



Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**Desenvolvimento de Sistema Automatizado Para o
Monitoramento da Degradação de Resíduos de
Brometo de Etídio**

Eduardo Ferreira Pereira

Orientador

Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, DF.

2015



Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

Eduardo Ferreira Pereira

***Desenvolvimento de Sistema Automatizado Para
o Monitoramento da Degradação de Resíduos de
Brometo de Etídio***

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como parte do requisito exigido para a obtenção do Título de Doutor em Química.

Orientador

Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, DF.

2015

Comunicado

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese de Doutorado do (a) aluno ***Eduardo Ferreira Pereira***, matrícula n^o ***11/0092066***, intitulada ***“Desenvolvimento de sistema automatizado para monitoramento da degradação de resíduos de brometo de etídio”***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 8 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Fonseca - IQ/UnB
(Presidente)

Dr^a. Gabriella Magarelli - EMBRAPA
(Membro Titular)

Dr. Fabiano Barbieri Gonzaga - INMETRO
(Membro Titular)

Prof^a Dr^a Valéria Regina Bellotto - IQ/UnB
(Membro Titular)

Prof. Dr. Jez William Braga - IQ/UnB
(Membro Suplente)

Em 8 de julho de 2015.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus Pais, meu Irmão e a minha noiva Verônica, pela paciência que tiveram durante todos estes anos em que fiquei envolvido neste longo processo.

Agradecimentos

Agradeço de coração a todos os que estiveram envolvidos nestes longos anos até este momento. Agradeço a Deus por tudo que aconteceu e que finalmente me levou a este momento final onde depois de tantos anos consigo concluir este ciclo de vida.

Agradeço aos meus pais que sempre foram muito compreensivos e sempre me apoiaram em minhas decisões e me ajudaram na minha educação e em todos os momentos da vida. Meu irmão Roberto e a Ana Cristina que estiveram presentes em minha vida e entendem os momentos de ausência por conta das necessidades do trabalho. Também aos familiares de BH minhas tias, tios e primos que souberam entender as ausências e as visitas rápidas.

Um agradecimento muito especial a minha noiva Verônica. Por entender os problemas, “pelos puxões de orelha” e me ajudar a concluir esta fase da minha vida sempre me incentivando e apoiando quando necessário. Sendo também um grande exemplo de vida.

Um agradecimento muito especial ao meu orientador Professor Doutor Alexandre Fonseca. Agradeço a paciência e a ajuda por ter me aceitado como orientando, mesmo com os problemas anteriores, em especial no início e durante a realização deste trabalho. “Desculpa ai qualquer coisa” e nunca perca a alegria que contagia o pessoal do laboratório e deixa as horas de bancada mais leves.

Agradeço também aos amigos do laboratório Lilian, Laíz, Lorrana, Alan e os mais recentes Hadassa, Gerson, Camila e o pessoal do AQQUA I. Também a professora Ana Cristi pelo convívio no laboratório e os professores Jez, Fernanda, Fernando e Valéria. Aos amigos dos outros laboratórios Alberto, Frederico e outros que contribuíram de alguma forma no processo, e se esqueci de alguém, desculpa ai de novo.

Ao pessoal da Comissão de Resíduos, Professora Élide, Noberto, Sinval, Adão, Jairo, João, Wellington e Manoel. Pela ajuda nas horas de dificuldade e nas horas de ausência quando precisei sair para agilizar as coisas do laboratório.

Agradeço também ao INCTAA pelo auxílio financeiro na compra de alguns dos componentes

A Universidade de Brasília, ao Instituto de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química. Em especial este último e seus coordenadores pela paciência e confiança depositados.

No final deu tudo certo, obrigado a todos ^_^x.

“O que é, por conseguinte, o tempo? Se ninguém me perguntar, eu sei; se o quiser explicar a quem me fizer a pergunta, já não sei”

(Agostinho de Hipona)

“Não é nossa função controlar todas as marés do mundo, mas sim fazer o que pudermos para socorrer os tempos em que estamos inseridos, erradicando o mal dos campos que conhecemos, para que aqueles que viverem depois tenham terra limpa para cultivar. Que tempo encontrarão não é nossa função determinar.”

(Gandalf - O Cinzento)

Resumo

O Brometo de Etídio (BE) é um composto fluorescente que tem seu rendimento quântico muito aumentado quando intercalado à moléculas de DNA e RNA e, por isto, é usado para detecção destas espécies em procedimentos de eletroferese em gel. Devido a estas características, esta substância é considerada perigosa, pois pode causar danos ao material genético humano sendo classificado como um agente mutagênico /tóxico. Para realização do seu descarte é necessário um processo de inertização, sendo um dos mais aplicados o proposto por Lunn e Sansone em que são utilizados o ácido hipofosfórico e o nitrato de sódio para oxidação da substância. Porém, esta é uma reação de longa duração e a sua finalização deve ser atestada com o uso da detecção por fluorescência. Considerando este aspecto, o principal objetivo do trabalho foi construir e avaliar um sistema automatizado de baixo custo com detecção fluorimétrica, empregando-se um LED (máximo de emissão em 535 nm) para monitorar a degradação do BE. Este instrumento é controlado por microcontroladores (PIC 16F877A e PIC 16F628) que são responsáveis pelos controles dos processos de fluxo das amostras e do fluido carreador e por adquirir e processar o sinal do sistema de detecção, composto de dois fotodiodos e como filtros para, emissão do BE, foram utilizados plásticos de coloração alaranjada. O Fluorímetro proposto foi avaliado tanto em batelada quanto em um sistema de fluxo e apresentou limites de detecção de $0,33 \text{ mg L}^{-1}$ no sistema de fluxo com abordagem *stopped-flow* e $0,04 \text{ mg L}^{-1}$ em batelada (utilizando cubeta). As medidas realizadas com o instrumento foram comparadas ao de um fluorímetro comercial de bancada e em todas as comparações não foram observadas diferenças significativas ao nível de 95% de confiança. Foram realizados testes para verificar se o sistema de decisão do instrumento proposto era confiável para indicar automaticamente o final da degradação sendo observada uma taxa de 100% de acerto para as amostras testadas com concentrações acima do limite máximo permitido e abaixo deste limite (5 mg L^{-1}). Alternativamente, avaliou-se a possibilidade de uso de um sistema de detecção de BE utilizando um LED como fonte de excitação e medidas das componentes RGB de imagens a partir de um aplicativo e da câmera de um aparelho celular. Para esta abordagem foi encontrado um limite de detecção de $0,91 \text{ mg L}^{-1}$ utilizando apenas componente R. Comparando-se os resultados obtidos para amostras fortificadas com BE realizadas com o fluorímetro proposto e com a detecção via celular com os resultados obtidos com um espectrofluorímetro comercial, não foram observadas diferenças significativas ao nível de 95 % de confiança. O Fluorímetro de LED proposto se mostrou eficiente e teve um rendimento satisfatório a um baixo custo (cerca de US\$ 200) podendo ser aplicado para a detecção de BE no procedimento de descarte ou na detecção destes em amostras residuais.

Abstract

Ethidium Bromide (BE) is a fluorescent compound which has a significant enhancement of quantum yield when intercalated with RNA and DNA molecules and, due to such effect, it is applied for detection of these species in gel electrophoresis. For that reason, BE is considered dangerous, producing damages to human genetic material and classified as a mutagenic/toxic agent. In order to discard BE residues, is necessary a prior process to turn the substance inert and one of the most applied protocols is the proposed by Lunn and Sansone, where hipofosforic acid and sodium nitrite are used to oxidize the BE. However, this reaction requires a long time period and its finalization must be attested by fluorescence measurements. Considering this, the main objective of this work was to fabricate and evaluate a low cost automated system with fluorometric detection, using a LED (maximum emission in 535 nm) to to monitor BE degradation. The proposed instrument is controlled by microcontrollers (PIC 16F877A and PIC 16F628) that controls the sample and carrier flows and performs the acquisition and processing of the analytical signal from the detector, comprising two photodiodes covered by two pieces of transparent orange plastic. The proposed fluorometer was tested with the use of batch or flow based strategies. Using a stopped-flow system, the limit of detection of 0.33 mg L⁻¹ was achieved and for the batch determination the detection limit was 0.04 mg L⁻¹. The determinations performed with the proposed LED fluorometer were compared to the determinations performed with a commercial spectrofluorometer with no significant differences at 95 % confidence level. Tests were also conducted to verify if the decision system of the proposed instrument was reliable to automatically indicate the end of degradation, being checked 100 % of accuracy for the tested samples with BE concentrations beyond and below the limit of concentration of 5 mg L⁻¹. Alternatively, the detection of BE using a green LED as excitation source and measurements of RGB pattern from photographic images acquired by a cell phone was evaluated. For this approach, the detection limit of 0.91 mg L⁻¹ was stimulated using only the Red component of RGB. By comparing the results acquired with the proposed fluorometer/cell phone detection with the data obtained with a commercial spectrofluorometer for BE fortified samples, no significant differences were observed at the 95 % confidence level. The proposed LED Fluorometer was efficient and had a satisfactory performance at a low cost (US\$ 200) and can be applied to the detection of BE in the disposal procedure or detecting in residual samples.

Sumário

| | |
|---|------|
| Comunicado | ii |
| Dedicatória | iii |
| Agradecimentos | iv |
| Resumo | vi |
| Abstract | vii |
| Sumário | viii |
| Lista de Siglas e Acrônimos | x |
| Índice de figuras | xii |
| Índice de tabelas | xvi |
| 1 - Introdução | 1 |
| 2 - Objetivos | 4 |
| 3 - Revisão bibliográfica | 5 |
| 3.1 - Resíduos de laboratório | 5 |
| 3.2 - O Brometo de Etídio (BE) | 8 |
| 3.2.1 – Resíduos de brometo de etídio e métodos de tratamento para suas soluções residuais. | 10 |
| 3.3 - O fenômeno da fluorescência | 16 |
| 3.4 - Instrumentos <i>labmade</i> à base de diodos emissores de luz (LED) | 18 |
| 3.5 – Instrumentos <i>labmade</i> para medidas de fluorescência | 22 |
| 3.6 – Medidas ópticas baseadas em imagens digitais. | 28 |
| 3.7 – Sistemas de análise em fluxo..... | 33 |
| 4 - Materiais e métodos | 36 |
| 4.1 - Reagentes e soluções | 36 |
| 4.2 – Construção do equipamento | 42 |
| 4.2.1 – Visão geral do sistema em fluxo | 42 |
| 4.2.2 - Construção do fluorímetro. | 44 |
| 4.2.3 – Desenvolvimento dos circuitos para o sistema automatizado..... | 48 |
| 4.2.4 – Software e procedimentos de funcionamento | 52 |
| 4.3 – Sistema para aquisição de imagens com <i>smartphones</i> | 57 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.1 – Construção do módulo de aquisição de imagens | 57 |
| 4.3.2 – Procedimento de aquisição das imagens | 59 |
| 4.4 - Procedimentos para comparação dos resultados..... | 59 |
| 5 - Resultados e discussão | 60 |
| 5.1- Testes iniciais com o instrumento proposto em batelada | 60 |
| 5.1.1- Espectro de emissão do LED utilizado | 60 |
| 5.1.2 - Espectro de transmitância do filtro utilizado | 61 |
| 5.1.3- Teste de estabilidade do circuito. | 63 |
| 5.1.4 - Testes iniciais com rodamina B | 65 |
| 5.1.5 - Testes iniciais com Brometo de Etídio..... | 68 |
| 5.1.6– Avaliação do sistema de detecção no monitoramento da degradação de BE | 70 |
| 5.2 - Resultados obtidos com a implementação de sistemas em fluxo. | 73 |
| 5.2.1- Testes iniciais com rodamina B em sistema de análise por injeção em fluxo | 73 |
| 5.2.2- Testes iniciais com brometo de etídio em sistema de análise por injeção em fluxo..... | 80 |
| 5.2.3 – Abordagem de fluxo <i>Stopped-flow</i> | 83 |
| 5.2.4 - Sistema de decisão | 88 |
| 5.3 – Sistema de detecção alternativo | 93 |
| 5.4 - Determinação de BE em amostras residuais..... | 96 |
| 6 - Conclusões | 102 |
| Bibliografia..... | 104 |

Lista de Siglas e Acrônimos

UnB – Universidade de Brasília

BE – brometo de etídio

LED - *Light Emitting Diode* (Diodo Emissor de Luz)

RSS – Resíduos de Serviços de Saúde

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

RNA - *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

GRP - Comissão de Gerenciamento, Tratamento e Destinação de Resíduos Perigosos da Universidade de Brasília.

PES – Polietersulfonas

AA – Amarelo de Acridina

COT – Carbono Orgânico Total

LCD - *Liquid Crystal Display* (display de cristal líquido)

Lab-made – laboratory made (feito no próprio laboratório)

CD – *Compact Disc*

LEAF - *Laser Excited Automatic Fluorimeter*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

NASBA - *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*

AFM1 – Aflotoxina M1

FIA - análise por injeção em fluxo

PTFE – Politetrafluoretileno

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

CMOS – semicondutor metal-óxido complementar

CCD - Dispositivo de carga acoplada

HPA - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

DVD - *Digital Versatile Disc*

Pixel - *Picture Element*

RGB - Vermelho (*Red*), Verde (*Green*) e Azul (*Blue*)

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massas

GAC - *Green Analytical Chemistry*

PIC - *Peripheral Interface Controller* (Controlador de Interface Periférica)

TBE – Tampão tris(hidroximetil)aminometano, ácido bórico e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)

TBS – Tampão Tris(hidroximetil)aminometano e cloreto de sódio

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estruturas da Fenantridina (a) e do brometo de etídio (b). | 8 |
| Figura 2 - Reação de degradação do BE proposta por Lunn e Sansone. ⁵³ | 16 |
| Figura 3 - Diagrama de níveis de energia demonstrando o efeito de fluorescência, adaptado da ref. 57. | 17 |
| Figura 4 - Diagrama de blocos para um espectrofotômetro de fluorescência clássico..... | 22 |
| Figura 5 – Descrição final do sistema de fluxo, reator (1), barra magnética para agitação (2), bomba peristáltica (3), vaso para carreador (4), Bomba solenoide (5), confluência de acrílico (6), tubulação de entrada para cubeta de fluxo no compartimento de detecção do instrumento (7), tampa para o compartimento de detecção do instrumento (8), chave liga/desliga do instrumento (9), chave seletora de funcionamento calibração/leitura do instrumento (10), botão iniciar (11), visor LCD (12), tubulação de saída da cubeta de fluxo (13) e agitador magnético para o reator (14)..... | 43 |
| Figura 6 - Fotografia do sistema de detecção acoplado ao sistema de fluxo utilizado para a detecção de BE em amostras de resíduos laboratoriais. | 43 |
| Figura 7 - Disposição geral da célula de medida. Célula de Fluxo (CF), fotodiodo (PD) e filtros (F) e a direita foto da célula de fluxo utilizada..... | 45 |
| Figura 8 – Componentes usados para construção do fluorímetro. Fotodiodos (a), filtro de cor alaranjada (b). LED aceso (c) e LED apagado (d). | 45 |
| Figura 9 - Compartimento da cubeta de fluxo com os componentes fixados no bloco de metal utilizados no instrumento proposto..... | 46 |
| Figura 10 - Circuito proposto por Borges <i>et. al.</i> ¹¹² responsável pela soma e amplificação dos sinais adquiridos pelos fotodiodos e o envio destes à entrada analógica do microcontrolador PIC 16F877A..... | 47 |
| Figura 11 - Circuito implementado para o controle do sistema de fluxo, da aquisição dos sinais, do tratamento dos dados adquiridos e informação das leituras através do visor LCD ou por comunicação via porta serial RS232. ... | 49 |
| Figura 12 - Circuitos confeccionados para o fluorímetro proposto com as indicações dos circuitos para detecção, controle central do instrumento, circuito de controle da bomba peristáltica e circuito de controle da bomba solenoide. | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 - Visão geral do equipamento de fluorescência, detalhes do visor LCD com botão “Iniciar” (A), célula de fluxo em suporte metálico (B), chave liga/desliga (C) e chave seletora “calibração/medida” (D). | 51 |
| Figura 14 - Fluxograma simplificado do algoritmo embarcado no microcontrolador PIC16f877A do fluorímetro. | 53 |
| Figura 15 - Módulo de madeira confeccionado para abrigar o suporte de cubetas e o LED para aquisição de imagens com o celular. | 57 |
| Figura 16 - Vistas do suporte de cubetas utilizado no sistema de aquisição de imagens. | 58 |
| Figura 17 - Espectro de emissão luminosa, obtido experimentalmente, do LED verde utilizado na construção do fluorímetro proposto. | 60 |
| Figura 18 - Espectro de transmissão do polímero usado como filtro para o fluorímetro | 62 |
| Figura 19 - Espectros normalizados para excitação e emissão do BE, emissão do LED e transmitância do filtro aplicado. | 63 |
| Figura 20 - Testes de estabilidade para circuito de detecção com leituras no modo escuro (LED apagado) e modo claro (LED aceso). | 64 |
| Figura 21 - Estabilização do LED usado como fonte no fluorímetro proposto.. | 65 |
| Figura 22 - Espectros de absorção e emissão para rodamina B. | 66 |
| Figura 23 - Curva analítica para rodamina B adquirida com o fluorímetro construído. | 67 |
| Figura 24 - Curva analítica para rodamina B obtida no fluorímetro em um fluorímetro comercial de bancada | 67 |
| Figura 25 - Espectros de excitação e emissão para uma solução $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BE adquirida em um espectrofluorímetro comercial, sem adição de DNA e com adição de DNA. | 68 |
| Figura 26 - Variação da fluorescência de uma solução $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Brometo de Etídio quando na ausência e na presença de DNA adquirido no fluorímetro construído. | 69 |
| Figura 27 – Variação do sinal de fluorescência para adições sucessivas de BE em um meio tamponado e com presença de DNA no instrumento proposto. .. | 70 |
| Figura 28 - Curva analítica utilizada para a determinação das concentrações de BE no experimento de titulação de uma solução de BE com nitrito de sódio. ... | 72 |

| | |
|--|----|
| Figura 29 - Evolução da redução da concentração de BE durante o processo de degradação conforme as adições das alíquotas da solução de nitrito de sódio. Concentrações determinadas a partir da curva analítica da Figura 28. | 72 |
| Figura 30 - Diagrama do sistema de análise por injeção em fluxo utilizado. Bomba peristáltica (BP) com indicação das vazões em mL min ⁻¹ , injetor proporcional (IP) com alça de amostragem (AA) de 0,5 mL, solução tampão (ST), solução de analíto (SA), detector fluorimétrico proposto (DF) e descarte (D). | 73 |
| Figura 31 – Fiagrama para solução de rodamina B para as condições do experimento..... | 74 |
| Figura 32 - Fiagrama para curva analítica realizada nas condições de fluxo propostas pela figura 30..... | 75 |
| Figura 33 - Célula de fluxo <i>labmade</i> confeccionada como alternativa a cubeta de fluxo comercial utilizada nos testes preliminares de fluxo. | 76 |
| Figura 34 - Fiagrama obtido para as leituras da curva analítica realizada com cela <i>labmade</i> | 77 |
| Figura 35 - Curvas analíticas obtidas para as soluções padrão de BE adquiridas por FIA para a cubeta de fluxo comercial e a célula de fluxo <i>labmade</i> | 77 |
| Figura 36 – Fiagrama para solução de rodamina B utilizada nos experimentos de verificação da influência dos reagentes no sistema de fluxo proposto..... | 79 |
| Figura 37 - Fiagrama do teste inicial em fluxo para o BE usando as mesmas condições de fluxo aplicadas nos testes anteriores. | 80 |
| Figura 38 - Curva analítica obtida a partir das alturas dos picos do fiagrama da figura 37 | 81 |
| Figura 39 - Fiagrama obtido para o BE nas condições de FIA aplicadas e com adição de DNA ao fluido carreador. | 82 |
| Figura 40 - Diagrama do sistema Stopped-flow proposto para a detecção do BE. | 84 |
| Figura 41 - Leitura do sinal de estabilização da reação de intercalamento entre o DNA do fluido carreador e o BE na cela de fluxo. | 85 |
| Figura 42 – Respostas do instrumento a injeções do padrão de 50 mg L ⁻¹ em modo <i>stopped-flow</i> | 86 |

| | |
|--|-----|
| Figura 43 - Sinais obtidos com o instrumento proposto para as soluções padrões de BE. As barras correspondem às injeções de ambientação e limpeza..... | 87 |
| Figura 44 - Curva analítica plotada a com a média das alturas dos sinais obtidos a partir dos sinais encontrados na figura 43. | 87 |
| Figura 45 - Curva de calibração do instrumento (losangos azuis) e respostas do instrumento para as soluções utilizadas no teste (asteriscos marrons). Rótulos dos dados indicam (concentração fornecida ; sinal lido). | 90 |
| Figura 46 - Curva analítica para estimativa dos erros relativos entre a regressão linear com Excel e o sistema de calibração do instrumento. | 91 |
| Figura 47 - Curva de comparação entre os resultados de concentração fornecidos pelo instrumento proposto e as concentrações fornecidas pela regressão linear utilizando o Excel. Concentração de brometo de etídio [BE] em mg L^{-1} | 92 |
| Figura 48 - Variação dos sinais R, G e B para os estudos iniciais com os padrões de 1,0 a 20,0 mg L^{-1} de BE..... | 93 |
| Figura 49 - Imagens da variação da coloração emitida pelo BE com o aumento da concentração..... | 94 |
| Figura 50 - Curva analítica obtida através da análise das imagens dos padrões de BE | 94 |
| Figura 51 - Curva analítica determinada no fluorímetro comercial (Cary-Eclipse)..... | 95 |
| Figura 52 - Curva analítica determinada para os padrões de BE no fluorímetro proposto (LED). | 95 |
| Figura 53 - curvas de comparação entre os resultados obtidos para o Fluorímetro comercial versus o Fluorímetro LED proposto (a) e o uso do celular (b). Concentrações de brometo de etídio [BE] em mg L^{-1} | 100 |

Índice de tabelas

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Dados e informações relacionadas ao BE. ²⁴ | 9 |
| Tabela 2 - Listagem dos métodos de degradação avaliados por Lunn e Sansone para tratamento de soluções de BE. Concentrações de soluções de BE de 500 mg L ⁻¹ | 14 |
| Tabela 3 - concentrações finais dos sais envolvidos na produção do tampão TBE pH 8,4..... | 38 |
| Tabela 4 - Diluição das amostras de resíduos dopadas utilizadas para avaliação das abordagens de determinação de BE testadas..... | 41 |
| Tabela 5 - Especificações dos materiais utilizados para a construção do sistema de fluxo. | 44 |
| Tabela 6- Informações das leituras obtidas dos testes de claro e escuro | 64 |
| Tabela 7 - Resultados obtidos para o teste do sistema de decisão do instrumento proposto..... | 89 |
| Tabela 8 - Descrição dos erros relativos entre as concentrações de referência, as concentrações estimadas pela curva analítica (Excel) e os resultados fornecidos pelo instrumento proposto. | 91 |
| Tabela 9 - Dados de regressão para curva de comparação da figura 48..... | 92 |
| Tabela 10 - Diluição das amostras de resíduos dopadas para leitura nos instrumentos..... | 97 |
| Tabela 11 - Dados das curvas analíticas obtidas para a determinação do BE nas amostras reais dopadas. | 97 |
| Tabela 12 - resultados de concentração obtida para as amostras de resíduos determinadas pelos equipamentos testados. | 98 |
| Tabela 13 - Concentrações e desvios padrões estimados para as concentrações de 2,5 mg L ⁻¹ dos padrões lidos..... | 98 |
| Tabela 14 - Resultados dos testes de variância e de comparação dos resultados obtidos | 99 |
| Tabela 15 - valores recuperados para as amostras analisadas concentração e erro relativo ao valor de referência..... | 100 |
| Tabela 16 - Dados da regressão referente ao gráfico da figura 53a - comparação entre o Fluorímetro comercial e o Fluorímetro LED..... | 101 |

Tabela 17 - Dados da regressão referente ao gráfico da figura 53b -
comparação entre o Fluorímetro comercial e o as análises utilizando o celular.
..... 101

1 - Introdução

A questão do gerenciamento dos resíduos gerados não é um problema atual e vem há tempos afligindo os seres humanos. Na época dos antigos romanos a extração e processamento de metais por fusão causavam graves problemas de contaminação ambiental.¹ Nos dias de hoje, essa questão envolve praticamente todas as atividades humanas, desde a produção industrial^{2,3} até os resíduos domiciliares,^{4,5} e tem sido objeto de estudo de diferentes áreas do conhecimento^{6,7} sendo também foco de diversas legislações.⁸

Na área acadêmica, a problemática dos resíduos também tem sido amplamente discutida.^{9,10} Com o objetivo de gerar novos materiais e novos conhecimentos, os laboratórios de pesquisa, de uma maneira geral, costumam produzir ao fim dos seus processos uma quantidade considerável de resíduos perigosos.¹¹ Nesse sentido, visando diminuir o impacto de suas atividades científicas no ambiente, a Universidade de Brasília (UnB) criou em 2002 uma comissão para o gerenciamento de resíduos, sendo um dos seus principais objetivos a implantação e estabelecimento de uma unidade de tratamento de resíduos. Atualmente, esta comissão trabalha com os principais resíduos perigosos da UnB e vem, apesar dos problemas com espaço, iniciando o tratamento dos resíduos gerados visando à diminuição dos custos de descarte para a universidade.

De fato, a comissão de resíduos da UnB tem oferecido um serviço de recolhimento dos resíduos perigosos gerados pela universidade, procedendo com a segregação dos produtos e reaproveitamento dos reagentes descartados além da organização de todo o processo de destinação ambientalmente correta. Apesar disso, pode-se considerar que os serviços oferecidos são ainda relativamente limitados, uma vez que muitos processos que poderiam ser realizados com os resíduos recebidos dependem de uma estrutura física e instrumental adequada para a sua realização. Muitas

substâncias consideradas perigosas poderiam ser transformadas em espécies de menor periculosidade ou mesmo convertidas em materiais inertes, minimizando os custos para a destinação final do resíduo. Entretanto, a maioria destes procedimentos envolvem reações químicas que precisam ser monitoradas principalmente com relação à verificação da eficiência dos tratamentos e para garantir que o que está sendo tratado e descartado não é também agressivo ao ambiente. Este monitoramento é, muitas vezes, impraticável em uma unidade de tratamento de resíduo por necessitar de espaço físico laboratorial adequado, recursos humanos e de equipamentos/instrumentos de custo relativamente elevado para a realização das análises químicas.

Com relação à necessidade de instrumentação analítica, a literatura mostra que existem instrumentos de baixo custo que podem ser fabricados no próprio laboratório (instrumentos *labmade*) e aplicados em determinações analíticas com eficiência adequada para muitas aplicações.¹² Estes instrumentos surgem como uma alternativa para atender as necessidades de análise e monitoramento de reações utilizadas em tratamentos de resíduos, pois minimizam os custos para a sua aquisição sem perda da confiabilidade dos resultados obtidos.

Paralelo a estas observações, verifica-se que resíduos contendo a substância brometo de etídio (BE) são gerados com bastante frequência, sendo a mesma considerada de elevada periculosidade. Seu tratamento pode ser realizado no próprio local de geração ou na unidade de tratamento de resíduos a partir de procedimentos simples de oxidação, acompanhado do monitoramento da fluorescência da substância a fim de verificar a taxa de degradação aos níveis considerados seguros ao descarte. Todo o procedimento envolve a manipulação da substância por pessoal treinado, o qual é exposto aos riscos inerentes.

No presente trabalho, foi proposto um sistema automatizado para o monitoramento de reações de degradação de BE com o objetivo de minimizar o contato do pessoal envolvido durante a execução do processo de tratamento do referido resíduo. Para isto, uma estratégia de análise em fluxo com

detecção por fluorescência foi avaliada empregando-se instrumentação *labmade* de baixo custo e de fácil manuseio.

2 - Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

1. Construir e avaliar um fluorímetro à base de diodos emissores de luz (LED) e fotodiodos para a determinação quantitativa de brometo de etídio em soluções aquosas.
2. Desenvolver e um sistema de análise em fluxo acoplado ao sistema de detecção fluorimétrico para monitorar a degradação de soluções residuais de BE.
3. Gerenciar as operações dos sistemas de análise em fluxo e de detecção a partir de um microcontrolador com programação embarcada.
4. Definir e verificar o funcionamento de um algoritmo para avaliação dos dados obtidos e tomada de decisão com relação ao andamento do processo de degradação de BE.
5. Verificar o potencial analítico de um sistema fluorimétrico baseado em excitação com radiação de um LED e imagens digitais como ferramenta para a quantificação de BE.

3 - Revisão bibliográfica

3.1 - Resíduos de laboratório

Durante muito tempo o Brasil não apresentava uma legislação atuante no tocante ao gerenciamento de resíduos de qualquer esfera. Esta situação foi alterada em 2010 com a promulgação da LEI 12.305/2010 que instituiu o plano nacional de gerenciamento de resíduos sólidos. Essa legislação englobou e tipificou vários tipos de resíduos com um enfoque mais rígido em resíduos considerados perigosos.^{8,13} Os resíduos de laboratórios de pesquisa ficaram enquadrados como resíduos de serviços de saúde (RSS) sujeitos as normatizações de manejo do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 358/2005¹⁴ e da RDC 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).¹⁵ Em colaboração, estes dois órgãos elaboraram este conjunto de normas visando à proteção da saúde e do meio ambiente.

Apesar desses avanços, a questão dos resíduos de laboratórios, assim como dos outros resíduos, foi negligenciada durante muito tempo. Em 1997, Jardim¹⁶ já chamava a atenção para esta questão e apontava as preocupações da sociedade e as contradições no posicionamento das universidades em relação aos resíduos gerados em suas atividades. Primeiramente, as universidades ignoravam a existência do problema e contraditoriamente avaliavam e responsabilizavam terceiros em questões de degradação do ambiente. Nessa época, Jardim apontava também a necessidade das universidades implantarem sistemas de gestão dos seus resíduos perigosos.

No editorial da revista Química Nova volume 28 No. 1 de 2005, são identificados vários problemas no gerenciamento dos resíduos das universidades destacando algumas características destes resíduos. Neste documento, relata-se que os resíduos das universidades são gerados em grande quantidade e em grande variedade, de modo que essa diversidade leva a geração de materiais muito tóxicos, os quais são muitas vezes estocados e

descartados de maneira incorreta. O editorial levanta ainda a questão de que as instituições de ensino estão alheias às mudanças e de que a problemática dos resíduos não é vista nos processos de criação de materiais e produtos tecnológicos. O editorial elenca vários esforços em centros de pesquisas e universidades, assim como eventos (congressos e simpósios) com enfoque na área de gestão de resíduos. Este se encerra com um documento intitulado “*A carta de Niterói*” cujo intuito era alertar as várias esferas da administração pública, visando a criação de ações para o gerenciamento dos resíduos perigosos nos centros de pesquisa e universidades.¹⁷

Nolasco e colaboradores¹⁸ fazem uma revisão na literatura das instituições de pesquisa que já possuem um sistema de gerenciamento de resíduos perigosos. Neste trabalho é mostrado que as instituições de ensino estrangeiras já se preocupavam com o problema desde a década de 1970 e que no Brasil tal preocupação só começa a se apresentar na década de 1990. Os autores apresentam ainda um conjunto de regras básicas para a implantação de um programa de gestão de resíduos nas universidades, as quais são listadas a seguir:

1. Responsabilização do gerador e inventário que ilustre os resíduos gerados na instituição;
2. Respeito à hierarquia da gestão de resíduos;
3. Correta segregação e identificação dos resíduos;
4. Armazenamento temporário de forma adequada com o uso de recipientes adequados e bem identificados;
5. O tratamento, local ou externo, deve obedecer às normas e legislações;
6. A segurança é fundamental, as operações devem ser feitas de forma a se evitar acidentes que levem a danos materiais, ambientais e pessoais;
7. O processo educacional é fundamental. O uso de ferramentas de divulgação é necessário e bem vindo.

Nolasco ainda enumera as vantagens da implantação de um plano de gerenciamento de resíduos. Dentre eles estão: redução de gastos com

reagentes e destinação final, redução do armazenamento, desenvolvimento de pesquisas e pessoal especializado.

Nascimento e Filho¹⁹ também exaltam a formação de pessoal e a questão da segurança que um sistema de gestão de resíduos perigosos pode trazer. O seu trabalho traz uma extensa descrição da legislação envolvida na questão dos resíduos perigosos com principal enfoque nas resoluções RDC 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e na resolução CONAMA 358/2005, resoluções que são voltadas para o descarte de Resíduos de Serviços de Saúde. Um grande problema em relação a estas normas é que elas não são detalhistas o suficiente para a gestão de resíduos de laboratório em instituições de ensino e não leva em conta a diversidade de materiais que podem ser gerados como resíduos nestes locais. Porém, estas normas são utilizadas como referências e servem de bases para as legislações ambientais que são vigentes no país.

A Universidade de Brasília é foco de um trabalho que faz o diagnóstico sobre a gestão de seus resíduos perigosos. Imbroise e colaboradores²⁰ realizaram este diagnóstico no período de 2002 a 2005. No trabalho é mostrado um histórico da gestão de resíduos com marcos legais ou não, que aconteceram na história do gerenciamento de resíduos na UnB. Fatos que mostraram desde um sistema de coleta e procedimentos de armazenagem incorretos até uma remoção de maneira inadequada de resíduos realizada pela administração da UnB em conjunto com o governo do Distrito Federal. As práticas descritas no trabalho são corriqueiras e acontecem de modo geral em várias outras instituições de ensino e órgãos da administração pública. O diagnóstico deixa evidente a dificuldade para a implantação de um sistema de gestão de resíduos, mas mostra também que um sistema bem estruturado pode trazer benefícios como a recuperação de insumos e redução do quantitativo para destinação final, situações que levam a uma economia considerável. Assim como Nolasco e colaboradores,¹⁸ Imbroise e colaboradores também citam a questão de pesquisa e formação de pessoal como sendo vantagens que advém de um programa de gestão de resíduos perigosos.

3.2 - O Brometo de Etídio (BE)

O Brometo de Etídio (BE) é uma substância pertencente a uma classe de derivados da fenantridina. Estes derivados foram sintetizados por Pictet and Hubert e posteriormente sua síntese foi aperfeiçoada por Morgam, Walls, Browning, Gulbranson e Robb em 1938,²¹ os quais também demonstraram suas características antibióticas que permitiam sua aplicação para o tratamento de infestações por tripanossomos. Os derivados fenantranílicos foram muito utilizados em tratamento de animais contaminados por este tipo de parasitas.²² A fenantridina é usada como esqueleto base para a síntese de vários compostos, semelhantes mas com eficiências diferentes no tratamento de infestações por tripanossomos. Woolfe²³ demonstrou em seu trabalho que a eficiência dos compostos sintetizados é alterada de acordo com os grupos que ocupam a posição do sal de amônio quaternário. Na Figura 1 pode-se observar as estruturas do esqueleto base da fenantridina(a) e do brometo de etídio(b). Na tabela 1 são expostos outros dados relativos ao BE

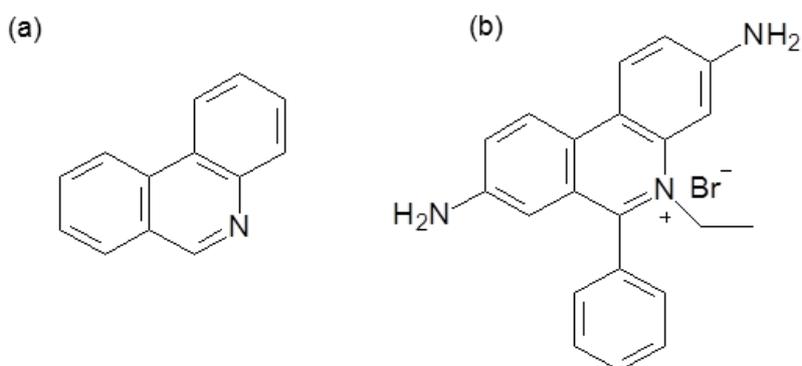


Figura 1 - Estruturas da Fenantridina (a) e do brometo de etídio (b).

