proteínas transportadoras, as proteínas motoras, as proteínas regulatórias, as imunoglobulinas e as proteínas com diversas outras funções. (OWEN R. FENNEMA, 1996)

Como citado anteriormente as albuminas são solúveis em água com $\text{pH} = 6,6$ com isso o desenvolvimento de métodos para quantificação de proteínas é facilitado quando se trabalha com albumina como padrão uma vez que se tem vantagem de poder trabalhar com soluções

aquosas. Buscando trabalhar com a quantificação de albuminas a amostra escolhida foi o suplemento alimentar whey protein que tem como matéria prima o soro do leite que é rico em α -lactoalbumina e β -lactoalbumina

1.1.2. Caseína

Todas as caseínas estão ligadas ao fosfato de cálcio formando uma esfera complexa altamente hidratada que é chamada de micela sedo, tão complexa que o tamanho pode variar de 30 até 300 nm de diâmetro, com uma pequena porcentagem atingindo até 600 nm.

Caseína é a proteína encontrada majoritariamente no leite nas seguintes formas: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína, κ -caseína. A partir disso foi estipulado para se trabalhar com essa proteína seria necessário trabalhar com o padrão que possui a maior concentração na matriz, portanto utilizou-se a α -caseína como padrão. Além disso foi necessário preparar a solução de maneira que melhor simula-se o meio em que a caseína está presente, por isso foi utilizado uma solução de fosfato de cálcio.

A Tabela 1 apresenta as proteínas presentes no leite e suas respectivas concentrações.

Tabela 1. Proteínas presentes no leite e suas proporções.

Proteína	Concentração(g/L)	Porcentagem
Caseínas	24-28	80
α_s -caseínas	15-19	42
α_{s1}	12-15	34
α_{s2}	3-4	8
β -caseínas	9-11	25
κ -caseínas	3-4	9
γ -caseínas	1-2	4
Proteínas do Soro	5-7	20
β -lactoalbumina	2-4	9
α -lactoalbumina	1-1.5	4
Proteose peptona	0.6-1.8	4
Proteínas do Sangue		
Albumina Sérica	0,1-0,4	1
Imunoglobulinas	0.6-1.0	2

Fonte: Extraído de (OWEN R. FENNEMA, 1996).

A partir dos valores mostrados na tabela fica clara a necessidade de se trabalhar com padrões de caseína quando se procura trabalhar com leite

1.2. Legislação

1.2.1. Leite

Segundo a Instrução Normativa N° 76, De 26 DE NOVEMBRO DE 2018 a quantidade mínima de proteína exigida no leite pasteurizado é de 2,9 g/100 g, para realizar a quantificação dessas proteínas o método de micro-kjedahl é utilizado.

1.2.2. Whey Protein

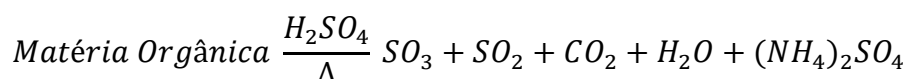
Atualmente ainda não há uma legislação rigorosa em relação ao teor de proteínas presente em suplementos alimentares, com isso a avaliação da concentração de proteínas fica restrito ao valor que está disponível no rótulo, esses produtos costumam apresentar teores proteicos em torno de 25 a 89%

1.3. Método de Kjeldahl

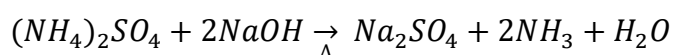
O método de micro-kjedahl é uma titulação de retorno onde ocorre a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação de amônia que é fixada em solução ácida e titulada, Este método é dividido em três etapas principais: a digestão, destilação e titulação (BRASIL, 2013)

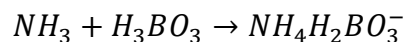
Digestão: nesta etapa ocorre o aquecimento da amostra com ácido sulfúrico concentrado até que o carbono e hidrogênio sejam oxidados. Com a finalidade de aumentar a temperatura de ebulição do ácido e aumentar a velocidade de oxidação da matéria orgânica é adicionada a reação uma mistura catalítica.

Durante a digestão, o carbono é transformado em dióxido de carbono (CO₂) e o hidrogênio em água (H₂O). O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônio, conforme a reação abaixo:

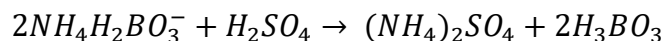


Destilação: O objetivo desta etapa é transformar o nitrogênio presente na solução na forma de sulfato de amônio (NH₄⁺) para gás NH₃. Com adição de NaOH concentrado e aquecimento, ocorre a liberação da amônia que é separada da mistura por destilação. O gás então reage com uma solução de ácido bórico, formando borato de amônio.





Titulação: a etapa final consiste na titulação do borato de amônio com uma solução de ácido sulfúrico padronizada.



Quanto maior o volume de ácido sulfúrico gasto na titulação maior a quantidade de nitrogênio presente na amostra.

1.4. Métodos Espectrofotométricos para Quantificação de Proteína

O desenvolvimento de métodos espectrofotométricos é muito importante visto que indústrias de alimentos e laboratórios de análises clínicas estão buscando procedimentos rápidos, sensíveis e de baixo custo, a partir disso alguns métodos que são aplicados serão descritos a seguir(ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

1.4.1. Método de Biureto

As origens do método podem ser traçadas desde a proposta inicial de Auntenrieth, em 1915. O método se baseia na reação do reativo de biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução(GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949). O cobre, em meio alcalino reage com proteínas gerando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. O produto de reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm. A banda que é utilizada para fins analíticos é a que está situada em 540 nm, uma vez que muitas substâncias absorvem na região de 270 nm causando muita interferência no método.

Esse método pode ser aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversos meios sendo eles: soro ou plasma sanguíneo, líquido cérebro espinhal, urina, alimentos, saliva, fibrinogênio e tecido animal. O método também tem sido aplicado em análises por injeção em fluxo bem como em alguns métodos cinéticos(SHIDELER *et al.*, 1980). Apesar de ser um método rápido, utilizar reagentes de baixo custo e apresentar uma baixa variação, o mesmo possui uma baixa sensibilidade quando comparado a outros procedimentos existentes, além de estar sujeito a interferência de substâncias que possam interagir com os íons Cobre (II).

1.4.2. Método de Lowry

O método que atualmente conhecemos como método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), para a determinação de proteínas totais, foi originalmente proposto por Wu (1922), sendo esta

metodologia mais utilizada para a determinação de proteínas. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, que sofre uma redução quando reage com proteínas na presença do catalisador cobre (II) e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

Foi sugerido por Chou e Goldstein (1960) e Legler *et al.* (1985) que a redução ocorre diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos, que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetra peptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas.

A principal vantagem do método de Lowry é sua alta sensibilidade e, por isto, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: liquor, plasma sanguíneo, saliva humana, tecido animal entre outros. Sargent propôs uma modificação do método de Lowry que possibilitou o aumento da sensibilidade em cinquenta vezes. Tal modificação está baseada no fato de o verde de malaquita reage com o azul de molibdato produzido no método de Lowry e o produto desta reação absorve fortemente em 690 nm amentando a sensibilidade, pelo fato de ser extensivamente aplicado tem sido utilizado em diversos tipos de equipamento automatizados(HARRINGTON, 1990),(OOSTA; MATHEWSON; CATRAVAS, 1978).

Mesmo apresentando uma alta sensibilidade esse método apresenta desvantagens significativas tais como: estar sujeito a muitos interferentes, apresentar longo tempo de análise, possuir absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas e seguir a Lei de Beer-Lambert apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas.

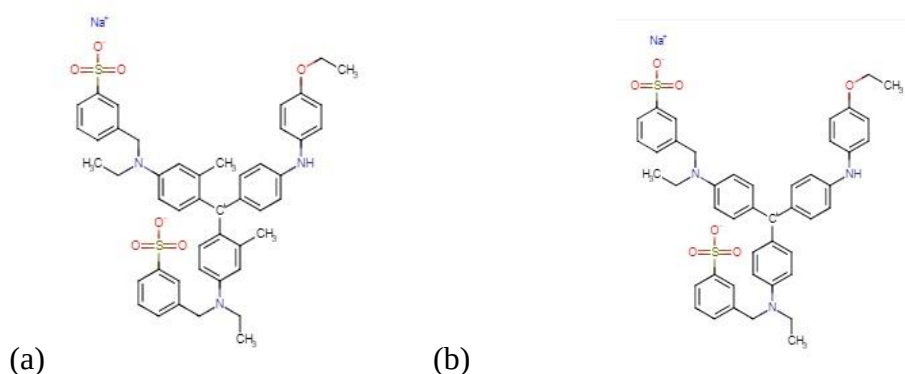
1.4.3. Método de Bradford

O método de Bradford (1976) é um ensaio que foi desenvolvido para determinação de proteínas totais, e nesse método utiliza-se os corantes Azul de Coomassie G ou R-250 que estão representados na Figura 2. Esse método apresenta algumas vantagens em relação aos métodos que o precedem, como por exemplo, o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) que apresenta uma quantidade maior de interferentes e precisa de uma maior quantidade de reagentes para ser realizado.

O método de Bradford é baseado na ligação do corante à proteína, as moléculas de corante iram reagir principalmente com os resíduos de arginina que possuem uma cadeia lateral carregada positivamente (MIKKELSEN; CORTÓN, 2004) e esse tipo de interação nos mostra que utilizando concentrações muito baixas de proteína o método não apresenta resultados

lineares, uma vez que teremos muitas moléculas de corantes livres mas poucos sítios de arginina para que o corante possa se ligar. Esse limite é estabelecido entre 0,2-0,20µg, o inverso também ocorre, quando temos uma concentração muito alta de proteína e uma baixa concentração de corante, a maioria dos sítios de arginina ficaram sem ligantes gerando resultados não lineares (MIKKELSEN; CORTÓN, 2004). No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica.

Figura 2. Azul de Coomassie (a) G-250 e (b) R-250.



Fonte: O autor

Para quantificar a concentração de proteínas utiliza-se a lei de Lambert-Beer, que relaciona a concentração da amostra e sua absorvância, obtendo uma relação linear. E o produto formado da ligação corante-proteína apresenta uma cor azulada com absorvância máxima em 590 nm e a faixa de absorvância é estabelecida entre 495-595 nm, pois nessa faixa que se obtém valores com uma melhor linearidade. O método de Bradford não é eficiente quando se trabalha em meio de surfactantes tais como Dodecil Sulfato de Sódio ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), Triton X-100($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ (n=10-9) e detergentes comerciais para lavar louças.

1.4.4. Método de SMITH ou BCA

O método proposto por Smith (SMITH *et al.*, 1985)., também conhecido por método do ácido bicinchonínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolína), se baseia na reação de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre (I) e formando um complexo com BCA, que absorve fortemente na região de 560 nm.

Este método tem a vantagem de ser mais simples no preparo dos reagentes, tão sensível quanto o método de Lowry., e relativamente rápido, sendo aplicado na determinação da concentração de proteínas totais em saliva, proteínas celulares, interferons, leite humano e determinação de grupos funcionais.

O método de Smith possui algumas desvantagens, como a dependência da temperatura de incubação das amostras, a variação da absortividade específica para diferentes proteínas e a variação da absorbância com o tempo.

1.4.5. Método de absorção no ultravioleta

Este método é baseado no fato de que as proteínas mostram absorção na região de 280 nm e na região abaixo de 220 nm, sendo a primeira devido a diversos aminoácidos, e a segunda devido à ligação peptídica. No entanto, em 280 nm, em pH neutro, somente os aminoácidos triptofano, tirosina e cistina possuem uma absortividade molar significativa.

O método tem sido muito utilizado durante os procedimentos de purificação e separação de proteínas para a quantificação das mesmas. Suas principais vantagens são as de não destruir a amostra e de ser rápido. O principal motivo desta limitação é que, em amostras complexas, diversas substâncias absorvem no ultravioleta tornando os resultados pouco confiáveis.

1.5. Aspectos Gerais Sobre o Papel

Papel é um produto baseado em recursos naturais. De acordo com padrões como DIN 6735, papel é especificado como um material plano constituído basicamente de fibras naturais, que são geradas pelo espelhamento de uma suspensão de fibra em um fio. Normalmente madeiras de pinho, carvalho, eucalipto e bétula são utilizadas como matéria prima.

Para algumas aplicações tais como filtros para processos industriais, procedimentos médicos e para tarefas domésticas ou para produção de cédulas de dinheiro a matéria prima utilizada é algodão, no entanto possui um custo maior quando comparado aos papeis produzidos utilizando fibras de madeira, mas as os papeis produzidos a base de algodão possuem vantagens quanto a composição química já que ele praticamente não possui lignina ou hemicelulose em sua estrutura é composto praticamente por celulose do tipo 1 (LAND, 2019).

Devido a matéria prima utilizada na produção do papel, as indústrias produtoras de papel devem lidar com várias propriedades que os papeis podem apresentar, tais como comprimento da fibra, largura da fibra, cor, resistência e flexibilidade. Devido a essa quantidade de propriedades os papeis adquirem várias aplicações.

Atualmente mais de 400 milhões de toneladas de papel são produzidas por ano e a maior parte é utilizada para produção de embalagens que é cerca de 50% da quantidade produzida anualmente e 40% da quantidade papel produzida é utilizada para produção de propagandas impressas e 6% da quantidade de papel produzida são chamados papeis especiais (SCHABEL; BIESALSKI, 2019).

E a produção de papéis para embalagens e papéis especiais tem crescido, e um dos fatores que justifica o crescimento da produção de papéis especiais é a popularização dos dispositivos a base de papel, inclusive na área médica. No entanto a aplicação de microdispositivos fluídicos ainda possui um mercado pequeno.

A maior parte desse material é consumida em pesquisas e os resultados mais recentes envolvem a determinação de pH ou a quantificação de glicose no sangue. Para maioria das aplicações de dispositivos micro fluídicos de papel, papéis produzidos a base de celulose de algodão são os mais empregados (LAND, 2019) .

1.6. Desenvolvimento do Dispositivo Microfluídico

1.6.1. Produção dos dispositivos micro fluídicos

Nos últimos anos, novos métodos de produção de dispositivos microfluídicos tem sido desenvolvido com intuito de facilitar o preparo e aumentar a versatilidade desses dispositivos visando aumentar a quantidade de métodos que utilizam esses dispositivos. Alguns métodos de produção destes dispositivos são (LAND, 2019; SRIRAM *et al.*, 2017):

- a) Litografia
- b) Impressão 3D
- c) Jatos de cera
- d) Manchas de cera
- e) Impressão de tela PDMS
- f) Marcador permanente
- g) Impressão com jato de cera
- h) Impressão com jato de tinta
- i) Lápis delineador
- j) Impressora de corte
- k) Fabricação de sol-gel hidrofóbica
- l) Spray de cola escolar

Todas essas técnicas possuem um objetivo em comum: produzir uma barreira hidrofóbica que seja inerte e consiga delimitar o espaço que a solução irá ocupar no papel utilizado. Apesar de todas essas técnicas serem vantajosas a que tem recebido maior destaque é a impressão com jato de cera, uma vez que esse método é simples e rápido e o formato dos

μ PADs \ (Dispositivos Analíticos em Papel, do inglês *Paper Analytical Devices*) pode ser facilmente obtido.

1.6.2. Design dos dispositivos microfluídicos

Depois de escolher a metodologia que mais se adequa ao trabalho proposto é necessário pensar sobre o design do dispositivo microfluídico, uma vez que essa etapa é muito importante para que o funcionamento do dispositivo não fique comprometido. Tendo isso em mente, três etapas são muito importantes: a primeira delas é a introdução da amostra que pode ser feita utilizando uma micropipeta para adicionar o volume necessário na região hidrofílica do dispositivo. Outro método de introdução da amostra não necessita de equipamentos externos, uma vez que o dispositivo irá absorver a quantidade de amostra necessária (LAND, 2019), no entanto, senão for realizado tomando os devidos cuidados, podem ocorrer erros de amostragem e além disso, o design do dispositivo deve conter uma região onde o mesmo possa ser manuseado sem que o operador entre em contato com a região hidrofóbica e nem com o canal hidrofílico.

