



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

PRISCILLA SOUZA FERREIRA

**DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DE ANTOCIANINAS EM DISPOSITIVO
MICROFLUÍDICO A BASE DE PAPEL**

**CAMPINAS
2016**

PRISCILLA SOUZA FERREIRA

**DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DE ANTOCIANINAS EM DISPOSITIVO
MICROFLUÍDICO A BASE DE PAPEL**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra
em Química na área de Química Analítica.**

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA PRISCILLA SOUZA FERREIRA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
ADRIANA VITORINO ROSSI.**

**CAMPINAS
2016**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

F413d Ferreira, Priscilla Souza, 1992-
Detecção colorimétrica de antocianinas em dispositivo microfluídico a base de papel / Priscilla Souza Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Adriana Vitorino Rossi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Microfluídica. 2. Microfluídica em papel. 3. Antocianinas. 4. Colorimetria. I. Rossi, Adriana Vitorino, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Colorimetric detection of anthocyanins in microfluidic paper-based devices

Palavras-chave em inglês:

Microfluidic

Paper microfluidic

Anthocyanins

Colorimetry

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Adriana Vitorino Rossi [Orientador]

Matthieu Tubino

Efraim Lázaro Reis

Data de defesa: 29-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi (Orientadora)

Prof. Dr. Efraim Lázaro Reis (DEQ-UFV)

Prof. Dr. Matthieu Tubino (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **PRISCILLA SOUZA FERREIRA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 29 de julho de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sandra Souza Ferreira e Antônio Joaquim Jorge Araújo Ferreira e irmãos por todo amor, carinho e apoio dado durante toda a minha vida, principalmente nos últimos dois anos apesar da distância física entre nós.

A vocês, sem dúvida, todo o meu esforço!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a profa. Adriana Vitorino Rossi por ter me recebido como sua aluna de mestrado, pelos conhecimentos compartilhados que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, pela ajuda, paciência e aprendizagem nas elaborações escritas de relatórios associados também a este trabalho e pela vivência diária sempre rica, respeitosa e divertida no laboratório e fora dele.

Agradeço ao grupo GPQUAE por todo auxílio, ideias e contribuições constantes. Cada um, sem dúvida, me enriqueceu como profissional e pessoa. Desde aos alunos de iniciação científica até pós doutorando (Arnaldo, Juliana, Sarah, Willian e Daniele), além da nossa querida técnica de laboratório Acácia Salomão, muito obrigada a vocês pela amizade, pela ajuda e por termos sempre uma convivência alegre e divertida, que foi de extrema importância para que eu superasse um pouco da saudade que sentia da minha família.

Agradeço à Gabriela Almeida pelo privilégio de poder conhecê-la durante o mestrado no Instituto de Química, por ter me recebido sempre com entusiasmo, pela sua amizade e pela ajuda em todas as disciplinas que fizemos juntas.

Agradeço à CPG-IQ/UNICAMP e ao FAEPEX/UNICAMP pelo auxílio financeiro para a participação da 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química realizada entre 30 de maio a 02 de junho de 2016 em Goiânia – GO com apresentação de um trabalho intitulado “Detecção colorimétrica de antocianinas em dispositivo microfluídico”.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço a todos os amigos de São Luís e de Campinas, em especial a Marcela, Júlia e Igrayne, que estiveram ao meu lado diariamente nesses dois anos, sempre dispostas em me darem apoio nos momentos difíceis e partilharem dos momentos alegres com carinho, estima e fraternidade; aos meus familiares, em especial aos meus pais, irmãos e avós pelo amor, educação e valores que me foi ensinado durante toda a minha vida e aos membros do laboratório I-125 que me acolheram com amor e amizade durante todo este processo.

Priscilla Souza Ferreira

Seja forte e corajoso. Não fique desanimado nem tenha medo, porque eu, o Senhor seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for.

Josué 1:9

RESUMO

Dispositivos microfluídicos a base de papel (μ PAD) combinados com métodos colorimétricos baseados em sistemas para aquisição de imagens digitais fornecem informações que podem ser correlacionadas às concentrações de espécies químicas. Para captura da imagem, utilizam-se dispositivos remotos e com programas computacionais são obtidos dados no sistema de cores RGB (Red, Green and Blue). A proposta foi desenvolvida para analisar soluções de antocianinas (ACYs) que têm quantificação oficial por espectrofotometria. Os μ PAD foram impressos com cera em papel cromatográfico em um design composto de 96 zonas reacionais circulares com diâmetro de 7 mm. Imagens digitais foram obtidas com scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone em diferentes condições de armazenamento dos μ PAD. Dados do sistema RGB foram obtidos pelo programa GIMP 2.8 e utilizados para avaliar a resolução adequada das imagens e estabelecer propostas qualitativas, constituídas por testes de identificação e reversibilidade de cor em diferentes valores de pH, e quantitativas, com avaliação de linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Para identificação, foi obtido perfil de variação de cor coerente para ACYS em diferentes valores de pH e o teste de reversibilidade mostrou-se adequado para confirmar a presença do pigmento pela mudança reversível de rosa para verde em ensaio realizado em uma mesma zona reacional dos μ PAD. Imagens mais adequadas para avaliar intensidades de cor em relação à concentração de ACYS foram obtidas com scanner, em comparação com aquelas obtidas com câmeras de tablet e smartphone, sendo que imagens obtidas com 400 dpi permitem avaliação visual dos μ PAD em abordagem qualitativa, sem comprometer qualidade de resultados quantitativos nem o tempo de aquisição de dados. As intensidades de cor das componentes do sistema RGB que foram convertidas a partir de imagens digitais dos μ PAD com soluções de ACYS em solução de pH 1 variaram proporcionalmente com a concentração; sendo que a componente G apresentou variação linear mais sensível e, por isso, foi escolhida para cálculos de concentração de ACYS em μ PAD. Na avaliação da linearidade, os valores de G tiveram correlação superior a 0,989; em termos de precisão foram obtidos desvios padrão relativos $< 4\%$ com exatidão em conformidade com normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). O limite de detecção determinado foi 30 mg L^{-1} e os limites de quantificação foram 46 e 154 mg L^{-1} para ACYS dos extratos de uva e jabuticaba, respectivamente.

ABSTRACT

Microfluidic Paper-based Devices (μ PAD) combined with colorimetric methods based on systems for digital image acquisition provide information that can be correlated to the concentration of chemical species. For image capture, use remote devices and with computer programs are obtained data in the color system RGB (Red, Green and Blue). The proposal was developed to analyze solutions of anthocyanins (ACYS) that has official quantification by spectrophotometry. The μ PAD were printed with wax in paper chromatography in a design composed by 96 circular reaction zones of 7 mm diameter. Digital images were obtained with a flatbed scanner, and the cameras of a tablet and a smartphone at different storage conditions of μ PAD. The RGB system data were obtained using the GIMP 2.8 and used to evaluate the proper image resolution and establish qualitative proposals, constituted by color identification and reversibility tests at different pHs values, and to quantitative proposals, with the evaluation of linearity, precision, accuracy, detection limit and quantitation limit. For identification, a coherent color variation profile was obtained for ACYS at different pHs values and the reversibility test was suitable to confirm the presence of ACYS by reversible change from pink to green under test conducted in the same reaction zone of μ PAD. The images most adequate to evaluate the color intensities in relation the concentration of ACYS were obtained with the scanner, as compared to ones obtained with the tablet and the smartphone, wherein images taken with 400 dpi allow visual assessment of μ PAD a qualitative approach without compromising quality quantitative results or the data acquisition time. The color intensities of the RGB components of the system that have been converted from digital images of μ PAD ACYS solutions in pH 1 Solution varied proportionally to the concentration; wherein the G component showed most sensitive and linear range, so it was chosen to ACYS concentration calculations μ PAD. In the evaluation of linearity, the G values had higher correlation to 0,989; in terms of precision, standard deviations $< 4\%$ were obtained, with accuracy in accordance with standards of the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and the Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). The determined detection limit was 30 mg L^{-1} and the quantification limits for ACYS were 46 and 154 mg L^{-1} for grape and jabuticaba extracts respectively.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química da celulose.	20
Figura 2: Esquema de μ PAD confeccionado a base de parafina em papel de filtro para quantificação de níquel e cobre. Fonte: Yagoda (1937).....	22
Figura 3: Esquema de μ PAD confeccionado pela técnica de fotolitografia para detecção simultânea de glicose e proteína em amostra de urina. Fonte: MARTINEZ et al, 2007.....	23
Figura 4: Esquema de μ PAD confeccionado por impressão a jato de tinta para determinação de fostato em águas e solo. Fonte: JAYAWARDANE, MCKELVIE e KOLEV, 2012.	24
Figura 5: Esquema simplificado de μ PAD confeccionado com cera sólida associado com detecção eletroquímica para aplicação em monitoramento de glicose. Fonte: GONÇALVES, 2014.....	25
Figura 6: Imagem de μ PAD obtido após o processo de carimbagem para aplicação na determinação de nitrito em alimentos. Fonte: CARDOSO, 2014.....	25
Figura 7: Estrutura química das antocianinas.	29
Figura 8: Mudanças estruturais de ACYS em meio aquoso e em função do pH. Fonte: TERCI e ROSSI, 2002.	30
Figura 9: Layouts dos μ PAD: (a) inicial e (b) final.	40
Figura 10: Ilustração do modo de adição dos reagentes nos μ PAD.	40
Figura 11: Ilustração do modo de digitalização dos μ PAD com scanner colocados diretamente sobre a placa digitalizadora.....	41
Figura 12: Ilustração do modo de captura de imagens dos μ PAD utilizando câmeras de tablet e smartphone.....	41
Figura 13: Interface gráfica do usuário do programa GIMP 2.8.....	44
Figura 14: Esquema da organização dos μ PAD utilizados no teste de estabilidade.	46

- Figura 15:** Imagens obtidas por MEV do papel cromatográfico Whatman nº 1 e do papel cromatográfico impregnado com solução de pH 1 e com soluções de ACYS de uva (60 mg L⁻¹) e jabuticaba (260 mg L⁻¹). Condições: cobertura de ouro, feixe de elétrons de 10 keV e formação de imagens por elétrons secundários (SEI) com ampliação de 50 e 200 vezes.....52
- Figura 16:** Espectros eletrônicos de soluções de ACYS de uva (83 mg L⁻¹) e jabuticaba (216 mg L⁻¹) em pH 1, utilizando água destilada como branco.53
- Figura 17:** μPAD usado para avaliar a especificidade do método para confirmar a presença de ACYS. O ensaio foi realizado com solução de ACYS 92 mg L⁻¹ do extrato de uva e 204 mg L⁻¹ do extrato de jabuticaba. As linhas correspondem as soluções de pH de 1 a 14, as colunas correspondem as soluções de ACYS e R indica o teste de reversibilidade.55
- Figura 18:** Relação entre -I_x com a concentração de ACYS em mg L⁻¹: (a) soluções de ACYS (20 a 100 mg L⁻¹) do extrato de uva e (b) soluções de ACYS (65 a 325 mg L⁻¹) do extrato de jabuticaba. Procedimentos com 5 replicatas. x = R, G ou B.57
- Figura 19:** Imagens digitais dos μPAD impregnados com solução de pH 1 e soluções de ACYS dos extratos de uva (20 a 100 mg L⁻¹) e jabuticaba (65 a 325 mg L⁻¹) adquiridas com 200, 400 e 600 dpi.58
- Figura 20:** Relação entre intensidades de cor da componente G de imagens de μPAD impregnados com solução de pH 1 e soluções de ACYS de uva (60 mg L⁻¹) e jabuticaba (195 mg L⁻¹) durante 4 meses. Imagens obtidas com scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone. Experimento com 5 replicatas e μPAD mantidos à temperatura ambiente e protegidos da luz.61
- Figura 21:** Relação entre intensidades de cor da componente G de imagens de μPAD impregnados com solução de pH 1 e soluções de ACYS de uva (60 mg L⁻¹) e jabuticaba (195 mg L⁻¹) durante 4 meses. Imagens obtidas com scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone. Experimento com 5 replicatas e μPAD mantidos à temperatura ambiente e expostos à luz de ambiente interno.61
- Figura 22:** Relação entre intensidades de cor da componente G de imagens de μPAD impregnados com solução de pH 1 e soluções de ACYS de uva (60 mg L⁻¹) e jabuticaba (195 mg L⁻¹) durante 4 meses. Imagens obtidas com scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone. Experimento com 5 replicatas e μPAD mantidos à temperatura de 5 °C e protegidos da luz.61
- Figura 23:** Imagens digitais dos μPAD obtidas com qualidade de 400 dpi utilizada no ensaio de avaliação da linearidade.63

Figura 24: Relação entre valores de -G obtidas de imagens digitais com qualidade de 400 dpi do método de μ PAD e C em mg L^{-1} de soluções de ACYS de uva (61 a 121 mg L^{-1}) e jaboticaba (179 a 358 mg L^{-1}) realizadas em 5 replicata.....	64
Figura 25: Relação entre C_e e C_{ref} (mg L^{-1}) de soluções de ACYS de uva (61 a 121 mg L^{-1}) e jaboticaba (179 a 358 mg L^{-1}). Procedimento com 5 replicatas.	64
Figura 26: Imagens digitais dos μ PAD obtidas com qualidade de 400 dpi utilizada no ensaio de avaliação da precisão.	65
Figura 27: Imagens digitais dos μ PAD obtidas com qualidade de 400 dpi utilizada no ensaio de avaliação da exatidão.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das soluções de pH conhecido.	39
Tabela 2: Descrição das misturas reacionais nos μ PAD para obtenção de imagens por MEV. Condições: cobertura de ouro, feixe de elétrons de 10 keV, formação de imagens por elétrons secundários (SEI), com ampliação de 50, 200, 500, 1000 e 4000 vezes.	42
Tabela 3: Resolução dos dispositivos de captura de imagens digitais de μ PAD.	47
Tabela 4: Soluções de ACYS em mg L^{-1} dos extratos de uva e jabuticaba preparadas em solução de pH 1 e aplicadas nos μ PAD para avaliação da linearidade.	47
Tabela 5: Concentração de ACYS nos extratos secos.	54
Tabela 6: Comparação de médias de G de soluções de ACYS de extratos de uva e jabuticaba a partir de 5 replicatas de imagens obtidas com resolução de 200 e 400 dpi aplicando-se teste t com 95 % de confiança.	59
Tabela 7: Comparação de médias de G de soluções de ACYS de extratos de uva e jabuticaba a partir de 5 replicatas de imagens obtidas com resolução de 200 e 600 dpi aplicando-se teste t com 95 % de confiança.	59
Tabela 8: Informações da curva analítica e parâmetros estatísticos obtidos a partir de dados da componente G de imagens com 400 dpi de μ PAD com soluções de ACYS de uva (61 a 121 mg L^{-1}) e jabuticaba (179 a 358 mg L^{-1}) em 5 replicatas.	63
Tabela 9: Avaliação da precisão das concentrações médias calculadas com dados da componente G de imagens em 400 dpi de μ PAD com soluções de ACYS de uva (61 a 121 mg L^{-1}) em pH 1 com intervalos de 3 horas em 5 replicatas.	66
Tabela 10: Avaliação da precisão das concentrações médias calculadas com dados da componente G de imagens em 400 dpi de μ PAD com soluções de ACYS de jabuticaba (179 a 358 mg L^{-1}) em pH 1 com intervalos de 3 horas em 5 replicatas.	66
Tabela 11: Parâmetros estatísticos do primeiro ensaio de exatidão com resultados gerados pela componente G de 5 replicatas de imagens de μ PAD em 400 dpi de soluções de ACYS de extrato de uva (61 a 121 mg L^{-1}) e jabuticaba (179 a 358 mg L^{-1}) em pH 1 e triplicatas de medidas espectrofotométricas em 520 nm dessas soluções.	67

Tabela 12: Parâmetros estatísticos do segundo ensaio de exatidão com resultados gerados pela componente G de 5 replicatas de imagens de μ PAD em 400 dpi de soluções de ACYS de extrato de uva (61 a 121 mg L⁻¹) e jabuticaba (179 a 358 mg L⁻¹) em pH 1.68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_{520} – absorvância em 520 nm

ACYS – antocianinas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

B – blue

C – concentração de ACYS

C_e – concentração experimental

C_{ref} – concentração de referência

bmp – Bitmap

dpi – dots per inch

DPR – desvio padrão relativo

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias

E – exatidão

G – green

GPQUAE – Grupo de Pesquisa em Química Analítica e Educação

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

I_x – intensidades de cores ($x = R, G$ ou B)

jpg – Joint Photographics Experts Group

MB – megabytes

MP – megapixel

MEV – microscopia eletrônica de varredura

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

PC – papel cromatográfico

PIBIC-EM – Programa de Iniciação Científica do Ensino Médio

R – red

r^2 – coeficiente de determinação

SEI – elétrons secundários

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

t – teste t

μ PAD – microfluidic paper-based devices

SUMÁRIO

Capítulo 1: INTRODUÇÃO	18
1.1 Microfluídica.....	19
1.2 Papel.....	19
1.3 Microfluídica em papel.....	20
1.3.1 Aplicação dos μ PAD.....	24
1.4 Detecção colorimétrica.....	26
1.5 Imagens digitais.....	27
1.6 Antocianinas.....	29
1.7 Propriedades e exploração econômica de ACYS.....	32
1.8 Caracterização das frutas estudadas.....	33
1.8.1 Uva (<i>Vitis vinífera</i>).....	33
1.8.2 Jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>).....	33
Capítulo 2: OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
Capítulo 3: PARTE EXPERIMENTAL	36
3.1 Considerações gerais.....	37
3.2 Preparo dos extratos de ACYS.....	37
3.3 Preparo das soluções de pH conhecido.....	38
3.4 Preparo dos μ PAD.....	39
3.5 Modo de adição dos reagentes nos μ PAD e conversão em imagens.....	40
3.6 Avaliação dos μ PAD impregnados com reagentes.....	42
3.7 Quantificação dos extratos.....	42
3.8 Identificação de ACYS nos μ PAD.....	43
3.9 Quantificação de ACYS nos μ PAD com análise digital de imagens.....	43

3.9.1 Avaliação das componentes do sistema RGB	44
3.9.2 Aquisição das imagens digitais	45
3.10 Estabilidade de μ PAD e formas de obtenção de imagens	45
3.11 Avaliação de desempenho do método	47
3.11.1 Linearidade	47
3.11.2 Precisão	48
3.11.3 Exatidão	48
3.11.4 Limite de detecção e limite de quantificação	49
Capítulo 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Avaliação dos μ PAD impregnados com reagentes	51
4.2 Quantificação dos extratos	52
4.3 Identificação de ACYS nos μ PAD	54
4.4 Quantificação de ACYS nos μ PAD com análise digital de imagens	55
4.4.1 Avaliação das componentes do sistema RGB	56
4.4.2 Aquisição das imagens digitais	57
4.5 Estabilidade de μ PAD e formas de obtenção de imagens	60
4.6 Avaliação de desempenho do método	62
4.6.1 Linearidade	62
4.6.2 Precisão	65
4.6.3 Exatidão	66
4.6.4 Limite de detecção e limite de quantificação	68
Capítulo 5: CONCLUSÕES	70
Capítulo 6: PERSPECTIVAS	73
Capítulo 7: TRATAMENTO DE RESÍDUOS	76
Capítulo 8: REFERÊNCIAS	78

Capítulo 1: INTRODUÇÃO

1.1 Microfluídica

Microfluídica é uma área científica em crescimento que se refere à manipulação de fluidos na ordem de micro ou nano litros com aplicabilidade, principalmente na Química, Biologia, Medicina e Materiais (COSTA, 2012). Destaca-se em Química Analítica devido às diversas vantagens em relação a algumas técnicas tradicionais como métodos espectrofotométricos, cromatográficos e eletroforéticos. Baixo consumo de reagentes, rapidez, simplicidade, realização de separações e detecções com alta resolução e sensibilidade (DORNELAS, 2013) são algumas vantagens que valorizam a técnica.

