

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Desenvolvimento de sensores inovadores fluorescentes e dispositivos
microfluídicos baseados em algodão para a determinação de metais em
diversas matrizes**

Claudinéia Rosa da Silva Oliveira
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

CLAUDINÉIA ROSA DA SILVA OLIVEIRA

Desenvolvimento de sensores inovadores fluorescentes e dispositivos microfluídicos baseados em algodão para a determinação de metais em diversas matrizes

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Willian Toito Suarez

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48d
2025

Oliveira, Claudinéia Rosa da Silva, 1993-

Desenvolvimento de sensores inovadores fluorescentes e dispositivos microfluídicos baseados em algodão para a determinação de metais em diversas matrizes / Claudinéia Rosa da Silva Oliveira. – Viçosa, MG, 2025.

1 tese eletrônica (192 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Willian Toito Suarez.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.427>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Água - Poluição - Medição. 2. Água - Teor de elementos traços - Medição. 3. Fluorescência. 4. Chumbo. 5. Cobre. 6. Cobalto. I. Suarez, Willian Toito, 1976-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 628.161

CLAUDINÉIA ROSA DA SILVA OLIVEIRA

Desenvolvimento de sensores inovadores fluorescentes e dispositivos microfluídicos baseados em algodão para a determinação de metais em diversas matrizes

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2025.

Assentimento:

Claudinéia Rosa da Silva Oliveira
Autora

Willian Toito Suarez
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 27/06/2025 às 17:33:58 e pelo orientador em 27/06/2025 às 17:36:45. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **5UX6.HT5H.W793** e clique no botão 'Validar documento'.

Aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, por me acompanhar e me guiar em todos os caminhos que eu pense em seguir e, principalmente, por sempre me mostrar que tudo na vida tem um motivo para acontecer, ainda que não saibamos o porquê em cada momento.

Aos meus pais, Aparecida e Luiz (in memoriam), por sempre acreditarem no meu potencial e não medirem esforços para que eu pudesse chegar onde estou. Aos meus irmãos Claudia e Claudeci por sempre comemorarem comigo e me incentivarem e, em especial a Clarisse que está sempre presente, puxando orelha, revisando meus textos, me incentivando a ser uma pessoa melhor, por compartilhar momentos e experiências, além de vibrar comigo em todas as conquistas. Eu amo vocês!

Ao meu orientador Willian Toito Suarez pelo aprendizado, pelos novos desafios a mim atribuídos e a confiança depositada para realização deste trabalho.

Aos membros da banca Josiane, Thaís Balbino, José Neto e Ricardo por aceitarem o convite para participarem da banca de defesa de doutorado. Ao professor Sérgio e suas orientandas Amanda e Anna Luisa, do Departamento de Química da UFV, pela parceria e colaboração neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de análise de alimentos, fármacos e amostras ambientais, LPbioFAM, Jéssica, Marcos, Iare, Edileuza, Taty, Gislaíne, Wesley, Gioavana, Beatriz e Lorryne pela agradável convivência, amizade e aprendizado, e em especial a Gabriela, Davi, Ana e Lucas pela ajuda e suporte na realização deste trabalho. A Josik pela amizade desde a graduação, pela amizade em todos os projetos que nos proponhamos a fazer e por sempre se mostrar solícita em qualquer dúvida que eu tivesse. E por sempre se fazer presente mesmo de longe.

Aos meus velhos e novos amigos, em especial a Camila Sales, Vini, Marcio, Marcinha, Camila Dias, Stefany, Clarys, Tamara, Naty, Patty, Taty e Karine por todo amparo, alegrias, papos aleatórios e muito sérios, vocês foram e são cruciais para cada ciclo na minha vida. Obrigada, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho! À tubaína, os amigos mais sebosos e inteligentes.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

OLIVEIRA, Claudinéia Rosa da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2025. **Desenvolvimento de sensores inovadores fluorescentes e dispositivos microfluídicos baseados em algodão para a determinação de metais em diversas matrizes.** Orientador: Willian Toito Suarez.

A presença de metais potencialmente tóxicos em água e em alimentos causa preocupações ambientais e de saúde pública. Os metais tóxicos, uma vez que podem acarretar consequências negativas para o meio ambiente, como a redução da flora e a contaminação dos recursos hídricos, e para os seres humanos, podem sofrer variadas doenças, incluindo câncer, problemas neurológicos e até morte devido à exposição ou ingestão de água e alimentos contaminados. Assim, esta pesquisa se justifica pela indiscutível importância de desenvolver estratégias confiáveis e rápidas para detectar e quantificar metais potencialmente tóxicos. Para isso, foram elaborados três métodos analíticos distintos para a determinação desses metais. O Capítulo 1 apresenta uma revisão sobre luminescência e a síntese de um sensor fluorimétrico. No Capítulo 2, é proposto um método fluorimétrico para a determinação de chumbo (II) em amostras de água, solo, urina e saliva sintética. O Capítulo 3 oferece uma revisão detalhada sobre métodos analíticos baseados em imagem, abordando a coleta e o tratamento dos dados. O Capítulo 4 descreve o desenvolvimento de um método baseado em fluorescência por imagem digital, utilizando um dispositivo portátil de algodão, para a determinação de cobre (II) em águas e cachaça. Por fim, o Capítulo 5 apresenta um método baseado em imagem digital, a partir de uma reação colorimétrica, para a determinação de cobalto (II) em amostras de água destilada e água de torneira.

Palavras-chave: detecção fluorimétrica; fluorescência; bis-iminas tiazóis; bis-iminas; metais potencialmente tóxicos; chumbo (II); cobalto (II); cobre (II); imagem digital; fio de algodão

ABSTRACT

OLIVEIRA, Claudinéia Rosa da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2025. **Development of innovative fluorescent sensors and cotton-based microfluid devices for the determination of metals in various matrices.** Adviser: Willian Toito Suarez.

The presence of potentially toxic metals in water and food raises environmental and public health concerns. These toxic metals can cause negative consequences for the environment, such as reduced flora and contamination of water resources, and for humans, leading to various diseases, including cancer, neurological issues, and even death from exposure or ingestion of contaminated water and food. Thus, this research is justified by the undeniable importance of developing reliable and rapid strategies for detecting and quantifying potentially toxic metals. To achieve this, three distinct analytical methods were developed for determining these metals. Chapter 1 presents a review of luminescence and the synthesis of a fluorimetric sensor. In Chapter 2, a fluorimetric method is proposed for determining lead (II) in water, soil, urine, and synthetic saliva samples. Chapter 3 offers a detailed review of analytical methods based on imaging, addressing data collection and treatment. Chapter 4 describes the development of a method based on digital image fluorescence, using a portable cotton device, for determining copper (II) in water and cachaça. Finally, Chapter 5 presents a method based on digital imaging from a colorimetric reaction for determining cobalt (II) in distilled water and tap water samples.

Keywords: fluorimetric detection; fluorescence; thiazole bis-imines; bis-imines; potentially toxic metals; lead (II); cobalt (II); copper (II); digital imaging; cotton thread

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática para configuração de spins nos orbitais para o estado fundamental e para os estados excitados, singleto e tripleto (multiplicidade do spin).....	23
Figura 2. Diagrama de Jablonski de energia de um processo fotoluminescente, sendo representado a energia (E), o estado fundamental singleto (S ₀), estado excitado singleto (S ₁), estado excitado tripleto (T ₁) e λ _n com n = 1, 2, 3, 4, correspondentes a comprimentos de onda variáveis.....	24
Figura 3. Esquema para síntese da <i>bis</i> -iminas tiazóis a partir de uma molécula de tiocarbazida, um aldeído aromático e 2-bromoacetofenona, em que X e Ar são grupos que podem ser substituídos.	27
Figura 4. Aldeídos utilizados para síntese das <i>bis</i> -iminas tiazóis T1, T2 e T3, respectivamente.	28
Figura 5. As moléculas T1, T2 e T3 da classe <i>bis</i> -iminas tiazóis com a representação por cor de cada componente da reação multicomponente, em azul advém do aldeído utilizado para cada molécula, em verde corresponde a tiocarbazida e em vermelho da 2-bromoacetofenona.	29
Figura 6. Estrutura geral de alguns heterociclos, iminas e tiazol <i>bis</i> -iminas.	39
Figura 7. Espectro infravermelho (FT-IR) da tiocarboidrazina.	44
Figura 8. Espectro de massa (IE, 70 eV) da tiocarboidrazina.	44
Figura 9. Espectro RMN de ¹ H (300 MHz; DMSO-d ₆ ; δ _{DMSO} 2.49) da tiocarboidrazina. ..	45
Figura 10. Espectro RMN de ¹³ C (75 MHz; DMSO-d ₆ ; δ _{DMSO} 39.5) da tiocarboidrazina. ...	45
Figura 11. Síntese das <i>bis</i> -iminas tiazóis T1, T2 e T3.	46
Figura 12. Moléculas sintetizadas e denominadas T1, T2 e T3.	47
Figura 13. Espectros de absorção das moléculas T1 (linha preta), T2 (linha vermelha) e T3 (linha azul) obtidos por espectroscopia UV-VIS.....	49
Figura 14. Intensidade luminescente das moléculas T1, T2 e T3, no comprimento de onda de excitação de 490, 480 e 430 nm, respectivamente, e comprimento de onda de emissão de 500, 485 e 455 nm, respectivamente.	52
Figura 15. Estudo de seletividade e pH das moléculas (A) T1 a 1,25 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ (B) T2 a 1,02 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ e (C) T3 a 1,14 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , tempo de integração de 3s, tempo de reação = 3 min, n = 3. Concentrações de íons metálicos de 1,25 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹	54
Figura 16. Intensidade luminescente para T3 com comprimento de onda de emissão em 455 nm em função do tempo em minutos, em pH 3 (n =3).....	57

Figura 17. Diferença entre as intensidades fluorescentes da <i>bis</i> imina tiazol T3 na presença de Pb ²⁺ (1,25 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) com emissão a 455 nm em função do tempo em minutos, pH 3, com n = 3.....	58
Figura 18. Gráfico de barras da intensidade de fluorescência da <i>bis</i> -imina tiazol T3, sem a presença de Pb ²⁺ , em função das adições de NaCl 0,1 mol L ⁻¹ , tempo de reação = 3 min, n = 3.	59
Figura 19. Estudo da concentração da molécula T3.....	60
Figura 20. Método de Job para a determinação da razão estequiométrica de T3-Pb ²⁺	61
Figura 21. Espectro UV do complexo T3-Pb ²⁺ e do T3.	61
Figura 22. Espectro de fluorescência em função das concentrações de Pb ²⁺ . Inseto: curva de calibração linear e linha de melhor ajuste para Pb ²⁺ na faixa de concentração de 0 µg L ⁻¹ a 10 µg L ⁻¹ (n = 3).	63
Figura 23. Diagrama de níveis de energia eletrônico molecular	76
Figura 24. Espectro infravermelho para T1.....	77
Figura 25. Espectro de massa (IE, 70 eV) para T1.....	77
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz; CDCl ₃ ; δ _{CHCl₃} 7,26) para T1.....	78
Figura 27. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz; CDCl ₃ ; δ _{CHCl₃} 77,00) para T1.....	78
Figura 28. Espectro de infravermelho para T2.....	79
Figura 29. Espectro de massa (IE, 70 eV) para T2.....	79
Figura 30. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz; CDCl ₃ ; δ _{CHCl₃} 7,26) para T2.....	80
Figura 31. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz; CDCl ₃ ; δ _{CHCl₃} 77,00) para T2.	80
Figura 32. Espectro de infravermelho para T3.....	81
Figura 33. Espectro de massas (IE, 70 eV) para T3.....	81
Figura 34. Espectro RMN de ¹ H (300 MHz; CDCl ₃ ; δ _{CHCl₃} 7,26) para T3.....	82
Figura 35. Espectro RMN de ¹³ C NMR (75 MHz; CDCl ₃ ; δ _{CHCl₃} 77,00) para T3.....	82
Figura 36. A) Emprego do fenômeno da reflectância utilizado pelo método DIB, através da captura pela câmera do smartphone da radiação refletida pela amostra e posterior uso do sistema RGB para decomposição da imagem e quantificação do analito; B) Empregos do fenômeno da transmitância/absorbância utilizando um espectrofotômetro UV-Vis com seus principais componentes internos	87
Figura 37. Representação esquemática do A) cubo para o sistema de cores RGB e do B) prisma para o sistema HSV	89
Figura 38. Vista da tela das interfaces dos softwares (A) ImageJ no ambiente Windows de um computador e dos aplicativos (B) PhotoMetrix e (C) ColorGrab em um smartphone	92

Figura 39. Número de publicações por ano (1990-2022) obtidos da plataforma <i>Web of Science</i> , utilizando a palavra-chave “ <i>digital image</i> ” para diversas áreas da ciência (A), em particular para química (B) e ensino de química (C).....	97
Figura 40. Síntese da <i>bis</i> -tiocarbazona (B2COOH)	113
Figura 41. Aparato utilizado para determinação do íon metálico via FDIB.	115
Figura 42. Dispositivo μ TAD desenvolvido para a detecção sensível de íons de Cu(II).....	116
Figura 43. Micrografia do (A) fio tratado; (B) com a molécula B2COOH; (C) B2COOH – CMC; (D) B2COOH – CMC - tampão pH7 – Cu(II) em 100x e 500x.	119
Figura 44. Curva de TG e DTG para decomposição térmica do dispositivo criado. Parâmetros experimentais: 0,2 μ L de B2COOH a 2,5 g L ⁻¹ , 10 μ L de CMC a 1% (m/v) e 5 μ L de tampão pH 7.	120
Figura 45. Espectros FTIR para o fio de algodão (FdA), CMC, molécula B2COOH, B2COOH_CMC (0,2 μ L de B2COOH a 2,5 g L ⁻¹ , 10 μ L de CMC a 1% (m/v)) e B2COOH_CMC (0,2 μ L de B2COOH a 2,5 g L ⁻¹ , 10 μ L de CMC a 1% (m/v), 5 μ L de tampão pH 7, 15 μ L de Cu(II) 79 mg L ⁻¹).	121
Figura 46. Influência da fita dupla face de fundo amarelado (A), fundo transparente (B) e fundo branco (C). Parâmetros experimentais: 0,2 μ L de B2COOH 5g L ⁻¹ , 5 μ L de tampão pH 7, 15 μ L de solução de Cu(II) 79 mg L ⁻¹ , tempo de reação: 8 minutos para resposta fora da câmara UV (figuras do lado esquerdo) e 10 minutos dentro da câmara UV (lado Direito).	123
Figura 47. Representação da estrutura da CMC baseada no polímero de celulose β -(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosose.....	123
Figura 48. O efeito causado pela adição inicial da B2COOH (5 g L ⁻¹) (A) comparado ao experimento onde à adição inicial foi do CMC (B) em concentrações de 1, 2 e 3%. Parâmetros experimentais: 0,2 μ L de B2COOH 5g L ⁻¹ , volume variável de CMC, 5 μ L de tampão pH 7, 15 μ L de solução de Cu(II) 79 mg L ⁻¹ , tempo de reação 10 minutos.	124
Figura 49. Estudo da variação do volume de CMC adicionado. Parâmetros experimentais: 0,2 μ L de B2COOH 5g L ⁻¹ , volume variável de CMC 1% (m/v), 5 μ L de tampão pH 7, 15 μ L de solução de Cu(II) 79 mg L ⁻¹ , tempo de reação:10 minutos.	125
Figura 50. Efeito da concentração de B2COOH variando de 1 a 10 g L ⁻¹ . Parâmetros experimentais: 0,2 μ L de B2COOH com concentração variável, 10 μ L de CMC 1% (m/v), 5 μ L de tampão pH 7, 15 μ L de solução de cobre II (79 mg L ⁻¹), tempo de reação: 10 minutos. ..	126
Figura 51. Efeito da concentração de B2COOH variando de 1 a 10 g L ⁻¹ nos dispositivos.	126
Figura 52. Comparação da resposta analítica entre os canais para diferentes concentrações de B2COOH.	127

Figura 53. Estudo do volume de amostra. Parâmetros experimentais: 0,2 µL de B2COOH 2,5 g L ⁻¹ , 10 µL de CMC 1% (m/v), 5 µL de tampão pH 7, volume variável da solução de Cu(II) (79 mg L ⁻¹), tempo de reação: 10 minutos.....	128
Figura 54. Influência do tempo de reação. Parâmetros experimentais: 0,2 µL de B2COOH 2,5 g L ⁻¹ , 10 µL de CMC 1% (m/v), 5 µL de tampão pH 7, 15 µL de solução padrão de Cu(II) 79 mg L ⁻¹	129
Figura 55. Influência do pH para formação do complexo formado. Parâmetros experimentais: 0,2 µL de B2COOH 2,5 g L ⁻¹ , 10 µL de CMC 1% (m/v), 5 µL de tampão com pH variável, 15 µL de solução padrão de Cu(II) 79 mg L ⁻¹ , tempo de reação 25 minutos.	130
Figura 56. Influência do pH para formação do complexo formado. Sendo a coluna esquerda referente aos brancos de cada pH e a coluna direita referente ao fio com a adição de cobre. 130	
Figura 57. Avaliação da seletividade. Parâmetros experimentais: 0,2 µL de B2COOH 2,5 g L ⁻¹ , 10 µL de CMC 1% (m/v), 5 µL de tampão pH 7, 15 µL de solução padrão de cada metal de concentração 1,25 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , tempo de reação 25 minutos.....	132
Figura 58. Estudo da interferência na determinação de Cu(II) (<i>n</i> = 3). Parâmetros experimentais: 0,2 µL de B2COOH a 2,5 g L ⁻¹ , 10 µL de CMC a 1% (m/v), 5 µL de tampão pH, 15 µL de solução padrão contendo metais interferentes e íons de Cu(II), ambos a uma concentração de 1,25 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , com tempo de reação de 25 minutos.	132
Figura 59. Curva analítica preparada a partir da adição crescente de Cu(II) em uma faixa de trabalho 1 a 50 mg L ⁻¹ , analisada em função do -log (G/G ₀) (A) e da diferença de intensidade inicial (G ₀) pela intensidade das amostras (ΔG = G ₀ – G)(B).	134
Figura 60. Curva analítica no µTAD para a molécula B2COOH em mg L ⁻¹	135
Figura 61. Espectro de fluorescência com excitação em 436 nm para a molécula B2COOH. Condições experimentais: Tempo de integração 3s, tempo de reação 10 min.....	136
Figura 62. Espectro no IV (reflectância) da <i>bis</i> -tiocarbazona (B2COOH).	151
Figura 63. Espectro de massas (1E, 70eV) da <i>bis</i> -tiocarbazona (B2COOH).	151
Figura 64. Espectro de RMN de ¹ H (300,069 MHz; DMSO; δDMSO 2,49) da <i>bis</i> -tiocarbazona.	152
Figura 65. Espectro de RMN de ¹³ C (75,459 MHz; DMSO; δDMSO 39,5) da <i>bis</i> -tiocarbazona (B2COOH).	153
Figura 66. Curva analítica para matriz aquosa (A) e matriz alcoólica (B) através do método de referência FAAS.	154
Figura 67. Aparato desenvolvido para captura de imagens utilizando o método DIB, com um smartphone posicionado na parte superior da caixa. O µTAD é centralizado na base de madeira	

para garantir o alinhamento com o foco da câmera, enquanto o LED proporciona iluminação controlada, garantindo precisão na aquisição das imagens.	161
Figura 68. Síntese da bis-tiosemicarbazona B-2OH a partir da reação entre 2-carboxibenzaldeído e tiosemicarbazida, utilizando ácido acético e etanol como catalisadores.	161
Figura 69. Dispositivo μ TAD para detecção de Co^{2+} , composto por uma fita dupla face de 5 cm com uma região de interesse (ROI) de 3 cm onde ocorre a reação colorimétrica.	162
Figura 70. Espectro infravermelho para o fio de algodão (FdA) e para o fio contendo a molécula $2,5 \text{ g L}^{-1}$, CMC (1%), tampão pH 8 e Co(II) utilizado para construção do dispositivo μ TAD.	165
Figura 71. Curva de TG e DTG para decomposição térmica do μ TAD contendo molécula B2OH, CMC, tampão pH 8 e Cobalto (50 mg L^{-1}).	165
Figura 72. Estudo da concentração de CMC para a formação de uma barreira adsorvente para a formação do complexo entre a molécula e o cobalto (II).	166
Figura 73. Avaliação do volume de CMC. Parâmetros analíticos: $0,3 \mu\text{L}$ de B-2OH e volume variável de CMC foram adicionados à ROI, juntamente com $5 \mu\text{L}$ de tampão de pH 8 e $15 \mu\text{L}$ de Cobalto (73 mg L^{-1}) na extremidade esquerda. Tempo de reação: 10 min.	167
Figura 74. Estudo do volume da amostra. Parâmetros analíticos: $0,3 \mu\text{L}$ de B-2OH e $10 \mu\text{L}$ de CMC foram adicionados à ROI, juntamente com $5 \mu\text{L}$ de tampão de pH 8 e volume variável de Cobalto (73 mg L^{-1}) na extremidade esquerda. Tempo de reação: 10 min.	168
Figura 75. Efeito da concentração do ligante. Parâmetros analíticos: $0,3 \mu\text{L}$ de B-2OH (concentração variável em g L^{-1}) e $10 \mu\text{L}$ de CMC foram adicionados à ROI, juntamente com $5 \mu\text{L}$ de tampão de pH 8 e $15 \mu\text{L}$ da solução de cobalto (73 mg L^{-1}) na extremidade esquerda. Tempo de reação: 10 min.	169
Figura 76. Estudo do tempo de reação entre a molécula de <i>Bis</i> -tiocarbazida e cobalto. Parâmetros analíticos: $0,3 \mu\text{L}$ de B-2OH (2 g L^{-1}) e $10 \mu\text{L}$ de CMC (1%) foram adicionados à ROI, juntamente com $5 \mu\text{L}$ de tampão de pH 8 e $15 \mu\text{L}$ de solução de cobalto (73 mg L^{-1}) na extremidade esquerda.	169
Figura 77. Estudo da seletividade do μ TAD para a determinação de metais, Canal R (A), R/R ₀ (B), Canal G (C), G/G ₀ (D), Canal R (E) e R/R ₀ (F). Parâmetros analíticos: $0,3 \mu\text{L}$ de B-2OH (2 g L^{-1}) e $10 \mu\text{L}$ de CMC (1%) foram adicionados à ROI, juntamente com $5 \mu\text{L}$ de tampão de pH 8 e $15 \mu\text{L}$ do íon metálico ($1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na extremidade esquerda. Tempo de reação: 10 min.	171

Figura 78. Estudo dos potenciais interferentes no μ TAD para a determinação de cobalto. Parâmetros analíticos: 0,3 μ L de B-2OH (2 g L ⁻¹), 10 μ L de CMC (1%), 5 μ L de tampão de pH 8 e 15 μ L da solução contendo cobalto e o interferente (6×10^{-4} mol L ⁻¹). Tempo de reação: 10 min. (n = 3).....	172
Figura 79. Curva analítica obtida para a determinação de cobalto via μ TAD DIB.	173
Figura 80. Espectro de massa (EI, 70 eV) da bis-tiocarbazona B-2OH.	189
Figura 81. Espectro FTIR (reflexão) da tiocarbazona B-2OH.	189
Figura 82. Espectro de RMN de ¹ H (300,069 MHz; DMSO; δ DMSO 2,49) da bis-tiocarbazona B-2OH.	190
Figura 83. Espectro de RMN de ¹³ C (75,459 MHz; DMSO; δ DMSO 39,5) da bis-tiocarbazona B-2OH.	191

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de prioridade de substâncias da ATSDR 2022	30
Tabela 2. Limites máximos de chumbo estabelecidos para água e vinho de acordo com o órgão regulamentar.	31
Tabela 3. Parâmetros avaliados, seu intervalo e impacto na resposta analítica.....	50
Tabela 4. Estudo de interferência na determinação de Pb^{2+} ($n = 3$) com a molécula T3 em pH 3.	56
Tabela 5. Desvio padrão relativo (RSD) em três níveis de concentração ($n = 12$).	62
Tabela 6. Determinação de chumbo em amostras reais utilizando o método proposto, incluindo o estudo de recuperação.....	64
Tabela 7. Dados de desempenho dos métodos para comparação na determinação de Pb^{2+}	66
Tabela 8. Determinação de chumbo em amostras pelo método proposto e pelo método de referência.	66
Tabela 9. Comparação dos resultados do presente estudo com os relatados na literatura.....	67
Tabela 10. Parâmetros avaliados e impacto na resposta analítica	122
Tabela 11. Comparação dos parâmetros analíticos das curvas.....	133
Tabela 12. Desvio padrão relativo (RSD) obtidos para análise de concentração de Cu(II) em três níveis de concentração ($n = 12$).	136
Tabela 13. Determinação de Cu(II) em amostras reais utilizando o FDIB a partir do teste de recuperação.....	138
Tabela 14. Determinação de cobre em amostras pelo método de referência e pelo método proposto.	141
Tabela 15. Comparação entre o método proposto e outros estudos reportados na literatura.	142
Tabela 16. Tabela Comparativa entre os métodos estudados para determinação de Cu^{2+}	153
Tabela 17. Desvio padrão relativo em três níveis de concentração ($n = 10$) para a determinação de cobalto.....	174
Tabela 18. Recuperação de cobalto em amostras de água ($n = 3$) utilizando o método μ TAD DIB.	174
Tabela 19. Tabela comparativa de desempenho analítico do sensor construído para detecção de cobalto.	175
Tabela 20. Determinação de cobalto utilizando o método proposto e o método de referência.	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variação
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
T2	<i>N</i> -(2-cianobenzilideno)-2-((2-cianobenzilideno)hidrazono)-4-fentiazol-3(2 <i>H</i>)-amina
T3	<i>N</i> -(2-nitrobenzilideno)-2-((2-nitrobenzilideno)hidrazono)-4-fentiazol-3(2 <i>H</i>)-amina
T1	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(2-cianobenzilideno)-2-(((<i>E</i>)-2-cianobenzilideno)hidrazono)-4-fentiazol-3(2 <i>H</i>)-amina
UV-Vis	Radiação ultravioleta visível
λ_{EMS}	Comprimento de onda de emissão
λ_{EXC}	Comprimento de onda de excitação
π^*	Orbital pi anti-ligante
π	Orbital pi ligante
<i>n</i>	Orbital não ligante
RSD	Desvio padrão relativo
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
OIV	<i>International Organisation of Vine and Wine</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
INTERNACIONAL	

SUMÁRIO

CÁPITULO I.....	21
LUMINESCÊNCIA E CHUMBO	21
1. Espectroscopia de luminescência	22
2. As <i>bis</i> -iminas tiazóis	27
3. Determinação de chumbo.....	29
REFEÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	32
CÁPITULO II	37
SÍNTESE VERDE DE <i>BIS</i> -IMINAS TIAZOL COMO SENSOR FLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM AMOSTRAS AMBIENTAIS, BIOLÓGICAS E ALIMENTARES	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MÉTODO EXPERIMENTAL	40
2.1. Reagentes e amostra.....	40
2.2. Preparação de amostras	41
2.3. Caracterizações.....	41
2.3.1. Luminescência.....	41
2.3.2. Espectrometria de UV-Vis	42
2.3.3. Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier	42
2.3.4. Espectrometria de massa	42
2.4. Síntese de tiocarbazida.....	42
2.5. Dados espectroscópicos da tiocarboidrazina	43
2.6. Síntese de <i>bis</i> -iminas tiazol.....	46
2.7. Dados espectroscópicos das <i>bis</i> -iminas tiazol	47
2.8. Estudos da <i>bis</i> imina tiazol T1, T2 e T3 para uso como sonda fluorescente	48
2.9. Estudo da seletividade, pH e interferentes.....	49
2.10. Otimização das condições de reação	50

2.11. Detecção de Fluorescência de Pb^{2+} utilizando T3	50
2.12. Rendimento Quântico	51
2.13. Parâmetros analíticos	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1. Luminescência das moléculas.....	52
3.2. Seletividade, pH e interferência.....	53
3.3. Estudo da estabilidade da luminescência de T3.....	56
3.4. Eficiência Quântica.....	57
3.5. Estudo do tempo de reação	57
3.6. Efeito da força iônica na fluorescência de T3.....	59
3.7. Estudo da concentração de T3	60
3.8. Reação de determinação estequiométrica T3/ Pb^{2+}	60
3.9. Validação do método	62
3.10. Determinação de Pb^{2+} em amostras	63
3.11. Comparação com o método de referência para quantificação de Pb^{2+}	65
4. CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO I.....	76
CÁPITULO III.....	83
MÉTODOS BASEADOS EM IMAGEM DIGITAL	83
1. INTRODUÇÃO	84
2. Conhecendo um pouco mais sobre imagens e processamento de imagens digitais.....	88
2.1. Sistema RGB	88
2.2. Sistema CMY e CMYK	89
2.3. Sistema HSV	90
3. Aparatos para a captura das imagens digitais	90
4. Aplicativos e softwares para a conversão das imagens em sistema numérico.....	92

4.1. Aquisição e tratamento dos dados do DIB	93
5. Uso da imagem digital em trabalhos acadêmicos	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
CÁPITULO IV.....	109
SÍNTESE DE <i>BIS</i> -TIOCARBAZONA COMO SENSOR EM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE (II) EM ÁGUA, CACHAÇA E CHÁ DE MAÇÃ VIA IMAGENS DIGITAIS DE FLUORESCÊNCIA	109
1. INTRODUÇÃO	110
2. MÉTODO EXPERIMENTAL	112
2.1. Reagentes e amostras	112
2.2. Síntese da <i>bis</i> -tiocarbazona.....	113
2.3. Caracterização <i>bis</i> -tiocarbazona	114
2.4. Caracterização do μ TAD desenvolvido	114
2.5. Aparatos e software para captura de fluorescência RGB	115
2.6. Desenvolvimento de sensor μ TAD e Quantificação de Cu^{2+} utilizando análise RGB	116
2.7. Otimização das condições ideais	116
2.8. Parâmetros analíticos	117
3. RESULTADOS.....	117
3.1. Caracterizações	117
3.1.1. Caracterização da B2COOH	117
3.1.2. Caracterização do μ TAD	118
3.1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura	118
3.1.2.2. Análise termogravimétrica	118
3.1.2.3. Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier	120
3.2. Otimização do método	121
3.2.1. Influência da fita dupla face.....	122
3.2.2. Influência da concentração de carboximetilcelulose	123
3.2.3. Influência do volume de carboximetilcelulose	124

3.2.4. Influência da concentração da molécula B ₂ COOH.....	125
3.2.5. Influência do volume de amostra.....	127
3.2.6. Influência do tempo de reação	128
3.2.7. Influência do pH	129
3.3. Método de validação	131
3.3.1. Seletividade e Interferência	131
3.3.2. Linearidade, Limite de detecção e limite de quantificação	133
3.3.3. Precisão	136
3.3.4. Exatidão	137
3.4. Comparação com o método de referência.....	138
4. CONCLUSÃO	142
REFERÊNCIAS.....	143
ANEXO II.....	151
CÁPITULO V	155
DISPOSITIVO μ TAD BASEADO EM BIS-TIOCARBAZONA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COBALTO EM ÁGUA VIA ANÁLISE DE DIGITAL	155
INTRODUÇÃO	156
2. MATERIAL E METODOS	159
2.1. Preparação das soluções e amostra.....	159
2.2. Caracterização do fio de algodão	159
2.3. Método DIB.....	160
2.4. Síntese de Bis-Tiocarbazona.....	160
2.5. Caracterização da molécula	161
2.6. Detecção de íons de cobalto por μ TAD	162
2.9. Otimização do método	162
2.10. Parâmetros analíticos	162
3. RESULTADOS.....	163

3.1. Caracterizações.....	163
3.1.2. Caracterização do μ TAD.....	164
3.1.2.1. Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier	164
3.1.2.2. Análise termogravimétrica	164
3.2. Otimização do método	166
3.2.2. Volume de CMC	166
3.2.3. Volume de amostra.....	167
3.2.4. Estudo da concentração da molécula B-2OH.....	168
3.2.5. Estudo do tempo de reação.....	168
3.3. Parâmetros analíticos.....	170
3.3.1. Seletividade	170
3.3.2. Interferência	172
3.3.3. Linearidade.....	173
3.3.4. Precisão	174
3.3.5. Recuperação	174
3.4. Comparação do método proposto com outros métodos da literatura.....	175
4. CONCLUSÃO	177
REFERÊNCIAS.....	178
ANEXO III.....	189
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	192

CÁPITULO I

LUMINESCÊNCIA E CHUMBO

1. Espectroscopia de luminescência

A espectroscopia de luminescência molecular é composta por um conjunto de três métodos nomeados como fluorescência, fosforescência e quimiluminescência. Estes métodos estão relacionados, uma vez que, se referem a formação de uma nova espécie quando a molécula inicial é excitada, a partir daí é possível realizar análises qualitativas e/ou quantitativas a respeito do analito [1].

Segundo Skoog *et al.* (2007) [1], a quimiluminescência é fenômeno de radiação que uma molécula excitada pode emitir durante uma reação química. Isso se esclarece quando essa radiação emitida é advinda de uma reação, sendo a molécula excitada o produto dela. Esse fenômeno pode acontecer durante a reação de oxi-redução conforme citado por Huang *et al.* (2021)[2].

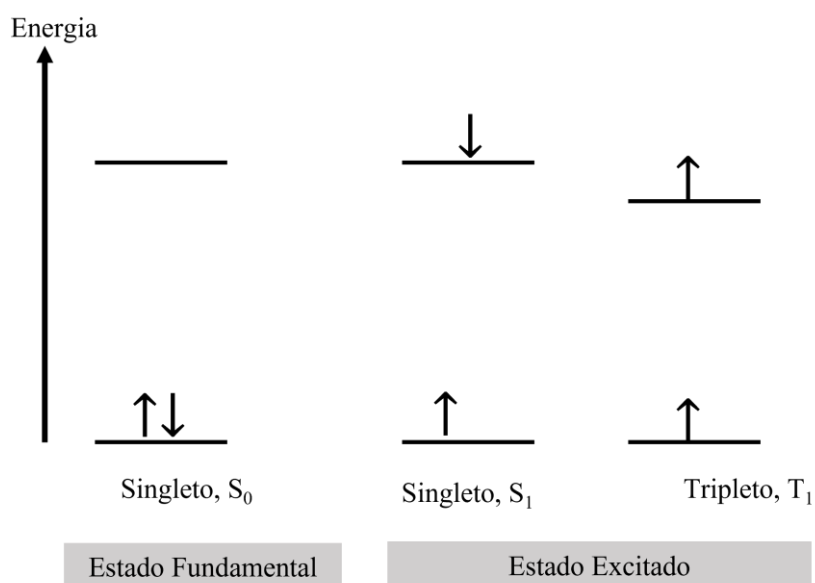
A fluorescência e fosforescência podem ser nomeadas como fotoluminescência, uma vez que a excitação das espécies é feita por absorção de fótons [1]. No entanto, se diferem no processo de transição eletrônicas devido a mudança de spin eletrônico.

De acordo com princípio de exclusão de Pauli, “dois elétrons de um átomo não podem ter os mesmos números quânticos”, devido a isso apenas dois elétrons devem ocupar um orbital com spins opostos. Quando o elétron está no estado fundamental é denominado como S_0 , no entanto, quando este elétron é excitado ele pode assumir o estado singleto excitado dado por S_1 (um orbital com maior energia) ou o estado tripleto, T_1 (orbital de menor energia), em que o spin do elétron promovido é invertido, Figura 1 [3].

De acordo com Figura 2, encontra-se o diagrama de Jablonski para os processos fotoluminescentes, como a fluorescência e fosforescência. Na borda inferior da figura tem-se o nível S_0 representando o estado fundamental singleto. No comprimento de onda λ_1 ocorre o fenômeno de absorção, seguido pelo momento em que os elétrons são excitados para um estado excitado singleto dado por S_2 . Durante este processo, intercorre a relaxação vibracional (setas onduladas em vermelho), favorecendo uma transição a partir de um nível de energia mais baixo.

Em sequência, na mesma figura, acontece o processo não radioativo quando há superposição de níveis de energia com mesma multiplicidade de spins, denominado de conversão interna (seta ondulada azul claro) [4]. Este processo se conduz até o estado excitado singleto, S_1 , que comporta o comprimento de onda λ_2 , na qual também acontece a mudança entre os níveis vibracionais devido ao relaxamento vibracional, advindos do processo de absorbância.

Figura 1. Representação esquemática para configuração de spins nos orbitais para o estado fundamental e para os estados excitados, singlete e tripleto (multiplicidade do spin).



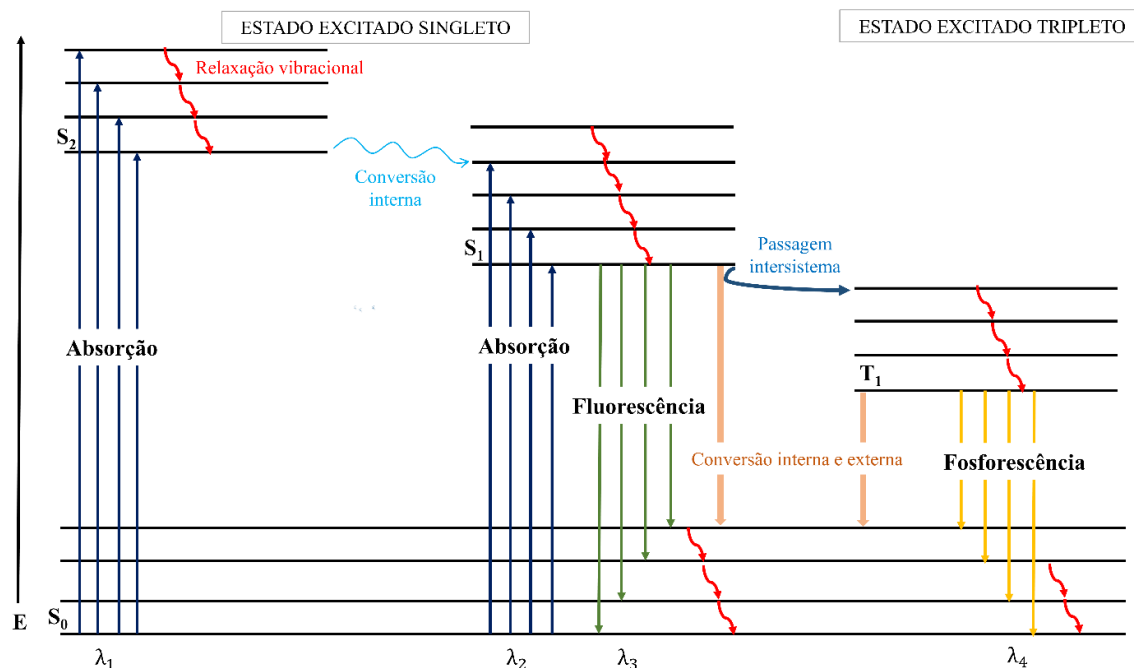
Fonte: adaptado de SOUZA *et al.* (2008).

Ademais, neste comprimento de onda, a excitação normalmente produzirá a banda de fluorescência, dada em λ_3 . Pode-se considerar que λ_2 é maior que λ_3 , e em λ_3 acontece o retorno dos elétrons do estado excitado singlete para o estado fundamental com a mesma orientação de spins, característica de uma transição com emissão de radiação permitida, esse processo é então denominado fluorescência. A fluorescência possui um tempo de vida curto, ou seja, o tempo médio da excitação e o retorno para o estado fundamental está na faixa de nanosegundos, que podem cessar em 10^{-5} s [1,5].

Entretanto, a partir do S₁ ocorre um cruzamento ou passagem intersistemas, que apresenta transições não radioativas que, diferente da conversão interna, envolve a multiplicidade de spin diferentes, característico de processos não permitidos. A passagem intersistemas, acontece entre o estado excitado singlete para o estado excitado tripleto, T₁, onde ocorre o processo de fosforescência. Entre os processos de fluorescência e fosforescência ocorre a conversão interna e externa (representados em setas laranjas), na qual baseia-se nos processos intermoleculares e a desativação de um estado eletrônico excitado por meio do contato da molécula com outras soluções.

Segundo Lakowicz (2006)[5], a fosforescência se baseia na orientação do spin do elétron fundamental em relação ao processo final de emissão de luz a partir dos estados excitados tripletos, os spins do orbital excitado possuem a mesma orientação de spin que o elétron no estado fundamental.

Figura 2. Diagrama de Jablonski de energia de um processo fotoluminescente, sendo representado a energia (E), o estado fundamental singlete (S_0), estado excitado singlete (S_1), estado excitado tripleto (T_1) e λ_n com $n = 1, 2, 3, 4$, correspondentes a comprimentos de onda variáveis.



Fonte: adaptado de SKOOG *et al.*, 2007.

Uma molécula fosforescente emite luz por um período longo, mesmo após a fonte de excitação ter sido interrompida, de mesmo modo que se vê em brinquedos que brilham no escuro ou em tomadas antigas. Dessa forma o tempo de vida seria na faixa milissegundos, em uma taxa de 10^3 a 10^0 s^{-1} , podendo chegar a horas, ou seja, o retorno acontece lentamente para estado fundamental de energia [5].

A fluorescência se difere da fosforescência devido a diferença de tempo de vida e aos processos de emissão, na qual, a fluorescência acontece envolvendo os estados eletrônicos da mesma multiplicidade de spins enquanto a fosforescência, envolve estados de multiplicidades de spins diferentes [4].

Segundo, Martelli *et al.* (2018)[6], uma molécula pode ser excitada por pulsos de radiação, na qual seu espectro é dado pelo tempo de decaimento do estado eletrônico excitado ou a espécie pode ser excitada por uma radiação contínua, de tal modo que obtém-se os espectros eletrônicos de emissão e excitação.

Para medirmos a resposta analítica da fluorescência, utilizamos o espectrofotômetro de fluorescência que detecta todo o espectro de fluorescência para todos os comprimentos de onda dentro do espectro de excitação [7]. O espectro é formado devido a presença de um monocromador, um de excitação e um de emissão, que faz uma varredura de espectro, além disso pode-se selecionar o comprimento de onda desejado para uma análise [1]. Ademais, é necessário uma fonte de excitação (tais como, a lâmpada de mercúrio, xenônio e LEDs) e um detector (tubo fotomultiplicador) [6].

Contudo, alguns fatores podem afetar a fluorescência, tais como o rendimento quântico ou eficiência quântica (ϕ), o tipo de transição, a estrutura da molécula, o efeito do solvente, da temperatura, pH, concentração e a presença de um agente supressor.

Eficiência quântica ou rendimento quântico, ϕ , expressa a razão entre a quantidade de luz ou número de fótons emitida e a quantidade de luz ou número de fótons que são absorvidos, como expresso na equação 1.

$$\phi = \frac{\text{Número de fótons emitidos}}{\text{Número de fótons absorvidos}} = \frac{K_f}{K_n} \quad (1.0)$$

Segundo Skoog *et al.* (2007)[1], a eficiência quântica também pode ser expressa de acordo com as constantes de velocidades relativas dos processos quando o estado singleto é desativado, assim, K_f se refere a fluorescência, enquanto K_n se refere ao somatório das velocidades de fluorescência, cruzamento intersistema, conversão externa, conversão interna, pré-dissociação e dissociação. Desta forma, de modo qualitativo, para valores de K_f altos e K_n baixo favorecerá para o aumento da fluorescência.

A transição também é um fator que pode afetar a fluorescência da molécula, isso acontece devido ao tempo de vida médio, de tal forma que, as transições de $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (maior eficiência quântica) são favorecidas, pois são menos energéticas e possuem o tempo de vida menor [1].

A fluorescência tem como influência a estrutura da molécula, bem como a sua rigidez, sendo típico de moléculas que possuem grupos aromáticas, tais como: quinina, laranja de acridina, rodamina B, pireno, fluorobenzeno, lisozima, isoquinolina, indol entre outros; e dificilmente resultará de absorção de radiação em comprimentos de onda menores que 250 nm, resultando no aumento da eficiência [4,5,8].

No entanto a eficiência pode ser reduzida com o aumento da temperatura, uma vez que, em altas temperaturas ocorre o aumento das colisões das moléculas, favorecendo a desativação por conversão externa ($S_1 \rightarrow S_0$) e diminui a viscosidade da solução. De mesmo modo, algumas

moléculas podem ter sua eficiência reduzida quando inserida em solventes com átomos pesados, pois favorecerá na formação de um estado tripleto, causando um decréscimo na fluorescência [1].

Algumas moléculas aromáticas podem sofrer influência do valor de pH, isso porque em meio ácido ou básico apresentam formas ressonantes, devido a sua protonação ou desprotonação, que depende da constante de dissociação do composto. Isso acontece, pois o valor da constante de dissociação no estado fundamental é diferente no estado excitado [1]. Devido a isso, cada molécula sofre uma interferência específica, ou seja, para algumas o pH ácido pode aumentar a intensidade fluorescência, enquanto outras o pH alcalino poderia aumentar.

Além do valor de pH, a concentração também pode influenciar na intensidade de fluorescência. Uma vez que, a fluorescência é detectada a partir do feixe de luz que é direcionado para solução contendo uma molécula, pode-se considerar que a intensidade da fluorescência está relacionada proporcionalmente a potência radiante do feixe de excitação que é absorvido, Equação 2.0.

Essa consideração, possibilita a relação com a concentração quando a lei de Beer é reescrita em termos de potência, Equação 3.0. Em que F é a potência de emissão de fluorescência, P é potência após atravessar uma distância b do meio, P₀ é a potência do feixe que incide na solução, ϕ é a constante dependente da eficiência quântica do processo de fluorescência, ϵ é a absorvidade molar das moléculas e c a concentração da molécula emissora [1].

$$F = \phi(P_0 - P) \quad (2.0)$$

$$F = \phi P_0 (1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (3.0)$$

Desta forma, a partir de cálculos matemáticos envolvendo o termo exponencial, a Equação 3.0 pôde ser reescrita conforme a Equação 4.0, uma vez que, considerou-se o termo P₀ constante e $2,3\phi\epsilon b = K$. Assim, quando os valores da concentração forem baixos, espera-se um comportamento linear em gráficos de potência de fluorescência em relação a concentração.

$$F = Kc \quad (4.0)$$

No entanto, a linearidade pode ser perdida quando a concentração se torna grande (e apresenta absorvância maior que 0,05), quando ocorre muitas colisões entre as moléculas excitadas (auto-supressão) e quando o comprimento de onda de emissão se sobrepõe a um pico de absorção (auto-absorção). Tais fatores podem reduzir a intensidade de fluorescência, sendo chamada de extinção da fluorescência [1,5].

Desse modo, o estudo da fluorescência pode seguir duas vertentes, a extinção da intensidade ou o acréscimo da intensidade fluorescente, que podem ser realizadas através da formação de complexos com metais de transição, por exemplo. Em ambos os casos, baixas concentrações geram alta linearidade e possuem alta sensibilidade.

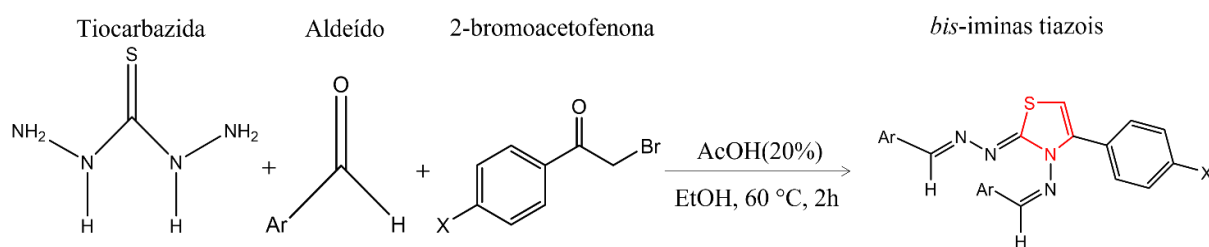
2. As *bis*-iminas tiazóis

As *bis*-iminas tiazóis foram sintetizadas pela primeira vez em 2017 por SHKOOR *et al.*, (2017) [9] através de uma reação multicomponentes (RMC), a partir da tiocarbazida, aldeído aromático e 2-bromoacetofenona em solução de etanol com ácido acético (organocatalisador) sob as condições de 60 °C por 2h, Figura 3.

A síntese proposta por Barros *et al.* (2021)[10], que foi utilizada neste trabalho, possui semelhanças a rota sintética desenvolvida por Shkoor *et al.*, (2017) e Srikanth *et al.* (2020) [9,12], ambas utilizam o conceito de RMC, na qual ocorre transformações químicas com três ou mais reagentes para síntese do produto final [13]. Este procedimento, tem como vantagem a facilidade na adição dos reagentes, de tal forma que não há prioridade na ordem de adicionar os reagentes, de modo que todos os componentes adicionados deverão estar presentes no produto.

A Figura 3, esquematiza o processo de síntese da molécula *bis*-iminas tiazóis a partir da RMC, em que X presente na estrutura do 2-bromoacetofenona pode ser substituído por H ou Br, sendo o hidrogênio utilizado. O aldeído utilizado pode assumir substituintes diferentes dado por Ar = C₆H₅-, *p*-CH₃C₆H₄-, *p*-(CH₃)₂NC₆H₄-, 2-Furyl- e 2-Thienyl, por exemplo. Na Figura há um segmento em vermelho, indicando a estrutura do grupo tiazóis, sendo está o núcleo das *bis*-iminas tiazóis e um grupo rico em aplicabilidades.

Figura 3. Esquema para síntese da *bis*-iminas tiazóis a partir de uma molécula de tiocarbazida, um aldeído aromático e 2-bromoacetofenona, em que X e Ar são grupos que podem ser substituídos.



Ar = C₆H₅; *p*-CH₃C₆H₄; *p*-(CH₃)₂NC₆H₄; 2-Furyl; 2-Thienyl

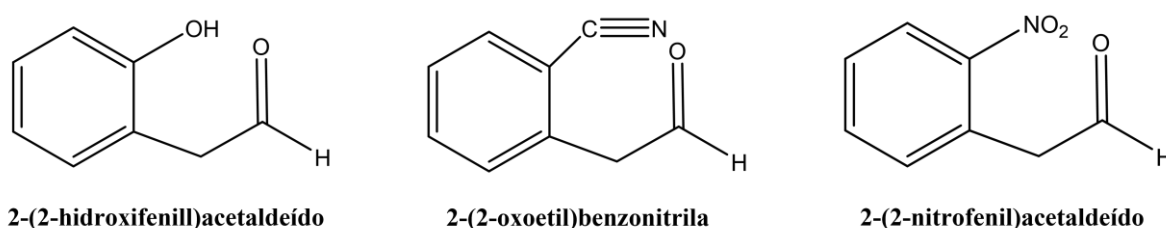
X = H, Br

Fonte: Adaptado de BARROS *et al.*, (2021) e SHKOOR *et al.* (2017).

A síntese foi realizada utilizando como fonte de aquecimento o forno micro-ondas, sendo este um dos diferenciais de sua síntese, uma vez que, torna o processo mais rápido e econômico. Além disso, Barros *et al.* (2021)[10] associa sua síntese como uma metodologia viável ao meio ambiente, se adequando a alguns conceitos da Química verde, principalmente pelo uso de solventes verdes e curto tempo de reação.

A partir dos aldeídos 2-(2-hidroxifenil)acetaldeído, 2-(2-oxoetil)benzonitrila e 2-(2-nitrofenil)acetaldeído, vide Figura 4, tem-se a formação das moléculas de interesse deste estudo, as moléculas T1, T2 e T3, respectivamente. A abreviação T1, T2 e T3, se refere as moléculas com nomenclatura (*E*)-*N*-(2-cianobenzilideno)-2-(((*E*)-2-cianobenzilideno)hidrazono)-4-fentiazol-3(2*H*)-amina; *N*-(2-cianobenzilideno)-2-((2-cianobenzilideno)hidrazono)-4-fentiazol-3(2*H*)-amina; *N*-(2-nitrobenzilideno)-2-((2-nitrobenzilideno)hidrazono)-4-fentiazol-3(2*H*)-amina, respectivamente.

Figura 4. Aldeídos utilizados para síntese das *bis*-iminas tiazóis T1, T2 e T3, respectivamente.



Fonte: autoria própria.

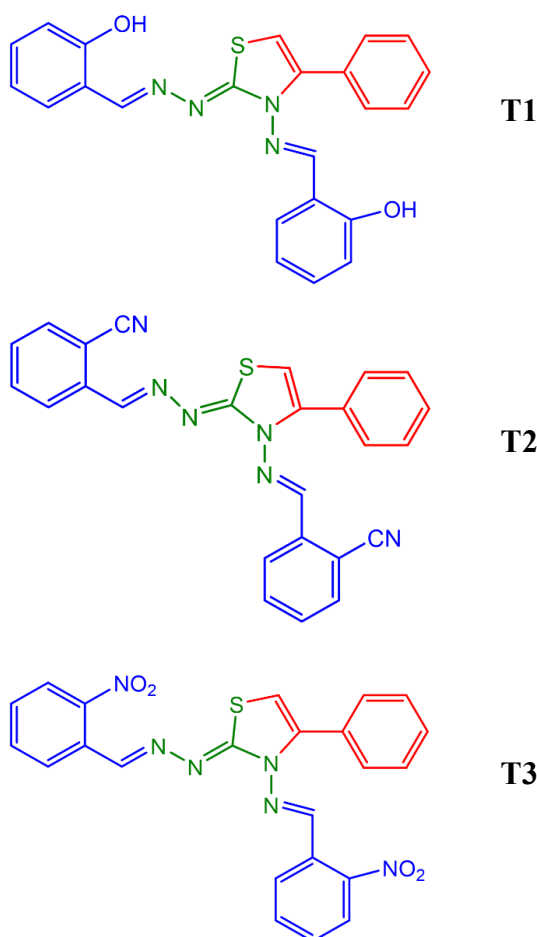
Pode-se ver as moléculas T1, T12 e T3 em sua fórmula estrutural na Figura 5, na qual é possível visualizar cada componente utilizado na RMC, a partir dos aldeídos mencionados anteriormente. Assim, em azul observa-se o aldeído, em verde corresponde a tiocarbazida e em vermelho da 2-bromoacetofenona.

O grupo tiazol presente na estrutura, possui diversas aplicabilidades, na química medicinal [14,15], na inibição da monoamina oxidase [16], antibacteriana [17], antimalárica [18] e anticancerígeno [19]. Além disso, a presença de duas iminas com grupos funcionais próximos, permite a coordenação de íons metálicos na estrutura [20]. Devido a essas propriedades, grupos *bis*-iminas são utilizadas para estabilização de tetrilomilidenos [21], reações de catálise [22,23], catálise assimétrica [24], fluorescência [25,26] e voltametria cíclica [25].

Ademais, na área da saúde também são aplicadas, como na detecção de cloridrato de cocaína [27] e anticancerígenas [28]. Por este motivo acredita-se que as *bis*-iminas tiazóis

podem conferir similaridade nestes quesitos, sendo necessário e importante que pesquisas e estudos sejam realizados.

Figura 5. As moléculas T1, T2 e T3 da classe *bis*-iminas tiazóis com a representação por cor de cada componente da reação multicomponente, em azul advém do aldeído utilizado para cada molécula, em verde corresponde a tiocarbazida e em vermelho da 2-bromoacetofenona.



Fonte: autoria própria.

3. Determinação de chumbo

O chumbo (Pb) é um elemento químico localizado na tabela periódica, família 14 no sexto período, está classificado como um metal representativo, possui número atômico 82 e massa atômica de 207,2 u. Esse elemento é tóxico e pode ser encontrado facilmente devido suas fontes naturais e antropogênicas [29]. O Pb é sólido a temperatura ambiente, possui temperatura de fusão de 327°C, possui coloração cinza metálica ou azulado quando exposto a luz e apresenta 11,29 gcm⁻³ de densidade.

O Pb é encontrado de forma natural a partir das emissões vulcânicas e névoas aquáticas [30] ou inserido no meio ambiente devido a produção de baterias, pigmentos, combustão de

combustíveis fósseis (quando a gasolina continha chumbo), fundição, atividades de mineração, construção civil, tintas, refinarias petroquímicas, indústrias químicas ou até mesmo pelo uso de fertilizantes minerais, entre outros [31–33].

De acordo com a Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR) [34] a cada 2 anos é criada uma lista com os elementos que apresentam o potencial mais significativo para saúde humana devido à sua toxicidade. E neste ano, 2022, o chumbo foi ranqueado em 2º lugar como elemento que necessita de priorização devido ao alto potencial de exposição humana [34], Tabela 1.

Tabela 1. Lista de prioridade de substâncias da ATSDR 2022

Rank 2022	Nome da substância	Pontos totais
1	Arsênio	1675
2	Chumbo	1531
3	Mercúrio	1455
4	Cloridrato de vinil	1355
5	Bifenilas policloradas	1342
6	Benzeno	1328
7	Cádmio	1317
8	Benzo(a)pireno	1306
9	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	1277
10	Benzo(b)fluoratenos	1255

Fonte: adaptado de ATSDR, 2022. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2022spl>

A contaminação pode acontecer devido as redes hidráulicas de casas ou edifícios conterem chumbo, esse elemento é considerado um dos mais perigosos para saúde humana de crianças e bebês, isso porque elas conseguem absorver cerca de 50% do chumbo que venha a ser ingerido, que acumula nos ossos, conservando-se por muitos anos [35,36]. O chumbo pode influenciar no sistema neurológico, nos rins e na circulação sanguínea, que inclusive é o meio de transporte do metal no ser humano [37]. Em adultos, a contaminação pode ser eliminada a partir de duas semanas, no entanto pode ser distribuído pelo cérebro, rins, fígado e também ocorre o processo de acumulação do metal nos ossos e dentes [30,38].

Logo, nota-se a importância na determinação e quantificação deste metal no meio ambiente, bem como em alimentos e bebidas. Para isso, pode-se fazer uso de diversas técnicas, tais como a espectroscopia de fluorescência a laser [39], adsorção [31], UV-Vis e cromatografia

líquida de alta performance (HPLC) [40], absorção via espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) [30,41], biosensor fluorescente [42] e métodos eletroquímicos [43].

A potencialidade tóxica do metal em água e em alimentos tem gerado uma grande preocupação nos setores ambiental e de saúde pública, uma vez que pode acarretar consequências negativas tanto para o meio ambiente, como a redução da flora e a contaminação dos recursos hídricos, como para os seres humanos, causando variadas doenças, inclusive câncer, e até morte devido à exposição ou ingestão dos recursos mencionados. Assim, esta pesquisa justifica-se pela inegável importância de buscar estratégias confiáveis, e que gerem resultados de forma rápida, para identificar e quantificar esse metal. Para isso, torna-se imprescindível a regulamentação dos limites de chumbo que pode estar presente em alimentos e bebidas, para que a contaminação por estes seja minimizada.

Os limites permitidos pelos órgãos WHO, CONAMA, MINISTÉRIO DA SAÚDE são listados com o nível máximo de 10 ppb para os dois primeiros e 1 ppb para água potável. Uma vez que, raramente se encontra água potável contaminada por este metal perante seu tratamento, e sim pela contaminação das tubulações residenciais. Uma outra matriz, que merece atenção é o vinho, muito consumida por adultos, esta é regulamentada pela OIV (*Organisation of Vine and Wine*) e a Legislação Brasileira (Decreto Federal nº. 99.066/ 08-03-1990), na qual estabelecem nível máximo de 150 ppb e 300 ppb, respectivamente.

Tabela 2. Limites máximos de chumbo estabelecidos para água e vinho de acordo com o órgão regulamentar.