Após a escolha de método para introdução da amostra é necessário controlar a maneira que o fluido irá se comportar no dispositivo. O fluido irá deslocar-se na região hidrofílica do dispositivo por conta do efeito de capilaridade (LAND, 2019), efeito esse que ocorre quando um fluido se desloca através de um capilar ou de corpo poroso devido à tensão superficial, e por consequência algumas propriedades do material escolhido podem interferir na capilaridade. Além disso muitas operações unitárias podem ser embutidas dos dispositivos, tais como filtração, pré-concentração, multiplexação e mistura dependendo da aplicação do dispositivo.

Após o cumprimento de todas essas etapas é necessário preocupar-se com a zona de detecção do dispositivo já que é ela quem vai delimitar a quantidade de fluido utilizado, e se for construída de maneira correta, evita contaminação cruzada entre os *spots* desenvolvidos. Além disso é na zona de detecção que a reação irá ocorrer.

1.7. Uso de Impressoras 3D para o Desenvolvimento de Instrumentos Analíticos

Nos últimos anos a quantidade de trabalhos na área de química analítica que utilizam impressoras 3D cresceu bastante, pelo fato de ser uma ferramenta versátil já que possibilita a produção de instrumentos utilizando um material de baixo custo, além de possibilitar a produção de dispositivos miniaturizados(MA *et al.*, 2018). Entretanto alguns cuidados devem ser tomados, uma vez que o filamento utilizado na impressora 3D pode ser constituído dos seguintes materiais; polipropileno (PP)\(do inglês Polypropylene), Ácido Polilático (PLA) \ (do

inglês Polyactic Acid), Acrilonitrila butadieno estireno (ABS) (do inglês *Acrylonitrile Butadiene Styrene*) e polietileno tereftalato glicol (PETG) (do inglês *Polyethylene Terephthalate Glycol*) (CAPEL *et al.*, 2018).

As impressoras 3D mais empregadas têm como princípio de funcionamento a extrusão de um material e a deposição por camadas, baseado no desenho projetado previamente em algum software. Dentro dessa classe tem-se dois métodos de impressão (DIXIT; KADIMISSETTY; RUSLING, 2018).

Fused Deposition Modeling (FDM); que consiste na deposição de um filamento termoplástico, que passa pelo bico da impressora onde é aquecido e depositado camada por camada, esse método de impressão é muito versátil uma vez que há diferentes materiais termoplásticos que podem ser utilizados.

FDM modificado para impressão utilizando polidemetilsiloxano (PDMS); esse método costuma ser escolhido para a fabricação de dispositivos micro fluídicos por conta de ser muito transparente e compressível.

Por conta da alta versatilidade, as impressoras 3D possibilitam a produção de dispositivos miniaturizados que podem auxiliar a elucidação de experimentos didáticos, uma vez que a produção dos objetos necessários possui um baixo custo. Por conta disso é possível encontrar alguns trabalhos na literatura que utilizaram esse recurso para o desenvolvimento de experimentos didáticos, como por exemplo a fabricação de eletrodos de Ag/AgCl (SCHMIDT; KING; KARIUKI, 2018), a partir de um filamento que possui a capacidade de conduzir corrente elétrica, com isso um eletrodo miniaturizado e barato pode ser produzido auxiliando assim o desenvolvimento de muitas aulas. Além disso, instrumentos para laboratório também podem ser produzidos, como por exemplo suportes para tubos de ensaio, micropipeta, bureta, ou até mesmo a impressão de béqueres desde que se escolha o solvente adequado para entrar em contato com o material do filamento

1.8. Aquisição do sinal analítico por smartphone

1.8.1. Smartphones

Os *smartphones* tornaram-se uma ferramenta de comunicação essencial e esses dispositivos são mais sofisticados do que os telefones celulares comuns (BECHER *et al.*, 2011). O seu nível de sofisticação se assemelha a computadores pessoais e mudaram drasticamente vários aspectos de nossas vidas, desde entretenimento, transações bancárias, compras e cuidados com a saúde. Espera-se que em um futuro próximo, aplicativos médicos baseados em

smartphones irão superar todos os diagnósticos convencionais de cuidados de saúde (KANCHI *et al.*, 2018) *Smartphones* vêm sendo empregados como ferramentas de detecção em procedimentos analíticos para os mais variados fins, principalmente para fins bionalíticos (KANCHI *et al.*, 2018).

Shin e colaboradores relataram recentemente o uso de um *smartphone* para estimativa do tempo de morte com base na análise colorimétrica de uma mancha de sangue. A amostra de sangue foi testada em cinco materiais diferentes: papel A4, tecido, papel de parede, vidro e madeira. A intensidade dos valores RGB foram monitorados e, posteriormente, a idade da mancha de sangue foi calculada a partir do gráfico dos valores de intensidade de brilho (V) valores em relação do tempo (SHIN *et al.*, 2017). *Smartphones* veem sendo empregados também na determinação de propriedades físicas, como por exemplo a viscosidade de líquidos (KIM; KIM; YEOM, 2018).

1.8.1.1. Sensor CCD

Sensor CCD (*Charge Coupled Device*) foi desenvolvido por Bell Labs em 1970 e propiciaram o surgimento de uma linha de câmeras do estado sólido compactas e robustas tanto para emprego na televisão quanto na digitalização de imagens. São compostos de elementos discretos de imagem em silício, em um único chip de circuito integrado, cuja a voltagem de saída é proporcional à intensidade da luz incidente e podem ser classificados em dois arranjos geométricos: sensores de varredura em linha e em área (REBELLO, 2003)

- Sensores de varredura em linha: Consiste em uma fila de “fotossítios” que produz uma imagem bidimensional através do movimento relativo do detector em relação a cena, são muito utilizados em sistemas de varredura de imagens “scanners” com base plana
- Sensor de varredura em área: Consiste em uma matriz de “fotossítios”, sendo, assim capaz de capturar imagens completas, como os tubos de vidicon. Sensores de varredura em área são similares aos sensores de varredura em linha, exceto em que os fotossítios são arranjos de forma matricial e uma combinação de porta/registros de transporte separa as colunas de “fotossítios”

O CCD ainda pode ser visto como um arranjo fixo, de estado sólido, de fontes de potencial distribuída em linha ou numa superfície normal, retangular ou quadrangular. Cada fonte acumula carga elétrica proporcional à intensidade da luz incidente.

Uma imagem pode ser obtida expondo o arranjo a uma cena desejada e criando-se uma distribuição bidimensional de potencial elétrico armazenado dentro de cada fonte. A imagem analógica é captada pela leitora e digitalizando o potencial dentro de cada fonte.

Os equipamentos de imagem do estado sólido baseiam-se no efeito fotoelétrico e na formação de elétrons livres na região de silício iluminada – atingida por fótons. Os fotoelétrons produzidos num local são aprisionados na fonte de potencial mais próxima e são transferidos como um “pacote de cargas” para o fundo de uma série de elementos até alcançar o terminal externo. Como os sensores CCD funcionam a partir da transferência de carga, caso um dos pixels seja afetado a informação dos pixels adjacentes também será afetada (REBELLO, 2003)

O sensor CCD possui algumas especificações técnicas (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2015):

- Resolução: é o número de pixels que define a imagem obtida pela câmera com sensor CCD
- Resposta Espectral: é mais larga para CCDs mais finos
- Resposta de Foto não uniforme: determina a variação na sensibilidade dos pixels de um sensor de imagens e gera um ruído proporcional ao nível do sinal
- Carga de saturação: Indica o número de elétrons que podem ser transferidos de um sítio para outro
- Eficiência de transferência de carga: é definido como a razão da carga transferida de um pixel para outro adjacente

Os sensores CCD apesar de serem utilizados apenas em aplicações específicas, contribuíram muito para o desenvolvimento de sensores fotossensíveis e para o estudo de novos circuitos que possibilitam não só à amplificação do sinal, mas também uma resposta mais rápida e com um menor ruído de fundo

1.8.1.2. Sensor CMOS

O circuito de instrumentação CMOS básico é denominado APS (*Active Pixel Sensor*). A característica que define é a utilização de pelo menos um elemento ativo (para amplificação do sinal) em cada pixel. As amostras analógicas são obtidas diretamente, endereçadas por coluna e digitalizadas por conversores analógico-digitais. Usualmente, cada coluna possui um conversor analítico digital, mas é possível a utilização de um único conversor para todos os pixels, o que pode exigir conversores de alta velocidade.

Uma das vantagens do sensor CMOS frente ao CCD é a integração de dispositivos com uma maior eficiência de custo, além as câmeras CCD exigem um consumo de potência cada vez mais alto, além de impossibilitar a miniaturização, por conta disso sensores CMOS têm

sido amplamente aplicados em câmeras de *smartphone* já que é possível obter resposta rápida e um baixo custo para desenvolvimento.(FERREIRA, 2008)

1.8.2. Condições de Iluminação

Antes de se obter as imagens digitais é primordial definir, qual será a fonte de radiação utilizada, em qual posição a imagem será obtida caso o trabalho seja realizado utilizando um *smartphone* ou uma *webcam* e construir um suporte onde a radiação externa não interfira na da fonte escolhida

1.8.3. Tratamento das imagens digitais

1.8.3.1. Espaço RGB

Foi proposto por Thomas Young em 1802, descrevia os fenômenos que ocorriam quando a luz branca era projetada através dos filtros vermelho, azul e verde. Esse modelo ficou consolidado já que descrevia a percepção de cores do olho humano e mais tarde esse mesmo modelo seria usado em equipamentos eletrônicos para construção de imagens. Essa teoria foi denominada de teoria tricromática.

Os valores das coordenadas do espaço RGB variam entre [0,0,0] (preto) até [255, 255, 255] (branco). Uma das desvantagens do uso deste modelo é que ele depende do equipamento que está sendo utilizado e como ele foi construído e por conta disso algum padrão colorimétrico pode apresentar cores diferentes quando avaliado em equipamentos diferentes.

Mesmo assim esse modelo tem sido muito aplicado em química analítica para quantificação de algumas soluções. Na literatura há vários trabalhos que o aplicam com intuito de avaliar o sinal obtido após processamento da imagem(GRUDPAN *et al.*, 2015), além disso com o objetivo de melhorar o comportamento linear de alguns analitos, algumas variações desse modelo podem ser aplicadas, como por exemplo o emprego da média dos valores afim de relacionar os 3 canais, conforme a Equação (1) a seguir.

$$\frac{R + G + B}{3} \quad (1)$$

Outra maneira de efetuar a relação entre os canais é aplicando a soma vetorial deles, também denominada de distância euclidiana, conforme a Equação (2).

$$\sqrt{R^2 + G^2 + B^2} \quad (2)$$

Tem-se também a aplicação da escala de cinza que é um modelo mais coerente, já que relaciona os canais R, G e B a partir da contribuição de cada um deles, conforme a Equação (3) a seguir.

$$I = 0,299R + 0,587G + 0,114B \quad (3)$$

onde I é a escala de cinza (PASSARETTI FILHO; DA SILVEIRA PETRUCI; CARDOSO, 2015).

Além dos cálculos mostrados acima é possível aplicar um método de linearização nos dados obtidos utilizando a ODR (Densidade Optica Relativa, do inglês *Optical Density Relative*), conforme a Equação (4).

$$ODR = -\log_{10} \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

No qual I é a intensidade da escala de cinza e I_0 é o valor do branco para a fonte de iluminação utilizada. Geralmente esse valor é fixado como 255 que é o valor correspondente ao branco na escala RGB, que pode ser a luz do scanner ou utilizada com o smartphone. O sinal obtido pela ODR minimiza o erro causado por pequenas variações no brilho da imagem que pode ser gerado pela absorção da luz que ocorre devido a presença de grupos cromóforos presentes na solução do corante.(PASSARETTI FILHO; DA SILVEIRA PETRUCI; CARDOSO, 2015).

Outros espaços colorimétricos que são utilizados em alguns trabalhos são: HSV, CIELAB CIE 1931 ou CIE XYZ(CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2015). O espaço HSV descreve uma cor baseado nos valores de Hue(H), Saturation(S) e Value(V). Hue é definido como o comprimento de onda predominante do espectro de radiação da cor, Saturação é definida como a pureza da cor e Value é definido como o valor do brilho, que representa a quantidade de luz presente na cor.

No espaço CIELAB a cor é descrita por três coordenadas L^* , a^* e b^* . A coordenada L^* representa a luminescência, a coordenada a^* representa a mudança de cor do vermelho até o verde e b^* representa a mudança de cor do amarelo até o azul. Já o espaço CIE 1931 ou CIE XYZ é definido por duas coordenadas que definem a cromaticidade, X e Z e uma terceira coordenada Y que define a luminescência, também como valores tristímulus.

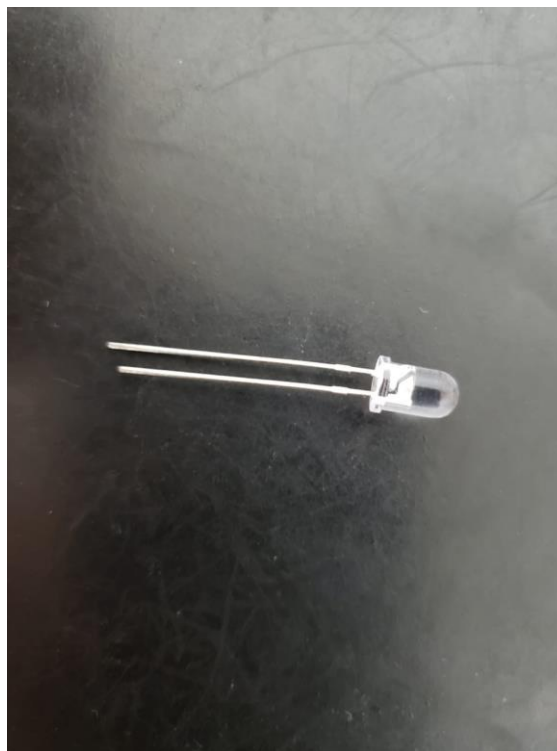
1.8.4. Sistema de detecção miniaturizado

1.8.4.1. LED

Light Emission Diode ou Diodo Emissor de Luz, como visto na Figura 3, tem sido muito aplicado para construção de instrumentos miniaturizados, por conta de ser uma fonte de radiação acessível, quando se trabalha com comprimentos de onda na região do visível, e ser muito flexível por conta de apresentar uma faixa espectral ampla.

O princípio de funcionamento é semelhante ao de um fotodiodo, o LED possui um semicondutor de junção PN que conduz corrente somente em *forward direction* (do lado mais positivo da fonte de tensão até o lado mais negativo da fonte de tensão) o diodo começa a conduzir depois de atingir uma tensão mínima. Na Figura 4, é possível avaliar o comportamento da corrente em função da Tensão e verificar o valor de tensão mínimo.

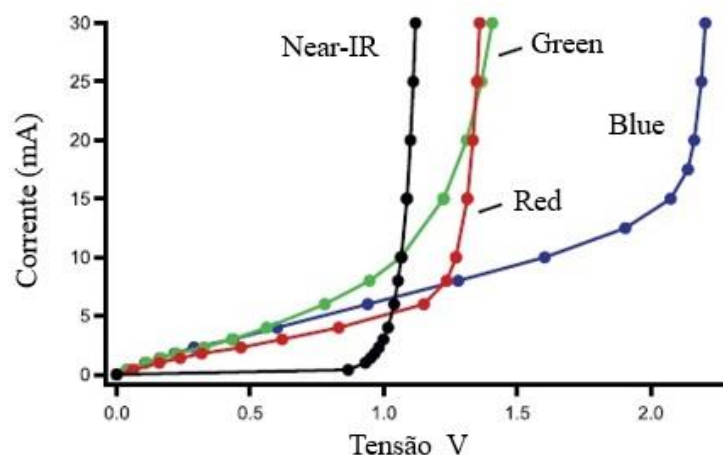
Figura 3. LED



Fonte: Adaptado de (BUI; HAUSER, 2015).

Com isso os elétrons da região N e os buracos da região P irão se sobrepor, causando a liberação de energia, a qual a quantidade liberada depende do *band gap* do material que o semicondutor foi dopado. Essa energia irá determinar o comprimento de onda da luz emitida, e por consequência a cor. (PLATT; JANSSON, 2013b).

