

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

Claudinéia R. S. Oliveira¹; Willian T. Suarez¹; Davi P. Coelho¹; Ana L. L. A. Sousa²; Gabriel A. D. Castro²; Sergio A. Fernandes²

¹Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-900, Brasil

²Grupo de Química Supramolecular e Biomimética (GQSB), Departamento de Química, CCE, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-900, Brasil

Palavras-Chave: fluorescência, fio de algodão, smartphone.

Introdução

O cobre (Cu) é um micronutriente crucial para a saúde humana, atuando de forma importante em diversos processos fisiológicos fundamentais (De Oliveira *et al.*, 2023). Este metal é indispensável ao organismo, desempenhando funções vitais no sistema nervoso (Diridiri *et al.*, 2024). No entanto, é fundamental monitorar a quantidade ingerida, pois o excesso de cobre pode causar efeitos adversos, como diarreia, náusea, doença de Parkinson e doenças nos rins e no fígado (Bisaglia; Bubacco, 2020; De Oliveira *et al.*, 2023; Yin *et al.*, 2024).

Com isso em mente, órgãos reguladores estabeleceram limites para a quantidade de cobre permitida em diferentes produtos. Para a cachaça, o limite recomendado é de até 5 mg L⁻¹, conforme o MAPA. Para a água potável, o limite é de 2 mg L⁻¹, segundo a OMS. Já para frutas *in natura*, a Anvisa estabelece um limite de 10 mg L⁻¹, conforme a regulamentação de 2022. A quantificação de Cu(II) pode ser realizada por diversas metodologias, incluindo métodos colorimétricos (De Oliveira *et al.*, 2023; Franco *et al.*, 2021; Franco *et al.*, 2021; Pessoa *et al.*, 2017; Böck *et al.*, 2022), adsorção (Yin *et al.*, 2024), eletroquímica (Vorozhtsov *et al.*, 2024), espectrofotometria (Wannas *et al.*, 2024), entre outros.

Desde 2020 é crescente popularização e utilização de smartphones seja para uso pessoal quanto profissional (Oliveira *et al.*, 2023). Alguns métodos colorimétricos utilizam esses dispositivos como detectores, o que torna essas metodologias de baixo custo, acessíveis e rápidas, além de oferecerem uma abordagem interativa quando comparado a métodos mais sofisticados (Oliveira *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2023). Esse tipo de método é denominado de DIB (*Digital Image Based*). No entanto, é possível utilizar recursos semelhantes com base na fluorescência, por meio do FDIB (*Fluorescence Digital Image-Based*) (De Almeida *et al.*, 2022).

O avanço tecnológico tem possibilitado o desenvolvimento de métodos mais sofisticados. A integração do FDIB (*Fluorescence Digital Image-Based*) com dispositivos microfluídicos e a detecção baseada em RGB (vermelho, verde e azul) representa uma inovação significativa e promissora na área de análise. Esses sistemas combinados permitem a execução de múltiplas etapas analíticas dentro de um único dispositivo, otimizando a eficiência e reduzindo os custos operacionais (Sackmann *et al.*, 2014). A tecnologia microfluídica proporciona um controle preciso sobre pequenas amostras, (Suarez *et al.*, 2020) enquanto a detecção RGB oferece uma análise detalhada quando relacionadas a concentração do analito de interesse.

Os dispositivos microfluídicos foram criados para determinação de metais, destacando-se entre eles o μ PAD (*Microfluidic Paper-based Analytical Device*) e o μ TAD (*Microfluidic Thread-based Analytical Device*) (Suarez *et al.*, 2020). Entre esses, o μ TAD se sobressai devido ao uso de fio de algodão como substrato. Esse material oferece várias vantagens, como flexibilidade, baixo custo, alta resistência e uma ampla área superficial. Além disso, o μ TAD permite o uso de volumes reduzidos de reagentes e amostras, tornando-o uma solução eficiente e econômica para a análise de metais.

Nesse contexto, com o objetivo de criar um μ TAD eficiente na quantificação de íons Cu^{2+} , surgiu a necessidade de desenvolver novos sensores químicos. Sousa *et al.* (2021), descrevem a síntese de vinte *bis*-tiocarbazonas como potenciais inibidores de urease, um composto de grande interesse da comunidade acadêmica e industrial (Cantarella *et al.*, 2018). A *bis*-tiocarbazonas são derivadas da tiocarbazida, caracterizada por uma ligação dupla entre um átomo de carbono e um átomo de enxofre e duas ligações simples com aminas.

