



Instituto de Química

Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em

Química Tecnológica

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA
AUTOMATIZADO MULTICANAL PARA DETERMINAÇÕES
QUILUMINOMÉTRICAS CONTROLADO POR SMARTPHONE**

Aluno: Guilherme José de Paula Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília – DF

2023



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Guilherme José de Paula Gonçalves

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA
AUTOMATIZADO MULTICANAL PARA DETERMINAÇÕES
QUIMILUMINOMÉTRICAS CONTROLADO POR SMARTPHONE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade de Brasília, como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel em Química
Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília – DF

2023

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA AUTOMATIZADO
MULTICANAL PARA DETERMINAÇÕES QUIMILUMINOMÉTRICAS CONTROLADO POR
SMARTPHONE**

Professor orientador: Dr. Alexandre Fonseca

Membro Titular (IQ/UnB): Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

Membro Titular (IQ/UnB): Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Membro Suplente (IQ/UnB): Prof.^a Dr.^a Ana Cristi Basile Dias

Brasília, julho de 2023

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento e a avaliação de um instrumento para análises por quimiluminescência que permite medidas simultâneas baseadas em imagens digitais em sete mini reatores independentes. Para a prototipagem dos componentes estruturais e dos reatores, empregou-se a impressão 3D com filamento de ácido polilático (PLA) e para a adição precisa do reagente luminescente, fabricou-se uma bomba multicanal, que comporta 7 seringas de 3,0 mL, com acionamento via *Bluetooth* por um smartphone. A obtenção do sinal analítico deu-se por meio de um aplicativo, desenvolvido no laboratório, que é capaz de produzir respostas quantitativas através da leitura de uma imagem em tempo real e das cores captadas pela câmera do celular. Para comprovar a eficiência do dispositivo proposto, foram realizadas medidas com o objetivo de quantificar ácido ascórbico em suplementos. Essa determinação, realizada indiretamente, é baseada na reação de excesso de hipoclorito com o ácido ascórbico, para que então o remanescente de hipoclorito promova a oxidação do luminol gerando assim a quimiluminescência (inversamente proporcional à concentração de ácido ascórbico). Os resultados obtidos através desse procedimento proporcionaram uma resposta linear ($R^2=0,9996$) na faixa de 10 a 40 mgL^{-1} , com um limite de detecção de 5,8 mgL^{-1} (IUPAC) e um limite de quantificação de 10 mgL^{-1} (menor concentração da curva). Os resultados obtidos pelo método proposto não diferiram significativamente dos resultados encontrados por titulação coulométrica ao nível de 95% de confiança, indicando uma exatidão adequada do método. Adicionalmente, uma precisão de 4,53% foi observada para 6 medidas de uma solução padrão com 30 mgL^{-1} em ácido ascórbico. O dispositivo apresentou potencial de aplicabilidade para a determinação de vitamina C e poderá ser avaliado para outras determinações analíticas. De modo geral, o instrumento é simples, permite medidas rápidas e apresenta um baixo custo, de aproximadamente U\$ 180,00.

Palavras-chave: Quimiluminescência. Imagens digitais. Impressão 3D.

ABSTRACT

The present work describes the development and evaluation of an instrument for chemiluminescence analysis that allows simultaneous measurements based on digital images in seven independent mini reactors. For prototyping the structural components and reactors, 3D printing with polylactic acid (PLA) filament was used and for the precise addition of the luminescent reagent, a multichannel pump was manufactured, which holds 7 syringes of 3.0 mL, with activation via Bluetooth by a smartphone. The analytical signal was obtained through an application, developed in the laboratory, which can produce quantitative responses by reading an image in real time and the colors captured by the cell phone camera. To prove the efficiency of the proposed device, measurements were taken with the aim of quantifying ascorbic acid in supplements. This determination, carried out indirectly, is based on the reaction of excess hypochlorite with ascorbic acid, so that the remaining hypochlorite promotes luminol oxidation, thus generating chemiluminescence (inversely proportional to the concentration of ascorbic acid). The results obtained through this procedure provided a linear response ($R^2=0.9996$) in the range of 10 to 40 mgL^{-1} , with a detection limit of 5.8 mgL^{-1} (IUPAC) and a quantification limit of 10 mgL^{-1} (lowest concentration on the curve). The results obtained by the proposed method did not differ significantly from the results found by coulometric titration at the 95% confidence level, indicating adequate accuracy of the method. Additionally, an accuracy of 4.53% was observed for 6 measurements of a standard solution with 30 mgL^{-1} in ascorbic acid. The device showed potential applicability for the determination of vitamin C and may be evaluated for other analytical determinations. In general, the instrument is simple, allows quick measurements and has a low cost of approximately U\$ 180,00.

Keywords: Chemiluminescence. Digital images. 3D printing.

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivos gerais	10
2.2	Objetivos Específicos	10
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
3.1	Quimiluminescência	11
3.2	Imagens digitais	13
3.3	Impressão 3D.....	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	Aparatos.....	17
4.2	Construção do Instrumento	17
4.2.1	Estruturas em PLA.....	17
4.2.1.1	Plataforma com zonas de reação.....	19
4.2.1.2	Cabine de leitura.....	20
4.2.1.3	Alinhador dos tubos para adição do reagente	20
4.2.1.4	Suportes para seringa.....	21
4.2.2	Composição eletromecânica	22
4.2.3	Instrumento completo	24
4.3	Aplicativo para controle do instrumento	25
4.4	Prova de conceito - Determinação Indireta de Ácido Ascórbico em suplementos.	26
4.4.1	Reagentes e Soluções.....	27
4.4.2	Preparo da amostra	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Otimização preliminar de algumas variáveis para a realização das medidas	30
5.2	Desempenho analítico – Determinação de ácido ascórbico em suplementos.....	34
5.3	Características gerais do instrumento proposto	38
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	39
7	REFERÊNCIAS	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das estruturas impressas com PLA	18
Tabela 2 - Configuração dos parâmetros da câmera	25
Tabela 3 - Volumes adicionados das soluções estoque de reagente em balão volumétrico de 25mL para a preparação dos padrões de ácido ascórbico.....	28
Tabela 4 – Dados obtidos para a calibração do instrumento	36
Tabela 5 - Teores de ácido ascórbico determinados nas amostras comerciais e valores descritos no rótulo	37
Tabela 6 - Resultados obtidos pelo método proposto e pelo método de referência	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Quimiluminescência (a) direta e (b) indireta.....	11
Figura 2 - Mecanismo reacional utilizado para quimiluminescência conforme proposto por Kricka.....	12
Figura 3 - Mecanismo de quimiluminescência do luminol.....	12
Figura 4 - Cubo RGB.....	14
Figura 5 - Estruturas fabricadas para construção do instrumento.....	18
Figura 6 - Plataforma de reação.....	19
Figura 7 - Cabine de leitura.....	20
Figura 8 - Montagem dos tubos.....	21
Figura 9 - Suporte para sete seringas.....	21
Figura 10 - Componentes eletrônicos.....	22
Figura 11 - Montagem da parte eletromecânica.....	24
Figura 12 - Equipamento completo	24
Figura 13 - Aplicativo de celular.....	26
Figura 14 - Reação de oxidação do ácido ascórbico.....	26
Figura 15 - Reação de quimiluminescência do luminol.....	27
Figura 16 - Tubos de polipropileno responsáveis pela sucção do reagente.....	29
Figura 17 - Inserção da plataforma de aplicação na cabine de leitura.....	29
Figura 18 - Sinal obtido para análise de apenas 4 spots intercalados.....	32
Figura 19 - Sinal obtido para apenas 4 reatores intercalados com novo ajuste de câmera.....	33
Figura 20 - Registro dos sinais referentes à componente B de RGB para soluções do branco (hipoclorito a 0,006 %) realizados nas sete zonas de reação de uma mesma plataforma.....	33
Figura 21 - Registro dos sinais referentes à componente B de RGB para seis soluções com diferentes concentrações de ácido ascórbico.....	34
Figura 22 - Curva analítica para a determinação de ácido ascórbico na faixa de 10 mgL ⁻¹ à 40 mgL ⁻¹ empregando-se seis medidas para cada concentração.....	35

1 INTRODUÇÃO

A quimiluminescência é um fenômeno químico que envolve a liberação de luz como resultado de uma reação química, isso ocorre quando elétrons excitados de uma molécula ou de um íon retornam ao estado fundamental, emitindo fótons. Essa técnica é frequentemente utilizada em aplicações analíticas, como na quantificação materiais biológicos (DNA, RNA, proteínas) e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, obtendo-se alto grau de sensibilidade, por se tratar de uma técnica de campo escuro. (TZANI et al., 2021)

Os equipamentos comerciais responsáveis por realizar essas análises podem apresentar custo elevado de aquisição, uma vez que devem proporcionar alta precisão na mistura dos reagentes e permitir a leitura do sinal em pequenos intervalos de tempo (menores que 1,0 s), já que a reação em questão ocorre quase que instantaneamente e com pequena duração da emissão. Além disso, o nicho específico dessa técnica, notoriamente direcionada para análises clínicas, é um ponto relevante, em que a alta capacidade de processamento das amostras são necessários para aplicação em análises de rotina, ou seja, são equipamentos robustos, capazes de receber uma amostra bruta e, após algumas etapas, fornecer o resultado requisitado.

Sabe-se que esses instrumentos geralmente funcionam a partir da mistura de reagentes em um sistema reacional para a promoção da quimiluminescência, em que se tem apenas um detector, usualmente uma fotomultiplicadora. Assim, essa metodologia permite apenas leituras sequenciais, ou seja, o equipamento realiza as análises unitárias, primeiramente, analisa os padrões para calibração, para então analisar a amostra. (Créton R, Jaffe LF et al., 2001). Desse modo, equipamentos comerciais de análise por quimiluminescência dificilmente são utilizados para determinações que saem do escopo de análises clínicas. Como alternativa para contornar o custo elevado, sistemas mais simples são desenvolvidos com o uso de imagens digitais, particularmente com um smartphone, no qual tem-se a combinação da conectividade e a capacidade de capturar imagens com poder computacional. (CAPITÁN-VALLVEY et al., 2015)

De fato, imagens digitais e impressão 3D estão facilitando a construção de instrumentos no próprio laboratório, com adequada eficiência analítica. Em particular, a impressão 3D ganhou atenção especial dos químicos analíticos devido a vantagens como: baixo custo de fabricação, economia de tempo, e flexibilidade de materiais e de técnicas. Já o uso de imagens digitais tem facilitado as análises colorimétricas e diminuído a subjetividade da técnica, uma vez que aplicativos específicos podem ser utilizados em smartphones para se obter valores mensuráveis de cor de maneira simples e rápida, mesmo por usuários pouco treinados.

