



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**Curso de química tecnológica**

**MARIANA MOURÃO MATOS**

**USO DE IMAGENS DIGITAIS E DISPOSITIVOS DE PAPEL PARA  
DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE VITAMINA B2 EM SUPLEMENTOS**

**Brasília**

**2021**

**MARIANA MOURÃO MATOS**

**USO DE IMAGENS DIGITAIS E DISPOSITIVOS DE PAPEL PARA  
DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE VITAMINA B2 EM SUPLEMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade de Brasília como  
requisito parcial para obtenção do título de  
bacharel em química tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

**Brasília**

**2021**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais José Maria de Matos e Fernanda Mourão Matos que me apoiaram durante essa jornada de todas as formas possíveis.

Aos meus amigos Isabella, Beatriz, Eloíza, Letícia, Rafael e Caio por terem compartilhado essa trajetória e juntos termos nos apoiado durante todas as vezes que pensávamos em desistir.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Fonseca que me deu todo o suporte necessário e retirou todas as minhas dúvidas durante a elaboração desta monografia.

E por último àqueles professores que tiveram paciência para auxiliar e empolgação para incentivar os seus alunos durante o curso de Química Tecnológica.

## RESUMO

Este trabalho dispõe sobre a determinação de riboflavina, mais conhecida como vitamina B2, em suplementos utilizando um instrumento *lab-made*, dispositivos de papel ( $\mu$ PAD) e imagens digitais. Foram realizados testes no instrumento utilizando soluções padrão de riboflavina de diversas concentrações para definir a linearidade da curva, a repetitividade do método, a precisão e a exatidão. Para a determinação da vitamina B2 foram escolhidos suplementos em xarope, comprimidos efervescentes e soluções em gota, estes foram diluídos para a realização da análise e o resultado foi comparado com os do método de referência, espectrometria de fluorescência. Ao final, o método proposto obteve erros relativos menores que 5% e precisões que variaram de 2,5% a 9%, o que demonstra a sua eficiência para realização de análises em laboratório e em campo.

Palavras chave: riboflavina. Vitamina B2.  $\mu$ PAD. Smartphone. Fluorimetria.

## **ABSTRACT**

This work is about the determination of riboflavin, better known as vitamin B2, in supplements using a lab-made instrument, paper devices ( $\mu$ PAD) and digital images. Tests were performed on the instrument using riboflavin standard solutions of various concentrations to define curve linearity, method repeatability, precision and accuracy. For the determination of vitamin B2, supplements in syrup, effervescent tablets and drop solutions were chosen, these were diluted for analysis and the result was compared with those of the reference method, fluorescence spectrometry. In the end, the proposed method had relative errors less than 5% and accuracies ranging from 2.5% to 9%, which demonstrates its efficiency for carrying out analyzes in the laboratory and in field.

Key words: riboflavina. Vitamin B2.  $\mu$ PAD. Smarthpone. Fluorimetry

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Riboflavina, FMN e FAD respectivamente.....	11
<b>Figura 2</b> - Esquema do sistema de injeção em fluxo para reação, sendo P1 e P2 as bombas peristálticas; S, injetor de amostra; M, tubo de mistura; F, célula de fluxo e W, descarte .....	15
<b>Figura 3</b> - Mecanismos utilizados para a análise de Adrafinil. A sendo o mecanismo para o complexo de cobre e B para o de zinco.....	16
<b>Figura 4</b> - Zona de amostragem e reação do Adrafinil com os complexos.....	17
<b>Figura 5</b> - Dispositivo analítico de papel utilizado na determinação de riboflavina.....	19
<b>Figura 6</b> - Dispositivo de papel antes e após o aquecimento na estufa.....	20
<b>Figura 7</b> - Detalhes do instrumento utilizado sendo: (A) dimensões e visão externa do instrumento com o celular no suporte. (B) visão externa do instrumento com o filtro encaixado, (C) visão interna da parte inferior da tampa mostrando os LEDs azuis em funcionamento, (D) suporte de acrílico com o dispositivo de papel fixado por parafuso, (E) dispositivo protegido pelo anteparo, (F) orifício para visualização dos spots.....	21
<b>Figura 8</b> - Interior do instrumento contendo: 1- motor de passos, 2- driver do motor, 3- arduino, 4-módulo bluetooth, 5- regulador PMW e 6- fonte de alimentação.....	22
<b>Figura 9</b> - Telas utilizadas no aplicativo: A- primeira tela para pareamento do instrumento, B- segunda tela para ajuste dos parâmetros e C- tela onde acontece a obtenção do gráfico.....	23
<b>Figura 10</b> – Espectro de fluorescência 3D da riboflavina .....	26
<b>Figura 11</b> – Gráfico 2D do espectro da riboflavina .....	27
<b>Figura 12</b> - Gráfico com os espectros da riboflavina, do LED e do filtro.....	28
<b>Figura 13</b> – Gráfico sinal RGB vs ordem de leitura .....	28
<b>Figura 14</b> – Gráfico do sinal analítico vs a concentração de riboflavina.....	29
<b>Figura 15</b> - Gráfico do sinal vs concentração da riboflavina na faixa de 2ppm a 12ppm.....	30

<b>Figura 16</b> - Gráfico do sinal das medidas em triplicata.....	31
<b>Figura 17</b> - Curva analítica do sinal das triplicatas.....	32
<b>Figura 18</b> - Gráfico com do sinal analítico com adições sucessivas.....	32

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
3.1. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA.....	14
3.2. DISPOSITIVOS ANALÍTICOS DE PAPEL ( $\mu$ PAD) .....	15
3.3. IMAGENS DIGITAIS EM QUÍMICA ANALÍTICA.....	17
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	19
4.1. DISPOSITIVO ANALÍTICO DE PAPEL ( $\mu$ PAD) .....	19
4.2. INSTRUMENTO.....	20
4.3. APLICATIVO .....	22
4.4. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	24
4.5. PROCEDIMENTOS PARA LEITURA NO PAPEL.....	24
4.6. PROCEDIMENTOS PARA LEITURA NO ESPECTROFLUORIMETRO.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

## 1. INTRODUÇÃO

Necessárias para uma boa saúde e um bom desenvolvimento do corpo humano, as vitaminas são compostos orgânicos essenciais para diversas funções desempenhadas no organismo (VIEIRA, 2011). Cada vitamina desempenha um papel específico e a sua deficiência pode causar problemas de saúde, dessa forma, é necessária a ingestão destas por meio dos alimentos ou suplementação, pois o corpo humano não consegue produzi-las (MAQBOOL, et al., 2017). São reconhecidas 13 vitaminas e estas são classificadas em: vitaminas hidrossolúveis, sendo as vitaminas C e do complexo B, e lipossolúveis sendo as vitaminas A, D, E e K (BALL, 2004).

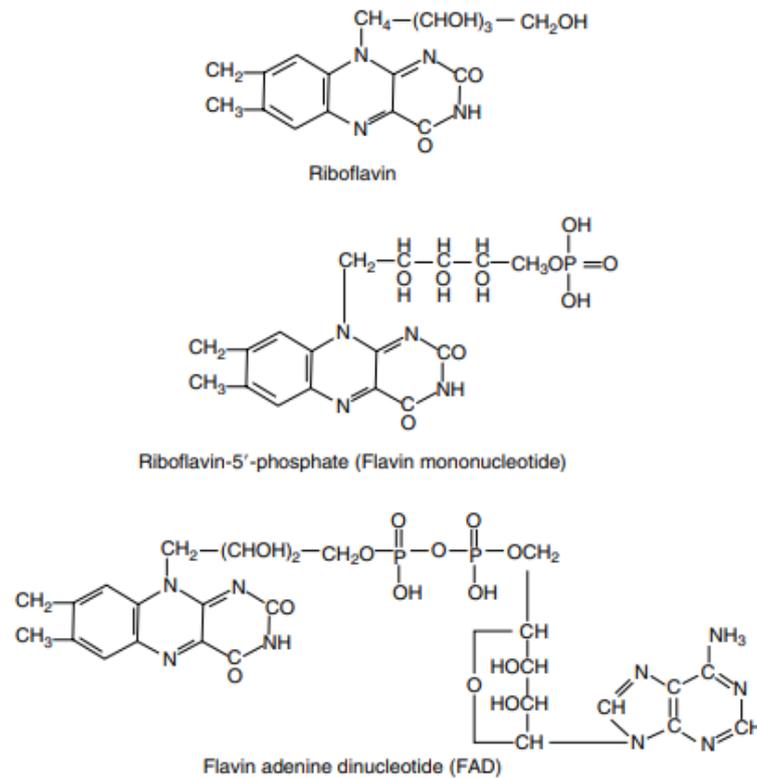
A riboflavina, mais conhecida como vitamina B2, é uma vitamina do complexo B que possui cor amarelada e fluoresce na presença de radiação UV e alguns comprimentos de onda do visível. Ela atua em diversas reações redox importantes, no metabolismo e na produção de energia do corpo humano como coenzimas, que são moléculas orgânicas que se ligam aos sítios ativos das enzimas para auxiliar na catálise da reação; quando seus níveis no corpo estão baixos podem acarretar em problemas de pele e mucosa (PETTEYS; FRANK, 2011). Além disso também podem causar um aumento do risco de anemia, enxaqueca, falha cardíaca, doença de Parkinson, catarata e hipertensão (RUCKER, et al., 2007).

