

MARIA CAROLINA ROBAINA VIEIRA

**IMINO-JULOLIDINA COMO SENSOR QUÍMICO NA DETERMINAÇÃO
FLUORESCENTE DE COBRE EM VINHO POR MEIO DE PLACA IMPRESSA 3D
USANDO CÂMARA VIS-LED E ANÁLISE DE IMAGENS DIGITAIS**

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

Orientador: Willian Toito Suarez

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

V658i
2022

Vieira, Maria Carolina Robaina, 1996-
Imino-julolidina como sensor químico na determinação
fluorescente de cobre em vinho por meio de placa impressa 3D
usando câmara Vis-LED e análise de imagens digitais / Maria
Carolina Robaina Vieira. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (66 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Willian Toito Suarez.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2022.

Referências bibliográficas: f. 57-65.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.364>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Fluorescência. 2. Cobre. 3. Vinho e vinificação - Análise.
4. Imagens digitais. 5. Imagem tridimensional. 6. Julolidinas.
7. Espectroscopia de infravermelho. I. Suarez, Willian Toito,
1976-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica.
III. Título.

CDD 22. ed. 543.56

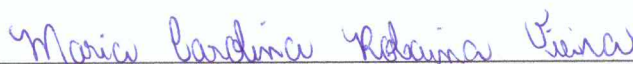
MARIA CAROLINA ROBAINA VIEIRA

**IMINO-JULOLIDINA COMO SENSOR QUÍMICO NA DETERMINAÇÃO
FLUORESCENTE DE COBRE EM VINHO POR MEIO DE PLACA IMPRESSA 3D
USANDO CÂMARA VIS-LED E ANÁLISE DE IMAGENS DIGITAIS**

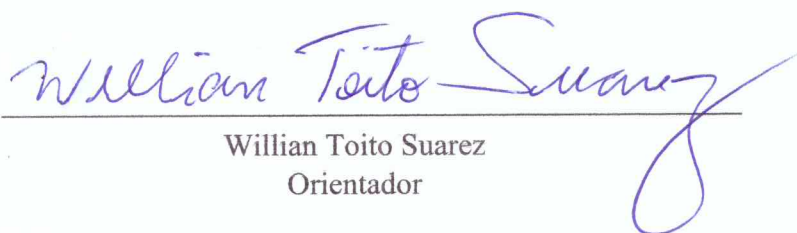
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2022.

Assentimento:



Maria Carolina Robaina Vieira
Autora



Willian Toito Suarez
Orientador

Dedico este trabalho aos meus pais, Jorge e Josane, e ao meu irmão, João.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por me dar forças para enfrentar todos os obstáculos e ter chegado até aqui.

Aos meus pais, Jorge e Josane, e ao meu irmão, João, por todo apoio, carinho e palavras de força para que tudo se realizasse.

Aos meus amigos de longa caminhada por estarem sempre ao meu lado durante estes anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Willian Toito Suarez, pela paciência e toda dedicação durante a orientação, que foi de grande aprendizado.

Aos meus colegas de laboratório por toda risada e amparo nos momentos difíceis.

Ao professor Tiago e ao José Neto por terem aceitado fazer parte da banca e contribuírem para esse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

VIEIRA, Maria Carolina Robaina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Imino-julolidina como sensor químico na determinação fluorescente de cobre em vinho por meio de placa impressa 3D usando câmara Vis-LED e análise de imagens digitais.** Orientador: Willian Toito Suarez.

No presente trabalho, foi desenvolvido um método simples e de baixo custo para a determinação fluorescente de cobre em amostras de vinhos empregando como reagente fluoróforo iminojulolidina com grupo OH (IJO) por meio da utilização de uma câmara VisLED confeccionada em 3D como suporte reacional e aquisição de imagens digitais realizadas usando um smartphone. A IJO sintetizada foi caracterizada através da espectroscopia de fluorescência, espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível e espectroscopia de infravermelho por transformação de Fourier (FTIR). Ademais, foram realizados estudos de pH, força iônica e estabilidade luminescente. O método proposto é baseado no aumento da fluorescência através da reação de complexação entre o Cu(II) e a IJO. Para a excitação do complexo foi construída uma câmara contendo quatro diodos Vis-LED com máximo de emissão a 420 nm com uma abertura na parte superior para o acoplamento do smartphone. A IJO sintetizada foi seletiva para a determinação de cobre, e apresentou uma faixa linear para o canal B (no modelo de cores RGB), com concentrações entre 1,0 – 16,0 mg L⁻¹ com R² = 0,9946 e com limites de detecção e quantificação de 0,63 mg L⁻¹ e 2,11 mg L⁻¹, respectivamente. Estudos indicaram uma excelente porcentagem de recuperação, que variou entre 91,71 a 108,00%, demonstrando que não há efeito significativo de matriz. As amostras de vinhos foram analisadas pelo método proposto e de referência, empregando o test t pareado com 95% de confiança, o qual não indicou diferenças significativas nos resultados obtidos.

Palavras-chave: Cobre. Fluorescência. Vinho. Imino-Julolidina. Análise de Imagens Digitais. Impressão em 3D. Fluorímetro. Câmara Vis-LED.

ABSTRACT

VIEIRA, Maria Carolina Robaina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2022. **Iminojulolidine as a Chemical sensor in the fluorescente determination of copper in wine through 3D printed plate using Vis-LED câmera and digital image analysis.** Adviser: Willian Toito Suarez.

In the present work, a simple and low method was developed for the determination of a copper fluorescent chamber in the custody presented of a group of wines used as an imino-julolidine fluorophore reagent with OH (IJO) through the use of a Vis-LED chamber made in 3D as reaction and digital image acquisition performed using a smartphone. The synthesized IJO was characterized through fluorescence spectroscopy, molecular absorption spectrophotometry in the ultraviolet and visible region and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). In addition, pH, ionic strength and luminescent stability studies were carried out. The proposed method is based on the increase in fluorescence through the complexation reaction between Cu(II) and IJO. For the excitation of the complex, a chamber was built containing four LEDVis diodes with maximum emission at 420 nm with an opening at the top for the smartphone coupling. The synthesized IJO was selective for copper determination, and presented a linear range for the B channel (in the RGB color model), with concentrations between 1,0 – 16,0 mg L⁻¹ with R² = 0,9946 and detection and quantification limits of 0,63 mg L⁻¹ and 2,11 mg L⁻¹, respectively. Studies have indicated an excellent percentage of recovery, which ranged from 91,71 to 108,00 %, demonstrating that there is no significant matrix effect. The wine samples were analyzed by the proposed and reference method, using the paired t test with 95% confidence, which did not indicate significant differences in the results obtained.

Keywords: Copper. Fluorescence. Wine. Imino-Julolidine. Digital Image Analysis. 3D printing. Fluorimeter. Vis-LED chamber.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Consumo mundial total de vinho, em milhões de hectolitro.	16
Figura 2 - Consumo mundial de vinho por cada país, em milhões de hectolitro (mhl).	17
Figura 3 - Esquema do processo produtivo do vinho.	18
Figura 4 - Algumas estruturas químicas das julolidinas e suas propriedades.	22
Figura 5 - Julolidina como sensor químico fluorescente para detecção de Zn^{2+} e Cu^{2+} reportado por Ganesan et al. (2019).	23
Figura 6 – Representação adaptada do diagrama de Jablonski.	25
Figura 7 - Ilustração das cores e suas respectivas cores complementares.	28
Figura 8 - Cubo tridimensional representativo do modelo de cores RGB e escala de cinza. ...	29
Figura 9 – Representação do modelo de cor CMYKI.	31
Figura 10 – Tipos de tecnologia para impressão 3D.	33
Figura 11 – Representação gráfica da câmara Vis-LED com a placa reacional confeccionada em impressora 3D.	36
Figura 12 - (A) molécula de IJO sem sofrer fluorescência e (B) molécula de IJO fluorescente.	37
Figura 13 - Placa 3D impressa em PLA.	38
Figura 14 - Espectro de luminescência da IJO, (A) excitação de 360 a 440 nm.....	41
Figura 15 - Espectro UV/Vis da IJO.	42
Figura 16 - Espectro no infravermelho da IJO.	43
Figura 17 - Intensidades de fluorescência da IJO com emissão em 480 nm (excitação a 420 nm) em função do tempo.	44
Figura 18 - Intensidades de fluorescência da IJO com emissão em 480 nm (excitação a 420 nm) com diferentes valores de pH.	45
Figura 19 - Histograma da intensidade de fluorescência da IJO em solução aquosa de NaCl em função da força iônica.....	46

Figura 20 - Diferença entre as intensidades luminescentes relativas da IJO com diferentes íons metálicos na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em (A) pH ácido (4,0), (B) pH neutro (7,0) e (C) pH básico (10,0).	47
Figura 21 - Diferença entre as intensidades luminescentes relativas da IJO com diferentes íons metálicos na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em pH neutro (7,0).	50
Figura 22 - Curva analítica obtida para determinação fluorescente de Cu^{2+} com faixa linear de 0,5 a 6,5 mg L^{-1}	52
Figura 23 - Curva analítica para determinação de cobre utilizando diferentes canais do modelo RGB usando câmara Vis-LED.	53
Figura 24 - Espectro do infravermelho do complexo Cu(II)/IJO.	59
Figura 25 - Possível estrutura para o complexo Cu(II)/IJO.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites máximos, em mg L ⁻¹ , de metais em vinho estabelecidos pela OIV, Legislação Brasileira e Mercosul.	21
Tabela 2 - Estudo da interferência na determinação de Cu (II) em amostras de vinhos usando o método empregando um fluorímetro (n=18).	48
Tabela 3 - Estudo da interferência na determinação de Cu (II) em amostras de vinhos usando o método com câmara Vis-LED (n=18).	50
Tabela 4 - Valores obtidos (coeficiente linear, coeficiente angular, coeficiente de determinação, limite de detecção e quantificação) a partir da análise usando Color Grab.	54
Tabela 5 - Porcentagens de recuperação de Cu ²⁺ em vinhos obtidas para os três níveis de concentração estudados para o método empregando um fluorímetro.	55
Tabela 6 - Porcentagens de recuperação de Cu ²⁺ em vinhos obtidas para os três níveis de concentração estudados para o método com câmara Vis-LED.	56
Tabela 7 - Valores obtidos pelo método empregando um fluorímetro e a câmara Vis-LED..	57
Tabela 8 - Comparação dos métodos empregando fluorímetro e câmara Vis-LED.	58
Tabela 9 - Comparação entre os métodos de identificação de cobre em vinho presentes na literatura.	61

LISTA DE SIGLAS

- ABS** – Acritonitrila butadieno estireno, do inglês “Acrylonitrile Butadiene Styrene”;
- CMYK** – Ciano, magenta, amarelo e chave (preto), do inglês “Cyan, Magenta, Yellow and Black”;
- DIB** – Baseado em imagem digital, do inglês “Digital image-based”;
- EDTA** – Ácido tetraetilenodiamino, do inglês “Ethylenediamine Tetraacetic Acid”;
- EDXRF** – Fluorescência de raio X de dispersão de energia, do inglês “Energy Dispersive X-Ray Fluorescence”;
- ETAAS** - espectrometria de absorção atômica eletrotérmica, do inglês “Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry”;
- F – DIB** - Baseado em imagem digital de fluorescência, do inglês “Fluorescence – Digital image-based”;
- FDM** – Modelagem por deposição fundida, do inglês “Fused Deposition Modeling”;
- HLS** – Matriz, luminosidade e saturação, do inglês “Hue, Saturation and Lightness”;
- ICP-OS** - Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente, do inglês “Inductively Coupled Plasma Optical Emission spectroscopy”;
- IJO** – Imino julolidina com grupo OH;
- LED** – Diodo emissor de luz, do inglês “Light – Emitting Diode”;
- MERCOSUL** – Mercado Comum do Sul;
- OIV** – Organização Mundial da Videira e do Vinho, do inglês “International Organisation of Vine and Wine”;
- PET** – Polietileno tereftalato, do inglês “Polyethylene Terephthalate”;
- PLA** – Ácido polilático, do inglês “Polylactic Acid”;
- PVA** – Álcool polivinílico, do inglês “Polyvinyl Alcohol”;
- RGB** – Vermelho, verde e azul, do inglês “Red, Green and Blue”;
- SLM** – Fusão a laser seletiva, do inglês “Selective Laser Melting”;
- SLS** – Sinterização seletiva a laser, do inglês “Selective Laser Sintering”;
- TPE** – Termoplástico elastomérico;
- TXRF** – Fluorescência de raio X de reflexão total, do inglês “Total reflection X-Ray Fluorescence”;
- UV** – Ultravioleta;
- Vis** – Visível;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. Vinho	16
2.1.1. Composição mineral do vinho	18
2.1.2. Fontes de metais em vinhos e Legislação	19
2.1.3. Determinação de Cobre em Vinhos	21
2.2. Julolidinas	22
2.3. Princípios de luminescência	23
2.4. Análise de imagens digitais.....	25
2.4.1 Teoria das cores.....	25
2.4.2 Modelo de cor RGB em análises digitais.....	26
2.4.3 Métodos analíticos baseados em análises digitais.....	27
2.5. Tecnologia de impressão 3D.....	28
3. OBJETIVO.....	30
3.1. Geral.....	30
3.2. Específico	30
4. PARTE EXPERIMENTAL	30
4.1. Materiais e Soluções	30
4.2. Instrumentação	31
4.2.1. Espectrofluorímetro.....	31
4.2.2 Câmara Vis-LED.....	31
4.2.2.1 Placa 3D	33
4.2.2.2 Aquisição de imagens	34
4.3. Estudo da estabilidade luminescente da IJO	34
4.4. Estudo do pH para IJO	34
4.5. Estudo da influência da força iônica	34
4.6. Seletividade	34
4.7. Determinação de Cu^{2+} empregando IJO.....	35
4.7.1. Espectrofluorímetro.....	35
4.7.2 Câmara Vis-LED.....	35
4.8. Veracidade.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Caracterização da IJO	36

5.1.1 Luminescência.....	36
5.1.2 Espectrofotometria UV/VIS.....	37
5.1.3 Infravermelho.....	38
5.2. Estudo da estabilidade luminescente.....	39
5.3. Estudo do pH.....	40
5.4. Estudo da força iônica.....	41
5.5. Seletividade.....	42
5.5.1. Espectrofluorímetro.....	42
5.5.2 Câmara Vis-LED.....	45
5.6. Determinação de Cu ²⁺ em amostras de vinho comerciais.....	47
5.6.1 Espectrofluorímetro.....	47
5.6.2 Câmara Vis-LED.....	48
5.7. Veracidade.....	50
5.8. Comparação dos métodos.....	52
5.9. Estrutura Cu(II)/IJO.....	54
5.10. Outros métodos para determinação de cobre em vinho.....	55
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
APÊNDICE.....	66

1. INTRODUÇÃO

O vinho é uma bebida amplamente consumida no mundo há séculos com valor comercial e importância social. A palavra vinho origina-se da palavra latina *vinum*, que por sua vez tem origem na palavra grega *oinos* que tanto podem significar "vinho" como "videira" é, genericamente, uma bebida alcoólica produzida por fermentação do sumo de uva. Numerosos estudos mostraram que o consumo moderado de vinho, especialmente os vinhos tintos, melhora a saúde e a longevidade (GOLDBERG e BROMBERG, 1996; GRONBAEK *et al.*, 1995).

Os metais traço desempenham um efeito importante na qualidade do vinho. Promovem processos redox específicos durante a maturação que conferem uma boa aparência aos vinhos. No entanto, altas concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn podem causar instabilidade e turbidez (RODRÍGUEZ *et al.*, 1999; GREEN, CLARK e SCOLLARY, 1997; GRINDLAY *et al.*, 2011). Outros metais, como As, Cd e Pb, são tóxicos (CHRISTAKI e TZIA, 2002; PYRZÝNSKA, 2004).

A legislação vigente no Brasil e no mundo exige um controle rigoroso dos níveis de contaminação por metais em bebidas. O controle da concentração de Cu é importante porque altas quantidades podem causar deterioração oxidativa do vinho levando ao clareamento do vinho tinto e escurecimento do vinho branco. Nos vinhos, as principais fontes de cobre são os equipamentos utilizados na produção do vinho, adições de sais de cobre (CuSO_4) e pesticidas empregados durante o crescimento das uvas. O nível máximo permitido de cobre no vinho é de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ pelo Brasil, Mercado Comum do Sul (Mercosul) e OIV (Organização Internacional do Vinho) (MERCOSUL, 1996; OIV, 2005).

