

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM MATRIZES COMPLEXAS

Natália da Costa Luchiari, Juliano Passaretti Filho, Maria Angélica Martins Costa, Arnaldo Alves Cardoso, Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes

natalia.luchiari@iq.unesp.br; juliano.passaretti@gmail.com; mangelica@iq.unesp.br; acardoso@iq.unesp.br; paulocclair@iq.unesp.br

Resumo: *A presença de contaminantes emergentes em corpos hídricos aumentaram gradativamente ao longo dos anos resultando em um desequilíbrio em ambientes aquáticos. A cafeína destaca-se por seu consumo massivo que abrange desde a indústria alimentícia ao segmento de cosméticos. Em virtude do seu elevado uso e persistência no ambiente, a cafeína é considerada um marcador de atividade antropogênica. Para isso é fundamental desenvolver métodos para sua determinação. Embora a elevada sensibilidade da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando detectores espectrométricos seja um atrativo, esse tipo de análise apresenta portabilidade limitada, respostas não são em tempo real, requer preparo de amostras e analistas especializados. Dessa maneira, é necessária a busca por técnicas alternativas rápidas e portáteis gerando poucos resíduos químicos. Todos esses requisitos podem ser obtidos pela miniaturização do sistemas de análise. As reações colorimétricas são uma alternativa promissora de análise na determinação de cafeína em matrizes aquosas complexas.*

Palavras-chave: *cafeína ; colorimétrica ; esgoto ; impressora 3D*

Introdução: A cafeína é uma purina amplamente empregada em alimentos, fármacos e produtos em geral presentes na vida moderna [1]. A excreção humana é apontada como uma relevante fonte de disseminação de compostos no ambiente e, assim como a cafeína após ser consumida, tem como via final as águas residuárias comprometendo principalmente os ecossistemas aquáticos. A cafeína tem sua funcionalidade na natureza como um pesticida natural capaz de proteger as espécies de planta que à produz de ataques de insetos, pois atua como inibidor de atividades enzimáticas do sistema nervoso do organismo e por fim a morte [2]. Estudos realizados por Hollingsworth et al (2002) avaliaram o potencial da cafeína como pesticida para lesmas e caracóis em culturas de alimentos, sendo uma alternativa natural como repelente o que implica no seu potencial para gerar um desequilíbrio ambiental [3]. A cafeína pode ser determinada utilizando CLAE, entretanto esses métodos dependem de etapas de preparo de amostra, solventes orgânicos e operadores especializados. Para um monitoramento ambiental é necessário analisar amostras in situ bem como obter dados de diferentes regiões. Diferentes reações são usadas para a determinação de alcalóides, como a cafeína [4]. Dentre elas a reação entre cafeína e bromato de potássio ($KBrO_3$) em meio ácido como revelador em placas de TLC pode ser uma alternativa viável para a determinação desta purina mediante a mudança de cor usando uma reação química como sensor. Reações com resposta colorimétrica são uma alternativa analítica rápida e baixo custo para determinação de analitos como a cafeína e mostram-se promissoras para desenvolvimento de métodos eficazes de análise. A reação colorimétrica envolvendo $KBrO_3$ em meio ácido na presença de cafeína resulta em um composto com absorção máxima na região do espectro visível em aproximadamente 500 nm [5]. Embora a reação colorimétrica de estudo utilize reagentes agressivos ao meio ambiente, elas são realizadas usando volumes de reagentes na ordem de microlitros e não conferem risco significativo de toxicidade para o ambiente. Neste trabalho foram desenvolvidas duas propostas para plataformas de análise colorimétrica de cafeína em amostras de esgoto lab-made. Ambas as plataformas foram desenvolvidas utilizando manufatura aditiva (impressão 3D). Um sistema foi concebido para apenas suportar a reação, semelhante a um spot-test e o segundo foi construído visando o fluxo dos reagentes direcionados para um spot reacional contendo a amostra a ser analisada.

Experimental: Dispositivo: Os dispositivos foram previamente criados em um software de desenho paramétrico e impressos em PLA (ácido polilático) usando uma impressora 3D (3D Cloner ST printer, Ind. Schumacher Ltda., Brazil). Os spots foram confeccionados em dois modelos: um deles com 9 spots para análises em

multiplicatas com capacidade para 6 μL de volume total Figura 1 (a). O segundo dispositivo foi desenvolvido visando adicionar os reagentes separadamente para formar o produto reacional no spot central do dispositivo, Figura 1 (b).