Matriz	Órgão	Concentração (ppb)
	WHO (2017)	10
Água	CONAMA (2005)	10
	MINISTERIO DA SAÚDE (2011)	1
Vinho	OIV (2005)	150
	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA (2011)	300

Fonte: autora a partir da WHO (2017), CONAMA (2005), OMS (2011), OIV (2015)

REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D.A. SKOOG, F.J. HOLLER, S.R. CROUCH, *Análise Instrumental*, Brooks/Col, 2007.
- [2] M. Huang, Y. Wang, M. Song, F. Chen, Bovine serum albumin-encapsulated gold nanoclusters-Cu²⁺ synergize and promote calcein chemiluminescence for glutathione detection in human whole blood, *Microchem. J.* 170 (2021) 106749. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106749>.
- [3] C.F. de SOUZA, R.Q. AUCÉLIO, Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocínética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente, Diss. Mestr. (2008) 172. <https://doi.org/10.17771/PUCRio.acad.13068>.
- [4] T.D.Z. Atvars, C. Martelli, *Espectroscopia De Emission*, Chemkeys - Liberdade para aprender (2002).
- [5] J.R. Lakowicz, *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9003-5>.
- [6] C. Martelli, T.D.Z. Atvars, *Espectroscopia eletrônica de emissão*, Rev. Chemkeys. (2018) 1–7. <https://doi.org/10.20396/chemkeys.v0i2.9611>.
- [7] C. BURGESS, D.G. JONES, *Spectrophotometry, Luminescence and Colour: Science and Compliance*, 1995. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(96\)90581-4](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(96)90581-4).
- [8] Z. Asemi-Esfahani, B. Shareghi, S. Farhadian, L. Momeni, Food additive dye–lysozyme complexation: Determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy and modeling methods, *J. Mol. Liq.* 363 (2022) 119749. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119749>.
- [9] M. Shkooor, A. Al-Abade, I. Aleiwib, M. Al-Talib, H. Tashtoush, Unusual product from the acid-catalyzed one-pot, multicomponent reaction of thiocarbohydrazide, aldehydes, and phenacyl bromides, *Synth. Commun.* 47 (2017) 1471–1477. <https://doi.org/10.1080/00397911.2017.1332225>.
- [10] S.A. BARROS, Amanda Oliveira; FERNANDES, SÍNTESE DE BIS-IMINAS TIAZOIS EMPREGANDO REAÇÃO MULTICOMPONENTES, Diss. Mestr. (2021) 6.
- [11] M. Srikanth, M. V Sushma, P.S. Reddy, B.K. Kumar, M. Vijjulatha, V.R. Rao, Design and synthesis of new thiazoles by microwave-assisted method : Evaluation as an anti-breast cancer agents and molecular docking studies Design and synthesis of new thiazoles by microwave-assisted method : Evaluation as an anti-breast cancer agents a,

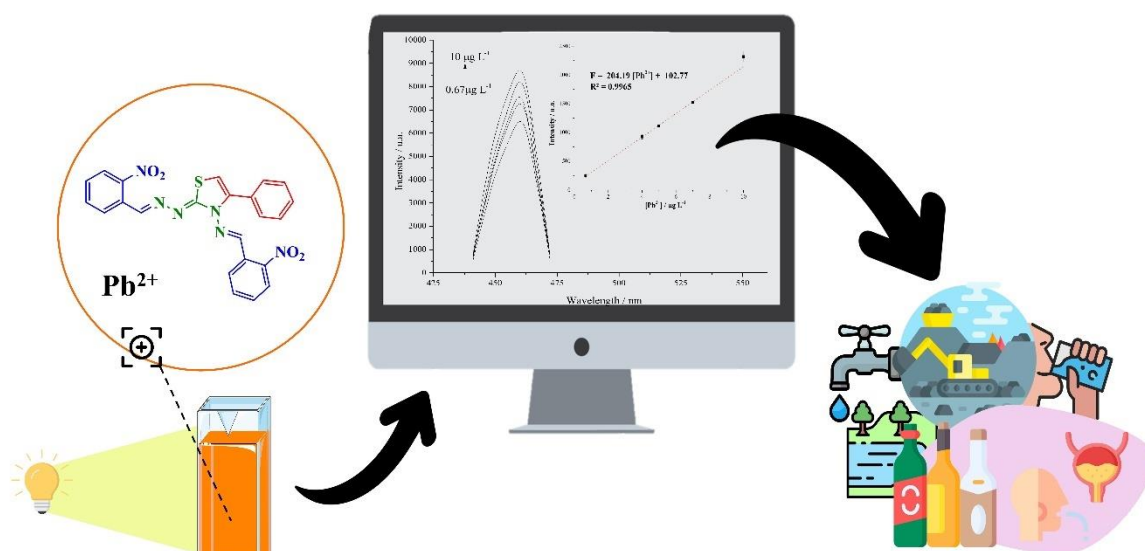
- Synth. Commun. 50 (2020) 2488–2501. <https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1781184>.
- [12] S. Mamidala, V.S. Mudigunda, S.R. Peddi, K.K. Bokara, V. Manga, R.R. Vedula, Design and synthesis of new thiazoles by microwave-assisted method: Evaluation as an anti-breast cancer agents and molecular docking studies, *Synth. Commun.* 50 (2020) 2488–2501. <https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1781184>.
- [13] J.E. Biggs-houck, A. Younai, J.T. Shaw, Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.003>.
- [14] V. Chugh, G. Pandey, R. Rautela, C. Mohan, *Materials Today : Proceedings Heterocyclic compounds containing thiazole ring as important material in medicinal chemistry*, *Mater. Today Proc.* (2022). <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.09.150>.
- [15] A. Singh, D. Malhotra, K. Singh, R. Chadha, P.M.S. Bedi, Thiazole derivatives in medicinal chemistry: Recent advancements in synthetic strategies, structure activity relationship and pharmacological outcomes, *J. Mol. Struct.* 1266 (2022) 133479. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133479>.
- [16] S.U. Qazi, A. Naz, A. Hameed, F.A. Osra, S. Jalil, J. Iqbal, S.A.A. Shah, A.Z. Mirza, Semicarbazones, thiosemicarbazone, thiazole and oxazole analogues as monoamine oxidase inhibitors: Synthesis, characterization, biological evaluation, molecular docking, and kinetic studies, *Bioorg. Chem.* 115 (2021) 105209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105209>.
- [17] A.E.M. Mekky, S.M.H. Sanad, Synthesis and antibacterial evaluation of novel mono- and bis(2H-chromen-2-imine) hybrids linked to heteroarene units, *Mendeleev Commun.* 30 (2020) 762–764. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mencom.2020.11.024>.
- [18] P. Makam, P. Kumar, T. Kannan, *European Journal of Pharmaceutical Sciences In vitro and in silico antimalarial activity of 2- (2-hydrazinyl) thiazole derivatives*, *Eur. J. Pharm. Sci.* 52 (2014) 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.11.001>.
- [19] J.E. Woods, R.M. Jourdain, D. Romo, Synthesis and Stability Studies of a Simplified, Thiazole-Containing Macrocyclic of the Anticancer Agent Salarin C, *Org. Lett.* 24 (2022) 6891–6896. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.2c02326>.
- [20] D.P. ARAÚJO, A.A. SABINO, Síntese de bis-iminas aromáticas e avaliação da atividade biológica contra fungos de interesse clínico, *Diss. Mestrado. UFMG.* (2011).
- [21] S. V Hirmer, F.S. Tschernuth, F. Hanusch, R. Baiertl, Modification of bidentate bis (N - heterocyclic imine) ligands for low-valent main group complexes, *Mendeleev Commun.*

- 32 (2022) 16–18. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2022.01.004>.
- [22] R.M. Clarke, T. Storr, The chemistry and applications of multimetallic salen complexes, (2014). <https://doi.org/10.1039/c4dt00591k>.
- [23] S. Uruş, Microwave assisted catalytic oxidation of cyclohexene, cyclohexane, cyclooctane and styrene with metal complexes of bis(azo-imine) ligands supported on mesoporous silica, *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* 197 (2022) 799–809. <https://doi.org/10.1080/10426507.2022.2031196>.
- [24] L. Canali, D. C. Sherrington, Utilisation of homogeneous and supported chiral metal(salen) complexes in asymmetric catalysis, *Chem. Soc. Rev.* 28 (1999) 85–93. <https://doi.org/10.1039/A806483K>.
- [25] D.M. Belal, U.I. El-ayaan, M.M. El-gamil, A.M. Younis, G.M.A. El-reash, Fluorescence , cyclic voltammetric , computational , and spectroscopic studies of Mn (II), Co (II), Pd (II), Zn (II) and Cd (II) complexes of salen ligand and their biological applications, *J. Mol. Struct.* 1271 (2023) 134142. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134142>.
- [26] K. Kuo, C. Huang, Y. Lin, Synthesis and photophysical properties of multinuclear zinc-salophen complexes : enhancement of fluorescence by fluorene termini †, (2008) 3889–3898. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/B801602J>.
- [27] A.S. Castro, C. Henrique, P. Rodrigues, M. Manoel, T. De Menezes, A. Beatriz, A. Thais, M. Firmino, D. Oliveira, Fe (II), Ni (II), Cu (II), and Co (II) salen Schiff base complexes : Proposal for a voltammetric sensor to analyze cocaine hydrochloride and its interferents, *Forensic Chem.* 25 (2021) 100347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forc.2021.100347>.
- [28] J.M. Mir, N. Jain, P.S. Jaget, R.C. Maurya, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Density functionalized [Ru II (NO)(Salen)(Cl)] complex : Computational photodynamics and in vitro anticancer facets, 19 (2017) 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.07.006>.
- [29] M. Chen, G. Carrasco, E. Park, K. Morgan, S.H.X. Tay, J. Tanzil, S.K. Ooi, K. Zhou, E.A. Boyle, Monsoonal variations of lead (Pb) in coastal waters around Singapore, *Mar. Pollut. Bull.* 179 (2022) 113654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113654>.
- [30] J.L. de Oliveira, Emprego da folha e de material extraído da folha de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) na remoção de íons Cd²⁺ e Pb²⁺ de soluções aquosas, Diss. Mestrado, UFOP. (2019).
- [31] P. Baskaran, M. Abraham, Adsorption of cadmium (Cd) and lead (Pb) using powdered

- activated carbon derived from *Cocos Nucifera* waste: A kinetics and equilibrium study for long-term sustainability, *Sustain. Energy Technol. Assessments*. 53 (2022) 102709. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102709>.
- [32] S. Collin, A. Baskar, D.M. Geevarghese, M.N.V.S. Ali, P. Bahubali, R. Choudhary, V. Lvov, G.I. Tovar, F. Senatov, S. Koppala, S. Swamiappan, Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects in plants: A review, *J. Hazard. Mater. Lett.* 3 (2022) 100064. <https://doi.org/10.1016/j.hazl.2022.100064>.
- [33] M. Komárek, V. Ettler, V. Chrastný, M. Mihaljevič, Lead isotopes in environmental sciences: A review, *Environ. Int.* 34 (2008) 562–577. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.10.005>.
- [34] A. for T.S. and D.R.D. of T. and H.H.S. ATSDR, Support Document to the 2019 Substance Priority List (Candidates for Toxicological Profiles) Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Human Health Sciences, (2022) 1–12.
- [35] WHO, Guidelines for Drinking-Water Quality, World Health Organization. (2022) 415–418.
- [36] G. Guo, M. Lei, Y. Wang, B. Song, J. Yang, Accumulation of as, cd, and pb in sixteen wheat cultivars grown in contaminated soils and associated health risk assessment, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 15 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijerph15112601>.
- [37] R. Nag, E. Cummins, Human health risk assessment of lead (Pb) through the environmental-food pathway, *Sci. Total Environ.* 810 (2022) 151168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151168>.
- [38] A. Zwolak, M. Sarzyńska, E. Szpyrka, K. Stawarczyk, Sources of Soil Pollution by Heavy Metals and Their Accumulation in Vegetables: a Review, *Water. Air. Soil Pollut.* 230 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4221-y>.
- [39] M. Mrkvičková, P. Dvořák, M. Svoboda, J. Kratzer, J. Voráč, J. Dědina, Dealing with saturation of the laser-induced fluorescence signal: An application to lead atoms, *Combust. Flame.* 241 (2022) 112100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.combustflame.2022.112100>.
- [40] M. Thirumalai, S.N. Kumar, D. Prabhakaran, N. Sivaraman, M.A. Maheswari, Dynamically modified C18 silica monolithic column for the rapid determinations of lead, cadmium and mercury ions by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1569 (2018) 62–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.044>.
- [41] I.S.I. Adam, A.N. Anthemidis, Flow injection wetting-film extraction system for flame

- atomic absorption spectrometric determination of cadmium in environmental waters, *Talanta*. 77 (2009) 1160–1164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.08.015>.
- [42] Y. Chen, H. Li, T. Gao, T. Zhang, L. Xu, B. Wang, J. Wang, R. Pei, Selection of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Pb(II), *Sensors Actuators B Chem.* 254 (2018) 214–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.068>.
- [43] Z. Zhang, M. Zhu, D. Zhang, A Thermogravimetric study of the characteristics of pyrolysis of cellulose isolated from selected biomass, *Appl. Energy.* 220 (2018) 87–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.03.057>.

CÁPITULO II

SÍNTESE VERDE DE *BIS*-IMINAS TIAZOL COMO SENSOR FLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM AMOSTRAS AMBIENTAIS, BIOLÓGICAS E ALIMENTARES

1. INTRODUÇÃO

Devido à presença de metais potencialmente tóxicos em diversos aspectos da sociedade, há uma preocupação significativa em relação ao impacto que essas substâncias podem ter no meio ambiente e na saúde humana [1]. Essa preocupação é justificável, pois esses metais tendem a se acumular no ambiente devido à sua estabilidade e resistência à degradação. [2] Além disso, alguns metais, como cobre [3–5], mercúrio [6,7], cobalto [8], chumbo [9], cádmio [10], arsênio [11], cromo [12] e selênio [13], possuem um alto potencial de contaminação em águas ambientais [14,15], bebidas e alimentos. Embora alguns desses metais sejam micronutrientes essenciais para os seres humanos, existem regulamentações que impõem limites ao seu uso. Especificamente, o Pb^{2+} requer um controle rigoroso devido aos efeitos adversos que causa no sistema neurológico, nos rins e na circulação sanguínea [16]. Em adultos, essa contaminação pode ser eliminada em até duas semanas, porém o metal pode se distribuir pelo cérebro, rins e fígado, acumulando-se nos ossos e dentes ao longo do tempo [17,18]. Diante desses dados, em 2022, a Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR) [19] classificou o chumbo como a segunda substância com maior potencial de exposição humana, enfatizando a importância do monitoramento e controle de sua presença em nosso ambiente.

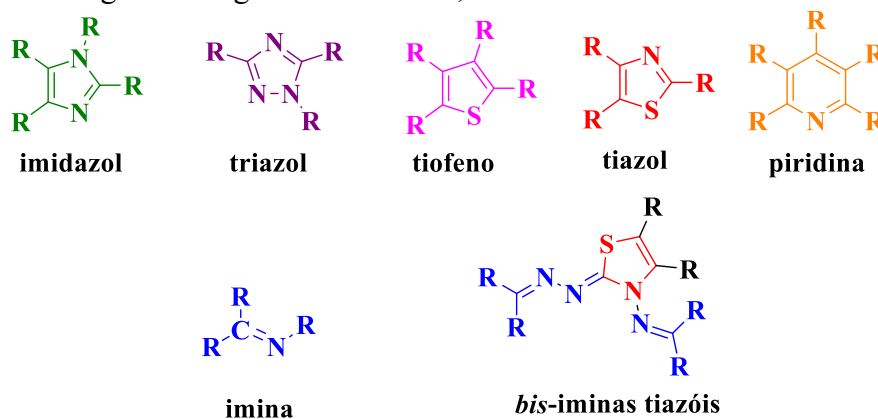
Portanto, tanto a Organização Mundial da Saúde (OMS)[20] quanto o Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil (CONAMA, 2005) estabeleceram um limite máximo aceitável para a concentração de Pb^{2+} em água, fixado em $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Esses padrões pré-definidos para água e efluentes em geral destacam a necessidade de quantificação desse metal, visando garantir um controle de qualidade eficaz. Vale ressaltar que também há regulamentações sobre o teor do íon Pb^{2+} em outras matrizes. Por exemplo, a legislação brasileira estabelece um valor de referência de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ para a bebida alcoólica cachaça. Já a Agência de Proteção Ambiental (EPA)[19], definiu um limite de $4,0 \times 10^5 \mu\text{g L}^{-1}$ para solos destinados a atividades recreativas e $120 \times 10^5 \mu\text{g L}^{-1}$ para áreas não recreativas. Enquanto isso, a Resolução CONAMA nº 420/2009 estabelece um limite de $4,0 \times 10^5 \mu\text{g L}^{-1}$ de íons de chumbo em solos de áreas urbanas e industriais. Diante dessa diversidade de limites de tolerância para Pb^{2+} , a identificação e quantificação desse cátion são essenciais, pois ele pode estar presente em bebidas e alimentos, além de ser absorvido pelo solo e potencialmente contaminar as culturas ali cultivadas, representando riscos à saúde humana.

Para a quantificação de Pb^{2+} , diversas metodologias podem ser aplicadas, como colorimetria [3,8], técnicas eletroanalíticas [14,15,21,22], absorção atômica por vapor frio [23],

espectroscopia Raman [24], adsorção [11,25] e fluorescência [6,13,26]. Dentre essas diferentes técnicas, a fluorescência merece destaque, pois é uma técnica óptica de detecção rápida e sensível [27–29], com baixos limites de detecção e excelentes faixas lineares de concentração [30,31]. Além disso, a fluorescência pode ser utilizada na determinação de íons metálicos por meio da supressão ou intensificação da intensidade fluorescente em espécies orgânicas e inorgânicas [30].

Nesse contexto, ainda existem muitos estudos voltados para o desenvolvimento de novos sensores químicos para a análise fluorométrica de metais em diversos tipos de amostras. Para esse fim, várias classes de substâncias heterocíclicas têm se destacado, como triazóis, imidazóis, tiofenos, tiazóis e piridinas (Figura 1) [32–34]. Além desses heterociclos, as iminas (Figura 1) também têm sido relatadas como sensores químicos para metais, apresentando excelente seletividade e sensibilidade [35,36]. Portanto, é plausível acreditar que a combinação de estruturas heterocíclicas com grupos funcionais imina na mesma molécula pode potencializar a ação do sensor químico. Dessa forma, os bis-iminas tiazólicas (Figura 7) são considerados uma opção promissora para o desenvolvimento de sensores voltados para a determinação de metais. Acredita-se que a estrutura dos bis-iminas tiazólicas favoreça a formação de complexos metálicos, incluindo com Pb^{2+} , podendo exibir intensidades de fluorescência significativas [25]. Diante disso, a investigação do uso dessas moléculas para a quantificação seletiva de íons Pb^{2+} é de grande interesse. Vale destacar que essa classe de moléculas já demonstrou sua relevância em outras aplicações, sendo relatada na literatura para uso em catálise e aplicações biológicas, como atividade anticancerígena e antibacteriana [27,37,38].

Figura 6. Estrutura geral de alguns heterociclos, iminas e tiazol bis-iminas.



Fonte: autoria própria.

2. MÉTODO EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e amostra

As soluções dos íons metálicos Pb^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} e Mn^{2+} foram preparadas utilizando reagentes analíticos de alta pureza, na forma de sais de nitrato ou cloreto, para obter concentrações de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para cada um. As soluções foram preparadas com água deionizada proveniente do sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, EUA), com resistividade (ρ) superior a $18,0 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. Uma solução estoque de 1000 mg L^{-1} de Pb^{2+} em água deionizada foi preparada.

As soluções das diferentes bis-íminas tiazólicas (Tn) foram obtidas dissolvendo-se $0,10 \text{ g}$ de cada Tn em etanol, resultando nas concentrações de $1,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (T1), $1,02 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (T2) e $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (T3), respectivamente. As soluções tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em água deionizada. O ajuste de pH foi realizado por meio da adição de pequenas alíquotas de soluções de NaOH e/ou HCl 1 mol L^{-1} .

Amostras de cachaça (destilado brasileiro) e água mineral foram adquiridas em um supermercado de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Amostras de água da torneira e de lagoa foram coletadas na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil ($20^\circ 46' 06''\text{S}$, $42^\circ 52' 17,0''\text{W}$). A urina sintética foi sintetizada conforme descrito por Ravazzi *et al.* [39]. As amostras de urina e saliva foram armazenadas em refrigerador para preservação de suas propriedades.

As amostras de solo G1, G2 e G3 foram coletadas na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil ($19^\circ 28' 11,74''\text{S}$ / $44^\circ 10' 57,02''\text{W}$), sendo compostas por uma mistura de latossolo vermelho e rejeito de mineração. Outra amostra de solo, G4, foi coletada a uma profundidade de 20 cm em um depósito de rejeitos de mineração na cidade de Boquira, Bahia, Brasil ($12^\circ 48' 50''\text{S}$, $42^\circ 42' 32''\text{W}$).

O preparo das amostras de solo seguiu o método EPA 3051A (USEPA), no qual $0,5 \text{ g}$ da amostra moída e peneirada (200 mesh) foi submetida à digestão com adição de 9 mL de HNO_3 e 3 mL de HCl em tubo de Teflon, levada a um forno de digestão (Anton Paar, Multiwave 3000) com uma taxa de aquecimento de 8 minutos até atingir $175 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo mantida nessa temperatura por 4 minutos (USEPA, 1998). O método EPA 3051A descreve um procedimento experimental eficaz denominado Resource Conservation and Recovery Act (RCRA), útil para análises precisas e exatas de metais em amostras de solo [40]. Após a digestão, o extrato foi coletado, filtrado (filtro de papel de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$) e transferido para um balão volumétrico de 50

mL, completando-se o volume com água deionizada. Por fim, os extratos foram armazenados em frascos de polietileno a temperatura inferior a 4 °C. Para fins de comparação e avaliação da eficiência do método desenvolvido, utilizou-se um espectrofotômetro de absorção atômica modelo 240 FS AA da Agilent Technologies.

2.2. Preparação de amostras

Para as amostras de água de lagoa, foram utilizada uma simples filtragem para remover quaisquer sólidos suspensos. Para as demais amostras, não foi necessário nenhum preparo adicional. Ao preparar as soluções, o volume correspondente à concentração desejada do íon metálico foi adicionado a um balão volumétrico, e o balão foi preenchido com a amostra de interesse. Por exemplo, para uma água com concentração de 0,509 mg L⁻¹, o volume correspondente da solução estoque de Pb²⁺ foi adicionado, e o balão foi completado com água mineral até o menisco. Após homogeneização, a solução foi transferida para um frasco e rotulada. Após a preparação de todas as soluções de amostra, as leituras foram realizadas no FAAS.

Para a produção de urina sintética, utilizou-se a metodologia descrita por Ravazzi et al. [39], que consiste na adição de 2920 mg L⁻¹ de NaCl, 1600 mg L⁻¹ de KCl, 1080 mg L⁻¹ de CaCl₂·2H₂O, 2240 mg L⁻¹ de Na₂SO₄, 1400 mg L⁻¹ de KH₂PO₄, 1000 mg L⁻¹ de NH₄Cl, 2500 mg L⁻¹ de ureia e 1080 mg L⁻¹ de creatinina em um volume final de 250 mL.

Para a produção de saliva sintética, utilizou-se a metodologia descrita, onde foram adicionados 3120 mg L⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O, 2000 mg L⁻¹ de NaCl, 2000 mg L⁻¹ de KCl, 3180 mg L⁻¹ de CaCl₂·H₂O, 20 mg L⁻¹ de Na₂S·H₂O, 1200 mg L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 20 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 400 mg L⁻¹ de NaHCO₃ e 4000 mg L⁻¹ de ureia em um volume final de 250 mL.

2.3. Caracterizações

2.3.1. Luminescência

Os espectros de fluorescência foram coletados utilizando o espectrofotômetro de fluorescência AvaSpec-2048L (Avantes, Netherlands), equipado com um detector CCD de matriz linear. O instrumento oferece uma resolução de 0,06 nm a 20 nm, um tempo de integração de 3 s e uma velocidade de varredura de 136,53 nm s⁻¹. Uma cubeta de quartzo com quatro lados polidos e um caminho ótico de 1,0 cm foi utilizada para essa análise. A varredura

foi realizada com um tempo de integração de 3 s e um tempo de ciclo de 3000 ms, com 3 medições realizadas por ciclo. Foi utilizado um detector CCD, modelo Sony ILX5111, com 2048 pixels e largura de fenda de 14x200 μm , juntamente com uma fibra óptica de 6,5 mm de diâmetro. A resolução utilizada variou de 0,06 a 20 nm para uma taxa de varredura de 136,53 nm s^{-1} . O pH foi monitorado utilizando um medidor de pH de bancada (Mettler Toledo, EUA) com um eletrodo de vidro combinado com um eletrodo de referência Ag/AgCl com KCl 3,0 mol L^{-1} .

2.3.2. Espectrometria de UV-Vis

Os espectros de absorção UV-Vis foram obtidos utilizando o espectrofotômetro UV-Vis (UV5100, China Continental), variando de 250 a 700 nm. Para a espectrofluorometria e espectrometria UV-Vis, foram usadas 4 mL de amostras.

2.3.3. Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier

As análises de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR) foram realizadas diretamente em 30 mg da amostra utilizando o espectrofotômetro de infravermelho VARIAN 660-IR com um acessório de reflexão total atenuada PIKE GladiATR, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} .

2.3.4. Espectrometria de massa

Espectros de massas (MS) foram adquiridos por inserção direta, utilizando o espectrômetro de massas (SHIMADZU) modelo GCMS-QP2010, operando a uma temperatura de 25 °C na interface e 300 °C na fonte de íons por 10 minutos. Para essas análises, 1 mg de cada uma das amostras foi inserido diretamente no MS, com a ajuda de uma sonda. Os valores de m/z foram registrados na faixa de 35 – 500 m/z. Para as análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (^1H e ^{13}C NMR), 30 mg de amostra foram dissolvidos em 600 μL de DMSO- d_6 ou CDCl_3 . Os espectros foram obtidos utilizando o espectrômetro Varian Mercury de 300 MHz (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C).

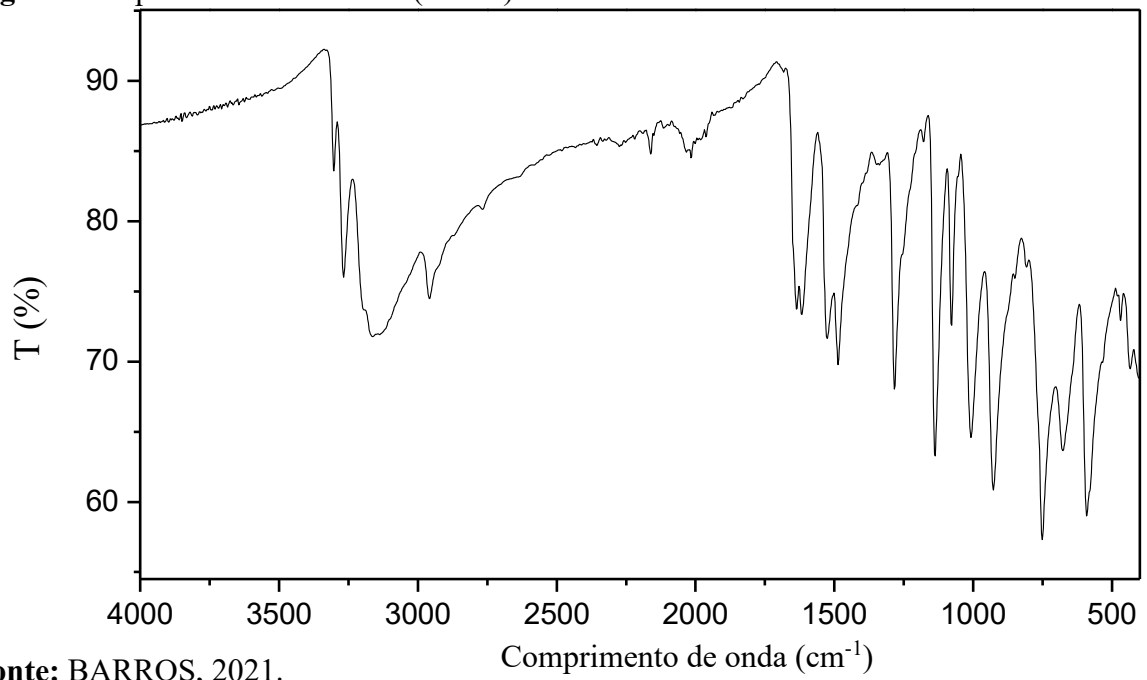
2.4. Síntese de tiocarbazida

Usando o funil de adição, foi vertido dissulfeto de carbono (1 mL) em uma solução de hidrazina (3,3 mL) em água (10 mL), contida em um balão de fundo redondo de 25 mL. O dissulfeto de carbono e a hidrazina foram manuseados com segurança em uma cabine de

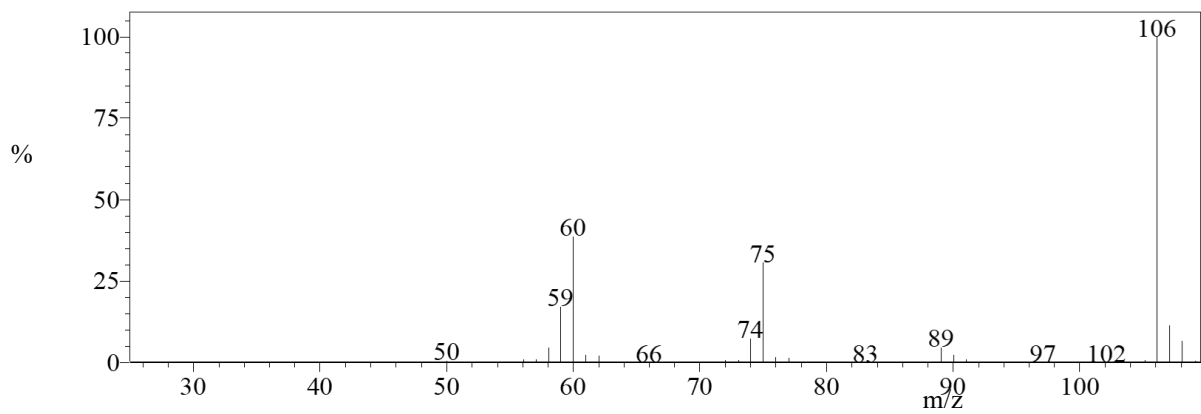
exaustão, utilizando máscaras, óculos e luvas apropriadas. A mistura foi agitada por 1 hora. Ao final desse período, a mistura foi aquecida em refluxo por 2 horas. Posteriormente, permitiu-se que a mistura esfriasse à temperatura ambiente, e foi observada a formação de um precipitado amarelo; este foi filtrado a vácuo e lavado com etanol frio [41].

2.5. Dados espectroscópicos da tiocarbohidrazina

Os espectros de infravermelho e de massas estão da tiocarbohidrazina são apresentados na Figura 8, Figura 9, Figura 10 e Figura 11. A tiocarbohidrazina formada por cristais brancos, apresentou rendimento 56%. Ponto de fusão (p.f.) entre 171,1 – 172,5 °C. O espectro infravermelho apresenta bandas intensas e características em (cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3271, 3172, 2964, 1630, 1529, 1488, 1285, 1006, Figura 2. Foi determinado a abundância no espectro de massas apresentando razão carga/massa (m/z) de 106 (100, M_p), 75 (30), 60 (40), Figura 3. Os espectros de RMN, Figura 4, são determinados para ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ 8.37 (s, 2H), 5.63 (s, 4H) e ^{13}C RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ 181.8.

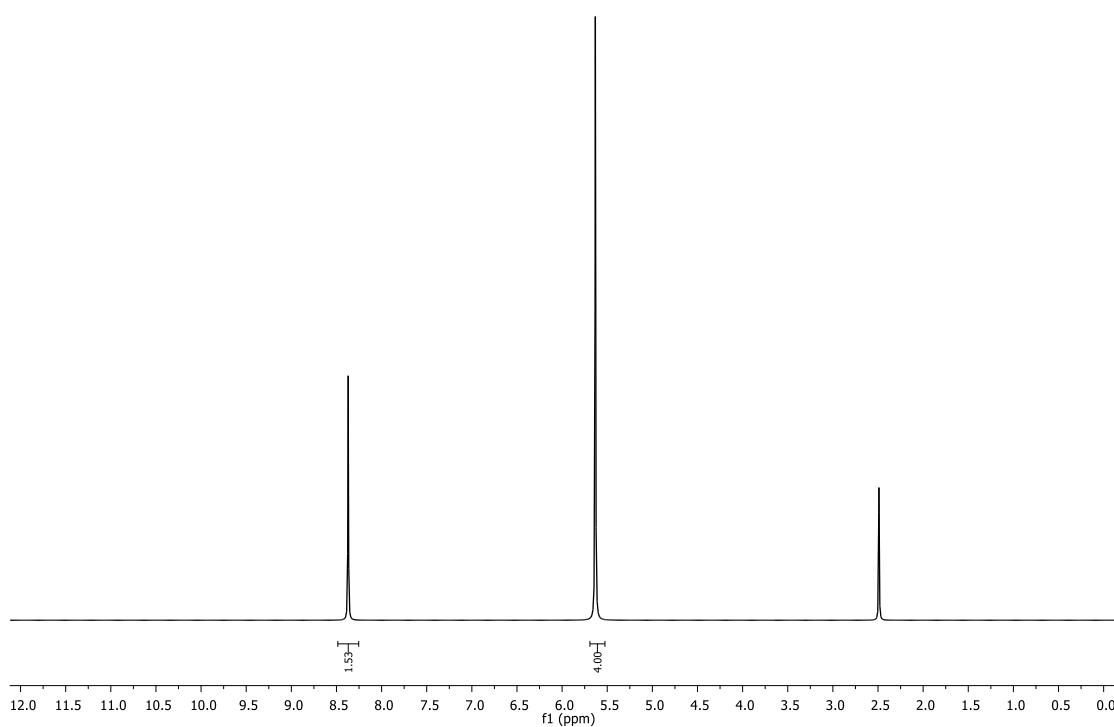
Figura 7. Espectro infravermelho (FT-IR) da tiocarbohidrazina.

Fonte: BARROS, 2021.

Figura 8. Espectro de massa (IE, 70 eV) da tiocarbohidrazina.

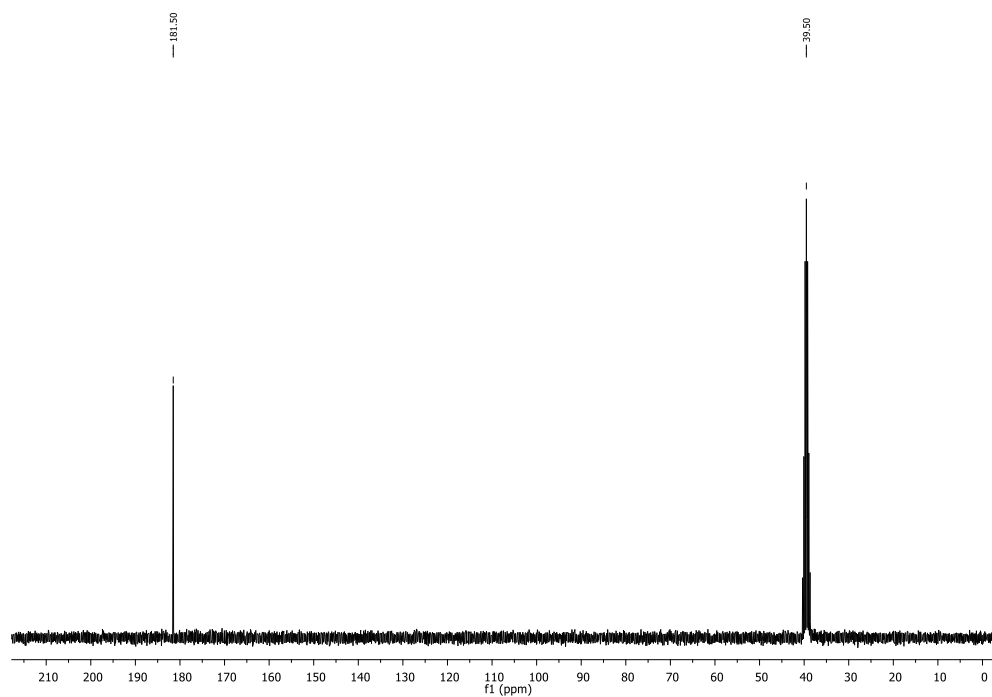
Fonte

Figura 9. Espectro RMN de ^1H (300 MHz; DMSO- d_6 ; δ_{DMSO} 2.49) da tiocarbohidrazina.



Fonte: Barros, 2021.

Figura 10. Espectro RMN de ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6 ; δ_{DMSO} 39.5) da tiocarbohidrazina.



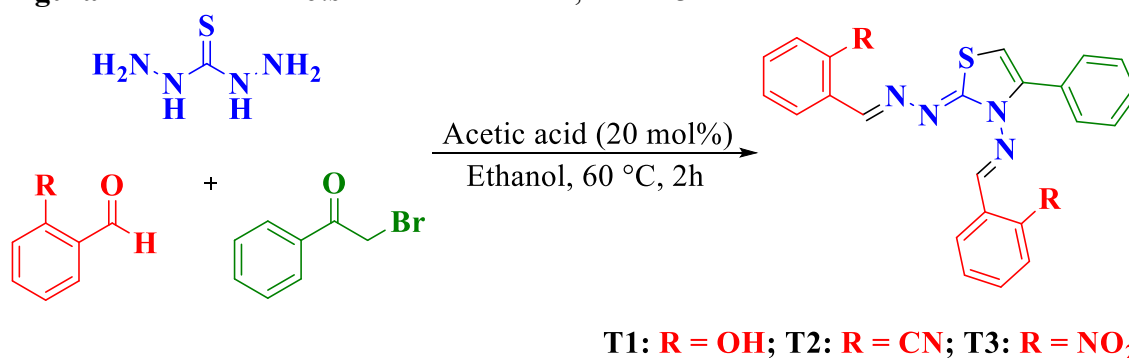
Fonte: Barros, 2021.

2.6. Síntese de bis-íminas tiazol

As bis-íminas de tiazol foram sintetizadas utilizando uma metodologia verde por meio de uma reação multicomponente em um one-pot [42–44] Inicialmente, um tubo de vidro Pyrex de 10 mL foi carregado com tioacarbazida (0,5 mmol), 2-bromoacetofenona (0,75 mmol), um aldeído aromático (1,0 mmol), ácido acético 20% molar e etanol (4 mL). Este tubo selado foi colocado na cavidade do reator de micro-ondas (CEM Discovery) com potência máxima de 50 W. A mistura de reação foi aquecida a 40 °C por 30 minutos (Figura 12). Ao final da reação, a mistura foi resfriada em um banho de gelo, resultando na formação de um precipitado. Este precipitado foi centrifugado, e o sólido foi lavado com etanol frio (3 x 4 mL). O sobrenadante foi deixado na geladeira para uma nova precipitação, e esse processo foi repetido duas vezes. Subsequentemente, todo o precipitado foi purificado por recristalização em etanol, depois filtrado a vácuo e lavado com etanol frio. As bis-íminas de tiazol T1, T2 e T3 (Figura 13) foram sintetizadas a partir de 2-hidroxibenzaldeído, 2-cianobenzaldeído e 2-nitrobenzaldeído, respectivamente.

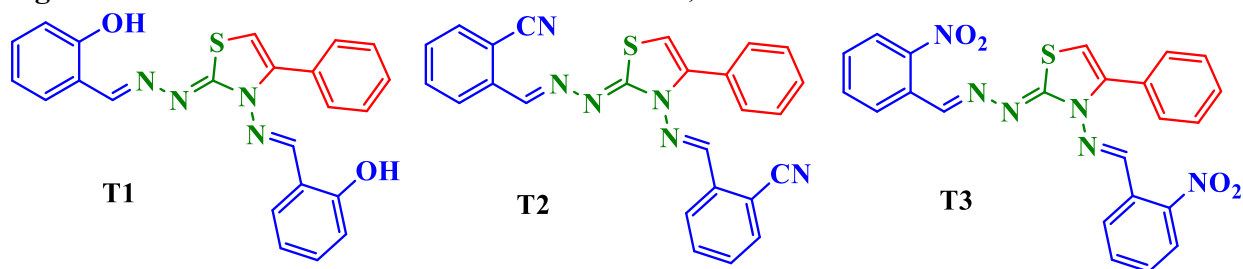
Os aldeídos meta-substituídos por átomos eletronegativos foram selecionados porque esses grupos meta aumentam o potencial das moléculas para serem usadas como sondas fluorescentes, como foi relatado por Berhanu *et al.* 2019 [36]. Isso ocorre porque grupos nessa posição geram complexos com anéis de 5/6 membros, que são mais estáveis [43,44].

Figura 11. Síntese das *bis*-íminas tiazóis T1, T2 e T3.



Fonte: autoria própria.

Figura 12. Moléculas sintetizadas e denominadas T1, T2 e T3.



Fonte: autoria própria.

2.7. Dados espectroscópicos das bis-iminas tiazol

Os espectros de caracterização estão apresentados no anexo I, incluindo o espectro de Infravermelho, espectro de massas, espectro de ¹H NMR (300 MHz) e espectro de ¹³C NMR (75 MHz). Todos esses espectros foram utilizados para a caracterização do composto T1 (*N*-(2-hidroxibenzilidene)-2-((2-hidroxibenzilidene)hidrazono)-4-fenil-tiazol-3(2H)-amina) (Figura 20, Figura 21, Figura 22 e Figura 23, anexo I), T2 (*N*-(2-cianobenzilidene)-2-((2-cianobenzilidene)hidrazono)-4-fenil-tiazol-3(2H)-amina) (Figura 24, Figura 25, Figura 26 e Figura 27, anexo I), e T3 (*N*-(2-nitrobenzilidene)-2-((2-nitrobenzilidene)hidrazono)-4-fenil-tiazol-3(2H)-amina) (Figura 28, Figura 29, Figura 30 e Figura 31, anexo I).

T1: Caracterização:

Sólido amarelo, rendimento 51%. P.f. 166,2 – 168,0 °C. λ_{max} : 220 nm. IV (cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 642, 680, 717, 747, 954, 1274, 1523, 1605 (Figura 25). GC-MS (m/z) (abundância %): 414 (45, M⁺), 295 (40), 121 (53), 44 (100) (Figura 26). RMN ¹H (CDCl₃): δ 6,18 (1H, s), 6,85 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6,91 – 6,98 (2H, m), 7,05 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 7,28 – 7,40 (4H, m), 7,46 – 7,53 (5H, m), 8,57 (1H, s), 9,72, 10,35 (1H, s), 11,15 (1H, s) (Figura 27). RMN ¹³C (CDCl₃): δ 98,9, 16,8, 117,2, 117,8, 118,4, 119,5, 119,5, 128,8, 129,1, 129,7, 131,7, 131,2, 132,4, 132,3, 141,0, 157,7, 157,5, 158,2, 158,9, 164,1. (Figura 28).

T2: Caracterização:

Espectro de Infravermelho (FT-IR) (Figura 29), Espectro de massas (Figura 30), espectro de RMN ¹H (300 MHz) (Figura 31), e espectro de RMN ¹³C (75 MHz) (Figura 32).

Sólido vermelho, rendimento 42%. P.f. 155,4 – 156,8 °C. λ_{max} : 234 nm. IV (cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 694, 761, 940, 1263, 1445, 1512, 1608, 2221, 3065 (Figura 29). GC-MS (m/z) (abundância %): 432 (60, M⁺), 303 (54), 134 (51), 129 (100) (Figura 30). RMN ¹H (CDCl₃): δ 6,24 (1H, s), 7,40 –

7,48 (5H, m), 7,48 – 7,57 (3H, m), 7,59 – 7,74 (3H, m), 7,79 – 7,83 (1H, m), 7,99 – 8,03 (1H, m), 8,79 (1H, s), 10,92 (1H, s) (Figura 31). RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 101,1, 111,1, 113,3, 117,3, 117,8, 125,8, 128,2, 128,8, 129,1, 129,5, 129,7, 130,3, 131,3, 132,7, 132,8, 133,1, 134,1, 137,5, 138,5, 141,3, 149,9, 151,8, 167,5. (Figura 32).

T3: Caracterização:

Espectro de Infravermelho (FT-IR) (Figura 33), Espectro de massa (Figura 34), Espectro de RMN ^1H (300 MHz) (Figura 35), e espectro RMN de ^{13}C (75 MHz) (Figura 36).

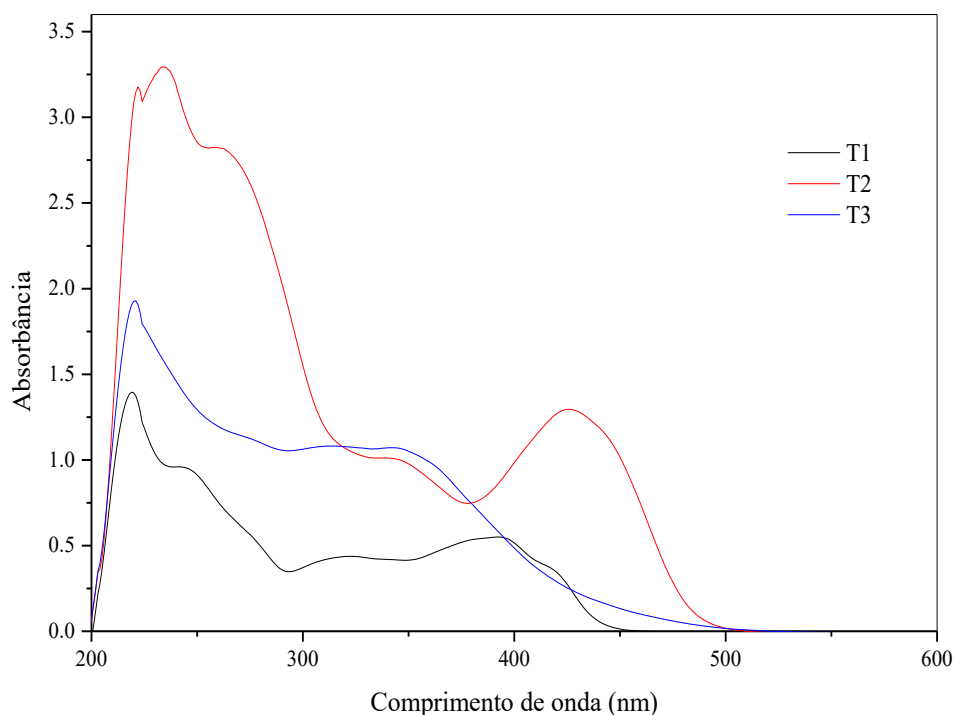
Sólido laranja, rendimento 51%. P.f. 148.4 – 149.9 °C. λ_{max} : 221 nm. $\text{IV} (\text{cm}^{-1})$ $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 694, 743, 843, 932, 1129, 1244, 1341, 1516, 2916, 2964 (Figura 33). GC-MS (m/z) (abundância %): 472 (20, M^+), 134 (100), 104 (92), 77 (63) (Figura 34). RMN de ^1H (CDCl_3): δ 6,21 (1H, s), 7,41 – 7,45 (3H, m), 7,49 – 7,56 (5H, m), 7,63 – 7,68 (1H, m), 7,81 – 7,86 (1H, m), 7,96 – 8,04 (2H, m), 8,20 – 8,23 (1H, m), 8,9 (1H, s), 10,87 (1H, s) (Figura 35). RMN de ^{13}C (CDCl_3): δ 100,6, 124,6, 124,8, 126,1, 128,0, 128,1, 128,9, 129,2, 129,5, 129,7, 129,9, 130,4, 131,1, 132,9, 133,2, 141,3, 148,4, 148,7, 150,0, 150,4, 167,2 (Figura 36).

2.8. Estudos da *bis* imina tiazol T1, T2 e T3 para uso como sonda fluorescente

Os espectros de absorção foram obtidos para as *bis*-iminas tiazol T1, T2 e T3 nas concentrações de $1,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $1,02 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente (Figura 14). A *bis*-imina tiazol T1 apresentou duas bandas de absorção em 328 nm e 396 nm, enquanto o *bis*-imina tiazol T2 também exibiu duas bandas de absorção, uma em 351 nm e outra em 426 nm. Por outro lado, a *bis*-imina tiazol T3 apresentou comprimentos de onda com absorbância máxima em $\lambda_{\text{max}} = 214 \text{ nm}$ e 350 nm.

As moléculas apresentaram absorção máxima na faixa de comprimento de onda entre 200 e 500 nm, característica das transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$, que são comuns para os grupos C=C e C=N presentes nas três moléculas. Além disso, na faixa de comprimento de onda entre 250 e 600 nm, observa-se uma interação proibida entre os orbitais $n \rightarrow \pi^*$, envolvendo um par de elétrons não ligantes e um orbital anti-ligante. Essa interação é característica das transições eletrônicas em compostos orgânicos, como aqueles que contêm os grupos C=N, N=N e N=O, sendo este último presente apenas na molécula T3 [50]. O diagrama de energia referente a absorção molecular pode ser encontrado no anexo I, Figura 24.

Figura 13. Espectros de absorção das moléculas T1 (linha preta), T2 (linha vermelha) e T3 (linha azul) obtidos por espectroscopia UV-VIS.



Fonte: autoria própria

2.9. Estudo da seletividade, pH e interferentes

O pH desempenha um papel crucial nas reações de complexação; assim, a reação foi analisada com o pH da solução variando de 3,0 a 10,0, utilizando uma solução tampão de 0,2 mol L⁻¹. Para acidificar o meio, foi utilizado HCl 1,0 mol L⁻¹, e para alcalinização, NaOH 1 mol L⁻¹. A determinação dos valores de pH foi realizada com um pHmetro de bancada da Mettler Toledo (EUA), equipado com um eletrodo de vidro combinado.

Conseqüentemente, o comportamento do ligante com os metais foi estudado em cada valor de pH, em uma proporção de 1:1 entre os *bis*-iminas tiazol (4×10^{-5} mol L⁻¹ T3) e os íons metálicos: Pb²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Al³⁺, Cr³⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺ e Mn²⁺. O método apresentado pode sofrer interferências em sistemas líquidos e sólidos, destacando a importância de considerar esses fatores para garantir sua aplicabilidade e precisão [30].

Portanto, foi realizada uma análise para identificar metais que pudessem afetar os resultados. O comportamento do ligante ($2,51 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ T3) com Pb²⁺ foi estudado na presença de outros metais, a fim de verificar possíveis interferências no sinal analítico. As reações foram conduzidas no pH ótimo de complexação, mantendo uma razão molar de 1:1

entre o analito/interferente para Pb^{2+} com os íons Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} e Mn^{2+} .

2.10. Otimização das condições de reação

Foram realizadas otimizações em determinadas condições de reação que podem impactar significativamente a resposta analítica deste novo método fluorimétrico. Os parâmetros analisados incluem tempo de reação, força iônica, concentração do *bis*-imina tiazol T3 e estabilidade da luminescência da molécula, Tabela 3. Essas otimizações tiveram como objetivo aprimorar a precisão e a exatidão do método, proporcionando resultados mais confiáveis e consistentes.

Tabela 3. Parâmetros avaliados, seu intervalo e impacto na resposta analítica.

Parâmetros	Intervalo	Resposta analítica
Tempo de reação	0 – 60 min	Tempo de resposta ótimo
Força iônica	0 – 1 molL ⁻¹ de NaCl	Mudança na estabilidade
Concentração da T3	1,14x10 ⁻⁶ – 8,33x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	Variação da fotoluminescência
Estabilidade luminescente de T3	0 – 60 min	Mudança na estabilidade

Fonte: autoria própria.

2.11. Detecção de Fluorescência de Pb^{2+} utilizando T3

Para a determinação dos íons Pb^{2+} , foram adicionados 30 μL de *bis*-imina tiazol T3 ($1,26 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e 680 μL de tampão pH = 3 em uma cubeta. Em seguida, diferentes volumes de água, amostra e solução padrão de Pb^{2+} foram introduzidos para alcançar as concentrações desejadas, totalizando um volume final de 3000 μL . Este estudo foi conduzido sob condições otimizadas, com ênfase no uso mínimo de reagentes, contribuindo para a minimização de resíduos gerados. Os espectros foram registrados em um comprimento de onda de emissão de 455 nm. O método fluorimétrico utilizou um monocromador após a fonte de radiação, permitindo selecionar manualmente o comprimento de onda de emissão. O comprimento de onda foi ajustado na faixa de 300 a 650 nm, com resolução de 5 nm. A maior intensidade de

fluorescência foi identificada em 455 nm, sendo este comprimento de onda selecionado para os experimentos subsequentes.

2.12. Rendimento Quântico

O rendimento quântico, denotado como Φ , é um fator que pode impactar a fluorescência de uma molécula, expressando a razão entre a quantidade de luz ou o número de fótons emitidos e a quantidade de luz ou o número de fótons absorvidos. Uma maneira de calcular esse valor é por meio do método comparativo de Williams, utilizando medições de absorbância. [45] Portanto, o rendimento quântico da *bis* imina tiazol T3 foi medido comparando-o com sulfato de quinina diluído em 0,1 mol L⁻¹ de H₂SO₄, usando a equação 1:

$$\Phi = \Phi_R + \frac{I}{I_R} + \frac{A_R}{A} + \frac{\eta^2}{\eta_R^2} \quad (1)$$

Onde o subscrito R refere-se aos parâmetros de referência (sulfato de quinina), Φ o rendimento quântico de fluorescência da molécula estudada, Φ_R é o rendimento quântico de referência (sulfato de quinina). I denoto a intensidade de emissão integrada medida ($\lambda = 455$ nm), enquanto IR refere-se à intensidade de emissão da quinina. A é a densidade óptica ($\lambda = 350$ nm), e A_R é a densidade óptica da quinina. η é o índice de refração do solvente utilizado, com $\eta = 1,36$ (etanol) e $\eta_R = 1,33$.

2.13. Parâmetros analíticos

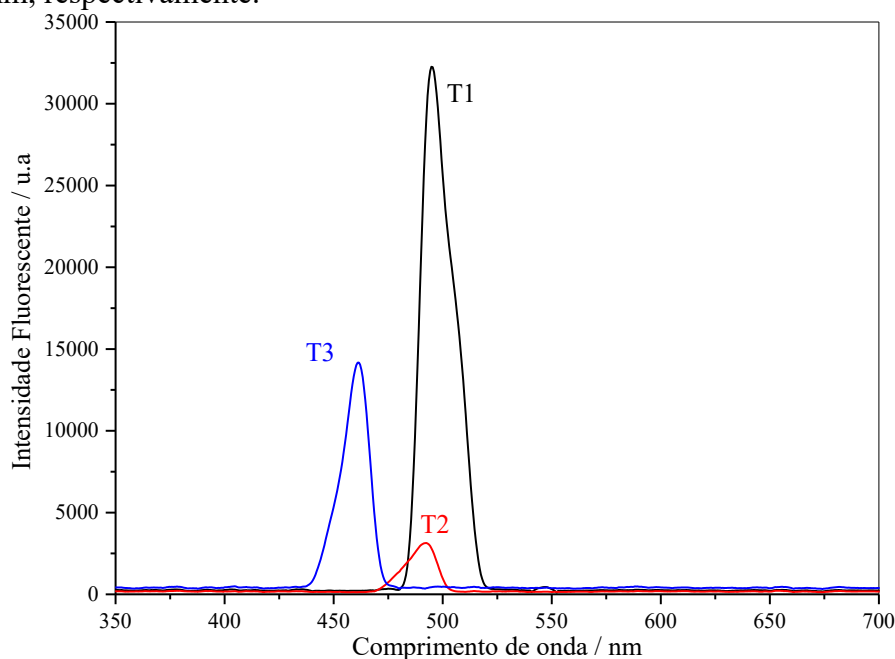
O método otimizado foi avaliado utilizando o espectrofotômetro de fluorescência AvaSpec-2048L (Avantes, Países Baixos), onde os seguintes parâmetros de desempenho foram determinados: linearidade, seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão intermediária, precisão intra-dia e exatidão, seguindo os padrões da ANVISA de 2017 [46]. Estudos de recuperação foram realizados em três níveis de concentração da curva analítica (1, 5, e 9 $\mu\text{g L}^{-1}$) para avaliar a exatidão do método.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Luminescência das moléculas

A partir da solução estequiométrica das *bis* iminas tiazol, foram realizados testes de fluorescência para determinar as longitudes de onda de emissão, λ_{EMS} , e comprimento de onda de excitação, λ_{EXC} , das moléculas T1, T2 e T3. Inicialmente, foi realizada uma varredura para entender o comportamento das moléculas, revelando uma alta luminescência entre 300 e 650 nm. A varredura variou a longitude de onda em 5 unidades, e a longitude de onda com o maior sinal analítico foi selecionada. Os espectros fluorescentes são mostrados na Figura 15, onde a molécula T1 tem $\lambda_{EMS} = 500$ nm e $\lambda_{EXC} = 490$ nm, T2 $\lambda_{EMS} = 485$ nm e $\lambda_{EXC} = 480$ nm e molécula T3 $\lambda_{EMS} = 455$ nm e $\lambda_{EXC} = 430$ nm. Assim, as longitudes de onda de emissão foram fixadas durante todo o estudo.

Figura 14. Intensidade luminescente das moléculas T1, T2 e T3, no comprimento de onda de excitação de 490, 480 e 430 nm, respectivamente, e comprimento de onda de emissão de 500, 485 e 455 nm, respectivamente.



Fonte: autoria própria.

O desvio de Stokes é definido como a diferença entre as máximas longitudes de onda de fotoluminescência e absorção [47]. O desvio de Stokes foi calculado para T1, T2 e T3, resultando em 10 nm, 5 nm e 25 nm, respectivamente. Esses resultados destacam a importância do alto desvio de Stokes observado para a molécula T3, o que pode contribuir para um maior rendimento quântico de fluorescência. De maneira geral, fluoróforos exibem um grande desvio de Stokes, alto rendimento quântico de fluorescência, conseguem evitar autoabsorção e

interferência da luz de excitação, além de melhorar a precisão na detecção fluorescente [48,49]. Esses resultados destacam a importância do alto desvio de Stokes observado para a molécula T3, o que pode contribuir para um maior rendimento quântico de fluorescência. Em comparação, 4-amino-triphenilamina (TPA-Th) sintetizada por Kolcu *et al.* (2020) [50] exibiu $\lambda_{EMS} = 471$ nm e $\lambda_{EXC} = 320$ nm, resultando em um desvio de Stokes de 151 nm, enquanto a molécula poli((N,N')-4,4'-(9H-fluoreno-9,9-diyl)bis(N-((9-etil-9H-carbazol-2-il)metileno)anilina)), P-SB (Kolcu *et al.* (2023) [51]), exibiu $\lambda_{EMS} = 428$ nm e $\lambda_{EXC} = 340$ nm, com um desvio de Stokes de 88 nm. Ambas as moléculas possuem estruturas semelhantes às *bis*-imina tiazóis, e seus desvios de Stokes maiores reforçam a relevância do desvio de 25 nm observado para T3, embora menor, indicando um potencial aprimoramento nas propriedades fotoluminescentes dessa classe de compostos.

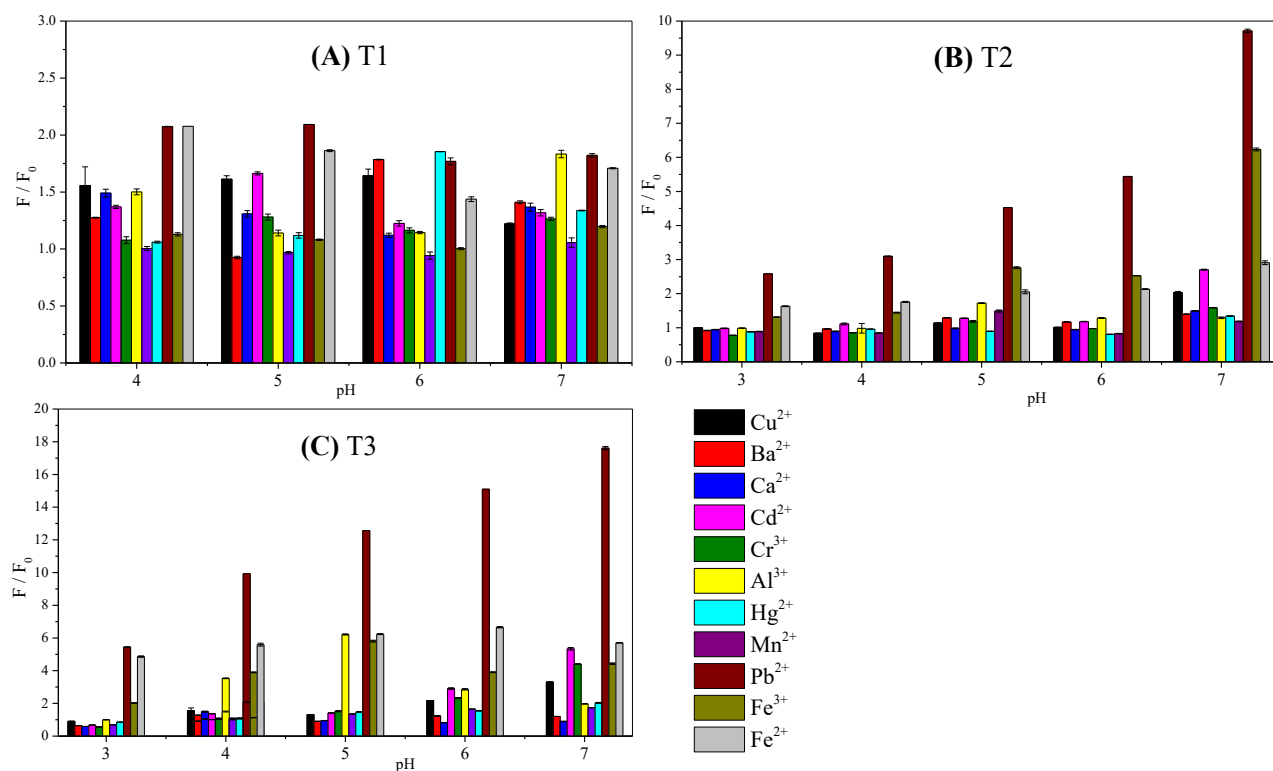
De acordo com a caracterização por RMN, todas as *bis*-imina tiazol apresentaram comportamento semelhante, e, assim, a discussão foi realizada com a molécula T1. O espectro de RMN de ^1H da *bis*-imina tiazol T1 (Figura 27, Anexo I.) mostra um singlete em δ 6,18, característico do H da ligação SCH. O dueto em δ 6,85, com $J = 8,3$ Hz, integrado para um hidrogênio, foi atribuído a CH aromático, assim como o multiplete em δ 6,91 – 6,98 integrado para dois hidrogênios. O dueto em δ 7,05, com $J = 8,2$ Hz, integrado para um hidrogênio, refere-se ao CH aromático. O multiplete em δ 7,28-7,40 para quatro hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios CH aromáticos. O multiplete em δ 7,53-7,46, integrado para cinco hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios aromáticos da porção da estrutura do acetofenona. Os singletos em δ 8,57 e 9,72 para os hidrogênios NCH e para os hidrogênios OH, foram observados dois singletos em δ 10,35 e 11,15. O espectro de RMN de ^{13}C para T1 (Figura 28, Anexo I) mostram um sinal em δ 98,9 que foi atribuído ao carbono CS. Os sinais entre δ 132,3 e 116,8 referem-se a carbonos aromáticos. Em δ 141,0 foi observado o sinal do carbono do anel tiazol, da ligação CN. Os sinais em δ 157,7 e 157,5 foram atribuídos ao CH das iminas. Em δ 158,2 e 158,9 estão os sinais atribuídos ao carbono ligado aos grupos OH e em δ 164,1 o sinal foi atribuído ao carbono ligado ao N e S do anel tiazol.

3.2. Seletividade, pH e interferência

As *bis*-iminas tiazóis T1, T2, e T3 passaram por um teste de seletividade para os cátions metálicos Pb^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} e Mn^{2+} , com uma concentração de $1,25 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} para os íons metálicos. Neste estudo, foram adicionados

volumes de 600 μL para T1, 60 μL para T2 e T3, 680 μL de solução tampão fosfato (0,2 mol L^{-1}), 720 μL da solução contendo os íons metálicos e água deionizada até completar 3000 μL em uma cubeta de quartzo com quatro faces polidas, com um tempo de reação de 3 minutos. O branco foi calibrado medindo a intensidade fluorescente das moléculas sem o metal, contendo apenas o tampão e a água. Observou-se que a precipitação das moléculas ocorre em ambiente básico, pH entre 8 e 10. Assim, essa faixa de pH foi desconsiderada para estudos subsequentes, e apenas os valores de pH entre 3 e 7 foram analisados, com o pH ajustado utilizando soluções tampão.

Figura 15. Estudo de seletividade e pH das moléculas (A) T1 a $1,25 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} (B) T2 a $1,02 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e (C) T3 a $1,14 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , tempo de integração de 3s, tempo de reação = 3 min, $n = 3$. Concentrações de íons metálicos de $1,25 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} .



Fonte: autoria própria.

A resposta analítica $F/F_0 > 1$ na Figura 16(A) indica falta de seletividade, uma vez que essa resposta foi observada para todos os metais em cada pH analisado. No entanto, se essa resposta tivesse sido observada apenas para um metal específico em um pH particular, como a detecção de chumbo, o sensor fluorescente seria seletivo para esse metal. Portanto, a seletividade só seria indicada se essa resposta fosse observada exclusivamente para um metal específico em um pH particular.

Portanto, esta molécula não é ideal para o objetivo do estudo. Por outro lado, a molécula T2 apresentou seletividade em pH = 3 e 4 para os íons Fe^{2+} , Fe^{3+} e Pb^{2+} . No entanto, ao considerar a aplicação deste método, é importante observar que pode ocorrer interferência no sinal devido à presença de Cr^{3+} em pH = 3 ($F/F_0 = 1,07$) e Cd^{2+} em pH = 4 ($F/F_0 = 1,66$). Para o íon Cr^{3+} , a supressão do sinal fluorescente é significativamente inferior a 1. Quanto ao Cd^{2+} , a razão do sinal é ligeiramente superior a 1, conforme mostrado na Figura 16 (B).

Na Figura 16 (C), observa-se que, em pH = 3, os íons Pb^{2+} , Fe^{2+} , e Fe^{3+} apresentam razões de intensidade significativamente mais altas em comparação com os outros metais, enquanto para os metais restantes, essa razão foi mais baixa ou próxima de 1. Especificamente, foram encontrados valores de $F/F_0 < 1$ para Cr^{3+} (0,77), Hg^{2+} (0,87) e Mn^{2+} (0,88), enquanto as razões para os outros metais foram acima de 0,95. Em pH = 4, intensidades superiores a 1 foram observadas para os íons Pb^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , destacando o potencial de interferência do alumínio e ferro (II) e (III), pois a razão F/F_0 foi de 9,9 para Pb^{2+} , 3,5 para Al^{3+} , 5,6 para Fe^{2+} e 3,90 para Fe^{3+} . Portanto, a *bis* imina tiazol T3 foi escolhida para a determinação de Pb^{2+} em pH = 3, devido às razões de intensidade fluorescente excepcionalmente mais altas para o chumbo em comparação com os outros metais neste valor de pH.

Com base nos resultados de interferência apresentados na Figura 16 para a *bis* imina tiazol T3 na presença de diferentes cátions metálicos, é evidente que há potenciais interferentes. Em vista disso, foi realizado um estudo utilizando uma razão molar de 1:1 entre Pb^{2+} e os íons Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} e Mn^{2+} . O erro relativo (%), foi calculado pela equação 2:

$$Er (\%) = \left(\frac{F_{\text{Pb}+\text{interferente}} - F_{\text{Pb}}}{F_{\text{Pb}}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

Com base nos resultados, pode-se concluir que Mn^{2+} e Fe^{3+} são potenciais interferentes na determinação de Pb^{2+} , pois apresentaram erro relativo superior a $\pm 10\%$ (Tabela 4). Como destacado na Figura 3(C) a pH 3, observa-se uma interferência notável de Fe^{2+} e uma interferência de Fe^{3+} na quantificação de chumbo. No entanto, ao investigar o efeito do ferro na presença de chumbo em uma razão 1:1, os valores associados ao erro relativo (Tabela 4) foram mais elevados para Fe^{3+} do que para Fe^{2+} . Em outras palavras, os resultados revelaram uma divergência em relação à seletividade [51]. No entanto, como forma de contornar o problema, a interferência de Fe^{3+} pode ser minimizada pela adição de 100 μL de ácido ascórbico ($10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) (a interferência, que inicialmente era -18,3, foi reduzida para -0,8).