Este estudo descreve a síntese e aplicação de uma *bis*-tiocarbazonas como sensor fluorescente utilizando a técnica FDIB para a construção de um dispositivo μ TAD baseado em fios de algodão. O dispositivo foi desenvolvido para a quantificação de íons Cu^{2+} em diversas amostras, incluindo água de torneira, água milliQ, água mineral, chá de maçã e cachaça. O método proposto oferece várias vantagens, incluindo alta sensibilidade, baixos limites de detecção e quantificação, rapidez na análise, e a necessidade de volumes reduzidos de reagentes e amostras, totalizando 30,2 μL .

Material e Métodos

A *bis*-tiocarbazona B2COOH foi sintetizada aplicando princípios de química verde, conforme as metodologias de Li *et al.* (2011) e Sousa *et al.* (2021). Para a síntese, uma solução de tiocarbazida (0,5 mmol) foi dissolvida em uma mistura de água/etanol (1,5/1,3 mL). Após a completa dissolução foi adicionado um aldeído aromático (1,3 mmol) e o ácido acético (30 mol%) como catalisador. Essa mistura foi mantida sob agitação por 3h a 110 °C. O produto foi então filtrado e recristalizado a partir de dimetilsulfóxido/água (DMSO/ H_2O) resultando na formação da *bis*- tiocarbazona B2COOH.

O microdispositivo analítico têxtil (μ TAD) foi desenvolvido com base na metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2023). Inicialmente, fios de algodão foram submetidos a um tratamento com Na_2CO_3 para remoção de impurezas, sendo, em seguida, cortados em segmentos de 5 cm. O dispositivo analítico foi então montado, fixando-se uma fita dupla face de 6 cm sobre uma folha de papel. A partir da extremidade esquerda da fita, uma marcação foi feita a 3 cm para delimitar a região de interesse (ROI). Na ROI, foram adicionados 0,2 μL da molécula B2COOH. Após a secagem, 10 μL de uma suspensão de carboximetilcelulose (CMC) a 1% (m/v) foram aplicados. Após nova secagem, 5 μL de uma solução tampão (pH 7) foram depositados na extremidade esquerda do fio. Para a utilização do dispositivo, 15 μL da solução padrão ou da amostra são aplicados na extremidade esquerda do fio. Por fim, uma imagem do μ TAD é capturada sob luz UV utilizando um smartphone (50 megapixels, Configurações: WB 6500, F2, S 1/4000, ISO 3200, Ev 0 e Lens wide). A imagem obtida é analisada em termos das cores RGB por meio do software *ImageJ*.

O método foi otimizado considerando uma variedade de potenciais interferentes, incluindo o tipo de fita dupla face, a concentração (1–3% m/V) e o volume de CMC (0–25 μL), a concentração da molécula *bis*- tiocarbazona (1,0–10 g L^{-1}), o volume da amostra (5–30 μL),

o tempo de reação (5–65 min) e o pH (ajustado com solução tampão de fosfato 0,2 mol L⁻¹, faixa de 3–10). A seletividade do ligante foi avaliada em pH 7 para os íons metálicos Pb²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Al³⁺, Cr³⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺ e Mn²⁺, todos na concentração de 1,25 × 10⁻³ mol L⁻¹. Além disso, foi realizado um estudo de interferência para esses mesmos metais na proporção 1:1, assim como para os açúcares D-glicose e D-frutose.

Após as otimizações, o método foi validado conforme os parâmetros de mérito: linearidade, seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão interdia, precisão intra-dia e exatidão, em conformidade com os padrões estabelecidos pela ANVISA (2017). Finalmente, um teste de recuperação foi conduzido em quatro níveis de concentração utilizando amostras de água (mineral, MilliQ e torneira), chá de maçã e quatro marcas de cachaça da cidade de Viçosa/MG. O preparo do chá de maçã foi realizado de acordo com a metodologia de Diridiri *et al.* (2024).

Resultados e Discussão

A *bis*-tiocarbazona B2COOH, Figura 1, foi sintetizada com um rendimento de 33%. A caracterização da molécula foi realizada por espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C) e espectroscopia no infravermelho (FTIR). A faixa de fusão foi determinada entre 175,9 e 176,7 °C.

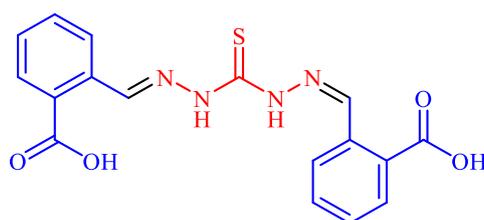


Figura 1. Fórmula estrutural *bis*-tiocarbazona B2COOH.