Considerando esses aspectos, o presente trabalho buscou utilizar essas novas ferramentas para o desenvolvimento de um luminômetro de baixo custo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O trabalho em questão apresenta como objetivo principal a construção e a avaliação de um sistema analítico automatizado e multicanal para a determinação quimiluminométrica de espécies, utilizando imagens digitais em tempo real como estratégia de detecção.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir e avaliar um equipamento de baixo custo, empregando as técnicas de modelagem e de impressão 3D com PLA;
- Montar um sistema eletromecânico controlado por smartphone para adição simultânea de reagentes a sete reatores;
- Desenvolver e avaliar um aplicativo para controle do instrumento e para captação de imagens digitais do arranjo com reatores realizando a detecção dos sinais obtidos com o sistema RGB;
- Avaliar o sistema proposto na determinação de Vitamina C em suplementos vitamínicos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Quimiluminescência

Luminescência é um termo usado para descrever a emissão de luz, que ocorre quando os elétrons excitados de uma molécula decaem para seu estado fundamental. Os vários tipos de luminescência como fluorescência, fosforescência e quimiluminescência, diferem da fonte de energia para obter o estado excitado, sendo que, no caso da quimiluminescência, a energia é produzida a partir de uma reação química. (DODEIGNE; THUNUS; LEJEUNE, 2000)

Conforme ilustra a Figura 1, a quimiluminescência pode ocorrer por meio de um processo direto, no qual a espécie excitada formada na reação química emite radiação luminescente ao retornar ao estado fundamental, caso contrário pode ocorrer a transferência de energia do estado excitado formado para uma molécula aceptora apropriada, resultando na emissão indireta de quimiluminescência. (Baader et al., 2001)

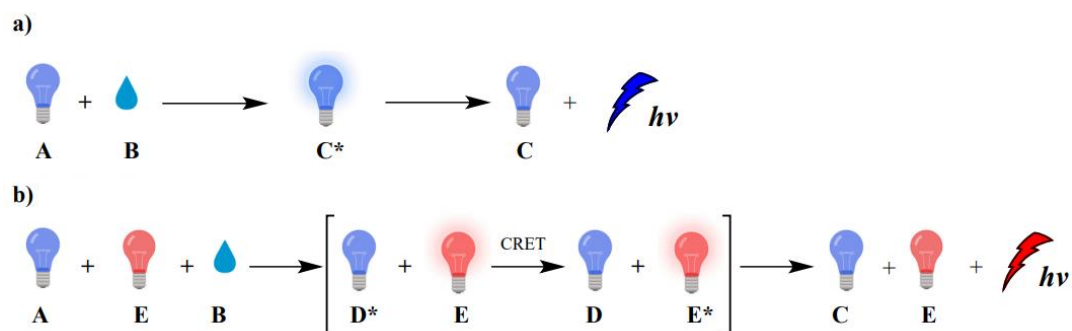


Figura 1 – Quimiluminescência (a) direta e (b) indireta. CRET - transferência de energia quimiluminescente

Fonte: Tzani et al., 2021

As reações que resultam em quimiluminescência não são muito comuns, já que a maioria das reações químicas liberam energia na forma de calor, através do relaxamento vibracional dos produtos ao seu estado fundamental. Para ocorrer a quimiluminescência, a energia dos fótons na faixa visível do espectro eletromagnético (entre 400 - 560nm) deve estar entre 44 e 71 kcalmol⁻¹, o que significa que a reação deve produzir pelo menos 44 kcalmol⁻¹ de energia. Normalmente, mudanças de energia livre dessa magnitude são encontradas em reações de oxidação, e, portanto, a maioria dessas reações foram

descobertas em reações de oxidação envolvendo oxigênio, peróxido ou outro oxidante forte. As reações quimiluminescentes de oxidação do luminol, representadas de maneira geral na Figura 2, foram descobertas por Albrecht em 1928. Esse reagente, muito utilizado para diferentes aplicações analíticas apresenta reações com uma variedade de oxidantes, incluindo oxigênio, hipoclorito, iodo, permanganato, peróxido e perborato. (KRICKA; THORPE, 1983)

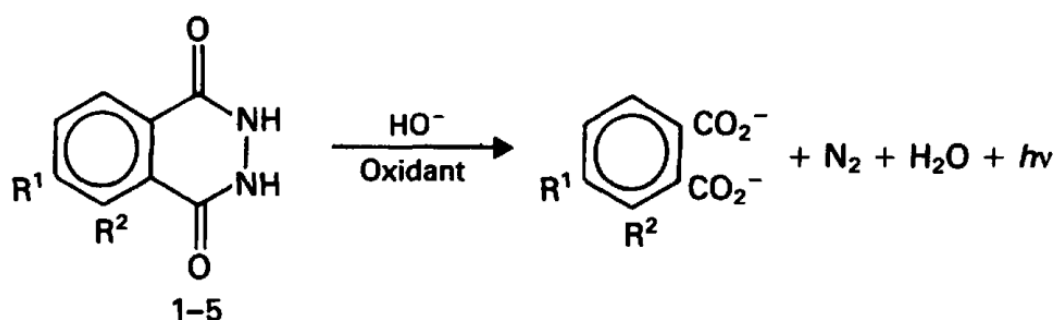


Figura 2 - Mecanismo reacional utilizado para quimiluminescência conforme proposto por Kricka

Fonte: KRICKA; THORPE, 1983

Na quimiluminescência, a emissão de fótons é dada pela quimiexcitação de uma molécula, podendo gerar um intermediário excitado que relaxa radioativamente. De acordo com a Figura 3, a luminescência do luminol ocorre após um cruzamento intersistema reverso (rISC), do produto da oxidação da molécula.



Figura 3 – Mecanismo de quimiluminescência do luminol

Fonte:(TZANI et al., 2021)

Vale destacar que alguns fatores como temperatura, pH e velocidade da reação influenciam diretamente no mecanismo de emissão, podendo até mesmo suprimir a luminescência. Para a reação de quimiluminescência do luminol, o comprimento de onda observado depende diretamente do pH (usualmente deve ser básico) e do solvente

empregado, por exemplo: em água a emissão ocorre na faixa de 430 nm, enquanto em acetonitrila na faixa de 500 nm. (FERREIRA; ROSSI, 2003)

Ferreira (2003) cita diferentes aplicações analíticas do luminol para uma diversidade de analitos orgânicos e inorgânicos, como determinação de Co(III) em farinha de arroz, de paracetamol em medicamentos, de sacarose em alimentos. As aplicações são divididas quanto a participação do luminol na reação química, podendo ser direta, quando o analito participa da reação de quimiluminescência, ou indireta, quando o analito consome ou gera espécies que participam da reação com o luminol.

A simplicidade da instrumentação é uma característica notável da quimiluminescência para fins analíticos. Diferentemente de outros métodos, não é necessária uma fonte externa para excitar a molécula, portanto, o instrumento pode ser composto basicamente por um frasco reacional e por um tubo fotomultiplicador (o detector). Além disso, geralmente não é preciso um dispositivo de seleção de comprimento de onda, uma vez que a reação química é a única fonte de radiação. A maioria das aplicações analíticas de quimiluminescência simplesmente requer a medição do pico de intensidade de luz ou da área sob o registro de emissão de luz no tempo. Conhecida pela alta sensibilidade, os limites de detecção típicos estão na faixa de partes por milhão a partes por bilhão ou menores, o que a torna muito útil em diversas aplicações. (KRICKA; THORPE, 1983)

Em geral, a quimiluminescência é uma técnica poderosa e versátil, utilizada em diversas áreas de pesquisa, ela oferece alta sensibilidade e seletividade nas aplicações, e por isso, esforços são desempenhados para otimizar sistemas convencionais e desenvolver novos sistemas, propondo atender as necessidades do mercado. (FERREIRA; ROSSI, 2003)

3.2 Imagens digitais

Uma imagem digital é uma representação eletrônica de uma cena, formada por um conjunto de pixels, que são pontos individuais que armazenam informações sobre a cor e a intensidade da luz em um determinado local da imagem. O sistema de cores RGB, muito utilizado na codificação de cores nas imagens digitais, é baseado nas cores primárias de luz, vermelha (R), verde (G) e azul (B), que podem ser combinadas em várias proporções para criar uma ampla gama de cores. Cada pixel em uma imagem digital é composto por três valores de cor, correspondentes à intensidade da luz vermelha, verde e azul, respectivamente. Os valores são compostos de 3 vetores (RED; GREEN; BLUE), podendo

variar de 0 a 255, sendo 0 correspondente à ausência da cor e 255 à cor mais intensa. A Figura 4 denota um cubo com esses 3 vetores, no qual observa-se que para a coordenada (0,0,255) tem-se a cor azul; para (0,255,0) tem-se o verde e para (255,0,0) tem-se o vermelho. Já as cores branca e preta são determinadas pelos vetores (255, 255, 255) e (0, 0, 0), respectivamente. (Gonzalez & Woods, 2017)

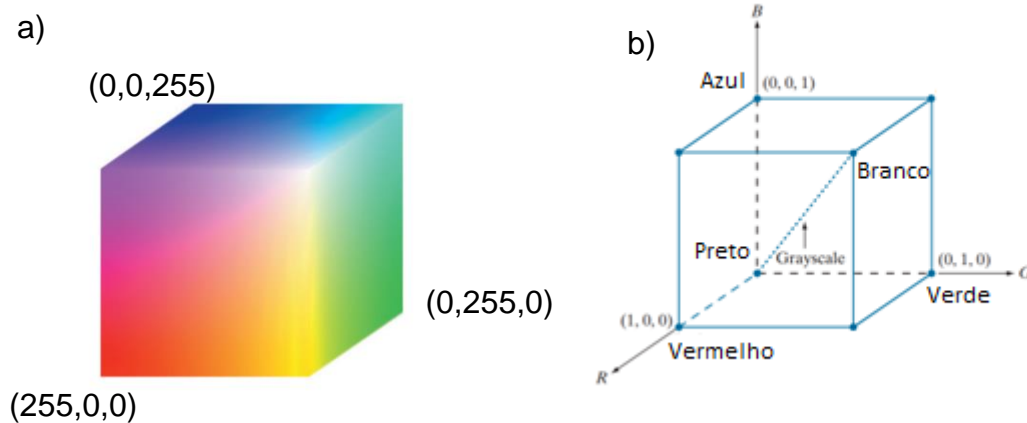


Figura 4 – Cubo RGB. **a.** Distribuição das cores. **b.** Vetores do sistema RGB

Fonte: Gonzalez & Woods, 2017 (Modificado)

Para criar uma imagem digital, é necessário capturar uma imagem original usando um dispositivo como uma câmera digital, scanner ou sensor de imagem, que convertem uma imagem em sinais eletrônicos que podem ser armazenados em um computador ou dispositivo de armazenamento. Uma vez armazenada digitalmente, ela pode ser processada usando software de edição de imagem, para ajustar a cor, brilho e contraste, bem como para adicionar efeitos especiais ou remover defeitos.

O sistema de cores RGB tem sido utilizado na quantificação analítica de substâncias por meio do processamento digital de imagens. Com o auxílio de softwares específicos, é possível extrair informações colorimétricas selecionando áreas de interesse em uma imagem e relacionar a intensidade de cor dessa área com a concentração do analito em uma amostra. Utilizada em muitos métodos, a imagem digital pode desempenhar o papel de sensores convencionais em algumas aplicações cuja relação cor/analito possa ser diagnosticada por meio do processamento dos dados RGB, contribuindo para a construção de instrumentos de baixo custo.(CAPITÁN-VALLVEY et al., 2015)

Em Kumar (2020), utilizou-se imagens digitais para determinação de Cu^{2+} em cachaça por meio de um *smartphone*, em que o sinal analítico foi dado por um indicador de cobre((8-metoxi-1,3',3'-trimetilespiro[cromeno-2,2'indolina])), que exibe mudança na coloração de incolor para rosa. Uma visualização e quantificação ELISA (imunoensaio) colorimétrica foi descrita em Ogirala (2017) para determinar os perfis de hormônio esteroide reprodutivo feminino usando as propriedades de absorção e transmissão de luz dos compostos químicos que compõem o ensaio hormonal por imagens digitais com *smartphone*.