Tabela 1 - Dados e informações relacionadas ao BE.²⁴

| | |
|----------------------|---|
| Nome IUPAC | Brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridínio |
| Sinônimos | Brometo de 2,7-diamino-10-etil-6-fenilfenantridínio, Brometo de 2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantridínio, Brometo de 3,8-diamino-1-etil-6-fenilfenantridínio, Brometo de 5-etil-6-fenilfenantridino-3,8-diamina, Brometo de etídio, Brometo de homídio, Dromilac, EtBr. |
| Número CAS | 1239-45-8 |
| Fórmula Molecular | C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃ |
| Massa Molar | 394,294 g/mol |
| Aparência física | Sólido vermelho arroxeado |
| Ponto de fusão | 260 - 262 °C |
| Solubilidade em água | ~ 40 g L ⁻¹ |

Posteriormente, foram descobertas propriedades antivirais, devido a sua ação impedindo a síntese de ácidos nucleicos em seres vivos. Os derivados da fenantridina atuam inibindo a ação da DNA polimerase e RNA polimerase porque se ligam ao DNA que serve como fonte de informações para a transcrição.²⁵ Uma característica importante observada por LePect e colaboradores²⁶ foi o aumento considerável da fluorescência destas substâncias, principalmente a do BE, quando estas se ligam ao DNA.

Angerer e Moudrianakis²⁷ realizaram experimentos para averiguar a interação do BE com o DNA e observaram que há uma elevada variação da emissão fluorescente do BE quando este se intercala ao DNA. Os autores sugeriram que o BE se intercala entre os pares de bases da molécula de DNA causando um deslocamento do espectro de emissão e aumento do rendimento quântico.

Olmsted III e Kearns²⁸ atribuíram à variação do rendimento quântico do BE intercalado ao DNA, ao efeito blindagem que acontece durante o processo. Quando intercalado entre as bases não é possível ao BE interagir com o solvente do meio e assim a sua estabilização por transferência de prótons excitados é diminuída. Os pesquisadores chegaram a esta conclusão por experimentos variando solventes próticos e apróticos e com o uso de RMN em meio deuterado.

Xueguang e colaboradores²⁹ estudaram a interação do Brometo de Etídio com várias formas de DNA (em estruturas duplas, triplas e quadruplas) e encontraram resultados que demonstram o observado por Angerer e Moudrianakis,²⁷ principalmente para a situação de dupla hélice, em que o BE se intercala às bases nucleotídicas na molécula de DNA. Além disso, os autores identificaram outras formas de interação que podem alterar o rendimento quântico do BE quando este não está intercalado ao DNA, o que dependeria da conformação da molécula e da exposição das bases para o intercalamento.

Por conta dessa capacidade para intercalar no DNA e da fluorescência resultante, o BE passou a ser um marcador não radioativo utilizado na identificação e visualização de ácidos nucléicos em eletroforese em gel.³⁰ Por isso, se tornou uma das principais ferramentas para a elucidação de estruturas secundárias e terciárias do DNA. Também devido à essa especificidade para reações com o DNA, o BE é considerado perigoso por apresentar uma toxicidade moderada, mas fortes efeitos mutagênicos e teratogênicos.³¹⁻³⁵

3.2.1 – Resíduos de brometo de etídio e métodos de tratamento para suas soluções residuais.

Devido à capacidade de causar mutações genéticas e a sua relativa toxicidade, este é um resíduo que exige certo cuidado e não pode ser simplesmente descartado de qualquer forma.

Na UnB, os laboratórios que trabalham com este marcador podem proceder de duas maneiras com os resíduos gerados:

1. Enviar para a Comissão de Gerenciamento, Tratamento e Destinação de Resíduos Perigosos da Universidade de Brasília (GRP) para descarte de maneira adequada.

2. Tratar *in loco* para descarte no próprio laboratório.

A segunda opção é, sem dúvida, a melhor, pois além de diminuir a carga de resíduos para GRP leva a uma redução de custos e do tempo de tratamento, pois muitas vezes as soluções residuais apresentam baixas concentrações em volumes elevados. Geralmente devido à desinformação em relação aos procedimentos de tratamento ou por insegurança em relação a sua execução (falta de formas de verificar a conclusão da reação), ou mesmo por comodidade os geradores usam a primeira opção.

Na literatura são encontrados alguns trabalhos relativos ao tratamento de soluções residuais contendo BE. De maneira geral, os principais tratamentos envolvem a transferência de fase da substância do meio líquido para um suporte sólido ou a oxidação do composto por diferentes estratégias. A seguir, são apresentados alguns destes trabalhos.

Iwata e colaboradores³⁶ reportam a imobilização de DNA em filmes que podem ser usados como filtros para BE e outros agentes intercalantes. Usando o mesmo conceito de filtros Yamada e colaboradores³⁷ usaram resíduos de DNA descartado para a produção de um filme que retêm substâncias intercalantes. Yamada utilizou a radiação ultravioleta para induzir o crescimento dos filmes, o que acarretava no aumento da massa molecular que por sua vez levava a insolubilidade do filme. A partir do filme insolúvel é possível se fabricar os elementos filtrantes.

Ainda usando o DNA como reagente ativo para sequestro dos materiais intercalantes Zao e colaboradores³⁸ partiram para imobilização do DNA em partículas porosas de Polietersulfona (PES). Assim, os pesquisadores desenvolveram microesferas do material com alta porosidade conferindo uma grande superfície de contato e uma grande absorção de BE. Para os testes, foram utilizados dois compostos, o próprio BE e outro agente intercalante o Alaranjado de Acridina (AA). Os autores reportaram uma redução de 56% (de 80 µmol/L para 35 µmol/L) para o BE e redução de 66% (de 80 µmol/L para 27 µmol/L) para o AA. Os autores ainda aplicaram a outros poluentes como desreguladores endócrinos. Para estes, o resultado foi mais satisfatório

indicando que as microesferas funcionalizadas com DNA tem boa aplicabilidade para remoção de substâncias tóxicas em meio aquoso.³⁹

É importante observar que os trabalhos citados anteriormente, envolvem um processo de transferência de fase do meio líquido para o meio sólido. Apesar de diminuírem a descarga de BE e outros agentes intercalantes para o ambiente ainda precisam que os resíduos gerados (os elementos filtrantes) sejam encaminhados para outros tratamentos posteriores, como o processo de incineração. Considerando esta limitação, outras formas de tratamento também são encontrados na literatura, visando a destruição do BE em meio líquido ou mesmo em meios sólidos.⁴⁰

Faisal e colaboradores⁴¹ sugerem o uso da degradação fotocatalítica usando os chamados processos oxidativos avançados. Os autores utilizaram dióxido de titânio e radiação UV para a degradação do BE e do Amarelo de Acridina (AA). Os resultados indicaram que o processo pode ser aplicado a esses corantes, mas para soluções a baixas concentrações, com cerca de 25 $\mu\text{mol/L}$ para o AA e uma faixa de 0,1 a 0,4 $\mu\text{mol/L}$ de BE. Os autores salientam ainda a necessidade de condições ótimas para que ocorra a degradação para obtenção do resultado desejado, total mineralização das substâncias.

Ádan e colaboradores⁴² apresentam trabalhos onde também aplicam os processos oxidativos avançados usando dióxido de titânio e radiação para a degradação do BE onde eles também salientam a questão da diluição das soluções como limitante do processo de degradação. Em outros dois trabalhos do mesmo grupo, os autores propõem alterações na estrutura do dióxido de titânio através da dopagem do catalisador com ferro. Essa dopagem facilitaria o processo de transferência de elétrons da banda de valência para a banda de condução por proporcionar uma diminuição da energia entre ambas. Assim essa mudança permitiria o uso de radiação solar no processo de degradação. Apesar desta alteração estrutural, os autores reportaram que a degradação alcançada não foi tão eficiente, a degradação do BE se mostrou completa, mas não houve variação significativa na redução do carbono orgânico total. Isto indica que não houve uma mineralização total do composto e que existem resíduos de estruturas degradadas do BE em solução.^{43,44}

Apesar dos estudos de degradação usando processos oxidativos avançados descritos acima, estes métodos ainda não são aplicados pela comunidade que utiliza este marcador. Os protocolos mais aplicados são os descritos por Lunn e Sansone,^{45,46} discutidos a seguir, os quais são aplicados por centros de pesquisa como Embrapa⁴⁷ e universidades pelo mundo. No geral os protocolos sugerem que as soluções a serem tratadas pelo método proposto por Lunn e Sansone estejam em concentrações de no máximo 500 mg L⁻¹ e podem ser descartadas quando estas atingirem um nível de concentração de aproximadamente 10 mg L⁻¹.⁴⁸⁻⁵⁰

Lunn e Sansone⁴⁵ em seu estudo de 1987 testaram diversas formas de tratamento de resíduos. Os procedimentos são apresentados de forma resumida na Tabela 2. Dentre os métodos selecionados, quatro deles utilizam a oxidação com permanganato de potássio, dois métodos utilizam hipoclorito de sódio, um método utilizando liga de níquel-alumínio e um método utilizando ácido hipofosfórico e nitrito de sódio, aplicados a soluções de tampão TBE, e outros tampões comumente utilizados em conjunto com o BE, com concentrações de 500 mg L⁻¹ (0,5 mg mL⁻¹). Os resultados encontrados por Lunn e Sansone indicaram que somente o teste com ácido hipofosfórico e nitrito de sódio foram eficientes na degradação e não apresentaram misturas residuais mutagênicas. Sendo assim, os autores recomendaram esse tratamento para o descarte seguro de soluções residuais contendo BE.

Tabela 2 - Listagem dos métodos de degradação avaliados por Lunn e Sansone para tratamento de soluções de BE. Concentrações de soluções de BE de 500 mg L⁻¹.

| Método | Procedimento |
|--------|---|
| A | 0,13g de permanganato de potássio, 3 mL de solução BE, agitação por 20 horas, descolorir com ascorbato de sódio e neutralizar com ácido acético. |
| B | 0,5g permanganato de potássio. 3 mL de solução de BE, 6 mL de água, agitar por 20 horas, descolorir com ascorbato de sódio e neutralização com ácido acético |
| C | 3 mL de solução de BE, 3 mL de ácido sulfúrico 6 mol/L, 0,25g de permanganato de potássio, agitação por 20 horas, descolorir com ascorbato de sódio e neutralizar com bicarbonato de sódio. |
| D | 3 mL de solução de BE, 3 mL de ácido sulfúrico 5 mol/L, 0,5 g de permanganato de potássio, 20 horas de agitação e descolorir com ascorbato de sódio e neutralizar com bicarbonato de sódio |
| E | 3 mL de solução de BE, 3 mL de hipoclorito de sódio comercial (≈5%), 20 horas de reação, ascorbato de sódio para reduzir o excesso de hipoclorito e neutralização com ácido acético |
| F | 3 mL de solução de BE, 6 mL de solução comercial de hipoclorito de sódio (≈5%), 20 horas de reação, ascorbato de sódio para reduzir o excesso de hipoclorito e neutralização com ácido acético |
| G | 3 mL de solução de BE, basificar com 3 mL de hidróxido de potássio (2 mol/L), 0,3 g de liga de níquel-alumínio, 20 horas de agitação, centrifugar a mistura e neutralizar o sobrenadante com ácido acético. |
| H | 3 mL de solução de BE, 600 µL de solução de ácido hipofosfórico (5%), 360 µL solução de nitrito de sódio (0,5 mol/L), agitação por 20 horas e neutralização com bicarbonato de sódio. |

Fonseca⁵¹ em sua tese de doutorado fez uma investigação em relação ao uso de diversos métodos tratamento de resíduos gerados em laboratórios biológicos. O BE se encontrava entre os tipos de resíduos estudados. Foram testados o método de proposto por Lunn e Sansone (ácido hipofosforoso e

nitrito de sódio), o método de Quilladert e Hofung⁵² (permanganato de potássio e ácido clorídrico), solução de peróxido de hidrogênio 5 mol L⁻¹, o método do hipoclorito de sódio 2% e o reagente de Fenton (peróxido de hidrogênio e íons ferro para geração de radicais hidroxilas). Fonseca utilizou fluorescência para acompanhar as reações de degradação, determinou Carbono Orgânico Total (COT) para acompanhar a mineralização do composto e observar a presença de subprodutos da degradação e o teste de Ames para verificar a toxicidade dos produtos de degradação. Os resultados obtidos demonstraram que em todos os métodos empregados aconteceu a diminuição da fluorescência durante o processo de degradação. O método de Lunn e Sansone obteve um percentual de 87% de degradação para um tempo de 3 dias. Já a redução do COT foi maior para o Reagente de Fenton (84%) e variou de 32 a 58% para os outros tratamentos. Os resultados de COT indicaram que existiam subprodutos de reação no produto final da degradação. Os testes de Mutagenicidade de Ames mostraram que os tratamentos que utilizam hipoclorito de sódio e permanganato de potássio apresentam resíduos finais de degradação com capacidade mutagênica. O método que utiliza peróxido de hidrogênio não apresentou bons resultados, as dosagens utilizadas já causavam a morte dos microorganismos por isto este resíduo final apresentou uma toxicidade elevada às cepas empregadas. Os métodos utilizando reagente de Fenton e o proposto por Lunn e Sansone (ácido hipofosfórico e nitrito de sódio) foram os únicos que não apresentaram resíduos finais mutagênicos, para Fonseca os dois tratamentos são os indicados para aplicação devido a não formação de espécies mutagênicas ao final do processo de tratamento.

Considerando que o tratamento com ácido hipofosfórico e nitrito de sódio é o mais comumente utilizado em vários centros de pesquisa, e que o mesmo apresenta uma notada eficiência na degradação de BE, este será adotado no presente trabalho por ser simples, barato e com reagentes de fácil aquisição.

O mecanismo de reação mais aceito é o proposto pelo grupo de Lunn e colaboradores,^{53,54} onde a reação ocasiona a eliminação dos grupos amina do composto com a clivagem do anel contendo o Nitrogênio, levando a desativação da molécula deixando-a sem a sua capacidade de intercalar.

Como visto nos trabalhos descritos anteriormente este perde sua característica mutagênica e sua toxicidade.

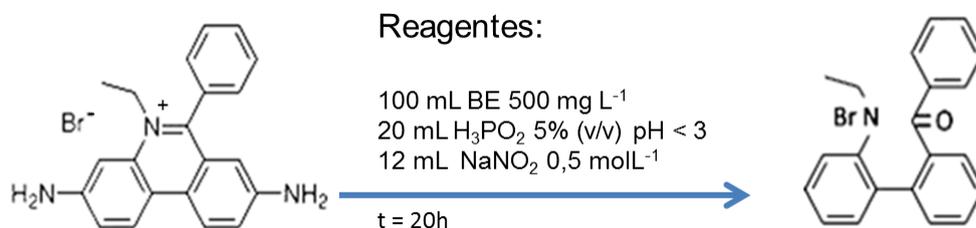


Figura 2 - Reação de degradação do BE proposta por Lunn e Sansone.⁵³

Geralmente em laboratórios de pesquisa o procedimento de detecção do ponto final desta reação é realizado utilizando-se uma fonte de radiação ultravioleta, onde é feita uma rápida verificação visual quanto à presença da fluorescência característica do BE.^{48,55,56}

3.3 - O fenômeno da fluorescência

Por ser um composto fluorescente, e ter sua fluorescência maximizada com a interação com a molécula de DNA, o BE é muito aplicado em sistemas de eletroforese. Sendo a fluorescência um método de detecção muito sensível e com grande seletividade esta se torna uma forma de detecção muito interessante para diversos compostos orgânicos entre eles o BE.⁵⁷

Uma molécula, ao absorver energia dos fótons de uma determinada fonte de radiação, apresenta a tendência de se livrar da carga de energia adquirida. A fluorescência é apenas uma das inúmeras formas que uma molécula tem para liberar essa energia absorvida. O diagrama da Figura 3 mostra como uma molécula pode absorver e perder energia através do

processo de fluorescência. Nesta ilustração, observa-se um típico diagrama de níveis de energia de uma molécula, no qual os níveis energéticos eletrônicos são intercalados pelos níveis energéticos vibracionais. Ao receber energia do fóton de radiação, o elétron da molécula é promovido do estado fundamental para um nível superior (Seta A). Essa energia é, em parte, perdida em processos que não emitem radiação, como a transferência de calor às moléculas mais próximas, chegando ao menor nível de energia do estado excitado, processo expresso pela seta B. Por outro lado também é possível acontecer o processo de perda de energia na forma de emissão de fótons de luz. Este é um processo bastante veloz onde a molécula ao emitir o fóton retorna ao seu estado fundamental (Seta C).⁵⁸

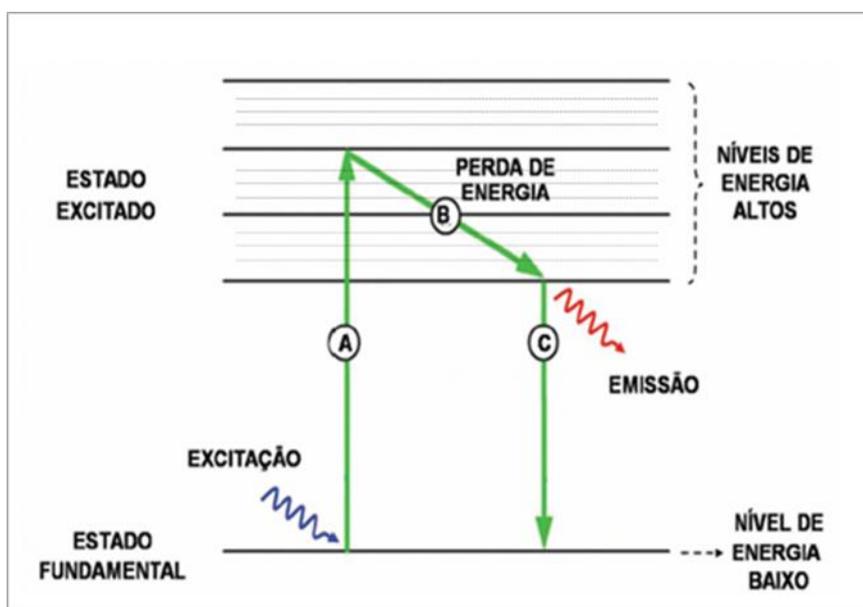


Figura 3 - Diagrama de níveis de energia demonstrando o efeito de fluorescência, adaptado da ref. 57.

A fluorescência se apresenta como uma das técnicas analíticas de maior sensibilidade e seletividade com aplicação nos mais diversos campos.^{59,60} O efeito de fluorescência é bastante utilizado em sistemas de imagem, diagnósticos, identificação de moléculas e outros. O campo de conhecimento que mais se beneficia deste efeito é a biologia que a aplica com maior frequência em seus estudos. Considerando esses aspectos, existe um grande número de trabalhos que utilizam a fluorescência molecular como estratégia de detecção.^{61,62}

3.4 - Instrumentos *labmade* à base de diodos emissores de luz (LED)

LED é a sigla em inglês de *Light Emitting Diode* que em português é traduzido como Diodo Emissor de Luz. Diodos são construídos a partir de materiais semicondutores, geralmente silício ou germânio, onde durante a sua produção são inseridas impurezas que alteram as características da rede cristalina do semicondutor (processo de dopagem). Do processo de dopagem surgem os semicondutores do tipo N ou P. Semicondutores do tipo P são gerados quando a dopagem acontece com elementos que possuem elétrons de valência em número menor que o elemento fundamental da composição da rede cristalina. Este procedimento vai gerar um material com déficit de elétrons na rede cristalina (chamado de lacuna). Já nos semicondutores do tipo N a dopagem é realizada com elementos que apresentam elétrons de valência em número maior que o material base, gerando uma rede cristalina com elétrons em excesso. A movimentação de cargas nos semicondutores do tipo P acontece com a movimentação das lacunas na rede cristalina, já nos semicondutores do tipo N a corrente é facilitada pela movimentação dos elétrons extras.⁶³

Para a construção dos LED são dispostos dois semicondutores um do tipo N e outro do tipo P. A região de contato entre os dois semicondutores é chamada de junção P-N. Nos LED a ligação é feita com a polarização direta, ou seja, lado P ligado ao polo positivo da bateria e o lado N ligado no polo negativo da bateria. Desta forma as lacunas e os elétrons livres se movimentam em direção à junção P-N e os elétrons livres (mais velozes) da área N ultrapassam a junção P-N para se recombinarem com as lacunas (mais lentas) da área P. Dependendo da composição dos semicondutores o efeito pode ser a geração de calor ou a emissão de radiação luminosa, como no caso dos LED.⁶⁴

A ideia de se construir instrumentos analíticos que funcionam de maneira similar aos comerciais de bancada não é nova. A literatura mostra que

os chamados instrumentos *labmade* podem funcionar de forma plenamente satisfatória para algumas aplicações, fornecendo informações de elevada confiabilidade a um custo significativamente baixo. Geralmente, estes instrumentos são desenvolvidos de forma dedicada, permitindo a determinação de um único analito ou de uma classe de analito, o que os tornam menos versáteis que os instrumentos convencionais. Entretanto, para aplicações de rotina, em que um único analito é determinado inúmeras vezes para o mesmo tipo de amostra, pode-se afirmar que os instrumentos *labmade* representam uma alternativa bastante elegante.^{65,66}

São exemplos clássicos deste tipo de instrumentação os fotômetros e fluorímetros baseados em diodos emissores de luz (LED) e fotodiodos, nos quais a fonte de radiação e o sistema monocromador ou filtros são substituídos por um LED que é capaz de emitir radiação com boa monocromaticidade (aproximadamente 20 nm) e com elevada intensidade de radiação. A literatura mostra que este tipo de instrumento pode ser aplicado com sucesso à determinação de muitos analitos a um custo bastante inferior aos fotômetros/fluorímetros comerciais, o que os torna uma opção atrativa para muitas aplicações.⁶⁷

Em Química Analítica, os equipamentos *labmade* junto com o desenvolvimento da microeletrônica vêm levando a miniaturização, que tem sido aplicada com objetivo de melhoria da eficiência dos processos de análise, no que se refere à economia de insumos, diminuição da quantidade de amostra, redução no tempo de rotina analítica e redução na geração de resíduos, o que proporciona uma elevada redução nos custos e favorece o atendimento da chamada química verde.^{68,69}

Peterson e colaboradores,⁷⁰ em 1974, descreveram a construção *labmade* de um fluorímetro para medidas de reações bioquímicas. O instrumento era capaz de processar automaticamente as amostras (adição de reagentes e processamento de sinal) e distinguir variações de sinal de fluorescência de até 1%. Porém, devido aos avanços da época o equipamento apresentava um elevado tamanho e usava partes de alto custo em sua confecção, sendo uma montagem com peças disponíveis na época.

Graças aos avanços tecnológicos que levaram ao aperfeiçoamento dos diodos emissores de luz (LED), microcontroladores programáveis, fibras óticas, entre outros, houve uma redução de custos na produção de instrumentos, levando a construção de diversos sistemas *labmade* em vários tipos de aplicações, inclusive em análises diretas e aquisição de informações em sistemas vivos.⁷¹⁻⁷³ Com estes avanços foi possível também reduzir o tamanho efetivo dos instrumentos, tornando-os portáteis, o que é muito interessante para diversas áreas, como indústrias químicas, defesa contra o terrorismo, proteção ambiental, saúde, etc. Nestes casos, características importantes como resistência a variáveis físicas (umidade, temperatura, pressão) e/ou a variáveis químicas (vapores corrosivos ou vapores orgânicos) e o consumo reduzido de energia devem ser levados em consideração nos projetos. As fontes de alimentação devem ser estáveis e duráveis e este é um dos principais obstáculos na construção destes equipamentos. Apesar disto, com o desenvolvimento da microeletrônica (processadores, microcontroladores, detectores e fontes de alta eficiência energética tem sido produzidos) essa barreira tem sido cada vez menor. Outro fator importante é que os equipamentos *labmade*, por apresentarem menor complexidade, exigem menos treinamento dos operadores envolvidos.⁷⁴

Cantrel e Ingle⁷⁵ propuseram um fotômetro portátil. O instrumento utiliza um LED como fonte de radiação, é alimentado por bateria e controlado por um microcontrolador, o qual, através de uma rotina programada, controla a fonte, a aquisição dos dados e seu armazenamento em uma memória que pode ser acessada por um computador para a posterior extração e tratamento da informação. O objetivo do trabalho foi utilizar o instrumento em campo, monitorando e coletando os dados em reações do tipo Red-Ox de corantes como Tionina sensíveis a Cr (VI), O₂ ou Fe(II) em sistemas ambientais. Os autores estimaram o custo total do equipamento em US\$ 25 e relatam que o mesmo possui uma grande versatilidade, pois pode ser convertido em um fluorímetro, ou em um equipamento de refletância, ou mesmo realizar medidas de espalhamento, funcionando como um turbidímetro.

Seguindo o mesmo exemplo de equipamentos de baixo custo, Nobrega e colaboradores⁷⁶ construíram um fotômetro multi-LED microcontrolado. A

aplicação do microcontrolador permite um amplo controle das funcionalidades do instrumento, como controles de entrada e saída de dados e outros periféricos diversos. Neste caso, o microcontrolador tinha a função central de controlar a variação dos LED (um de cada cor) através de um pequeno motor de passo que variava as posições de um disco onde se encontravam fixados, desta forma variando os LED que funcionavam como fontes. O microcontrolador realizava a aquisição do sinal do detector e o envio do sinal processado para um *display* de cristal líquido LCD. O instrumento proposto foi testado na determinação de ferro em xaropes farmacêuticos e em aplicações bioquímicas clínicas. Os resultados demonstraram que o equipamento foi bastante eficiente apresentando um desempenho analítico similar ao de instrumentos comerciais.

Veras e colaboradores⁷⁷ desenvolveram um espectrofotômetro com materiais alternativos. A fonte de radiação usada foi um LED branco e como elemento dispersivo foi utilizado um CD. Neste trabalho, o equipamento foi todo controlado por um microcontrolador que comandava a movimentação de um motor de passo, responsável pela variação do ângulo de incidência da radiação no CD (que levava a alteração do comprimento de onda que atingia a cubeta), realizava a aquisição dos dados do detector e os processava enviando para um computador. O espectrofotômetro proposto foi testado e comparado com outros dois equipamentos comerciais para a determinação de corantes alimentares (ex: tartrazina) e na determinação de ferro em soluções orais usando a metodologia da 1-10-fenantrolina. Os resultados apresentados mostraram que para o instrumento proposto o desempenho foi estatisticamente semelhante aos equipamentos comerciais comparados. O instrumento proposto se mostrou simples, barato e de grande versatilidade podendo ser utilizado tanto em rotina como em laboratórios de ensino.

Os exemplos anteriores demonstram o uso de materiais alternativos e de baixo custo na construção de equipamentos analíticos que apresentam eficiências comparáveis aos sistemas comerciais que podem ser desenvolvidos e aplicados em laboratórios. A seguir serão apresentados e discutidos trabalhos sobre o desenvolvimento de equipamentos que detectam a

fluorescência, seja para acompanhar uma reação, para determinar um analíto ou mesmo auxiliar em um diagnóstico.⁷⁸

3.5 – Instrumentos *labmade* para medidas de fluorescência

Um instrumento clássico de fluorescência costuma apresentar a configuração ilustrada na Figura 4, na qual pode-se observar: (a) fonte de radiação, (b) sistema de seleção de comprimento de onda de excitação, (c) suporte para amostra, (d) sistema de seleção de comprimento de onda de emissão, (e) o detector e por fim em (f) o sistema de processamento de dados. Grande parte da energia radiante de um fluorímetro clássico é perdida na parte óptica e são necessárias condições de estabilidade e alinhamento muito precisos, o que limita a portabilidade destes equipamentos.

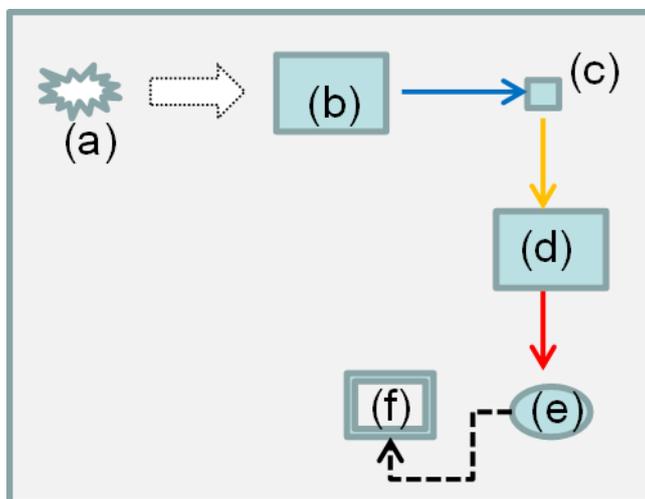


Figura 4 - Diagrama de blocos para um espectrofotômetro de fluorescência clássico.

Para a geração do efeito de fluorescência, vários tipos de fonte de excitação podem ser utilizados. Lâmpadas de xenônio, lâmpadas de vapor de Hg ou *lasers* são as mais empregadas. O comum entre estas fontes citadas é que todas são de alta potência. Quando se utilizam lâmpadas, essa potência é

necessária, pois muita radiação é perdida no processo de seleção de comprimento de onda pela parte óptica do equipamento. Para os *lasers*, embora apresentem alta potência e não necessitem de seletores de comprimento de onda, o problema está no seu elevado custo e na limitação de comprimentos de onda de emissão do laser, o que restringe sua aplicabilidade a um seleto grupo de fluoróforos.⁷⁹ Como exemplo do uso de lasers para fluorescência pode-se citar o trabalho de Mazzinghi,⁸⁰ o qual construiu um instrumento para aquisição da fluorescência emitida pela clorofila de folhas de plantas. O objetivo do autor era averiguar o stress das plantas através da razão dos sinais de fluorescência em 685 e 730 nm. O fluorímetro proposto usava um *laser* de diodo e foi chamado de LEAF (*Laser Excited Automatic Fluorimeter*). Vários testes foram realizados em laboratório com plantas alterando variáveis ambientais para imprimir stress à planta. Os resultados indicaram que o LEAF foi capaz de detectar as diferenças (queda) de fluorescência no sinal em 730nm, indicativo de que a planta estava em estado de stress. O objetivo final do LEAF é sua aplicação em campo.

Considerando as várias possibilidades de fontes de excitação para fluorescência, os diodos emissores de luz (LED) surgem como uma excelente alternativa. Com a evolução da eletrônica e de novos materiais, os LED estão se tornando mais potentes e com real capacidade para substituir as fontes clássicas de fluorescência. O fato de serem baratos, pequenos e consumirem pouca energia tem atraído o seu uso no desenvolvimento de instrumentos de fluorescência, os quais podem ser simples, para o monitoramento de um único analito, ou com configurações mais complexas que utilizam outras modalidades de aplicação da fluorescência para monitorar reações biológicas.^{79,81,82} Além disso, a aplicação de LED com vários comprimentos de onda na construção de equipamentos, em conjunto com ferramentas quimiométricas pode levar a um melhor aproveitamento destes sistemas em diversos campos do conhecimento.⁸³

Vale destacar também que em um fluorímetro com fonte de LED, toda a parte óptica geralmente é adaptada. Os monocromadores de excitação geralmente são substituídos por filtros ou mesmo eliminados (uso de LED monocromáticos) e a detecção da emissão necessita de filtros para seleção do

comprimento. Dessa maneira tem-se maior robustez por existirem menos peças móveis, permitindo uma maior portabilidade.⁷⁹

O uso de LED como fonte de radiação para equipamentos de fluorescência pode ocorrer de diversas maneiras. Farmer e colaboradores⁸⁴ construíram um fluorímetro com sistema de regulação de temperatura. O equipamento usa LED como fonte de radiação e este pode ser trocado de acordo com o analito a ser excitado. O detector utilizado foi um fotodiodo arranjado em um ângulo de 90° para se evitar a radiação da fonte. A seleção do comprimento de onda é feita por dois filtros de banda, um de 485 nm para excitação e outro de 530 nm para emissão. O principal objetivo era usar o equipamento para observar reações sensíveis à temperatura, reações para detecção de DNA, reações de amplificação de ácidos nucleicos (PCR) ou amplificação de ácidos nucleicos sequencial (NASBA). O tamanho reduzido do bloco de aquecimento favorece tanto ao aumento quanto a redução da temperatura de forma mais rápida, melhorando a frequência analítica de reações feitas com variação de temperatura.

Cucci e colaboradores⁸⁵ utilizaram como fonte de radiação um LED (UV $\lambda = 365$ nm) e como detector um tubo fotomultiplicador comercial portátil (PMT-FL *Fialab instruments*). A parte óptica consistia de um filtro de linha para excitação em 365 nm e um filtro de banda de 450 ± 80 nm para a emissão. O objetivo dos autores com este equipamento foi desenvolver um equipamento para detecção de aflotoxina M1 (AFM1) em leite. O equipamento realiza a aquisição do sinal de fluorescência, processando o sinal e enquadra o resultado encontrado em uma das três faixas de concentração de acordo com a legislação italiana. Em concentrações de AFM1 menores de 25 ng.L^{-1} o leite é liberado. Para concentrações entre 25 e 50 ng.L^{-1} o instrumento emite um alerta de atenção pois o leite não pode ser liberado para o público em geral (principalmente crianças que dependem deste tipo de leite). Para a terceira faixa, acima de 50 ng.L^{-1} , o instrumento dá um alerta para rejeição do leite. A ideia do instrumento é ser usado como um controle de qualidade inicial e assim se evitar a mistura de leite inadequado ao leite considerado adequado. Os resultados encontrados indicaram a necessidade de melhorias no sistema. Os

resultados só foram satisfatórios com o uso de intensificadores de fluorescência como o succinil- β -CD.

Outra aplicação na área de alimentos foi proposta por Chang e colaboradores.⁸⁶ Os autores propuseram a construção de uma língua eletrônica para o controle de qualidade de chás. O instrumento proposto é de fácil uso para a determinação de dois componentes em chás, teanina e ácido tânico, os quais são os responsáveis pelas características de adstringência e sabor umami (aveludado) característico dos chás verdes. Para esta determinação foi necessária a derivatização com ftaldeído para a determinação da teanina por fluorescência. Já o ácido tânico foi determinado pela supressão da quimiluminescência do luminol. A comparação do instrumento proposto com um equipamento de bancada demonstrou que a língua eletrônica proposta apresentou um desempenho satisfatório, sendo portátil, de baixo custo e rápida para atestar a qualidade dos chás. Apesar disto, testes devem ainda ser realizados para melhorar a eficiência e deixar o equipamento mais amigável.

Pokrzywmicka e colaboradores⁸⁷ foram mais adiante e construíram um sistema onde os LED servem como fonte de radiação e detectores. Os autores se basearam na propriedade que os LED apresentam de serem sensíveis a radiações eletromagnéticas com energias superiores às radiações que eles emitem, devido ao efeito fotoelétrico interno. Neste trabalho um LED foi usado como fonte e dois LED foram usados como detectores, um orientado em 90° e outro na mesma linha do LED fonte. Deste modo, o arranjo permitiu a aquisição de sinais de absorção e de fluorescência molecular. Os autores utilizaram um pHmetro de bancada para o registro dos sinais gerados pelos LED detectores. Para avaliação do arranjo proposto, foram realizados testes com quinina, visando à sua determinação em amostras de água tônica, a partir dos sinais de fluorescência e de absorbância. Os resultados obtidos se mostraram estatisticamente condizentes com aqueles obtidos pelo método padrão, indicando um bom funcionamento da montagem. Uma vantagem desta estratégia de detecção é a possibilidade de minimizar a influência de interferentes no meio, tais como íons cloreto. Quando estes estão presentes, a fluorescência é suprimida, mas a análise pode ser realizada com o arranjo para absorção, corrigindo este efeito. Este arranjo dos LED como detectores de

fótons é também uma alternativa bastante econômica uma vez que estes componentes eletrônicos são muito mais baratos que a maioria dos fotodiodos.