A riboflavina além de ser muito usada como suplementação em multivitamínicos e em suplementos de vitaminas do complexo B, também é utilizada como corante e fortificante em alguns alimentos e suplementos como os de vitamina C, bebidas energéticas, cereais, pães, queijos processados, molhos, entre outros (SOMER, 1992).

As principais fontes naturais de riboflavina nos alimentos são leite e derivados, carnes, peixes, algumas frutas e vegetais folhosos verdes, como a couve, e somente uma pequena parte é composta pela riboflavina livre em si, uma parte menor ainda é composta pela sua forma fosforilada, chamada de mononucleótido de flavina (FMN) que é uma de suas formas biologicamente ativa, precursora da segunda forma biologicamente ativa chamada de dinucleótido de flavina e adenina (FAD) (POWERS, 2003). São o FMN e o FAD que funcionam como coenzimas propriamente ditas.

A riboflavina também é sensível a luz se degradando em lumiflavina (7,8,10-trimetil-isoalloxazina) em soluções alcalinas e em lumicromo (7,8-dimetil-alloxazina) em soluções ácidas e neutras, ambas espécies são inativas biologicamente (POWERS, 2003).

**Figura 1** – Riboflavina, FMN e FAD respectivamente.



Fonte: RUCKER et al (2007)

De acordo com Aniceto (2000), as principais formas para determinação quantitativa de riboflavina encontradas na literatura são por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), fluorimetria, espectrofotometria e método microbiológico. A Farmacopéia Americana (USP-23) e a Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*) recomendam a utilização do método fluorimétrico para a determinação da riboflavina, com comprimento de onda de excitação em 444nm e emissão em 530 nm, já a farmacopeia brasileira recomenda o método espectrofotométrico de absorção com comprimento de onda na faixa de 230 nm a 350 nm (ANVISA, 2019).

Desta forma alguns dos instrumentos utilizados nos métodos recomendados apresentam custos elevados com valores que podem ultrapassar 20 mil dólares, o que dificulta a determinação de rotina da riboflavina por laboratórios com poucos recursos.

Dessa forma, visando facilitar a determinação quantitativa, este trabalho propõe um método barato e rápido que não requer habilidades específicas do analista utilizando um dispositivo analítico de papel ( $\mu$ PAD, do inglês micro paper analytical devices), um equipamento *lab-made* e um smartphone.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Desenvolver e avaliar um método alternativo para determinação fluorimétrica de riboflavina em suplementos utilizando um instrumento lab-made controlado por smartphone, dispositivos de papel e imagens digitais de forma exata e reprodutível.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver e avaliar a determinação de riboflavina por fluorimetria em dispositivos de papel.
- Avaliar o uso do instrumento e do aplicativo para a determinação da riboflavina.
- Analisar as amostras com os parâmetros RGB e ajustar conforme necessário.
- Comparar os resultados obtidos com o método de referência utilizando artifícios estatísticos.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA A DETERMINAÇÃO DE RIBOFLAVINA

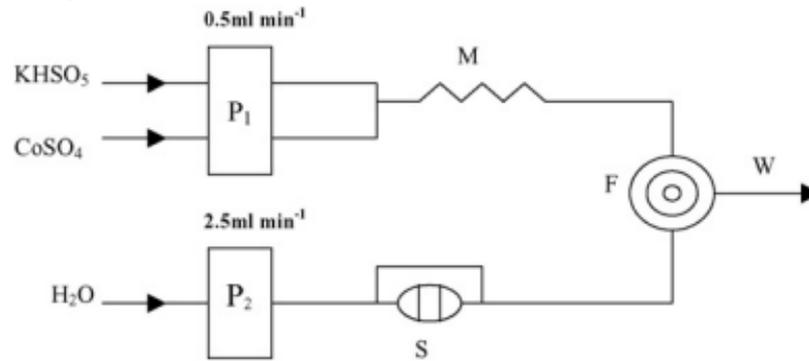
Apesar dos métodos mais usuais serem a fluorimetria, espectrofotometria e método microbiológico (Aniceto, 2000), há relatos na literatura de métodos alternativos para a determinação de riboflavina como por exemplo o desenvolvimento de um método de análise por voltametria de redissolução anódica de pulso diferencial realizado por Anisimova, Mikheeva e Slipchenko (2000) para determinar a riboflavina em rações de animais e suplementos vitamínicos. Foi utilizado como eletrodo de trabalho, carbono vítreo e eletrodo de referência, um eletrodo de cloreto de prata-prata; foi empregado para remoção do oxigênio, o gás nitrogênio e foi determinado que as melhores soluções de suporte seriam o citrato de diamônio e o hidrogenotartarato de sódio. Foi encontrada uma boa faixa de linearidade na curva analítica nos intervalos de concentração de 10 a 3500 mg kg<sup>-1</sup> e um limite de detecção de 5,0 x 10<sup>-4</sup> mg kg<sup>-1</sup>.

Sá (2015), desenvolveu um método eletroanalítico para a determinação da riboflavina em fármacos, utilizando um eletrodo de filme de bismuto (BiFE), o eletrodo de cobre como substrato e como eletrólito de suporte um tampão de acetato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. A técnica utilizada foi voltametria de onda quadrada e foi observado que os potenciais dos picos utilizados é dependente do pH, além disso foi encontrada uma boa faixa de linearidade na curva de calibração em dois intervalos de concentração, o primeiro de 0,3 a 0,8 µmol L<sup>-1</sup> e o segundo de 1,0 a 9,0 µmol L<sup>-1</sup>, e um limite de detecção de 0,1 µmol L<sup>-1</sup>.

Mas além da utilização de eletroquímica, Wang et al (2007) utilizaram a quimioluminescência que ocorre na reação de decomposição do peroxomonossulfato (HSO<sub>5</sub><sup>-</sup>). Foi observado que quando adicionadas pequenas quantidades de riboflavina na mistura de HSO<sub>5</sub><sup>-</sup> e Co(II), que foi utilizado como catalisador, acontecia um realce na emissão de quimioluminescência que apresentava uma relação linear com a sua concentração, portanto foi desenvolvido um sistema de injeção em fluxo (Figura 2) para monitorar a intensidade de quimioluminescência e determinar a quantidade de riboflavina em formulações farmacêuticas. Para isso foi medida a intensidade do branco, HSO<sub>5</sub><sup>-</sup> e CoSO<sub>4</sub>, e subtraída das medidas dos padrões e das amostras, que apresentavam um pico maior e mais definido conforme adicionada a riboflavina. Foi

encontrada uma boa linearidade na faixa de  $1,0 \times 10^{-4}$  a  $1,0 \times 10^{-8}$  g mL<sup>-1</sup> e um limite de detecção de  $9,0 \times 10^{-9}$  g mL<sup>-1</sup>. Além disso foi constatado que o método é bastante seletivo, pois não houve grandes efeitos de interferentes, sensível e preciso.

**Figura 2.** Esquema do sistema de injeção em fluxo para reação, sendo P1 e P2 as bombas peristálticas; S, injetor de amostra; M, tubo de mistura; F, célula de fluxo e W, descarte.



Fonte: WANG, et al. (2007)

### 3.2. DISPOSITIVOS ANALÍTICOS DE PAPEL (μPAD)

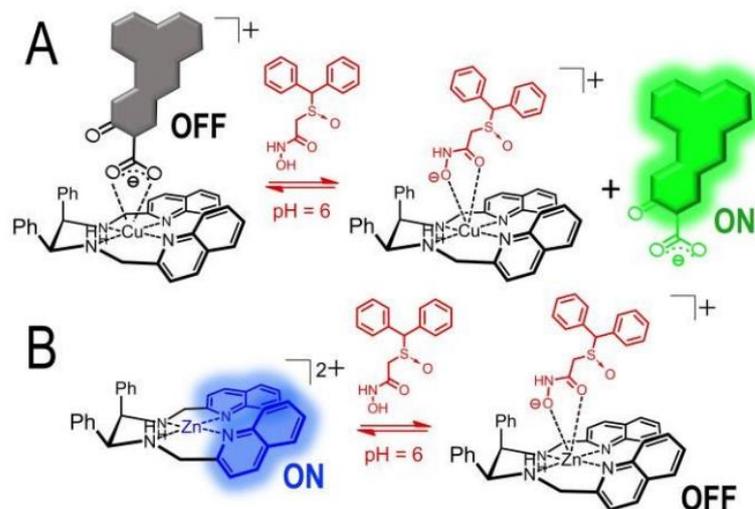
Dispositivos analíticos de papel ou μPADs geralmente são um arranjo de microestruturas hidrofílicas e hidrofóbicas padronizadas em um substrato de papel como papel cromatográfico e papel filtro, utilizando diversas técnicas como impressão em cera, fotolitografia e deposição química de vapor (FU; WANG, 2018). É uma técnica de análises introduzida por Whitesides (2007) e apesar de não possuir a sensibilidade de um método convencional como os métodos espectrométricos, ainda é muito vantajosa por ser portátil, fácil de usar, possuir baixo custo de produção e não necessitar de grandes quantidades de reagentes (LI, et al., 2014). Como os tipos de papel utilizados passam pelo processo de branqueamento e são compostos por celulose pura, não sendo introduzidos outros aditivos, são dispositivos que não possuem interferentes e impurezas que podem eventualmente prejudicar algumas análises (FU; WANG, 2018). De acordo com Fu e Wang (2018) o método de análise mais utilizado com esta técnica é o colorimétrico mas também é possível utiliza-la para análises eletroquímicas, fotoeletroquímicas e inclusive fluorimétricas.