Inúmeros métodos instrumentais têm sido relatados na literatura para a determinação de cobre em vinhos, por exemplo, espectrometria de absorção atômica eletrotérmica, ETAAS (ALKIS *et al.*, 2014); espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, ICP-OES (MORENO *et al.*, 2008); nebulização ultrassônica (UNS) acoplada a ICP-OES, USNICP-OES (LARA *et al.*, 2005); fluorescência de raios-X de reflexão total, TXRF (PESSANHA *et al.*, 2010) e cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) hifenizado para espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplado (LATORRE *et al.*, 2019). Esses métodos analíticos exigem instrumentações caras para aquisição, operação e manutenção e

usam pré-tratamento de amostra trabalhoso e demorado. Além disso, esses pré-tratamentos de amostras apresentam riscos de contaminação e perda de analito.

Nos últimos anos têm crescido a procura por desenvolver métodos mais simples, robustos e com instrumentação de baixo custo para determinar concentrações de Cu^{2+} em bebidas. O método baseado em imagem digital (DIB) emprega imagens obtidas de dispositivos como webcams, câmeras e smartphones (SINGKHONRAT *et al.*, 2019), que visa obter imagens de reações colorimétricas (WONGNIRAMAİKULA, LIMSAKULA, CHOODUM, 2018) e, recentemente, por fluorescência (DOS SANTOS *et al.*, 2019; MOHAMED e SHALABY, 2019). Com aplicativos ou softwares específicos, as imagens obtidas por meio desses dispositivos são decompostas em valores de cores usando modelos como RGB (Vermelho, Verde e Azul), CMYK (Ciano, Magenta, Amarelo, Chave (Preto) e HLS (matiz, luminosidade e saturação) (DANTAS *et al.*, 2017). Os valores de cor obtidos após a decomposição das imagens digitais são intrínsecos à intensidade da cor ou fluorescência captada pelo aparelho digital, sendo possível relacionar esses valores com a concentração do analito (PORTO *et al.*, 2019).

Julolidinas são compostos N-heterocíclicos que têm sido estudadas há mais de um século devido às suas diversas propriedades e aplicações, sendo reportadas como substâncias com atividade antiviral (ZHANG *et al.*, 2018), sondas fluorescentes (SCHULZ-FINCKE *et al.*, 2018), corantes sensibilizantes para células solares (WU *et al.*, 2013), antidepressivos (VEJDELEK e PROTIVA, 1990) e materiais ópticos não lineares (LIU *et al.*, 2016).

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um método para determinação de cobre em vinho, que visa a portabilidade, baixo custo e consumo de reagentes e amostras, baseado na construção de um fluorímetro composto por uma câmara escura contendo quatro diodos LEDVis com emissão máxima a 480 nm, tendo como detector um smartphone (acoplado na parte superior da câmara) para aquisição das imagens e uma placa 3D como recipiente reacional.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Vinho

O vinho é uma bebida derivada exclusivamente da fermentação alcóolica da uva madura e fresca ou de suco de uva fresca, de grande importância social e econômica. Inicialmente, esta bebida foi usada como uma substância capaz de provocar alterações mentais durante cerimônias religiosas em tempos antigos (RIZZON, 2010; GRINDLAY *et al.*, 2011). Entretanto, com a evolução da viticultura e da enologia, o vinho passou a ganhar mais qualidade e a bebida tornou-se um item praticamente indispensável na dieta humana.

A produção de vinhos no Brasil teve início no século XVI, com os colonizadores portugueses. Os vinhos eram produzidos artesanalmente, em baixa escala, através de cascas *Vitis vinífera*. Posteriormente, por volta de 1875, com a chegada de imigrantes italianos e com a implantação de uvas de origem americana, do tipo *Vitis labrusca*, houve um crescimento na produção de vinhos, principalmente na região sul. Atualmente, o Rio Grande do Sul é o maior produtor de vinhos do Brasil, com aproximadamente 90% dos vinhos produzidos no país. Os 10% restantes estão divididos entre os estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco (IBGE, 2020).

Segundo dados da OIV (Organização Internacional do Vinho), mais de 23 bilhões de litros de vinho foram produzidos e consumidos apenas em 2020 (**Figura 1**) (OIV, 2021). No Brasil o volume chegou a mais de 430 milhões de litros neste mesmo ano (**Figura 2**).

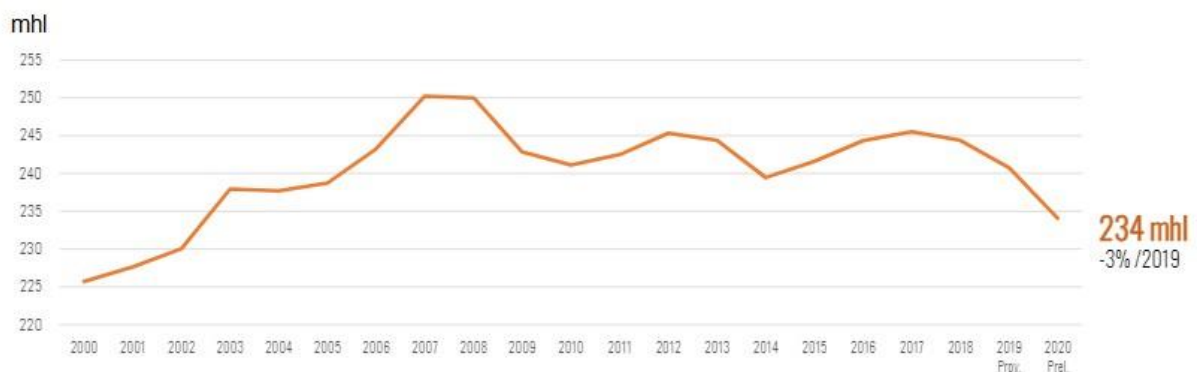


Figura 1 - Consumo mundial total de vinho, em milhões de hectolitro.

Fonte: (OIV, 2021)

	2016	2017	2018	2019	2020	2020 % mundo
Estados Unidos	31.3	31.5	32.4	33.0	33.0	14%
França	28.3	28.6	26.0	24.7	24.7	11%
Itália	22.4	22.6	22.4	22.8	24.5	10%
Alemanha	20.2	19.7	20.0	19.8	19.8	8%
Reino Unido	12.9	13.1	12.9	13.0	13.3	6%
China	19.2	19.3	17.6	15.0	12.4	5%
Rússia	10.1	10.4	9.9	10.0	10.3	4%
Espanha	9.9	10.5	10.9	10.3	9.6	4%
Argentina	9.4	8.9	8.4	8.9	9.4	4%
Austrália	5.4	5.9	6.0	5.9	5.7	2%
Portugal	4.7	5.2	5.1	4.6	4.6	2%
Canadá	5.0	5.0	4.9	4.7	4.4	2%
Brasil	3.1	3.3	3.3	3.6	4.3	2%
Romênia	3.8	4.1	3.9	3.9	3.8	2%
Holanda	3.6	3.7	3.6	3.5	3.5	1%
Japão	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	1%
África do Sul	4.4	4.5	4.3	3.9	3.1	1%
Suíça	2.7	2.7	2.6	2.7	2.6	1%
Bélgica	2.8	2.8	2.7	2.7	2.6	1%
Áustria	2.4	2.4	2.4	2.3	2.3	1%
Suécia	2.4	2.3	2.3	2.3	2.2	1%
República Tcheca	2.1	2.2	2.1	2.1	2.1	1%
Outros Países	34.8	33.1	37.3	37.7	32.2	14%
Total no mundo (mhl)	244	246	244	241	234	100%

Figura 2 - Consumo mundial de vinho por cada país, em milhões de hectolitro (mhl).

Fonte: (OIV, 2021)

O vinho pode ser dividido em três categorias quanto à coloração: tinto, branco e rosê. Quanto às quantidades de açúcares, dividindo-se em seco, com teor de açúcar menor do que 5

g L^{-1} , *demi-sec*, com $5 - 20 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares e suave, com teor de açúcares maior do que 20 g L^{-1} . Quanto à classe, possui duas predominantes: vinhos de mesa e vinhos finos. O vinho de mesa é um vinho inferior, elaborado a partir de uvas americanas. Já os vinhos finos, são elaborados a partir de uvas nobres de origem europeia. Os vinhos finos e de mesa possuem teor alcoólico entre 10-14% (RIZZON, 2010; GRINDLAY *et al.*, 2011). Para a obtenção de vinhos de boa qualidade é necessário fazer o uso de uvas de boa qualidade e seguir a sequência para o processo de vinificação, como mostra a **Figura 3**.

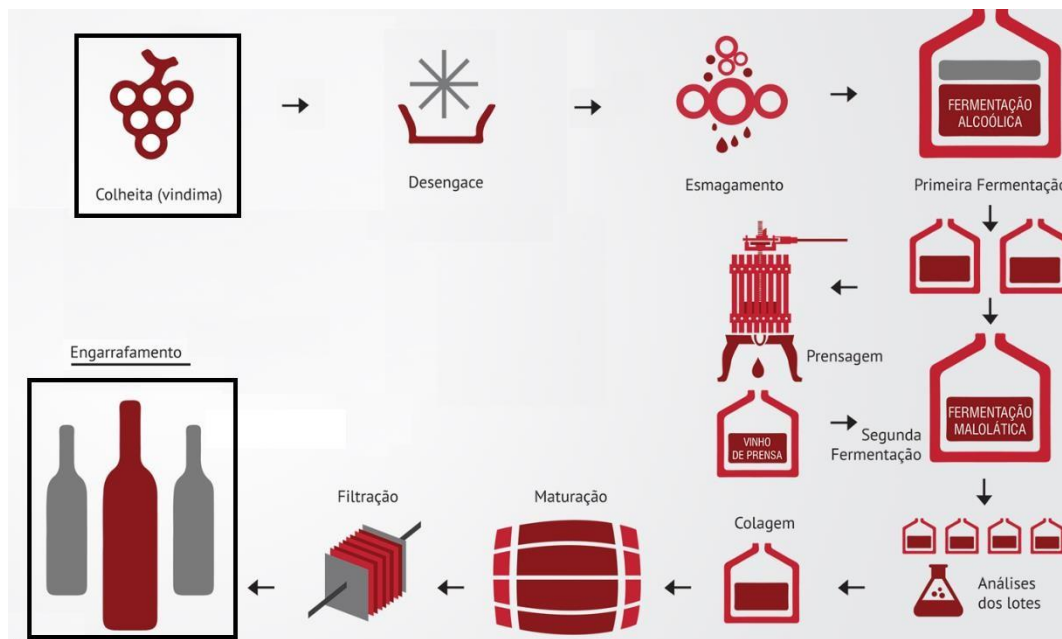


Figura 3 - Esquema do processo produtivo do vinho.

2.1.1. Composição mineral do vinho

A composição mineral do vinho reflete a sua origem e percursos particulares, sendo por isso singular e identificadora, contribuindo de forma substancial para as características sensoriais. Os metais Cu, Fe e Zn afetam as características organolépticas do vinho, incluindo sabor, aroma, cor e frescor, principalmente devido à formação de precipitados ou através da turvação durante as etapas do processo de vinificação, fermentação, maturação ou estocagem (CHRISTAKI e TZIA, 2002).

Alguns constituintes inorgânicos podem afetar todo o processo de produção do vinho principalmente devido à influência que exercem sobre as propriedades organolépticas da bebida. Elementos como Ca, K, Al, Cu, Mg e Na, influenciam a estabilidade, a cor e a limpidez do vinho (CADORE, MATOSO e SANTOS, 2008).

Metais como Fe, Zn, Mn e Cu são também indispensáveis no desenvolvimento de leveduras, visto que são importantes porque auxiliam na manutenção de processos biológicos. As leveduras absorvem metais através da sua membrana celular diminuindo assim os níveis de metais no vinho (ZOECKLEIN *et al.*, 1999).

Íons metálicos desempenham um papel importante na dieta humana, ou seja, pelo caráter de essencialidade. Muitos estudos revelam que o vinho é uma importante fonte de ferro e que a razão potássio/sódio desperta interesse para investigar o efeito do vinho na dieta em casos de hipertensão (CADORE, MATOSO e SANTOS, 2008).

Mas, numa perspectiva global, apesar da sua negligenciável importância nutricional e da sua contribuição fundamental para as características organolépticas do vinho, muita das pesquisas, estão voltadas fundamentalmente para os potenciais efeitos negativos que esses íons metálicos podem proporcionar (CATARINO, 2008).

2.1.2. Fontes de metais em vinhos e Legislação

A determinação de metais em vinhos é de grande importância para o controle da qualidade e da autenticidade dos vinhos, e para conhecer o grau de biodisponibilidade e toxicidade dos metais (PYRZÝNSKA, 2004). Altas concentrações dos íons Cu^{2+} , As^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} no vinho podem afetar as características organolépticas como aroma, sabor, cor e formam precipitados turvos durante as etapas de produção de vinificação, fermentação, maturação ou estocagem (CHRISTAKI e TZIA, 2002; PYRZÝNSKA, 2004), como também uma ingestão excessiva destes metais poderá acarretar uma possível intoxicação.

Segundo Mozaz *et al.* (1999), metais como Cu, Fe e Mn são responsáveis por alterações na estabilidade de vinhos envelhecidos e modificações da qualidade sensorial dos vinhos, ocasionando efeitos depreciativos (MOZAZ *et al.*, 1999). Este fenômeno é conhecido pelo termo inglês “Browning”, que envolve uma série de reações oxidativas dos compostos orgânicos contidos nos vinhos, ocasionando a perda do aroma e frescor e o aparecimento de precipitados tanínicos. Mas esses metais apresentam um importante papel na atividade fermentativa durante o processo de produção de vinho (RODRÍGUEZ *et al.*, 1999; GREEN, CLARK e SCOLLARY, 1997; GRINDLAY *et al.*, 2011).

A origem de metais em vinhos é oriunda de duas grandes fontes: a natural, que ocorre através das raízes. A outra fonte é causada pela ação humana, que pode ser dividida em três

subgrupos (KMENT *et al.*, 2005). O primeiro compreende o uso de fertilizantes e pesticidas no cultivo das uvas, o segundo está relacionado à poluição ambiental e trata-se da deposição do material particulado presente no ar sobre as uvas. Por último, durante o processo de produção com o uso de diferentes materiais nas vinícolas, incluindo aço inoxidável, alumínio, madeira e plásticos (TARIBA, PIZENT e KLJAKOVIC-GASPIC, 2011). De recipientes de aço inoxidável e latão, barris de carvalho, tubos e conexões incluem os elementos Cr, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn (KRISTL, VEBER e SLEKOVEC, 2002; ROSSANO *et al.*, 2007; TARIBA, PIZENT e KLJAKOVIC-GASPIC, 2011).

Zn e Mn são fontes durante a fermentação de leveduras, pois estão envolvidos na ativação enzimática (POHL, 2007). Cu e Zn ocorrem naturalmente no solo, mas seu conteúdo é influenciado por práticas agrícolas e contato direto com superfícies de tanques e tubos metálicos durante a vinificação. Os teores de Cr e Ni nos vinhos estão relacionados quase exclusivamente a fontes antropogênicas, devido à interação com recipientes metálicos (MARENGO e ACETO, 2003). O Cd é considerado um elemento antropogênico (HOPFER *et al.*, 2015) que pode se originar tanto do uso de fertilizantes, fungicidas e pesticidas no vinhedo quanto da poluição atmosférica (POHL, 2007). O teor de Pb nos vinhos está relacionado com os tratamentos fungicidas, materiais dos recipientes e tráfego de veículos, sendo a contribuição do solo mínima (MARENGO e ACETO, 2003).

Os níveis máximos de metais em vinho são regulamentados e fiscalizados por órgãos. O mais importante a nível mundial é a *International Organisation of Vine and Wine* (OIV), que regula a produção e comercialização de vinho no mundo (OIV, 2005). No Brasil, os limites para concentração no vinho são estabelecidos através do Decreto Federal nº. 99.066 de 08 de março de 1990, que regulamenta a Lei 7.678/88 do ministério da agricultura (BRASIL, 1990). O mercado comum do sul (MERCOSUL), importante grupo econômico dos países da América do Sul também estabelece limites para concentrações de metais em vinhos comercializados entre os países que pertencem ao grupo (MERCOSUL, 1996). A **Tabela 1** apresenta os teores máximos aceitáveis de metais em vinho pela OIV, Legislação Brasileira e Mercosul.

Tabela 1 - Limites máximos, em mg L⁻¹, de metais em vinho estabelecidos pela OIV, Legislação Brasileira e Mercosul.

Metais	Concentração (mg L ⁻¹)		
	OIV	Brasil	Mercosul
Arsênio (As)	0,2	0,2	0,2
Cádmio (Cd)	0,01	0,01	0,01
Chumbo (Pb)	0,15	0,3	0,3
Cobre (Cu)	1,0	1,0	1,0
Zinco (Zn)	5,0	5,0	5,0

Alguns elementos adquiriram uma prioridade de estudos superior a outros eventualmente por se encontrarem em concentrações que podem substancializar problemas de ordem toxicológica. Por essa razão, vários métodos têm sido propostos para determinar a concentração de metais em vinhos e com isso manter o controle da qualidade.