Reação colorimétrica KBrO_3 : A reação consiste na mistura de 2 μL KBrO_3 2000 $\text{mg L}^{-1}_{(\text{aq})}$ e 2 μL padrões de cafeína de 10-200 $\text{mg L}^{-1}_{(\text{aq})}$ e 2 μL de ácido clorídrico 37% (HCl). Após a mistura dos reagentes o sistema foi submetido a aquecimento no microdispositivo 3D. Após o aquecimento e evaporação da solução resultante foram adicionados 10 μL de dimetilformamida (DMF) aos spots e o dispositivo e posterior evaporação do solvente por 30 minutos.

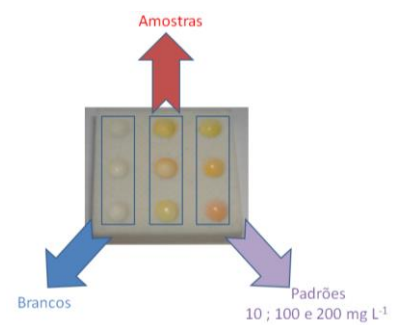
Resultados e discussões: A reação foi ajustada para microescala e a capacidade volumétrica de cada spot-test permitiu trabalhar com volumes de 2 μL de cada reagente para ensaio da reação colorimétrica. O volume de DMF adicionado em cada spot após completa evaporação dos solventes foi de 6 μL . Após 15 minutos o DMF evaporou e a resposta colorimétrica observada, resultando em spots com coloração avermelhada proporcionais as concentrações de cafeína adicionadas. A relação entre a variável verde (G) no sistema RGB de falsas cores referente às imagens individuais dos spots analisados mostraram uma boa correlação linear ($R^2 = 0.9944$) para uma faixa de 10 a 200 mg L^{-1} , como descrito pela Equação 1.

$$\text{Equação 1: } -\log(G/G_0) = 0.1398[\text{Cafeína } \text{mgL}^{-1}] + 0.0381$$

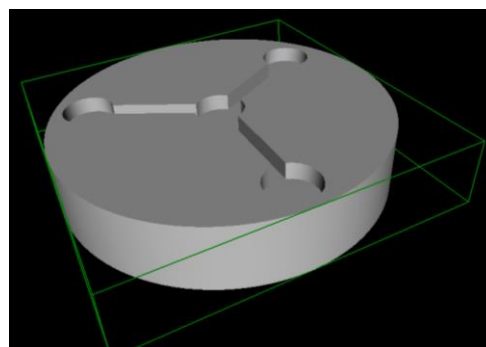
O preparo das soluções diluídas de cafeína para avaliar a concentração em função da resposta analítica no microdispositivo foram estudadas para as concentrações de 10 mg L^{-1} ; 100 mg L^{-1} e 200 mg L^{-1} . O segundo dispositivo empregado para análise unitária permitiu trabalhar com volumes de 10 μL de cada reagente para ensaio da reação colorimétrica, sendo o spot central com capacidade para 30 μL para comportar o volume total de análise. Ambos os dispositivos foram fabricados em PLA branco para melhor observar o contraste de cor da resposta analítica. Os sistemas foram submetidos ao aquecimento à 70 $^\circ\text{C}$ e uma folha A4 foi utilizada entre a superfície aquecida para evitar que o contato direto com o calor. A reação mostrou estabilidade colorimétrica por até 1 hora após seu término.

Figura 1: Microdispositivos impressos em 3D com: (a) spots para análises em multiplicatas e (b) spot reacional e canais para transferência de reagentes.

a)



b)



Conclusão: A reação colorimétrica estudada mostrou-se viável e promissora para determinação de concentrações distintas de cafeína em matrizes aquosas complexas. A utilização de dispositivos impressos em 3D contribuíram significativamente para o desenvolvimento de um sistema analítico barato e portátil que deve ainda ser adaptado para microescala atendendo as propriedades microfluídicas. Modificações na superfície do desenho estão sendo desenvolvidas para melhorar o transporte microfluídico.

Referências: [1]G. Fisono, A. Borgkvist, and A. Usiello, Cellular and Molecular Life Sciences **61**, 857 (2004).
[2] J. A. Nathanson, Science **226**, 184 (1984).
[3] R. G. Hollingsworth, J. W. Armstrong, and E. Campbell, Nature **417**, 915 (2002).
[4] R. A. De Zeeuw, D. T. Witte, and J. P. Franke, Journal of Chromatography A **500**, 661 (1990).
[5] M.S. Karawya, A.M. Diab and N. Z. Swelen, Analytical Letters **17**, 77 (1984).

Agradecimentos: IQ/Unesp e Fapesp (Process n° 2016/03369-3)