



**UnB**

**Universidade de Brasília  
Instituto de Química**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO EM ANTITRANSPIRANTES EMPREGANDO  
DISPOSITIVOS DE PAPEL COM DETECÇÃO FLUORIMÉTRICA POR IMAGENS  
DIGITAIS**

DÊNIS OMAEL SILVA PEREIRA

Orientador  
Prof. Dr. Alexandre Fonseca

BRASÍLIA, DF  
2023



**UnB**

**Universidade de Brasília  
Instituto de Química**

DÊNIS OMAEL SILVA PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO EM ANTITRANSPIRANTES EMPREGANDO  
DISPOSITIVOS DE PAPEL COM DETECÇÃO FLUORIMÉTRICA POR IMAGENS  
DIGITAIS**

Dissertação de Mestrado em Química  
apresentado ao Programa de Pós-Graduação  
da Universidade de Brasília.

Orientador

Prof. Dr. Alexandre Fonseca

BRASÍLIA, DF  
2023

## **AGRADECIMENTOS**

Queria agradecer primeiramente aos meus pais, Ozair e Cláudia, por todo apoio e motivação dada para seguir os meus sonhos, eu não teria chegado a lugar nenhum sem vocês. Agradeço, também, aos meus amigos que estiveram ao meu lado durante minha jornada, eu sempre pude contar com vocês. Queria agradecer a minha companheira Izabella, que sempre esteve por perto, seja ajudando com sua inteligência, no trabalho ou com sua amizade, fico feliz de finalmente estarmos juntos. Um agradecimento aos colegas de laboratório pela sua companhia e camaradagem, foi um prazer tomar café com vocês.

Agradeço ao meu orientador que me guiou pelo caminho desta dissertação, sem o qual nada disso seria possível, a você professor Alexandre meu agradecimento especial. Obrigado pela dedicação e tempo aplicado em meu auxílio na realização da pesquisa, o senhor é excepcional.

Gostaria de agradecer a todos os professores da Universidade de Brasília que em muito contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço a todos os funcionários que de alguma forma com a sua prestação de serviço auxiliaram em meu desenvolvimento ao longo dos anos.

## RESUMO

Dispositivos analíticos de papel (PAD) são ferramentas simples e de baixo custo que utilizam pequenas quantidades de reagentes e amostras em determinações qualitativas ou quantitativas. Sua aplicação para análises que empregam a fluorimetria baseada em imagens digitais é ainda um desafio devido a necessidade de uniformização da radiação de excitação nas zonas de detecção, assim como do ajuste fino das imagens, previamente a aquisição dos sinais RGB (*red*, *green*, e *blue*) em tempo real. Paralelamente o cloridróxido de alumínio é um ingrediente ativo da maioria dos antitranspirantes comercialmente disponíveis, sendo a determinação do alumínio uma maneira de realizar o controle de qualidade desses produtos, visto que o analito é potencialmente prejudicial à saúde humana. Para esse fim, foi desenvolvido um fluorímetro capaz de realizar determinações por fluorescência de maneira ágil utilizando PAD e imagens digitais, com o controle e leitura feito por smartphone, utilizando um *app* desenvolvido durante a pesquisa. Utilizando o método de complexação de alumínio (III) com Morina e a componente B de RGB como sinal analítico, obteve-se uma resposta linear ( $R^2 = 0,994$ ) para concentrações de 1,0 a 8,0 mg L<sup>-1</sup> de alumínio, com um limite de detecção de 0,24 mg L<sup>-1</sup>, sendo a precisão das medidas da ordem de 3,1 %. Foram realizadas determinações de cloridróxido de alumínio em amostras de antitranspirantes comerciais usando o instrumento proposto e um método de referência baseado em absorção atômica em chama, não sendo observadas diferenças significativas, ao nível de 95% de confiança, ao se realizar uma análise de variância. Demonstrou-se, dessa forma, que dispositivos PAD podem ser empregados com sucesso na determinação de alumínio em antitranspirantes utilizando um fluorímetro lab-made com detecção via imagem digital.

Palavras-chave: PAD, fluorescência, imagens digitais, alumínio, química verde, smartphone.

## ABSTRACT

Paper analytical devices (PAD) are simple, low-cost tools that use small amounts of reagents and samples in qualitative or quantitative determinations. Their application for analyses using fluorimetry based on digital images is still a challenge due to the need for uniformity of the excitation radiation in the detection zones, as well as the fine tuning of the images, prior to the acquisition of the RGB (red, green, and blue) signals in real time. In parallel, aluminium chlorohydrate is an active ingredient of most commercially available antiperspirants, and the determination of aluminum is one way to perform quality control of these products, since the analyte is potentially harmful to human health. For this purpose, a fluorimeter capable of performing fluorescence determinations in an agile manner using PAD and digital images, with control and reading done by smartphone, using an app developed during the research, was developed. Using the complexation method of aluminum (III) with Morin and the RGB component B as analytical signal, a linear response ( $R^2 = 0.994$ ) was obtained for concentrations from 1.0 to 8.0 mg L<sup>-1</sup> of aluminum, with a detection limit of 0.24 mg L<sup>-1</sup>, and the precision of the measurements was around 3.1%. Aluminium chlorohydrate determinations were performed in commercial antiperspirant samples using the proposed instrument and a reference method based on flame atomic absorption, and no significant differences were observed, at the 95% confidence level, when comparing the results with an analysis of variance. It was thus demonstrated that PAD devices can be successfully employed for the determination of aluminum in antiperspirants using a lab-made fluorimeter with digital image detection.

Keywords: PAD, fluorescence, digital images, aluminum, green chemistry, smartphone.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS .....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 PAD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Imagens digitais .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Fluorescência .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1 Fluorescência e imagens digitais.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2 Fluorescência e dispositivos de papel .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Alumínio em antitranspirantes.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Reagente Morina .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Parte Experimental .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Fabricação do dispositivo de papel .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Hardware - Sistema para a realização das medidas .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Aplicativo Android desenvolvido para as medidas .....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 Preparo das soluções .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.1 Reagentes.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.2 Preparo dos padrões .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4.3 Preparo das amostras .....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Aplicação das soluções .....</b>	<b>23</b>
<b>3.6 Otimização por planejamento fatorial .....</b>	<b>24</b>
<b>3.6.1 Proporção estequiométrica Alumínio:Morina .....</b>	<b>24</b>
<b>3.6.2 Concentração de Etanol .....</b>	<b>25</b>
<b>3.6.3 pH .....</b>	<b>25</b>
<b>3.6.4 Preparo das soluções para o planejamento fatorial .....</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Procedimentos para avaliação do instrumento.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7.1 Experimentos de repetibilidade.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7.2 Experimentos com aplicações consecutivas (pré-concentração)</b> .....	<b>26</b>
<b>3.7.3 Obtenção da faixa linear .....</b>	<b>27</b>
<b>3.7.4 Determinação por absorção atômica em chama.....</b>	<b>27</b>

<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	28
<b>4.1 Resultados da otimização usando planejamento fatorial</b> .....	28
<b>4.2 Testes de pipetagem e repetibilidade</b> .....	30
<b>4.3 Aplicações consecutivas (ensaio de pré-concentração)</b> .....	32
<b>4.4 Precisão e faixa linear</b> .....	33
<b>4.4.1 Componente RGB e fluorescência</b> .....	33
<b>4.4.2 Estudo da faixa linear</b> .....	35
<b>4.5 Exatidão: determinação de alumínio em antitranspirantes</b> .....	39
<b>5. Conclusões</b> .....	41
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	42

## **LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS**

μPAD	Microfluidic paper-based analytical device
PAD	Paper-based analytical device
HSV	Hue, saturation e brightness
CMYK	Cyan, magenta, yellow, black
RGB	Red, green, blue
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RDC	Resolução da diretoria colegiada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
LED	Light-emitting diode
PWM	Pulse Width Modulation
NEMA	National Electrical Manufacturers Association
API	Application Programming Interface
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
P.A.	Para Análise
HPLC	High-performance liquid chromatography
L.D.	Limite de detecção
L.Q.	Limite de quantificação

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Diferentes fatores e níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial .....	25
<b>Tabela 2:</b> Tabela codificada para o planejamento fatorial $2^3$ .....	26
<b>Tabela 3:</b> Resultados do planejamento fatorial .....	29
<b>Tabela 4:</b> Concentração, sinal analítico e coeficiente de variação para curva analítica realizando replicatas das medidas.....	38
<b>Tabela 5:</b> Comparação entre método de referência e instrumento proposto na determinação do teor de cloridróxido de alumínio (% m/m) em 10 amostras de antitranspirantes. Antitranspirantes: líquidos (L), <i>roll-on</i> (R), aerossol (A) e creme (C). .....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Processo de fabricação ampliado em um corte transversal.....	3
<b>Figura 2:</b> Resultado após a penetração da cera. ....	3
<b>Figura 3:</b> Gráfico do número de artigos e os anos de publicação obtido através de uma consulta com os termos “digital images” na categoria tópicos da base de dados <i>Web of Science</i> .....	5
<b>Figura 4:</b> Esquema de componentes de um espectrofluorímetro.....	7
<b>Figura 5:</b> Molécula do flavonol Morina e estrutura proposta para o complexo alumínio-Morina. ....	12
<b>Figura 6:</b> Frente e verso do PAD com escala em cm.....	14
<b>Figura 7:</b> Esquema do instrumento .....	15
<b>Figura 8:</b> Componentes principais do dispositivo .....	16
<b>Figura 9:</b> Interior da caixa .....	17
<b>Figura 10:</b> Tela inicial do aplicativo e menu de seleção do módulo HC-05 para conexão com o instrumento. ....	19
<b>Figura 11:</b> Interface para ajustes no aplicativo.....	20
<b>Figura 12:</b> Interface durante a leitura das imagens.....	21
<b>Figura 13:</b> Modo de aplicação da amostra no papel .....	24
<b>Figura 14:</b> Respostas do instrumento obtida para um dos ensaios do planejamento fatorial.....	28
<b>Figura 15:</b> gráfico cúbico de respostas para planejamento fatorial $2^3$ . Sinal analítico em vermelho e destaque no ponto ótimo.....	29
<b>Figura 16:</b> Teste de repetibilidade utilizando técnica de pipetagem normal. 10 medidas consecutivas de um padrão $6 \text{ mg L}^{-1}$ de alumínio complexado com Morina.....	31
<b>Figura 17:</b> Teste de repetibilidade utilizando técnica de pipetagem reversa. 10 medidas consecutivas de um padrão $6 \text{ mg L}^{-1}$ de alumínio complexado com Morina .....	31
<b>Figura 18:</b> Medida de um branco (B) seguido de aplicações cumulativas de $2 \mu\text{L}$ de padrão $1 \text{ mg L}^{-1}$ .....	33
<b>Figura 19:</b> Respostas do instrumento para padrões com concentrações de $0,5$ a $16,0 \text{ mg L}^{-1}$ .....	34

<b>Figura 20:</b> Espectros normalizados obtidos usando espectrômetro UV-visível para transmitância do filtro, emissão do LED, absorção do complexo, emissão do complexo. ....	35
<b>Figura 21:</b> Construção de curva analítica para padrões 0,5 a 16 mg L <sup>-1</sup> afim de verificar faixa linear no método. ....	36
<b>Figura 22:</b> Respostas do instrumento para padrões de alumínio realizando triplicatas das medidas. Branco (B) e valores das concentrações dos padrões acima do sinal. ....	37
<b>Figura 23:</b> Construção de curva analítica para padrões de alumínio realizando triplicatas das medidas .....	37
<b>Figura 24:</b> Construção de curva analítica reduzida para padrões de alumínio realizando triplicatas das medidas .....	39

## 1. Introdução

### 1.1 PAD

Os chamados micro dispositivos fluídicos à base de papel ( $\mu$ PAD do inglês *microfluidic paper-based analytical device*), ou simplesmente dispositivos analíticos de papel (PAD) são ferramentas analíticas relativamente novas que podem ser utilizadas para analisar pequenos volumes de amostra e que possuem propriedades desejáveis para realização de procedimentos miniaturizados, como portabilidade, baixo custo e possibilidade de uso por pessoas leigas <sup>1</sup>.

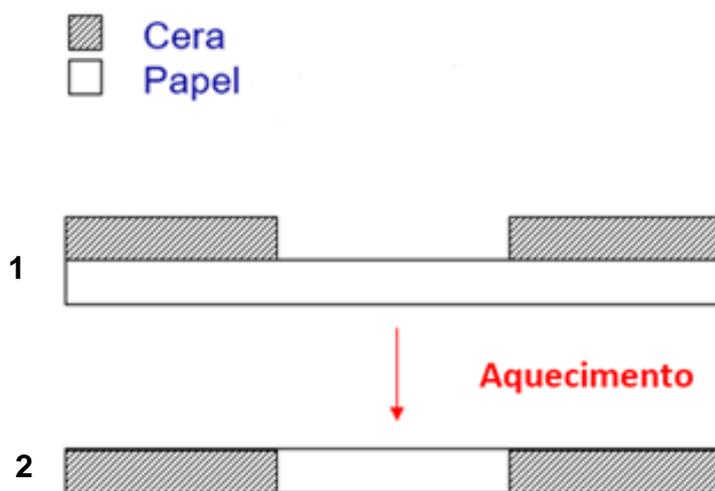
A composição e estrutura do papel confere características hidrofílicas aos dispositivos que favorecem a sua utilização com soluções aquosas, amplamente empregadas em métodos de análises químicas <sup>2</sup>. O transporte dos líquidos também é mais fácil se comparado com técnicas microfluídicas tradicionais, pois a capilaridade promove o movimento dos fluidos ao longo dos dispositivos sem exigir o uso de dispositivos extras como bombas eletrônicas, que diminuem a portabilidade devido ao aumento do sistema e a necessidade de fontes de energia para operação e controle <sup>3</sup>.

As análises também costumam ser mais rápidas do que aquelas realizadas por procedimentos convencionais devido à alta proporção superfície/volume, a estrutura porosa e os volumes reduzidos, o que possibilita análises onde o volume da amostra é limitado <sup>2</sup>. Por fim, o papel gera uma quantidade menor de resíduos se comparado com análises tradicionais devido a sua simplicidade e tamanho <sup>4</sup>.

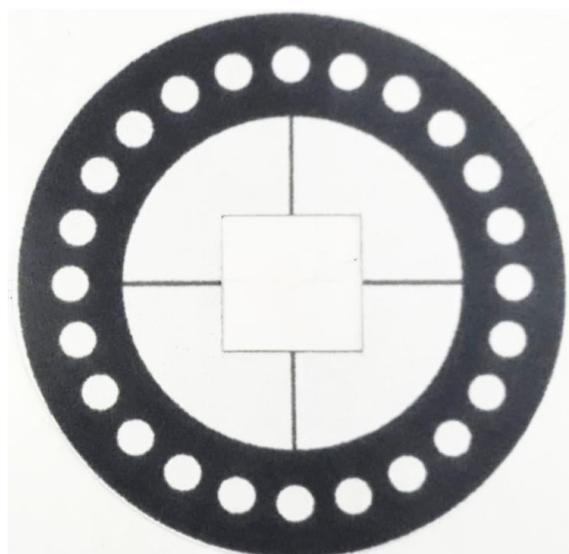
Os PAD podem ser construídos facilmente limitando canais hidrofílicos no substrato por meio de barreiras hidrofóbicas, resultando em uma fabricação fácil e de baixo custo. Existem diferentes métodos para realizar esse trabalho, cada um possuindo suas vantagens e desvantagens. Por exemplo, Chitnis (2011) usou um laser de CO<sub>2</sub> para subtrair as partes hidrofóbicas de um papel recoberto com cera para formar os seus canais para a detecção de hemoglobina por luminol, um método de fabricação limitado pelo alto custo dos equipamentos necessários para produção <sup>5</sup>. Em outro exemplo, foi utilizado um processo de

carimbagem para aplicação de tinta hidrofóbica sobre o papel, de forma a se desenvolver uma técnica rápida e de baixo custo. Porém, esse processo se mostrou inconsistente e apresentou uma baixa resolução nas possibilidades de *design* do dispositivo <sup>6</sup>.