Foi constatada a importância de adicionar um polímero, o CMC, para estabilizar a região de reação. Foram testadas diferentes ordens de adição dos reagentes B1 e CMC, além de variações na concentração de CMC (1%, 2% ou 3% m/V). A Figura 2A ilustra a adição da B1 primeiro, seguida pelo CMC, enquanto a Figura 2B mostra o CMC sendo adicionado antes da B1. Em ambos os casos, o tempo de secagem adequado foi essencial entre as adições dos reagentes

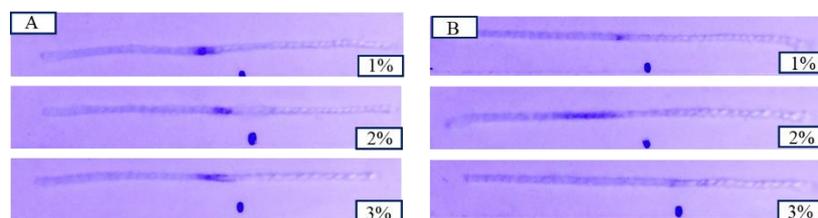


Figura 2. O efeito causado pela adição inicial da B1 (5 gL⁻¹) (A) comparado à adição inicial do CMC (B) em concentrações de 1, 2 e 3%. Parâmetros experimentais: 0,2 µL de B1 5gL⁻¹, 10 µL de CMC, 5 µL de tampão pH 7, 15 µL de solução de cobre II 79 mg L⁻¹, tempo de reação 10 minutos.

Quando o CMC foi adicionado primeiro, o ROI se deslocou para a esquerda com concentrações de 1% e 2%, e a concentração de 3% impediu a reação, resultando em baixo contraste do ROI. Ao adicionar a B1 inicialmente, a resposta analítica foi intensa em todas as concentrações de CMC. Assim, a concentração de 1% de CMC proporcionou a melhor resposta analítica e foi escolhida como a ideal.

Foi avaliada a influência do volume de CMC a 1% na pré-concentração do complexo no ROI, variando de 0 a 25 μL . O CMC pré-concentra o complexo, enquanto volumes menores que 10 μL não estabilizam o ROI e volumes maiores deslocam o ROI e reduzem a área de análise, Figura 3. O volume de 10 μL de CMC a 1% foi selecionado por proporcionar a melhor concentração e intensidade do complexo.

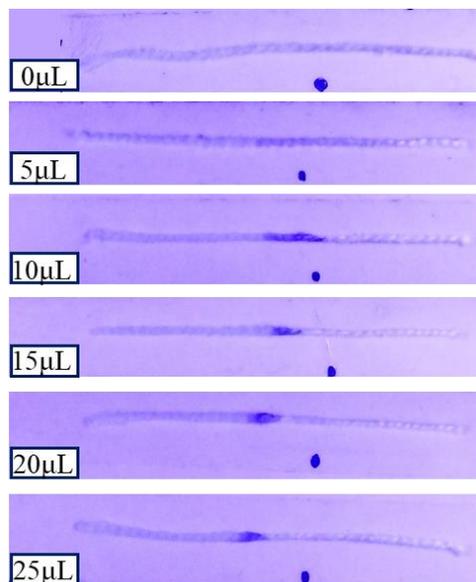


Figura 3. Estudo da variação do volume de CMC adicionado. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B1 5gL^{-1} , X μL de CMC 1% (m/V), 5 μL de tampão pH 7, 15 μL de solução de cobre II 79 mg L^{-1} , tempo de reação: 10 minutos.

A concentração da molécula foi estudada variando de 1 a 10 gL^{-1} , mantendo-se fixo o volume de 0,2 μL e avaliando-se o ΔG , definido como $\Delta G = G_{\text{B4}} - G_{\text{B4Cu}}$. Nesse estudo, a resposta analítica ideal é aquela com o maior ΔG , pois isso indica que a diferença do μTAD sem a amostra e com a amostra é mais evidente. Dessa forma, a concentração de 2,5 gL^{-1} foi escolhida para estudos posteriores, pois apresentou o maior ΔG , Figura 4. Não foi possível estabelecer uma relação direta entre a concentração e a variação de ΔG , uma vez que não foi encontrada uma proporcionalidade definida com a concentração da B1.