Na literatura é possível encontrar o uso de vários materiais para fabricação de dispositivos microfluídicos. Os primeiros eram feitos de silício e vidro (BECKER e GÄRTNER, 2008) devido à existência de tecnologia já desenvolvida na indústria de semicondutores. No entanto, estes materiais têm custo elevado e requerem equipamentos especializados. O silício ainda possui a desvantagem de ser opaco, não sendo adequado para aplicações baseadas em detecção óptica (VAZ, 2012).

Recentemente, o desenvolvimento de plataformas de baixo custo, fácil manuseio e portáteis, que visam aplicações em campo, tem recebido atenção devido a ampla variedade de aplicações analíticas e bioanalíticas. Os substratos descartáveis em destaque são plásticos, tecido e papel (GARCIA, 2014). Dentre estes, o papel tem demonstrado versatilidade para produção em alta velocidade de dispositivos microfluídicos por processos de fabricação menos complexos, além de ser um substrato compatível com a maioria das análises químicas, biomédicas e médicas.

1.2 Papel

O papel é um material disponível em praticamente todos os lugares em diferentes formas, é barato, biodegradável, leve, flexível, de fácil estocagem e transporte, com aplicações em inúmeras áreas. Conforme apontado por Costa (2012), 40 % da produção mundial de papel é usada para fins comunicativos e mais

de 50 % em embalagens, lenços, meio de filtração e isolamento elétrico. Em Química Analítica, papel é comumente utilizado como filtro em métodos físicos de separação.

Uma das características mais importante do papel é a uniformidade de sua composição e de sua superfície (COLLINS; BRAGA e BONATO, 2006). Ele é constituído por um conjunto de redes de fibras oriundas de celulose extraídas de diversos tipos de madeira que se interligam formando uma estrutura tridimensional. As fibras possuem comprimento médio entre 30 e 300 μm com diâmetro entre 10 e 50 μm (ROBERTS, 1996).

A celulose é um polissacarídeo cujo monômero é β -1,4-D-glicopirranose, conforme mostra a Figura 1. As ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas dos monômeros de glicose são responsáveis pela forte interação entre as moléculas de celulose, o que confere resistência às fibras.

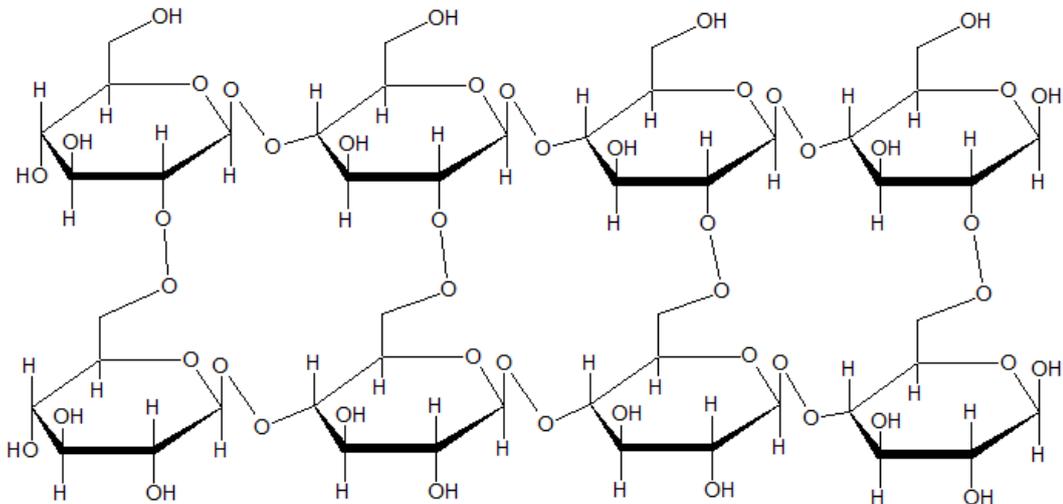


Figura 1: Estrutura química da celulose.

1.3 Microfluídica em papel

Dispositivos microfluídicos à base de papel (microfluidic paper-based devices, μPAD) representam uma opção promissora combinando as capacidades de dispositivos microfluídicos convencionais com a simplicidade de indicadores químicos e biológicos que usam tiras de papel poroso impregnadas com reagentes

específicos. Após confecção dos μ PAD, é possível realizar análises rápidas e de baixo custo (MARTINEZ et al, 2009), requerendo apenas um suporte externo simples e pequenos volumes de amostras e reagentes. Além disso, devido ao ordenamento enovelado das fibras do papel e a sua hidrofiliçidade, os fluidos são conduzidos pelos poros sob ação capilar. Isso aponta vantagens na utilização de μ PAD, pois dispensa aplicação de equipamentos externos como bombas seringas e fontes de alta tensão para condução dos fluidos.

O primeiro uso do papel como substrato em aplicação química foi desenvolvido por Plínio, o velho, entre 23 a 79 d.C. Ele impregnava tiras de papel com extrato de nozes de galha, que são estruturas anômalas formadas nas folhas e brotos de carvalho que é rico em taninos, para confirmar a contaminação de sulfato de ferro em acetato de cobre, que baseava-se em reação colorimétrica entre o ferro e o tanino presente no extrato. Caso houvesse presença de ferro, a tira de papel adquiria cor preta (HILLIS, 1945; ALVIM e DE ANDRADE, 2006).

O uso de papel como indicadores químicos foi introduzido no século XVII por Robert Boyle em seu livro intitulado 'Experimental History of Colours', onde relata trabalhos com tornassol e outros com corantes vermelhos extraídos de pau-brasil e de líquens, dentre outros. Em um estudo, ele gotejava licor de violeta em papel seguido de adição de algumas gotas de vinagre e observava a modificação da cor violeta para vermelha. (CHAGAS, 2000; TERCI e ROSSI, 2002).

Em processos de separação, o uso de papel vem sendo relatado desde a metade do século XIX, a partir dos trabalhos de Martin e Synge. Eles utilizaram tiras de papel de filtro como fase estacionária para separar aminoácidos obtidos após hidrólise de lã (MARTIN e SYNGE, 1941 apud COLLINS, 2009).

Em relação a utilização de papel no preparo dos primeiros dispositivos microfluídicos na acepção mais moderna do termo, destacam-se os estudos de Yagoda, que em 1937, confeccionou zonas reacionais circulares de aproximadamente 12,5 mm de diâmetro à base de parafina em papel de filtro seguido de aquecimento para quantificar níquel e cobre (Figura 2). A adição de reagentes era feita com uma micropipeta previamente calibrada, posicionada perpendicularmente aos dispositivos, a uma distância de 3 mm. Nesse estudo, os μ PAD eram impregnados com soluções alcólicas a 1 % de dimetilglioxima e alfa-

benzoinoxima para a quantificação de níquel e cobre, respectivamente pela formação de dimetilglioximato de níquel, que é percebido visualmente por uma tonalidade vermelha e o complexo $\text{Cu}(\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N})$, que tem tonalidade amarelo esverdeada. A quantificação baseava-se na comparação da cor das manchas resultantes nas zonas reacionais dos μPAD com escala de cor de padrões, após secagem (YAGODA, 1937).

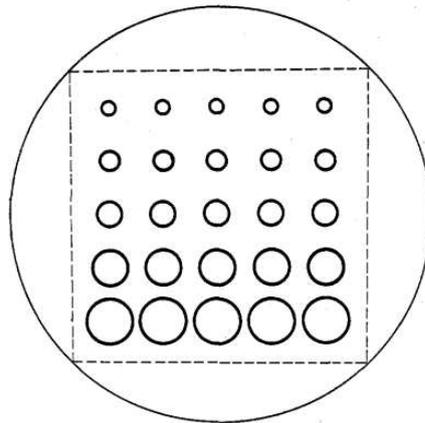


Figura 2: Esquema de μPAD confeccionado a base de parafina em papel de filtro para quantificação de níquel e cobre. Fonte: Yagoda (1937).

Mais recentemente, em 2007, o grupo de pesquisa de Whitesides, da Universidade de Harvard, desenvolveu μPAD utilizando a técnica de fotolitografia, o que permitiu a construção de barreiras hidrofóbicas com diâmetro de 7,5 cm de fotorresistor exposto à luz ultravioleta em 405 nm durante 10 s. Estes dispositivos foram utilizados para determinação simultânea de glicose e proteína em amostras de urina, sendo detectada visualmente por modificação de cores. O teste de confirmação para glicose baseia-se na oxidação enzimática de iodeto a iodo, gerando um produto de coloração castanha. No teste de proteína, utiliza-se o indicador azul de tetrabromofenol, sendo que urina com ausência de proteína forma uma mancha amarela nas zonas reacionais dos μPAD e com a presença de proteína aparece uma mancha de tonalidade azul esverdeada, conforme ilustra a Figura 3 (MARTINEZ et al, 2007; SILVA, 2012). A ideia inicial do grupo de Whitesides consistia em criar dispositivos miniaturizados que necessitavam de pequenos volumes de amostras e reagentes, com facilidade de transporte e descarte, além de serem baratos para aplicação em regiões remotas, que estejam ou não em

situações de emergência, em ambientes caseiros ou como alternativa barata às tecnologias avançadas em ambientes clínicos, visando atender grande número de população.



Figura 3: Esquema de μ PAD confeccionado pela técnica de fotolitografia para detecção simultânea de glicose e proteína em amostra de urina. Fonte: MARTINEZ et al, 2007.

Há várias técnicas relatadas na literatura para fabricação de μ PAD, que segundo Costa (2012), consiste na aplicação de materiais hidrofóbicos sobre o papel por vários métodos como impressão a cera, serigrafia, impressão flexográfica, recorte a laser, plotagem mecânica, fotolitografia, tratamento por plasma, corte de papel, deposição de polidimetilsiloxano, dentre outros.

A impressão à base de cera é uma das técnicas mais simples, rápidas e baratas que permite a fabricação de μ PAD em alta velocidade. Para isso é necessária uma impressora que usa cartuchos de cera sólida, cujo custo estimado para impressora e kit com quatro bastões de cera são R\$ 1550,00 e R\$ 168,00 respectivamente (cotação 26/06/2016). Este processo cria canais hidrófilos, onde os fluidos são transportados, delimitados por barreiras hidrofóbicas no papel (CARRILHO; MARTINEZ e WHITESIDES, 2009). Inicialmente, utiliza-se um programa para definir o layout dos μ PAD, que, em seguida, é impresso com impressora à cera. O processo é finalizado com o aquecimento do μ PAD em placa ou estufa para fundir a cera impressa, o que gera as barreiras hidrofóbicas. As zonas reacionais formadas restringem a amostra, diminuem problemas de dispersão e contribuem para aumentar a detectabilidade do analito, de acordo com a geometria e a área.

1.3.1 Aplicação dos μ PAD

Os μ PAD têm aplicabilidade para análises diversas. Jayawardane, Mckelvie e Kolev (2012), desenvolveram μ PAD feitos de papel de filtro pela técnica de impressão à jato de tinta para determinação de fosfato em águas e solo em análise ambiental. Neste trabalho, os layouts dos μ PAD foram feitos no programa Microsoft Word com 30 mm de comprimento com 4 a 8 mm de diâmetro. A impressão era realizada com cartucho que continha 4 % de dímero alquil ceteno, seguida de aquecimento a 105 °C durante 30 min para que o dímero se distribuísse na superfície dos μ PAD e formasse as barreiras hidrofóbicas. Estes μ PAD eram associados a métodos colorimétricos pela reação entre molibdato/antimônio e ácido ascórbico com a amostra (Figura 4). Imagens digitais foram obtidas com um scanner de mesa para correlacionar intensidades de cor no sistema RGB com a presença de fosfato em águas e solos utilizando o programa computacional Image J.

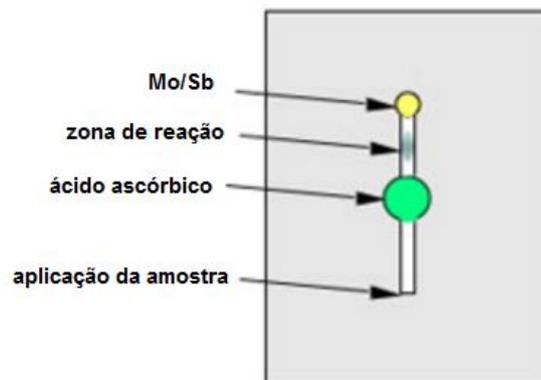


Figura 4: Esquema de μ PAD confeccionado por impressão a jato de tinta para determinação de fosfato em águas e solo. Fonte: JAYAWARDANE, MCKELVIE e KOLEV, 2012.

Em análises biomédicas, Gonçalves (2014) confeccionou μ PAD impressos com cera sólida e à jato de tinta para serem aplicados em monitoramento de glicose, com detecção eletroquímica. Os layouts dos μ PAD foram feitos no programa Adobe Illustrator (Figura 5). Em relação à técnica a base de cera, os autores utilizaram uma impressora que aquece a cera a 135 °C antes de iniciar a impressão. Isso permite diminuição de tempo de preparo dos μ PAD que tiveram tempo total de processo de 5 s.



Figura 5: Esquema simplificado de μ PAD confeccionado com cera sólida associado com detecção eletroquímica para aplicação em monitoramento de glicose. Fonte: GONÇALVES, 2014.

μ PAD confeccionados pela técnica de carimbagem, que envolve transferência de parafina para a superfície do papel, foram utilizados para a determinação de nitrito no controle de qualidade de alimentos (CARDOSO, 2014). Inicialmente, papel filtro era imerso em uma solução que continha parafina líquida a 90 °C por 60 s seguido de secagem a temperatura ambiente até solidificação da parafina. Feito isto, carimbos metálicos de aço inoxidável foram aquecidos a 150 °C e colocados em contato com o papel parafinado manualmente por 2 s para carimbar o layout dos μ PAD com formação das barreiras hidrofóbicas. Neste estudo, o layout dos μ PAD continha 8 zonas de reação circulares interconectadas por uma zona central onde era aplicada a amostra. A dimensão desses dispositivos tinha 10 mm de comprimento e 3 mm de largura com diâmetros de 5 e 10 mm nas zonas reacionais interconectadas e central, respectivamente, conforme a Figura 6.

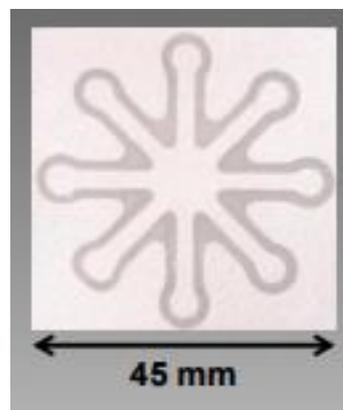


Figura 6: Imagem de μ PAD obtido após o processo de carimbagem para aplicação na determinação de nitrito em alimentos. Fonte: CARDOSO, 2014.

Em relação aos modos de detecção, os μ PAD podem ser associados à detecção colorimétrica, como no trabalho de ABE et al (2010) para determinação de proteína, glicose e em ensaios de pH por meio de alterações de cor combinados com análises digitais de imagens. Os autores utilizaram scanner de mesa para aquisição de imagens e o programa computacional Image J para avaliação das intensidades de cor no sistema RGB. Com detecção eletroquímica utilizando cronoamperômetros com potencial de 500 mV e voltametria de redissolução anódica com potencial de 5 mV, destacam-se os estudos de Nie et al (2010) que aplicaram μ PAD na determinação de glicose, lactato e ácido úrico em amostras de urina artificial e em ensaios de seletividade para chumbo em soluções aquosas contendo mistura de chumbo e zinco. Para isso, foram adicionados nos μ PAD três eletrodos a partir de tintas condutoras de carbono e prata com dimensão de 1,5 cm de comprimento e 3 mm de largura. O trabalho de Delaney et al (2011) foi pioneiro no estudo de μ PAD com eletroquimiluminência, usando a câmera de um smartphone para captura de imagem; eles fabricaram μ PAD a base de tinta em um layout de 7 mm de comprimento e 1,5 mm de largura com adição do luminóforo tris(bipiridil)rutênio(II) nas áreas hidrofílicas para detectar emissão de luz de 2-etanoldibutilamino e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). Estes compostos podem ser encontrados em mais de 250 vias biológicas.