O processo para análise fluorimétrica consiste na aplicação da amostra no dispositivo e a emissão de uma fonte de luz com comprimento de onda adequado para a sua excitação. A luz resultante então é filtrada para que o detector somente detecte

os fótons de emissão da amostra e então a intensidade é medida e usada para determinar a concentração do analito.

Caglayan, et al (2016), desenvolveram um método para a análise de Adrafinil, uma droga proibida pela Agência Mundial Anti-Doping utilizada para o tratamento de distúrbios do sono, em urina utilizando fluorescência e dispositivos de papeis. Foi sintetizado um ligante (meso-1,2-difenil-N,N'-bis(quinoline-2-ylmethyl)-ethane-1,2-diamine) que se coordena com metais de transição d9 e d10 oferecendo dessa forma o mecanismo de fluorescência (Figura 3).

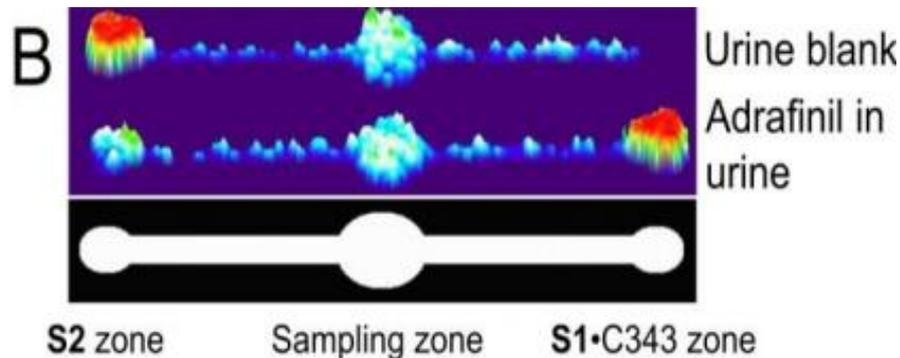
**Figura 3.** Mecanismos utilizados para a análise de Adrafinil. A sendo o mecanismo para o complexo de cobre e B para o de zinco.



Fonte: CAGLAYAN, et al. (2016)

Os metais utilizados foram Cu (II) e Zn (II), quando o zinco é utilizado (S2) a parte de quinolina do complexo fluoresce e na presença do analito o complexo não emite mais, quando o cobre é utilizado (S1) é necessário a utilização de um indicador de fluorescência, o Coumarin 343 (C343) que quando coordenado ao complexo sua emissão é bloqueada porém na presença do analito ocorre a substituição do indicador pelo analito e sua fluorescência é restaurada (CAGLAYAN, et al., 2016). Foi desenvolvido então um dispositivo de papel que envolve a impressão em um papel cromatográfico com uma impressora de cera zonas de amostragem (Figura 4).

**Figura 4.** Zona de amostragem e reação do Adrafinil com os complexos.



Fonte: CAGLAYAN, et al. (2016)

As intensidades foram então analisadas por meio de uma análise linear discriminante (LDA), e eles constataram um limite de detecção de  $0.04 \mu\text{mol L}^{-1}$ , uma alta precisão e uma alta repetitividade do método, tendo um resultado satisfatório no final do estudo.

### 3.3. IMAGENS DIGITAIS EM QUÍMICA ANALÍTICA.

Análises por meio de imagens digitais são técnicas de baixo custo que se baseiam no uso de sensores digitais como scanners, smartphones e câmeras que são responsáveis por capturar as imagens e convertê-las em dados de, por exemplo, intensidade das cores primárias (RGB) (LUCHIARI, et al., 2019). Então, por facilitarem a instrumentação, diminuir o tempo de análise e os resíduos químicos, atualmente cada vez mais estão sendo utilizados dispositivos digitais e eletrônicos na química analítica, substituindo análises em equipamentos caros e utilizando técnicas complexas por determinações qualitativas e quantitativas com o auxílio de imagens digitais.

De acordo com Granica e Tymecki (2019) a técnica mais utilizada de conversão de dados é o modelo de cor RGB que assume que todas as cores podem ser descritas pelas três cores primárias: vermelho (R), verde (G) e azul (B), desta forma a cor e sua intensidade podem ser convertidas em parâmetros digitais que são armazenados e avaliados para se obter a informação analítica. E para isso, o smartphone é o exemplo mais importante de dispositivos utilizados na química analítica por possuir diversas ferramentas de detecção, como câmeras de alta resolução, microfones, sensores de

proximidade e sensores de intensidade da luz, e conseguir representar essa intensidade em sinais analíticos (GRANICA; TYMECKI, 2019).

Granica e Tymecki (2019) utilizaram um smartphone Samsung Galaxy A5 e a técnica RGB de detecção para realizar análises fluorimétricas com riboflavina, rodamina B, quinina e calceína. Eles concluíram que o canal verde do RGB é o mais sensível e que o método poderia substituir o uso de fluorímetros convencionais por proporcionarem baixos limites de detecção e curvas com elevada linearidade.

Há ainda um trabalho feito por Song, et al (2017) para a detecção de um agente clareador utilizando um smartphone e um dispositivo de papel, onde a amostra é aplicada no papel e esta é irradiada por um comprimento de onda na faixa do UV, promovendo uma emissão azul, que é captada pelo celular e posteriormente processada por um software, ImageJ, para analisar os valores de cinza na zona de detecção. O estudo proporcionou um método barato, portátil e efetivo para esse tipo de análise com limite de detecção de  $0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

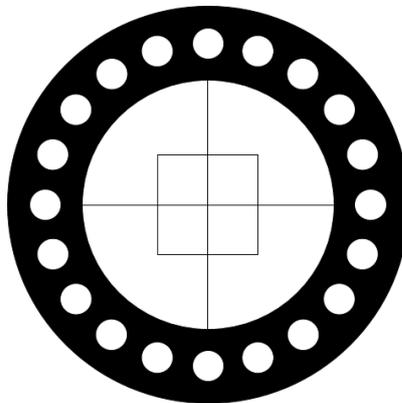
Portanto há uma grande vantagem em combinar o uso de  $\mu\text{PAD}$  e smartphones para proporcionar uma detecção com uma instrumentação mais fácil e mais barata, e um menor uso de reagentes. A maioria das análises utilizando smartphones na literatura são feitas por meio de análises de fotos com softwares específicos, o instrumento desenvolvido possui a vantagem de nos permitir realizar as medidas em tempo real, o que nos proporciona ainda, observar a degradação da riboflavina conforme a luz é emitida.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. DISPOSITIVO ANALÍTICO DE PAPEL ( $\mu$ PAD)

Para construir o dispositivo de papel utilizado foi necessário primeiro produzir o *layout* da Figura 5 em um aplicativo como o Microsoft-PowerPoint. O layout consistiu de um círculo com 80 mm de diâmetro, contendo 20 spots com 5,0 mm de diâmetro dispostos em ângulos de 18 graus entre eles. O arranjo proposto foi impresso em papel cromatográfico CHR1 da Whatman®, utilizando uma impressora a base de cera (Xerox ColorQube 8580).

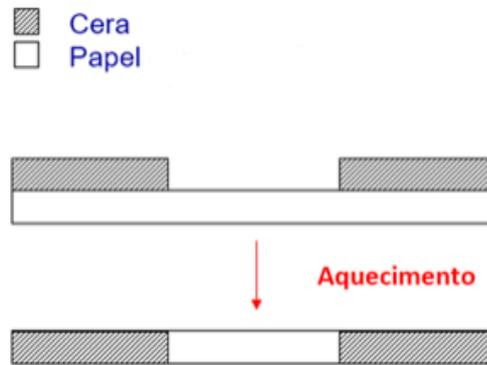
**Figura 5.** Dispositivo analítico de papel utilizado na determinação de riboflavina.