Um método que se destaca é a impressão por cera, se mostrando rápida, eficiente e relativamente barata na fabricação do PAD, onde se emprega uma impressora de cera comercial, um papel adequado e uma forma de aquecimento para realizar a penetração da cera de um lado ao outro do papel. As modificações na etapa de protótipo podem ser realizadas rapidamente e a expansão da cera no papel pode ser facilmente prevista, reduzindo possíveis erros de fabricação. A técnica se mostra adequada para produção em grande escala, podendo ser facilmente adaptada a uma linha de produção para escalar a produção. O processo de fabricação envolve duas operações principais: a impressão dos padrões de cera na superfície do papel e o derretimento da cera, que devido a um aumento de temperatura penetra o papel e forma as barreiras hidrofóbicas conforme ilustra a Figura 1, resultando no produto ilustrado na Figura 2 <sup>7</sup>.



**Figura 1:** Processo de fabricação ampliado em um corte transversal. Etapa de impressão do dispositivo, com deposição da cera na superfície do papel (1), após o aquecimento a cera penetra e se deposita nas fibras do papel (2).



**Figura 2:** Resultado após a penetração da cera. Parte escura indica a região hidrofóbica (cera) e a parte clara indica a região hidrofílica (papel).

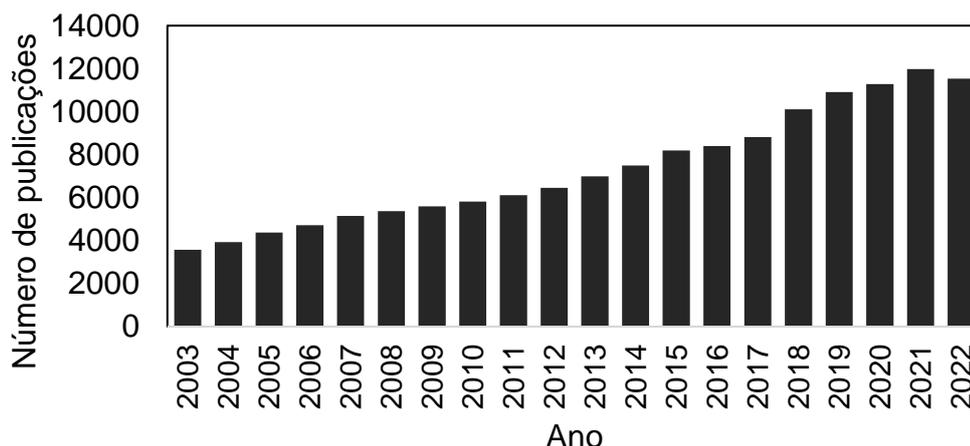
O método de detecção a ser usado em associação com o PAD é outra parte que requer atenção, com diversos métodos combinando diferentes sensores e adequações às peculiaridades de se realizar essas análises em papel. O uso da colorimetria é uma das alternativas mais populares, com os resultados de análises qualitativas podendo ser avaliados a olho nu (*spot testes*, testes falso/positivo) <sup>8</sup>. Por outro lado, para a quantificação de analitos, a colorimetria requer o uso de calibração com soluções padrão e deve ser realizada, preferencialmente, obtendo-se imagens digitais a partir de algum dispositivo de imagem, como a câmera de um smartphone <sup>9</sup>. O uso de PAD combinado com sensores eletroquímicos é outra alternativa bastante estudada.

Por exemplo, é possível realizar análises quantitativas de uma gama de substâncias relevantes à saúde humana usando detecção amperométrica <sup>10</sup>.

## **1.2 Imagens digitais**

Colorimetria é a ciência e tecnologia usada pra quantificar e descrever fisicamente a percepção humana de cor <sup>11</sup>. Tradicionalmente, muitos ensaios químicos eram realizados por meio de métodos colorimétricos visuais cujos procedimentos levavam a mudanças de cor que podiam ser relacionadas à identificação ou quantificação do analito observando a mudança de cor a olho nu. Por exemplo, em uma titulação se observa a mudança de cor para se determinar o ponto final e, conseqüentemente, a concentração do analito. Já a colorimetria fotoelétrica, usa aparatos como colorímetro fotoelétrico e espectrofotômetro. Atualmente as técnicas quantitativas clássicas vêm sendo substituídos por essas alternativas instrumentais, levando à colorimetria a ser usada em testes qualitativos e análises de menor sensibilidade devido à sua facilidade de uso e baixo custo. Esses métodos sempre apresentaram desvantagens inerentes a percepção da cor: estimativas sobre cor são subjetivas e variam de pessoa para pessoa, a influência da luz de fundo, existência de perturbações da percepção visual em parte da população (por exemplo, daltonismo) e, no geral, apresentam limitações em análises quantitativas <sup>12</sup>.

O advento e avanço de sensores de imagens e detectores de cor abriram novas possibilidades para utilização desses métodos com uma melhor aplicabilidade e precisão, uma vez que é possível tratar a cor como uma propriedade óptica da matéria, que contém informação química e que pode ser medida objetivamente. Na última década, a popularização de dispositivos para captura de imagens digitais gerou um salto exponencial na quantidade de publicações científicas que exploram as suas novas possibilidades de uso em medidas analíticas, conforme ilustrado na Figura 3. Os usos desses novos sensores possibilitam substituir instrumentações de custo elevado por alternativas de fácil acesso e maior portabilidade, que apresentam um desempenho analítico adequado para realizar medidas precisas e variadas, minimizando as desvantagens inerentes a instrumentos e técnicas mais antigas.



**Figura 3:** Gráfico do número de artigos e os anos de publicação obtido através de uma consulta com os termos “digital images” na categoria tópicos da base de dados *Web of Science*.

Para realizar essas análises se faz necessário o uso de um método para quantificar as cores a serem medidas. Para isso, os espaços de cor derivados da teoria das três cores primárias que simulam a percepção humana são comumente utilizados. Entre os diferentes modos de se expressar cores no meio digital destacam-se o HSV (do inglês *hue, saturation e value*), CMYK (do inglês *cyan, magenta, yellow e key*) e principalmente o RGB (do inglês *red, green e blue*). Para o sistema RGB uma dada cor pode ser representada por três valores correspondentes às cores da sigla (vermelho, verde e azul, respectivamente), com a intensidade de cada componente variando de 0 a 255. Sendo os dois extremos: o branco, presença máxima de todos os componentes, representado por (255,255,255) e o preto, mínimo de todas as componentes, por (0,0,0) <sup>13</sup>.

A obtenção de imagens digitais para posterior avaliação dos valores de cor podem ter diversas origens, como câmeras digitais, *smartphones, webcams e scanners* <sup>14</sup>. Após obtidas, essas imagens são geralmente tratadas em um software, determinando os valores para um espaço de cor, o que pode ser feito por uma análise da cor de um pixel (menor unidade de uma imagem digital) ou pela média dos valores de múltiplos pixels de uma área da imagem <sup>15</sup>. A partir desses valores quantitativos é possível encontrar relações entre a variação das cores e suas intensidades com as propriedades de interesse para as análises, como por exemplo, quantificar a concentração de analitos ou complexos coloridos.

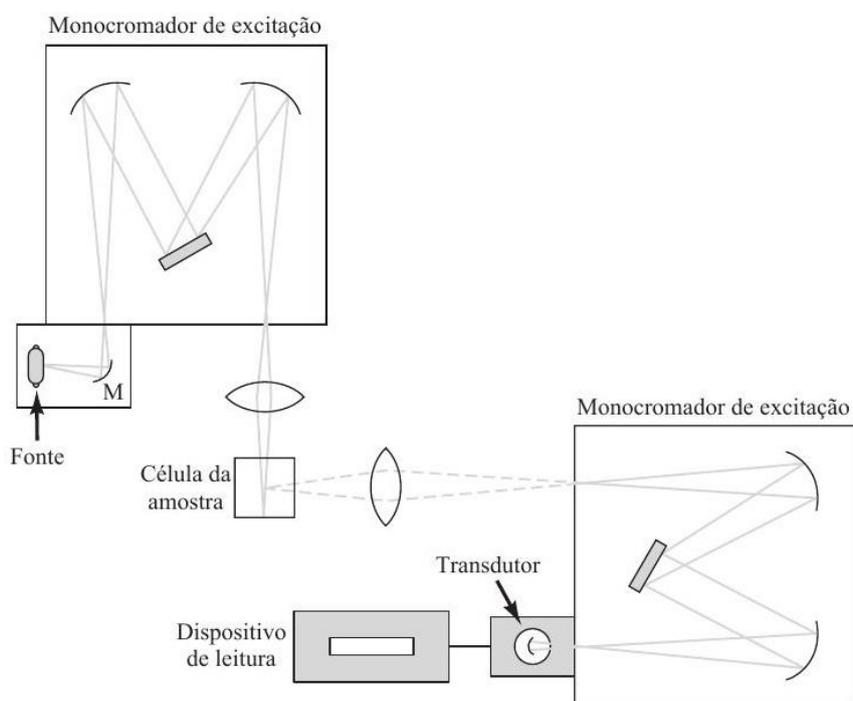
### 1.3 Fluorescência

Fluorescência e fosforescência são exemplos de luminescência, que é a emissão de luz de um estado excitado de uma molécula, sendo uma emissão de curta duração, chamada então de fluorescência, enquanto a luminescência de maior duração é denominada fosforescência. Fluorescência é um processo no qual átomos ou moléculas são excitados pela absorção de radiação eletromagnética e as espécies excitadas então relaxam retornando ao seu estado fundamental e liberando o excesso de energia como fótons no processo <sup>16</sup>. Essa fluorescência molecular é determinada pela excitação de uma amostra em um comprimento de onda de absorção e medindo a emissão em um comprimento de onda mais alto, chamado de comprimento de onda de fluorescência.

A fluorescência é observada em transições eletrônicas a partir de um estado eletrônico excitado de menor energia (primeiro singleto, S1) para um dos níveis vibracionais do estado fundamental. Então, uma molécula fluorescente absorve radiação que promove seus elétrons para níveis de energia superiores ao estado excitado do primeiro singleto e processos como a conversão interna e relaxação vibracional levam a energia até o estado excitado (S1) para que então ocorra a fluorescência.

Como fluorescência é um dos muitos mecanismos pelos quais a molécula retorna ao seu estado fundamental após ser excitada pela absorção da radiação, muitos compostos não fluorescem devido as suas estruturas possuírem caminhos para relaxação não-radiativa mais rápida que a emissão fluorescente. Experimentalmente se sabe que a fluorescência é favorecida em moléculas rígidas, no qual essa rigidez diminui a velocidade da relaxação não-radiativa de modo que a relaxação pela fluorescência possa ocorrer. Em muitos compostos a eficiência quântica (razão entre o número de moléculas que fluorescem e o número total de moléculas excitadas, ou a razão entre os fótons emitidos e excitados) diminui quando ocorre o aumento da temperatura, devido ao aumento da frequência de colisões que ocasiona à maior probabilidade de relaxação colisional, esse processo também pode ocorrer quando a diminuição da viscosidade do solvente.

Entre os instrumentos capazes de realizar medidas de fluorescência está o espectrofluorímetro, ilustrado na Figura 4, que é composto por diversos componentes de forma a otimizar e adequar a peculiaridades desse fenômeno. O primeiro componente necessário no instrumento é uma fonte de excitação: como lâmpadas de arco de mercúrio, lâmpadas de arco de xenônio-mercúrio ou um laser. Caso a fonte de excitação seja de amplo espectro é necessário o uso de seletores de comprimento de onda, que podem ser filtros ou monocromadores, que permitem a varredura do espectro. É necessária uma geometria de  $90^\circ$  entre a excitação da amostra e as medidas de emissão para evitar a observação da fonte pelo detector, esse arranjo deve ser contido em um ambiente fechado de forma a evitar exposição à radiação externa. Após a amostra ser excitada, a emissão deve passar por outro filtro, podendo ser usado um segundo monocromador capaz de realizar a seleção do comprimento de onda de emissão específico para o analito. Esses monocromadores e os transdutores para obtenção do sinal são normalmente similares aos empregados nos espectrofotômetros de absorção, com fotomultiplicadoras sendo usadas em espectrofluorímetros de alta sensibilidade, esses componentes acabam elevando o custo da instrumentação e aumentando sua complexidade <sup>17</sup>.



**Figura 4:** Esquema de componentes de um espectrofluorímetro. Adaptado de Skoog (2015).

### **1.3.1 Fluorescência e imagens digitais**

Atualmente, com avanço da tecnologia presente em câmeras digitais pode-se produzir imagens com uma alta contagem de pixels e operando sobre condições de baixa iluminação, condições que possibilitam o uso em medidas de fluorescência, já que esse tipo de medida requer uma alta sensibilidade e são realizadas em condições específicas (baixa luminosidade e excitação em comprimento de onda específico) <sup>18</sup>. O uso de uma fonte excitação de menor

custo no desenvolvimento também pode levar a instrumentos mais compactos, isso combinado ao avanço e redução do tamanho de dispositivos capazes de capturar imagens digitais (por exemplo, *smartphones*) pode levar ao desenvolvimento de ferramentas portáteis capazes de realizar ensaios rápidos e com aplicações do tipo ponto de uso.

Em um exemplo da combinação entre imagens digitais e uma análise utilizando fluorescência, através do uso do flash para promover a excitação e a câmera para obter as imagens digitais, ambos de um *smartphone*, McCracken (2017) construiu um dispositivo para avaliar a concentração de *Bisfenol A* em amostras de água. Para isso foi usado ácido 1-hidroxipireno-3,6,8-trissulfônico (HPTS) que tem sua fluorescência inibida pela concentração do analito em solução. A técnica mostrou um limite de detecção de 4,4 µM, se mostrando promissora em detectar o *Bisfenol* como contaminante em lixiviados de resíduos e amostras industriais. Porém a técnica requer o uso de um software externo ao *smartphone* para tratar a imagem e realizar a análise por RGB, além de usar uma cubeta com caminho óptico de 1 cm para as análises <sup>19</sup>.

### **1.3.2 Fluorescência e dispositivos de papel**

Atualmente estuda-se o potencial das técnicas de fluorescência e quimiluminescência para realizar análises em dispositivos de papel, com alguns métodos obtendo baixos limites de detecção e resultados precisos em análises ultrasensíveis <sup>20</sup>. Apesar disso, esses métodos apresentam algumas dificuldades: alguns papéis apresentam a capacidade de autofluorescência e acrescentam ruído de fundo às medidas.