3.3 Impressão 3D

Denominada como manufatura aditiva, a impressão 3D é uma técnica para prototipagem rápida, com baixo consumo de energia, que pode ser utilizada em vários setores da indústria e que tem ganho muito espaço na chamada cultura Maker. Caracterizada pela versatilidade e adaptabilidade, essa manufatura aditiva dispensa ferramentas de molde, uma vez que a construção de um modelo se dá pela deposição de material por camadas, o que reduz drasticamente o tempo e os custos de produção, notadamente para escalas menores.

Dentre as técnicas de impressão 3D, a baseada na deposição de filamento fundido (*FDM - Fused Deposition Modeling*) é a mais popular para a produção de estruturas pequenas por usuários em geral. Essa técnica consiste na deposição do material camada a camada por meio da fundição do material, disponível com grande variedade de propriedades e de cores, que se adere à mesa de construção. (AGRAWAAL; THOMPSON, 2021).

Após o desenvolvimento digital do objeto 3D, ele é processado por um software que permite ao usuário configurar os parâmetros da impressão a depender do material e da aplicação, ao final um arquivo é gerado e enviado para impressora que começa a confecção. Alguns cuidados são necessários para segurança do usuário e para evitar contratempos durante a impressão, o bico da extrusora apresenta elevadas temperaturas, a exemplo do PLA, a temperatura é de 185°C. Além do mais, o usuário deve-se atentar à limpeza da mesa de construção para evitar problemas de má aderência das camadas iniciais.

Bogucki (2019) e Choobbari (2020) utilizam a impressão 3D para produção dos componentes e das peças (*hardware*) de sistemas analíticos, mostrando um contraponto interessante em relação a manufatura subtrativa convencional (fresagem, retificação), em que o plano digital da construção dos objetos permite o compartilhamento do projeto para qualquer indivíduo no mundo, que pode reproduzir os projetos mesmo sem ter acesso a unidades de usinagem.

Não obstante, com avanço dos estudos e da tecnologia nessa área, a manufatura aditiva tem demonstrado potencial para aplicações diretas nas técnicas de análise química. Nawada (2017) e colaboradores utilizaram a impressão 3D para criar leitos porosos ordenados com formas geométricas diferentes para aplicação em cromatografia. Em Rohaizad (2019) a impressão foi utilizada para fabricar um pseudo-eletrodo de referência Ag/AgCl com filamento de grafeno/PLA, o processo de construção contou com eletrodeposição de prata na superfície do material, com posterior branqueamento para formação de AgCl(s) na superfície do eletrodo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aparatos

Para a fabricação das estruturas por impressão 3D empregou-se uma impressora da marca Biqu modelo B1 (Biqu, 2023) e filamentos de PLA (diâmetro 1.75mm) nas cores preta e branca da marca Voolt3D.

Para o preparo de soluções tampão e ajustes de pH das soluções de trabalho, utilizou-se um pHmetro da marca Hanna modelo HI2221. Titulações coulométricas de vitamina C com geração *in situ* de iodo foram realizadas em um instrumento lab-made com eletrodos de platina. (FELIPE, 2022)

Um celular Galaxy J5 pro equipado com uma câmera de 13 megapixels (resolução de 4128 x 3096 pixels); com memória de 32 GB foi utilizado para controle do instrumento e aquisição das imagens digitais.

4.2 Construção do Instrumento

4.2.1 Estruturas em PLA

As peças do equipamento foram modeladas em ambiente 3D com auxílio de um programa (*open source*) denominado Blender (Blender, 2023), e confeccionadas na impressora 3D, utilizando filamento de PLA nas cores preto e branco. A Figura 5 mostra uma ilustração com as 12 peças que compõem o equipamento e a Tabela 1 traz uma breve descrição das peças.

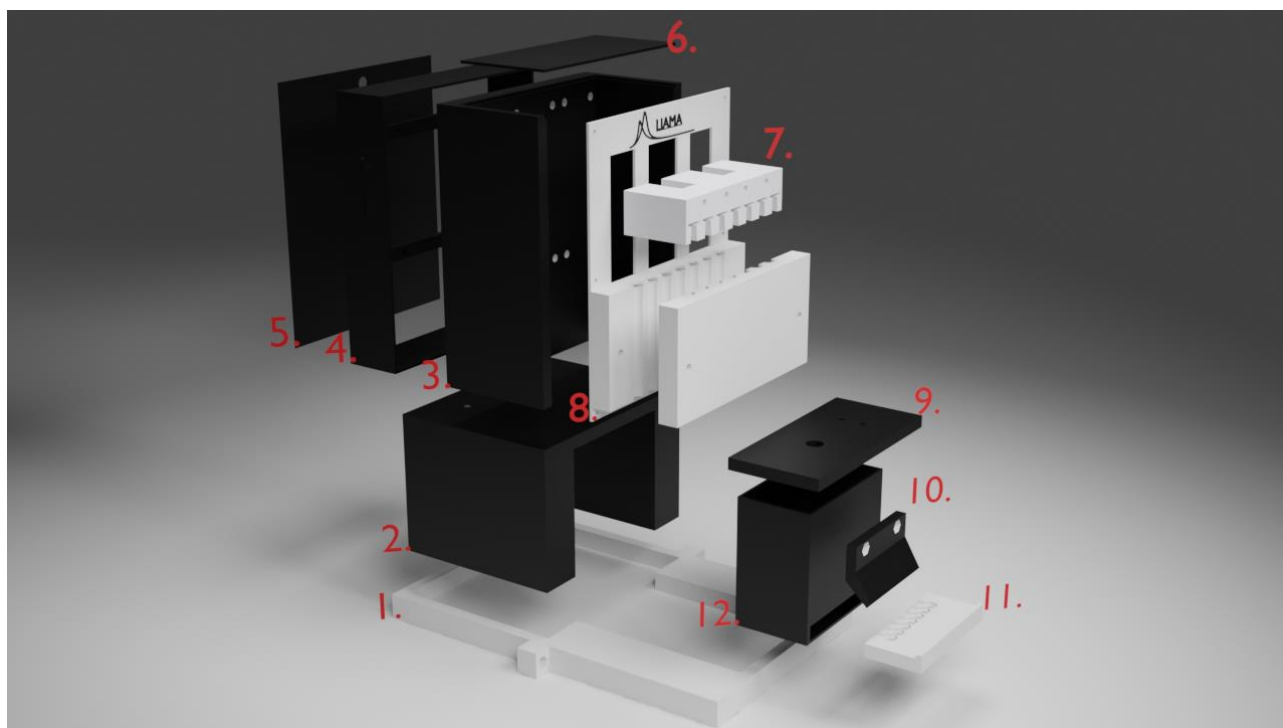


Figura 5- Estruturas fabricadas para construção do instrumento

Tabela 2 - Descrição das estruturas impressas com PLA

Número da peça	Descrição
1	Apoio
2	Base inferior
3	Base para fixação do eixo z ligado ao motor
4	Compartimento para componentes eletrônicos
5	Tampa traseira
6	Tampa superior
7	Suporte móvel para os êmbolos
8	Suporte fixo para o corpo das seringas
9	Suporte para apoio do celular
10	Alinhador dos tubos de saída das seringas (fixado dentro da cabine 12.)
11	Plataforma de aplicação com zonas de detecção
12	Cabine de leitura

A maioria das peças foram impressas na cor preta, principalmente a cabine de leitura, onde ocorre a reação, para garantir um ambiente escuro e conseqüentemente, mitigar interferências da luz externa no momento da análise. No entanto, para a plataforma com os reatores, utilizou-se cor branca, de modo a diminuir a absorção da radiação quimiluminescente pelo material.

4.2.1.1 Plataforma com zonas de reação

Conforme ilustrado na Figura 6, fabricou-se uma plataforma com 95 mm x 42 mm x 13 mm contendo 7 zonas de reação dispostas paralelamente, nas quais se desenvolvem as reações de quimiluminescência. A função básica desse dispositivo é receber pequenos volumes de amostra e reagentes, e delimitar o espaço de emissão da radiação para a aquisição do sinal mediante a câmera do celular. Nessa configuração é possível realizar até 7 medidas individuais, permitindo a obtenção de sinais para soluções padrão, e para a solução da amostra, o que possibilita a calibração do instrumento e a determinação analítica em uma única corrida.

Primeiramente, essa peça foi desenvolvida inteiramente em PLA, em que os reagentes estavam diretamente em contato com o material, porém, com decorrer do estudo, foi observado que esse dispositivo apresentava imperfeições, decorrentes da deposição do filamento, que promoviam variações indesejáveis no sinal analítico, afetando a precisão e a exatidão das medidas. Em outras palavras, com o uso contínuo do aparato, observou-se que os reagentes permeavam o material, gerando erros nas leituras. Para contornar esse problema, utilizou-se um modelo semelhante, em que batoques plásticos (Figura 6B) foram adaptados nas cavidades de PLA, eliminando o contato das soluções com o material poroso. Desse modo, as zonas de reação, definidas pelos batoques, apresentaram um diâmetro interno de 8 mm com capacidade para 150 μ L de solução.

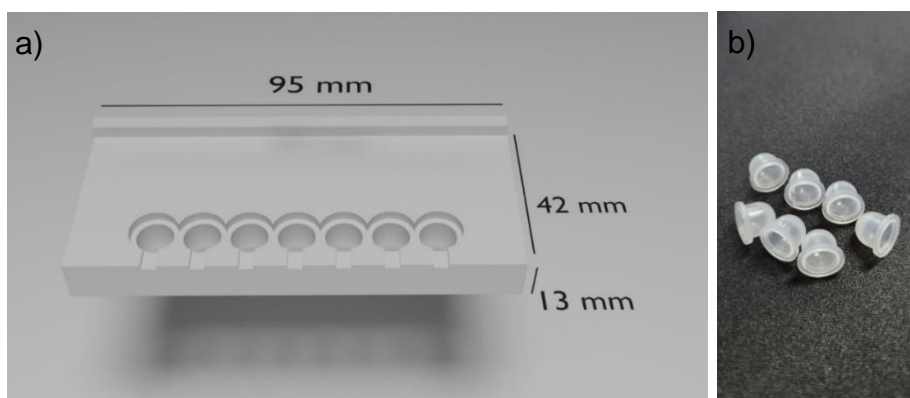


Figura 6 - Plataforma de reação **a.** Dimensões. **b.** Batoques com 8 mm de diâmetro interno.

4.2.1.2 Cabine de leitura

Responsável por promover um ambiente adequado para a reação de quimiluminescência, a cabine de leitura foi impressa na cor preta, para minimizar a entrada de luz ambiente no momento da análise. O suporte para a fixação do celular é encaixado diretamente acima da cabine e a plataforma com as zonas de reação é inserida em uma abertura inferior da cabine, de forma semelhante à uma gaveta, como ilustra a Figura 7.