2.1.3. Determinação de Cobre em Vinhos

O desenvolvimento de novos métodos analíticos é importante para determinar a concentração de cobre estabelecida pelos diversos órgãos reguladores (<1,0 mg L⁻¹). Com isso, inúmeros métodos instrumentais têm sido relatados na literatura (COSTA *et al.*, 2021).

Alkis *et al.* (2014) quantificaram vários metais, incluindo o cobre, em diversos vinhos produzidos em quatro regiões da Turquia usando espectrômetro de absorção atômica (AAS) equipado com unidade de atomização eletrotérmica (ET). Os resultados para vinhos tintos e brancos para o íon Cu²⁺ foram de 131 e 158 µg L⁻¹, respectivamente.

Pessanha *et al.* (2010) determinaram Cu em diferentes fases de produção de vinho por meio da fluorescência de raios-X de reflexão total (TXRF) e fluorescência de raios-X de dispersão de energia (EDXRF). Quase todos os elementos presentes nas amostras de vinho e mosto não ultrapassaram os valores recomendados encontrados na literatura para vinho. Entretanto, o Cu nas folhas da vinha mais velha era extremamente alto, provavelmente devido ao uso excessivo de fungicidas à base de Cu para controlar o míldio da vinha. Maior teor de Cu também foi detectado nas uvas, embora não tão pronunciado. Relativamente ao vinho foi detectado um nível ligeiramente superior na vinha mais velha, embora não ultrapassando o valor recomendado.

Kontoudakis *et al.* (2019) criaram várias metodologias para a especificação de Cu no vinho e aquelas com desempenho superior foram utilizadas em 49 vinhos e comparadas com dados de composição. As estratégias analíticas adotadas foram potenciometria de stripping, HPLC e uma extração (fase sólida ou líquido-líquido) seguida de absorção atômica

Zengin and Gurkan (2021) sintetizaram um nanocomposto para ser usado seletivamente na separação controlada por pH, pré-concentração e análise de especificação de Cu (II) em amostras de vinhos. Uma boa linearidade foi obtida na faixa de 2 – 140 $\mu\text{g L}^{-1}$ com $r^2 > 0,993$. O limite de detecção obtido foi de 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtidos a partir de uma pré-concentração de 70 vezes. Os resultados foram comparados com os obtidos pela análise de FAAS e observou-se que houve boa concordância estatisticamente entre os resultados de ambos os métodos.

2.2. Julolidinas

Composto de julolidinas vêm recebendo enorme atenção da comunidade científica nas últimas décadas, sendo estudados há mais de um século devido às suas diversas propriedades e aplicações, sendo reportadas como substâncias com atividade antiviral (ZHANG *et al.*, 2018), sondas fluorescentes (SCHULZ-FINCKE *et al.*, 2018), corantes sensibilizantes para células solares (WU *et al.*, 2013), antidepressivos (VEJDELEK e PROTIVA, 1990) e materiais ópticos não lineares (LIU *et al.*, 2016). As julolidinas são derivadas da 2,3,6,7-tetraidro-1*H*,5*H*benzo[*ij*]-quinolizina e são compostos N-heterocíclicos. A **Figura 4** mostra algumas estruturas químicas das julolidinas e suas propriedades.

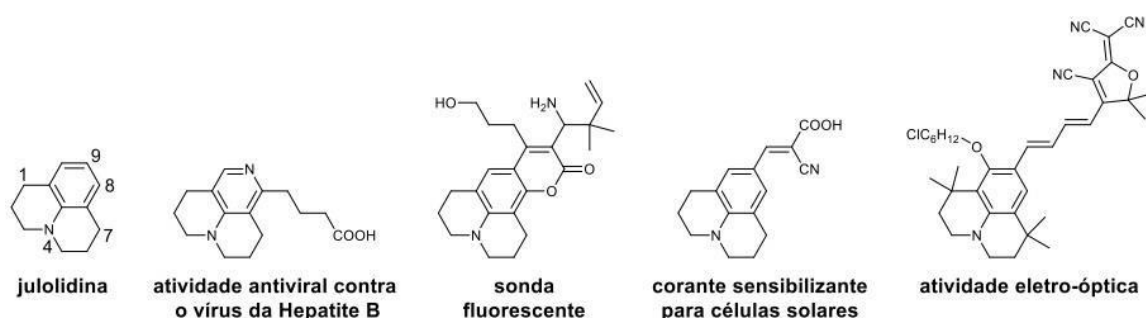


Figura 4 - Algumas estruturas químicas das julolidinas e suas propriedades.

Fonte: (PAIVA, 2021)

O primeiro registro de uma rota sintética para se obter uma estrutura básica das julolidinas, foi descrita por Pinkus, em 1892 (PINKUS, 1892). O método clássico para a síntese da julolidina consiste na *N* - alquilação de tetraidroquinolinas, formilamidas ou anilinas, geralmente utilizando 1-bromo-3- cloropropano (VAREJÃO; VAREJÃO; FERNANDES,

2019). Um exemplo do uso do método clássico na síntese de julolidinas foi reportado por Glass e Weissberger em 1955, onde, partindo da 1,2,3,4-tetraidroquinolina e 1-bromo-3-cloropropano sob aquecimento, obtiveram a julolidina com rendimentos variando de 77 a 81%. (GLASS; WEISSBERGER, 1955; PAIVA, 2021).

Por conta de suas propriedades fluorescentes, as julolidinas vêm sendo estudadas como sensores químicos para diversas aplicações (VAREJÃO; VAREJÃO; FERNANDES, 2019), como detecção de íons em solução aquosa (**Figura 5**) (GANESAN et al., 2019), detecção de compostos orgânicos voláteis (MARTINI et al., 2015) e na obtenção de imagens em células vivas (JI; DAI; ZHOU, 2019).

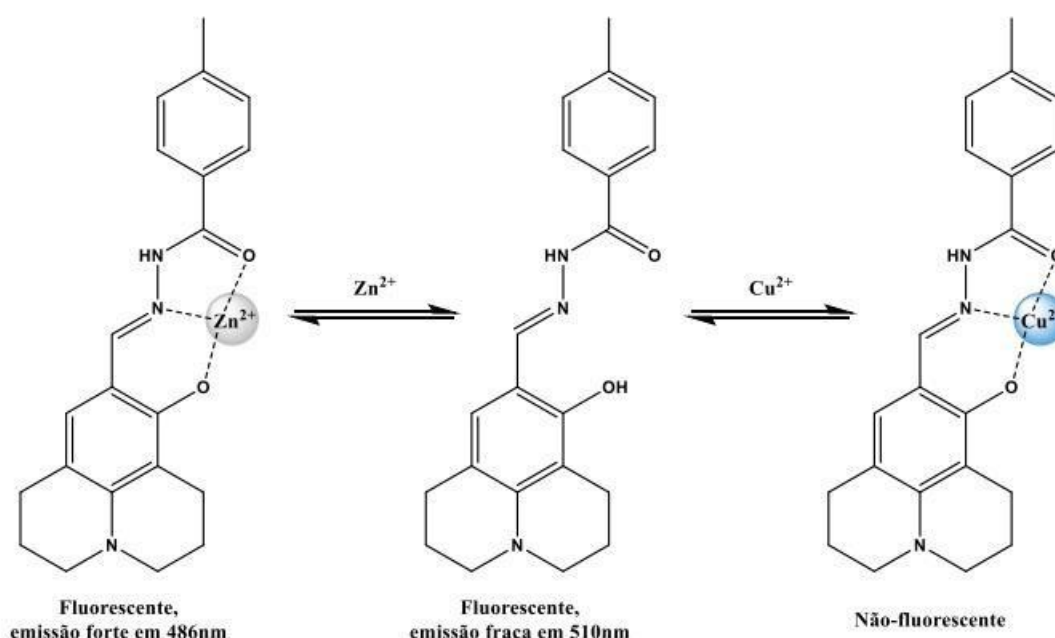


Figura 5 - Julolidina como sensor químico fluorescente para detecção de Zn²⁺ e Cu²⁺ reportado por Ganesan et al. (2019).

Fonte: Adaptado por Paiva (2021) de Ganesan *et al.* (2019).

2.3. Princípios de luminescência

A espectroscopia de luminescência molecular quando comparada com a espectrofotometria UV/Vis, apresenta maior sensibilidade, sendo consequência do baixo sinal de fundo que as moléculas fluorescentes apresentam. Além disso, a ampla faixa linear é outra vantagem que essa técnica apresenta e com isso, têm sido amplamente aplicada em análises de compostos de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial com baixos limites de detecção (SOTOMAYOR *et al.*, 2008).

A luminescência molecular é o fenômeno de emissão de luz de moléculas que foram excitadas, retornando ao seu estado fundamental. Quando essa emissão é dada pela absorção de fótons, esse fenômeno é chamado de fotoluminescência (VALEUR e BERBERAN-SANTOS, 2012). O fenômeno de luminescência pode ser dividido em fluorescência ou fosforescência, dependendo da natureza dos estados excitados. O primeiro compreende a transição do estado singlete excitado (S_1) para o fundamental (S_0), com tempo de vida na ordem de 10^{-9} a 10^{-6} s. A fosforescência, por sua vez, correspondente à transição do estado excitado tripleto (T_1) para o fundamental (S_0). Além disso, ela apresenta maior tempo de duração, geralmente entre 10^{-4} e 1 s (LAKOWICZ, 2006), conforme mostrado na **Figura 6**.

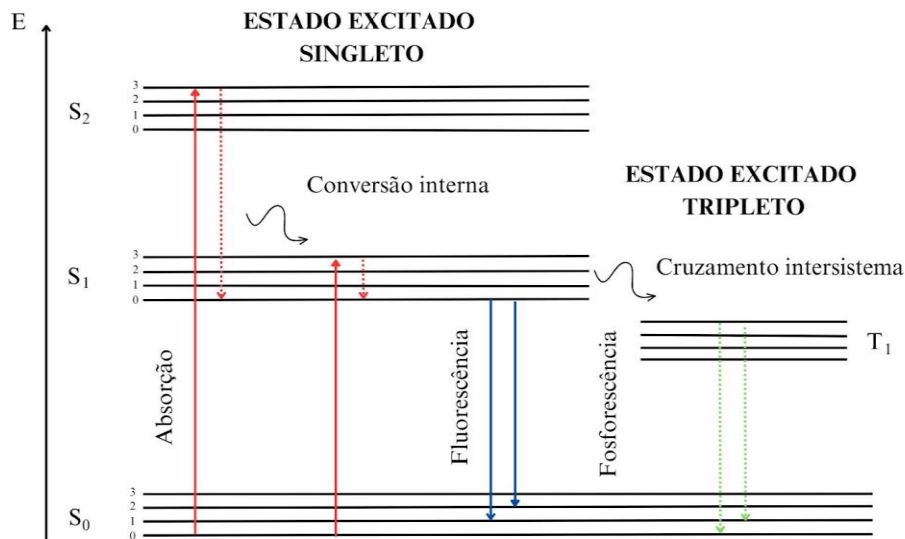


Figura 6 - Representação adaptada do diagrama de Jablonski.
Fonte: Própria autoria.

Agentes desativadores ou ativadores podem ser utilizados e o seu efeito na fluorescência medido pela relação de Stern-Volmer (**Equação 1**).

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_q[Q] \quad \text{Equação 1}$$

onde I_0 e I são as intensidades das fluorescências na ausência e na presença do agente desativador, Q a concentração do metal e K_q é a constante de Stern-Volmer.

2.4. Análise de imagens digitais

Métodos de análises químicas baseadas na formação de produtos coloridos a partir da reação de um analito de interesse com um reagente específico tem sido vastamente utilizados, sendo estes denominados de métodos colorimétricos. Sem dúvidas, a espectrofotometria na região do visível é a técnica mais aplicada nas análises colorimétricas quantitativas. A espectrofotometria tem se mostrado bastante robusta no que diz respeito às variedades de espécies químicas que podem ser analisadas (ROCHA e TEIXEIRA, 2004). Atualmente tem se buscado a diminuição do tamanho dos sistemas de análises espectrofotométricas a ponto da portabilidade, o que possibilita análises *in situ* e aquisição de dados em tempo real (STEIMLE, 2002). Entretanto, sistemas espectrofotométricos com dimensão reduzida e com boa precisão ainda possuem um custo relativamente elevado. Uma saída satisfatória nas análises colorimétricas seria a utilização de sistemas com detecção por dispositivos de capturas de imagens digitais (KOMPANY-ZAREH, MANSOURIAN, RAVAAE, 2002; WONGWILAI *et al.*, 2010).

2.4.1. Teoria das cores

A colorimetria utiliza de técnicas para identificação e quantificação baseadas nas cores perceptíveis pela visão humana. Na química, substâncias podem absorver determinado comprimento de onda na região do visível (380-780 nm). O olho humano consegue detectar a cor que não foi absorvida, ou seja, a cor observada é complementar à cor absorvida (HARRIS, 2005; SKOOG *et al.*, 2013; VOGEL *et al.*, 1989), como mostra a **Figura 7**.

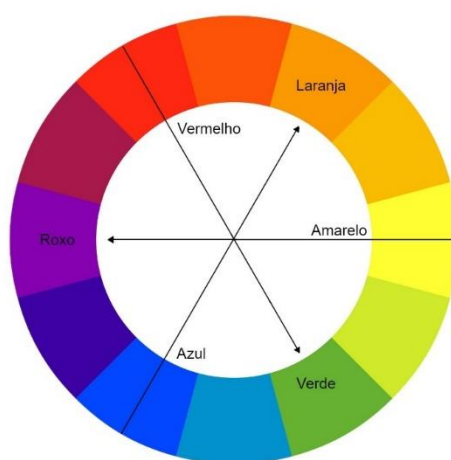


Figura 7 – Ilustração das cores e suas respectivas cores complementares.

Quando a luz entra em contato com a matéria, esta pode ser absorvida, refletida ou transmitida. No fenômeno de absorção, quando comprimentos de onda específicos são absorvidos, o restante é refletido e observa-se a cor complementar. Quando todos os comprimentos de onda são absorvidos, a cor preta é observada e quando nenhum comprimento de onda é absorvido, a luz branca é refletida. A luz branca compreende todas as cores presentes no espectro visível. Ainda, a luz pode ser transmitida e passar sem nenhuma modificação pelo material (HARRIS, 2005; SKOOG *et al.*, 2013; VOGEL *et al.*, 1989).

2.4.2. Modelo de cores em análises digitais

O modelo de cores RGB (do inglês, Red, Green e Blue) que utiliza as cores vermelha, verde e azul, em que conceito fundamental emprega todas as demais cores baseadas nas várias combinações destas três cores é o mais utilizado em métodos analíticos baseados no uso de imagens digitais (PACIORNIK *et al.*, 2006). A **Figura 8** mostra em um cubo a visualização da representação geométrica desse sistema em um espaço tridimensional.

Neste cubo, as cores vermelha, verde, azul, magenta, ciano e amarelo são representadas nos vértices do cubo, com intensidades variando de 0 a 255. Na origem (0, 0, 0), encontra-se o preto puro, ou ausência de cor, a qual não possui contribuição de nenhuma das cores primárias; e na extremidade oposta, encontra-se o branco, ou máximo de cor, a qual recebe a contribuição das três cores em suas intensidades máximas (255, 255, 255). Na diagonal, encontra-se a escala de cinza, formada pela adição das três cores nas mesmas proporções (R = G = B) (REIS, 2017).

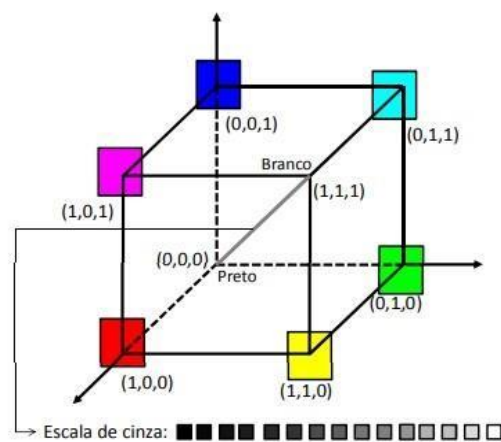


Figura 8 - Cubo tridimensional representativo do modelo de cores RGB e escala de cinza.
Fonte: (GONZALEZ and WOODS, 2008).

Apesar do modelo RGB ser o mais utilizado em análises baseadas em imagens digitais pelo fato dos valores R, G e B variarem de acordo com a concentração do analito e proporcionalmente com a cor resultante da reação colorimétrica, o modelo de cor conhecido pelas siglas CMY ou CMYK, que é baseado nas cores usadas nas impressoras, Ciano, Magenta e Amarelo – do inglês (Cyan, Magenta e Yellow), também é utilizado (PACIORNIK *et al.*, 2006). A combinação das cores primárias CMY deveriam absorver todos os comprimentos de onda da luz e, assim, produzir a cor preta. No entanto, isso não acontece, e um tom castanho escuro é produzido (YAM, 2004). Isso se deve ao fato de as tintas utilizadas para impressão não serem totalmente puras. Sendo assim, uma quarta cor, a cor preta (do inglês, black) se faz necessário para produzir um preto verdadeiro, ou preto puro, como mostra a **Figura 9**.