Aplicações com dispositivos de papel são realizadas usualmente empregando-se medidas colorimétricas com um reagente seletivo ao analito,

sendo as medidas de fluorescência pouco praticadas em PAD, pois esse tipo de análise envolve certos fatores que necessitam de instrumentação um pouco mais elaborada que aquela necessária para as medidas de colorimetria usuais. Em medidas de fluorescência molecular há necessidade de uma fonte excitação adequada ao analito, assim como a leitura da intensidade da radiação de emissão que ocorre em uma faixa de comprimento de onda também específica. Dessa forma, é usualmente necessária a seleção dos comprimentos de onda de excitação e emissão tal como empregar uma fonte de radiação adequada para a realização das medidas.

Levando em conta esses fatores, como a intensidade da fluorescência depende da quantidade de fótons absorvidas durante a excitação <sup>21</sup>, a irradiação deve ocorrer de forma uniforme e reprodutível, o que depende da distância das áreas individuais da fonte de excitação, influenciando a absorção e emissão da radiação pelas substâncias em diferentes zonas do PAD. Há também compostos fluorescentes que se degradam sobre radiação ultravioleta ao longo do tempo, <sup>22</sup>, logo a aquisição de imagens deve ocorrer imediatamente após a exposição do PAD a luz de excitação, obtendo a fluorescência máxima e prevenindo a perda de sensibilidade.

#### **1.4 Alumínio em antitranspirantes**

O alumínio é o terceiro elemento químico mais abundante na crosta terrestre <sup>23</sup>, sendo assim, os seres humanos são constantemente expostos ao metal ou compostos iônicos do elemento, na forma de pó e de partículas dispersas no meio ambiente. Já são conhecidas muitas das propriedades químicas do alumínio e da sua relação com a toxicidade, porém, certos fatores do mecanismo pelo qual sua atividade tóxica se manifesta ainda são pouco elucidados <sup>24</sup>.

Sais de alumínio são os ingredientes ativos de agentes antitranspirantes aplicados diretamente sobre a pele, bloqueando os dutos de suor pela formação e subsequente precipitação de hidróxido de alumínio dentro das glândulas sudoríparas écrinas, o que leva a inibição da secreção de suor da pele <sup>25</sup>.

Estudos mostram que essa é uma rota potencial para absorção do alumínio pelo corpo, com estudos ligando o acúmulo de alumínio no organismo a problemas de saúde devido a exposição a longo prazo <sup>26</sup>. Há também relatos de casos de dermatite de contato, com uma incidência maior de casos pediátricos devido a exposição a antitranspirantes, vacinas e cosméticos diversos contendo alumínio, fato que deve ser levado em consideração quando se avalia qual concentração desse composto é definitivamente segura para população <sup>27</sup>.

Encontram-se disponível no mercado cosméticos com a função de desodorantes (atuam inibindo o crescimento microbiano ou mascarando as substâncias odoríferas presentes no suor) e antitranspirantes (inibidores de secreção) <sup>28</sup>. Essas funções não são mutuamente exclusivas e os produtos são referidos de maneira geral como desodorantes. Atualmente, o Brasil é um dos maiores consumidores globais de produtos desodorantes, movimentando aproximadamente R\$11,6 bilhões em vendas no ano de 2020 <sup>29</sup>. Sendo assim, a quantidade de alumínio presente em cosméticos é regulada por critérios definidos por órgãos governamentais de cada país, existindo a necessidade de técnicas analíticas capazes de realizar determinação do teor de alumínio nesses produtos.

O princípio ativo que apresenta o efeito antitranspirante são os cloridróxidos de alumínio ( $Al_y(OH)_{3y-z}Cl_z \cdot nH_2O$ ) e complexos de alumínio-zircônio ( $Al_xZr(OH)_yCl_z$ ). Os diferentes ativos preconizados para uso como antitranspirantes e suas recomendações de uso são regulamentados pela Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da RDC<sup>o</sup> N<sup>o</sup> 530, de 4 de agosto de 2021. Sendo os limites definidos em 20% hidroxiclolorreto de alumínio e zircônio anidro e 25% base anidra de cloridróxido de alumínio <sup>30</sup>.

Dentre as técnicas usuais para quantificação desse elemento se encontra o uso de técnicas clássicas como determinação do alumínio por titulação reversa usando o indicador Negro de Eriocromo T, utilizando excesso de complexante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e sulfato de zinco como titulante <sup>31</sup>. Esse método depende da habilidade do analista em observar o ponto de viragem e está sujeita a subjetividade da percepção da cor do indivíduo, o que inevitavelmente leva a erros, por mais habilidoso que seja o profissional

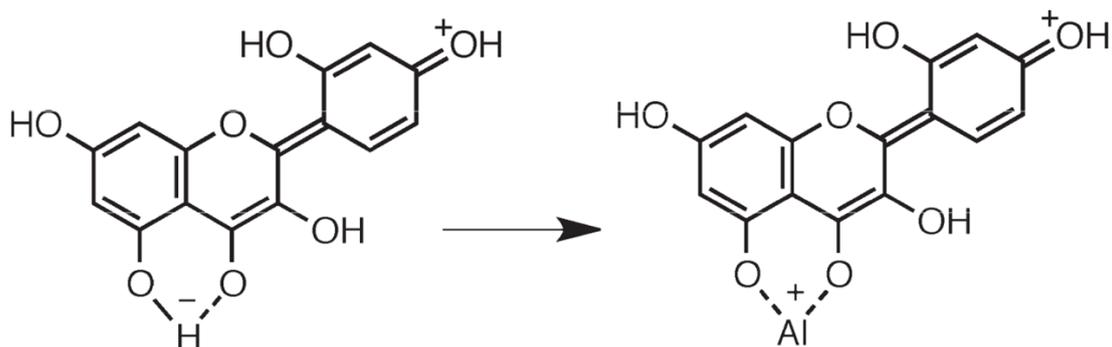
realizando o processo. Técnicas clássicas também estão sujeitas a um limite de detecção menor que as técnicas instrumentais, necessitando de uma quantidade maior de amostra e da preparação de grandes volumes de reagentes para sua execução.

Para determinação instrumental do alumínio em produtos cosméticos, uma das técnicas recomendadas pela ANVISA é a espectrometria de absorção atômica <sup>32</sup>, uma técnica com elevada precisão e alta especificidade elementar. Porém, seu uso apresenta um custo mais elevado, devido ao preço de aquisição do instrumento, manutenção, custo das instalações e o uso de uma chama a base de óxido nitroso/acetileno nas determinações do alumínio.

Em uma tentativa de reduzir os custos da determinação do alumínio em antitranspirantes, Silvestre (2018) propôs o uso de uma plataforma de papel na determinação de cloridrato de alumínio, usando um agente complexante Alizarina e espectroscopia de reflectância difusa <sup>33</sup>. Em outra proposta, afim de reduzir ainda mais os custos, Abughrin (2021) propôs um método para realizar essa determinação em soluções utilizando detecção com imagens digitais capturadas por um smartphone, usando a complexação do alumínio com o reagente Quercetina <sup>34</sup>. Ambas as abordagens apresentam suas desvantagens, no primeiro caso ainda há necessidade de um espectrofotômetro portátil para realizar as medidas, com a aquisição do sinal de forma não automatizada. Na segunda, se faz necessário o uso de uma cubeta de solução e o processamento via um software externo ao smartphone para obtenção dos resultados.

### **1.5 Reagente Morina**

O reagente Morina (2',3,4',5,7-pentahidroxifavona) é um flavonol isolado a partir de várias espécies vegetais. Exibe vários efeitos biológicos e bioquímicos incluindo atividades antioxidante, antiproliferativa, antineoplásica, anti-inflamatória e cardioprotetora <sup>35</sup>. Uma de suas propriedades com relevância para análise química é como agente complexante para realização de medidas fluorimétricas usando seu complexo com o alumínio (Figura 4), sendo capaz de realizar determinações na faixa de parte por bilhão <sup>36</sup>.



**Figura 5:** Molécula do flavonol Morina e estrutura proposta para o complexo alumínio-Morina.

De acordo com a literatura existem diferentes complexos de alumínio-Morina dependendo da concentração do complexante, sendo possível múltiplas relações estequiométricas (1:1, 1:2, 1:3). Há também a possibilidade do reagente se complexar com diferentes metais gerando emissões em diferentes comprimentos de excitação e emissão <sup>37</sup>.

Na literatura, é relatado a possibilidade de realizar medidas de fluorescência em soluções majoritariamente aquosas <sup>38</sup>, o que facilita a parte do preparo da solução e diminui o custo da análise. Porém, o uso de etanol é comumente empregado, intensificando a fluorescência e aumentando a solubilidade da Morina na solução <sup>39</sup>. Outro parâmetro de interesse nas análises é o pH, podendo modificar a intensidade da fluorescência e modificar a estrutura do complexo <sup>37</sup>, dois valores são frequentemente mencionados como ideais, o pH 3,0 <sup>36</sup> e 5,0 <sup>38</sup>.

## 2. Objetivos

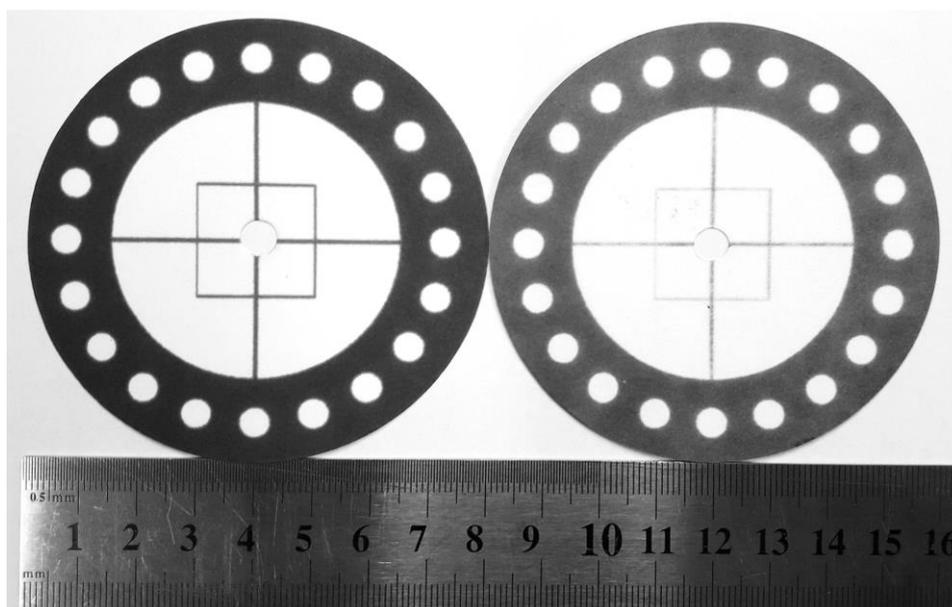
O presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação do uso de um fluorímetro lab-made controlado por smartphone e com detecção baseada em imagens digitais na determinação de alumínio em amostras de antitranspirantes empregando-se dispositivos analíticos de papel.

- Para isso buscou-se: Otimizar as variáveis instrumentais (filtro de absorção, LED de excitação e componente RGB) a fim de proporcionar um melhor desempenho analítico;
- Otimizar as variáveis necessárias ao preparo de solução para o complexo fluorescente alumínio-Morina (pH, concentração molar, solvente) de forma a potencializar a fluorescência;
- Avaliar o desempenho analítico do método fluorescente em papel (precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação);
- Definir o melhor método para o preparo das amostras;
- Determinar alumínio em amostras comerciais de antitranspirantes pelo método proposto e por espectroscopia de absorção com chama para fins de comparação dos resultados.

### 3. Parte Experimental

#### 3.1 Fabricação do dispositivo de papel

Para a fabricação do PAD empregou-se a técnica de impressão com cera<sup>7</sup>, de forma a se obter regiões hidrofílicas circulares em papel cromatográfico rodeadas por material hidrofóbico (cera da impressora). Para isso, o layout apresentado na Figura 5 foi desenvolvido no programa Microsoft Powerpoint e consistiu em um círculo com diâmetro de 8 cm, contendo 20 “spots” (zonas de detecção) com 5 mm de diâmetro cada, posicionados em ângulo de 18° entre eles. Esse design e o processo de fabricação foi discutido no trabalho de conclusão de curso do autor<sup>40</sup>.

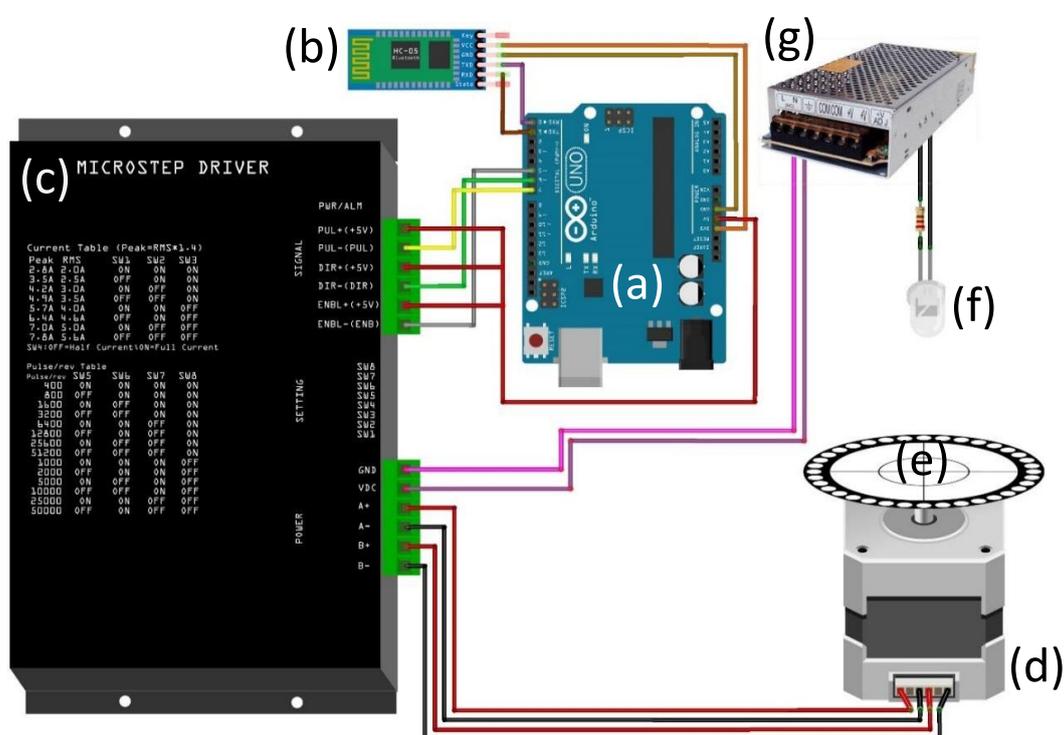


**Figura 6:** Frente e verso do PAD com escala em cm.

A impressão foi realizada sobre papel cromatográfico 1 CHR da Whatman® (200 x 200 mm) com uma impressora a base de cera (Xerox ColorQube 8570). Quatro dispositivos foram impressos por folha, preenchendo eficientemente o espaço disponível. Em uma segunda etapa, o papel foi levado à estufa por 5 minutos a 80°C de modo a promover a deposição da cera na fibra do papel. Feito isso os dispositivos foram recortados em seu formato circular empregando-se uma cortadora a laser (LaserLine NX-01) e armazenados para uso posterior.