Figura 4. Gráfico de Tensão x Corrente, para vários LEDs



Fonte: O Autor

Quando a tensão limite é atingida, os valores de corrente são exponenciais em relação a tensão como apresentado na Figura 3. Por conta disso, uma pequena variação na tensão pode gerar um aumento significativo da corrente. Com o intuito de minimizar esse problema, o circuito do LED é montado com um circuito integrado (CI) – LM 317, visto na Figura 5, que é um regulador de tensão. O objetivo do uso desse CI é que o LED seja alimentado com corrente constante, minimizando efeitos de variação de emissão de luz causados por variação da corrente de alimentação, conforme a Equação (5).

Figura 5. LM317



Fonte: O Autor

$$i = \frac{1,20}{R} \quad (5)$$

O LED pode apresentar os seguintes comprimentos de onda (PLATT; JANSSON, 2013b)

- LED infravermelho: 850 até 950 nm
- LED vermelho: 621 até 700 nm
- LED laranja: 605 até 620 nm
- LED âmbar: 590 até 591 nm
- LED amarelo: 585 até 590 nm
- LED verde: 527 até 570 nm
- LED azul: 470 até 475 nm
- LED ultravioleta: 385 até 405 nm

Por conta dessa ampla faixa de comprimentos de onda a utilização dos LEDs é viável em várias aplicações e em diferentes matrizes, viabilizando um sistema de baixo custo, com uma resposta rápida e boa sensibilidade.

1.8.4.2. Fotodiodo

Quando a radiação atinge o fotodiodo uma pequena corrente é gerada. Esse fenômeno é conhecido como efeito fotovoltaico e é similar ao que ocorre em um painel solar, que pode ser exemplificado como um grande arranjo de fotodiodos. A Figura 6 exibe o fotodiodo utilizado.

Figura 6. Fotodiodo



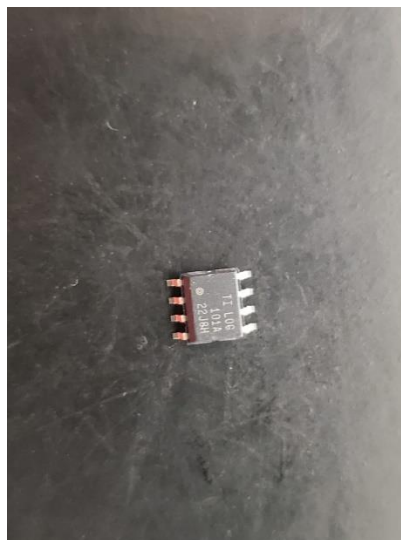
Fonte: O Autor

Quando a radiação atinge um semicondutor ela pode excitar os elétrons para um estado de maior energia, com isso o elétron começa a se mover até que ele é ejetado. No modo fotovoltaico a luz incidente pode excitar o material, com isso pares eletrônicos serão gerados e as bandas desocupadas ficarão com buracos eletrônicos, assim os elétrons se moverão para o catodo e os buracos eletrônicos para o anodo, gerando uma junção NP. Esse fenômeno também pode ocorrer na ausência de luz visível, mas será gerado uma pequena corrente que é chamada de “corrente escura”(PLATT; JANSSON, 2013a)

Já no modo fotocondutivo a radiação que atinge o fotodiodo gera pares de elétrons e buracos “eletrônicos” no material semicondutor. Eles se movimentarem em direções opostas por conta da tensão de polarização, por conta disso uma pequena corrente passará pelo fotodiodo. O modo fotocondutivo irá gerar uma resposta mais rápida do que o modo fotovoltaico por conta da polarização reversa que vai diminuir a camada de depleção mais larga, com isso a capacitância irá diminuir (PLATT; JANSSON, 2013a).

Com intuito de utilizar o fotodiodo para medidas analíticas é possível montar um circuito com o amplificador operacional (LOG 101) que está representado na Figura 7 afim de transformar o valor de corrente obtido em valores de absorbância. Um circuito com um amplificador operacional logarítmico pode ser utilizado, o qual uma voltagem de saída (V_o) é proporcional à razão da das correntes de entrada (BUI; HAUSER, 2015), conforme a Equação (6).

Figura 7. Amplificador Operacional LOG 101



Fonte: O Autor

$$V_o = -\log \frac{i_{ref}}{i_{sinal}} \quad (6)$$

2. OBJETIVO

O trabalho tem como objetivo otimizar o método de Bradford para aplicá-lo em duas estratégias, uma utilizando um dispositivo em papel e smartphone como detector e na outra construir um fotômetro miniaturizado. E quantificar a concentração de proteína em amostras de Whey Protein.

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

- Balança Analítica (Shimadzu® modelo AUY220 com precisão de $\pm 0,1$ mg)
- pHmetro (GEHAKA® PG 1800)
- Agitador Magnético (Fisatom® 752)
- Micropipetas (Labmate Pro®)
- Tubo Falcon (Corning®)
- Smartphone (Galaxy S9 plus marca Samsung com câmera de 12 megapixels)
- Fotodiodo (OSRAM® BPW 21)
- Regulador de Tensão (LM317 Texas Instruments®)
- TL071(LOG 101 Texas Instruments®)
- Multímetro (Minimapa ET-1400)
- LED (Broadcom®)
- Impressora 3D (GTmax 3D core A1 com uma extrusora)
- Impressora a Cera (Xerox, ColorQube™ 8580DN)
- Estufa (NI 1512 NOVA®)

3.2. Reagentes

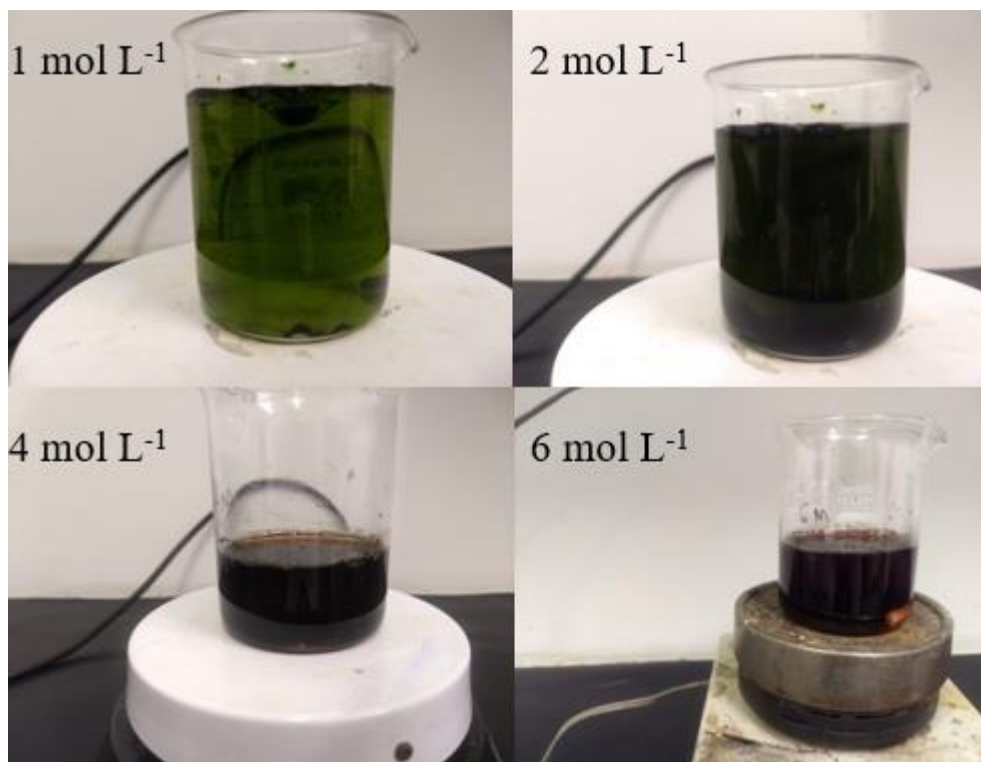
- Ácido Clorídrico 37% V/V (Sigma Aldrich)
- Albumina (Sigma Aldrich)
- Hidróxido de Sódio (Dinâmica Química Contemporânea)
- Etanol Absoluto (Dinâmica Química Contemporânea)
- Sulfato de Amônio (Dinâmica Química Contemporânea)
- CBB R-250 (Sigma Aldrich)

3.3. CBB R-250

3.3.1. CBB-1HCl

O azul brilhante R foi preparado dissolvendo 60 mg do reagente em 100 ml de ácido clorídrico e depois colocado sobe agitação durante 40 minutos e posteriormente é filtrado para retirar as partículas solidas e posterior diluição do reagente em com ácido clorídrico (1:1). Foram preparadas soluções com ácido clorídrico em concentrações de 1, 2, 4 e 6 mol L⁻¹. O aspecto de cada umas das soluções é apresentado na Figura 8(GRINTZALIS; GEORGIU; SCHNEIDER, 2015).

Figura 8. Solução Azul Brilhante em diferentes concentrações de HCl



Fonte: O Autor

3.3.2. CBB-AS

A solução de CBB-AS (Coomassie Brilliant Blue-Ammonium Sulfate) ou hidrofóbico, foi preparada pela mistura de 10 ml da solução de CBB-2HCl, previamente preparada, com 10 ml de ácido clorídrico 2 M, 2% de etanol absoluto e 3,6 g de sulfato de amônio. A função do etanol absoluto é manter o reagente estável à temperatura ambiente por pelo menos 3 semanas sem perder a sensibilidade (GEORGIU *et al.*, 2008).

3.4. Solução de Albumina

A solução padrão de albumina foi utilizada para a construção da curva de calibração. Para o preparo da solução estoque pesou-se 500 mg de padrão em 100 ml de água deionizada. Apesar da albumina ser uma das proteínas mais solúveis em água não foi necessário promover o efeito de *salting-in* que é o aumento da solubilidade de proteínas devido ao acréscimo de baixas concentrações de sais em solução. Os íons salinos interagem com as cargas iônicas das

proteínas aumentando assim o número efetivo de cargas e a quantidade de moléculas de água fixadas à ionosfera proteica

3.5. Solução Albumina e CBB-R250

Em todos os estudos realizados a solução de corante com albumina foi preparada da seguinte maneira, a 4 mL da solução de albumina foi adicionado 1 mL da solução de CBB-R.

3.6. Otimização do Papel

Para a construção do dispositivo micro fluídico, vários tipos de papeis foram avaliados. Um volume de 60 μ L da solução de albumina com reagente foi adicionado ao papel e posteriormente foi avaliado a partir da aquisição da imagem.

3.7. Otimização pH

Após a formação do complexo proteína-reagente, a solução de NaOH 0,1 M preparada previamente foi adicionada lentamente para ajuste do pH desejado.

3.8. Otimização da Concentração HCl

O reagente foi preparado utilizando diferentes concentrações de HCl, como descrito anteriormente, afim de avaliar em qual concentração e pH o reagente formaria o complexo com a proteína, esse estudo sendo feito utilizando um espectrofotômetro Ocean Optics 3000

3.9. Aquisição das imagens

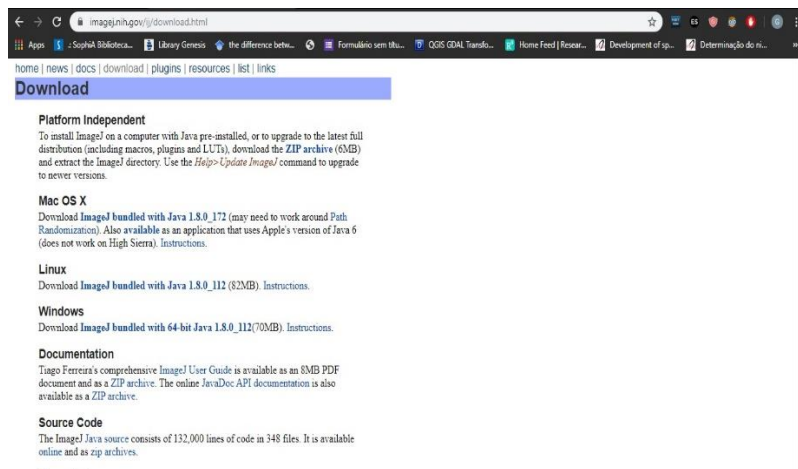
Para a aquisição das imagens foi utilizado um *smartphone* Galaxy S9 Plus da marca Samsung e que possui uma câmera de 12 megapixels. As imagens foram obtidas em um ambiente com a iluminação controlada. Após a obtenção das imagens o *software* ImageJ foi utilizado para fazer o tratamento das imagens, afim de se obter os valores dos canais R,G e B para a construção da curva analítica. Os dados foram obtidos como descrito em seguida.

3.9.1. Tratamento de dados pelo *imageJ*

3.9.1.1. Dowload do *imageJ*

O programa foi obtido gratuitamente no seguinte endereço eletrônico: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>, conforme apresentado na Figura 9.

Figura 9. Download imageJ



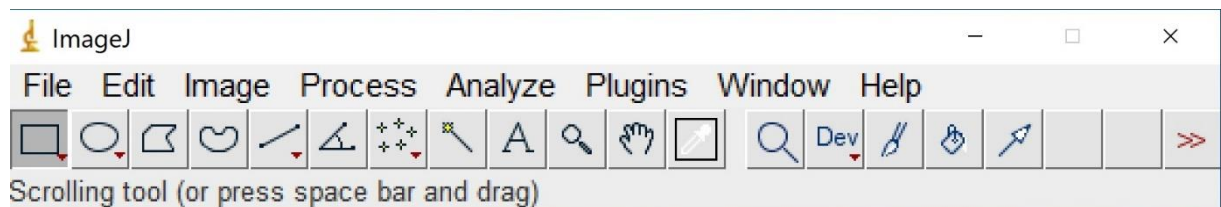
Fonte: O Autor

O programa foi instalado em um computador com sistema operacional *Windows*.

3.9.1.2. Abrindo um arquivo de imagem

Após a instalação do aplicativo, basta executá-lo e aparecerá a interface exibida na Figura 10.

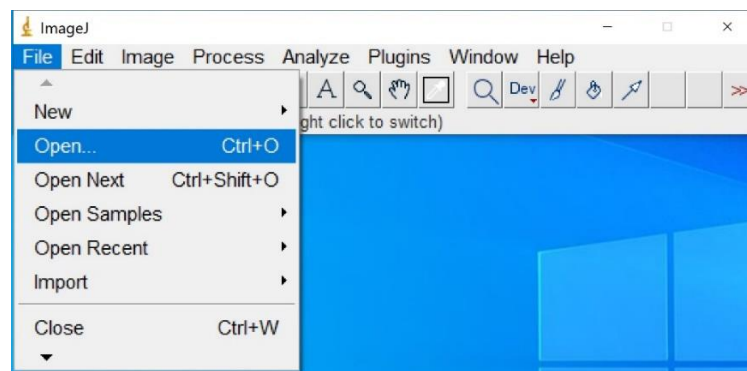
Figura 10. Interface imageJ



Fonte: O Autor

Basta clicar em *File* e depois clicar na opção *Open*, como visto na Figura 11.

Figura 11. Abrindo uma imagem com imageJ



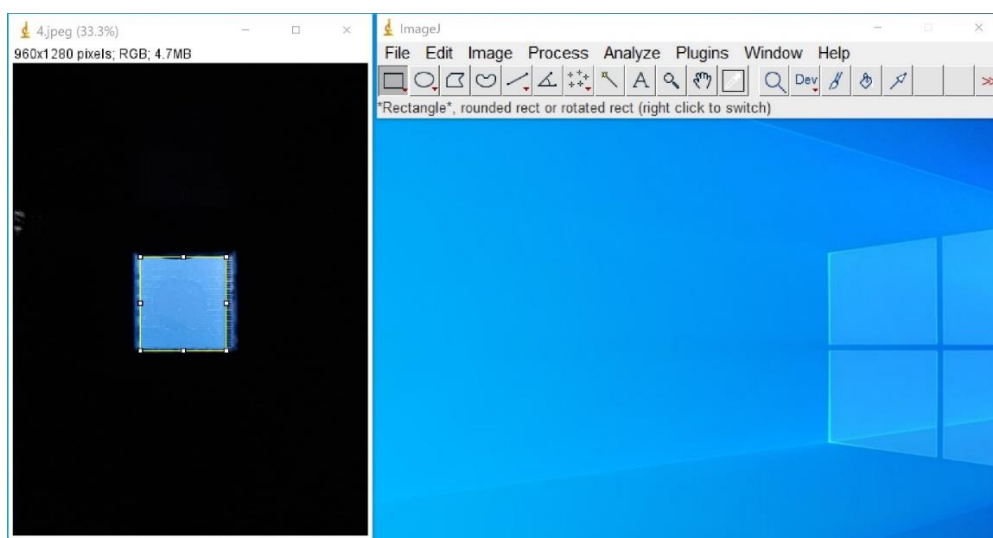
Fonte: O Autor

A imagem que será analisada precisa estar no formato .JPEG.