É importante relatar que o suporte para o celular apresenta uma abertura circular com 12 mm de diâmetro, a qual é utilizada para o posicionamento correto da câmera. Além disso, a distância entre a câmera do celular e a plataforma com as zonas de reação é de 118 mm, o que permite a obtenção de um foco adequado para a imagem com todos os sete reatores.

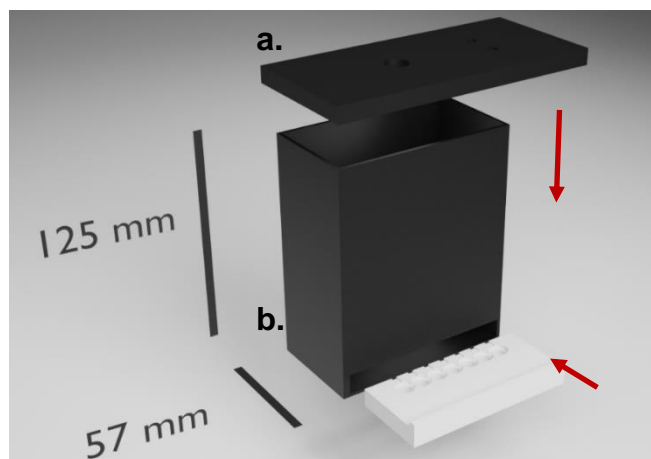


Figura 7 - Cabine de leitura. a. Suporte para celular. b. Plataforma com zonas de reação.

4.2.1.3 Alinhador dos tubos para adição do reagente

Essa peça foi instalada no interior da cabine de leitura para um melhor alinhamento dos tubos de saída de reagente (conectados às seringas) com as zonas de reação da plataforma. A Figura 8A mostra a sua fixação no interior da cabine com o auxílio de parafusos e porcas, enquanto a Figura 8B mostra um conjunto com sete tubos de polipropileno com diâmetro interno de 3 mm, os quais perpassam o alinhador e são conectados aos tubos de saída das seringas. Por fim, como mostra a Figura 8C as

extremidades dos tubos de polipropileno ficam bem alinhadas com as zonas de reação, sem que haja obstrução visual destas últimas para permitir as leituras por imagens digitais.

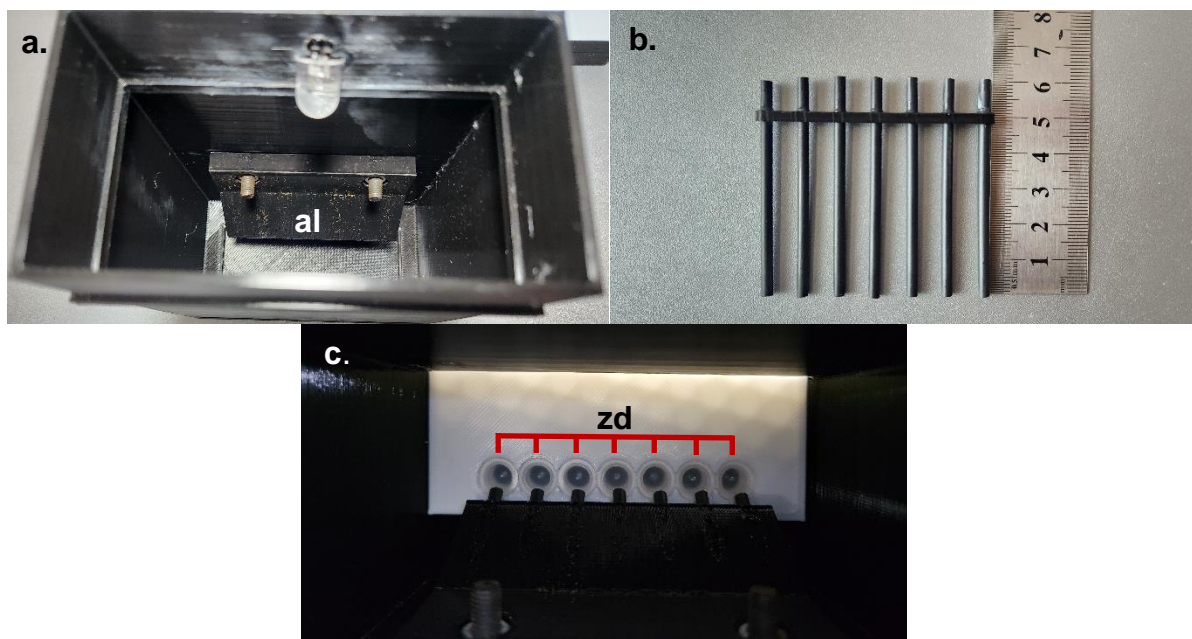


Figura 8 - Montagem dos tubos **a.** Visão interna da cabine de leitura com a fixação do alinhador. **b.** Tubos de polipropileno. **c.** Introdução dos tubos no direcionador, alinhados com a plataforma.
al - alinhador; zd - zonas de detecção

4.2.1.4 Suportes para seringa

Responsável pela mobilidade dos êmbolos e pela fixação do corpo das seringas, (itens 7 e 8 da Figura 5) os suportes foram projetados para comportar sete seringas de 3 mL (Figura 9). A conexão da peça de número 7 com o mecanismo eletromecânico do instrumento, que realiza movimentos no eixo z será descrito na próxima seção.

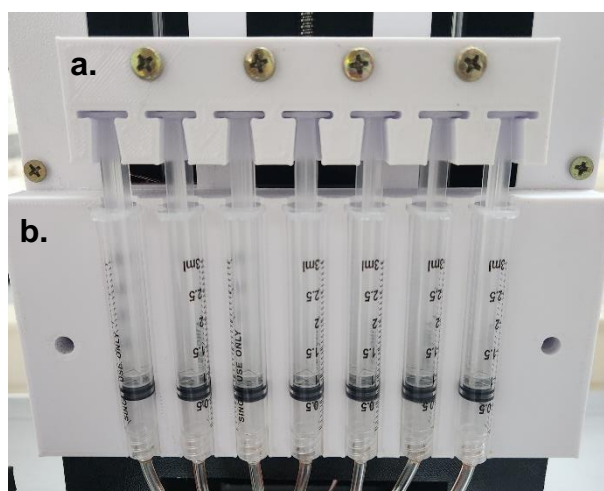


Figura 9 – Suporte para sete seringas. **a.** Suporte dos êmbolos. **b.** Suporte do corpo da seringa.

4.2.2 Composição eletromecânica

O controle das seringas foi realizado de maneira remota por meio de um smartphone, empregando-se comunicação *bluetooth* com um microcontrolador Arduino UNO. Para isso, um motor de passos da família NEMA 17; um driver para motores TB6600; uma fonte de energia de 12V (c/c); um módulo *bluetooth HC-05*, duas chaves de fim de curso e um kit eixo z com fuso de 2,0 mm e guias lineares com *pillow blocks* foram utilizados no projeto. A Figura 10 mostra fotografias destes componentes de forma individual.

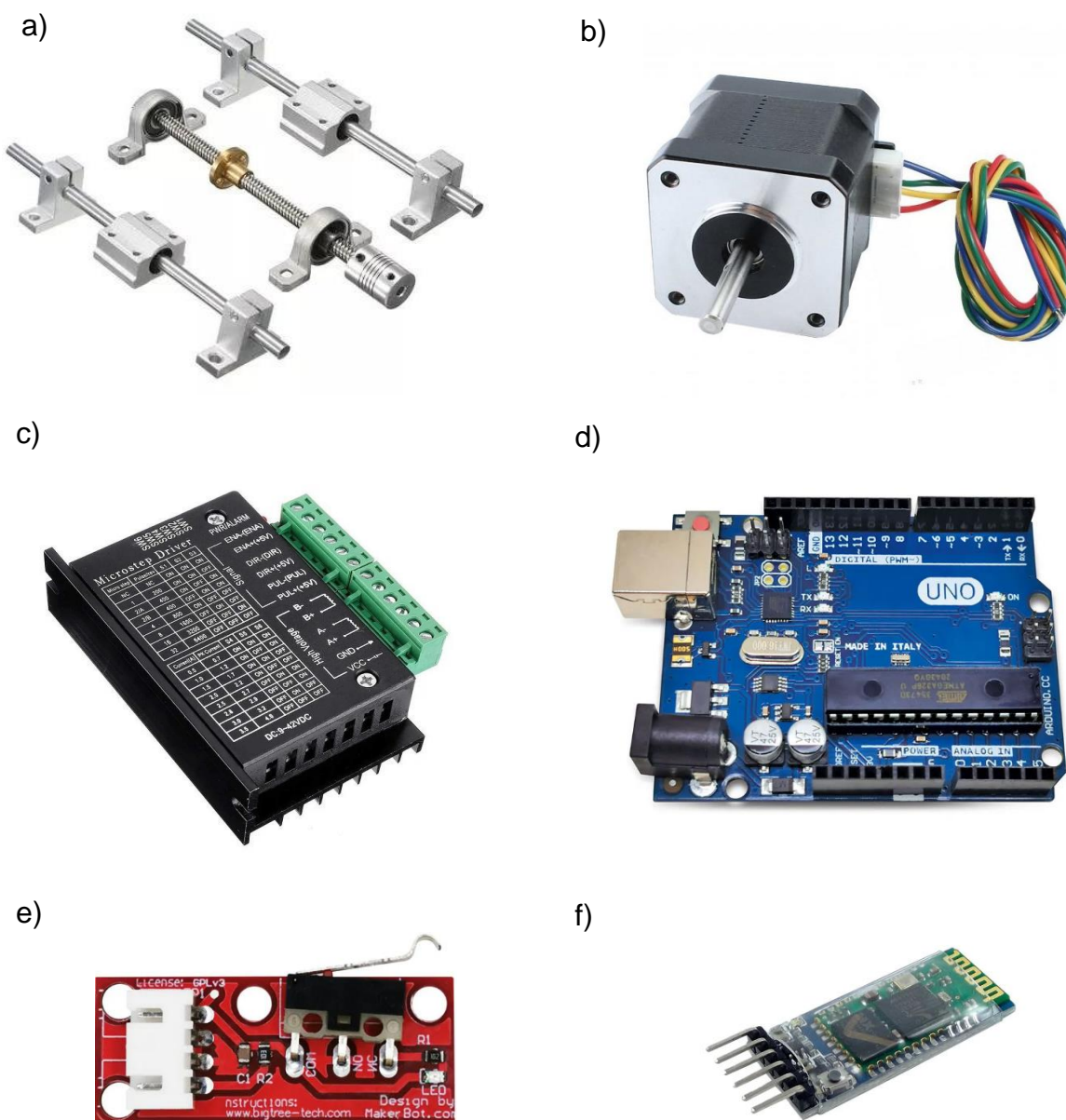


Figura 10 - Componentes eletrônicos **a.** Kit eixo z **b.** Motor de passo Nema 17 **c.** Módulo TB 6600 **d.** Arduino UNO **e.** Chave fim de curso **f.** Módulo Bluetooth HC-05

Conforme ilustra a Figura 11A, o eixo do motor de passos é conectado ao fuso, o qual gira e movimenta uma base onde o suporte móvel para os êmbolos das seringas é fixado (Figura 11B). Para um melhor apoio e para que todas as seringas atuem de maneira uniforme, o suporte móvel é fixado também às guias lineares laterais, sobre os *pillow-blocks*, proporcionando um movimento suave dos êmbolos com o giro do motor.