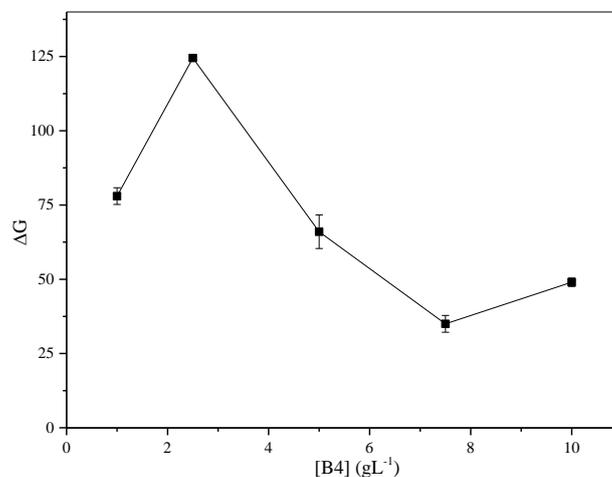


Figura 4. Efeito da concentração de B1 variando de 1 a 10 gL^{-1} . Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B4 X gL^{-1} , 10 μL de CMC 1% (m/V), 5 μL de tampão pH 7, 15 μL de solução de cobre II (79 mg L^{-1}), tempo de reação: 10 minutos.

O volume de amostra foi estudado de 5 a 30 μL . Com 5 μL , o ROI não foi alcançado, e volumes acima de 20 μL rompeu a barreira do CMC, arrastando o complexo. O volume de 10 μL minimizou a intensidade do ROI. O volume de 15 μL proporcionou maior intensidade e estabilidade do ROI, sendo escolhido para otimização do estudo, Figura 5.

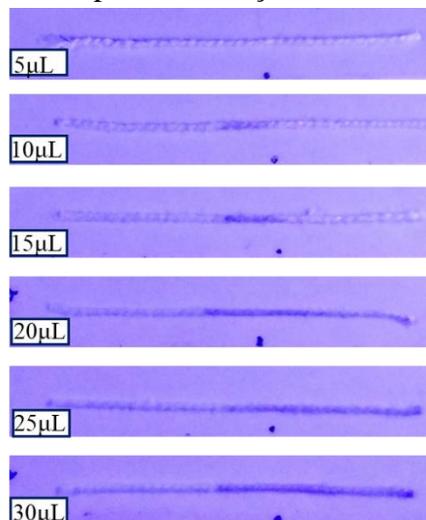


Figura 5. Estudo do volume de amostra. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B1 2,5 gL^{-1} , 10 μL de CMC 1% (m/V), 5 μL de tampão pH 7, X μL de solução de cobre II (79 mgL^{-1}), tempo de reação: 10 minutos.

A influência do tempo de reação foi avaliada de 5 a 65 minutos para 15 μL de solução padrão de cobre (79 mgL^{-1}). O maior ΔG , indicando a maior diferença entre a intensidade com e sem cobre, foi observado a 25 minutos, o tempo ideal para formar o complexo com maior intensidade, Figura 6.

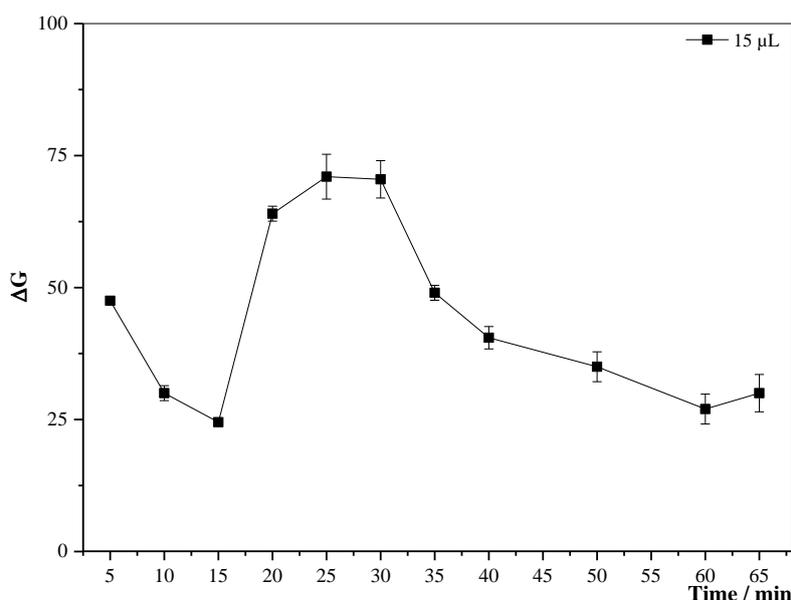


Figura 6. Influência do tempo de reação. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B1 2,5 gL^{-1} , 10 μL de CMC 1% (m/V), 5 μL de tampão pH 7, 15 μL de solução padrão de cobre II 79 mgL^{-1} .