3.9.1.3. Escolha da região analisada

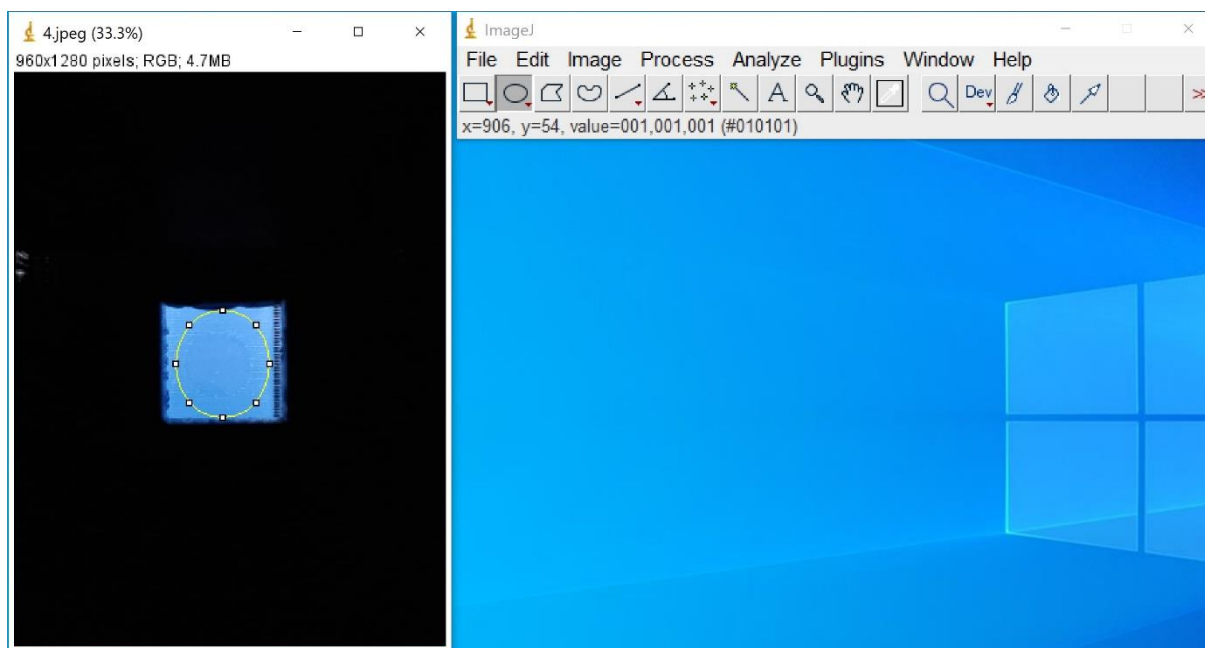
Após a escolha da imagem que será analisada, é necessário escolher a região que será avaliada selecionando as duas geometrias possíveis de seleção, como visto na Figura 12 e Figura 13.

Figura 12. Avaliando uma imagem com imageJ utilizando a forma “Quadrado”.



Fonte: O Autor

Figura 13. Avaliando uma imagem com imageJ utilizando a forma “Elipse”.

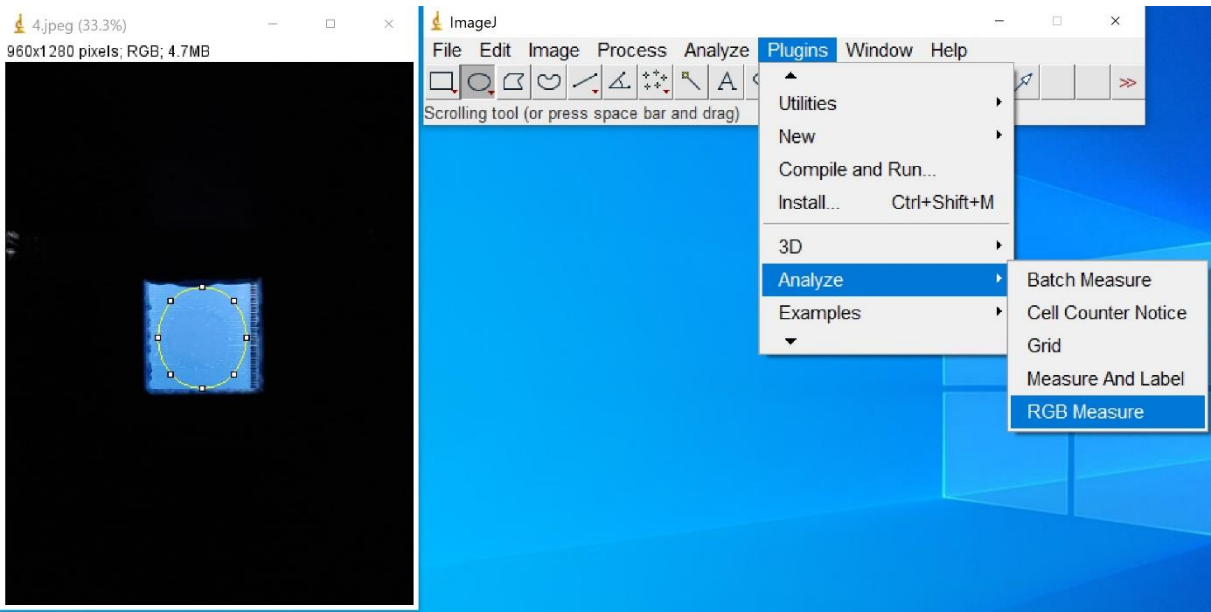


Fonte: O Autor

3.9.1.4. Aquisição dos dados

Basta selecionar a opção *Plugins* e depois clicar em *Analyze* e em seguida selecionar *RGB Measure*, como visto na Figura 14.

Figura 14. Adquirindo os dados com imageJ



Fonte: O Autor

Após a execução de todos esses passos, uma imagem conforme visto na Figura 15 deverá aparecer.

Figura 15. Tabela com os dados obtidos

Results						
File	Edit	Font	Results			
	Label	Area	Mean	Min	Max	
1	Red	39608	88.123	14	146	
2	Green	39608	165.706	70	214	
3	Blue	39608	239.002	147	255	
4	(R+G+B)/3	39608	164.363	77	205	
5	0.299R+0.587G+0.114B	39608	150.811	62	198	

Fonte: O Autor

Com isso, basta selecionar o canal que apresenta a melhor resposta analítica para o estudo que será realizado.

3.9.2. Color Grab

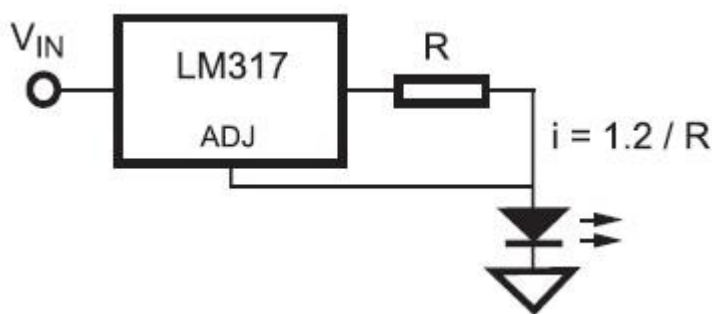
Além de utilizar o software *imageJ* é possível utilizar o aplicativo *ColorGrab* (Loomatix, version 3.6.1. 2017), que possibilita a conversão da imagem em valores de RGB imediatamente após a obtenção. As otimizações foram realizadas utilizando este aplicativo.

3.10. Fotômetro portátil

3.10.1. Circuito LED

Como citado anteriormente a variação da corrente não é linear com a tensão o que significa que uma pequena variação na tensão pode gerar um aumento no valor da intensidade da corrente o que pode levar a variação da emissão de radiação e resultados pouco reprodutíveis. Para solucionar esse problema o LED é ligado a um circuito elétrico baseado em um regulador de tensão (LM317) que a corrente pode ser calculada a partir da escolha de um resistor adequado utilizando a equação. O circuito utilizado está representado na Figura 16. Neste trabalho, utilizou-se um resistor variável (potenciômetro) de 100 OHM, que foi ajustado para gerar uma corrente de 40 mA.

Figura 16. Circuito LED, LM317.

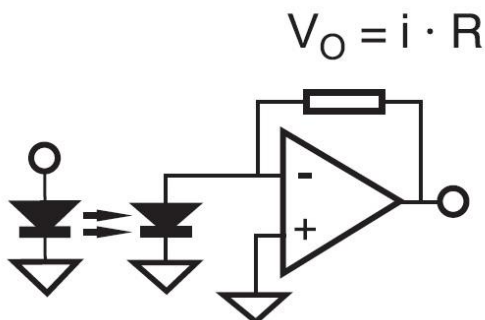


Fonte: Extraído de (BUI; HAUSER, 2015).

3.10.2. Circuito fotodiodo

O diodo utilizado no trabalho foi montado no modo foto corrente, como visto na Figura 17.

Figura 17. Circuito Fotodiodo.



Fonte: Extraído de (BUI; HAUSER, 2015).

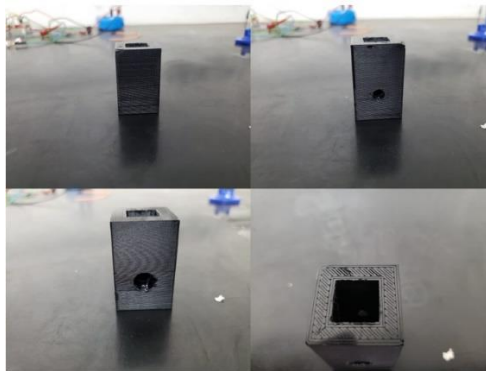
Para realizar as medidas de absorbância o fotodiodo foi ligado a um amplificador de razão logarítmica (LOG101) onde o valor de tensão é diretamente transformado em absorbância.

3.10.3. Suporte LED e fotodiodo

Para acoplar o LED e o Fotodiodo, um suporte foi projetado no software AutoDesk Inventor e impresso com o auxílio de uma Impressora 3D utilizando o filamento de ABS. O suporte está representado na Figura 18.

Além do espaço para o fotodiodo e o LED, foi feito o espaço para inserção da cubeta onde as medidas foram realizadas.

Figura 18. Suporte fotômetro.

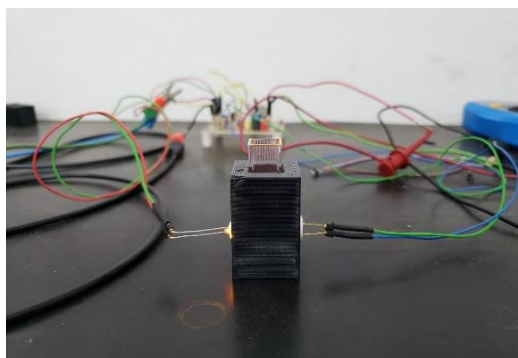


Fonte: O Autor

3.10.4. Aquisição dos dados

Para a realização dos experimentos foi escolhido um LED laranja com comprimento de onda variando entre 605 e 620 nm. Os estudos realizados para a escolha do LED serão apresentados na seção das otimizações. O fotômetro miniaturizado pode ser visto na **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

Figura 19. Fotômetro miniaturizado.



Fonte: O Autor

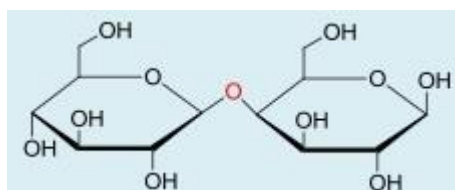
4. OTIMIZAÇÕES

4.1. Otimização do papel

4.1.1. Folha sulfite

O primeiro papel testado foi a folha sulfite que tem como constituinte básico a celulose, que está representada na Figura 20 que possui algumas hidroxilas na sua estrutura. Estes grupos facilitam a absorção de água pela folha de papel e, como todos os reagentes são soluções aquosas, eles são facilmente absorvidos. No entanto, essa absorção não é uniforme, o que confere um baixo coeficiente de correlação como mostrado na Figura 21.

Figura 20. Estrutura da celulose.



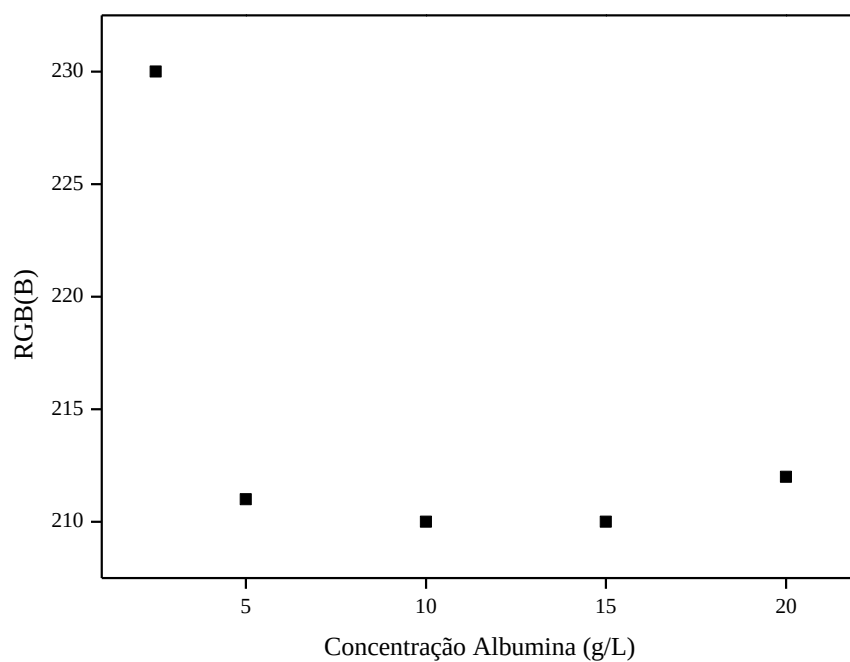
Fonte:(TEIXEIRA *et al.*, 2017).

Para tentar contornar essa baixa reprodutibilidade e continuar utilizando a folha sulfite, que apresenta algumas vantagens como baixo custo, fácil acesso e manuseio, foi proposto fazer a leitura antes que a amostra fosse absorvida pelo papel. Entretanto os resultados também não foram satisfatórios e a Equação (7) foi obtida

$$y = 261,4 - 1,34x \quad (7)$$

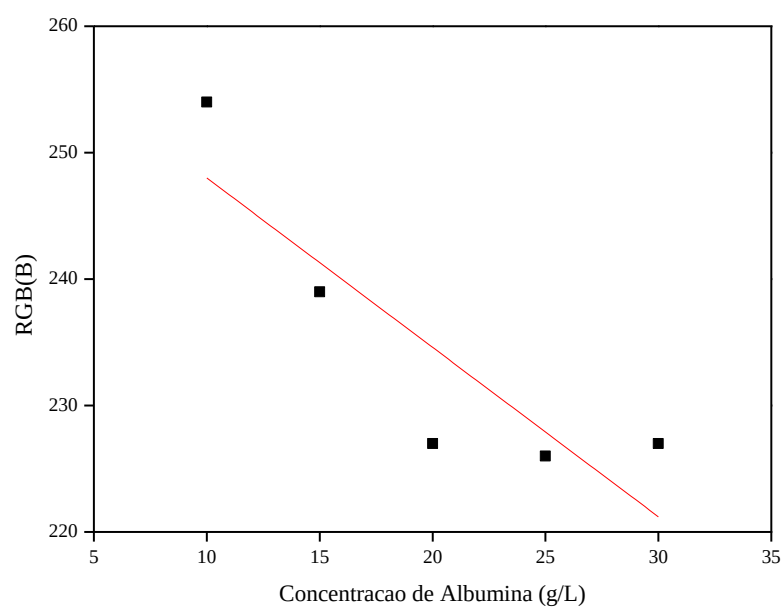
com coeficiente de correlação $R^2=0,7669$, conforme visto na Figura 22. Como os resultados obtidos utilizando a folha sulfite não obtiveram uma boa linearidade, partiu-se para avaliação do papel de filtro.