O mesmo grupo citado no trabalho anterior aplicou o arranjo de LED para construção de um sistema de detecção em fluxo. Tymecky e colaboradores⁸⁸ utilizaram dois LED de maneira integrada como fonte de excitação e detector para fluorescência. Vale destacar que os LED, funcionando como um detectores de fótons, apresentam uma alta sensibilidade a comprimentos de onda menores (mais energéticos) que os comprimentos que eles emitem. Com base nisso, os autores combinaram um LED de 470 nm como fonte de excitação e outro LED de 670 nm como detector. Para os estudos foram utilizados a fluoresceína ($\lambda_{ex}= 490\text{nm}$ - $\lambda_{em}= 521\text{nm}$) como fluoróforo modelo e a calceína para a detecção fluorimétrica de cálcio. Devido à capacidade de resposta rápida do LED como detector, o par foi montado em um sistema automatizado de Análises por Injeção em Fluxo (FIA) de duas formas. Em uma cela de FIA especial para fluorescência e de forma integrada, com os LED fundidos em 45°, e um tubo de teflon (PTFE) passando pela parte central da montagem. Os estudos com a fluoresceína demonstram que o sistema integrado dos LED apresentou uma maior sensibilidade com respostas maiores no diagrama do que a configuração com a cela. Para a determinação de cálcio em águas minerais foram obtidos resultados estatisticamente semelhantes aos do método de referência (titulação complexométrica com EDTA) e dos valores expressos nos rótulos. Os autores concluíram que a integração dos LED levou a uma grande variação no sinal o que favorece a obtenção de menores limites de detecção e possibilita a aplicação a amostras reais com um custo bastante reduzido.

Tedetti e colaboradores⁸⁹ construíram um fluorímetro submersível para determinação de compostos fluorescentes resultantes da dissolução da matéria orgânica em águas naturais. A matéria orgânica é um importante indicador ambiental, pois pode servir como ferramenta para indicar uma possível situação de impacto por poluentes. Sabe-se que a matéria orgânica dissolvida rica em compostos como triptofanos e tirosinas é geralmente de origem natural, enquanto substâncias húmicas e flúvicas são indicadores de matéria orgânica degradada, oriunda de sedimentos dragados. Os hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos (HPA) também são indicadores do tipo de matéria orgânica dissolvida. Com base nessas informações, os autores propuseram um instrumento submersível com dois LED ultravioleta (255 e 280 nm) como fonte de excitação e um fotodiodo de silício precedido por um sistema de seleção de comprimento de onda composto de dois filtros de banda (360 ou 340 nm) como detector. Para avaliação do instrumento, foram escolhidos o fenantreno (indicador de fontes petrogênicas) e uma mistura de compostos com estruturas similares ao triptofano. Os resultados obtidos demonstram que para soluções sintéticas e em condições de laboratório o equipamento apresentou resultados ótimos com curvas analíticas de boa linearidade e limites de detecção de 1,10 µg/L e 0,69 µg/L para fenantreno e triptofanos respectivamente. Para águas naturais de rio, o equipamento não se mostrou tão eficiente para o fenantreno devido às baixas concentrações nas amostras, mas para os triptofanos os resultados foram ao encontro dos resultados obtidos em equipamentos comerciais. Já para amostras de águas de portos, os resultados de fenantreno foram coincidentes com os resultados dos equipamentos comerciais. Os bons rendimentos do instrumento proposto são salientados pelos autores, mas melhorias devem ser feitas para melhorar a captação da radiação e diminuir a interferência de outros fluoróforos. O instrumento se mostrou uma ferramenta útil para o monitoramento em locais onde ocorrem descargas de esgotos ou portos onde a concentração dos compostos alvo são maiores e dentro das faixas de detecção do aparelho.

Na literatura, é comum observar trabalhos que tratam do uso da detecção por fluorescência acoplada em sistemas microfluídicos, especialmente aqueles baseados em eletroforese. Nestes casos, embora seja possível detectar a fluorescência do composto alvo, a principal barreira está relacionada ao foco da radiação proveniente do LED no capilar, de modo que muitos autores têm proposto saídas diferentes para esta limitação. Xu e colaboradores⁹⁰ sugerem a imersão do sistema de excitação e emissão em glicerol para diminuir as diferenças de índices de refração que acontecem entre os componentes ópticos. Já Yang e colaboradores⁹¹ propõem o uso de lentes focais tiradas de equipamentos de DVD para focar a radiação de excitação nos capilares. Outra possibilidade é o uso de um ângulo diferenciado para a coleta

da radiação emitida, como forma de minimizar a influência da fonte na coleta da radiação.⁹² Fica exposto que o uso de materiais alternativos exigem soluções para a melhoria da aquisição de sinal, uma vez que sistemas óticos adaptados ou menos complexos são geralmente utilizados.

3.6 – Medidas ópticas baseadas em imagens digitais.

O uso de imagens digitais vem se popularizando em química analítica, porém a análise de cores já vem sendo aplicada em outros ramos como o da garantia de qualidade, principalmente em áreas como a alimentícia ou forense.^{93,94}

Atualmente vários trabalhos são encontrados na literatura, com o objetivo de se aplicar imagens digitais em química analítica. No geral a maioria aplica o processo de reflectância, onde uma imagem é adquirida por algum tipo de sensor, seja de um equipamento dedicado, como uma câmera fotográfica, seja de um equipamento alternativo, como uma *web-cam* ou câmeras de equipamentos celulares ou *smartphones*.⁹⁵ Nestes equipamentos a radiação emitida pela imagem é captada pelo sensor da câmera e convertida digitalmente para um formato numérico, nesta forma digital a imagem pode ser trabalhada. Para a conversão, os sensores estão dispostos de forma bidimensional, sendo a menor unidade deste arranjo de sensores denominada *pixel*. Desta forma, quanto maior o número e tamanho dos *pixels* melhor é a tradução da imagem para o formato digital, esta é a definição de resolução do sistema de detecção.⁹⁶

Geralmente a aplicação de imagens digitais está associada à utilização das cores da imagem digitalizada e para isto é preciso utilizar um padrão de cores. Brice Bayer, cientista dos laboratórios Kodak, propôs o chamado sistema RGB, onde as cores de uma imagem são oriundas da combinação das cores vermelho (*red* – R), verde (*green* – G) e azul (*blue* – B). Os sensores para aquisição de imagens são arranjos de forma que para cada cor existe um conjunto de sensores responsável pela sua aquisição. Sendo assim, cada

cor é armazenada em uma matriz de dados específica. Este armazenamento é feito em 8 bits totalizando 256 níveis de cores que quando combinados permitem até 16 milhões de cores. Numericamente, ao analisar um ponto da imagem é feita uma decomposição e são obtidos os valores R, G e B separadamente. Os valores de R,G e B variam de 0 a 255, vale ressaltar que este padrão se aplica a faixa visível do espectro eletromagnético que varia de aproximadamente 380 a 730 nm.⁹⁷

Para aquisição das imagens neste trabalho foi utilizada uma câmera de um *smartphone* por isto o enfoque desta seção serão trabalhos que utilizam este tipo de detecção.

Ramanathan e colaboradores⁹⁸ trabalharam em um sistema de análise de aerossóis de carbono da fuligem. Estes são responsáveis por causar problemas ambientais e de saúde na população de grandes cidades. Estes aerossóis são gerados nos processos de queima de combustível como dos veículos automotores. Um dos problemas dos métodos de análise utilizados é que os filtros dos sistemas de amostragem devem ser levados ao laboratório, digeridos e analisados com o uso de um equipamento de alto custo chamado *Aethalometer* ou análises termo óticas que também demandam recursos. Por causa disto um sistema de mais baixo custo e portátil permitiria um acesso mais rápido a estas informações. Para isto, os autores construíram um sistema de amostragem que realiza a filtragem do ar através de um filtro por um período determinado. Ao acumular a fuligem o filtro adquire uma coloração que tem relação com a quantidade de fuligem no ar. A partir de uma imagem destes filtros é possível se decompor as componentes R,G e B. Para a aplicação foi utilizada a componente R por ser a que tem maior variação em relação a quantidade de partículas aprisionadas no filtro. Um desafio enfrentado pelos pesquisadores foi realizar a calibração do método, nesta fase foi preciso utilizar as técnicas estabelecidas para se criar um conjunto de padrões onde se tinha certeza da concentração das partículas de fuligem e a coloração dos filtros. Assim os pesquisadores criaram um modelo matemático a partir dos dados do método padrão e das imagens dos filtros. Assim ao se tirar a fotografia, com celular, de um disco utilizado no amostrador, o modelo matemático realiza automaticamente a decomposição da imagem, aplica o valor da componente R

nas equações e determina a quantidade de material particulado no filtro. Utilizando a análise de imagem os pesquisadores conseguiram correlacionar os valores dos equipamentos padrões com os valores da metodologia desenvolvida, utilizando as imagens digitais e o sistema de amostragem proposto, em análises de material particulado no ar das cidades de Los-Angeles, San Diego e Khairatpa (Índia).

Choodum e Nic Daied⁹⁹ utilizaram uma câmera fotográfica e para adquirir imagens digitais e demonstrou sua aplicação na detecção de drogas opiáceas (morfina, codeína e diamorfina). A ideia foi aplicar a análise das cores oriundas das reações clássicas de identificação destas drogas e desenvolver uma metodologia semi-quantitativa de identificação e análise destes opiáceos. Foram utilizadas duas reações, o teste de Marquis onde as drogas alvo respondem com uma coloração púrpura avermelhada. Já o teste do ácido nítrico produz uma maior variação de cores de acordo com o material avaliado. Para morfina o teste apresenta uma coloração inicial alaranjada e com o passar do tempo vagarosamente passa para cor vermelha e apresenta coloração final amarela. Para codeína se observa inicialmente a cor laranja e uma mudança direta e lenta para amarelo. Por último, a diamorfina apresenta a transição de cor final verde. Os dois testes são realizados para garantir melhores resultados qualitativos para a identificação. Para aquisição das imagens as fotos foram tiradas com as reações em tubos de ensaio e posicionadas em um fundo branco. Todos os experimentos foram realizados em 6 replicatas para averiguar se o tempo de reação, a variação da iluminação ambiente e a forma curva do tubo de ensaio influenciam na aquisição dos dados. Os testes foram realizados primeiramente para a reação de Marquis e estudados os perfis R,G e B. Os resultados obtidos demonstraram que para morfina e codeína a componente G apresentou melhor sensibilidade enquanto que para diamorfina a componente B foi a mais sensível. Já para o teste do ácido nítrico as três substâncias apresentaram baixa sensibilidade para R e G e a componente B foi a mais significativa. A partir dos dados os autores planejaram as curvas analíticas e observaram que quando as informações são convertidas em absorbância, para as três substâncias em estudo as intensidades totais e a faixa linear apresentavam uma melhora significativa. Os autores testaram as

equações geradas pelo método frente a uma amostra real de heroína, os resultados obtidos foram comparados com uma metodologia padrão usando CG-EM. Usando os dados do teste de Marquis e do ácido nítrico foi possível identificar a amostra como sendo diamorfina e usando a componente R do teste de Marquis foi possível obter uma melhor acurácia em comparação com o método padrão. Os autores concluem que o uso de imagens tem um grande potencial para o desenvolvimento de métodos rápidos, portáteis e economicamente viáveis de testes semi-quantitativos de análise destas substâncias.

Balsom e colaboradores¹⁰⁰ utilizaram uma *web-cam* para a detecção da fluorescência. *Web-cams* comerciais se tornaram bastante atrativas por utilizarem sensores de fótons que ficaram mais baratos com o avanço da tecnologia. Normalmente estes sensores são baseados em CMOS (semicondutor metal-óxido complementar), os quais não apresentam uma resposta muito eficiente do ponto de vista analítico. No entanto, essa dificuldade pode ser contornada ao se utilizar ferramentas digitais, tais como o acúmulo de imagens com o objetivo de aumentar a sensibilidade do sistema de detecção. O instrumento proposto foi construído com 5 partes: o detector que consistia da *web-cam* CMOS, uma base para realização de experimentos, a fonte de excitação composta de um LED multicolor e filtros de interferência para excitação, um microcomputador e o software para análise de imagens. Os resultados iniciais encontrados para o fluoróforo fluoresceína mostraram que, para uma imagem simples, o sistema de detecção apresentava um limite de detecção de aproximadamente 1000 $\mu\text{mol/L}$. Já com a utilização do método de estocagem de imagens e com o processamento de imagem, este limite de detecção cai para aproximadamente 30 $\mu\text{mol/L}$. Essa redução é suficiente para que o instrumento proposto seja comparável aos equipamentos que utilizam câmeras CCD de alto rendimento. Este exemplo demonstra que o uso de ferramentas computacionais e de materiais alternativos permite obter instrumentos de elevada eficiência com custos muito reduzidos. Neste trabalho, os autores estimaram o custo do equipamento em aproximadamente US\$100.

Rajendra e colaboradores¹⁰¹ desenvolveram um sistema de imunoenaios onde é possível identificar bactérias patogênicas que se desenvolvem em alimentos. Para isto os autores funcionalizaram sílica dopando-a com anticorpos que respondem por um sinal fluorescente a bactérias como *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e outras. A sílica funcionalizada foi suportada sobre uma tira de nitrocelulose e utilizada de forma semelhante a um imunoensaio de fluxo lateral (LFIA), semelhante aos métodos utilizados em testes de gravidez, drogas de abuso e em monitoramento ambiental. Para detectar a fluorescência emitida pelo imunoensaio foi construído um fluorímetro constituído de um LED branco como fonte de excitação, um filtro de fluorescência em formato cúbico, uma lente plano convexa com distância focal de 50 mm e uma pequena bandeja para alocação da fita de nitrocelulose. Para seleção do comprimento de onda de excitação foi utilizado um filtro de banda (460-490 nm) e para a emissão um filtro barreira de 520 nm. Todos estes componentes foram abrigados em uma caixa plástica pra blindagem da radiação externa. Como detector foi utilizado um celular da marca Sony com uma câmara de 5 mega *pixels* com software Androide. Para a realização dos ensaios as fitas funcionalizadas tiveram uma de suas extremidades mergulhada em soluções com várias concentrações de bactérias variando de 10^7 - 10^4 Cfu mL⁻¹. Para cada tira foi aguardado um tempo de 10 minutos para garantir a difusão da solução ao longo das fitas. Passado o prazo de espera as fitas foram inseridas, uma a uma, na bandeja do fluorímetro para a aquisição da imagem da fita. A aquisição e a edição das imagens foi realizada com o software *Photo Edit Ultimate* e as imagens processada pelo aplicativo *IJ_Mobile*. Assim foi possível obter um perfil de intensidade de fluorescência por pixel. Como resultados os autores conseguiram demonstrar que a sílica funcionalizada funciona tão bem quantos os métodos padrões, utilizados como controle, e sua resposta foi suficiente para detectar concentrações da ordem de 10^5 Cfu mL⁻¹. Esta concentração já é suficiente para causar efeitos adversos em seres humanos para as bactérias estudadas. O método e o instrumento desenvolvidos tem a vantagem de não necessitar de pré-concentração das amostras e o processo de produção da sílica funcionalizada leva a uma melhoria do sinal de fluorescência, permitindo o uso de LED de baixa potência. A metodologia desenvolvida foi eficiente para a

detecção de bactérias patogênicas de forma rápida e a um baixo custo e pode ser facilmente adaptado para ser aplicado em monitoramento e diagnósticos de exames clínicos, de alimentos e ambientais.

3.7 – Sistemas de análise em fluxo.

O conceito de análise por injeção em fluxo, cuja sigla em inglês é FIA, foi proposto por Joroamir Ruzicka em 1975. Nesta, ocorre à inserção da amostra em fluido carreador, responsável por carregar a amostra ao sistema de detecção, e durante o percurso se processam as reações necessária para a detecção do analito. Para a realização dos movimentos dos fluídos nos sistemas de fluxo são utilizados diversos artifícios, bombas peristálticas, bombas solenoides, bombas de seringa e outras. Para garantir a mistura dos reagentes e os caminhos de fluxo são utilizadas confluências, válvulas solenoides, sistemas injetores, válvulas de caminho, tubos de plástico e outras abordagens. Estes aparatos são combinados de inúmeras formas pra a criação das linhas de fluxo que são montadas de forma a garantir a melhor eficiência de análise e por isso costumam ter configurações características para cada tipo de análise (tipo de analito e reagentes envolvidos).¹⁰²

Porém, o mais importante em uma análise em fluxo é o efeito de dispersão da amostra quando esta é injetada em um fluxo contínuo, este efeito é o que governa os processos de análise em fluxo e é fundamental para a aplicação da FIA em um processo de análise segundo Ruzicka e Hansen.¹⁰³ A dispersão é influenciada por fatores como a quantidade de amostra injetada, o comprimento das tubulações para criação dos caminhos de fluxo ou mesmo a velocidade do fluxo que será empregada. Segundo os autores, quando se injeta uma solução corante em um carreador incolor, usando como detector um espectrofotômetro, os parâmetros de altura do pico, largura do pico e forma do pico é dependente de três fatores que se correlacionam. A quantidade de

amostra injetada nestas condições (fluxo constante e sem reação) demonstra que existe um máximo de quantidade de amostra que pode ser injetada, além do qual acontece um desperdício de tempo, amostra e reagentes. Uma linha de fluxo muito grande favorece a uma maior dispersão ocasionando um alargamento do pico e uma diminuição da altura deste. Porém, apesar de inconveniente para a altura do pico na situação anterior, o processo de dispersão é fundamental em sistemas reativos, pois esta é responsável pela mistura dos reagentes que vão gerar as espécies detectáveis pelo detector. Desta forma a manipulação da velocidade de fluxo, da quantidade de amostra injetada e do tamanho da linha de fluxo são muito importantes no processo de otimização de uma análise por FIA.

Uma grande vantagem da FIA é a sua capacidade de mostrar uma alta taxa de reprodutibilidade, permitindo a sua aplicação em sistemas de análise fora da zona de equilíbrio e sua utilização na determinação de analitos sem a necessidade se esperar uma reação completa. Isto aliado a processos de automação pode levar a um aumento da frequência analítica para uma grande variedade de métodos. Novamente, para que sejam obtidos os melhores resultados deve-se fazer uma boa otimização dos parâmetros de fluxo e quantidade de amostra injetada, fundamental para uma aplicação bem sucedida em química analítica.^{103,104}

Como dito anteriormente, sistemas de análise em fluxo são bastante aplicados no ramo da automação e mecanização de análises químicas. Com a aplicação da FIA é possível se programar a automatização de várias etapas envolvidas em uma análise química, tais como processos de amostragem, pré-concentração de amostras, diluições, processos de separação, titulações, adições de reagentes e outras aplicações. Além das aplicações em química analítica, a FIA vem sendo aplicada em outros ramos como determinação de constantes físico-químicas (coeficientes de difusão, viscosidades e etc...), acompanhamento de reações químicas como reações de complexação, sínteses orgânicas, determinação de parâmetros cinéticos ou determinação de estequiometrias de reações.¹⁰⁵

A FIA se encaixou perfeitamente nos requisitos da química verde, sendo uma das bases da chamada *Green Analytical Chemistry* (GAC). Armenta e colaboradores^{106,107} salientam que os avanços dos métodos automatizados baseados em fluxo são muito importantes por conta da sua capacidade de reduzir a quantidade de amostras e reagentes envolvidos nos processos de análise, gerando também uma menor quantidade de resíduos e podendo até se incorporar aos sistemas desde o pré-tratamento das amostras, passando pela detecção até o gerenciamento dos resíduos gerados no fluxo. Melchert e colaboradores,¹⁰⁸ em seu artigo de revisão, traçam um paralelo entre a evolução ocorrida nos métodos que utilizam fluxo de reagentes e a substituição de reagentes perigosos e a minimização dos resíduos gerados. Segundo os autores, a FIA clássica introduzida por Ruzicka, a análise por injeção sequencial (SIA), a multicomutação, os micro sistemas de análise total (μ TAS) e as estratégias *Lab On Valve* são táticas que vêm paulatinamente reduzindo as quantidades de reagentes utilizados e por consequência de resíduos gerados. A engenhosidade em se aplicar a automação, aliada às alternativas de sistemas em fluxo citadas anteriormente, permitem a substituição de reagentes considerados tóxicos, levando à redução da geração de resíduos. Todo este processo de redução de consumo e redução de geração de resíduos leva à redução de custos tanto no início, pois se consome menos reagente, quanto no fim do processo, pois menos é gasto nos tratamentos dos resíduos.

4 - Materiais e métodos

4.1 - Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água purificada por osmose reversa e reagentes de grau analítico.

- Testes iniciais com rodamina B:

Para uma avaliação inicial do instrumento proposto utilizou-se como substância fluorescente a rodamina B. Uma solução estoque contendo 500 mg L⁻¹ do fluoróforo foi preparada pela dissolução do composto sólido (Merck) em água. Diluições das soluções estoque para 0,01 a 0,20 mg L⁻¹ foram realizadas em tampão amônia para pH 10 (0,1 mol L⁻¹).

- Testes iniciais com BE:

Foi preparada uma solução estoque de 100 mg L⁻¹ de BE, a partir da dissolução da massa apropriada de brometo de etídio (Sigma-Aldrich) em água purificada. Desta solução foram realizadas diluições para o preparo de soluções dos experimentos.

A solução estoque de DNA 2 mg mL⁻¹ foi preparada pela dissolução de 200 mg de DNA (*calf thymus*) (Sigma-Aldrich) em 10 mL de solução tampão TBS. Previamente à leitura, esta solução foi diluída a 1/100 (v/v) com a solução tampão TBS.

Solução tampão TBS foi realizada a partir da dissolução de Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) para uma concentração de 50 mmol L⁻¹ e cloreto de sódio para uma concentração de 150 mmol L⁻¹ em água.

Avaliações iniciais com BE (espectros figura 24), espectros obtidos com espectro fluorímetro comercial, foram realizadas utilizando-se soluções de 5,0

mg L⁻¹ de BE feitas em tampão TBS sem DNA e posteriores do instrumento foram realizadas com soluções de brometo de etídio de forma isolada ou na presença de DNA. Para isto foi realizada em uma cubeta a mistura de 2,5 mL de tampão TBS, 0,5 mL de solução DNA 2,0 mg mL⁻¹

O teste de variação da fluorescência do BE (gráfico figura 25) no instrumento proposto foi realizado com três soluções, a primeira foi o branco onde 2,5 mL do tampão TBS, 0,5 mL de solução de DNA 2,0 mg mL⁻¹ e 20 µL de água. 0,5 mL de água e 20 µL de solução 100 mg L⁻¹ de BE. A segunda solução foi preparada com 2,5 mL do tampão TBS, 0,5 mL de água e 20 µL de solução 100 mg L⁻¹ de BE. A terceira solução foi preparada com a mistura de 2,5 mL do tampão TBS, 0,5 mL de solução de DNA 2,0 mg mL⁻¹ e 20 µL de solução 100 mg L⁻¹ de BE. As misturas foram realizadas diretamente em cubeta que foi devidamente homogeneizada.

Para experimentos realizados em batelada no instrumento proposto alíquotas da solução estoque de 100 mg L⁻¹ foram diluídas na própria cubeta com 2,0 mL de solução tampão TBS e 0,5 ml de solução de DNA, formando soluções com concentrações na faixa de 0 a 4,15 mg L⁻¹ de BE. É importante relatar que foram realizadas adições sucessivas de 20,00 µL da solução estoque de BE à cubeta para compor os padrões. Isto foi realizado para minimizar o volume de resíduos gerados durante os experimentos.

- Avaliação do sistema de detecção no monitoramento da degradação de BE:

Nesta seção foi realizado o processo de degradação de uma solução de 40 mg L⁻¹ de BE. 25 mL desta solução foram pipetados para um béquer. Neste béquer foi adicionado 188 µL de ácido hipofosforoso concentrado, para obtenção de uma solução com pH menor que 3. A esta mistura foram adicionados alíquotas de 20 µL de uma solução diluída (3,0x10⁻² mol L⁻¹) de nitrito de sódio. Após cada adição foram aguardados 30 min de reação para realização das leituras.

Após a leitura o sinal era computado e calculado utilizando uma curva analítica preparada em água acidificada com 188 μL de ácido hipofosforoso concentrado para obtenção das concentrações de 1,0 a 40,0 mg L^{-1} em BE (gráfico da figura 29).

Para realização das leituras das alíquotas da solução de degradação foi realizada, diretamente na cubeta, a amostragem de 20 μL da solução sendo degradada e foram adicionados, 1,5 mL de tampão TBE e 0,5 mL de solução DNA 2,0 mg mL^{-1} .

A solução tampão TBE pH 8,4 foi preparada dissolvendo os sais das substâncias para as concentrações finais de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - concentrações finais dos sais envolvidos na produção do tampão TBE pH 8,4.

| Reagente | Concentração final (mol L^{-1}) |
|---|---|
| Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) | 0,089 |
| Ácido Bórico | 0,089 |
| Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) | 0,002 |
| Cloreto de Sódio | 0,1 |

A solução estoque de DNA 2 mg mL^{-1} foi preparada pela dissolução de 200 mg de DNA (*calf thymus*) (Sigma-Aldrich) em 10 mL de solução tampão TBE. Previamente à leitura, esta solução foi diluída a 1/100 (v/v) com a solução tampão TBE.

Soluções estoque contendo 100 mg L^{-1} ou 500 mg L^{-1} de brometo de etídio foram preparadas pela dissolução da massa apropriada de brometo de etídio (Sigma-Aldrich) em água.

- Testes iniciais com rodamina B em sistema de análise por injeção em fluxo:

Os estudos iniciais foram realizados com uma solução de rodamina B de concentração 2,0 mg L^{-1} preparada em água.

Como solução carreadora foi utilizada a solução tampão TBE sem DNA.

Para o diagrama da curva analítica (Figura 31) foram preparadas 5 soluções de rodamina B em água com as concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 mg L⁻¹.

O teste realizado para verificar a influência dos reagentes no sistema de fluxo foi realizado com duas soluções. A primeira consistia de uma solução 2,0 mg L⁻¹ em rodamina B. a segunda solução era composta de uma mistura de rodamina B para uma concentração 2,0 mg L⁻¹ onde foram adicionados o ácido hipofosfórico para uma concentração de 0,75% (v/v) e nitrito de sódio para uma concentração 0,045 mol L⁻¹.

- Testes iniciais com BE em sistema de análise por injeção em fluxo:

Para os testes usando FIA com o BE, foi preparada uma solução estoque de 500 mg L⁻¹ de BE, a partir da dissolução da massa apropriada de brometo de etídio (Sigma-Aldrich) em água purificada. Desta solução foram realizadas diluições posteriores para o preparo de soluções.

A partir da solução estoque foram produzidas 5 soluções de concentrações 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 mg L⁻¹ para a realização de um diagrama utilizando a solução tampão TBE sem a adição de DNA.

Para o teste usando FIA com BE e DNA, primeiramente foi feita uma solução TBE com DNA na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ e a partir da solução estoque de BE foram produzidas cinco soluções padrão de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹.

- Abordagem stopped-flow:

Para estes teste foram utilizadas soluções de BE preparada a partir da solução estoque de 500 mg L⁻¹. A solução de carreamento utilizada foi a tampão TBE com DNA 2,0 mg mL⁻¹.

Para o teste o tempo de reação de intercalamento foi utilizada uma solução padrão de BE com $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ preparada em tampão TBE puro. Posteriormente foi utilizada uma segunda solução padrão de BE com $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ também preparada em tampão TBE puro para testar se o tempo de reação varia com o aumento da concentração de BE.

Para a curva analítica foram preparadas soluções padrão com concentrações de $1,0$; $2,0$; $5,0$; $10,0$ e $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ preparadas em tampão TBE puro. Para este caso o branco utilizado foi uma solução de tampão TBE puro, a mesma utilizada na produção dos padrões.

- Testes para o sistema de decisão:

Para calibração do sistema foram definidos dois pontos de calibração $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ preparadas em tampão TBE puro. O branco utilizado foi a própria solução tampão TBE pura.

As amostras de testes foram todas produzidas em da mesma forma que os padrões de calibração e três níveis diferentes. Sendo um para resposta de degradação concluída com valor de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ e mais duas que deveriam sinalizar degradação não concluída com concentrações de $7,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$. No teste foram também incorporadas as soluções utilizadas como padrões de calibração para verificar suas respostas, no caso da de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi também utilizada para testar a resposta do instrumento no limiar de decisão do instrumento.

- Testes com o sistema de detecção alternativo:

Para os testes iniciais com o sistema de detecção alternativo, utilizando imagens digitais adquiridas com um smartphone, foram utilizadas soluções padrão de BE preparadas a partir da solução estoque de $500,0 \text{ mg L}^{-1}$ em tampão TBE puro com concentrações $1,0$; $2,0$; $5,0$; $10,0$; $15,0$ e $20,0 \text{ mg L}^{-1}$. As curvas analíticas na faixa linear de $1,0$ a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ realizadas posteriormente nas 3 abordagens foram realizadas com soluções padrão de BE preparadas da mesma maneira que as soluções iniciais.

- Determinação de BE em amostras residuais:

Para as determinações foi selecionada uma amostra residual de BE que foi primeiramente filtrada em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi transferido para balões de 25,00 mL e foram dopados com volumes específicos da solução estoque de BE para atingirem os níveis de concentração 0,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg L⁻¹. Para finalização as amostras foram avolumadas para 25,00 mL com o próprio resíduo filtrado.

Por conta da faixa linear de determinação usando a abordagem de imagens digital, as soluções foram diluídas. Em balões de 25,00 mL foram adicionados 10 mL de solução tampão TBE com DNA 2,0 mg L⁻¹, mesma aplicada nos experimentos com abordagem *stopped-flow*. Ao final os volumes foram completados com água purificada. As quantidades utilizadas de cada solução estão expostas na tabela 4.

Tabela 4 - Diluição das amostras de resíduos dopadas utilizadas para avaliação das abordagens de determinação de BE testadas.

| Concentração inicial (mg L ⁻¹) | Volume pipetado da amostra (mL) | Concentração final em 25 mL (mg L ⁻¹) |
|--|---------------------------------|---|
| 0,0 | 12,500 | 0,0 |
| 2,0 | 12,500 | 1,0 |
| 5,0 | 12,500 | 2,5 |
| 10,0 | 6,250 | 2,5 |
| 20,0 | 3,125 | 2,5 |

Os padrões para as curvas analíticas foram produzidas da mesma forma que as amostras em balões de 25,00 mL onde foram adicionados 10,0 mL da mesma solução tampão TBE com DNA utilizada para as amostras e diluição da solução estoque de BE com volumes apropriados para a obtenção de soluções padrão com as seguintes concentrações 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹. O volume final foi completado com água purificada.

4.2 – Construção do equipamento

O equipamento proposto é constituído de um fluorímetro para aquisição das leituras analíticas, acoplado a um sistema de fluxo para automação dos procedimentos. Para facilitar o entendimento, será realizada primeiramente uma descrição geral do sistema em fluxo utilizado, seguida de uma descrição mais detalhada dos circuitos e dos softwares desenvolvidos.

4.2.1 – Visão geral do sistema em fluxo

Conforme mostrado na descrição esquemática mostrada na Figura 5 e na fotografia apresentada na Figura 6, o sistema proposto para monitoramento de degradação de BE é constituído por um frasco reator, onde são alocados a solução residual contendo BE juntamente com os reagentes para o tratamento, um reservatório para uma solução tamponada de DNA, uma bomba peristáltica para transporte da solução de DNA, uma mini-bomba solenoide para transporte da solução residual, um “T” em acrílico para confluência das soluções e o módulo de controle do instrumento, o qual comporta um sistema de detecção fluorimétrico e os circuitos eletrônicos.

De forma geral, a solução que está sendo tratada é confluída com a solução de DNA e a mistura resultante é transportada para uma célula de fluxo fluorimétrica onde é realizada a aquisição do sinal analítico.

Na tabela 5 são apresentadas as especificações dos componentes utilizados para a construção do sistema de fluxo, bomba solenoide, bomba peristáltica e a cubeta de fluxo.

Nas próximas seções serão apresentadas as estratégias utilizadas para o desenvolvimento de todo o sistema, incluindo a construção do fluorímetro, o

desenvolvimento dos circuitos para automação e os softwares para controle das operações.

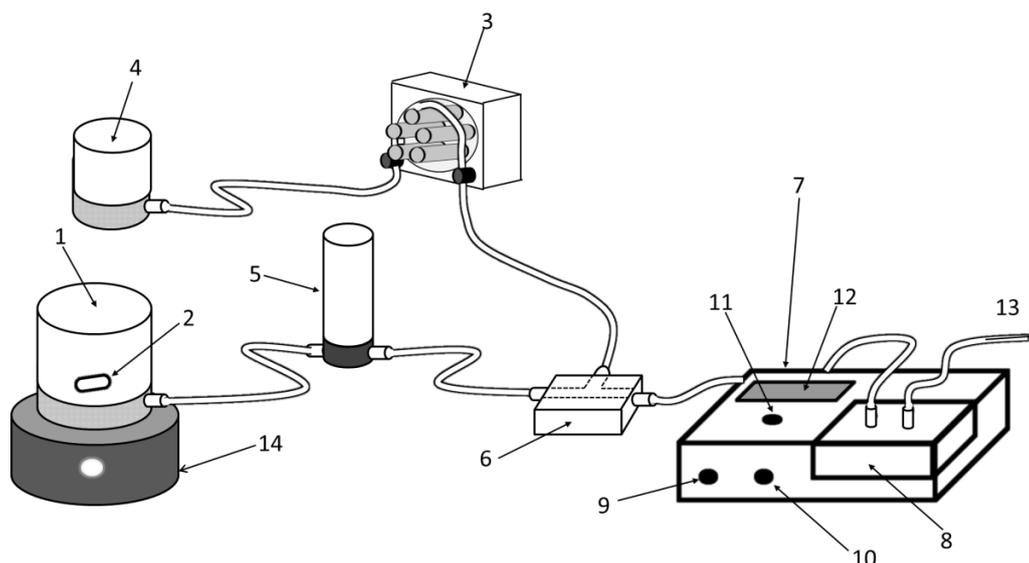


Figura 5 – Descrição final do sistema de fluxo, reator (1), barra magnética para agitação (2), bomba peristáltica (3), vaso para carreador (4), Bomba solenoide (5), confluência de acrílico (6), tubulação de entrada para cubeta de fluxo no compartimento de detecção do instrumento (7), tampa para o compartimento de detecção do instrumento (8), chave liga/desliga do instrumento (9), chave seletora de funcionamento calibração/leitura do instrumento (10), botão iniciar (11), visor LCD (12), tubulação de saída da cubeta de fluxo (13) e agitador magnético para o reator (14).