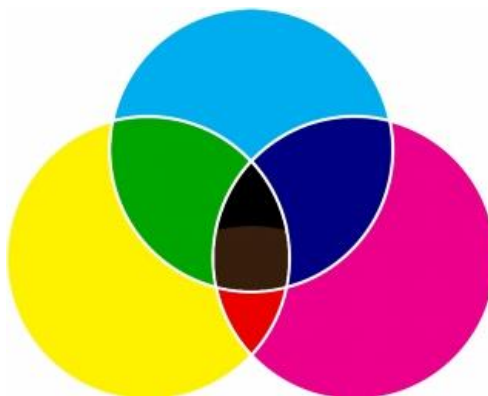


Figura 9 – Representação do modelo de cor CMYK.

2.4.3. Métodos analíticos baseados em análises digitais

Com o avanço tecnológico, o smartphone se torna essencial e mais comum no dia-a-dia da população, apresentando uma alta variedade de dispositivos e várias funções distintas. Pesquisas apontam que cerca de 5,1 bilhões fazem uso do dispositivo móvel, totalizando 67% da população mundial (VALENTE, 2019).

Monemi *et al.* (1999) desenvolveu o primeiro trabalho usando imagens digitais para determinar proteínas de ligação do retinol por quimiluminescência (MONEMI *et al.*, 1999). Desde então, tem se aumentado o uso de imagens digitais em química analítica, mostrando ser um método promissor e o emprego de smartphones para a obtenção de sinal analítico vem ganhando muito destaque devido aos inúmeros benefícios que o método apresenta, como baixo custo de implementação, fácil manuseio, portabilidade, podendo monitorar parâmetros ambientais, de alimentos e bebidas.

Lobregas *et al.* (2019), desenvolveram uma sonda através de nanopartículas de prata seletiva para a detecção colorimétrica de Hg^{2+} . Verificou que a cor marrom escura da sonda diminuiu à medida que aumentava a concentração de Hg^{2+} . Foi possível detectar Hg^{2+} numa concentração maior ou igual a 350 ppm com limites de detecção de $2,92 \times 10^{-4}$ M.

Singkhonrat *et al.* (2019), avaliou a oxidação lipídica em óleos por colorimetria através da captura de imagens digitais usando o image-J para a decomposição das imagens adquiridas. O método quando comparado com o método espectroscópico UV-Vis se mostrou preciso. O limite de detecção foi de 0,175 meq. O_2 /Kg.

Ballesteros *et al.* (2021), desenvolveram um método utilizando um reagente colorimétrico natural (*Camellia sinensis*) para a detecção colorimétrica de ferro baseada na análise de imagem digital, em que se mostrou um método analítico simples, econômico e ecológico. O método baseou-se na decomposição do sinal obtido pelos canais R, G e B do complexo violeta formado pela reação do Fe (III) com os polifenóis presentes no chá verde. uma faixa linear de 2,5 a 17,5 mg L^{-1} de Fe (III) foi obtida com uma sensibilidade de calibração de 5,96 au L mg^{-1} . O limite de detecção e limite de quantificação calculados foram 0,9 mg L^{-1} e 1,6 mg L^{-1} , respectivamente. O desvio padrão relativo para a análise de soluções padrão de Fe^{3+} de concentrações de 6,0 e 14,0 mg L^{-1} , foram de 1,5% e 0,8%, respectivamente. O método proposto foi aplicado para a determinação da quantidade de Fe em suplementos dietéticos produzindo resultados estatisticamente concordantes com os obtidos pela FAAS.

2.5. Tecnologia de impressão 3D

A tecnologia chamada hoje de impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva, é a técnica de construir sólidos tridimensionais, camada por camada, geralmente ocorrendo através da impressão de sucessivas camadas bidimensionais umas sobre as outras, até formar o objeto. O primeiro objeto impresso pela primeira vez foi por Kodama (1981), porém problemas com relação a patentes creditam o mérito da descoberta a Charles Hull (1986) (KODAMA, 1981; HULL, 1986). Essa técnica se difere da modelagem 3D, onde o produto planejado é retirado de um material bruto, em forma geométrica básica que atenda aos requisitos do produto a ser moldado. Por essa diferença, a impressão 3D propicia economia de material em relação à modelagem 3D (AGUIAR, 2016).

A impressão 3D permite a criação de infinitas formas e estruturas que não poderiam ser criadas ou teriam dificuldade de serem fabricadas através de tecnologias tradicionais e com isso, foi vista como uma solução para a construção de protótipos rápidos para a indústria (MALLAKPOUR *et al.*, 2021). Porém, na atualidade, o seu uso já ultrapassou a finalidade inicial, visto que esta técnica está sendo aplicada em outras áreas, como na medicina, bioengenharia, construção civil, na área de alimentos e eletrônicos, ciência forense, entre outras.

O primeiro método desenvolvido nos anos 80 foi a estereolitografia (SLA), sendo seguida por diversos outros métodos como Modelagem por Fusão e Deposição (FDM), Sinterização Direta a Laser de Metal (DMLS), Fusão de Feixe de Elétrons (EBM), Polyjet, Sinterização Seletiva a Laser (SLS), Fabricação de Objetos Laminados (LOM), Processamento de Luz Direta (DLP), Derretimento Seletivo a Laser (SLM) e Jato de Tinta (Inkjet) (BHATIA e SEHGALI, 2021). A **Figura 10** apresenta uma visão geral das principais tecnologias de impressão 3D.

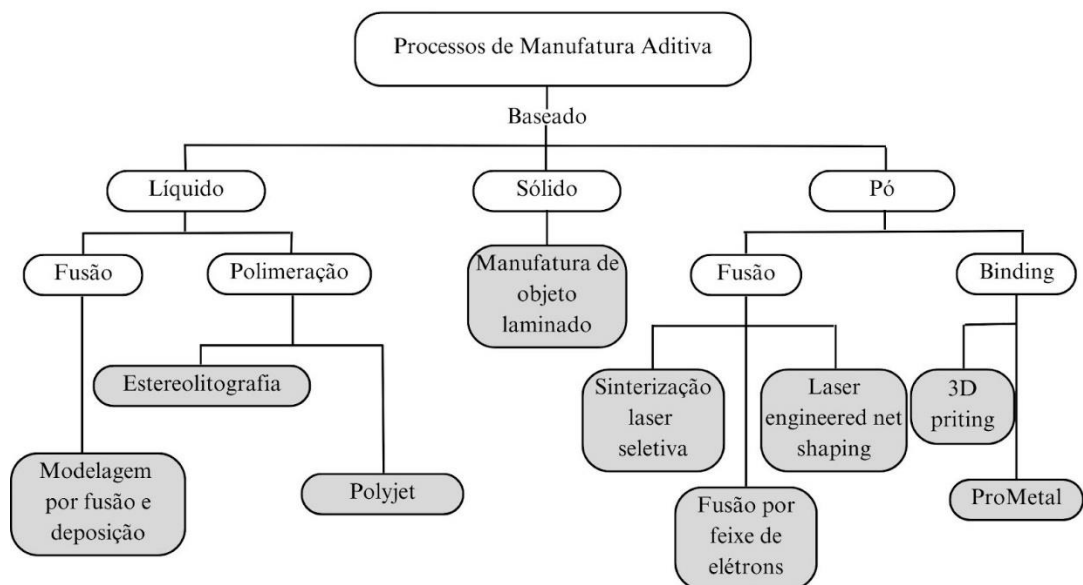


Figura 10 - Tipos de tecnologia para impressão 3D.
Fonte: Adaptada (SRIVATSAN and SUDARSHAN, 2016).

Entre as diversas tecnologias, a de modelagem por fusão e deposição (FDM) foi aquela que mais se popularizou e é um dos processos mais utilizados em impressão 3D (GROSS *et al.*, 2014; SHALLAN *et al.*, 2014). Embora o método de construção seja menos preciso quando comparado a outras técnicas de prototipagem rápida (como SLA e SLS, por exemplo), ele é mais barato quando comparado com essas técnicas e apresenta grande versatilidade, permitindo

o uso de diversos materiais poliméricos, sendo os mais utilizados, o ácido polilático (PLA) e o copolímero acrilonitrila butadieno estireno (ABS). No entanto, outros filamentos termoplásticos vem sendo explorados, como o álcool polivinílico (PVA), polietileno tereftalato (PET), náilon, madeira e termoplástico elastomérico (TPE), com possibilidade de combinar diferentes materiais para construção de uma única peça (DUARTE, 2016).

3. OBJETIVO

3.1. Geral

O objetivo principal deste trabalho foi empregar o fluoróforo imino-julolidina com grupo OH (IJO) como sensor químico fluorescente na determinação de cobre em vinhos comerciais empregando análise de imagens digitais.

3.2. Específico

- Caracterizar a IJO para obter informações a respeito da sua estrutura;
- Estudo das condições ótimas de reação para obtenção da melhor resposta analítica para quantificação de íons Cu^{2+} , como efeito de pH, concentração de IJO, interferência de íons metálicos;
- Empregar a IJO para a determinação de Cu^{2+} em vinhos através do aumento da intensidade fluorescente;
- Comparação do método utilizando um espectrofluorímetro com o método baseado na análise de imagens digitais e impressão 3D usando câmara Vis-LED, mostrando a seletividade e eficaz do método.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais e Soluções

As soluções dos íons metálicos, que foram os possíveis interferentes, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Al^{3+} , As^{3+} foram preparadas a partir dos seus sais de nitrato ou sais de cloreto de grau analítico com água

ultrapura (resistividade > 18,0 MΩ cm) obtida de um sistema Millipore Milli-Q (EUA). A solução estoque de Cu²⁺ 50,0 mg L⁻¹ foi preparada a partir da dissolução de 0,196 g de CuSO₄.5H₂O em 1 L de água destilada.

A IJO foi sintetizada por Paiva (2021) no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa – Viçosa/MG. A solução de IJO de 30,0 g L⁻¹ foi preparada a partir da dissolução de 0,60 g de IJO sintetizada em 20 mL de etanol.

As seis amostras reais de vinho tinto das marcas (S1) Argentino Viejo Viñedo Tinto 750 mL, (S2) Chileno Travessia Assemblage Tinto 750 mL, (S3) Galiotto Tinto Suave 1L, (S4) Pérgola Tinto Suave 1L, (S5) Português Praça dos Marqueses Tinto 750 mL e (S6) Ravanal Cabernet Sauvignon Tinto 750 mL foram adquiridas em supermercados da cidade de Viçosa-MG.

4.2. Instrumentação

Os espectros no UV-Visível foram adquiridos em espectrofotômetro Thermo Scientific modelo Evolution Array (PAÍS). Os experimentos de espectroscopia de infravermelho por transformação de Fourier (FTIR) foram conduzidos em um espectrofotômetro FTIR Varian 660 equipado com GladiATR para caracterizar os grupos funcionais na IJO. Os valores foram expressos em números de onda (cm⁻¹) e registrados no intervalo de 4000-400 cm⁻¹. O pH foi monitorado em um pHmetro de bancada (Mettler Toledo, EUA). Os espectros de absorção UVVis foram registrados num espectrofotômetro Lambda 950 UV-Vis com uma cubeta de quartzo de 1,0 cm à temperatura ambiente (Perkin-Elmer, EUA).

4.2.1. Espectrofluorímetro

Os espectros de emissão de fluorescência foram registados por espectrofluorímetro FluoroMax® series (Horiba, França) e um Avaspec-HS2048XL (Avantes, Holanda) usando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm.

4.2.2. Câmara Vis-LED

A câmara utilizada para a aquisição das imagens das soluções fluorescentes foi construída com papel cartão com dimensões de 23 cm largura × 15 cm altura × 11 cm de profundidade, contendo quatro diodos emissores de luz (LED) emitindo no comprimento de

onda máximo de 420 nm. A **Figura 11**, a câmara construída por Da Silva (2020), que foi similar a utilizada no método proposto.

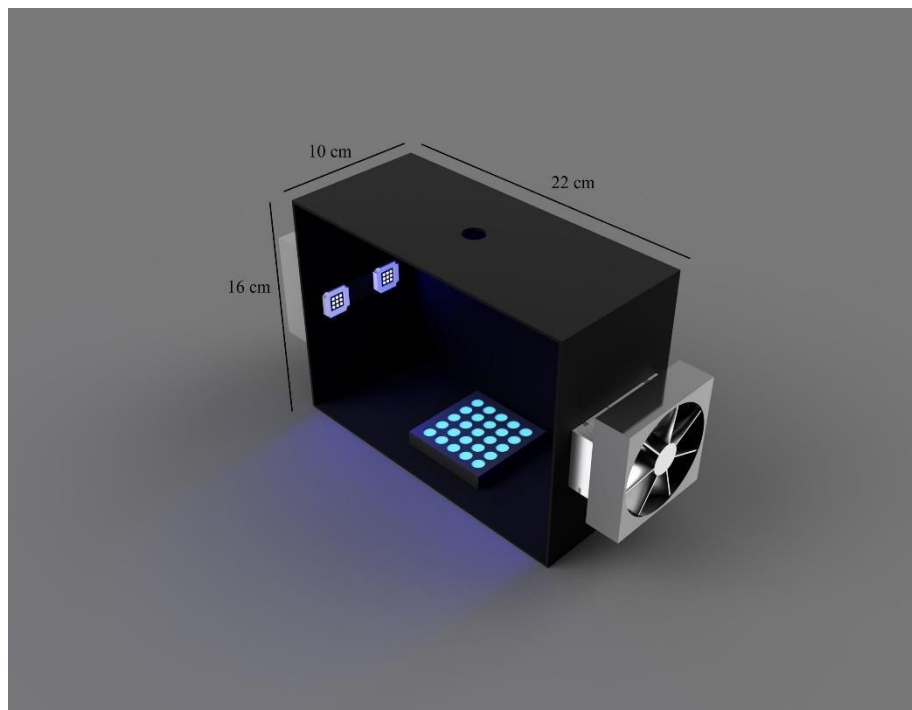


Figura 11 – Representação gráfica da câmara Vis-LED com a placa reacional confeccionada em impressora 3D.

Fonte: Da Silva *et al.*, 2020.

A **Figura 12** mostra a molécula de IJO sem fluorescer (A) e quando recebe radiação com comprimento de onda de 420 nm na câmara Vis-LED, resultando na sua fluorescência (B).

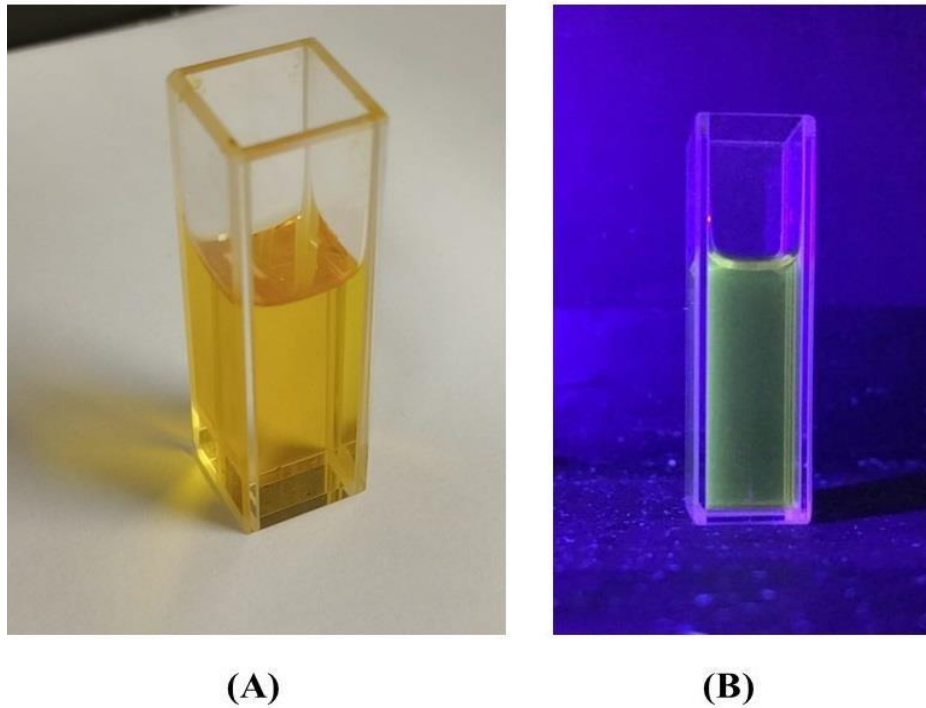


Figura 12 - (A) molécula de IJO sem sofrer fluorescência e (B) molécula de IJO fluorescente.
Fonte: Própria autoria.