O deslocamento linear do suporte móvel dos êmbolos e, portanto, o volume deslocado pelas seringas, é definido por duas variáveis: o tamanho do fuso (2,0 mm) e o número de passos executados pelo motor (1 passo = menor incremento de deslocamento angular do eixo do motor). Como o driver utilizado para o motor de passos foi configurado para que um giro completo de seu eixo (360°) seja obtido com 3200 passos e um deslocamento de 2,0 mm é obtido com esse giro a partir do fuso empregado, pode-se dizer que o deslocamento mínimo do embolo da seringa é de 2,0 mm/3200 ou 0,625 µm/passo. Considerando essa informação e o fato de seringas de 3,0 mL serem utilizadas durante os estudos, foi possível estimar que 100 µL de líquido são dispensados ou aspirados por cada seringa quando o motor gira 2782 passos. Em outras palavras, um comando enviado pelo celular para o Arduino informa o número de passos a serem executados pelo motor, o qual determina efetivamente o volume deslocado pelos êmbolos.

Para completar o arranjo, instalou-se também duas chaves fim de curso (Figura 10E), uma em cada extremidade do fuso, de modo a se evitar o movimento dos êmbolos para além dos limites da seringa. Assim, quando os êmbolos atingem o volume máximo ou mínimo da seringa, uma das chaves de fim de curso é acionada e o motor é desligado automaticamente, evitando sobrecargas.

Os componentes eletrônicos responsáveis pelo controle do sistema foram dispostos em um compartimento localizado na parte posterior da bomba (item 4 da Figura 5) com uma porta de fácil acesso para eventuais ajustes. A Figura 11C mostra a disposição dos componentes no compartimento juntamente com esquema eletrônico da montagem realizada.

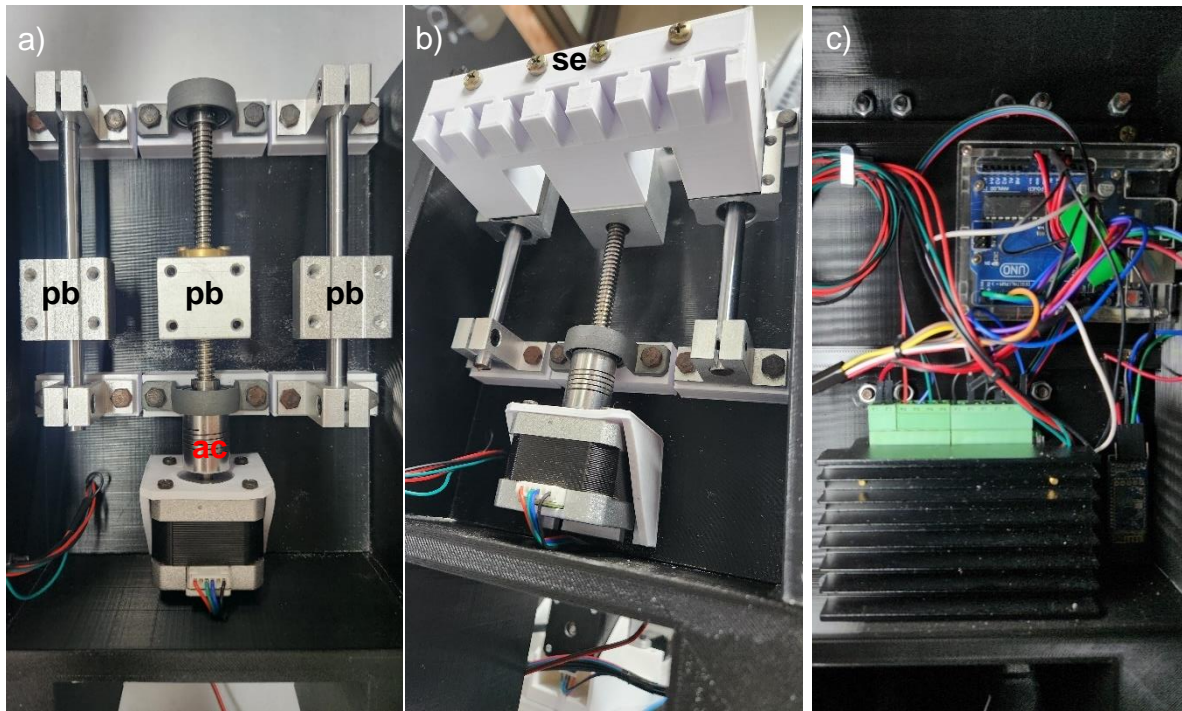


Figura 11 - Montagem da parte eletromecânica **a.** Fixação do conjunto eletromecânico. **b.** Conexão dos *pillow blocks* com o suporte dos êmbolos. **c.** Compartimento para os eletrônicos
pb - *pillow block*; **ac** - acoplamento (motor/eixo); **se** - suporte dos êmbolos

4.2.3 Instrumento completo

Após a montagem completa das estruturas em PLA com a parte eletromecânica, o equipamento é apresentado de acordo com a Figura 12

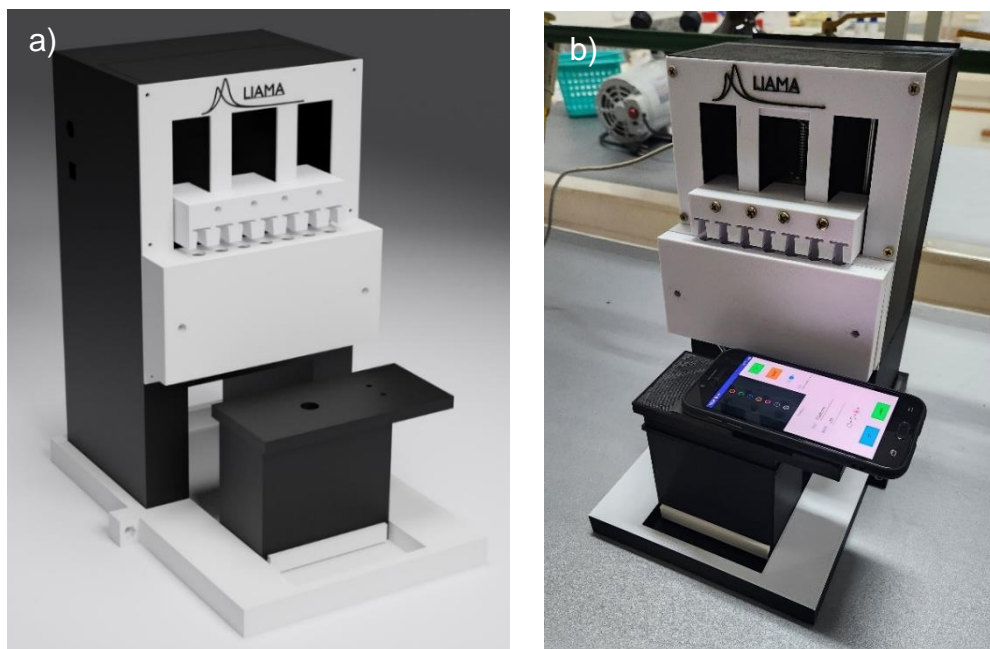


Figura 12 – Equipamento completo. **a.** Modelo 3D desenvolvido no software BLENDET. **b.** Foto real do instrumento completo

4.3 Aplicativo para controle do instrumento

Um aplicativo para sistema Android® foi desenvolvido em linguagem *Java* pelo grupo de pesquisas para permitir a aquisição dos sinais emitidos pelo analito através do método de detecção por imagens digitais. Os sinais RGB são coletados em tempo real por um smartphone (J5 pro Samsung), plotados e gravados para posterior análise. Além da aquisição do sinal, o aplicativo também controla as seringas por meio de comunicação *bluetooth*, como já relatado na seção anterior.

A primeira interface do programa é apresentada na Figura 12A, que solicita ao usuário a conexão com o instrumento via *bluetooth*. Devidamente conectado, a segunda interface (Figura 12B) fornece a imagem em tempo real da câmera, juntamente com 7 amostradores circulares que permitem a aquisição dos valores de R, G e B para cada uma das zonas de reação de forma independente. O programa permite que o usuário altere a posição e o tamanho dos amostradores RGB (*slider* SSZ), determine o número de leituras a ser realizado (MEAS - número de pontos de leituras coletados em intervalos de 0,3 s, necessários para o registro completo dos picos de sinal), e possui um botão (LED) para ligar/desligar um LED instalado dentro da cabine de leitura do instrumento, e que é utilizado para a visualização da plataforma com as zonas de reação, anteriormente as medidas.

Os botões de opções R, G e B, nesta interface (Figura 12B), permite definir qual o parâmetro de cor (R, G ou B) será plotado pelo aplicativo durante as medidas, embora todos os valores para R, G e B, coletados para cada um dos amostradores, sejam salvos e possam ser acessados posteriormente. Já os botões “UP” e “DOWN” são utilizados para movimentar os êmbolos das seringas totalmente para cima ou totalmente para baixo, respectivamente, e são utilizados para abastecimento ou esvaziamento das seringas.

Para facilitar o uso pelo analista, os ajustes de imagem como: brilho, contraste, exposição, ganho e balanço de branco foram otimizados para maior sensibilidade à luminescência do luminol e configurados, em segundo plano, de modo que o usuário não consiga alterá-los. Os valores para alguns destes parâmetros são listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Configuração dos parâmetros da câmera

Parâmetro	Ajuste
EXP	100%
ISO	60%
AWB	<i>fluorescent</i>
SSZ	5
FOCUS	1,8

Ainda na segunda tela, o usuário insere o nome do arquivo (campo “FILE”) que será salvo automaticamente ao fim das leituras, em formato de texto, e que contém uma coluna com os valores de tempo em que as medidas foram adquiridas a partir do início da reação quimiluminescente, e mais vinte e uma colunas com os valores de RGB detectados para os sete amostradores.

Após o correto posicionamento da plataforma com os reatores na parte inferior da cabine e posicionamento dos amostradores de RGB, o usuário deve clicar em “START”, que abrirá a terceira tela do aplicativo (Figura 12C) no mesmo momento em que um comando é enviado ao controlador das seringas para que seja dispensado um volume conhecido de reagente sobre os reatores e se inicie a aquisição de dados com registro gráfico dos sinais em tempo real.