O pH foi variado de 3 a 10 com volume fixo de 5 μL para avaliar a influência na formação e estabilidade dos complexos, Figura 7. Valores de pH entre 3 e 6 apresentaram

resposta analítica inferior, enquanto em pH 7 e 9 foram mais consistentes. Optou-se pelo tampão pH 7 para garantir uma resposta analítica estável e reprodutível.

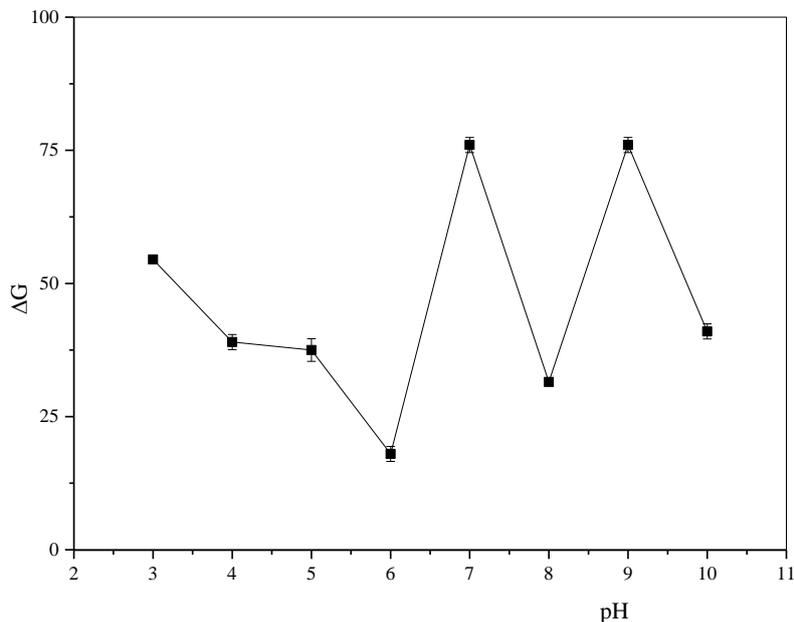


Figura 7. Influência do pH para formação do complexo formado. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B1 2,5 gL^{-1} , 10 μL de CMC 1% (m/V), 5 μL de tampão pH X, 15 μL de solução padrão de cobre II 79 mgL^{-1} , tempo de reação 25 minutos.

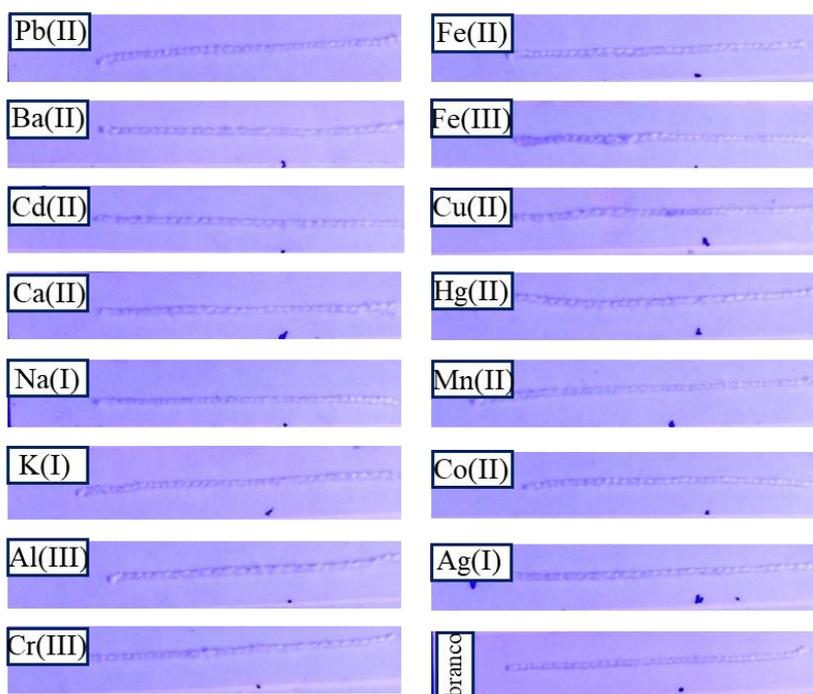


Figura 8. Avaliação da seletividade. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B1 2,5 gL^{-1} , 10 μL de CMC 1% (m/V), 5 μL de tampão pH 7, 15 μL de solução padrão de cada metal de concentração $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, tempo de reação 25 minutos.