4.2.2.1. Placa 3D

A placa utilizada como meio reacional foi impressa com poliácido láctico (PLA, do inglês polylactic acid) (0,5 de altura, 3,0 cm largura e 3,0 cm de comprimento) através de uma impressora 3D Creality Ender 3 Pró, utilizando-se do programa fatiador Ultimaker Cura 4.5. A placa utilizada, como mostra a **Figura 13**, possui cavidade com volume máximo de 30 μL .



Figura 13 - Placa 3D impressa em PLA.
Fonte: Própria autoria.

4.2.2.2. Aquisição de imagens

As imagens digitais foram adquiridas colocando um smartphone *Moto G31* sobre a abertura na parte superior da câmera Vis-LED e posteriormente analisadas pelo aplicativo *Color Grab* instalado no smartphone.

4.3. Estudo da estabilidade luminescente da IJO

Para demonstrar a fotoestabilidade da IJO sintetizada, as soluções foram irradiadas durante 30 dias com um comprimento de excitação de 420 nm e seus espectros monitorados em 480 nm.

4.4. Estudo do pH para IJO

A fim de verificar o efeito do pH na influência do sinal luminescente da IJO foi realizado um estudo na faixa de pH de 3 a 10. O pH das soluções de IJO foram ajustados usando soluções de NaOH e HCl 0,05 mol L⁻¹.

4.5. Estudo da influência da força iônica

Para verificar se a força iônica influencia na intensidade de luminescência da IJO, foram realizados ensaios adições de NaCl de 0 a 1 mol L⁻¹ com incrementos de 0,2 mol L⁻¹.

4.6. Seletividade

A seletividade de um método analítico é a capacidade que este possui de medir exatamente as substâncias de interesse na presença de outros componentes que possam interferir na análise (ANVISA, 2013). A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes; e garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (VESSMAN *et al.*, 2001). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2011).

A fim de verificar se há interferência na determinação de Cu²⁺ a partir de IJO para o método usando espectrofluorímetro e câmara Vis-LED através da aquisição de imagens digitais, foi realizado um estudo em que vários metais em condições idênticas foram testados na

proporção 1:1 e 1:10 de analito/interferente. Os metais avaliados foram: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Al^{3+} e As^{3+} .

4.7. Determinação de Cu^{2+} empregando IJO

4.7.1. Espectrofluorímetro

A fim de aumentar a intensidade do sinal luminescente, estudos foram realizados e obteve-se uma diluição ótima de IJO em etanol. De acordo com os resultados obtidos, a melhor diluição foi de 50 μL de IJO para 2,95 mL de etanol. Para a determinação luminescente de Cu^{2+} utilizando o espectrofluorímetro, 3 mL da solução de IJO diluída foram transferidos para uma cubeta de quartzo de 1,0 cm com quatro lados polidos, juntamente com o volume da solução padrão de Cu^{2+} , de acordo com as concentrações desejadas. O tempo de espera foi de 5 min para que ocorresse a interação das partículas e logo após, obteve-se os espectros de emissão luminescente em triplicata.

4.7.2. Câmara Vis-LED

Como no método anterior, estudos foram realizados e observou-se que um melhor sinal foi obtido sem a diluição da IJO. Para a determinação luminescente de Cu^{2+} utilizando a câmara Vis-LED, 20 μL da solução de IJO foram transferidos para a placa 3D juntamente com um volume de 10 μL da solução padrão de Cu^{2+} , de acordo com as concentrações desejadas. O tempo de espera foi de 5 min para que ocorresse a interação das partículas e logo após, obteve-se as imagens digitais em triplicata

4.8. Veracidade

O teste de recuperação é um teste de exatidão aplicado para avaliar possíveis efeitos de matriz, uma vez que a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no sinal analítico de interesse (THOMPSON *et al.*, 1999).

Ensaio de recuperação de Cu^{2+} foram realizados em três níveis de concentração para cada método proposto, sendo para o método utilizando o fluorímetro 1,0, 3,0 e 5,0 mg L^{-1} e 4,0, 7,0 e 10,0 mg L^{-1} para o método utilizando a Câmara Vis-LED. As amostras reais de vinhos não precisaram de nenhum tratamento prévio devido ao baixo volume utilizado. Obteve-se, então, os espectros de emissão para as amostras de vinhos. A recuperação percentual foi determinada através da **Equação 2**.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{c_1 - c_2}{c_2} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde:

C_1 = concentração determinada na amostra adicionada,

C_2 = concentração adicionada,

A recuperação está inteiramente ligada a exatidão do método, mostrando a quantidade do analito recuperada em comparação com a quantidade real presente na amostra (BRITO *et al.*, 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da IJO

5.1.1. Luminescência

A luminescência é uma das técnicas mais empregadas para a caracterização de moléculas que apresentam fluorescência, devido aos rendimentos quânticos de fluorescência elevados.

Nesse estudo, 3 mL de solução de IJO foi submetida a excitação em diferentes comprimentos de onda, com incrementos de 20 unidades variando entre 360 a 440 nm (**Figura 14**).

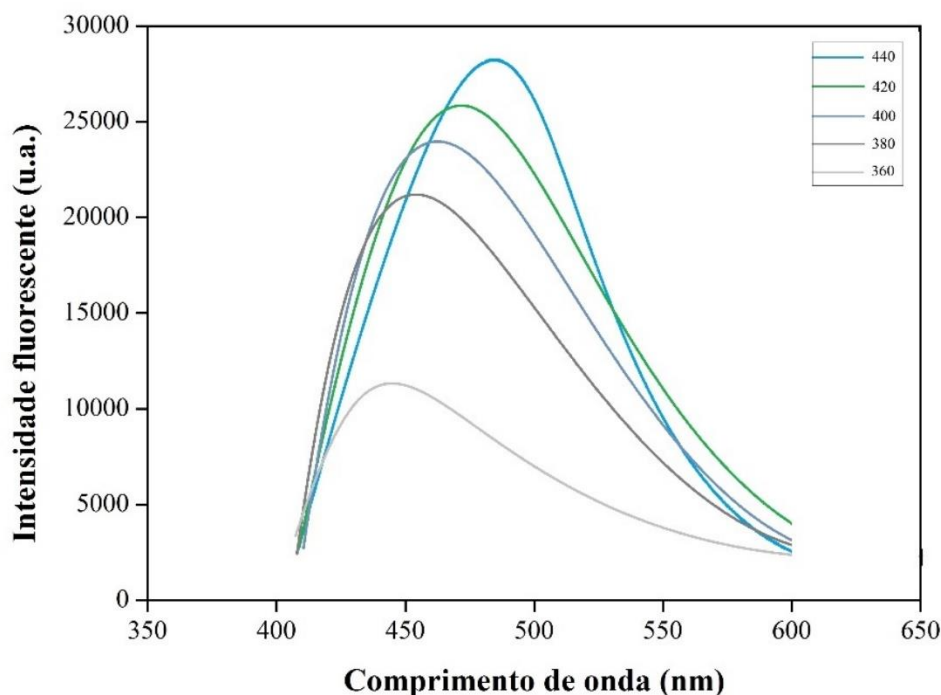


Figura 14 - Espectro de luminescência da IJO com excitação de 360 a 440 nm.

De acordo com os espectros obtidos, observa-se uma alta capacidade luminescente da IJO em todo o intervalo de comprimento de onda analisado, tendo os picos de maiores intensidades de emissão na faixa de 400 a 440 nm. Sendo assim, o comprimento de onda de 420 nm foi selecionado para estudos posteriores usando o método fluorímetro e para a confecção da câmara Vis-LED, onde seria observada a fluorescência da IJO através da análise de imagens digitais, foram empregados quatro diodos emissores de luz visível (LED) com um comprimento de onda máximo de emissão em 480 nm.

5.1.2. Espectrofotometria UV/VIS

De acordo com o espectro UV/Vis da **Figura 15**, observa-se que possui uma banda em aproximadamente 210 nm que pode ser característica de ligações R-OH com transição eletrônica de natureza $n-\sigma^*$, uma banda em aproximadamente 260 nm característica de ligações aromáticas C=C com transição eletrônica de natureza $\pi-\pi^*$ e outra banda bem definida em torno de 350 nm, característica de R-N=R' com transição eletrônica de natureza $n\pi^*$.

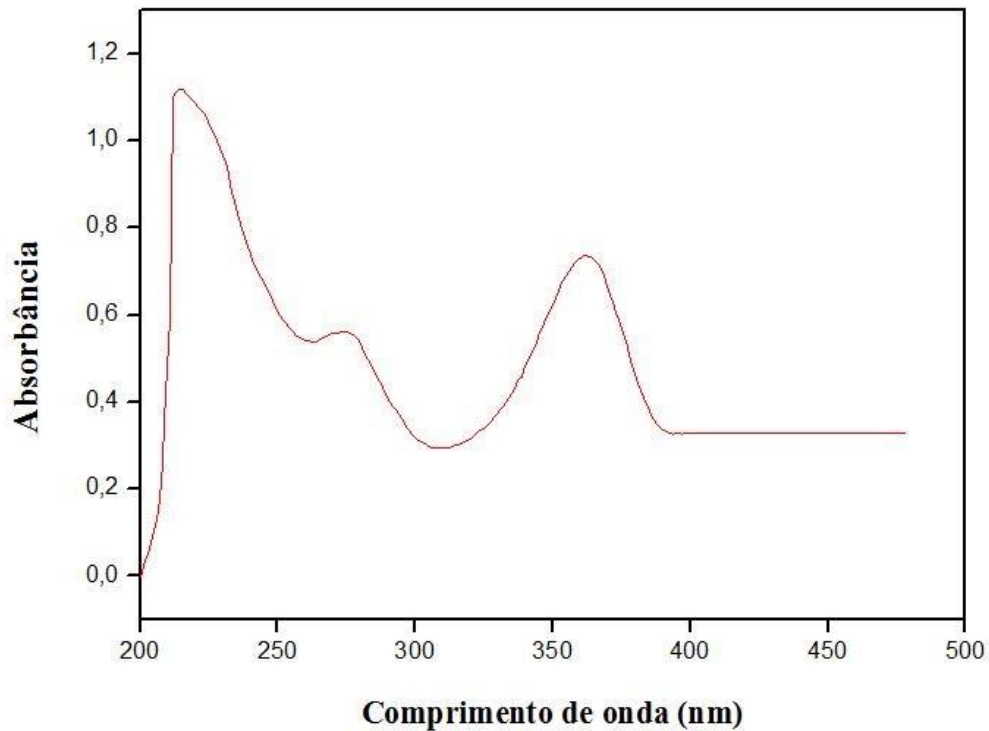


Figura 15 - Espectro UV/Vis da IJO.

5.1.3. Infravermelho

No espectro obtido na região do infravermelho (**Figura 16**) foram observadas bandas características de absorção do estiramento das ligações C_{sp^3} -H em 2939 e 2845 cm^{-1} . A banda em 1614 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C=C, e em 1589 cm^{-1} ao estiramento da ligação C=N. Em 1460 e 1370 cm^{-1} foi possível notar as bandas correspondentes ao estiramento e à deformação angular da ligação C-N, respectivamente. Em 746 e 528 cm^{-1} podemos notar duas bandas de deformação angular das ligações C_{sp^2} -H e C=C (PAIVA, 2021).

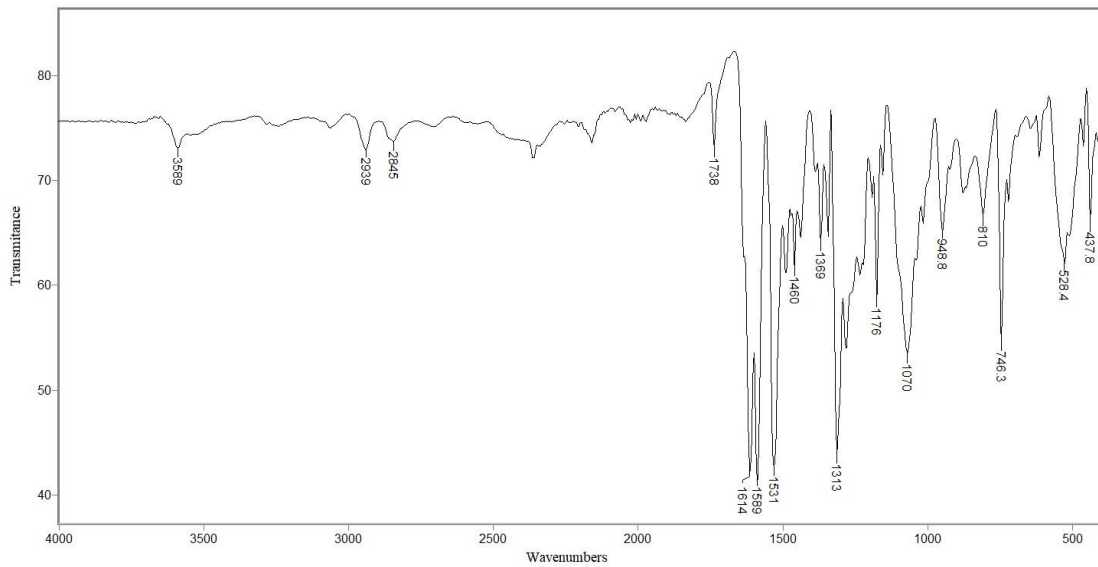


Figura 16 - Espectro no infravermelho da IJO.

5.2. Estudo da estabilidade luminescente

A fim de estudar a estabilidade luminescente, a solução de IJO foi irradiada durante um mês com um comprimento de onda de excitação em 420 nm.

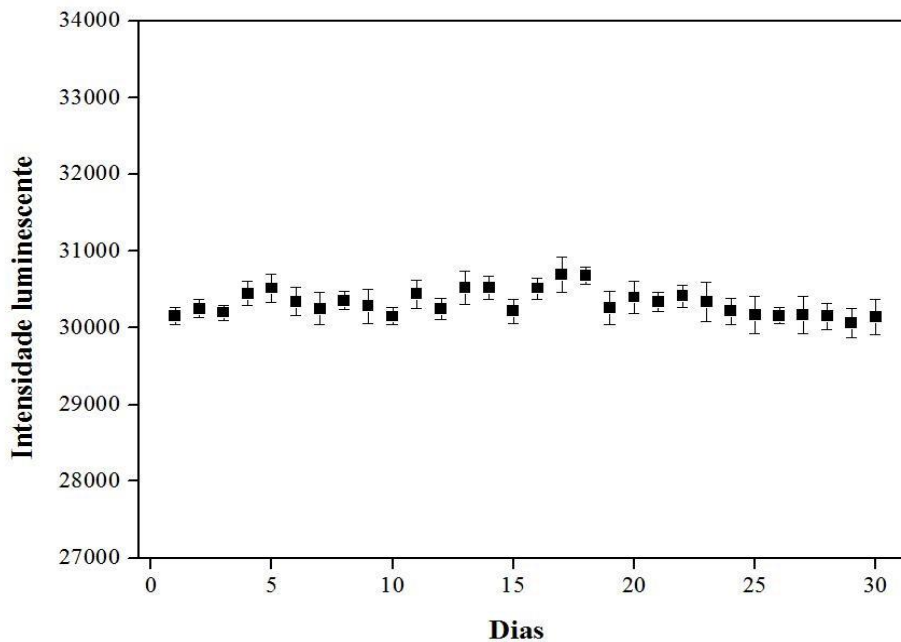


Figura 17 - Intensidades de fluorescência da IJO com emissão em 480 nm (excitação a 420 nm) em função do tempo.

Como observado na **Figura 17**, a solução de IJO manteve sua estabilidade luminescente durante o período de um mês, mostrando que é altamente foto-estável e resistente a fotodegradação.

5.3. Estudo do pH

A **Figura 18** mostra como ocorre a variação da intensidade luminescente em função do pH.

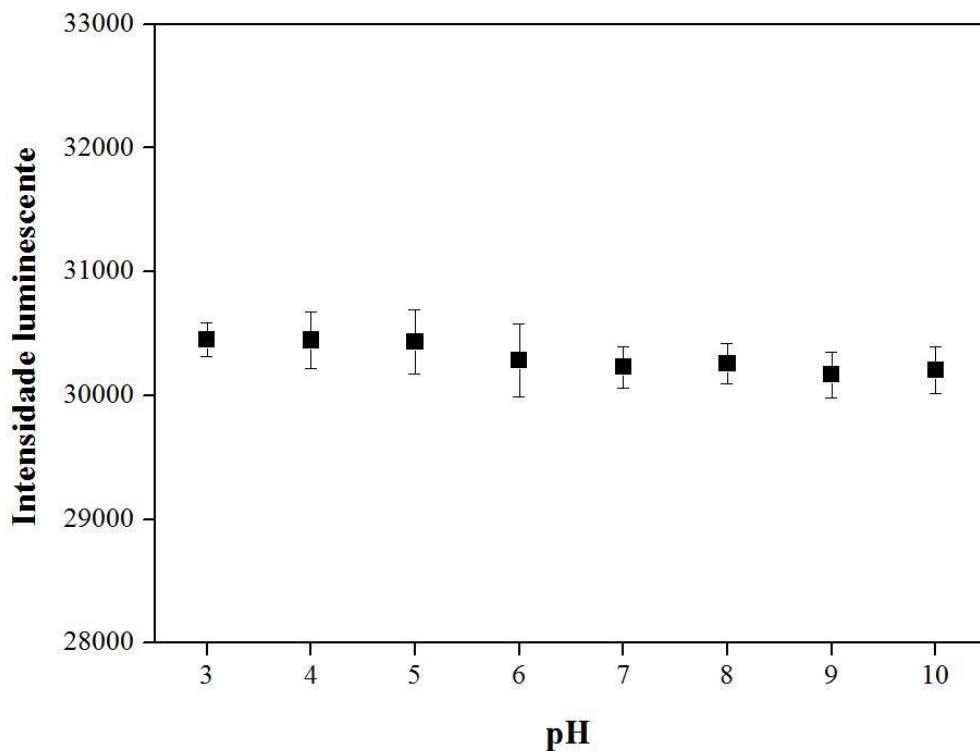


Figura 18 - Intensidades de fluorescência da IJO com emissão em 480 nm (excitação a 420 nm) com diferentes valores de pH.