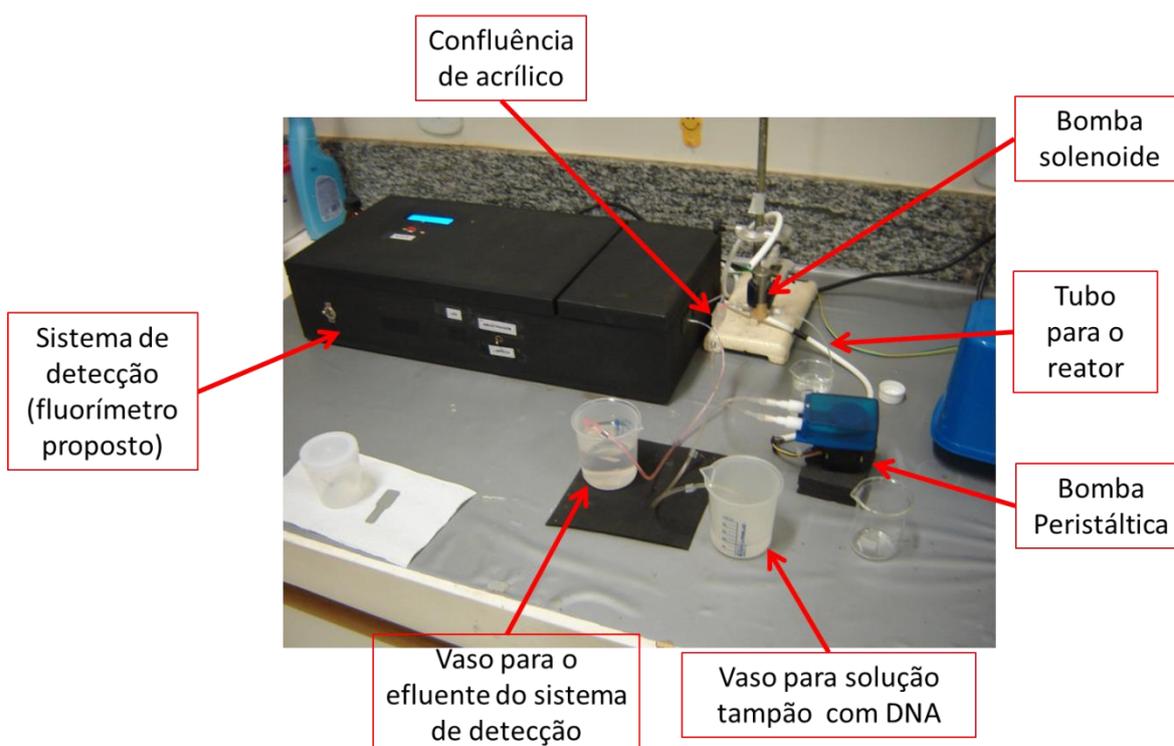


Figura 6 - Fotografia do sistema de detecção acoplado ao sistema de fluxo utilizado para a detecção de BE em amostras de resíduos laboratoriais.

Tabela 5 - Especificações dos materiais utilizados para a construção do sistema de fluxo.

| Item | Marca | Especificação |
|--------------------|--------------------|--|
| Bomba solenoide | Biochem Valve Inc. | Modelo SP12-8 Tensão: 12 V Volume de bombeamento: 8 μL Fluxo máximo: 2 mL min^{-1} |
| Bomba peristáltica | Qualitem | Motor de passo Tensão: 12-18 V Velocidade: 60 níveis Vazão máxima: 0,9 mL s^{-1} Dimensões: 95x58x53 cm |
| Célula de fluxo | Precision Cells | Material quartzo Modelo 59 FL 10 Volume da câmara interna: 440 μL |

4.2.2 - Construção do fluorímetro.

O fluorímetro proposto baseou-se na utilização de um diodo emissor de luz (LED) como fonte de radiação, dois filtros ópticos para seleção do comprimento de onda de emissão e de dois fotodiodos cujos sinais eram somados para aumentar a sensibilidade do instrumento na realização da detecção. Estes componentes foram dispostos conforme apresentado na Figura 6 de modo que o feixe de luz produzido pelo LED atingisse o suporte para solução da amostra (cubeta) a um ângulo 90° em relação aos fotodiodos.

O LED utilizado foi adquirido junto ao fornecedor TMG eletrônicos¹⁰⁹ com potência de 3 W e máximo de emissão em 535 nm. É importante relatar que o fornecedor não disponibiliza maiores especificações sobre este componente, mas que informações gerais sobre o mesmo podem ser obtidas a partir de um *datasheet* genérico para LED de 3W.¹¹⁰ Como detectores foram utilizados dois fotodiodos de silício da série S1223 marca hamamatsu.¹¹¹ Os

fotodiodos escolhidos apresentam uma janela espectral de resposta na faixa de 400 a 1000 nm. Esta faixa espectral abrange o comprimento de onda de emissão da molécula do brometo de etídio (aproximadamente 603 nm quando intercalado ao DNA). Para a minimização da radiação espúria oriunda do LED que se espalha na cubeta e atinge o detector sem interagir com a amostra, foram utilizados dois filtros de corte alternativos. Para isto, a embalagem de cor laranja e transparente utilizada para pastilhas sabor laranja da marca “Tic-Tac” foi devidamente recortada no formato de pequenos círculos com cerca de 0,5 cm de diâmetro e fixados com o auxílio de fita adesiva na parte frontal de cada fotodiodo. Fotografias dos componentes utilizados são mostrados na Figura 7.

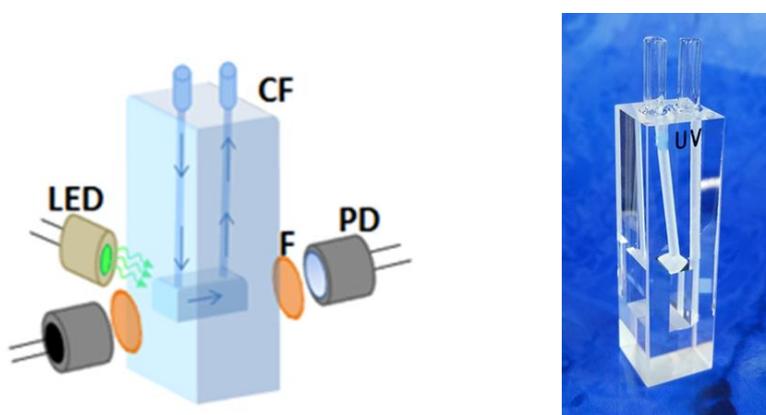


Figura 7 - Disposição geral da célula de medida. Célula de Fluxo (CF), fotodiodo (PD) e filtros (F) e a direita foto da célula de fluxo utilizada.

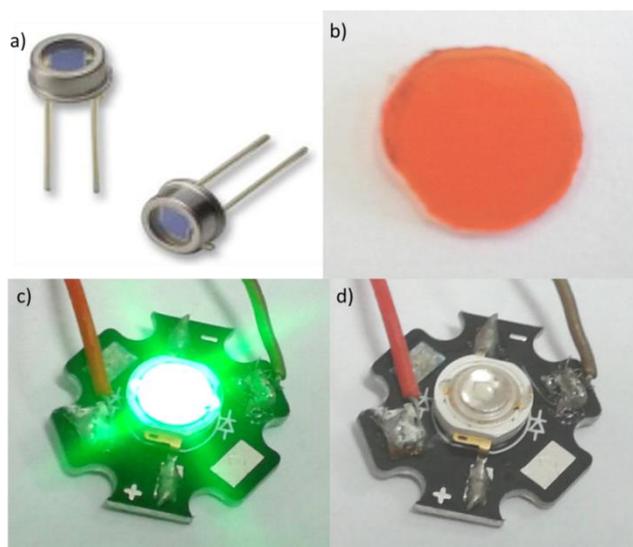


Figura 8 – Componentes usados para construção do fluorímetro. Fotodiodos (a), filtro de cor alaranjada (b). LED aceso (c) e LED apagado (d).

Todos estes componentes foram colados, utilizando cola instantânea acrílica, em um suporte metálico para cubetas. Uma fotografia do suporte com os componentes adaptados é mostrada na Figura 9, juntamente com a cubeta de fluxo para fluorescência. É importante destacar que o suporte utilizado comporta cubetas convencionais com caminho óptico de 10 mm e também cubetas de fluxo com dimensões semelhantes à primeira.

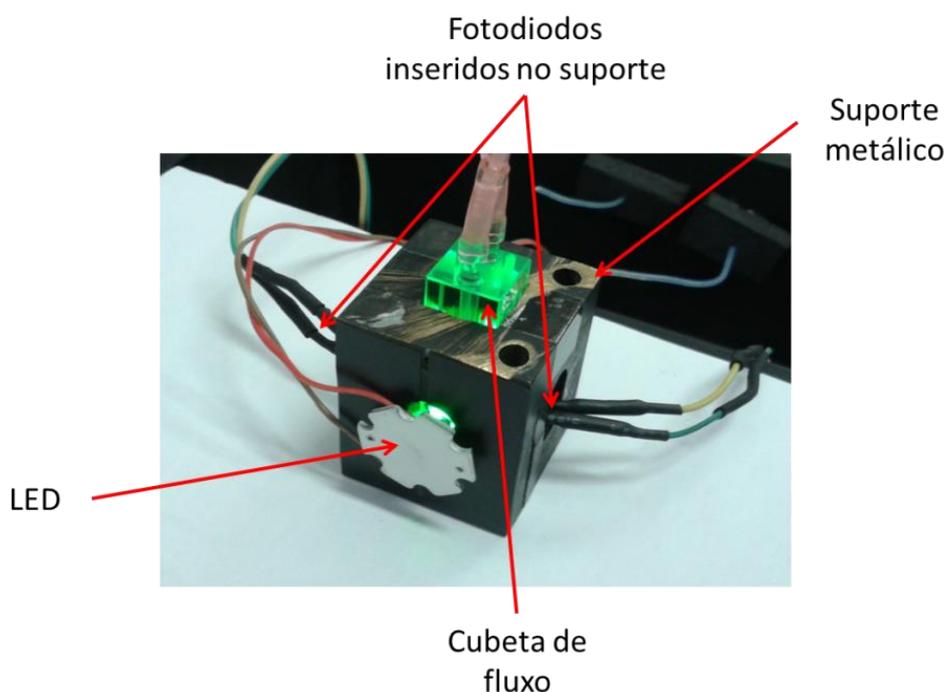


Figura 9 - Compartimento da cubeta de fluxo com os componentes fixados no bloco de metal utilizados no instrumento proposto.

Durante as medidas realizadas, o LED permanecia continuamente ligado. Para o seu acionamento foi montado um circuito simples com alimentação de 12 V em corrente contínua (dc) e um resistor de 22 Ω (15 W) foi utilizado para limitar a corrente no LED em aproximadamente 0,5 A.

O circuito de detecção foi baseado no proposto por Borges *et al.*¹¹² Conforme ilustrado na Figura 10, os fotodiodos foram conectados a circuitos conversores de corrente para voltagem, utilizando os amplificadores operacionais OP07. Os sinais resultantes desta conversão eram então somados e amplificados em outro circuito também baseado no amplificador

OP07. O sinal de saída do circuito somador/amplificador foi então direcionado ao conversor analógico/digital (A/D) de 10 bits de um circuito microcontrolador conforme será detalhado mais adiante.

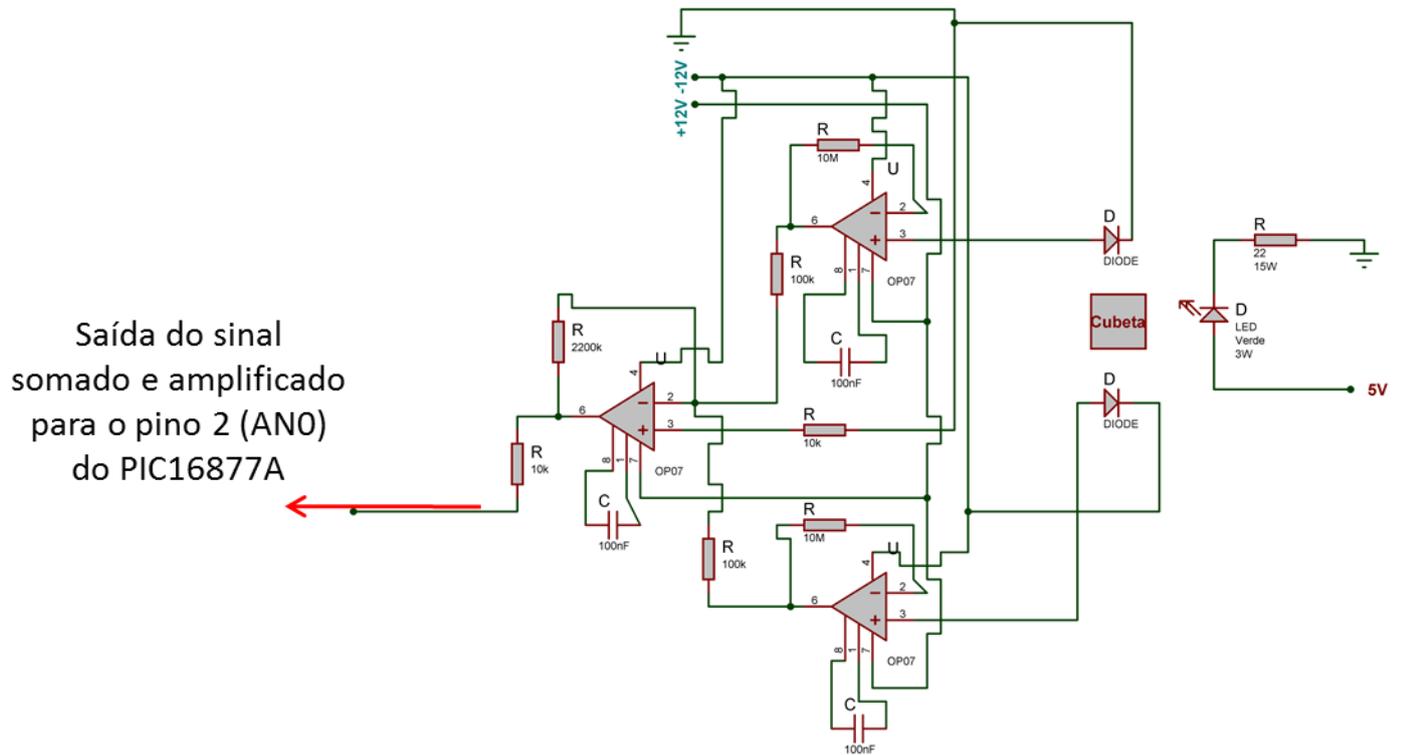


Figura 10 - Circuito proposto por Borges *et. al.*¹¹² responsável pela soma e amplificação dos sinais adquiridos pelos fotodiodos e o envio destes à entrada analógica do microcontrolador PIC 16F877A.

4.2.3 – Desenvolvimento dos circuitos para o sistema automatizado

Para controlar o sistema de fluxo, em conjunto com o sistema de detecção, foi proposta a utilização de microcontroladores programáveis da família PIC (16F877A e 16F628A). Um esquema geral dos circuitos desenvolvidos para automação dos procedimentos é mostrado na Figura 11.

Um circuito *driver* baseado no PIC 16F628A foi confeccionado para controlar o acionamento da mini bomba peristáltica, a partir de um banco de transistores ULN2803. Neste circuito, as saídas digitais do PIC16F628A (pinos 6 a 9) foram conectadas ao banco de transistores e acionadas de forma intermitente e sequencial por meio do programa gravado na memória do PIC16F628. Com este acionamento, os terminais do motor de passo da bomba, conectados ao banco de transistores, são acionados também de forma intermitente e sequencial, promovendo o seu funcionamento. É importante destacar que o acionamento do circuito driver da bomba peristáltica é realizado do microcontrolador central (PIC16F877A) e que apresenta duas velocidades, uma mais lenta para amostragem e outra mais rápida para limpeza do caminho do fluxo.

No protótipo proposto foi utilizada também uma mini bomba solenoide. Para acioná-la, utilizou-se outro banco de transistores ULN2803 conectado ao PIC 16F877A. Neste circuito, o banco de transistores, ao ser acionado por um sinal pulsado de 5V oriundo do PIC16F877A, realizava o acionamento da bomba solenoide também de forma pulsada.

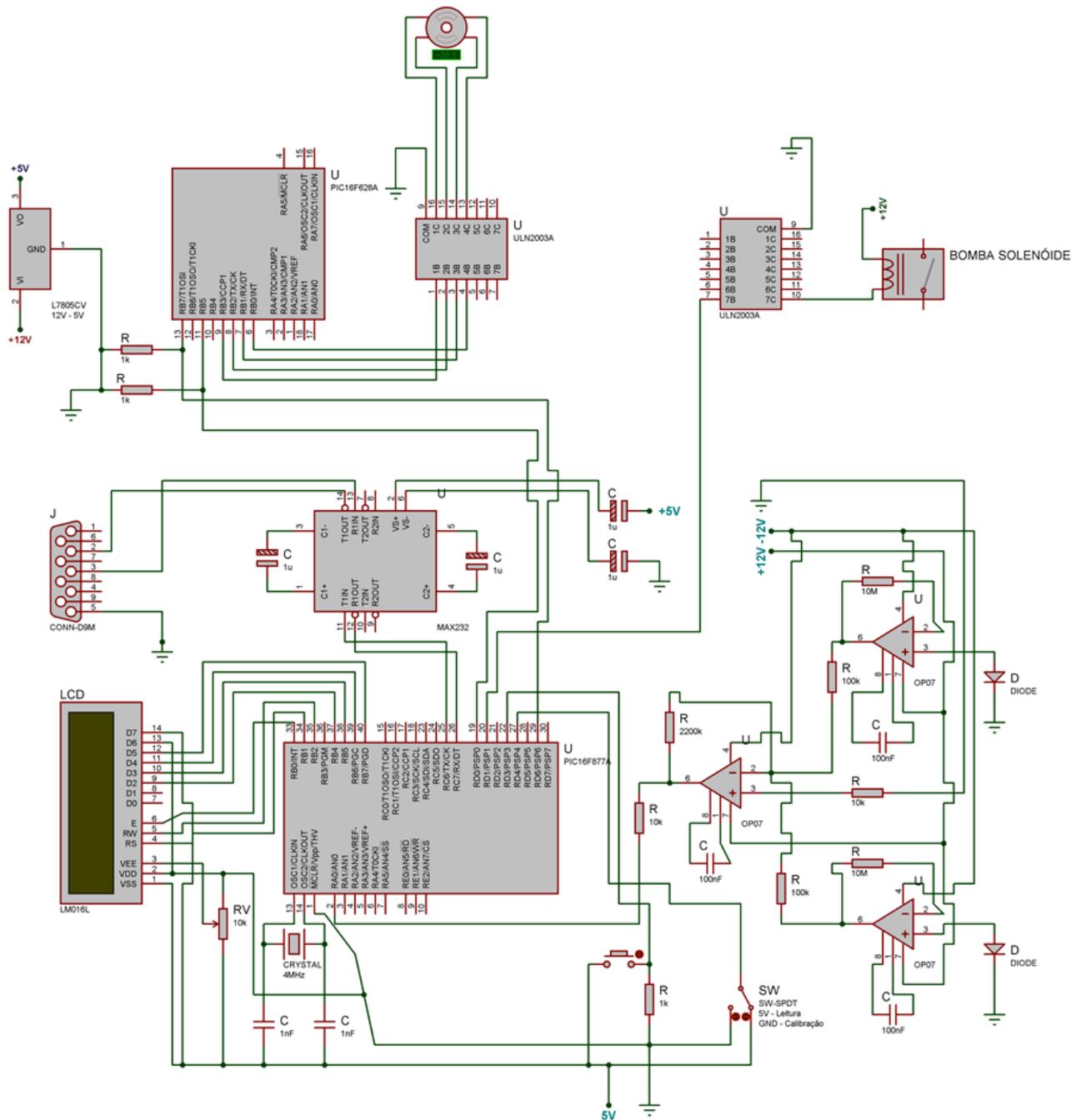


Figura 11 - Circuito implementado para o controle do sistema de fluxo, da aquisição dos sinais, do tratamento dos dados adquiridos e informação das leituras através do visor LCD ou por comunicação vias porta serial RS232.

O microcontrolador central (PIC16F877A) foi utilizado também para a conversão A/D (10bits) do sinal analítico, proveniente do circuito de detecção, e para a transferência deste sinal para um display de cristal líquido (LCD) ou para um computador via comunicação serial. Para isto foram conectados ao PIC 16F877A um visor tipo LCD de duas linhas e 16 posições para visualização das leituras. Também foi construída uma saída serial tipo RS232 para comunicação com um computador, para isto empregou-se um circuito integrado MAX232.

Para alimentação elétrica de todo o sistema foi utilizada uma fonte de tensão comumente empregada para alimentação de computadores. Da fonte, foram utilizadas as saídas de $\pm 12V$ para alimentação dos amplificadores operacionais, +5V para alimentação dos microcontroladores PIC, +12 V para a alimentação da válvula solenoide e +12 V para alimentação do circuito da bomba peristáltica.

Ao circuito foram adicionados um botão (tipo *push button*) e duas chaves de seleção de função. O botão é utilizado para dar o início às funções de funcionamento do equipamento (processo de amostragem e leitura). A primeira chave é usada para ligar e desligar o instrumento. A segunda chave funciona como seleção de modo de funcionamento, em uma posição seleciona-se a rotina de calibração e na outra posição a rotina de leitura de amostra.

Todos os circuitos foram dispostos em uma caixa de madeira construída com dois compartimentos separados, sendo um para a parte de detecção fluorimétrica (cubeta, LED e fotodiodos) e outro para a fonte de alimentação e para os circuitos eletrônicos. As Figuras 12 e 13 mostram algumas fotografias do instrumento com indicações dos componentes.

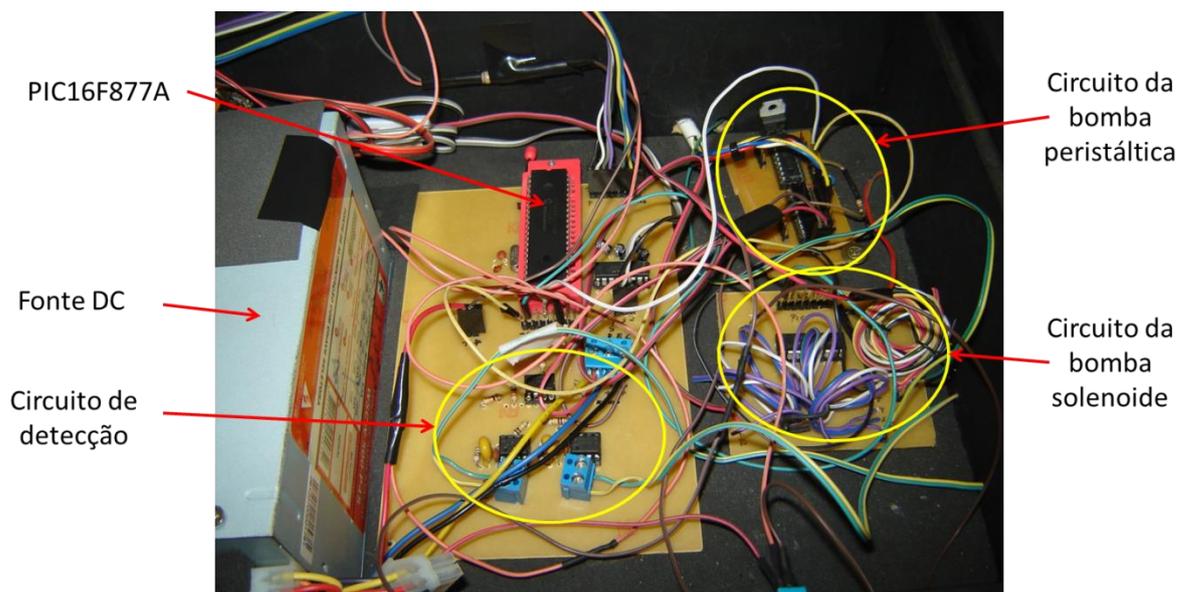


Figura 12 - Circuitos confeccionados para o fluorímetro proposto com as indicações dos circuitos para detecção, controle central do instrumento, circuito de controle da bomba peristáltica e circuito de controle da bomba solenoide.

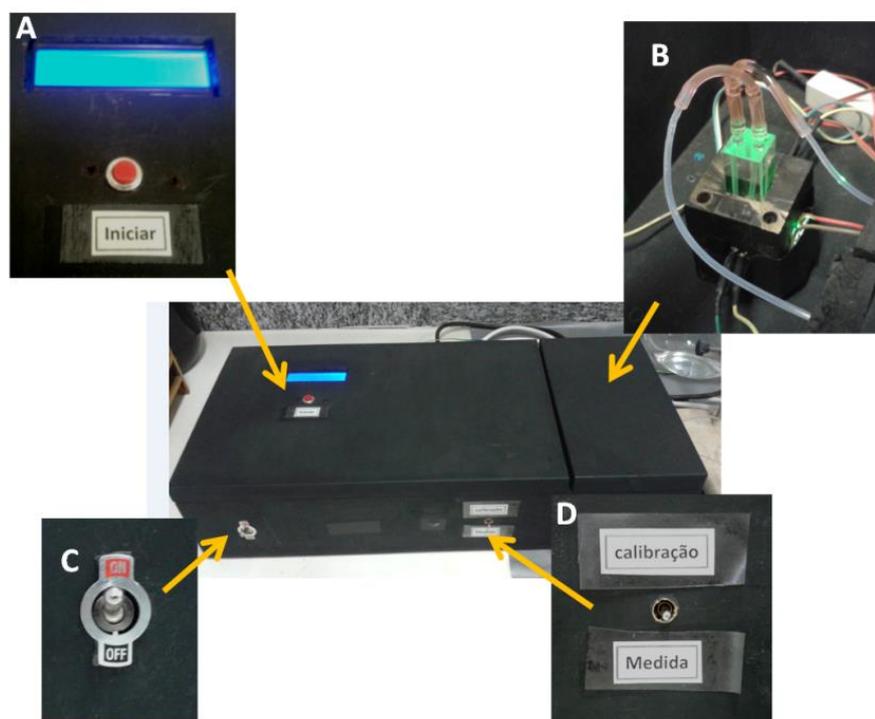


Figura 13 - Visão geral do equipamento de fluorescência, detalhes do visor LCD com botão “Iniciar” (A), célula de fluxo em suporte metálico (B), chave liga/desliga (C) e chave seletora “calibração/medida” (D).

4.2.4 – Software e procedimentos de funcionamento

Todos os *softwares* para os microcontroladores foram desenvolvidos em linguagem C e compilados a partir de um compilador dedicado (PIC C *Compiler* versão 3.235). O software compilado foi gravado na memória do microcontrolador PIC 16F877A empregando-se o gravador PIC *Burner* USB e o software de gravação *US-Burn* versão 1.3.

O fluxograma da Figura 14 ilustra de forma resumida o processo de funcionamento do software embarcado no microcontrolador PIC16F877A, responsável pelo gerenciamento da maioria das operações realizadas pelo equipamento proposto e o qual será brevemente explicado a seguir.

Antes de se iniciar as rotinas de medida com o instrumento, o mesmo deve ser ligado e deve-se aguardar um período de cerca de 30 minutos para estabilização da fonte de radiação e dos circuitos eletrônicos. Após a estabilização, o usuário deve seguir as orientações fornecidas através do visor LCD, com relação ao modo de medida que será realizado (calibração ou medida) e às soluções que serão injetadas no sistema.

Inicialmente o usuário deve escolher o modo de medida desejado, ou seja, realizar a calibração do instrumento com soluções padrão ou realizar a determinação de uma amostra utilizando-se os dados da última calibração do instrumento. A escolha da operação a ser realizada é feita através da chave seletora “calibração/medida”.

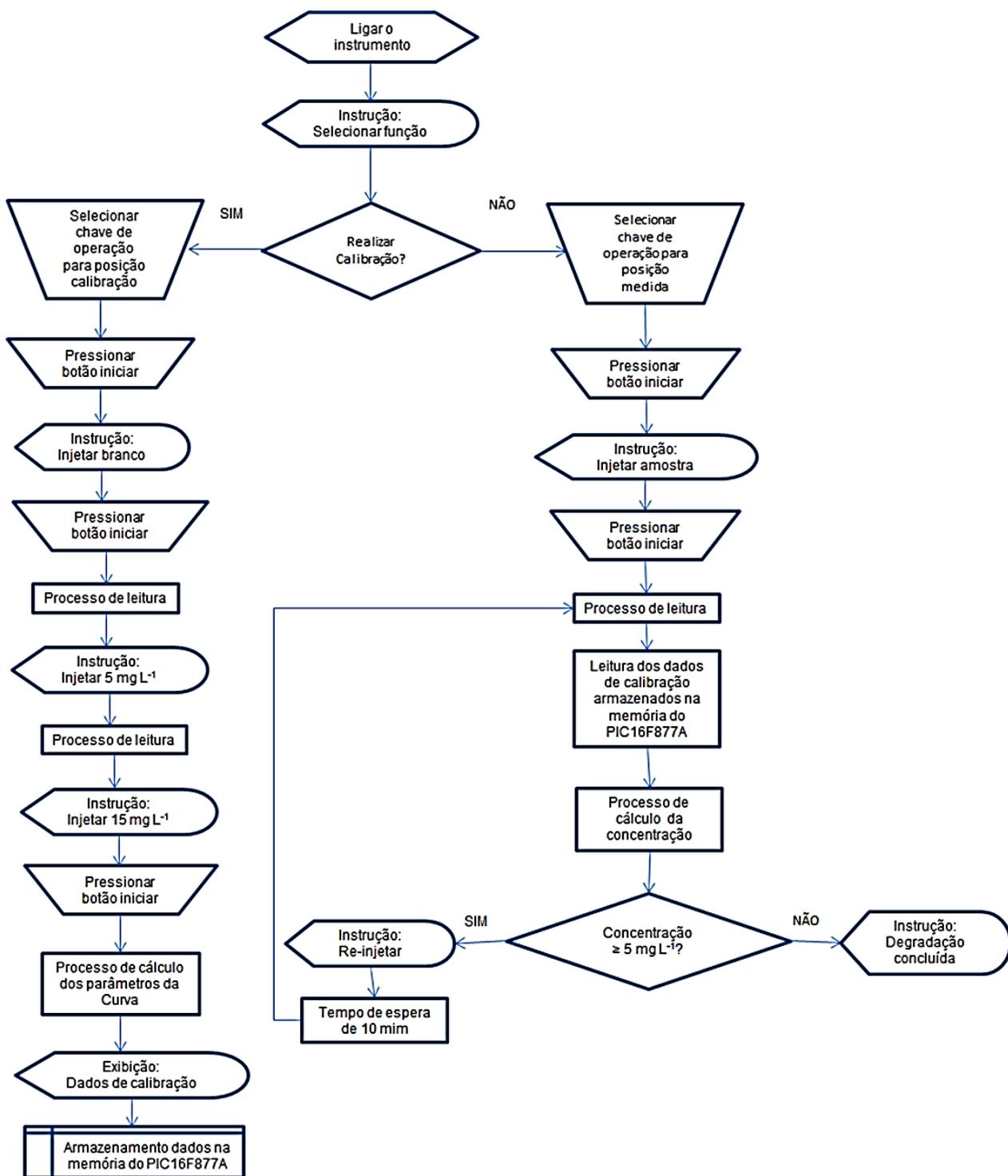


Figura 14 - Fluxograma simplificado do algoritmo embarcado no microcontrolador PIC16f877A do fluorímetro.

Usualmente, o usuário começa o procedimento pela rotina de calibração, a qual é iniciada após a seleção adequada da chave seletora (FIGURA 13 D) e o pressionamento o botão “iniciar” (FIGURA 13 A), localizado na parte superior do instrumento. Logo em seguida, no visor LCD, é solicitada a injeção da solução do branco ($0,00 \text{ mg L}^{-1}$ de BE). Neste momento, o usuário deve desconectar o tubo conectado ao reator vazio e mergulhar o mesmo no frasco que contém a solução do branco, pressionando em seguida o botão “iniciar”. Com isto, inicia-se a rotina de leitura do instrumento. Esta rotina é composta de dois passos. Primeiramente é realizado um processo de limpeza e ambientação da cubeta e da linha de fluxo. Neste processo o PIC16F77A envia um sinal intermitente para o circuito da bomba solenoide promovendo 100 pulsos de bombeamento. Concomitantemente outro sinal do PIC16F877A é enviado ao circuito da bomba peristáltica, a qual faz o bombeamento, em baixa velocidade, da solução tampão/DNA. Sendo assim, a solução do branco é bombeada juntamente com a solução tampão/DNA até a célula de fluxo, mas não é realizada aquisição do sinal de fluorescência. Logo após, a bomba peristáltica é novamente acionada em velocidade maior para a lavagem da cubeta de fluxo, deixando o sistema pronto para uma nova injeção.

Terminada a limpeza do sistema, o processo de bombeamento das soluções de DNA e do branco é repetido e a mistura é carregada até a célula de fluxo sendo o bombeamento interrompido após o preenchimento da célula. Antes de se iniciar as leituras de fluorescência efetivamente, o programa aguarda três minutos. Este tempo é o necessário para que ocorra a reação de intercalação entre o BE e o DNA presente na solução tampão/DNA. Passado o tempo de reação, acontece a aquisição da medida de fluorescência. Após a aquisição dos valores é feita uma lavagem da cubeta de fluxo através do acionamento em velocidade alta da bomba peristáltica. Uma rápida leitura é realizada pós-lavagem para garantir que o sinal retornou ao valor de linha base. Vale destacar que a média dos valores obtidos para o branco é armazenado na memória do controlador como S_{bco} .

Após a injeção do branco, o usuário é solicitado a injetar as soluções com concentrações de $5,0$ e $15,0 \text{ mg L}^{-1}$ em BE da mesma forma que realizado para a solução do branco. Da maneira análoga, os valores medidos são

armazenados na memória do microcontrolador e utilizados para se estimar o coeficiente angular (m) da curva de calibração através da seguinte equação;

$$m = \frac{(S_{15} - S_{bco}) - (S_5 - S_{bco})}{(15 - 5)} \quad (1)$$

onde S_{15} e S_5 correspondem ao sinal elétrico lido para as soluções com 15 e 5,0 mg L⁻¹, respectivamente, e S_{bco} refere-se ao sinal para o branco. O denominador (15 - 5) corresponde à variação de concentração para a faixa estudada.

Com estes dados se obtém a equação para a curva analítica (equação 2), a qual relaciona o sinal elétrico medido e corrigido para a amostra ($S_{am} - S_{bco} = y$) com a concentração da solução que está sendo determinada (x).

$$x = \frac{y}{m} \quad (2)$$

É importante destacar que o sinal corrigido para uma solução que contém 0,00 mg L⁻¹ de BE proporciona um sinal muito próximo à 0,00 V de modo que o coeficiente linear para a curva acima é aproximado para 0,0.

Finalizado o processo de calibração o software retorna a opção inicial de seleção entre calibração e medida. Para realização de medida de uma amostra é selecionada a chave seletora (Figura 13 D) para a posição medida.

Selecionada a opção de medida, pressiona-se o botão “iniciar” e o instrumento solicita a injeção da amostra. Neste caso, o tubo amostrador deverá estar conectado ao reator, já contendo a mistura reacional, e, então, após o usuário pressionar novamente o botão iniciar, a solução da amostra e a solução tampão de DNA são bombeados, de forma análoga a injeção dos padrões. Novamente, a limpeza e ambientação das linhas de fluxo são

realizadas preliminarmente com a própria solução a ser analisada e, em seguida, é realizada uma nova injeção para a aquisição do sinal de fluorescência referente a amostra que está sendo degradada.

Neste momento, a mistura reacional é composta da solução residual contendo BE junto com os reagentes de degradação. Estes devem ser adicionados de forma que para cada 100 mL de solução contendo BE na concentração de até 500 mg L^{-1} devem ser adicionados 20 mL de solução 5% de ácido hipofosfórico e 12 mL de solução de nitrito de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. É importante salientar que o pH final desta solução deve ser menor ou igual a 3 e se a solução de BE estiver mais concentrada que o valor de 500 mg L^{-1} deve ser diluída até este patamar, segundo orienta o protocolo proposto por Lunn e Sansone.