Fonte: acervo pessoal.

Depois de impressos, os papeis foram colocados em estufa por 5 minutos a 80°C para que a cera (regiões em preto na Figura 5) fosse derretida e absorvida pelo papel, delimitando as áreas hidrofílicas dentro dos spots e as áreas hidrofóbicas nas regiões com cera (Figura 6). Em seguida, a parte de trás do papel foi selada com adesivo de vinil (Contact®) para que não houvesse vazamento de líquido pelo fundo dos spots. Para isso, após a aplicação do adesivo, o papel foi passado por uma laminadora de documentos a 150 °C para que a adesão do vinil se tornasse mais efetiva. Por fim os círculos foram cortados sob medida com uma cortadora a laser (Laserline-NX01).

**Figura 6.** Dispositivo de papel antes e após o aquecimento na estufa.



Fonte: PEREIRA (2021)

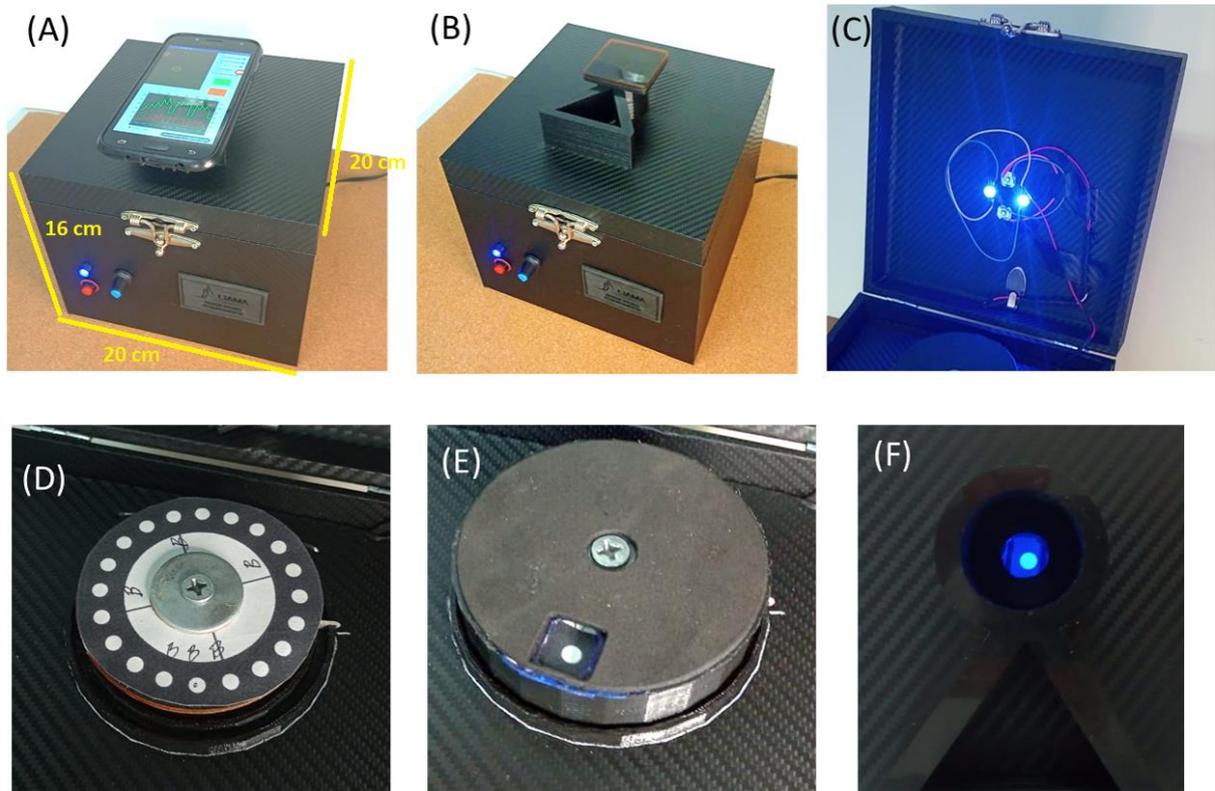
#### 4.2. INSTRUMENTO

Para a realização das medidas de cada spot do dispositivo, de forma sequencial e independente, utilizou-se o instrumento mostrado na figura 7. Seus componentes foram integrados à uma caixa de madeira com dimensões de 16 cm x 20 cm x 20 cm que dispõe de um suporte de acrílico circular para fixação do dispositivo de papel (Figura 7 (D)), e o qual é preso com um parafuso, ao eixo de um motor de passos (NEMA 17).

Sobre o dispositivo de papel e o suporte de acrílico foi colocado um anteparo, fabricado por impressão 3D, que deixa à mostra somente o spot de interesse para que os outros não sejam atingidos pela radiação, o que causaria a degradação do analito (riboflavina).

Na parte inferior da tampa há dois pares de LED, um par azul com emissão em aproximadamente 470 nm e outro par com radiação UV emitindo em 370nm, sendo utilizado para este trabalho somente o par de LED azul. É importante notar que o LED irradia de forma uniforme cada spot, pois se isso não acontecesse as medidas não seriam confiáveis. Na parte superior da tampa se encontra o suporte para o celular, onde também se encaixa um filtro óptico de absorção de vidro (verde amarelado) entre o smartphone e o instrumento (Figura 7 A e B). Como será discutido mais adiante, o filtro tem a função de minimizar a detecção de radiação do LED refletida pelo papel, e favorecer a detecção da radiação de interesse. Vale destacar que a tampa do instrumento e o suporte para o celular possuem orifícios para visualização de cada spot irradiado (Figura 7 F).

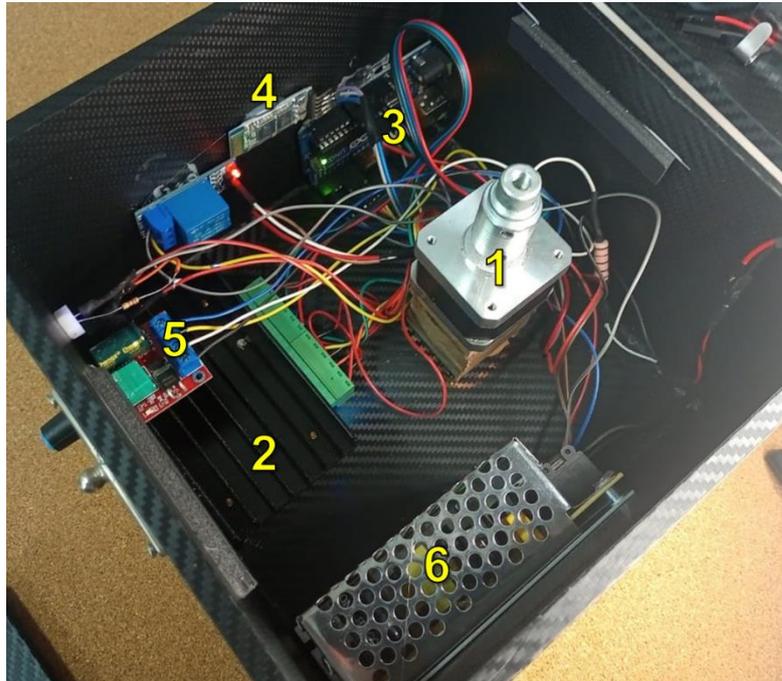
**Figura 7.** Detalhes do instrumento utilizado sendo: (A) dimensões e visão externa do instrumento com o celular no suporte. (B) visão externa do instrumento com o filtro encaixado, (C) visão interna da parte inferior da tampa mostrando os LEDs azuis em funcionamento, (D) suporte de acrílico com o dispositivo de papel fixado por parafuso, (E) dispositivo protegido pelo anteparo, (F) orifício para visualização dos spots.



Fonte: acervo pessoal

Na Figura 8 é mostrado o arranjo eletromecânico que permite a automação do procedimento como o motor de passos (1), o que faz com que cada um dos spots vá para a região aberta do anteparo e seja irradiada pelo LED azul. Para o controle do motor foi utilizado um microcontrolador arduino UNO (3) que é responsável pela comunicação entre o módulo Bluetooth (4) e o driver do motor de passos (2), ou seja, o arduino recebe as informações do software utilizado no celular via Bluetooth e as interpreta e envia para o driver que então faz com que o motor de passos gire no momento certo. Há ainda um regulador do tipo PWM (5), que controla a intensidade do LED, e a fonte de alimentação dos circuitos (6).

**Figura 8.** Interior do instrumento contendo: 1- motor de passos, 2- driver do motor, 3- arduino, 4- módulo bluetooth, 5- regulador PWM e 6- fonte de alimentação.



Fonte: acervo pessoal.