Figura 21. Curva de calibração obtida utilizando folha sulfite após a absorção.



Fonte: O Autor

Figura 22. Curva de calibração obtida utilizando folha sulfite antes da absorção.



Fonte: O Autor

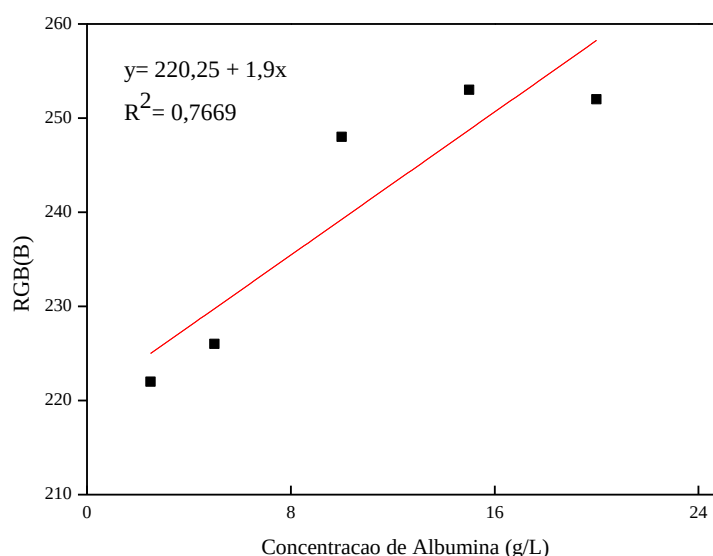
4.1.2. Papel de filtro

O papel de filtro foi escolhido como alternativa, uma vez que a absorção é mais rápida e uniforme já que ele feito à base de algodão e por conta disso a quantidade de celulose é bem maior. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 23, conforme a Equação (8),

$$y = 220,25 + 1,9x \quad (8)$$

com coeficiente de correlação $R^2=0,8303$. Foi possível observar que houve uma melhora em relação ao papel sulfite, porém esta não justifica o uso do papel de filtro e, como a absorção é rápida, não é viável fazer a leitura antes da absorção. Como os resultados obtidos ainda não foram satisfatórios, partiu-se para o desenvolvimento do dispositivo micro fluídico utilizando a impressão com jato de cera e optando por um papel cromatográfico.

Figura 23. Curva de Calibração obtida utilizando papel de filtro.

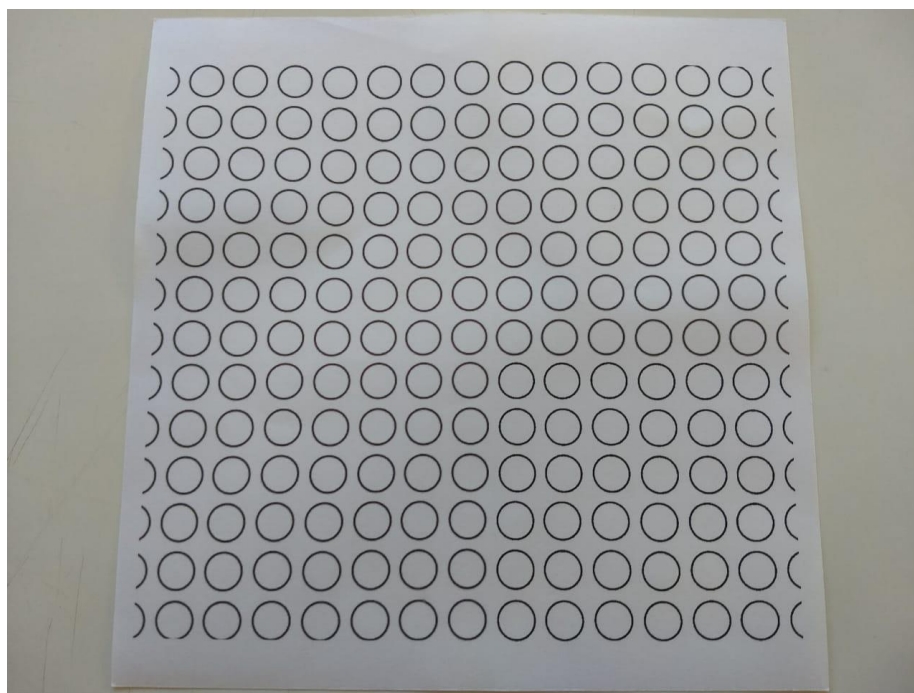


Fonte: O Autor

4.1.3. Papel Cromatográfico

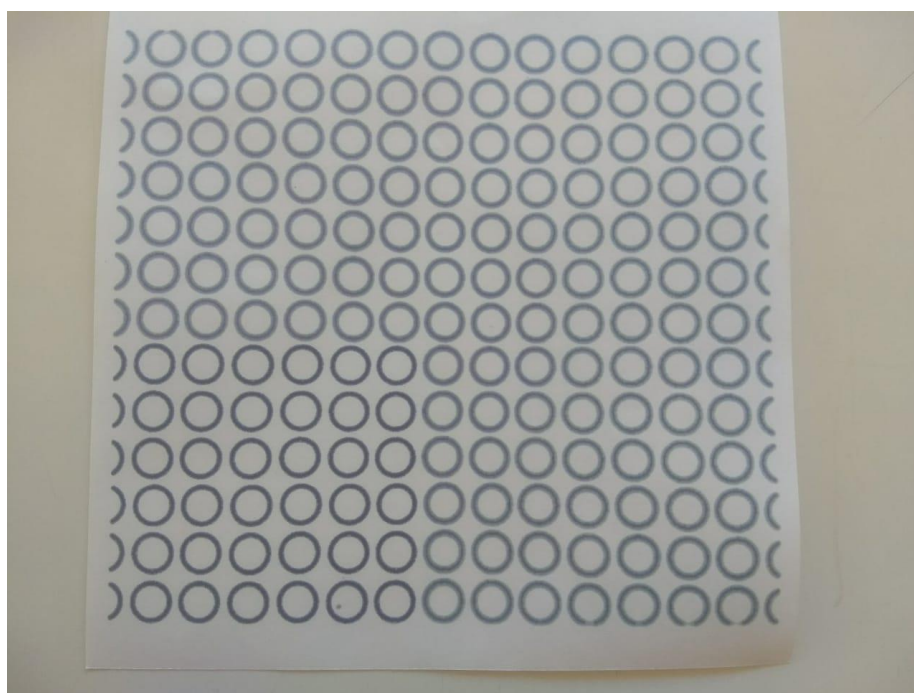
Após vários testes com a folha sulfite e com o papel de filtro, partiu-se para o papel quantitativo com *spots* hidrofóbicos impressos utilizando uma impressora a cera, conforme a Figura 24. Para utiliza-lo é necessário um tratamento prévio, aquecendo-o por 15 min a 50°C em estufa ou em chapa de aquecimento, onde o processo é mais rápido. Ocorre a penetração da cera no interior do papel, gerando a barreira hidrofóbica que irá limitar a região da amostra, conforme visto na Figura 25.

Figura 24. Folha após impressão com jato de cera.



Fonte: O Autor

Figura 25. Folha após aquecimento.



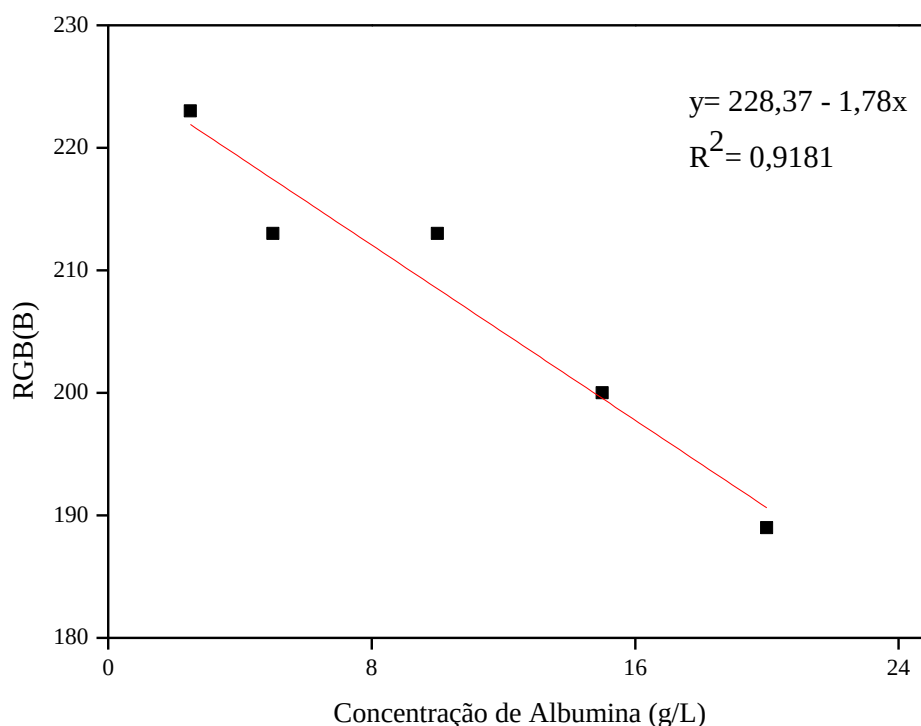
Fonte: O Autor

O resultado obtido após a leitura com essa condição foi promissor, conforme a Equação (9),

$$y = 226,37 - 1,7878x \quad (9)$$

com coeficiente de correlação $R^2=0,9161$, como visto na Figura 26.

Figura 26. Curva Analítica obtida utilizando o papel cromatográfico.



Fonte: O Autor

Com base nestes resultados, partiu-se para a avaliação das outras variáveis que interferem na resposta analítica, que são concentração de ácido clorídrico e a faixa de pH em que o reagente se encontra.

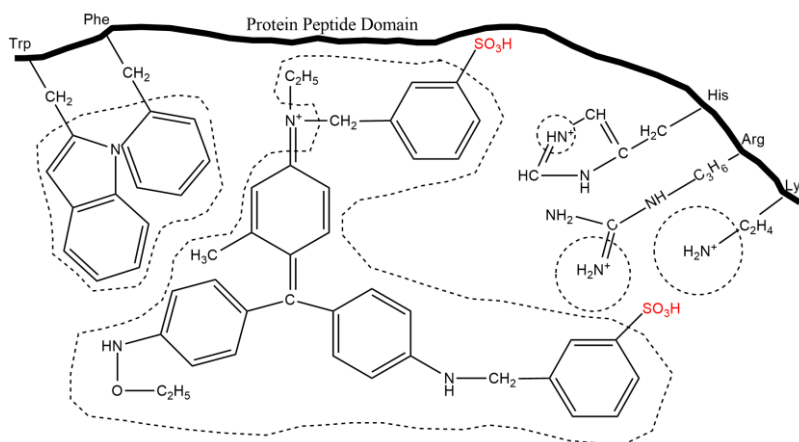
4.2. Estudo do pH

O estudo de pH é importante uma vez que dependendo do seu valor o reagente terá um comportamento diferente. Em pH 0,39 o reagente possui a estrutura descrita na Figura 27. Neste pH o reagente terá a menor afinidade pela proteína e consequentemente o método terá uma menor sensibilidade.

A Figura 28 apresenta a estrutura do azul brilhante em pH 1,3. Neste pH o reagente terá uma interação intermediária com o analito de interesse e consequentemente uma melhor sensibilidade, mas ainda há como melhorar a sensibilidade.

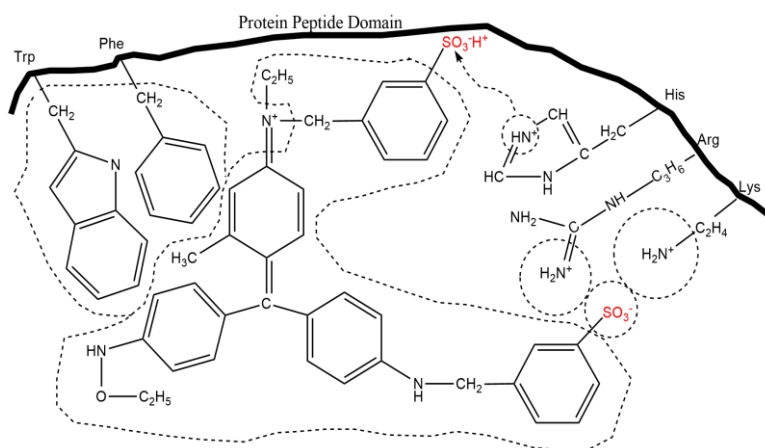
A estrutura apresentada pela Figura 29 em que o reagente se encontra em um pH maior que 1,3 tem a melhor interação pelo analito e com isso terá a melhor sensibilidade. Estas interações são todas eletrostáticas.

Figura 27. Estrutura do Azul Brilhante em pH= 0,39.



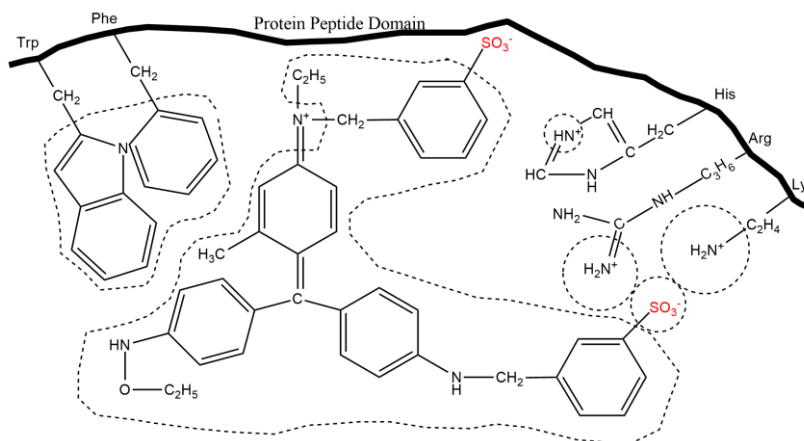
Fonte: Adaptado de (GEORGIU *et al.*, 2008).

Figura 28. Estrutura do Azul Brilhante em pH= 1,3.



Fonte: Adaptado de (GEORGIU *et al.*, 2008).

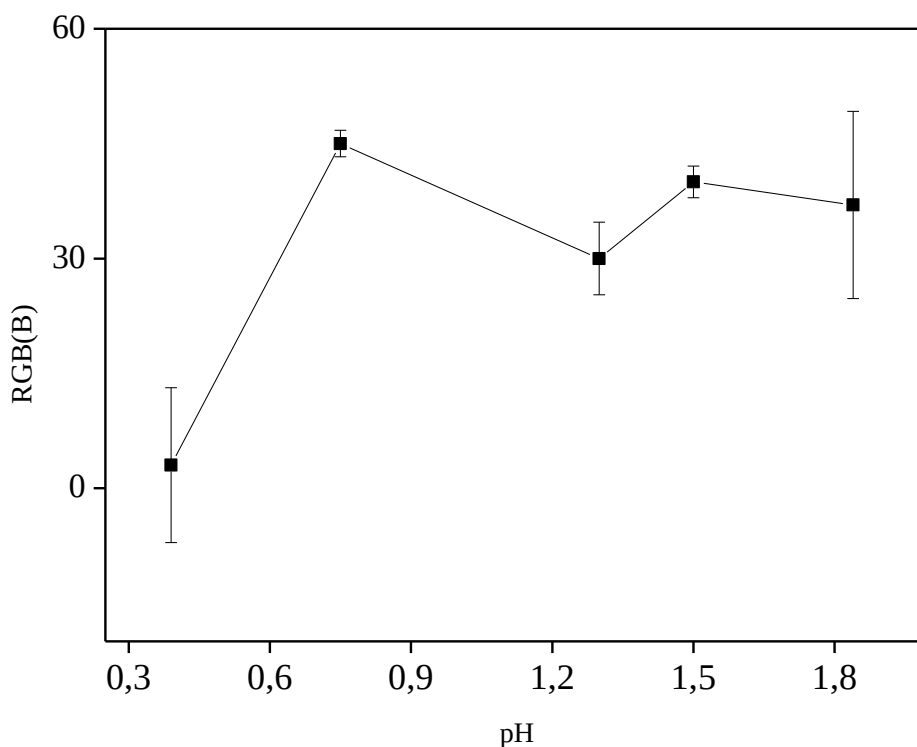
Figura 29. Estrutura do Azul Brilhante em pH> 1,3.