Terminada a aquisição da medida da mistura reacional, o instrumento procede ao cálculo da concentração, empregando-se a equação 2 e avalia se esta concentração está abaixo do valor de $5,00 \text{ mg L}^{-1}$, valor que corresponde à metade da concentração recomendada para um descarte adequado. De fato se a concentração estiver abaixo deste limite, o visor LCD indicará “degradação concluída” e se a concentração estiver igual ou acima deste limite aparecerá à indicação “reinjetar”. Neste caso, o instrumento procederá automaticamente a reinjeção após 10 minutos e verificará se o patamar de concentração foi ou não atingido até que este atinja o valor inferior ao de 5 mg L^{-1} , quando o visor LCD indicará “degradação concluída”.

4.3 – Sistema para aquisição de imagens com *smartphones*

4.3.1 – Construção do módulo de aquisição de imagens

Uma forma alternativa de detecção de BE foi realizada utilizando-se um aparelho de celular (Samsung Galaxy Win) com câmera integrada de 5 megapixels em conjunto com aplicativos ou softwares que analisam as componentes Vermelha, Verde e Azul (RGB) de uma imagem.

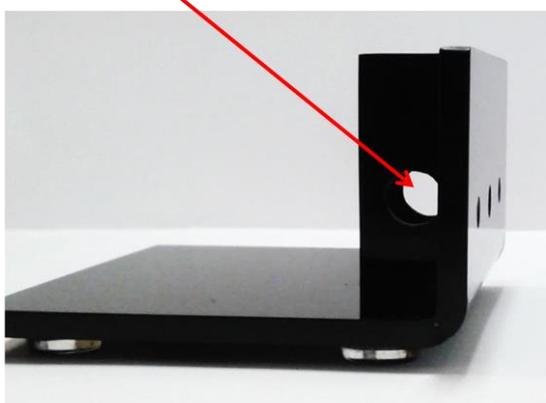
Para realização deste experimento foi construído um módulo que permitisse a aquisição de imagens de fluorescência na ausência de radiação externa. Para isto foi utilizada uma caixa de madeira com tampa medindo 23 cm x 23 cm x 16 cm (largura x comprimento x altura), a qual foi recoberta externa e internamente por folhas de espuma vinílica acetinada (EVA) de cor preta. Na parte frontal da caixa foi confeccionado um orifício com 1,5 cm de diâmetro para posicionamento da câmera do celular e, alinhado a este orifício, foi posicionado, a 7,3 cm da face interna frontal, um suporte para cubetas em acrílico preto. A Figura 15 mostra algumas fotografias do módulo construído.



Figura 15 - Módulo de madeira confeccionado para abrigar o suporte de cubetas e o LED para aquisição de imagens com o celular.

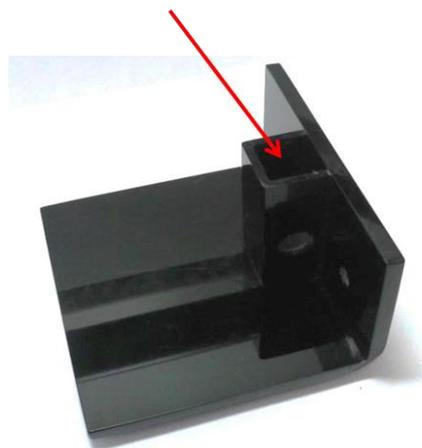
O suporte de acrílico (Figura 16) possui três orifícios principais. Dois na posição lateral do local onde se coloca a cubeta e um posicionado a 90° dos outros dois. Apenas um dos orifícios laterais foi utilizado para a fixação de um LED verde de baixa potência e teve por objetivo permitir a passagem da radiação de excitação, enquanto o terceiro orifício (a 90° do LED) foi utilizado para o monitoramento da radiação emitida pela substância sendo analisada.

Orifício de entrada da radiação do LED



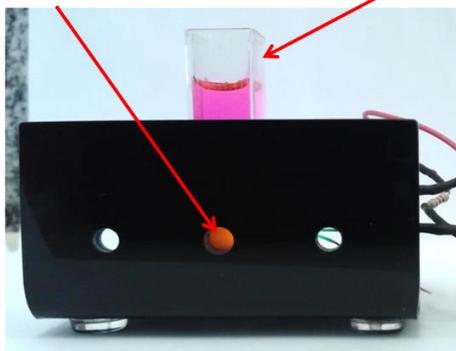
Vista lateral do suporte

Compartimento para inserção da cubeta



Vista superior do suporte

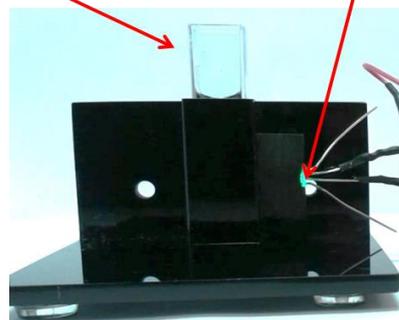
Orifício de saída da radiação emitida pelo BE



Vista frontal do suporte

Cubeta posicionada no suporte

LED RGB fixado ao suporte da cubeta



Vista traseira do suporte

Figura 16 - Vistas do suporte de cubetas utilizado no sistema de aquisição de imagens.

4.3.2 – Procedimento de aquisição das imagens

Para aquisição das imagens das soluções de BE foi realizada o seguinte procedimento. As soluções com os padrões de 1,0 a 5,0 mg L⁻¹ foram preparadas em solução tampão TBE com DNA (já descrita anteriormente) em balões volumétricos de 10,0 mL utilizando-se o pipetas automáticas e a partir da solução estoque de 500 mg L⁻¹. Após o período (cerca de 3 minutos) reacional, as soluções foram colocadas em uma cubeta de 3,5 mL, a cubeta foi encaixada no suporte, a caixa foi fechada e foi realizada a aquisição da imagem e dos parâmetros RGB utilizando o aplicativo *Color detector real time* usando o aparelho celular. O mesmo procedimento foi realizado mais duas vezes com a mesma mistura da cubeta para a aquisição de leituras em triplicata e posterior cálculo da média das leituras. Este procedimento foi repetido para todos os padrões e amostras analisadas.

4.4 - Procedimentos para comparação dos resultados.

As soluções de BE, padrões e amostras, também foram lidas tanto no fluorímetro construído quanto em um equipamento comercial de bancada da marca Cary modelo Eclipse. Este procedimento foi adotado para avaliação do desempenho do instrumento proposto em uma aplicação dedicada. Para a leitura nos dois equipamentos, foi utilizada uma cubeta de polimetimetacrilato de 3,5 mL com caminho ótico de 1,0 cm.

No caso do fluorímetro de bancada as configurações utilizadas foram λ excitação de 525 nm, λ de emissão em 605 nm. Fendas de excitação e emissão de 5 nm e voltagem da fotomultiplicadora em nível médio.

Os resultados obtidos foram utilizados nas rotinas de comparação para testar a eficiência do fluorímetro proposto.

5 - Resultados e discussão

5.1- Testes iniciais com o instrumento proposto em batelada

5.1.1- Espectro de emissão do LED utilizado

O LED utilizado no instrumento é composto de InGaN e apresenta um padrão de abertura da emissão de radiação em um ângulo de 90° . O espectro de emissão para o referido LED é apresentado na Figura 17, o qual foi adquirido a partir de um espectrofotômetro *Ocean Optics USB 2000*. Pode-se observar que o máximo de emissão ocorre em 535 nm e que a largura de banda a meia altura é de aproximadamente 30 nm. Conforme será apresentado mais adiante, estas características são adequadas para a utilização do LED como fonte de excitação para a fluorescência do brometo de etídio.

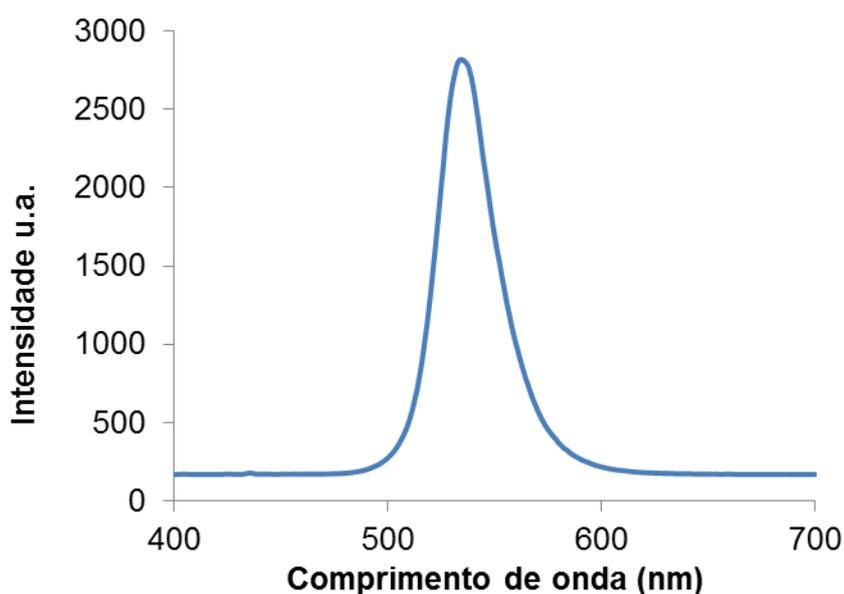


Figura 17 - Espectro de emissão luminosa, obtido experimentalmente, do LED verde utilizado na construção do fluorímetro proposto.

5.1.2 - Espectro de transmitância do filtro utilizado

O filtro proposto para uso no instrumento foi confeccionado a partir de embalagens de confeitos tipo “Tic-tac”, os quais são constituídos de polipropileno com corante laranja. A escolha desta estratégia para seleção da faixa de comprimentos de onda a serem utilizados na proposta foi baseada principalmente no baixo custo e na facilidade de obtenção do mesmo, o que facilita a construção deste instrumento por outros grupos de pesquisa.

De acordo com o espectro de transmitância apresentado na figura 18, este filtro alternativo apresenta uma baixa transmitância (entre 20 e 25 %) na faixa de 400 a 570 nm (região que engloba a faixa de emissão à meia altura do LED, 520 a 550 nm) e transmissão acima de 80% na região de 610 a 700 nm (região de emissão do fluoróforo). Considerando estas observações, pode-se afirmar que a radiação oriunda do LED não é totalmente eliminada pelo filtro o que pode levar a um aumento significativo do sinal de fundo durante as medidas. Entretanto, deve-se salientar que as medidas de fluorescência são realizadas com ângulo de 90° entre o LED e os detectores de forma que a radiação do LED que efetivamente pode atingir os detectores é proveniente principalmente do espalhamento ocasionado nas paredes da cubeta em uso, radiação esta menos intensa que aquela proveniente diretamente do LED. De fato, como os detectores devem trabalhar em regime de elevada amplificação, obtém-se um sinal de fundo proveniente deste espalhamento, o qual não chega a limitar o uso do instrumento para a aplicação proposta como será visto mais adiante.

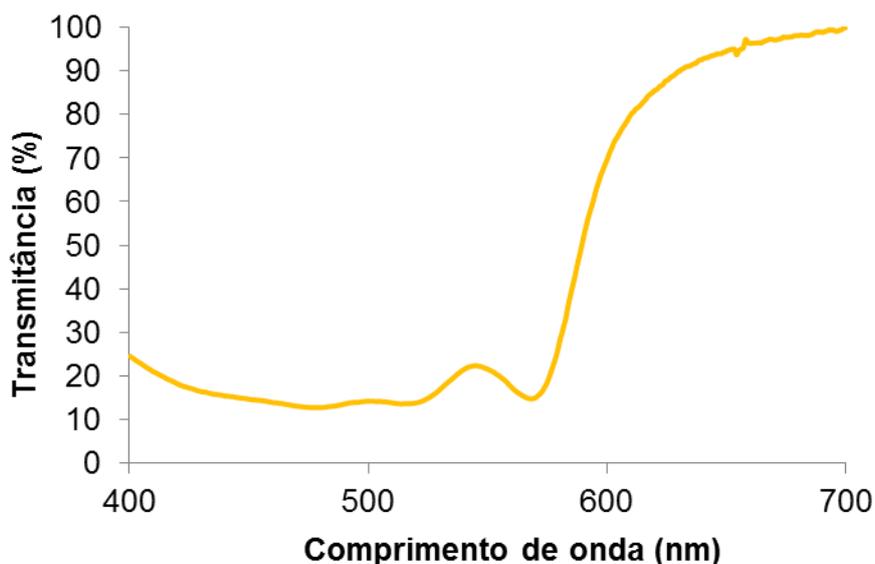


Figura 18 - Espectro de transmissão do polímero usado como filtro para o fluorímetro

A Figura 19 mostra os espectros normalizados para excitação (absorção) e emissão do BE, emissão do LED e transmitância do filtro aplicado. Pode-se observar que o LED utilizado apresenta o máximo de emissão (546 nm) muito próximo ao máximo de absorção do BE (530nm) e que a maior parte da sua radiação é eliminada pelo filtro aplicado.

Ainda na Figura 19 pode-se observar que a emissão do BE tem seu máximo em aproximadamente 603 nm, comprimento de onda que esta na faixa de transmitância da ordem de 80% do filtro aplicado, porém boa parte da faixa de emissão de BE, entre 620 e 700 nm, está na região de 86 a 100% de transmitância do filtro aplicado. Novamente, embora o filtro não proporcione 100 % de transmitância em toda a faixa de emissão do fluoróforo, esta limitação não chegou a comprometer os resultados obtidos nos níveis de concentração estudados.

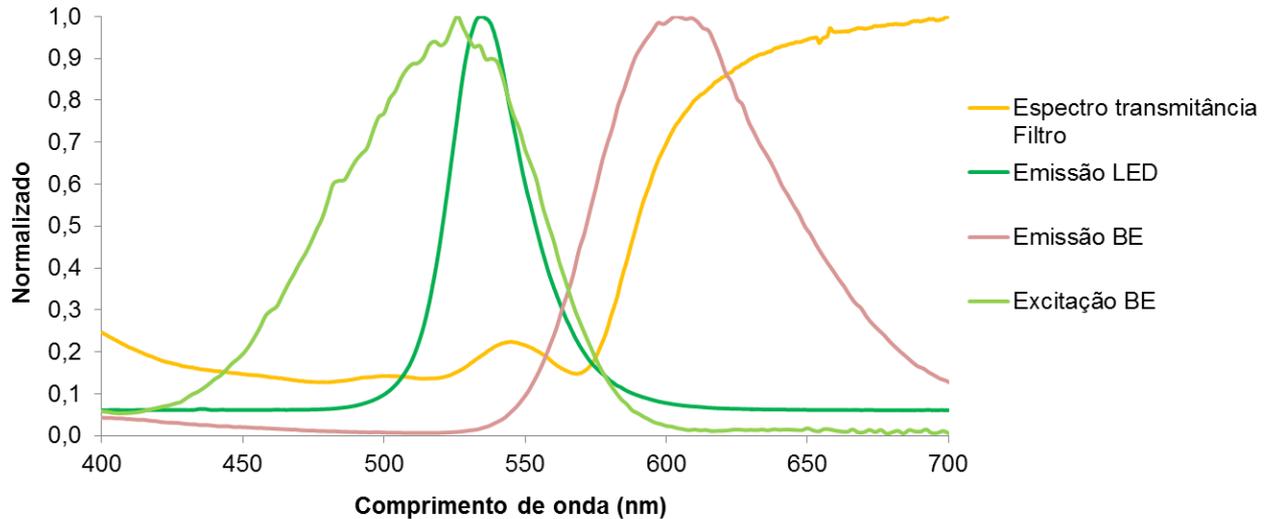


Figura 19 - Espectros normalizados para excitação e emissão do BE, emissão do LED e transmitância do filtro aplicado.

5.1.3- Teste de estabilidade do circuito.

Inicialmente foi realizado um teste para verificar o nível de ruído gerado apenas pelo circuito eletrônico sem a presença da radiação do LED. Neste teste, denominado teste de escuro, foram mensurados o ruído e a estabilidade do sinal do instrumento com o tempo de funcionamento. Em um segundo teste, as medidas foram realizadas com o acionamento da fonte de excitação (LED ligado, teste de claro), de modo a verificar o efeito deste componente no sinal instrumental.

Conforme apresentado na Figura 20, os ruídos obtidos para o sinal no escuro ou no claro são bastante semelhantes, indicando que a fonte de excitação não altera significativamente o sinal no que diz respeito à este quesito. Foi observado também que a linha de base para ambos os testes é bastante estável com *drifts* (variação do sinal com o tempo) da ordem de $0,018 \text{ V h}^{-1}$, os quais podem ser considerados satisfatórios para a aplicação em questão. A Tabela 5 traz um resumo dos dados apresentados na Figura 19.

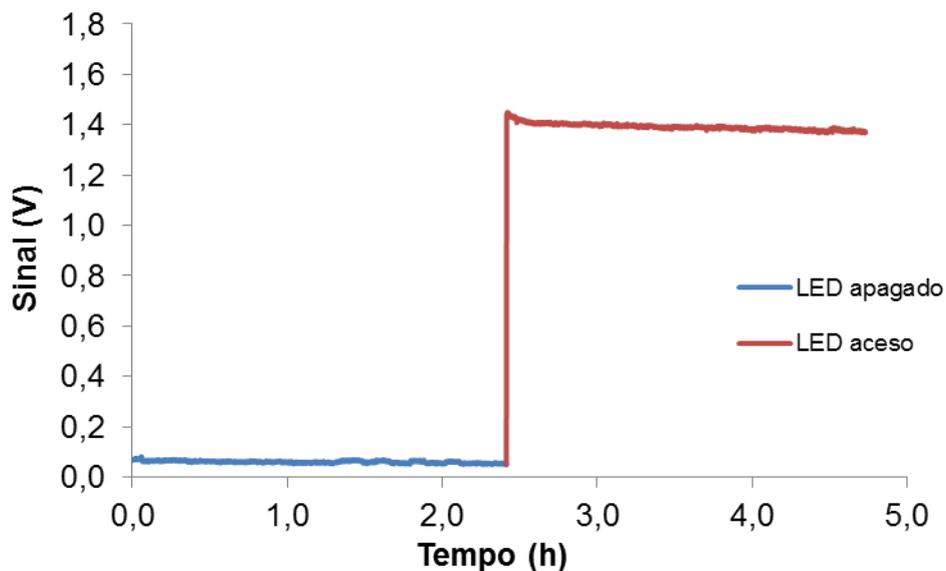


Figura 20 - Testes de estabilidade para circuito de detecção com leituras no modo escuro (LED apagado) e modo claro (LED aceso).

Tabela 6- Informações das leituras obtidas dos testes de claro e escuro

| | Escuro | Claro |
|--|--------|--------|
| Média (V) | 0,061 | 1,392 |
| Max (V) | 0,082 | 1,449 |
| Min (V) | 0,050 | 1,367 |
| Desvio padrão (V) | 0,005 | 0,013 |
| Coefficiente de variação (%) | 7,53 | 0,94 |
| Taxa de variação do sinal (V.h ⁻¹) | -0,004 | -0,018 |

Conforme relatado anteriormente, a Figura 20 comprova que parte da radiação espalhada do LED chega aos detectores (fotodiodos) aumentando o sinal da linha de base em relação àquele obtido apenas para o escuro. Considerando este resultado, todas as medidas realizadas com fluoróforos tiveram os seus respectivos sinais descontados do sinal para o branco.

A partir do teste de claro foi também estimado o tempo para a estabilização do sinal do LED após o seu acionamento, o que simula o comportamento do sistema fluorimétrico quando o usuário acaba de ligar o

instrumento e permite estabelecer o tempo necessário para que o instrumento esteja pronto para a realização das leituras.

De acordo com a Figura 21, a estabilização do sinal ocorre aproximadamente 12 minutos após o acionamento do LED, sendo que a espera mínima de 15 minutos foi adotada antes das realizações das medidas nos estudos posteriores.

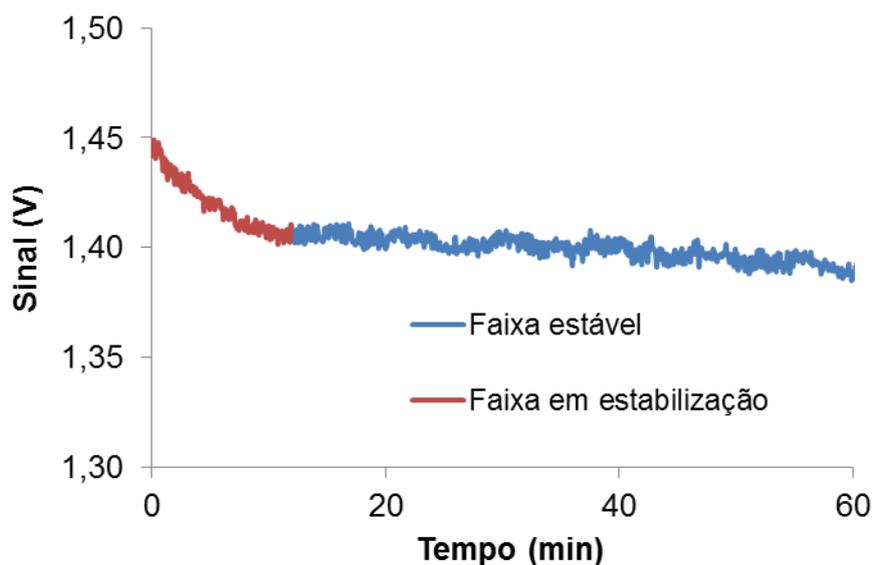


Figura 21 - Estabilização do LED usado como fonte no fluorímetro proposto.

5.1.4 - Testes iniciais com rodamina B

O cromóforo rodamina B foi escolhido como reagente para os testes iniciais por apresentar baixa toxicidade, expondo a menos riscos de contaminação os envolvidos nos experimentos e gerando um resíduo de risco muito menor para o meio ambiente.

A Figura 22 mostra o espectro de excitação (absorção) e emissão de fluorescência para a rodamina B com indicações dos valores de máximo de absorção (554 nm) e máximo de emissão (575 nm) para a substância.

Comparando-se este espectro de absorção com o espectro de emissão do LED (Figura 16), observa-se que o LED emite na região de excitação do fluoróforo, embora não exista coincidência entre os máximos de emissão do LED (fonte) e excitação da rodamina B (fluoróforo). Observa-se também que o filtro óptico utilizado apresenta uma boa taxa de transmitância (Figura 18) a partir de aproximadamente 600 nm. Esta faixa compreende uma parte do espectro de emissão da rodamina B, permitindo que as medidas analíticas sejam realizadas.

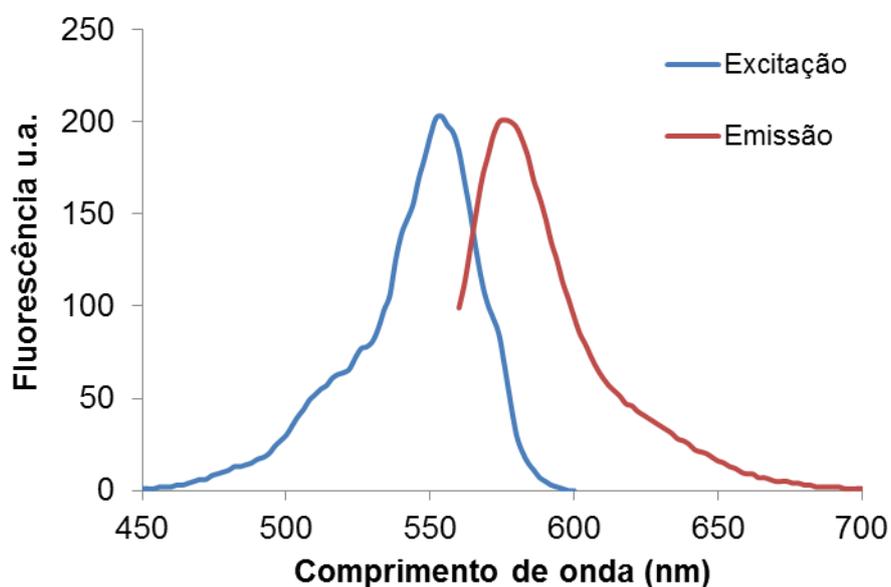


Figura 22 - Espectros de absorção e emissão para rodamina B.

Utilizando este fluoróforo, foram construídas curvas analíticas na faixa de 0,01 a 0,20 mg L⁻¹ no fluorímetro proposto (Figura 23) e também em um espectrofluorímetro comercial utilizando o comprimento de emissão em 575 nm e de excitação em 554 nm (Figura 24). A curva construída com o fluorímetro desenvolvido apresentou um coeficiente de determinação de 0,9990, o qual é comparável ao obtido com o sistema comercial para a faixa estudada ($R^2=0,9971$) e demonstra um desempenho adequado do sistema em termos de linearidade. O para o fluorímetro de LED proposto foi calculado um limite de detecção de 0,004 mg L⁻¹ e um limite de quantificação de 0,012 mg L⁻¹. Para o espectrofluorímetro de bancada foram calculados os limites de detecção de

0,001 mg L⁻¹ e de quantificação de 0,002 mg L⁻¹. Apesar dos limites encontrados para o instrumento de LED proposto serem maiores que os encontrados para o espectrofluorímetro de bancada, pode-se considerar que estes estejam na mesma ordem de grandeza e que os valores encontrados são comparáveis, indicando que o instrumento proposto tem um desempenho próximo ao desempenho do espectrofluorímetro de bancada, levando em consideração o custo de construção e os materiais utilizados.

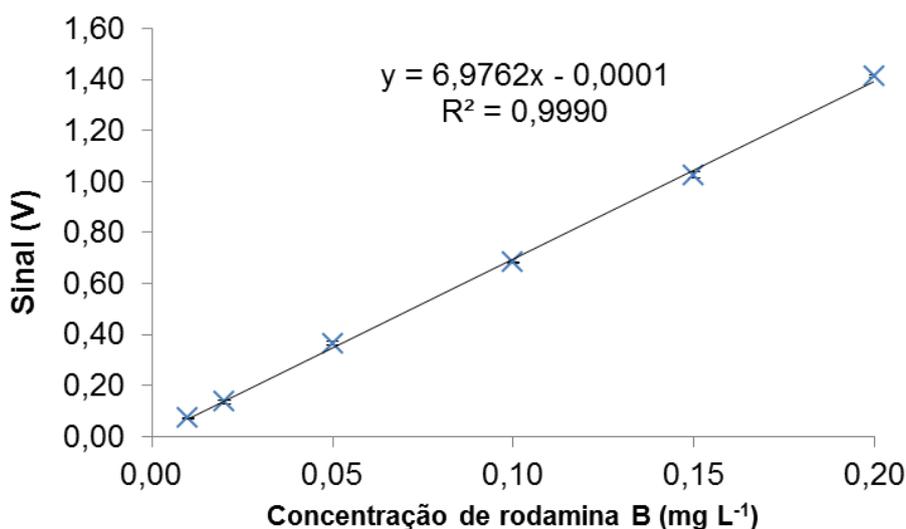


Figura 23 - Curva analítica para rodamina B adquirida com o fluorímetro construído

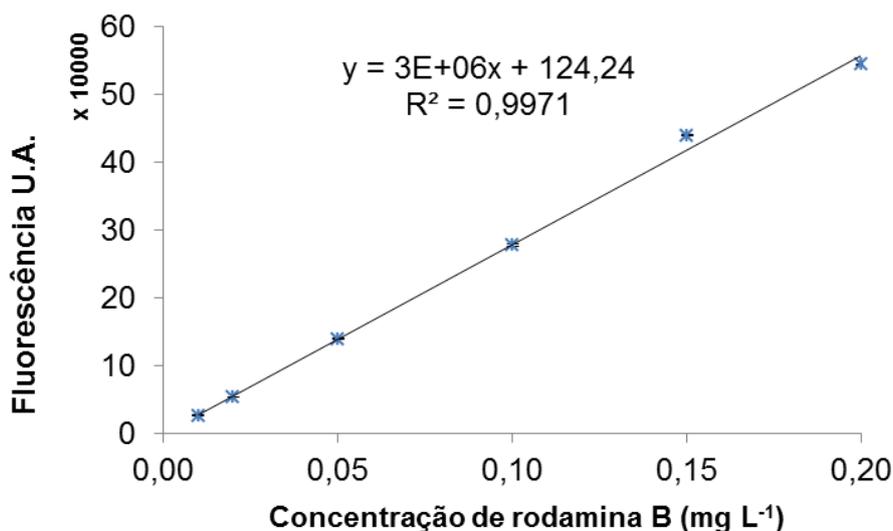


Figura 24 - Curva analítica para rodamina B obtida no fluorímetro em um fluorímetro comercial de bancada

5.1.5 - Testes iniciais com Brometo de Etídio

Os resultados anteriores com rodamina B demonstram que o instrumento é capaz de detectar o sinal tão bem quanto um instrumento de bancada. Para o brometo de etídio foram realizados testes preliminares com o objetivo de averiguar se o equipamento é sensível o suficiente para detectar o composto e perceber a variação de fluorescência que acontece quando se adiciona o DNA.

Os espectros apresentados na Figura 25 foram obtidos para uma solução de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de brometo de etídio adquiridos com um espectrofluorímetro comercial. Pode-se observar a absorção e emissão do fluoróforo sem estar intercalado com DNA. Ainda na Figura 25 é possível observar o aumento da intensidade de fluorescência quando o brometo de etídio está intercalado com o DNA e que existe um leve deslocamento da banda de emissão de 600 nm para comprimentos de onda maiores cerca 603 nm, enquanto o máximo de excitação (absorção) sofre um leve deslocamento da posição inicial 515 nm para 525 nm.

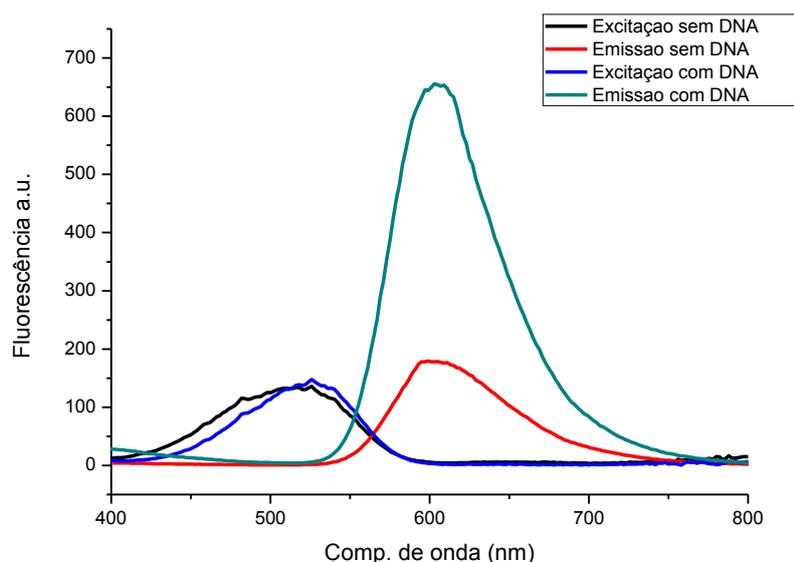


Figura 25 - Espectros de excitação e emissão para uma solução $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BE adquirida em um espectrofluorímetro comercial, sem adição de DNA e com adição de DNA.

A variação da fluorescência com o intercalamento também foi observada com o instrumento proposto, utilizando as mesmas condições utilizadas para o equipamento de bancada. Conforme apresentado na Figura 26, observa-se um aumento significativo da fluorescência (cerca de 2,5 vezes) em relação ao fluoróforo não intercalado. Esse resultado indica a possibilidade de uso do instrumento para a aplicação do projeto, pois a concentração aproximada de brometo de etídio usada neste experimento foi de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ e os protocolos como o da Universidade de Princeton permitem o descarte de soluções deste fluoróforo em concentrações menores que 10 mg L^{-1} sem necessidade de tratamentos. (48)

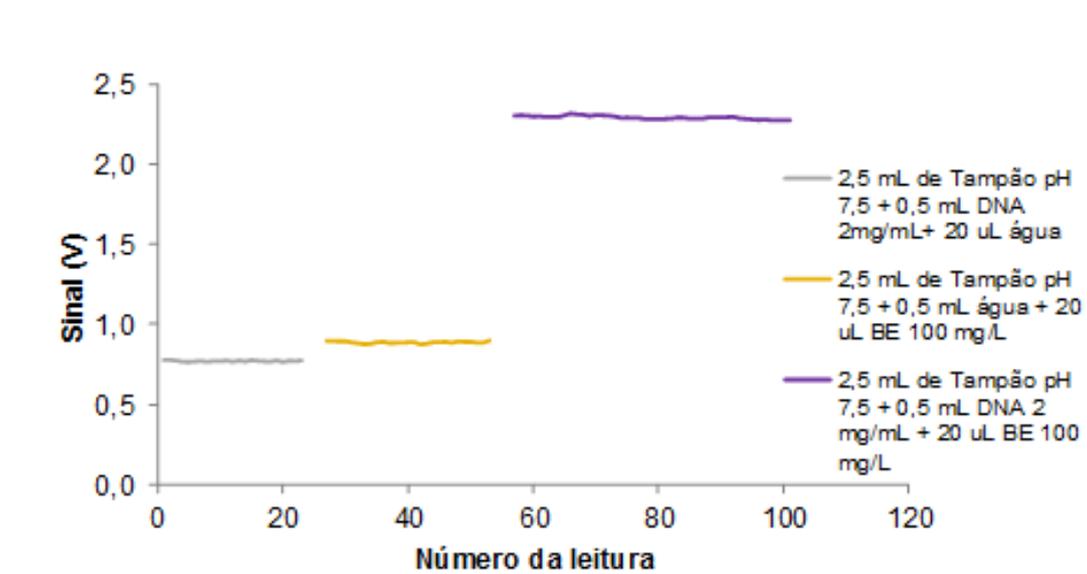


Figura 26 - Variação da fluorescência de uma solução $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Brometo de Etídio quando na ausência e na presença de DNA adquirido no fluorímetro construído.

Com o objetivo de avaliar a capacidade analítica do fluorímetro proposto na determinação do fluoróforo BE, realizou-se um teste por adição de alíquotas de um padrão de BE diretamente à cubeta já contendo a solução de DNA tamponada. Foram realizadas adições sucessivas de $20 \mu\text{L}$ de uma solução 100 mg L^{-1} de Brometo de Etídio a uma cubeta que continha $2,5 \text{ mL}$ de tampão TBS ($\text{pH}=7,5$) e $0,5 \text{ mL}$ de solução de DNA 2 mg mL^{-1} . Pode-se observar na Figura 28 que a curva analítica construída para uma faixa de concentração aproximada de $0,05$ a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ em BE apresentou uma linearidade adequada

($R^2=0,996$) indicando a possibilidade de uso do instrumento para a aplicação quantitativa¹¹³ Com base nas leituras e na projeção do gráfico da Figura 27 (ponto onde o gráfico se curva na parte inferior da curva estimada), estimou-se de forma visual um limite de detecção de aproximado de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ para o método com o instrumento proposto, um valor bem abaixo do que o sugerido para um descarte seguro.

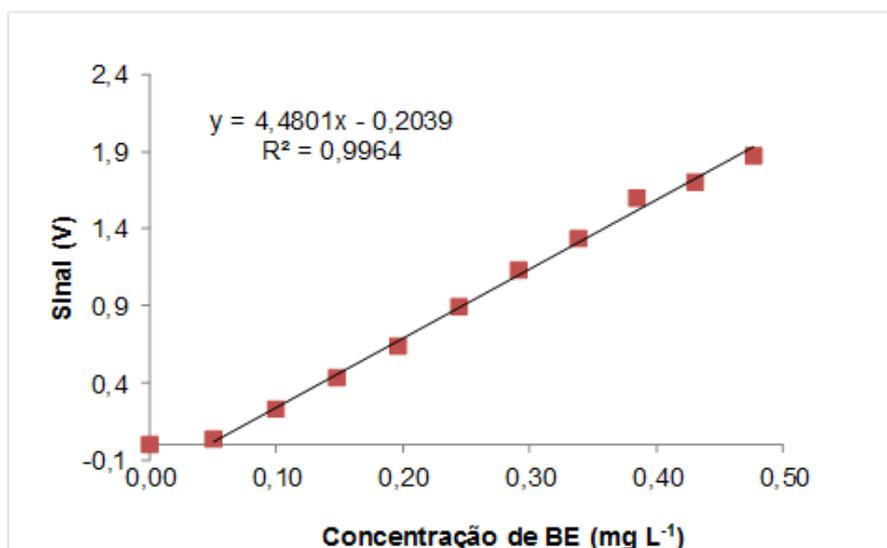


Figura 27 – Variação do sinal de fluorescência para adições sucessivas de BE em um meio tamponado e com presença de DNA no instrumento proposto.