O cobre foi o único metal a apresentar uma reação detectável na área de interesse (ROI), Figura 8, destacando a seletividade específica para o cobre. Embora o teste de seletividade não tenha identificado interferentes significativos, o teste de interferência realizado com Cu(II) e outros íons metálicos na proporção de 1:1 ($6,00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) revelou uma possível

interferência do Mn(II), com um erro relativo de 8%, enquanto os demais metais apresentaram erros iguais ou inferiores a 5% em relação à amostra contendo apenas cobre, Figura 9.

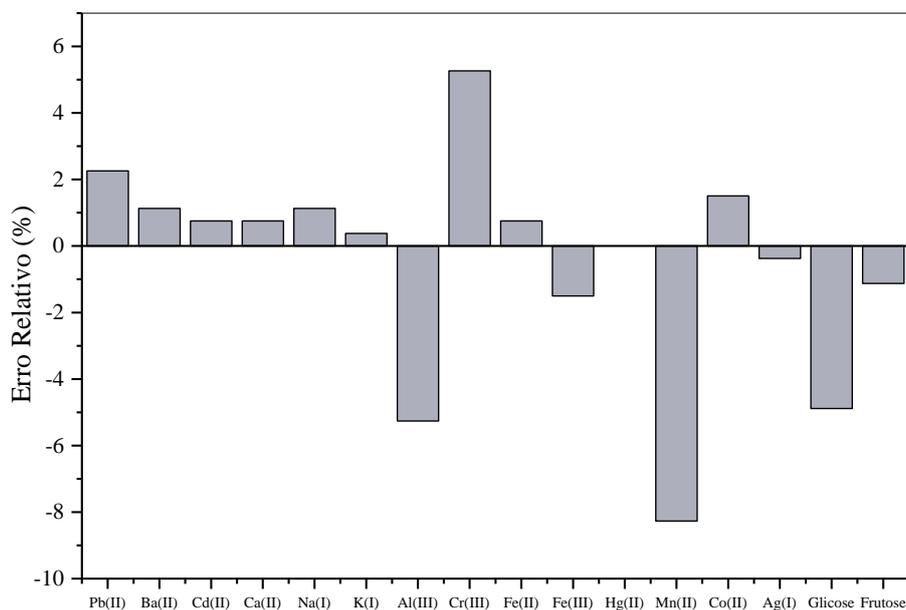


Figura 9. Estudo de interferente. Parâmetros experimentais: 0,2 μL de B1 2,5 gL^{-1} , 10 μL de CMC 1% (m/V), 5 μL de tampão pH 7, 15 μL de solução contendo Cu e o íon metálico correspondente na proporção 1:1 molar, tempo de reação 25 minutos.

A linearidade do método foi investigada correlacionando o $-\log(G/G_0)$ e a diferença de intensidade ($\Delta G = G_0(\text{inicial}) - G$) com a concentração de Cu^{2+} (mgL^{-1}) na faixa de 5 a 50 mgL^{-1} . As curvas analíticas mostram boa linearidade, Figura 10. Este estudo proporciona uma avaliação da relação entre a intensidade do sinal colorimétrico e a concentração de cobre, essencial para assegurar a precisão e confiabilidade das análises realizadas. Alguns parâmetros estão apresentados na Tabela 1. Embora ambas as curvas tenham demonstrado boa linearidade para o método, a curva selecionada para os estudos subsequentes foi a equação descrita pelo logaritmo.

A precisão foi determinada pela repetibilidade, $n=12$, para três níveis de concentração, 5, 15 e 50 mgL^{-1} . Os resultados intradia e interdia são apresentados na Tabela 2, no qual os resultados do desvio padrão relativo (%RSD) foram inferiores a 5%, indicando boa repetibilidade dos dados (AOAC). Os testes de recuperação, Tabela 3, variam de 87,7 a 119,5%, indicando boa recuperação as amostras analisadas.

Tabela 1. Comparação dos parâmetros analíticos das curvas

Curva / Parâmetros	$-\log(G/G_0) = 0,00601[\text{Cu}^{2+}] - 0,017$	$\Delta G = 1,44[\text{Cu}^{2+}] - 2,59$
r	0,9968	0,9959
R ²	0,9916	0,9897
LD / mgL^{-1}	0,47	0,66
LQ / mgL^{-1}	1,58	2,19

Tabela 2. Desvio padrão relativo (RSD) obtidos para análise de concentração de Cu^{2+} em três níveis de concentração ($n = 12$).