#### 4.3. APLICATIVO

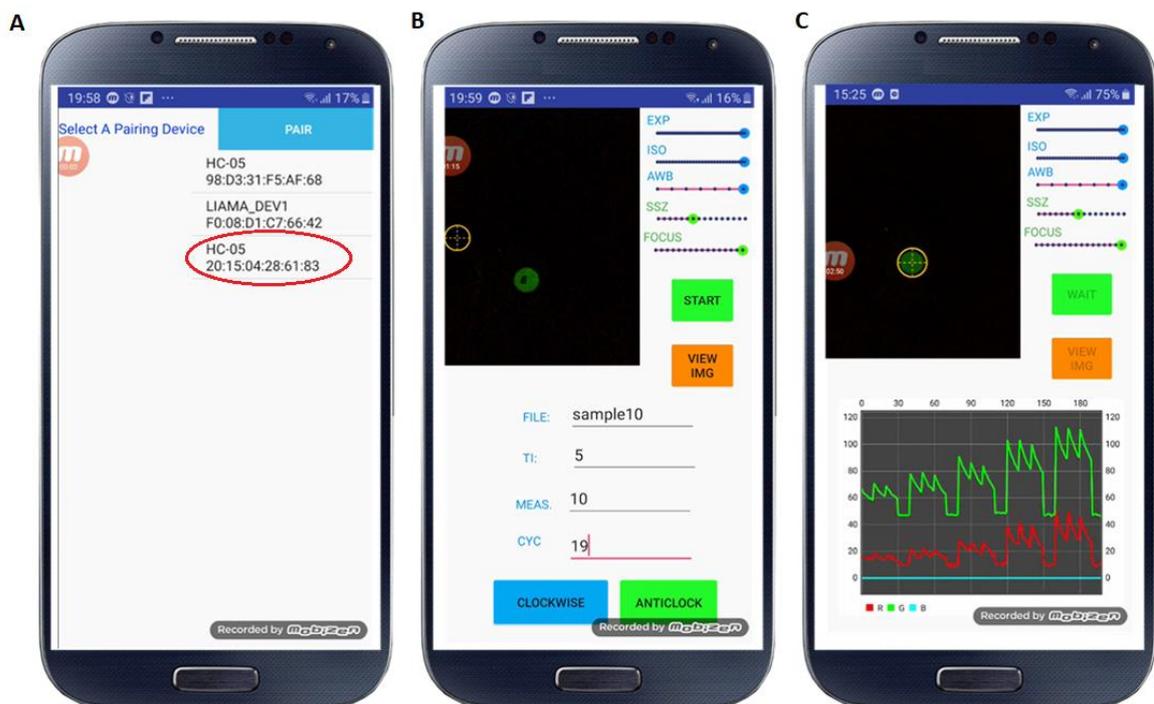
Para o controle do instrumento foi desenvolvido um aplicativo para uso no sistema operacional Android®. A Figura 9 mostra as etapas até a obtenção do gráfico. Quando é selecionado o aplicativo no celular, este é carregado e a primeira tela (A) nos permite selecionar o dispositivo bluetooth de interesse para o pareamento, para o instrumento utilizado seleciona-se a terceira opção da lista, o HC-05 destacado na imagem. Quando o pareamento é realizado, o aplicativo nos mostra a segunda tela (B) que nos permite modificar diversas ferramentas para melhor obtenção das imagens enquanto nos mostra a imagem em tempo real sendo captada pela câmera do celular. Foi observado que para a melhor captura da imagem a exposição (EXP), a sensibilidade (ISO), o balanço de brancos (AWB) e o foco (FOCUS) devem ser mantidos no máximo. O controle “ssz” determina o tamanho do amostrador de RGB, o pequeno círculo amarelo mostrado na Figura 9 B que delimita os pixels da imagem que serão utilizados para a aquisição do sinal. Como mostra a Figura 9 C, seu diâmetro é ajustado de forma a envolver todo o spot a ser lido.

Durante o procedimento de leitura, o motor de passos gira exatamente em incrementos de  $18^{\circ}$  de forma a posicionar, de forma uniforme, cada spot sob a radiação do LED. Apesar disso, pequenas variações podem ocorrer fazendo com que

o amostrador de RGB não fique perfeitamente alinhado com os spots. Para resolver esse problema, foi implementada na programação uma sub-rotina que permite localizar o centro do spot na imagem e alinhar o amostrador com ele, a cada leitura, tornando a medida mais reprodutível. De fato, para que isso seja possível, o software transforma a imagem colorida em uma imagem em preto e branco com alto contraste, para facilitar a localização do spot e de seu centro, o que não é acompanhado pelo usuário durante as medidas. Assim, para ter certeza de que a imagem em preto e branco a ser utilizada está de acordo com os parâmetros desejados pressiona-se o botão “VIEW IMAGE” e se o círculo estiver bem definido, sem defeitos, a análise está pronta para ser realizada.

Logo abaixo dessas regulagens, é preciso determinar alguns parâmetros para a realização das análises: em “FILE” escreve-se o nome do arquivo a ser salvo no celular, em “MEAS” determina-se a quantidade de medidas a serem tiradas em cada spot e em “CYC” determina-se a quantidade de ciclos a serem realizados, ou seja, quantos spots serão analisados. Neste trabalho não se utiliza o parâmetro “TI”.

Figura 9. Telas utilizadas no aplicativo: A- primeira tela para pareamento do instrumento, B- segunda tela para ajuste dos parâmetros e C- tela onde acontece a obtenção do gráfico.



Fonte: acervo pessoal.

Com todos os parâmetros regulados a análise pode começar a ser feita, pressionando o botão “START” e o aplicativo começará a realizar as medidas. A análise segue o sistema RGB onde o amostrador vai medir os parâmetros R, G e B de cada pixel em seu interior e fazer uma média dessas cores plotando esses dados em um gráfico contendo uma curva para cada cor.

#### 4.4. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada por osmose reversa e reagentes com ao menos 99% de pureza. As soluções padrão de vitamina B2 foram preparadas a partir de uma solução estoque de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , a qual foi preparada pela dissolução de 0,0509g de riboflavina da marca Sigma em 500,0 mL de ácido acético 0,64% (m/v) a quente. A solução de ácido acético 0,64% (m/v) foi preparada pela diluição de ácido acético glacial da marca Synth.

As soluções das amostras de suplementos de vitaminas do complexo B foram preparadas de acordo com sua apresentação, dois xaropes e duas soluções em gota foram diluídas para a concentração de aproximadamente  $6,0 \text{ mg L}^{-1}$  (com base na concentração indicada no rótulo) em solução de ácido acético 0,64 % (m/v). Para uma amostra comercializada como comprimido efervescente, foram triturados 3 comprimidos e pesada a massa média pulverizada e homogeneizada equivalente a um comprimido, a qual foi dissolvida/diluída em 250mL de ácido acético 0,64% (m/v).

#### 4.5. PROCEDIMENTOS NA LEITURA DO PAPEL

Para as análises no instrumento foram transferidos  $2,0 \mu\text{L}$  das soluções de trabalho para cada um dos spots, utilizando uma micropipeta e a técnica de pipetagem reversa que, segundo Ewald (2015), apresenta melhores resultados para a aplicação de volumes muito pequenos. Além disso, para diminuir as chances de erro, também é recomendado dispensar a gota verticalmente e encostá-la no papel para que este seja prontamente absorvida pelo papel, em vez de soltá-la.

Os spots foram então secos com o auxílio de um secador de cabelos e o LED ajustado no máximo de intensidade, após a fixação do  $\mu\text{PAD}$  ao suporte do instrumento. Como dito anteriormente, os parâmetros de imagem foram ajustados para o máximo no aplicativo de controle e foram realizadas 10 leituras de RGB para cada spot.

#### 4.6. PROCEDIMENTOS PARA MEDIDA NO ESPECTROFLUORÍMETRO

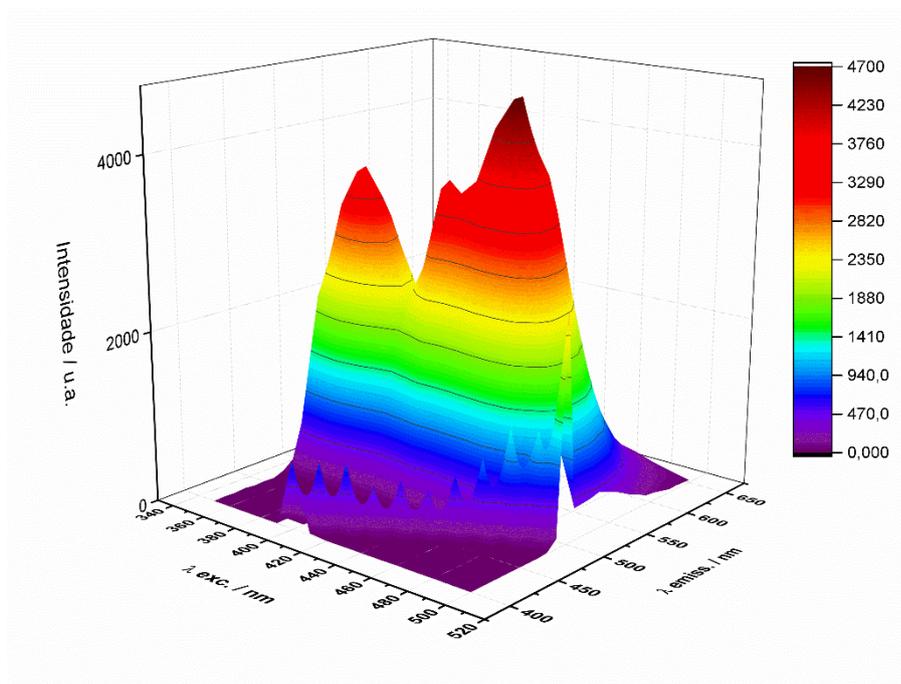
O método de referência escolhido foi o sugerido pela AOAC. Foi utilizado um espectrômetro de fluorescência Lumina da marca Thermo Scientific para a realização das análises.