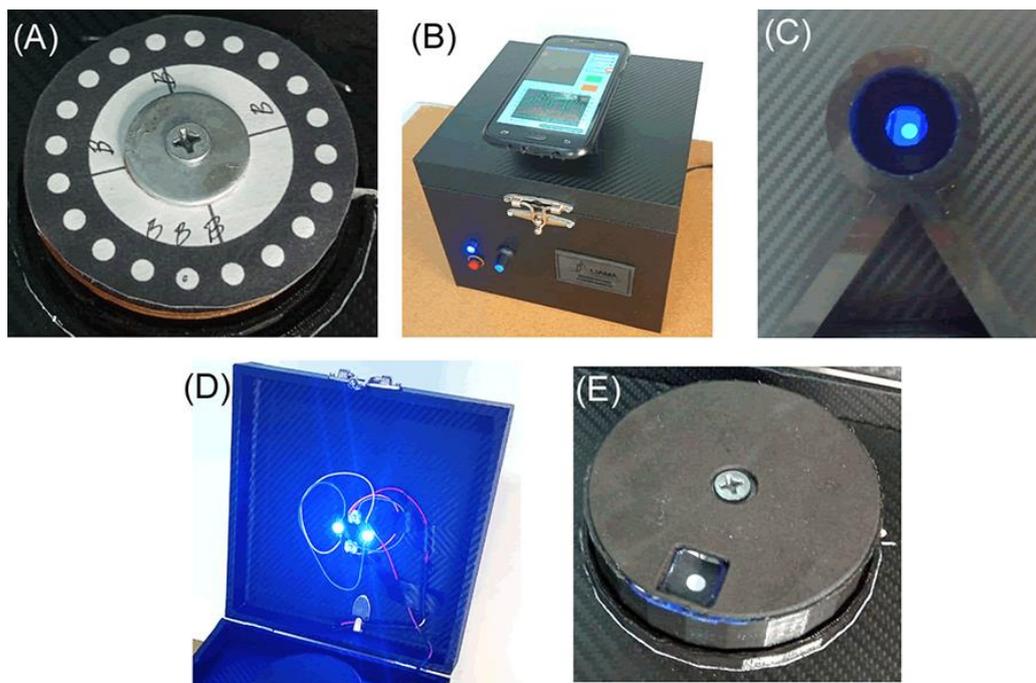
### 3.2 Hardware - Sistema para a realização das medidas

Uma ilustração esquemática do fluorímetro desenvolvido para a detecção de fluorescência no PAD proposto é mostrada na Figura 6. Como pode ser visto, o instrumento é composto por um microcontrolador Arduino UNO, um módulo Bluetooth HC-05, um driver para acionamento do motor de passos, um motor de passos NEMA 17, uma base circular de acrílico para o PAD, um par de LEDs violeta (429 nm) para excitação do analito e uma fonte de alimentação 12 V (c. c.), sendo as funções de cada componente brevemente descritas a seguir.



**Figura 7:** Esquema do instrumento. Arduino UNO (a), módulo Bluetooth HC-05 (b), driver para o motor de passos (c), motor de passos NEMA (d), base circular para dispositivo PAD (e), LED acoplado com resistor (f), fonte de alimentação 12 V (g).

Conforme ilustra a Figura 7 (A), o dispositivo circular de papel é colocado de forma alinhada sobre a base de acrílico que é fixada com um parafuso ao eixo do motor de passos, permitindo que cada um dos *spots* seja irradiado por um par de LED devidamente selecionado. Em outras palavras, o motor gira o disco em incrementos de 18°, permitindo a leitura de fluorescência individual dos *spots*.



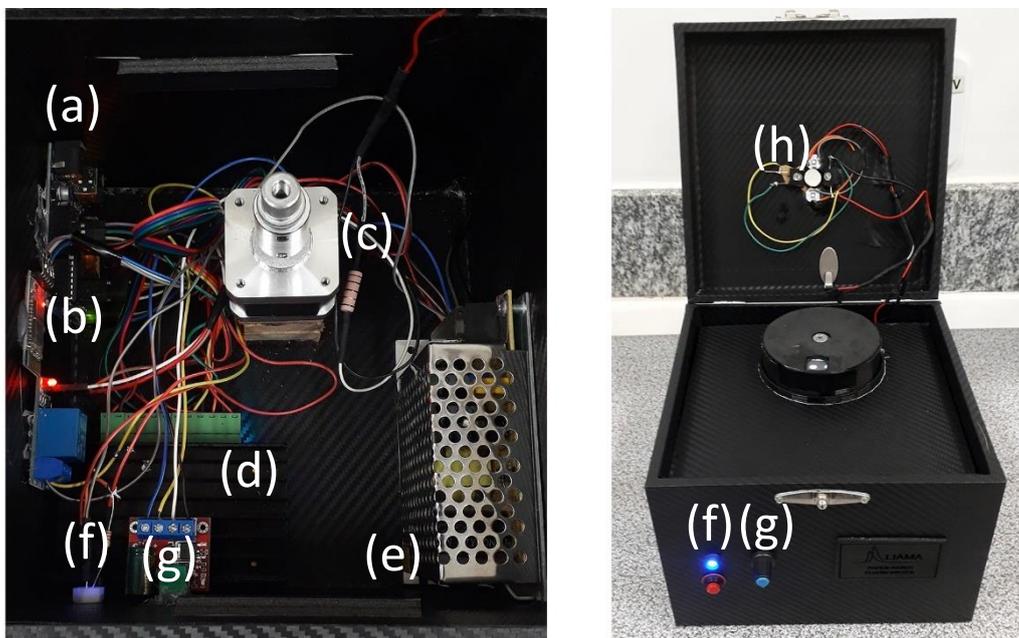
**Figura 8:** Componentes principais do dispositivo. PAD afixado (A), dispositivo com smartphone (B), fenda para capturar as imagens da câmera do smartphone (C), arranjo de LEDs (D), máscara para facilitar a identificação do *spot* (E).

O smartphone é posicionado conforme a Figura 7 (B), os LEDs foram fixados à tampa do instrumento ao longo de uma abertura circular (janela de observação (Figura 7 (C))). Acima da base circular de fixação do PAD foi fixado o par de LED que fornece a radiação de excitação para o analito (Figura 7 (D)). O instrumento dispõe de dois pares de LED, sendo que um par apresenta máximo de emissão em 400 nm e o outro emite com pico em 429 nm.

Para facilitar a identificação do *spot* pelo aplicativo e evitar a fotodegradação das substâncias contidas nos *spots* que não estão sendo medidos, foi empregada uma máscara impressa em PLA (ácido poliláctico) com uma impressora 3D (Figura 7 (E)). Essa máscara é fixada sobre o dispositivo de papel, antes do acionamento do LED, e contém uma pequena abertura que permite a visualização individual dos *spots*.

O conjunto ilustrado na Figura 6 foi alojado em uma caixa de madeira com dimensões de 15 cm x 20 cm x 20 cm sendo realizada a separação das partes eletrônicas do instrumento e da base giratória contendo o PAD (Figura 8). Para o controle fino do motor de passos foi empregado um microcontrolador Arduino Uno-R3 (Figura 8 (a)) que recebe os comandos enviados por um smartphone Android que através de comunicação bluetooth pelo módulo HC-05 (Figura 8 (b))

aciona o motor de passos (Figura 8 (c)) por meio do driver microstep (Figura 8 (d)). A alimentação elétrica de todo o sistema provém de uma fonte DC de 12 V e 5 A (Figura 8 (e)), que por sua vez é conectada à rede elétrica.



**Figura 9:** Interior e exterior da caixa. Arduino UNO (a), módulo Bluetooth HC-05 (b), motor de passos NEMA acoplado a base (c), driver para o motor de passos (d), fonte de alimentação (e), switch de energia do sistema (f), potenciômetro PWM (g), janela de observação e arranjo de LEDs (h).

Na parte frontal externa da caixa foram colocados um botão liga/desliga (Figura 8 (f)) e um botão para controle da intensidade de emissão dos LED (Figura 8 (g)). Esse controle fino da intensidade de radiação é obtido por meio de um módulo controlador de pulso com modulação (PWM), o qual produz um resultado mais satisfatório do que aquele em que se emprega apenas a variação da corrente que alimenta os LED.

Para realizar as medidas, o usuário deve posicionar o celular com o aplicativo específico, previamente instalado, a um suporte no topo da caixa, alinhando a câmera à janela de observação do instrumento (Figura 8 (h)), o que permite captar a radiação emitida no *spot* que está sendo iluminado pelo LED. De modo a filtrar a radiação indesejada do LED, foi empregado um filtro de absorção adequado, posicionado entre a câmera do smartphone e a janela de observação, e uma correção de cores com o aplicativo do celular como filtro digital. Outros analitos podem necessitar de uma mudança nas configurações do LED ou filtro, dependendo das características de excitação e emissão das

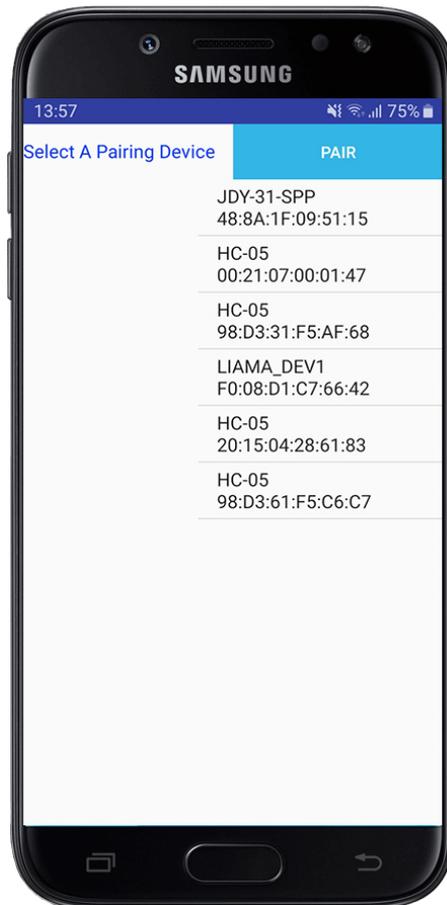
substâncias. Como a absorção máxima do complexo alumínio-Morina ocorre em 410 nm e a emissão do complexo ocorre em 505 nm <sup>38</sup>, a excitação foi realizada com um LED comercialmente disponível e que emite na faixa de 380 nm a 450 nm (máximo em 429 nm). Para filtrar a radiação de emissão empregou-se um filtro de absorção com faixa de transmitância de 450 nm até 590 nm (máximo em 500 nm).

O celular a ser usado requer um sistema Android, uma câmera digital de boa resolução, capacidade de realizar conexões Bluetooth e possuir memória interna suficiente para armazenar os dados. Neste trabalho empregou-se um smartphone Samsung™ Galaxy J5 Pro equipado com uma câmera 13 MP (4128 x 3096 pixels de resolução).

### **3.3 Aplicativo Android desenvolvido para as medidas**

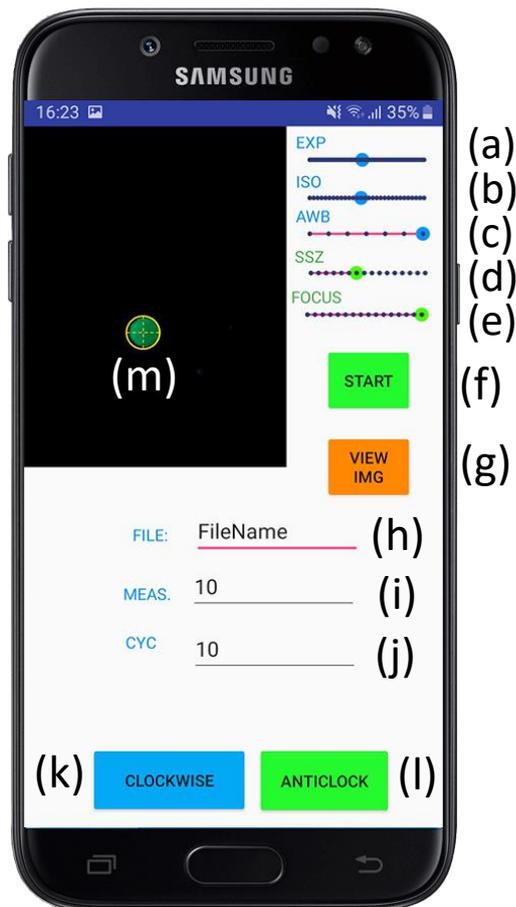
O aplicativo para uso em sistema operacional Android® foi desenvolvido pelo Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica do IQ-UnB (LIAMA) com uso da API 24 (*Android Nougat*) e da interface de desenvolvimento Android Studio. Para facilitar o entendimento, não serão abordadas aqui as sub-rotinas de programação criadas para o funcionamento do aplicativo, sendo descritos apenas os passos que devem ser seguidos pelo usuário a fim de se realizar as medidas.

Inicialmente o usuário se depara com a interface da Figura 9 para a seleção do dispositivo Bluetooth. No caso em questão, o usuário deve clicar na opção HC-05 20:15:04:28:61:83 (modelo do receptor Bluetooth e seu identificador único) para que a conexão com o instrumento seja estabelecida.



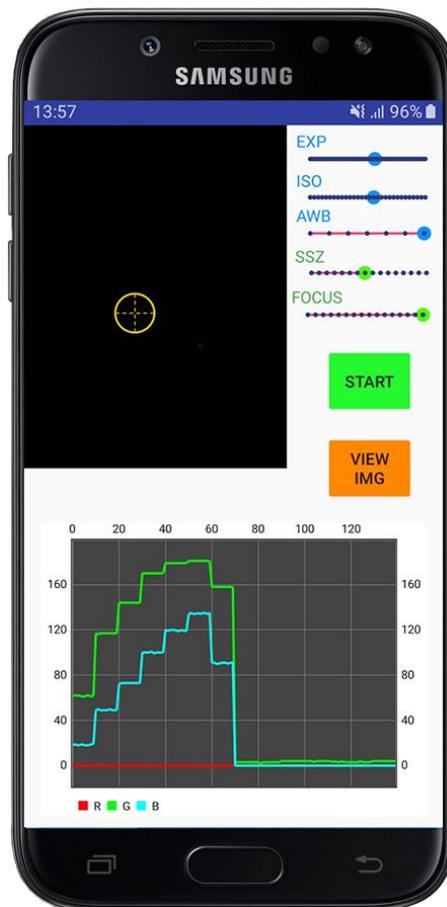
**Figura 10:** Tela inicial do aplicativo e menu de seleção do módulo HC-05 para conexão com o instrumento.

Após uma mensagem indicar sucesso na conexão, o usuário se depara com a interface ilustrada na Figura 10, onde é apresentada a imagem em tempo real da câmera e onde podem ser ajustados cinco parâmetros relacionados a imagem, a saber: exposição (EXP), sensibilidade do sensor da câmera à luz do ambiente (ISO), balanço de branco (AWB), tamanho do amostrador de pixels (SSZ) e distância focal (FOCUS). No campo FILE o usuário pode definir o nome a ser usado para o arquivo de texto que será salvo contendo todas as leituras das componentes RGB. Em MEAS (*measurements*) indica-se quantas leituras serão feitas para cada *spot*. O campo CYC determina o número de *spots* que se deve analisar durante o processo de leitura, por consequência os movimentos que devem ser executados pelo motor de passos. Ao final da tela dois botões CLOCKWISE (sentido horário) e ANTICLOCK (sentido anti-horário) permitem pequenos movimentos para direita ou esquerda com o motor de passo para melhor alinhamento do PAD em relação à janela de observação.



**Figura 11:** Interface para ajustes no aplicativo. Controle de exposição (a), controle do ISO (b), ajuste do controle de branco (c), tamanho do amostrador (d), foco da câmera (e), botão START (f), botão VIEW IMG (g), campo de texto para nomear arquivo (h), campo de texto para ajustar número de medidas (i), número de *spots* a serem medidos (j), botão CLOCKWISE (k), botão ANTICLOCK (l), amostrador circular (m).