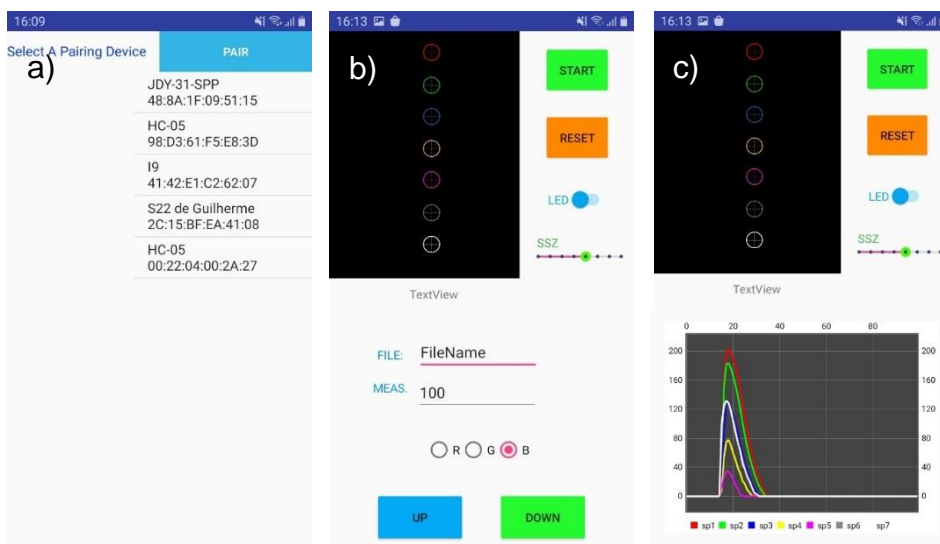


Figura 13 – Aplicativo de celular **a.** Interface de pareamento *bluetooth* **b.** Interface principal **c.** Interface após a medida

4.4 Prova de conceito - Determinação Indireta de Ácido Ascórbico em suplementos.

Para avaliar o instrumento proposto, foi realizada a determinação de ácido ascórbico em comprimidos efervescentes de suplementos, baseada na supressão da luminescência do sistema luminol/hipoclorito em meio básico causada pelo analito (OLIVEIRA et al., 2009). Nesse método, íons hipoclorito em excesso devem reagir, em uma primeira etapa, com o ácido ascórbico (Figura 13), reduzindo a concentração de oxidante no meio. Em uma segunda etapa, o hipoclorito remanescente oxida o luminol, gerando uma espécie excitada que emite radiação visível (azul) ao retornar para o estado fundamental (Figura 14).

Desse modo, quanto maior a concentração de ácido ascórbico (analito) em uma amostra ou padrão, menor será a concentração de hipoclorito após a primeira etapa e, conseqüentemente, menor será o sinal de luminescência gerado na segunda etapa, caracterizando um comportamento inversamente proporcional entre concentração do analito e sinal analítico.

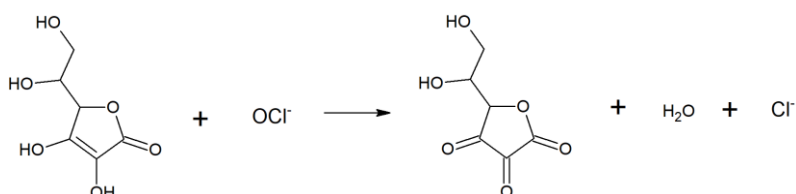


Figura 14 – Reação de oxidação do ácido ascórbico

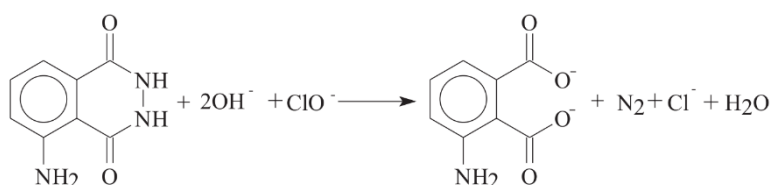


Figura 15 – Reação de quimiluminescência do luminol

Fonte: Oliveira et al., 2009

4.4.1 Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desmineralizada por osmose reversa e reagentes de grau analítico com as concentrações e/ou pureza indicados abaixo:

- Luminol (Aldrich 99%)
- Hipoclorito de Sódio (Vetec – solução a 12%(m/m))
- Ácido ascórbico (Fmaia 99 %)
- Carbonato de Potássio (Carlo Erba 99%)
- Ácido clorídrico grau analítico (Synth – solução 37% (m/m))

Para o preparo de 500 mL de uma solução tampão carbonato/bicarbonato 0,2 mol L⁻¹ pH 11, pesou-se 13,82 g de carbonato de potássio e dissolveu-se essa massa com 300 mL de água em um béquer de 500 mL. Em seguida, com o auxílio de um pHmetro, ajustou-se o pH da solução a 11,00 unidades com gotas de uma solução de ácido clorídrico. A solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 500,0 mL e o seu volume foi completado com água destilada.

Uma solução de luminol 3 mmolL^{-1} foi preparada diariamente pela dissolução de 53,0 mg do reagente em 100 mL de solução tampão pH 11. Para facilitar a dissolução do sólido empregou-se a sonicação do meio por cerca de 5 minutos.

Uma solução estoque de hipoclorito de sódio a 0,06% foi preparada pela diluição da solução comercial do reagente a 12 % (m/m) em água, enquanto uma solução de ácido ascórbico a 1000 mgL^{-1} foi preparada pela dissolução da massa apropriada do analito em água livre de oxigênio. A partir destas soluções, preparou-se padrões com 0,0 a $40,0 \text{ mgL}^{-1}$ em ácido ascórbico utilizando balões volumétricos de 25,00 mL de acordo com o descrito na Tabela 3. Vale destacar que as soluções estoques e dos padrões foram preparadas diariamente devido à sua rápida decomposição e que a reação prévia entre o analito e o hipoclorito foi realizada diretamente nos balões.

Tabela 3 - Volumes adicionados das soluções estoque de reagente em balão volumétrico de 25mL para a preparação dos padrões de ácido ascórbico

Concentração (mgL^{-1})	0	10	20	30	40
NaOCl (0,06%)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Padrão de ácido ascórbico (1000 mgL^{-1})	0 μL	250 μL	500 μL	750 μL	1000 μL

4.4.2 Preparo da amostra

Para cada marca de suplemento analisada, pesou-se individualmente três comprimidos efervescente e realizou-se a sua pulverização com almofariz e pistilo. Em seguida, a massa pulverizada correspondente a massa média de um comprimido foi dissolvida em 100 mL de água destilada em um béquer. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com as águas de lavagem do béquer para compor a solução estoque da amostra.

Para análise no instrumento, 125 μL da solução estoque da amostra foram transferidos para um balão de 25,00 mL com adição de 2,5 mL de NaOCl (0,06%) , sendo o volume completado com água.

4.5 Procedimento para análise

Antes do início das análises é necessário realizar o abastecimento das seringas com a solução de luminol. Para isso, primeiramente, o operador aciona o botão “DOWN” no aplicativo, fazendo com que as seringas sejam posicionadas em seu volume zero. Em seguida, os tubos de polipropileno, conectados às seringas, são mergulhados em um béquer contendo a solução de luminol (Figura 15A) e pressiona-se o botão “UP”, fazendo com que se aspire o líquido até o volume total da seringa. Feito isso, os tubos são encaixados à cabine de leitura, através do alinhador (Figura 15B), e o sistema fica pronto para a realização das análises.

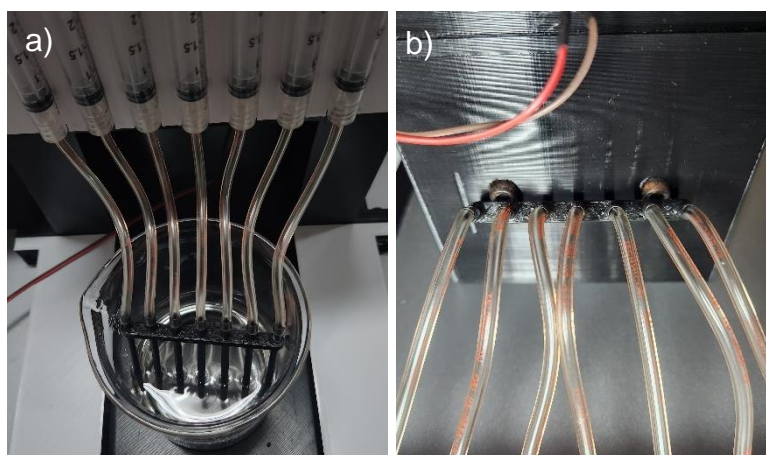


Figura 16 - Tubos de polipropileno responsáveis pela sucção do reagente **a.** Imersão dos tubos na solução. **b.** Encaixe dos tubos na cabine de leitura

À plataforma de aplicação, com o auxílio de uma micropipeta, adiciona-se 20 μL da solução a ser analisada (amostra + hipoclorito de sódio; ou padrão + hipoclorito de sódio) em cada um dos reatores. Após preencher todos os reatores com as soluções, o dispositivo é inserido no equipamento de leitura para proceder com as configurações do aplicativo. Nesse ponto, um LED disposto dentro equipamento é ligado para auxiliar na visualização e alinhamento dos amostradores de RGB com os diâmetros dos reatores.



Figura 17 - Inserção da plataforma de aplicação na cabine de leitura

Realizadas essas etapas, o LED deve ser desligado e pressiona-se o botão “START”, que injeta 70 μL da solução de luminol diretamente nos reatores, promovendo a reação de quimiluminescência e a obtenção do sinal analítico captado em tempo real pela câmera digital do celular. O sinal é plotado diretamente na tela do celular ao final da análise, para que o analista consiga deduzir previamente se os resultados estão dentro do esperado, sem a necessidade de levar os dados ao computador para simples conferência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização preliminar de algumas variáveis para a realização das medidas

Para permitir a determinação de ácido ascórbico com o instrumento proposto, foi necessário ajustar alguns parâmetros de captação das imagens, a concentração de hipoclorito e a distância entre a câmera e as zonas de reação que proporcionasse uma variação de sinal da componente B relacionável com a concentração do analito. Vale destacar que a componente B de RGB foi utilizada como sinal analítico, uma vez que a radiação emitida pela reação quimiluminescente em estudo é azul, e que se obtém uma resposta transiente (em forma de pico) para a variação de B no tempo, cuja altura é relacionada à concentração do analito.

Para que a câmera fosse capaz de captar pequenas variações de intensidade luminosa, ajustou-se inicialmente a sensibilidade à luz (ISO) ao máximo, o que foi feito também para o tempo de exposição (EXP). Além disso, o balanço de branco foi ajustado para o modo “*fluorescent*”, o qual proporciona maior sensibilidade para a cor azul. Com essa configuração realizou-se medidas com soluções de diferentes concentrações de hipoclorito, sempre utilizando um volume de 20 µL destas nos reatores. Vale destacar que a distância entre a câmera do celular e a plataforma com as zonas de reação era de 93 mm.

Com esta configuração, foi observado que concentrações de hipoclorito maiores que 0,006 % ($8,06 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹) provocavam a saturação do sinal analítico, ou seja, os picos atingiam valores acima do máximo possível da escala RGB (255 unidades), não sendo possível observar uma diminuição do sinal quando pequenas quantidades de ácido ascórbico eram adicionadas aos reatores juntamente com as soluções de hipoclorito. Assim, soluções de hipoclorito a 0,006 % foram utilizadas nos estudos seguintes, uma vez que proporcionavam sinais com elevadas razões sinal/ruído.

Estabelecida esta condição, foi realizado um ensaio de repetibilidade das medidas em que todos os sete reatores recebiam 20 µL da solução de hipoclorito 0,006 % para posterior reação com 70 µL da solução de luminol. Diferente do esperado, notou-se que a resposta para algumas zonas de reação, principalmente aquelas localizadas nas laterais da plataforma, apresentavam sinais com diferenças significativas daqueles obtidos para os reatores mais ao centro da plataforma. Levantou-se, então, a hipótese de que a distância da câmera para os reatores não era suficientemente grande para uma aquisição homogênea das imagens. Em outras palavras, devido à curta distância, imagens dos reatores mais ao centro poderiam apresentar um foco mais apurado do que aquelas obtidas para os reatores laterais. Desse modo, aumentou-se a distância da câmera para a plataforma de 93 mm para 118 mm e utilizou-se um zoom de 1,8 vezes para a captação das imagens, o que melhorou a repetibilidade das medidas, com os picos apresentando alturas cujo coeficiente de variação para $n = 7$ se situava abaixo de 5 %.