Nota-se que não teve diferença significativa na intensidade luminescente na faixa de pH de 3 a 10, mantendo-se praticamente a mesma intensidade luminescente.

5.4. Estudo da força iônica

A fim de estudar a intensidade luminescente da IJO quando submetida ao aumento da força iônica, realizou-se o estudo em pH fixo em 7 com adição crescente de concentração de NaCl de 0,0 a 1,0 mol L⁻¹ com incrementos de 0,2 mol L⁻¹.

A **Figura 19** apresenta o resultado do estudo da intensidade luminescente da IJO quando submetida a um aumento da força iônica do meio.

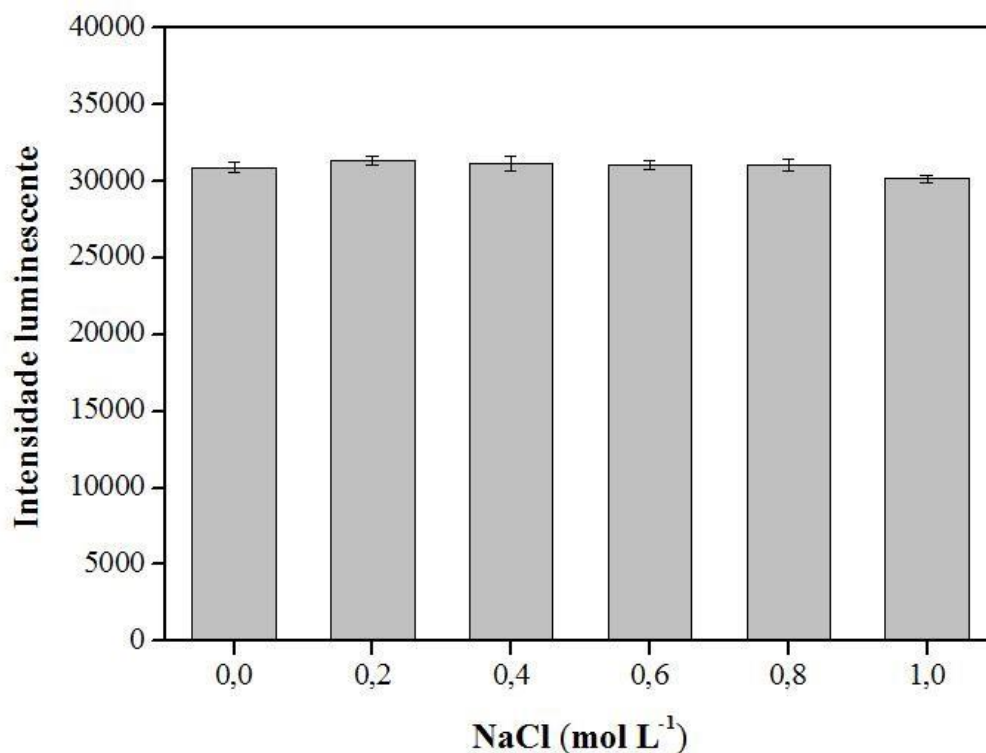


Figura 19 - Histograma da intensidade de fluorescência da IJO em solução aquosa de NaCl em função da força iônica.

Pelo histograma da **Figura 19**, é possível observar que não teve mudança significativa na intensidade luminescente da IJO quando submetida ao aumento da força iônica do meio, mostrando uma alta estabilidade da IJO.

5.5. Seletividade

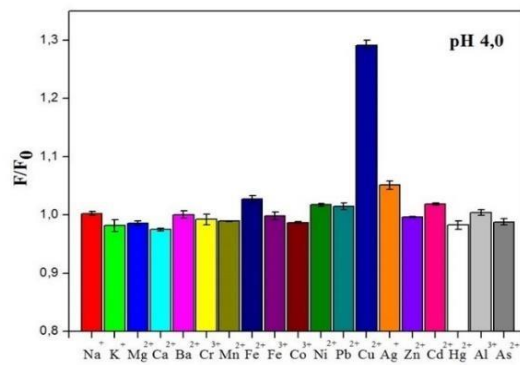
Com o intuito de utilizar a IJO na determinação do íon Cu^{2+} , realizou-se um estudo da viabilidade de sua utilização sem qualquer modificação na estrutura baseado na análise da atenuação da fluorescência da IJO quando há presença de íons Cu^{2+} e demais metais que possivelmente poderiam estar presentes no vinho. Com isso, estudou-se a seletividade do método para o íon Cu^{2+} .

5.5.1. Espectrofluorímetro

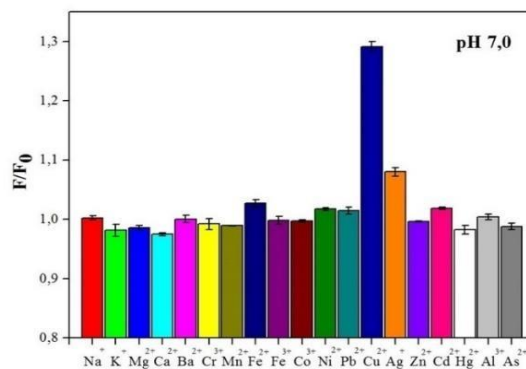
A **Figura 20** apresenta o estudo do sinal de emissão para soluções de vários íons de metais na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de Cu^{2+} na concentração de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ em meio ácido ($\text{pH} = 4,0$), neutro ($\text{pH} = 7,0$) e básico ($\text{pH} = 10,0$), utilizando IJO e fluorímetro.

Observa-se que houve um aumento significativo da intensidade fluorescente para os íons Cu^{2+} e Ag^+ quando analisados em pH básico. No pH ácido e neutro houve um aumento significativo apenas para o íon Cu^{2+} . Com o intuito de se obter a seletividade apenas para o íon Cu^{2+} não foi necessária nenhuma alteração na estrutura da IJO, sendo o pH 7,0 escolhido para a realização de estudos posteriores.

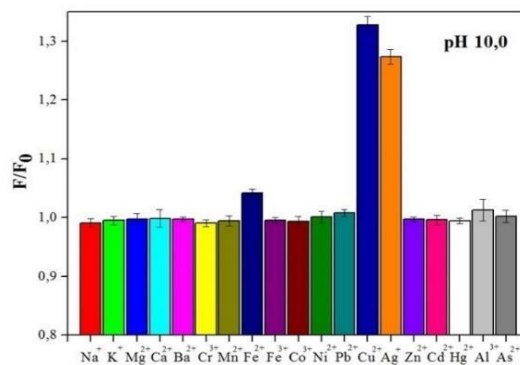
Neste estudo foi observado que alguns metais podem ser interferentes para análise de Cu (II) em vinhos. Assim, o grau de interferência de alguns íons foi testado com concentrações de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a fim de assegurar a seletividade do método como mostra a **Tabela 2**.



(A)



(B)



(C)

Figura 20 - Diferença entre as intensidades luminescentes relativas da IJO com diferentes íons metálicos na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em (A) pH ácido (4,0), (B) pH neutro (7,0) e (C) pH básico (10,0).

Tabela 2 - Estudo da interferência na determinação de Cu (II) em amostras de vinhos usando o método empregando um fluorímetro (n=18).

Interferente	Razão Cu²⁺: Interferente	Erro relativo (%)
Na(I)	1:1	+1,23
	1:10	-1,56
K(I)	1:1	+2,17
	1:10	+1,99
Mg(II)	1:1	+2,65
	1:10	+2,57
Ca(II)	1:1	+1,48
	1:10	-1,75
Ba(II)	1:1	+2,02
	1:10	-1,87
Cr(III)	1:1	-2,50
	1:10	-3,25
Mn(II)	1:1	+1,87
	1:10	+2,64
Fe(II)	1:1	+4,10
	1:10	+2,60
Fe(III)	1:1	+2,80
	1:10	+5,80
Co(III)	1:1	+3,05
	1:10	+2,96
Ni(II)	1:1	-4,90
	1:1	+5,40
Pb(II)	1:10	-5,77
	1:1	+5,01
Ag(I)	1:10	+4,42
	1:1	+2,35
Zn(II)	1:10	+3,76
	1:1	-4,33
Cd(II)	1:10	-2,36
	1:1	+4,81
Hg(II)	1:1	

	1:10	+2,19
Al(III)	1:1	+0,79
	1:10	-1,19
As(II)	1:1	+3,64
	1:10	+2,87

Verificou-se que nenhum dos metais apresentou interferência superior à $\pm 10\%$ nas proporções de 1:1 e 1:10, garantindo assim, a seletividade do método.

5.5.2. Câmara Vis-LED

Partindo do estudo de seletividade realizado pelo método do fluorímetro, realizou-se o mesmo para o método câmara Vis-LED apenas em pH neutro (7,0).

A **Figura 21** apresenta o estudo do sinal de emissão para soluções de vários íons de metais na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de Cu^{2+} na concentração de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ em pH neutro (7,0), utilizando IJO e câmara Vis-LED.

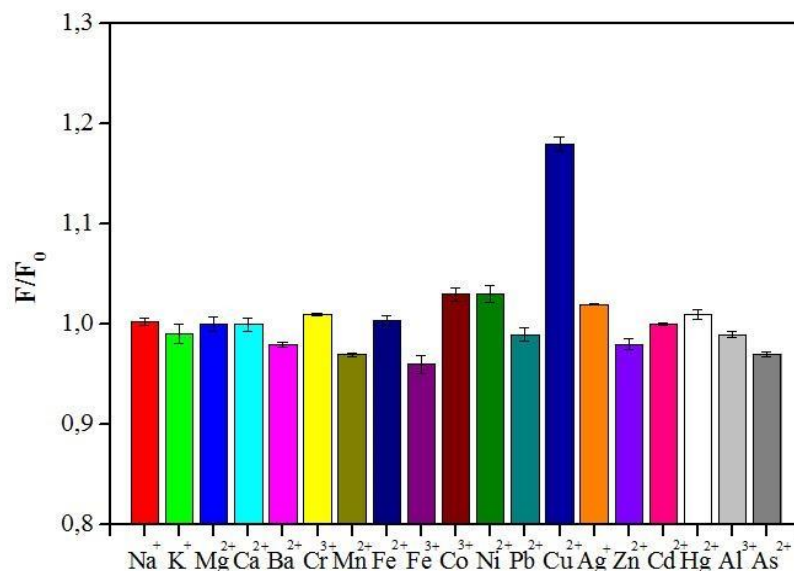


Figura 21 - Diferença entre as intensidades luminescentes relativas da IJO com diferentes íons metálicos na concentração de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em pH neutro (7,0).

Na **Figura 21** observa-se resultado semelhante ao obtido pelo método do fluorímetro, onde houve aumento significativo da intensidade fluorescente apenas para o íon Cu^{2+} . Sendo a IJO seletiva na determinação de íon Cu^{2+} e não necessitando de nenhuma alteração em sua estrutura.

A **Tabela 3** apresenta o estudo de interferência para alguns possíveis íons que podem interferir na determinação de Cu (II) para o método câmara Vis-LED.

Tabela 3 - Estudo da interferência na determinação de Cu (II) em amostras de vinhos usando o método com câmara Vis-LED (n=18).

Interferente	Razão Cu^{2+}: Interferente	Erro relativo (%)
Na(I)	1:1	+3,41
	1:10	+4,03
K(I)	1:1	+2,67
	1:10	+5,84
Mg(II)	1:1	+4,35
	1:10	+3,99
Ca(II)	1:1	+2,20
	1:10	+1,74
Ba(II)	1:1	+3,03
	1:10	+3,88
Cr(III)	1:1	+1,72
	1:10	+0,91
Mn(II)	1:1	+4,07
	1:10	-3,66
Fe(II)	1:1	+4,58
	1:10	+5,06
Fe(III)	1:1	+3,89
	1:10	-2,99
Co(III)	1:1	+4,11
	1:10	+6,37
Ni(II)	1:1	-5,01
	1:10	-4,77
Pb(II)	1:1	-2,23
	1:10	-3,56

Ag(I)	1:1	+6,82
	1:10	+7,45
Zn(II)	1:1	+2,02
	1:10	+3,83
Cd(II)	1:1	+4,55
	1:10	-4,67
Hg(II)	1:1	+3,91
	1:10	+3,78
Al(III)	1:1	+4,05
	1:10	+3,81
As(II)	1:1	+2,04
	1:10	-1,65

Como também observado no método fluorímetro, o método câmara Vis-LED não apresentou interferência superior à 10% para nenhum dos possíveis íons interferentes, garantindo assim, a seletividade do método.

5.6. Determinação de Cu^{2+} em amostras de vinho comerciais

As melhores condições de trabalho foram obtidas a partir da otimização, obtendo-se uma curva de calibração para determinação de Cu^{2+} para os dois métodos propostos.

5.6.1. Espectrofluorímetro

Para o método fluorímetro, a curva de calibração apresentou resultado linear na faixa de 0,5 a 6,5 mg L^{-1} ($I = 4620,16 [\text{Cu}^{2+}] + 117,48$) como mostra a **Figura 22**; onde I é a intensidade luminescente e $[\text{Cu}^{2+}]$ é a concentração de Cu^{2+} dada em mg L^{-1}). O coeficiente de determinação da regressão linear obtida foi alto (0,9981), indicando que o modelo consegue explicar bem os valores observados. O limite de detecção do método proposto foi 0,16 mg L^{-1} ($LD = \frac{3 \times dp_{\text{branco}}}{ic}$) e o de quantificação foi de 0,54 mg L^{-1} ($LQ = \frac{10 \times dp_{\text{branco}}}{ic}$), onde dp_{branco} é o desvio padrão da resposta do branco e ic é o coeficiente angular da curva analítica. A precisão do método foi estudada a partir de soluções de 2,5 e 4,5 mg L^{-1} para o método fluorímetro obtendo-se desvios padrões relativos de 0,1% e 0,3%.

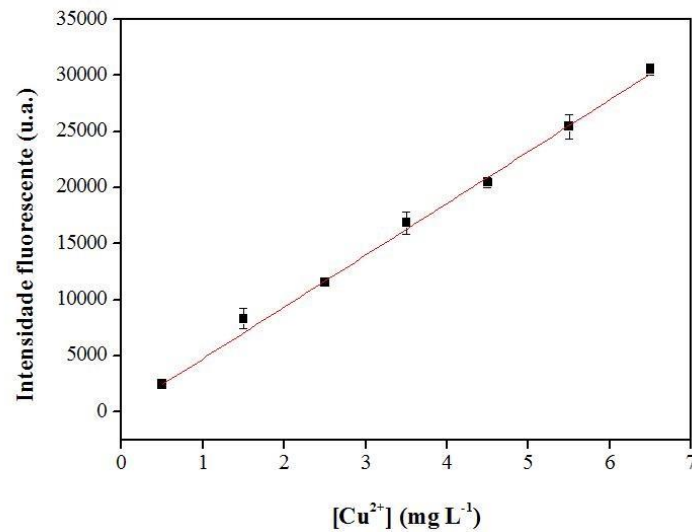


Figura 22 - Curva analítica obtida para determinação fluorescente de Cu^{2+} com faixa linear de 0,5 a 6,5 mg L^{-1} .

5.6.2. Câmara Vis-LED

Diferente do método usando o fluorímetro, em que a curva analítica foi construída baseando-se na intensidade fluorescente, neste foram construídas curvas analíticas com relação a intensidade da cor formada devido a fluorescência para verificar se o método atende quantitativamente para a determinação de Cu^{2+} . Para isso, foi utilizado o aplicativo Color Grab para a decomposição das imagens no modelo de cores RGB. As curvas analíticas foram construídas através da diluição de uma solução estoque de Cu^{2+} com concentração de 50 mg L^{-1} em concentrações variando de 1,0 a 16,0 mg L^{-1} , como mostra a **Figura 23**.