1.4 Detecção colorimétrica

Reações que geram um produto colorido servem para estudos em μ PAD com detecção colorimétrica, sendo que a intensidade da cor desse produto é proporcional à concentração da espécie química (SANTOS, 2014).

As reações cromogênicas ocorrem dentro das zonas reacionais dos μ PAD e a identificação do analito pode ser feita visualmente em resposta de confirmação (positivo/negativo) em abordagem qualitativa; pode ser semi-quantitativa por meio de comparação com escala de cor de um padrão ou quantitativa por relações matemáticas da intensidade de cor do analito, a partir do tratamento de imagem digitalizada. Para isso, é necessário obter a imagem da área colorida empregando um dispositivo de captura de imagem, a qual é convertida em valores de componentes de cores utilizando-se um programa computacional, sendo que esses

valores, correspondentes a intensidades de cor servem para a construção de curvas analíticas em propostas de quantificação (GARCIA, 2014).

Com o avanço tecnológico da informática, atualmente existem vários modos de comunicação digital que podem ser utilizados para transmissão dessas imagens: correio eletrônico, mensagens multimídia, nuvem e whatsapp, que permitem aplicação em áreas remotas ou com recursos limitados. Martinez et al (2008) utilizaram imagens digitais de μ PAD preparado pela técnica de fotolitografia para determinação de glicose e proteína em urina artificial usando as vantagens da comunicação digital para transferência de dados colorimétricos do local de ensaio para um laboratório com analista adequado para avaliação dos dados. Depois, o diagnóstico foi reencaminhado novamente em meio digital para o prestador de serviço local. Neste contexto, a detecção colorimétrica é a mais utilizada devido ao baixo custo, aplicabilidade para realizar análises em campo e fácil acesso aos equipamentos necessários para captura e transmissão de imagens digitais.

1.5 Imagens digitais

Itens de uso comum como scanner e câmeras de tablet ou smartphone permitem aquisição de imagens digitais e podem servir como ferramentas para propostas analíticas, por fornecerem, de forma rápida, informações que podem ser associadas às concentrações de espécies químicas coloridas, tendo potencialidade para aplicação em campo com baixo custo de implementação (GARCIA, 2014; CASTRO, 2013).

A análise de imagens digitais pode ser feita pela avaliação dos pixels, que é o menor elemento que constitui uma imagem (SANTOS, 2013). Com relação a imagens digitais coloridas, o processamento pode ser realizado em diferentes sistemas de cores quando é projetada através de filtros coloridos, como no sistema RGB (Red, Green and Blue), sendo que a quantidade de energia refletida do objeto digitalizado determina sua representação entre o branco (quando refletem toda a energia) e o preto (quando absorvem toda a energia).

O sistema RGB descreve quantitativamente as cores com uma representação numérica. Para isso, esse sistema usa 8 bits (1 byte) para cada

componente (R, G e B), que pode assumir 256 níveis de intensidades de cor, isto é, cada componente pode assumir valores de 0 a 255, sendo que a cor de um pixel é a combinação das três componentes (GOMES, 2008; SANTOS, 2013), o que gera cerca de 16 milhões de combinações de cores. Essas informações numéricas podem ser obtidas empregando programas computacionais.

Ao ser digitalizada, a resolução da imagem pode ser dada em pixel ou megapixel (MP) e em “dots per inch” (dpi), que são duas medidas que se associa com a qualidade da imagem digital gerada. A primeira forma indica que quanto mais pixels uma imagem tem, melhor é a sua qualidade, sendo comumente utilizada em especificações de câmeras digitais de smartphones e tablets. A segunda relaciona a quantidade de pixels por área da imagem quando a imagem for impressa ou mostrada na tela do processador, sendo geralmente utilizada em programas computacionais de digitalização de scanner. Assim quanto maior o número de pixels por área da imagem, melhor é qualidade da imagem (SCURI, 1999). Isso influencia os valores numéricos das componentes RGB, o tamanho do arquivo digital gerado, normalmente especificado em megabyte (MB) e o espaço ocupado na memória do computador, além do tempo gasto para aquisição e processamento desse arquivo. Portanto, é imprescindível definir a qualidade adequada para aquisição de dados, considerando-se a sensibilidade do dispositivo de captura de imagem, a capacidade do processador, a facilidade para envio de informações utilizando a comunicação digital, considerando também os objetivos pretendidos com o tratamento desses dados.

Como a intensidade da cor pode ser proporcional à concentração de uma espécie química (SANTOS, 2013), em μ PAD, a quantificação dessa espécie pode ser realizada a partir da correlação dos valores das componentes do sistema RGB de uma imagem digitalizada associada com essa espécie e sua concentração. Pode-se considerar uma analogia a medidas espectrofotométricas, mas dispensando-se todo instrumental necessário que neste trabalho foi aplicado para analisar amostras contendo antocianinas (ACYS).

1.6 Antocianinas

ACYS são corantes naturais fenólicos, da classe dos flavonóides, responsáveis pelas tonalidades que variam do vermelho ao azul, encontrados em raízes, folhas, frutos e flores (LOPES et al, 2012). Em relação às funções desses corantes na planta, ressaltam-se ação protetora à luz e em mecanismos de reprodução e defesa.

A estrutura química de ACYS (Figura 7) é caracterizada pela presença de dois anéis aromáticos denominados A e C, unidos por três átomos de carbono formando o anel heterocíclico B. Os anéis aromáticos A e B são derivados da rota do ácido xiquímico formando estruturas na forma C₆-C₃, o anel C é derivado da rota dos acetatos formando um tricetídeo com seis átomos de carbono resultando na outra parte C₆. O anel B sofre substituição de um hidrogênio por um grupo de açúcar (MALACRIDA e MOTTA, 2006), sendo o cátion flavílico a estrutura mais estável e predominante em pH < 2.

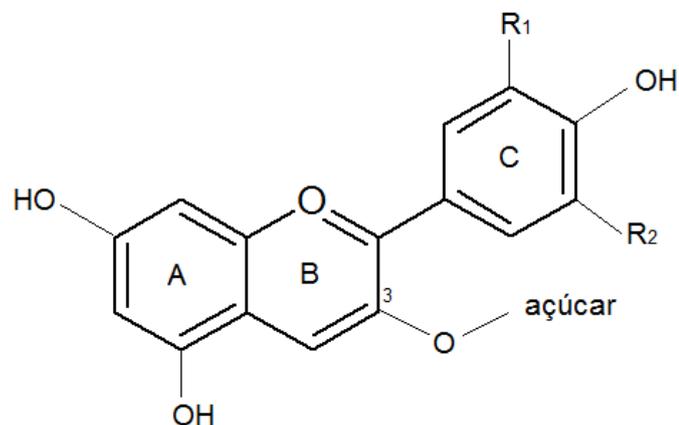


Figura 7: Estrutura química das antocianinas.

A glicosilação pode ocorrer em várias posições, no entanto, é mais evidenciada na posição 3. Os açúcares mais comumente ligados às ACYS são: glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose, que favorecem a solubilidade do corante em meio aquoso. Além disso, a quantidade de grupos metoxilas e hidroxilas na molécula influencia a estabilidade, a coloração em solução e diferencia os vários tipos de ACYS existentes em frutas. Por exemplo, cianidina-3-glicosídeo é diferenciada de outras ACYS pela presença de grupos hidroxilas e

hidrogênio nas posições R₁ e R₂, respectivamente, ao passo que a malvidina-3-glicosídeo é substituída em R₁ e R₂ por grupos metoxilas.

Outra característica importante de ACYS é a sensibilidade a alterações de pH, fazendo com que suas soluções exibam diferentes cores devido a alterações estruturais descritas na Figura 8.

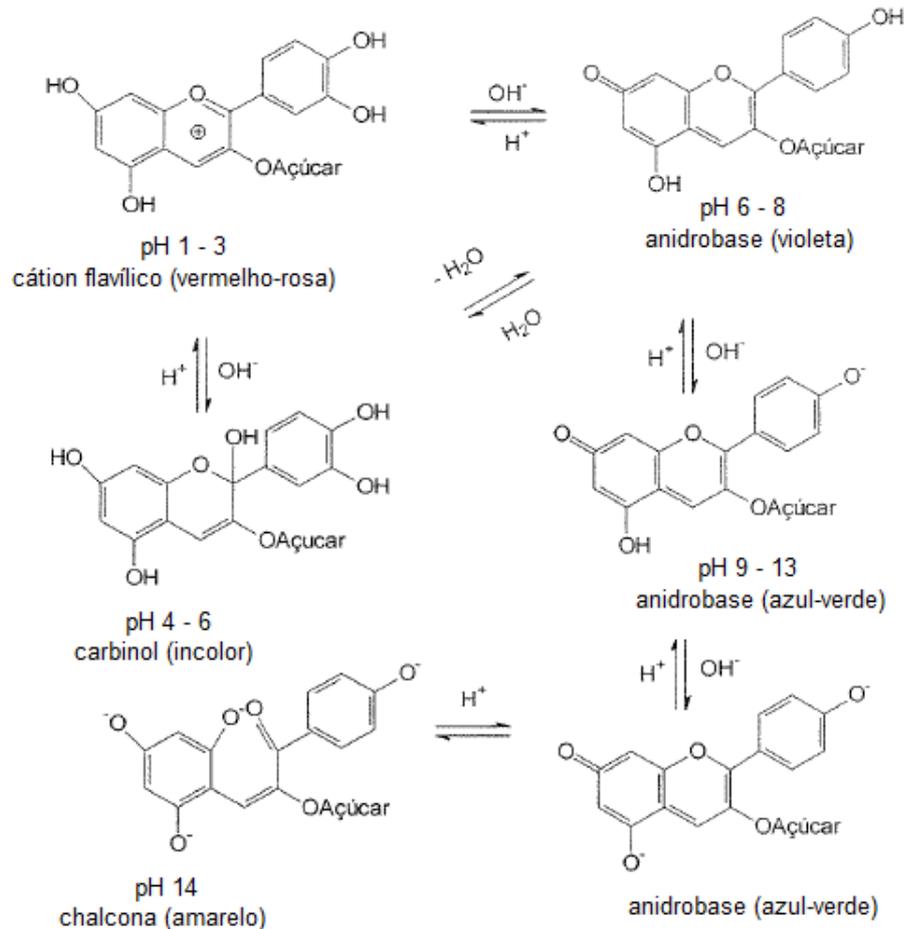


Figura 8: Mudanças estruturais de ACYS em meio aquoso e em função do pH. Fonte: TERCI e ROSSI, 2002.

Frequentemente, em meio ácido (pH 1 a 3), soluções aquosas de ACYS apresentam tons avermelhados. Isto corresponde ao equilíbrio entre o cátion flavílico e a pseudobase carbinol. À medida que o pH vai aumentando, a solução perde cor até se tornar praticamente incolor (pH 4 a 6) devido à formação da pseudobase carbinol. A partir de valores de pH entre 6 a 8, ocorre a formação da anidrobases, cuja solução apresenta tom violeta. Acima deste pH, as ACYS são ionizadas e em pH entre 9 a 13 forma-se outra anidrobases que cuja solução aquosa apresenta tons azuis ou verdes. Por fim, em meio fortemente básico (pH 14), ocorre a ruptura do

anel heterocíclico formando a estrutura denominada chalcona que é percebida em solução com tom amarelo (TERCI, 2004).

As diferenças de tonalidades adquiridas por soluções de ACYS estão relacionadas com a presença de grupos cromóforos. A interação desses grupos com a radiação eletromagnética na região do visível pelo processo de absorção, confere-lhes cor, o que torna possível quantificá-las em solução por técnicas espectrofotométricas.

O método oficial para quantificação de ACYS é baseado em medidas espectrofotométricas (LEE; DURST e WROLSTAD, 2005), sendo aplicável para ACYS presentes em frutas, bebidas, corantes naturais e vinhos. Este método leva em consideração a diferença de absorbância em 520 nm de soluções de ACYS em pH 1 que corresponde à sua forma colorida (cátion flavílico) e em pH 4,5 que corresponde à sua forma incolor (carbinol), com resultados proporcionais à concentração do corante. Como vários tipos de ACYS em proporções variadas podem estar presentes nos extratos naturais, o método oficial expressa a concentração do pigmento antociânico em termos de cianidina-3-glicosídeo, que é o tipo de ACYS mais comumente encontrada na natureza.

Com estas propriedades de modificação de cor em solução em diferentes valores de pH, ACYS tem aplicação como indicadores naturais de pH no ensino de Química, como aponta Terceiro e Rossi (2002), que estudaram aplicação de ACYS extraídas de amora, jambolão e jabuticaba como indicadores de pH em solução e em tiras de papel filtro impregnadas com os extratos de ACYS. Este estudo concedeu, recentemente, patente de invenção sob o número 0216120-6 às autoras. Outros trabalhos tratam da determinação de ponto final de titulações ácido-base em estudo realizado com extratos de ACYS de flores e frutas: ipê roxo, petúnia, quaresmeira, jabuticaba e jambolão (GUIMARÃES et al, 2012) e aplicação de ACYS extraídas de amora, framboesa e mirtilo para sensibilizar células solares (PATROCÍNIO e IHA, 2010).

1.7 Propriedades e exploração econômica de ACYS

Ainda crescem os estudos sobre substituição de corantes sintéticos por naturais em alimentos, principalmente porque os consumidores buscam melhor qualidade de vida (SILVA et al, 2010). Isso implica também em benefícios ambientais, visto que muitos produtos alimentícios como sucos, doces e polpas têm remoção de cascas de frutas para descarte em vez de serem utilizadas, evitando desperdício (OLIVEIRA et al, 2009). Em frutas roxas, por exemplo, geralmente ACYS são encontradas em maior quantidade nas cascas, com exceções como amora, mirtilo, açaí e pitaya vermelha. Na indústria cosmética também é evidenciada a aplicabilidade de ACYS, como por exemplo, na formulação de lipossomas para encapsulação de extrato de ACYS de açaí para produzir dermocosméticos. (TABARIN e GONÇALVES, 2010) e em formulações de xampus e condicionadores utilizando ACYS do extrato de camu-camuzeiro (YUYAMA, 2011).

Aspectos vantajosos da aplicação de ACYS como corantes naturais em alimentos e cosméticos estão relacionados com suas propriedades potencialmente favoráveis para a saúde humana. Destacam-se sua ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena, antidiabética e antiobesidade (OSMANI, 2009).

A grande extensão territorial do Brasil, que abrange vários ecossistemas (floresta amazônica, mata atlântica, cerrado e caatinga) resulta em uma ampla biodiversidade de plantas, flores e frutos. Neste contexto, é justificável aprofundar estudos sobre novas fontes de ACYS que ocorrem naturalmente, visando obter dados que podem estimular sua exploração econômica sustentável, já que existem aplicações como corantes naturais em alimentos, em formulações de cosméticos e fitoterápicos.

1.8 Caracterização das frutas estudadas

1.8.1 Uva (*Vitis vinífera*)

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA), o processo de viticultura no Brasil teve início com imigrantes portugueses. Os primeiros cultivares ocorreram na região Nordeste com expansão para outros estados: Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Atualmente, existem várias áreas de plantio, o que indica uma tendência de expansão da cultura no Brasil, sendo os principais polos produtores encontrados no Sul e Sudeste do país (CAMARGO; MAIA e RITSCHER, 2010).

Existem vários estudos que relatam os benefícios farmacológicos associados ao consumo de uva, que é fonte de diversos compostos fenólicos, principalmente ACYS (LUCILE, et al, 2007; DEL VALLE LEGUIZAMÓN; LÉON e SAÑUDO, 2005), por sua destacada atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena. Segundo Soares et al (2008), o teor de ACYS obtido da casca de uva do tipo isabel foi de 82 mg por 100 g, expressa em cianidina-3-glicosídeo. Os pigmentos antocianínicos da uva roxa encontram-se principalmente na casca (MEZARROBA, 2001).

1.8.2 Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)

É uma fruta de origem sul-americana, conhecida há mais de 400 anos. Jabuticabeiras nativas podem ser encontradas em grande parte do Brasil, com maior ocorrência em Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (SUGUINO et al, 2012).

Assim como acontece com uva, cresce o número de estudos envolvendo a jabuticaba devido ao seu alto teor de compostos fenólicos como ACYS (MOURA et al, 2009; CAVALCANTI, 2013), que também estão localizadas na casca (Figura 5). Nos estudos de Teixeira; Stringheta e De Oliveira (2015), o teor de ACYS em casca de jabuticaba foi de 641 mg por 100 g.

Capítulo 2: OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando o interesse em tecnologias alternativas para quantificação de analitos coloridos em solução, visando aplicação em campo sem utilização de equipamentos de laboratório, este trabalho teve como objetivo desenvolver um procedimento para detectar e quantificar ACYS extraídas de frutas, utilizando-se μ PAD, com aquisição de imagens usando scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone, e tratamento dos dados a partir das componentes do sistema RGB das imagens digitalizadas com programa de uso livre.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar a superfície do papel usado para confeccionar os μ PAD antes e após impregnação com solução de pH 1 e com soluções de ACYS de uva e jabuticaba.
- II. Avaliar a adequação dos μ PAD em proposta qualitativa para detectar ACYS pela modificação de cor em soluções de pH variando de 1 a 14 e em soluções de HCl e NaOH 2 mol L⁻¹.
- III. Estudar as condições de aplicação da amostra e de armazenamento dos μ PAD impregnados com solução de pH 1, a adequação de diferentes dispositivos para aquisição de imagens bem como a resolução dessas imagens para posterior conversão de dados no sistema RGB, visando a quantificação de ACYS.
- IV. Avaliar algumas figuras de mérito do método de quantificação de ACYS em μ PAD a partir dos parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Capítulo 3: PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Considerações gerais

Este trabalho foi dividido em estudos qualitativos e quantitativos de ACYS extraídas de frutas. Para sua execução, tem-se registro no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob o número 47740-1.