As medidas foram realizadas nas soluções padrão de 2,0 mg L<sup>-1</sup> a 10,0 mg L<sup>-1</sup> e nas amostras, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm; os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 460 nm e 525 nm respectivamente.

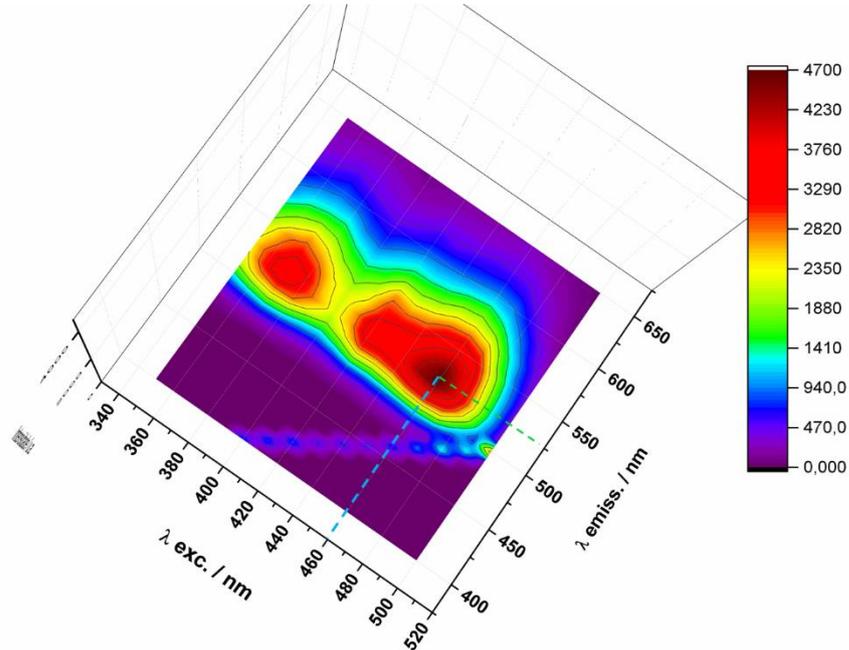
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi realizado um estudo para se determinar os comprimentos de onda de máxima emissão e excitação da riboflavina por meio de um espectro de fluorescência 3D. Para isso foi utilizada uma solução padrão de riboflavina de  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  dissolvida em ácido acético a 0,64% m/v, e realizada uma varredura para a obtenção do espectro 3D, utilizando o mesmo espectrômetro de fluorescência Lumina da marca Thermo Scientific. Os espectros de emissão foram adquiridos no intervalo de 400 nm a 650 nm variando-se a excitação de 350 nm a 500 nm em incrementos de 10 nm. O resultado obtido foi um pico de maior intensidade em 460 nm para a excitação e aproximadamente 525 nm para emissão (Figuras 10 e 11)

**Figura 10.** Espectro de fluorescência 3D da riboflavina



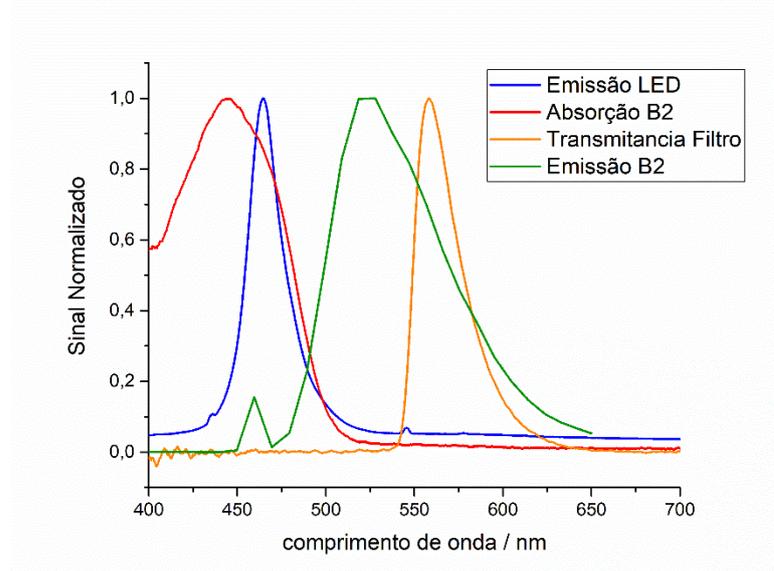
Fonte: Acervo pessoal

**Figura 11.** Gráfico 2D do espectro da riboflavina

Fonte: acervo pessoal

Foram obtidos também os espectros de emissão do LED azul e de transmitância do filtro óptico e para isso, utilizou-se um espectrômetro UV-vis USB2000 da marca Ocean Optics. Para medidas de comparação, os espectros obtidos (Figura 12) tiveram os valores de intensidade normalizados, mantendo-se os dados de comprimento de onda. O pico de emissão do LED foi observado em aproximadamente 460 nm, que, como observado no espectro se encontra dentro da faixa de absorção da riboflavina. Já para o valor de transmitância do filtro, foi encontrado uma banda na faixa de 540 nm a 600 nm, o que nos mostra que há passagem da radiação emitida pela vitamina e bloqueio da reflexão da luz azul do LED pelo papel.

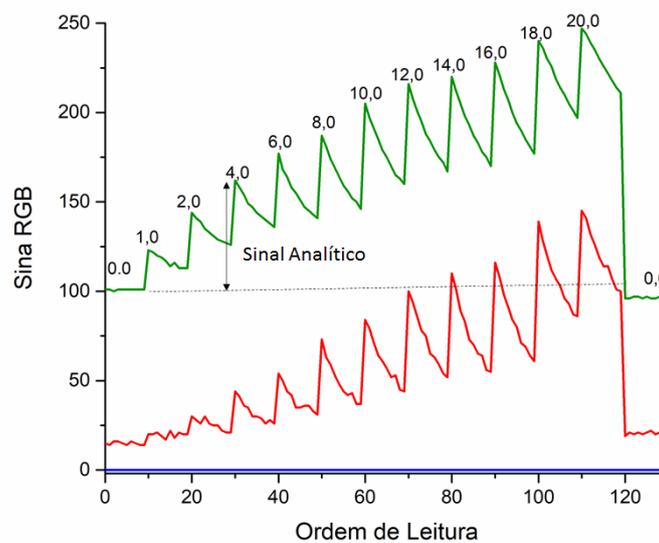
**Figura 12.** Gráfico com os espectros da riboflavina, do LED e do filtro.



Fonte: acervo pessoal.

Posteriormente foram então realizados os testes para validação do método. Primeiro foi realizado um teste de linearidade onde se utilizou as soluções padrão de riboflavina com concentrações de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  a  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ , além de uma solução em branco contendo somente a solução de ácido acético 0,64%. Os resultados para as medidas de intensidade nas componentes RGB são mostrados na Figura 13.

**Figura 13.** Gráfico sinal RGB vs ordem de leitura



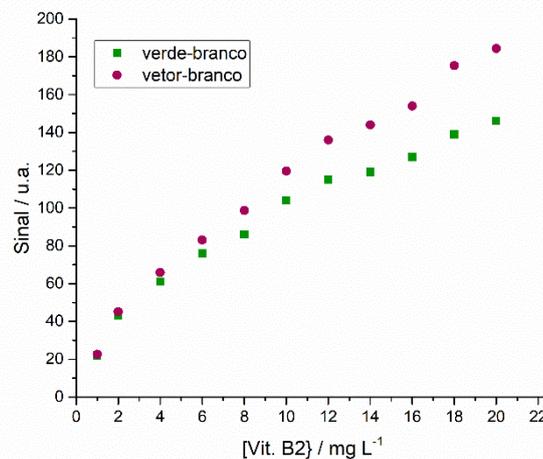
Fonte: acervo pessoal.