Tabela 4. Estudo de interferência na determinação de Pb^{2+} ($n = 3$) com a molécula T3 em pH 3.

Interferente	Razão Pb^{2+} : Interferente	Erro Relativo (%)
Cu^{2+}	1:1	-3,7
Ba^{2+}	1:1	-7,0
Ca^{2+}	1:1	-5,0
Cd^{2+}	1:1	4,9
Cr^{3+}	1:1	3,5
Al^{3+}	1:1	8,3
Hg^{2+}	1:1	5,0
Mn^{2+}	1:1	-16
Fe^{2+}	1:1	5,7
Fe^{3+}	1:1	-18
Fe^{3+} com ácido ascórbico	1:1	-0,80

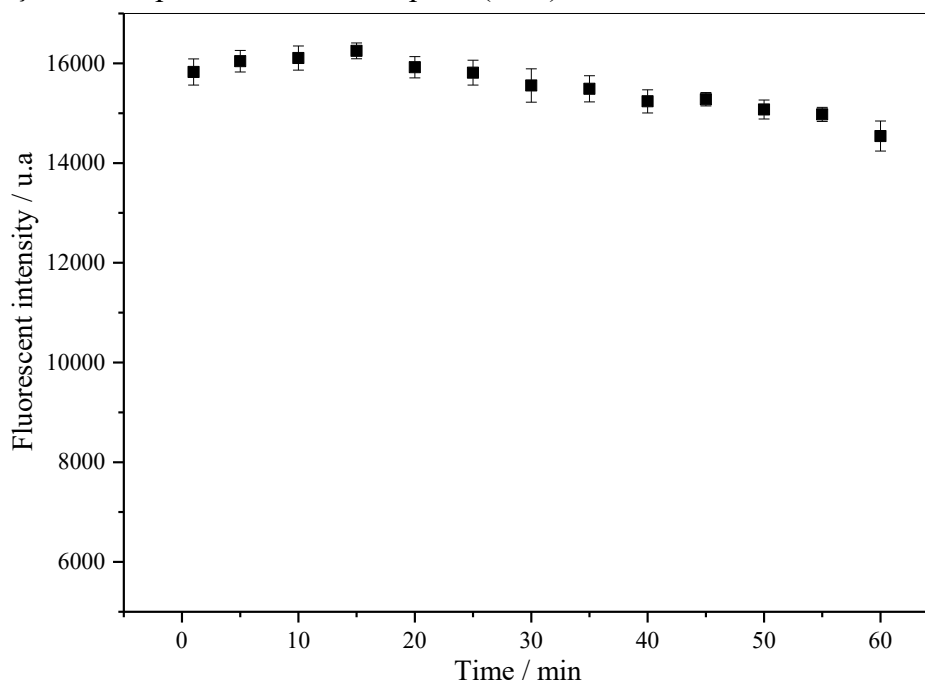
Fonte: autoria própria.

3.3. Estudo da estabilidade da luminescência de T3

O teste de estabilidade da luminescência da *bis* imina tiazol T3 foi realizado, mantendo-a irradiada ($\lambda_{EM} = 455$ nm) por 60 minutos. Para isso, 60 μ L de T3 ($1,25 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}), 680 μ L de tampão fosfato $0,2$ mol L^{-1} e 2260 μ L de água destilada foram adicionados a uma cubeta de quartzo. A cubeta foi mantida no fluorímetro durante os experimentos, utilizando uma fonte de radiação xenônio pulsada (AvaLigth-Xe; Avantes). A Figura 17 mostra a resposta da molécula ao longo do tempo, onde se observa que a *bis* imina tiazol T3 foi capaz de manter sua capacidade fotoluminescente por 1 hora, com uma pequena perda significativa, cerca de 8% após 1 hora.

A perda de fotoluminescência para um tempo próximo a 60 min foi observada na ausência do metal de interesse, $Pb(II)$. As *bis*-iminas tiazóis, como a molécula T3, podem apresentar variações na fotoluminescência que podem ser atribuídas a mudanças no pH, à presença de oxidantes como o oxigênio, e à presença de íons metálicos e outros interferentes no meio reacional [52].

Figura 16. Intensidade luminescente para T3 com comprimento de onda de emissão em 455 nm em função do tempo em minutos, em pH 3 ($n=3$).



Fonte: autoria própria.

3.4. Eficiência Quântica

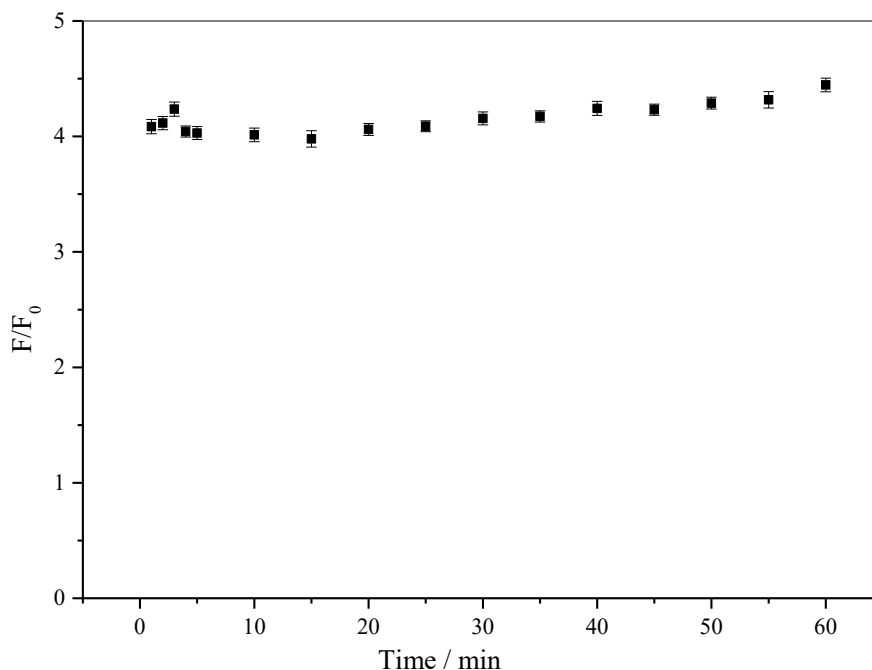
O rendimento quântico foi medido por comparação com o composto de referência sulfato de quinina, utilizando a equação 1 para cálculo. A concentração utilizada foi de 2 mg L^{-1} tanto para o sulfato de quinina quanto para T3. O resultado obtido foi um rendimento quântico de 3,23%, em comparação com o rendimento de eficiência de 0,546 para a quinina em uma solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Esse resultado sugere que a molécula T3 tem uma eficiência quântica inferior à da quinina nas mesmas condições, visto que a eficiência do sulfato de quinina é bem estabelecida. No entanto, para fins analíticos, o rendimento quântico obtido foi satisfatório, como pode ser visto pelo baixo limite de detecção alcançado.

3.5. Estudo do tempo de reação

Em uma cubeta de quartzo, foram adicionados $60 \mu\text{L}$ da *bis* imina tiazol T3 ($1,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), $680 \mu\text{L}$ de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 3, $1540 \mu\text{L}$ de água e $720 \mu\text{L}$ do íon metálico Pb^{2+} a uma concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, a amostra foi irradiada por um intervalo de 1 a 60 minutos, com variação de 1 minuto entre as leituras. Os resultados são mostrados na Figura 18. Com o tempo, o sinal de intensidade foi forte, exibindo uma razão entre as intensidades fluorescentes (F (molécula com metal) / F_0 (somente molécula)) maior que

1, permanecendo igual ou aproximadamente 4 durante todo o período. O ponto de 3 minutos foi escolhido, pois a razão F/F_0 foi a mais intensa, e após esse tempo, a razão não sofreu mudanças consideráveis.

Figura 17. Diferença entre as intensidades fluorescentes da *bis* imina tiazol T3 na presença de Pb^{2+} ($1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com emissão a 455 nm em função do tempo em minutos, pH 3, com $n = 3$.



Fonte: autoria própria.

Como pode ser visto na Figura 18, a razão F/F_0 permaneceu consistentemente na faixa de 3,98 a 4,44, sempre acima de 1. A análise dos primeiros três minutos resultou nos seguintes valores:

- 2 min: $F/F_0 = 4,1154 \pm 0,057$
- 3 min: $F/F_0 = 4,2362 \pm 0,061$

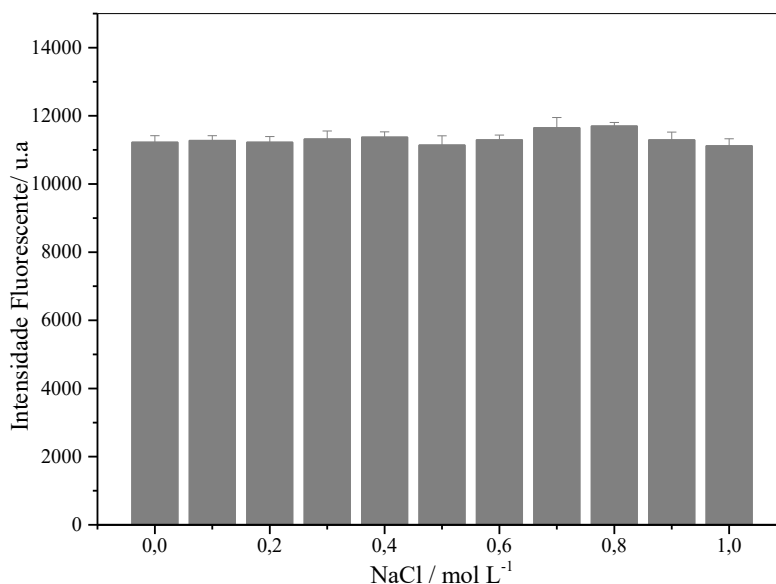
Para avaliar a significância desses valores ao longo do tempo, métodos estatísticos como o teste t de amostras independentes foram utilizados, adotando um nível de significância de p-valor $< 0,05$. Os resultados indicaram que não há diferença significativa entre os valores de 2 e 3 minutos, com um p-valor de 0,0669 (aproximadamente 0,07). Embora não estatisticamente significativa, a medição aos 3 minutos foi escolhida porque apresentou um valor de F/F_0 mais alto, o que pode indicar uma tendência importante para estudos futuros.

3.6. Efeito da força iônica na fluorescência de T3

Um volume fixo da solução de *bis*-imina tiazol T3 ($1,24 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e o tampão de pH 3 foram adicionados a uma cubeta de quartzo, variando o volume de água destilada e cloreto de sódio. O teste de força iônica foi conduzido utilizando apenas NaCl. Este sal é amplamente utilizado na literatura para estudar a fotoluminescência de sondas [53], e, portanto, foi selecionado. Além disso, algumas amostras estudadas neste trabalho apresentam alta concentração de íons Na⁺ ou Cl⁻, como na urina e saliva. Assim, NaCl foi adicionado progressivamente, variando de 0 a 1 mol L⁻¹ em incrementos de 0,1 mol L⁻¹. O gráfico (Figura 19) mostra variações pequenas, mas não significativas, indicando que a intensidade fluorescente da *bis*-imina tiazol T3 não foi afetada pelo aumento da força iônica no meio reacional. Dessa forma, a *bis*-imina tiazol T3 exibiu alta estabilidade durante o estudo de força iônica.

Como pode ser visto na Figura 19, as variações na concentração de NaCl não afetaram significativamente a intensidade de fluorescência da *bis*-imina tiazol T3, indicando boa estabilidade iônica sob essas condições específicas de teste, o que demonstra a robustez do método e sua aplicabilidade para diversas condições ambientais e amostras biológicas [53].

Figura 18. Gráfico de barras da intensidade de fluorescência da *bis*-imina tiazol T3, sem a presença de Pb²⁺, em função das adições de NaCl 0,1 mol L⁻¹, tempo de reação = 3 min, n = 3.

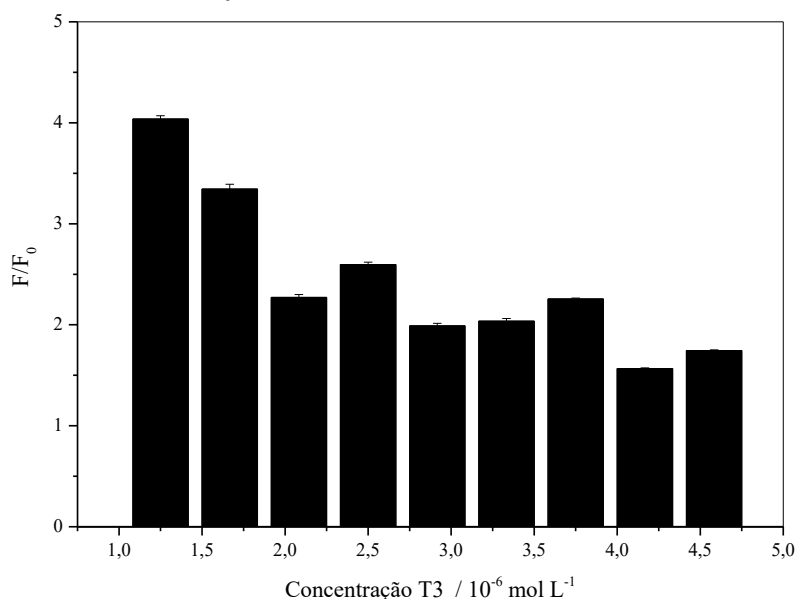


Fonte: autoria própria.

3.7. Estudo da concentração de T3

O efeito da concentração do ligante T3 foi estudado na faixa de $1,14 \times 10^{-6}$ a $8,33 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Para uma concentração de $1,14 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, a resposta analítica foi máxima, e essa concentração foi selecionada para os estudos subsequentes (Figura 20). Acima da concentração de 5×10^{-6} mol L⁻¹, o sinal do equipamento foi saturado, mostrando eficácia limitada para o estudo quando o ligante está em excesso e pelo excesso de luz no detector.

Figura 19. Estudo da concentração da molécula T3.

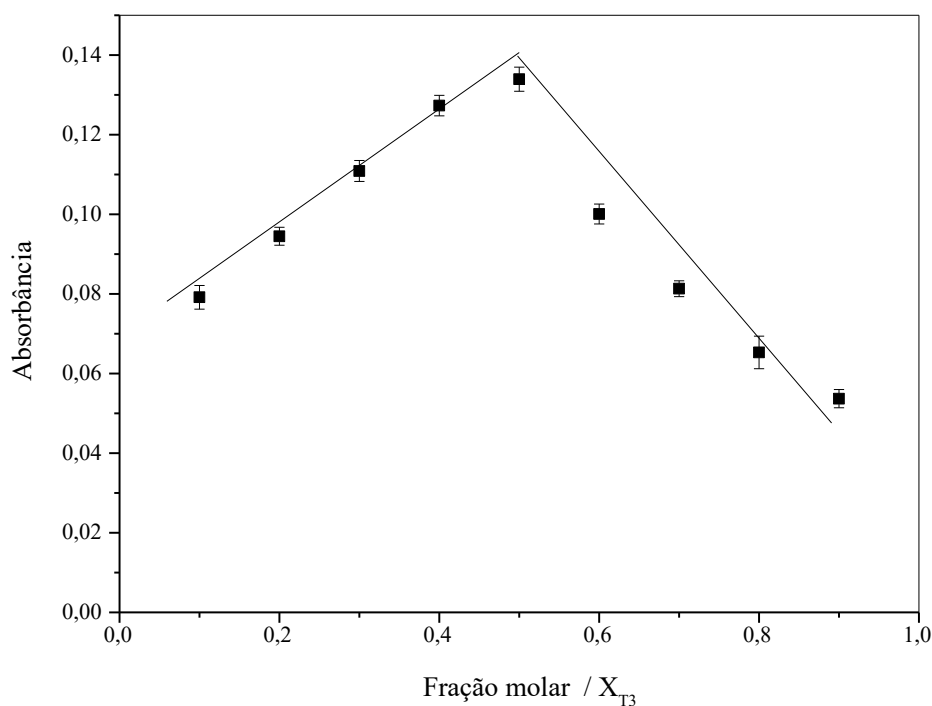


Fonte: autoria própria.

3.8. Reação de determinação estequiométrica T3/Pb²⁺

Em seguida, a estequiometria da reação entre a molécula de ligante T3 e Pb²⁺ foi estudada. Para isso, foi utilizado o gráfico de Job, também conhecido como método das variações contínuas. É uma técnica experimental amplamente utilizada na investigação das estequiometrias de reações de complexação [52,53]. Para este estudo, foram preparadas soluções contendo o metal e o ligante em diferentes proporções com $5,7 \times 10^{-6}$ mol. O gráfico de Job é apresentado na Figura 21 e ilustra a relação entre a absorbância (sinal analítico) e a fração molar do *bis*-imina tiazol T3, onde $X_{T3} = (n_{T3}) / (n_{T3} + n_{Pb})$. Experimentalmente, foi observado que o ponto de interseção das duas linhas corresponde a 0,5. Isso indica que a razão estequiométrica da reação T3/Pb²⁺ é 1:1.

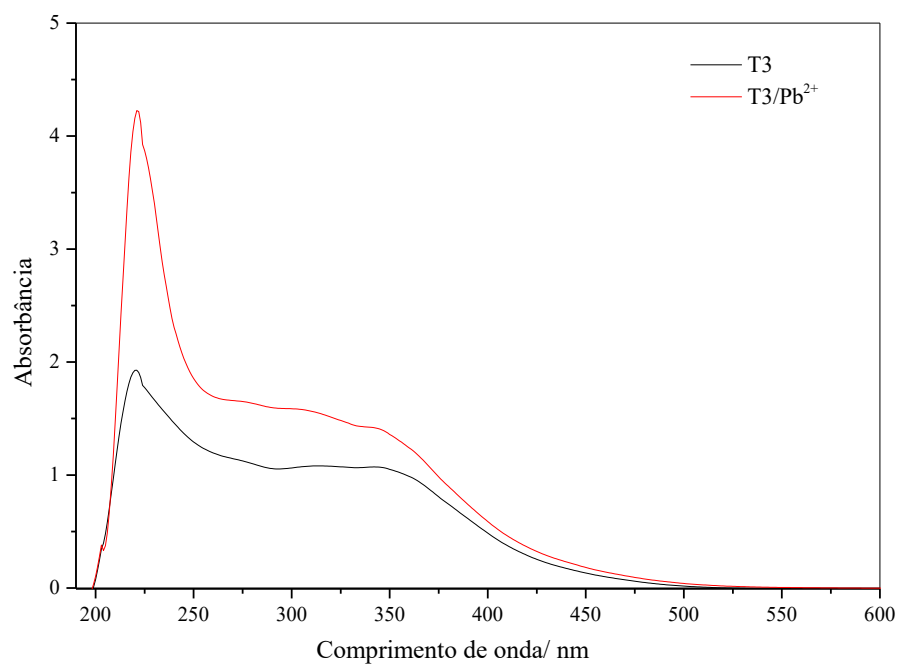
Figura 20. Método de Job para a determinação da razão estequiométrica de T3-Pb²⁺.



Fonte: autoria própria

No espectro UV-Vis do ligante T3 (Figura 22), foi observada uma banda de alta intensidade com comprimento de onda máximo de absorção em 214 e 350 nm. Após a reação de complexação com Pb²⁺ na razão 1:1, o máximo de absorção da banda de 214 nm deslocou-se para 225 nm, indicando um deslocamento para o vermelho (efeito batocrômico).

Figura 21. Espectro UV do complexo T3-Pb²⁺ e do T3.



Fonte: autoria própria.

3.9. Validação do método

O desempenho analítico foi avaliado sob condições experimentais ótimas. O coeficiente de correlação (r) foi 0,9987, e o coeficiente de determinação (R^2) foi 0,9965. A curva de calibração (Figura 23) apresentou boa linearidade na faixa de trabalho de 0,67 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. A equação de calibração é dada por $F = 204,19[\text{Pb}^{2+}] + 102,77$, onde $[\text{Pb}^{2+}]$ está em $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 3$) e F é a variação na intensidade de emissão. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados usando $\text{LOD} = 3 \times \sigma / S$ e $\text{LOQ} = 10 \times \sigma / S$, onde σ é o desvio padrão de dez medições em branco, e S é a inclinação da curva analítica. Assim, o LOD e o LOQ foram 0,18 e 0,62 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A precisão do método proposto foi estimada por meio de ensaios de repetibilidade ($n = 12$) em três níveis de concentração, obtendo-se % RSD (Desvio Padrão Relativo) inferior a 5, conforme estabelecido pela AOAC [50] para precisão intradia e interdia, conforme mostrado na Tabela 5.

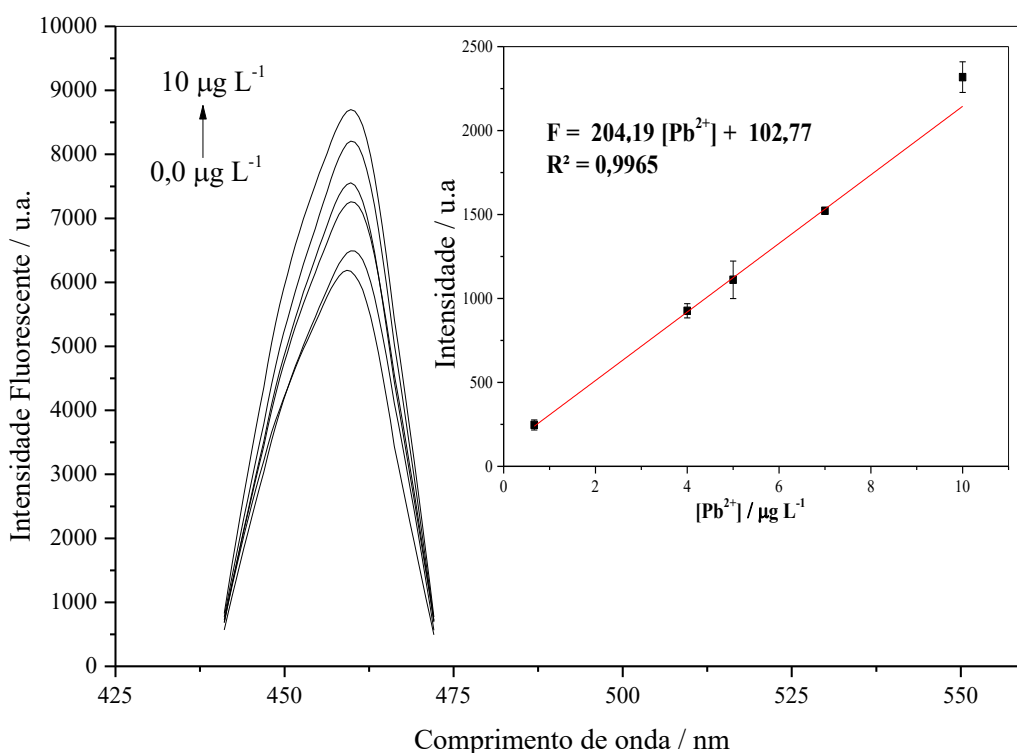
A leitura do branco (solução de *bis*-iminas que não contém Pb^{2+}) foi realizada e mostrou um baixo desvio padrão junto com uma alta inclinação da curva analítica (S) de 204,19 unidades arbitrárias/ $\mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo, o que resultou em um LOD baixo de 0,18 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb). Vários fatores podem explicar esse LOD baixo. Um deles é a sensibilidade do método. O espectrofluorômetro utilizado possui alta sensibilidade, permitindo a determinação de baixas concentrações de chumbo. Além disso, o alto fator de correlação indica uma curva de calibração bem definida, e um bom rendimento quântico, o que favorece a quantificação em níveis de concentração baixos.

Tabela 5. Desvio padrão relativo (RSD) em três níveis de concentração ($n = 12$).

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	%RSD	
	Intradia	Interdia
0,67	2,00	1,91
3,00	1,45	2,28
10,0	1,09	1,46

Fonte: autoria própria.

Figura 22. Espectro de fluorescência em função das concentrações de Pb^{2+} . Inseto: curva de calibração linear e linha de melhor ajuste para Pb^{2+} na faixa de concentração de $0 \mu\text{g L}^{-1}$ a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 3$).



Fonte: autoria própria.

3.10. Determinação de Pb^{2+} em amostras

Estudos de recuperação foram realizados para amostras de água de lagoa, água mineral, água da torneira, urina sintética, saliva sintética e solos em três níveis de concentração. Os resultados estão mostrados na Tabela 6, e as recuperações obtidas variaram de 83,53% a 119,10%. Os resultados se mostraram confiáveis e dentro da faixa de 60% a 120% para recuperação, de acordo com os padrões da AOAC. [52]

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, algumas considerações sobre o coeficiente de variação (CV) foram destacadas, pois alguns valores de CV ultrapassaram 10% para algumas amostras:

- Água Mineral (CV = 17,48%): A matriz da água mineral é complexa devido à presença de diversos minerais que poderiam interferir na análise. No entanto, essa variação foi observada apenas na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

- Água de Lagoa (CV = 17,57% a $5 \mu\text{g L}^{-1}$): A variação pode ser justificada pela presença de matéria orgânica, que poderia contribuir para a alta variabilidade na recuperação.

Tabela 6. Determinação de chumbo em amostras reais utilizando o método proposto, incluindo o estudo de recuperação.

Amostra		Adicionado / $\mu\text{g L}^{-1}$	Encontrado / $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação (%)
Água	Torneira	1,00	$0,83 \pm 0,04$	83,5
		5,00	$5,17 \pm 0,16$	103,4
		9,00	$7,81 \pm 0,13$	86,8
	Mineral	1,00	$1,14 \pm 0,08$	114,4
		5,00	$4,92 \pm 0,86$	98,5
		9,00	$8,60 \pm 0,15$	95,6
	Lagoa	1,00	$0,83 \pm 0,05$	82,9
		5,00	$5,18 \pm 0,91$	103,7
		9,00	$10,1 \pm 0,29$	112,4
Cachaça	S1	1,00	$1,04 \pm 0,04$	103,7
		5,00	$5,09 \pm 0,33$	101,9
		9,00	$9,84 \pm 0,31$	109,3
	S2	1,00	$0,85 \pm 0,04$	85,6
		5,00	$4,60 \pm 0,15$	92,0
		9,00	$9,52 \pm 0,16$	105,8
	S3	1,00	$0,91 \pm 0,04$	91,4
		5,00	$5,44 \pm 0,07$	108,9
		9,00	$8,94 \pm 0,23$	99,3
	S4	1,00	$1,07 \pm 0,04$	107,8
		5,00	$4,65 \pm 0,08$	92,9
		9,00	$8,97 \pm 0,09$	99,7
	S5	1,00	$1,10 \pm 0,04$	110,5
		5,00	$4,99 \pm 0,53$	99,9
		9,00	$9,08 \pm 0,79$	100,9
Urina sintética	U1	2,00	$1,98 \pm 0,67$	99,5
	U2	5,00	$5,95 \pm 0,55$	119,1
	U3	9,00	$8,93 \pm 0,05$	99,2
Saliva Sintética	AD1	1,00	$0,96 \pm 0,08$	95,9
	AD5	5,00	$4,98 \pm 0,90$	99,7
	AD9	9,00	$9,48 \pm 0,09$	105,3
Solo	G1	-	$1,70 \times 10^5 \pm 7,07$	-
	G2	-	$1,10 \times 10^4 \pm 28,99$	-
	G3	-	$5,00 \times 10^4 \pm 2,33$	-
	G4	-	$9,20 \times 10^4 \pm 120,21$	-

Fonte: autoria própria.

• Urina Sintética (CV = 33,84% a $2 \mu\text{g L}^{-1}$): A alta variabilidade pode ser atribuída a vários fatores, como o efeito de uma concentração muito baixa associada a uma matriz sintética contendo diversos compostos inorgânicos. Quando comparado a outras concentrações, foram encontrados valores de CV mais baixos (9,24% e 0,56% para 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), indicando menos interferências, sugerindo que concentrações mais altas de chumbo podem ter

minimizado a variabilidade. Outros fatores a considerar incluem a estabilidade da amostra e as técnicas de preparação da amostra.

- Cachaça (CV = 10,62% a $5 \mu\text{g L}^{-1}$): O CV ultrapassou 10% para apenas uma concentração e uma marca de cachaça, o que pode ser justificado pela matriz da cachaça, que contém compostos orgânicos que poderiam interferir nas medições.

3.11. Comparação com o método de referência para quantificação de Pb^{2+}

As amostras de água, urina sintética, saliva sintética e solo foram analisadas pelo método de referência (FAAS). Os parâmetros analíticos de ambos os métodos podem ser vistos na Tabela 7. Para avaliar a precisão do método proposto, as amostras foram enriquecidas com $0,509 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb^{2+} . As amostras foram diluídas para posterior leitura por espectrometria de fluorescência. Os resultados para a determinação de Pb^{2+} por ambos os métodos estão apresentados na Tabela 7. Nessa tabela, foram obtidos valores de erro relativo abaixo de 13%, indicando boa precisão do método para algumas amostras. Por isso, foi realizada uma análise estatística por teste t pareado, que mostrou não haver diferença significativa entre os métodos. O estudo foi conduzido com um nível de confiança de 95% para os grupos de água, saliva e solo, apresentando valores de p dentro do intervalo de confiança.

O método proposto foi mais eficiente na análise de urina em comparação com o método de referência, mostrando um erro relativo superior a 10%. Além disso, a recuperação pelo método proposto foi de 99%, enquanto pelo FAAS foi de 113%, com o valor de p ficando abaixo do nível de confiança estabelecido.

O alto conteúdo de Ca e Na nas amostras de urina e saliva pode ter causado potenciais interferências nos resultados obtidos pelo FAAS, como evidenciado pela observação da chama laranja correspondente [54]. Isso reforça a importância de considerar e controlar interferentes potenciais na análise de chumbo na urina para garantir a precisão dos resultados.

Os resultados obtidos nas amostras de solo foram consistentes e mostraram um baixo erro relativo, indicando que ambos os métodos foram satisfatórios para a análise. As concentrações de chumbo obtidas pelos métodos empregados foram comparáveis, reforçando a confiabilidade e precisão das técnicas utilizadas. Isso demonstra que tanto o método proposto quanto o método de referência foram eficientes na quantificação de chumbo no solo, proporcionando resultados confiáveis e consistentes.

Tabela 7. Dados de desempenho dos métodos para comparação na determinação de Pb²⁺.

Parâmetros analíticos	Método	
	FAAS	Fluorescência
Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	0,667 - 10,00
Faixa de trabalho (mg L^{-1})	0,2 – 2,00	-
R ²	0,9986	0,9900
Recuperação (%) ^a	104 - 117	86 -112

^a Para amostras de água, urina sintética e saliva sintética.

Fonte: autoria própria.

Os dados apresentados na Tabela 8 foram submetidos a um teste t pareado com um nível de confiança de 95% (n = 3). As amostras de água mineral, água potável e água da lagoa apresentaram um valor maior de t calculado = 1,270. Para as amostras de solo, o valor alto de t calculado foi de 0,3800, e para urina sintética e saliva, os valores foram de 20,27 e 3,652, respectivamente. Com base nos resultados, a amostra preparada seguindo o método EPA 3051a foi muito satisfatória para direcionar bons resultados para ambos os métodos. De fato, esse método utilizou diluições para atingir as faixas de trabalho em ambos os métodos, e certamente, a diluição para ajustar a concentração das amostras ajuda a explicar o baixo erro relativo encontrado.

Tabela 8. Determinação de chumbo em amostras pelo método proposto e pelo método de referência.

Amostras	Add. / mg L^{-1}	Método		Erro Relativo / %	p-valor	
		FAAS / mg L^{-1}	Fluorescência / mg L^{-1}			
Água mineral	0,509	0,529 ± 0,01	0,486 ± 0,05	8,12		
Água da lagoa	0,509	0,558 ± 0,02	0,571 ± 0,29	0,51	33,19	
Água de torneira	0,509	0,562 ± 0,01	0,442 ± 0,13	11,3		
Urina sintética	0,509	0,578 ± 0,01	0,499 ± 0,05	12,7	<0,0001	
Saliva sintética	0,509	0,598 ± 0,01	0,534 ± 0,01	10,6	0,0675	
Solos	G1	-	$1,50 \times 10^5 \pm 0,95$	$1,60 \times 10^5 \pm 7,07$	6,67	0,7292
	G2	-	$1,17 \times 10^4 \pm 0,22$	$1,10 \times 10^4 \pm 28,99$	5,98	
	G3	-	$4,77 \times 10^4 \pm 0,36$	$4,55 \times 10^4 \pm 2,33$	4,60	
	G4	-	$1,02 \times 10^5 \pm 3,59$	$9,50 \times 10^4 \pm 120,21$	6,86	

Fonte: autoria própria.

A determinação de chumbo via espectrofluorimetria foi comparada com metodologias semelhantes quanto à faixa de trabalho e limite de detecção (LD), conforme visto na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação dos resultados do presente estudo com os relatados na literatura.

Sensor	Faixa de trabalho	LD	Ref.
^a SP-BDDE	1,0 – 80,0 µg L ⁻¹	0,062 µg L ⁻¹	[55]
^b SPE-BiFE	3,20 – 38,4 µg L ⁻¹	0,10 µg L ⁻¹	[56]
Nanotubos de carbono	0,5 – 15,0 µg L ⁻¹	0,01 µg L ⁻¹	[57]
^c ZnS QDs	1036 – 20,72 µg L ⁻¹	507,14 µg L ⁻¹	[58]
^d GSH-AuNCs@QCM	1036 – 1036x10 ⁶ µg L ⁻¹	1,036 µg L ⁻¹	[59]
^e N-CDs	100,01 – 10 000 µg L ⁻¹	49,69µg L ⁻¹	[60]
^e N-CDs	10 - 10000 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	[61]
<i>bis</i> -iminas tiazol	0,667 - 10,0 µg L ⁻¹	0,18 µg L ⁻¹	Este trabalho

^a Eletrodo de diamante dopado com boro impresso em tela.

^b Eletrodo impresso em tela - eletrodo de filme de bismuto.

^c Pontos quânticos de ZnS.

^d Sensor colorimétrico fluorescente com membranas de celulose quaternizada incorporadas a nanoclusters (QCM).

^e Pontos de carbono dopados com nitrogênio.

Fonte: autoria própria a partir das referências 55 a 61.

Com base na comparação dos trabalhos da literatura apresentados na Tabela 7, observa-se que a faixa de detecção linear do método desenvolvido e seu LD estão entre os menores relatados nesta tabela. O método fluorimétrico proposto apresenta LD superior apenas aos métodos eletroquímicos, uma vez que é possível realizar uma etapa de pré-concentração. Esse procedimento, por vezes, dura de 60 a 300 segundos, e o método proposto é mais rápido em comparação a eles, sendo útil para análises *in situ*, já que o método fluorimétrico pode ser realizado *in situ* utilizando imagem digital baseada em smartphone. [62,63]. Além disso, o método é mais simples de ser utilizado, não requerendo o polimento do eletrodo como o SPE-BiFE e os nanotubos de carbono usados, e assim, o método proposto é mais rápido e apresenta um alto rendimento analítico. Adicionalmente, o método proposto apresentou uma faixa linear e LD para detecção de Pb²⁺ exigidos pela Organização Mundial da Saúde, Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil, Agência de Proteção Ambiental para água potável, bebida alcoólica cachaça e solos. Assim, o método proposto apresentou desempenho comparável, e às vezes melhor, quando comparado a outros relatados na literatura, sendo um bom método analítico para aplicações ambientais e de saúde pública.

4. CONCLUSÕES

Um método eficiente foi desenvolvido para quantificar Pb²⁺ usando um novo ligante da classe das *bis*-iminas tiazóis, atuando como sensor fluorescente. O método proposto foi

aplicado para determinar Pb^{2+} em água, solos, urina, saliva e cachaça, mostrando-se preciso, exato, simples, rápido, com uma boa faixa linear e ajustes de dados. Além disso, a reação utilizada para a determinação de Pb^{2+} é inédita e demonstrou seletividade e sensibilidade para este cátion metálico em $\text{pH} = 3$.

A validação do método, comparando-o com o método de referência (FAAS), confirmou sua confiabilidade e provou ser válido para a aplicação do método proposto como uma alternativa viável e precisa para a análise de Pb^{2+} em amostras. Assim, sob condições ótimas, o LD foi $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$ e o LQ foi $0,62 \mu\text{g L}^{-1}$, com uma faixa linear de $0,67$ a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Devido à sua natureza rápida, com um tempo de resposta de três minutos, a frequência analítica é de 20 amostras por hora. O método desenvolvido apresenta vantagens, como alta sensibilidade e baixo consumo de reagentes, utilizando moléculas de *bis*-imina tiazol como sensor, que exibem uma boa resposta analítica enquanto são seletivas para o íon metálico.

REFERÊNCIAS

- [1] Y. Huang, R. Han, J. Qi, H. Duan, C. Chen, X. Lu, N. Li, Health risks of industrial wastewater heavy metals based on improved grey water footprint model, *J Clean Prod* 377 (2022) 134472. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134472>.
- [2] Z. Wang, P. Luo, X. Zha, C. Xu, S. Kang, M. Zhou, D. Nover, Y. Wang, Overview assessment of risk evaluation and treatment technologies for heavy metal pollution of water and soil, *J Clean Prod* (2022) 134043. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134043>.
- [3] M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, V.B. dos Santos, I.S. Resque, M.H. dos Santos, L.F. Capitán-Vallvey, Microanalysis based on paper device functionalized with cuprizone to determine Cu²⁺ in sugar cane spirits using a smartphone, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 253 (2021) 119580. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119580>.
- [4] M.D.O.K. Franco, W. Toito, V. Bezerra, Molecular and Biomolecular Spectroscopy Microanalysis based on paper device functionalized with cuprizone to determine Cu²⁺ in sugar cane spirits using a smartphone, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 253 (2021) 119580. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119580>.
- [5] M. Valentin Maia, W. Toito Suarez, V. Bezerra dos Santos, J. Paulo Barbosa de Almeida, Carbon dots on paper for determination of Cu²⁺ in Sugar Cane Spirits samples for fluorescence digital image-based method, *Microchemical Journal* 179 (2022) 107500. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107500>.
- [6] M.C.R. Vieira, F.A. Carvalho, M.K. de O. Franco, W.T. Suarez, C.B. Vilanculo, M.H. dos Santos, F.F. Gambarra-Neto, Novel Hg (II) selective fluorescent green sensor based on carbon dots synthesized from starch and functionalized with methimazole, *Ecotoxicol Environ Saf* 213 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112043>.
- [7] M. Meng, R. Sun, H. Liu, B. Yu, Y. Yin, L. Hu, J. Shi, G. Jiang, An Integrated Model for Input and Migration of Mercury in Chinese Coastal Sediments, *Environ Sci Technol* 53 (2019) 2460–2471. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06329>.
- [8] W. Toito, M.O.K. Franco, L.F. Capitán-vallvey, M.M. Erenas, Chitosan-modified cotton thread for the preconcentration and colorimetric trace determination of Co (II), *Microchemical Journal* 158 (2020) 105137. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105137>.
- [9] S. Wang, Y. Huang, L. Zhang, F. Li, F. Lin, Y. Wang, X. Chen, Highly selective fluorescence turn-on determination of Pb (II) in Water by in-situ enrichment of Pb (II) and MAPbBr₃

- perovskite growth in sulfhydryl functionalized mesoporous alumina film, *Sens Actuators B Chem* 326 (2021) 128975. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128975>.
- [10] S. Kouzbour, B. Gourich, F. Gros, C. Vial, Y. Stiriba, A novel approach for removing cadmium from synthetic wet phosphoric acid using sulfide precipitation process operating in batch and continuous modes, *Miner Eng* 187 (2022) 107809. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2022.107809>.
- [11] W. Li, W. Ji, M. Yilmaz, T.C. Zhang, S. Yuan, One-Pot synthesis of MWCNTs/Fe-MOFs nanocomposites for enhanced adsorption of As(V) in aqueous solution, *Appl Surf Sci* 609 (2023) 155304. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.155304>.
- [12] D.O.M. Neto, C.R. Bellato, D.D.C. Silva, D. De Química, U.F. De Viçosa, A.P.H. Hofs, M. Gerais, Iron oxide / carbon nanotubes / chitosan magnetic composite film for chromium species removal, *Chemosphere* 218 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.080>.
- [13] Y. Ma, K. Zeng, T. Duan, Fast and clean determination of total selenium in biological materials by an improved oxygen flask combustion method combined with hydride generation atomic fluorescence spectrometry, *Microchemical Journal* 148 (2019) 743–747. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.064>.
- [14] V. Bezerra dos Santos, E.L. Fava, O.D. Pessoa-Neto, S.R. Bianchi, R.C. Faria, O. Fatibello-Filho, A versatile and robust electrochemical flow cell with a boron-doped diamond electrode for simultaneous determination of Zn²⁺ and Pb²⁺ ions in water samples, *Analytical Methods* 6 (2014) 8526–8534. <https://doi.org/10.1039/C4AY01811G>.
- [15] V. Bezerra dos Santos, E.L. Fava, N. Sá de Miranda Curi, R.C. Faria, T.B. Guerreiro, O. Fatibello-Filho, An electrochemical analyzer for in situ flow determination of Pb(II) and Cd(II) in lake water with on-line data transmission and a global positioning system, *Analytical Methods* 7 (2015) 3105–3112. <https://doi.org/10.1039/C5AY00012B>.
- [16] R. Nag, E. Cummins, Human health risk assessment of lead (Pb) through the environmental-food pathway, *Science of The Total Environment* 810 (2022) 151168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151168>.
- [17] J.L. de Oliveira, Emprego da folha e de material extraído da folha de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) na remoção de íons Cd²⁺ e Pb²⁺ de soluções aquosas, *Dissertação de Mestrado, UFOP* (2019).
- [18] A. Zwolak, M. Sarzyńska, E. Szyrka, K. Stawarczyk, Sources of Soil Pollution by Heavy Metals and Their Accumulation in Vegetables: a Review, *Water Air Soil Pollut* 230 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4221-y>.

- [19] A. for T.S. and D.R.D. of T. and H.H.S. ATSDR, Support Document to the 2019 Substance Priority List (Candidates for Toxicological Profiles) Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Human Health Sciences, (2022) 1–12.
- [20] WHO, Guidelines for Drinking-Water Quality, World Health Organization (2022) 415–418.
- [21] X. Lyu, R. Tao, T. Zhang, Pre-combustion mercury removal with co-production of hydrogen via coal electrolysis, *Journal of Environmental Sciences* (2022). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.09.017>.
- [22] J.P.B. de Almeida, V. de A. Carvalho, L.P. da Silva, M.L. do Nascimento, S.B. de Oliveira, M. V Maia, W.T. Suarez, C.D. Garcia, V.B. dos Santos, Lab-on-a-Drone: remote voltammetric analysis of lead in water with real-time data transmission, *Analytical Methods* 15 (2023) 4827–4833. <https://doi.org/10.1039/D3AY01088K>.
- [23] H. Shirkhanloo, M. Habibnia, A. Rashidi, A. Faghihi, Simultaneously speciation of mercury in water , human blood and food samples based on pyrrolic and pyridinic nitrogen doped porous graphene nanostructure, *Food Chem* 403 (2023) 134394. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134394>.
- [24] M. Das, D. Gangopadhyay, R. Pelc, R. Hadravová, J. Šebestík, P. Bouř, Aggregation-aided SERS: Selective detection of arsenic by surface-enhanced Raman spectroscopy facilitated by colloid cross-linking, *Talanta* 253 (2023) 123940. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123940>.
- [25] M.E. Mahmoud, A.E.H. Abdou, M.E. Sobhy, Engineered nano-zirconium oxide-crosslinked-nanolayer of carboxymethyl cellulose for speciation and adsorptive removal of Cr(III) and Cr(VI), *Powder Technol* 321 (2017) 444–453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.08.041>.
- [26] L.A. Portugal, E. Palacio, R. Frizzarin, J.H. Santos Neto, V. Cerda, S.L.C. Ferreira, Multi-commutated flow system for inorganic selenium speciation in infusion tea samples by chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry, *Talanta* 252 (2023) 123897. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123897>.
- [27] C. Tang, J. Qiao, Y. Wen, Z. Zeng, S. Shao, S. Dong, Quality control of woody edible oil : The application of fluorescence spectroscopy and the influencing factors of fluorescence, *Food Control* 142 (2022) 109275. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109275>.
- [28] J. Dou, W. Dawuti, X. Zheng, R. Zhang, J. Zhou, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Urine fluorescence spectroscopy combined with machine learning for screening of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 40 (2022) 103102. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103102>.

- [29] J.R. Lakowicz, *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9003-5>.
- [30] D.A. SKOOG, F.JAMES. HOLLER, S.R. CROUCH, *Analytical Instrumental*, Brooks/Cole, 2007.
- [31] E.K.N. da Silva, V.B. dos Santos, I.S. Resque, C.A. Neves, S.G.C. Moreira, M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, A fluorescence digital image-based method using a 3D-printed platform and a UV-LED chamber made of polyacid lactic for quinine quantification in beverages, *Microchemical Journal* 157 (2020) 104986. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104986>.
- [32] T. Wang, N. Zhang, W. Bai, Y. Bao, Fluorescent chemosensors based on conjugated polymers with N-heterocyclic moieties: Two decades of progress, *Polym Chem* 11 (2020) 3095–3114. <https://doi.org/10.1039/d0py00336k>.
- [33] K. Mahesh, S. Karpagam, K. Pandian, *How to Design Donor–Acceptor Based Heterocyclic Conjugated Polymers for Applications from Organic Electronics to Sensors*, Springer International Publishing, 2019. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0237-4>.
- [34] M.A.M. Alhamami, J.S. Algethami, S. Khan, A Review on Thiazole Based Colorimetric and Fluorimetric Chemosensors for the Detection of Heavy Metal Ions, *Crit Rev Anal Chem* 0 (2023) 1–25. <https://doi.org/10.1080/10408347.2023.2197073>.
- [35] M. de Oliveira Krambeck Franco, G.A. Dias Castro, C. Vilanculo, S.A. Fernandes, W.T. Suarez, A color reaction for the determination of Cu²⁺ in distilled beverages employing digital imaging, *Anal Chim Acta* 1177 (2021) 338844. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338844>.
- [36] A.L. Berhanu, Gaurav, I. Mohiuddin, A.K. Malik, J.S. Aulakh, V. Kumar, K.H. Kim, A review of the applications of Schiff bases as optical chemical sensors, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 116 (2019) 74–91. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.025>.
- [37] M. Srikanth, M. V Sushma, P.S. Reddy, B.K. Kumar, M. Vijjulatha, V.R. Rao, Design and synthesis of new thiazoles by microwave-assisted method : Evaluation as an anti-breast cancer agents and molecular docking studies Design and synthesis of new thiazoles by microwave-assisted method : Evaluation as an anti-breast cancer agents a, *Synth Commun* 50 (2020) 2488–2501. <https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1781184>.
- [38] S. Mamidala, S.R. Peddi, R.K. Aravilli, P.C. Jilloju, V. Manga, R.R. Vedula, Microwave irradiated one pot, three component synthesis of a new series of hybrid coumarin based thiazoles: Antibacterial evaluation and molecular docking studies, *J Mol Struct* 1225 (2021) 129114. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129114>.
- [39] C.G. Ravazzi, M. de O. Krambeck Franco, M.C.R. Vieira, W.T. Suarez, Smartphone application for captopril determination in dosage forms and synthetic urine employing digital imaging, *Talanta* 189 (2018) 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.015>.

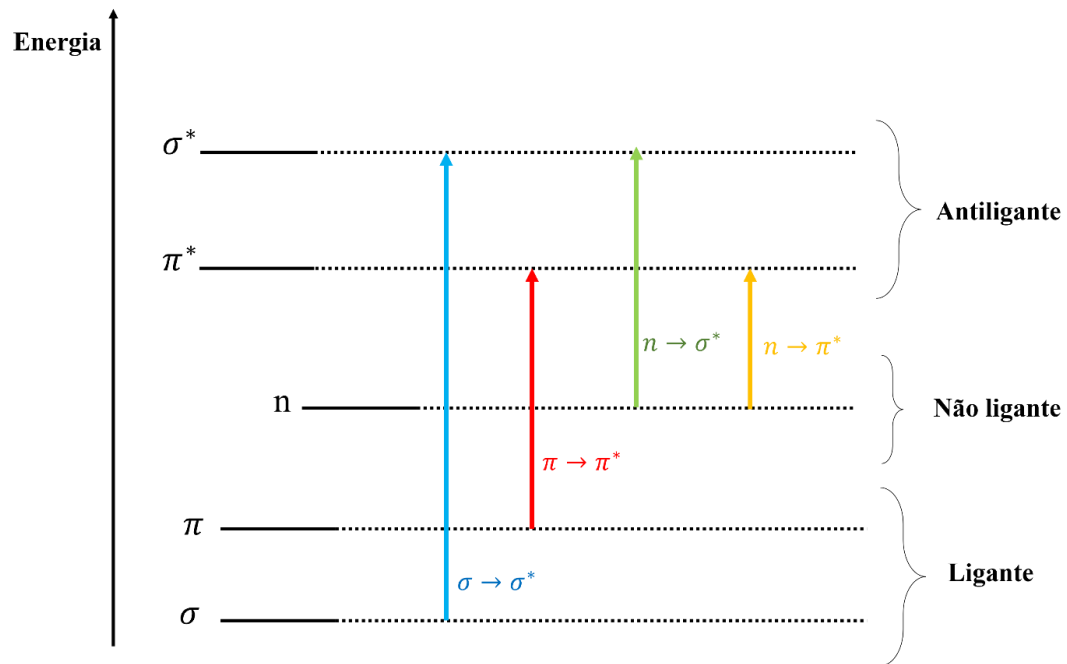
- [40] D.D. Link, P.J. Walter, H.M. Kingston, Development and validation of the new EPA microwave-assisted leach method 3051A, *Environ Sci Technol* 32 (1998) 3628–3632. <https://doi.org/10.1021/es980559n>.
- [41] X.-H. Liu, J.-Q. Weng, B.-L. Wang, Y.-H. Li, C.-X. Tan, Z.-M. Li, Microwave-assisted synthesis of novel fluorinated 1,2,4-triazole derivatives, and study of their biological activity, *Research on Chemical Intermediates* 40 (2014) 2605–2612. <https://doi.org/10.1007/s11164-013-1113-4>.
- [42] R.A. Sheldon, The: E factor 25 years on: The rise of green chemistry and sustainability, *Green Chemistry* 19 (2017) 18–43. <https://doi.org/10.1039/c6gc02157c>.
- [43] M. Shkooor, A. Al-Abade, I. Aleteiwib, M. Al-Talib, H. Tashtoush, Unusual product from the acid-catalyzed one-pot, multicomponent reaction of thiocarbohydrazide, aldehydes, and phenacyl bromides, *Synth Commun* 47 (2017) 1471–1477. <https://doi.org/10.1080/00397911.2017.1332225>.
- [44] D.G. Raut, R.B. Bhosale, One-pot PEG-mediated syntheses of 2-(2-hydrazinyl) thiazole derivatives: novel route, *Journal of Sulfur Chemistry* 39 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1080/17415993.2017.1371175>.
- [45] A.T.R. Williams, S.A. Winfield, J.N. Miller, Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer, *Analyst* 108 (1983) 1067–1071. <https://doi.org/10.1039/AN9830801067>.
- [46] ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada RDC N. 166, Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2017 (2017).
- [47] B.R.C. Vale, K.O. Vieira, J.C.L. Sousa, J.L. Ferrari, M.A. Schiavon, Efeito da estrutura molecular de ligantes de superfície em pontos quânticos de CdTe dispersos em água, *Quim Nova* 38 (2015) 22–29. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140292>.
- [48] Q. An, S. Su, L. Chai, Y. Wang, X. Wang, X. Li, T. Liang, W. Hu, X. Song, C. Li, Imaging of peroxynitrite in mitochondria by a near-infrared fluorescent probe with a large Stokes shift, *Talanta* 253 (2022) 124073. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124073>.
- [49] Z. Zhang, M. Zhu, D. Zhang, A Thermogravimetric study of the characteristics of pyrolysis of cellulose isolated from selected biomass, *Appl Energy* 220 (2018) 87–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.03.057>.
- [50] F. Kolcu, S. Çulhaoğlu, İ. Kaya, Synthesis and investigation of bis(phenyl)fluorene and carbazole appended dipodal Schiff base for fluorescence sensing towards Sn(II) ion and its regioselective polymerization, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 441 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2023.114665>.

- [51] F. Kolcu, D. Erdener, İ. Kaya, A Schiff base based on triphenylamine and thiophene moieties as a fluorescent sensor for Cr (III) ions: Synthesis, characterization and fluorescent applications, *Inorganica Chim. Acta.* 509 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119676>.
- [52] AOAC INTERNACIONAL, Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations, *Jurnal Sains Dan Seni Its* 4 (2013) 1–17.
- [53] V.M.S. Gil, N.C. Oliveira, On the use of the method of continuous variations, *J Chem Educ* 67 (1990) 473–478. <https://doi.org/10.1021/ed067p473>.
- [54] I. Constantinidis, J.D. Satterlee, UV-Visible and Carbon NMR Studies of Quinine Binding to Urohemin I Chloride and Uroporphyrin I in Aqueous Solution, *J Am Chem Soc* 110 (1988) 927–932. <https://doi.org/10.1021/ja00211a037>.
- [55] W. Silva Lyra, V.B. Dos Santos, A.G.G. Dionízio, V.L. Martins, L.F. Almeida, E. Nóbrega Gaião, P.H.G.D. Diniz, E.C. Silva, M.C.U. Araújo, Digital image-based flame emission spectrometry., *Talanta.* 77 (2009) 1584–1589. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.057>.
- [56] J.P.B. de Almeida, V.B. dos Santos, G.A. do Nascimento, W.T. Suarez, W.M. de Azevedo, A.F. Ferreira, M.V. Maia, A fluorescence digital image-based method using carbon quantum dots to evaluate the compliance of a biocidal agent, *Anal. Methods.* 14 (2022) 2631–2641. <https://doi.org/10.1039/D2AY00678B>.
- [57] V.B. Dos Santos, E.L. Fava, N.S. De Miranda Curi, R.C. Faria, O. Fatibello-Filho, A thermostated electrochemical flow cell with a coupled bismuth film electrode for square-wave anodic stripping voltammetric determination of cadmium(II) and lead(II) in natural, wastewater and tap water samples, *Talanta* 126 (2014) 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.03.015>.
- [58] B. Ninwong, S. Chuanuwatanakul, O. Chailapakul, W. Dungchai, S. Motomizu, On-line preconcentration and determination of lead and cadmium by sequential injection/anodic stripping voltammetry, *Talanta* 96 (2012) 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.057>.
- [59] J.M. Jacob, R. Rajan, G.G. Kurup, Biologically synthesized ZnS quantum dots as fluorescent probes for lead (II) sensing, *Luminescence* 35 (2020) 1328–1337. <https://doi.org/10.1002/bio.3895>.
- [60] X. Jiang, H. Zhang, C. Yang, J. Xia, G. Liu, X. Luo, A novel electrostatic drive strategy to prepare glutathione-capped gold nanoclusters embedded quaternized cellulose membranes fluorescent colorimetric sensor for Pb(II) and Hg(II) ions detection, *Sens Actuators B Chem* 368 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132046>.

- [61] B. Wongsing, S. Promkot, P. Naksen, S. Ouiganon, C. Buranachai, K. Phooplub, P. Jarujamrus, The Development of the Fluorescence-based Portable Device for Lead (II) and Formalin Determination in Food Samples by Using Nitrogen-Doped Carbon Dots (N-CDs), *J Fluoresc* 33 (2023) 565–574. <https://doi.org/10.1007/s10895-022-03097-9>.
- [62] I.S. Resque, V.B. dos Santos, W.T. Suarez, An environmentally friendly analytical approach based on spot test and digital image to evaluate the conformity of bleaching products, *Chem. Pap.* 73 (2019) 1659–1668. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00717-w>.
- [63] V.B. dos Santos, E.F.S. Campos, J.P.B. de Almeida, W.T. Suarez, C.R.S. Oliveira, S.C.B. de Oliveira, Fluorescence digital image-based method to measure biogenic amines in Buffalo Mozzarella and other cheeses produced in Brazil, *Microchem. J.* 189 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108508>.

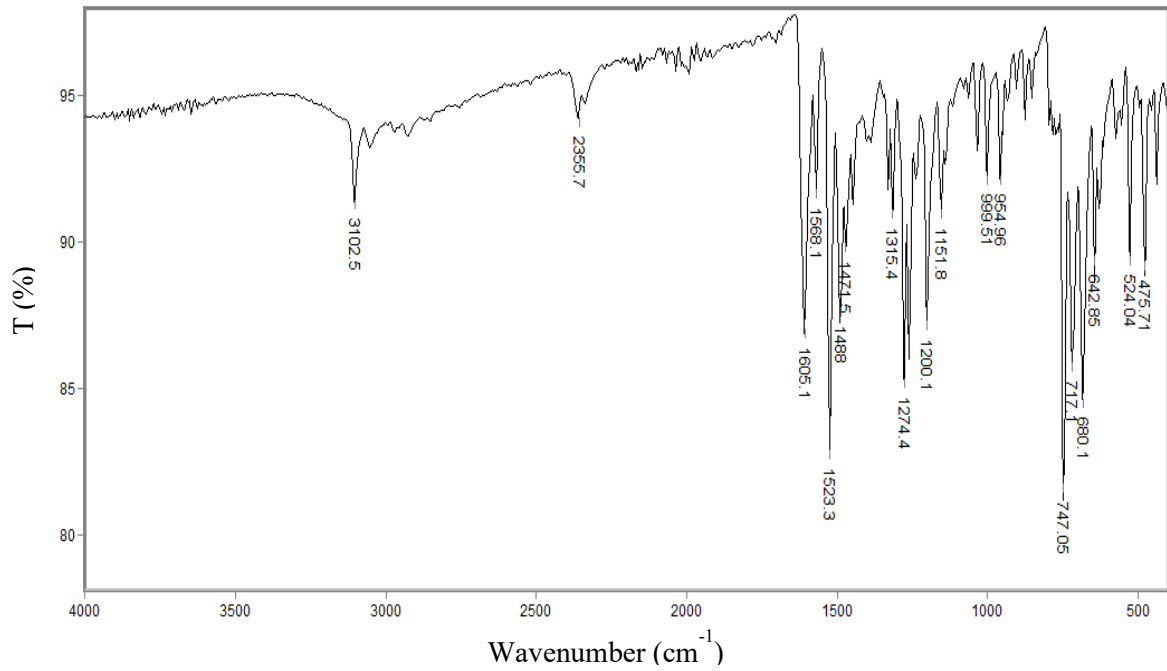
ANEXO I

Figura 23. Diagrama de níveis de energia eletrônico molecular



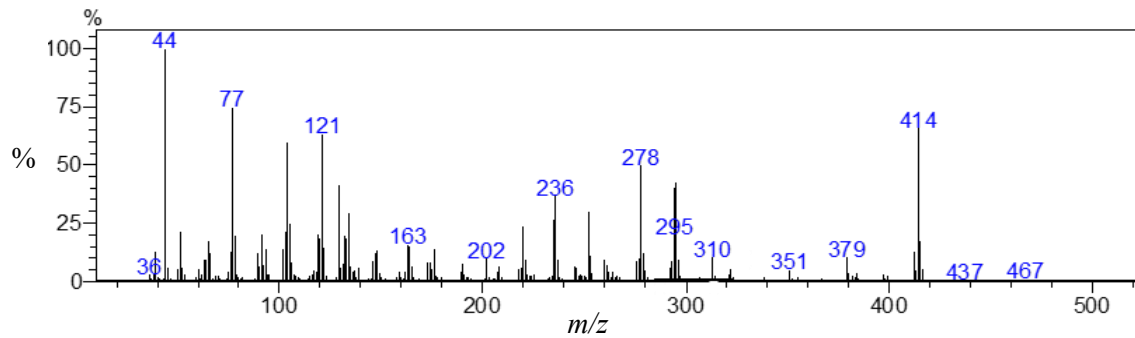
Fonte: adaptado de Skoog, 2016.

Figura 24. Espectro infravermelho para T1.



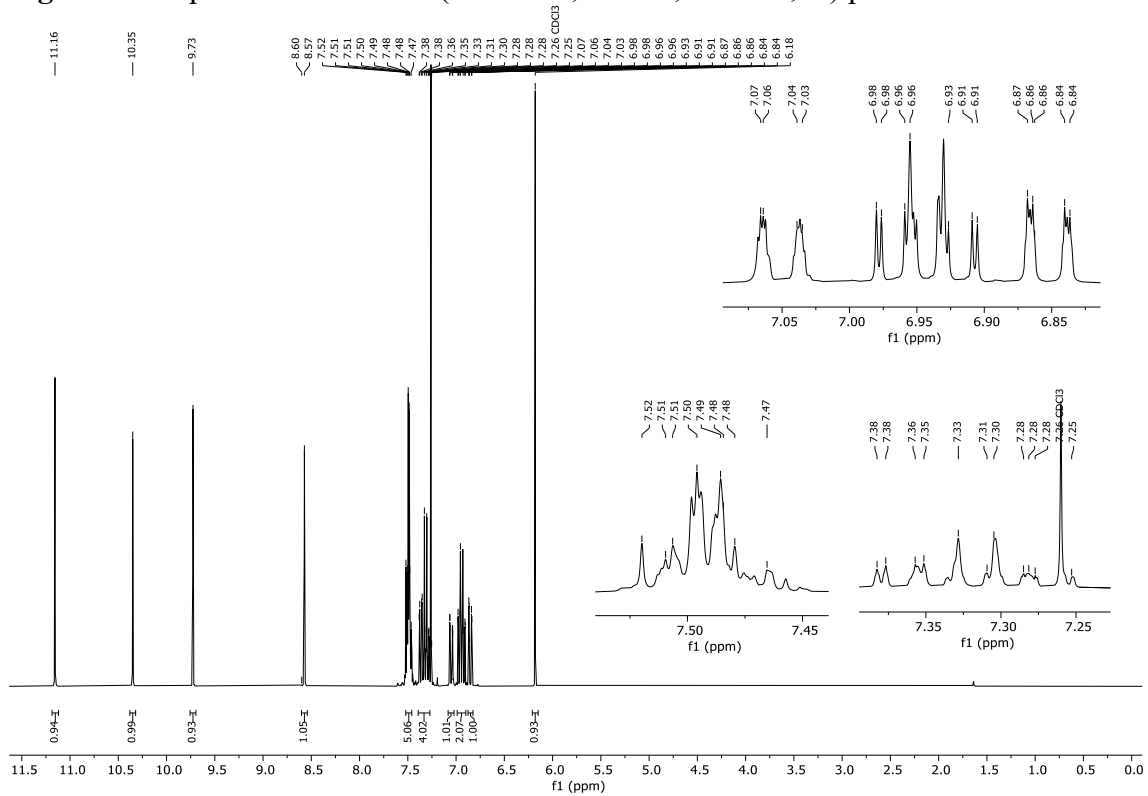
Fonte: Barros, 2021.

Figura 25. Espectro de massa (IE, 70 eV) para T1.