Os estudos qualitativos envolveram testes com detecção visual, que visaram um procedimento para identificar a presença de ACYS pela modificação de cor em soluções de pH conhecidos variando de 1 a 14 e com ensaios de reversibilidade de cor em soluções de HCl e NaOH 2 mol L⁻¹ impregnadas nos μ PAD.

Os estudos quantitativos incluíram a quantificação dos extratos de acordo com o método oficial AOAC International (LEE; DURST e WROLSTAD, 2005) e pelo método desenvolvido, que corresponde à quantificação de ACYS em imagens digitais de μ PAD. A proposta quantitativa iniciava-se com a aplicação de amostra contendo ACYS no μ PAD, depois eram obtidas imagens empregando scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone para conversão digital em intensidades de cor no sistema RGB utilizando-se o programa livre GIMP 2.8. Buscou-se estabelecer correlações do sinal digitalizado proporcionais à concentração de ACYS, tendo sido testadas diversas qualidades de obtenção das imagens para ajuste das condições de digitalização e correlação com as concentrações encontradas por método oficial. O trabalho foi finalizado com validação analítica do método desenvolvido com avaliação dos parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

3.2 Preparo dos extratos de ACYS

Frutas frescas, uva (*Vitis vinífera*) e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), foram colhidas na própria árvore ou adquiridas no comércio local, sendo posteriormente conservadas em freezer até o momento do uso. Para obtenção dos extratos, deixavam-se as frutas congeladas atingirem à temperatura ambiente antes do processamento.

Optou-se pela utilização de procedimentos descritos na literatura e que vem sendo estudados e aperfeiçoados em trabalhos com ACYS desenvolvidos no Grupo de Pesquisa em Química Analítica e Educação (GPQUAE, IQ-UNICAMP) para obtenção dos extratos. Cerca de 30 g de cascas das frutas foram removidas manualmente para pesagem (SHIMADZU AX200) e depois imersas em etanol 94 % v/v na proporção 1:3 (massa de cascas/volume de solvente). O sistema foi mantido sob agitação em mesa agitadora (Novatécnica, CT-145) por 2 h, seguindo-se de filtração simples com papel de filtro qualitativo (Qualy, 80 g m²). Para verificar o perfil espectral dos extratos de ACYS foram obtidos espectros eletrônicos (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000) em triplicata com varredura entre 400 a 650 nm em celas de quartzo de 1 cm de caminho óptico (Q4-Biocel) utilizando-se etanol 94 % como branco.

Para concentrar os pigmentos antociânicos, os extratos brutos foram acondicionados em placas de Petri e deixados para secar à temperatura ambiente sob fluxo de ar do sistema de exaustão de capela com vazão de 0,6 m s⁻¹ até a formação de uma pasta viscosa, denominada “extrato seco” (FAVARO, 2008). Após isso, os extratos secos foram cobertos com papel alumínio e estocados em freezer até uso para quantificação de acordo com o método oficial.

3.3 Preparo das soluções de pH conhecido

A composição das soluções de pH conhecido utilizadas nos ensaios qualitativos e quantitativos de ACYS em μ PAD está listada na Tabela 1. A confirmação do pH foi realizada utilizando pHmetro (ANALYSER pH 300) com eletrodo de vidro combinado e para ajuste, quando necessário, foram utilizadas soluções de HCl e NaOH 1 mol L⁻¹ com exceção das soluções de pH 1 e 4,5, que foram ajustadas com HCl concentrado, conforme indicação do método oficial.

Tabela 1: Composição das soluções de pH conhecido.

pH	Solução (volume final = 100 mL)
1,0	94 mL de KCl 0,025 mol L ⁻¹ + 6 mL de HCl concentrado
2,0	25 mL de KCl 0,2 mol L ⁻¹ + 7 mL de HCl 0,2 mol L ⁻¹
3,0	4 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ + 16 mL de ácido cítrico 0,1 mol L ⁻¹
4,0	8 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ + 12 mL de ácido cítrico 0,1 mol L ⁻¹
4,5	80 mL de C ₂ H ₃ NaO ₂ 0,4 mol L ⁻¹ + 20 mL de HCl concentrado
5,0	10 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ + 10 mL de ácido cítrico 0,1 mol L ⁻¹
6,0	13 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ + 7 mL de ácido cítrico 0,1 mol L ⁻¹
7,0	17 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ + 4 mL de ácido cítrico 0,1 mol L ⁻¹
8,0	19 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ + 1 mL de ácido cítrico 0,1 mol L ⁻¹
9,0	50 mL de KCl/H ₃ BO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ + 21 mL de NaOH 0,1 mol L ⁻¹
10,0	50 mL de KCl/H ₃ BO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ + 44 mL de NaOH 0,1 mol L ⁻¹
11,0	50 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,05 mol L ⁻¹ + 4 mL de NaOH 0,1 mol L ⁻¹
12,0	25 mL de KCl 0,2 mol L ⁻¹ + 6 mL de NaOH 0,2 mol L ⁻¹
13,0	25 mL de KCl 0,2 mol L ⁻¹ + 66 mL de NaOH 0,2 mol L ⁻¹
14,0	Solução saturada de KOH

3.4 Preparo dos μ PAD

Os μ PAD foram preparados por impressão com cera (Xerox Phaser 8560N) em papel cromatográfico (Whatman n° 1) em um design composto de 96 zonas reacionais circulares de 7 mm de diâmetro, desenhadas com linhas de 0,5 mm de espessura, dispostas em um arranjo de 8 linhas e 12 colunas com distância de 9 mm entre os centros de duas zonas. Após a impressão, os dispositivos eram levados à estufa (QUIMIS®, Q317M13) a 150 °C por 120 s para permeação da cera e impermeabilização das zonas reacionais. Para evitar perda de líquido por vazamento, fixava-se filme plástico autoadesivo transparente (Con-Tact®) no verso dos μ PAD. A Figura 9 ilustra o layout dos μ PAD antes e após tratamento em estufa.

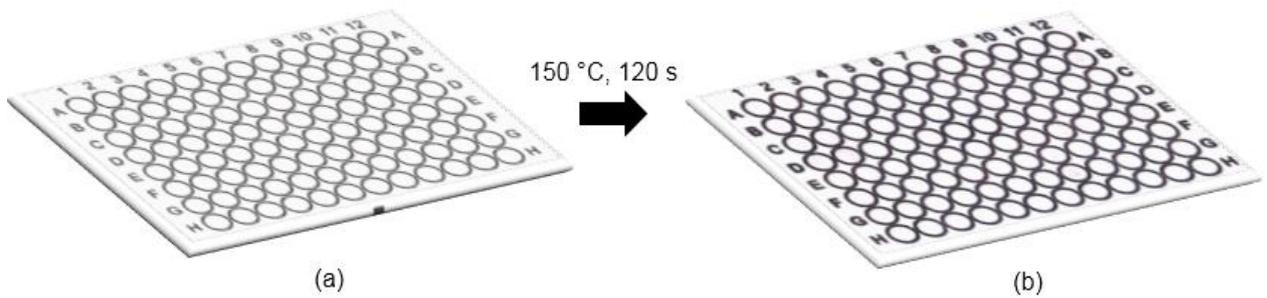


Figura 9: Layouts dos μ PAD: (a) inicial e (b) final.

3.5 Modo de adição dos reagentes nos μ PAD e conversão em imagens

Os μ PAD foram fixados em um suporte de madeira com auxílio de fita crepe (AFA[®]) nas laterais, de modo a permitir uma superfície rígida e estável para adição dos reagentes. Uma micropipeta (Eppendorf, 10 μ L) era posicionada perpendicularmente aos dispositivos com distância de aproximadamente 3 cm, como indicado na Figura 10.

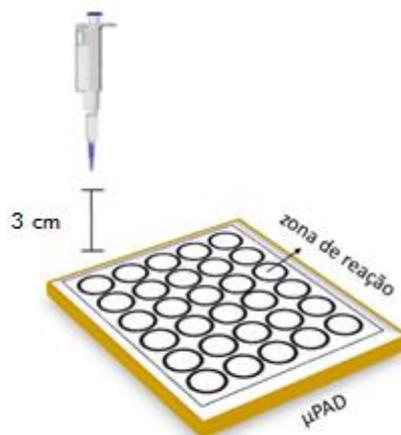


Figura 10: Ilustração do modo de adição dos reagentes nos μ PAD.

Para os testes iniciais, eram adicionados 4 μ L das soluções de pH conhecido no centro de cada zona reacional deixando-as secar¹ à temperatura ambiente. Em seguida, eram adicionados 4 μ L das soluções de ACYS de concentrações conhecidas, com nova secagem à temperatura ambiente. No

¹Neste trabalho, toda referência à secagem relaciona-se com a remoção do excesso de água aparente da superfície do papel do μ PAD.

decorrer do trabalho foram realizadas alterações nos volumes adicionados, descritas na sequência.

Empregando scanner de mesa (Lexmark X83), imagens digitais foram adquiridas pela posição dos μ PAD no centro da placa de digitalização. Utilizando câmeras de tablet (Samsung Tab 4, 3 MP) e smartphone (Motorola Moto G 2ª geração XTI068, 6 MP) as imagens eram obtidas por captura direta dos μ PAD fixados no suporte de madeira com distância de 15 cm, conforme ilustram as Figuras 11 e 12. As imagens geradas foram salvas nos formatos bmp (Bitmap) e jpg (Joint Photographics Experts Group), sendo que para a determinação das intensidades de cor foi empregado o programa de uso livre GIMP 2.8, que é compatível com os formatos de arquivos utilizados no presente trabalho.

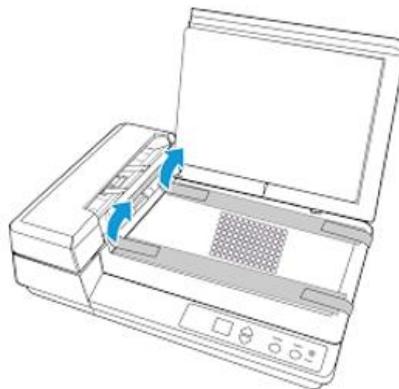


Figura 11: Ilustração do modo de digitalização dos μ PAD com scanner colocados diretamente sobre a placa digitalizadora.

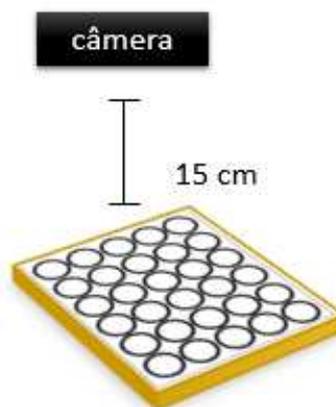


Figura 12: Ilustração do modo de captura de imagens dos μ PAD utilizando câmeras de tablet e smartphone.

3.6 Avaliação dos μ PAD impregnados com reagentes

Para obter informações morfológicas dos μ PAD impregnados com soluções envolvidas na obtenção das manchas avermelhadas, cuja intensidade de cor pode ser associada à concentração de ACYS, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos μ PAD impregnados com essas soluções, descritas na Tabela 2. Para isso, utilizou-se microscópio JSM-6360 (JEOL/EO) com feixe de elétrons de 10 keV e os μ PAD das amostras da Tabela 2 receberam cobertura de ouro e a formação das imagens deu-se por elétrons secundários (SEI) com ampliação de 50, 200, 500, 1000 e 4000 vezes.

Tabela 2: Descrição das misturas reacionais nos μ PAD para obtenção de imagens por MEV. Condições: cobertura de ouro, feixe de elétrons de 10 keV, formação de imagens por elétrons secundários (SEI), com ampliação de 50, 200, 500, 1000 e 4000 vezes.

Amostra	Misturas reacionais nos μ PAD para análise por MEV
1	PC*
2	PC + 4 μ L de solução de pH 1
3	PC + 4 μ L de solução de pH 1 + 4 μ L de solução de ACYS de uva
4	PC + 4 μ L de solução de pH 1 + 4 μ L de solução de ACYS de jabuticaba

*papel cromatográfico

3.7 Quantificação dos extratos

Para quantificar os extratos e as soluções de ACYS utilizadas neste trabalho, foi aplicado o método oficial AOAC International (LEE; DURST e WROLSTAD, 2005), que é baseado na metodologia do pH diferencial proposto por Fuleki e Francis em 1968. Este método envolve medidas de absorvância em 520 nm das soluções em diferentes colorações (vermelho e incolor) relacionadas com as estruturas de ACYS em pH 1, que corresponde ao cátion flavílico, e em pH 4,5, que corresponde ao carbinol. Dessa forma, a diferença de absorvância de soluções de ACYS em pH 1 e 4,5 é proporcional à concentração efetiva do corante.

Partiu-se de aproximadamente 70 mg do extrato seco de ACYS, que foram dissolvidos em solução de pH 1 em balões volumétricos de 10 mL. Na sequência, uma alíquota de 1 mL do extrato aquoso foi adicionada em balões volumétricos de 5 mL e diluída com soluções de pH 1 e 4,5 com medidas de

absorbância em 520 e 700 nm realizadas em triplicata em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

3.8 Identificação de ACYS nos μ PAD

Neste estudo, a variação de cor de soluções de ACYS nos μ PAD bem como sua reversibilidade foi avaliada por detecção visual em duas etapas. A primeira etapa consistiu na reação de soluções de ACYS de concentrações 92 mg L⁻¹ do extrato de uva e 204 mg L⁻¹ do extrato de jabuticaba com soluções de pH conhecido variando de 1 a 14. A segunda etapa consistiu na reação das mesmas soluções de ACYS com soluções de HCl e NaOH 2 mol L⁻¹ adicionadas de forma alternada em uma mesma zona reacional dos μ PAD.

Os μ PAD eram impregnados com 4 μ L de soluções de pH conhecido variando de 1 a 14 com secagem à temperatura ambiente. Na sequência, eram adicionados 4 μ L de soluções de ACYS preparadas em água deionizada, seguindo-se outra etapa de secagem à temperatura ambiente. Para o teste de reversibilidade eram adicionados 2 μ L de solução de HCl 2 mol L⁻¹ em uma coluna distinta nos μ PAD seguido de secagem à temperatura ambiente. Depois, nessa mesma coluna, eram adicionados 2 μ L de solução de ACYS com nova secagem, e, para finalizar o teste, eram adicionados 2 μ L de solução de NaOH 2 mol L⁻¹ e novamente de HCl 2 mol L⁻¹, buscando-se observar a reversibilidade de cor das manchas no conjunto das zonas reacionais. Foram 3 replicatas para o ensaio de variação de cor e 8 replicatas para o ensaio de reversibilidade.

3.9 Quantificação de ACYS nos μ PAD com análise digital de imagens

O programa de uso livre GIMP 2.8, desenvolvido por Mattis e Kimball em 1996, fornece dados no sistema RGB e foi empregado para conversão digital das intensidades de cor das imagens geradas pela reação entre soluções de ACYS dos extratos de uva e jabuticaba com solução de pH 1 nos μ PAD. O programa pode ser obtido pelo link <https://www.gimp.org/downloads/>.

A seguir, são relatados os procedimentos desenvolvidos para testar o modo de aquisição de imagem empregando scanner de mesa com avaliação de diferentes qualidades de digitalização e o modo de seleção da área da imagem para conversão digital no sistema RGB, buscando as condições mais adequadas para quantificar ACYS.

3.9.1 Avaliação das componentes do sistema RGB

O programa GIMP 2.8 realiza automaticamente a contagem dos pixels para leitura de intensidades de cor a partir da ferramenta seleção elíptica, que foi usada para delimitar a área da imagem para estudo com contagem de 92.885 pixels. Os valores de RGB foram extraídos usando a ferramenta informações de cores através do histograma, ilustrado na Figura 13 e, posteriormente, importados para uma planilha em Excel.

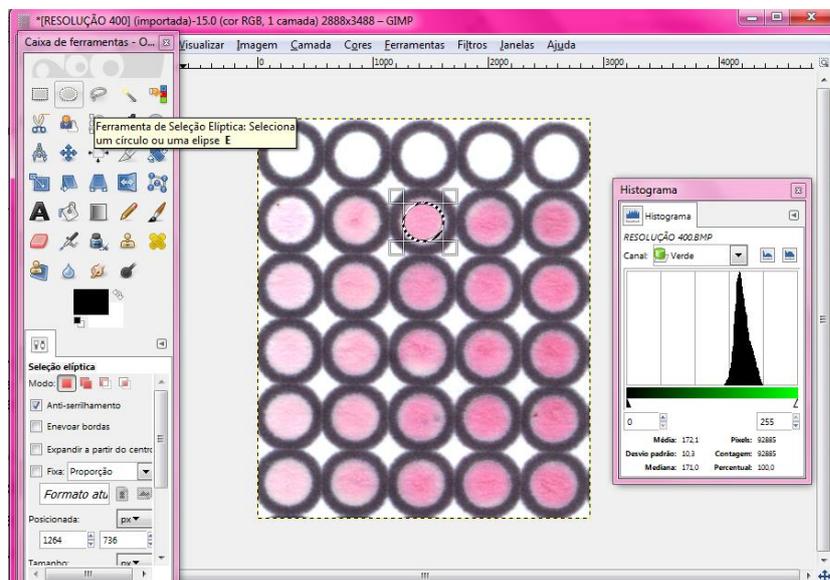


Figura 13: Interface gráfica do usuário do programa GIMP 2.8.

Soluções de ACYS do extrato de uva nas concentrações 20; 40; 60; 80 e 100 mg L⁻¹ e 65; 130; 195; 260 e 325 mg L⁻¹ do extrato de jabuticaba foram preparadas pela diluição de soluções estoque de concentrações 104 e 343 mg L⁻¹, respectivamente para os extratos de uva e jabuticaba, em solução de pH 1.