Concentração (mg L^{-1})	%RSD	
	Intradia	Interdia
5	1.89	1.09
15	3.19	2.13
50	2.22	3.36

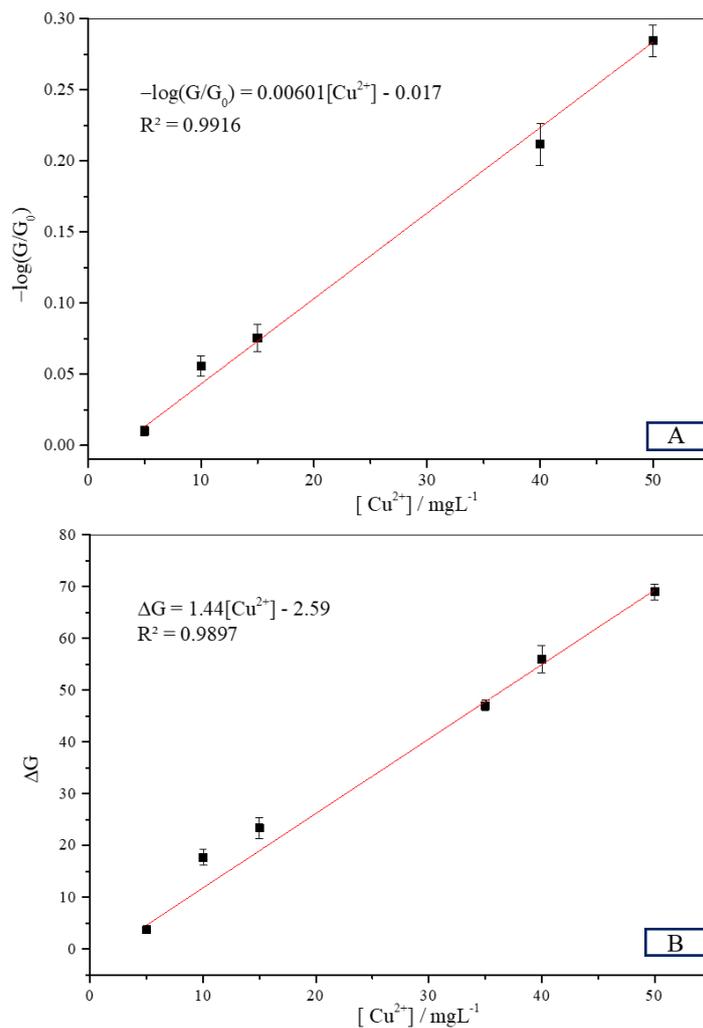


Figura 10. Curva analítica preparada a partir da adição crescente de Cu^{2+} em uma faixa de trabalho 5 a 50 mgL^{-1} , analisada em função do $-\log(G/G_0)$ (A) e da diferença de intensidade inicial (G_0) pela intensidade das amostras ($\Delta G = G_0 - G$) (B)

Tabela 3. Determinação de cobre em amostras reais utilizando o método proposto, incluindo o estudo de recuperação.

Amostra	Add / mg L ⁻¹	Encontrado / mg L ⁻¹	Recuperação / %
Torneira	5	5,4	108,9 ± 0,3
	10	11,0	109,8 ± 0,3
	30	33,8	112,6 ± 1,8
	45	44,2	98,2 ± 0,5
Água MilliQ	5	4,9	98,3 ± 0,3
	10	11,7	117,5 ± 0,3
	30	28,7	95,7 ± 0,8
	45	45,4	100,9 ± 0,9
Mineral	5	4,9	98,3 ± 0,3
	10	11,9	119,4 ± 0,6
	30	30,2	100,6 ± 1,1
	45	44,2	98,3 ± 0,5
C1	5	4,4	87,7 ± 0,3
	10	11,9	119,4 ± 0,6
	30	32,7	109,1 ± 0,8
	45	45,1	100,3 ± 1,4
C2	5	4,9	98,2 ± 0,3
	10	11,9	119,4 ± 0,6
	30	32,2	107,4 ± 2,2
	45	46,1	102,4 ± 0,5
C3	5	5,1	101,8 ± 0,3
	10	11,9	119,5 ± 1,0
	30	33,8	112,6 ± 1,2
	45	44,2	98,3 ± 1,1
C4	5	5,1	101,8 ± 0,3
	10	10,8	107,9 ± 0,6
	30	29,2	97,3 ± 1,1
	45	46,1	102,4 ± 0,5
Chã de maça T1	5	5,6	112,4 ± 0,3
	10	10,6	106,0 ± 0,3
	30	33,8	112,6 ± 0,9
	45	43,9	97,6 ± 1,4