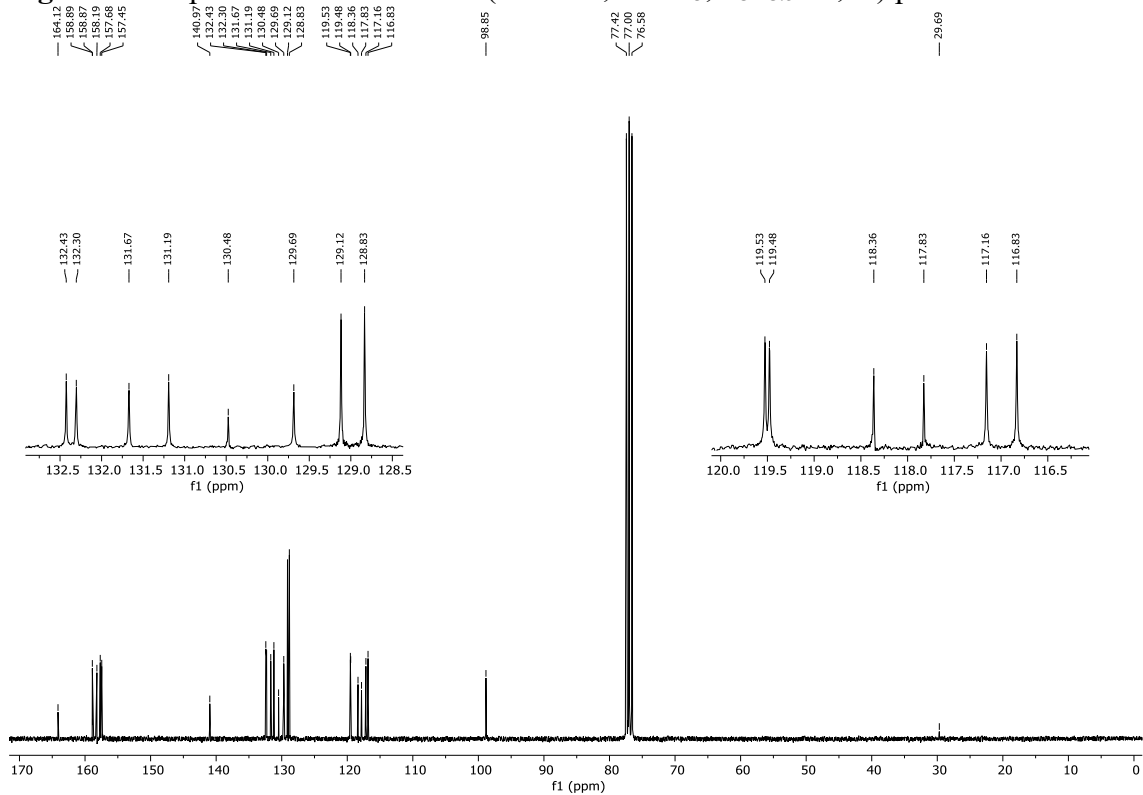
Fonte: Barros, 2021.

Figura 26. Espectro de RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3 ; δ_{CHCl_3} 7,26) para T1.



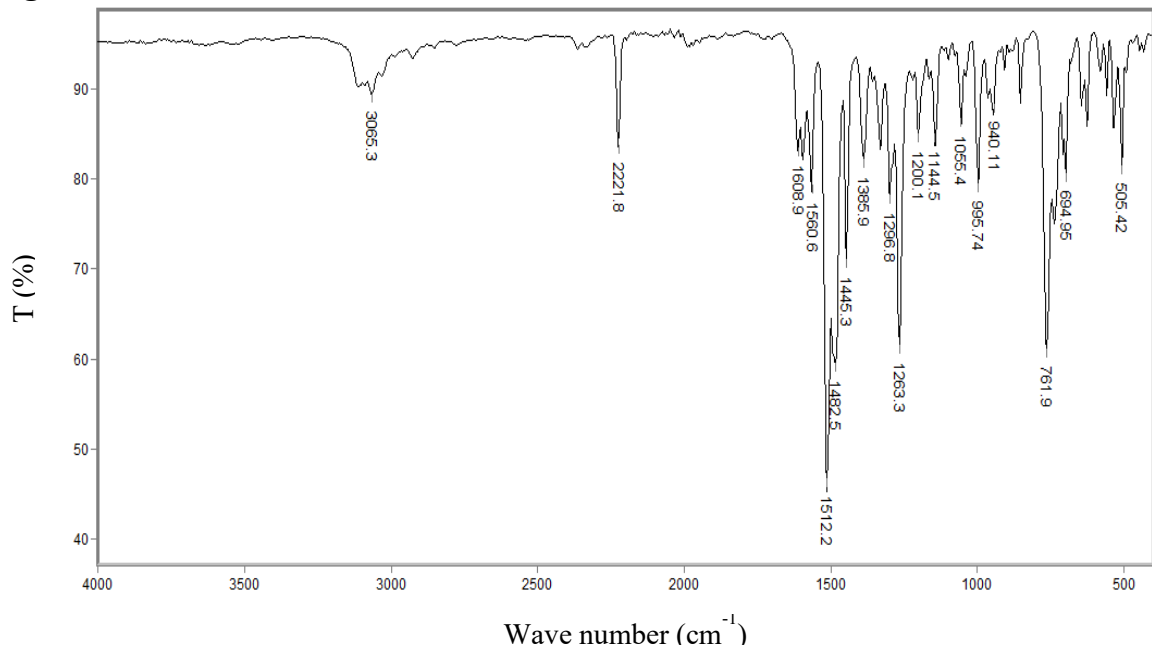
Fonte: Barros, 2021.

Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3 ; δ_{CHCl_3} 77,00) para T1.



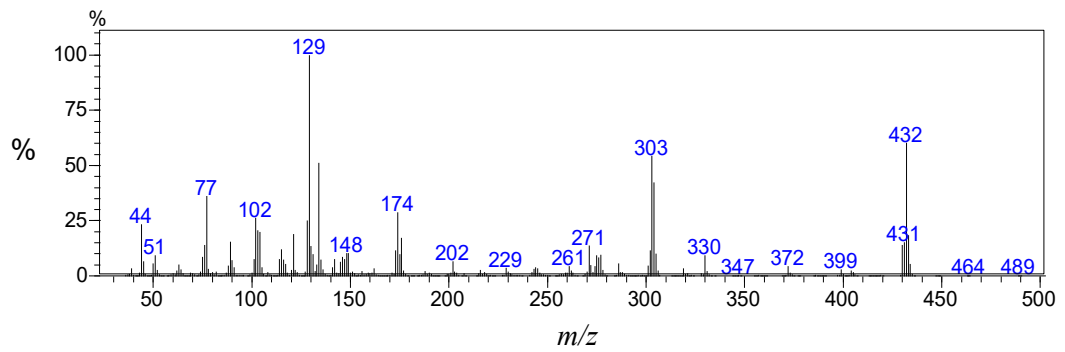
Fonte: Barros, 2021.

Figura 28. Espectro de infravermelho para T2.



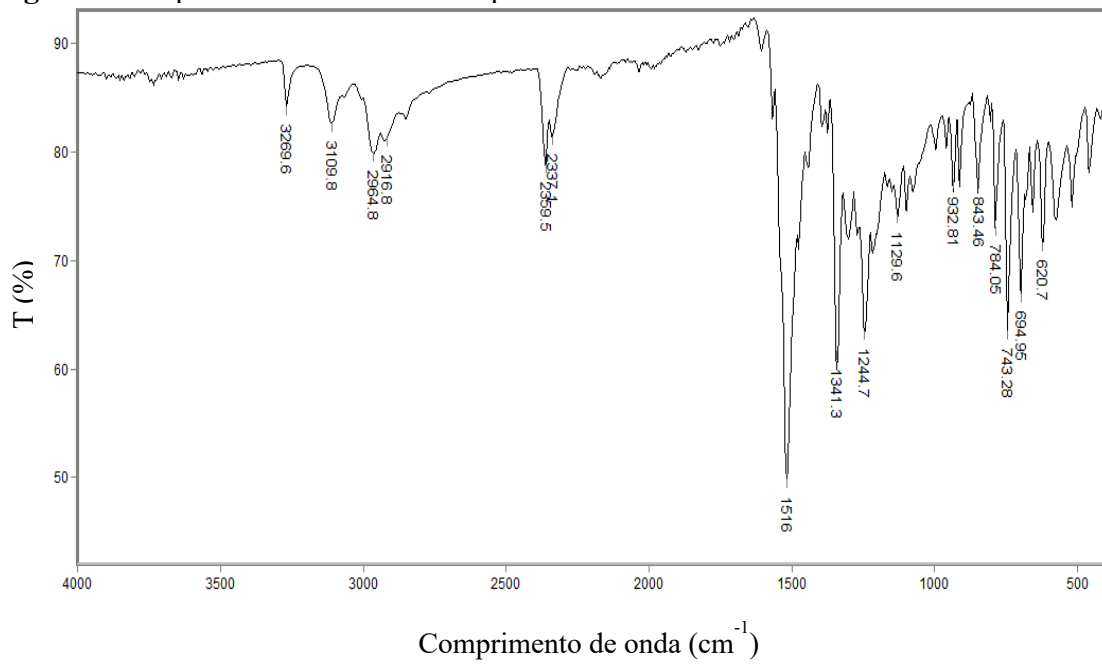
Fonte: Barros, 2021.

Figura 29. Espectro de massa (IE, 70 eV) para T2.



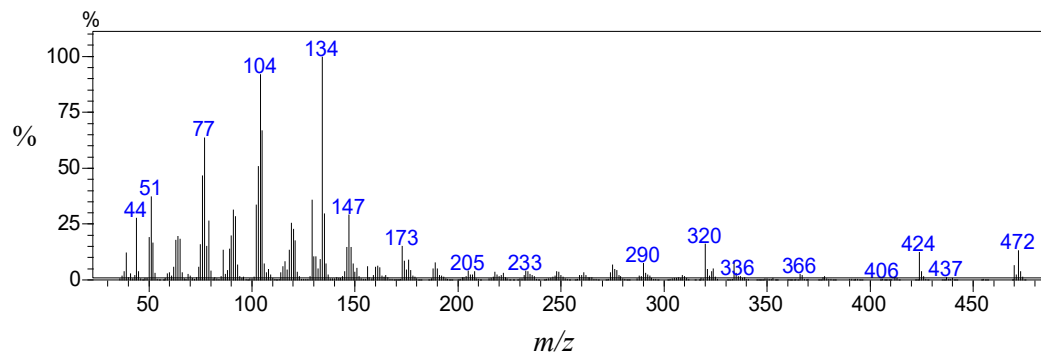
Fonte: Barros, 2021.

Figura 32. Espectro de infravermelho para T3.



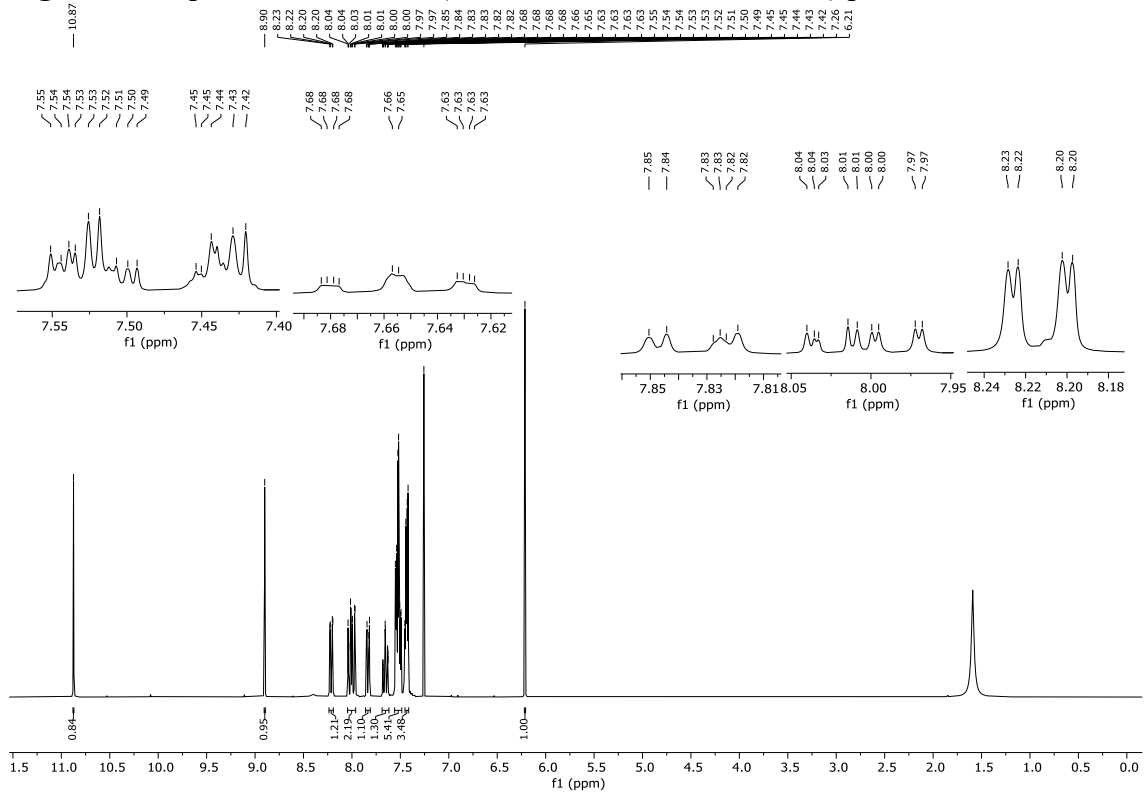
Fonte: Barros, 2021.

Figura 33. Espectro de massas (IE, 70 eV) para T3.



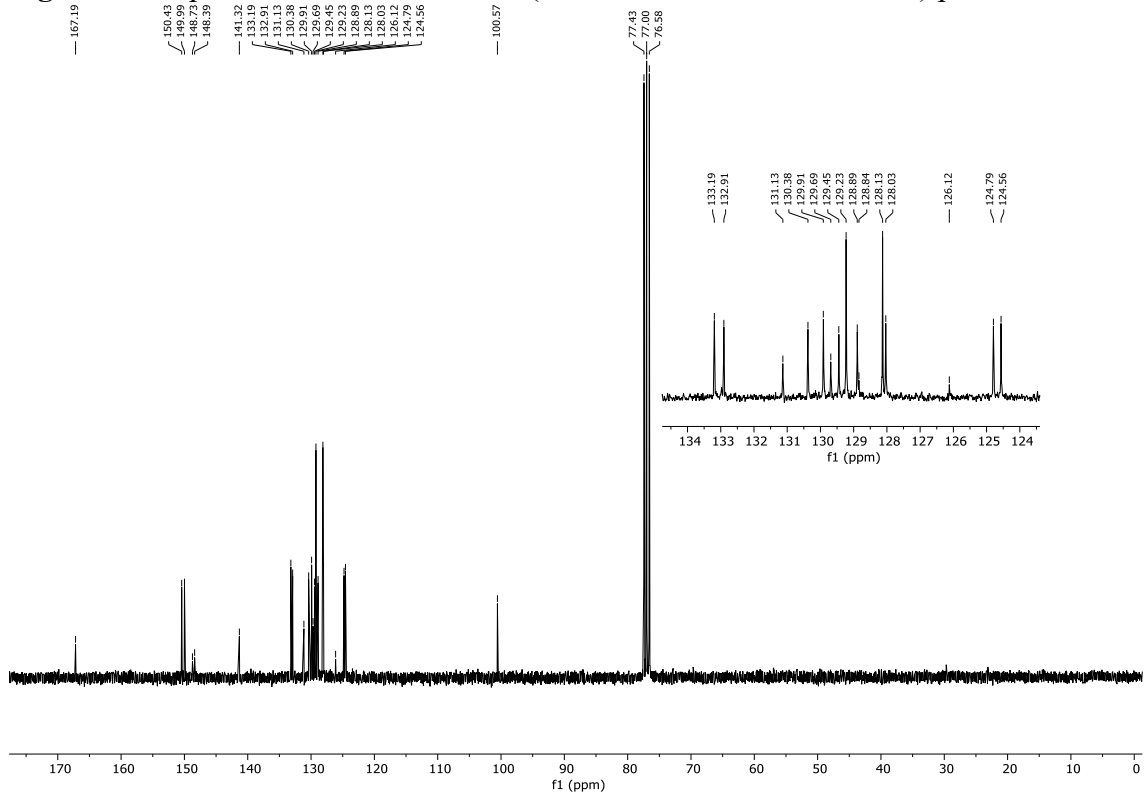
Fonte: Barros, 2021.

Figura 34. Espectro RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 ; δ_{CHCl_3} 7,26) para T3.



Fonte: Barros, 2021.

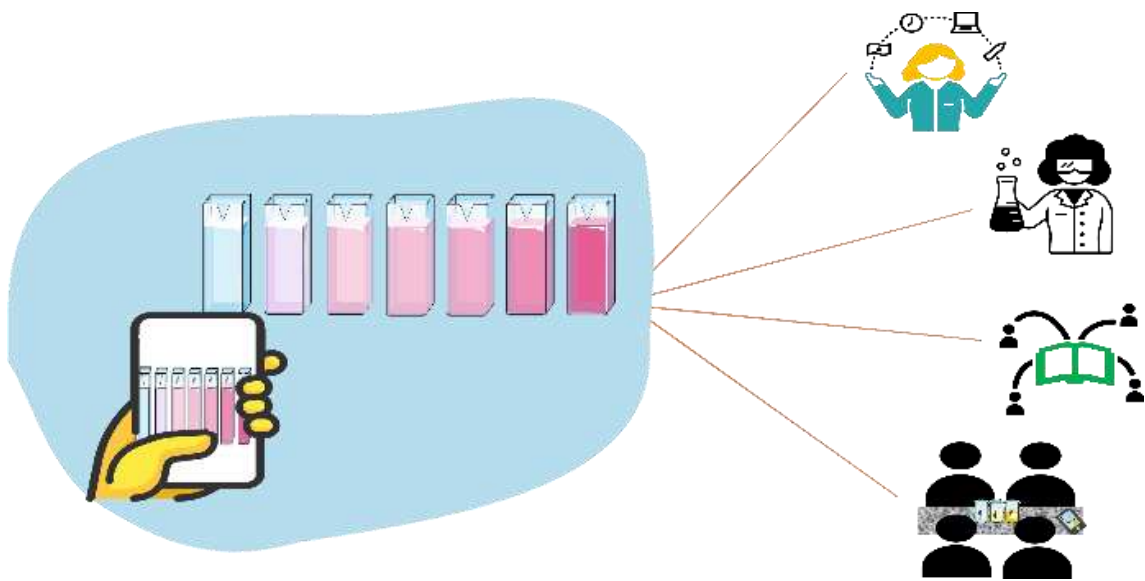
Figura 35. Espectro RMN de ^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3 ; δ_{CHCl_3} 77,00) para T3.



Fonte: Barros, 2021.

CÁPITULO III

MÉTODOS BASEADOS EM IMAGEM DIGITAL



1. INTRODUÇÃO

A disciplina Química é vista com certo receio pelos estudantes por apresentar alto nível de abstração e complexidade [1]. Contudo, seu estudo é essencial para o entendimento de fenômenos que ocorrem no cotidiano, como as reações de maturação e decomposição de alimentos, do envelhecimento da pele, os princípios de determinam as velocidades de uma reação, a composição química e as propriedades de certos materiais, bem como as reações por trás das variações climáticas que contribuem para o aquecimento global. Portanto, compreender os conceitos fundamentais da Química é de extrema importância para o estudante, podendo ser trabalhados de forma mais ilustrativa e eficiente, através de imagens digitais, por exemplo.

Nos últimos anos, com o desenvolvimento da tecnologia e popularização, a utilização de smartphones cresceu, sendo mais acentuada no ano de 2020, em virtude da pandemia provocada pelo novo coronavírus (Covid-19), quando grande parte dos serviços foram desenvolvidos de forma remota [2]. Assim, parte da população que já utilizava seu celular para atividades pessoais, passou também a utilizá-lo para o trabalho e para a educação. Além disso, os smartphones têm sido lançados com maior tecnologia, elevadas resoluções de suas câmeras, maior capacidade de armazenamento de dados, aplicativos para fins diversos, tornando-o um poderoso instrumento analítico de análises químicas qualitativas e quantitativas [3].

As primeiras imagens físicas foram desenvolvidas durante o século XIX e XX a partir dos experimentos da câmera escura de orifício [4]. Em 1822 com a descoberta química da imagem através do químico Louis Jacques Mandé Daguerre, que comercializou o daguerreótipo, um instrumento que permitia fixar as imagens projetadas por meio da luz[4], o qual foi o pioneiro na imagem colorida e gravação usando as cores vermelho, verde e azul [5]. Em meados da década de 70 do século XX foi desenvolvido um sensor de imagem que hoje conhecemos como sensor CCD (*Charged Coupled Device*, dispositivo acoplado de carga), fruto de um projeto dos físicos Willard Boyle e George Smith, vindo em 2009 a ganhar o prêmio Nobel de física pelo invento [6]. Em um sensor CCD os elétrons são gerados após a incidência da radiação em sua superfície, em seguida, ocorre a amplificação do sinal, usando um amplificador operacional integrado na saída do dispositivo, e logo ocorre a conversão analógica/ digital [7]. Com a capacidade da conversão da radiação eletromagnética em sinal elétrico, isso culminou como um dos maiores marcos para a revolução da fotografia digital com a criação das primeiras câmeras de TV e fotografias digitais.

Já o sensor CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*, óxido de metal semiconductor complementar) foi desenvolvido por Erick R. Fossum, que teve o sensor CCD como parâmetro para o seu desenvolvimento em meados do final da década de 80 para o início da década de 90. Os sensores CMOS têm em cada pixel um circuito constituído de fotodiodos, capacitores e transistores interligados. Em 1990 o CMOS teve um grande avanço em torno de seu concorrente, CCD, que estavam presentes em todas as máquinas fotográficas, perdendo sua hegemonia para o CMOS que apresentavam mais vantagens como o baixo consumo de energia, e redução do tamanho do sistema de imageamento, levando a uma revolução na miniaturização dos dispositivos, tornando-os compactos e leves [8].

O uso de câmeras com sensor CCD e CMOS têm sido introduzido na química analítica por diversos motivos, tais como aquisição rápida de sinal, baixo sinal de fundo, devido ao controle da radiação espúria e baixo ruído e boa linearidade que é um parâmetro para um método analítico é definida como a capacidade de fornecer respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito [9].

Diversos métodos analíticos vêm sendo utilizados e constantemente desenvolvidos baseados em reações químicas que produzem produtos coloridos, reações estas que são denominadas de reações colorimétricas. Estas reações visíveis ao olho nu podem ser facilmente registradas por sensores de webcams, scanners, câmeras digitais, e smartphones, os quais atualmente empregam detectores do tipo CMOS. Métodos baseados em imagem digitais (DIB) (DIB) é uma ferramenta de custo acessível, rápida, intuitiva e portátil quando comparada aos espectrofotômetros convencionais utilizados em laboratórios, podendo ser aplicada nas mais diversas áreas [10–13] para quantificação de determinada espécie química de interesse. O método DIB visa obter imagens mediante a ocorrência de reações colorimétricas [14] e, mais recentemente, através da fluorescência (é a propriedade de emitir fótons ao ser excitado por radiação eletromagnética, retornando ao seu estado fundamental sem mudar a orientação de spin do elétron excitado) emitida por algumas espécies químicas, entre elas pode-se destacar algumas nanopartículas funcionalizadas, como os pontos quânticos de carbono (do inglês *carbon quantum dots*^c, CQD) [10,11,15,16], onde nesse caso, o método é uma extensão do DIB, denominado FDIB (do inglês *fluorescence Digital Imaging-Based*) [10,11,17–20].

Os primeiros trabalhos baseados em DIB surgiram em meados do início do século XXI, mais precisamente em 2004 com o trabalho do Maleki *et al.*[21], seguido em 2005 com o trabalho de Gaião *et al.*[22]. Maleki *et al.*[21] desenvolveram um modelo de rede neural artificial (ANN) para determinação simultânea de íons Al^{3+} e Fe^{3+} em ligas usando o reagente

cromogênico, cromo azurol S, que reage com os íons Al^{3+} e Fe^{3+} para formar complexos coloridos solúveis em água. As intensidades da cor dos dois complexos dependem da concentração dos íons Al^{3+} e Fe^{3+} . Para isso, desenvolve-se uma titulação baseada em imagens digitais para a determinação da concentração de HCl e H_3PO_4 , bem como o grau de alcalinidade em amostras de águas minerais e de torneira, usando uma WebCam de sensor CCD como um detector colorimétrico. Neste trabalho vermelho de fenol, verde de bromocresol e alaranjado de metila foram usados como indicadores na titulação. Quatro anos depois, em 2009, Lyra *et al.* [23] desenvolveram um método espectrofotométrico de emissão atômica de chama baseado em imagem digitais (DIB-FES) para análise quantitativa de lítio, sódio e cálcio em antidepressivos, soro fisiológico e água potável de uma estação de tratamento de água (ETA), respectivamente. Foi uma das primeiras aplicações de DIB com emissão atômica na literatura.

No início, o método DIB estava apenas restrito a poucos grupos de pesquisas, uma vez que apenas estes grupos detinham o conhecimento para a obtenção de dados de sistemas de cores, por meio de uma Engenharia reversa, por transformarem as imagens digitais em dados analíticos. Para isso, algoritmos eram desenvolvidos em Delphi, Matlab entre outros [23]. Anos depois, com o avanço no desenvolvimento de dispositivos de captura de imagens com maiores resoluções, capacidade de processamento de dados, softwares e aplicativos que facilitam a obtenção de dados, popularizou-se o uso desse novo método analítico [12,24,25].

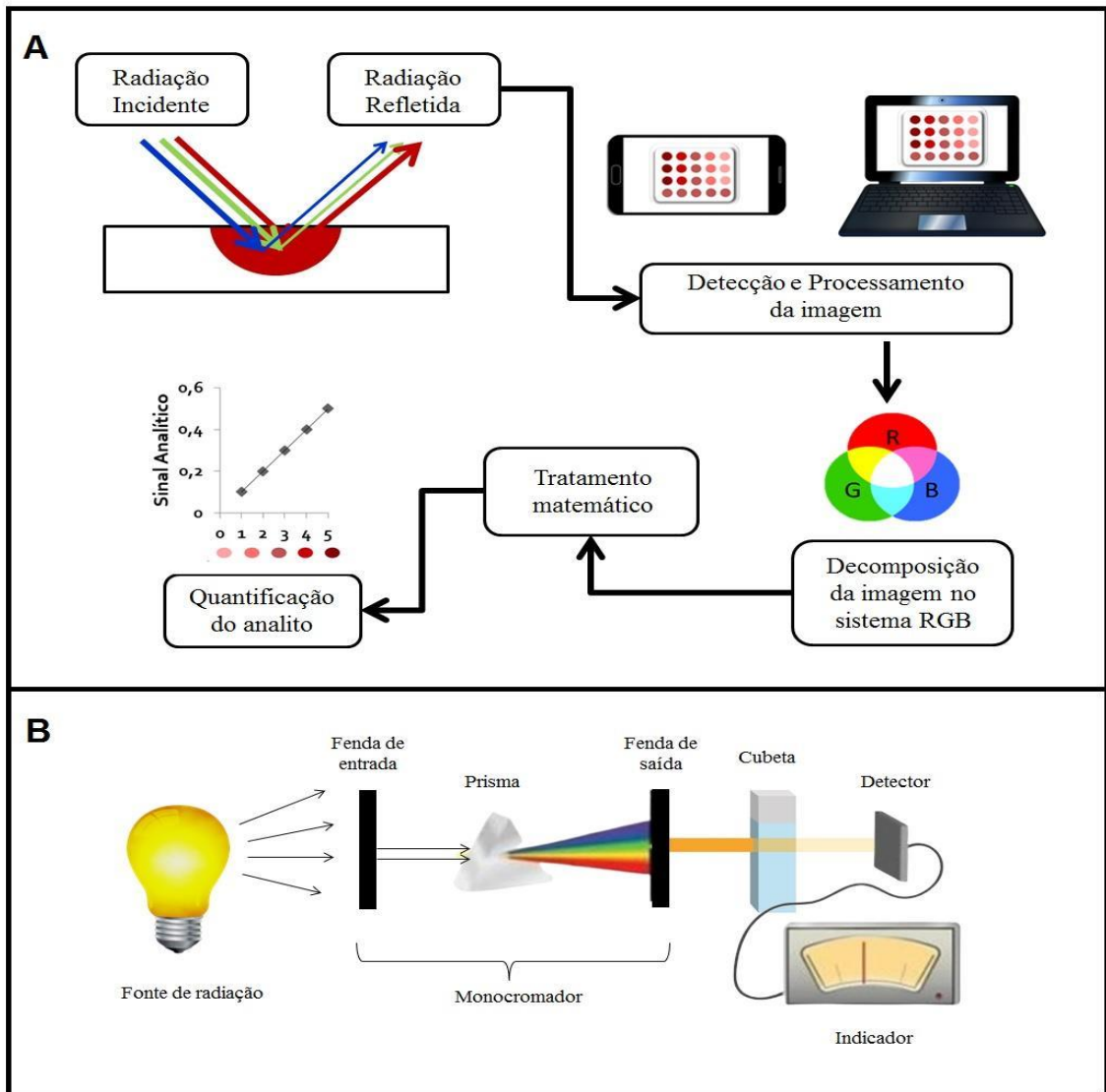
O método DIB padrão, usando uma câmera digital para a captura de uma imagem de uma reação colorimétrica, tem como princípio norteador para seu funcionamento o fenômeno da reflectância [13,14,25]. diferentemente das técnicas espectrofotométricas tradicionais como, por exemplo, Ultravioleta-Visível (UV/Vis) que se baseiam no princípio da transmitância, e por fim, sua conversão em absorvância [25,26]. Na reflectância, a medição é realizada através de fótons que foram refletidos por um determinado meio parcialmente absorvente. O fenômeno da reflexão geralmente ocorre na interface ar-superfície e também na interface parede-solução com um ângulo entre a radiação incidente e emitida diferente de 180° (Figura 37A) [27]. Já a transmitância, T , é definida como a relação entre a radiação emitida, I , e a radiação incidente, I_0 , com um ângulo de 180° formado entre as duas, de acordo com a Equação 1 (Figura 1B).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

A absorvância corresponde ao logaritmo decimal negativo da transmitância, de acordo com a Equação 2:

$$A = -\log T = -\log \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (2)$$

Figura 36. A) Emprego do fenômeno da reflectância utilizado pelo método DIB, através da captura pela câmera do smartphone da radiação refletida pela amostra e posterior uso do sistema RGB para decomposição da imagem e quantificação do analito; B) Empregos do fenômeno da transmitância/absorbância utilizando um espectrofotômetro UV-Vis com seus principais componentes internos



Fonte: autoria própria.

Contudo, sabe-se que existem uma correlação entre reflectância e absorbância, pois, quanto maior for a absorbância de fótons em um meio, menor será sua reflectância. Assim, é necessário distinguir os dois processos físicos e usar o termo transmitância e absorbância para espectrometria UV-Vis, e reflectância para métodos baseados em imagens digitais, onde a simples captura da imagem seja obtida pelo dispositivo [27,28]. O espectrofotômetro é um instrumento que mede a quantidade de fótons absorvidos depois que passam pela solução que

contém a amostra absorvente determinando sua concentração, de acordo com a medida da intensidade da radiação detectada.

Uma câmera de smartphone posicionada a um ângulo de 180° com a fonte de radiação (Figura 37B) pode ser utilizada como detector, nesse caso, seria mais recomendado usar o termo transmitância ou absorbância nos dados obtidos, contudo essa configuração precisa ser precisamente descrita, caso contrário, será a configuração padrão, onde o dispositivo de captura apenas tira uma fotografia do meio reacional colorimétrico, e por consequência, a reflectância é o fenômeno medido.

2. Conhecendo um pouco mais sobre imagens e processamento de imagens digitais

A percepção e interpretação das cores pelo cérebro humano constitui um fenômeno ainda não plenamente compreendido. A natureza física da cor é formalmente expressa com base em resultados experimentais e teóricos, onde a radiação cromática engloba o espectro de energia eletromagnética em uma região que vai de aproximadamente 400 a 700 nm, três valores básicos são utilizados para descrever a qualidade de uma fonte de radiação cromática: a radiância, a luminância e o brilho [29]. A *radiância* é a quantidade total de energia que flui da fonte de radiação e é medida em *watts* (W). A *luminância*, por sua vez, é medida em *lumens* (lm), que mede a quantidade de energia que um observador percebe de uma fonte de luz. Por fim, o brilho é um parâmetro subjetivo, que incorpora a noção acromática de intensidade e é um dos principais fatores na descrição da sensação de cores [29].

O objetivo de um modelo de cores (também chamado de *espaço de cores* ou *sistema de cores*) é facilitar a especificação das cores em alguma forma padronizada, amplamente aceita [23]. Essencialmente, um modelo de cores é uma especificação de um sistema de coordenadas e um subespaço dentro desse sistema no qual cada cor é representada por um único ponto. Entre os diferentes sistemas de cores mais utilizados estão o RGB (vermelho, verde e azul), o CMYK (ciano, magenta, amarelo e cor chave – preto), o CMY (ciano, magenta e amarelo), o HSL (matiz, saturação e luminosidade), o HSV (matiz, saturação e brilho) entre outros [23].

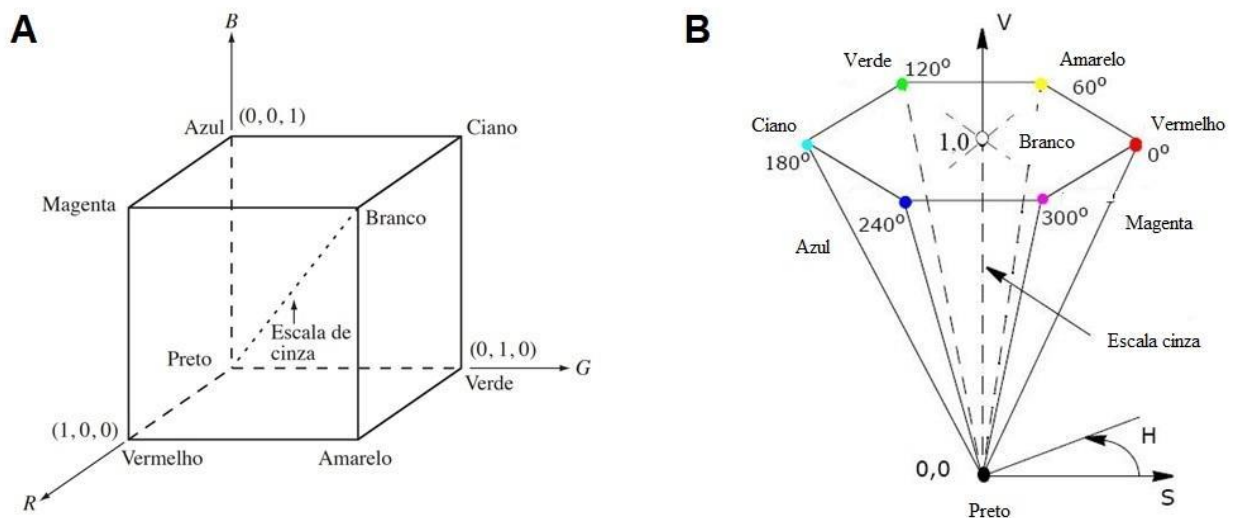
2.1. Sistema RGB

O RGB é o sistema de cores mais utilizado devido à sua simplicidade. Nesse, cada cor aparece em seus componentes espectrais do vermelho, verde e azul. As intensidades das cores geradas são armazenadas em 256 níveis, em uma escala de 0 a 255 para cada canal de cor (vermelho, verde e azul), onde a combinação desses três canais leva a um valor de equivalente

a $(256)^3 = 16.777.216$ cores, cobrindo todo o espectro eletromagnético visível ao olho humano [29]. O valor 0 para todos os canais representa a cor preto, enquanto o valor 255 para todos os canais representa a cor branca [14,30,31].

O modelo RGB também pode ser representado sobre coordenadas cartesianas, onde o subespaço de cores de interesse é ilustrado como um cubo (Figura 38A), contendo os valores RGB nos três vértices; as cores ciano, magenta e amarelo estão em outros três vértices; o preto está na origem; o branco está no vértice mais distante da origem. Nesse modelo, a escala de cinza (pontos de valores RGB iguais) estende-se do preto até o branco ao longo do segmento de reta que une esses dois pontos. As diferentes cores nesse modelo são pontos no cubo ou dentro dele e são definidas por vetores que se estendem a partir da origem. Por conveniência, assume-se que todos os valores de cor foram normalizados, de forma que o cubo apresentado na Figura 38A é um cubo unitário, isto é, assume-se que todos os valores de R, G e B estejam no intervalo $[0, 1]$ [29].

Figura 37. Representação esquemática do A) cubo para o sistema de cores RGB e do B) prisma para o sistema HSV



Fonte: autoria própria.

2.2. Sistema CMY e CMYK

A maioria dos dispositivos que depositam pigmentos coloridos sobre o papel, como impressoras e copiadoras coloridas, requer dados de entrada nas cores ciano, magenta e amarelo (do inglês *cyan, magenta and yellow*, CMY) ou realizam internamente uma conversão de RGB

a CMY. Essa conversão é realizada utilizando a Equação 3, um modelo subtrativo, e assim é possível encontrar e definir a cor preto.

$$[C M Y] = [1 1 1] - [R G B] \quad (3)$$

A Equação 1 demonstra que a radiação refletida de uma superfície coberta com ciano puro, por exemplo, não contém vermelho (uma vez que, $C = 1 - R$ na equação). De forma similar, o magenta puro não reflete o verde, e o amarelo puro não reflete o azul [29]. A Equação 1 também revela que valores de RGB podem ser facilmente obtidos a partir de um conjunto de valores CMY subtraindo os valores CMY individuais de 1. Na prática, a combinação dessas cores para a impressão produz um preto de aparência turva. Dessa forma, para produzir o verdadeiro preto (que é a cor predominante na impressão), uma quarta cor, o *preto*, é adicionada, gerando o modelo de cores CMYK (K, do inglês Key).

2.3. Sistema HSV

O modelo HSV é definido pelos parâmetros: matiz (H, *hue*), saturação (S, *saturation*) e valor (V, *value*). A Figura 38B mostra uma representação gráfica 3D do sistema HSV no formato de uma pirâmide hexagonal derivada do cubo RGB. Os diferentes valores de matizes estão representados na parte superior da pirâmide, a saturação é medida ao longo do eixo vertical, o qual passa pelo centro da pirâmide. Nessa base hexagonal da pirâmide, cada vértice corresponde a uma das cores do sistema RGB ou às cores complementares (ciano, magenta e amarelo), sendo o ângulo entre eles de 60°. De acordo com a Figura 38B, o vermelho é dado pelo ângulo 0°, o amarelo equivale a 60° e assim por diante.

A saturação varia de 0 a 1, e corresponde a “pureza” da cor, quanto menor esse valor, mais próximo do tom de cinza aparecerá a imagem, quanto maior esse valor, mais “pura” a cor será. O valor (brilho) varia de 0 (pico da pirâmide), que representa a cor preto, a 1 (base da pirâmide), onde as intensidades das cores são máximas.

3. Aparatos para a captura das imagens digitais

Para as aplicações envolvendo o método DIB, frequentemente é empregado o uso de plataformas de suporte, *Spot Test* (testes locais ou pontuais), para acomodar a solução contendo o analito. Para esta finalidade estas plataformas devem ser construídas à base de materiais inertes a fim de evitar reações indesejadas com o analito sob análise e, para isso, materiais como papel [32–34], placas cerâmicas [35], microplacas de poliestireno[31] e cubetas de quartzo ou

vidro [36] estão entre os materiais mais utilizados. Devido a versatilidade desses materiais e suas características, muitas aplicações com DIB têm sido empregadas como novos métodos para os clássicos do tipo Spot Test [14,35], Recentemente foi observado o uso de polímeros do ácido polilático (PLA) (Polylactic acid) [10,11], um material biodegradável, estando em conformidade com a química verde. As plataformas de PLA podem ser obtidas através de impressoras 3D por meio de extrusão por filamento fundido, possibilitando construir diferentes formas e volumes, moldes customizados, leves, resistentes, além de facilitar a miniaturização e sua utilização para análises *in situ* [10,11].

Outro fator que merece destaque é no que se refere à radiação, visto que o controle/homogeneização da radiação para a captura da imagem digital é de fundamental importância, a fim de evitar a radiação espúria, que é definida como a radiação do instrumento que está fora da banda de comprimento de onda nominal escolhida para a determinação [27]. A negligência desses cuidados pode acarretar a baixa acurácia e precisão do método comprometendo os resultados das análises [37,38]. Assim, para contornar esses inconvenientes, faz-se necessário o emprego de câmaras fechadas [11,35], evitando o excesso de radiação e sombra proveniente do ambiente.

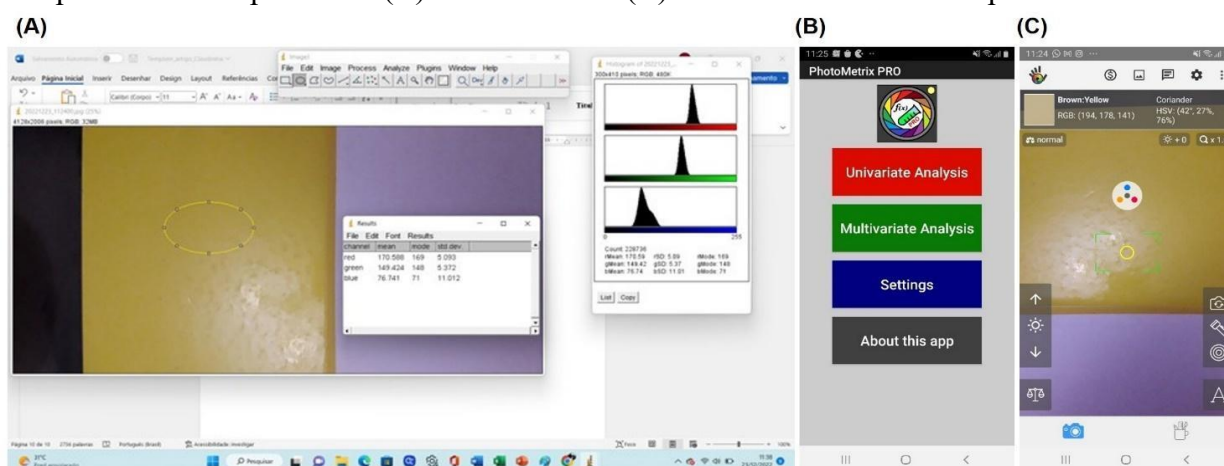
Entre os dispositivos utilizados para a captura das imagens digitais, pode-se destacar a webcam [22], o scanner [39], a câmera digital [40], e o smartphone [11,41]. Com o desenvolvimento tecnológico estes aparelhos apresentaram uma melhora tanto na sua estrutura, havendo redução dos seus tamanhos e, por consequência, maior portabilidade, assim como a evolução do seu hardware, equiparando-se a microcomputadores com elevada memória interna (capacidade de armazenamento de dados) e câmeras de alta resolução, proporcionando o emprego desses aparelhos em aplicações espectroscópicas e colorimétricas [42].

Um estudo realizado por Benedetti *et al.*[40] mostrou que câmeras com diferentes qualidades de resolução não comprometem as análises químicas, assim como não dão resultados divergentes. Mas deve-se enfatizar que essa diferença de resolução, implica em precisões diferentes, na medida que smartphone ou outro dispositivo de captura com câmeras de alta resolução favorece uma maior precisão na obtenção dos dados de uma imagem, por gerar melhor definição nos pixels analisados, em detrimento de dispositivos com câmeras de baixa resolução.

4. Aplicativos e softwares para a conversão das imagens em sistema numérico

A imagem digital pode ser utilizada para diversas áreas, de tal forma que seja necessário estudarmos um meio de analisá-la. Para isso podem ser empregado algum software ou aplicativo de leitura do RGB (vermelho, verde e azul), HSV (matiz, saturação, brilho), HSI (matiz, saturação, intensidade) e o HLS (matiz, luminosidade, saturação), tais como: Color Grab, ColorX, PhotoMetrix PRO, PhotoMetrix UVC, ImageJ *Software*, entre outros. Assim, através dos tratamentos necessários é possível determinar a presença e concentração de determinados analitos em amostras variadas.

Figura 38. Vista da tela das interfaces dos softwares (A) ImageJ no ambiente Windows de um computador e dos aplicativos (B) PhotoMetrix e (C) ColorGrab em um smartphone



Fonte: autoria própria.

Cada software citado acima foi desenvolvido com a finalidade de utilizar este recurso para trabalhos acadêmicos e/ou profissionais. O *software* ImageJ (Figura 39A), foi desenvolvido por Wayne Rasband (Instituto Nacional de Saúde Mental, Bethesda, Maryland/EUA) na linguagem Java, que permite ser executado em qualquer sistema operacional como computadores, notebook ou no *smartphone* [43]. Este pode ser utilizado com macros, tem o recurso de adicionar *plug-ins* e é bem disseminado na literatura [44]. Além disso, fornece métodos simplificados de análise de imagem, por ser de código aberto, possui facilidade de operação e de compartilhamento [45].

O aplicativo PhotoMetrix (Figura 39B) foi desenvolvido por Gilson A. Helfer e colaboradores das Universidades de Santa Cruz do Sul, Luterana do Brasil e Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, para plataformas *Windows Mobile*, *iOS* e *Android*, utilizando linguagem C# e Java. O aplicativo está disponível na *Play Store* ou *Apple Store* de forma gratuita, e

instruções de uso [46]. As imagens podem ser adquiridas pela câmera do celular (versão PhotoMetrix PRO[®]) ou por uma câmera externa acoplada no celular (versão PhotoMetrix UVC), nas duas versões é possível realizar a calibração univariada e multivariada por mínimos quadrados parciais [24,47], medir os valores de RGB e as outras formas já mencionados.

O *software* ColorX foi desenvolvido por Silvija Šafranko e colaboradores da Universidade de Osijek (Croácia) e Faculdade de Tecnologia de Alimentos Osijek (Croácia) para coleta e análise dados através do algoritmo criado a partir dos valores de RGB. Esse *software* foi elaborado utilizando linguagem de programação Visual Basic (baseado em *Windows*), possui interface gráfica de fácil entendimento, permite a importação de imagens do celular ou aquisição de uma imagem a partir de uma câmera digital conectada via USB [48]. O aplicativo ColorGrab (Figura 39C) foi elaborado pela Equipe Loomatix (2012). Este pode ser utilizado para obter os canais RGB, HSV, HEX, entre outros, em tempo real, reconhece as cores e possui uma versão de acessibilidade, em que é possível ouvir o que é feito. Está disponível para *softwares Android*, onde é possível exportar para outros aplicativos e importar da sua galeria para analisar os canais RGB [49].

Em geral, estes *softwares/aplicativos* vieram para facilitar o trabalho do analista, permitindo controlar e interpretar os resultados obtidos, além de serem de fácil operação, gratuita e de resposta rápida.

4.1. Aquisição e tratamento dos dados do DIB

Para a construção das curvas analíticas a fim de determinar a concentração do analito de interesse, faz-se necessário lançar mão de ferramentas matemáticas que correlacione os valores do RGB das imagens obtidas com a concentração do analito. Para essa finalidade, normalmente calcula-se o vetor (v) de todos os dados RGB através da distância euclidiana, conforme Equação 4[10,35]:

$$v = \sqrt{(R - R_0)^2 + (G - G_0)^2 + (B - B_0)^2} \quad (4)$$

Onde os parâmetros R , G e B representam os valores referentes aos canais vermelho, verde e azul, respectivamente obtidos da imagem e os parâmetros R_0 , G_0 e B_0 representam os valores do RGB da solução do branco, aquela isenta do analito. Com todos esses parâmetros conhecidos, uma curva do vetor *versus* concentração do analito pode ser traçada e, por conseguinte, a quantificação da espécie de interesse pode ser determinada. Essa forma de

tratamento muitas vezes se revela imprescindível para uma análise mais rigorosa e criteriosa, uma vez que quanto maior for a curva do vetor, maior será a interação/reação do analito de interesse com a espécie cromófora. De modo contrário, quanto menor a curva (tendendo a zero) menor a interação/reação do analito com o cromóforo. Vale salientar que há uma relação diretamente/inversamente proporcional, a depender das espécies presentes na matriz, entre a variação da concentração do analito e a variação dos valores de RGB que nesse caso é utilizado para fins de quantificação.[10,11]

Outra maneira comumente utilizada para construção de curvas analíticas se dá através de equações logarítmicas, como na relação entre $-\log(I/I_0)$, que é a razão entre as intensidades da radiação refletida diante da presença do analito, I , com a intensidade da radiação refletida sem a presença do analito, I_0 , (branco) *versus* a concentração do analito [40]. Existem outras formas possíveis para quantificação, como usar o valor bruto do sistema RGB [11] ou fazer o uso da multiplicação dos valores ($R \times B \times G$), conhecido como valor de cor [22]. Para esse último cálculo, os valores de RGB podem chegar à ordem de 10^7 e, com isso, todos os valores gerados pelo modelo RGB serão utilizados. A vantagem deste último modo de tratamento é que ele apresenta uma sensibilidade maior para pequenas variações do sistema RGB, quando comparada ao modo dos valores brutos, porém este modo da multiplicação dos canais trabalha com escala de valores alta [22], o que pode ser um desconforto para os cálculos. Entretanto, a forma mais simples é empregar sem qualquer cálculo os valores reais do RGB, o que facilita os cálculos [11].

5. Uso da imagem digital em trabalhos acadêmicos

Este é um estudo de revisão crítica e descritiva concebido através da produção científica indexada na base de dados *Web of Science*, com uma visão geral sobre o uso da ferramenta em áreas científicas relacionadas ao tema. Além disso, pretende-se quantificar o número de publicações realizadas nos últimos anos relacionado à imagem digital de maneira geral e na grande área de Química, e por fim, artigos relacionados ao ensino de química.

Desse modo, o presente artigo tem como objetivo exploratório-descritivo, evidenciar e discutir algumas percepções sobre o uso de métodos baseados em imagens digitais (DIB, Digital Image-Based), desde aspectos gerais até sua aplicação ao ensino da Química, baseando na problemática “Como a imagem digital tem sido utilizada na quantificação de analitos no ensino de Química para o Ensino Médio e Superior?”. Para esta finalidade, foi realizada uma pesquisa no banco de dados indicado, utilizando a palavra-chave “*digital image*” a fim de analisar de forma qualitativa a relevância deste tema no âmbito acadêmico. Na Figura 40 tem-se os dados

extraídos desta plataforma, em que, pode-se observar um crescimento considerável em termos de publicações desde 1990 até começo de 2022 para trabalhos acadêmicos que envolvem imagens digitais nas mais diversas áreas (Figura 40A), trabalhos que aplicam imagens digitais apenas na química (Figura 40B), bem como trabalhos envolvendo imagens digitais no ensino de química (Figura 40C).

O uso de imagens digitais vem sendo trabalhado nas mais diversas áreas científicas com objetivos específicos, por exemplo, Kelly *et al.*[50] utilizaram as imagens digitais para medir deformações em superfícies de uma coluna vertebral. Em ciência forense, animais e ambientes também foram registrados [51] para identificar morfologicamente espécies de vida selvagem. Ainda com relação à ciência forense, imagens digitais de cabelos foram usadas para obtenção de evidências de crimes [52,53].

No campo de informática voltada a patologia, Yao *et al.*[54] elaboraram o método ThinPrep para preparar análises de imagens digitais na citomorfologia da tireoide, podendo quantificar informações morfológicas para fins de diagnósticos. Stone *et al.*[55] utilizou DIB em 10 pacientes com problemas cutâneos, incluindo alopecia mucinosa, psoríase e nevos displásicos, a fim de acompanhar as lesões. As imagens digitais também tiveram aplicações urológicas [56] ao contribuir com a prática cirúrgica, na medida em que os urologistas podiam ter a certeza de obter imagens de vídeos em tempo real e com a clareza, melhorando o diagnóstico e o tratamento.

No campo de ciência arqueológica, Trimmis [57] utilizou imagens digitais para estudar o *kernoi*, que são lajes de pedra com marcas de taças arranjadas circularmente durante a Idade do Bronze, localizadas no mar Egeu. Já no campo da comunicação, Evsutin *et al.*[58] trataram da importância da marca d'água nas imagens digitais a fim de garantir direitos autorais e combate à falsificação. Na Ciência da computação de Materiais, Thoby *et al.*[59] utilizaram o método de correlação de imagens digitais para calcular campos cinemáticos de espécimes. Na agronomia o DIB tem sido empregado para análises do carbono orgânico do solo de acordo com os níveis de iluminação [60], bem como para a quantificação do teor de ferro presente no solo [61]. Na engenharia civil, Jo *et al.*[62] utilizaram imagens digitais para avaliar a força de tensão de cabos em pontes estaiadas. Uma vez que o uso do smartphone garante vantagens como o baixo custo, portabilidade e ter facilidade de uso, pode-se utilizá-lo em qualquer área para finalidades infinitas [3].

Os exemplos anteriores mostram como é ampla a aplicabilidade das imagens digitais, no entanto, ainda há muitos exemplos, mas não é nossa intenção apresentar todas. Quanto à

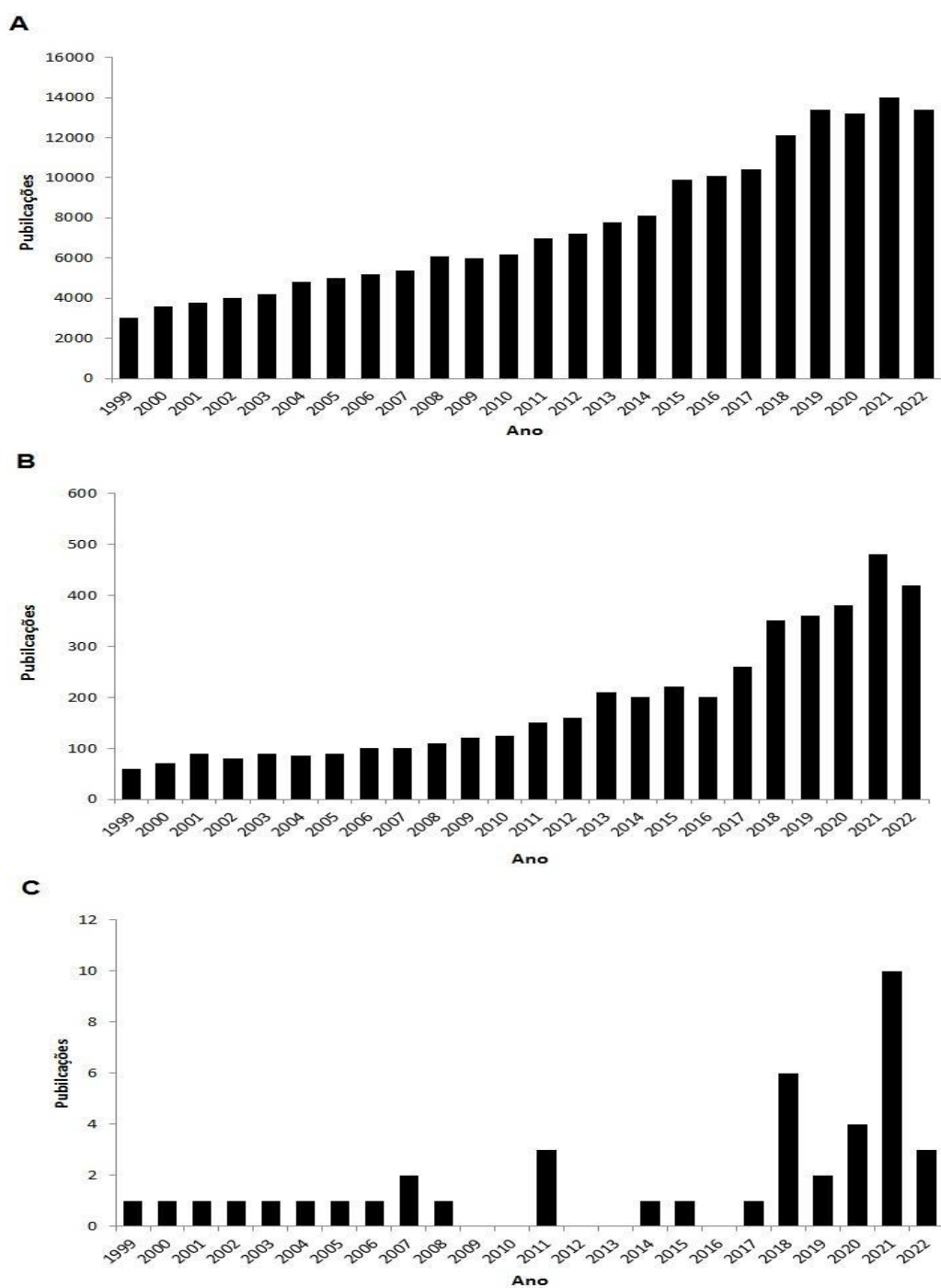
química, Lupetti *et al.*[63] utilizaram a imagem digital para monitorar e prevenir o escurecimento de tecidos vegetais pela enzima polifenol oxidase. Franco *et al.*[9] através de reações colorimétricas conseguiram detectar quantitativamente o cobre em aguardente de cana-de-açúcar. Em outra publicação, os autores[64] utilizaram o DIB para determinar o teor de açúcares redutores em cachaça, a saber glicose e frutose por meio da reação de redução de Cu(II) a Cu (I).

Böck *et al.*[47] utilizaram o método de baixo custo para determinar cobre em aguardente de cana-de-açúcar, utilizando o *software* PhotoMetrix UVC® embutido no smartphone, através da reação de complexação entre o cobre e a cuprizona, que apresenta uma coloração azul, possibilitando também a leitura dos canais das cores. Oliveira *et al.*[31] apresentaram pela primeira vez um novo método para determinar a acidez total da laranja, limão e maracujá a partir da microtitulação utilizando antocianinas como indicador biodegradável com detecção por DIB. Resque *et al.*[35] verificaram a conformidade de produtos alvejantes contendo o hipoclorito de sódio. O método consistia em capturar uma imagem digital da reação colorimétrica do hipoclorito com antocianinas usando um smartphone como detector. Patari *et al.*[65] desenvolveram um dispositivo em 3D a base de papel para detecção de leite adulterado. Neste trabalho foram detectados simultaneamente vários adulterantes químicos do leite como: a ureia, detergentes, sabão, amido, peróxido de hidrogênio, hidrogenocarbonato de sódio e sal. Soares *et al.* [66] propuseram um método para quantificação de biodiesel em misturas de diesel. A análise baseou-se em uma reação de complexação entre o Fe(III) e o íon hidroxamato produzido através da reação entre os ésteres alquílicos proveniente do biodiesel e a hidroxilamina. Para a captura das imagens foi utilizada a câmera de um smartphone, sendo a imagem posteriormente decomposta no sistema RGB pelo aplicativo PhotoMetrix. O limite de detecção encontrado para um nível de confiança de 99,7% foi de 1,0% (v/v) de biodiesel.

De Almeida *et al.*[11] determinaram o tempo de eficácia de uma solução sanitizante à base de hipoclorito de sódio em tapetes sanitizantes. O sal é utilizado no combate à microorganismos patógenos e foi monitorado através da fluorescência dos *carbon quantum dots* (CQD), mediante ao efeito *quenching* (supressão da fluorescência) uma vez que o hipoclorito de sódio por ser um agente oxidante forte, retira elétrons dos CQDs contribuindo para a diminuição da fluorescência. Os CQD são uma classe de nanomateriais de carbono que apresentam propriedades luminescentes e vantagens de baixa toxicidade, compatibilidade com o meio ambiente, baixo custo, fotoestabilidade quando comparado aos Quantum Dots de semimetais tradicionais. Como essa variação da fluorescência está diretamente atrelada à

concentração do hipoclorito de sódio, fica acessível a determinação da concentração do agente sanitizante.

Figura 39. Número de publicações por ano (1990-2022) obtidos da plataforma *Web of Science*, utilizando a palavra-chave “*digital image*” para diversas áreas da ciência (A), em particular para química (B) e ensino de química (C)



Fonte: autoria própria via *Web of Science*.

Dos Santos *et al.*[67] desenvolveram um trabalho usando smartphone como um detector para determinar o ácido ascórbico (AA) em frutas nativas e exóticas da Amazônia. A reação consistiu na redução de Fe(III) por AA e posterior complexação com 1,10-fenantrolina. Araújo *et al.*[68] propuseram um método quimiométrico para identificar adulteração em açaí, utilizando uma webcam para a captura das imagens digitais. Neste estudo foram considerados dois adulterantes, a farinha de trigo e de mandioca. Foi empregado a análise de componentes principais (PCA) e os modelos SIMCA (Modelagem Independente Suave por Analogia de Classes) e o PLS (Análise Discriminante Por Mínimos Quadrados Parciais). Foi empregado o sistema RGB, HSI e modelos de cores em tons de cinza. O modelo SIMCA se mostrou uma estratégia quimiométrica eficaz no acesso às informações químicas contidas nas imagens digitais. Maroubo & Melchert [69] desenvolveram um método alternativo para a extração das sulfonamidas (SAs) através da microextração sólido-líquido em carnes, uma vez que as SAs são antimicrobianos sintéticos de baixo custo amplamente utilizados na medicina veterinária para tratar doenças e prevenir infecções. No entanto, longos períodos de exposição às SAs podem causar efeitos adversos. Para a quantificação do teor de sulfonamidas foi empregado uma reação colorimétrica, tendo como base a formação de um composto rosa, um sal de imina. Para a captura das imagens foi empregado um smartphone e o Color Grab foi utilizado para o tratamento das imagens mediante o sistema RGB.

Da Silva *et al.*[10] quantificaram através do DIB, sulfato de quinina em bebidas tônicas, através do sinal da fluorescência emitida por esta molécula. Para esta análise foi empregada uma câmara UV (ultravioleta) com quatro diodos emissores de radiação UV de alto brilho com comprimento de ondas máximo de emissão a 370 nm. Os sinais de fluorescência foram medidos no sistema RGB, sendo utilizado o canal azul, uma vez que este apresentou uma maior sensibilidade comparado aos outros canais. Soares & Rocha [13], elaboraram um método para determinação do ácido úrico na saliva como forma de detectar disfunções renais. Esse método foi baseado em uma reação colorimétrica através da redução de Cu(II) a Cu(I) pelo ácido úrico, seguida pela complexação com ácido 2,2-biquinolina-4,4-dicarboxílico (BCA), resultando em um complexo violeta.

Kajornklin *et al.*[70] por sua vez utilizaram imagens digitais para quantificar o valor da constante de equilíbrio de uma reação do complexo cobalto (II) e da reação de formação do complexo cobalto ferro(III)-tiocianato, através do software ImageJ. Já Böck *et al.*[71] utilizaram o software PhotoMetrix PRO para quantificar o teor de etanol, via colorimetria,

através da reação de nitrato de amônio com o etanol produzindo um complexo de alcóxido de cério (IV) de cor vermelha, que teve sua intensidade de cor e RGB medidos.

De modo geral, a imagem digital pode ser utilizada para detecção óptica, eletroquímica, neurocirurgia minimamente invasiva [72], por exemplo, em análises Colorimétricas [3,48,73,74], fluorimétricas [10,41,75], espectrométrica [76,77], na patologia humana [78,79], na microscopia [80], espectrometria de infravermelho [81], potenciometria [82,83], e eletroforese em gel [84], permitindo que diversas análises sejam realizadas *in loco* (no próprio local).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] V. Klein, C.S. Barin, Histórias em quadrinhos como elemento de flexibilização do ensino de química, *Rev. Bras. Ensino Ciência e Tecnol.* 12 (2019) 54–68. <https://doi.org/10.3895/rbect.v12n1.8024>.
- [2] R. Kobayashi, T.P.M. Goumans, N.O. Carstensen, T.M. Soini, N. Marzari, I. Timrov, S. Poncé, E.B. Linscott, C.J. Sewell, G. Pizzi, F. Ramirez, M. Bercx, S.P. Huber, C.S. Adorf, L. Talirz, Virtual Computational Chemistry Teaching Laboratories - Hands-On at a Distance, *J. Chem. Educ.* 98 (2021) 3163–3171. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00655>.
- [3] M.L. Firdaus, E. Saputra, S.M. Ginting, S. Wyantuti, D.R. Eddy, L. Rahmidar, B. Yuliarto, Smartphone-based digital image colorimetry for non-enzymatic detection of glucose using gold nanoparticles, *Sens. Bio-Sensing Res.* 35 (2022) 5. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2022.100472>.
- [4] A. Mentiene, *La Découverte de la Photographie en 1839, 1892*.
- [5] L.D.T. HAURON, A. D., HAURON, aité pratique de photographie des couleurs: système de héliochromie., *Ariane Isler-de Jong.* 35 (1878) 247–273. <https://doi.org/https://www.jstor.org/stable/23632423>.
- [6] Nobel Prize.org, Prêmio Nobel de Física 2009, (2023) 1–4.
- [7] R. Palum, Image Sampling with the Bayer Color Filter Array, *Soc. Imaging Sci. Technol. Image Process. Image Qual. Image Capture, Syst. Conf.* (2001) 239–245.
- [8] D. Damasceno, T.G. Toledo, M.S. Godinho, C.P. Da Silva, S.B. De Oliveira, A.E. De Oliveira, Análise multivariada de imagens na química: um experimento para determinação do pH de águas potáveis, *Quim. Nov.* 38 (2015) 836–841.
- [9] M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, V.B. dos Santos, I.S. Resque, A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone, *Food Chem.* 338 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127800>.
- [10] E.K.N. da Silva, V.B. dos Santos, I.S. Resque, C.A. Neves, S.G.C. Moreira, M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, A fluorescence digital image-based method using a 3D-printed platform and a UV-LED chamber made of polyacid lactic for quinine quantification in beverages, *Microchem. J.* 157 (2020) 104986. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104986>.