Fonte: Adaptado de (GEORGIU *et al.*, 2008).

A Figura 30 mostra o gráfico que representa o comportamento do reagente em vários valores de pH. Foi utilizado a concentração arbitrária de 5 g L^{-1}

Figura 30. Estudo do comportamento do azul brilhante em diferentes valores pH.



Fonte: O Autor

Após a avaliação, foi possível concluir que no $\text{pH} = 0,75$ obteve-se um sinal maior e um menor desvio.

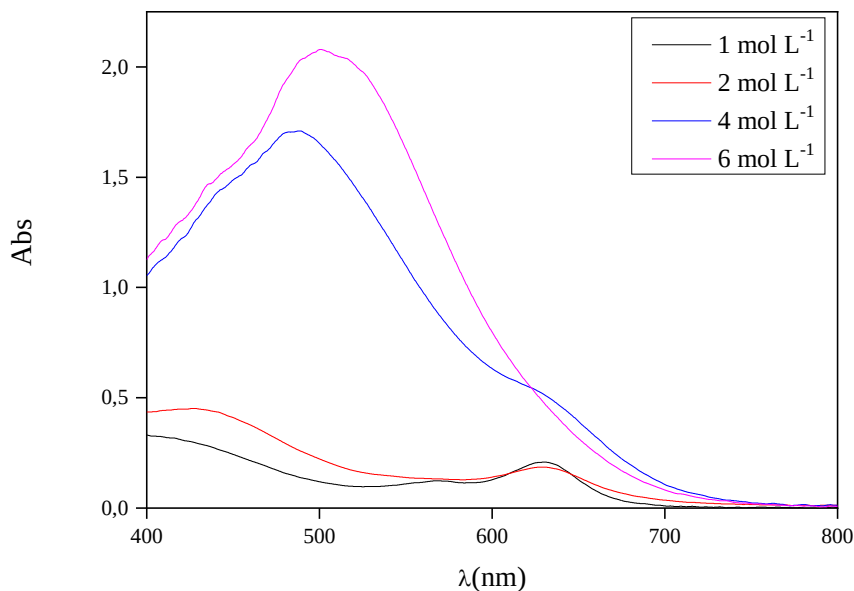
4.3. Estudo concentração de Ácido Clorídrico

A concentração do ácido clorídrico utilizado para o preparo da solução de azul brilhante, nos experimentos descritos anteriormente foi de 2 mol L^{-1} . Entretanto, o estudo da concentração utilizada mostrou-se muito importante, então diferentes soluções foram preparadas e os espectros no UV-VIS foram avaliados.

Foi possível notar, conforme a Figura 31, que em cada concentração de ácido clorídrico obteve-se um máximo de absorbância diferente, com as menores concentrações entre 600 e 700 nm e as concentrações mais elevadas entre 450 e 550 nm. Com isso, os espectros foram avaliados aplicando o reagente nas amostras.

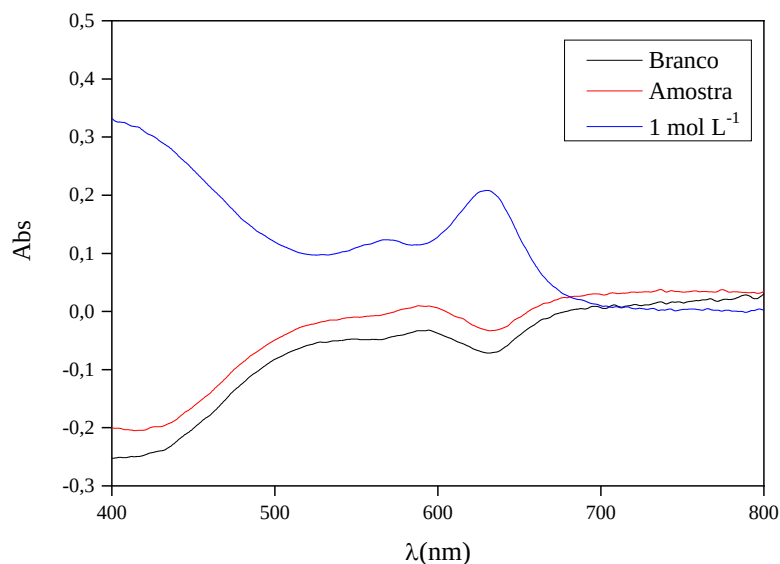
Observando os espectros obtidos na Figura 32, é possível perceber que não houve diferença entre o máximo de absorbância do reagente, do branco e da amostra, com isso fica claro que não é viável utilizar essa concentração de ácido clorídrico.

Figura 31. Espectro de absorbância do azul brilhante em diferentes concentrações de HCl.



Fonte: O Autor

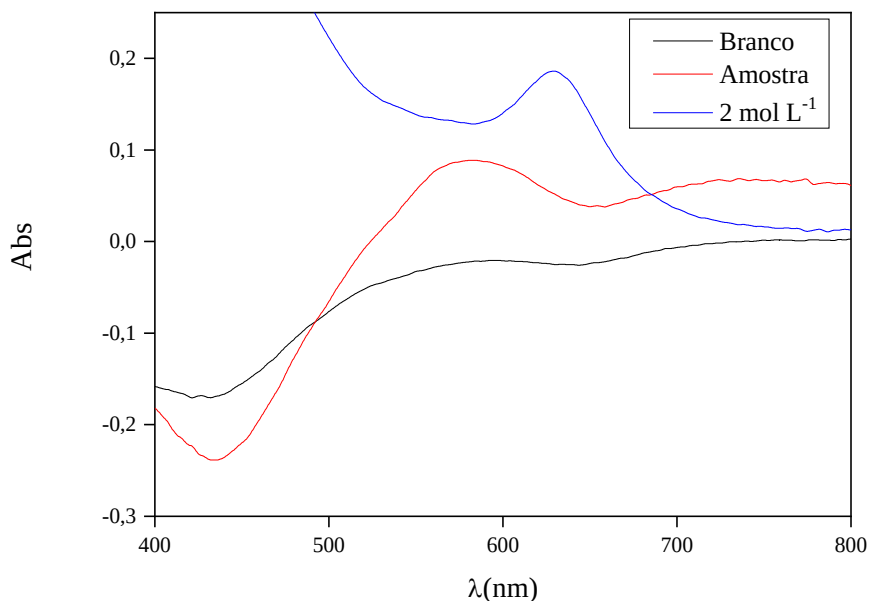
Figura 32. Espectro de absorbância para HCl 1 mol L⁻¹ e o efeito da amostra no reagente.



Fonte: O Autor

A partir da análise do espectro da Figura 33, é possível perceber que um deslocamento do máximo absorbância do reagente com a amostra quando comparado com o branco e o reagente 2 mol L⁻¹.

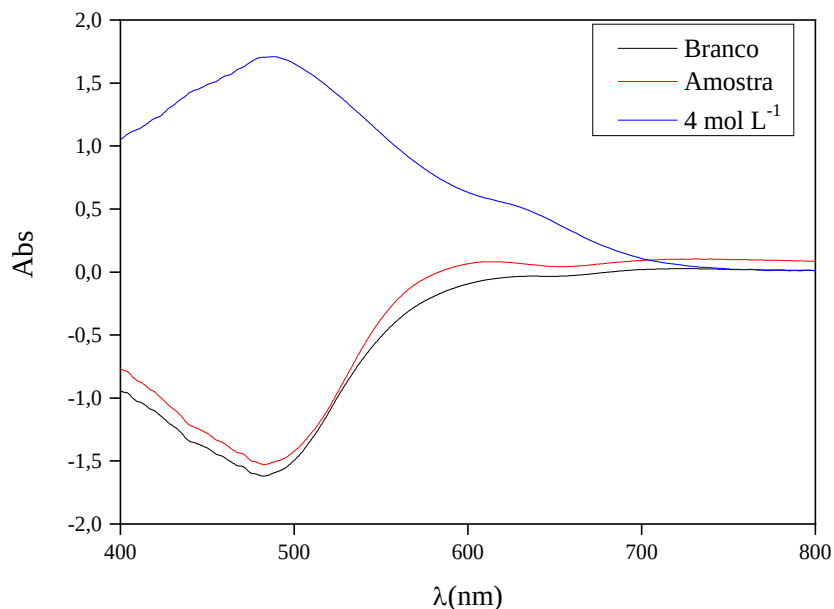
Figura 33. Espectro de absorvância para HCl 2 mol L⁻¹ e o efeito da amostra no reagente.



Fonte: O Autor

Observando os espectros obtidos na Figura 34, é possível perceber que não houve diferença entre o máximo de absorvância do reagente, do branco e da amostra, com isso fica claro que não é viável utilizar essa concentração de ácido clorídrico.

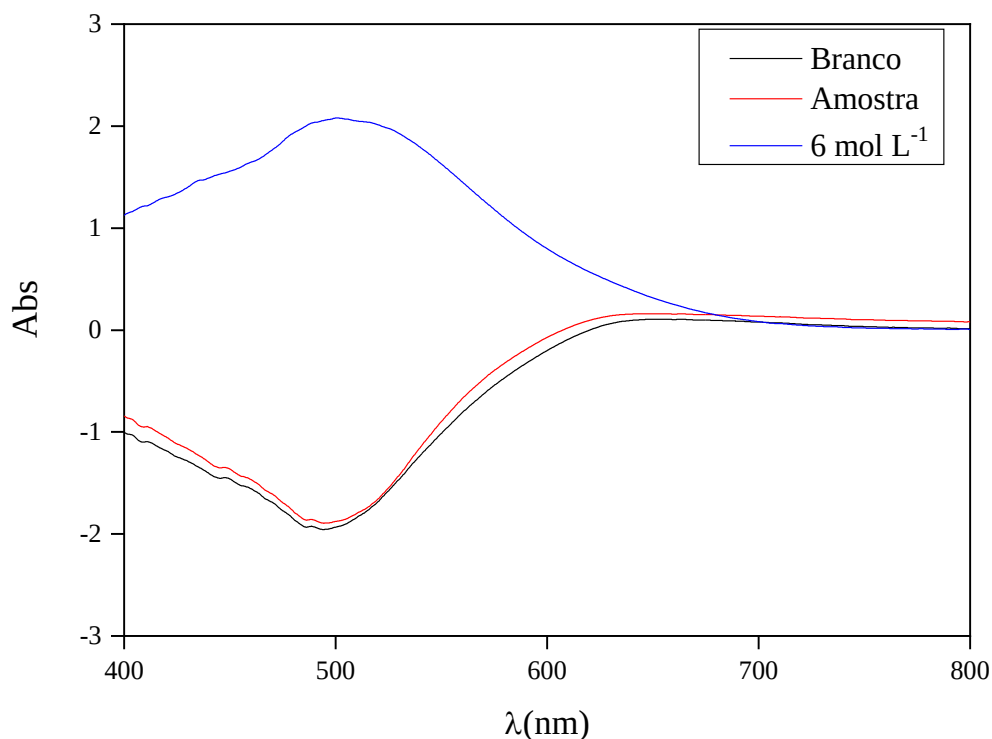
Figura 34. Espectro de absorvância para HCl 4 mol L⁻¹ e o efeito da amostra no reagente.



Fonte: O Autor

Observando os espectros obtidos na Figura 35, é possível perceber que não houve diferença entre o máximo de absorvância do reagente, do branco e da amostra, com isso fica claro que não é viável utilizar essa concentração de ácido clorídrico.

Figura 35. Espectro de absorvância para HCl 6M e o efeito da amostra no reagente.

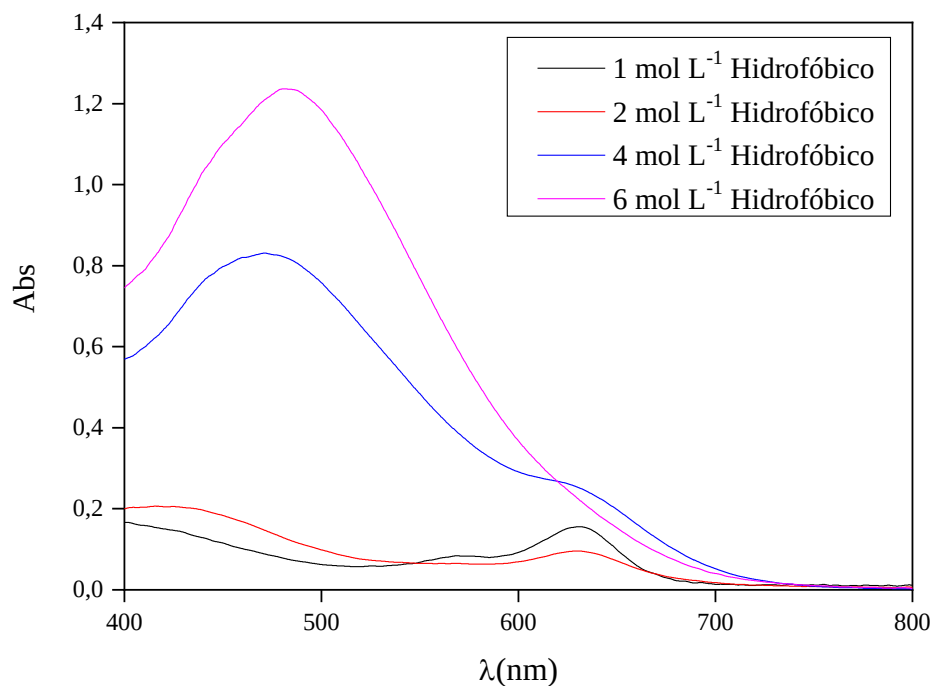


Fonte: O Autor

A partir destas análises, a concentração de ácido clorídrico escolhida foi a de 2 mol L⁻¹ que foi coerente com o valor ótimo de pH encontrado. Depois foram realizados experimentos adicionando sulfato de amônio e etanol anidro, para preparar o CBB R-250 hidrofóbico, com isso novos espectros foram obtidos para se avaliar o efeito desses reagentes.

Quando se compara a Figura 36 com a Figura 31 é possível perceber que o valor de absorvância obtido foi menor. Com isso, o reagente hidrofóbico não foi aplicado à amostra uma vez que a etapa a mais de adição desses reagentes não confere nenhuma alteração considerável aos resultados obtidos.

Figura 36. Espectro de absorvância utilizando diferentes concentrações de HCl para o CBB-R250 Hidrofóbico

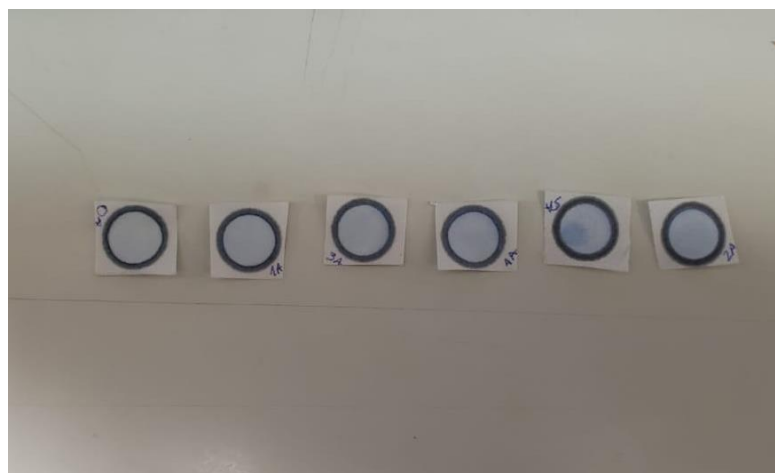


Fonte: O Autor

4.4. Aplicação dos parâmetros otimizados para leitura com papel

Após a otimização das variáveis do experimento foi possível construir uma curva analítica utilizando a amostra no papel. Cada um dos spots, apresentados na Figura 37, foi tratado individualmente utilizando o software *imageJ* e os valores do canal R foram utilizados para construir a curva de calibração

Figura 37. Imagem obtida do reagente com proteína no papel.