Adicionaram-se 4 μL de soluções de pH 1 no centro das zonas de reação em 5 replicatas nos μPAD , seguindo-se de secagem à temperatura ambiente. Depois, eram adicionados 4 μL de soluções de concentrações conhecidas de ACYS, seguindo-se novamente de secagem à temperatura ambiente. Finalmente, os μPAD eram posicionados no centro da placa do scanner e digitalizados com qualidade de 200 dpi. Como branco, utilizaram-se os valores das componentes R, G ou B das imagens dos μPAD impregnados apenas com solução de pH 1.

3.9.2 Aquisição das imagens digitais

O scanner utilizado permite a obtenção de imagens com resolução entre 50 e 19.200 dpi. Neste estudo, foram avaliadas as resoluções de 200, 400, 600 e 800 dpi. Os μPAD eram preparados pela adição de 4 μL de soluções de pH 1 no centro das zonas de reação em 5 replicatas, seguindo-se de secagem à temperatura ambiente. Na sequência, eram adicionados 4 μL de soluções de ACYS de concentrações entre 20 a 100 mg L^{-1} (extrato de uva) e 65 a 325 mg L^{-1} (extrato de jabuticaba), seguindo-se novamente de secagem à temperatura ambiente. Feito isto, os dispositivos eram posicionados no centro da placa do scanner e as imagens foram obtidas com qualidades de 200, 400, 600 e 800 dpi.

3.10 Estabilidade de μPAD e formas de obtenção de imagens

Paralelamente aos testes qualitativos e quantitativos em μPAD , foi iniciado um teste para avaliar a reatividade dos μPAD impregnados previamente com solução de pH 1 e, depois, com soluções de ACYS, já que solução de ACYS em pH 1 assume sua estrutura mais estável denominada cátion flavílico, com soluções de coloração vermelha-rosa. Assim, quanto mais intensa for a coloração da mancha na zona reacional nos μPAD , maior é a concentração de ACYS da solução aplicada.

As intensidades de cor obtidas para os extratos de uva e jabuticaba foram monitoradas durante 4 meses em 3 condições de armazenamento: temperatura

ambiente e protegidos da luz, temperatura ambiente e expostos à luz de ambiente interno e temperatura de 5 °C e protegidos da luz.

Nesse estudo, eram adicionados 4 μL de solução de pH 1 em cada zona reacional dos μPAD , seguindo-se de secagem à temperatura ambiente com posterior armazenamento nas 3 condições já descritas. As colunas dos μPAD correspondem ao tempo de estudo da estabilidade com checagem semanal e as linhas correspondem ao número de replicatas, conforme mostra a Figura 14.

Semanalmente, eram adicionados 4 μL de soluções de ACYS de uva de concentração 60 mg L^{-1} e jabuticaba de concentração 195 mg L^{-1} nas zonas reacionais previamente impregnadas com solução de pH 1, seguindo-se secagem a temperatura ambiente.

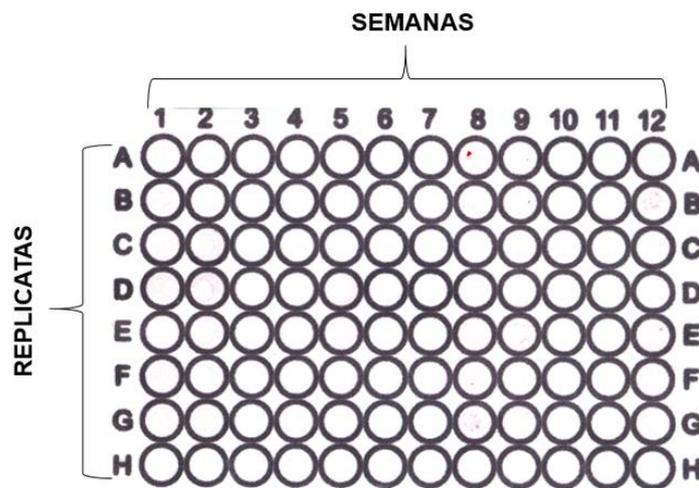


Figura 14: Esquema da organização dos μPAD utilizados no teste de estabilidade.

Neste teste, as intensidades de cor foram avaliadas a partir de imagens digitais de μPAD obtidas com scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone. A resolução de imagens obtidas com scanner foi expressa em dpi e para obtenção dessas imagens seguiu-se o procedimento descrito no subitem 3.9.1. Já as resoluções de imagens obtidas com câmeras de tablet e smartphone foram expressas em MP, sendo que imagens adquiridas com a câmera de smartphone foram capturadas com flash ativado de acordo com o esquema da Figura 12, e imagens obtidas com a câmera do tablet pelo mesmo esquema de posicionamento

foram adquiridas sem flash. Dados de resolução dos dispositivos de captura de imagem estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Resolução dos dispositivos de captura de imagens digitais de μ PAD.

Dispositivo de captura de imagem	Resolução
scanner de mesa	400 dpi
tablet	3 MP
smartphone	6 MP

3.11 Avaliação de desempenho do método

Para avaliar o desempenho do método, realizou-se a análise dos parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, segundo a resolução 899 de 2003 para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos de 2010 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

3.11.1 Linearidade

Este parâmetro demonstra que os resultados obtidos experimentalmente pelo método desenvolvido são diretamente proporcionais à concentração do analito em um intervalo predeterminado.

A partir de soluções estoque de ACYS dos extratos de uva e jabuticaba de concentrações 121 e 358 mg L⁻¹, respectivamente, foram preparadas cinco soluções de cada extrato a partir de diluições adequadas em solução de pH 1, descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Soluções de ACYS em mg L⁻¹ dos extratos de uva e jabuticaba preparadas em solução de pH 1 e aplicadas nos μ PAD para avaliação da linearidade.

ACYS de uva (mg L⁻¹)	ACYS de jabuticaba (mg L⁻¹)
61	179
76	224
91	269
106	313
121	358

Em seguida, 8 μL de soluções de ACYS de concentrações conhecidas foram adicionadas nos μPAD com posterior secagem à temperatura ambiente. Imagens digitais foram obtidas em scanner com qualidade de 400 dpi com posterior aquisição de dados da componente G para construção de curvas analíticas para cada extrato.

3.11.2 Precisão

Neste trabalho foi avaliada a precisão intra-corrída (repetibilidade) realizada no mesmo dia em intervalos de 3 horas.

Foram adicionados 8 μL de soluções de ACYS de concentrações 69, 84 e 114 mg L^{-1} do extrato de uva e 202; 247 e 336 mg L^{-1} do extrato de jabuticaba preparadas diretamente em pH 1 a partir de soluções estoque de concentrações 121 mg L^{-1} (extrato de uva) e 358 mg L^{-1} (extrato de jabuticaba) em um conjunto de cinco zonas reacionais nos μPAD . Deixaram-se secar à temperatura ambiente e, em seguida, as imagens digitais foram obtidas em scanner com qualidade de 400 dpi para cálculo das concentrações experimentais (C_e) a partir das equações das retas das curvas analíticas construídas no parâmetro de linearidade.

3.11.3 Exatidão

Para avaliar a exatidão dos resultados de quantificação de ACYS obtidos a partir da intensidade de cor em μPAD em relação aos resultados do método oficial, foram realizados dois ensaios.

No primeiro ensaio, 8 μL de soluções de ACYS descritas na Tabela 4 foram adicionadas em colunas distintas nos μPAD , que foram deixados para secar à temperatura ambiente, seguindo-se a obtenção de imagens digitais com resolução de 400 dpi em scanner. Isso foi realizado em 5 replicatas. As mesmas soluções tiveram suas absorvâncias em 520 nm (A_{520}) medidas em triplicata em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, utilizando-se água destilada como branco. Buscava-se correlacionar os valores da componente G a partir de imagens dos μPAD com os valores de absorvância.

No segundo ensaio de exatidão, utilizaram-se as curvas analíticas obtidas no parâmetro de linearidade (subitem 3.11.1) para obter as C_e de soluções de ACYS do extrato de uva de concentrações 64; 84 e 114 mg L⁻¹ e de soluções de ACYS do extrato de jabuticaba de concentrações 202; 247 e 336 mg L⁻¹, a partir das equações das retas geradas para os ensaios de linearidade com os dois extratos.

3.11.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinar o limite de detecção do método desenvolvido foram adicionados 8 µL de soluções de ACYS do extrato de uva e jabuticaba de concentrações 60; 30; 15; 7,5 e 3,7 mg L⁻¹ preparadas diretamente em pH 1. Em seguida, deixaram-se a temperatura ambiente e, por detecção visual dos µPAD e de imagens digitais dos mesmos, avaliaram-se as cores resultantes nas zonas reacionais, que foi inspecionada por 4 voluntários, membros do GPQUAE. O limite de quantificação foi determinado pelas curvas analíticas construídas no parâmetro de linearidade.

Capítulo 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação dos μ PAD impregnados com reagentes

Para avaliar as fibras do papel cromatográfico utilizado para confeccionar os μ PAD após adição de solução de pH 1 e de soluções de ACYS, foram obtidas imagens por MEV do papel, do papel impregnado com solução de pH 1 e do papel impregnado com solução de pH 1 e soluções de ACYS de uva e jabuticaba de concentrações 60 e 260 mg L⁻¹, nesta ordem.

A Figura 15 traz a morfologia do papel cromatográfico Whatman nº 1, sendo que as áreas mais escuras evidenciam poros circulares profundos presentes na estrutura fibrosa superficial. Ele foi selecionado para a confecção dos μ PAD devido a seu alto grau de porosidade com diâmetro de 15 μ m e uniformidade de distribuição e tamanho das fibras, além da resistência às soluções utilizadas. Na imagem da superfície do papel impregnado com solução de pH 1 é possível notar que houve um ligeiro distanciamento das fibras, indicado pelo aparecimento de mais áreas escuras relacionadas com os poros existentes sob a estrutura fibrosa superficial, sem terem sido notados indícios de rompimento. Imagens morfológicas do papel obtidas pela adição de soluções de ACYS de uva e jabuticaba nos μ PAD previamente impregnados com solução de pH 1 foram similares à imagem da superfície do papel contendo apenas solução de pH 1.

Estes resultados sugerem que a estrutura fibrosa do papel cromatográfico Whatman nº 1 não sofreu rompimento após adição de solução de pH 1 e de soluções de ACYS, o que indica sua utilização como suporte reacional para confecção dos μ PAD visando quantificação de ACYS.

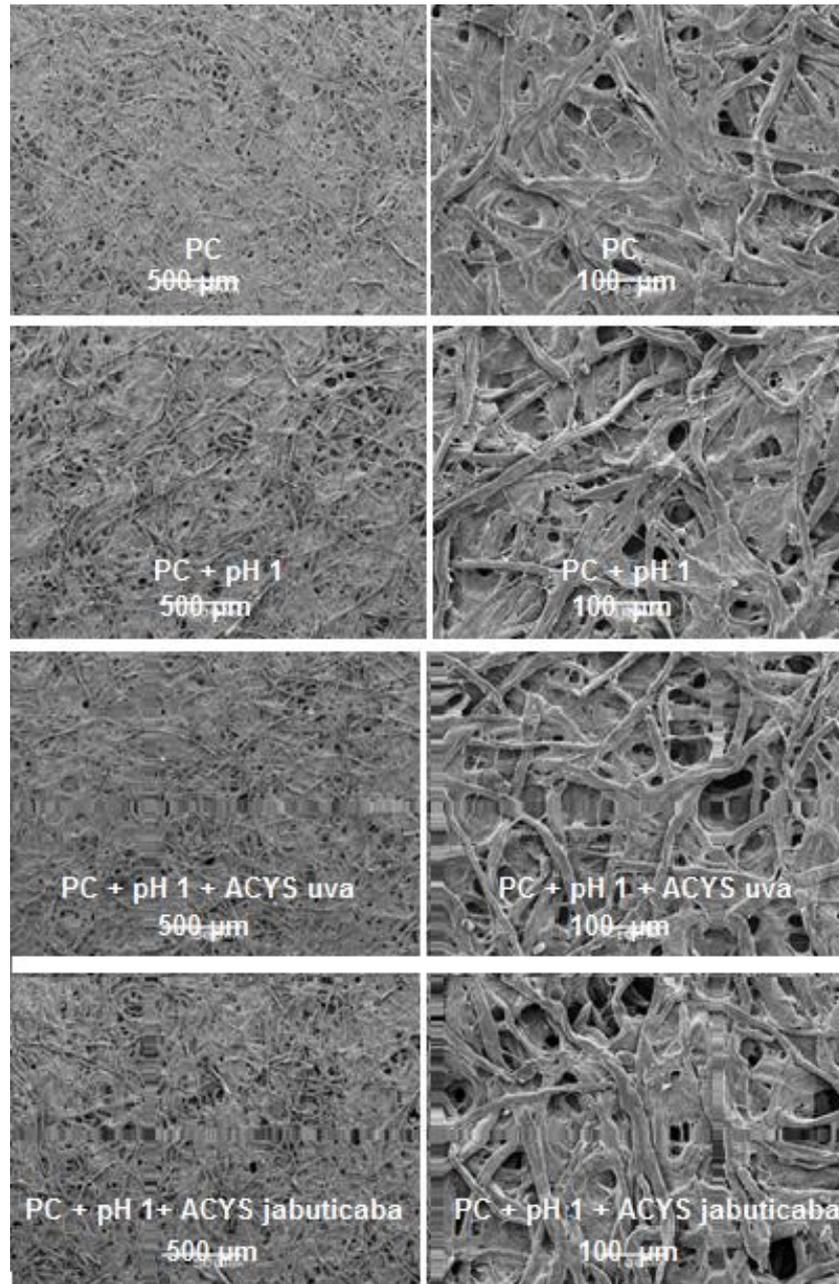


Figura 15: Imagens obtidas por MEV do papel cromatográfico Whatman nº 1 e do papel cromatográfico impregnado com solução de pH 1 e com soluções de ACYS de uva (60 mg L^{-1}) e jabuticaba (260 mg L^{-1}). Condições: cobertura de ouro, feixe de elétrons de 10 keV e formação de imagens por elétrons secundários (SEI) com ampliação de 50 e 200 vezes.

4.2 Quantificação dos extratos

De acordo com os espectros eletrônicos apresentado na Figura 16, soluções de ACYS preparadas em pH 1 a partir de dissolução do extrato seco de uva e jabuticaba têm absorção intensa entre 450 e 550 nm, como indicado por Harbone (1967). Os valores de absorbância obtidos em 520 nm, como indica o

método oficial, foram 0,989 e 0,409 para jabuticaba e uva, respectivamente utilizando cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

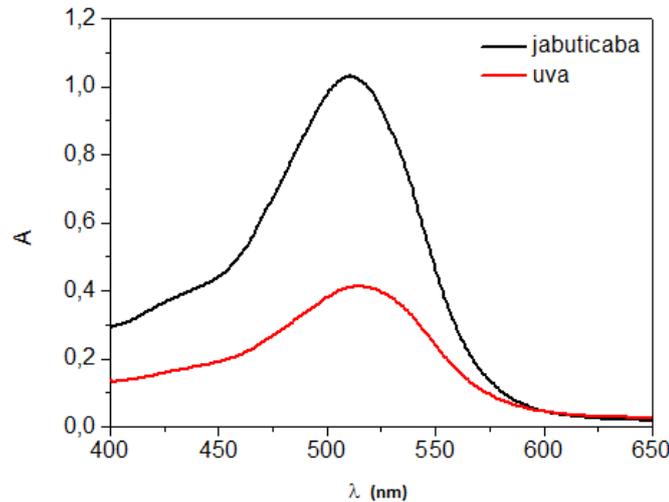


Figura 16: Espectros eletrônicos de soluções de ACYS de uva (83 mg L⁻¹) e jabuticaba (216 mg L⁻¹) em pH 1, utilizando água destilada como branco.

O teor de ACYS em frutas é influenciado por variáveis tais como clima, tipo de solo e grau de amadurecimento, além disso a concentração pode ser afetada pelo processo de extração utilizado para o corante. Na literatura, existem vários estudos de ACYS em frutas (MALACRIDA e MOTTA, 2006; PRIOR et al, 1998; TERCI, 2004), sendo geralmente empregados solventes polares como metanol, etanol ou água para extração. Apesar da composição dos extratos, o método oficial para quantificar ACYS utiliza como padrão a cianidina-3-glicosídeo, que é a mais comum em frutas roxas.

A Equação 1 foi empregada no cálculo da concentração de ACYS totais expressa em termos de cianidina-3-glicosídeo com medidas de absorbância em 520 e 700 nm realizadas em triplicata.

$$C_{\text{mg L}^{-1}} = \frac{A \times \text{MM} \times \text{DF} \times 10^3}{\epsilon \times b} \quad \text{Equação 1}$$

onde: C = concentração de ACYS em mg L⁻¹; A = (A_{520 nm} - A_{700 nm})_{pH 1} - (A_{520 nm} - A_{700 nm})_{pH 4,5}; MM = 449,2 g mol⁻¹ (massa molecular da cianidina-3-glicosídeo); DF = 15 (fator de diluição); ε = 26.900 L mol⁻¹ cm⁻¹ (absortividade molar da cianidina-3-glicosídeo em pH 1 aquoso); 10³ (fator de conversão de g para mg) e b = caminho óptico em cm.

A Tabela 5 traz as concentrações de ACYS dos extratos utilizados neste trabalho, obtidas pelo método oficial (LEE; DURST e WROLSTAD, 2005).

Tabela 5: Concentração de ACYS nos extratos secos.

Fruta	Concentração (mg L⁻¹)
uva	83 ± 2
jaboticaba	216 ± 3

4.3 Identificação de ACYS nos μ PAD

Buscou-se avaliar por observação visual as diferentes colorações exibidas pelas soluções de ACYS dos extratos de uva e jaboticaba com soluções de pH variando de 1 a 14 impregnadas nos μ PAD. Este foi um teste importante para garantir a especificidade e aplicabilidade do método desenvolvido para fins qualitativos.