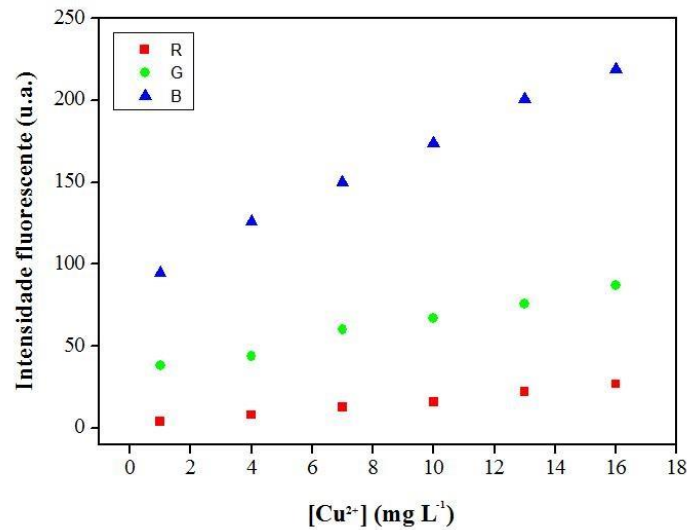


Figura 23 - Curva analítica para determinação de cobre utilizando diferentes canais do modelo RGB usando câmara Vis-LED.

Como apresentado pela **Figura 23**, todos os canais apresentam uma boa correlação entre a concentração do analito e a intensidade fluorescente. Apesar de todos os canais serem lineares, o canal B se apresentou com uma maior sensibilidade, tendo uma maior faixa possível de trabalho. Com isso, o canal B foi escolhido para estudos posteriores.

A partir dos dados da curva analítica, foi possível calcular os limites de detecção do método proposto para os três canais estudados. A precisão do método foi estudada a partir de soluções de 4,0 e 10,0 mg L⁻¹ para o método usando câmara Vis-LED obtendo-se desvios padrões relativos de 1,5% e 1,8%.

A quantificação de Cu²⁺ se baseia na equação da reta obtida a partir da curva analítica, sendo ela expressa da seguinte maneira (**Equação 3**):

$$I = a + b [Cu^{2+}] \quad \text{Equação 3}$$

onde y é a resposta analítica para cada canal, [Cu²⁺] é a concentração de cobre dada em mg L⁻¹, b é o coeficiente angular e a é o coeficiente linear. A partir dos dados apresentados na **Figura 23** e na **Tabela 4** obteve-se as seguintes equações da reta:

$$\text{canal R} \quad y = 1,52 [Cu^{2+}] + 2,05$$

$$\text{canal G} \quad y = 3,31 [Cu^{2+}] + 33,83 \quad \text{canal B} \quad y = 8,28 [Cu^{2+}] + 90,49$$

Tabela 4 - Valores obtidos (coeficiente linear, coeficiente angular, coeficiente de determinação, limite de detecção e quantificação) a partir da análise usando Color Grab.

	a^a	b^a	R²	LD^a	LQ^a
R	2,05	1,52	0,9922	3,46	11,52
G	33,83	3,31	0,9858	1,59	5,29
B	90,49	8,28	0,9946	0,63	2,11

^a Concentração expressa em mg L⁻¹.

Realizou-se a quantificação de cobre em vinhos e não foi detectada nenhuma concentração acima do limite estabelecido pela legislação. Não foi possível quantificar concentrações inferiores devido a limitação do método proposto, que obteve uma faixa linear a partir da concentração máxima de cobre aceita.

5.7. Veracidade

As **Tabelas 5** e **6** mostram os resultados obtidos para o estudo de recuperação para determinação de cobre em vinhos nos dois métodos. Os ensaios foram feitos em triplicata (n=3).

Tabela 5 - Porcentagens de recuperação de Cu²⁺ em vinhos obtidas para os três níveis de concentração estudados para o método empregando um fluorímetro.

Amostra	Adicionado^a	Recuperado^a	Recuperação (%)
S1	1,00	1,07 ± 0,01	107,00
	3,00	2,99 ± 0,06	99,67
	5,00	4,98 ± 0,03	99,60
S2	1,00	0,98 ± 0,02	98,00
	3,00	3,04 ± 0,02	101,33
	5,00	5,11 ± 0,04	102,20
S3	1,00	0,99 ± 0,05	99,00
	3,00	2,95 ± 0,07	98,33
	5,00	4,92 ± 0,08	98,40
S4	1,00	1,03 ± 0,01	103,00
	3,00	3,10 ± 0,04	103,33
	5,00	5,03 ± 0,06	100,60
	1,00	1,06 ± 0,07	106,00

S5	3,00	3,08 ± 0,03	102,67
	5,00	5,16 ± 0,06	103,20
S6	1,00	0,94 ± 0,01	94,00
	3,00	2,97 ± 0,05	99,00
	5,00	5,01 ± 0,03	100,20

^a Concentração expressa em mg L⁻¹; Média ± desvio padrão.

Tabela 6 - Porcentagens de recuperação de Cu²⁺ em vinhos obtidas para os três níveis de concentração estudados para o método com câmara Vis-LED.

Amostra	Adicionado^a	Recuperado^a	Recuperação (%)
S1	4,00	4,32 ± 0,05	108,00
	7,00	6,42 ± 0,04	91,71
	10,00	9,91 ± 0,09	99,10
S2	4,00	3,94 ± 0,01	98,50
	7,00	7,17 ± 0,06	102,43
	10,00	10,09 ± 0,03	100,90
S3	4,00	3,89 ± 0,07	97,25
	7,00	6,72 ± 0,05	96,00
	10,00	9,88 ± 0,08	98,8
S4	4,00	4,09 ± 0,02	102,25
	7,00	6,95 ± 0,06	99,29
	10,00	10,02 ± 0,04	100,20
S5	4,00	4,12 ± 0,05	103,00
	7,00	7,08 ± 0,01	101,14
	10,00	9,93 ± 0,03	99,30
S6	4,00	3,96 ± 0,07	99,00
	7,00	6,87 ± 0,04	98,14
	10,00	9,93 ± 0,09	99,30

^a Concentração expressa em mg L⁻¹; Média ± desvio padrão.

Como pode ser observado nas tabelas acima, os percentuais de recuperação variaram entre 94,00% a 103,00% para o método usando fluorímetro e 91,71 % a 108,00% para o método usando câmara Vis-LED. Os resultados de recuperação foram comparados com os valores descritos por Brito *et al.* (2003), cuja recomendação é que o intervalo de recuperação esteja entre 80 e 110%, para níveis de concentração de 100 ppb a 10 ppm. Portanto, todos os valores obtidos para a recuperação de Cu^{2+} foram satisfatórios. Pode-se afirmar, portanto, que não foram encontrados efeitos de matriz significativos nas amostras analisadas.

5.8. Comparação dos métodos

A **Tabela 7** apresenta os valores obtidos pelos dois métodos

Tabela 7 - Valores obtidos pelo método empregando um fluorímetro e a câmara Vis-LED.

	MÉTODO	
	Fluorímetro	Câmara Vis-LED
Faixa linear (mg L^{-1})	0,5 – 6,5	1,0 – 16,0
R²	0,9981	0,9946
LD (mg L^{-1})	0,16	0,63
LQ (mg L^{-1})	0,54	2,11
Recuperação (%)	94,00 – 103,00	91,71 – 108,00

Como mencionado, o limite aceito pela legislação é de no máximo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cobre em vinho e o método usando uma câmara Vis-LED não atende a uma faixa linear para quantificar o cobre abaixo dessa concentração limite. Sendo que só seria possível quantificar o cobre em concentrações acima da permitida pela legislação. Assim, o método impossibilita a comparação com outros métodos a partir da quantificação de cobre em amostras de vinhos. Desta forma, para se obter uma maior sensibilidade pelo método proposto foi realizado o método de adição de padrão, em que quantidades conhecidas foram adicionadas a amostras.

Seis amostras de vinho (S1-S6) foram fortificadas no método usando fluorímetro e no método proposto da seguinte maneira:

- Método fluorímetro: adição de $100 \mu\text{L}$ de Cu^{2+} com concentração de $50,0 \text{ mg L}^{-1}$
- Método Vis – LED: adição de 5 mL de Cu^{2+} com concentração de $50,0 \text{ mg L}^{-1}$

Com isso, realizou-se a comparação entre o método usando um fluorímetro e método usando câmara Vis-LED com resultados obtidos usando o método de absorção atômica, com os resultados obtidos presentes na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Comparação dos métodos empregando fluorímetro e câmara Vis-LED.

Amostra	Método de referência^a (A.A.)	Método Fluorímetro	Método proposto^a	Erro relativo Método proposto (%)
S1	0,71 ± 0,2	0,73 ± 0,6	0,68 ± 0,8	4,23
S2	0,62 ± 0,3	0,64 ± 0,4	0,66 ± 0,5	6,45
S3	0,95 ± 0,2	0,97 ± 0,2	0,98 ± 0,3	3,16
S4	0,33 ± 0,2	0,32 ± 0,7	0,34 ± 0,9	3,03
S5	0,84 ± 0,3	0,81 ± 0,4	0,80 ± 0,8	4,76
S6	0,54 ± 0,4	0,56 ± 0,3	0,51 ± 0,3	5,56

^aConcentração expressa em mg L⁻¹

O presente trabalho apresentou resultados satisfatórios, se apresentando exato com concentrações próximas das obtidas utilizando um método de referência, como mostra a Tabela 8. Duas amostras (2 e 6) apresentaram erro percentual acima de 5%, o que pode ser explicado pela limitação do método em relação a concentração máxima exigida ser muito próxima do limite de detecção do método. Afim de comparar os resultados entre o método proposto e o de referência, foi empregado o test t com 95% de confiabilidade, onde indicou que não há diferença significativa entre os resultados obtidos ao nível de confiança de 95%

5.9. Estrutura Cu(II)/IJO

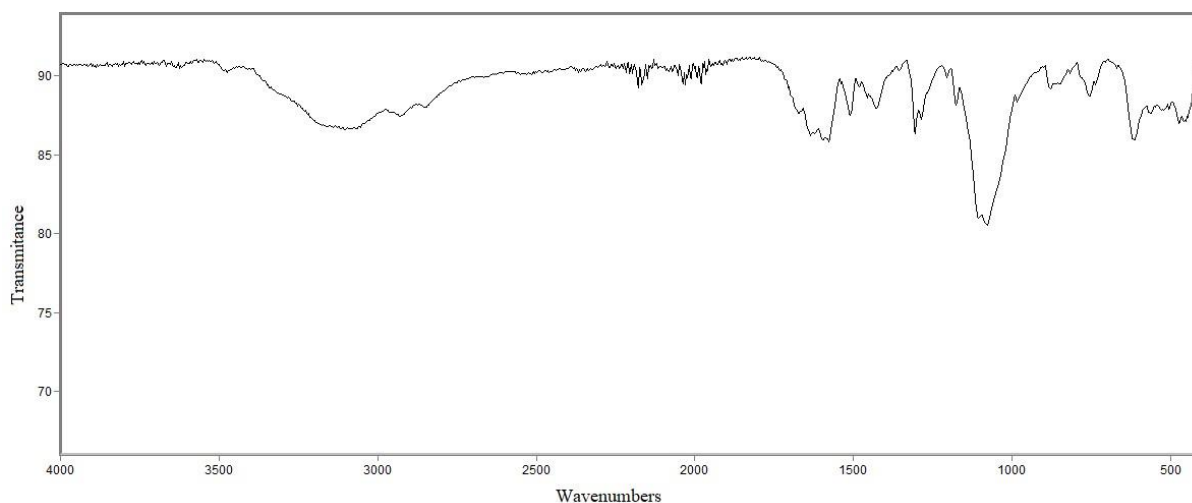


Figura 24 - Espectro do infravermelho do complexo Cu(II)/IJO.

Uma possível estrutura para a interação Cu(II)/IJO pode ser especulada a partir de alterações dos deslocamentos das bandas dos espectros no infravermelho do complexo em relação ao ligante livre. Analisando o espectro do complexo (**Figura 24**), observa-se o desaparecimento da banda em 3589 cm^{-1} , que foi atribuída ao estiramento da ligação N-H, característico de aminas secundárias aromáticas, e também o deslocamento e alargamento da banda de estiramento da ligação C-O em 1070 cm^{-1} , o que indica que o oxigênio da hidroxila faz coordenação com o íon metálico. No espectro do complexo há também o aparecimento de banda característica de estiramento de ligação O-H, o que indica que pode haver uma molécula de água coordenada ao íon metálico. Tendo em vista que o Cu^{2+} pode possuir número de coordenação 4 ou 6 e, com os dados analisados a partir dos espectros no infravermelho do ligante livre e do complexo, foi possível propor uma estrutura para o complexo (**Figura 25**).

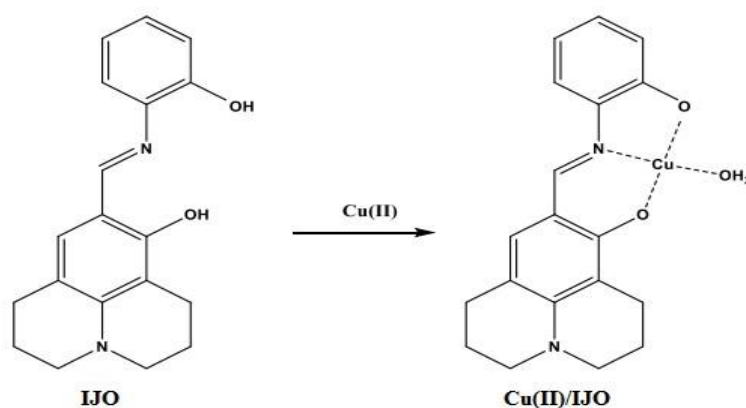


Figura 25 - Possível estrutura para o complexo Cu(II)/IJO.

5.10. Outros métodos para determinação de cobre em vinho.

Diversos métodos para determinação de cobre em vinho são encontrados na literatura, entre eles os principais são a espectrometria de absorção atômica (AAS) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Apesar de serem técnicas extremamente sensíveis, os equipamentos são caros e com alto custo de manutenção, e muitas vezes é preciso usar um padrão para evitar qualquer efeito de matriz.

A **Tabela 9** apresenta a relação entre o método proposto e outros métodos relatados pela literatura altamente sensíveis.

Tabela 9 - Comparação entre os métodos de identificação de cobre em vinho presentes na literatura.

Método	Técnica	Faixa linear ^a	LD ^a	LQ ^a	Volume por análise ^b
Dutra <i>et al.</i> (2018)	FAAS	0,25 – 5,00	0,05	0,18	20
Seeger <i>et al.</i> (2015)	AAS	25 – 100 x 10 ⁻³	6,3 x 10 ⁻³	19 x 10 ⁻³	20
Alkis <i>et al.</i> (2014)	ICP-AES/MS	0,05 – 100 x 10 ⁻³	3,0 x 10 ⁻³	0,9 x 10 ⁻³	-
Proposto	Fluorescência Câmara Vis- LED	1,00 – 16,00	0,63	2,11	30

^aConcentração expressa em mgL⁻¹; ^bVolume expresso em µL.

6. CONCLUSÃO

A molécula de IJO sintetizada por Paiva (2021) se mostrou estável e com pouca variação de intensidade fluorescente mesmo com a variação do pH e da força iônica do meio, sem a necessidade de modificação da sua estrutura para quantificar cobre em vinho. O presente trabalho apresenta sucesso ao propor a confecção de um equipamento câmara Vis-LED com princípios de fluorescência para determinação de cobre usando placa 3D e análise de imagens digitais, além de ter uma portabilidade que possibilita seu deslocamento para a realização de análises em outros ambientes. Resultados satisfatórios foram obtidos quando comparado com o método empregando um espectrofluorímetro, como boa faixa linear, limite de detecção e quantificação. O método proposto exhibe vantagens por sua simplicidade de operação, baixo custo de confecção, simples manuseio e baixo consumo de reagentes bem como pequena quantidade de amostra, o que leva a pouca formação de resíduo e fácil descarte, indício da sustentabilidade do método. Porém, a legislação exige um baixo limite de cobre em vinho, o que dificulta a quantificação pelo método proposto por causa de suas limitações e acarretando na realização de uma fortificação para determinar sua exatidão. Por fim, o método proposto poderia ser aplicado para a determinação de cobre em outras matrizes, já que foi comprovada a seletividade da molécula de IJO para o cobre.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. C. D. **Um processo para utilizar a tecnologia de impressão 3D na construção de instrumentos didáticos para o ensino de ciências**. 2016.. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, SP, 2021.

ALKIS, I. M. *et al.* Investigation of heavy metal concentrations in some Turkish wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 105-110, 2014.

BERASARTE, I. *et al.* pH measurement and phosphate determination in pharmaceutical eye drops for eye diseases by digital image analysis. **Microchemical Journal**, v. 162, p. 105854, 2021.

BHATIA, A.; SEHGAL, A. K. Additive manufacturing materials, methods and applications: A review. **Materials Today: Proceedings**, n. xxxx, 2021.