- [11] J.P.B. de Almeida, V.B. dos Santos, G.A. do Nascimento, W.T. Suarez, W.M. de Azevedo, A.F. Ferreira, M.V. Maia, A fluorescence digital image-based method using carbon quantum dots to evaluate the compliance of a biocidal agent, *Anal. Methods*. 14 (2022) 2631–2641. <https://doi.org/10.1039/D2AY00678B>.
- [12] M.F. Filgueiras, P.C. de Jesus, E.M. Borges, Quantification of Nitrite in Food and Water Samples Using the Griess Assay and Digital Images Acquired Using a Desktop Scanner, *J. Chem. Educ.* 98 (2021) 3303–3311. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c01392>.
- [13] S. Soares, F.R.P. Rocha, Spot test for determination of uric acid in saliva by smartphone-based digital images: A new proposal for detecting kidney dysfunctions, *Microchem. J.* 162 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105862>.
- [14] K.D. Pessoa, W.T. Suarez, M.F. dos Reis, M. de Oliveira Krambeck Franco, R.P.L. Moreira, V.B. dos Santos, A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 185 (2017) 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.072>.
- [15] L. Curbani, J.M.L.N. Gelinski, E.M. Borges, Determination of Ethanol in Beers Using a Flatbed Scanner and Automated Digital Image Analysis, *Food Anal. Methods*. 13 (2020) 249–259. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01611-7>.
- [16] W. Li, X. Hu, Q. Li, Y. Shi, X. Zhai, Y. Xu, Z. Li, X. Huang, X. Wang, J. Shi, X. Zou, S. Kang, Copper nanoclusters @ nitrogen-doped carbon quantum dots-based ratiometric fluorescence probe for lead (II) ions detection in porphyra, *Food Chem.* 320 (2020) 126623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126623>.
- [17] Y. Shan, B. Wang, H. Huang, D. Jian, X. Wu, L. Xue, S. Wang, F. Liu, On-site quantitative Hg 2+ measurements based on selective and sensitive fluorescence biosensor and miniaturized smartphone fluorescence microscope, *Biosens. Bioelectron.* 132 (2019) 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.02.062>.
- [18] S. Wang, Y. Huang, L. Zhang, F. Li, F. Lin, Y. Wang, X. Chen, Highly selective fluorescence turn-on determination of Pb (II) in Water by in-situ enrichment of Pb (II) and MAPbBr 3 perovskite growth in sulfydryl functionalized mesoporous alumina film, *Sensors Actuators B. Chem.* 326 (2021) 128975. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128975>.
- [19] Z. Zhao, L. Wei, M. Cao, M. Lu, A smartphone-based system for fluorescence polarization assays, *Biosens. Bioelectron.* 128 (2019) 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.031>.

- [20] Y. Sun, M. Wei, R. Liu, H. Wang, H. Li, Q. Kang, D. Shen, A smartphone-based ratiometric fluorescent device for field analysis of soluble copper in river water using carbon quantum dots as luminophore, *Talanta*. 194 (2019) 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.019>.
- [21] N. Maleki, A. Safavi, F. Sedaghatpour, Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera, *Talanta*. 64 (2004) 830–835. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.02.041>.
- [22] E. da N. Gaiao, V.L. Martins, W. da S. Lyra, L.F. de Almeida, E.C. da Silva, M.C.U. Araújo, Digital image-based titrations., *Anal. Chim. Acta*. 570 (2006) 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.048>.
- [23] W. Silva Lyra, V.B. dos Santos, A.G.G. Dionízio, V.L. Martins, L.F. Almeida, E. Nóbrega Gaião, P.H.G.D. Diniz, E.C. Silva, M.C.U. Araújo, Digital image-based flame emission spectrometry, *Talanta*. 77 (2009) 1584–1589. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.057>.
- [24] F.C. Böck, G.A. Helfer, A. Ben da Costa, M.B. Dessuy, M.F. Ferrão, PhotoMetrix and colorimetric image analysis using smartphones, *J. Chemom.* 34 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.1002/cem.3251>.
- [25] W.T. Suarez, O.D. Pessoa-Neto, V.B. Dos Santos, A.R. de Araujo Nogueira, R.C. Faria, O. Fatibello-Filho, M. Puyol, J. Alonso, A compact miniaturized continuous flow system for the determination of urea content in milk., *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1525–1533. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4052-6>.
- [26] O. Pessoa-Neto, V. Santos, F. Vicentini, W. Suarez, J. Alonso-Chamarro, O. Fatibello-Filho, R. Faria, A low-cost automated flow analyzer based on low temperature co-fired ceramic and LED photometer for ascorbic acid determination, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 341–347. <https://doi.org/doi:10.2478/s11532-013-0377-2>.
- [27] D.A. SKOOG, F.J. HOLLER, S.R. CROUCH, *Analytical Instrumentation*, Brooks/Cole, 2007.
- [28] W. Silva Lyra, V.B. Dos Santos, A.G.G. Dionízio, V.L. Martins, L.F. Almeida, E. Nóbrega Gaião, P.H.G.D. Diniz, E.C. Silva, M.C.U. Araújo, Digital image-based flame emission spectrometry., *Talanta*. 77 (2009) 1584–1589. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.057>.
- [29] R.. GONZALEZ, R.C.; Woods, *Digital Image Processing*, (2010) 2010.
- [30] L.F. Capitán-Vallvey, N. López-Ruiz, A. Martínez-Olmos, M.M. Erenas, A.J. Palma, Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review,

- Anal. Chim. Acta. 899 (2015) 23–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009>.
- [31] L.M.A. de Oliveira, V.B. dos Santos, E.K.N. da Silva, A.S. Lopes, H.A. Dantas-Filho, An environment-friendly spot test method with digital imaging for the micro-titration of citric fruits, *Talanta*. 206 (2020) 120219. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120219>.
- [32] W. Li, X. Zhang, C. Miao, R. Li, Y. Ji, Fluorescent paper-based sensor based on carbon dots for detection of folic acid, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 2805–2813. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02507-w>.
- [33] K. Mahato, P. Chandra, Paper-based miniaturized immunosensor for naked eye ALP detection based on digital image colorimetry integrated with smartphone, *Biosens. Bioelectron.* 128 (2019) 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.006>.
- [34] R. Monošík, V. Bezerra dos Santos, L. Angnes, A simple paper-strip colorimetric method utilizing dehydrogenase enzymes for analysis of food components, *Anal. Methods*. 7 (2015) 8177–8184. <https://doi.org/10.1039/C5AY01556A>.
- [35] I.S. Resque, V.B. dos Santos, W.T. Suarez, An environmentally friendly analytical approach based on spot test and digital image to evaluate the conformity of bleaching products, *Chem. Pap.* 73 (2019) 1659–1668. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00717-w>.
- [36] C.T. Gee, E. Kehoe, W.C.K. Pomerantz, R.L. Penn, Quantifying Protein Concentrations Using Smartphone Colorimetry: A New Method for an Established Test, *J. Chem. Educ.* 94 (2017) 941–945. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00676>.
- [37] E.K.N. da Silva, V.B. dos Santos, I.S. Resque, C.A. Neves, S.G.C. Moreira, M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, A fluorescence digital image-based method using a 3D-printed platform and a UV-LED chamber made of polyacid lactic for quinine quantification in beverages, *Microchem. J.* 157 (2020) 104986. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104986>.
- [38] S. Paciornik, A. V. Yallouz, R.C. Campos, D. Gannerman, Scanner image analysis in the quantification of mercury using spot-tests, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 156–161. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000100022>.
- [39] A.A. Mohamed, A.A. Shalaby, Digital imaging devices as sensors for iron determination, *Food Chem.* 274 (2019) 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.014>.
- [40] L.P. dos S. Benedetti, V.B. dos Santos, T.A. Silva, E.B. Filho, V.L. Martins, O. Fatibello-Filho, A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol

- in drinks, *Anal. Methods*. 7 (2015) 4138–4144. <https://doi.org/10.1039/C5AY00529A>.
- [41] M. Valentin Maia, W. Toito Suarez, V. Bezerra dos Santos, J. Paulo Barbosa de Almeida, Carbon dots on paper for determination of Cu^{2+} in Sugar Cane Spirits samples for fluorescence digital image-based method, *Microchem. J.* 179 (2022) 107500. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107500>.
- [42] K.E. McCracken, J.-Y. Yoon, Recent approaches for optical smartphone sensing in resource-limited settings: a brief review, *Anal. Methods*. 8 (2016) 6591–6601. <https://doi.org/10.1039/C6AY01575A>.
- [43] K. Moodley, H. Murrell, A colour-map plugin for the open source, Java based, image processing package, *ImageJ, Comput. Geosci.* 30 (2004) 609–618. <https://doi.org/10.1016/j.cageo.2004.03.017>.
- [44] R. Lind, 5 - Open source software for image processing and analysis: picture this with ImageJ, in: L. Harland, M. Forster (Eds.), *Open Source Softw. Life Sci. Res.*, Woodhead Publishing, 2012: pp. 131–149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781908818249.131>.
- [45] S. Patntirapong, C. Chanruangvanit, K. Lavanrattanakul, Y. Satravaha, Assessment of bisphosphonate treated-osteoblast behaviors by conventional assays and a simple digital image analysis, *Acta Histochem.* 123 (2021) 151659. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151659>.
- [46] G.A. Helfer, V.S. Magnus, F.C. Böck, A. Teichmann, M.F. Ferrão, A.B. Da Costa, PhotoMetrix: An application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices, *J. Braz. Chem. Soc.* 28 (2017) 328–335. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160182>.
- [47] F.C. Böck, G.A. Helfer, B. Adilson, M.B. Dessuy, M.F. Ferrão, Método de baixo custo para determinação de cobre em aguardente de cana usando Photometrix UVC ® embutido no smartphone, 367 (2022).
- [48] S. Šafranko, P. Živković, A. Stanković, M. Medvidović-Kosanović, A. Széchenyi, S. Jokić, Designing ColorX, Image Processing Software for Colorimetric Determination of Concentration, to Facilitate Students' Investigation of Analytical Chemistry Concepts Using Digital Imaging Technology, *J. Chem. Educ.* (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00920>.
- [49] LOOMATIX, https://play.google.com/store/apps/details?id=com.loomatix.colorgrab&hl=pt_BR&gl=US, Acessado 20 Maio 2022. (2022).

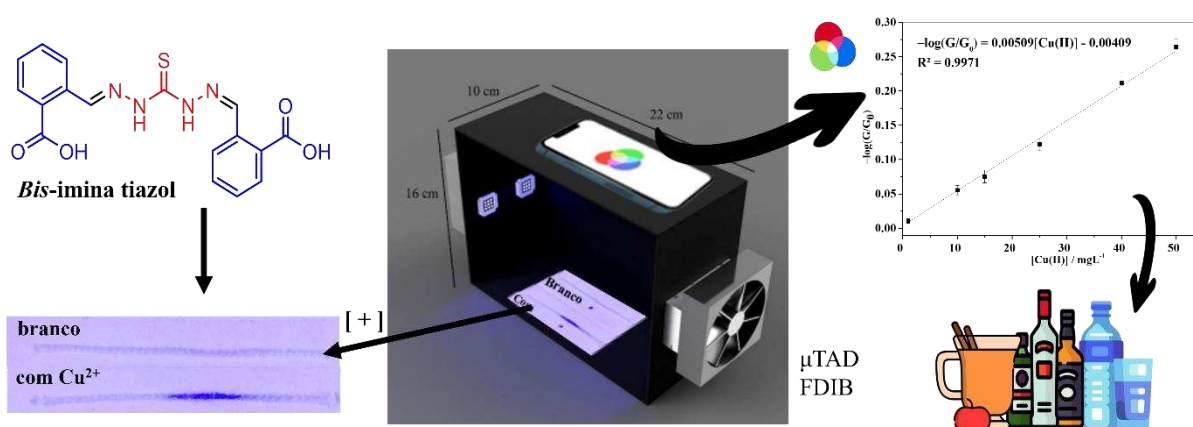
- [50] B.P. Kelly, C.R. Silva, J.N. Lehrman, A.G.U. Sawa, B. de Andrada Pereira, J. Godzik, J.D. Turner, Use of digital imaging correlation techniques for full-field strain distribution analysis of implantable devices and tissue in spinal biomechanics research, *J. Biomech.* 135 (2022) 111025. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2022.111025>.
- [51] P.W. Trail, Morphological species identification of wildlife forensic evidence based on digital images, *Forensic Sci. Int. Anim. Environ.* 1 (2021) 100021. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100021>.
- [52] E. Brooks, B. Comber, I. McNaught, J. Robertson, Digital imaging and image analysis applied to numerical applications in forensic hair examination, *Sci. Justice.* 51 (2011) 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2010.06.008>.
- [53] M.R. Vaughn, R.A.H. van Oorschot, S. Baidur-Hudson, A comparison of hair colour measurement by digital image analysis with reflective spectrophotometry, *Forensic Sci. Int.* 183 (2009) 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.11.002>.
- [54] K. Yao, X. Jing, J. Cheng, U.G.J. Balis, L. Pantanowitz, M. Lew, A Study of Thyroid Fine Needle Aspiration of Follicular Adenoma in the “Atypia of Undetermined Significance” Bethesda Category Using Digital Image Analysis, *J. Pathol. Inform.* 13 (2022) 100004. <https://doi.org/10.1016/j.jpi.2022.100004>.
- [55] J.L. Stone, R.L. Peterson, J.E. Wolf, Digital imaging techniques in dermatology, *J. Am. Acad. Dermatol.* 23 (1990) 913–917. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0190-9622\(90\)70314-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0190-9622(90)70314-8).
- [56] R.L. Kuo, G.M. Preminger, Current Urologic Applications of Digital Imaging, *J. Endourol.* 15 (2001) 53–57. <https://doi.org/10.1089/08927790150500953>.
- [57] K.P. Trimmis, An elegy of stone and light: Applying digital imaging methods for the recording of the Aegean stone kernoi in the context of Akrotiri, Thera, *J. Archaeol. Sci. Reports.* 40 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2021.103249>.
- [58] O. Evsutin, K. Dzhnashia, Watermarking schemes for digital images: Robustness overview, *Signal Process. Image Commun.* 100 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.image.2021.116523>.
- [59] J.-D. Thoby, T. Fourest, B. Langrand, D. Notta-Cuvier, E. Markiewicz, Robustness of specimen design criteria for identification of anisotropic mechanical behaviour from heterogeneous mechanical fields, *Comput. Mater. Sci.* 207 (2022) 111260. <https://doi.org/10.1016/j.commatsci.2022.111260>.
- [60] G. Gozukara, A.E. Hartemink, Y. Zhang, Illumination levels affect the prediction of soil

- organic carbon using smartphone-based digital images, *Comput. Electron. Agric.* 204 (2023) 107524. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2022.107524>.
- [61] R.A. Viscarra Rossel, Y. Fouad, C. Walter, Using a digital camera to measure soil organic carbon and iron contents, *Biosyst. Eng.* 100 (2008) 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2008.02.007>.
- [62] H.C. Jo, S.H. Kim, J. Lee, H.G. Sohn, Y.M. Lim, Sag-based cable tension force evaluation of cable-stayed bridges using multiple digital images, *Meas. J. Int. Meas. Confed.* 186 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.110053>.
- [63] K.O. Lupetti, L.C. de Carvalho, A.F. de Moura, O. Fatibello-Filho, Análise de imagem em química analítica: empregando metodologias simples e didáticas para entender e prevenir o escurecimento de tecidos vegetais, *Quim. Nova.* 28 (2005) 548–554. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000300031>.
- [64] M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, V.B. dos Santos, I.S. Resque, A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone, *Food Chem.* 338 (2021) 127800. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127800>.
- [65] S. Patari, P. Datta, P.S. Mahapatra, 3D Paper-based milk adulteration detection device, *Sci. Rep.* 12 (2022) 13657. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17851-3>.
- [66] S. Soares, L.C. Nunes, W.R. Melchert, F.R.P. Rocha, Spot test exploiting smartphone-based digital images for determination of biodiesel in diesel blends, *Microchem. J.* 152 (2020) 104273. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104273>.
- [67] V.B. dos Santos, E.K.N. da Silva, L.M.A. de Oliveira, W.T. Suarez, Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits, *Food Chem.* 285 (2019) 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.167>.
- [68] A. Araújo, W. Marinho, A. de Araújo Gomes, A Fast and Inexpensive Chemometric-Assisted Method to Identify Adulteration in Acai (*Euterpe oleracea*) Using Digital Images, *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 1920–1926. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1127-4>.
- [69] L. Maroubo, W. Melchert, Development of an Environmentally Friendly Extraction Method Using Smartphone-Based Digital Images for the Determination of Total Sulfonamides in Meat Samples, *J. Braz. Chem. Soc.* 00 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220153>.

- [70] P. Kajornklin, P. Jarujamrus, P. Phanphon, P. Ngernpradab, S. Supasorn, Fabricação de um dispositivo experimental de baixo custo, simples e impresso em papel toalha para demonstrar os fatores que afetam o equilíbrio químico e a constante de equilíbrio químico, *K*, (2020) 1984–1991.
- [71] F.C. Böck, G.A. Helfer, A.B. da Costa, M.B. Dessuy, M.F. Ferrão, Rapid Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded in Smartphone, *Food Anal. Methods*. 11 (2018) 1951–1957. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1167-4>.
- [72] J.R. de Jesus, M.F. Ferrão, A. Ben da Costa, G.A. Helfer, M.A.Z. Arruda, 11 - Applications of smartphones in analysis: Challenges and solutions, in: C. Hussain (Ed.), *Smartphone-Based Detect. Devices*, Elsevier, 2021: pp. 199–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823696-3.00009-X>.
- [73] I. Berasarte, A. Bordagaray, R. Garcia-Arrona, M. Ostra, M. Vidal, pH measurement and phosphate determination in pharmaceutical eye drops for eye diseases by digital image analysis, *Microchem. J.* 162 (2021) 105854. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105854>.
- [74] S.G. Souza Cruz, A.E. Silva De Abreu, Determining quantitative lead concentration in soil with portable xrf equipment, *Geociencias*. 39 (2020) 493–504. <https://doi.org/10.5016/geociencias.v39i2.12872>.
- [75] L. Khoshmaram, M. Mohammadi, A. Nazemi Babadi, A portable low-cost fluorimeter based on LEDs and a smart phone, *Microchem. J.* 171 (2021) 106773. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106773>.
- [76] F.C. Böck, G.A. Helfer, A.B. da Costa, M.B. Dessuy, M.F. Ferrão, Low cost method for copper determination in sugarcane spirits using Photometrix UVC® embedded in smartphone, *Food Chem.* 367 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130669>.
- [77] S.K. Kohl, J.D. Landmark, D.F. Stickle, Demonstration of absorbance using digital color image analysis and colored solutions, *J. Chem. Educ.* 83 (2006) 644–646. <https://doi.org/10.1021/ed083p644>.
- [78] W. Li, W. Ji, M. Yılmaz, T.C. Zhang, S. Yuan, One-Pot synthesis of MWCNTs/Fe-MOFs nanocomposites for enhanced adsorption of As(V) in aqueous solution, *Appl. Surf. Sci.* 609 (2023) 155304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.155304>.
- [79] R. Pomponio, Q. Tang, A. Mei, A. Caron, B. Coulibaly, J. Theilhaber, M. Rogers-

- Grazado, M. Sanicola-Nadel, S. Naimi, R. Olfati-Saber, C. Combeau, J. Pollard, T.T. Lin, R. Wang, An integrative approach of digital image analysis and transcriptome profiling to explore potential predictive biomarkers for TGF β blockade therapy, *Acta Pharm. Sin. B.* (2022). <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.03.013>.
- [80] T. Hallager, M.H. Saxtorph, J.O. Eriksen, T.V. Hviid, N.S. Macklon, L.G. Larsen, Conventional microscopy versus digital image analysis for histopathologic evaluation of immune cells in the endometrium, *J. Reprod. Immunol.* 145 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103294>.
- [81] J. Honorato Santos Neto, L.O. dos Santos, A.M.P. dos Santos, C. Galvão Novaes, S. Luis Costa Ferreira, A new and accessible instrumentation to determine urea in UHT milk using digital image analysis, *Food Chem.* 381 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132221>.
- [82] G. Albizu, A. Bordagaray, S. Dávila, R. Garcia-Arrona, M. Ostra, M. Vidal, Analytical control of nickel coating baths by digital image analysis, *Microchem. J.* 154 (2020) 104600. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104600>.
- [83] G.F. Giordano, M.B.R. Vicentini, R.C. Murer, F. Augusto, M.F. Ferrão, G.A. Helfer, A.B. da Costa, A.L. Gobbi, L.W. Hantao, R.S. Lima, Point-of-use electroanalytical platform based on homemade potentiostat and smartphone for multivariate data processing, *Electrochim. Acta.* 219 (2016) 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.09.157>.
- [84] J.R. de Jesus, I.C. Guimarães, M.A.Z. Arruda, Quantifying proteins at microgram levels integrating gel electrophoresis and smartphone technology, *J. Proteomics.* 198 (2019) 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.002>.

CÁPITULO IV

SÍNTESE DE *BIS*-TIOCARBAZONA COMO SENSOR EM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO PARA DETERMINAÇÃO DE COBRE (II) EM ÁGUA, CACHAÇA E CHÁ DE MAÇÃ VIA IMAGENS DIGITAIS DE FLUORESCÊNCIA

1. INTRODUÇÃO

O cobre desempenha um papel importante em diversos processos fisiológicos, atuando como cofator enzimático em várias cuproenzimas, que estão envolvidas em reações de transferência de elétrons entre um substrato e o oxigênio molecular, utilizando átomos de cobre tanto forma oxidada (Cu(II)) ou reduzida (Cu(I)) [1,2]. Este metal é indispensável ao organismo, desempenhando funções vitais no sistema nervoso [3]. Entretanto, o controle de sua ingestão é fundamental, pois o excesso de cobre pode causar efeitos adversos, como diarreia, náusea e úlceras e até desencadear a doença de Parkinson [1,3,4]. Devido a esses riscos, órgãos reguladores estabelecem limites para a quantidade de cobre permitida em diferentes produtos. Para a cachaça, o limite recomendado é de até 5 mg L⁻¹, conforme a Instrução Normativa Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) do Brasil, nº 13 de 29/06/2005. Para a água potável, o limite é de 2 mg L⁻¹, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) da portaria GM/M N°888, de 4 de maio de 2021. Já para frutas *in natura*, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) do Brasil, com instrução normativa nº 160 de 1º de julho de 2022, na qual estabelece um limite de concentração de 10 mg Kg⁻¹. A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) define o nível máximo de íons Cu(II) de 1,3 mg L⁻¹ presente em água potável [5].

A quantificação de Cu(II) pode ser realizada por alguns métodos, incluindo métodos colorimétricas [1,6–9], adsorção [10,11], eletroquímica [12–17], espectroscopia de emissão óptica de plasma indutivamente acoplada/espectroscopia de massa [18,19] e espectroscopia UV-VIS [20–24]. Porém, como o uso de smartphones, tanto para uso pessoal quanto para uso profissional, tem se tornado mais crescente e popularizado [23], alguns métodos colorimétricos utilizam o smartphone como detectores de sinais analíticos [25]. Isso tem tornado os métodos colorimétricos de baixo custo, acessíveis e de rápida execução, possibilidade de análise *in situ* [26,27], além de oferecerem uma abordagem interativa quando comparado a métodos mais sofisticados [1]. Esses métodos, conhecidos como DIB (*Digital Image Based*), comumente consistem na captura das imagens que evidenciam reações colorimétricas, resultante da presença de cromóforos nos reagentes envolvidos na reação [8]. O método DIB vem ganhando destaque no cenário científico nos últimos anos, com a publicação de inúmeros trabalhos com aplicações analítica como na detecção de aminas biogênicas em alimentos [28,29], adulterantes em leite [30,31], contaminantes em bebidas [1,6,32,33], metais em águas ambientais [34], surfactantes em águas ambientais e outras matrizes [30,35–37], como em: amostras forenses [38–40], acidez em frutas [41,42] etc. Contudo, o FDIB (*Fluorescence Digital Image-Based*), é uma metodologia mais recente, comparada ao DIB que utiliza de reações colorimétricas na

região do UV-Vis. Este método se baseia na medida de fluorescência gerada por moléculas [28,29] ou nanopartículas [43] como os pontos quânticos, usando imagens digitais de fluorescência [26,29]. Para as análises envolvendo o método DIB/FDIB é recomendado o emprego de câmaras fechadas [27,33,44], a fim de isolar a matriz contendo o analito da radiação externa, evitando a presença da radiação espúria e de ambientes com sombras e/ou excesso de brilho, minimizando assim a presença de interferentes que venha comprometer os resultados das análises [45]. Em DIB/FDIB smartphone tem sido o dispositivo mais amplamente utilizado, por ser algo de uso comum do analista, conectividade, e amplo uso de aplicativos disponíveis [46], ColorX [47], Color Grab [1,7], frente a outros dispositivos como câmera digital [48], scanner [49] e webcam [50]. Os sistemas de cores mais amplamente utilizados para decomposição das imagens obtidas são HSB [51], CMYK, CMY [52] e HSV [53], sendo o sistema RGB [41] o mais amplamente utilizado. Mesmo sendo desenvolvidos para colorimetria, esses modelos podem ser usados para fluorimetria [29,43,44,54].

O avanço tecnológico tem possibilitado o desenvolvimento de métodos mais sofisticados e sensíveis. A integração do FDIB com dispositivos microfluídicos e a detecção baseada usando FDIB representa uma inovação significativa e promissora na área de análises químicas [26,29,43,54]. Esses sistemas combinados permitem a execução de múltiplas etapas analíticas dentro de um único dispositivo, otimizando a eficiência e reduzindo os custos operacionais [55]. A tecnologia microfluídica proporciona um controle preciso sobre pequenas amostras [56]. A versatilidade de aparatos utilizados em dispositivos microfluídicos tem permitido avanços significativos na determinação de metais. Entre esses dispositivos, destacam-se o μ PAD (*Microfluidic Paper-based Analytical Device*) e o μ TAD (*Microfluidic Thread-based Analytical Device*) [56]. O μ TAD, em particular, utiliza fios de algodão como substrato, o que proporciona vantagens como, flexibilidade, baixo custo, alta resistência e uma ampla área superficial. Além disso, o μ TAD permite o uso de volumes reduzidos de reagentes e amostras, tornando-o uma solução eficiente, econômica e atrativa para a análise de metais e permite mudanças em sua capilaridade [1,56–58].

Com o objetivo de desenvolver um μ TAD eficiente na quantificação de íons Cu(II), este estudo propõe a síntese e aplicação de uma *bis*-tiocarbazona como um sensor fluorescente. As *bis*-tiocarbazonas já são descritas como potenciais inibidores de urease [59], um composto de grande interesse da comunidade acadêmica e industrial [60]. A *bis*-tiocarbazonas são derivadas da tiocarbazida, caracterizada por uma ligação dupla entre um átomo de carbono e um átomo de enxofre e duas ligações simples com aminas. Além disso, a *bis*-tiocarbazonas é conhecida por formar complexos [61].

Este estudo tem como objetivo descrever a síntese e aplicação de uma *bis*-tiocarbazona como sensor fluorescente, utilizando a técnica de Detecção por Imagem Digital Baseada em Fluorescência (FDIB) para a construção de um dispositivo microfluídico (μ TAD) baseado em fios de algodão, constituindo em um sistema de baixo custo, de resposta rápida, ambientalmente amigável e que usa baixíssimas quantidades de reagentes e solventes, gerando muito pouco resíduos, sendo aplicado no presente trabalho para a quantificação de íons Cu(II) em diversas matrizes de águas, bebidas e alimentos.

2. MÉTODO EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e amostras

Foram preparadas soluções de diversos íons metálicos, incluindo Pb(II), Ba(II), Ca(II), Cd(II), Al(III), Cr(III), Fe(II), Cu(II), Fe(III), Hg(II) e Mn(II), todos com concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para D-glicose e D-frutose, foram preparadas soluções a partir de 0,0225 g para 100 mL, resultando em uma concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções tampão de citrato com pH 3, 4 e 5 foram preparadas adicionando 2,57 g de citrato de sódio dihidratado e 0,2421 g de ácido cítrico em 100 mL de água deionizada. Para os tampões fosfato com pH 6 e 7, dissolveram-se 2,010 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,3394 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em água deionizada. A solução tampão de pH 9 foi obtida pela adição de 12,111 g de trishidroximetilaminometano (TRIS) e ajuste do pH com 3,2 mL de HCl concentrado. O ajuste fino do pH foi feito com pequenas alíquotas de soluções de HCl ou NaOH 1 mol L^{-1} e utilizado um pHmetro de bancada Mettler Toledo (USA) com eletrodo de vidro combinado.

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada do sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, EUA), com resistividade de $18,0 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$. A molécula B_2COOH foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO), com concentração de 5 g L^{-1} , pela adição de 0,0278 g em 5 mL de DMSO para obtenção da solução estoque.

A suspensão de carboximetilcelulose (CMC) foi preparada dissolvendo-se 0,03; 0,06; e 0,09 g de CMC em 3 mL de água Milli-Q, obtendo-se concentrações de 1, 2 e 3% (m/V), respectivamente. A mistura foi aquecida a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min, sob agitação a 5000 rpm. Após o preparo, a suspensão foi mantida em repouso por 24 h antes de ser utilizada.

Uma solução padrão de Cu(II) foi preparada a partir de um padrão de 1 g L^{-1} . As soluções de trabalho foram obtidas por diluições da solução estoque, ajustando o volume de íon

conforme a concentração desejada e completando o volume com a amostra em um balão volumétrico. As amostras analisadas por FAAS foram acidificadas com HNO_3 a 1% v/v.

As amostras de cachaça e água mineral foram adquiridas em supermercados de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A água da torneira e a água Milli-Q foram obtidas no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A maçã *in natura* foi comprada em uma loja de produtos naturais em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

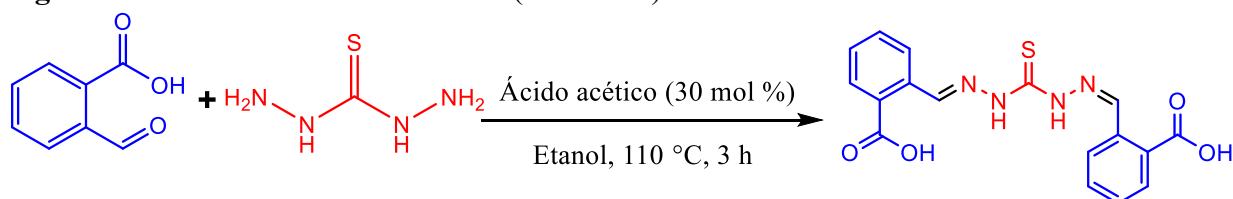
A amostra de chá de maçã foi preparada seguindo a metodologia descrita por Diridiri *et al.* (2024) [3]. Para isso, 0,1032 g da amostra de maçã *in natura* foram misturados a 100 mL de água. Essa solução foi aquecida até atingir o ponto de ebulição, onde foi mantida durante 15 minutos. Após esse processo, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente e, posteriormente, 25 mL da solução foram diluídos em um balão volumétrico de 250 mL. As demais amostras não necessitam de preparo de amostra.

O fio de algodão utilizado foi adquirido em uma loja de tecidos de Viçosa, e seu preparo seguiu o protocolo descrito por Oliveira *et al.*[1]. O fio foi lavado em solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) em ebulição por 10 minutos, enxaguado com água Milli-Q até atingir pH neutro, e deixado para secar em temperatura ambiente antes de ser armazenado para aplicações posteriores.

2.2. Síntese da *bis*-tiocarbazona

Inspirada na metodologia de síntese de Li *et al.* [62], a *bis*-tiocarbazona B2COOH foi sintetizada utilizando como substratos a tiocarbazida (0,5 mmol) e 2-carboxibenzaldeído (1 mmol), empregando ácido acético (30 mol %) como catalisador em uma mistura de água/etanol numa proporção de (1,5:1,3) como solvente. A mistura reacional foi mantida sob agitação a 110 °C por 3 h (Figura 41). O produto formado (B2COOH) foi então filtrado e purificado por recristalização em uma mistura de água e etanol.

Figura 40. Síntese da *bis*-tiocarbazona (B2COOH)



Fonte: autoria própria.

2.3. Caracterização *bis*-tiocarbazona

A análise da massa/carga da *bis*-tiocarbazonas foi realizada através de injeção direta, em um espectrômetro de massas (SHIMADZU) modelo GC/MS QP2010. O equipamento foi operado empregando uma temperatura da interface de 300 °C, e temperatura da fonte de íons sendo mantida por 15 min a 300 °C. Os valores de m/z foram registrados no intervalo de 35-700 m/z .

O espectro no infravermelho (IV) foi obtido no espectrômetro FTIR Varian 660 equipado com GladiATR. Os valores foram expressos em números de onda e registrados no intervalo de 4000 - 450 cm^{-1} .

A faixa de temperatura de fusão foi obtida no equipamento PF 1500 FARMA (GEHAKA) empregando uma taxa de 0,5 °C/min.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) foram obtidos no espectrômetro Varian Mercury 300 MHz ($B_0 = 7\text{ T}$), operando a 300,069 MHz para ^1H e 75,459 MHz para ^{13}C . O solvente deuterado utilizado foi DMSO- d_6 . Os sinais foram caracterizados como simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), multiplete (m), duplo duplete (dd) e triplo duplete (td). Os deslocamentos químicos foram registrados em mg L^{-1} o sinal residual do DMSO (δDMSO 2,49 ppm para ^1H e δDMSO 39,5 ppm para ^{13}C).

2.4. Caracterização do μTAD desenvolvido

A morfologia das fibras de algodão foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 1430VP. As amostras foram fixadas em fita de carbono dupla-face sobre um stub, e, em seguida, submetidas a um evaporador de Carbono, modelo Q150T E.

A Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em ATR foi realizada utilizando um espectrofotômetro de infravermelho Jasco 4100, a uma faixa de varredura de 4000 a 550 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 256 scans.

A análise térmica do μTAD foi conduzida no intervalo de 30°C a 700°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} , utilizando o equipamento de análise térmica PerkinElmer STA 6000.

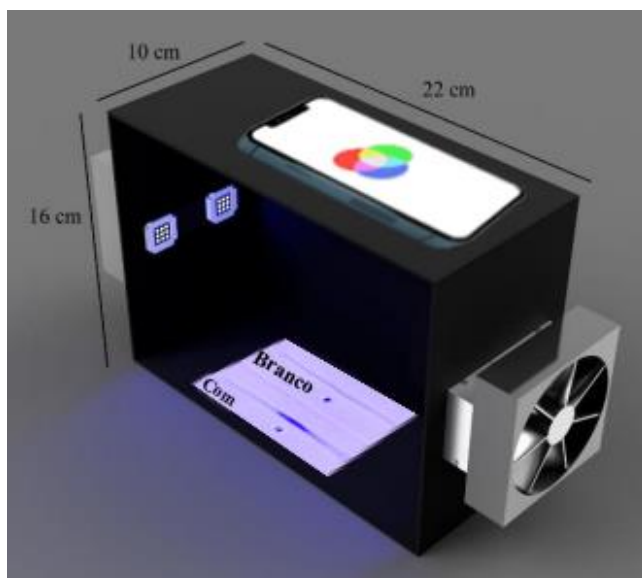
O espectro de emissão de fluorescência em 370 nm foi coletado utilizando espectrofotômetro de fluorescência AvaSpec-2048L (Avantes, Netherlands) com detector CCD

de matriz linear (Sony ILX5111) com resolução de 0,06 nm a 20 nm, tempo de integração de 3000 ms.

2.5. Aparatos e software para captura de fluorescência RGB

Em estudos anteriores, Maia *et al.* [32] desenvolveram uma câmara com dimensões de 23 x 15 x 11 cm, equipada com quatro UV-LEDs com comprimento de onda de 436 nm e potência de 10 W, destinada à obtenção de imagens digitais de soluções fluorescentes. A câmara utilizava uma fonte de alimentação de 12 V e corrente contínua de 10 A, Figura 2. Para confirmação do comprimento de onda na câmara, foi utilizado o Espectrômetro modular Ocean optics (USB4000) com detector Toshiba TCD1340AP (CCD), por apresentar base de fibra óptica é possível inseri-la na fonte luminosa.

Figura 41. Aparato utilizado para determinação do íon metálico via FDIB.



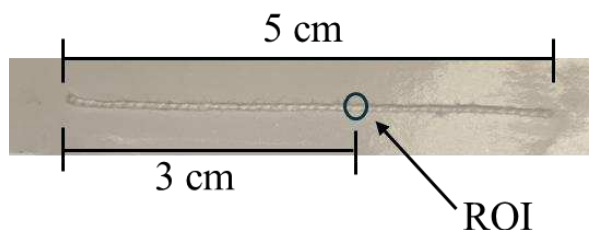
Fonte: Adaptado de Maia *et al.* [32].

Neste trabalho, os fios foram posicionados de forma demarcada na caixa, minimizando variações visuais. As imagens foram adquiridas com um smartphone Xiaomi Redmi Note 11, com câmera de 50 megapixels. Utilizando a função PRO, as configurações de captura foram ajustadas para: balanço de branco (WB) a 6500 K, abertura de F2, velocidade do obturador (S) de 1/4000, ISO 3200, compensação de exposição (Ev) em 0 e lente grande angular. Essas configurações garantiram um padrão consistente em todas as imagens adquiridas. Após a captura, as imagens foram transferidas para um computador e tratadas no *software* gratuito *ImageJ*, onde foram extraídos os respectivos valores de RGB.

2.6. Desenvolvimento de sensor μ TAD e Quantificação de Cu^{2+} utilizando análise RGB

O μ TAD foi desenvolvido conforme descrito por De Oliveira et al. (2023)[1]. O dispositivo analítico foi montado fixando-se uma fita dupla face de 6 cm sobre uma folha de papel e adicionado um fio de algodão de 5 cm. A partir da extremidade esquerda do fio, uma marcação foi feita a 3 cm para delimitar a região de interesse (ROI), Figura 43. Na ROI, 0,2 μL da molécula B2COOH foram depositados. Após a secagem, 10 μL de uma suspensão de CMC a 1% (m/v) foram aplicados. Após nova secagem, 5 μL de uma solução tampão (pH 7) foram depositados na extremidade esquerda da fita. Para o uso do dispositivo, 15 μL da solução padrão ou da amostra foram aplicados na mesma extremidade. Finalmente, a imagem do μ TAD foi capturada sob assistência de radiação UV na câmara de UV-LED, utilizando o smartphone, nas configurações descritas no item 2.8. A imagem de fluorescência foi feita usando o sistema RGB, empregando o software *ImageJ*.

Figura 42. Dispositivo μ TAD desenvolvido para a detecção sensível de íons de $\text{Cu}(\text{II})$.



Fonte: autoria própria.

2.7. Otimização das condições ideais

O método foi otimizado levando em consideração uma série de potenciais interferentes, como o tipo de fita dupla face usado na montagem do microdispositivo, a concentração e o volume de CMC, a concentração da molécula *bis*- tiocarbazona, o volume da amostra, o tempo de reação e o pH. A seletividade do ligante foi avaliada em pH 7 para os íons metálicos $\text{Pb}(\text{II})$, $\text{Ba}(\text{II})$, $\text{Ca}(\text{II})$, $\text{Cd}(\text{II})$, $\text{Al}(\text{III})$, $\text{Cr}(\text{III})$, $\text{Fe}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{III})$, $\text{Hg}(\text{II})$ e $\text{Mn}(\text{II})$, bem como para os açúcares D-glicose e D-frutose, todos na concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, foi conduzido um estudo de interferência na proporção 1:1 molar para os mesmos compostos na concentração $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

2.8. Parâmetros analíticos

Após a otimização do método utilizando μ TAD, foram avaliadas as figuras de mérito, incluindo seletividade, interferências, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão intradia e interdia, além da exatidão, seguindo as diretrizes estabelecidas pela ANVISA (2017) [63] e IUPAC [64]. Também foram realizados estudos de recuperação em quatro níveis de concentração (5, 10, 30 e 45 mg L⁻¹) para validar o método proposto quando a exatidão em função de um possível efeito de matriz. Para a comparação de métodos, as análises foram conduzidas em três níveis de concentração (5, 10 e 45 mg L⁻¹), usando FDIB quanto Espectrofotometria por absorção atômica (AAS).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterizações

3.1.1. Caracterização da B2COOH

Os espectros utilizados para a caracterização da *bis*-tiocarbazida B2COOH estão disponíveis no anexo II, incluindo espectro de massas (EM), espectro de infravermelho (IV), espectro de RMN de ¹H (300,069 MHz; DMSO-d₆, δ DMSO 2,49) e espectro de RMN de ¹³C (75,459 MHz; DMSO-d₆, δ DMSO 39,5).

Caracterizações da B2COOH: massa molar de 370,07 g/mol, sólido verde claro, rendimento 33%, ponto de fusão (p.f.) 175,9 – 176,7 °C. **IV** (cm⁻¹) ν_{\max} : 3167, 3006, 2361, 1673, 1239, 748 (Figura 63, anexo II). **EM** m/z (abundância em %): 370 (1, M⁺), 40 (100), 146 (55) (Figura 64, anexo II). **RMN de ¹H** (300,069 MHz; DMSO-d₆, δ DMSO 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento): 11,92 (2H, sl, δ N-H); 9,18 (1H, sl, H2); 8,96 (1H, sl, H9); 8,41 - 8,06 (2H, m, H7 e H12); 7,89 (2H, d, H4 e H15, 7,6 Hz); 7,65 (2H, t, H5 e H14, 7,6 Hz); 7,53 (2H, t, H6 e H13, 7,6Hz) (Figura 65, anexo II). **RMN de ¹³C** (75,459 MHz; DMSO-d₆; δ DMSO 39,5): δ (atribuição): 175,5 (C1); 168,1 (δ COOH); 134,4 (C2 e C9); 131,9 (C7, C12); 130,9 (C3 e C10); 130,2 (C4, C5, C14 e C15); 129,6 (C6 e C13); 127,3 (C8 e C11) (Figura 66, anexo II).

3.1.2. Caracterização do μ TAD

3.1.2.1. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) do μ TAD, Figura 44, foi realizada em diferentes etapas de tratamento do fio. Inicialmente, o fio foi tratado (FdA) após a limpeza com carbonato de sódio (Figura 44A); com adição da molécula B2COOH (Figura 44B); B2COOH-CMC (Figura 44C); B2COOH-CMC- tampão pH 7- Cu(II) (Figura 44D). Todas as micrografias foram obtidas em aumentos de 500 e 1000X.

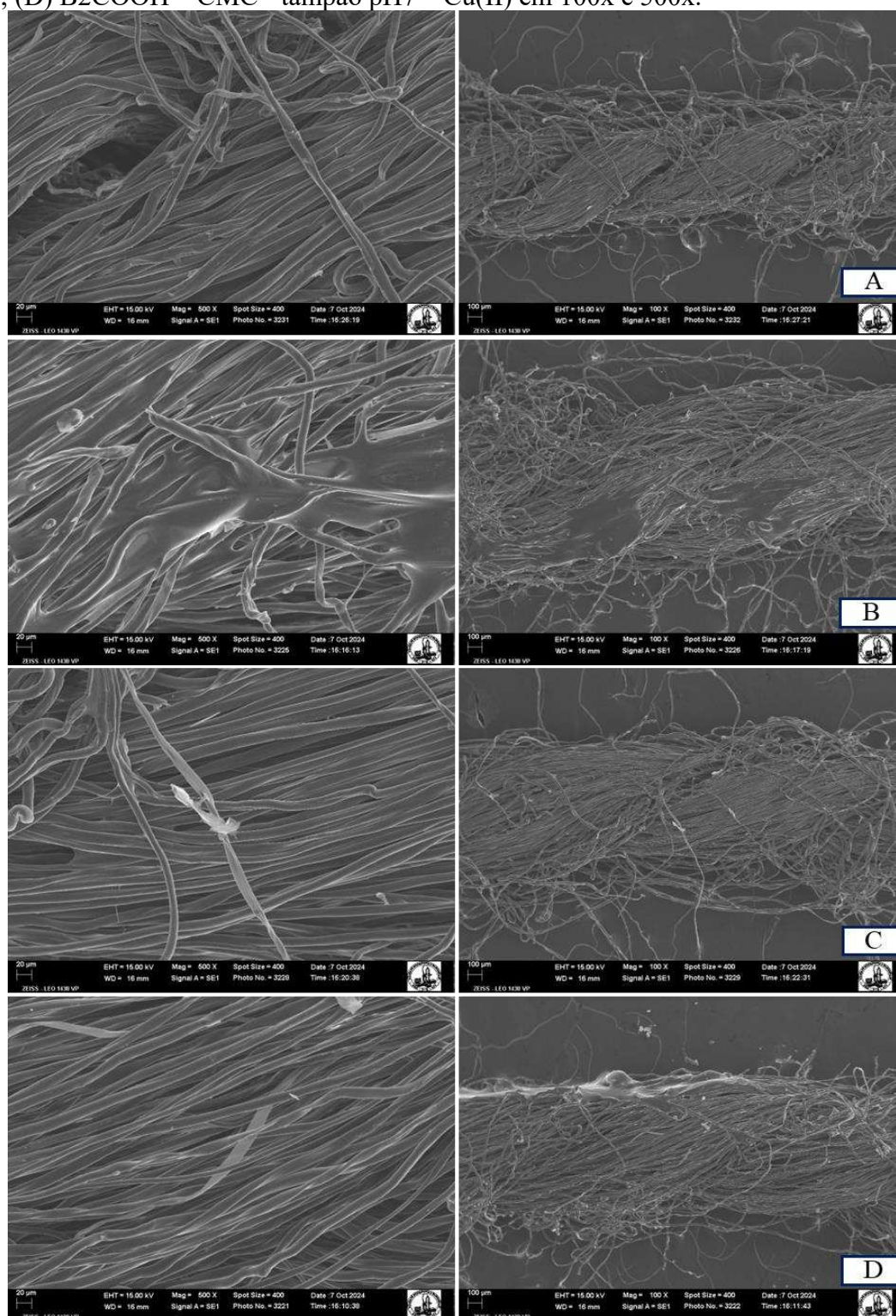
A partir das micrografias, revelaram uma progressão na modificação da superfície das fibras do fio ao longo das etapas de preparação do μ TAD. A adição de B2COOH e CMC resultou em uma superfície otimizada para a formação do complexo formado com o íon Cu(II) na ROI. Além disso, o CMC, em particular, desempenha papel crucial para formação de uma barreira adsorvente que retém o complexo formado na ROI, fornecendo estabilidade ao sensor, compactação das fibras e sensibilidade para detecção dos íons de Cu(II).

3.1.2.2. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) do μ TAD, Figura 45, indica a variação da massa da amostra em função da temperatura e a respectiva curva derivada da perda de massa (DTG), entre 30 °C e 700 °C. A decomposição acontece em duas etapas: a primeira entre 150 °C e 250 °C, apresenta uma perda de massa gradual de 2,46%, associada à decomposição térmica de moléculas voláteis ou baixa massa molecular, como moléculas de água livre [1].

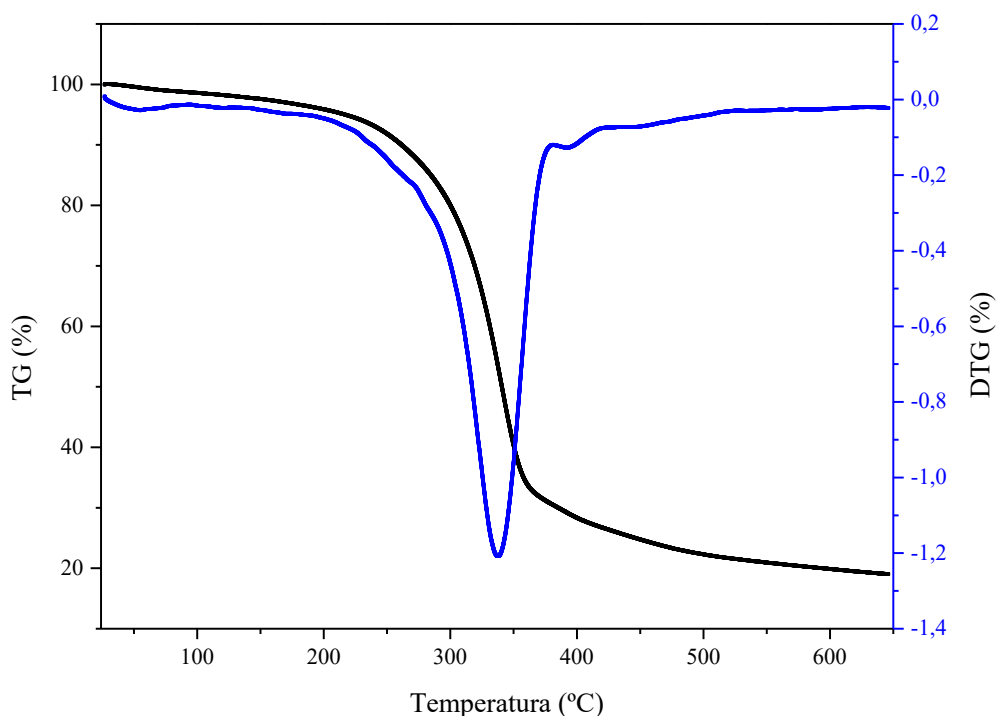
Na segunda etapa de decomposição, entre 240° C e 400° C, ocorre uma perda de massa significativa de 74,19%, relacionada à decomposição da estrutura orgânica do fio. Com o aumento da temperatura, ocorre a conversão do resíduo carbonoso em compostos aromáticos, acompanhada pela liberação de gases como CO₂ e CO, o que provoca a segunda etapa da degradação térmica do material à base de algodão [65,66]. Nesse momento, a curva DTG exibe um pico em torno de 332 °C, indicando o ponto de máxima de decomposição da análise. Após 450 °C, a amostra se estabiliza, sem que haja mais perda de massa.

Figura 43. Micrografia do (A) fio tratado; (B) com a molécula B2COOH; (C) B2COOH – CMC; (D) B2COOH – CMC - tampão pH7 – Cu(II) em 100x e 500x.



Fonte: autoria própria.

Figura 44. Curva de TG e DTG para decomposição térmica do dispositivo criado. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B_2COOH a 2,5 g L^{-1} , 10 μL de CMC a 1% (m/v) e 5 μL de tampão pH 7.



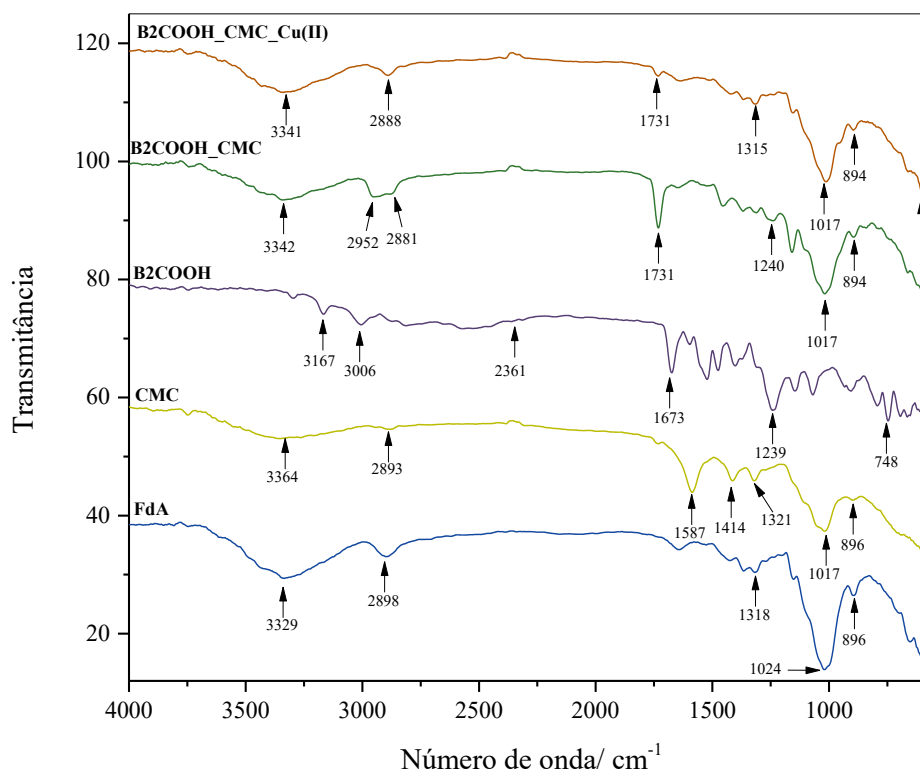
Fonte: autoria própria.

3.1.2.3. Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de FTIR das amostras de fio de algodão (FdA), CMC, B_2COOH , $\text{B}_2\text{COOH_CMC}$ e $\text{B}_2\text{COOH_CMC_Cu(II)}$ foram apresentados na Figura 46, evidenciam uma funcionalização bem-sucedida do fio demonstrado pela introdução dos reagentes utilizados no processo. O fio de algodão e o CMC apresentam bandas de estiramento característico para a hidroxila na região entre $3400 - 3200 \text{ cm}^{-1}$, indicando interações poliméricas. Além disso, as vibrações de deformação axial da ligação C – H, típicas para cadeias alifáticas, são detectadas em 2898 e 1318 cm^{-1} para FdA em 2893 e 1321 cm^{-1} para CMC. Por fim, as bandas de vibração de estiramento das ligações C-O-C aparecem em 1024 cm^{-1} e 1017 cm^{-1} para FdA e CMC, respectivamente. Também é observada uma banda em 896 cm^{-1} associada à ligação glicosídica. Para o CMC, encontrou-se bandas fortes de deformação axial assimétrica e simétrica em 1587 e 1414 cm^{-1} . O espectro $\text{B}_2\text{COOH_CMC}$ e $\text{B}_2\text{COOH_CMC_Cu(II)}$ apresenta um deslocamento da banda de absorção em 3329 cm^{-1} para 3341 cm^{-1} . Além disso, após a adição de cobre, observa-se o surgimento de uma banda em 2888 cm^{-1} , sugerindo a possibilidade de um rearranjo estrutural no ROI. Além disso, a banda de vibração de deformação axial das duplas

ligações C=O, localizada em 1731 cm^{-1} , característica do B2COOH, confirma uma funcionalização eficiente do fio.

Figura 45. Espectros FTIR para o fio de algodão (FdA), CMC, molécula B2COOH, B2COOH_CMC (0,2 μL de B2COOH a $2,5\text{ g L}^{-1}$, 10 μL de CMC a 1% (m/v)) e B2COOH_CMC (0,2 μL de B2COOH a $2,5\text{ g L}^{-1}$, 10 μL de CMC a 1% (m/v), 5 μL de tampão pH 7, 15 μL de Cu(II) 79 mg L^{-1}).



Fonte: autoria própria.

3.2. Otimização do método

O método foi otimizado levando em conta diversos potenciais interferentes, como o uso de fita dupla face, concentração de CMC [1], volume de CMC [1,56], concentração da molécula B2COOH, volume de amostra [56], tempo de reação e pH. Essas otimizações visam garantir a obtenção de resultados consistentes, confiáveis e reprodutíveis. A Tabela 10, mostra os parâmetros e a resposta analítica esperada. Alguns trabalhos na literatura já estudaram alguns desses parâmetros, e tomando como base os trabalhos de Oliveira *et al* [1] com valores de concentração de CMC e volume de CMC, e o trabalho de Suarez *et al* [56], para estudo da faixa de volume de amostra.

Tabela 10. Parâmetros avaliados e impacto na resposta analítica

Parâmetros	Faixa	Resposta analítica
Fita dupla face	Amarelada, Transparente e Branco	Mudança na reação fluorimétrica
Concentração de CMC	1 – 3 %	Intensidade da cor no ROI
Volume de CMC	0 – 25 μL	Mudança na barreira formada
Concentração de B2COOH	1 – 10 g L^{-1}	Intensidade do sinal no ROI
Volume de amostra	5 – 30 μL	Formação do complexo de Cu(II)
Tempo de reação	5 – 65 min	Tempo de resposta ideal
Faixa de pH	3 – 10	Estabilidade do complexo

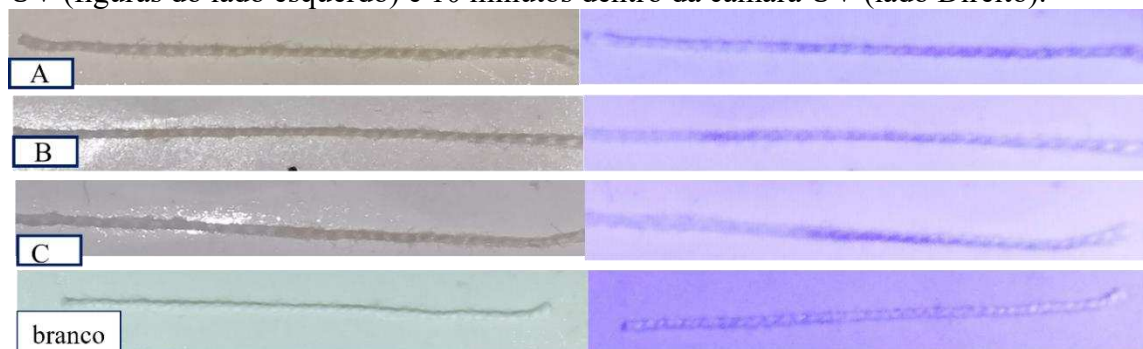
Fonte: autoria própria

3.2.1. Influência da fita dupla face

Três tipos diferentes de fita dupla face foram utilizadas para avaliar possíveis mudanças perceptíveis na reação fluorimétrica e sua influência nos valores dos canais RGB. Foram utilizadas as seguintes fitas: fita transparente com fundo amarelado (Figura 47A), fita transparente (Figura 47B) e fita com fundo branco (Figura 47C). A partir da extremidade esquerda do dispositivo, foi marcada região de interesse (ROI) em 3 cm (marcado por um ponto no papel), onde foi adicionado 0,2 μL da molécula B2COOH (5 g L^{-1}), 5 μL de tampão com pH 7 e 15 μL de uma amostra de cobre (79 mg L^{-1}).

Além disso, na Figura 47 - branco, observa-se que o dispositivo sem cobre não exibe reação colorimétrica nem fluorescência mensurável, tanto fora quanto dentro da câmara UV-LED. A fluorescência só ocorre com a adição de cobre, permitindo a detecção do metal exclusivamente na câmara UV-LED por meio da FDIB. A partir das imagens, os valores de RGB foram coletados e, mesmo com a variação do fundo na fita dupla face, a resposta permaneceu inalterada. Isso indica que o tipo de fita ou seu fundo não exercem influência significativa na reação.

Figura 46. Influência da fita dupla face de fundo amarelado (A), fundo transparente (B) e fundo branco (C). Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B_2COOH 5g L^{-1} , 5 μL de tampão pH 7, 15 μL de solução de Cu(II) 79 mg L^{-1} , tempo de reação: 8 minutos para resposta fora da câmara UV (figuras do lado esquerdo) e 10 minutos dentro da câmara UV (lado Direito).

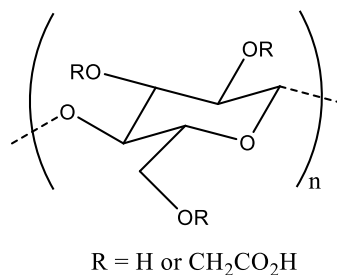


Fonte: autoria própria.

3.2.2. Influência da concentração de carboximetilcelulose

Foi notória a importância de adicionar um polímero (estrutura mostrada na Figura 48) para estabilizar a região de reação. Para isso, foi utilizado CMC. Foram analisadas a melhor ordem de adição dos reagentes B_2COOH e CMC, bem como a concentração ideal de CMC (1, 2 ou 3% (m/v)).

Figura 47. Representação da estrutura da CMC baseada no polímero de celulose β -(1 \rightarrow 4)-D-glucopirranose



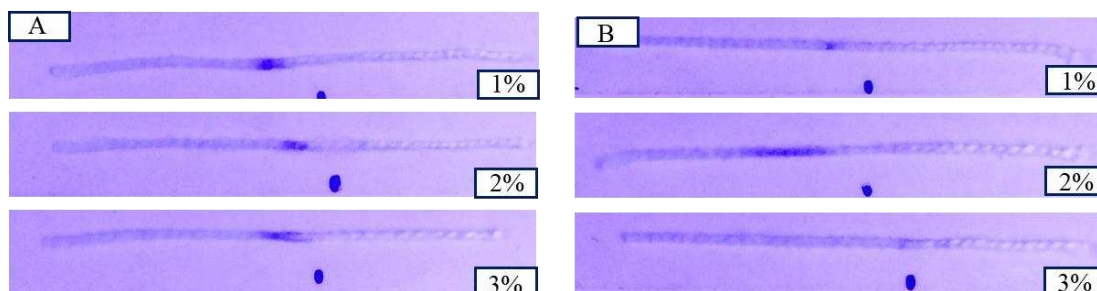
Fonte: autoria própria.

A Figura 49A mostra a ordem de adição onde a B_2COOH é colocada primeiro no fio, seguida pelo CMC. Já a Figura 49B mostra o CMC sendo adicionado primeiro, seguido pela B_2COOH . Em ambos os processos, foi necessário esperar o tempo de secagem adequado para a adição do próximo reagente.

Observou-se que, ao adicionar o CMC primeiro, o ROI é deslocado para a esquerda em concentrações de 1% e 2% (m/v). Com 3% (m/v), o CMC impede a reação, resultando em baixo contraste do ROI. Ao adicionar a B_2COOH inicialmente, a resposta analítica é intensa em todas as concentrações de CMC. A concentração de 1% (m/v) de CMC apresentou a maior variação no canal G ao compararmos o valor de G da amostra contendo cobre com o do branco (sem a

presença do íon cobre). Portanto, a adição da molécula antes do CMC foi definida como a abordagem ideal, utilizando CMC na concentração de 1% (m/v).

Figura 48. O efeito causado pela adição inicial da B2COOH (5 g L^{-1}) (A) comparado ao experimento onde à adição inicial foi do CMC (B) em concentrações de 1, 2 e 3%. Parâmetros experimentais: $0,2 \text{ } \mu\text{L}$ de B2COOH 5 g L^{-1} , volume variável de CMC, $5 \text{ } \mu\text{L}$ de tampão pH 7, $15 \text{ } \mu\text{L}$ de solução de Cu(II) 79 mg L^{-1} , tempo de reação 10 minutos.



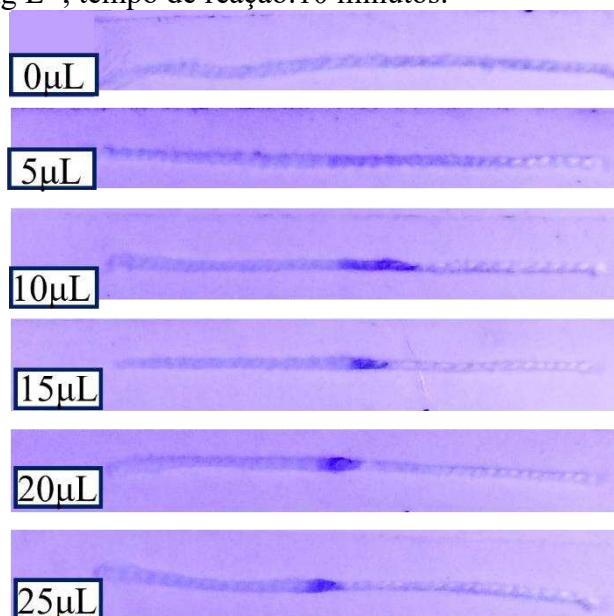
Fonte: autoria própria.