Ao pressionar o botão START é iniciado o processo de leitura. O PAD é girado pelo motor em 18° graus no sentido horário. Nesse momento, o amostrador circular de RGB alinha-se a imagem do *spot* e as leituras das componentes RGB dos pixels pertencentes a esse *spot* são realizadas até que se atinja o número de leituras especificadas no campo MEAS. A média dos valores para cada ponto de leitura são determinados e, então plotados como ilustrado pela Figura 11. O processo se repete automaticamente até que o número de *spots* especificados pelo campo CYC sejam medidos. Durante as leituras um arquivo de texto tipo .txt com o nome especificado pelo usuário é automaticamente gravado para acesso posterior.



**Figura 12:** Interface durante a leitura das imagens.

Para melhorar a seleção da área a ser considerada para a medida de RGB foi empregada a Transformada de Hough <sup>41</sup>, da biblioteca OpenCV <sup>42</sup>, a qual permite o reconhecimento dos *spots* circulares em tempo real e o alinhamento do amostrador de RGB (Figura 10 (m)) com o *spot* a ser analisado, antes da aquisição do sinal. A Transformada de Hough funciona convertendo a imagem inicial para uma escala de cinza, seguida da aplicação de um algoritmo de detecção de bordas, por fim é aplicada a transformada circular de Hough que detecta o formato das bordas que constituem um círculo e a informação é enviada para o programa.

Assim que o motor gira 18°, o software localiza o *spot* na imagem e desloca o centro do amostrador RGB para o centro do *spot* visualizado na imagem, só então, a média dos valores de R, G e B para os pixels contidos no interior do amostrador são adquiridos e plotados no gráfico. Isso ajuda a compensar possíveis variações na posição causadas pelo movimento do motor de passos e garante uma maior repetibilidade para as medidas. O botão VIEW

IMG mostra uma prévia da imagem em escala de cinza utilizada pelo processo da Transformada de Hough, de modo a verificar a adequação do ajuste de imagem e garantir a detecção do círculo.

### **3.4 Preparo das soluções**

#### **3.4.1 Reagentes**

O reagente hidrato de Morina foi adquirido da Sigma-Aldrich, grau P.A. O ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 65% e ácido fórmico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ) 98% foram adquiridos, respectivamente, da Chemco e AnalaR, ambos graus P.A. O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 35% foi adquirido da Dinâmica, grau P.A. O solvente etanol (EtOH) 90% foi adquirido da Tedia, grau HPLC. A solução padrão de alumínio  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  foi adquirido da Qhemis.

#### **3.4.2 Preparo dos padrões**

Uma solução alcoólica de Morina  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada dissolvendo uma massa adequada de reagente em etanol 90% e armazenada em um frasco âmbar para uso posterior.

Para o preparo dos padrões de alumínio-Morina que foram aplicadas ao PAD foi usado uma solução estoque para espectroscopia atômica de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de alumínio e a solução estoque de Morina descrita acima. Alíquotas adequadas das duas soluções foram adicionadas a balões de 10 mL para criar padrões na faixa de  $0,5$  a  $16,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,0$  a  $8,0 \text{ mg L}^{-1}$  em alumínio. A fim de se otimizar a fluorescência em papel para o complexo, foi realizado um planejamento fatorial detalhado da seção 3.6 e usando as informações obtidas utilizou-se a quantidade de Morina que respeitasse aproximadamente a proporção molar de 1:1 (alumínio:Morina) para o padrão de maior concentração da faixa, obtendo a concentração molar de Morina de  $0,74$  e  $0,37 \text{ mmol L}^{-1}$ , para as concentrações de  $16,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $8,0 \text{ mg L}^{-1}$  em alumínio, respectivamente. A mesma concentração de Morina foi utilizada para todas as soluções das faixas estudadas. Por fim, se adicionou uma quantidade adequada de etanol para obter uma concentração de 50% (v/v), sendo o volume dos balões completados com

o tampão ácido fórmico/formiato de sódio pH 3,0 a 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O branco dessas soluções foi preparado da mesma forma sem adição do alumínio.

### 3.4.3 Preparo das amostras

As amostras de diferentes antitranspirantes foram adquiridas localmente na cidade Brasília (Distrito Federal, Brasil). As 10 amostras de antitranspirantes podem ser separadas em suas diferentes formas de comercialização: 3 líquidos (L), 3 *roll-on* (R), 3 aerossóis (A) e 1 creme (C).

Para liberação do alumínio presente nas amostras de antitranspirantes foi pesado com exatidão cerca de 1,0 g da amostra, seguido da adição de 10 mL de ácido nítrico concentrado (65%) e 5 mL de peróxido de hidrogênio (35%), sendo a solução resultante aquecida sobre agitação a 50 °C por 20 minutos com o auxílio de uma chapa de aquecimento <sup>43</sup>. Esse volume foi então transferido para um balão volumétrico de 100 mL, completado com água purificada por osmose reversa e então filtrado através de um filtro de membrana hidrofóbica (Durapore® PVDF 0,22 µm). A solução obtida foi diluída para faixa adequada para as análises do método de referência (absorção atômica por chama) e no instrumento proposto (usando o método de preparo descrito no item anterior). No caso das amostras aerossol foi necessário uma etapa extra, no qual a lata contendo a amostra foi agitada e pulverizada em um béquer, a pasta resultante foi então aquecida até não haver uma mudança na massa. Cerca de 1,0 g dessa pasta seca, exatamente medida, foi então pesada e o procedimento de abertura e diluição usado para as demais amostras foi realizado.

### 3.5 Aplicação das soluções

A aplicação das soluções das amostras/padrões nos dispositivos de papel foi realizada com o auxílio de uma micropipeta de 0,5 a 10 µL (HTL LM10), transferindo-se 2,0 µL de solução para cada *spot*. Como mostra a Figura 12, durante a aplicação, o papel é apoiado sobre um béquer para evitar o contato do mesmo com a bancada, o que poderia levar a perda da solução por meio do contato do fundo do *spot* com a superfície da bancada. Após a aplicação, aguardou-se cerca de 2 minutos para a secagem de toda a solução no papel.



**Figura 13:** Modo de aplicação da amostra no papel.

### **3.6 Otimização por planejamento fatorial**

Optou-se por utilizar o reagente Morina na determinação do alumínio devido a elevada sensibilidade e sua aparente simplicidade na adaptação do método para seu uso em microdispositivos de papel. De forma a otimizar as variáveis experimentais para as análises quantitativas com o PAD proposto foi realizado um planejamento fatorial para avaliar os efeitos dos fatores disponíveis na maximização da diferença entre o sinal RGB para uma solução de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de alumínio + Morina e uma solução em branco, realizada em triplicata, pois mesmo sem a presença do íon metálico o composto apresenta uma fraca fluorescência.

#### **3.6.1 Proporção estequiométrica Alumínio:Morina**

Tendo em vista esses fatores, se faz necessário um estudo de diferentes concentrações de reagente e avaliar o impacto dessa variável em medidas realizadas no instrumento proposto. Para isso foram escolhidas duas proporções estequiométricas alumínio:Morina: 1:1 e 1:3 ( $0,37$  e  $1,1 \text{ mmol L}^{-1}$  de Morina, respectivamente), que possibilitassem averiguar o impacto desse fator.

### 3.6.2 Concentração de Etanol

Como a adição do solvente orgânico etanol tem um efeito potencializador da fluorescência do complexo é importante avaliar seu efeito, pois sua adição pode causar mudanças no comprimento de excitação do complexo e modificar a solubilidade das substâncias. Para avaliar possíveis mudanças na linearidade e repetibilidade das medidas, se faz necessário realizar um estudo sobre seu impacto. Foram selecionadas duas proporções para os experimentos: sem adição (usando somente quantidade de etanol presente na solução padrão de Morina) e 50% (com adição de um volume de etanol ao balão volumétrico para obter a concentração).

### 3.6.3 pH

Um estudo da faixa de pH ótima para o preparo das soluções foi realizado. Dois valores são frequentemente relatados como ótimos, o pH 3,00<sup>36</sup> e pH 5,00<sup>38</sup>. Com o objetivo de se otimizar essa variável ela foi incluída no planejamento. Para isso foram preparadas duas soluções tampão 0,1 mol L<sup>-1</sup> para controle do pH, um tampão formiato (pH 3,0) e um tampão acetato (pH 5,0).

### 3.6.4 Preparo das soluções para o planejamento fatorial

O preparo das soluções utilizadas no planejamento fatorial consistiu da adição de um volume adequado de solução alcoólica de Morina (0,01 mol L<sup>-1</sup>) em balões de 10 mL, seguido da adição de 100 µL de solução estoque de alumínio para espectroscopia atômica de 1000 mg L<sup>-1</sup>, mantendo-se a proporção estequiométrica desejada para o estudo. Dependendo do planejamento, foi adicionado ainda, 5,0 mL de etanol 90% e por fim o balão foi completado com a solução tampão de pH adequado.

A Tabela 1 atribui os diferentes níveis aos fatores enquanto a Tabela 2 mostra a distribuição das variáveis usadas nos ensaios.

**Tabela 1:** Diferentes fatores e níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial.

Fator		Níveis	
		-	+
1	Morina	1:1	1:3
2	EtOH	Sem adição	50%
3	pH	3,0	5,0

**Tabela 2:** Tabela codificada para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

<b>Ensaio</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

### **3.7 Procedimentos para avaliação do instrumento**

#### **3.7.1 Experimentos de repetibilidade**

Como o volume suportado pelos *spots* no PAD são pequenos (2,0 µL) foi realizada uma estimativa do erro de pipetagem presente nas técnicas de pipetagem reversa (preencher todo o volume disponível na pipeta, seguido do acionamento até o volume desejado) e pipetagem normal. O teste consistiu em 5 pesagens da massa de 2,0 µL de água destilada pipetada pela pipeta usada em todas as aplicações desse trabalho, com a massa aferida sendo convertida para volume usando a densidade referente a temperatura do experimento.

Para avaliar a repetibilidade das medidas feitas no instrumento foram realizados dois experimentos: um utilizando a técnica de pipetagem normal para as aplicações no papel e outra com a aplicação por meio de pipetagem reversa. Assim, dez aplicações com volume de 2,0 µL foram realizadas com uma solução padrão contendo 6,0 mg L<sup>-1</sup> de alumínio e um branco para ambas as técnicas. O número de replicatas escolhido (10) se baseou no número de medidas necessárias para construção de uma curva analítica e leitura de amostras, sendo a repetibilidade nesse intervalo de maior interesse.

#### **3.7.2 Experimentos com aplicações consecutivas (pré-concentração)**

Para avaliar o efeito de aplicações consecutivas de soluções alumínio:Morina em um mesmo *spot* do PAD como uma possível etapa de pré-concentração, foram realizadas aplicações de 2,0 µL de uma solução padrão de

1,0 mg L<sup>-1</sup> em alumínio, seguida da secagem do referido *spot* antes da próxima aplicação com mesmo volume e concentração do analito. Em outras palavras, um *spot* recebeu uma aplicação de padrão, seguido de um segundo *spot* que recebeu duas aplicações, sendo o número de aplicações aumentado sucessivamente até se atingir seis aplicações no último *spot* da série. Finalizadas as aplicações, se aguardou a secagem completa dos *spots* e as medidas foram realizadas.

### **3.7.3 Obtenção da faixa linear**

A região linear de calibração para o método foi avaliada inicialmente com a aplicação de um branco seguido de 10 padrões na faixa de concentração de 0,5 a 16 mg L<sup>-1</sup> em alumínio aplicados em série, sendo os primeiros pontos 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>, seguido de incrementos de 2,0 mg L<sup>-1</sup>.

Para avaliação da linearidade e precisão do método foi realizada a aplicação dos padrões de 1,0 a 8,0 mg L<sup>-1</sup>, em triplicata, intercalados por uma aplicação da solução do branco. Sendo os primeiros pontos 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, seguido de padrões em incrementos de 2,0 mg L<sup>-1</sup>.

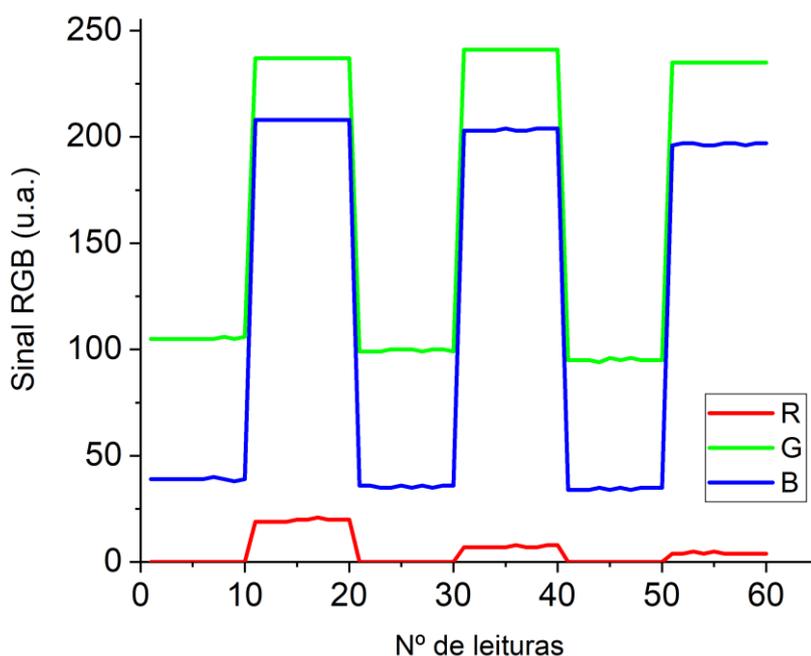
### **3.7.4 Determinação por absorção atômica em chama**

Para as determinações do analito em amostras de antitranspirantes pelo método de referência foi usado o espectrômetro de absorção atômica AA 240FS (*Fast Sequential*) da marca Varian. Foram utilizados nas análises uma chama de acetileno-óxido nítrico na proporção sugerida pelo fabricante e uma lâmpada de cátodo de Alumínio (396,2 nm). Os padrões foram preparados utilizando a solução padrão usada nos demais experimentos, sendo as diluições feitas de forma a se obter padrões na faixa de 10-60 mg L<sup>-1</sup> preparados em HNO<sub>3</sub> 2%. As amostras foram preparadas a partir da solução obtida ao fim da etapa de preparo de soluções, sendo então diluídas para uma concentração adequada a faixa e acidificadas para mesma concentração de ácido nítrico dos padrões.

