UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Lígia Bueno

Estudo e fabricação de dispositivos inteligentes (línguas e narizes eletrônicos) visando à discriminação de contaminação em alimentos

Versão corrigida da tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

17/03/2016

Lígia Bueno

Estudo e fabricação de dispositivos inteligentes (línguas e narizes eletrônicos) visando à discriminação de contaminação em alimentos

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutora em Química

Orientador: Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bueno, Lígia
B928e Estudo e fabricação de dispositivos inteligentes (línguas e narizes eletrônicos) visando à discriminação de contaminação em alimentos / Lígia Bueno. -- São Paulo, 2016.
155p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Paixão, Thiago Regis Longo Cesar da

1. Controle de qualidade : Análise química 2. Colorimetria 3. Quimiometria 4. Dispositivos eletrônicos 5. Contaminação de alimentos 6. Bactérias I. T. II. Paixão, Thiago Regis Longo Cesar da, orientador.

543 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Estudo e fabrição de dispositivos inteligentes (línguas e narizes eletrônicos) visando à discriminação de contaminação em alimentos"

LÍGIA BUENO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências no Programa de Química.

Aprovado(a) por:

_____
Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão
(Orientador e Presidente)

_____
Prof. Dr. Mauro Bertotti
IQ - USP

_____
Prof. Dr. Fernando Josepetti Fonseca
EP - USP

_____
Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto
IQ-UNESP - Araraquara

_____
Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro
IQ - UFG

SÃO PAULO
05 de abril de 2016

DEDICATÓRIA

A Deus, por seu extremo cuidado como Pai, amigo, consolador, por sua fidelidade, por ser O Grande Eu Sou em minha vida, em todos os momentos.

Ao meu esposo, Flávio, por todo o amor a mim dedicado, por me fazer uma pessoa melhor e enxergar o mundo mais colorido e prazeroso. Nenhuma palavra dita aqui é capaz de explicar o que temos, somos ou sentimos. Eu te amo muito e para sempre!

A minha família, em especial minha mãe, por toda garra, cuidado, carinho e esforço em me manter no caminho. Amo vocês e me dá muita satisfação e orgulho fazer parte dessa “grande família”.

Ao meu orientador, Thiago Paixão, pelo entusiasmo no trabalho, por ter aceitado trilhar comigo esse caminho, por todas as palavras de incentivo, pelo investimento e crença em meu trabalho quando nem eu acreditava ser possível. Pela dedicação e respeito por cada aluno, como docente e orientador.

“Mas Deus escolheu as coisas loucas deste mundo para confundir as sábias; e Deus escolheu as coisas fracas deste mundo para confundir as fortes. E Deus escolheu as coisas vis deste mundo, e as desprezíveis, e as que não são para aniquilar as que são.”

I Coríntios 1:27,28

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS por ter permitido que eu chegasse até aqui, por não me desamparar e me abençoar todos os dias de minha vida.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Thiago Paixão, que como grande líder, sempre nos incentiva, apoia e consegue ver o que há de melhor em nosso trabalho. Sem sua disposição e empenho nada disso seria possível.

A FAPESP pela bolsa e todo o auxílio durante estes quatro anos. A CAPES pela bolsa do doutorado sanduíche pelo Programa Ciências sem Fronteiras.

A Universidade de São Paulo pela estrutura e corpo docente. Aos funcionários por todo o apoio em todos os experimentos e durante os períodos de monitoria.

Aos meus colegas de laboratório, em todas as formações, por toda paciência, ajuda e todos os momentos de descontração. Em especial ao William R. Araújo, Thiago Selva e José Ricardo pela ajuda com os experimentos e com os mais diversos problemas que tive, principalmente aqueles com tecnologia.

Aos colegas do grupo LAIA que sempre foram muito prestativos em nos ajudar, especialmente ao Fernando Silva Lopes pela ajuda em diversos momentos com softwares, equipamentos e conhecimento.

Aos amigos que fiz durante este período e que vou levar no meu coração: Mirtes, por acreditar em meu trabalho. A Thalita por compartilhar as “chatices”, pelas caronas e por todos os momentos divertidos e tristes que passamos. Obrigada, meninas.

Aos colegas do grupo LSEME por todos os empréstimos e bolos de aniversário, especialmente ao Alex pela amizade desde os tempos de graduação e a Pollyana pela imensa ajuda durante o período vivido na Inglaterra.

Aos colaboradores do meu trabalho durante estes anos: Maiara Salles, William R. Araújo, Gabriel Meloni e Hazim El Sharif, o qual também agradeço a amizade, parceria e por todos os momentos de descontração no Brasil e na Inglaterra.

A Universidade de Surrey, pela estrutura, apoio financeiro. Especialmente a microbiologista Alison Cottel, pela ajuda com os micro-organismos.

Ao professor Subrayal M. Reddy pela colaboração, por abrir as portas de seu laboratório e também pelo carinho, atenção e ajuda em todos esses anos de parceria.

Ao Antonio, por fazer meu período de doutorado sanduiche na Inglaterra mais agradável e menos doloroso. Obrigada pelo carinho e amizade.

Ao Marcelo Pulido e a Editora Moderna, pela oportunidade de participar da produção de livros didáticos.

Aos professores Tiago Ferreira e Jonas Gruber pela participação e contribuição em meu exame de qualificação. Aos professores Wendell K.T. Coltro, Nelson R. Stradiotto, Fernando J. Fonseca e Mauro Bertotti pela participação e contribuições durante a defesa do título de doutorado.