3.2.3. Influência do volume de carboximetilcelulose

A influência do volume de CMC a 1% (m/v) na pré-concentração do complexo formado no ROI foi avaliada em volumes de 0 a $25 \text{ } \mu\text{L}$ (Figura 50). De acordo com a figura, observa-se que a presença do CMC pré-concentra o complexo, pois sem a adição de CMC não há formação de um ROI definido.

Com $5 \text{ } \mu\text{L}$, o volume foi insuficiente para estabilizar o complexo no ROI, resultando em uma maior área reacional devido ao espalhamento da amostra. Para volumes iguais ou superiores a $15 \text{ } \mu\text{L}$, ocorre um deslocamento do ROI, além de reduzir a área disponível para análise. Com $10 \text{ } \mu\text{L}$, a amostra foi concentrada em uma região próxima ao ROI, tornando a intensidade do complexo formado mais evidente. Portanto, o volume de $10 \text{ } \mu\text{L}$ de CMC a 1% (m/v) foi selecionado para os estudos posteriores.

Figura 49. Estudo da variação do volume de CMC adicionado. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B_2COOH 5 g L^{-1} , volume variável de CMC 1% (m/v), 5 μL de tampão pH 7, 15 μL de solução de Cu(II) 79 mg L^{-1} , tempo de reação: 10 minutos.



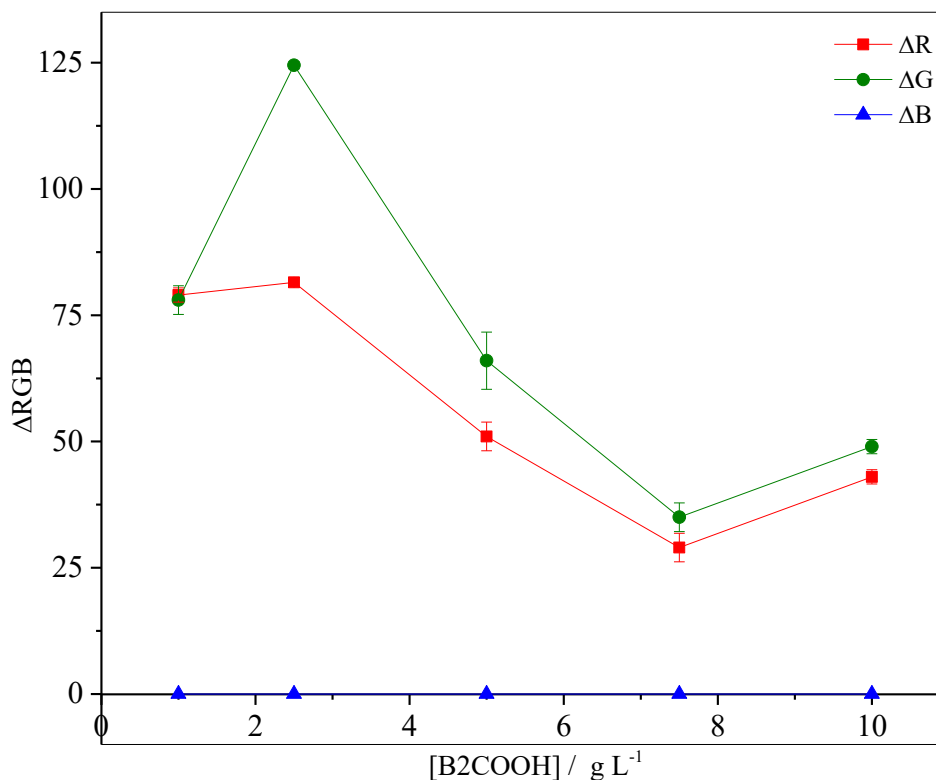
Fonte: autoria própria.

3.2.4. Influência da concentração da molécula B_2COOH

A concentração da molécula foi estudada variando de 1 a 10 g L^{-1} , mantendo-se fixo o volume de 0,2 μL enquanto se avaliava o ΔRGB , onde $\Delta\text{R} = \text{R}_{\text{B}_2\text{COOH}} - \text{R}_{\text{B}_2\text{COOH}_{\text{Cu}}}$, $\Delta\text{G} = \text{G}_{\text{B}_2\text{COOH}} - \text{G}_{\text{B}_2\text{COOH}_{\text{Cu}}}$ e $\Delta\text{B} = \text{B}_{\text{B}_2\text{COOH}} - \text{B}_{\text{B}_2\text{COOH}_{\text{Cu}}}$. Aqui, consideramos o valor do canal na ausência ($\text{G}_{\text{B}_2\text{COOH}}$, por exemplo) e presença do íon de cobre ($\text{G}_{\text{B}_2\text{COOH}_{\text{Cu}}}$, por exemplo). Nesse estudo, a resposta analítica ideal corresponde ao melhor valor de cor nos canais ou ao menor desvio padrão.

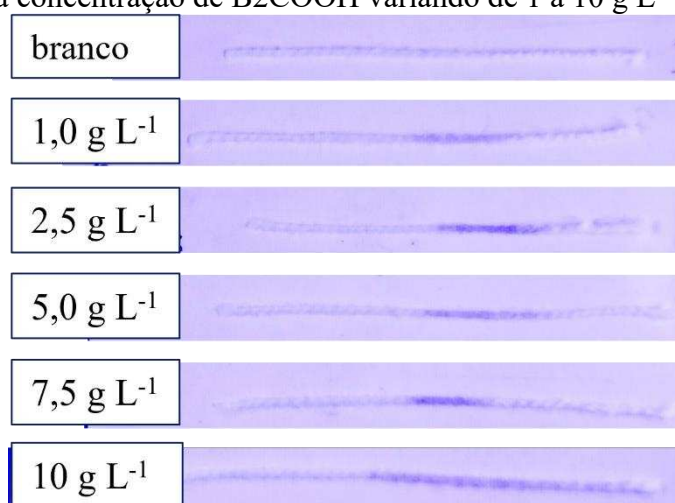
Como pode ser visto na Figura 51 e 52, o canal B não apresentou diferença nos valores entre a ausência e presença do íon de cobre, resultando em uma variação igual a zero. Já os canais R e G reagiram de maneira semelhante, sendo que o canal G mostrou o maior valor de cor na concentração de $2,5\text{ g L}^{-1}$. Por isso, o canal G e a concentração de $2,5\text{ g L}^{-1}$ foi escolhida para os estudos subsequentes, além disso o canal apresentou pequenos valores de desvio padrão para cada concentração estudada. Para ilustrar o que foi mencionado, a Figura 53 mostra que o canal G apresentou a maior resposta em todas as concentrações estudadas, especialmente na de $2,5\text{ g L}^{-1}$. Além disso, os desvios padrão para cada concentração foram baixos, reforçando a consistência dos resultados.

Figura 50. Efeito da concentração de B2COOH variando de 1 a 10 g L⁻¹. Parâmetros experimentais: 0,2 µL de B2COOH com concentração variável, 10 µL de CMC 1% (m/v), 5 µL de tampão pH 7, 15 µL de solução de cobre II (79 mg L⁻¹), tempo de reação: 10 minutos.



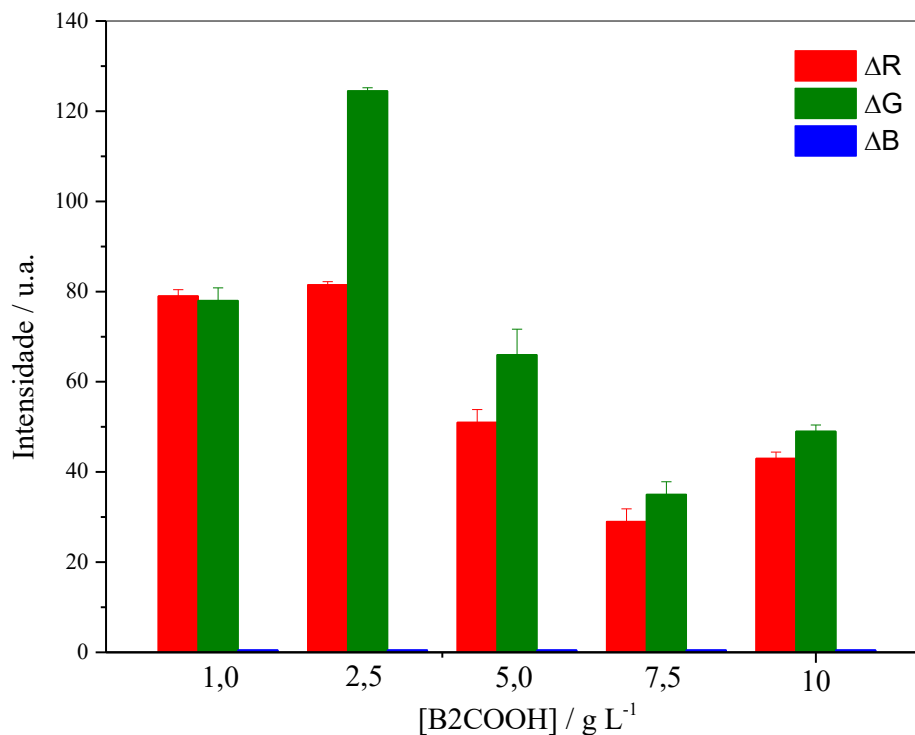
Fonte: autoria própria.

Figura 51. Efeito da concentração de B2COOH variando de 1 a 10 g L⁻¹ nos dispositivos.



Fonte: autoria própria

Figura 52. Comparação da resposta analítica entre os canais para diferentes concentrações de B2COOH.

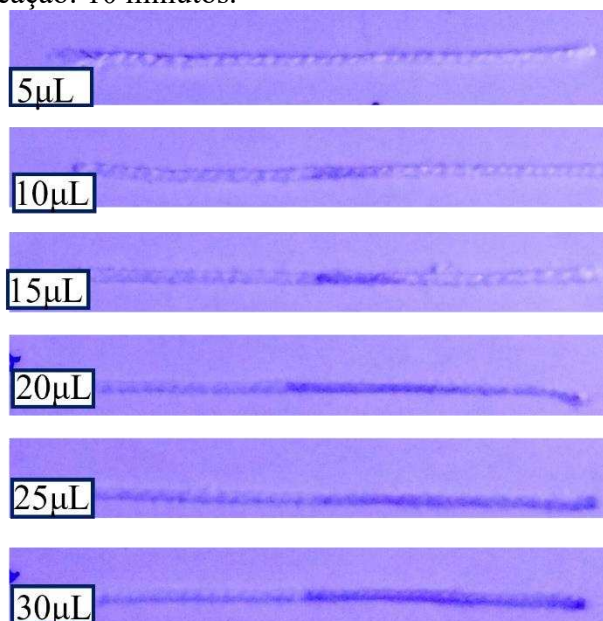


Fonte: autoria própria.

3.2.5. Influência do volume de amostra

O volume de amostra adicionado foi estudado entre 5 e 30 μL , conforme mostrado na Figura 54. O volume de 5 μL não foi suficiente para alcançar o ROI e permitir a reação necessária para formar o complexo. Para volumes acima de 20 μL , ocorre um rompimento da contenção criada pelo CMC, resultando na quebra da barreira formada no ROI e no arraste do complexo formado. Com o volume de 10 μL , há uma minimização da intensidade do ROI, o que não é favorável experimentalmente. Por outro lado, o volume de 15 μL foi suficiente, apresentando uma intensidade maior do sinal de fluorescência e sem deslocamento do ROI. Assim, o volume de 15 μL foi selecionado para dar continuidade à otimização do estudo.

Figura 53. Estudo do volume de amostra. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B_2COOH 2,5 g L^{-1} , 10 μL de CMC 1% (m/v), 5 μL de tampão pH 7, volume variável da solução de Cu(II) (79 mg L^{-1}), tempo de reação: 10 minutos.

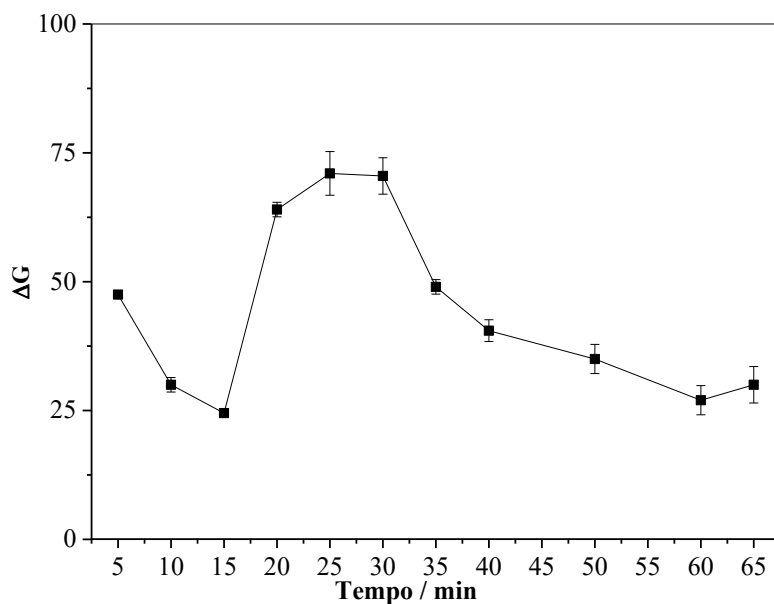


Fonte: autoria própria.

3.2.6. Influência do tempo de reação

A influência do tempo de reação foi avaliada para o volume de 15 μL de uma solução padrão de Cu(II) 79 mg L^{-1} em um intervalo de tempo de 5 a 65 minutos. O maior ΔG representa a maior diferença entre a intensidade do sinal de fluorescência da molécula sem a presença do íon metálico e com a presença. Portanto, 25 minutos é o tempo de reação ideal para a formação do complexo de maior intensidade, Figura 55.

Figura 54. Influência do tempo de reação. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B_2COOH 2,5 g L^{-1} , 10 μL de CMC 1% (m/v), 5 μL de tampão pH 7, 15 μL de solução padrão de Cu(II) 79 mg L^{-1} .



Fonte: autoria própria.

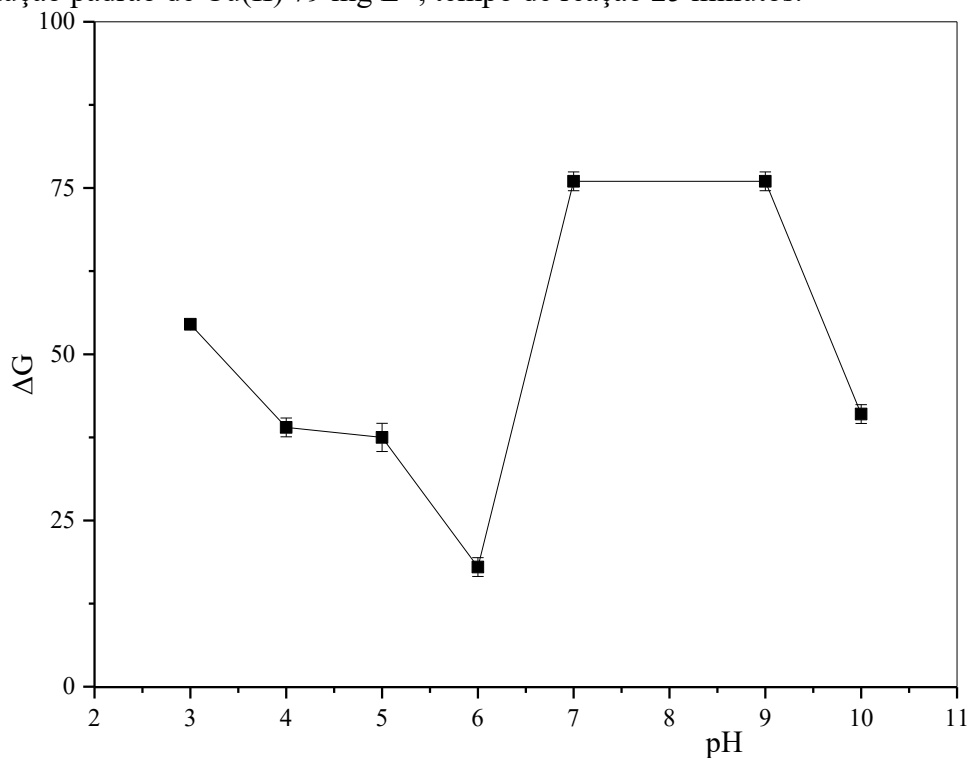
3.2.7. Influência do pH

O pH é importante para determinar a formação e estabilidade dos complexos formados. Uma vez, que alguns complexos podem precipitar ou dissolver melhor em condições ácidas ou básicas. Foi avaliado a influência do pH utilizando tampões de pH 3 a 10, mantendo-se fixo o volume de 5 μL aplicado na extremidade do μTAD , Figura 56.

Para este estudo, estamos avaliando a variação do ΔG em relação ao pH e buscamos identificar a maior variação possível. Observamos que os valores de pH entre 3 e 6 resultaram em uma resposta analítica inferior, enquanto pH de 7 e 9 apresentaram uma melhor resposta analítica, Figura 56. De modo visual, tem-se a Figura 57, em que mostra os fios em cada pH e sua condição com e sem metal.

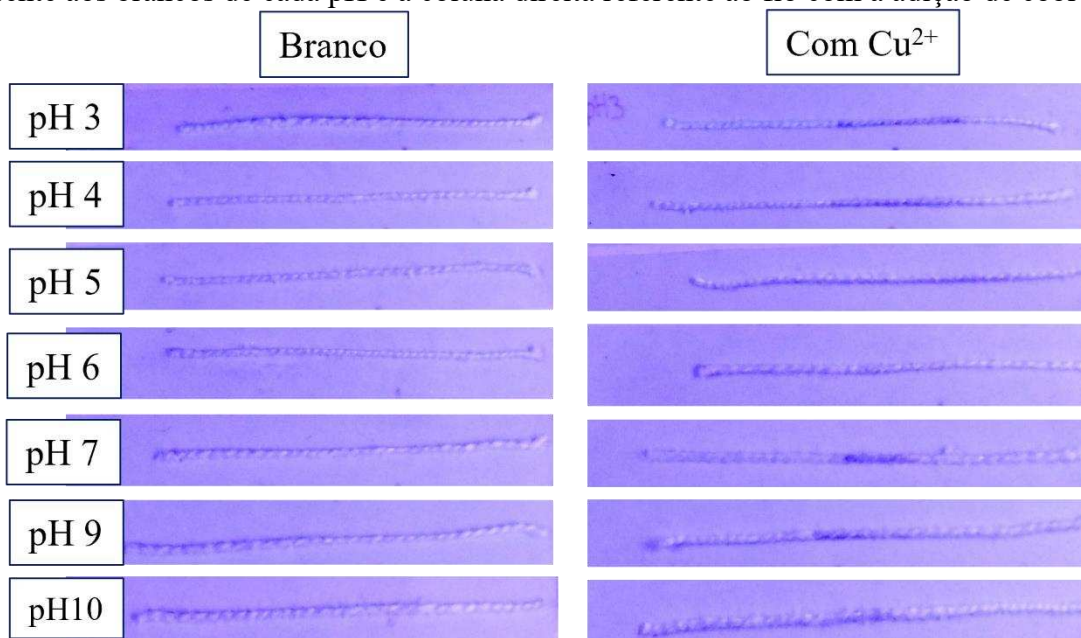
No entanto, para viabilizar a utilização do μTAD de maneira consistente, optou-se pelo uso do tampão pH 7. Isso foi escolhido com o objetivo de manter as condições ideais para a formação do complexo de interesse, garantindo uma resposta analítica mais estável e reprodutível ao longo dos experimentos.

Figura 55. Influência do pH para formação do complexo formado. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B_2COOH $2,5 \text{ g L}^{-1}$, 10 μL de CMC 1% (m/v), 5 μL de tampão com pH variável, 15 μL de solução padrão de Cu(II) 79 mg L^{-1} , tempo de reação 25 minutos.



Fonte: autoria própria.

Figura 56. Influência do pH para formação do complexo formado. Sendo a coluna esquerda referente aos brancos de cada pH e a coluna direita referente ao fio com a adição de cobre.



Fonte: autoria própria.

3.3. Método de validação

3.3.1. Seletividade e Interferência

O sistema μ TAD foi avaliado ao teste de seletividade dos metais Pb(II), Ba(II), Ca(II), Cd(II), Na(I), K(I), Al(III), Cr(III), Fe(II), Fe(III), Cu(II), Hg(II), Mn(II), Co(II) e Ag(I) em pH 7 e com concentração $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

De acordo com a Figura 58, observou-se que o cobre foi o único metal a apresentar uma reação detectável no ROI na câmera UV-LED. Embora o Fe(III) tenha mostrado uma alteração de coloração na extremidade esquerda, a área de interesse focada no ROI evidencia a seletividade específica para o cobre.

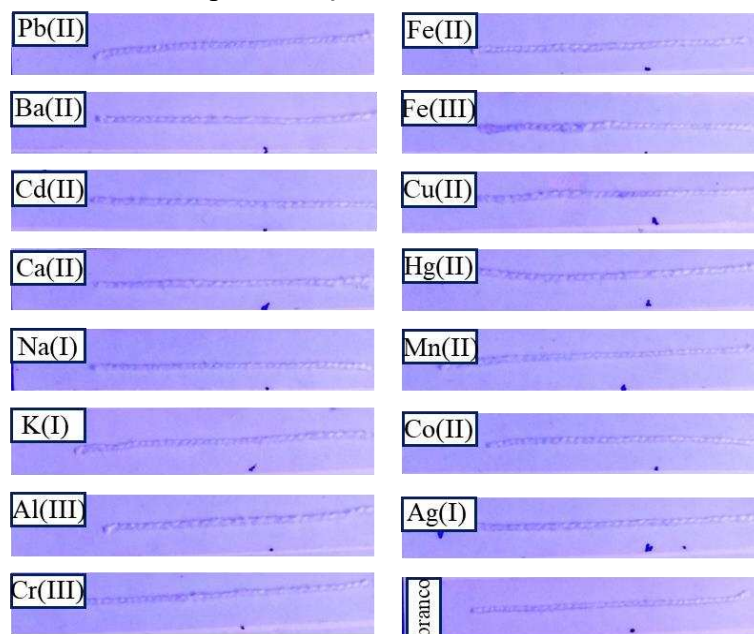
O estudo de interferência foi conduzido com os metais Pb(II), Ba(II), Ca(II), Cd(II), Na(I), K(I), Al(III), Cr(III), Fe(II), Fe(III), Cu(II), Hg(II), Mn(II), Co(II) e Ag(I), além de D-glicose e D-frutose, todas as soluções tiveram o pH ajustado para 7, na razão molar de 1:1. O erro relativo calculado (%) foi calculado utilizando a equação 1.

$$\text{Erro Relativo (\%)} = \frac{G_{Cu+interferente} - G_{Cu}}{G_{Cu}} \times 100 \quad (1)$$

Os íons estudados, Figura 59, não apresentaram erro relativo superior a 8,3%. No entanto para os íons de Mn(II), Al(III) e Cr(III) nota-se erros relativos consideráveis. A partir do tratamento das imagens digitais, observou-se a redução da cor do microdispositivo para esses íons. Esses íons não complexam quando estão sozinhos com a molécula, não há mudança fluorimétrica na resposta, no entanto a sua presença com o cobre ocasiona a redução da cor e a mudança na resposta analítica. Assim, quando os íons metálicos estão em solução junto com o cobre, eles podem competir pelas ligações com a molécula ligante, levando a mudança de coloração e conseqüentemente na mudança de cor [67].

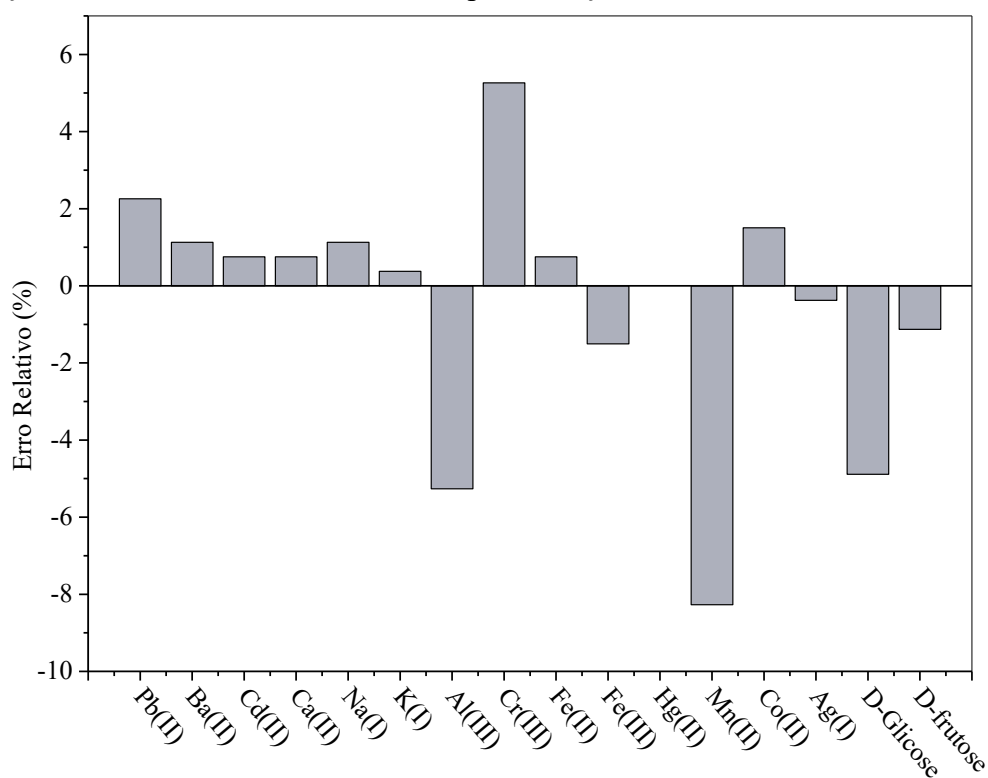
O erro determinado para a D-glicose está relacionado ao fato de esse açúcar ser um redutor de Cu(II), o que faz com que o íon de cobre, originalmente com carga 2^+ , seja reduzido para 0 [68]. Esse processo resulta em uma perda na coloração, o que traz variações para os resultados.

Figura 57. Avaliação da seletividade. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B_2COOH 2,5 g L^{-1} , 10 μL de CMC 1% (m/v), 5 μL de tampão pH 7, 15 μL de solução padrão de cada metal de concentração $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de reação 25 minutos.



Fonte: autoria própria.

Figura 58. Estudo da interferência na determinação de Cu(II) ($n = 3$). Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B_2COOH a 2,5 g L^{-1} , 10 μL de CMC a 1% (m/v), 5 μL de tampão pH, 15 μL de solução padrão contendo metais interferentes e íons de Cu(II) , ambos a uma concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com tempo de reação de 25 minutos.



Fonte: autoria própria.

3.3.2. Linearidade, Limite de detecção e limite de quantificação

A maneira mais comum de construir as curvas analíticas no sistema fluorimétrico é através da relação F/F_0 , onde F representa a fluorescência da amostra e F_0 é a fluorescência do branco (que não contém o analito) [29]. Outra abordagem é utilizar a variação dos sinais brutos, expressa como $\Delta G = G_0 - G$, onde subtraímos o sinal da amostra do sinal do branco [26,54]. Por outro lado, na colorimetria, a relação mais utilizada é a logarítmica $-\log(I/I_0)$, que compara a intensidade de radiação na presença do analito (I) com a intensidade de radiação na sua ausência (I_0) [25].

A linearidade do método foi investigada através dos parâmetros da curva analítica correlacionando o $-\log(G/G_0)$ com a concentração de Cu(II) (mg L^{-1}), e da diferença de intensidade inicial (G_0) pela intensidade das amostras ($\Delta G = G_0 - G$), dentro da faixa de trabalho de 1 a 50 mg L^{-1} . A curva analítica resultante está representada na Figura 60, descrita pela equação $-\log(G/G_0) = 0,00509[\text{Cu(II)}] - 0,00409$ em A e $\Delta G = 1,30387[\text{Cu(II)}] - 2,35067$ em B. Além disso, as imagens da curva analítica podem ser visualizadas na Figura 61.

Este estudo proporciona uma avaliação da relação entre a intensidade do sinal colorimétrico e a concentração de cobre, essencial para assegurar a precisão e confiabilidade das análises realizadas. O coeficiente de correlação (r) apresentou valor igual a 0,9988 e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9971, para a curva A, e $r = 0,9986$ e $R^2 = 0,9964$ para a curva B. Ambas as curvas apresentaram uma boa linearidade para o método, no entanto, visando a aplicação em uma gama maior de amostras, estudou-se os parâmetros da curva a fim de determinar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), Tabela 11.

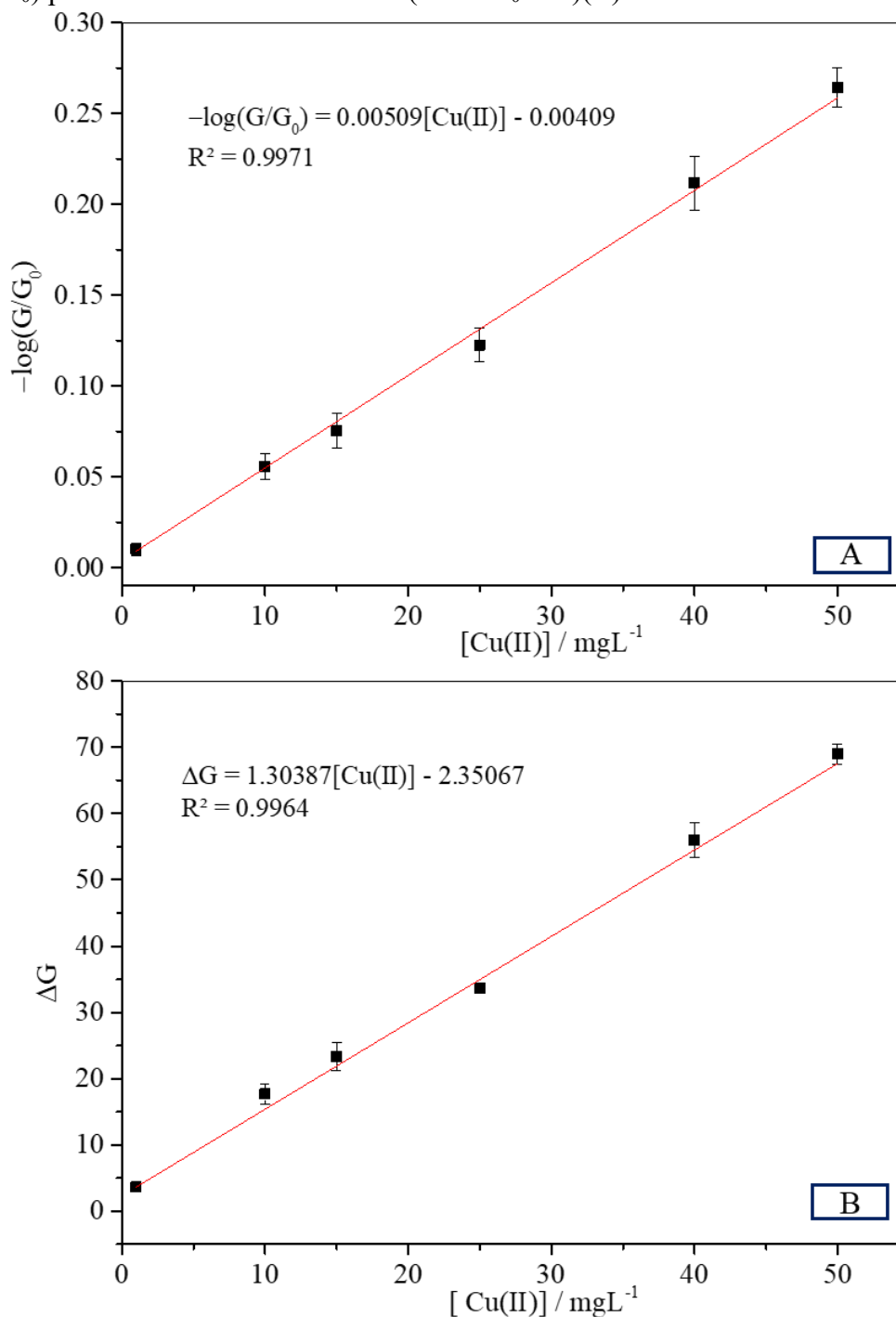
O limite de detecção foi calculado usando a equação $LD = 3 \times \sigma/S$ e o $LQ = 10 \times \sigma/S$, em que σ é o desvio padrão do branco, e S é a inclinação da curva analítica. O método de tratamento selecionado para os demais estudos foi aquele descrito por $-\log(G/G_0) = 0,00509[\text{Cu(II)}] - 0,00409$, pois, embora sutil apresentou um menor LD e LQ.

Tabela 11. Comparação dos parâmetros analíticos das curvas.

Curva / Parâmetros	$-\log(G/G_0) = 0,0051[\text{Cu(II)}] - 0,0041$	$\Delta G = 1,30 [\text{Cu(II)}] - 2,35$
r	0,9988	0,9986
R²	0,9971	0,9964
LD	0,20 mg L^{-1}	0,29 mg L^{-1}
LQ	0,81 mg L^{-1}	0,96 mg L^{-1}

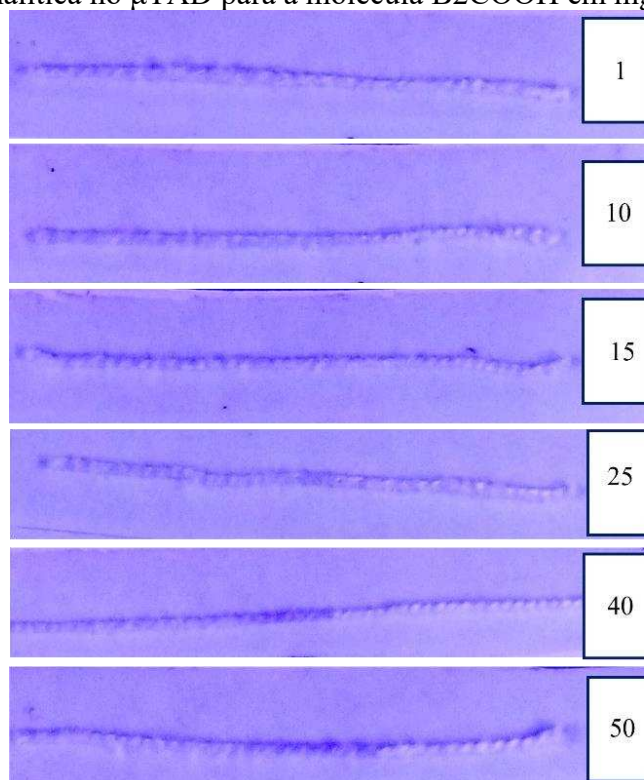
Fonte: autoria própria.

Figura 59. Curva analítica preparada a partir da adição crescente de Cu(II) em uma faixa de trabalho 1 a 50 mg L⁻¹, analisada em função do $-\log(G/G_0)$ (A) e da diferença de intensidade inicial (G_0) pela intensidade das amostras ($\Delta G = G_0 - G$)(B).



Fonte: autoria própria.

Figura 60. Curva analítica no μ TAD para a molécula B2COOH em mg L^{-1} .

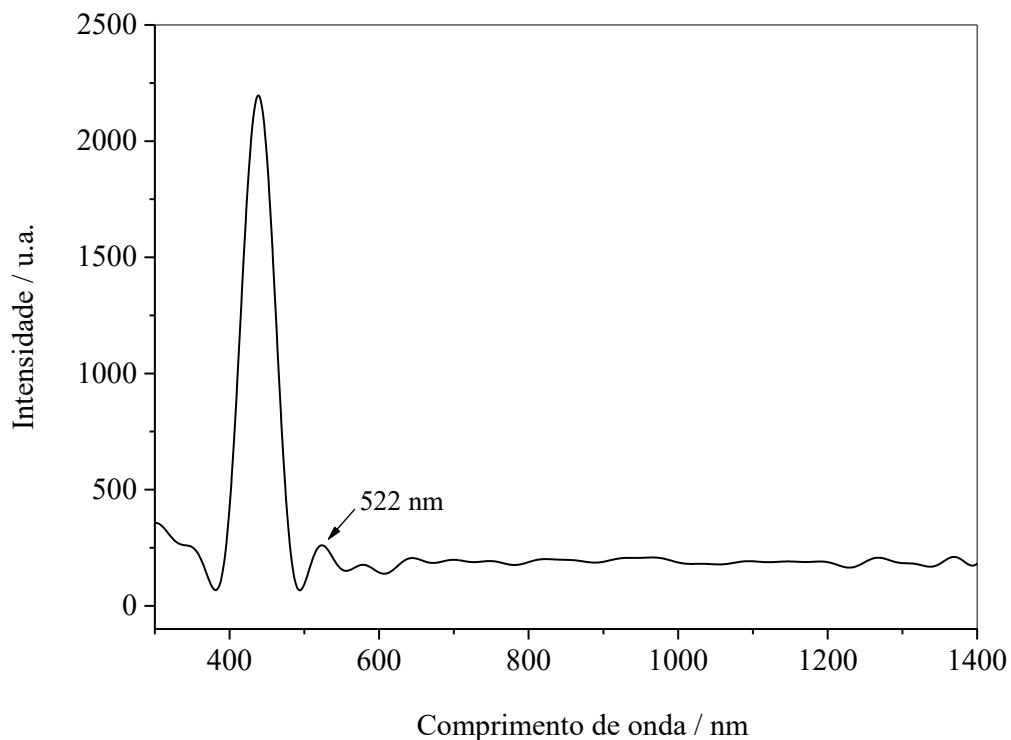


Fonte: autoria própria.

A luminescência da molécula B2COOH foi avaliada usando espectrofluorometria no comprimento de onda de excitação em 436 nm, semelhante ao utilizado na câmara UV-LED. Para isso, em uma cubeta de quatro lados polidos, foram adicionados 30 μL da molécula B2COOH, 680 μL de tampão pH 7 e 2290 μL de água para o branco da análise.

A Figura 62 apresenta os espectros obtidos para análise da molécula B2COOH. Observou-se uma fluorescência significativa no comprimento de onda utilizado, em concordância com os resultados do FDIB. Isso confirma a supressão do sinal fluorescente da molécula após reação com o cobre (II), evidenciando uma possível interação entre ambos. Além disso, é determinado o comprimento de onda de emissão em 522 nm, característico da cor verde, correspondente ao canal utilizado para o tratamento dos dados e que obtivemos melhores respostas analíticas.

Figura 61. Espectro de fluorescência com excitação em 436 nm para a molécula B2COOH. Condições experimentais: Tempo de integração 3s, tempo de reação 10 min.



Fonte: autoria própria.

3.3.3. Precisão

A precisão foi determinada pela repetibilidade ($n = 12$) para três níveis de concentração, 5, 15 e 50 mg L⁻¹. Os resultados intradia e interdia são apresentados na Tabela 12, no qual os resultados do desvio padrão relativo (%RSD) foram inferiores a 5%, indicando boa repetibilidade dos dados, de acordo com a *Association of Official Analytical Collaboration* (AOAC)[69].

Tabela 12. Desvio padrão relativo (RSD) obtidos para análise de concentração de Cu(II) em três níveis de concentração ($n = 12$).

Concentração (mg L ⁻¹)	%RSD	
	Intradia	Interdia
5	1,89	1,09
15	3,19	2,13
50	2,22	3,36

Fonte: Autoria própria.

3.3.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação em quatro níveis de concentração (5, 10, 30 e 45 mg L⁻¹) para amostras de água de torneira, água deionizada (Milli-Q), água mineral, 4 marcas diferentes de cachaça e chá de maçã *in natura*. Os resultados de recuperação variaram de 96,7% a 119,5%, permanecendo dentro da faixa aceitável de 80% a 120%, conforme recomendado pela AOAC [69], Tabela 13.

O coeficiente de variação (CV) variou de 1,2% a 8,5%, com todas as amostras apresentando CV abaixo de 10%, o que demonstra a boa precisão do método, mesmo para amostras de matrizes complexas, como água de torneira, mineral, chá e cachaça.

Tabela 13. Determinação de Cu(II) em amostras reais utilizando o FDIB a partir do teste de recuperação.

Amostra	Add / mg L⁻¹	Encontrado/ mg L⁻¹	Recuperação / %	Coefficiente de Variação / %	
Água	Torneira	5,00	5,40 ± 0,3	109	5,70
		10,00	11,0 ± 0,3	110	3,00
		30,00	33,8 ± 1,8	113	5,40
		45,00	44,2 ± 0,5	98	1,20
	Deionizada	5,00	4,90 ± 0,3	98	6,20
		10,00	10,7 ± 0,5	108	5,30
		30,00	28,7 ± 0,8	96	3,00
		45,00	45,4 ± 0,9	101	2,00
	Mineral	5,00	4,90 ± 0,3	98	6,20
		10,00	11,9 ± 0,6	119	4,90
		30,00	30,2 ± 1,1	101	3,80
		45,00	44,2 ± 0,5	98	1,20
Cachaça	C1	5,00	5,10 ± 0,3	102	6,00
		10,00	11,9 ± 0,6	119	4,90
		30,00	32,7 ± 0,8	109	2,40
		45,00	45,1 ± 1,4	100	3,10
	C2	5,00	4,90 ± 0,3	98	6,20
		10,00	11,9 ± 0,6	119	4,90
		30,00	32,2 ± 2,2	107	6,80
		45,00	46,1 ± 0,5	102	1,20
	C3	5,00	5,10 ± 0,3	102	6,00
		10,00	11,9 ± 1,0	119	8,50
		30,00	33,8 ± 1,2	113	3,60
		45,00	44,2 ± 1,1	98	2,40
	C4	5,00	5,10 ± 0,3	102	6,00
		10,00	10,8 ± 0,6	108	5,30
		30,00	29,2 ± 1,1	97	3,90
		45,00	46,1 ± 0,5	102	1,20
Chá de maçã	T1	5,00	5,40 ± 0,3	109	5,70
		10,00	10,6 ± 0,3	106	3,10
		30,00	33,8 ± 0,9	113	2,70
		45,00	43,9 ± 1,4	98	3,20

Fonte: autoria própria.

3.4. Comparação com o método de referência

As amostras de água, três marcas de cachaça e o chá de maçã foram analisados em três níveis de concentração (5, 10 e 45 mg L⁻¹) utilizando o método de referência (FAAS) e o método proposto (FDIB). A tabela 15 (anexo II) apresenta a comparação dos parâmetros analíticos de ambos os métodos.

A recuperação obtida pelo método de referência variou entre 89% e 125%, enquanto pelo método proposto, foi de 96% a 119%. Ambas as técnicas demonstraram uma boa faixa de recuperação para as amostras, confirmando a confiabilidade dos resultados e a aplicabilidade do método proposto para as diferentes matrizes analisadas. O FAAS apresentou uma faixa de trabalho mais restrita em comparação ao FDIB, o que favorece a análise de amostras de baixa concentração, mas exige uma etapa de preparo mais elaborada para amostras mais concentradas. Ambos os métodos demonstraram excelente linearidade, com R^2 superiores a 0,990. A comparação entre ambos os métodos, pode ser vista na Tabela 13, Anexo II, e as curvas analíticas para o método de referência na Figura 67, Anexo II.

Os resultados para a quantificação de Cu(II) são apresentados na Tabela 14. Os erros relativos entre os dois métodos variaram de 0,23% a 10,1%, indicando boa exatidão para todas as amostras analisadas e consistência nos resultados experimentais. Além disso, o coeficiente de variação (CV) foi calculado para ambos os métodos, com valores variando entre 0,1% e 11,5%.

Para validar esses resultados, utilizou-se o *software GraphPad Prism* realizando-se o Teste-F e o Teste-T pareado, ambos com nível de confiança de 95% ($n = 3$). Os testes avaliaram as médias dos dois métodos para as mesmas amostras e a variância. As amostras foram divididas em três grupos: água, cachaça e chá. Os testes demonstraram concordância entre os métodos em todos os grupos, com valores de p calculados superiores ao valor de p de referência (0,005), indicando que não houve diferença significativa entre os métodos nas concentrações analisadas. Além disso, os valores críticos de T e F foram superiores aos valores calculados, reforçando a ausência de diferenças estatísticas entre os métodos.

Assim, o método proposto mostrou-se comparável ao método de referência, apresentando vantagens adicionais, como portabilidade, custo reduzido e maior praticidade. Além disso, comparações com trabalhos da literatura também confirmam a viabilidade do método proposto, Tabela 14.

O método μ TAD FDIB proposto neste trabalho apresenta uma abordagem inovadora para a detecção de íons Cu(II), sendo comparável a métodos previamente estabelecidos na literatura, conforme mostrado na Tabela 17. Observa-se que os métodos DIB e μ TAD DIB exibem faixas de trabalho relativamente estreitas e limites de detecção baixos. Em contraste, o presente estudo se destaca pela combinação entre as técnicas μ TAD e FDIB, que, ao basear-se na fluorescência, oferece vantagens como miniaturização das análises, redução do volume de

reagentes e amostras, além de possibilitar a aplicação em amostras diversas, como água, cachaça e chá de maçã.

Adicionalmente, a etapa de pré-concentração utilizando CMC melhora significativamente a sensibilidade do método, abrindo caminhos para futuras otimizações. Embora o limite de detecção obtido seja próximo aos estudos da literatura, foi possível determinar uma faixa linear de trabalho de 1 a 50 mgL⁻¹, sendo adequada para amostras com concentrações baixas e mais elevadas de cobre (II). Além disso, por se tratar de um método utilizando um novo sensor, demonstra uma sensibilidade competitiva em relação aos métodos já existentes. Ademais, o uso do smartphone destaca os trabalhos, tornando-os mais acessíveis e práticos, o que facilita nas análises em campo. Assim, a combinação do novo sensor a partir da molécula da classe *bis*-iminas, o baixo consumo de reagente e de amostra, torna o método inovador e aplicável na análise de cobre (II).

Tabela 14. Determinação de cobre em amostras pelo método de referência e pelo método proposto.

AMOSTRA	Adicionado / mg L ⁻¹	Método		Erro Relativo / %	Test t	t _c ^a	Test F	F _c ^b	
		FAAS / mg L ⁻¹	FDIB / mg L ⁻¹						
Água	Torneira	5,00	5,00 ± 0,01	5,40 ± 0,3	7,98	1,641 p-valor: 0,1129	2,056	0,0005 p-valor: 0,9830	2,980
		10,0	10,0 ± 0,01	11,0 ± 0,3	10,1				
		45,0	45,7 ± 0,04	44,2 ± 0,5	3,20				
	MilliQ	5,00	5,00 ± 0,02	4,90 ± 0,3	2,30				
		10,0	10,1 ± 0,04	10,7 ± 0,5	6,37				
		45,0	45,5 ± 0,02	45,4 ± 0,9	0,23				
	Mineral	5,00	5,00 ± 0,03	4,90 ± 0,3	2,21				
		10,0	10,2 ± 0,05	11,9 ± 0,6	7,59				
		45,0	43,5 ± 0,01	44,2 ± 0,5	1,57				
Cachaça	C1	5,00	4,50 ± 0,03	5,10 ± 0,3	9,62	0,458 p-valor: 0,6508	2,056	0,0016 p-valor: 1,0	2,980
		10,0	11,9 ± 0,20	11,9 ± 0,6	0,64				
		45,0	43,3 ± 0,07	45,1 ± 1,4	4,32				
	C2	5,00	5,00 ± 0,01	4,90 ± 0,3	0,73				
		10,0	11,0 ± 0,42	11,9 ± 0,6	9,07				
		45,0	44,5 ± 0,22	46,1 ± 0,5	3,42				
	C3	5,00	5,40 ± 0,04	5,10 ± 0,3	5,75				
		10,0	11,5 ± 0,07	11,9 ± 1,0	3,62				
		45,0	46,1 ± 0,02	44,2 ± 1,1	4,04				
Chá de maça	T1	5,00	5,00 ± 0,01	5,10 ± 0,3	8,43	0,06538 p-valor: 0,9495	2,11	0,00004 p-valor: 1,0	3,640
		10,0	9,80 ± 0,01	10,8 ± 0,6	7,92				
		45,0	45,1 ± 0,01	46,1 ± 0,5	2,59				

^a- T crítico ^b – F crítico

Fonte: autoria própria

Tabela 15. Comparação entre o método proposto e outros estudos reportados na literatura.

Método analítico	Amostra	Faixa linear mg L ⁻¹	Detector	LD g L ⁻¹	Ref.
DIB	Cachaça Whiskies	0,25 – 6,75	Smartphone	0,18	[7]
DIB	Tequila Cachaça	2,0 – 13,0	Smartphone	0,034	[70]
DIB	Solução aquosa	5,0 – 571,9	Smartphone	0,08	[71]
FDIB	Cachaça	2,0 – 7,22	Smartphone	0,23	[32]
μTAD/DIB	Cachaça	3 – 25	Scanner	1,6	[72]
μTAD/DIB	Água	1 – 10	Smartphone	0,23	[1]
μTAD/DIB	Cachaça	1 – 12	Smartphone	0,21	[1]
μTAD/FDIB	Água Cachaça Chá de maçã	1 – 50	Smartphone	0,20	Este trab.

Fonte: autoria própria a partir das referências 7, 70, 71, 32,72 e 1.

4. CONCLUSÃO

O dispositivo microfluídico desenvolvido, utilizando fio de algodão, *bis*-tiocarbazona B2OOH como sensor fluorescente e CMC para pré-concentração, demonstrou ser uma solução eficaz para a determinação de Cu(II) em amostras de água, cachaça e chá de maçã. O método se destaca por oferecer baixos limites de detecção (0,24 mg L⁻¹) e quantificação (0,81 mg L⁻¹), além de uma faixa de trabalho linear (1 a 50 mg L⁻¹). Com vantagens como alta sensibilidade, baixo consumo de reagentes e amostras, e a ausência de necessidade de equipamentos sofisticados, o dispositivo se mostrou econômico e facilmente transportável para análises em campo.

A validação por meio de comparação com o método FAAS confirmou a confiabilidade do método, sem diferenças estatísticas significativas e com erros relativos inferiores a 10%. A reação inédita que acopla μTAD/FDIB para determinação de Cu(II), baseada na *bis*-tiocarbazona sintetizada, reforça a inovação do trabalho, oferecendo alta seletividade e sensibilidade para o íon de cobre em pH 7. Ademais, este método representa uma alternativa promissora para análises rápidas, de baixo custo e portáteis, com potencial aplicação em monitoramento ambiental e controle de qualidade em diversas matrizes.

REFERÊNCIAS

- [1] J.L. de Oliveira, W. Toito Suarez, V.B. Dos Santos, L.P. da Silva, L.F. Capitán-Vallvey, Using a cotton thread-based colorimetric sensor modified by carboxymethylcellulose and cuprizone with smartphone detection for quantification of copper., *Anal. Methods.* 15 (2023) 5683–5691. <https://doi.org/10.1039/d3ay01541f>.
- [2] T.V. Peres, M. Aschner, Chapter 30 - Nutritional, Genetic, and Molecular Aspects of Manganese Intoxication, in: J.F.B.T.-M. Collins Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals (Ed.), Academic Press, Boston, 2017: pp. 367–376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802168-2.00030-0>.
- [3] P.N. Diridiri, S.E. Bodur, A. Bayraktar, Ö.T. Günkara, S. Bakırdere, Determination of copper ion at trace levels in apple tea samples by simultaneous complexation and spray assisted microextraction method prior to detection by flame atomic absorption spectrophotometry, *Food Chem.* 441 (2024) 138243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138243>.
- [4] M. Bisaglia, L. Bubacco, Copper ions and Parkinson’s disease: Why is homeostasis so relevant?, *Biomolecules.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/biom10020195>.
- [5] O. Regulamentos, N. De Água, P. Primária, N. Regulamentos, Regulamentos Nacionais de Água Potável Primária | US EPA, (2025) 1–24.
- [6] M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, V.B. dos Santos, I.S. Resque, A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone, *Food Chem.* 338 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127800>.
- [7] M. de Oliveira Krambeck Franco, G.A. Dias Castro, C. Vilanculo, S.A. Fernandes, W.T. Suarez, A color reaction for the determination of Cu^{2+} in distilled beverages employing digital imaging, *Anal. Chim. Acta.* 1177 (2021) 338844. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338844>.
- [8] K.D. Pessoa, W.T. Suarez, M.F. dos Reis, M. de Oliveira Krambeck Franco, R.P.L. Moreira, V.B. dos Santos, A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 185 (2017) 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.072>.
- [9] F.C. Böck, G.A. Helfer, B. Adilson, M.B. Dessuy, M.F. Ferrão, Método de baixo custo para determinação de cobre em aguardente de cana usando Photometrix UVC ® embutido no smartphone, 367 (2022).

- [10] H. Yin, M. Zhang, B. Wang, F. Zhang, Effective removal of Cu(II) from water by three-dimensional composite microspheres based on chitosan/sodium alginate/silicon dioxide: Adsorption performance and mechanism, *Int. J. Biol. Macromol.* 277 (2024) 134585. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134585>.
- [11] M.S. Salman, M.N. Hasan, M.M. Hasan, K.T. Kubra, M.C. Sheikh, A.I. Rehan, R.M. Waliullah, A.I. Rasee, M.E. Awual, M.S. Hossain, A.K.D. Alsukaibi, H.M. Alshammari, M.R. Awual, Improving copper(II) ion detection and adsorption from wastewater by the ligand-functionalized composite adsorbent, *J. Mol. Struct.* 1282 (2023) 135259. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135259>.
- [12] B. Liu, Determination of Copper in Metal Processing Wastewater by Stripping Voltammetry, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 224 (2017). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/224/1/012060>.
- [13] Y. Li, Y. Liu, Z. Zhang, J. Tong, C. Bian, H. Dong, S. Xia, A Portable Sensor System for Detection of Copper Ions in Water Samples, 2019 IEEE 14th Int. Conf. Nano/Micro Eng. Mol. Syst. (2019) 385–388.
- [14] S. Seher, A. Shah, F.J. Iftikhar, J. Nisar, M.N. Ashiq, M.A. Aljar, M.S. Akhter, Detection of Copper Ions by a Simple, Greener and Cost Effective Sensor with GCE Modified with L-Tryptophan, *J. Electrochem. Soc.* 167 (2020) 27506. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ab6287>.
- [15] N.I. Vorozhtsov, D.D. Korablina, E.I. Kalenikova, L.A. Sviridova, A.I. Petkova, A.A. Moiseeva, V.A. Tafeenko, A.N. Ataeva, B. V Makhmudova, A.A. Markova, A.A. Shtil, N. V Zyk, E.K. Beloglazkina, Cu(II) and Ni(II) complexes of 1-(N-phenylthiocarbamoyl)-pyrazolines: Synthesis, electrochemistry and cytotoxic properties, *Results Chem.* 9 (2024) 101632. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101632>.
- [16] L.A. Romero-Cano, A.I. Zárate-Guzmán, F. Carrasco-Marín, L. V. González-Gutiérrez, Electrochemical detection of copper in water using carbon paste electrodes prepared from bio-template (grapefruit peels) functionalized with carboxyl groups, *J. Electroanal. Chem.* 837 (2019) 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.02.005>.
- [17] M. Lin, M.S. Cho, W.S. Choe, Y. Son, Y. Lee, Electrochemical detection of copper ion using a modified copolythiophene electrode, *Electrochim. Acta.* 54 (2009) 7012–7017. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.07.025>.
- [18] M.R. Awual, M.M. Hasan, M.M. Rahman, A.M. Asiri, Novel composite material for

- selective copper(II) detection and removal from aqueous media, *J. Mol. Liq.* 283 (2019) 772–780. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.03.141>.
- [19] J. Otero-Romaní, A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, A. Martín-Esteban, Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry/mass spectrometry for the determination of Cu, Ni, Pb and Zn in seawater after ionic imprinted polymer based solid phase extraction, *Talanta*. 79 (2009) 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.04.066>.
- [20] F.A. Wannas, E.A. Azooz, A.A.A.A.-H. Shalan Al-Mushhdi, I.A. Naguib, Ionic liquid-based cloud point extraction for spectrophotometric determination of copper in water and food samples using a novel imidazole derivative, *J. Food Compos. Anal.* (2024) 106638. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106638>.
- [21] K.P. Satheesh, V.S. Rao, A Study on spectrophotometric determination of copper from wastewater and its removal using magnetite Nanoparticles, 8 (2016) 31–36.
- [22] D. Fu, D. Yuan, Spectrophotometric determination of trace copper in water samples with thiomichlersketone, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 66 (2007) 434–437. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.03.018>.
- [23] A.K. Bansal, M. Nagar, Spectrophotometric determination of copper(II) and nickel(II) using thiosemicarbazone of citral, 83 (2006) 731–732.
- [24] E.N. Mezaal, K.A. Sadiq, R.M. Rumez, Spectrophotometric Method for Determination of Cu(II) Using a New Schiff Base Ligand, *J. Appl. Spectrosc.* 91 (2024) 236–245. <https://doi.org/10.1007/s10812-024-01711-1>.
- [25] C.R. da Silva Oliveira, W. Toito Suarez, H.R. dos Anjos Nahas, F.J. Moreira Novaes, J.P. Barbosa de Almeida, V. Bezerra dos Santos, Methods Based on Digital Image: from General Considerations to Chemistry Teaching, *Rev. Virtual Química.* (2023) 1–20. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20230060>.
- [26] J.P.B. de Almeida, V.B. dos Santos, G.A. do Nascimento, W.T. Suarez, W.M. de Azevedo, A.F. Ferreira, M.V. Maia, A fluorescence digital image-based method using carbon quantum dots to evaluate the compliance of a biocidal agent, *Anal. Methods.* 14 (2022) 2631–2641. <https://doi.org/10.1039/D2AY00678B>.
- [27] E.K.N. da Silva, V.B. dos Santos, I.S. Resque, C.A. Neves, S.G.C. Moreira, M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, A fluorescence digital image-based method using a 3D-printed platform and a UV-LED chamber made of polyacid lactic for quinine quantification in beverages, *Microchem. J.* 157 (2020) 104986.

- <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104986>.
- [28] M.-S. Steiner, R.J. Meier, A. Duerkop, O.S. Wolfbeis, Chromogenic Sensing of Biogenic Amines Using a Chameleon Probe and the Red–Green–Blue Readout of Digital Camera Images, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8402–8405. <https://doi.org/10.1021/ac102029j>.
- [29] V.B. dos Santos, E.F.S. Campos, J.P.B. de Almeida, W.T. Suarez, C.R.S. Oliveira, S.C.B. de Oliveira, Fluorescence digital image-based method to measure biogenic amines in Buffalo Mozzarella and other cheeses produced in Brazil, *Microchem. J.* 189 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108508>.
- [30] M.S.M.S.F. Acevedo, M.J.A. Lima, C.F. Nascimento, F.R.P. Rocha, A green and cost-effective procedure for determination of anionic surfactants in milk with liquid-liquid microextraction and smartphone-based photometric detection, *Microchem. J.* 143 (2018) 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.08.002>.
- [31] A.F.S. Silva, I.C. Gonçalves, F.R.P. Rocha, Smartphone-based digital images as a novel approach to determine formaldehyde as a milk adulterant, *Food Control.* 125 (2021) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107956>.
- [32] M. Valentin Maia, W. Toito Suarez, V. Bezerra dos Santos, J. Paulo Barbosa de Almeida, Carbon dots on paper for determination of Cu^{2+} in Sugar Cane Spirits samples for fluorescence digital image-based method, *Microchem. J.* 179 (2022) 107500. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107500>.
- [33] M. de O.K. Franco, W.J. Cardoso, C.B. Vilanculo, V.B. dos Santos, J.P.B. de Almeida, L.F. Capitán-Vallvey, W.T. Suarez, Using a biphasic system and digital imaging analysis with chemometric tools for simultaneous determination of Cu^{2+} and furfural in cachaça, *Anal. Methods.* 15 (2023) 2300–2308. <https://doi.org/10.1039/D3AY00311F>.
- [34] W. Wei, J. Huang, W. Gao, X. Lu, X. Shi, Carbon dots fluorescence-based colorimetric sensor for sensitive detection of aluminum ions with a smartphone, *Chemosensors.* 9 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9020025>.
- [35] H.S. de Sousa, R. Arruda-Santos, E. Zanardi-Lamardo, W.T. Suarez, J.L. de Oliveira, R.A. Farias, V. Bezerra dos Santos, A novel in situ method for linear alkylbenzene sulfonate quantification in environmental samples using a digital image-based method, *Anal. Methods.* 16 (2024) 2009–2018. <https://doi.org/10.1039/D4AY00073K>.
- [36] V.B. dos Santos, L.B. Ayres, H.S. de Sousa, C.D. Garcia, W. Toito Suarez, Detection of surfactants using a hydrophobic natural deep eutectic solvent and smartphone, *Sensors and Diagnostics.* 3 (2024). <https://doi.org/10.1039/d4sd00196f>.