5.1.6– Avaliação do sistema de detecção no monitoramento da degradação de BE

A metodologia aplicada para o processo de degradação, proposta por Lunn e Sanssone, é corriqueiramente utilizada em laboratórios de pesquisa e sua aplicação é segura e eficiente⁵¹. Para verificar a possibilidade de uso do fluorímetro proposto no monitoramento deste processo de degradação foi realizado um experimento para simular a oxidação gradativa do resíduo. Neste experimento, alíquotas de $20 \mu\text{L}$ de uma solução de nitrito de sódio ($3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) eram adicionadas a $25,00 \text{ mL}$ de uma solução de BE a 40 mg L^{-1} , previamente acidificada com $188 \mu\text{L}$ de ácido hipofosforoso concentrado,

levando a um pH menor que 3,0. Após cada alíquota adicionada da solução de nitrito de sódio à mistura reacional eram esperados 30 minutos e realizadas a leitura no fluorímetro proposto. O procedimento de leitura é descrito na seção 4.1.

Para se estimar a concentração de BE a cada adição de solução de nitrito, foi construída uma curva analítica na faixa de 1,0 a 40,0 mg L⁻¹ de BE (Figura 28) e, à partir dos resultados de concentração de BE obtidos, construiu-se a curva de degradação ilustrada na Figura 29.

Pode-se observar que o instrumento foi capaz de detectar as concentrações de BE a cada adição do oxidante (nitrito) até a redução à valores muito próximos de zero, indicando a possibilidade de monitoramento do processo. É importante relatar que algumas concentrações determinadas apresentaram valores menores que zero, o que pode ser resultado do longo período de realização do experimento em relação à construção da curva de calibração, um efeito do *drift* da linha de base do instrumento.

Neste experimento, a ideia inicial era adicionar um excesso de oxidante ao resíduo e monitorar as concentrações de BE em intervalos regulares de tempo, simulando melhor a cinética do processo. Entretanto, ao realizar este procedimento, foi observada a completa degradação do BE em poucos minutos, o que inviabilizou este monitoramento.

É importante destacar que a literatura recomenda que a degradação de BE, com concentrações da ordem de 500 mg L⁻¹, realizada por meio do procedimento aplicado neste trabalho, seja efetuada por um período de 20 horas após a adição do oxidante, o que irá garantir a completa degradação do marcador. Sabe-se, entretanto, que esta recomendação se dá por medidas de segurança, considerando a periculosidade da substância a ser degradada, o que deve ser respeitado. Em um futuro protocolo, baseado nas medidas realizadas com o instrumento proposto, deverá ser obedecida esta recomendação para que seja garantida a efetiva degradação.

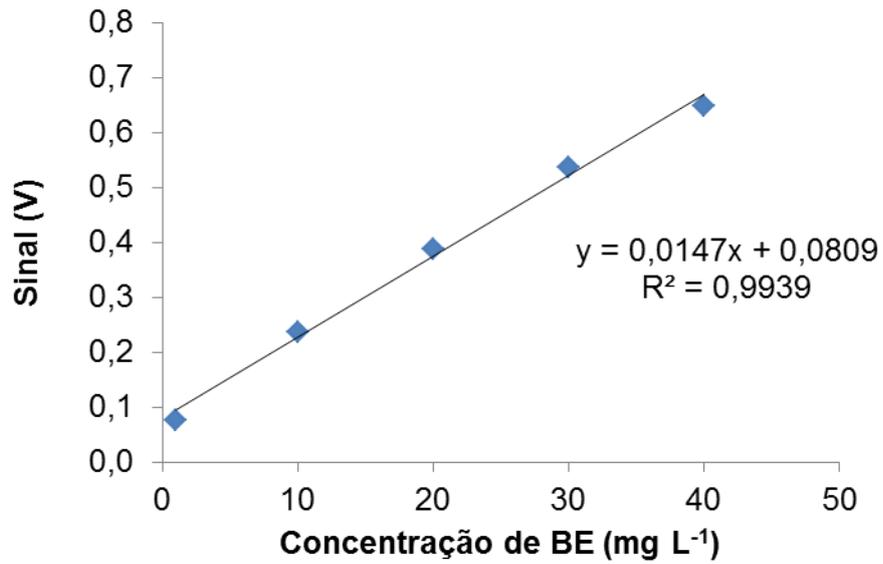


Figura 28 - Curva analítica utilizada para a determinação das concentrações de BE no experimento de titulação de uma solução de BE com nitrito de sódio.

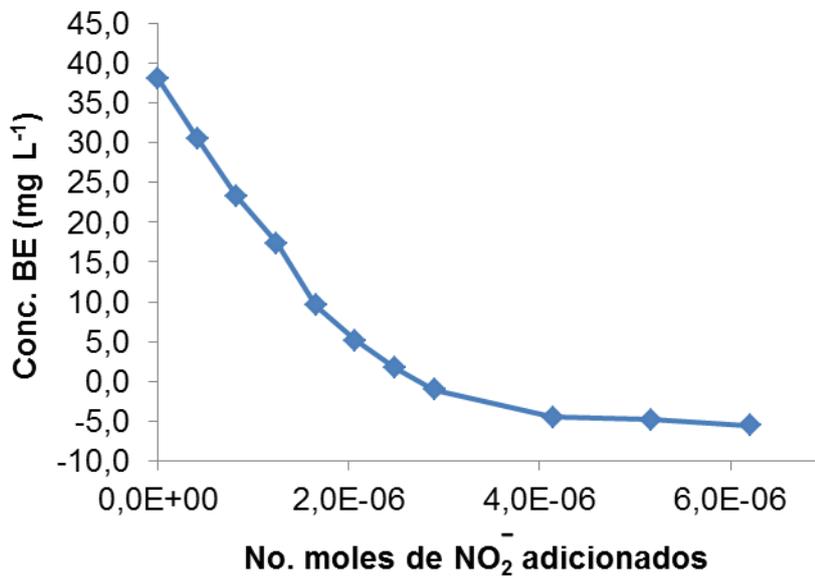


Figura 29 - Evolução da redução da concentração de BE durante o processo de degradação conforme as adições das alíquotas da solução de nitrito de sódio. Concentrações determinadas a partir da curva analítica da Figura 28.

5.2 - Resultados obtidos com a implementação de sistemas em fluxo.

Os sistemas de análise em fluxo propostos e avaliados para a automação do monitoramento da reação de degradação de BE são discutidos a seguir.

5.2.1- Testes iniciais com rodamina B em sistema de análise por injeção em fluxo

Estudos preliminares foram realizados utilizando-se o fluoróforo rodamina B, ao invés do BE, a fim de se avaliar a capacidade de detecção do sistema proposto. Para isto, a configuração ilustrada na Figura 30 foi montada e aplicada para a injeção de um volume de aproximadamente 0,3 mL de solução de rodamina B ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) em um fluxo carregador ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$) contendo o tampão TBE (pH 8,4). Neste teste foram utilizados uma bomba peristáltica Ismatec (IPC), um injetor proporcional¹⁰³ e como forma de detecção o fluorímetro proposto no trabalho com uma célula de fluxo em quartzo (Precision Cells 59FLES10).

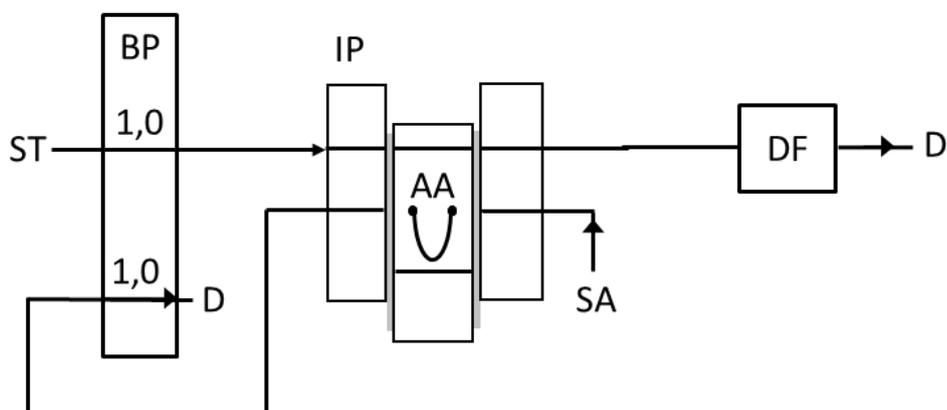


Figura 30 - Diagrama do sistema de análise por injeção em fluxo utilizado. Bomba peristáltica (BP) com indicação das vazões em mL min^{-1} , injetor proporcional (IP) com alça de amostragem (AA) de 0,5 mL, solução tampão (ST), solução de analito (SA), detector fluorimétrico proposto (DF) e descarte (D).

Observa-se no diagrama apresentado na Figura 31 que os sinais para a concentração estudada apresentaram uma boa razão sinal/ruído com uma precisão de 1,04 % para as quatro injeções realizadas, o que confirmou a possibilidade da detecção fluorimétrica em fluxo com o instrumento proposto.

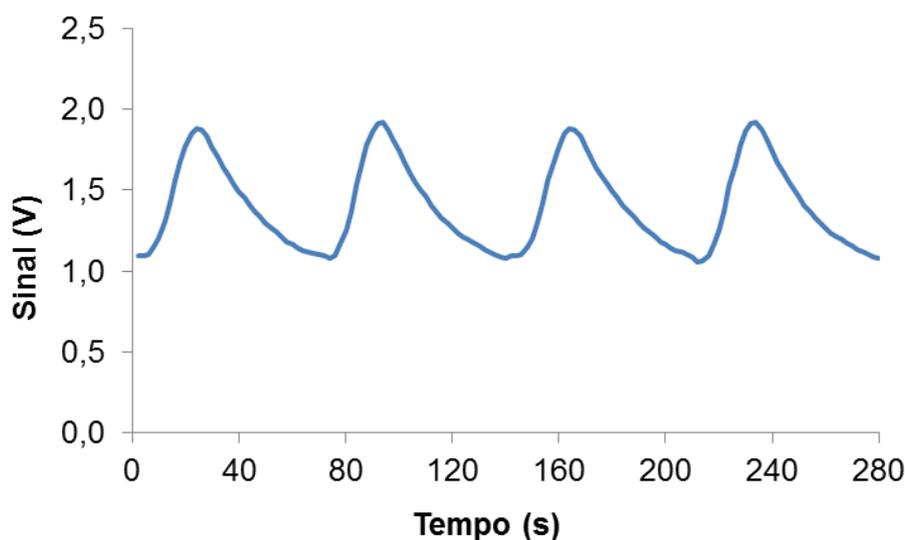


Figura 31 – Diagrama para solução de rodamina B para as condições do experimento.

Aplicando-se as mesmas condições e a mesma configuração de fluxo da Figura 30 foi construída uma curva analítica na faixa de concentração de 0,5 a 10,0 mg L⁻¹ de rodamina B, a fim de avaliar o desempenho do sistema em uma medida quantitativa. O diagrama da Figura 32 mostra que os sinais obtidos para concentrações de rodamina B maiores ou iguais 1,0 mg L⁻¹ apresentaram razões sinal/ruído adequadas (maiores que 4,23) e que uma curva analítica baseada nas alturas dos picos obtidos (Figura 35) pode ser construída. De fato, a curva analítica apresentou um coeficiente de determinação de 0,998, demonstrando um comportamento linear para a calibração, sendo estimado um limite de detecção de 1,23 mg L⁻¹ a partir do sinal do branco adicionado de três vezes o seu desvio padrão.¹¹⁴

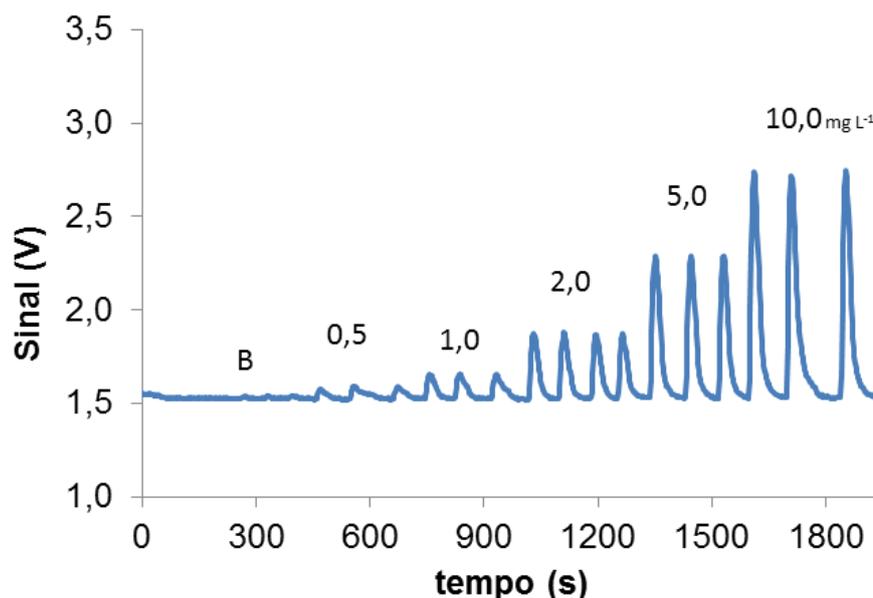


Figura 32 - Diagrama para curva analítica realizada nas condições de fluxo propostas pela figura 30.

Observando a resposta obtida com a cubeta de fluxo comercial foi realizada uma tentativa de se substituir este componente por uma célula de fluxo *labmade* construída a partir do corpo de uma pipeta volumétrica de 1,0 mL, conforme mostra a Figura 33. O objetivo de se utilizar esta célula de fluxo alternativa era diminuir os custos para desenvolvimento do instrumento visto que a célula de fluxo comercial utilizada é adquirida no mercado por cerca de US\$ 700, um custo justificado pela utilização do quartzo como material de construção que permite a realização de medidas no ultravioleta.

Com esta nova célula construiu-se a curva analítica para rodamina B na mesma faixa de concentração (0,5 a 10,0 mg L⁻¹ do fluoróforo), sendo o diagrama obtido apresentado na Figura 34 e a curva analítica apresentada na Figura 35. Observa-se que o diagrama apresentou uma resposta menor que a cela de fluxo em quartzo, com razões sinal/ruído menores (3,27 para o padrão de 1,0 mg L⁻¹). Uma explicação para esta diminuição pode estar na geometria da cela adaptada, a qual apresenta uma forma arredondada que espalha a radiação de excitação. Além disso, o material não é totalmente polido, apresentando algumas ranhuras que também contribuem para o menor

aproveitamento da radiação de excitação. Estes inconvenientes levaram a uma queda da sensibilidade como pode ser observado nas curvas analíticas plotadas na Figura 35.

Apesar de a célula *labmade* proporcionar uma boa linearidade, com R^2 maior que 0,999, haveria a limitação para o seu uso em concentrações mais baixas. Deve-se ter em mente que a rodamina B é um fluoróforo mais eficiente nas condições experimentais que o BE e por isso uma perda de sensibilidade poderia inviabilizar a sua aplicação no instrumento proposto para o analito alvo. Neste sentido, todas as medidas posteriores foram realizadas com a célula de fluxo comercial.

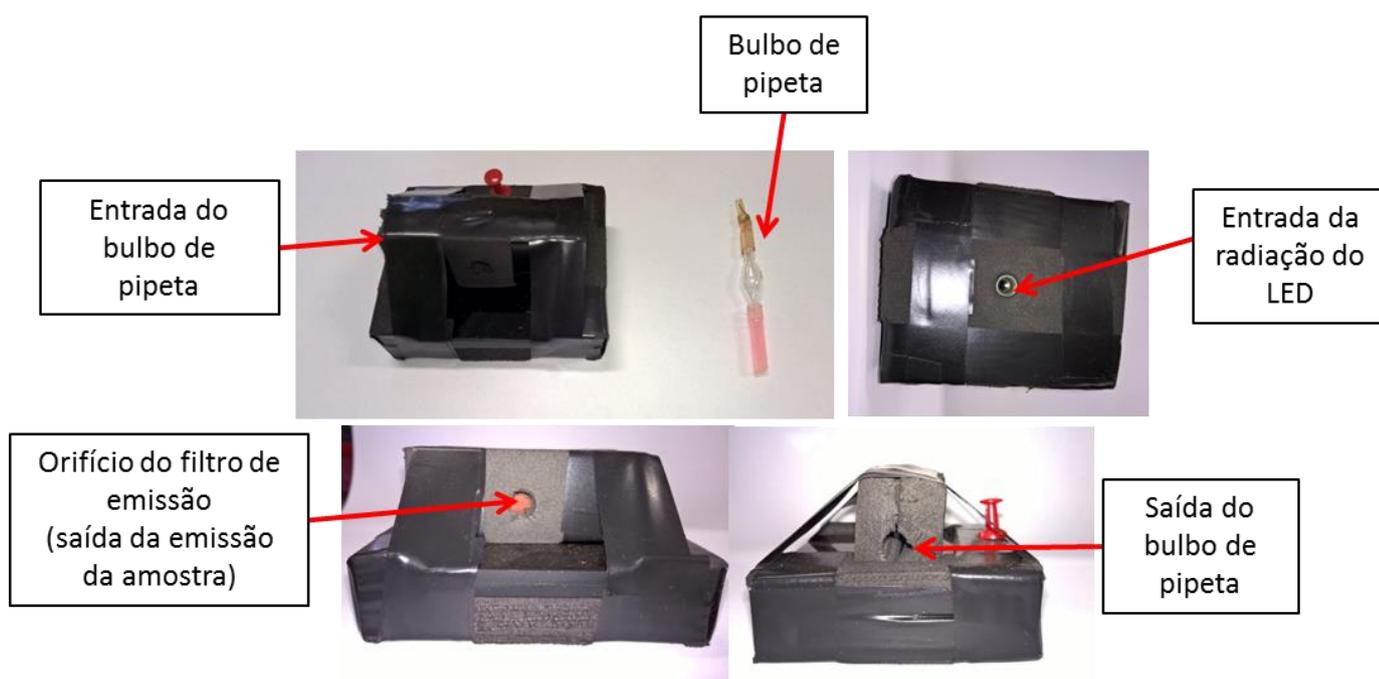


Figura 33 - Célula de fluxo *labmade* confeccionada como alternativa a cubeta de fluxo comercial utilizada nos testes preliminares de fluxo.

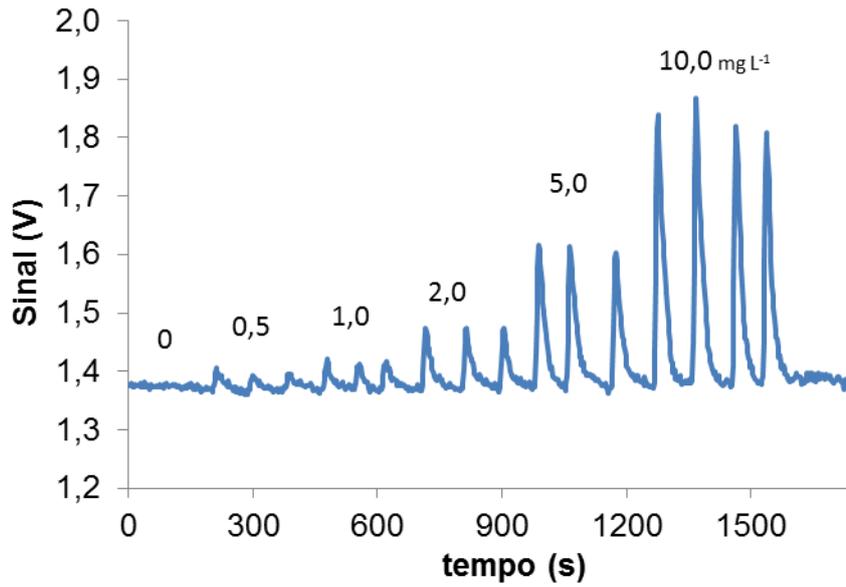


Figura 34 - Diagrama obtido para as leituras da curva analítica realizada com célula *labmade*.

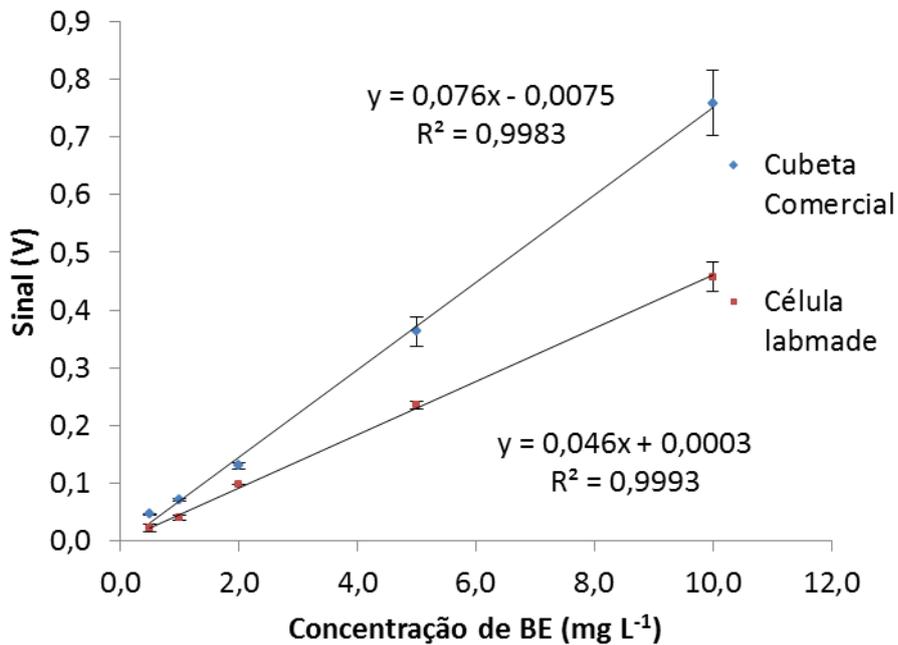


Figura 35 - Curvas analíticas obtidas para as soluções padrão de BE adquiridas por FIA para a cubeta de fluxo comercial e a célula de fluxo *labmade*.

Terminados estes estudos, foi realizada uma avaliação prévia de possíveis influências dos reagentes de degradação (nitrito e ácido hipofosforoso) quando os mesmos estão presentes na solução do fluoróforo. O mesmo sistema de análise por injeção em fluxo (Figura 30) foi utilizado, alternando-se injeções de uma solução de rodamina B ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) sem adição dos reagentes de degradação e de uma solução de rodamina B na mesma concentração, mas contendo agora os reagentes de degradação (ácido hipofosfórico 0,75 % v/v e nitrito de sódio $0,045 \text{ mol L}^{-1}$).

Neste experimento, esperava-se observar apenas o efeito das concentrações dos reagentes adicionados à rodamina B no perfil dos sinais analíticos obtidos, sem que fosse observado um decaimento significativo da altura dos picos. Entretanto, conforme apresentado na Figura 36, há uma atenuação da ordem de 90,12% do sinal de fluorescência quando se compara o sinal obtido na presença e ausência dos reagentes de degradação. De fato, em uma pesquisa bibliográfica foram encontradas algumas publicações que mostram que existe uma supressão de fluorescência de rodaminas causada pela presença de nitrito em solução. Em 2003 Zhang e colaboradores utilizaram rodamina 110 para determinar nitrito em água de torneira e naturais, os autores identificaram a conversão da rodamina 110 em um derivado diazônio em uma das suas aminas e a formação de um grupo nitroso na outra amina. O grupo diazônio é hidrolisado e substituído por um grupo OH. Neste processo se altera a doação de elétrons para as ligações conjugadas e assim a fluorescência diminui. O grupo de Pugen e colaboradores utilizou a rodamina B no processo de determinar óxidos de nitrogênio de amostras de ar convertendo-os a nitrito e reagindo com rodamina B. Estes dois exemplos explicam o motivo do decaimento da fluorescência devido à presença do nitrito em meio ácido. Este resultado indica a possibilidade de se aplicar o sistema proposto em análises de nitrito utilizando-se desta abordagem.^{115,116}

Considerando este possível efeito de supressão de fluorescência da rodamina durante as medidas e o fato de que os reagentes de degradação não apresentam fluorescência na faixa de excitação utilizada, não foi possível verificar a influência dos reagentes nos perfis dos picos.

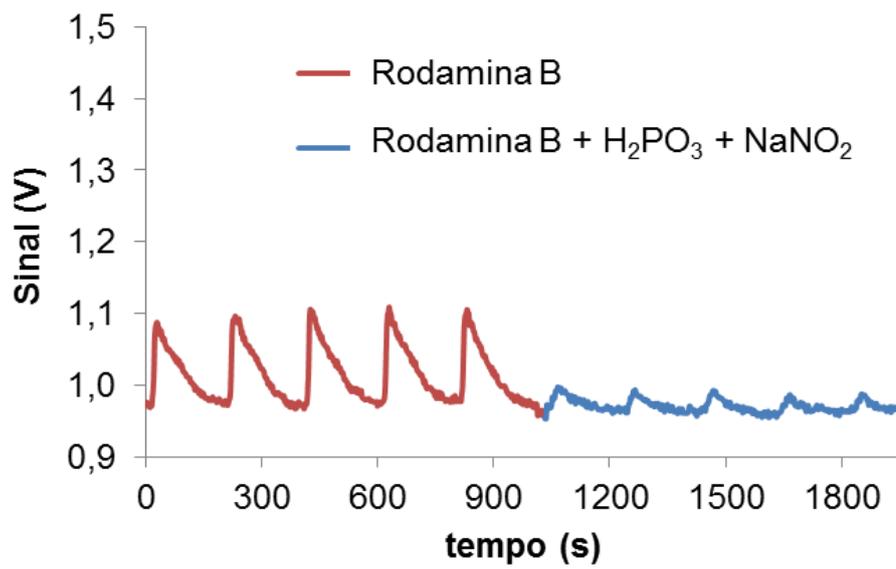


Figura 36 – Diagrama para solução de rodamina B utilizada nos experimentos de verificação da influência dos reagentes no sistema de fluxo proposto.

5.2.2- Testes iniciais com brometo de etídio em sistema de análise por injeção em fluxo

Utilizando a mesma configuração de fluxo (Figura 30) com a célula comercial, foi construída uma curva analítica com brometo de etídio utilizando como carregador o tampão TBE puro (sem adição de DNA). Primeiramente, para realização desta curva analítica foi necessário utilizar padrões de concentrações muito altas, 5 níveis de concentração variando de 10 a 200 mg L⁻¹. Isto foi necessário, pois soluções com concentrações menores que 10 mg L⁻¹ não proporcionaram picos com boas razão sinal/ruído nesta configuração. O diagrama obtido pode ser visto na Figura 37 e a curva analítica construída encontra-se na Figura 38.

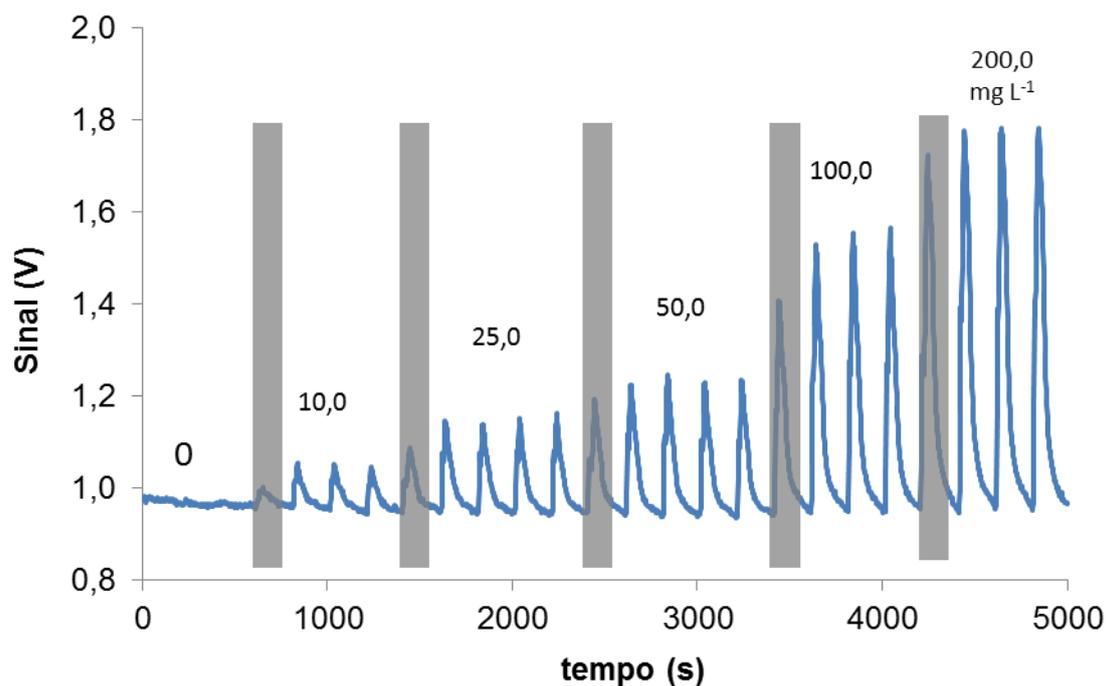


Figura 37 - Diagrama do teste inicial em fluxo para o BE usando as mesmas condições de fluxo aplicadas nos testes anteriores.

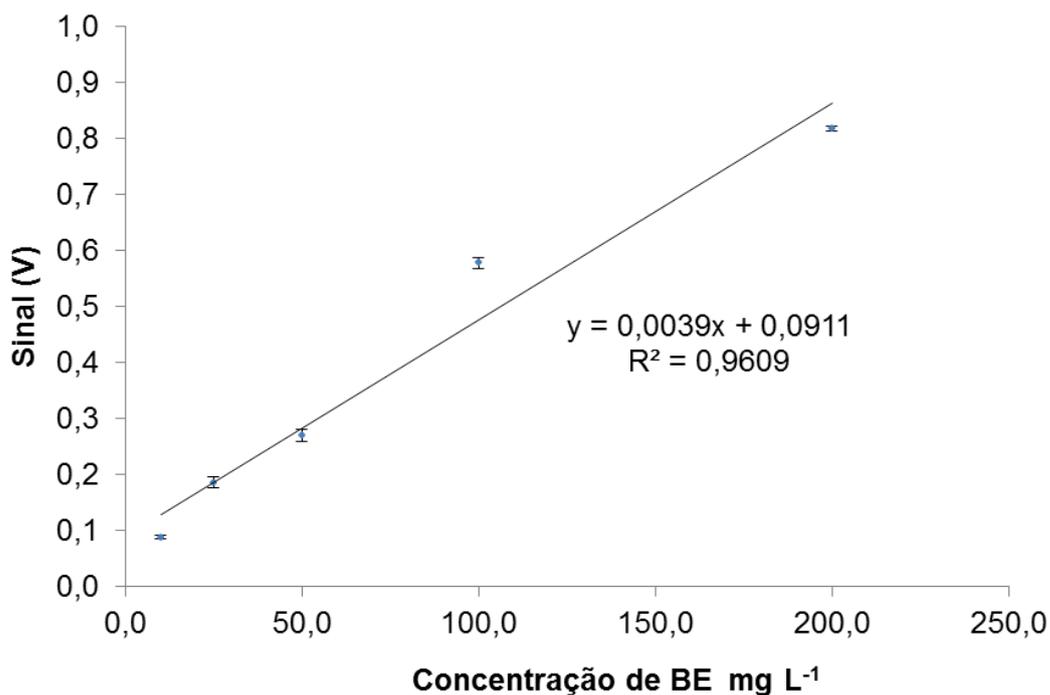


Figura 38 - Curva analítica obtida a partir das alturas dos picos do diagrama da figura 37

A curva analítica obtida a partir das alturas dos picos do diagrama da Figura 37 apresentou uma linearidade limitada com um valor de R^2 igual a 0,96, sendo estimado um limite de detecção de $4,7 \text{ mg L}^{-1}$ com base no sinal do branco adicionado de três vezes o seu desvio padrão.¹¹⁴ Estes resultados mostraram que a estratégia, sem a adição de DNA ao tampão, limita consideravelmente a sensibilidade, o que certamente comprometeria a sua utilização para a determinação de BE nos resíduos laboratoriais.

Com o objetivo de se melhorar a sensibilidade para o BE, realizou-se a alteração do fluido carregador com a adição do DNA ao tampão a uma concentração de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Conforme discutido anteriormente, existe um aumento da fluorescência do BE quando intercalado ao DNA que pode aumentar a sensibilidade para esta determinação. Deste modo, foi realizado um experimento utilizando uma curva analítica com 5 níveis de concentração variando de $0,5$ a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Conforme apresentado na Figura 39 o fiagrama obtido com esta alteração na solução carregadora não proporcionou picos bem definidos para as concentrações estudadas, sendo observadas razões sinal/ruído consideravelmente baixas. Parte deste problema pode ser atribuída à cinética lenta de intercalamento entre o BE e o DNA,⁵⁷ a qual pode limitar a sua aplicação para o sistema automatizado por injeção em fluxo, onde as leituras são realizadas sem que os equilíbrios químicos tenham sido efetivamente estabelecidos.¹⁰³ De fato, este experimento demonstrou que a injeção de um pequeno volume da solução da amostra em um fluxo carregador de solução de DNA não proporcionou um resultado satisfatório para a determinação de BE na faixa de concentração estudada e, portanto, uma outra estratégia, descrita na próxima seção foi utilizada para tentar se contornar este problema.

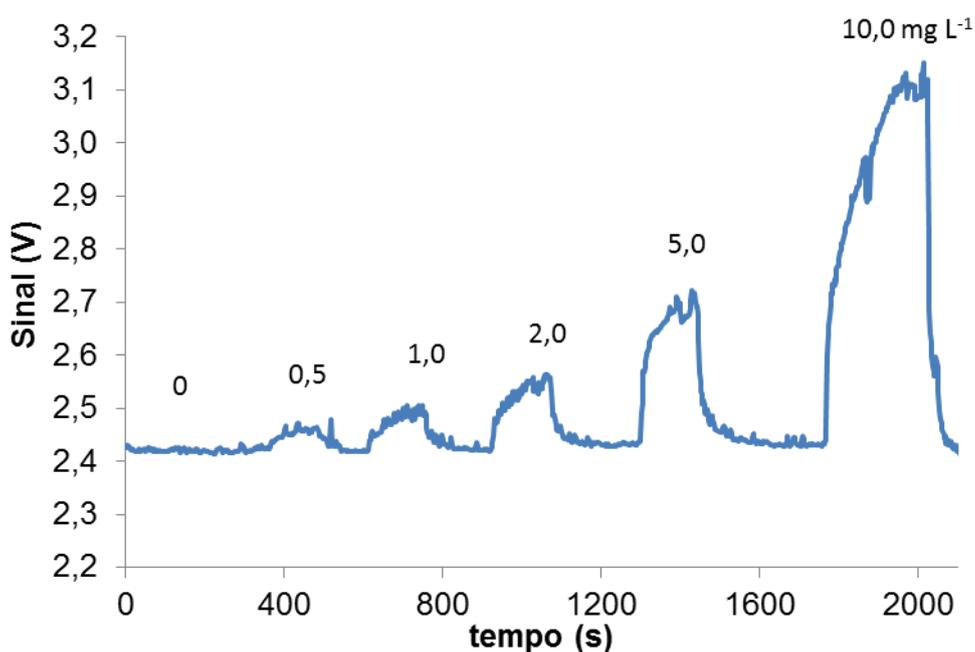


Figura 39 - Fiagrama obtido para o BE nas condições de FIA aplicadas e com adição de DNA ao fluido carreador.