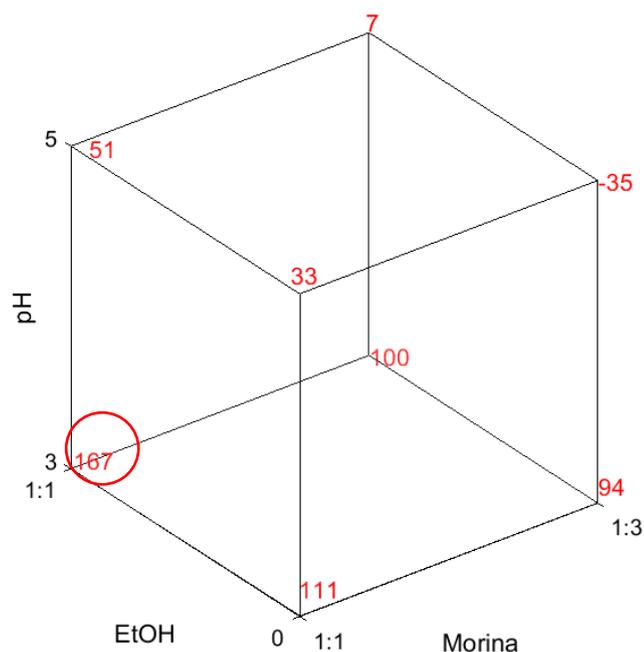
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Resultados da otimização usando planejamento fatorial

Entre as três componentes RGB, a componente azul foi a que apresentou maiores diferenças de sinal entre o branco e as soluções contendo alumínio, como mostra a Figura 13. Sendo assim, foi construído um gráfico cúbico de respostas para visualizar os resultados (Figura 14) e a Tabela 3 contendo a média dos valores para as medidas realizadas em triplicata e seu coeficiente de variação, consistindo da diferença de sinal da componente B entre o branco e a solução de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em alumínio. O valor máximo de sinal foi de 167 unidades, obtido com relação estequiométrica alumínio-Morina de 1:1, proporção 1:1 de etanol e pH 3,0, sendo observado que esse ensaio também proporcionou o menor coeficiente de variação, e indicando que estas condições são ótimas para a realização das medidas.



**Figura 14:** Respostas do instrumento obtida para um dos ensaios do planejamento fatorial. Soluções de branco e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de alumínio em triplicata.



**Figura 15:** Gráfico cúbico de respostas para planejamento fatorial  $2^3$ . Sinal analítico em vermelho e destaque no ponto ótimo.

**Tabela 3:** Resultados do planejamento fatorial.

<i>Ensaio</i>	Morina	EtOH	pH	Resposta (u.a.)	Coeficiente de variação (%)
	1	2	3		
1	-	-	-	111 ± 4	3,6
2	+	-	-	94 ± 7	7,4
3	-	+	-	167 ± 3	1,8
4	+	+	-	100 ± 2	2,0
5	-	-	+	33 ± 9	27
6	+	-	+	-35 ± 1	2,9
7	-	+	+	51 ± 9	17,6
8	+	+	+	7 ± 1	14,3

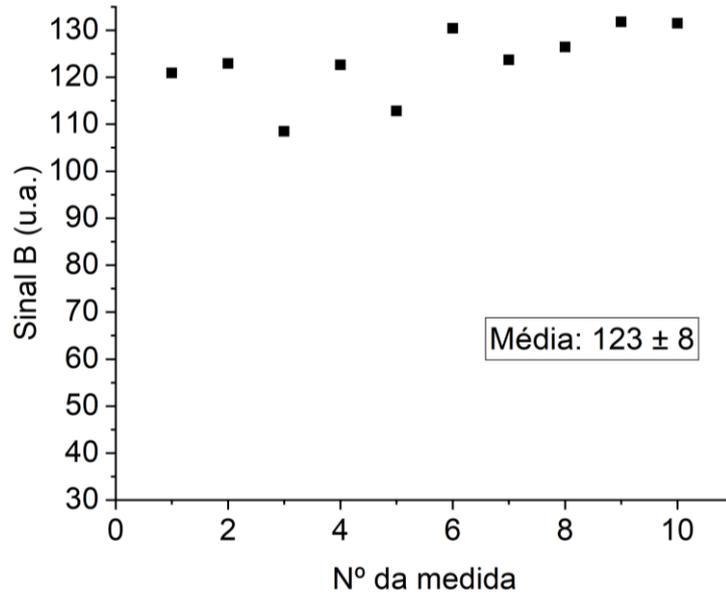
Fica evidente a importância da execução do planejamento, visto que além do ponto ótimo obter um sinal elevado ele apresentou uma menor dispersão das medidas (coeficiente de variação 1,8%). Como o valor obtido é próximo do limite da componente azul (255), há pouco ganho a ser obtido em experimentos seguintes de otimização da solução, sendo os ajustes digitais por meio da interface do aplicativo mais efetivos no ganho de sinal a partir desse ponto.

## 4.2 Testes de pipetagem e repetibilidade

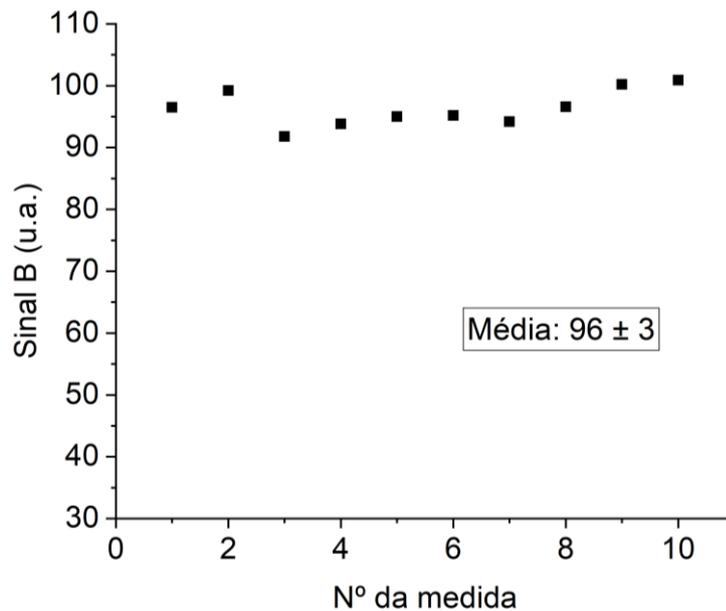
No teste para comparação das técnicas de pipetagem foram observados erros relativos ao volume nominal da pipeta de +2,3% para a técnica normal e de -0,75% para a técnica reversa, indicando um desempenho ligeiramente melhor para a pipetagem reversa. Esses erros são esperados, visto que ao trabalhar com volumes muito pequenos a pipetagem reversa é recomendada por evitar respingo de amostras e formação de espuma ou bolhas <sup>44</sup>, porém, é necessário avaliar as influências específicas das soluções a serem usadas nas determinações.

Foram construídos dois gráficos para comparar a repetibilidade, os quais são mostrados na Figura 15 e na Figura 16. O sinal analítico consistiu no valor médio de 10 leituras para cada *spot* com o valor do padrão subtraído do valor médio do sinal para o branco. Para a pipetagem convencional, o valor variou entre 109 e 132, sendo o sinal médio estimado em 123 unidades com desvio padrão de 8 unidades. Com isso, obteve-se um coeficiente de variação do sinal de 6,5%. Para a pipetagem reversa, com o gráfico representado pela Figura 16, o sinal analítico variou entre 92 e 101, sendo o sinal médio estimado em 96 unidades com desvio padrão de 3 unidades. Com isso, obteve-se um coeficiente de variação do sinal de 3,1%.

É importante observar que a média do sinal obtido para as medidas com uso da pipetagem reversa se mostrou menos intenso do que aquele obtido por pipetagem normal. Entretanto, possíveis diferenças na configuração das imagens para as duas medidas levou à essa variação, a qual não está relacionada com a técnica de pipetagem.



**Figura 16:** Teste de repetibilidade utilizando técnica de pipetagem normal. 10 medidas consecutivas de um padrão  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de alumínio complexado com Morina.



**Figura 17:** Teste de repetibilidade utilizando técnica de pipetagem reversa. 10 medidas consecutivas de um padrão  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de alumínio complexado com Morina.

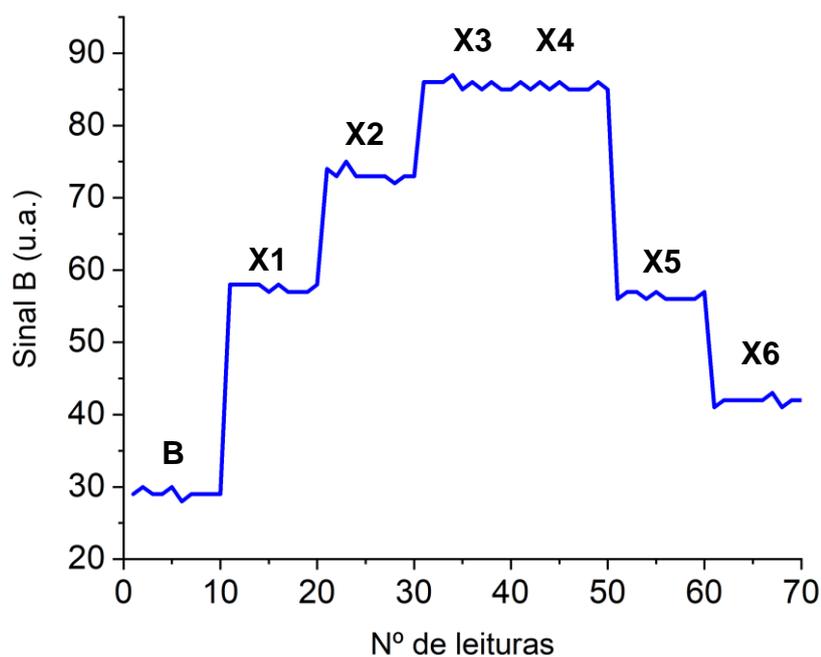
Realizando-se um teste F para comparar as variâncias das técnicas é possível verificar que as variâncias são diferentes ao nível de confiança de 95%. Levando em conta esses dados, fez-se o uso de pipetagem reversa para os estudos subsequentes, uma vez que esta estratégia é recomendada para

transferências de volumes pequenos de líquidos menos viscosos, como soluções alcoólicas a 50%, utilizadas neste trabalho <sup>45</sup>.

Esse desempenho demonstra uma boa precisão para as medidas se considerado o grande número de variáveis que podem afetar o sinal analítico. Possíveis fatores que impactam a precisão do método estão relacionados com a reprodutibilidade na fabricação do dispositivo, visto que por mais meticulosa que seja a fabricação há fatores de difícil controle: como a falta de uniformidade do papel, possíveis falhas na impressão em cera e diferenças de temperatura no momento da fabricação. Como a aplicação da amostra é manual, requerendo múltiplas pipetagens, podem ocorrer variações nos volumes aplicados aos *spots*, o que é agravado pelo uso de pequenos volumes da solução do analito (apenas 2,0  $\mu$ L), ainda se deve levar em conta que a massa de analito presente é da ordem de nano gramas, o que também contribui para as variações de sinal.

#### **4.3 Aplicações consecutivas (ensaio de pré-concentração)**

O teste das aplicações consecutivas mostra a possibilidade de se usar o PAD para realizar uma etapa de pré-concentração nas análises. Conforme ilustra a Figura 17, foi possível proporcionar um aumento de sinal usando até três aplicações consecutivas, sendo que a partir de 5 aplicações os efeitos são prejudiciais para as medidas. A suspeita é que devido ao escorrimento causado pelas múltiplas aplicações, ocorre um acúmulo do complexo fluorescente nas extremidades das zonas de detecção. Fica evidente que para esse tipo de medida é necessário manter uma uniformidade na deposição do composto sobre o papel. De qualquer forma, nota-se que o uso de 3 ou 4 aplicações consecutivas pode praticamente dobrar o sinal analítico obtido com apenas uma aplicação, o que demonstra a possibilidade de se aumentar a sensibilidade analítica através desta estratégia.

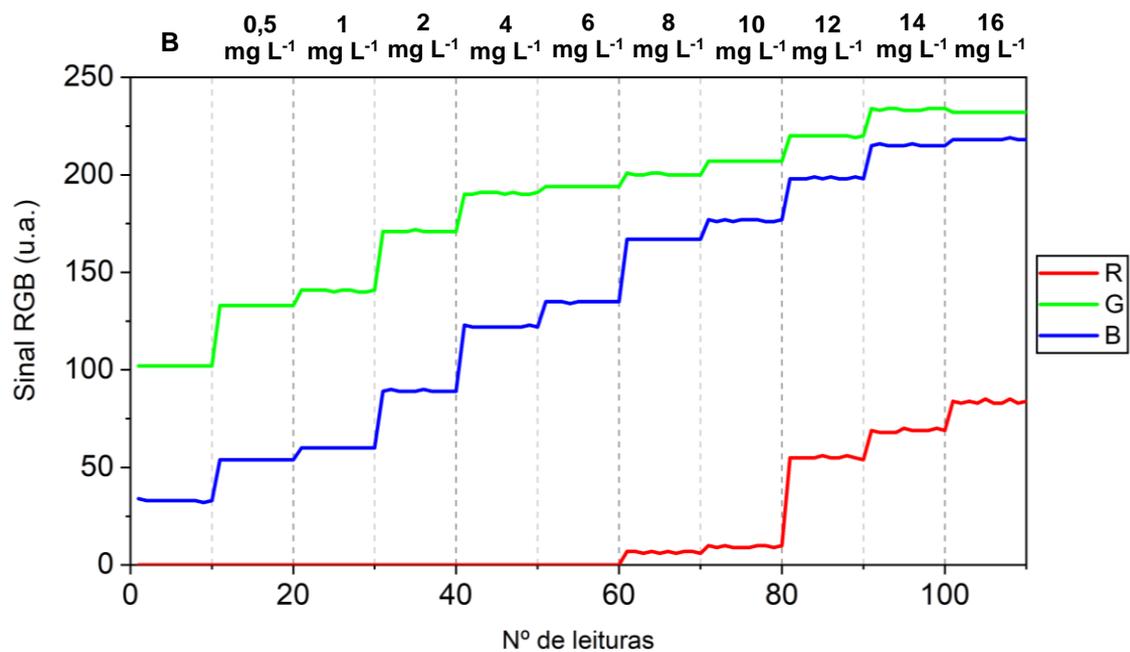


**Figura 18:** Medida de um branco (B) seguido de aplicações cumulativas de 2  $\mu\text{L}$  de padrão 1  $\text{mg L}^{-1}$ .

#### 4.4 Precisão e faixa linear

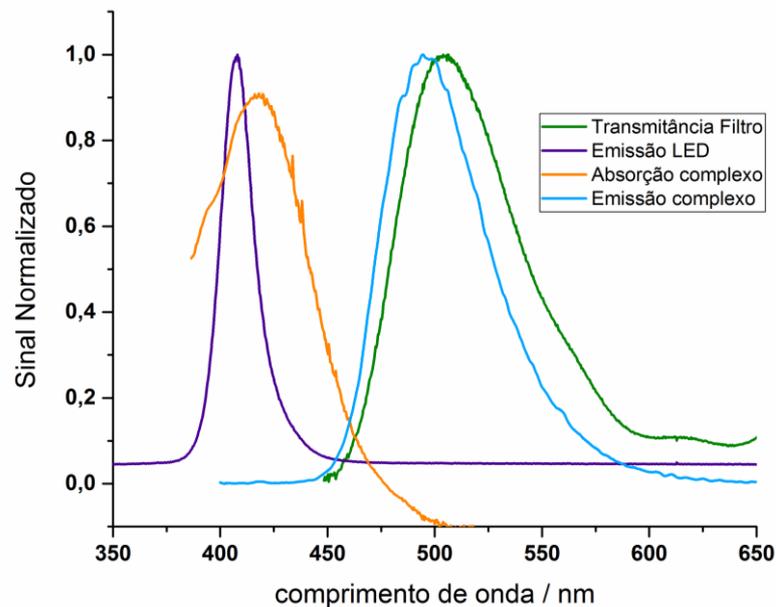
##### 4.4.1 Componente RGB e fluorescência

A Figura 18 mostra as respostas para as componentes R, G e B ao se utilizar soluções padrão com concentrações de 0,5 a 16,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Como pode ser visto, a componente B novamente foi a que proporcionou os melhores resultados para a faixa estudada, sem apresentar saturação do sinal para as maiores concentrações do complexo de alumínio com Morina, sendo então utilizada nos estudos realizados para a determinação do metal.