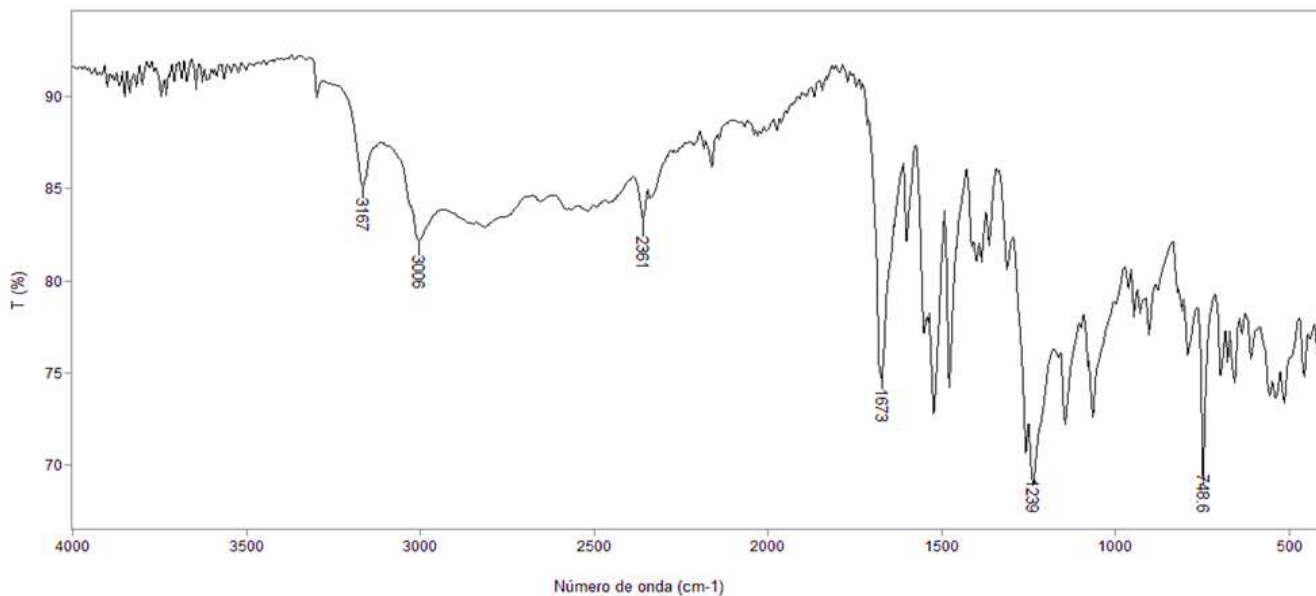
- [37] I.S. Resque, V.B. dos Santos, W.T. Suarez, An environmentally friendly analytical approach based on spot test and digital image to evaluate the conformity of bleaching products, *Chem. Pap.* 73 (2019) 1659–1668. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00717-w>.
- [38] Y.-T. Yen, Y.-S. Lin, T.-Y. Chen, S.-C. Chyueh, H.-T. Chang, Carbon dots functionalized papers for high-throughput sensing of 4-chloroethcathinone and its analogues in crime sites., *R. Soc. Open Sci.* 6 (2019) 191017. <https://doi.org/10.1098/rsos.191017>.
- [39] A. Kathiravan, A. Gowri, V. Srinivasan, T.A. Smith, M. Ashokkumar, M. Asha Jhonsi, A simple and ubiquitous device for picric acid detection in latent fingerprints using carbon dots, *Analyst.* 145 (2020) 4532–4539. <https://doi.org/10.1039/D0AN00750A>.
- [40] R. Santonocito, N. Tuccitto, V. Cantaro, A.B. Carbonaro, A. Pappalardo, V. Greco, V. Buccilli, P. Maida, D. Zavattaro, G. Sfuncia, G. Nicotra, G. Maccarrone, A. Gulino, A. Giuffrida, G. Trusso Sfrassetto, Smartphone-Assisted Sensing of Trinitrotoluene by Optical Array, *ACS Omega.* 7 (2022) 37122–37132. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02958>.
- [41] V.B. dos Santos, E.K.N. da Silva, L.M.A. de Oliveira, W.T. Suarez, Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits, *Food Chem.* 285 (2019) 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.167>.
- [42] L.M.A. de Oliveira, V.B. dos Santos, E.K.N. da Silva, A.S. Lopes, H.A. Dantas-Filho, An environment-friendly spot test method with digital imaging for the micro-titration of citric fruits, *Talanta.* 206 (2020) 120219. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120219>.
- [43] J.P. de Almeida, T. Tributino, J.R. Sabino-Junior, E. Amaral, C.R.S. Oliveira, M.V. Maia, W. Toito Suarez, L.B. Ayres, C.D. Garcia, V.B. dos Santos, Combining Digital Imaging and Quantum Dots for Analytical Purposes, *Anal. Methods.* (2025). <https://doi.org/10.1039/D4AY02097A>.
- [44] J.P.B. de Almeida, V.B. dos Santos, G.A. do Nascimento, W.T. Suarez, W.M. de Azevedo, A.F. Ferreira, M.V. Maia, A fluorescence digital image-based method using carbon quantum dots to evaluate the compliance of a biocidal agent, *Anal. Methods.* 14 (2022) 2631–2641. <https://doi.org/10.1039/D2AY00678B>.
- [45] L.P. dos S. Benedetti, V.B. dos Santos, T.A. Silva, E.B. Filho, V.L. Martins, O. Fatibello-Filho, A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol

- in drinks, *Anal. Methods*. 7 (2015) 4138–4144. <https://doi.org/10.1039/C5AY00529A>.
- [46] L. von Mühlen, O.D. Prestes, M.F. Ferrão, C. Sirtori, Miniaturized Method for Chemical Oxygen Demand Determination Using the PhotoMetrix PRO Application, *Molecules*. 27 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27154721>.
- [47] S. Šafranko, P. Živković, A. Stanković, M. Medvidović-Kosanović, A. Széchenyi, S. Jokić, Designing ColorX, Image Processing Software for Colorimetric Determination of Concentration, to Facilitate Students' Investigation of Analytical Chemistry Concepts Using Digital Imaging Technology, *J. Chem. Educ.* (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00920>.
- [48] L.P. Dos Santos Benedetti, V.B. Dos Santos, T.A. Silva, E. Benedetti-Filho, V.L. Martins, O. Fatibello-Filho, A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages, *Anal. Methods*. 7 (2015) 7568–7573. <https://doi.org/10.1039/c5ay01372k>.
- [49] A.A. Mohamed, A.A. Shalaby, Digital imaging devices as sensors for iron determination, *Food Chem.* 274 (2019) 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.014>.
- [50] E. da N. Gaiao, V.L. Martins, W. da S. Lyra, L.F. de Almeida, E.C. da Silva, M.C.U. Araújo, Digital image-based titrations., *Anal. Chim. Acta*. 570 (2006) 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.048>.
- [51] X. Zhu, X. Yuan, L. Han, H. Liu, B. Sun, A smartphone-integrated optosensing platform based on red-emission carbon dots for real-time detection of pyrethroids, *Biosens. Bioelectron.* 191 (2021) 113460. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113460>.
- [52] L. Ding, D. Peng, R. Wang, Q. Li, A user-secure and highly selective enhancement of latent fingerprints by magnetic composite powder based on carbon dot fluorescence, *J. Alloys Compd.* 856 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.158160>.
- [53] L. Yan, B. Zhang, Z. Zong, W. Zhou, S. Shuang, L. Shi, Artificial intelligence-integrated smartphone-based handheld detection of fluoride ion by Al³⁺-triggered aggregation-induced red-emission enhanced carbon dots, *J. Colloid Interface Sci.* 651 (2023) 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.07.125>.
- [54] E.K.N. da Silva, V.B. dos Santos, I.S. Resque, C.A. Neves, S.G.C. Moreira, M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, A fluorescence digital image-based method using a 3D-printed platform and a UV-LED chamber made of polyacid lactic for quinine quantification in beverages, *Microchem. J.* 157 (2020) 104986. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104986>.

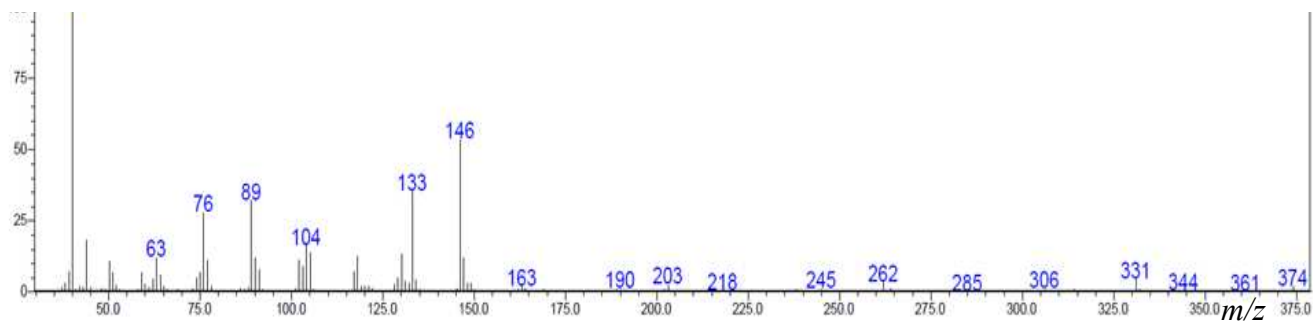
- [55] E.K. Sackmann, A.L. Fulton, D.J. Beebe, The present and future role of microfluidics in biomedical research, *Nature*. 507 (2014) 181–189. <https://doi.org/10.1038/nature13118>.
- [56] W.T. Suarez, M.O.K. Franco, L.F. Capitán-Vallvey, M.M. Erenas, Chitosan-modified cotton thread for the preconcentration and colorimetric trace determination of Co(II), *Microchem. J.* 158 (2020) 105137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105137>.
- [57] O. Mudanyali, S. Dimitrov, U. Sikora, S. Padmanabhan, I. Navruz, A. Ozcan, Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone, *Lab Chip*. 12 (2012) 2678–2686. <https://doi.org/10.1039/C2LC40235A>.
- [58] M.J. Arroyo, M.M. Erenas, I. de Orbe-Payá, K. Cantrell, J.A. Dobado, P. Ballester, P. Blondeau, A. Salinas-Castillo, L.F. Capitán-Vallvey, Thread based microfluidic platform for urinary creatinine analysis, *Sensors Actuators, B Chem.* 305 (2020) 127407. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127407>.
- [59] Â. de Fátima, C. de P. Pereira, C.R.S.D.G. Olímpio, B.G. de Freitas Oliveira, L.L. Franco, P.H.C. da Silva, Schiff bases and their metal complexes as urease inhibitors – A brief review, *J. Adv. Res.* 13 (2018) 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.007>.
- [60] H. Cantarella, R. Otto, J.R. Soares, A.G. de B. Silva, Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review, *J. Adv. Res.* 13 (2018) 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.008>.
- [61] A.A. Aly, S. Bräse, P. Weis, Tridentate and bidentate copper complexes of [2.2]paracyclophanyl-substituted thiosemicarbazones, thiocarbazonates, hydrazones and thioureas, *J. Mol. Struct.* 1178 (2019) 311–326. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.10.036>.
- [62] G. Li, Z. Shi, X. Li, Z. Zhao, Synthesis of New Ferrocene bis Thiocarbazonates under Solvent-Free Conditions using Microwave, *J. Chem. Res.* 35 (2011) 278–281. <https://doi.org/10.3184/174751911X13043447062703>.
- [63] ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada RDC N. 166, Agência Nac. Vigilância Sanitária. 2017 (2017).
- [64] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835–855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>.
- [65] G. Rosace, A. Castellano, V. Trovato, G. Iacono, G. Malucelli, Thermal and flame retardant behaviour of cotton fabrics treated with a novel nitrogen-containing carboxyl-

- functionalized organophosphorus system, *Carbohydr. Polym.* 196 (2018) 348–358. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.012>.
- [66] L. Sun, H. Wang, W. Li, J. Zhang, Z. Zhang, Z. Lu, P. Zhu, C. Dong, Preparation, characterization and testing of flame retardant cotton cellulose material: flame retardancy, thermal stability and flame-retardant mechanism, *Cellulose*. 28 (2021) 3789–3805. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03632-6>.
- [67] J.R. Stetter, V.C. Stamoudis, A.D. Jorgensen, Interactions of aqueous metal ions with organic compounds found in coal gasification: process condensates, *Environ. Sci. Technol.* 19 (1985) 924–928. <https://doi.org/10.1021/es00140a006>.
- [68] M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, V.B. dos Santos, I.S. Resque, A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone, *Food Chem.* 338 (2021) 127800. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127800>.
- [69] AOAC INTERNACIONAL, Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations, *J. Sains Dan Seni Its.* 4 (2013) 1–17.
- [70] M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, V.B. dos Santos, I.S. Resque, M.H. dos Santos, L.F. Capitán-Vallvey, Microanalysis based on paper device functionalized with cuprizone to determine Cu^{2+} in sugar cane spirits using a smartphone, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 253 (2021) 119580. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119580>.
- [71] M. Trigo-López, A. Muñoz, S. Ibeas, F. Serna, F.C. García, J.M. García, Colorimetric detection and determination of Fe(III), Co(II), Cu(II) and Sn(II) in aqueous media by acrylic polymers with pendant terpyridine motifs, *Sensors Actuators, B Chem.* 226 (2016) 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.11.116>.
- [72] D. da Silva Souza, G.M. Fernandes, B.C. Dias, J.R. Stefanelli Junior, R. Sequinel, J.F. da Silveira Petrucci, A Green Analytical Methodology for Detecting Adulteration in Automotive Urea-SCR Products Using Microfluidic-Paper Analytical Devices, *Sustain.* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/su14063363>.

ANEXO II

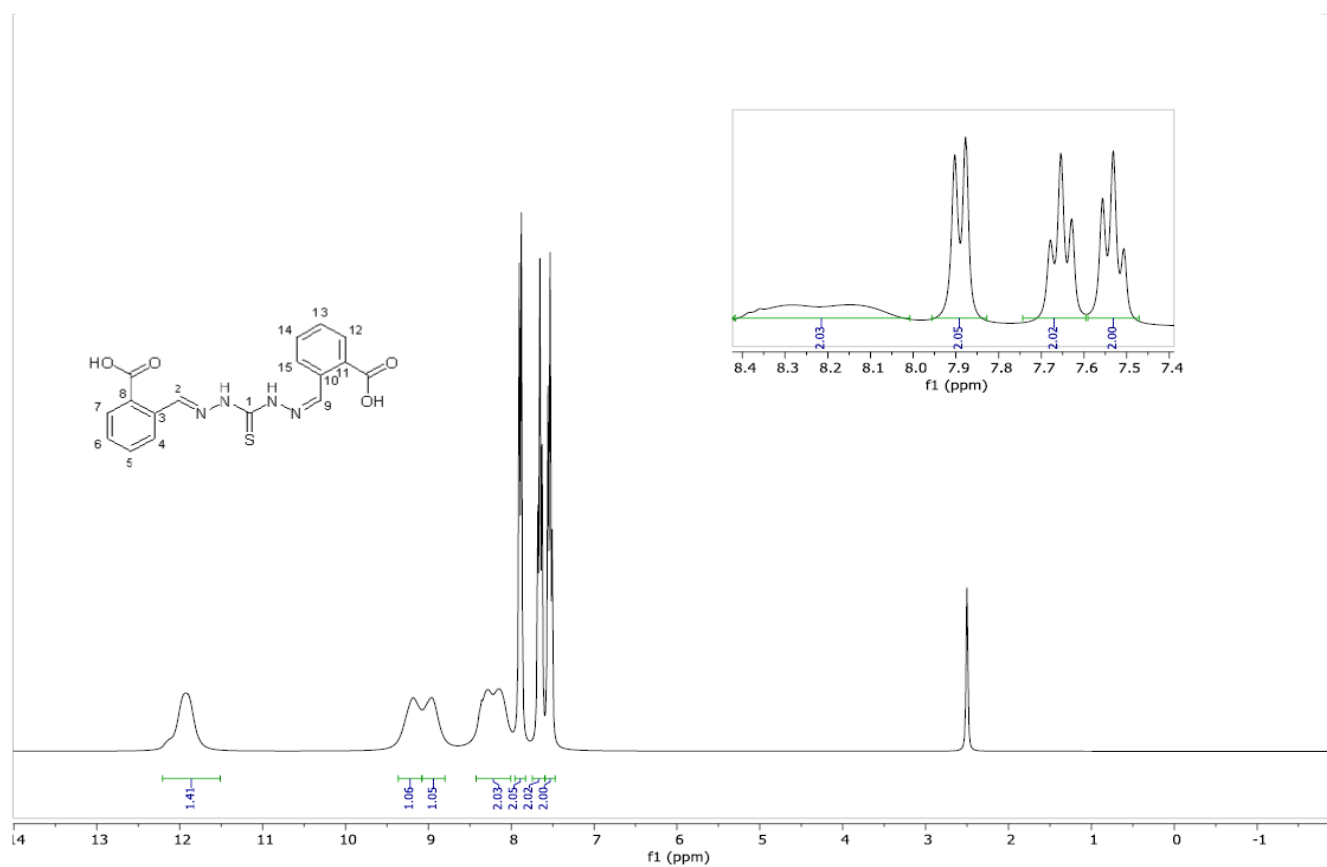
Figura 62. Espectro no IV (reflectância) da *bis*-tiocarbazona (B2COOH).

Fonte: Sousa, 2021

Figura 63. Espectro de massas (1E, 70eV) da *bis*-tiocarbazona (B2COOH).

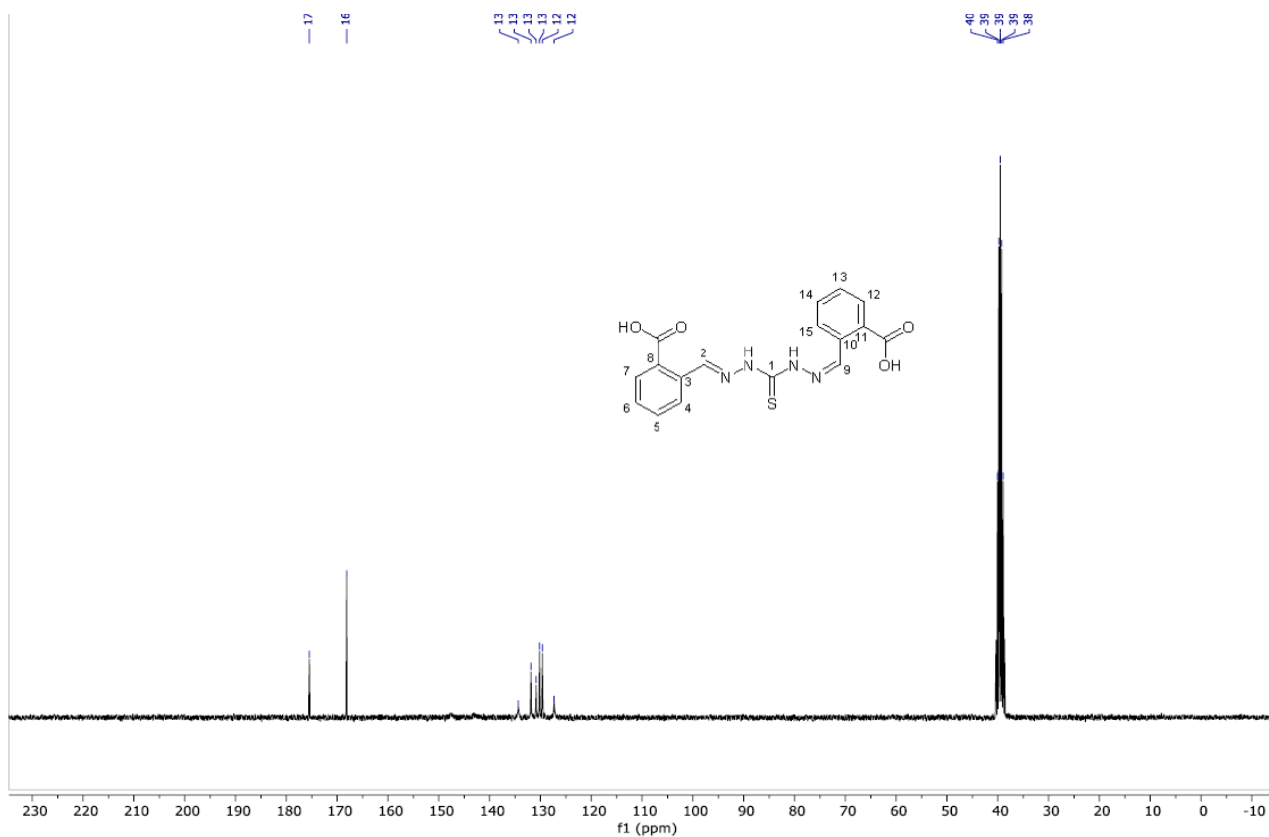
Fonte: Sousa, 2021.

Figura 64. Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; DMSO; δDMSO 2,49) da *bis*-tiocarbazona.



Fonte: Sousa, 2021

Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δDMSO 39,5) da *bis*-tiocarbazona (B2COOH).



Fonte: Sousa, 2021.

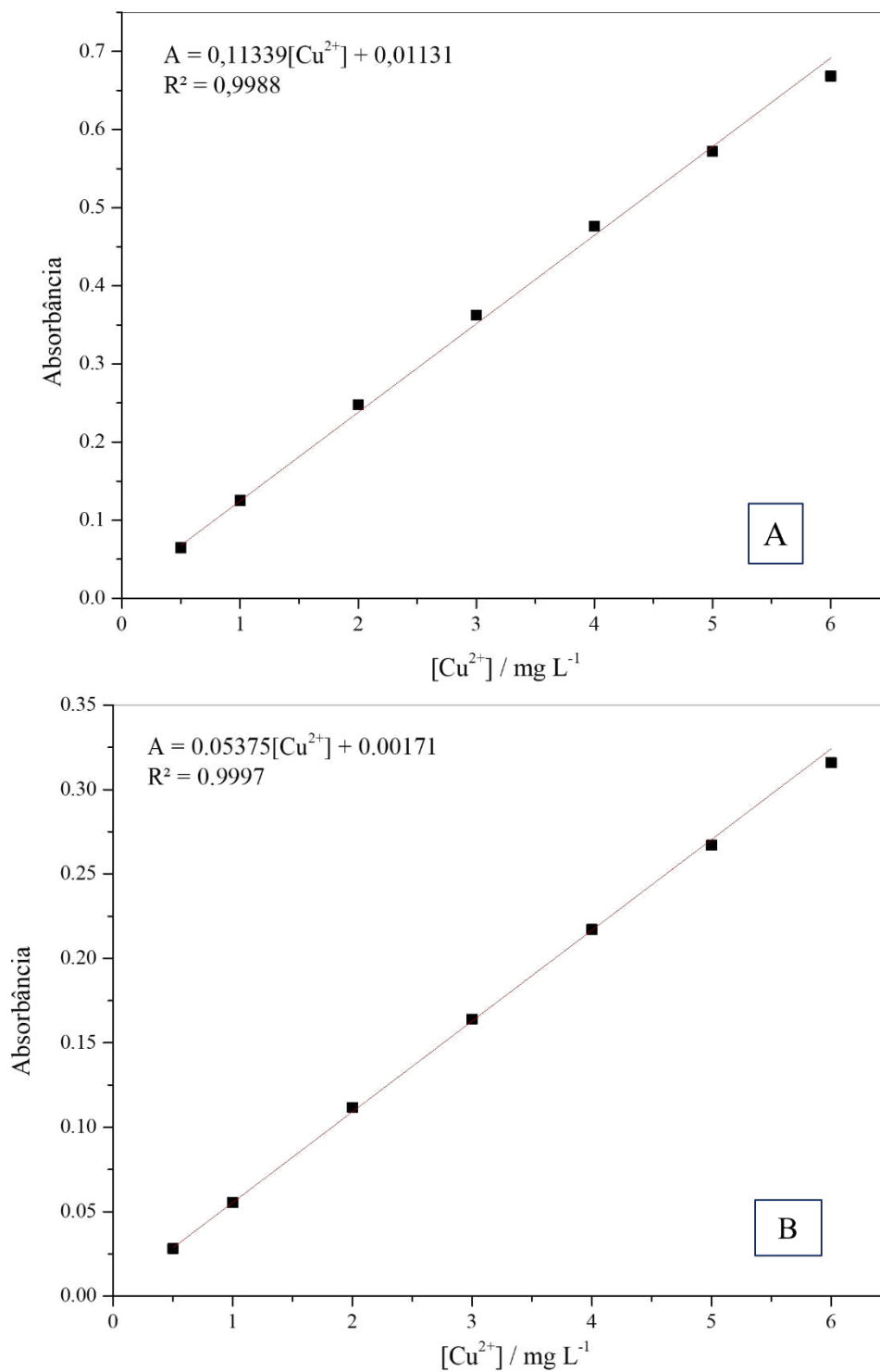
Tabela 16. Tabela Comparativa entre os métodos estudados para determinação de Cu^{2+}

Parâmetros analíticos	Método		
	FAAS ¹	FAAS ²	FDIB
Faixa linear (mg L^{-1})	0,5 - 6	0,5 - 6	1,0 - 50
R^2	0,9988	0,9997	0,9971
LD (mg L^{-1})	0,046	0,047	0,20
Recuperação (%) ^a	96 - 102	89 - 125	96 - 119

¹ matriz aquosa; ² matriz alcoólica

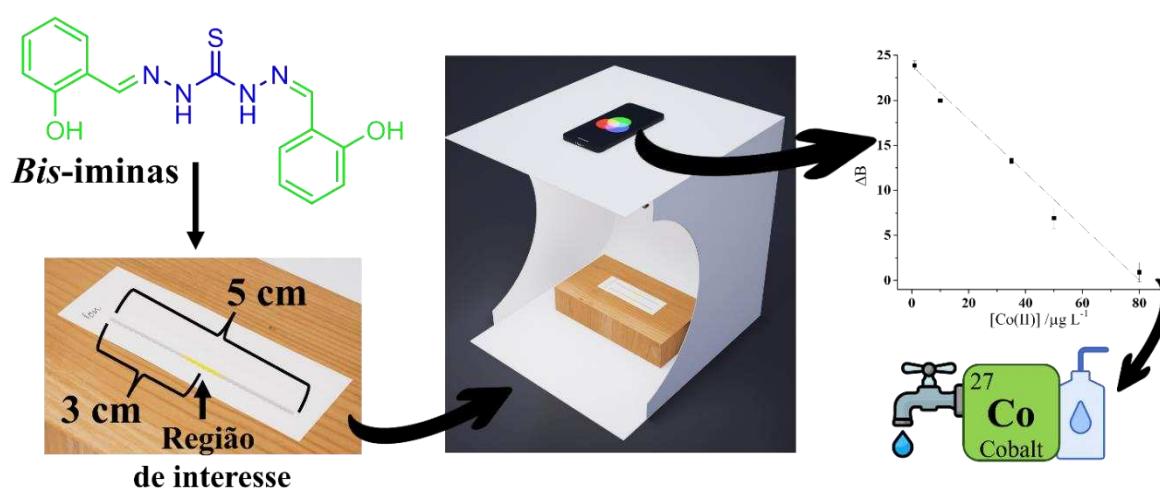
Fonte: autoria própria.

Figura 66. Curva analítica para matriz aquosa (A) e matriz alcoólica (B) através do método de referência FAAS.



Fonte: autoria própria.

CÁPITULO V

DISPOSITIVO μ TAD BASEADO EM BIS-TIOCARBAZONA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COBALTO EM ÁGUA VIA ANÁLISE DE DIGITAL

INTRODUÇÃO

O cobalto é um metal que desempenha um papel vital não apenas em aplicações industriais [1–4], mas também em processos biológicos humanos essenciais [5,6]. Biologicamente, o cobalto é indispensável como componente central da vitamina B₁₂ (cianocobalamina), que é essencial para a saúde humana. Essa vitamina facilita a síntese de DNA, a produção de glóbulos vermelhos e a função neurológica, ressaltando a importância do cobalto como micronutriente [5,6]. No entanto, apesar de sua importância, a exposição a espécies inorgânicas de cobalto além dos níveis recomendados pode levar a efeitos tóxicos, incluindo miocardiopatia, hipotireoidismo e distúrbios neurológicos [7–9]. A dualidade do cobalto como nutriente vital e possível toxina destacou a importância de monitorar e quantificar seus níveis em sistemas ambientais e biológicos [10–14].

A contaminação ambiental por cobalto provém de fontes naturais e antropogênicas [11,15]. Enquanto processos naturais, como a intemperização de rochas que contêm cobalto e emissões vulcânicas, liberam cobalto no ambiente, as atividades industriais continuam sendo os principais contribuintes para seus níveis elevados [11,15]. Essas indústrias incluem mineração, fundição, a fabricação de ligas e a produção de baterias recarregáveis – uma demanda que aumentou devido à transição global para tecnologias de energia verde. Como resultado, a poluição por cobalto na água, solo e cadeias alimentares representa riscos crescentes para os ecossistemas e a saúde humana [16–19]. De fato, o excesso de cobalto na água, alimento ou solo pode resultar em bioacumulação e biomagnificação, agravando sua toxicidade [4,8,20,21].

Para mitigar esses riscos, órgãos reguladores internacionais e nacionais estabeleceram diretrizes para controlar as concentrações de cobalto em várias matrizes. A Organização Mundial da Saúde (OMS) enfatiza o monitoramento do cobalto como parte dos perigos químicos na água potável, mas não definiu um limite global específico, refletindo suas concentrações geralmente baixas em condições típicas. No entanto, o cobalto ainda deve ser gerido para prevenir a contaminação ambiental e riscos à saúde pública. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) [22] estabelece as concentrações máximas de cobalto na água em 0,05 mg L⁻¹ (50 µg L⁻¹) para águas doces de Classe I e 0,2 mg L⁻¹ (200 µg L⁻¹) para a Classe III. A Diretriz de Saúde do EWG (Environmental Working Group) estabeleceu 70 µg L⁻¹ de cobalto como um limite tolerável para água potável. [23]

Nesse contexto, vários métodos analíticos têm sido empregados para a detecção de cobalto. Esses métodos incluem técnicas como espectrofotometria [24–26], espectrometria de

absorção atômica (FAAS) [27–30], e espectrometria de massas com plasma induzido por acoplamento (ICP-MS) [31–33]. Embora esses métodos ofereçam alta sensibilidade e precisão, muitas vezes estão associados a limitações significativas, incluindo a necessidade de equipamentos caros e uma preparação de amostras trabalhosa. Isso reduz sua viabilidade para análises no local ou em tempo real, particularmente em ambientes remotos ou com recursos limitados. Assim, os avanços recentes em química analítica têm se concentrado no desenvolvimento de métodos alternativos que sejam mais econômicos, portáteis e ecológicos [33,34]. Dentre eles, a detecção colorimétrica utilizando métodos baseados em imagens digitais (DIB) [35–44], tem sido utilizada para diversas aplicações, como: detecção de adulterantes no leite [34,35], amins biogênicas em alimentos [36,37], contaminantes em bebidas [38–40], amostras forenses [41–43], acidez de frutas [44,45], metais em águas ambientais [46], surfactantes em águas ambientais e outras matrizes [34,47,48].

O método DIB [34,49] é baseado na captura de imagens de reações colorimétricas utilizando câmeras digitais [50], smartphones [42,45], webcams [51], scanners [52] como os dispositivos digitais mais utilizados.

Dispositivos Analíticos Baseados em Papel Microfluídico (μ PADs) representam um avanço significativo na química analítica, oferecendo várias vantagens, como a redução das necessidades de reagentes e amostras, tempos de processamento rápidos e alta portabilidade. Essas características os tornam particularmente adequados para aplicações em campo [53–57]. No entanto, o papel como substrato tem uma limitação: ele requer padronização para definir os canais do dispositivo. Para resolver essa desvantagem, um substrato alternativo ganhou popularidade: o fio. Essa inovação, conhecida como Dispositivo Analítico Microfluídico Baseado em Fio (μ TAD), oferece uma solução promissora [58–63]. Dispositivos baseados em algodão se destacam como uma opção sustentável e de baixo custo; sua biodegradabilidade, baixo custo de produção e excelentes propriedades absorventes proporcionam benefícios ambientais e econômicos. Especificamente projetados para análise no local, os μ TADs baseados em algodão são altamente aplicáveis em áreas críticas, como monitoramento ambiental, vigilância da saúde pública e avaliações de segurança alimentar [61,63–67]. Além disso, os μ TADs são ideais para integração com análise baseada em Imagem Digital (DIB), criando uma abordagem poderosa para detecção química. A distribuição uniforme de reagentes e as mudanças de cor durante as reações químicas facilitadas pelos μ TADs podem ser capturadas e quantificadas por meio da análise DIB. Essa combinação permite uma análise portátil, rápida e altamente sensível no local, com uso mínimo de reagentes, baixo custo e ampla

versatilidade em diversas aplicações. Nesse contexto, diversos estudos têm sido dedicados ao desenvolvimento de novos sensores colorimétricos para detecção de cobalto em diferentes tipos de amostras. Entre as várias abordagens, classes específicas de ligantes quelantes têm ganhado destaque, incluindo bases de Schiff, derivados de rodamina, compostos azo e cumarinas [68–71].

As bis-tiocarbazonas são consideradas uma opção promissora para o desenvolvimento de sensores voltados para a detecção e quantificação de íons de cobalto [63–65]. Sua estrutura única, com grupos bis-imina e tiocarbonila, acredita-se que facilite a formação de complexos metálicos altamente estáveis com Co^{2+} , potencialmente resultando em mudanças colorimétricas significativas e maior sensibilidade [72–74]. A capacidade das bis-tiocarbazonas de formar esses complexos está enraizada em seu sistema conjugado, que promove uma forte coordenação com os íons de cobalto. Essa propriedade as torna candidatas ideais para aplicações em química analítica, particularmente no desenvolvimento de sensores colorimétricos capazes de detectar cobalto de forma seletiva. À luz de suas vantagens químicas e estruturais, a exploração das bis-tiocarbazonas para a detecção seletiva e sensível dos íons Co^{2+} é de considerável interesse. Esses compostos não só oferecem potencial no desenvolvimento de sensores, mas também estão alinhados com os princípios da química verde quando sintetizados utilizando catalisadores e solventes ambientalmente amigáveis [72–74].

Este estudo apresenta, pela primeira vez, o desenvolvimento de um μTAD que incorpora bis-tiocarbazonas como sensores colorimétricos seletivos para a detecção e quantificação de Co^{2+} . Utilizando a abordagem baseada em Imagem Digital (DIB), esse método inovador combina as propriedades únicas de ligação metálica das bis-tiocarbazonas com a alta sensibilidade e especificidade dos μTADs , oferecendo detecção rápida e precisa de cobalto. Essa abordagem oferece várias vantagens, incluindo o uso reduzido de reagentes e amostras, combinado com equipamentos portáteis e de fácil manuseio. Essas características tornam-na particularmente adequada para análises no local e monitoramento em tempo real. Além disso, o processo de síntese segue os princípios da química verde, utilizando solventes ambientalmente amigáveis, garantindo impacto ecológico mínimo. Bis-tiocarbazonas, μTADs e análise DIB representam um passo promissor para o avanço de sensores sustentáveis e eficientes para detecção de Co^{2+} .

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Preparação das soluções e amostra

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada (resistividade $> 18,0 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) do sistema Milli-Q® Millipore, Bedford (EUA). As soluções de íons metálicos foram preparadas em uma concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando reagentes de alta pureza da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As soluções tampão com diferentes valores de pH foram preparadas utilizando reagentes específicos: tampões de citrato (pH 3, 4 e 5) com citrato de sódio diidratado e ácido cítrico; tampões de fosfato (pH 6 e 7) com $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; e tampões em pH 8 e 9 com tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), com pH ajustado utilizando HCl concentrado. Ajustes finais foram feitos com soluções de HCl ou NaOH e medidos com um medidor de pH de bancada (Mettler Toledo, EUA).

A solução da molécula B-2OH foi preparada dissolvendo-a em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 2 g L^{-1} . As suspensões de carboximetilcelulose (CMC) a 1%, 2% e 3% m/v foram preparadas em água Milli-Q, aquecidas a 60°C por 20 minutos sob agitação a 5000 rpm.

A solução estoque de íons de cobalto foi preparada dissolvendo 0,0297 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água deionizada. O fio de algodão, adquirido em Viçosa, foi preparado seguindo Oliveira *et al.* [40], sendo lavado em uma solução fervente de Na_2CO_3 por 10 minutos, enxaguado com água Milli-Q até pH neutro e seco à temperatura ambiente.

2.2. Caracterização do fio de algodão

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada no modo ATR (Reflexão Total Atenuada) utilizando um espectrofotômetro RockSolid™, com uma faixa de varredura de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de $0,5 \text{ cm}^{-1}$, precisão de $\pm 0,2 \text{ cm}^{-1}$ e um laser de diodo como fonte.

A caracterização térmica do μTAD (F_B2OH_CMC_tampão pH8_Co²⁺) foi realizada na faixa de temperatura de 30°C a 700°C , com uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto. O experimento foi realizado sob uma atmosfera de nitrogênio com um fluxo constante de 50 mL min^{-1} , utilizando o analisador térmico PerkinElmer STA 6000.

2.3. Método DIB

As análises utilizando o método DIB para colorimetria são baseadas em fenômenos de reflectância [75,76], uma vez que a cor capturada é a radiação refletida, e não a radiação absorvida, como é medida na espectrometria. Para obter o sinal analítico, softwares e/ou aplicativos para decompor a imagem digital em valores de cor utilizam os sistemas de cor HSV [77], HSB [78], CMYK, CMY, escala de cinza [79] e RGB [44]. Alguns desses softwares são: ImageJ [13,80], PhotoMetrix Pro [81], ColorX [82], Color Grab sendo todos de uso gratuito. O sistema de cor mais amplamente utilizado é o sistema RGB, pois é um sistema simples e fácil de usar, já que combina os três canais: vermelho (R), verde (G) e azul (B), variando de 0 a 255 para cada canal [45,75,83].

Para as análises pelo método DIB, o aparelho de suporte das amostras deve ser inserido ou conter reagentes seletivos para evitar reações indesejadas com os analitos. Por isso, papéis [84,85], cerâmicas [86,87], polímeros [45,88] e vidros [89] são os mais utilizados. Contudo, para obter dados precisos e exatos, é necessário utilizar uma câmara fechada com luz branca homogênea [39,88,90,91]. Nesse contexto, foi utilizada uma câmara feita de acrílico e estireno-butadieno acrilonitrila (ABS), com dimensões de 24 x 24 x 22 cm, para a obtenção das imagens digitais. Além disso, na parte superior interna, há LEDs brancos alimentados por uma fonte de 5 V / 1 A, usados para fornecer luz uniforme e homogênea para capturar imagens digitais adequadas. Por outro lado, na base interna, há um suporte de madeira com dimensões de 17,8 x 8,2 x 4 cm que foi utilizado para ajustar a distância focal. Além disso, na parte externa, foi feito um buraco de 2 cm de diâmetro para acoplar um smartphone de 50 megapixels (Xiaomi Redmi Note 11) e obter as imagens digitais do μ TAD, como mostrado na Figura 68. Após a captura das imagens, elas foram decompostas utilizando os dados RGB com o aplicativo Color Grab e/ou o *software Image J*.

2.4. Síntese de Bis-Tiocarbazona

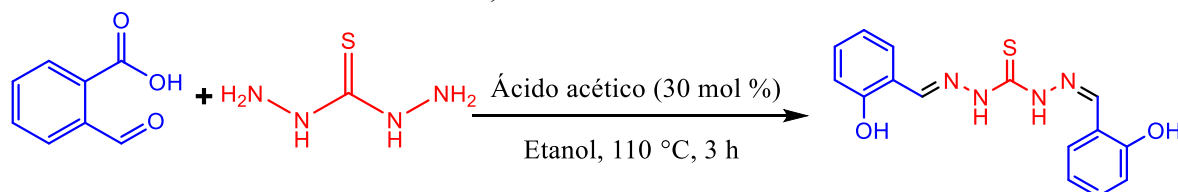
Com base na síntese descrita por Li *et al.* (2011)[73], e em trabalhos anteriores, a bis-tiosemicarbazona B2OH foi sintetizada. Para isso, 0,5 mmol de tiosemicarbazida e 1 mmol de 2-carboxibenzaldeído foram utilizados como substratos, e ácido acético (30 mol %) foi usado como catalisador. A reação foi realizada em uma mistura de solventes de água e etanol na proporção de 1,5:1,3. A mistura foi agitada por 3 horas a 110 °C (Figura 69). Após a reação, o produto (B-2OH) foi isolado por filtração e purificado por recristalização com uma mistura de água e etanol.

Figura 67. Aparato desenvolvido para captura de imagens utilizando o método DIB, com um smartphone posicionado na parte superior da caixa. O μ TAD é centralizado na base de madeira para garantir o alinhamento com o foco da câmera, enquanto o LED proporciona iluminação controlada, garantindo precisão na aquisição das imagens.



Fonte: autoria própria.

Figura 68. Síntese da bis-tiosemicarbazona B-2OH a partir da reação entre 2-carboxibenzaldeído e tiosemicarbazida, utilizando ácido acético e etanol como catalisadores.



Fonte: autoria própria.

2.5. Caracterização da molécula

A massa das bis-tiocarbazonas foi determinada utilizando um espectrômetro de massas GC/MS QP2010 (SHIMADZU). O equipamento operou com as temperaturas da fonte de íons e da interface mantidas a 300 °C por 15 minutos, enquanto o espectro de massas foi registrado na faixa de 35 a 700 m/z.

Os espectros de infravermelho (IV) foram coletados utilizando um espectrômetro Varian 660 FTIR, equipado com um acessório GladiATR, na faixa de 4000 a 450 cm^{-1} .

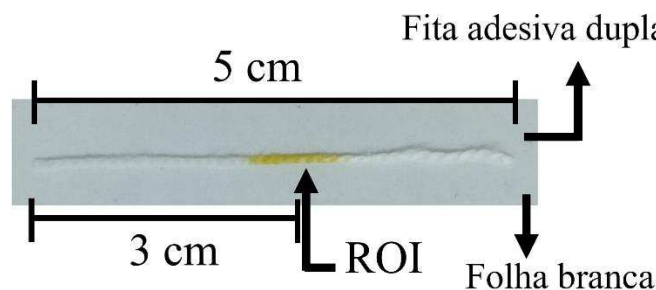
O ponto de fusão foi medido com um dispositivo PF 1500 FARMA (GEHAKA), aplicando uma taxa de aquecimento de 0,5 °C/min.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) para hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) foram obtidos em um espectrômetro Varian Mercury 300 MHz ($B_0 = 7\text{T}$), operando a 300,069 MHz para ^1H e 75,459 MHz para ^{13}C , respectivamente, utilizando DMSO- d_6 como solvente deuterado.

2.6. Detecção de íons de cobalto por μTAD

Seguindo a metodologia descrita por De Oliveira *et al.* [40], um fio de algodão de 5 cm foi fixado em uma fita adesiva dupla face de 6 cm. A região de interesse (ROI), localizada no centro de 3 cm do fio, foi tratada com 0,3 μL de B_2OH (2 g L^{-1}) e 10 μL de CMC (1%). Na extremidade esquerda do fio, foram adicionados 5 μL de tampão pH 8 e 15 μL da amostra contendo íons de cobalto, conforme ilustrado na Figura 70. Um período de secagem de 10 minutos à temperatura ambiente foi realizado após cada aplicação para garantir a estabilidade completa dos reagentes utilizados.

Figura 69. Dispositivo μTAD para detecção de Co^{2+} , composto por uma fita dupla face de 5 cm com uma região de interesse (ROI) de 3 cm onde ocorre a reação colorimétrica.



Fonte: autoria própria.

2.9. Otimização do método

Os parâmetros otimizados para a determinação de cobalto incluíram pH (de 3 a 9), concentração de CMC (de 1% a 3%), volume de CMC (de 0 a 25 μL), volume da amostra (de 5 a 30 μL), concentração de B_2OH (de 0,5 a 2 g L^{-1}) e tempo de reação (de 5 a 60 min).

2.10. Parâmetros analíticos

Com base no método otimizado, foram avaliados os indicadores de mérito, incluindo seletividade, interferência (razão 1:1), curva de calibração, limite de detecção (LD), limite de

quantificação (LQ) e precisão inter- e intra-dia para concentrações de cobalto de 10, 50 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, estudos de recuperação foram realizados utilizando amostras de água mineral e água da torneira, spiked com cobalto em três níveis de concentração (10, 50 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$). Todas as análises foram conduzidas de acordo com os padrões estabelecidos pela ANVISA (2017) [92].

Para o cálculo dos interferentes, foi usada a Equação 1 para determinar o erro relativo. Esse cálculo leva em consideração tanto o sinal do canal B com cobalto e o interferente, quanto o sinal do canal B apenas para cobalto:

$$\text{Erro relativo (\%)} = \frac{B_{\text{Co+interferente}} - B_{\text{Co}}}{B_{\text{Co}}} \times 100 \quad (1)$$

O limite de detecção (LD) foi determinado por 3 vezes o desvio padrão da solução em branco (σ) dividido pela inclinação da curva analítica (S), conforme mostrado na Equação 2. O limite de quantificação (LQ) é calculado pela Equação 3:

$$\text{LD} = \frac{3 \cdot \sigma}{S} \quad (2)$$

$$\text{LQ} = \frac{10 \cdot \sigma}{S} \quad (3)$$

3. RESULTADOS

3.1. Caracterizações

3.1.1. Caracterizações da molécula B-2OH

A molécula B-2OH tem uma massa molar de 314,08 g mol^{-1} , é um sólido verde claro, apresentou um rendimento de 77% na reação e tem uma faixa de fusão entre 187,6 e 188,7 $^{\circ}\text{C}$.

EM m/z (abundância em %): 314 (24, M+.), 120 (100), 65 (92) (Figura 81, anexo III).

FTIR (cm^{-1}): ν max (cm^{-1}): 3138, 2981, 1556, 1278, 953, 743 (Figura 82, anexo III).

RMN de ^1H (300,069 MHz; DMSO-*d*₆, δ DMSO 2,49): δ (integração, multiplicidade, atribuição, constante de acoplamento) 12,02 (1H, sl, $\delta\text{N-H}$); 11,89 (1H, sl, $\delta\text{N-H}$); 11,61 (1H, sl, $\delta\text{O-H}$); 10,03 (1H, sl, $\delta\text{O-H}$); 8,74 (1H, sl, H₂); 8,52 (1H, sl, H₉); 8,06 (1H, sl, H₄); 7,41 (1H, sl, H₁₅); 7,28 (2H, t, H₆ e H₁₃, 7,7 Hz); 6,91 (4H, d, H₅, H₇, H₁₂ e H₁₄, 7,9 Hz) (Figura 83, anexo III).

RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO-*d*6; δ DMSO 39,5): δ (atribuição): 174,4 (C1); 157,1 (C8 e C11); 149,4 (C2 e C9); 141,2 (C6 e C13); 131,5 (C4 e C15); 126,9 (C5 e C14); 119,4 (C7 e C12); 116,4 (C3 e C10). (Figura 84, anexo III).

3.1.2. Caracterização do μ TAD

3.1.2.1. Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier

No espectro de FTIR do fio de algodão (FdA), Figura 71, observam-se números de onda característicos do material, como o estiramento O–H em 3318 cm^{-1} , proveniente da hidroxila da celulose. Também são determinados os estiramentos correspondentes aos grupos C–H, presentes na estrutura, em 2888 cm^{-1} , típicos de cadeias alifáticas, além das deformações do grupo C–H em 1368 cm^{-1} .

Além disso, no número de onda 1634 cm^{-1} , observa-se uma deformação provavelmente proveniente da água absorvida durante o processo de lavagem do fio. Já os números de onda em 1310 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} e 888 cm^{-1} podem ser associados aos estiramentos C–O e C–O–O, presentes na celulose.

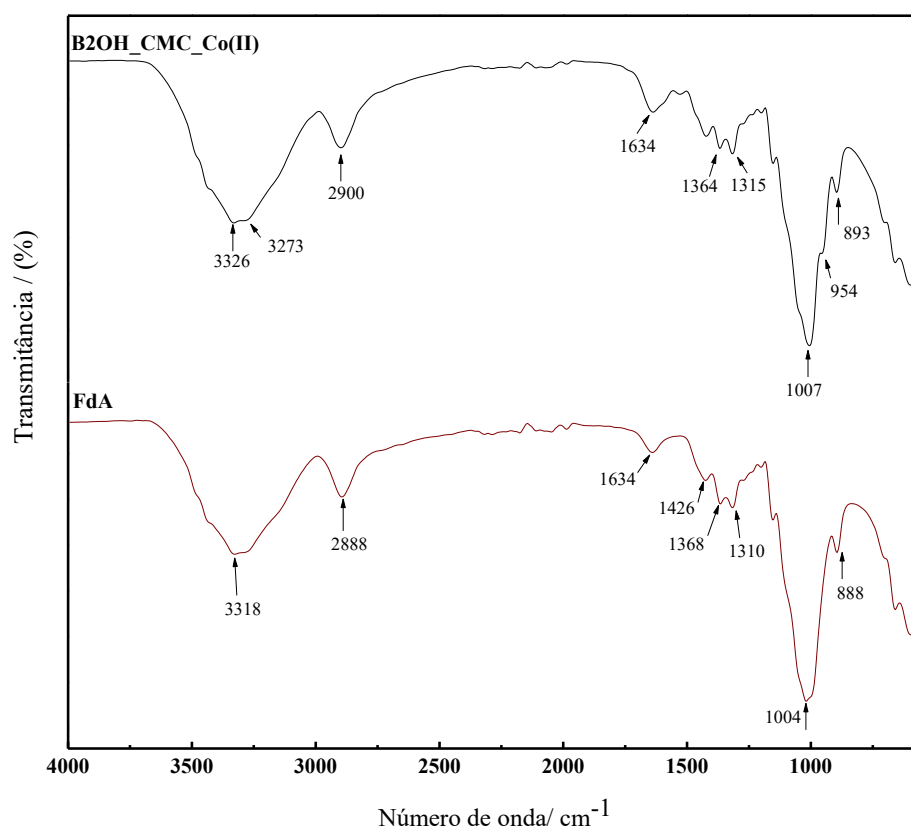
O espectro de FTIR para o fio contendo a molécula, tampão, CMC e cobalto apresentou alguns deslocamentos e números de onda característicos da molécula. As bandas em 3326 cm^{-1} e 1634 cm^{-1} são típicas do estiramento N–H e C=N, presentes em sua estrutura.

Além disso, ocorreu um deslocamento na banda relacionada ao estiramento C–O–C, que se deslocou para 1007 cm^{-1} . O espectro na região IV indica uma incorporação adequada dos reagentes ao fio de algodão, além da possível presença de uma banda característica da inserção de Co(II) na estrutura, representada pela banda em 954 cm^{-1} , que pode estar relacionada às vibrações entre o metal e o ligante.

3.1.2.2. Análise termogravimétrica

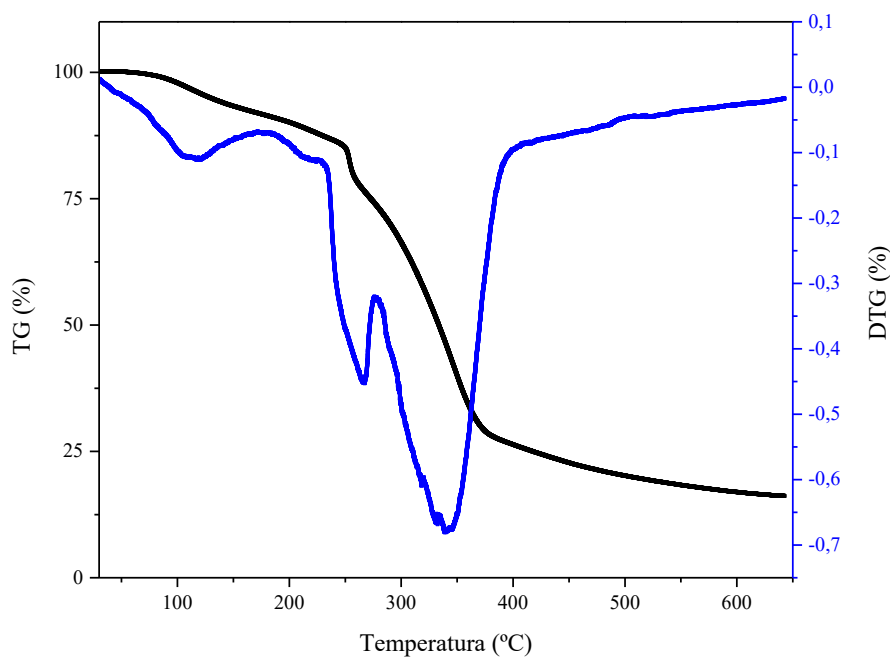
A análise termogravimétrica (Figura 72) revela duas etapas de perda de massa com três eventos de decomposição na faixa de temperatura entre $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $700\text{ }^{\circ}\text{C}$. O primeiro ocorre entre $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $214\text{ }^{\circ}\text{C}$, indicando a perda de moléculas de água, com uma redução de massa de 12,1% [40]. Na segunda etapa, entre $248\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $395\text{ }^{\circ}\text{C}$, há uma perda expressiva de 73,8%, associada à liberação de CO a $340,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, também evidenciada pelo DTG. Acima de $408\text{ }^{\circ}\text{C}$, não há perdas significativas de massa.

Figura 70. Espectro infravermelho para o fio de algodão (FdA) e para o fio contendo a molécula $2,5 \text{ g L}^{-1}$, CMC (1%), tampão pH 8 e Co(II) utilizado para construção do dispositivo μTAD .



Fonte: autoria própria.

Figura 71. Curva de TG e DTG para decomposição térmica do μTAD contendo molécula B2OH, CMC, tampão pH 8 e Cobalto (50 mg L^{-1}).



Fonte: autoria própria.

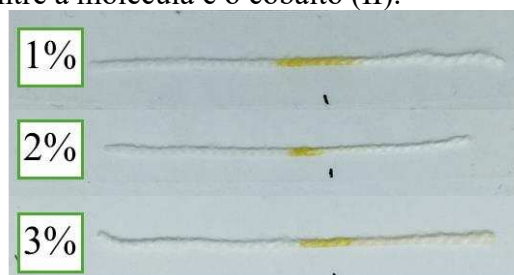
3.2. Otimização do método

3.2.1. Concentração de CMC

A concentração de CMC foi estudada variando de 1% a 3% e analisada qualitativamente. No dispositivo μ TAD, 0,3 μ L de B-2OH e 10 μ L de CMC foram adicionados à ROI, juntamente com 5 μ L de tampão de pH 8 e 15 μ L de cobalto (73 mg L^{-1}) na extremidade esquerda. Após um tempo de reação de 10 minutos, as imagens foram capturadas.

Como mostrado na Figura 73, na concentração de 3%, a barreira que deveria ter sido formada pelo CMC foi quebrada, fazendo com que a amostra fosse arrastada ao longo do fio. Essa ruptura pode ser associada ao aumento da viscosidade na ROI, o que dificulta a formação de uma barreira adsorvente para a formação localizada do complexo. Na concentração de 2%, a concentração foi insuficiente, resultando em uma ROI reduzida. Em contraste, a concentração de 1% de CMC mostrou a melhor resposta, pois a ROI permaneceu uniforme e a barreira não foi quebrada.

Figura 72. Estudo da concentração de CMC para a formação de uma barreira adsorvente para a formação do complexo entre a molécula e o cobalto (II).



Fonte: autoria própria.

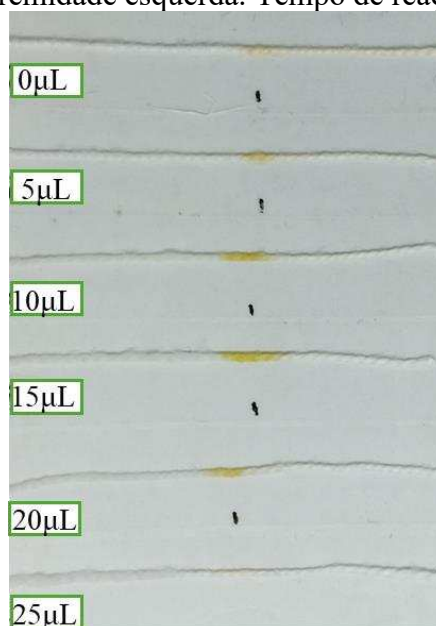
3.2.2. Volume de CMC

O volume de CMC foi estudado variando de 0 a 25 μ L, conforme mostrado na Figura 74. Qualitativamente, observa-se que a adição de CMC é significativa, pois na ausência de CMC não é formada nenhuma barreira para a reação ocorrer na ROI, como visto quando o volume de CMC é zero. No entanto, volumes baixos (5 μ L) também são ineficazes, pois formam uma barreira fraca, permitindo que a amostra passe.

Quando 10 μ L de CMC são usados, uma ROI bem definida é formada, e a intensidade do canal B é reduzida, conforme observado na análise quantitativa. Com 15 μ L, a ROI permanece bem definida, mas com uma área maior. Para volumes superiores a 15 μ L, uma barreira bem definida não é formada, chegando até a causar o deslocamento da ROI para a

esquerda. Considerando esses fatores e a intensidade do canal B observada para cada volume, o volume de 10 μL apresentou a melhor resposta, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, com a menor intensidade do canal B. O canal B é a cor complementar da cor amarela; portanto, esse canal deve ser mais sensível à análise de cobalto utilizando DIB [83,95–97].

Figura 73. Avaliação do volume de CMC. Parâmetros analíticos: 0,3 μL de B-2OH e volume variável de CMC foram adicionados à ROI, juntamente com 5 μL de tampão de pH 8 e 15 μL de Cobalto (73 mg L^{-1}) na extremidade esquerda. Tempo de reação: 10 min.



Fonte: autoria própria.

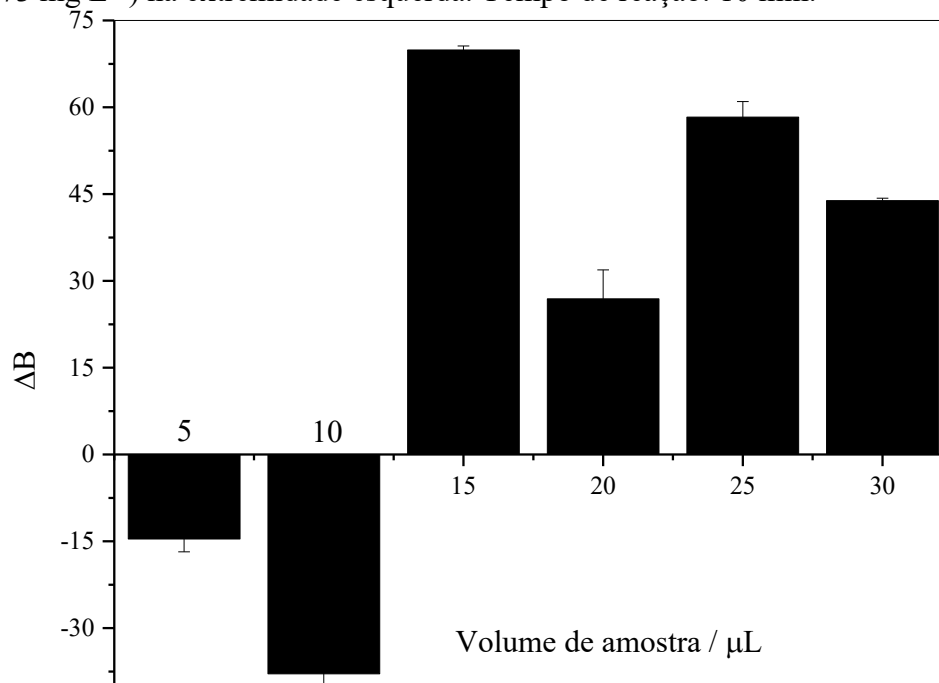
3.2.3. Volume de amostra

O volume da amostra foi avaliado na faixa de 5 a 30 μL , analisando a intensidade do canal B da amostra em comparação com o branco (B_0). A Figura 75 ilustra a relação entre o volume da amostra e o ΔB ($B_0 - B$), sendo que um alto ΔB é necessário.

Entre os volumes testados, 15 μL e 25 μL apresentaram as melhores respostas analíticas. No entanto, considerando a redução no consumo de reagentes, o volume de 15 μL foi selecionado para estudos subsequentes. Observou-se que volumes menores que 15 μL foram insuficientes para atingir a ROI, tornando a reação colorimétrica indetectável. Por outro lado, volumes maiores fizeram com que a barreira falhasse em concentrar o analito na ROI, fazendo com que parte da amostra fosse arrastada para a extremidade direita do dispositivo. Notou-se

que para volumes menores de amostra, ΔB negativos foram obtidos, confirmando a não detecção do cobalto.

Figura 74. Estudo do volume da amostra. Parâmetros analíticos: 0,3 μL de B-2OH e 10 μL de CMC foram adicionados à ROI, juntamente com 5 μL de tampão de pH 8 e volume variável de Cobalto (73 mg L^{-1}) na extremidade esquerda. Tempo de reação: 10 min.



Fonte: autoria própria.

3.2.4. Estudo da concentração da molécula B-2OH

A concentração da molécula *bis*-tiocarbazida B-2OH foi avaliada na faixa de 0,5 a 2 g L^{-1} , analisando a diferença entre o canal B contendo cobalto e o canal B do branco (B_0). Como mostrado na Figura 76, não foi observada uma relação direta entre a concentração da molécula e a resposta analítica. No entanto, a concentração de 2 g L^{-1} apresentou a melhor resposta analítica, exibindo um maior ΔB , e foi, portanto, selecionada para estudos subsequentes.

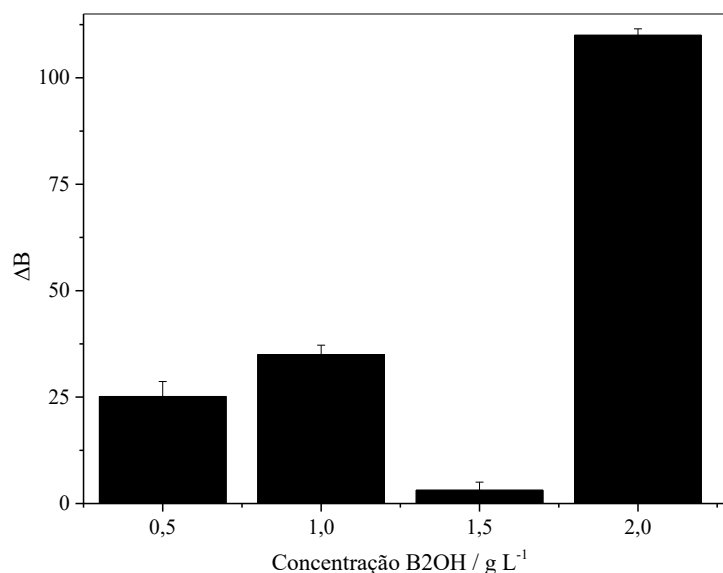
3.2.5. Estudo do tempo de reação

O tempo de reação foi avaliado em uma faixa de 5 a 60 min, com imagens capturadas a cada 5 min. Como nos outros estudos, o objetivo foi determinar a maior diferença entre B e B_0 . A Figura 77 apresenta os resultados, destacando 10 min como o tempo de reação que proporcionou a melhor resposta analítica, sendo um dos pontos com a maior diferença.

À medida que o tempo de reação aumentou, foram observadas flutuações mínimas em ΔB , indicando um possível equilíbrio. Portanto, 10 min foi selecionado para estudos

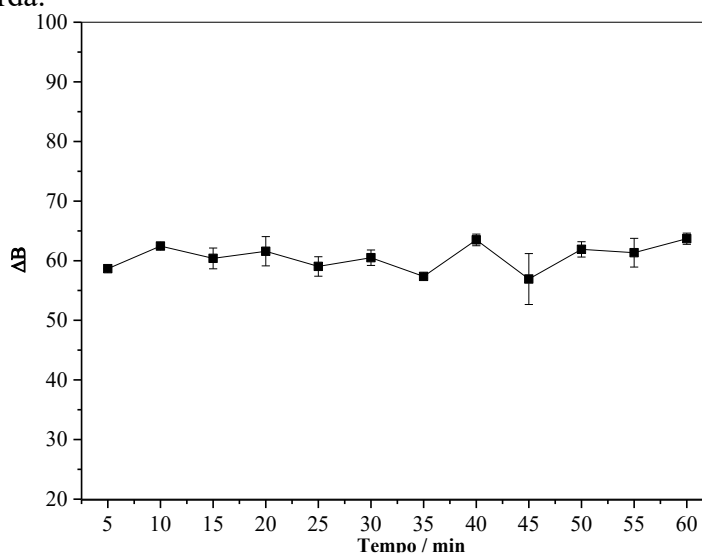
subsequentes, pois é mais eficiente e adequado para análises mais rápidas, sem comprometer a qualidade dos resultados.

Figura 75. Efeito da concentração do ligante. Parâmetros analíticos: 0,3 μL de B-2OH (concentração variável em g L^{-1}) e 10 μL de CMC foram adicionados à ROI, juntamente com 5 μL de tampão de pH 8 e 15 μL da solução de cobalto (73 mg L^{-1}) na extremidade esquerda. Tempo de reação: 10 min.



Fonte: autoria própria.

Figura 76. Estudo do tempo de reação entre a molécula de *Bis*-tiocarbazida e cobalto. Parâmetros analíticos: 0,3 μL de B-2OH (2 g L^{-1}) e 10 μL de CMC (1%) foram adicionados à ROI, juntamente com 5 μL de tampão de pH 8 e 15 μL de solução de cobalto (73 mg L^{-1}) na extremidade esquerda.



Fonte: autoria própria.