5.2.3 – Abordagem de fluxo *Stopped-flow*

Considerando os resultados descritos na seção anterior e o fato de que a dispersão no sistema de análise por injeção em fluxo poderia contribuir negativamente para a obtenção de respostas mais sensíveis ao analito, alterou-se a estratégia de automação do procedimento para um novo sistema em que as soluções do analito e do reagente (tampão com DNA) fossem confluídas diretamente e à mesma vazão até o detector fluorimétrico. Além disso, foi considerada também a facilidade para se automatizar o processo de injeção da amostra no sistema, pois o controle/movimentação automática de um injetor proporcional é relativamente mais complexo de se efetuar do que a injeção direta a partir de uma bomba solenoide, por exemplo.

O diagrama para esta nova estratégia de automação é mostrado na Figura 40, onde uma bomba solenoide é responsável pelo bombeamento/injeção da solução da amostra e uma mini-bomba peristáltica (*Qualitem*) é empregada para a propulsão da solução reagente (Solução tamponada de DNA). Neste ponto, vale destacar que a substituição da bomba peristáltica convencional por uma mini-bomba peristáltica foi realizada com o objetivo de tornar o instrumento mais simples e de menor custo, uma vez que a nova bomba pode ser adquirida por aproximadamente US\$ 60, valor que é muitas vezes menor que o da bomba peristáltica utilizada anteriormente.

Neste procedimento, após a confluência das soluções no ponto “C” (Figura 40) e o preenchimento da célula de fluxo, as bombas interrompem o bombeamento e aguardava-se o tempo de estabilização do sinal (usualmente 3,0 minutos) antes de se realizar as medidas fluorimétricas. Esta estratégia recebe o nome de *stopped-flow* e é normalmente utilizada para o monitoramento de reações de cinética lenta.¹⁰³

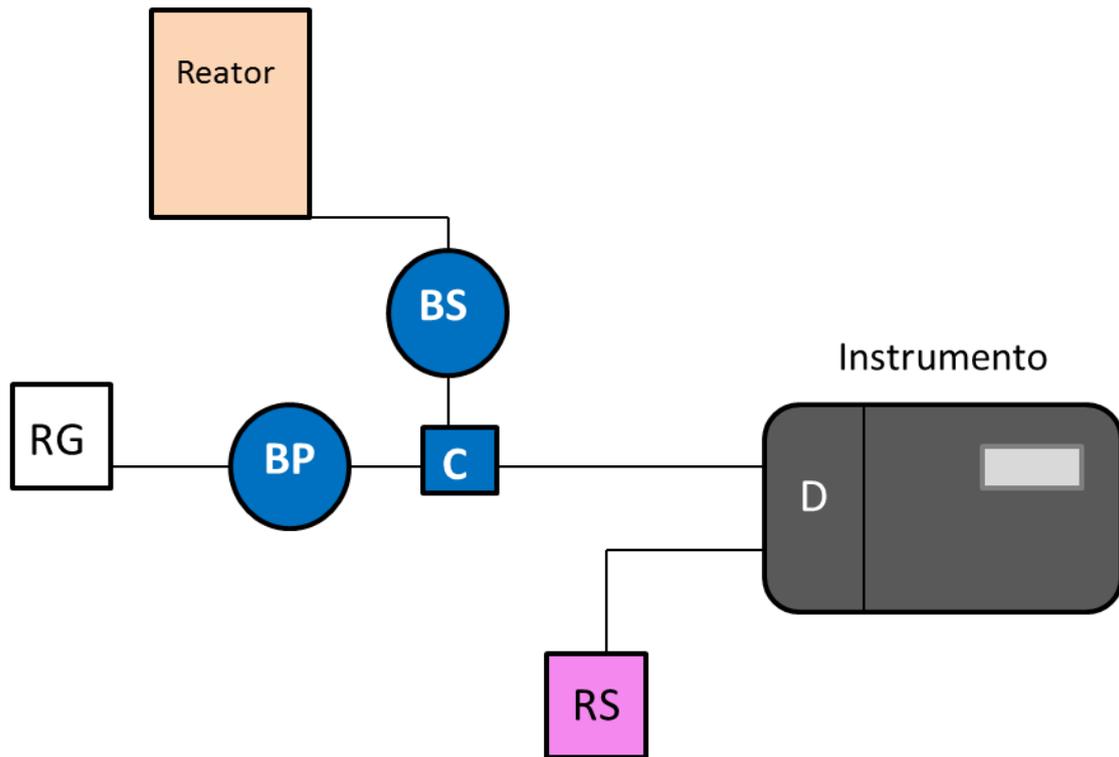


Figura 40 - Diagrama do sistema Stopped-flow proposto para a detecção do BE.

Um primeiro experimento realizado com esta configuração consistiu em monitorar a variação do sinal analítico após a mistura de uma solução de BE (10 mg L^{-1}) com solução tamponada de DNA. Para isto, realizou-se o monitoramento do sinal imediatamente após o preenchimento da célula de fluxo e interrupção do bombeamento. O gráfico da Figura 41 mostra a variação do sinal com o tempo e se observa que a leitura atinge um máximo estável após de 2,5 minutos (150 s). Para a solução testada, um aumento de aproximadamente 7,24 % foi estimado para o sinal estabilizado quando comparado ao sinal obtido imediatamente após a mistura. Deste resultado, propôs-se realizar as leituras de fluorescência com pelo menos 3 minutos após a interrupção do fluxo, de forma a garantir o tempo necessário para o estabelecimento do equilíbrio reacional.

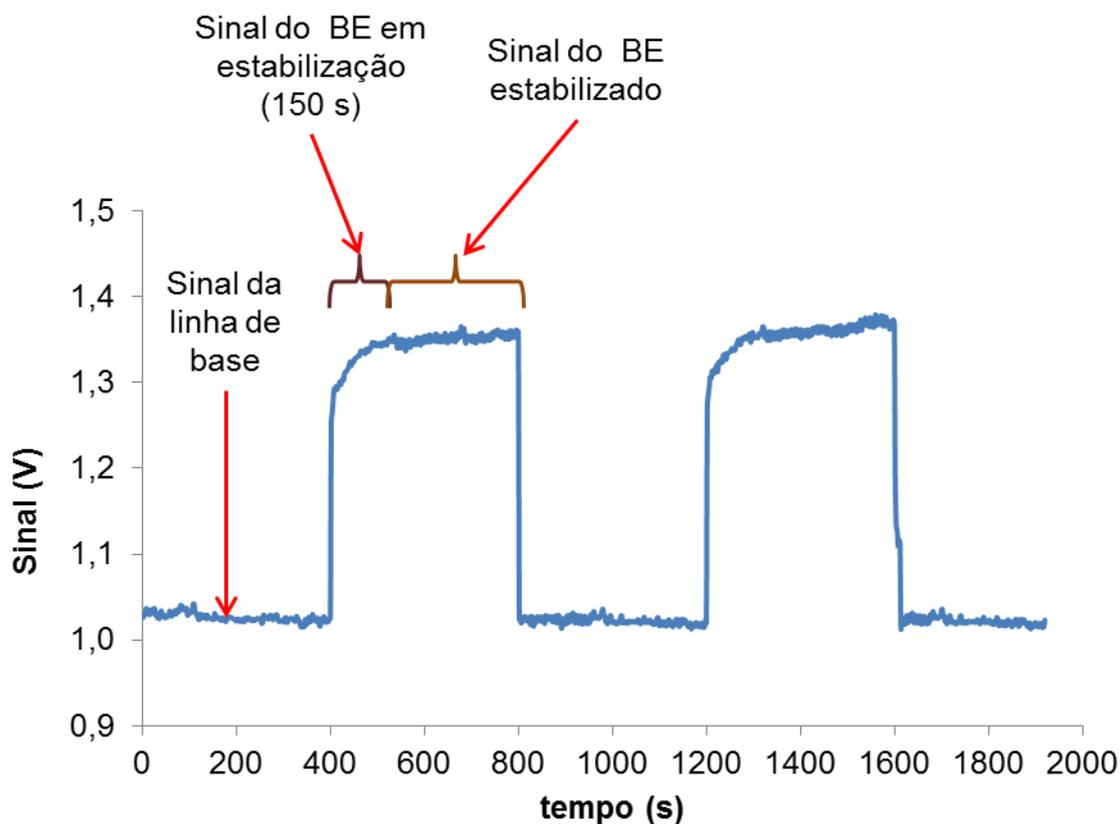


Figura 41 - Leitura do sinal de estabilização da reação de intercalamento entre o DNA do fluido carreador e o BE na cela de fluxo.

A Figura 42 mostra os sinais obtidos para seis injeções consecutivas de uma solução padrão com $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BE utilizando a estratégia de *stopped-flow* e leituras de fluorescência realizadas 3 minutos após a parada do fluxo. Como podem ser observados, os sinais não são transientes, apresentando um patamar constante para a linha de base (quando apenas a solução carregadora com DNA preenche a célula de fluxo) e outro patamar para o sinal resultante da mistura do padrão com a solução de DNA. Baseada na diferença de sinal dos patamares, estimou-se a precisão de 0,99 % para as medidas considerando o coeficiente de variação dos dados.

Neste ponto, é importante destacar que o perfil do sinal analítico obtido (em forma de patamares) facilitou consideravelmente a aquisição dos dados gerados por meio do programa desenvolvido para o microcontrolador. De fato, a determinação da área ou altura de um sinal transiente (pico) requer um

algoritmo mais complexo que aquele necessário para diferenciar os níveis contínuos de sinal obtidos com esta nova estratégia.

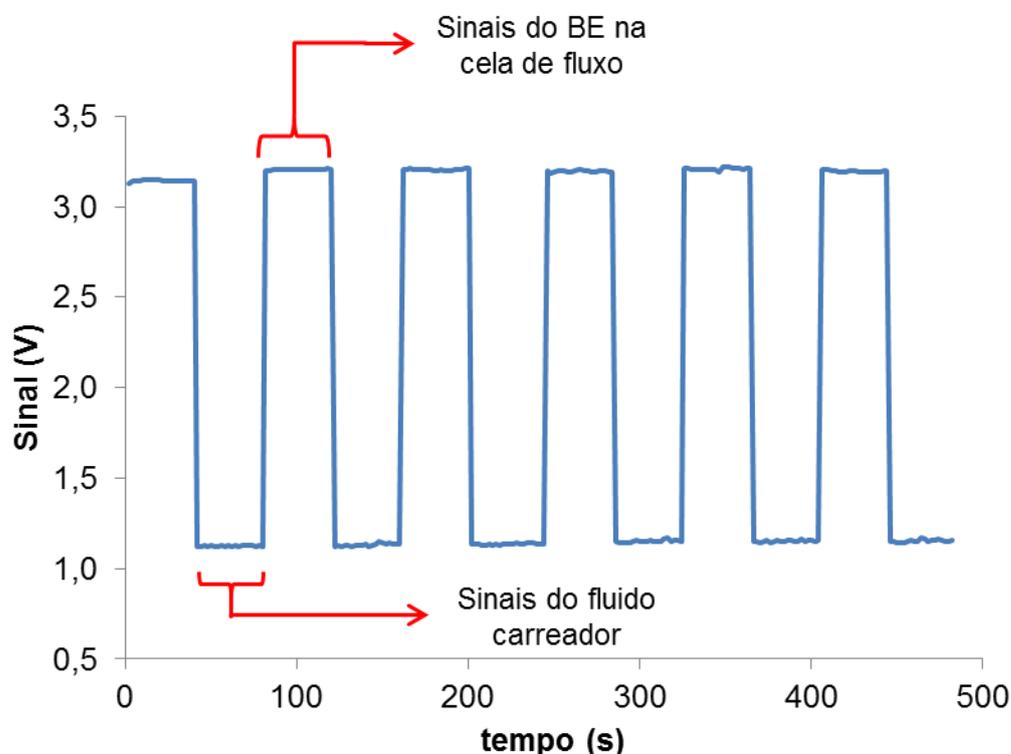


Figura 42 – Respostas do instrumento a injeções do padrão de 50 mg L⁻¹ em modo *stopped-flow*.

Observado este resultado, o sistema foi avaliado na construção de uma curva analítica para BE em 5 níveis de concentração variando de 1,0 a 20 mg L⁻¹. Os sinais obtidos são apresentados na Figura 43 e a curva analítica construída com os valores médios dos sinais é apresentada na Figura 44. Como pode ser observado, a linha de base permaneceu praticamente constante durante as medidas e os sinais para as concentrações avaliadas apresentaram razões sinal/ruído maiores que 2,5 o que permitiu a obtenção da curva analítica com linearidade adequada ($R^2 = 0,9966$) em uma faixa de concentração que engloba o valor de 10,0 mg L⁻¹, considerado como limite máximo de concentração para descarte nos protocolos de tratamento estudados. O valor de limite de detecção, calculado a partir do valor do branco adicionado de 3 vezes o desvio padrão do sinal do branco, foi de 0,33 mg L⁻¹ e o limite de quantificação, estimado a partir do valor do branco somado a 10 vezes o desvio padrão do sinal do branco, foi de 1,16 mg L⁻¹, os quais podem

ser considerados adequados para o propósito do referido instrumento. Deste modo, esta estratégia de automação e detecção foi selecionada para a determinação de BE em soluções residuais e para monitorar a degradação deste marcador.

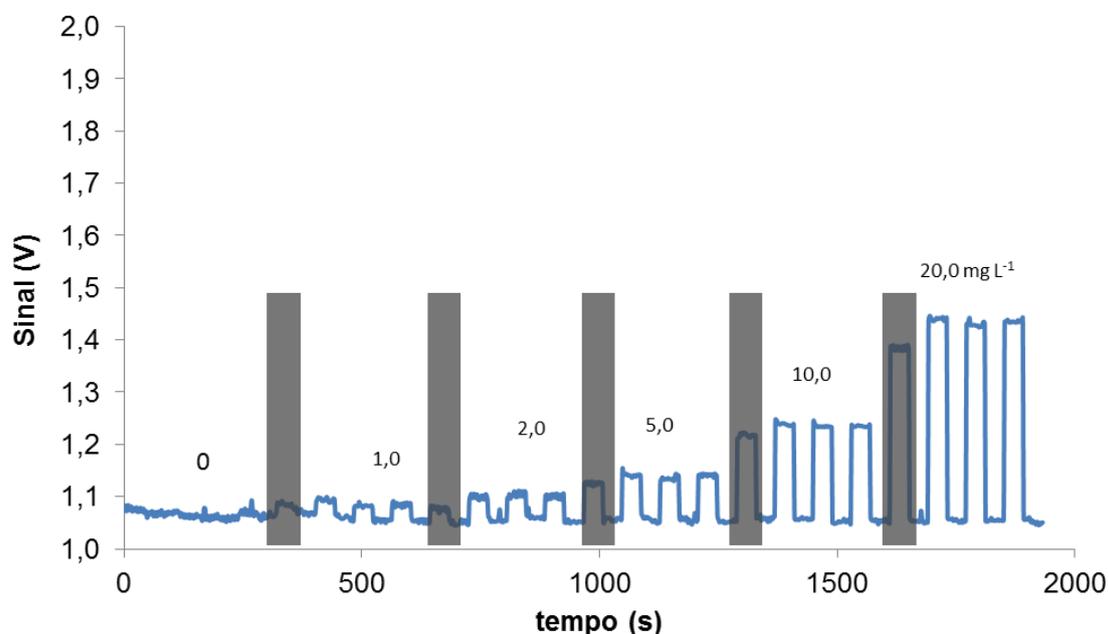


Figura 43 - Sinais obtidos com o instrumento proposto para as soluções padrões de BE. As barras correspondem às injeções de ambientação e limpeza.

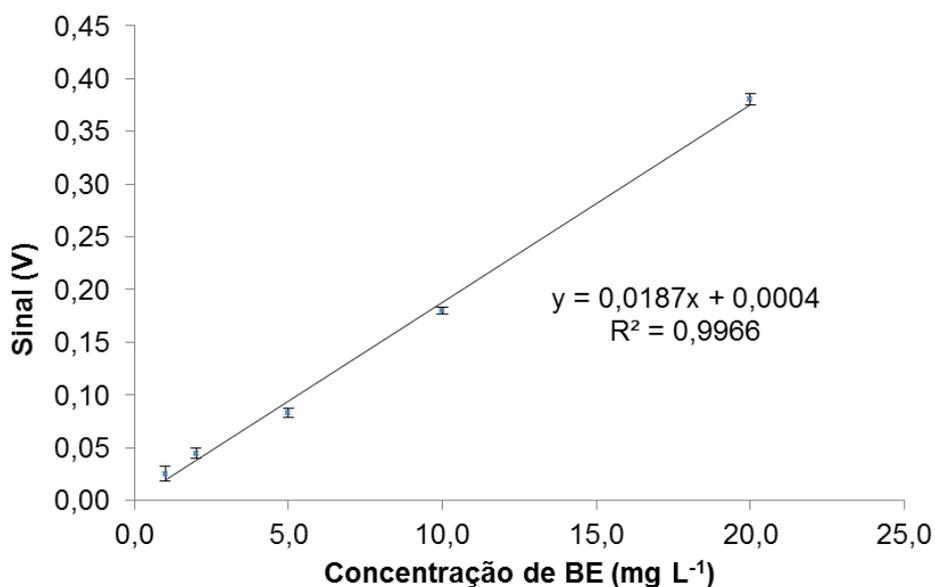


Figura 44 - Curva analítica plotada a com a média das alturas dos sinais obtidos a partir dos sinais encontrados na figura 43.

5.2.4 - Sistema de decisão

O sistema de decisão foi idealizado para que o instrumento informasse ao usuário o momento em que o processo de degradação pode ser considerado finalizado. Como dito anteriormente, o instrumento precisa ser calibrado e para isto foram utilizados apenas dois padrões (5,0 e 15,0 mg L⁻¹ em BE) e o branco (0,0 mg L⁻¹ em BE), de forma que a concentração de 10,0 mg L⁻¹ estaria entre os pontos da curva de calibração. O valor do branco (0,0 mg L⁻¹) serve como sinal de referência e conforme visto nas equações 1 e 2 (materiais e métodos) é subtraído das leituras dos padrões.

O uso de apenas dois pontos de concentração para a calibração se justifica pela simplificação do procedimento e principalmente pelo fato de que a concentração de 5,0 mg L⁻¹, metade da concentração recomendada pelos protocolos de degradação foi utilizada como concentração limite. Desta forma concentrações maiores ou iguais a 5,0 mg L⁻¹ não são consideradas com a degradação finalizada. Deste modo, mesmo que a calibração levasse a um erro negativo da ordem de 50% na concentração de uma solução com 10,1 mg L⁻¹, ainda assim o instrumento indicaria que a degradação está incompleta. Por outro lado, se um erro positivo de igual grandeza for observado para uma amostra contendo 4,9 mg L⁻¹, o instrumento indicará erroneamente que a degradação está incompleta. Em ambos os casos deve-se observar que não haveria o descarte de solução com concentração maior que a estabelecida pelos protocolos, garantindo um procedimento seguro.

Para averiguar o correto funcionamento do sistema de decisão foi idealizado um conjunto de amostras sintéticas para comparação dos resultados. O instrumento foi ligado e aguardou-se o tempo de estabilização (aproximadamente 15 minutos) antes de proceder-se a calibração com os pontos descritos. Com a calibração realizada, cinco níveis de concentração (2,0; 5,0; 7,0; 10,0 e 15,0 mg L⁻¹) foram lidos para verificar a resposta do instrumento proposto. Estas concentrações foram escolhidas de forma a verificar se o instrumento daria a resposta correta de finalização da reação.

Assim, para os valores escolhidos seriam avaliadas uma amostra com resultado de degradação concluída ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) e quatro respostas de “reinjetar”, indicando a não finalização do processo de degradação.

Os resultados obtidos para as leituras das amostras são encontrados na Tabela 7 e também na Figura 45, a qual mostra a curva de calibração obtida em conjunto com os pontos referentes às amostras testadas. Observa-se que as respostas obtidas com o instrumento proporcionaram erros relativos positivos, variando entre 2,7 % e 22,5 %, quando estes resultados são comparados com as concentrações adicionadas à amostra. Apesar disto, nenhuma das amostras avaliadas foi classificada erroneamente com relação à conclusão do processo de degradação, o que mostra que o instrumento foi eficiente neste sentido.

Tabela 7 - Resultados obtidos para o teste do sistema de decisão do instrumento proposto.

| Concentração das amostras (mg L^{-1}) | Concentração indicada pelo instrumento (mg L^{-1}) | Medias das concentrações indicadas pelo instrumento (mg L^{-1})* | Erro relativo % | Resposta fornecida pelo instrumento | Acertos (+=acerto) (-=erro) |
|--|---|---|-----------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| 2,0 | 2,58 | 2,45±0,42 | +22,5 | Degradação Concluída | + |
| | 1,98 | | | Degradação Concluída | + |
| | 2,78 | | | Degradação Concluída | + |
| 7,0 | 7,47 | 7,54±0,36 | +7,7 | Reinjetar | + |
| | 7,93 | | | Reinjetar | + |
| | 7,23 | | | Reinjetar | + |
| 10,0 | 9,96 | 10,27±0,36 | +2,7 | Reinjetar | + |
| | 10,19 | | | Reinjetar | + |
| | 10,66 | | | Reinjetar | + |
| 5,0** | 5,85 | 5,55±0,31 | +11,0 | Reinjetar | + |
| | 5,23 | | | Reinjetar | + |
| | 5,58 | | | Reinjetar | + |
| 15,0** | 15,14 | 15,94±0,96 | +6,3 | Reinjetar | + |
| | 17,00 | | | Reinjetar | + |
| | 15,67 | | | Reinjetar | + |

*Valores com indicação dos desvios padrão

**Linhas em cinza – leitura dos padrões de calibração do instrumento.

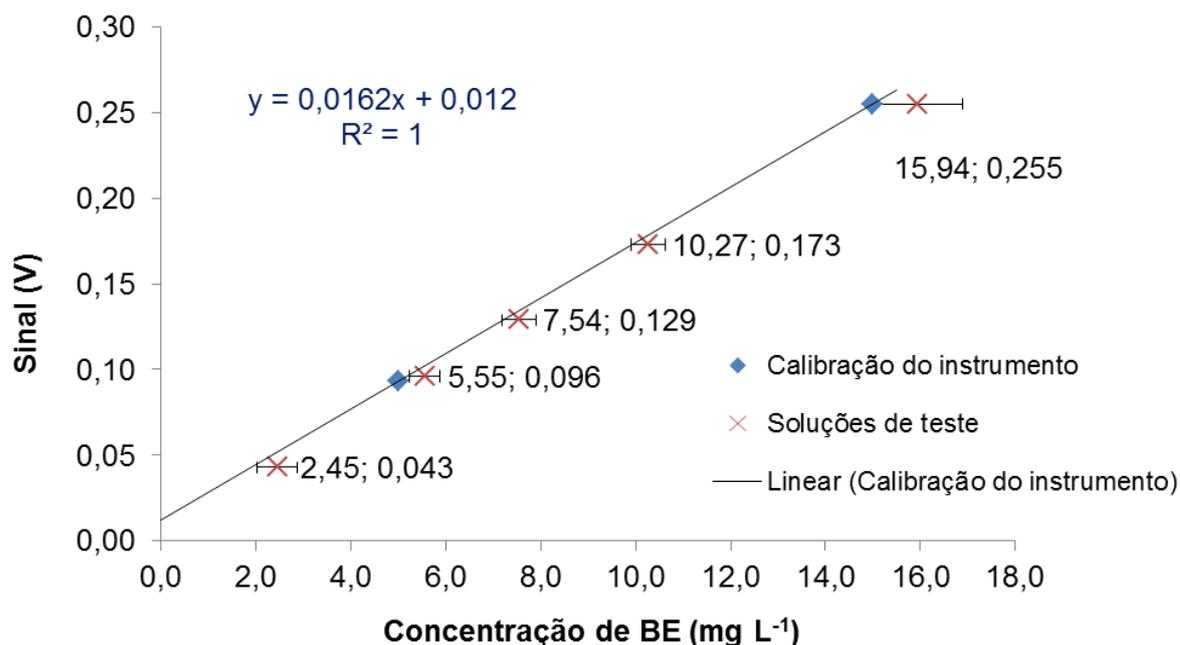


Figura 45 - Curva de calibração do instrumento (losangos azuis) e respostas do instrumento para as soluções utilizadas no teste (asteriscos marrons). Rótulos dos dados indicam (concentração fornecida ; sinal lido).

Com o objetivo de avaliar se o modo de calibração empregado proporcionou os erros relativos observados, procedeu-se a calibração utilizando-se a resposta do instrumento para três soluções (2,0; 5,0 e 15,0 mg L⁻¹) e a regressão linear por mínimos quadrados a partir do aplicativo Excel para se determinar as concentrações das amostras. Conforme pode ser observado na Tabela 8.

Para comparação foi feita uma calibração utilizando o Excel para o cálculo das concentrações estimadas. A curva para o cálculo das concentrações estimadas pode ser visualizada na Figura 46.

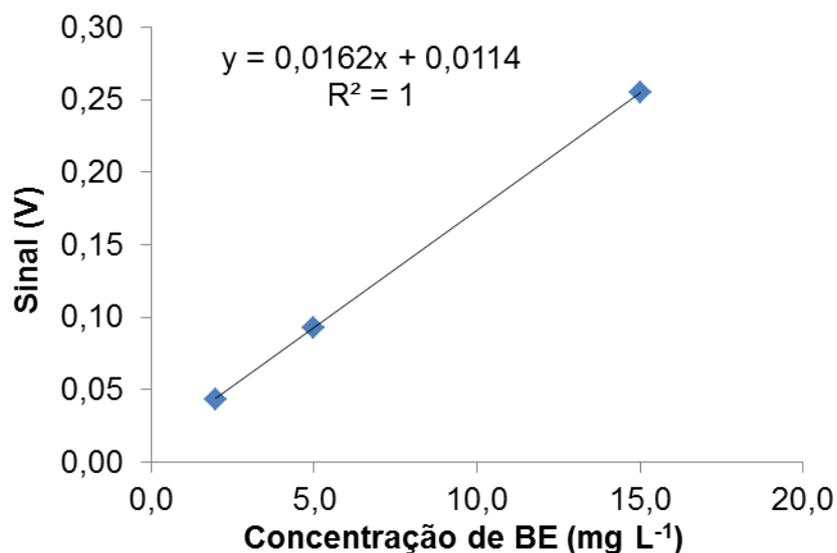


Figura 46 - Curva analítica para estimativa dos erros relativos entre a regressão linear com Excel e o sistema de calibração do instrumento.

Tabela 8 - Descrição dos erros relativos entre as concentrações de referência, as concentrações estimadas pela curva analítica (Excel) e os resultados fornecidos pelo instrumento proposto.

| [BE] [*] _{ref.} / mg L ⁻¹ | [BE] / mg L ⁻¹ | | Erros relativos ^{**} % | |
|--|---------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|
| | Cal. Excel | Cal. Instr. | Cal. Excel | Cal. Instr. |
| 2,00 | 1,99 | 2,45 | -0,4 | 22,5 |
| 5,00 | 5,13 | 5,55 | 2,6 | 11,0 |
| 7,00 | 7,38 | 7,54 | 5,5 | 7,7 |
| 10,0 | 10,16 | 10,27 | 1,6 | 2,7 |
| 15,0 | 15,56 | 15,94 | 3,7 | 6,3 |

*Concentrações de Referência

**Erros relativos à concentração de referência

A Figura 47 mostra a curva de comparação entre os valores estimados pela curva analítica usando o Excel e o valor estimado pela calibração do instrumento. A figura mostra que a curva apresenta uma boa linearidade com os pontos se enquadrando de forma satisfatória a reta estimada ($R^2=0,9994$). Outra informação importante pode ser observada a partir dos dados de regressão encontrados na tabela 9. Os resultados para a interseção mostram que existe uma tendência do valor de interseção se afastar de 0. Esse resultado indica que os resultados do instrumento proposto são levemente superiores aos resultados estimados. Esta variação é fruto do processo de

calibração adotado para o instrumento. Por usar somente dois pontos para calibração o software embarcado suprime a constante (interseção) considerando o seu valor 0. Este processo faz com que o equipamento superestime a concentração da solução. Apesar de ser uma fonte de erro sistemático no funcionamento do instrumento este é contornado pela escolha do limite de decisão definido ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$), que já é um valor inferior ao valor considerado ideal para garantir que qualquer erro ou flutuação de leitura não remeta a um erro de interpretação e a uma resposta errada e por consequência indique um descarte em um momento indevido.

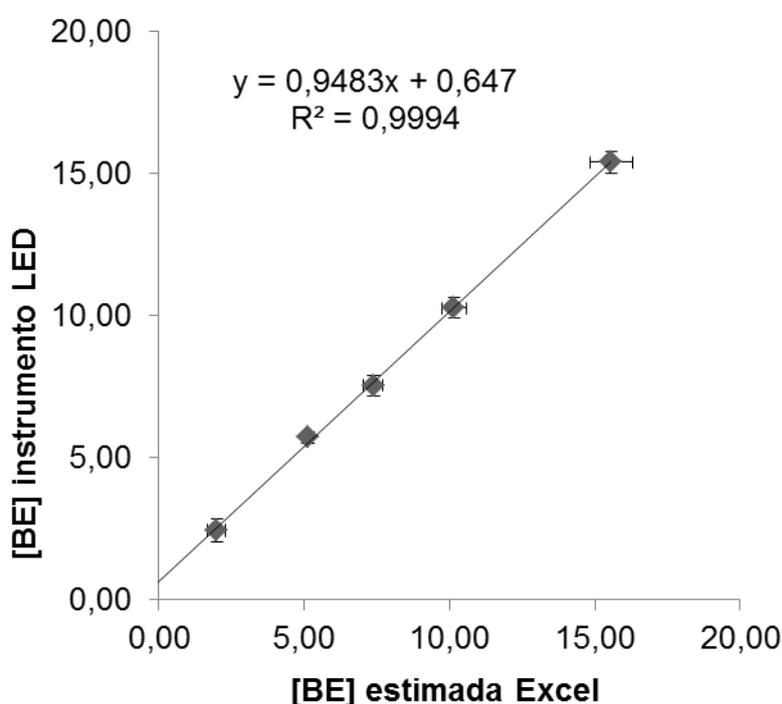


Figura 47 - Curva de comparação entre os resultados de concentração fornecidos pelo instrumento proposto e as concentrações fornecidas pela regressão linear utilizando o Excel. Concentração de brometo de etídio [BE] em mg L^{-1} .

Tabela 9 - Dados de regressão para curva de comparação da figura 48

| | <i>Coeficientes</i> | <i>Erro padrão</i> | <i>95% inferiores</i> | <i>95% superiores</i> |
|------------|---------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| Interseção | 0,6470 | 0,1276 | 0,2409 | 1,0531 |
| Inclinação | 0,9483 | 0,0138 | 0,9045 | 0,9920 |

5.3 – Sistema de detecção alternativo

A forma alternativa de detecção de BE baseada nas imagens digitais obtidas por celular foi avaliada preliminarmente com o monitoramento das respostas das componentes R, G e B para soluções padrão de BE na faixa de concentração de 1,0 a 20,0 mg L⁻¹ preparadas em solução tamponada de DNA. A Figura 48 mostra que a componente R proporcionou a resposta mais sensível para as concentrações estudadas e que a faixa linear para as medidas nesta componente se encontra entre 1,0 e 5,0 mg L⁻¹. De fato, como se observa na Figura 49, a emissão do fluoróforo apresenta uma coloração laranja/avermelhada que justifica a melhor sensibilidade para a componente R. Nesta figura, observa-se também que a fotografia obtida para a solução do branco (0,0 mg L⁻¹ em BE) apresenta um fundo verde, decorrente do espalhamento da radiação de excitação na cubeta, o qual leva a um aumento do sinal de fundo para a componente G.

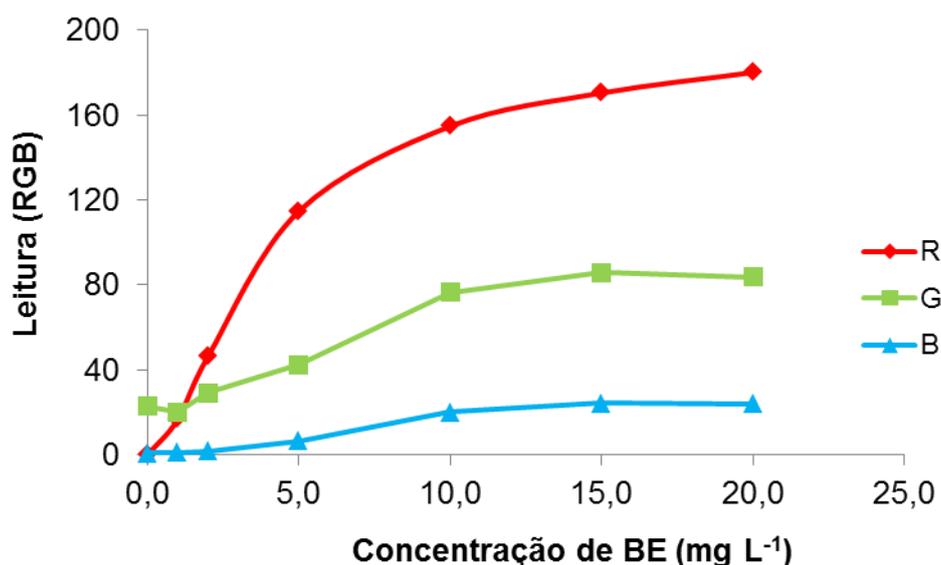


Figura 48 - Variação dos sinais R, G e B para os estudos iniciais com os padrões de 1,0 a 20,0 mg L⁻¹ de BE

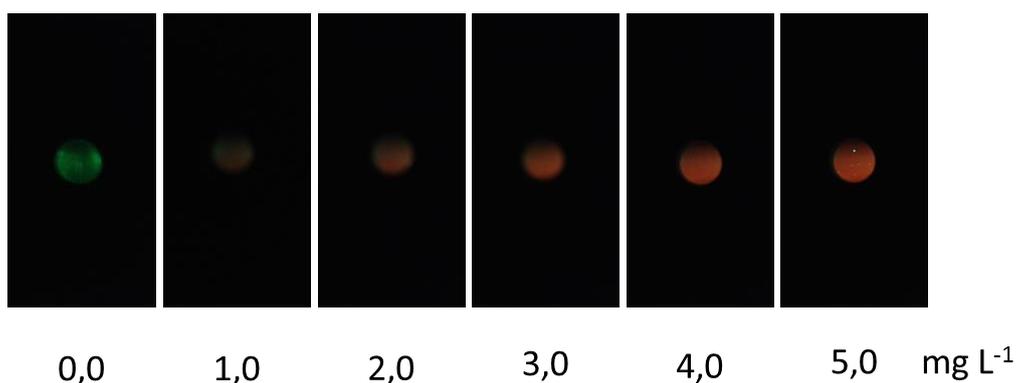


Figura 49 - Imagens da variação da coloração emitida pelo BE com o aumento da concentração.

A partir destes resultados preliminares, construiu-se uma curva de calibração com cinco níveis de concentração variando de 1,0 a 5,0 mg L⁻¹. Conforme apresentado na Figura 50, a curva apresentou um comportamento linear satisfatório ($R^2=0,9904$) sendo estimado um limite de detecção de 0,91 mg L⁻¹, o qual foi calculado a partir do módulo do intercepto.