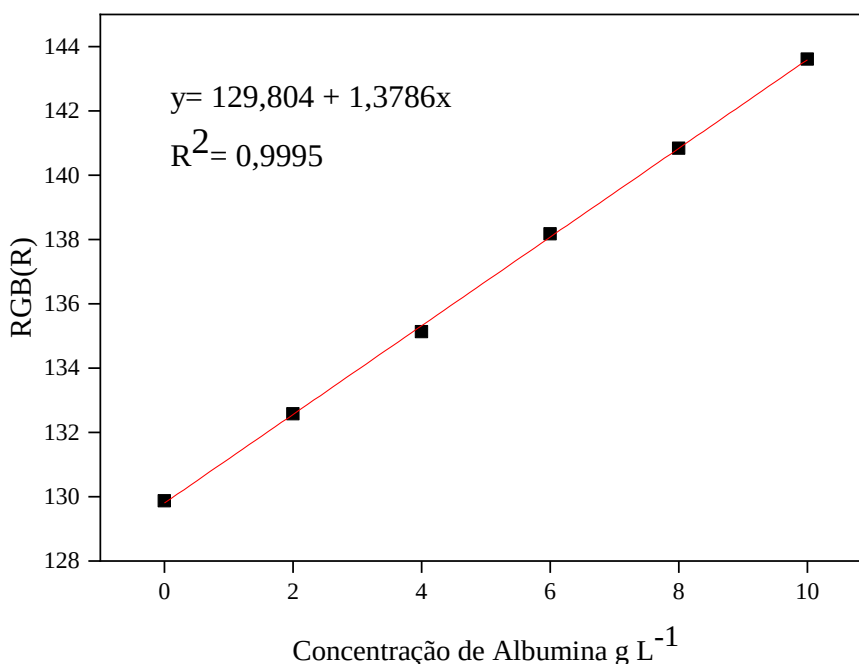
Fonte: O Autor

Observando a Figura 38 percebe-se que a curva analítica pode ser expressa conforme a Equação (10),

$$y = 1,378x + 129,80 \quad (10)$$

com um coeficiente de correlação $R^2=0,9995$. A partir disso fica evidente que é possível utilizar imagens obtidas pelo *smartphone* para determinar a concentração de um analito de interesse, e além disso foi possível demonstrar que o reagente CBB-R250 pode ser utilizado para quantificações espectrofotométricas.

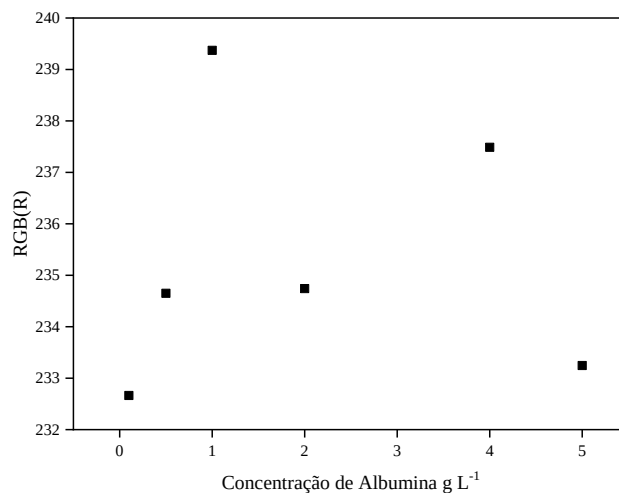
Figura 38. Curva de calibração para Albumina utilizando *smartphone* e aplicando as variáveis otimizadas.



Fonte: O Autor

O papel funciona muito bem para a realização de *spot tests*, uma vez que a reação é feita fora do papel e o mesmo é utilizado apenas como uma plataforma para obtenção das imagens. Entretanto os estudos realizados utilizando o papel como uma plataforma reacional mostraram que a formação do complexo proteína-corante não ocorre como mostrado na Figura 39.

Figura 39. Curva utilizando o papel como uma plataforma reacional



Fonte: O autor

Isso se deve ao fato de que os volumes utilizados quando a reação ocorre no papel são muito pequenos o que implica em uma baixa massa de proteína adicionada e como a complexação do corante ocorre por interações eletrostáticas com a proteína, não haverá proteína suficiente para que a reação ocorra de maneira satisfatória. Além disso pode ocorrer a interação do corante com a celulose.

Com isso foi decidido partir para a estratégia utilizando o fotômetro miniaturizado, uma vez que o mesmo apresenta uma maior sensibilidade e uma certa portabilidade. A utilização do papel apenas para realização de *spot tests* não possui um apelo significativo com isso uma alternativa proposta foi a utilização de um fotômetro miniaturizado.

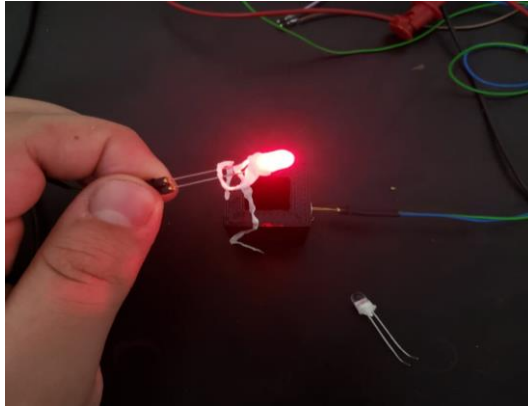
4.5. Estudo do LED utilizado com fotômetro miniaturizado

Para a utilização do fotômetro é necessário selecionar qual o LED que se adequa melhor ao máximo de absorbância para o complexo formado entre a proteína e o corante CBB. Esse procedimento é essencial para que a lei de Lambert-beer seja obedecida e a relação entre absorbância e concentração seja linear. Uma escolha inadequada do LED pode causar desvios na linearidade. Para isso, a curva analítica foi construída utilizando o LED laranja com comprimento de onda entre 605 e 620 nm, e o LED vermelho com comprimento de onda entre 621 e 700 nm.

4.5.1. LED vermelho

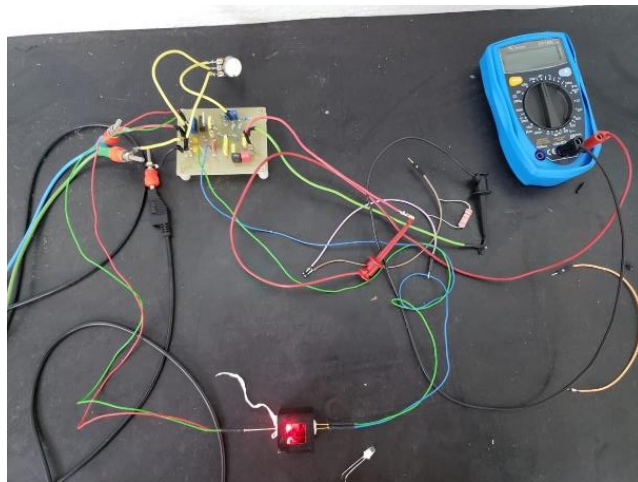
A Figura 40 a seguir mostra o LED vermelho utilizado nesta etapa e a Figura 41 exibe o fotômetro com o LED instalado.

Figura 40. LED Vermelho.



Fonte: O Autor

Figura 41. Fotômetro com LED Vermelho.

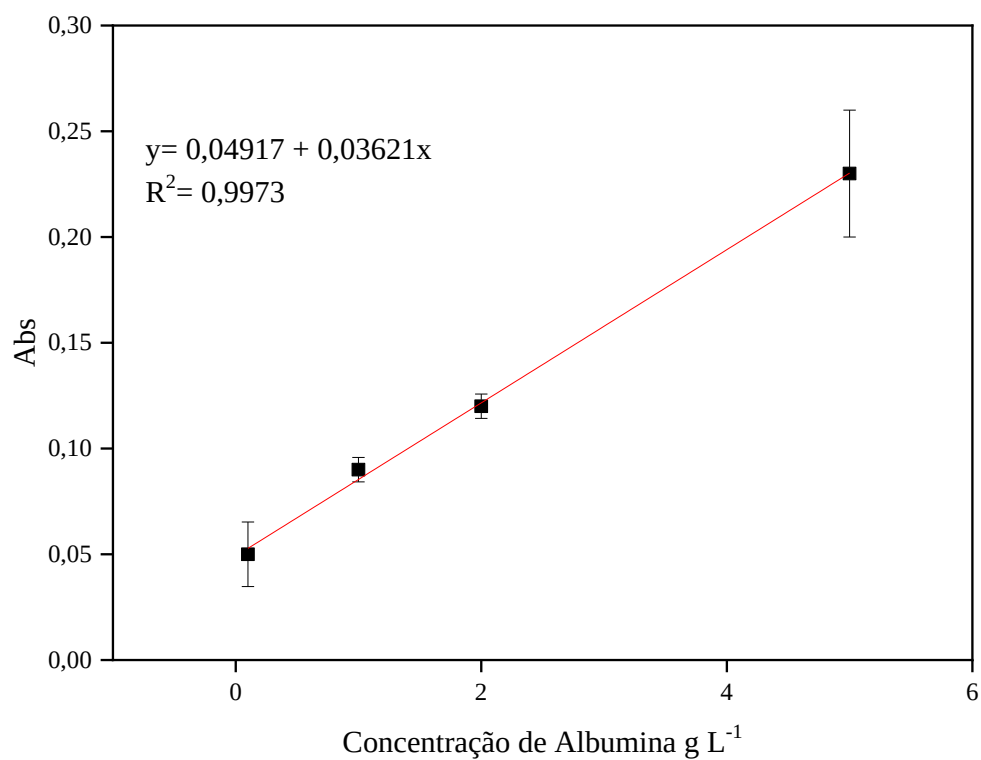


Fonte: O Autor

A Figura 42 mostra a curva analítica, expressa pela Equação (11), utilizando o LED vermelho, sendo seu coeficiente de correlação $R^2=0,99734$.

$$y = 0,03621x + 0,04917 \quad (11)$$

Figura 42. Curva de calibração obtida utilizando o LED vermelho.

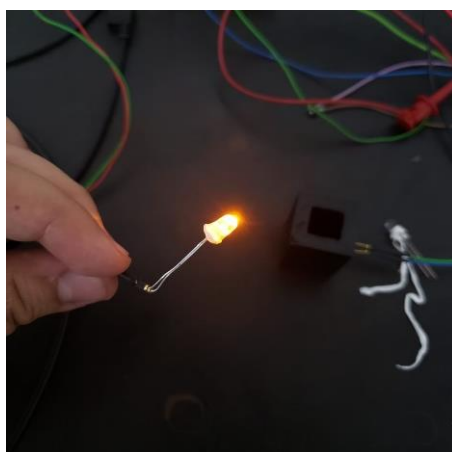


Fonte: O Autor

4.5.2. LED laranja

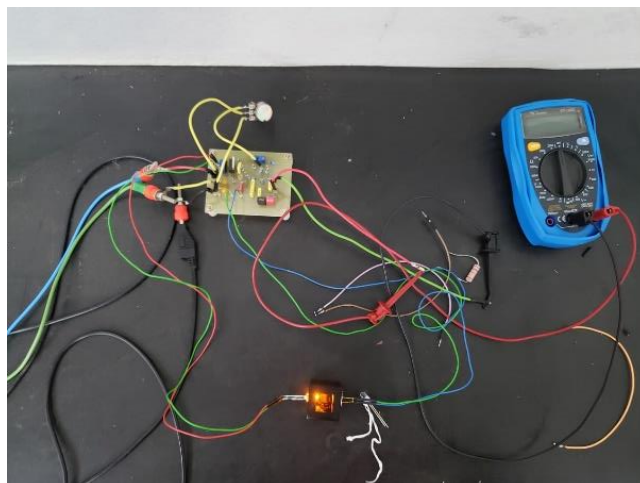
A Figura 43 a seguir mostra o LED laranja utilizado nesta etapa e a Figura 44 exibe o fotômetro com o LED instalado.

Figura 43. LED Laranja.



Fonte: O Autor

Figura 44. Circuito LED Laranja.

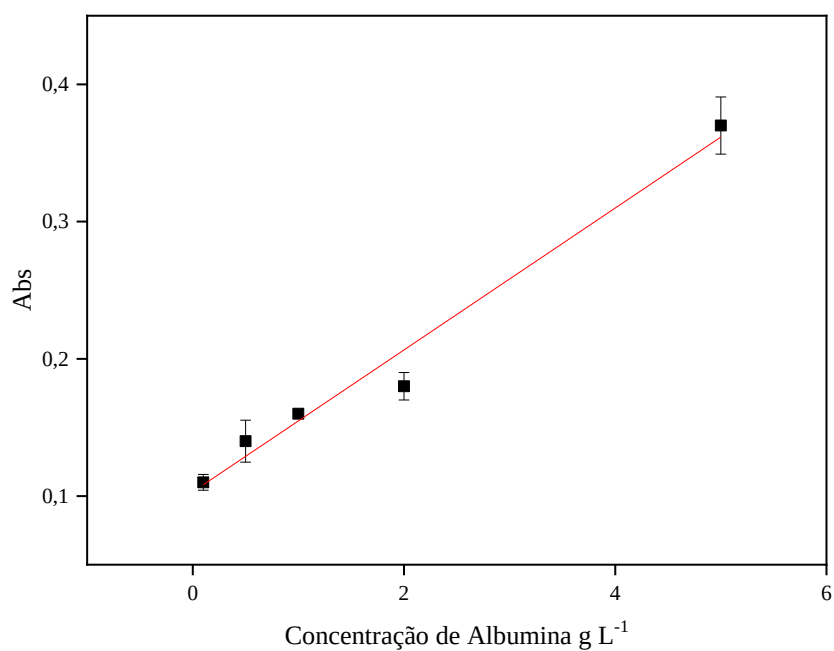


Fonte: O Autor

Figura 45 mostra a curva analítica, expressa pela Equação (12), obtida utilizando o LED laranja, sendo seu coeficiente de correlação $R^2=0,97083$.

$$y = 0,05171x + 0,10306 \quad (12)$$

Figura 45. Curva de calibração obtida utilizando o LED laranja.



Fonte: O Autor

4.5.3. LED laranja x LED vermelho

Na Tabela 2 é possível verificar a comparação dos parâmetros analíticos obtidos para os dois LEDs.

Tabela 2. Comparação entre o LED laranja e o LED vermelho

Parâmetros Analíticos	LED Laranja	LED Vermelho
Coeficiente de Correlação Linear	0,97083	0,99734
Coeficiente Angular	0,05171	0,03621
Limite de Detecção	0,03 g/L	1,54 g/L
Sinal do Branco	0,01	0,085

Fonte: O Autor

A partir dos dados observados, é possível perceber que o LED laranja apresentou o melhor comportamento, já que esse obteve uma sensibilidade maior e um menor limite de detecção. Além disso, é possível perceber que o sinal do branco para o LED laranja está dentro da faixa de ruído do fotômetro miniaturizado que vai de 0 até 0,03.

5. AVALIAÇÃO DA AMOSTRA

5.1. Preparo da Amostra

O método proposto foi aplicado em uma amostra de *whey protein* que foi preparada da seguinte maneira: pesou-se 0,0795 g da amostra e foi colocado em um balão volumétrico de 100 mL completando até o menisco com água deionizada, com isso tem-se uma solução de 0,5 g L⁻¹ de proteínas. Segundo o rótulo do *whey protein* utilizado, uma porção de 35 g contém 22 g de proteína, a partir disso os cálculos foram feitos para saber quantas gramas de *whey* eram necessários para preparar a solução de 0,5 g L⁻¹.

A solução de 0,5 g L⁻¹ foi filtrada duas vezes para retirar os materiais particulados presente em solução, a fim de minimizar qualquer interferência para as medidas realizadas utilizando o fotômetro, já que a presença de matérias particulados pode aumentar a dispersão da luz na amostra, causando um aumento indesejado no valor de absorbância.