Conclusões

O dispositivo microfluídico construído com fio de algodão, utilizando a *bis*-tiocarbazona B2OOH como sensor e CMC para a pré-concentração do complexo formado, demonstrou-se eficaz na determinação de cobre (II) em amostras de água, cachaça e chá de

maçã. O método apresentou baixos limites de detecção e quantificação (0,47 e 1,58 mgL⁻¹, respectivamente) na faixa de 5 - 50 mgL⁻¹.

O método apresentado, destacou-se também por suas vantagens, como alta sensibilidade, baixo consumo de reagentes e amostras, além de não exigir equipamentos sofisticados. O método foi de baixo custo, com um processo de desenvolvimento econômico e o dispositivo é facilmente transportável para análises em campo.

Agradecimentos

A Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica, à FAPEMIG (APQ-01889-21), CNPq e CAPES pelo apoio financeiro, e à CAPES pela bolsa concedida.

Referências

- Bisaglia, M. Bubacco, L. Copper ions and Parkinson's disease: Why is homeostasis so relevant? **Biomolecules**, 10(2), 2020.
- Böck, F. C. *et al.* Método de baixo custo para determinação de cobre em aguardente de cana usando Photometrix UVC ® embutido no smartphone. **Journal of chemometrics**, 367, 2022.
- Cantarella, H. *et al.* Agronomic efficiency of NBPT as a urease inhibitor: A review. **Journal of Advanced Research**, 13, 19–27, 2018.
- De Almeida, J. P. B. *et al.* A fluorescence digital image-based method using carbon quantum dots to evaluate the compliance of a biocidal agent. **Analytical Methods**, 14(213), 2631–2641, 2022.
- Diridiri, P. N. *et al.* Determination of copper ion at trace levels in apple tea samples by simultaneous complexation and spray assisted microextraction method prior to detection by flame atomic absorption spectrophotometry. **Food Chemistry**, 441, 138243, 2024.
- Franco, M. de 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**, 338, 2020, 127800, 2021.
- Franco, M. O. K. *et al.* A color reaction for the determination of Cu²⁺ in distilled beverages employing digital imaging. **Analytica Chimica Acta**, 1177, 338844, 2021.
- Li, G. *et al.* Synthesis of New Ferrocene bis Thiocarbazonas under Solvent-Free Conditions using Microwave. **Journal of Chemical Research**, 35(5), 278–281, 2011.
- Oliveira, C. R. S. *et al.* Methods Based on Digital Image: from General Considerations to Chemistry Teaching. **Revista Virtual de Química**, 1–20, 2023.
- Oliveira, J. L. *et al.* Using a cotton thread-based colorimetric sensor modified by carboxymethylcellulose and cuprizone with smartphone detection for quantification of copper. **Analytical methods: advancing methods and applications**, England, 15(42), 5683–5691, 2023.
- Pessoa, K. D. *et al.* A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 185, 310–316, 2017.
- Sackmann, E. K. *et al.* The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 507(7491), 181–189, 2014.
- Sousa, A. L. L. A. *et al.* **Síntese de bis-tiocarbazonas como potenciais inibidores de urease**. 2021. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021.
- Suarez, W. T. *et al.* Chitosan-modified cotton thread for the preconcentration and colorimetric trace determination of Co (II). **Microchemical Journal**, 158, 105137, 2020.
- Vorozhtsov, N. I. *et al.* Cu (II) and Ni (II) complexes of 1-(N-phenylthiocarbamoyl)-pyrazolines: Synthesis, electrochemistry and cytotoxic properties. **Results in Chemistry**, 9, 101632, 2024.
- Wannas, F. Abd *et al.* Ionic liquid-based cloud point extraction for spectrophotometric determination of copper in water and food samples using a novel imidazole derivative. **Journal of Food Composition and Analysis**, 106638, 2024.



63º Congresso Brasileiro de Química
05 a 08 de novembro de 2024
Salvador - BA

Yin, Hang *et al.* Effective removal of Cu(II) from water by three-dimensional composite microspheres based on chitosan/sodium alginate/silicon dioxide: Adsorption performance and mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, 277, 134585, 2024.