Em diferentes valores de pH, μ PAD contendo soluções de ACYS assumiram colorações distintas, mas se verificou que as cores ficaram mais definidas aproximadamente 1 min após a aplicação nos μ PAD, provavelmente devido à melhor adsorção das soluções de ACYS nas fibras do papel, favorecendo a interação com a solução de pH para formar as diferentes estruturas de ACYS responsáveis pelo aparecimento das cores distintas nos μ PAD.

Neste teste, foi possível constatar visualmente que o perfil de cores de ACYS dos extratos de uva e jaboticaba são similares, com ligeiras diferenças no intervalo de pH de 7 a 10, conforme pode ser observado na Figura 17. Estas diferenças são fundamentadas por vários trabalhos, demonstrando que a variação de cor depende da quantidade e do tipo de ACYS presentes em cada fruta (LOPES et al, 2012; FAVARO, 2008).

IDENTIFICAÇÃO																	
ACYS uva 92 mg L ⁻¹							ACYS jabuticaba 204 mg L ⁻¹										
pH							pH	R	pH							pH	R
1							8		1							8	
2							9		2							9	
3							10		3							10	
4							11		4							11	
5							12		5							12	
6							13		6							13	
7							14		7							14	

Figura 17: μ PAD usado para avaliar a especificidade do método para confirmar a presença de ACYS. O ensaio foi realizado com solução de ACYS 92 mg L⁻¹ do extrato de uva e 204 mg L⁻¹ do extrato de jabuticaba. As linhas correspondem as soluções de pH de 1 a 14, as colunas correspondem as soluções de ACYS e R indica o teste de reversibilidade.

Os ensaios de reversibilidade dos equilíbrios químicos envolvidos nas reações de ACYS com HCl e NaOH 2 mol L⁻¹ trouxeram informações importantes que corroboram para sua identificação nos μ PAD. Este ensaio foi realizado em uma coluna distinta dos mesmos dispositivos microfluídicos utilizados no teste de identificação. Quando solução de ACYS era adicionada nas zonas reacionais impregnadas com solução de HCl, adquiriram tonalidades que variavam entre rosa e vermelho. Após adição da solução de NaOH nessa mesma zona reacional então contendo também solução de ACYS em meio ácido, observava-se uma alteração de cor até verde. Neste ponto, a adição de HCl novamente fazia com que a coloração retornasse para o vermelho inicial; isso se repetia nos 3 ciclos de adições testados. Esta propriedade foi observada para os dois extratos de ACYS e serviram para confirmar a presença e a sensibilidade do pigmento sob efeito de pH.

4.4 Quantificação de ACYS nos μ PAD com análise digital de imagens

Os resultados apresentados a seguir referem-se aos procedimentos experimentais visando encontrar melhores condições para quantificar ACYS empregando o programa GIMP 2.8 para converter as intensidades de cor no sistema RGB e avaliando as imagens pela variação da resolução de digitalização.

4.4.1 Avaliação das componentes do sistema RGB

No scanner, a intensidade de radiação incidente no papel é constante e controlada pela fonte de iluminação do equipamento em relação ao tablet e smartphone testados. A intensidade de radiação refletida é variável, considerando-se que espaços em branco refletem mais luz do que áreas escuras e/ou coloridas. Sendo assim, uma mancha de solução de ACYS diluída adicionada no μ PAD é menos colorida e, ao ser digitalizada, gera valores mais próximos de 255 (branco) no sistema RGB. Por outro lado, uma solução mais concentrada forma uma mancha mais colorida e gera valores mais baixos. Como há relação inversamente proporcional dos valores dessas componentes com a concentração de ACYS, este procedimento simples de digitalização das imagens fundamentou a proposta de quantificar ACYS com o uso de dispositivos remotos para aquisição de imagens digitais e um programa livre de tratamento de imagem para obter dados numéricos no sistema RGB, como alternativa ao método espectrofotométrico.

As intensidades de cores no sistema RGB (I_x , onde $x = R, G$ ou B) obtidas com soluções de ACYS do extrato de jabuticaba nos μ PAD forneceram valores mais baixos em comparação com o extrato de uva. Isso está relacionado com o teor de ACYS que é mais elevado na jabuticaba, corroborando com os resultados de quantificação de ACYS desses extratos pelo método oficial (subitem 4.2), ou seja, soluções de ACYS mais concentradas formam manchas avermelhadas intensas nas zonas reacionais dos μ PAD impregnados com solução de pH 1, correspondendo a valores mais baixos para a componente G, que é cor complementar. A Figura 18 ilustra os dados dessas relações que são diretamente proporcionais aos valores de $-I_x$. Portanto, relacionando $-G$ com a concentração de ACYS (C) obtém-se relação diretamente proporcional. Para as componentes R e B os valores variam muito pouco e são próximos de 255, sendo inadequado utilizá-las em relações quantitativas com C .

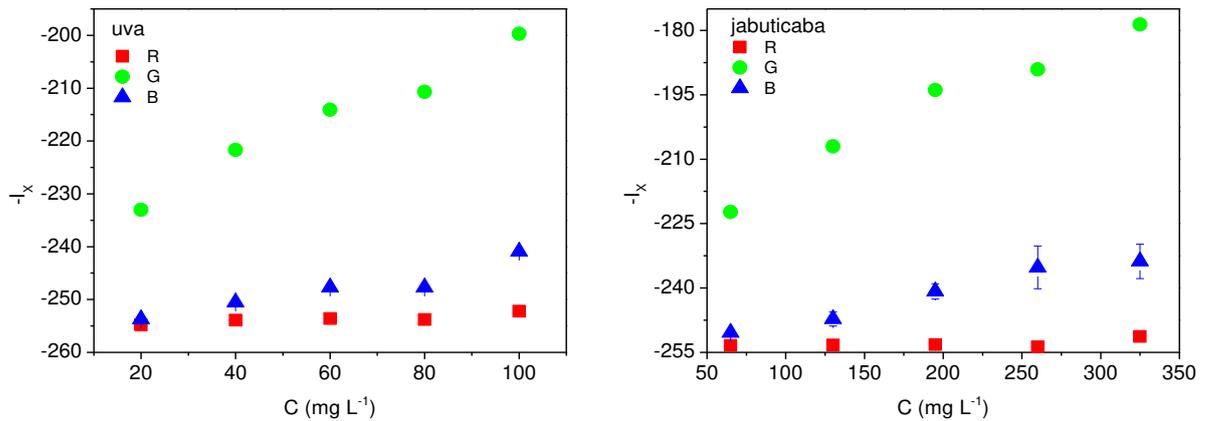


Figura 18: Relação entre $-\log(x)$, com a concentração de ACYS em mg L^{-1} : (a) soluções de ACYS (20 a 100 mg L^{-1}) do extrato de uva e (b) soluções de ACYS (65 a 325 mg L^{-1}) do extrato de jaboticaba. Procedimentos com 5 replicatas. $x = R, G$ ou B .

Avaliando cada componente individualmente, verificou-se que há proporcionalidade das intensidades de cor com a concentração de ACYS dos dois extratos de frutas. No entanto, os resultados obtidos para a componente G foram mais correlacionados com coeficiente de determinação (r^2) iguais a 0,9846 e 0,9445 para soluções de ACYS de jaboticaba e uva, respectivamente. Isto sugeriu a escolha da componente G para cálculos de concentração de ACYS a partir de imagens digitais de μPAD . Portanto, as intensidades de cor para as análises de imagens dos μPAD visando a quantificação de ACYS foram referentes a esta componente.

4.4.2 Aquisição das imagens digitais

Era importante escolher a resolução para obtenção das imagens dos μPAD pelo scanner na faixa de trabalho do equipamento (50 a 19.200 dpi), pois isso poderia afetar os resultados obtidos. Para isso, foram avaliadas imagens digitais obtidas com 200; 400; 600 e 800 dpi.

A escolha de 200 dpi como qualidade mínima foi indicada como padrão pelo programa de operação do equipamento e gerava arquivos de 0,4 MB em 20 s. Arquivos com 600 dpi eram obtidos em 53 s e tinham em média 4 MB. Já com 800 dpi, os arquivos gerados superavam 7 MB para serem adquiridos. Considerando que medidas espectrofotométricas são rápidas, considerou-se pouco adequado a velocidade de obtenção de imagens com 800 dpi que leva cerca de 2 min

e buscou-se comparar valores de intensidades de cor obtidos pela componente G a partir de imagens adquiridas com 200,400 e 600 dpi.

A Figura 19 traz imagens de μ PAD com soluções de ACYS de concentrações entre 20 a 100 mg L⁻¹ do extrato de uva e 65 a 325 mg L⁻¹ do extrato de jabuticaba com diferentes resoluções. Notam-se visualmente diferenças nas imagens obtidas com 200 dpi em relação às imagens com 400 e 600 dpi.

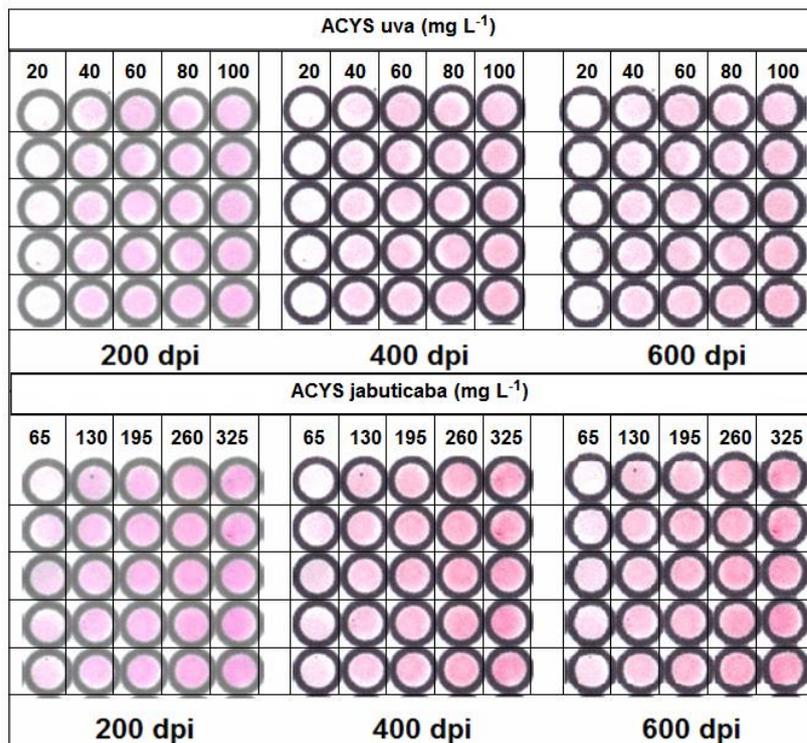


Figura 19: Imagens digitais dos μ PAD impregnados com solução de pH 1 e soluções de ACYS dos extratos de uva (20 a 100 mg L⁻¹) e jabuticaba (65 a 325 mg L⁻¹) adquiridas com 200, 400 e 600 dpi.

Para avaliar se existiram diferenças significativas nos valores da componente G obtidos pela digitalização de imagens com 200 e 400 dpi e com 200 e 600 dpi, foi aplicado o teste t para diferença nas médias, a partir do cálculo de t pela Equação 2 (SKOOG et al, 2006).

$$t = \frac{\bar{G}_j - \bar{G}_n}{s_{\text{comb}} \sqrt{\frac{n_j + n_l}{n_j \times n_l}}} \quad \text{Equação 2}$$

onde: t = valor para o teste t; \bar{G} = média dos valores da componente G; s_{comb} = desvio padrão combinado; n = número de replicatas; j para dados obtidos com 200 dpi e l para dados obtidos com 400 ou 600 dpi.

Os resultados encontrados mostraram que todos os valores de $t_{\text{calculado}}$ são menores que o valor de $t_{\text{crítico}} = 2,780$ como aparece nas Tabelas 6 e 7. Portanto, não há diferença significativa para um nível de confiança de 95 % e as três resoluções forneceram resultados estatisticamente iguais.

Tabela 6: Comparação de médias de G de soluções de ACYS de extratos de uva e jabuticaba, a partir de 5 replicatas de imagens obtidas com resolução de 200 e 400 dpi aplicando-se teste t com 95 % de confiança.

Fruta	Concentração (mg L ⁻¹)	Resolução 200 dpi		Resolução 400 dpi		Teste t (NC = 95 %)		
		G ₁	s ²	G ₂	s ²	S _{comb}	t _{calculado}	t _{crítico}
uva	20	249,8	0,04	250,0	0,03	0,2	1,758	2,780
	40	228	1	226	1	4	0,588	
	60	210	0,3	213	1	2	2,456	
	80	205	1	212	1	4	2,344	
	100	196	0,9	195,9	0,09	4	0,224	
jabuticaba	65	230	1	223	0,8	4	2,700	
	130	203	0,7	203,2	0,08	3	0,117	
	195	195	0,6	196	0,3	3	0,302	
	230	188	0,3	184	0,5	1	0,004	
	325	180	2	167	2	9	2,451	

Tabela 7: Comparação de médias de G de soluções de ACYS de extratos de uva e jabuticaba, a partir de 5 replicatas de imagens obtidas com resolução de 200 e 600 dpi aplicando-se teste t com 95 % de confiança.

Fruta	Concentração (mg L ⁻¹)	Resolução 200 dpi		Resolução 600 dpi		Teste T (NC = 95 %)		
		G ₁	s ²	G ₃	s ²	S _{comb}	t _{calculado}	t _{crítico}
uva	20	250	0,5	251	0,1	0,2	1,140	2,780
	40	228	0,7	223	0,4	3	2,758	
	60	210	0,4	213	0,9	2	2,531	
	80	205	0,5	207	0,1	2	1,612	
	100	196	0,2	195	0,1	0,9	2,421	
jabuticaba	65	230	0,8	224	0,8	4	2,706	
	130	203	0,7	203	0,2	3	0,057	
	195	195	0,6	192	0,3	3	2,045	
	230	188	1	180	0,8	4	2,752	
	325	180	3	161	3	12	2,483	

Os arquivos de imagens gerados com 400 dpi (1,8 MB) são maiores que os arquivos gerados com 200 dpi (0,4 MB), mas são menores que os arquivos com 600 dpi (4 MB). Por outro lado, com 400 dpi é possível notar diferenças visuais nos μ PAD, que não foram detectadas nas imagens com 200 dpi. Considerando-se que o aumento no tamanho do arquivo gerado não é crítico com rápido processamento para obtenção das imagens, optou-se por essa resolução para o prosseguimento dos trabalhos, já que é a mínima que possibilita a avaliação visual dos μ PAD em abordagem qualitativa, sem comprometer qualidade de resultados quantitativos nem o tempo de aquisição de dados.

4.5 Estabilidade de μ PAD e formas de obtenção de imagens

Na avaliação das intensidades de cor em imagens digitais de μ PAD obtidas com scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone, foi possível notar diferenças nos valores da componente G. As qualidades das imagens digitais obtidas com câmeras de tablet e smartphone foram inferiores às imagens adquiridas com scanner. Isso é justificado pela resolução dos dispositivos de captura de imagem e, principalmente, pela incidência de luz externa, no caso das câmeras de tablet e smartphone.

No scanner, a digitalização é realizada a partir de imagem gerada pela própria fonte de luz do equipamento, que varre o objeto a ter a imagem digitalizada de forma linear, com medida da quantidade de luz refletida em cada ponto. Por outro lado, a captura de imagens digitais com câmeras de tablet e smartphone foi feita à 15 cm de distância dos μ PAD, sofrendo influência de iluminação externa, o que geraram valores mais baixos para a componente G, conforme ilustram as Figuras 20 a 22 com dados obtidos nas 3 condições de armazenamento: temperatura ambiente e protegidos da luz, temperatura ambiente e expostos à luz de ambiente interno e temperatura de 5 °C e protegidos da luz. Portanto, o scanner forneceu imagens mais adequadas para avaliação das intensidades de cor em relação às imagens obtidas com câmeras do tablet e do smartphone utilizados.

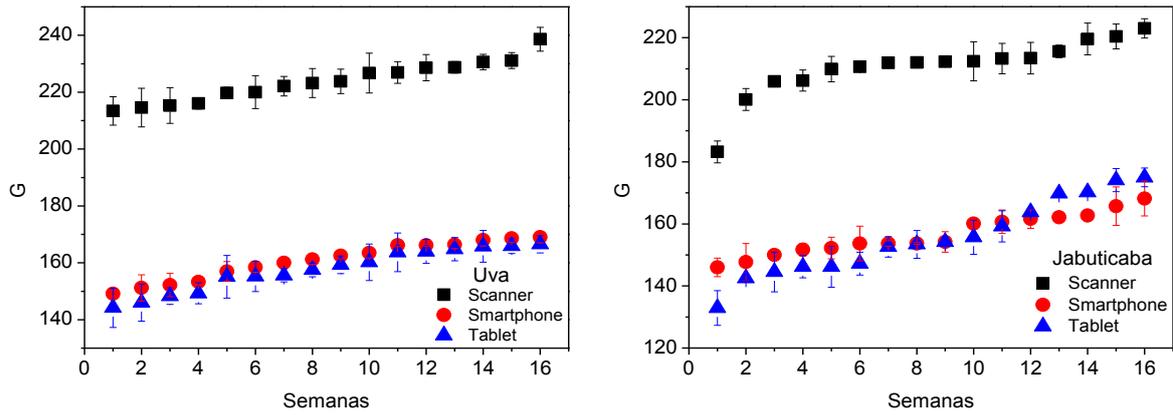


Figura 20: Relação entre intensidades de cor da componente G de imagens de μ PAD impregnados com solução de pH 1 e soluções de ACYS de uva (60 mg L^{-1}) e jaboticaba (195 mg L^{-1}) durante 4 meses. Imagens obtidas com scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone. Experimento com 5 replicatas e μ PAD mantidos à temperatura ambiente e protegidos da luz.