5.2. Leitura da Amostra

A leitura foi realizada em triplicata e os resultados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos aplicando o método proposto em amostras de Whey Protein

Amostra	Abs
X ₁	0,13
X ₂	0,13
X ₃	0,13

Fonte: O Autor

Utilizando a Equação (12) obtida através da curva de calibração do LED laranja é possível calcular os valores de concentração. Portanto, para o ponto X₁, tem-se que,

$$0,13 = 0,05171x + 0,10306 \quad (13)$$

Isolando x na Equação (13), obtém-se 0,5105 g L⁻¹ como valor de concentração.

Aplicando o mesmo raciocínio para os outros pontos é possível obter um valor médio de 0,5105 g/L com um erro relativo de

$$E_r = \frac{0,5105 - 0,5}{0,5} = 0,021 \times 100 = 2,1\% \quad (14)$$

5.2.1. Ensaio de Adição e Recuperação

Para avaliar se os resultados obtidos estão realmente relacionados a presença de proteínas na amostra, o ensaio de adição e recuperação foi realizado dopando a amostra com duas concentrações diferentes 0,5 e 0,7 g L⁻¹. Esta dopagem foi feita da seguinte maneira: foi pesada a massa de proteína necessária para se obter a concentração de dopagem desejada em 4 mL de amostra e depois a leitura foi realizada utilizando o fotômetro miniaturizado. A Tabela 4 exibe os resultados obtidos.

Tabela 4. Resultados obtidos no ensaio de adição e recuperação

Concentração dopada	Sinal
0,5	0,16
0,7	0,17

Fonte: O Autor

Para o cálculo da concentração basta seguir os passos do tópico anterior. Os resultados podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5. Fator de recuperação

Concentração dopada(g L ⁻¹)	Concentração obtida(g L ⁻¹)	Recuperação (%)
0,5	1,10	110
0,7	1,29	107,5

Fonte: O Autor

5.3. Características Analíticas

Após todos os estudos realizados foi possível obter os seguintes parâmetros que estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros obtidos

Parâmetros Analíticos	
Equação da Curva	$y = 0,05171 + 0,10306$
Limite de Detecção	0,033 g/L
Limite de Quantificação	0,1 g/L
Coeficiente de Variação	12,2%
Erro relativo	2,1%
Recuperação	107,5 e 110 %

Fonte: O Autor

6. CURVA ANALÍTICA CASEÍNA

Foi avaliado a aplicação do CBB para a quantificação de caseína, uma vez que é a proteína majoritária presente no leite, como mostra a Tabela 1. Os ensaios foram realizados com um padrão de α -caseína, que é caseína em maior concentração no leite, para preparar a curva de calibração entre 0 e 30 g L⁻¹, a massa de caseína foi adicionada a um balão de 100 mL e solubilizada utilizando uma solução de fosfato de cálcio dibásico, uma vez que a caseína é uma proteína fosfatada. Foi adicionado um volume que equivale a 88% da massa de α -caseína que será utilizada e o volume é completado até o menisco com água deionizada

O suporte utilizado para obtenção das imagens está representado na Figura 46. Além disso na Figura 47 é possível observar a imagem obtida de um dos pontos da curva de calibração

Figura 46. Suporte para obtenção das imagens utilizando smartphone.



Fonte: O Autor

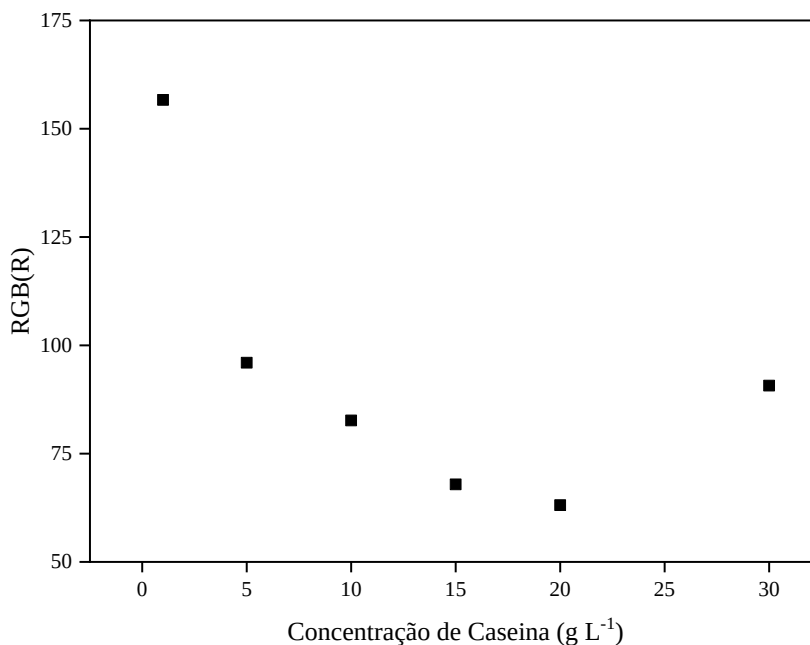
Figura 47. Imagem obtida para a concentração de 20 g L⁻¹.



Fonte: O Autor

Para trabalhar com a caseína foi necessário preparar o reagente CBB em uma concentração 4 vezes maior pois a condição utilizada para a albumina não proporcionou resultados reprodutíveis. A curva analítica obtida está representada na Figura 48.

Figura 48. Curva analítica obtida para a Caseína.



Fonte: O Autor

Para melhorar a curva obtida, a faixa linear foi limitada de 5 a 20 g L⁻¹ e além disso foi aplicado a Equação (4).

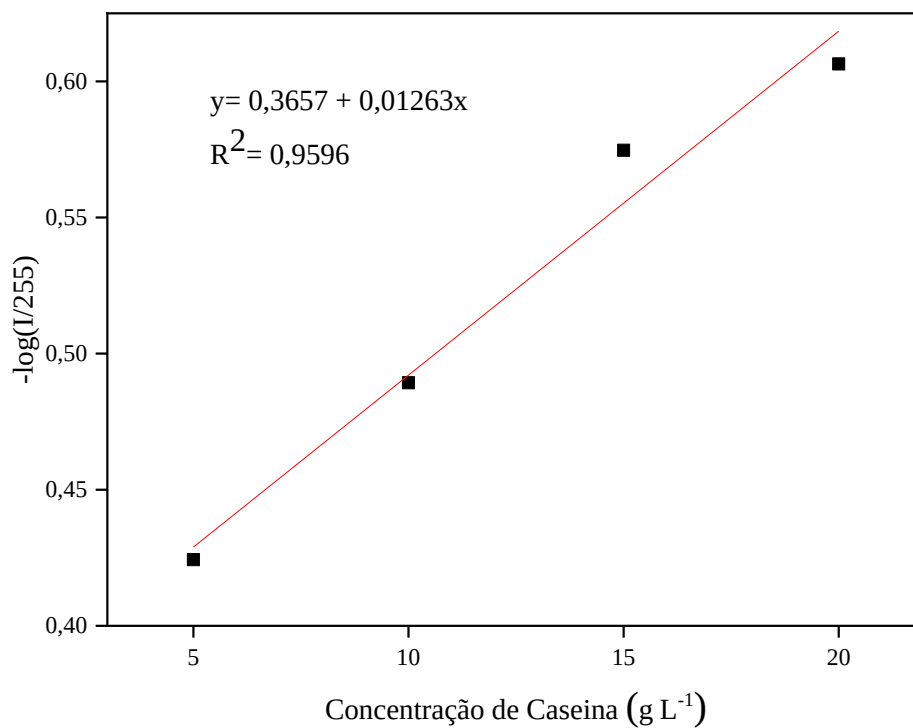
A curva representada na Figura 49 possui as correções citadas aplicadas e é expressa pela Equação (15) a seguir, com coeficiente de correlação linear $R^2 = 0,95966$.

$$y = 0,01263x + 0,36575 \quad (15)$$

Além da avaliação da curva utilizando smartphone, esse mesmo estudo foi realizado utilizando o fotômetro miniaturizado. A curva obtida está representada na Figura 50 e é expressa pela Equação (16) a seguir, com coeficiente de correlação linear $R^2 = 0,9992$. Para a caseína, o LED escolhido também foi o laranja.

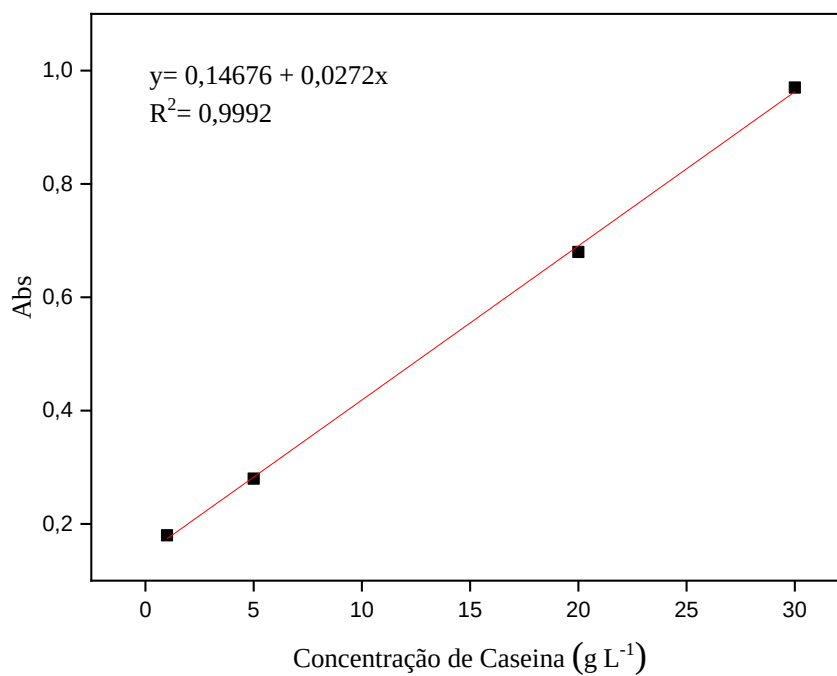
$$y = 0,0272x + 0,14676 \quad (16)$$

Figura 49. Curva analítica obtida para caseína após aplicação das correções citadas.



Fonte: O Autor

Figura 50. Curva Analítica Obtida aplicando o fotômetro miniaturizado



Fonte: O Autor

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Após a realização dos estudos é possível concluir que o método proposto é válido para quantificação de proteínas em whey protein. O presente trabalho tem como vantagem a utilização de pequenas quantidades de reagente, a possibilidade de realizar análises *in situ*, uma vez que o fotômetro portátil pode ser ligado a uma bateria de 9 volts ao invés de se utilizar uma fonte de tensão de bancada e além disso fica claro que a miniaturização e utilização de impressões 3D está se tornando uma peça fundamental para o desenvolvimento de trabalhos na área de instrumentação analítica, uma vez que possibilita o desenvolvimento de métodos de baixo custo e que permitem a realização de análises *in-situ*. Foi possível também, a aplicação da mesma reação em dispositivos de papel. No entanto, era necessário a realização da reação antes da adição no papel, o que não torna a estratégia muito atraente.

E a próxima etapa é aplicar o método proposto em um maior conjunto de amostras, e comparar com a metodologia padrão, além disso as otimizações para se trabalhar com a caseína serão realizadas, uma vez que é necessário realizar o estudo espectrofotométrico e avaliar as proporções para reação entre a caseína e o corante

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECHER, M. *et al.* Mobile security catching up? Revealing the nuts and bolts of the security of mobile devices. *Proceedings - IEEE Symposium on Security and Privacy*, n. November 2010, p. 96–111, 2011. <https://doi.org/10.1109/SP.2011.29>
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- BRASIL. Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método de Micro-Kjedahl. *Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS*, p. 2–9, 2013.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.044>
- CAPEL, A. J. *et al.* 3D printing for chemical, pharmaceutical and biological applications. *Nature Reviews Chemistry*, v. 2, n. 12, p. 422–436, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41570-018-0058-y>>. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0058-y>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009>
- CHOU, S. C.; GOLDSTEIN, A. Chromogenic groupings in the Lowry protein determination. *The Biochemical journal*, v. 75, n. 1927, p. 109–115, 1960. <https://doi.org/10.1042/bj0750109>
- DIXIT, C. K.; KADIMISETTY, K.; RUSLING, J. 3D-printed miniaturized fluidic tools in chemistry and biology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 106, p. 37–52, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.013>>. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.013>
- FERREIRA, P. M. *Instrumentação de Sensores de Imagem IR InGaAs P-I-N QWIP Em Modo de Corrente.* , 2008

GEORGIOU, C. D. *et al.* Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: A hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, n. 1, p. 391–403, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1996-x>

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of biological chemistry*, v. 177, n. 2, p. 751–66, fev. 1949. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18110453>>.

GRINTZALIS, K.; GEORGIOU, C. D.; SCHNEIDER, Y. J. An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination. *Analytical Biochemistry*, v. 480, p. 28–30, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.024>>.

GRUDPAN, K. *et al.* Applications of everyday IT and communications devices in modern analytical chemistry: A review. *Talanta*, v. 136, p. 84–94, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.042>>.

HARRINGTON, C. R. Lowry protein assay containing sodium dodecyl sulfate in microtiter plates for protein determinations on fractions from brain tissue. *Analytical Biochemistry*, v. 186, n. 2, p. 285–287, 1990. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90081-J](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90081-J)

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>>.

KIM, S.; KIM, K. C.; YEOM, E. Microfluidic method for measuring viscosity using images from smartphone. *Optics and Lasers in Engineering*, v. 104, n. March 2017, p. 237–243, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2017.05.016>>.

LAND, K. J. *Paper-based Diagnostics*. Cham: Springer International Publishing, 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-96870-4>>.

LEGLER, G. *et al.* On the chemical basis of the Lowry protein determination. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 2, p. 278–287, 1985. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90511-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90511-1)

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of*

biological chemistry, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>>.

MA, X. *et al.* 3D printed micro-scale force gauge arrays to improve human cardiac tissue maturation and enable high throughput drug testing. *Acta Biomaterialia*, v. 95, p. 319–327, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.026>>.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.026>

MIKKELSEN, S. R.; CORTÓN, E. *Bioanalytical Chemistry*. 2004.
<https://doi.org/10.1002/0471623628>

OOSTA, G. M.; MATHEWSON, N. S.; CATRAVAS, G. N. Optimization of Folin-Ciocalteu reagent concentration in an automated Lowry protein assay. *Analytical Biochemistry*, v. 89, n. 1, p. 31–34, 1978. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90723-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90723-6)

OWEN R. FENNEMA. *Owen R. Fennema - Food Chemistry (Food Science and Technology)*. 1996. v. 3.

PASSARETTI FILHO, J.; DA SILVEIRA PETRUCI, J. F.; CARDOSO, A. A. Development of a simple method for determination of NO₂ in air using digital scanner images. *Talanta*, v. 140, n. 2, p. 73–80, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.009>>.

PLATT, C.; JANSSON, F. *Encyclopedia of Electronic Components Volume 3 Sensors*. 2013a. v. 3.

PLATT, C.; JANSSON, F. *Encyclopedia of Eletronic Components Volume 2 LEDs, LCDs, Audio, Thyristors, Digital Logic, Amplification*. 2013b. v. 2.

REBELLO, J. M. A. O Mundo das Imagens Digitais. *Matéria*, v. 8, n. 2, p. 167–186, 2003.

SCHABEL, S.; BIESALSKI, M. The Role of Paper Chemistry and Paper Manufacture in the Design of Paper-Based Diagnostics. *Paper-based Diagnostics*. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 23–46. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-96870-4_2>.

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. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00512>

SHIDELER, C. E. *et al.* Automated multiple flow-injection analysis in clinical chemistry: determination of total protein with Biuret reagent. *Clinical chemistry*, v. 26, n. 10, p. 1454–8, set. 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7408173>>.

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>>.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

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>>.

TEIXEIRA, M. B. D. *et al.* The Paper: A brief historical review, a description of the industrial production technology and experiments for preparation of handmade sheets. *Revista Virtual de Quimica*, v. 9, n. 3, p. 1364–1380, 2017. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170079>

VOET, DONALD VOET, J. *Biochemistry (4th edition)*. [S.l: s.n.], 2010. v. 4. Disponível em: <<https://www.wiley.com/en-us/Biochemistry%2C+4th+Edition-p-9780470570951>>.

WU, H. A New Colorimetric Method For Determination of Plasma Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 51, p. 33–39, nov. 1922.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 787–793, nov. 1998. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421998000600020&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000600020>