Apesar dessa melhora, observou-se que, com o uso repetido de uma mesma plataforma, os resultados se tornavam menos precisos entre as medidas de uma mesma corrida, o que limitava a aplicação quantitativa do dispositivo proposto. De fato, até esse ponto dos estudos, a plataforma com os reatores era fabricada em uma peça única de PLA (sem os batoques) e suspeitou-se que parte da solução depositada nos reatores pudesse estar penetrando no material, diminuindo o volume efetivamente analisado ou causando

efeito de memória pelo acúmulo de analito nas suas paredes. Ao submeter estas plataformas à lavagem com água destilada e secagem com toalhas de papel, não se notava, visualmente, vestígios de líquidos ou de material remanescente, porém ao colocá-las em estufa a cerca de 40° C, notou-se o aparecimento de umidade na superfície do material, indicando, possivelmente, o aprisionamento de líquido no interior do material que não era eliminado sem o aquecimento em estufa.

Nesse sentido, para facilitar a operação de lavagem e secagem e minimizar esses efeitos indesejáveis nas leituras, optou-se pela fixação de batoques em cavidades pré-fabricadas nas plataformas de PLA. Como será melhor discutido adiante, essa estratégia se mostrou eficiente, proporcionando boa precisão para as medidas, mesmo para o uso de diferentes plataformas.

Corrigidos os efeitos da concentração de hipoclorito, da distância da câmera até a plataforma e da porosidade do PLA na obtenção dos sinais analíticos, buscou-se verificar a influência da emissão quimiluminescente de uma zona de reação no sinal obtido por uma zona adjacente. Dessa maneira, um novo teste foi realizado para averiguar essa hipótese, em que se utilizou uma solução de hipoclorito mais concentrada (0,012 %), sendo adicionados 20 µL dessa solução em quatro reatores de maneira alternada, quatro preenchidos e três vazios, e procedeu-se com as leituras. A Figura 17 mostra que mesmo os reatores vazios apresentaram uma resposta para a componente B de RGB, indicando que a radiação emitida nos reatores que continham hipoclorito acaba sendo captada pelos amostradores de RGB dispostos sobre os reatores vazios. De fato, como a radiação quimiluminescente não é colimada, os feixes luminosos se espalham em todas as direções, podendo influenciar na leitura do sinal de reatores vizinhos. Além disso, essa interferência se torna mais importante quando os parâmetros de sensibilidade da câmera (ISO e EXP) são ajustados ao máximo.

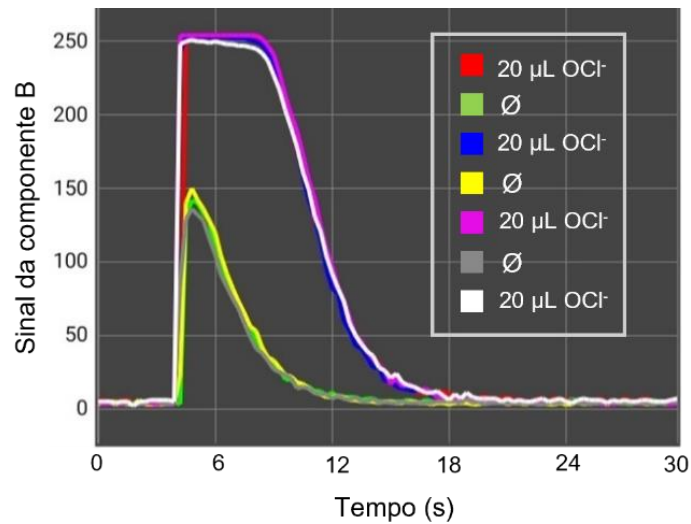


Figura 18 - Sinal obtido para análise de apenas 4 spots intercalados

Considerando esse comportamento, manteve-se a concentração de hipoclorito em 0,006 % e reduziu-se a sensibilidade (ISO) para o valor de 12000, 60% da configuração inicial, mantendo-se o ajuste de tempo de exposição no máximo, o que permitiu a detecção independente em cada reator sem influência da emissão do reator vizinho. Conforme ilustra a Figura 18, essa redução de sensibilidade da câmera eliminou a resposta indesejada para os reatores vazios, porém a resposta da componente B para a solução de hipoclorito em branco (0,006 %) também diminuiu, mas proporciona uma detecção livre de interferência para todos os reatores.

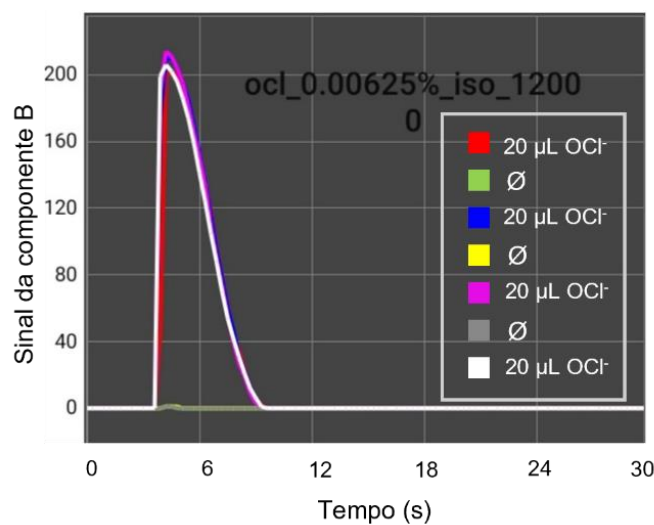


Figura 19 - Sinal obtido para apenas 4 reatores intercalados com novo ajuste de câmera

Para avaliar a precisão do método proposto, realizou-se um ensaio de repetibilidade no qual analisou-se cerca de 20 μL do branco (hipoclorito de sódio 0,006%) nos sete reatores. Os picos obtidos estão apresentados na Figura 19, sendo que o desvio padrão relativo para as alturas dos picos, que determina a dispersão das medidas individuais em relação à média, foi de 1,56%. Esse valor indica que a precisão das medidas é satisfatória para uma determinação quantitativa e que fatores como a adição simultânea automatizada do luminol e uniformidade dos spots corroboram para a repetibilidade das medidas em uma mesma plataforma.

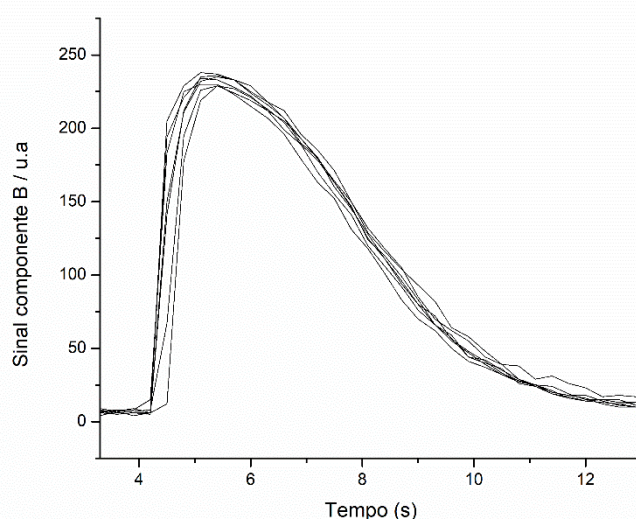


Figura 20 - Registro dos sinais referentes à componente B de RGB para soluções do branco (hipoclorito a 0,006 %) realizados nas sete zonas de reação de uma mesma plataforma.

5.2 Desempenho analítico – Determinação de ácido ascórbico em suplementos

A Figura 21 mostra um registro com os sinais típicos para a faixa de concentração de 10 a 40 mg L^{-1} de ácido ascórbico juntamente com o sinal para o branco obtidos em uma única plataforma. Como pode ser visto, a aquisição das respostas ocorre de maneira rápida (menos que 15 s) e apresentam elevadas razões sinal/ruído. Observa-se também, como já discutido, a diminuição da altura dos picos com o aumento da concentração de ácido ascórbico nos padrões, de modo que a diferença entre a altura do pico para o branco (H) e altura do pico para a amostra ou padrão (h), mostrado na Figura 20, é efetivamente utilizada para fins de calibração e determinação quantitativa.

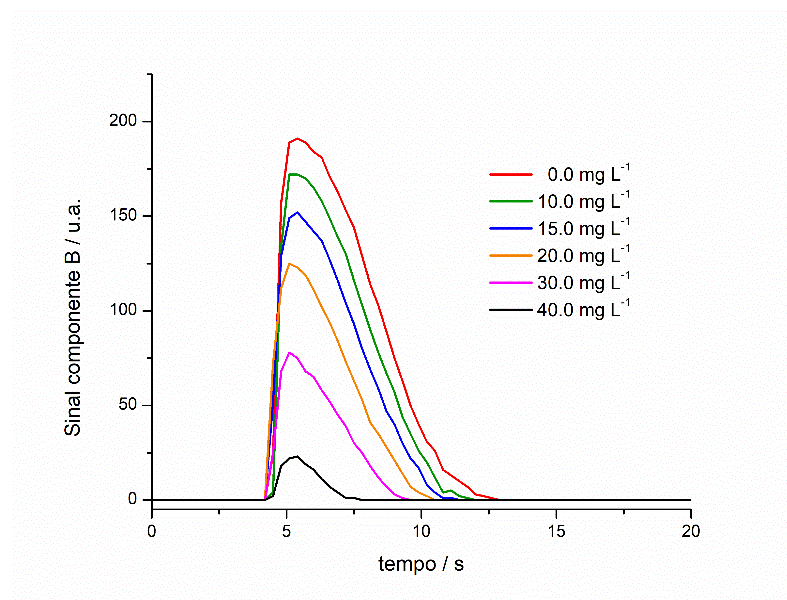


Figura 21 - Registro dos sinais referentes à componente B de RGB para seis soluções com diferentes concentrações de ácido ascórbico.

Com o objetivo de avaliar a linearidade das respostas com a concentração do analito na faixa de concentração descrita e ao mesmo tempo aferir a precisão obtida para todos os níveis de concentração, realizou-se a leitura para os cinco padrões e o branco em sextuplicata. Em outras palavras, as medidas para calibração foram realizadas em seis plataformas diferentes, cada uma contendo a solução do branco mais os cinco padrões.

Como mostra a curva analítica na Figura 21, uma elevada correlação linear foi observada entre os sinais e as concentrações ($R^2 = 0,9996$), com pequenos desvios para as replicatas. A partir de seis medidas para o branco, um limite de detecção de $2,25 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,27 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$) foi determinado por (SKOOG et al., 2007)

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma_{dp}}{b} = \frac{3,3 \times 3,3044}{4,85} = 2,25 \text{ mg L}^{-1}$$

Equação 1

em que σ_{dp} representa o desvio padrão para seis medidas e b é a inclinação da curva de calibração. De maneira similar um limite de quantificação de $6,81 \text{ mg L}^{-1}$ ($3,87 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$) foi estimado por (SKOOG et al., 2007)

$$LQ = \frac{10 \times \sigma_{dp}}{b} = \frac{10 \times 3,3044}{4,85} = 6,81 \text{ mg L}^{-1}$$

Equação 2

Considerando que esses limites estão bem abaixo da concentração de uma solução estoque da amostra preparada (4000 mg L^{-1}) e que há a necessidade de diluição dessa solução para a determinação no instrumento proposto, pode-se dizer que há uma detectabilidade adequada da estratégia para a aplicação.