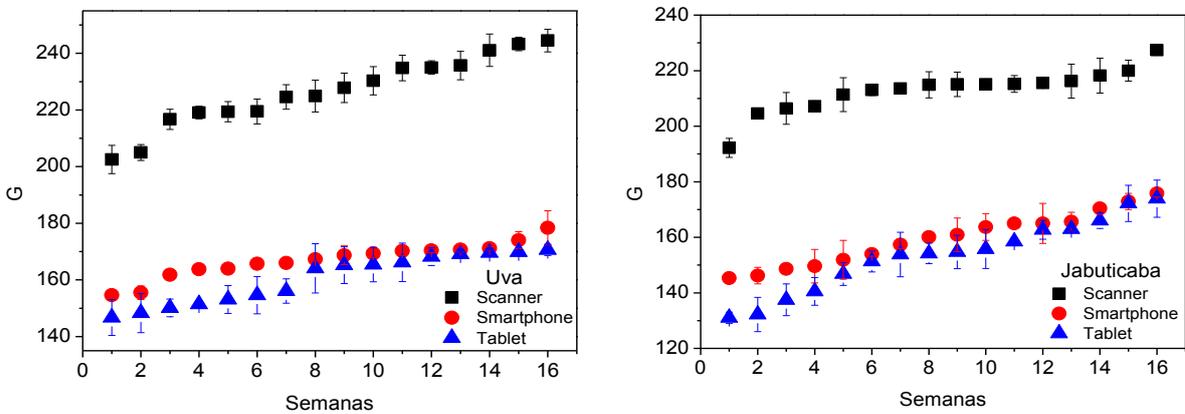


Figura 21: Relação entre intensidades de cor da componente G de imagens de μ PAD impregnados com solução de pH 1 e soluções de ACYS de uva (60 mg L^{-1}) e jaboticaba (195 mg L^{-1}) durante 4 meses. Imagens obtidas com scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone. Experimento com 5 replicatas e μ PAD mantidos à temperatura ambiente e expostos à luz de ambiente interno.

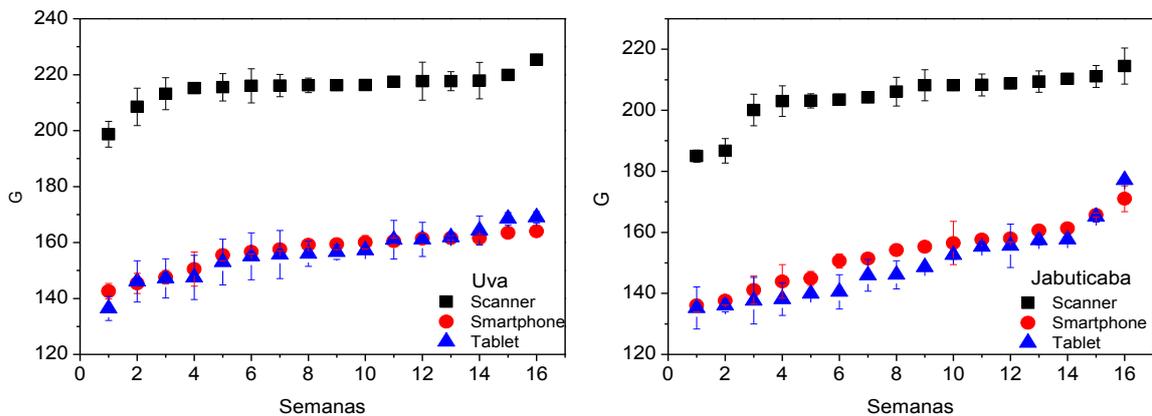


Figura 22: Relação entre intensidades de cor da componente G de imagens de μ PAD impregnados com solução de pH 1 e soluções de ACYS de uva (60 mg L^{-1}) e jaboticaba (195 mg L^{-1}) durante 4 meses. Imagens obtidas com scanner de mesa e câmeras de tablet e smartphone. Experimento com 5 replicatas e μ PAD mantidos à temperatura de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ e protegidos da luz.

As diferentes condições de armazenamento dos μ PAD não mostraram influência visualmente detectável nas intensidades de cor. No entanto, ao longo do período de monitoramento, os valores da componente G aumentaram discretamente. Esses resultados indicam que, no período de 4 meses, houve ligeiro comprometimento dos μ PAD impregnados com solução de pH 1 devido à redução da tonalidade das manchas nas zonas reacionais dos dispositivos, que após conversão em dados da componente G, geraram valores mais altos.

4.6 Avaliação de desempenho do método

Os resultados a seguir referem-se à avaliação de alguns parâmetros por meio de testes laboratoriais visando a validação do método desenvolvido no presente trabalho para quantificação de ACYS em μ PAD a partir de tratamento de imagem digital com determinação de intensidades de cor por meio de dados gerados pela componente G do sistema RGB. Todas as imagens digitais obtidas para cada parâmetro foram adquiridas empregando scanner de mesa com qualidade de 400 dpi. O método foi validado com análise dos parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação de acordo com a resolução 899 de 2003 para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA e com a Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos de 2010 do INMETRO.

4.6.1 Linearidade

As intensidades de cor geradas pela componente G variaram linearmente com C na faixa estudada para extratos de uva (61 a 121 mg L⁻¹) e jabuticaba (179 a 358 mg L⁻¹) com desvio padrão relativo (DPR) para todas as medidas inferiores a 1 %. A Tabela 8 contém informações sobre a curva analítica construída e de outros parâmetros estatísticos.

Tabela 8: Informações da curva analítica e parâmetros estatísticos obtidos a partir de dados da componente G de imagens com 400 dpi de μ PAD com soluções de ACYS de uva (61 a 121 mg L⁻¹) e jabuticaba (179 a 358 mg L⁻¹) em 5 replicatas.

	ACYS uva (mg L ⁻¹)					ACYS jabuticaba (mg L ⁻¹)				
	61	76	91	106	121	179	224	269	313	358
G	228	222	212	208	199	183	172	165	154	148
desvio padrão	0,6	0,7	0,7	1	0,6	1	1	1	1	0,9
variância	0,4	0,5	0,4	2	0,4	2	2	2	1	0,8
DPR (%)*	0,3	0,3	0,3	0,7	0,3	0,7	0,7	0,9	0,8	0,6

*desvio padrão relativo.

O teor de ACYS é mais elevado em soluções mais coloridas. Somente por inspeção visual dos μ PAD é possível verificar que soluções de ACYS do extrato de jabuticaba têm maior quantidade de pigmento antociânico devido à formação de manchas avermelhadas mais intensas nas zonas reacionais, as quais, após tratamento computacional da imagem, geram valores mais baixos para a componente G, por essa razão associada em valor negativo para gerar relações crescentes com a concentração. A Figura 23 mostra as imagens digitais de μ PAD usadas para avaliação da linearidade. Neste estudo, os valores de r^2 encontrados foram 0,9899 e 0,9892 para soluções de ACYS dos extratos de uva e jabuticaba, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 24.

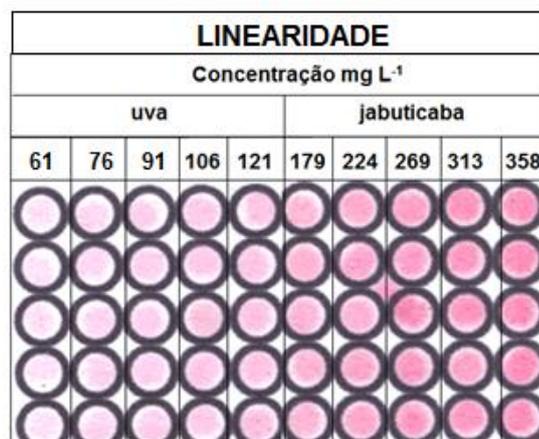


Figura 23: Imagens digitais dos μ PAD obtidas com qualidade de 400 dpi utilizada no ensaio de avaliação da linearidade.

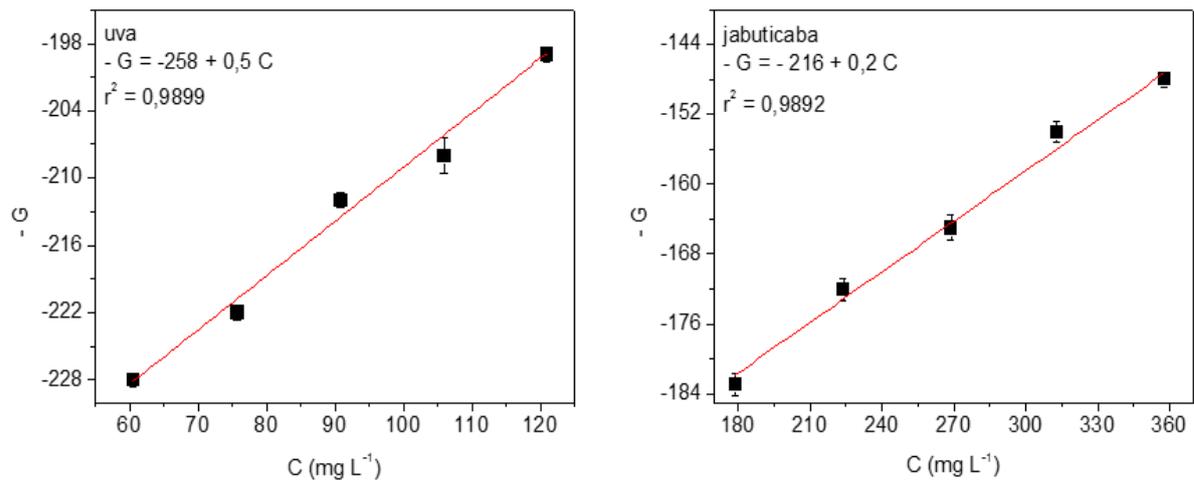


Figura 24: Relação entre valores de $-G$ obtidas de imagens digitais com qualidade de 400 dpi do método de μ PAD e C em mg L⁻¹ de soluções de ACYS de uva (61 a 121 mg L⁻¹) e jaboticaba (179 a 358 mg L⁻¹) realizadas em 5 replicatas.

Optou-se pela comparação dos valores de C_e obtidos a partir da componente G pelas Equações 4 e 5 (subitem 4.6.2) com os valores de concentrações de referência (C_{ref}) obtidos pelo método oficial para avaliar a sensibilidade do método de μ PAD. A Figura 25 mostra essas relações indicando que os dois métodos apresentam sensibilidades analíticas similares na faixa de trabalho estudada para soluções de ACYS dos extratos de uva (61 a 121 mg L⁻¹) e jaboticaba (179 a 358 mg L⁻¹), já que os valores obtidos para as inclinações das retas foram 0,97 para os conjuntos de dados.

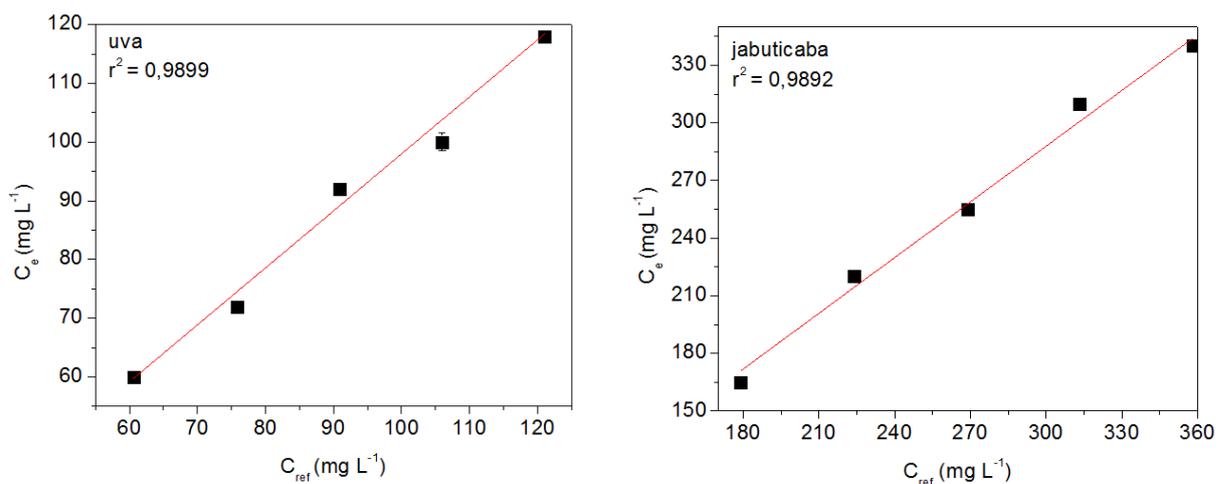


Figura 25: Relação entre C_e e C_{ref} (mg L⁻¹) de soluções de ACYS de uva (61 a 121 mg L⁻¹) e jaboticaba (179 a 358 mg L⁻¹). Procedimento com 5 replicatas.

4.6.2 Precisão

As C_e foram calculadas pelas equações das retas das curvas analíticas obtidas no parâmetro de linearidade para os dois extratos (Equações 3 e 4).

$$G_{uva} = - 258 + 0,5 \times C_e \quad \text{Equação 3}$$

$$G_{jaboticaba} = - 216 + 0,2 \times C_e \quad \text{Equação 4}$$

onde: G = média de cinco valores determinados para a componente G e C_e = concentração experimental em mg L^{-1} .

Há concordância dos valores de C_e de soluções de ACYS dos extratos de uva e jaboticaba obtidos com medidas realizadas no mesmo dia com intervalo de três horas cada (repetibilidade). A Figura 26 traz a imagem dos μPAD obtida com 400 dpi utilizada na avaliação da precisão.

REPETIBILIDADE																	
uva concentração mg L^{-1}									jaboticaba concentração mg L^{-1}								
intervalo 1			intervalo 2			intervalo 3			intervalo 1			intervalo 2			intervalo 3		
61	91	121	61	91	121	61	91	121	179	269	358	179	269	358	179	269	358

Figura 26: Imagens digitais dos μPAD obtidas com qualidade de 400 dpi utilizada no ensaio de avaliação da precisão.

Não foi encontrado na literatura estudo colorimétrico de ACYS em μPAD associado com tratamento de imagem digital. As Tabelas 9 e 10 mostram que o DPR para todos os conjuntos de medidas deste trabalho foi menor que 4 %. Estes resultados indicam que o método desenvolvido é preciso e está de acordo com os critérios de aceitação definidos pela resolução 899 de 2003 da ANVISA que não admite DPR maiores que 5%.

Tabela 9: Avaliação da precisão das concentrações médias calculadas com dados da componente G de imagens em 400 dpi de μ PAD com soluções de ACYS de uva (61 a 121 mg L⁻¹) em pH 1 com intervalos de 3 horas em 5 replicatas.

Precisão	Solução ACYS de uva (mg L ⁻¹)								
	Intervalo 1			Intervalo 2			Intervalo 3		
	64	84	114	64	84	114	64	84	114
C_e	67	88	112	67	85	110	65	85	113
desvio padrão	2	2	4	2	1	0,9	2	3	2
variância	5	3	14	5	2	0,8	3	7	3
DPR*	3	2	3	3	2	0,8	3	3	1

*desvio padrão relativo.

Tabela 10: Avaliação da precisão das concentrações médias calculadas com dados da componente G de imagens em 400 dpi de μ PAD com soluções de ACYS de jabuticaba (179 a 358 mg L⁻¹) em pH 1 com intervalos de 3 horas em 5 replicatas.

Precisão	Solução ACYS de jabuticaba (mg L ⁻¹)								
	Intervalo 1			Intervalo 2			Intervalo 3		
	202	247	336	202	247	336	202	247	336
C_e	177	243	332	172	243	331	205	247	335
desvio padrão	1	3	4	5	4	3	2	3	2
variância	2	8	15	28	17	6	4	10	6
DPR*	0,8	1	1	3	2	0,7	1	1	0,7

*desvio padrão relativo.

4.6.3 Exatidão

Buscou-se encontrar correlações de dados do método desenvolvido com medidas espectrofotométricas, tendo sido escolhidos valores de G correspondentes a três concentrações distintas de cada extrato dentro da faixa de trabalho (69, 84 e 114 mg L⁻¹ para o extrato de uva e 202, 247 e 336 mg L⁻¹ para o extrato de jabuticaba). Em seguida, encontrou-se a correlação desses valores (G_{uva} e $G_{jabuticaba}$) com A_{520} das respectivas soluções, indicados pelas Equações 5 e 6.

$$G_{uva} = - 253 + 112 A_{520} \quad \text{Equação 5}$$

$$G_{jabuticaba} = - 218 + 55 A_{520} \quad \text{Equação 6}$$

onde: G é média de 5 valores da componente G e A_{520} é média de 3 leituras de absorvância medida em 520 nm.

Após o cálculo de A_{520} , as concentrações das soluções foram recalculadas pela Equação 1.

A exatidão (E) foi avaliada pela tendência entre C_e obtidas pelo método desenvolvido e C_{ref} obtida pelo método oficial, indicada na Equação 7. Valores de E mais próximos de 100 % indicam maior exatidão do método desenvolvido (μ PAD) em relação ao método oficial.

$$E (\%) = \frac{C_e}{C_{ref}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

onde: E = exatidão; C_e = concentração experimental em mg L^{-1} e C_{ref} = concentração de referência em mg L^{-1} .

De acordo com a resolução 899 de 2003 da ANVISA, a tendência que avalia a exatidão deve estar inserida no intervalo de $100 \% \pm 2 \%$ para cada concentração. No ensaio 1, buscava-se verificar a adequação de um procedimento mais simples, comparando-se valores individuais, e, como era esperado, a exatidão foi comprometida para todas as soluções de ACYS de jabuticaba e uma solução de ACYS de uva, conforme indicam os resultados da Tabela 11, que ficaram abaixo do intervalo recomendável pela ANVISA.

Tabela 11: Parâmetros estatísticos do primeiro ensaio de exatidão com resultados gerados pela componente G de 5 replicatas de imagens de μ PAD em 400 dpi de soluções de ACYS de extrato de uva (61 a 121 mg L^{-1}) e jabuticaba (179 a 358 mg L^{-1}) em pH 1 e triplicatas de medidas espectrofotométricas em 520 nm dessas soluções.