Nota-se que somente existem sinais nas componentes verde e vermelho, pois o filtro elimina a componente azul. Além disso, observa-se que os sinais para o analito atingem a máxima intensidade na primeira leitura e que esse sinal começa a decair com o tempo, indicando que há degradação rápida da molécula quando esta está sob exposição de radiação. Nota-se também que o branco das duas componentes (R e G) não se inicia do 0, o que indica que há alguma reflexão do papel, desta forma o sinal analítico foi considerado como a diferença entre o sinal máximo e o sinal do branco (detalhe na Figura 13 para o padrão de 4,0 mg L<sup>-1</sup>).

Como o sinal predominante ocorre na componente verde mas existe sinal na componente vermelha foi plotado um gráfico com os valores do sinal para a componente verde e para o vetor entre a componente verde e a vermelha corrigidas do valor do branco *versus* a concentração de riboflavina dos padrões (Figura 14). O módulo do vetor foi calculado utilizando a equação 1 para cada sinal.

$$\text{vetor } RxG = \left| \sqrt{R^2 + G^2} \right| \quad (1)$$

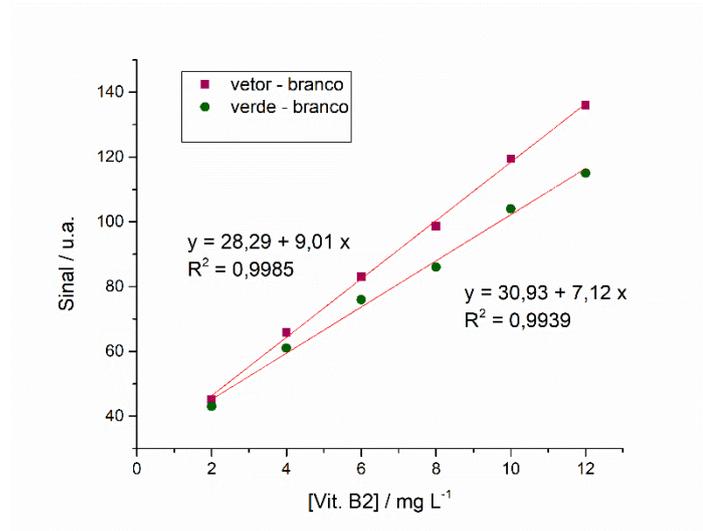
**Figura 14.** Gráfico do sinal vs a concentração de riboflavina



Fonte: acervo pessoal.

Observou-se que a faixa linear ocorre no intervalo de 2,0 mg L<sup>-1</sup> a 12,0 mg L<sup>-1</sup>, o que fica melhor representado nos gráficos da Figura 15 que mostram as equações das retas e os respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>).

**Figura 15.** Gráfico do sinal vs concentração da riboflavina na faixa de 2ppm a 12ppm

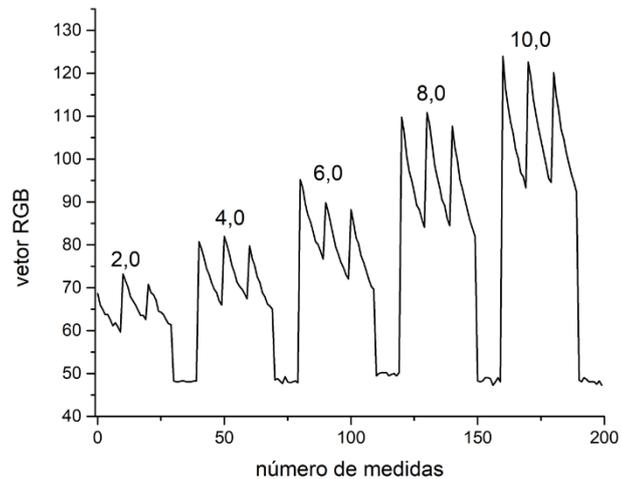


Fonte: acervo pessoal.

Nota-se neste gráfico da Figura 15 uma melhor sensibilidade e uma maior linearidade na curva do vetor indicados pelo coeficiente angular e o  $R^2$  respectivamente. Logo, para as curvas analíticas empregadas para as determinações de riboflavina, foi utilizado o sinal do vetor.com combinação das componentes R e G.

A precisão das medidas em um mesmo dispositivo foi avaliada pela aplicação em triplicata dos padrões de 2,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> intercaladas por aplicações da solução em branco, sendo o registro apresentado na Figura 16. Como pode ser visto, os sinais para o branco se mantiveram em um nível praticamente constante (entre 45 e 50 unidades de intensidade) e os picos para os padrões, com exceção para o padrão de 6,0 mg L<sup>-1</sup> também se apresentaram uniformes.

**Figura 16.** Gráfico do sinal das medidas em triplicata.



Fonte: acervo pessoal

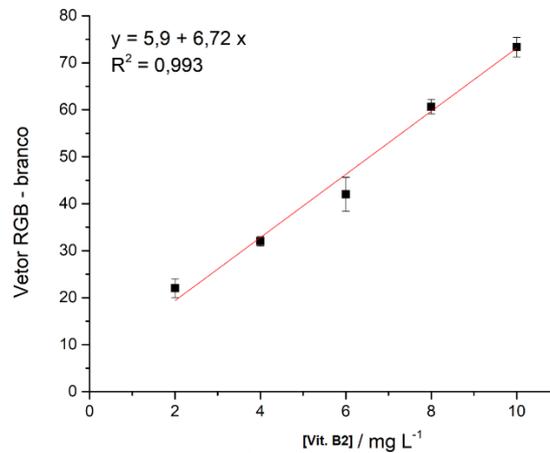
Para cada ponto de concentração foi calculada a média do sinal de pico e o seu desvio padrão, representado pela barra de erro, para avaliar a repetitividade do método (Figura 17). Nota-se que a maioria dos pontos apresentam desvios muito pequenos com exceção do ponto da solução de 6,0 mg L<sup>-1</sup>, que apresentou um decréscimo no sinal ao longo das triplicatas.

A curva analítica baseada nas respostas para as triplicatas (Figura 17) apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,993, confirmando a resposta linear do vetor RGB para a concentração do analito. Com base nessa curva analítica foi calculado também o limite de detecção (L.D) da técnica, ou seja, a menor quantidade que pode ser detectada com segurança pelo instrumento, utilizando a equação 2:

$$\text{Sinal para LD} = b + 3 \times D.P \quad (2)$$

Onde “b” o coeficiente linear da reta do tipo  $y = ax + b$  e D.P o desvio padrão para o cálculo de b. O L.D resultante foi de 0,9 mg L<sup>-1</sup> encontrado pela substituição do valor do sinal achado na equação da reta de calibração. Este L.D é adequado para esta técnica visto que a riboflavina se apresenta em quantidades muito superiores nos suplementos, o que exige a diluição das amostras para a análise.

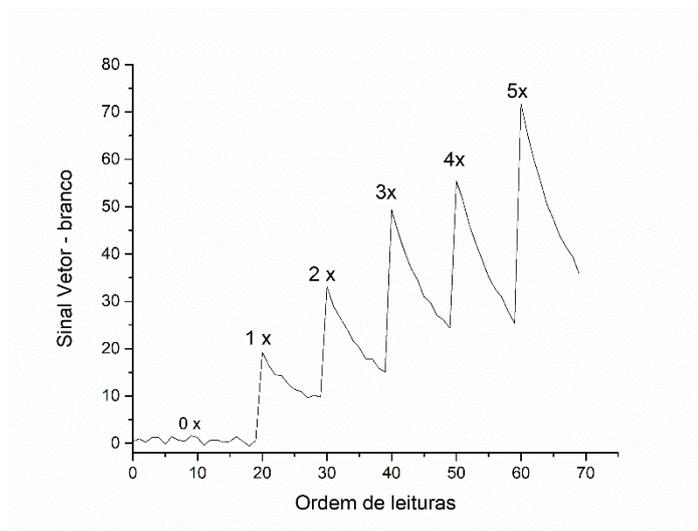
**Figura 17.** Curva analítica do sinal das triplicatas.



Fonte: acervo pessoal

Deve-se pontuar, entretanto, que limites de detecção menores podem vir a ser obtidos ao se realizar adições sucessivas das soluções nos spots, resultando em um aumento do sinal analítico. De fato, foram realizadas adições múltiplas de 2,0 µL da solução padrão de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de riboflavina em diferentes spots de forma a demonstrar que é possível amplificar o sinal analítico para uma solução de concentração mais baixa. Como pode ser visto na Figura 18, há um aumento praticamente linear do sinal quando se procede com até cinco adições sucessivas do analito. Vale relatar que entre cada adição é necessário realizar a secagem do spot.