**Figura 19:** Respostas do instrumento para o branco e padrões com concentrações de 0,5 a 16,0 mg L<sup>-1</sup>.

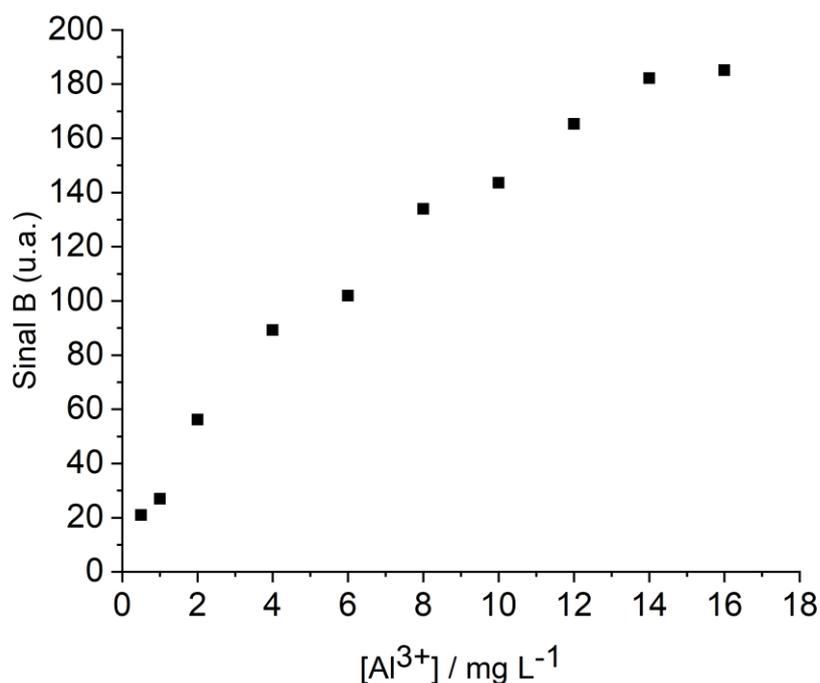
Emissões fluorescentes com o comprimento de onda deslocado para a cor azul são esperadas devido a maior quantidade de etanol usada nas soluções<sup>39</sup>. Como mostram os espectros obtidos usando um espectrômetro UV-visível na Figura 19, a emissão do complexo excitado a 420 nm, apresenta um máximo em 490 nm, correspondente à uma coloração azul esverdeada. Dessa forma, com o uso do filtro de absorção (transmitância 450 nm até 590 nm) e do LED propostos (emissão de 380 nm até 450 nm) há o favorecimento da componente B de RGB como sinal analítico para a detecção.



**Figura 20:** Espectros normalizados obtidos usando espectrômetro UV-visível para transmitância do filtro, emissão do LED, absorção do complexo, emissão do complexo.

#### 4.4.2 Estudo da faixa linear

A região linear de calibração para o método foi avaliada inicialmente com padrões na faixa de concentração de 0,5 a 16 mg L<sup>-1</sup> de alumínio, representado pela Figura 20. Foi observado que com a inclusão de padrões com concentrações acima de 8 mg L<sup>-1</sup> ou abaixo de 1 mg L<sup>-1</sup> as curvas analíticas apresentavam coeficientes de correlação linear (R) abaixo de 0,9 sendo consideradas insatisfatórias para o uso quantitativo. Assim, a faixa selecionada para um estudo mais detalhado da resposta foi de 1,0 a 8,0 mg L<sup>-1</sup> em Al<sup>3+</sup>.

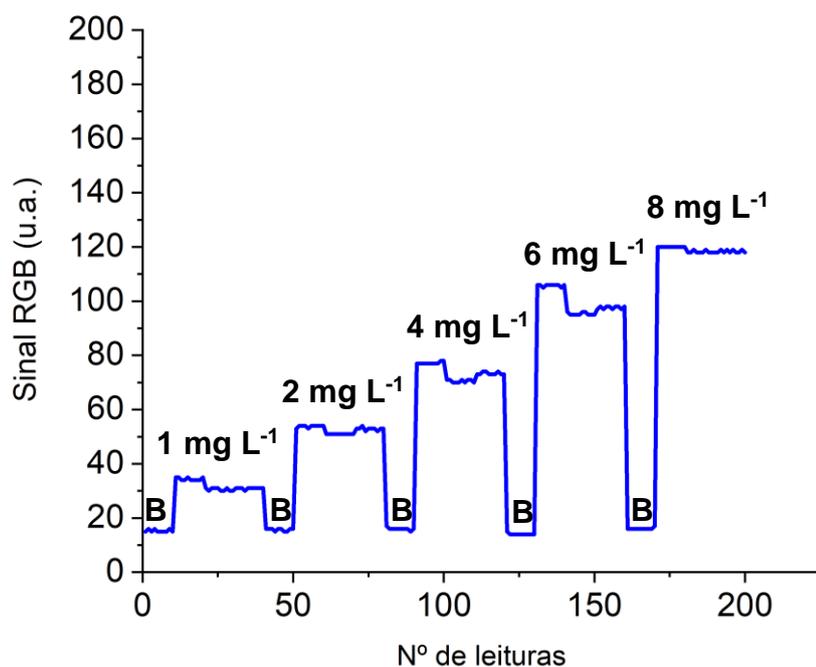


**Figura 21:** Construção de curva analítica para padrões 0,5 a 16 mg L<sup>-1</sup> afim de verificar faixa linear no método.

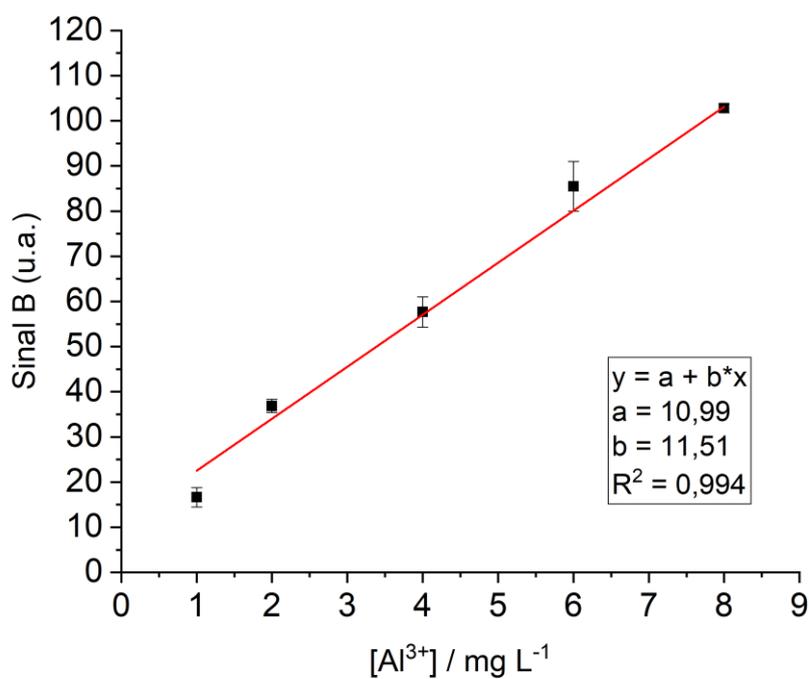
Para uma melhor avaliação da linearidade e precisão do método foi realizada a aplicação dos padrões de 1,0 a 8,0 mg L<sup>-1</sup>, em triplicata, intercalados por uma aplicação da solução do “branco”, produzindo o gráfico de resposta do instrumento representado pela Figura 21. A partir deste registro se construiu a curva analítica da Figura 22 empregando-se o sinal médio para as medidas em triplicata previamente subtraídas do valor do branco.

Como indicado na Figura 22, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi estimado em 0,994, o qual demonstra um comportamento linear adequado para a faixa de concentração estudada. Vale destacar que esse resultado foi obtido através de um instrumento simples, totalmente fabricado no laboratório, e com um dispositivo de papel, o que poderia limitar negativamente o comportamento linear.

Além do comportamento linear, é possível se observar também que a variação das leituras em triplicata foram aceitáveis, com um coeficiente de variação máximo de 13,0% (para o padrão de 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e mínimo de 1,0 % (para o padrão de 8,0 mg L<sup>-1</sup>) conforme lista a Tabela 4.



**Figura 22:** Respostas do instrumento para padrões de alumínio realizando triplicatas das medidas. Branco (B) e valores das concentrações dos padrões acima do sinal.



**Figura 23:** Construção de curva analítica para padrões de alumínio realizando triplicatas das medidas.

**Tabela 4:** Concentração, sinal analítico e coeficiente de variação para curva analítica realizando replicatas das medidas.

Padrão (mg L <sup>-1</sup> )	Sinal B (u.a.)	Coeficiente de variação (%)
1,0	16,6 ± 2,1	13,0
2,0	36,9 ± 1,4	3,8
4,0	57,7 ± 3,4	5,9
6,0	85,5 ± 5,5	6,4
8,0	102,8 ± 1,0	1,0

O limite de detecção instrumental foi estimado pela Equação 1 <sup>46,47</sup> em 0,24 mg L<sup>-1</sup>, utilizando-se o valor da inclinação para uma curva analítica sem a subtração do branco (b) e o valor do desvio padrão da resposta do branco para 5 replicatas ( $\sigma_{dp}$ ), observa-se que esse valor se encontra muito abaixo das concentrações de alumínio observadas nas amostras de antitranspirantes, verificando a adequação do instrumento para esse tipo de análise. O limite de quantificação foi então estimado em 0,72 mg L<sup>-1</sup> através da equação 2 <sup>46,47</sup>.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma_{dp}}{b} = \frac{3,3 \times 0,84}{11,6} = 0,24 \text{ mg L}^{-1}$$

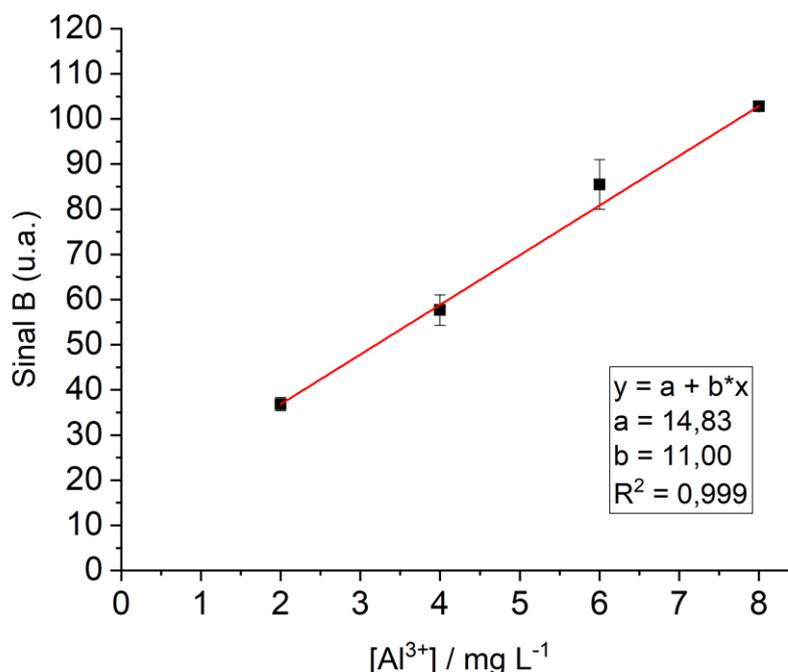
**Equação 1**

$$LQ = \frac{10 \times \sigma_{dp}}{b} = \frac{10 \times 0,84}{11,6} = 0,72 \text{ mg L}^{-1}$$

**Equação 2**

Levando em conta o limite de detecção, coeficiente de variação e uma maior praticidade no preparo das soluções optou-se por realizar as determinações em amostras em uma faixa de concentração de 2,0 a 8,0 mg L<sup>-1</sup>, como mostra Figura 20. Conforme esperado, obteve-se um coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) de 0,999 ao se utilizar um menor número de pontos para a

calibração. Essa melhora na linearidade mostra a adequação da faixa para realização da etapa de determinação das amostras.



**Figura 24:** Construção de curva analítica reduzida para padrões de alumínio realizando triplicatas das medidas.

#### 4.5 Exatidão: determinação de alumínio em antitranspirantes

A Tabela 4 lista os resultados obtidos para a determinação dos teores de cloridrato de alumínio (% m/m) em 10 amostras de antitranspirantes utilizando-se o método proposto e o método de referência por absorção atômica em chama. Como pode ser visto, erros relativos abaixo de 10% foram observados para a maioria das análises (8/10). De fato, realizando a análise de variância (ANOVA) não há diferença significativa ao nível de 95% de confiança se comparando os resultados do método de referência e o instrumento proposto, porém, conforme ilustra a Tabela 4, duas das amostras (L2 e R1) apresentaram erros relativos maiores que 20%, indicando possível efeito de matriz nas análises dessas amostras. Para amostra L2 foi observado a presença da substância fluorescente cumarina na lista de ingredientes, esse composto possui uma emissão máxima em 390 nm <sup>48</sup>, sobrepondo a faixa de absorção do complexo alumínio-Morina, o que pode ocasionar a intensificação da fluorescência e justificar o alto erro

relativo (+29,1%). A amostra R1 apresentou um alto erro relativo negativo (-21,4%), provavelmente devido a interferência do agente espessante hidroxietilcelulose, o qual pode não ter sido eficientemente decomposto durante a abertura da amostra, causando sua deposição na superfície do papel e interferência nos resultados.

Excluindo essas amostras, o método desenvolvido se mostrou efetivo na determinação de alumínio em uma variedade de antitranspirantes, sendo uma alternativa rápida, barata e versátil se comparado com os métodos empregados atualmente <sup>31,32</sup>. Como a legislação brasileira define o limite de 25% base anidra de cloridróxido de alumínio da massa seca do antitranspirantes <sup>30</sup>, se constata a presença de duas amostras de aerossol (A2 e A3) que se encontram em não conformidade, fica evidente a importância de se desenvolver métodos de forma a fiscalizar esses produtos de forma mais rápida e eficiente.

**Tabela 5:** Comparação entre método de referência e instrumento proposto na determinação do teor de cloridróxido de alumínio (% m/m) em 10 amostras de antitranspirantes. Antitranspirantes: líquidos (L), *roll-on* (R), aerossol (A) e creme (C). Média ± Desvio padrão da triplicata.

Amostra	Método de referência	Instrumento Proposto	Erro relativo (%)
L1	3,7 ± 0,1	3,9 ± 0,3	+5,9
L2	3,9 ± 0,1	5,0 ± 0,1	+29,1
L3	3,8 ± 0,1	3,7 ± 0,1	-1,4
R1	9,6 ± 0,1	7,6 ± 1,1	-21,4
R2	7,1 ± 0,1	7,2 ± 0,6	+0,6
R3	13,8 ± 0,3	14,9 ± 0,9	+8,2
A1	14,1 ± 0,3	14,2 ± 3,0	+1,3
A2	41,3 ± 1,0	43,4 ± 2,1	+5,0
A3	44,3 ± 1,0	45,3 ± 3,5	+2,2
C1	13,1 ± 0,2	14,0 ± 0,5	+6,3

## 5. Conclusões

Os estudos demonstraram a possibilidade de uso analítico quantitativo de medidas de fluorescência do complexo alumínio-Morina em dispositivos de papel empregando-se detecção com imagens digitais. Foram realizados estudos sobre as especificidades da técnica, assim como avaliação da precisão e exatidão. Se espera que esse conhecimento seja utilizado para pesquisas futuras no campo.