Ensaio 1									
Solução ACYS uva					Solução ACYS jabuticaba				
-G	A_{520}	C_e (mg L^{-1})	C_{ref} (mg L^{-1})	E (%)	-G	A_{520}	C_e (mg L^{-1})	C_{ref} (mg L^{-1})	E (%)
-225	0,3	62	69	91	-175	0,8	196	202	97
-216	0,3	83	84	99	-167	0,9	232	247	94
-202	0,5	114	114	100	-149	1	314	336	94

No ensaio 2, a concentração experimental foi obtida a partir de curvas analíticas para os dois extratos e a tendência da maior parte dos resultados obtidos pelo método desenvolvido atende o intervalo recomendável pela ANVISA para todas

as concentrações avaliadas dos dois extratos, exceto uma solução de ACYS do extrato de uva de concentração 69 mg L⁻¹, conforme indicado na Tabela 12.

Tabela 12: Parâmetros estatísticos do segundo ensaio de exatidão com resultados gerados pela componente G de 5 replicatas de imagens de μ PAD em 400 dpi de soluções de ACYS de extrato de uva (61 a 121 mg L⁻¹) e jabuticaba (179 a 358 mg L⁻¹) em pH 1.

Ensaio 2					
Solução ACYS uva			Solução ACYS jabuticaba		
C _e (mg L ⁻¹)	C _{ref} (mg L ⁻¹)	E (%)	C _e (mg L ⁻¹)	C _{ref} (mg L ⁻¹)	E (%)
67	69	97	205	202	101
85	84	101	247	247	100
113	114	99	335	336	100

Estes resultados apontam a adequação do uso da componente G para estabelecer proposta de quantificação de ACYS a partir de conversão digital de imagens de μ PAD, dispensando equipamentos de laboratório para obter concentrações de ACYS em amostras de frutas.

4.6.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Após análise visual das intensidades de cor resultantes da reação entre ACYS de uva e jabuticaba com solução de pH 1 nos μ PAD e das imagens digitais dos mesmos, realizadas por 4 analistas, o limite de detecção determinado foi 30 mg L⁻¹, pois foi a menor concentração que foi possível ser percebida a olho nu. A Figura 27 traz imagens digitais dos μ PAD obtidas com 400 dpi para avaliação do limite de detecção de soluções de ACYS dos dois extratos de frutas.

Para determinação do limite de quantificação, foram usadas as curvas analíticas construídas no parâmetro de linearidade e aplicada a Equação 8.

$$LQ = \frac{10 \times DP}{I} \quad \text{Equação 8}$$

onde: LQ = limite de quantificação; DP = desvio padrão do intercepto com o eixo Y e I = inclinação da curva de calibração.

LIMITE DE DETECÇÃO									
uva concentração mg L ⁻¹					jaboticaba concentração mg L ⁻¹				
60	30	15	7,5	3,8	60	30	15	7,5	3,8

Figura 27: Imagens digitais dos μ PAD obtidas com qualidade de 400 dpi utilizada no ensaio de avaliação da exatidão.

Os limites de quantificação definidos em imagens de μ PAD obtidas com 400 dpi para solução de ACYS de uva e jaboticaba na faixa de concentração de trabalho e nas condições experimentais foram 46 e 154 mg L⁻¹, respectivamente.

Capítulo 5: CONCLUSÕES

A integridade do papel utilizado na confecção dos μ PAD, indicada pelas imagens obtidas por MEV, apontaram que o papel cromatográfico Whatman nº 1 é adequado para a fabricação desses dispositivos, pois a adição dos reagentes não levou à degradação nem à ruptura das fibras, apesar do ligeiro distanciamento observado após adição de soluções de pH 1 e de ACYS dos extratos de uva e jabuticaba. Isto demonstra que esses μ PAD podem ser utilizados como suporte reacional visando quantificação de ACYS.

Os ensaios de identificação de ACYS nos μ PAD com soluções de pH variando de 1 a 14 e os ensaios de reversibilidade dos equilíbrios químicos envolvidos nas reações entre o pigmento com soluções de HCl e NaOH 2 mol L⁻¹ confirmaram a presença e a sensibilidade de ACYS ao efeito de alterações de pH. Estes resultados apontaram aplicabilidade da proposta com μ PAD para fins qualitativos.

As imagens digitais dos μ PAD foram convertidas em dados de intensidades de cor no sistema RGB empregando o programa GIMP 2.8, que é de uso livre e bastante difundido. Os valores negativos de intensidade de cor no sistema RGB são relacionadas com a concentração de ACYS e os resultados indicaram que a componente G é mais adequada para relações quantitativas porque teve variação linear mais sensível.

A melhor resolução para aquisição das imagens digitais dos μ PAD foi 400 dpi, pois permitiu notar diferenças visuais nos μ PAD, que não foram detectadas nas imagens de 200 dpi, além de gerar arquivos de 1,8 MB com tempo de aquisição da ordem do tempo para medidas espectrofotométricas.

O scanner forneceu imagens mais adequadas para avaliação das intensidades de cor em relação às imagens obtidas com as câmeras dos tablet e smartphone testados. Em relação às diferentes condições de armazenamento dos μ PAD, não foi notado efeito sobre as intensidades de cor, mas que, no decorrer de 4 meses que constituíram o período de monitoramento, tiveram discreta tendência de aumento nos valores da componente G.

Testes para avaliação de desempenho do método desenvolvido foram realizados a partir das imagens digitais obtidas em scanner dos μ PAD com 400 dpi.

Na avaliação da linearidade, notou-se que a componente G tem relação linear com a concentração de ACYS na faixa de estudo: extrato de uva (61 a 121 mg L⁻¹) e extrato de jabuticaba (179 a 358 mg L⁻¹). Na avaliação da repetibilidade, foram obtidos DPR inferiores a 4 %, o que está de acordo com os critérios de aceitação definidos pela ANVISA (DPR < 5%). Nos ensaios de exatidão, a tendência dos resultados obtidos pelo método desenvolvido atende a recomendação da ANVISA (100 ± 2 %). A menor concentração detectada a olho nu foi 30 mg L⁻¹, considerada como limite de detecção. Os valores dos limites de quantificação encontrados nas condições de trabalho foram 46 e 154 mg L⁻¹ de ACYS em extratos de uva e jabuticaba, respectivamente.

O conjunto de resultados obtidos indicou que μ PAD confeccionados utilizando impressora que usa cera sólida são aplicáveis para fins qualitativos e quantitativos de ACYS. Incluindo equipamentos de baixo custo como scanner de mesa, tablet e smartphone e tratamento matemático dos dados por um programa de uso livre, o procedimento pode ser considerado viável e acessível, dispensando medidas espectrofotométricas e com desempenho comparável.

Capítulo 6: PERSPECTIVAS

Os μ PAD estudados visando a identificação e quantificação de ACYS por detecção colorimétrica associados à análise de imagens digitais oferecem vantagens em relação aos métodos espectrofotométricos. Dentre elas, destacam-se baixo custo de produção dos μ PAD com rápido processo de confecção; utilização de computador, scanner de mesa; câmeras de tablet e smartphone para aquisição de imagens digitais e quantificação baseada na conversão de intensidades de cor em dados do sistema RGB empregando programa computacional de uso livre. Tudo isso mostrou-se adequado para a aplicação pretendida para os μ PAD.

A associação de μ PAD com colorimetria, onde é possível determinar intensidades de cor em medidas de reflectância empregando programa computacional torna-se uma ferramenta analítica promissora que pode representar alternativa vantajosa comparável a medidas espectrofotométricas, viabilizando a quantificação de espécies químicas com equipamentos mais baratos e disponíveis que, devido ao desenvolvimento da informática, computadores, tablets, scanners e smartphones, tornaram-se usuais em instituições de pesquisa e ensino como também em ambientes domésticos. Isto facilita a aplicação dos μ PAD em campo, em áreas de difícil acesso e em localidades com recursos limitados, além de representarem opção de comunicação rápida para transmissão digital de informações.

Este tipo de abordagem já motivou projetos de pesquisa de doutorado, mestrado, iniciação científica e iniciação científica do ensino médio (PIBIC-EM), com μ PAD e tratamento matemático de imagens, desenvolvidos por membros do GPQUAE em projetos que já foram finalizados e outros que estão em andamento.

A utilização de μ PAD para a reação colorimétrica entre ACYS e soluções de pH conhecido variando de 1 a 14 mostrou resultados promissores que serviram para confirmar a presença de ACYS em amostras de frutas utilizando volumes de reagentes na ordem de microlitros. Apesar da maior parte dos meios reacionais serem altamente ácido ($\text{pH} = 1$), não foi notado indícios de rompimento das fibras do papel, o que facilitou a realização da reação colorimétrica diretamente nos μ PAD.

Um grande desafio na utilização de μ PAD associado com detecção colorimétrica é o modo de adição de reagentes que vem sendo feito manualmente

utilizando micropipeta. Isso dificulta a dispersão homogênea da cor sobre a superfície da zona reacional, o que influencia diretamente na conversão de dados no sistema RGB das imagens digitalizadas dos μ PAD. Contudo, estas dificuldades podem ser superadas por algumas modificações no procedimento como a montagem de um suporte para micropipeta para uniformizar a distância entre os μ PAD e a micropipeta para que a adição de reagentes sempre aconteça na mesma proporção de afastamento, por exemplo.

Outro aspecto que pode vir a representar avanços futuros relaciona-se com o estudo de novos layouts de μ PAD para que seja possível determinar simultaneamente diversos corantes que podem ser encontrados em frutas com distinta sensibilidade à alterações de pH. Isso pode vir a contribuir para aumentar possibilidades de exploração econômica sustentável de fontes naturais de corantes devido à grande biodiversidade de plantas, flores e frutos presentes no Brasil.

Capítulo 7: TRATAMIENTO DE RESÍDUOS

Todos os resíduos gerados durante os trabalhos experimentais foram descartados e/ou tratados corretamente de acordo com as normas da Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP.

- I. Soluções ácidas e básicas sem íons tóxicos foram descartas na pia após neutralização.
- II. Soluções de ACYS de uva e jaboticaba preparadas em solução de pH 1 também tiveram descarte em pia após neutralização.

Capítulo 8: REFERÊNCIAS

ABE, K.; KOTERA, K.; SUZUKI, K.; CITTERIO, D. Inkjet-printed paperfluidic immunochemical sensing device. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 398, n. 2, p. 885-893, 2010.

ALVIM, T. R.; DE ANDRADE, J. C. A importância da química analítica qualitativa nos cursos de química das instituições de ensino superior brasileiras. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 168, 2006.

BECKER, H.; GÄRTNER, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 390, n. 1, p. 89-111, 2008.

CAMARGO, U. A; MAIA, J. D. G; RITSCHER, P. Embrapa uva e vinho: novas cultivares brasileiras de uva. Rio Grande do Sul, 2010. Disponível em: http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/livro/novas_cultivares_brasileiras_uva.pdf Acessado em 02/08/2016.

CARDOSO, T. M. G. Desenvolvimento de tecnologias alternativas para fabricação de dispositivos microfluídicos em papel. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 16, p. 7091-7095, 2009.

CASTRO, P. P. Spot test quantitativo para chumbo com análise de imagens, aplicado a solos. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

CAVALCANTI, R. N. Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

CHAGAS, A. P. O ensino de aspectos históricos e filosóficos da química e as teorias ácido-base do século XX. *Química Nova*, v. 23, n. 1, p. 126-133, 2000.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Unicamp, 2006.

COLLINS, C. H. O Desenvolvimento da Cromatografia em Papel. *Scientia Chromatographica*. v. 1, n. 4, p 7-10, 2009.

COSTA, M. Q. N. Desenvolvimento de microfluídica em papel para utilização em biossensores. Dissertação (mestrado). Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

DELANEY, J. L.; HOGAN, C. F.; TIAN, J.; SHEN, W. Electrogenated chemiluminescence detection in paper-based microfluidic sensors. *Analytical chemistry*. v. 83, n. 4, p. 1300-1306, 2011.

DEL VALLE LEGUIZAMÓN, G; LEÓN, A. G; SAÑUDO, Reginaldo Báez. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia Mexicana*, v. 28, n. 4, p. 359-368, 2005.

DORNELAS, K. L. Fabricação de dispositivos microfluídicos a base de papel utilizando materiais de baixo custo. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

FAVARO, M. M. A. Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação como corantes. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

GARCIA, P. T. Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos de papel com superfície quimicamente modificada para ensaios clínicos utilizando detecção colorimétrica. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

GONÇALVES, A. L. M. Design e fabrico de novos electrodos impressos em papel para desenvolvimento de biossensores enzimáticos com aplicações biomédicas. Dissertação (mestrado). Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014.

GOMES, M. S.; TREVIZAN, L. C.; NÓBREGA, J. A.; KAMOGAWA, M. Y. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento

didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. *Química Nova*. v. 31, n. 6, p. 1577-1581, 2008.

GUIMARÃES, W.; ALVES, M. I. R.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Antocianinas em extratos vegetais: aplicação em titulação ácido-base e identificação via cromatografia líquida/espectrometria de massas. *Química Nova*. v. 35, n. 8, p. 1673-1679, 2012.

HARBORNE, J. B. Comparative biochemistry of the flavonoids-IV.: correlations between chemistry, pollen morphology and systematics in the family plumbaginaceae. *Phytochemistry*, v. 6, n. 10, p. 1415-1428, 1967.

HILLIS, M. O. The history of microanalysis. *Journal of Chemical Education*. v. 22, n. 7, p. 348, 1945.

JAYAWARDANE, B. M.; MCKELVIE, I. D.; KOLEV, S. D. A paper-based device for measurement of reactive phosphate in water. *Talanta*. v. 100, p. 454-460, 2012.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E.; Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*. v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LOPES, T.; XAVIER, M.; QUADRI, M. G.; QUADRI, M. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Current Agricultural Science and Technology*. v.13, n. 3, p. 291-297, 2012.

LUCILE T. A. B. E.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* *Ciência e tecnologia de alimentos*. v. 27, n. 2, p. 394-40, 2007.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *Boletim do Centro Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochemical Journal*. v. 35, n. 12, p. 1358, 1941.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; BUTTE, M. J.; WHITESIDES, G. M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie-International Edition*. v. 46, n. 8, p.1318-1320, 2007.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S. W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G. M. Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Analytical Chemistry*. v. 80, n. 10, p. 3699-3707, 2008.

MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M.; CARRILHO, E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical chemistry*. v. 82, n. 1, p. 3-10, 2009.

MEZAROBA, M. E. de P. C. Extração de antocianina de casca de uva Isabel. 2001. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

MOURA, S. M.; CARDOSO, T.; SILVA, A.; CONSTANT, P. B. L.; FIGUEIREDO, R. Determinação de antocianinas, polifenóis e antioxidantes totais do extrato aquoso de jabuticaba. XX CBED, VIII Encontro Latino-Americano de Economia Doméstica e I Encontro Intercontinental de Economia Doméstica. Fortaleza, 2009.

NIE, Z.; NIJHUIS, C. A.; GONG, J.; CHEN, X.; KUMACHEV, A.; MARTINEZ, A. W.; Whitesides, G. M. Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*. v. 10, n. 4, p. 477-483, 2010.

PATROCÍNIO, A. O. T.; IHA, N. Y. Murakami. Em busca da sustentabilidade: Células solares sensibilizadas por extratos naturais. *Química Nova*, v. 33, n.3, p. 574-578, 2010.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Vegetals as natural sources of antioxidants. *Química Nova*. v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos de 2010 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf. Acessado em 01/07/2016.

OSMANI, S. A.; HALKJAER H. E.; MALIEN, A. C.; OLSEN, C. E.; BAK, S.; LINDBERG M. B. Effect of glucuronosylation on anthocyanin color stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 8, p. 3149-3155, 2009.

ROBERTS, J. C. *The Chemistry of Paper*. The Royal Society of Chemistry. The Royal Society of Chemistry, 1996.

SANTOS, J. L. O. Estratégias analíticas para determinação de nitrito e nitrato em matrizes ambientais e alimentícias, empregando análise de imagens digitais. Dissertação (mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

SANTOS, P. S. S. Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos 3D em papel para utilização em biossensores. Dissertação (mestrado). Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

SCURI, A. E. *Fundamentos da imagem digital*. Tecgraf, Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: <http://webserver2.tecgraf.puc-rio.br/~scuri/download/fid.pdf> Acessado em 01/07/2016.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. *Fundamentos de Química Analítica*. Thomson, São Paulo, 2006.

SILVA, A. S. Avaliação da interferência analítica de fármacos na determinação de proteínas e cetonas no exame químico de urina: estudos in vitro e in vivo. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SILVA, G. J. F. D.; CONSTANT, P. B. L.; FIGUEIREDO, R. W. D.; MOURA, S. M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jaboticaba (*Myrciaria ssp.*). Alimentos e Nutrição Araraquara. v. 21, n. 3, p.429-436, 2010.

Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessamento/index.htm>. Acessado em: 01/07/2016.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. Revista Brasileira de Fruticultura. v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SUGUINO, E; MARTINS, A. N; TURCO, P. H. N; CIVIDANES, T. M. S; FARIA, A. M. A cultura da jaboticabeira. Pesquisa e tecnologia. v. 9, n. 1, 2012.

TABARIN, V. P.; GONÇALVES, G. M. S. Obtenção de lipossomas contendo extrato de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) para uso em cosméticos. Anais do XV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas. v. 27.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; DE OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. Ceres, v. 55, n. 4, p. 297-304, 2015.

TERCI, D. B. L; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: Usar papel ou solução?. Química Nova. v. 25, n. 4, p. 684-688, 2002.

TERCI, D. B. L. Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução 899/2003. Disponível em: <https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelinke.php?numlink=1-9-34-2003-05-29-899> Acessado em 01/07/2016.

VAZ, A. C. C. Desenvolvimento de um biossensor de ADN integrado num chip de microfluídica. Dissertação (mestrado). Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

YAGODA, H. Applications of Confined Spot Tests in Analytical Chemistry: Preliminary Paper. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*. v. 9, n.2 p. 79-82, 1937.

YUYAMA, K. The camu-camu culture in Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 33, n. 2, p. 335-690, 2011.