**Figura 18.** Gráfico com do sinal analítico com adições sucessivas.



Fonte: acervo pessoal

Foi calculada também a precisão do método, em termos de coeficiente de variação, conforme mostra a Tabela 1, esta varia de 2,5% a 9%, sendo o maior percentual para o padrão de menor concentração, 2,0 mg L<sup>-1</sup>, o que sugere uma precisão adequada para o método. Essa variação no sinal se deve a diversas fontes de erro, como a pipetagem de um volume muito pequeno (2,0 µL), onde podem ocorrer variações na gota afetando o resultado final, o tamanho dos spots impressos que também pode variar, o que acabaria espalhando mais ou menos a solução e a análise de uma massa muito pequena. Por exemplo, para a solução de 2,0 mg L<sup>-1</sup>, somente 4,0 ng de riboflavina são transferidos para o spot em 2,0 µL, o que certamente afeta a precisão do método por se tratar de uma quantidade ínfima de analito.

**Tabela 1.** Resultados estatísticos para as medidas da curva de calibração. Média do sinal, desvio padrão e precisão (coeficiente de variação).

<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Precisão (%)</b>
<b>2</b>	22	2,0	9,0
<b>4</b>	32	1,0	3,0
<b>6</b>	42	3,6	8,5
<b>8</b>	61	1,5	2,5
<b>10</b>	73	2,1	2,8

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

Por fim, para a avaliação da exatidão do método foram realizadas análises em 5 amostras de suplementos de vitamina B2 no instrumento proposto e por meio do método de referência, utilizando espectroscopia de fluorescência. Para efeitos de comparação esses resultados são apresentados na Tabela 2 juntamente com os desvios padrão e os erros relativos.

**Tabela 2.** Resultados para determinação de riboflavina em medicamentos. Comparação entre o instrumento e o método de referência.

<b>Amostra</b>	<b>Unidade</b>	<b>Instrumento proposto</b>	<b>Método de referência</b>	<b>Erro relativo (%)</b>
<b>1</b>	mg/mL	2,54 ± 0,19	2,55 ± 0,06	-0,39
<b>2</b>	mg/mL	1,09 ± 0,01	1,04 ± 0,05	4,81
<b>3</b>	mg/g	1,09 ± 0,01	1,04 ± 0,02	4,81
<b>4</b>	mg/mL	1,11 ± 0,09	1,08 ± 0,03	2,78
<b>5</b>	mg/mL	0,67 ± 0,05	0,66 ± 0,03	1,52

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

Nota-se que todos os erros são menores que 5% evidenciando que o método possui uma boa exatidão. Além disso foram realizados testes t com 95% de confiança e foi indicado que não existem diferenças significativas entre os métodos, ou seja, os resultados não diferem entre si e todas as hipóteses nula foram aceitas.

## 6. CONCLUSÃO

Foram realizadas análises em amostras de suplementos e em soluções padrão no instrumento construído e no método de referência para avaliar a precisão e a exatidão do método e foram obtidos resultados analíticos satisfatórios para a validação do método.

Portanto foi demonstrado que o presente método utilizando um instrumento lab-made, imagens digitais e dispositivos analíticos de papel controlados por um aplicativo de smartphone, apresenta potencial para ser utilizado para a determinação quantitativa de vitamina B2 por fluorescência, apresentando resultados de precisão e exatidão satisfatórios para tal. Além disso, o instrumento por ser de fácil transporte e controlado somente por um smartphone facilitaria a sua utilização em campo e por laboratórios que por ventura não possam arcar com os custos de um espectrofluorímetro ou fluorímetro. Portanto os estudos demonstraram que o método apresentou uma rápida e fácil obtenção dos resultados e uma alta confiabilidade.

Porém são necessários mais estudos para que o instrumento funcione de forma cada vez mais eficiente e as medidas sejam realizadas mais facilmente, podendo servir como uma técnica extremamente útil nas análises desse tipo de suplemento e até para outros produtos que contenham vitamina B2.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALL, G.F.M. Vitamins: Their Role in the Human Body. *Blackwell Publishing*. London, 2004.

VIEIRA, B. D. T. N. *Determinação simultânea das vitaminas do complexo B em carne de bovino por HPLC*. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011. Disponível em: <<http://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/4185/1/Tese%20vitaminas.pdf>>. Acesso em: 1 ago. 2021.

SOMER, E. The Essential guide to vitamins and minerals, *Harper Perennial*, A Division of HarperCollins Publishers: Nova York, 1992 pp 1-48.

FRED, Myer. Methods of Vitamin Assay, 3ed, *Interscience Publishers*, Nova York p. 147-166.

RUBERT, Aline et al. Vitaminas do complexo B: uma breve revisão. *Revista Jovens Pesquisadores*, Santa Cruz do Sul, v.7, n. 1, p. 30-45, jan./jun. 2017.

MAQBOOL, Muhammad Amir et al. Biological importance of vitamins for human health: A review. *Journal of agriculture and basic Science*, v. 2, n. 3, 2017.

RUCKER, Robert B. et al. *Handbook of vitamins*. 4. Ed. Boca Raton, FL: CRC press, 2007. 571 p.

POWERS, Hilary J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr* 77, p. 1352–1360. 2003

The United States Pharmacopeia-The National Formulary. USP-23, NF-18,1995, p. 1379-1381.

Official Methods of Analysis of the AOAC, 14<sup>a</sup> ed., *Association of Official Analytical Chemists*, Inc., Arlington, 1984, p. 868,869.

SAID, HM & ROSS, C. Riboflavin. In *Modern Nutrition in Health and Diseases*, 11 ed. Philadelphia, PA: Shils, ME, Shike, M, Ross, C, Caballero, B and Cousins, RJ, editors, 2013.

PETTEYS, B. J., & FRANK, E. L. Rapid determination of vitamin B2 (riboflavin) in plasma by HPLC. *Clinica Chimica Acta*, 412(1-2), p. 38–43. 2011.

GHANN, Willian Emmanuel. *Studies of Surfactants Effect on Riboflavin Fluorescence and Its Determination in Commercial Food Products and Vitamin Tablets..* Tennessee, 2008. Tese (Master of Science in Chemistry) - East Tennessee State University.

ANICETO, Clezio et al. Determinação espectrofotométrica de vitamina B2 (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. *Química nova*, São Paulo, 23(5), out. 2000.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Farmacopeia Brasileira*, volume 2. 6<sup>a</sup> Ed. Brasilia, 2019.

ANISIMOVA, L. S. ; MIKHEEVA, E. V.; SLIPCHENKO, V. F.. Voltammetric Determination of Riboflavin in Vitaminized Supplements and Feeds. *Journal of Analytical Chemistry*, Russia, v. 56, n. 7, p. 658–662, 15 nov 2000.

LI, B; FU, L; ZHANG, W; FENG, W; CHEN, L. *Portable paper-based device for quantitative colorimetric assays relying on light reflectance principle* [J]. *Electrophoresis*. 2014;35(8):1152–9.

ZHANG, Xiu-Xiu *et al.* Sensitive paper-based analytical device for fast colorimetric detection of nitrite with smartphone. *Analytical and Bioanalytical*

*Chemistry*, Alemanha. 5 p, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0965-2>. Acesso em: 3 ago. 2021.

FU, Lung-Ming; WANG, Yao-Nan. Detection Methods and Applications of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Trends in Analytical Chemistry*, Taiwan. 60 p, 2018.

SÁ, Elder . *Determinação eletroanalítica da vitamina B2 (riboflavina) utilizando eletrodo de filme de bismuto*. Dissertação (Mestre em química) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, Florianópolis, 2015.

CARRILHO, Emanuel; MARTINEZ, Andres W.; WHITESIDES, George M. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 16, p. 7091–7095, 15 ago. 2009.

MARTINEZ, A. W., PHILLIPS, S. T., BUTTE, M. J., & WHITESIDES, G. M. (2007). Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), p.1318–1320.

CAGLAYAN, M. G, et al. Fluorescent zinc and copper complexes for detection of adrafinil in paper-based microfluidic devices. *Chemical Communications*, 2016.

LUCHIARI, Natália, et al. Development of miniaturized fluorimetric device for caffeine determination using a smartphone. RSC. 6p, 2019.

GRANICA, Mateusz; TYMECKI, Lukasz. Analytical aspects of smart (phone) fluorometric measurements. *Talanta*, Polônia, jan. 2019.

WANG, M., Zhao, L., LIU, M., & LIN, J.-M. Determination of riboflavin by enhancing the chemiluminescence intensity of peroxomonosulfate–cobalt(II) system. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. China, p. 1222–1227, jun. 2006.

SONG, Yi-Zhen, et al. Performance of electrokinetic stacking enhanced paper-based analytical device with smartphone for fast detection of fluorescent whitening agent. *Analytica Chimica Acta*, China, p. 85–90, 2017.

PEREIRA, Dênis Omael Silva. *Sistema controlado por smartphone para detecção de fluorescência em dispositivo de papel baseada em imagens digitais*. Orientador: Alexandre Fonseca. 2021. 37 f. TCC (Graduação) - Química tecnológica, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília. 2021.

EWALD, Kornelia. *Impact of pipetting techniques on precision and accuracy*. Userguide. Hamburgo, Alemanha, 2015, p. 4, n. 20.