O instrumento proposto e o aplicativo desenvolvido para o seu controle permitiram a rápida obtenção de informações que podem ser relacionadas com as concentrações do analito, diminuindo os custos das análises, podendo ser utilizado por um usuário pouco treinado e diminuindo o impacto ambiental se comparado com os métodos normalmente utilizados para esse propósito (titulação, espectrometria de absorção atômica por chama). Foi também verificada a aplicação da técnica na determinação de antitranspirantes comerciais, tal como os cuidados no preparo de amostra, métodos de determinação e possíveis erros provenientes da matriz do analito. O instrumento apresentou erros pequenos se comparado com o método de referência, sendo suficiente para verificar a adequação dos produtos conforme a legislação brasileira.

A estimativa do custo total do instrumento foi de aproximadamente R\$ 500,00 (U\$130) (sem incluir o preço do smartphone usado para as medidas), o que permite a sua construção ou aquisição por laboratórios de pequeno porte. O tamanho compacto e o peso de aproximadamente 500 g, poderão permitir o uso do instrumento de maneira portátil para análises em campo.

## 6. Referências Bibliográficas

- (1) 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* **2007**, *46* (8), 1318–1320. <https://doi.org/10.1002/anie.200603817>.
- (2) Akyazi, T.; Basabe-Desmonts, L.; Benito-Lopez, F. Review on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices towards Commercialisation. *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V. February 25, 2018, pp 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.010>.
- (3) Osborn, J. L.; Lutz, B.; Fu, E.; Kauffman, P.; Stevens, D. Y.; Yager, P. Microfluidics without Pumps: Reinventing the T-Sensor and H-Filter in Paper Networks. *Lab Chip* **2010**, *10* (20), 2659–2665. <https://doi.org/10.1039/c004821f>.
- (4) Huangfu, C.; Zhang, Y.; Jang, M.; Feng, L. A MPAD for Simultaneous Monitoring of Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Free Chlorine in Drinking Water. *Sens Actuators B Chem* **2019**, *293*, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.02.092>.
- (5) Chitnis, G.; Ding, Z.; Chang, C.-L.; Savran Acde, C. A.; Ziaie, B. Laser-Treated Hydrophobic Paper: An Inexpensive Microfluidic Platform. *Lab Chip* **2011**, *11* (6), 5. <https://doi.org/10.1039/c0lc00512f>.
- (6) Curto, V. F.; Lopez-Ruiz, N.; Capitan-Vallvey, L. F.; Palma, A. J.; Benito-Lopez, F.; Diamond, D. Fast Prototyping of Paper-Based Microfluidic Devices by Contact Stamping Using Indelible Ink. *RSC Adv* **2013**, *3* (41), 18811–18816. <https://doi.org/10.1039/c3ra43825b>.
- (7) Carrilho, E.; Martinez, A. W.; Whitesides, G. M. Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. *Anal Chem* **2009**, *81* (16), 7091–7095. <https://doi.org/10.1021/ac901071p>.
- (8) Xu, M.; Bunes, B. R.; Zang, L. Paper-Based Vapor Detection of Hydrogen Peroxide: Colorimetric Sensing with Tunable Interface. *ACS Appl Mater Interfaces* **2011**, *3* (3), 642–647. <https://doi.org/10.1021/am1012535>.
- (9) Cate, D. M.; Adkins, J. A.; Mettakoonpitak, J.; Henry, C. S. Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society January 6, 2015, pp 19–41. <https://doi.org/10.1021/ac503968p>.
- (10) Nie, Z.; Deiss, F.; Liu, X.; Akbulut, O.; Whitesides, G. M. Integration of Paper-Based Microfluidic Devices with Commercial

- Electrochemical Readers. *Lab Chip* **2010**, *10* (22), 3163–3169.  
<https://doi.org/10.1039/c0lc00237b>.
- (11) Fan, Y.; Li, J.; Guo, Y.; Xie, L.; Zhang, G. Digital Image Colorimetry on Smartphone for Chemical Analysis: A Review. *Measurement* **2021**, *171*, 108829.  
<https://doi.org/10.1016/J.MEASUREMENT.2020.108829>.
- (12) Byrne, L.; Barker, J.; Ælle Pennarun-Thomas, G.; Diamond, D.; Edwards, S. Digital Imaging as a Detector for Generic Analytical Measurements. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2000**, *19* (8), 517–522. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(00\)00019-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-9936(00)00019-4).
- (13) Grudpan, K.; Kolev, S. D.; Lapanantnopakhun, S.; McKelvie, I. D.; Wongwilai, W. Applications of Everyday IT and Communications Devices in Modern Analytical Chemistry: A Review. *Talanta*. Elsevier B.V. May 1, 2015, pp 84–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.042>.
- (14) Capitán-Vallvey, L. F.; López-Ruiz, N.; Martínez-Olmos, A.; Erenas, M. M.; Palma, A. J. Recent Developments in Computer Vision-Based Analytical Chemistry: A Tutorial Review. *Anal Chim Acta* **2015**, *899*, 23–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009>.
- (15) Feng, L.; Li, H.; Li, X.; Chen, L.; Shen, Z.; Guan, Y. Colorimetric Sensing of Anions in Water Using Ratiometric Indicator-Displacement Assay. *Anal Chim Acta* **2012**, *743*, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.041>.
- (16) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; West, D. M.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica: Tradução Da 9ª Edição Norte-Americana, 2ª.*; Cengage Learning Brasil, 2015.
- (17) Nery, E. W.; Kubota, L. T. Sensing Approaches on Paper-Based Devices: A Review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer September 23, 2013, pp 7573–7595.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-6911-4>.
- (18) Yu, H.; Tan, Y.; Cunningham, B. T. Smartphone Fluorescence Spectroscopy. *Anal Chem* **2014**, *86* (17), 8805–8813.  
<https://doi.org/10.1021/ac502080t>.
- (19) McCracken, K. E.; Tat, T.; Paz, V.; Yoon, J. Y. Smartphone-Based Fluorescence Detection of Bisphenol A from Water Samples. *RSC Adv* **2017**, *7* (15), 9237–9243. <https://doi.org/10.1039/c6ra27726h>.
- (20) Wang, Y.; Wang, S.; Ge, S.; Wang, S.; Yan, M.; Zang, D.; Yu, J. Ultrasensitive Chemiluminescence Detection of DNA on a Microfluidic Paper-Based Analytical Device. In *Monatshefte fur*

*Chemie*; Springer, 2014; Vol. 145, pp 129–135.  
<https://doi.org/10.1007/s00706-013-0971-1>.

- (21) Sivakumar, R.; Lee, N. Y. Paper-Based Fluorescence Chemosensors for Metal Ion Detection in Biological and Environmental Samples. *BioChip Journal* **2021**, *15* (3), 216–232. <https://doi.org/10.1007/S13206-021-00026-Z>.
- (22) Vaid, F. H. M.; Zahid, S.; Faiyaz, A.; Qadeer, K.; Gul, W.; Anwar, Z.; Ahmad, I. Photolysis of Methylcobalamin in Aqueous Solution: A Kinetic Study. *J Photochem Photobiol A Chem* **2018**, *362*, 40–48. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEM.2018.05.011>.
- (23) Yaroshevsky, A. A. Abundances of Chemical Elements in the Earth's Crust. *Geochemistry International* **2006**, *44* (1), 48–55. <https://doi.org/10.1134/S001670290601006X>.
- (24) Berthon, G. Aluminium Speciation in Relation to Aluminium Bioavailability, Metabolism and Toxicity. *Coord Chem Rev* **2002**, *228* (2), 319–341. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00021-8).
- (25) Darbre, P. D. Aluminium, Antiperspirants and Breast Cancer. *J Inorg Biochem* **2005**, *99* (9), 1912–1919. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2005.06.001>.
- (26) Pineau, A.; Fauconneau, B.; Sappino, A. P.; Deloncle, R.; Guillard, O. If Exposure to Aluminium in Antiperspirants Presents Health Risks, Its Content Should Be Reduced. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2014**, *28* (2), 147–150. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2013.12.002>.
- (27) Novack, D. E.; Yu, J.; Adler, B. L. Aluminum: The 2022 American Contact Dermatitis Society Allergen of the Year. *Cutis* **2022**, *110* (1), 21–24. <https://doi.org/10.12788/CUTIS.0566>.
- (28) Pinheiro NASCIMENTO, L.; Platchek RAFFIN, R.; Stanisçuaski GUTERRES, S. Aspectos Atuais Sobre a Segurança No Uso de Produtos Antiperspirantes Contendo Derivados de Alumínio. *Infarma* **2004**, *16* (7/8).
- (29) Mendonça, E. *Brasileiros desembolsam R\$ 11,6 bilhões por ano em desodorantes*. Cosmetic Innovation. <https://cosmeticinnovation.com.br/brasileiros-desembolsam-r-116-bilhoes-por-ano-em-desodorantes/> (accessed 2022-07-26).
- (30) ANVISA. *RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 530, DE 4 DE AGOSTO DE 2021*. Diário Oficial da União (DOU). <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n-530-de-4-de-agosto-de-2021-337561674> (accessed 2023-04-21).

- (31) Sedwick, V.; Leal, A.; Turner, D.; Bakarr Kanu, A. Quantitative Determination of Aluminum in Deodorant Brands: A Guided Inquiry Learning Experience in Quantitative Analysis Laboratory. *J Chem Educ* **2018**, *95* (3), 451–455.  
[https://doi.org/10.1021/ACS.JCHEMED.7B00336/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ED-2017-00336T\\_0004.GIF](https://doi.org/10.1021/ACS.JCHEMED.7B00336/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ED-2017-00336T_0004.GIF).
- (32) Anvisa. *Guia de Controle De Qualidade de Produtos Cosméticos*, 2<sup>a</sup> edição.; 2008.
- (33) Silvestre, A. L. P.; Milani, M. I.; Rossini, E. L.; Pezza, L.; Pezza, H. R. A Paper Platform for Colorimetric Determination of Aluminum Hydrochloride in Antiperspirant Samples. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2018**, *204*, 432–435.  
<https://doi.org/10.1016/J.SAA.2018.06.049>.
- (34) Abughrin, S. E. H.; Alshana, U.; Caleb, J. Smartphone Digital Image Colorimetry for the Determination of Aluminum in Antiperspirant Products. *Article in Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.18828>.
- (35) Pereira, W. L.; Oliveira, T. T.; Kanashiro, M.; Costa, M. R. Ação Antiproliferativa do Flavonoide Morina e Do Extrato Da Folha de Oliveira (*Olea europaea* L.) Contra a Linhagem de Célula H460. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2015**, *17* (4), 798–806.  
[https://doi.org/10.1590/1983-084X/14\\_020](https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_020).
- (36) Will, F. Fluorometric Determination of Aluminum in the Partper-Billion Range. *Anal Chem* **2002**, *33* (10), 1360–1362.  
<https://doi.org/10.1021/AC60178A024>.
- (37) Browne, B. A.; McColl, J. G.; Driscoll, C. T. Aluminum Speciation Using Morin: I. Morin and Its Complexes with Aluminum. *J Environ Qual* **1990**, *19* (1), 65–72.  
<https://doi.org/10.2134/JEQ1990.00472425001900010008X>.
- (38) Domínguez-Renedo, O.; Marta Navarro-Cuñado, A.; Ventas-Romay, E.; Asunción Alonso-Lomillo, M. Determination of Aluminium Using Different Techniques Based on the Al(III)-Morin Complex. *Talanta* **2019**, *196*, 131–136.  
<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.12.048>.
- (39) Alonso-Mateos, A.; Almendral-Parra, M. J.; Curto-Serrano, Y.; Rodríguez-Martín, F. J. Online Monitoring of Aluminium in Drinking Water with Fluorimetric Detection. *Journal of Fluorescence* **2007**, *18*:1 **2007**, *18* (1), 183–192. <https://doi.org/10.1007/S10895-007-0262-5>.
- (40) Pereira, D. O. S. Sistema Controlado Por Smartphone Para Detecção de Fluorescência Em Dispositivo de Papel Baseada Em

Imagens Digitais, 2021. <https://bdm.unb.br/handle/10483/30592> (accessed 2023-06-18).

- (41) Ni, J.; Khan, Z.; Wang, S.; Wang, K.; Haider, S. K. Automatic Detection and Counting of Circular Shaped Overlapped Objects Using Circular Hough Transform and Contour Detection. *Proceedings of the World Congress on Intelligent Control and Automation (WCICA) 2016, 2016-September*, 2902–2906. <https://doi.org/10.1109/WCICA.2016.7578268>.
- (42) Sigut, J.; Castro, M.; Arnay, R.; Sigut, M. OpenCV Basics: A Mobile Application to Support the Teaching of Computer Vision Concepts. *IEEE Transactions on Education* **2020**, 63 (4), 328–335. <https://doi.org/10.1109/TE.2020.2993013>.
- (43) Papadopoulos, A.; Assimomytis, N.; Varvaresou, A. Sample Preparation of Cosmetic Products for the Determination of Heavy Metals. *Cosmetics 2022, Vol. 9, Page 21* **2022**, 9 (1), 21. <https://doi.org/10.3390/COSMETICS9010021>.
- (44) *Forward, Reverse, Repetitive, & Heterogeneous Sample Pipetting | Thermo Fisher Scientific - BR*. Thermo Fisher. <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/lab-plasticware-supplies/lab-plasticware-supplies-learning-center/lab-plasticware-supplies-resource-library/fundamentals-of-pipetting/proper-pipetting-techniques/forward-reverse-repetitive-heterogeneous-sample-pipetting.html> (accessed 2023-03-05).
- (45) Suominen, I.; Koivisto, S. *Increasing Precision When Pipetting Protein Samples: Assessing Reliability of the Reverse Pipetting Technique | American Laboratory*. American Laboratory. <https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/1133-Increasing-Precision-When-Pipetting-Protein-Samples-Assessing-Reliability-of-the-Reverse-Pipetting-Technique/> (accessed 2023-03-05).
- (46) INMETRO. *Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos*; 2016.
- (47) ANVISA. *RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166*. Diário Oficial da União (DOU).
- (48) Marcolan, M.; Martins, P. A.; Pedrosa, V. A.; Rodrigues, M. R.; De Oliveira, H. P. M.; Codognoto, L. Spectrofluorimetric Determination of Coumarin in Commercial Tablets. *J Fluoresc* **2011**, 21 (2), 733–738. <https://doi.org/10.1007/S10895-010-0763-5/TABLES/1>.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE  
DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifique e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 04 de julho de 2023.

Assinatura do/a discente: \_\_\_\_\_

Programa: Programa de Pós-graduação em Química

Nome completo: Dênis Omael Silva Pereira

Título do Trabalho: DETERMINAÇÃO DE ALUMÍNIO EM  
ANTITRANSPIRANTES EMPREGANDO DISPOSITIVOS DE  
PAPEL COM DETECÇÃO FLUORIMÉTRICA POR IMAGENS  
DIGITAIS

Nível: ( X ) Mestrado ( ) Doutorado

Orientador/a: Alexandre Fonseca