3.3. Parâmetros analíticos

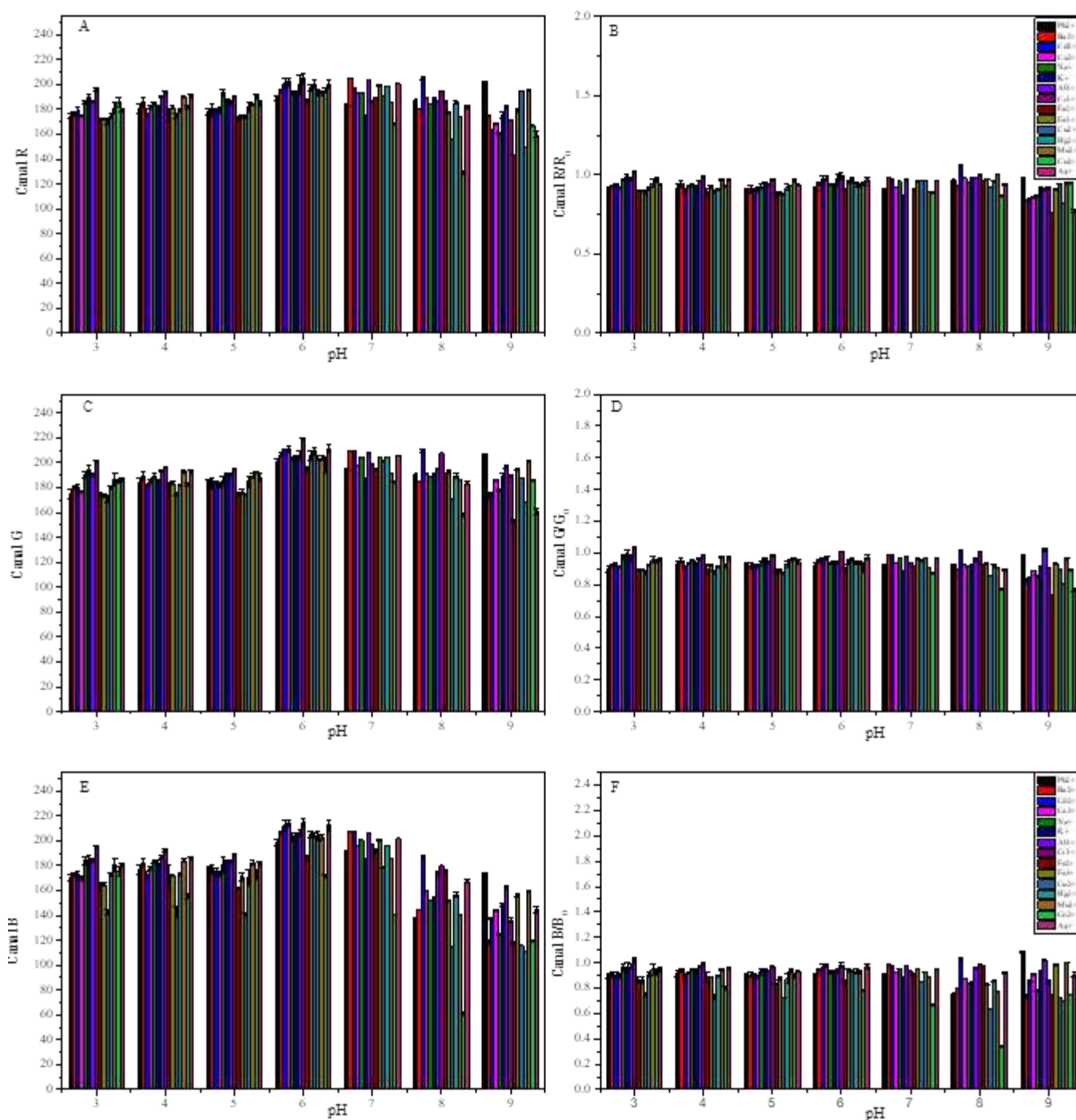
3.3.1. Seletividade

Com base nos valores observados nos blanks para cada pH, o comportamento do cobalto no pH 8 no canal B e a razão B/B_0 se destacaram. O valor do branco neste canal e pH foi 182, enquanto o valor correspondente para o cobalto foi 61. Isso representa uma redução de intensidade de aproximadamente 3 vezes, Figura 78E – 78F.

Nos canais R e G (Figura 78A – 178), nenhum metal se destacou. A diferença entre os íons metálicos foi pequena e, quando comparada com o valor do branco, não foi muito significativa, o que sugere a ausência de interferentes no método.

Com esses resultados, pode-se concluir que o cobalto apresentou uma diminuição significativa na intensidade no pH 8 no canal B e na razão B/B_0 , destacando-se em relação aos outros metais avaliados. Portanto, o cobalto é o metal mais promissor para a continuidade dos estudos, particularmente com o tratamento de imagens sendo realizado no *software ImageJ*.

Figura 77. Estudo da seletividade do μ TAD para a determinação de metais, Canal R (A), R/Ro (B), Canal G (C), G/Go (D), Canal R (E) e R/Ro (F). Parâmetros analíticos: 0,3 μ L de B-2OH (2 g L^{-1}) e 10 μ L de CMC (1%) foram adicionados à ROI, juntamente com 5 μ L de tampão de pH 8 e 15 μ L do íon metálico ($1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na extremidade esquerda. Tempo de reação: 10 min



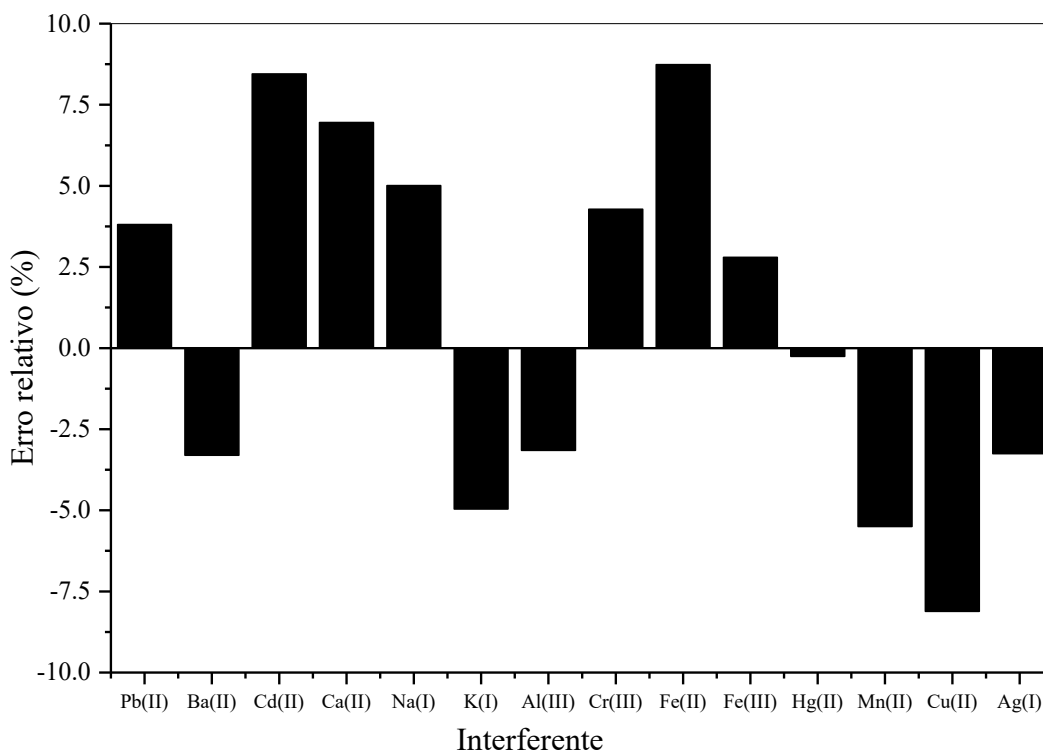
Fonte: autoria própria.

3.3.2. Interferência

Soluções contendo os íons metálicos (Pb^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Na^+ , K^+ , Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , e Ag^+) e cobalto foram preparadas em uma proporção molar de 1:1 com concentração de $6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os dispositivos μTAD foram preparados em triplicata para cada íon/cobalto e para o branco. Com base na Equação 1, a porcentagem relativa para cada um foi calculada, conforme mostrado na Figura 79.

Na Figura 78, o íon de cobre não apresenta sinal de possível interferente quando analisado isoladamente. No entanto, na presença de Co^{2+} , observa-se uma redução no sinal do canal estudado, evidenciando uma possível interferência entre os íons, conforme indicado na Figura 79.

Figura 78. Estudo dos potenciais interferentes no μTAD para a determinação de cobalto. Parâmetros analíticos: 0,3 μL de B-2OH (2 g L^{-1}), 10 μL de CMC (1%), 5 μL de tampão de pH 8 e 15 μL da solução contendo cobalto e o interferente ($6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Tempo de reação: 10 min. (n = 3)



Fonte: autoria própria.

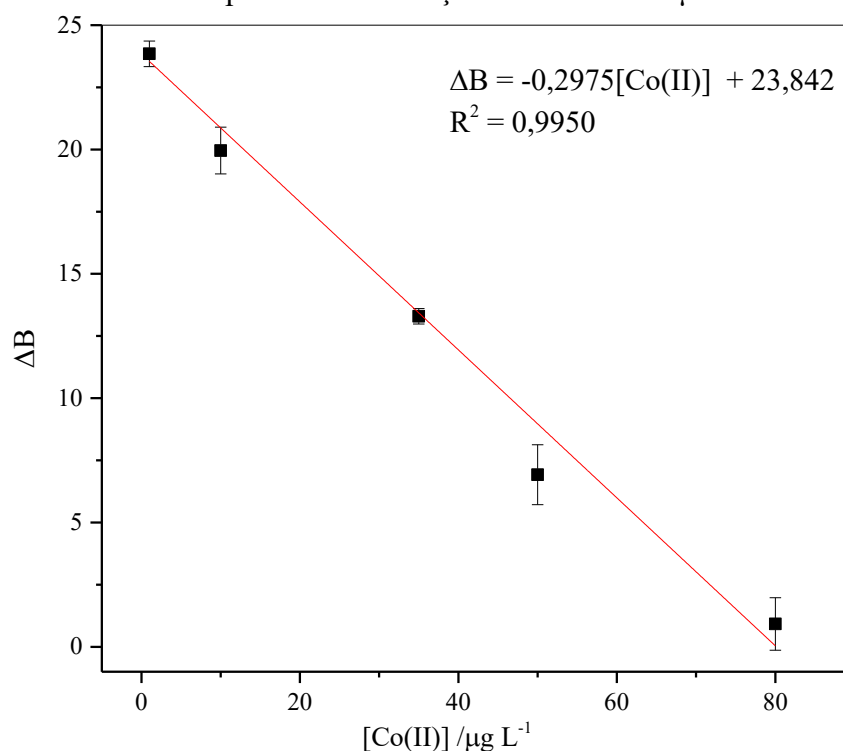
De acordo com a Figura 78, o íon cádmio deveria atuar como um potencial interferente. No entanto, o erro relativo observado ficou abaixo de 10%, Figura 79, indicando que, mesmo em altas concentrações desse íon, é possível determinar com precisão a concentração de íons cobalto. Além disso, o erro relativo variou de -5,49% para Mn(II) a 8,74% para Fe(II),

demonstrando que, apesar de pequenas variações, os resultados estão dentro dos padrões estabelecidos pela AOAC [98] de $\pm 10\%$. Assim, o método proposto é viável para a análise de amostras contendo esses íons.

3.3.3. Linearidade

Para esta análise, soluções foram preparadas na faixa de trabalho de 1 a 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir de uma solução padrão de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. A curva analítica é mostrada na Figura 80, relacionando a concentração do íon cobalto à resposta analítica, expressa como $\Delta B = B_0 - B$, onde B_0 é o valor do branco e B é o valor da amostra contendo cobalto. A equação de regressão linear obtida foi $\Delta B = -0,2975 [\text{Co(II)}] + 23,842$, com um coeficiente de correlação $R = 0,9981$ e um coeficiente de determinação $R^2 = 0,9950$. Com base nas Equações 2 e 3 apresentadas acima, é possível determinar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método, considerando o desvio padrão da resposta analítica do branco com $n = 10$. Assim, o método de determinação de cobalto apresentou um LD de 0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$ e um LQ de 0,94 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 79. Curva analítica obtida para a determinação de cobalto via $\mu\text{TAD DIB}$.



Fonte: autoria própria.

3.3.4. Precisão

Para avaliar a precisão do método, testes de repetibilidade ($n = 10$) foram realizados em três níveis de concentração (10, 50 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$). A partir desses testes, foi calculada a desvio padrão relativo (%RSD), conforme mostrado na Tabela 17. Os resultados indicam que a precisão intradia (2 dias) e interdia (6 horas) variou de 2,21% a 3,34%, demonstrando a consistência dos resultados obtidos.

Tabela 17. Desvio padrão relativo em três níveis de concentração ($n = 10$) para a determinação de cobalto.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% RSD	
	Intradia	Interdia
10	2,96	3,25
50	3,17	2,53
80	3,34	2,21

Fonte: autoria própria.

3.3.5. Recuperação

A precisão do método foi avaliada por meio de testes de recuperação realizados com duas amostras de água: água destilada do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, localizada em Viçosa, Minas Gerais, Brasil, e água da torneira do Departamento de Química da mesma instituição. A recuperação foi realizada em três níveis de concentração para ambas as amostras, e as porcentagens de recuperação obtidas estão mostradas na Tabela 18.

Com base nos resultados apresentados, observou-se que a recuperação variou de 85% a 110%, indicando uma boa determinação de cobalto nas amostras. Além disso, o coeficiente de variação variou de 2,20% a 9,5% em todas as concentrações, com valores abaixo de 10%, demonstrando que os resultados apresentaram boa precisão.

Tabela 18. Recuperação de cobalto em amostras de água ($n = 3$) utilizando o método $\mu\text{TAD DIB}$.

Amostra	Add $\mu\text{g L}^{-1}$	Encontrado $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperado %	Coefficiente de Variação %
Água destilada	10,00	10,20 \pm 0,97	102	9,50
	50,00	49,96 \pm 2,08	100	4,20
	80,00	75,40 \pm 1,70	94	2,20
Água de torneira	10,00	8,50 \pm 0,37	85	4,40
	50,00	55,30 \pm 3,90	110	7,00

80,00	73,12 ± 3,85	91	5,30
-------	--------------	----	------

Add: concentração adicionada. **Fonte:** autoria própria.

3.4. Comparação do método proposto com outros métodos da literatura.

Com base nos estudos publicados na literatura, foi criada a Tabela 19, apresentando uma comparação entre os métodos relatados anteriormente e o método desenvolvido. Além disso, a tabela inclui informações sobre o tipo de amostra analisada, a faixa de trabalho linear e o limite de detecção determinado por cada método.

A tabela apresenta métodos estabelecidos na literatura, que se destacam pela alta sensibilidade devido aos limites de detecção baixos, mas possuem faixas de trabalho mais estreitas e requerem etapas de preparação de amostras, como extrações, para pré-concentrar a amostra. Métodos como PV-IS-DLLME-DIC e FAAS são eficazes para amostras com menores concentrações de cobalto.

Em contraste, o método proposto μ TAD-DIB se destaca pela boa faixa linear, tornando-se uma abordagem mais flexível. Esse método permite a análise de amostras em diferentes concentrações de cobalto sem a necessidade de processos complexos de preparação de amostras. Assim, o μ TAD-DIB oferece vantagens em termos de versatilidade e simplicidade, especialmente para a determinação das concentrações de cobalto.

Tabela 19. Tabela comparativa de desempenho analítico do sensor construído para detecção de cobalto.

Método de detecção Técnica de extração e detecção	Amostra	Faixa Linear ^a	LD ^a	Ref.
μ TAD-DIB	Água de torneira	25 - 600	6,5	[13]
Espectrofotométrico	Água	8 - 80	-	[99]
PV-IS-DLLME ^b - DIC	Alimento	3,27–100,00	1,14	[100]
FAAS ^c	Água	5,0 –350,0	1,2	[101]
LLME ^d - DIC	Vitamina B ₁₂	0 – 50,00	0,9	[102]
DIC	Ambiental	10 - 200	4,1	[103]
μ TAD - DIB	Água	1 - 80	0,3	Este trab.

^a μgL^{-1} ; ^bExtração líquida-líquida dispersiva por variação de pressão em uma seringa; ^c Espectrometria de Absorção Atômica em Chama; ^d Extração líquida-líquida dispersiva; DIC: Colorimetria de Imagem Digital; LD: limite de detecção. Ref.: referências. **Fonte:** autoria própria a partir das referências citadas.

As amostras de água deionizada e água de torneira foram analisadas em três níveis de concentração (10, 50 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$), utilizando a FAAS como método de referência e o μTAD – DIB como método proposto.

As taxas de recuperação variaram entre 86% e 116% para o método de referência, enquanto para o método proposto ficaram entre 85% e 110%. Já os coeficientes de variação do método de referência oscilaram entre 0,41% e 1,21%, indicando boa exatidão. A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos para ambos os métodos, onde se observam erros relativos superiores a 10% em algumas amostras, como a água deionizada no primeiro nível de concentração e a água de torneira no terceiro nível. Apesar disso, a maioria das amostras apresentou erro relativo inferior a 10%. Essa variação pode estar associada à magnitude do valor de referência, já que foram encontradas concentrações um pouco acima ou abaixo da esperada, o que acabou ampliando o erro relativo entre os métodos.

Com o auxílio do *software GraphPad Prism*, foi possível avaliar a correlação entre os métodos por meio dos testes t e F pareados, considerando um nível de significância de 95% ($n = 3$) e um valor de p de referência de 0,005. Os dados apresentados na Tabela 20 mostram que os valores calculados ficaram abaixo dos valores críticos tanto no teste t quanto no teste F. Assim, os resultados indicam que os métodos não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si.

Tabela 20. Determinação de cobalto utilizando o método proposto e o método de referência.

Amostra	Add / $\mu\text{g L}^{-1}$	Método		Erro Relativo / %	Test t	t_c^a	Test F	F_c^b
		FAAS / $\mu\text{g L}^{-1}$	DIB / $\mu\text{g L}^{-1}$					
Água destilada	10,0	8,6 \pm 0,06	10,2 \pm 0,97	18,6	1,944 p- valor: 0,0687	2,110	2,218 P- valor: 0,1673	2,980
	50,0	48,1 \pm 0,24	49,7 \pm 2,08	3,94				
	80,0	77,3 \pm 0,90	75,4 \pm 1,70	5,40				
Água de torneira	10,0	8,6 \pm 0,10	8,5 \pm 0,37	1,94	1,944 p- valor: 0,0687	2,110	2,218 P- valor: 0,1673	2,980
	50,0	58,2 \pm 0,37	55,3 \pm 3,90	2,71				
	80,0	88,3 \pm 0,73	73,1 \pm 3,85	14,6				

^a – T crítico ^b – F crítico. Add.: adicionado **Fonte:** autoria própria.

Assim, o método μTAD – DIB proposto se revela um recurso versátil, com baixo volume de amostra, baixo custo e um bom intervalo linear de trabalho, sem a necessidade de preparo de amostra, como no caso da leitura pelo FAAS. Isso torna o método uma alternativa

eficiente para a determinação de cobalto em baixas concentrações, além de oferecer flexibilidade quanto aos tipos de amostras analisadas.

4. CONCLUSÃO

Este estudo propôs um método prático, rápido e eficiente para detectar Co^{2+} em amostras de água, utilizando uma abordagem microfluídica colorimétrica com fibras de algodão e análise de imagem digital, utilizando um smartphone e software gratuito. O uso de uma caixa dedicada possibilita a análise em campo, exigindo apenas uma fonte de energia para garantir a qualidade consistente da imagem. Os resultados mostraram que a síntese da molécula B-2OH foi eficiente, utilizando poucos reagentes e tendo um impacto ambiental positivo.

Além disso, a molécula se mostrou eficaz como sensor colorimétrico quando incorporada com CMC para detecção de Co^{2+} , como evidenciado pelas caracterizações realizadas. Após otimizações, o método foi validado, apresentando uma curva analítica de $\Delta B = -0,2975 [\text{Co(II)}] + 23,842$, $R^2 = 0,9950$, juntamente com a determinação do limite de quantificação, limite de detecção, precisão e recuperação em três níveis de concentração. Os resultados foram promissores, especialmente com um tempo de reação de apenas 10 min, o que melhora a frequência analítica do método. Estudos de seletividade e interferência mostraram impacto mínimo de outros íons metálicos que poderiam interferir na amostra, confirmando a robustez do método. Assim, o método $\mu\text{TAD DIB}$ se mostrou confiável, preciso, versátil e eficiente para análise de determinação de Co^{2+} , sendo também adequado para regiões com recursos limitados.

REFERÊNCIAS

1. Yuan, F.; Shao, Y.-C.; Wang, B.; Wu, Y.-S.; Zhang, D.; Li, Z.-J.; Wu, Y.A. Recent Progress in Application of Cobalt-Based Compounds as Anode Materials for High-Performance Potassium-Ion Batteries. *Rare Met.* **2022**, *41*, 3301–3321, doi:10.1007/s12598-022-02052-8.
2. Wang, S. Cobalt—Its Recovery, Recycling, and Application. *JOM* **2006**, *58*, 47–50, doi:10.1007/s11837-006-0201-y.
3. Yang, L.; Zhu, Q.; Yang, K.; Xu, X.; Huang, J.; Chen, H.; Wang, H. A Review on the Application of Cobalt-Based Nanomaterials in Supercapacitors. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 4065, doi:10.3390/nano12224065.
4. Lison, D. Cobalt. In *Handbook on the Toxicology of Metals*; Elsevier, 2022; pp. 221–242.
5. Genchi, G.; Lauria, G.; Catalano, A.; Carocci, A.; Sinicropi, M.S. Prevalence of Cobalt in the Environment and Its Role in Biological Processes. *Biology (Basel)*. **2023**, *12*, 1335, doi:10.3390/biology12101335.
6. Osman, D.; Cooke, A.; Young, T.R.; Deery, E.; Robinson, N.J.; Warren, M.J. The Requirement for Cobalt in Vitamin B12: A Paradigm for Protein Metalation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2021**, *1868*, 118896, doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118896.
7. Klasson, M.; Bryngelsson, I.-L.; Pettersson, C.; Husby, B.; Arvidsson, H.; Westberg, H. Occupational Exposure to Cobalt and Tungsten in the Swedish Hard Metal Industry: Air Concentrations of Particle Mass, Number, and Surface Area. *Ann. Occup. Hyg.* **2016**, *60*, 684–699, doi:10.1093/annhyg/mew023.
8. Mahey, S.; Kumar, R.; Sharma, M.; Kumar, V.; Bhardwaj, R. A Critical Review on Toxicity of Cobalt and Its Bioremediation Strategies. *SN Appl. Sci.* **2020**, *2*, 1279, doi:10.1007/s42452-020-3020-9.
9. Kettelarij, J.; Midander, K.; Lidén, C.; Julander, A. Contamination of Skin and Surfaces by Cobalt in the Hard Metal Industry. *Contact Dermatitis* **2018**, *79*, 226–231, doi:10.1111/cod.13056.
10. Amiri, S.; Shokrollahi, H. The Role of Cobalt Ferrite Magnetic Nanoparticles in Medical Science. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 1–8, doi:10.1016/j.msec.2012.09.003.
11. Leysens, L.; Vinck, B.; Van Der Straeten, C.; Wuyts, F.; Maes, L. Cobalt Toxicity in Humans—A Review of the Potential Sources and Systemic Health Effects. *Toxicology* **2017**, *387*, 43–56, doi:10.1016/j.tox.2017.05.015.

12. Paustenbach, D.J.; Tvermoes, B.E.; Unice, K.M.; Finley, B.L.; Kerger, B.D. A Review of the Health Hazards Posed by Cobalt. *Crit. Rev. Toxicol.* **2013**, *43*, 316–362, doi:10.3109/10408444.2013.779633.
13. Suarez, W.T.; Franco, M.O.K.; Capitán-Vallvey, L.F.; Erenas, M.M. Chitosan-Modified Cotton Thread for the Preconcentration and Colorimetric Trace Determination of Co(II). *Microchem. J.* **2020**, *158*, 105137, doi:https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105137.
14. Wang, Z.; Luo, P.; Zha, X.; Xu, C.; Kang, S.; Zhou, M.; Nover, D.; Wang, Y. Overview Assessment of Risk Evaluation and Treatment Technologies for Heavy Metal Pollution of Water and Soil. *J. Clean. Prod.* **2022**, 134043, doi:10.1016/j.jclepro.2022.134043.
15. Poznanović Spahić, M.M.; Sakan, S.M.; Glavaš-Trbić, B.M.; Tančić, P.I.; Škrivanj, S.B.; Kovačević, J.R.; Manojlović, D.D. Natural and Anthropogenic Sources of Chromium, Nickel and Cobalt in Soils Impacted by Agricultural and Industrial Activity (Vojvodina, Serbia). *J. Environ. Sci. Heal. Part A* **2019**, *54*, 219–230, doi:10.1080/10934529.2018.1544802.
16. Melchor-Martínez, E.M.; Macias-Garbett, R.; Malacara-Becerra, A.; Iqbal, H.M.N.; Sosa-Hernández, J.E.; Parra-Saldívar, R. Environmental Impact of Emerging Contaminants from Battery Waste: A Mini Review. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* **2021**, *3*, 100104, doi:10.1016/j.cscee.2021.100104.
17. Cheyns, K.; Banza Lubaba Nkulu, C.; Ngombe, L.K.; Asosa, J.N.; Haufroid, V.; De Putter, T.; Nawrot, T.; Kimpanga, C.M.; Numbi, O.L.; Ilunga, B.K.; et al. Pathways of Human Exposure to Cobalt in Katanga, a Mining Area of the D.R. Congo. *Sci. Total Environ.* **2014**, *490*, 313–321, doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.014.
18. Earl, C.; Shah, I.H.; Cook, S.; Cheeseman, C.R. Environmental Sustainability and Supply Resilience of Cobalt. *Sustainability* **2022**, *14*, 4124, doi:10.3390/su14074124.
19. Gál, J.; Hursthouse, A.; Tatner, P.; Stewart, F.; Welton, R. Cobalt and Secondary Poisoning in the Terrestrial Food Chain: Data Review and Research Gaps to Support Risk Assessment. *Environ. Int.* **2008**, *34*, 821–838, doi:10.1016/j.envint.2007.10.006.
20. Marinho Reis, A.P. Exposure to Cobalt Metal (without Tungsten Carbide) and Some Cobalt Compounds: A Literature Review. *J. UMinho Sci.* **2024**, *3*, doi:10.21814/jus.5230.
21. Danzeisen, R.; Williams, D.L.; Viegas, V.; Dourson, M.; Verberckmoes, S.; Burzloff, A. Bioelution, Bioavailability, and Toxicity of Cobalt Compounds Correlate. *Toxicol. Sci.* **2020**, *174*, 311–325, doi:10.1093/toxsci/kfz249.

22. *Ministério Do Meio Ambiente Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de Março de 2005;* Brazil, 2005; pp. 58–63;.
23. Above, F.; Guidelines, H. Health Concerns for Cobalt. **2025**, 14–17.
24. Ahmed, M.J.; Uddin, M.N. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Cobalt in Industrial, Environmental, Biological and Soil Samples Using Bis(Salicylaldehyde)Orthophenylenediamine. *Chemosphere* **2007**, *67*, 2020–2027, doi:10.1016/j.chemosphere.2006.11.020.
25. Gomes Teixeira, L.S.; Costa, A.C.S.; Assis, J.C.R.; Ferreira, S.L.C.; Korn, M. Solid Phase Spectrophotometry for the Determination of Cobalt in Pharmaceutical Preparations. *Microchim. Acta* **2001**, *137*, 29–33, doi:10.1007/s006040170024.
26. Säbel, C.E.; Neureuther, J.M.; Siemann, S. A Spectrophotometric Method for the Determination of Zinc, Copper, and Cobalt Ions in Metalloproteins Using Zincon. *Anal. Biochem.* **2010**, *397*, 218–226, doi:10.1016/j.ab.2009.10.037.
27. Shegefti, S.; Mehdinia, A.; Shemirani, F. Preconcentration of Cobalt(II) Using Polythionine-Coated Fe₃O₄ Nanocomposite Prior Its Determination by AAS. *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 1963–1970, doi:10.1007/s00604-016-1837-0.
28. Eskandari, H.; Hassan, G.; Karkaragh, I.; Saghseloo, A.G.; Dehaghi, G.B. Spectrophotometric and AAS Determination of Trace Amounts of Cobalt after Preconcentration by Using α -Benzilmonoxime-Microcrystalline Naphthalene. *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 1227–1230, doi:10.2116/analsci.20.1227.
29. Jaganathan, J.; Aggarwal, I. Determination of Iron, Cobalt, Nickel, and Copper in Hafnium Fluoride by GF-AAS. *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 190–191, doi:10.1366/0003702934048217.
30. Cerutti, S.; Orsi, R.F.; Kaplan, M.; Gásquez, J.A.; Olsina, R.A.; Martinez, L.D. On-Line Preconcentration System for Cobalt Determination in Bee Honey Using Flow Injection-Flame AAS. *Instrum. Sci. Technol.* **2004**, *32*, 401–412, doi:10.1081/CI-120037672.
31. Zhu, T.; Ding, X.; Kusimba, C.M.; Feng, Z. Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy (LA-ICP-MS) to Determine the Provenance of the Cobalt Pigment of Qinghua Porcelain from Jingdezhen in Yuan Dynasty of China (1271–1368AD). *Ceram. Int.* **2015**, *41*, 9878–9884, doi:10.1016/j.ceramint.2015.04.064.
32. Martín-Cameán, A.; Jos, A.; Calleja, A.; Gil, F.; Iglesias-Linares, A.; Solano, E.; Cameán, A.M. Development and Validation of an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) Method for the Determination of Cobalt, Chromium, Copper

- and Nickel in Oral Mucosa Cells. *Microchem. J.* **2014**, *114*, 73–79, doi:10.1016/j.microc.2013.12.009.
33. Lidén, C.; Skare, L.; Lind, B.; Nise, G.; Vahter, M. Assessment of Skin Exposure to Nickel, Chromium and Cobalt by Acid Wipe Sampling and ICP-MS. *Contact Dermatitis* **2006**, *54*, 233–238, doi:10.1111/j.0105-1873.2006.00736.x.
34. Acevedo, M.S.M.S.F.; Lima, M.J.A.; Nascimento, C.F.; Rocha, F.R.P. A Green and Cost-Effective Procedure for Determination of Anionic Surfactants in Milk with Liquid-Liquid Microextraction and Smartphone-Based Photometric Detection. *Microchem. J.* **2018**, *143*, 259–263, doi:10.1016/j.microc.2018.08.002.
35. Silva, A.F.S.; Gonçalves, I.C.; Rocha, F.R.P. Smartphone-Based Digital Images as a Novel Approach to Determine Formaldehyde as a Milk Adulterant. *Food Control* **2021**, *125*, 1–7, doi:10.1016/j.foodcont.2021.107956.
36. Steiner, M.-S.; Meier, R.J.; Duerkop, A.; Wolfbeis, O.S. Chromogenic Sensing of Biogenic Amines Using a Chameleon Probe and the Red–Green–Blue Readout of Digital Camera Images. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8402–8405, doi:10.1021/ac102029j.
37. Santos, V.B. dos; Campos, E.F.S.; de Almeida, J.P.B.; Suarez, W.T.; Oliveira, C.R.S.; de Oliveira, S.C.B. Fluorescence Digital Image-Based Method to Measure Biogenic Amines in Buffalo Mozzarella and Other Cheeses Produced in Brazil. *Microchem. J.* **2023**, *189*, doi:10.1016/j.microc.2023.108508.
38. Valentin Maia, M.; Toito Suarez, W.; Bezerra dos Santos, V.; Paulo Barbosa de Almeida, J. Carbon Dots on Paper for Determination of Cu²⁺ in Sugar Cane Spirits Samples for Fluorescence Digital Image-Based Method. *Microchem. J.* **2022**, *179*, 107500, doi:10.1016/j.microc.2022.107500.
39. de O.K. Franco, M.; Cardoso, W.J.; Vilanculo, C.B.; dos Santos, V.B.; de Almeida, J.P.B.; Capitán-Vallvey, L.F.; Suarez, W.T. Using a Biphasic System and Digital Imaging Analysis with Chemometric Tools for Simultaneous Determination of Cu²⁺ and Furfural in Cachaça. *Anal. Methods* **2023**, *15*, 2300–2308, doi:10.1039/D3AY00311F.
40. de Oliveira, J.L.; Toito Suarez, W.; Dos Santos, V.B.; da Silva, L.P.; Capitán-Vallvey, L.F. Using a Cotton Thread-Based Colorimetric Sensor Modified by Carboxymethylcellulose and Cuprizone with Smartphone Detection for Quantification of Copper. *Anal. Methods* **2023**, *15*, 5683–5691, doi:10.1039/d3ay01541f.
41. Yen, Y.-T.; Lin, Y.-S.; Chen, T.-Y.; Chyueh, S.-C.; Chang, H.-T. Carbon Dots Functionalized Papers for High-Throughput Sensing of 4-Chloroethcathinone and Its

- Analogues in Crime Sites. *R. Soc. open Sci.* **2019**, *6*, 191017, doi:10.1098/rsos.191017.
42. Kathiravan, A.; Gowri, A.; Srinivasan, V.; Smith, T.A.; Ashokkumar, M.; Asha Jhonsi, M. A Simple and Ubiquitous Device for Picric Acid Detection in Latent Fingerprints Using Carbon Dots. *Analyst* **2020**, *145*, 4532–4539, doi:10.1039/D0AN00750A.
 43. Santonocito, R.; Tuccitto, N.; Cantaro, V.; Carbonaro, A.B.; Pappalardo, A.; Greco, V.; Buccilli, V.; Maida, P.; Zavattaro, D.; Sfuncia, G.; et al. Smartphone-Assisted Sensing of Trinitrotoluene by Optical Array. *ACS Omega* **2022**, *7*, 37122–37132, doi:10.1021/acsomega.2c02958.
 44. dos Santos, V.B.; da Silva, E.K.N.; de Oliveira, L.M.A.; Suarez, W.T. Low Cost in Situ Digital Image Method, Based on Spot Testing and Smartphone Images, for Determination of Ascorbic Acid in Brazilian Amazon Native and Exotic Fruits. *Food Chem.* **2019**, *285*, 340–346, doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.167.
 45. de Oliveira, L.M.A.; dos Santos, V.B.; da Silva, E.K.N.; Lopes, A.S.; Dantas-Filho, H.A. An Environment-Friendly Spot Test Method with Digital Imaging for the Micro-Titration of Citric Fruits. *Talanta* **2020**, *206*, 120219, doi:10.1016/j.talanta.2019.120219.
 46. Wei, W.; Huang, J.; Gao, W.; Lu, X.; Shi, X. Carbon Dots Fluorescence-Based Colorimetric Sensor for Sensitive Detection of Aluminum Ions with a Smartphone. *Chemosensors* **2021**, *9*, 1–13, doi:10.3390/chemosensors9020025.
 47. dos Santos, V.B.; Ayres, L.B.; de Sousa, H.S.; Garcia, C.D.; Toito Suarez, W. Detection of Surfactants Using a Hydrophobic Natural Deep Eutectic Solvent and Smartphone. *Sensors and Diagnostics* **2024**, *3*, doi:10.1039/d4sd00196f.
 48. de Sousa, H.S.; Arruda-Santos, R.; Zanardi-Lamardo, E.; Suarez, W.T.; de Oliveira, J.L.; Farias, R.A.; Bezerra dos Santos, V. A Novel in Situ Method for Linear Alkylbenzene Sulfonate Quantification in Environmental Samples Using a Digital Image-Based Method. *Anal. Methods* **2024**, *16*, 2009–2018, doi:10.1039/D4AY00073K.
 49. de Almeida, J.P.; Tributino, T.; Sabino-Junior, J.R.; Amaral, E.; Oliveira, C.R.S.; Maia, M.V.; Toito Suarez, W.; Ayres, L.B.; Garcia, C.D.; dos Santos, V.B. Combining Digital Imaging and Quantum Dots for Analytical Purposes. *Anal. Methods* **2025**, doi:10.1039/D4AY02097A.
 50. Dos Santos Benedetti, L.P.; Dos Santos, V.B.; Silva, T.A.; Benedetti-Filho, E.; Martins, V.L.; Fatibello-Filho, O. A Digital Image Analysis Method for Quantification of Sulfite in Beverages. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 7568–7573, doi:10.1039/c5ay01372k.
 51. Gaiao, E. da N.; Martins, V.L.; Lyra, W. da S.; de Almeida, L.F.; da Silva, E.C.; Araújo,

- M.C.U. Digital Image-Based Titrations. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *570*, 283–290, doi:10.1016/j.aca.2006.04.048.
52. Mohamed, A.A.; Shalaby, A.A. Digital Imaging Devices as Sensors for Iron Determination. *Food Chem.* **2019**, *274*, 360–367, doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.014.
53. Rahbar, M.; Nesterenko, P.N.; Paull, B.; Macka, M. Geometrical Alignment of Multiple Fabrication Steps for Rapid Prototyping of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 11918–11923, doi:10.1021/acs.analchem.7b03796.
54. Cate, D.M.; Noblitt, S.D.; Volckens, J.; Henry, C.S. Multiplexed Paper Analytical Device for Quantification of Metals Using Distance-Based Detection. *Lab Chip* **2015**, *15*, 2808–2818, doi:10.1039/C5LC00364D.
55. Mujawar, L.H.; El-Shahawi, M.S. Poly(Methyl Methacrylate)-Modified Cellulose Fibers Patterned with Highly Selective Chromogenic Reagent for Rapid and Trace Determination of Co²⁺ in Water. *Anal. Methods* **2018**, *10*, 4454–4462, doi:10.1039/C8AY01746H.
56. Sousa, L.R.; Silva-Neto, H.A.; Castro, L.F.; Oliveira, K.A.; Figueredo, F.; Cortón, E.; Coltro, W.K.T. “Do It Yourself” Protocol to Fabricate Dual-Detection Paper-Based Analytical Device for Salivary Biomarker Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2023**, *415*, 4391–4400, doi:10.1007/s00216-023-04581-2.
57. Martinez, A.W.; Phillips, S.T.; Whitesides, G.M.; Carrilho, E. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3–10, doi:10.1021/ac9013989.
58. Ahlawat, S.; Bhatia, R.; Kumar, B. Impact of Thread-Based Microfluidic Devices in Modern Analysis: An Update on Recent Trends and Applications. *Curr. Anal. Chem.* **2023**, *19*, 281–297, doi:10.2174/1573411019666230214112818.
59. Agustini, D.; Caetano, F.R.; Quero, R.F.; Fracassi da Silva, J.A.; Bergamini, M.F.; Marcolino-Junior, L.H.; de Jesus, D.P. Microfluidic Devices Based on Textile Threads for Analytical Applications: State of the Art and Prospects. *Anal. Methods* **2021**, *13*, 4830–4857, doi:10.1039/D1AY01337H.
60. Aryal, P.; Hefner, C.; Martinez, B.; Henry, C.S. Microfluidics in Environmental Analysis: Advancements, Challenges, and Future Prospects for Rapid and Efficient Monitoring. *Lab Chip* **2024**, *24*, 1175–1206, doi:10.1039/D3LC00871A.
61. Chen, L.; Ghiasvand, A.; Paull, B. Applications of Thread-Based Microfluidics: Approaches and Options for Detection. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2023**, *161*, 117001,

- doi:10.1016/j.trac.2023.117001.
62. Weng, X.; Kang, Y.; Guo, Q.; Peng, B.; Jiang, H. Recent Advances in Thread-Based Microfluidics for Diagnostic Applications. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *132*, 171–185, doi:10.1016/j.bios.2019.03.009.
 63. Shimazu, R.; Tomimuro, K.; Ni, Y.; Malegori, C.; Hamedpour, V.; Hiruta, Y.; Oliveri, P.; Merckx, M.; Citterio, D. Microfluidic Thread-Based Analytical Devices for Point-of-Care Detection of Therapeutic Antibody in Blood. *Sensors Actuators B Chem.* **2022**, *352*, 131002, doi:10.1016/j.snb.2021.131002.
 64. Medina-Castillo, A.L.; Malaspina, R.; López Aveiga, M.G.; Fernández Ramos, M.D. Microfluidic-Based Analytical Devices (MFADs). In *Non-invasive and Non-destructive Methods for Food Integrity*; Springer Nature Switzerland: Cham, 2024; pp. 229–251.
 65. Malon, R.S.P.; Heng, L.Y.; Córcoles, E.P. Recent Developments in Microfluidic Paper-, Cloth-, and Thread-Based Electrochemical Devices for Analytical Chemistry. *Rev. Anal. Chem.* **2017**, *36*, doi:10.1515/revac-2016-0018.
 66. Farajikhah, S.; Cabot, J.M.; Innis, P.C.; Paull, B.; Wallace, G. Life-Saving Threads: Advances in Textile-Based Analytical Devices. *ACS Comb. Sci.* **2019**, *21*, 229–240, doi:10.1021/acscombsci.8b00126.
 67. Ajayi, D.T.; Teepoo, S. A Nanosilica-Coated Thread-Based Analytical Device for Nitrate and Nitrite Detection in Food Samples. *Talanta* **2024**, *279*, 126582, doi:10.1016/j.talanta.2024.126582.
 68. Ragavi, S.P.; Thirumalai, D.; Asharani, I. V. A Review on Small Organic Colorimetric and Fluorescent Hosts for the Detection of Cobalt and Nickel Ion. *J. Fluoresc.* **2024**, doi:10.1007/s10895-024-03807-5.
 69. Shahbaz, M.; Dar, B.; Sharif, S.; Khurshid, M.A.; Hussain, S.; Riaz, B.; Musaffa, M.; Khalid, H.; Ch, A.R.; Mahboob, A. Recent Advances in the Fluorimetric and Colorimetric Detection of Cobalt Ions. *RSC Adv.* **2024**, *14*, 9819–9847, doi:10.1039/D4RA00445K.
 70. Alamgir, S.; Mhahabubur Rhaman, M.; Basaran, I.; Powell, D.R.; Alamgir Hossain, M. Colorimetric and Spectroscopic Cobalt(II) Sensing by a Simple Schiff Base. *Polyhedron* **2020**, *187*, 114681, doi:10.1016/j.poly.2020.114681.
 71. Vashisht, D.; Kaur, K.; Jukaria, R.; Vashisht, A.; Sharma, S.; Mehta, S.K. Colorimetric Chemosensor Based on Coumarin Skeleton for Selective Naked Eye Detection of Cobalt (II) Ion in near Aqueous Medium. *Sensors Actuators B Chem.* **2019**, *280*, 219–226,

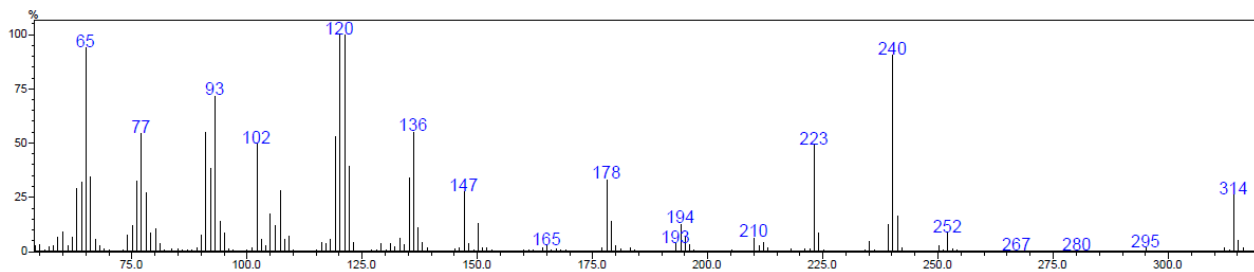
- doi:10.1016/j.snb.2018.10.020.
72. Sousa, A.L.L. de A. Síntese de Bis-Tiocarbazonas Como Potenciais Inibidores de Urease (Master's Thesis), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021.
 73. Li, G.; Shi, Z.; Li, X.; Zhao, Z. Synthesis of New Ferrocene Bis Thiocarbazones under Solvent-Free Conditions Using Microwave. *J. Chem. Res.* **2011**, *35*, 278–281, doi:10.3184/174751911X13043447062703.
 74. Shi, Z.; Zhao, Z.; Liu, X.; Wu, L. Synthesis of New Deoxycholic Acid Bis Thiocarbazones under Solvent-Free Conditions Using Microwave Irradiation. *J. Chem. Res.* **2011**, *35*, 198–201, doi:10.3184/174751911X12995267948561.
 75. Pessoa, K.D.; Suarez, W.T.; dos Reis, M.F.; de Oliveira Krambeck Franco, M.; Moreira, R.P.L.; dos Santos, V.B. A Digital Image Method of Spot Tests for Determination of Copper in Sugar Cane Spirits. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *185*, 310–316, doi:10.1016/j.saa.2017.05.072.
 76. Soares, S.; Rocha, F.R.P. Spot Test for Determination of Uric Acid in Saliva by Smartphone-Based Digital Images: A New Proposal for Detecting Kidney Dysfunctions. *Microchem. J.* **2021**, *162*, doi:10.1016/j.microc.2020.105862.
 77. Yan, L.; Zhang, B.; Zong, Z.; Zhou, W.; Shuang, S.; Shi, L. Artificial Intelligence-Integrated Smartphone-Based Handheld Detection of Fluoride Ion by Al³⁺-Triggered Aggregation-Induced Red-Emission Enhanced Carbon Dots. *J. Colloid Interface Sci.* **2023**, *651*, 59–67, doi:10.1016/j.jcis.2023.07.125.
 78. Zhu, X.; Yuan, X.; Han, L.; Liu, H.; Sun, B. A Smartphone-Integrated Optosensing Platform Based on Red-Emission Carbon Dots for Real-Time Detection of Pyrethroids. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *191*, 113460, doi:10.1016/j.bios.2021.113460.
 79. Ding, L.; Peng, D.; Wang, R.; Li, Q. A User-Secure and Highly Selective Enhancement of Latent Fingerprints by Magnetic Composite Powder Based on Carbon Dot Fluorescence. *J. Alloys Compd.* **2021**, *856*, doi:10.1016/j.jallcom.2020.158160.
 80. Destino, J.F.; Cunningham, K. At-Home Colorimetric and Absorbance-Based Analyses: An Opportunity for Inquiry-Based, Laboratory-Style Learning. *J. Chem. Educ.* **2020**, *97*, 2960–2966, doi:10.1021/acs.jchemed.0c00604.
 81. von Mühlen, L.; Prestes, O.D.; Ferrão, M.F.; Sirtori, C. Miniaturized Method for Chemical Oxygen Demand Determination Using the PhotoMetrix PRO Application. *Molecules* **2022**, *27*.
 82. Šafranko, S.; Živković, P.; Stanković, A.; Medvidović-Kosanović, M.; Széchenyi, A.;

- Jokić, S. Designing ColorX, Image Processing Software for Colorimetric Determination of Concentration, to Facilitate Students' Investigation of Analytical Chemistry Concepts Using Digital Imaging Technology. *J. Chem. Educ.* **2018**, 1928–1937, doi:10.1021/acs.jchemed.8b00920.
83. da Silva Oliveira, C.R.; Toito Suarez, W.; dos Anjos Nahas, H.R.; Moreira Novaes, F.J.; Barbosa de Almeida, J.P.; Bezerra dos Santos, V. Methods Based on Digital Image: From General Considerations to Chemistry Teaching. *Rev. Virtual Química* **2023**, 1–20, doi:10.21577/1984-6835.20230060.
84. Mudanyali, O.; Dimitrov, S.; Sikora, U.; Padmanabhan, S.; Navruz, I.; Ozcan, A. Integrated Rapid-Diagnostic-Test Reader Platform on a Cellphone. *Lab Chip* **2012**, *12*, 2678–2686, doi:10.1039/C2LC40235A.
85. Franco, M. de O.K.; Suarez, W.T.; dos Santos, V.B.; Resque, I.S.; dos Santos, M.H.; Capitán-Vallvey, L.F. Microanalysis Based on Paper Device Functionalized with Cuprizone to Determine Cu^{2+} in Sugar Cane Spirits Using a Smartphone. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *253*, 119580, doi:10.1016/j.saa.2021.119580.
86. Sangsin, S.; Srivilai, P.; Tongraung, P. Colorimetric Detection of Cr^{3+} in Dietary Supplements Using a Smartphone Based on EDTA and Tannic Acid-Modified Silver Nanoparticles. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *246*, 119050, doi:10.1016/j.saa.2020.119050.
87. Resque, I.S.; dos Santos, V.B.; Suarez, W.T. An Environmentally Friendly Analytical Approach Based on Spot Test and Digital Image to Evaluate the Conformity of Bleaching Products. *Chem. Pap.* **2019**, *73*, 1659–1668, doi:10.1007/s11696-019-00717-w.
88. de Almeida, J.P.B.; dos Santos, V.B.; do Nascimento, G.A.; Suarez, W.T.; de Azevedo, W.M.; Ferreira, A.F.; Maia, M.V. A Fluorescence Digital Image-Based Method Using Carbon Quantum Dots to Evaluate the Compliance of a Biocidal Agent. *Anal. Methods* **2022**, *14*, 2631–2641, doi:10.1039/D2AY00678B.
89. Gee, C.T.; Kehoe, E.; Pomerantz, W.C.K.; Penn, R.L. Quantifying Protein Concentrations Using Smartphone Colorimetry: A New Method for an Established Test. *J. Chem. Educ.* **2017**, *94*, 941–945, doi:10.1021/acs.jchemed.6b00676.
90. Benedetti, L.P. dos S.; dos Santos, V.B.; Silva, T.A.; Filho, E.B.; Martins, V.L.; Fatibello-Filho, O. A Digital Image-Based Method Employing a Spot-Test for

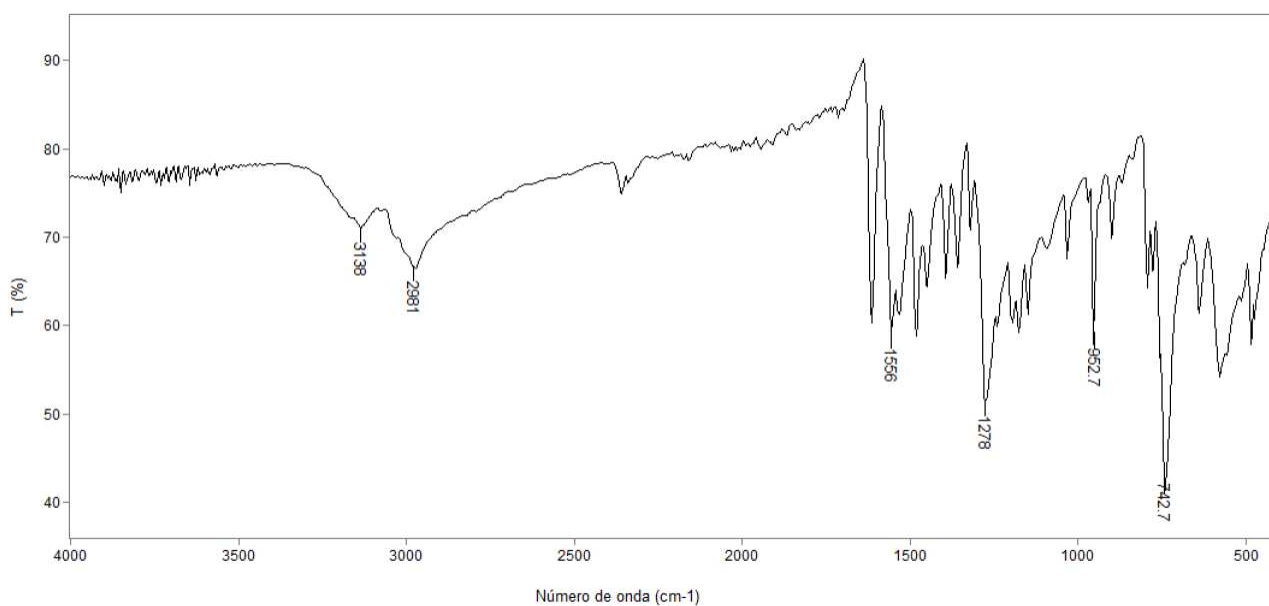
- Quantification of Ethanol in Drinks. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 4138–4144, doi:10.1039/C5AY00529A.
91. da Silva, E.K.N.; dos Santos, V.B.; Resque, I.S.; Neves, C.A.; Moreira, S.G.C.; Franco, M. de O.K.; Suarez, W.T. A Fluorescence Digital Image-Based Method Using a 3D-Printed Platform and a UV-LED Chamber Made of Polyacid Lactic for Quinine Quantification in Beverages. *Microchem. J.* **2020**, *157*, 104986, doi:10.1016/j.microc.2020.104986.
92. ANVISA Resolução Da Diretoria Colegiada RDC N. 166. *Agência Nac. Vigilância Sanitária* **2017**, 2017.
93. Rosace, G.; Castellano, A.; Trovato, V.; Iacono, G.; Malucelli, G. Thermal and Flame Retardant Behaviour of Cotton Fabrics Treated with a Novel Nitrogen-Containing Carboxyl-Functionalized Organophosphorus System. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *196*, 348–358, doi:10.1016/j.carbpol.2018.05.012.
94. Sun, L.; Wang, H.; Li, W.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Lu, Z.; Zhu, P.; Dong, C. Preparation, Characterization and Testing of Flame Retardant Cotton Cellulose Material: Flame Retardancy, Thermal Stability and Flame-Retardant Mechanism. *Cellulose* **2021**, *28*, 3789–3805, doi:10.1007/s10570-020-03632-6.
95. de Oliveira Krambeck Franco, M.; Dias Castro, G.A.; Vilanculo, C.; Fernandes, S.A.; Suarez, W.T. A Color Reaction for the Determination of Cu²⁺ in Distilled Beverages Employing Digital Imaging. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1177*, 338844, doi:10.1016/j.aca.2021.338844.
96. Maia, M.V.; Suarez, W.T.; dos Santos, V.B.; de Oliveira, S.C.B.; de Almeida, J.P.B. A Novel Approach to Hg²⁺ Determination in Water Samples Using Carbon Dots Based on Paper and Fluorescence Digital Image Analysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2024**, *99*, 1157–1164, doi:10.1002/jctb.7618.
97. Christian Gomes Morais Nascimento, M.; Carolina Robaina Vieira, M.; R. P. Rocha, F.; Almeida Silva, T.; Toito Suarez, W. Flow-Based Green Ceramics Microdevice with Smartphone Image Colorimetric Detection for Free Chlorine Determination in Drinking Water. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2023**, *287*, doi:10.1016/j.saa.2022.122096.
98. AOAC INTERNACIONAL Guidelines on Method Validation to Be Performed in Support of Analytical Methods for Agrochemical Formulations. *J. Sains Dan Seni Its* **2013**, *4*, 1–17.

99. Tu, L.N.; Van Tan, L.; Chien, N.X. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Cu(II) and Co(II) Using 5-Bromosalicylaldehyde Thiosemicarbazone by Partial Least Squares Regression Method. *Rasayan J. Chem.* **2018**, *11*, 850–856, doi:10.7324/RJC.2018.1122088.
100. Barreto, J.A.; dos Santos de Assis, R.; Santos, L.B.; Cassella, R.J.; Lemos, V.A. Pressure Variation In-Syringe Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Associated with Digital Image Colorimetry: Determination of Cobalt in Food Samples. *Microchem. J.* **2020**, *157*, 105064, doi:10.1016/j.microc.2020.105064.
101. Salimi, F.; Shamsipur, M.; Koosha, E.; Ramezani, M. A New Dispersive Micro-Solid Phase Extraction Based on Rejection Property Method Combined with FAAS for the Simultaneous Determination of Cobalt and Copper after Optimisation by Box-Behnken Design. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2022**, *102*, 872–884, doi:10.1080/03067319.2020.1727459.
102. Lemos, V.A.; Junior, I.V.S.; Santos, L.B.; Barreto, J.A.; Ferreira, S.L.C. A New Simple and Fast Method for Determination of Cobalt in Vitamin B12 and Water Samples Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Digital Image Analysis. *Water. Air. Soil Pollut.* **2020**, *231*, doi:10.1007/s11270-020-04680-1.
103. Khoshmaram, L.; Bagherian, E. Dispersive Surfactant Micelle-Mediated Extraction Combined with a Smartphone-Based Portable Colorimeter: A Cost-Effective and Simple Approach for Cobalt Determination. *Anal. Methods* **2024**, *16*, 434–441, doi:10.1039/D3AY01698F.

ANEXO III

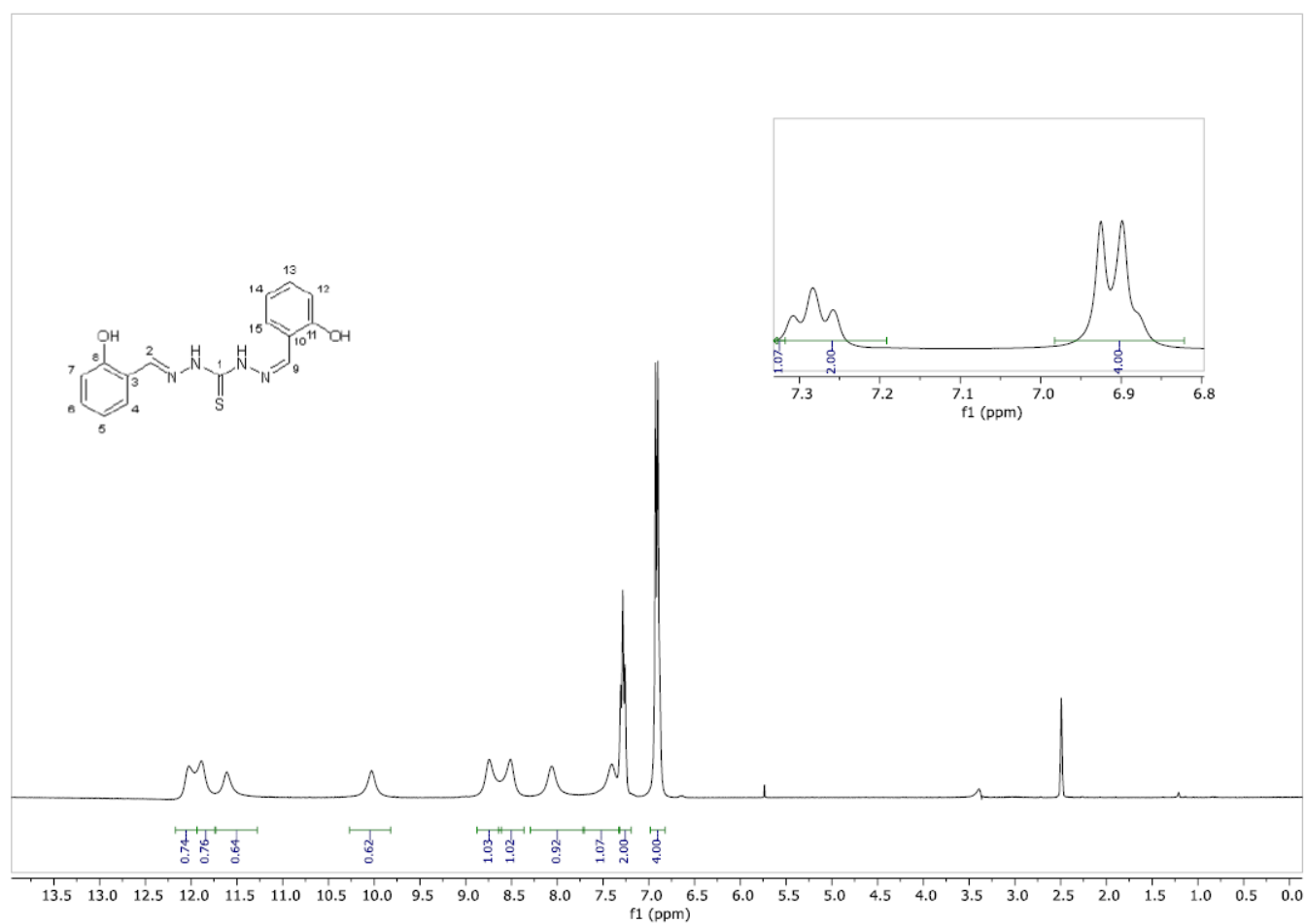
Figura 80. Espectro de massa (EI, 70 eV) da bis-tiocarbazona B-2OH.

Fonte: Sousa, 2021.[72]

Figura 81. Espectro FTIR (reflexão) da tiocarbazona B-2OH.

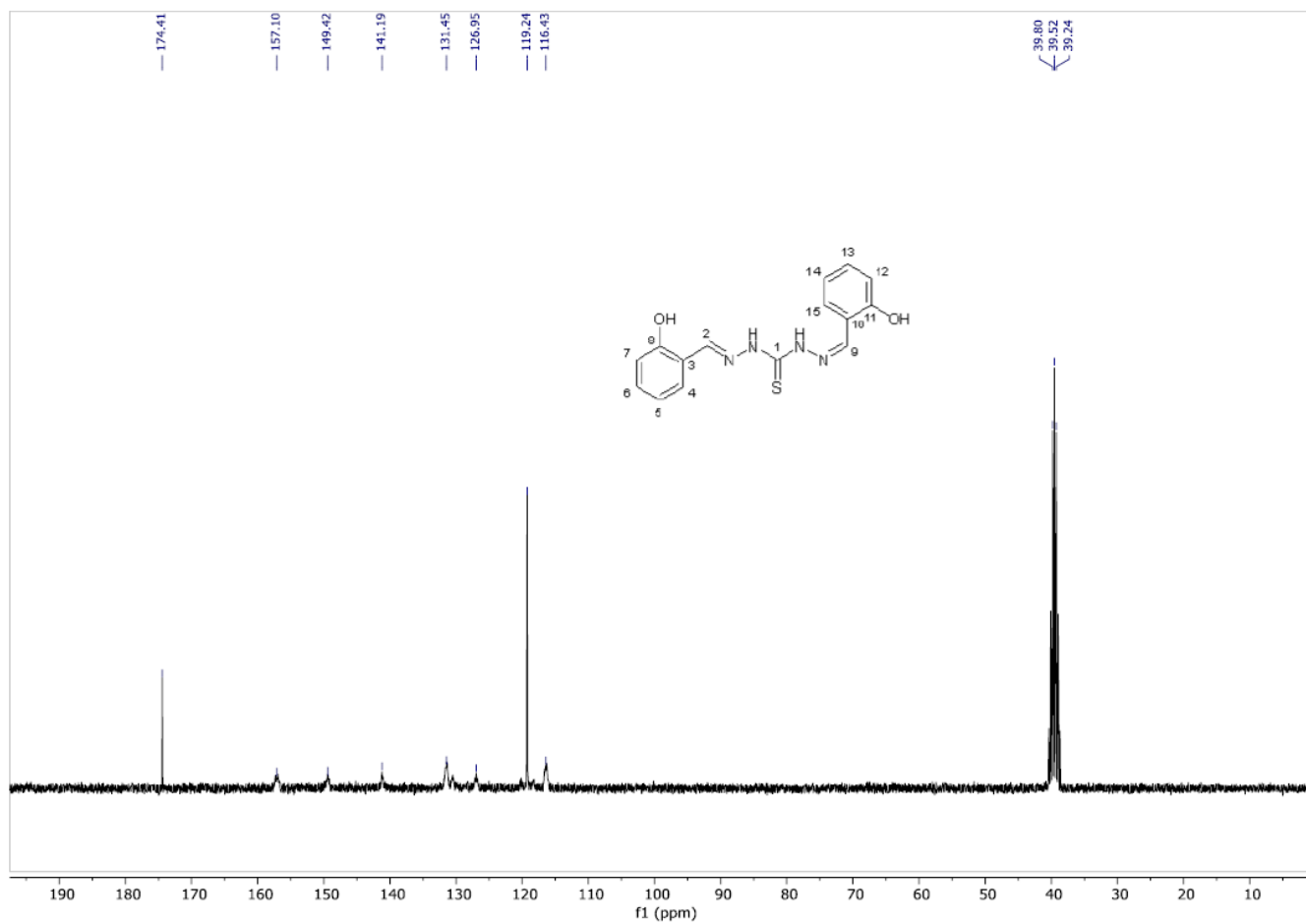
Fonte: Sousa, 2021.[72]

Figura 82. Espectro de RMN de ^1H (300,069 MHz; DMSO; δDMSO 2,49) da bis-tiocarbazona B-2OH.



Fonte: Sousa, 2021.[72]

Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C (75,459 MHz; DMSO; δDMSO 39,5) da bis-tiocarbazona B-2OH.



Fonte: Sousa, 2021.[72]

PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos ao longo deste trabalho, as perspectivas futuras incluem a realização de estudos adicionais de caracterização, como testes de Job para as moléculas B₂COOH e B₂OH, visando melhor compreensão de suas estequiometrias de complexação. Também se pretende propor uma estrutura detalhada para os complexos formados entre as *bis*-iminas e os metais cobre e cobalto, respectivamente.

Além dessas etapas experimentais, destaca-se como objetivo do grupo de pesquisa, a médio e longo prazo, o desenvolvimento de metodologias que permitam a identificação e quantificação desses compostos de forma simples, rápida e acessível, utilizando dispositivos portáteis como um *smartphone*. Essa abordagem visa democratizar a análise química, tornando-a mais viável em diferentes contextos e locais com infraestrutura laboratorial limitada.

Por fim, está prevista a submissão dos dois últimos estudos realizados para publicação em periódicos científicos especializados, contribuindo assim para o avanço do conhecimento na área de desenvolvimento de sensores químicos baseados em *bis* iminas.