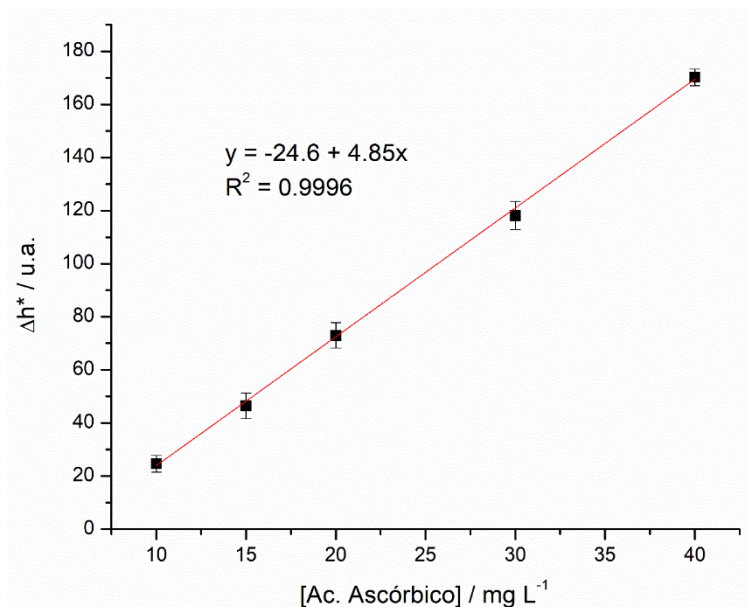


Figura 22 - Curva analítica para a determinação de ácido ascórbico na faixa de 10 mgL^{-1} à 40 mgL^{-1} ($5,68 \cdot 10^{-5}$ à $22,71 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) empregando-se seis medidas para cada concentração. *Diferença entre altura do pico para o branco e a altura do pico para o padrão.

A Tabela 4 lista os sinais médios obtidos para as seis medidas realizadas para cada solução padrão, acompanhados dos desvios padrão e dos coeficientes de variação. Como pode ser observado, variações entre 1,8 e 12,5 %, encontradas nas medidas, demonstram uma precisão satisfatória, mesmo quando plataformas diferentes são utilizadas, o que indica que as etapas necessárias à obtenção do sinal analítico, como a pipetagem das soluções para os reatores, a adição automática de luminol, a detecção por imagem digital e o próprio processo de fabricação das plataformas são reprodutíveis.

Tabela 4 – Dados obtidos para a calibração do instrumento

Concentração (mg/L)	Sinal médio (u.a)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
10	24,7	3,1	12,5
15	46,5	4,8	10,3
20	73,0	4,8	6,6
30	118,2	5,3	4,5
40	170,2	3,1	1,8

Para avaliar a exatidão do método, foram analisadas 5 formulações farmacêuticas comerciais de vitamina C efervescente, sendo os resultados comparados com os valores contidos na bula e com aqueles determinados por meio da coulometria amperostática, técnica baseada na mensuração do número de elétrons para oxidar/reduzir determinado reagente/analito. A Tabela 5 apresenta a concentração de vitamina C descritas nos rótulos, e as concentrações obtidas pelo instrumento proposto, com os respectivos erros relativos, indicando que diferenças menores que 6 % foram observadas para todas as amostras avaliadas e que, considerando o rótulo como referência, o método com o instrumento proposto apresentou uma exatidão adequada. Além disso, um teste t ao nível de 95 % de confiança não indicou diferenças significativas entre os valores, reforçando a indicação de exatidão satisfatória.

Tabela 5 - Teores de ácido ascórbico determinados nas amostras comerciais e valores descritos no rótulo.

Amostra	Concentração de ácido ascórbico (mg/comp.) obtida pelo instrumento proposto**	Concentração de ácido ascórbico no rótulo (mg/comp.)	Erro relativo (Er)
A	1001,86 ± 23,35	1000	0,18%
B	1013,51 ± 23,37	1000	1,35%
C	1054,02 ± 22,47	1000	5,4%
D	1040,01 ± 26,95	1000	4,0%
E	942,53 ± 13,31	1000	-5,74%

A comparação entre os resultados obtidos com o método proposto e o método por coulometria amperostática é resumido na Tabela 6. Nesse caso, a diferença relativa entre os resultados se apresentou menor que 3% para a maioria das amostras analisadas, porém, uma das amostras (Amostra E) levou à uma diferença de -10,23%, o que pode ser atribuído a um possível efeito de matriz da amostra em um dos métodos empregados, mas que não foi investigado nesse trabalho. De qualquer forma, um teste t ao nível de 95% de confiança foi realizado, não sendo determinadas diferenças significativas entre os resultados, o que mostra uma exatidão adequada do método e a possibilidade de sua aplicação para a determinação quantitativa de ácido ascórbico em suplementos.

Tabela 6 - Resultados obtidos pelo método proposto e pelo método de referência

Amostra	Método proposto (mg/comp.)*	Método de referência** (mg/comp.)	Erro relativo (Er)
A	1001,86 ± 23,35	999,16 ± 22,80	0,27%
B	1013,51 ± 23,37	1018,16 ± 76,74	-0,46%
C	1054,02 ± 22,47	1028,33 ± 10,40	2,49%
D	1040,01 ± 26,95	1033,33 ± 2,88	0,64%
E	942,53 ± 13,31	1050 ± 15,00	-10,23%

* média ± desvio padrão. ** análise feita por coulometria amperostática

5.3 Características gerais do instrumento proposto

O custo dos materiais para a construção do luminômetro foi de aproximadamente R\$ 900,00 (cerca de US\$ 180,00), o qual pode ser considerado baixo ao se comparar com os instrumentos comerciais disponíveis no mercado. Além disso, a possibilidade de se realizar a calibração e as medidas em uma única corrida, proporciona uma elevada velocidade analítica e maior confiança nos resultados, uma vez que as medidas para as amostras e para os padrões são realizadas sob as mesmas condições.

Deve-se salientar também que os volumes de amostras e reagentes utilizados nas determinações são bastante baixos. Em uma corrida usual, apenas 20 µL de solução de padrão/amostra são transferidos para cada reator, os quais recebem a adição individual de apenas 70 µL da solução de luminol para a realização da reação luminescente. Assim, considerando os sete reatores da plataforma, são produzidos apenas 0,63 mL de resíduos

ao final de uma corrida, o que demonstra o atendimento do método a um dos preceitos da chamada Química Verde (Melchert, 2012), a redução de consumo de reagentes e de geração de rejeitos.

Por fim, como o consumo de luminol desse instrumento é bastante baixo, e este reagente apresenta um custo relativamente elevado (cerca de US\$ 160,00 a cada 5 g), tem-se uma redução dos custos das análises se comparado com estratégias semelhantes, o que pode viabilizar o seu uso para diferentes aplicações, como aquelas de interesse bioquímico com elevada demanda.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

É possível concluir que o luminômetro desenvolvido é uma alternativa simples, de baixo custo e eficiente para a realização de medidas quimiluminescentes de interesse quantitativo e que as estratégias adotadas para a adição controlada dos reagentes e detecção do sinal analítico, por meio de imagens digitais, tiveram sucesso. Esse trabalho abre caminho para uso em outras aplicações analíticas que necessitem de rapidez e bom desempenho e poderá, no futuro, ser utilizado de maneira portátil uma vez que todo o controle do aparato é realizado por smartphone.

7 REFERÊNCIAS

AGRAWAAL, H.; THOMPSON, J. E. **Additive manufacturing (3D printing) for analytical chemistry.** *Talanta Open* Elsevier B.V., , 1 ago. 2021.

BAADER, N. & et al. **QUIMILUMINESCÊNCIA DE PERÓXIDOS ORGÂNICOS: GERAÇÃO DE ESTADOS ELETRONICAMENTE EXCITADOS NA DECOMPOSIÇÃO DE 1,2-DIOXETANOS.** [s.l: s.n.].

Biqu. Disponível em: <<https://biqu.equipment/collections/3d-printer/products/biqu-b1-3d-printer-skr-v1-4-32bit-motherboard-tft35-b1-v3-0-dual-operation-system-fdm-imprensa-3d-printer-beginner>>. Acesso em: 29 jun. 2023.

Blender. Disponível em: <<https://www.blender.org/>>. Acesso em: 29 jun. 2023.

BOGUCKI, R. et al. A 3D-Printable Dual Beam Spectrophotometer with Multiplatform Smartphone Adaptor. **Journal of Chemical Education**, v. 96, n. 7, p. 1527–1531, 9 jul. 2019.

CAPITÁN-VALLVEY, L. F. et al. **Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review.** *Analytica Chimica Acta* Elsevier B.V., , 29 out. 2015.

Chemiluminescence microscopy as a tool in biomedical research. *Biotechniques*. **Créton R, Jaffe LF**, 2001.

CHOOBBARI, M. L. et al. A sample volume independent paper microfluidic device for quantifying glucose in real human plasma. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 24, n. 9, 1 set. 2020.

FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. **A QUIMILUMINESCÊNCIA COMO FERRAMENTA ANALÍTICA: DO MECANISMO A APLICAÇÕES DA REAÇÃO DO LUMINOL EM MÉTODOS CINÉTICOS DE ANÁLISE** *Quim. Nova*. [s.l: s.n.].

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. (RICHARD E. **Digital image processing.** [s.l: s.n.].

KUMAR, A.; BERA, A.; KUMAR, S. A Smartphone-Assisted Sensitive, Selective and Reversible Recognition of Copper Ions in an Aqueous Medium. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 3, p. 1020–1028, 23 jan. 2020.

MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. **Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. *Analytica Chimica Acta***, 10 fev. 2012.

NAWADA, S.; DIMARTINO, S.; FEE, C. Dispersion behavior of 3D-printed columns with homogeneous microstructures comprising differing element shapes. ***Chemical Engineering Science***, v. 164, p. 90–98, 2017.

OGIRALA, T. et al. Smartphone-based colorimetric ELISA implementation for determination of women's reproductive steroid hormone profiles. ***Medical and Biological Engineering and Computing***, v. 55, n. 10, p. 1735–1741, 1 out. 2017.

OLIVEIRA, G. G. et al. **DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL PELA INIBIÇÃO DA REAÇÃO QUIMILUMINESCENTE DO LUMINOL-HIPOCLORITO DE SÓDIO EM UM SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO EMPREGANDO O CONCEITO DE MULTICOMUTAÇÃO** *Quim. Nova*. [s.l: s.n.].

ROHAIZAD, N. et al. 3D-printed Ag/AgCl pseudo-reference electrodes. ***Electrochemistry Communications***, v. 103, p. 104–108, 1 jun. 2019.

SKOOG, D. A. et al. ***Principles of Instrumental Analysis***. [s.l: 2007].

TZANI, M. A. et al. **Direct and indirect chemiluminescence: reactions, mechanisms and challenges. *Molecules* MDPI**, , 1 dez. 2021.