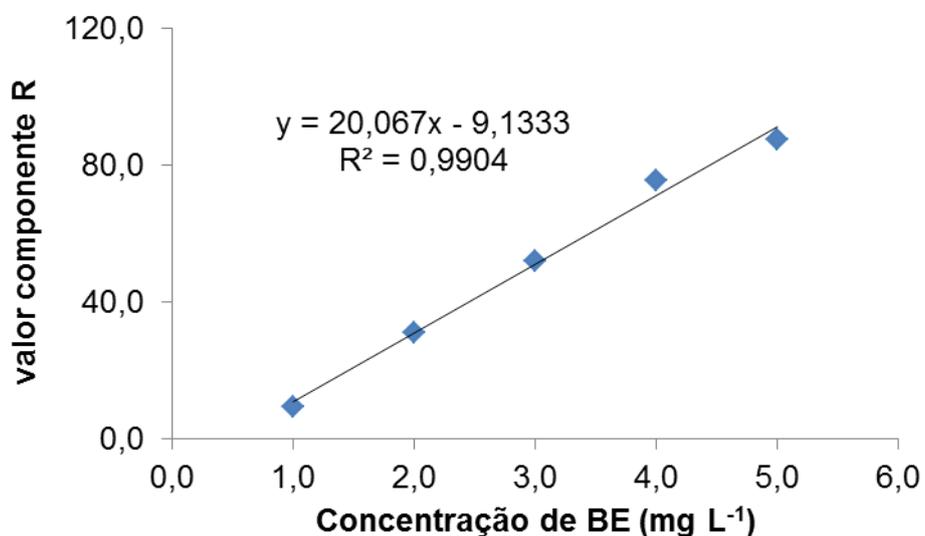


Figura 50 - Curva analítica obtida através da análise das imagens dos padrões de BE

As curvas analíticas obtidas, para a mesma faixa de concentração, utilizando-se um espectrofluorímetro comercial (Figura 51) e o fluorímetro a

base de LED proposto (Figura 52), apresentaram coeficientes de determinação de 0,9957 e 0,9927, respectivamente, os quais são comparáveis ao obtido com a estratégia proposta por imagens. Apesar disto, os limites de detecção obtidos para estes mesmos instrumentos (0,02 mg L⁻¹ para o espectrofluorímetro e 0,04 mg L⁻¹ para o fluorímetro de LED) são menores que aquele obtido para a estratégia com o celular. Esta diferença se deve possivelmente ao elevado valor do módulo para o intercepto em “y” encontrado para a curva analítica construída com o celular, para o qual não foi diagnosticada a sua origem. De qualquer forma, os dados obtidos com o celular demonstraram um desempenho aceitável se considerada a faixa de trabalho a ser aplicada para a determinação de BE nos resíduos laboratoriais.

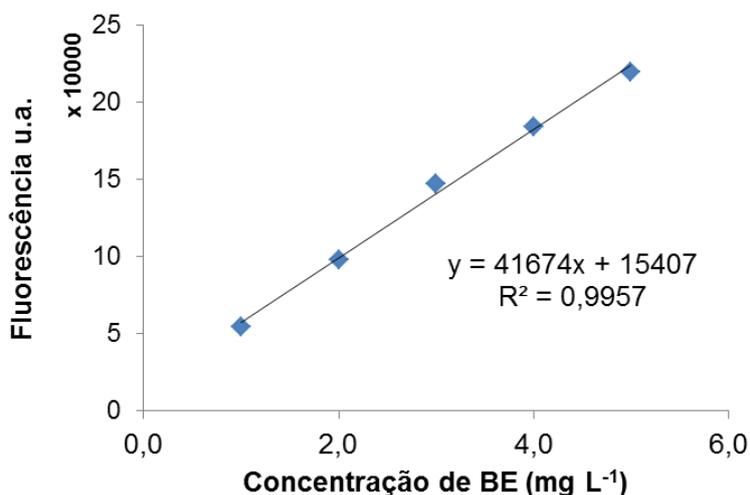


Figura 51 - Curva analítica determinada no fluorímetro comercial (Cary-Eclipse).

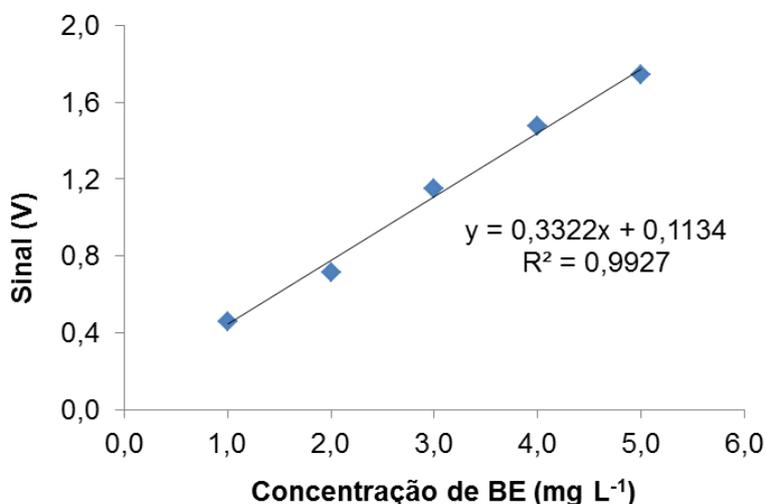


Figura 52 - Curva analítica determinada para os padrões de BE no fluorímetro proposto (LED).

Pode-se observar que para as faixas de respostas dos instrumentos o fluorímetro de bancada apresentou o melhor limite de detecção seguido pelo fluorímetro proposto e por último o método de análise de imagens utilizando o celular. Isto pode limitar a aplicabilidade da análise de imagens para amostras de concentrações muito baixas (menores de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Para verificar o funcionamento frente a amostras reais foi realizado um experimento com soluções residuais descrito na próxima seção.

5.4 - Determinação de BE em amostras residuais.

Para a verificação do funcionamento do sistema de análise de imagens e do fluorímetro de LED com relação à determinação em amostras reais foi realizada a leitura utilizando o protocolo de análises explicado anteriormente. Para isto, foi selecionada uma amostra de resíduo do depósito temporário de da GRP. Primeiramente foi verificado que esta amostra continha somente traços de BE, os quais não seriam detectados pelos instrumentos. Entretanto, a composição da matriz, à base de resíduos de gel e de DNA, permitiram simular adequadamente uma situação real, após a fortificação desta amostra com BE.

A amostra selecionada foi filtrada em papel de filtro qualitativo para remoção de resíduos de gel e outros sólidos em suspensão, e, posteriormente, transferida para 5 balões de 25,00 mL onde foram adicionados volumes específicos de uma solução estoque de BE para compor soluções com concentrações de 0,0 a $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ do analito.

Para a leitura nos instrumentos, estas amostras foram diluídas de forma a ficarem com concentrações dentro das curvas analíticas para os instrumentos em 10 mL de solução tampão DNA $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$, sendo o volume dos balões de 25,00 mL completados com água purificada, compondo as concentrações finais indicadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Diluição das amostras de resíduos dopadas para leitura nos instrumentos.

| Concentração inicial (mg L ⁻¹) | Volume pipetado da amostra (mL) | Concentração final em 25 mL (mg L ⁻¹) |
|---|---------------------------------------|---|
| 0,0 | 12,500 | 0,0 |
| 2,0 | 12,500 | 1,0 |
| 5,0 | 12,500 | 2,5 |
| 10,0 | 6,250 | 2,5 |
| 20,0 | 3,125 | 2,5 |

As curvas analíticas foram produzidas da mesma forma com 10 mL de solução tampão com DNA os volumes específicos de BE em balões de 25 mL e avolumados até a marcação com água destilada. As concentrações foram as descritas na seção anterior (cinco níveis variando de 1,0 a 5,0 mg L⁻¹).

Após as leituras dos padrões, construíram-se as curvas analíticas cujos parâmetros obtidos estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 - Dados das curvas analíticas obtidas para a determinação do BE nas amostras reais dopadas.

| Instrumento | Inclinação | Intercepto | Coefficiente de determinação (R ²) |
|--------------------------|------------|------------|--|
| Fluorímetro de LED | 0,281 | 0,130 | 0,9966 |
| Fluorímetro de Comercial | 31,62 | 22,94 | 0,9932 |
| Celular | 18,97 | -10,90 | 0,9908 |

Das três curvas obtidas pode-se observar que a que apresentou a menor correlação é a curva obtida com o celular. Entretanto, deve-se levar em conta que nestas medidas nenhum tipo de tratamento de dados foi aplicado,

utilizando-se apenas a variação da componente R do sistema RGB para as medidas.

A partir dos dados das curvas e da leitura das amostras, foram determinadas as concentrações das amostras diluídas. Na tabela 12 podem-se observar os valores encontrados para as soluções analisadas.

Tabela 12 - resultados de concentração obtida para as amostras de resíduos determinadas pelos equipamentos testados.

| Concentração da solução (mg L ⁻¹) | | Fluorímetro de LED (mg L ⁻¹) | Fluorímetro Comercial (mg L ⁻¹) | Celular (mg L ⁻¹) |
|--|--------------|--|---|----------------------------------|
| Solução inicial | Solução lida | | | |
| 2 | 1 | 0,82 | 0,80 | 0,88 |
| 5 | 2,5 | 2,45 | 2,57 | 2,46 |
| 10 | 2,5 | 2,72 | 2,65 | 2,61 |
| 20 | 2,5 | 2,56 | 2,65 | 2,54 |

Para comparação dos resultados foram calculadas as médias e os desvios padrões das soluções de 2,5 mg L⁻¹. Os valores calculados se encontram na tabela 13.

Tabela 13 - Concentrações e desvios padrões estimados para as concentrações de 2,5 mg L⁻¹ dos padrões lidos.

| Fluorímetro LED (mg L ⁻¹) | Fluorímetro Comercial (mg L ⁻¹) | Celular (mg L ⁻¹) |
|--|--|----------------------------------|
| 2,58 ± 0,14 | 2,62 ± 0,05 | 2,54 ± 0,08 |

As comparações foram realizadas levando em consideração o Fluorímetro comercial como método de determinação de referência, então as comparações foram realizadas entre o Fluorímetro de LED e o Fluorímetro comercial e entre o celular e o Fluorímetro comercial.

Primeiramente, foram realizados os testes F para comparar as variâncias obtidas. Nas duas situações as variâncias foram equivalentes ($F_{calc} < F_{crítico}$). Com base na análise das variâncias foram realizados os testes t com 95 % de confiança para cada situação. Novamente, para os dois

casos, os valores também foram considerados equivalentes. Na Tabela 14 são apresentados os resultados para as duas comparações realizadas.

Tabela 14 - Resultados dos testes de variância e de comparação dos resultados obtidos

| Comparações Valores críticos | Fluorímetro de LED x Fluorímetro comercial | Celular x Fluorímetro comercial |
|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| $F_{(2,2)} = 19$ | $F_{\text{calculado}} = 7,99$ | $F_{\text{calculado}} = 2,53$ |
| $t_{(2,95\%)} = 2,776$ | $t_{\text{calculado}} = 0,534$ | $t_{\text{calculado}} = 1,578$ |

Esses resultados indicam que tanto o uso do celular quanto do fluorímetro de LED proposto apresentam resultados semelhantes ao fluorímetro comercial de bancada, demonstrando formas mais simples e baratas para se detectar o BE em soluções residuais.

Dos resultados da Tabela 12, foram recuperadas as concentrações originais das amostras lidas. Novamente foram comparados os valores obtidos entre o Fluorímetro comercial versus o Fluorímetro LED proposto e o uso do celular. Na Tabela 15 são mostrados os valores recuperados com o seu erro relativo ao valor de referência e na Figura 53 mostram-se os gráficos de correlação entre os resultados obtidos com o fluorímetro de LED ou com imagens de celular em relação às medidas com o fluorímetro comercial. Nas Tabelas 16 e 17, são mostrados os resultados das regressões para as comparações entre as medidas com fluorímetro de LED *versus* fluorímetro comercial e imagens com o celular *versus* fluorímetro comercial, respectivamente.

Tabela 15 - valores recuperados para as amostras analisadas concentração e erro relativo ao valor de referência.

| Valores de referência (mg L ⁻¹) | Fluorímetro LED (mg L ⁻¹) Valor (erro %) | Fluorímetro comercial (mg L ⁻¹) Valor (erro %) | Celular (mg L ⁻¹) Valor (erro %) |
|---|---|---|---|
| 2,0 | 1,64 (-17,9) | 1,59 (-20,1) | 1,76 (-12,2) |
| 5,0 | 4,90 (-2,0) | 5,13 (2,6) | 4,92 (-1,6) |
| 10,0 | 10,89 (8,9) | 10,61 (6,1) | 10,45 (4,5) |
| 20,0 | 20,64 (3,2) | 21,34 (6,7) | 20,51 (2,5) |

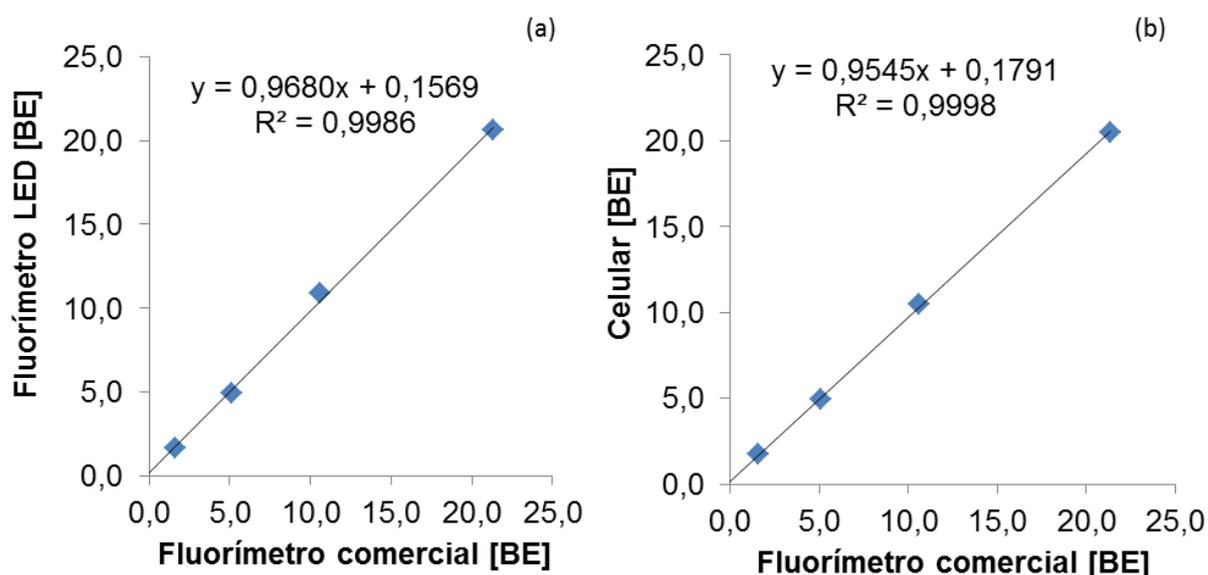


Figura 53 - curvas de comparação entre os resultados obtidos para o Fluorímetro comercial versus o Fluorímetro LED proposto (a) e o uso do celular (b). Concentrações de brometo de etídio [BE] em mg L⁻¹.

Os valores da Tabela 16 mostram os parâmetros de regressão (figura 53a) para a comparação entre os resultados obtidos com o Fluorímetro de LED proposto e o fluorímetro comercial de bancada. Os resultados de regressão mostram que os dois equipamentos tem resultados que podem ser considerados equivalentes. Os valores das variações na interseção englobam o valor 0 e a inclinação engloba o valor 1.

Os resultados para a comparação entre as medidas com o fluorímetro de bancada e com o uso do celular, são mostrados na Figura 53b e na Tabela 17. Novamente, foi observada uma boa correlação entre os dados indicando uma elevada semelhança nas respostas dos instrumentos.

Tabela 16 - Dados da regressão referente ao gráfico da figura 53a - comparação entre o Fluorímetro comercial e o Fluorímetro LED.

| | <i>Coefficientes</i> | <i>Erro padrão</i> | <i>Variação 95% inferiores</i> | <i>Variação 95% superiores</i> |
|------------|----------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Interseção | 0,1569 | 0,3126 | -1,1880 | 1,5018 |
| Inclinação | 0,9680 | 0,0256 | 0,8579 | 1,0781 |

Tabela 17 - Dados da regressão referente ao gráfico da figura 53b - comparação entre o Fluorímetro comercial e o as análises utilizando o celular.

| | <i>Coefficientes</i> | <i>Erro padrão</i> | <i>Variação 95% inferiores</i> | <i>Variação 95% superiores</i> |
|------------|----------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Interseção | 0,1791 | 0,1295 | -0,3782 | 0,7364 |
| Inclinação | 0,9545 | 0,0106 | 0,9089 | 1,0002 |

6 - Conclusões

O presente trabalho demonstrou que é possível se construir um fluorímetro para detecção de BE com materiais considerados alternativos e de baixo custo e funcionando com um rendimento similar ao de um fluorímetro de bancada. Os experimentos realizados comprovaram a sua eficiência para a determinação de BE em soluções residuais. Estes testes iniciais também comprovaram que o uso de materiais de baixo custo como o LED e o filtro plástico obtido da embalagem de “tic-tac” foram, apesar das limitações mostradas, também eficientes para aplicação no instrumento

Os experimentos utilizando análise por injeção em fluxo demonstraram que o instrumento proposto pode ser aplicado com analitos diferentes do brometo de etídio, onde não exista uma cinética de reação muito lenta que possa influenciar muito na aquisição do sinal. Testes futuros para outros analitos podem ser interessantes visando aumentar a aplicabilidade do instrumento proposto. Como visto existem possibilidades para monitorar outros fluoróforos na faixa de excitação do LED e de emissão dos filtros utilizados. Os experimentos envolvendo nitrito e a rodamina B também demonstraram que pode existir uma aplicação interessante nesta área que não foi explorada neste trabalho.

Para o caso do brometo de etídio a mudança de estratégia de fluxo, adotando-se a estratégia *stopped-flow*, facilitou bastante o processo de automatização para amostragem do resíduo. A programação dos microcontroladores para os controles da microbomba e da bomba peristáltica foram implementados de forma muito mais facilitada e garantiram a manutenção do baixo custo do equipamento (cerca de R\$ 550,00). O sistema automatizado proposto também tem a vantagem de expor menos o operador aos riscos do brometo de etídio. Mesmo existindo uma tendência a superestimar os resultados apresentados, os experimentos com o sistema de decisão mostraram que o equipamento não errou em nenhuma das concentrações estudadas e que este é seguro em apontar o momento certo

para descarte. Assim, o equipamento automatizado aliado ao sistema de decisão permite ao operador um melhor controle da reação de degradação permitindo uma garantia de que ao descartar o seu material não existem riscos.

Os testes realizados com a aquisição de imagens utilizando uma câmera de celular em conjunto com o aplicativo *color detector real time* foram muito promissores. Os experimentos realizados com o brometo de etídio mostraram que é possível se utilizar a câmera do celular junto com o aplicativo (gratuito) para a aquisição de informações analíticas. As comparações realizadas entre os dados obtidos com o Fluorímetro LED proposto, o celular e um Fluorímetro de bancada comercial mostraram que tanto o Fluorímetro LED quanto o celular, para esta aplicação, apresentaram resultados semelhantes e que o celular é uma alternativa interessante como forma de detecção da fluorescência do BE. Futuramente, seria interessante se expandir a aplicabilidade desta abordagem com o desenvolvimento de um software (aplicativo) onde seja realizado o processo completo de aquisição do sinal (leitura, seleção da componente R,G ou B, construção da curva analítica e cálculo das concentrações) e testar a versatilidade do celular para outros analitos.

Em suma, o Fluorímetro de LED proposto mostrou uma boa aplicabilidade e funcionamento para os objetivos que foram propostos no trabalho aliado a uma facilidade de uso e um baixo custo.

Bibliografia

1. Baird, C.; Química Ambiental , 3th ed.;Bookman: Porto Alegre, Brasil, 2002.
2. Freire, R. S.; Pelegrini, R.; Kubota, L. T.; Durán, N.; *Quím. Nova* **2000**, 23(4), 509.
3. Rosa, D.S.; Guedes, C.G.F.; *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **2003**, 13, 64.
4. Barr, S.; *Environ. Behav.* **2007**, 39(4), 435.
5. Wilson, D.C.; Velis, C.; Cheeseman, C.; *Habitat International* **2006**, 30, 797.
6. Morrisey, A. J.; Browne, J.; *Waste Management.* **2004**, 24, 297.
7. Furiam, S.M.; Günther, W.R.; *Sitientibus* **2006**, 35, 7.
8. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm ,
acessado em: junho de 2013.
9. Felder, M. A. J.; Petrell, R. J.; Duff, S. J. B.; *Waste Manage. Res.* **2001**, 19, 354.
10. Garcia, L. P.; Zanetti-Ramos, B. G.; *Cad. Saúde Pública.* **2004**, 20(3), 744.
11. Gil, E. S.; Garrote, C. F. D.; da Conceição, E. C.; Santiago, M. F.; de Souza, A. R.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2007**, 43, 20.
12. Li, Q.; Morris, K. J.; Dasgupta, P. K.; Raimundo Jr., I.M.; Temkim, H.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, 479, 151.
13. Leite, W. C. A.; Pugliesi, E.; Castro, M. C. A. A.; Córdoba, R.E.;VII Congresso de Medio Ambiente /AUGM La Plata - Argentina : , 2012.
14. **Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil).** *Resoluções do Conama: Resoluções vigentes publicadas entre setembro de 1984 e.* [ed.] Ministério do Meio Ambiente. Brasília : MMA, 2012.

15. **Ministério da Saúde, Agência Nacional de vigilância Sanitária.** *Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.* [ed.] Ministério da Saúde. Brasília : Ministério da Saúde, 2006.
16. Jardim, W. F.; *Quím. Nova.* **1996**, 21(5), 671.
17. Gerbase, A. E.; Coelho, F. S.; Machado, P. F. L.; Ferreira, V. F.; *Quím. Nova.* **2005**, 28, 3.
18. Nolasco, F. R.; Tavares, G. A.; Bendassolli, J. A.; *Eng. sanit. ambient.* **2006**, 11(2), 118.
19. Nascimento, E. S.; Filho, A. T.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, 46(2), 198.
20. Imbroise, D.; Santos, A. J. M. G.; Barbosa, S. S.; Shintaku, S. F.; Monteiro, H. G.; Ponce, G. A. E.; Furtado, J. G.; Tinoco, C. J.; Mello, D. C.; Machado, P. F. L.; *Quim. Nova.* **2006**, 29(2), 404.
21. Morgan, G. T.; Walls, L. P.; *J. Chem. Soc.* **1931**, 2447.
22. Newton, B. A.; *J. Gen. Microbiol.* **1957**, 17, 718.
23. Woolfe, G.; *Brit. J. Pharmacol.*, **1956**, 11, 334.
24. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e7637?lang=pt®ion=BR>, acessado em agosto de 2015.
25. LePecq, J. B.; Paoletti, C.; *J. Mol. Biol.* **1967**, 27, 87.
26. LePecq, J. B.; Yot, P.; Paoletti, C.; *C. R. Acad. Sci. Paris.* **1964**, 259, 1786.
27. Angerer, L. M.; Moudrianakis, E. N.; *J. Mol. Biol.* **1972**, 63, 505.
28. Olmstead III, J.; Kearns, D. R.; *Biochemistry.* **1977**, 16, 3647.
29. Xueguang, S.; Enhuua, C.; Yujian, H.; Jingfen, Q.; *Sci. China: Chem.* **1999**, 42(1), 69.
30. Brunk, C.F.; Simpson, L.; *Anal. Biochem.* **1977**, 82, 455.
31. Macgregor, J. T.; Johnson, I. J.; *Mutat. Res.* **1977**, 48, 108.

32. Carielo, N. F.; Keohavong, P.; Sanderson, B. S. J.; Thilly, W. G.; *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*(9), 4157.
33. Singer, V.L.; Lawlor, T.E.; Yue, S.; *Mutat. Res.* **1999**, *439*, 37.
34. Waring, M. J.; *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269.
35. Urbanke, C.; Römer, R.; Maas, G.; *Eur. J. Biochem.* **1973**, *33*, 511.
36. Iwata, K.; Sawadaishi, T.; Nishimura, S. I.; Tokura, S.; Nishi, N.; *Int. J. Biol. Macromol.* **1996**, *18*, 149.
37. Yamada, M.; Kato, K.; Nomizu, M.; Sakairi, N.; Ohkawa, K.; Yamamoto, H.; Nishi, N.; *Chem. Eur. J.*, **2002**, *6*, 1407.
38. Zhao, C.; Sun, S.; Yang, K.; Nomizu, M.; Nishi, N.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *98*, 1668.
39. Zhao, C.; Yang, K.; Wen, X.; Li, F.; Zheng, B.; Nomizu, M.; Nishi, N.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *98*, 1674.
40. Sukhumungoon, P.; Rattanachuay, P.; Hayeebilan, F.; Kantachote, D.; *Afr. J. Microbol. Res.* **2013**, *7*(6), 471.
41. Faisal, M.; Abu Tariq, M.; Muneer, M.; *Dyes Pigm.* **2007**, *72*, 233.
42. Adán, C.; Martínez-Arias, A.; Fernández-García, M.; Bahamonde, A.; *Appl. Catal. B: Env.* **2007**, *76*, 395.
43. Adán, C.; Bahamonde, A.; Martínez-Arias, A.; Fernández-García, M.; Pérez-Estrada, L. A.; Malato, S.; *Catal. Today.* **2007**, *129*, 79.
44. Carbajo, J.; Adán, C.; Rey, A.; Martínez-Arias, A.; Bahamonde, A.; *Appl. Catal. B: Environ.* **2011**, *102*, 85.
45. Lunn, G.; Sansone, E. B.; *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 453.
46. Lunn, G.; Sansone, E. B.; *Appl. Ind. Hyg.* **1989**, *4*, 234.
47. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/623626/1/cot025.pdf>, acessado em junho de 2013.

48. <http://web.princeton.edu/sites/ehs/chemwaste/etbr.html>, acessado em junho de 2013.
49. <http://www.ed.ac.uk/schools-departments/health-safety/guidance/hazardous-substances/ethidium-bromide>, acessado em junho de 2013.
50. <http://ehs.columbia.edu/etbr.html>, acessado em junho de 2013.
51. Fonseca, J. C. L.; *AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE RESÍDUOS QUÍMICOS ORIGINADOS EM LABORATÓRIOS BIOLÓGICOS*. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara : s.n., 2006. p. 23, Tese de doutorado.
52. Quilladert, P.; Hofnung, M.; Bensaude, O.; *Trends Genet.* **1988**, 4(4), 89.
53. Lunn, G.; Sansone, E. B.; Andrews, A. W.; Keefer, L. K.; *Cancer Res.* **1988**, 48, 522.
54. **World Health Organization.** *Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes: Some Aromatic Amines and 4-Nitrobiphenyl*. [ed.] M. Castegnaro, et al., Genebra : World Health Organization, 1985.
55. <http://ehs.columbia.edu/EthidiumBromidePolicy.pdf>, acessado em maio de 2015.
56. <http://www.utexas.edu/safety/ehs/resources/info.ethidium.pdf>, acessado em maio de 2015.
57. Strothkamp, K. G.; Strothkamp, R. E.; *J. Chem. Educ.* **1994**, 71(1), 77.
58. Sartori, P. H. S.; Loreto, E. L. S.; *Quim. Nova Esc.* **2009**, 31(2), 150.
59. O’Hagan, W. J.; McKenna, M.; Sherrington, D. C.; Rolinski, O. J.; Birch, D. J. S.; *Meas. Sci. Technol.* **2002**, 13, 84.
60. Periasamy, A.; *J. Biomed. Opt.* **2001**, 6(3), 287.

61. Das, S.; Powe, A.M.; Baker, G. A.; Valle, B.; El-Zahab, B.; Sintim, H. O.; Lowry, M.; Fakayode, S. O.; McCarroll, M. E.; Patonay, G.; Li, M.; Strongin, R. M.; Geng, M. L.; Warner, I. M.; *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 597.
62. Hess, S. T.; Huang, S.; Heikal, A. A.; Webb, W. W.; *Biochemistry.* **2002**, *41*(3), 697.
63. Ewing, G. W.; *Métodos Instrumentais de Análises Químicas. Vol 2* [trad.] Aurora Giora Albanese e Joaquim Trodoro de Souza Campos. Blucher: São Paulo, Brasil, 2010.
64. Fonseca, A.; *Desenvolvimento de um fotometro multicanal baseado em um arranjo de diodos emissores de luz.* Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo : s.n., 2004.
65. Yan, H.; *Lect. Notes Bioinf.* **2005**, *3384*, 653.
66. Tavener, S. J.; Thomas-Oates, J. E.; *Educ. Chem. (London, U. K.)* **2007**, *9*, 151.
67. Mota, F. A. C.; Santana, G. P.; *Scientia Amazonia.* **2012**, *1*(2), 23.
68. Ríos, A.; Zougagh, M.; Ávila, M.; *Anal. Chim. Acta.* **2012**, *740*, 1.
69. Coltro, W. K. T.; Piccin, E.; Carrilho, E.; Jesus, D. P.; da Silva, J. A. F.; da Silva, H. D. T.; Lago, C. L.; *Quim. Nova.* **2007**, *30*(8), 1986.
70. Peterson, J. I.; Friauf, W. S.; Leighton, S. B.; *Anal. Biochem.* **1974**, *58*, 255.
71. Duckrow, R. B.; LaManna, J. C.; Resenthal, M.; *Anal. Biochem.* **1982**, *125*, 13.
72. Kudo, Y.; Takeda, K.; Hickis, T. P.; Ogura, A.; Kawasaki, Y.; *J. Neurosci. Methods.* **1989**, *30*, 161.
73. Van Best, J. A.; Docchio, F.; *Appl. Opt.* **1998**, *37*(19), 4303.
74. Capitán-Vallvey, L.,F.; Palma, A.J.; *Anal. Chim. Acta.* **2011**, *696*, 27.
75. Cantrell, K.,M.; Ingle, J.,D.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 27.

76. Gaião, E. N.; Medeiros, E. P.; Lyra, W. S.; Moreira, P. N. T.; Vasconcelos, P. C.; Silva, E. C.; Araújo, M. C. U.; *Quim. Nova.* **2005**,. 28(6), 1102.
77. Veras, G.; Silva, E. C.; Lyra, W. S.; Soares, S. F. C.; Guerreiro, T. B.; Santos, S. R. B.; *Talanta.* **2009**, 77, 1155.
78. Yeh, T.S.; Tseng, S. S.; *J. Chin. Chem. Soc.* **2006**, 53, 1067.
79. Moe, A. E.; Marx, S.; Banani, N.; Liu, M.; Marquardt, B.; Wilson, D. M.; *Sens. Actuators B.* **2005**, 111-112, 230.
80. Mazzinghi, P.; *Rev. Sci. Instrum.* **1996**, 67(10), 3737.
81. Dasgupta, P. K.; Eom, I. Y.; Morris, K. J.; Li, J.; *Anal. Chim. Acta.* **2003**, 500, 337.
82. Smith, M. C.; Steimle, G.; Ivanov, S.; Holly, M.; Fries, D. P.; *Anal. Chim. Acta.* **2007**, 598, 286.
83. Marengo, E.; Manfredi, M.; Zerbinati, O.; Robotti, E.; Mazzucco, E.; Gosetti, F.; Bearman, G.; France, F.; Shor, P.; *Anal. Chem.* **2011**,. 83, 6609.
84. Farmer, A. S.; Fries, D. P.; Flannery, W.; Massini, J.; *Rev. Sci. Instrum.* **2005**, 76, 115102.
85. Cucci, C.; Mignani, A. G.; Dall'Asta, C.; Pela, R.; Dossena, A.; *Sens. Actuators B.* **2007**, 126, 467.
86. Chang, K. H.; Chen, R. L. C.; Hsieh, B. C.; Chen, P. C.; Hsiao, H. Y.; Nieh, C. H.; Cheng, T. J.; *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26, 1507.
87. Porkrzywnicka, M.; Koncki, R.; Tymecki, L.; *Talanta.* **2010**, 82, 422.
88. Tymecki, L.; Porkrzywnicka, M.; Koncki, R.; *Analyst.* **2011**, 176, 73.
89. Tedetti, M.; Joffre, P.; Goutx, M.; *Sens. Actuators B.* **2013**, 182, 416.
90. Xu, J.; Chen, S.; Xiong, Y.; Yang, B.; Guan, Y.; *Talanta.* **2008**, 75, 885.
91. Yang, F. B.; Pan, J. Z.; Zhang, T.; Fang, Q.; *Talanta.* **2009**, 78, 1155.

92. Yang, F.; Li, X. C.; Zhang, W.; Pan, J. B.; Chen, Z. G.; *Talanta*. **2011**, *84*, 1099.
93. Du, C. J.; Sun, D. W.; *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 230.
94. Choodum, A.; Parabun, K.; Klawach, N.; Daeid, N. N.; Kanatharana, P.; Wongnimaikul, W.; *Forensic Sci. Int.* **2014**, *235*, 8.
95. Shen, L.; Hagenb, J. A.; Papautsky, I.; *Lab Chip*. **2012**, *12*, 4240.
96. Schwaebel, T.; Trapp, O.; Bunz, U. H. F.; *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 273.
97. Gomes, M. S.; Trevizan, L. C.; Nóbrega, J. A.; Kamogawa, M. Y.; *Quim. Nova*. **2008**, *31(6)*, 1577.
98. Ramanathan, N.; Lukac, M.; Ahmed, T.; Kar, A.; Praveen, P.S.; Honles, T.; Leong, I.; Rehman, I. H.; Schauer, J. J.; Ramanathan, V.; *Atmos. Environ.* **2011**, *45*, 4481.
99. Choodum, A.; Daied, N. N.; *Talanta*. **2011**, *86*, 284.
100. Balsam, J.; Bruck, H. A.; Kostov, Y.; Rasooly, A.; *Sens. Actuators B*. **2012**, *171-172*, 141.
101. Rajendran, V. K.; Bakthavathsalam, P.; Ali, B. M. J.; *Microchim. Acta*. **2014**, *181*, 1815.
102. Reis, B. F.; *Quim. Nova*. **1996**, *19(1)*, 51.
103. Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Anal. Chim. Acta* **1980**, *114*, 19.
104. Gómes, V.; Callao, M. P.; *Trends Anal. Chem.* **2007**, *26(8)*, 767.
105. Hansen, E. H.; Miró, M.; *Trends Anal. Chem.* **2007**, *26(1)*, 18.
106. Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27(6)*, 497.
107. Garriges, S.; Armenta, S.; de la Guardia, M.; *Trends Anal. Chem.* **2010**, *29(7)*, 592.

108. Melchert, W. R.; Reis, B. F.; Rocha, F. R. P.; *Anal. Chim. Acta* **2012**, *714*, 8.
109. <http://www.tmgeletronica.com.br> , acessado em julho de 2012.
110. <http://www.wayjun.com/Datasheet/Led/3W%20High%20Power%20LED.pdf> , acessado em julho de 2012.
111. <http://www.alldatasheet.com/datasheet-pdf/pdf/131548/HAMAMATSU/S1223.html>, acessado em julho de 2012
112. Borges, E. P.; Fernandes, E. N.; Rocha, F. R. P.; Reis, B. F.; *Quim. Nova.* **2002**, *25(6)*, 1191.
113. Pimentel, M. F.; Neto, B. B.; *Quim. Nova.* **1996**, *19(3)*, 268.
114. Miller, J. N.; Miller, J. C.; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th Ed., ISBN 0-131-291920, Pearson Education Ltd, Harlow, UK, 2005.
115. Zhang, X.; Wang, H.; Fu, N.; Zhang, H.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2003**, *59*, 1667.
116. Pugen, Y.; Haiou, Q.; Cuili, L.; Zhiyong, T.; *Int. J. Spectrosc.* **2011**, *2011*, 1.