BRASIL. Decreto nº 99.066, de 08 de março de 1990. Regulamenta a Lei 7.678, de 08 de novembro de 1988 que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 mar. 1990. Seção 1. p. 4755- 4763.

BRITO, N. M. *et al.* VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

CADORE, S.; MATOSO, E.; SANTOS, M. C. A espectrometria atômica e a determinação de elementos metálicos em material polimérico. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1533-1542, 2008.

CARDOSO, R. M. *et al.* 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 1033, p. 49–57, 2018.

CARDOSO, R. M. *et al.* 3D-Printed graphene/polylactic acid electrode for bioanalysis: Biosensing of glucose and simultaneous determination of uric acid and nitrite in biological fluids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 307, p. 127621, 2020.

CATARINO, S.; CURVELO-GRACIA, A. S.; SOUZA, R. B. Elementos contaminantes nos vinhos. **Ciência Técnica Vitícola**, v. 23, p. 3-19, 2008.

CHRISTAKI, T.; TZIA, C. Quality and safety assurance in winemaking. **Food Control.**, v. 13, n. 8, p. 503-517, 2002.

COMISSÃO TÉCNICA DE QUÍMICA (CT-05). Orientação sobre validação de métodos analíticos. Inmetro, p. 20, 2011.

COSTA, M. H. et al. A fast, low-cost, sensitive, selective, and non-laborious method based on functionalized magnetic nanoparticles, magnetic solid-phase extraction, and fluorescent carbon dots for the fluorimetric determination of copper in wines without prior sample treatment. *Food chemistry*, v. 363, p. 130248-130255.

DANTAS, H. V. *et al.* An inexpensive NIR LED Webcam photometer for detection of adulterations in hydrated ethyl alcohol fuel. **Microchemical Journal**, v. 135, p. 148 - 152, 2017.

DA SILVA, E. K. N. *et al.* 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**, v. 157, p. 104986, 2020.

DIAÑEZ, I. et al. 3D printing in situ gelification of κ -carrageenan solutions: Effect of printing variables on the rheological response. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 321–330, 2019.

DOS SANTOS, V. B. *et al.* 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 Chemistry**, v. 285, p. 340 - 346, 2019.

DUARTE, L. C. **Impressão 3D: uma alternativa para fabricação de dispositivos analíticos miniaturizados**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2016.

DUTRA, M. C. P. *et al.* Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn. **Food Chemistry**, v. 269, p. 157 - 165, 2018.

FRANCO, M. O. K. *et al.* A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone. **Food Chemistry**. v. 338, p. 127800127807, 2020.

FRANCO, M. O. K. *et al.* A color reaction for the determination of Cu²⁺ in distilled beverages employing digital imaging. **Analytica Chimica Acta**, v. 1177, p. 338844, 2021.

GANESAN, J. S. *et al.* Execution of julolidine based derivative as bifunctional chemosensor for Zn²⁺ and Cu²⁺ ions: Applications in bio-imaging and molecular logic gate. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 219, p. 33–43, 2019.

GEETHANJALI, H. S. *et al.* Fluorescence quenching of boronic acid derivatives by aniline in alcohols – A Negative deviation from Stern–Volmer equation. **Journal of Luminescence**, v. 167, p. 216–221, 2015.

GLASS, D. B.; WEISSBERGER, A. *Organic Syntheses*. Vol. III ed. New York: Wiley Ed, 1955.

GOLDBERG, D. M., BROMBERG, I. L. Health effects of moderate alcohol consumption: a paradigmatic risk factor. **Clinica Chimica Acta**, v. 246, p.14–16, 1996.

GREEN, A. M.; CLARK, A. C.; SCOLLARY, G. R. Determination of free and total copper and lead in wine by stripping potentiometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 358, n. 6, p. 711-717, 1997.

GRINDLAY, G. *et al.* Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 691, n. 1-2, p. 18-32, 2011.

GRONBAEK, M. *et al.* Mortality associated with moderate intakes of wine, beer or spirits. **British Medical Journal**, v. 10, p. 1165–1169,1995.

GROSS, B. C. *et al.* Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 7, p. 3240–3253, 2014.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, 6a edição, Ed. Livros Técnicos e Científicos Ltda., Rio de Janeiro: 2005, 876p.

HO, C. M. B. *et al.* 3D printed microfluidics for biological applications. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 18, p. 3627–3637, 2015.

HOQUE, M. E.; CHUAN, Y. L.; PASHBY, I. Extrusion based rapid prototyping technique: An advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. **Biopolymers**, v. 97, n. 2, p. 83–93, 2012.

HOPFER, H. *et al.* The combined impact of vineyard origin and processing winery on the elemental profile of red wines. **Food Chemistry**, v. 172, p. 486-496, 2015.

HULL, C. W. Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects By Stereo Photography. **Patent**, n. 19, p. 16, 1986.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Vinhedo, 2020.

JABŁOŃSKI, A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. **Zeitschrift für Physik**, v. 94, n. 1–2, p. 38–46, 1935.

JI, Y.; DAI, F.; ZHOU, B. Developing a julolidine-fluorescein-based hybrid as a highly sensitive fluorescent probe for sensing and bioimaging cysteine in living cells. **Talanta**, v. 197, p. 631–637, 2019.

KATSELI, V. *et al.* Miniature 3D-printed integrated electrochemical cell for trace voltammetric Hg(II) determination. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 308, p. 127715, 2020.

KMENT, P. *et al.* Differentiation of Czech wines using multielement composition - A comparison with vineyard soil. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 157-165, 2005.

KODAMA, H. Automatic method for fabricating a three dimensional plastic model with photohardening polymer. **Review of Scientific Instruments**, v. 52, n. 11, p. 1770-1773, 1981.

KOMPANY-ZAREH, M.; MANSOURIAN, M.; RAVAEE, F. Simple method for colorimetric spot-test quantitative analysis of Fe(III) using a computer controlled handscanner. **Analytica Chimica Acta**, v. 471, n. 1, p. 97-104, 2002.

KONTOUDAKIS, N. *et al.* Analytical strategies for the measurement of different forms of Cu and Fe in wine: Comparison between approaches in relation to wine composition. **Food Chemistry**, v. 274, p. 89-99, 2019.

KRISTL, J.; VEBER, M.; SLEKOVEC, M. The application of ETAAS to the determination of Cr, Pb and Cd in samples taken during different stages of the winemaking process. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 3, p. 200-204, 2022.

LAKOWICZ, Joseph R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3. Ed. Singapura: Springer, 2006.

LARA, R. *et al.* Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICPOES. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 293 – 297, 2005.

LATORRE, M. *et al.* Size exclusion chromatography – Inductively coupled plasma – Mass spectrometry for determining metal-low molecular weight compound complexes in natural wines. **Talanta**, v. 195, p. 558 – 565, 2019.

LIU, F. *et al.* Synthesis of julolidine-containing nonlinear optical chromophores: Achieving excellent electro-optic activity by optimizing the bridges and acceptors. **Dyes and Pigments**, v. 134, p. 358-367, 2016.

MALLAKPOUR, S.; TABESH, F.; HUSSAIN, C. M. 3D and 4D printing: From innovation to evolution. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 294, n. June, p. 102482, 2021.

MARENGO, E.; ACETO, M. Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines. **Food Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 621-630, 2003.

MARTINI, G. *et al.* Julolidine fluorescent molecular rotors as vapour sensing probes in polystyrene films. **Dyes and Pigments**, v. 113, p. 47–54, 2015.

MERCOSUL. Resolução 45/96 do GMC em Bs. As. 21/IV/96. Regimento Vitivinícola do Mercosul. Buenos Aires: GMC, 2 jun. 1996.

MOHAMED, A. A.; SHALABY, A. A. Digital imaging devices as sensors for iron determination. **Food Chemistry**, v. 274, p. 360 - 367, 2019.

MONEMI, M. *et al.* Opposite changes in myosin heavy chain composition of human masseter and biceps brachii muscles during aging. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 4, p. 351 - 412, 1999.

MOZAZ, S. R.; SOTRO, A. G.; SE GOVIA, J. G.; AZPILICUETA, C. A. Influence of decantation of viura must on the cation content. Evolution during wine fermentation and stabilization. **Food Research International**, v. 32, p. 683-689, 1999.

O'NEILL, P. F. *et al.* Advances in three-dimensional rapid prototyping of microfluidic devices for biological applications. **Biomicrofluidics**, v. 8, n. 5, p. 52112, 2014.

PACIORNIK, S. *et al.* Scanner image analysis in the quantification of mercury using spottests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 156–161, 2006.

PAIVA, W. F. **Síntese de derivados de julolidinas como sensores químicos**. 2021. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2021.

PESSANHA, S. *et al.* Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by Total Reflection X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray fluorescence: Comparison on two vineyards. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 6, p. 504–507, 2010.

PINKUS, G. Ueber die Einwirkung von Trimethylenchlorbromid auf einige aromatische Amine und Amide. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 25, n. 2, p. 2798– 2806, 1892.

POHL, P. What do metals tell us about wine? **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 941-949, 2007.

PORTO, I. S. A. *et al.* Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 149, p. 104031-104034, 2019.

PORTO, T. M. S. **ESTUDO DOS AVANÇOS DA TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO 3D E DA SUA APLICAÇÃO NA CONSTRUÇÃO CIVIL**. 2016. 80 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

PÚBLICO, C. *et al.* Agência Nacional De Vigilância Sanitária – Anvisa Prova B. 2013.

PYRZÝNSKA, K. Analytical methods for the determination of trace metals in wine. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 34, n. 2, p. 69-83, 2004.

Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des mûts. **Organisation International de la Vigne et du Vin**. Paris: OIV, 2005.

REIS, J. A. Uso de imagens digitais para determinação quantitativa de metanol em bebidas alcoólicas. 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, AM, 2017.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.

RODRÍGUEZ MOZAZ, S. *et al.* Influence of decantation of viura must on the cation content. Evolution during wine fermentation and stabilization. **Food Research International**, v. 32, n. 10, p. 683-689, 1999.

ROSSANO, E. C. *et al.* Influence of winemaking practices on the concentration of rare earth elements in white wines studied by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 311-317, 2007.

SALENTIIN, G. I. *et al.* Fused Deposition Modeling 3D Printing for (Bio)analytical Device Fabrication: Procedures. **Materials, and Applications. Analytical Chemistry**, v. 89, n. 13, p. 7053–7061, 2017.

SCHULZ-FINCKE, A. C. *et al.* Design of an Activity-Based Probe for Human Neutrophil Elastase: Implementation of the Lossen Rearrangement to Induce Förster Resonance Energy Transfers. **Biochemistry. American Chemical Society**, v. 57, n. 5, p. 742-752, 2018.

SEEGER, T. S. *et al.* Feasibility of dispersive liquid–liquid microextraction for extraction and preconcentration of Cu and Fe in red and white wine and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 105, p. 136 -140, 2015.

SHALLAN, A. I. *et al.* Cost-Effective Three-Dimensional Printing of Visibly Transparent Microchips within Minutes. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 6, p. 3124–3130, 2014.

SHARIFI, H.; TASHKHOURIAN, J.; HEMMATEENEJAD, B. A 3D origami paper-based analytical device combined with PVC membrane for colorimetric assay of heavy metal ions: Application to determination of Cu(II) in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1126, p. 114–123, 2020.

SINGKHORAT, J. *et al.* Digital image colorimetric analysis for evaluating lipid oxidation in oils and its emulsion. **Food Chemistry**, v. 286, p. 703 -709, 2019.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. .; NIEMAN, T. A. **Pricípios de Análise Instrumental**. 5. ed. [S.l.]: Bookman, 2013.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. *et al.* Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1755–1774, 2008.

SRIVATSAN, T.; SUDARSHAN, T. (2016). Additive Manufacturing: Innovations, **Advances, and Applications**. Boca Raton, Florida, Estado Unidos: CRC Press.

STEIMLE, E. T.; KALTENBACHER, E. A.; BYRNE, R. H. In situ nitrite measurements using a compact spectrophotometric analysis system. **Marine Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 255-262, 2002.

TARIBA, B.; PIZENT, A.; KLJAKOVIC-GASPIC, Z. Determination of lead in croatian wines by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v. 62, n. 1, p. 25-31, 2011.

THOMPSON, M. *et al.* Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 337–348, 1999.

VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. John Wiley & Sons, New Jersey: 2012.

VAREJÃO, J. O. S.; VAREJÃO, E. V. V.; FERNANDES, S. A. Synthesis and Derivatization of Julolidine: A Powerful Heterocyclic Structure. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2019, n. 27, p. 4273–4310, 2019.

VEJDELEH, Z.; PROTIVA, M. Potential antidepressants and tranquilizers: Synthesis of some 9-(aminoalkoxy)-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-benzo[*ij*] quinolizines and 1-(substituted amino)-3(1-naphthoxy)-2-propanols. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 55, n. 5, p. 1290-1296, 1990.

VESSMAN, J. *et al.* Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381–1386, 2001.

VIDAL, E. *et al.* New, inexpensive and simple 3D printable device for nephelometric and 76 fluorimetric determination based on smartphone sensing. **RSC Advances**, v. 10, n. 33, p. 19713–19719, 2020.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**, Editora Mestre Jou, 5a ed.; São Paulo, 1989.

WONGNIRAMAİKULA, W.; LIMSAKULA, W.; CHOODUM, A. A biodegradable colorimetric film for rapid low-cost field determination of formaldehyde contamination by digital image colorimetry. **Food Chemistry**, v. 249, p. 154 - 161, 2018

WONGWILAI, W. *et al.* Webcam camera as a detector for a simple lab-on-chip time based approach. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 1137-1141, 2010.

WU, G. *et al.* Julolidine dyes with different acceptors and thiophene-conjugation bridge: Design, synthesis and their application in dye-sensitized solar cells. **Synthetic Metals**, v. 180, p. 9-15, 2013.

XU, Q. *et al.* Preparation of highly photoluminescent sulfur-doped carbon dots for Fe(III) detection. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 3, n. 2, p. 542–546, 2015.

YAM, Kit L.; PAPADAKIS, Spyridon E. “A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 137-142, 2004.

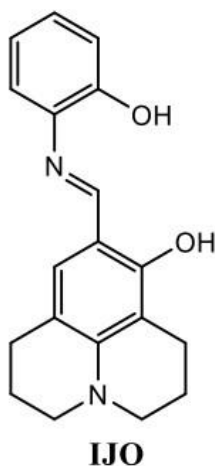
ZENGIN, H. B.; GURKAN, R. Application of a novel poly(SMAm)-Tris-Fe₃O₄ nanocomposite for selective extraction and enrichment of Cu(I) /Cu(II) from beer, soft drinks and wine samples, and speciation analysis by micro-volume UV–Vis spectrophotometry. **Talanta**, v. 224, p. 121789 – 121800, 2021.

ZHANG, Y. B. *et al.* Matrine-Type Alkaloids from the Roots of *Sophora flavescens* and Their Antiviral Activities against the Hepatitis B Virus. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 10, p. 2259-2265, 2018.

ZOECKLEIN, B. W. *et al.* **Wine Analysis and Production**. Springer US, 1999.

APÊNDICE

DADOS ESPECTROSCÓPICOS



(E)-9-(((2-hydroxyphenyl)imino)methyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-8-ol (IJO) Rendimento: 87%

Massa molar: 308,38 g mol⁻¹

IV (cm⁻¹) ν_{\max} : 2930, 2837, 1603, 1530, 1425, 1393, 1122, 760, 729.

CG-EM m/z (abundância em %): 308 (100, M⁺), 307 (40), 200 (38).

RMN de ¹H (300 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 7,26), δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento, atribuição): 12,70 (s, ¹H, OH); 7,81 (ddd, ¹H, J = 4,0, 1,3, 0,6 Hz, H13); 7,79 (ddd, ¹H, J = 3,9, 1,3, 0,7 Hz, H14); 7,40 (ddd, ¹H, J = 8,2, 7,3, 1,3 Hz, H14); 7,27 (ddd, ¹H, J = 8,0, 7,3, 1,2 Hz, H15); 7,08 (s, ¹H, H10); 3,30-3,13 (m, 4H, H3a, H3b, H5a, H5b); 2,80 (t, 2H, J = 6,5 Hz, H7a, H7b); 2,74 (t, ²H, J = 6,1 Hz, H1a, H1b); 2,18-1,89 (m, 4H, H2a, H2b, H6a, H6b).

RMN de ¹³C (75 MHz; CDCl₃ δ_{CHCl_3} 77,16), δ (atribuição): 20,81 (C7); 21,34 (C2); 22,17 (C6); 27,45 (C1); 49,80 (C3); 50,19 (C5); 105,39 (C9); 106,97 (C10'); 113,53 (C7'); 120,96 (C13); 121,28 (C16); 124,08 (C15); 126,08 (C10); 126,28 (C14); 132,11 (C17); 146,50 (C4'); 152,44 (C12); 154,97 (C8); 170,11 (C11).