A todos os amigos que fiz durantes estes anos de pós-graduação nos corredores, nas disciplinas, almoços na copa. Obrigada a todos pelas risadas, descontração e carinho.

Ao meu esposo, Flávio, por ter sido meu companheiro; por seu amor, paciência, incentivo e ajuda em todos os momentos. Obrigada, amor, por ser um presente de Deus para mim.

A minha família, a base de tudo, por me apoiar, entender meus momentos de ausência, torcer mesmo quando não entendia o que isso significava. Agradeço especialmente a minha mãe por todo o carinho, amor e dedicação. A Joice por todas as palavras de incentivo e ânimo nos momentos difíceis, por me dar minha florzinha Elis como presente. A Flavia por todas as orações e amor.

Ao Marco Antônio Sanches, por todos os almoços, cada agradável conversa e por cada ensinamento obtido em todas elas.

Às amigas que guardarei no coração para sempre e onde quer que eu vá estarão comigo sempre: Cris e Nívia, agradeço pela amizade, pelas orações, por todas as lágrimas derramadas (de alegria e tristeza). A Andreia por me amparar, me dirigir, por clamar e interceder nos momentos mais importantes dessa caminhada. Jamais esquecerei o fazem por mim. Obrigada nunca será suficiente.

À minha amiga de tantos anos, Aline Silva, por cada conversa, pela admiração, por dividir comigo cada conquista, cada momento difícil e também aqueles que foram muito felizes.

Obrigada, de coração, a todos que participaram deste projeto, direta ou indiretamente. Aqueles que não foram citados, por favor, não fiquem chateados e sintam-se abraçados, sou muito grata a todos.

RESUMO

Bueno, L. **Estudo e fabricação de dispositivos inteligentes (línguas e narizes eletrônicos) visando à discriminação de contaminação em alimentos**. 2016. 155p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A proposta da presente tese foi desenvolver dispositivos inteligentes (língua e nariz eletrônicos/ colorimétrico) de baixo custo para discriminar amostras de alimentos contaminados quimicamente e biologicamente. Um dispositivo*"optoeletrônico"* à base de membranas poliméricas coloridas com indicadores de pH foi utilizado para discriminar compostos voláteis emitidos por micro-organismos (aminas liberadas pelos processos de deterioração dos alimentos e que são produto da descarboxilação de aminoácidos em alimentos predominantemente proteicos). As aminas avaliadas nesse estudo foram: isobutilamina, isopentilamina e trietilamina. O limite de detecção de 5 ppm das aminas foi alcançado utilizando o dispositivo *"optoeletrônico"* e, esse sistema, também foi testado em amostras reais de carne contaminadas obtendo uma boa discriminação das amostras com e sem as aminas. Aminas biogênicas (cadaverina, tiramina e putrescina) também foram testadas obtendo uma separação pelo gráfico de escores. Em uma segunda etapa o dispositivo também foi avaliado para discriminar quatro espécies de bactérias (*Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*) incubadas a 37°C e 25°C. Em ambos os casos o dispositivo inteligente utilizou um smartphone para registrar as imagens que atuou como detector para extração dos dados de RGB das imagens. A partir dessas informações (valores de RGB), as ferramentas quimiométricas PCA (do inglês Principal Component Analysis, Análise de Componentes Principais) e HCA (do inglês Hierarchical Cluster Analysis, Análise de Agrupamentos Hierárquicos) foram utilizadas para discriminar as amostras e a k-NN (do inglês k^{th} Nearest Neighbor, k- vizinhos mais próximos) para validar o método. Em uma terceira etapa, uma língua eletrônica voltamétrica foi fabricada para discriminar amostras de leite adulteradas com melamina, ureia e formaldeído contendo concentrações finais de 0,95; 4,16 e 10,0 mmol L^{-1}, respectivamente. Essa língua voltamétrica foi composta por três eletrodos metálicos: platina, ouro e cobre e dados voltamétricos foram utilizados como dados de entrada para as ferramentas quimiométricas (PCA e HCA). Foram testados três tipos de leite (integral, desnatado e semidesnatado) de três diferentes marcas e todos eles puderam ser discriminados com sucesso. O trabalho também apresenta a utilização de MIPs (polímeros molecularmente impressos – do inglês, *molecularly imprinted polymers*) como alternativa para detecção e discriminação de alimentos contaminados fazendo uso da impressão (cavidades) de substâncias químicas contaminantes ou das proteínas específicas de cada micro-organismo presente no processo de deterioração dos alimentos.

Palavras-chave: Controle de qualidade, Análise química, Colorimetria, Quimiometria, Dispositivos eletrônicos, Contaminação de alimentos, Bactérias, Polímeros molecularmente impressos.

ABSTRACT

Bueno, L. **Study and development of smart devices (electronic nose and tongues) aiming at discrimination of contamination in food samples**. 2016. 155p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The present thesis aimed at development of low cost smart devices (electronic tongue and colorimetric nose) to discriminate chemically and biologically contamination in food samples. An "optoelectronic" plastic-based device with colored membranes contained pH indicator was used to discriminate volatile compounds released by microorganisms, due to the deterioration process of protein in food by the organisms. The amines evaluated in this study were: isobutylamine, isopentylamine and triethylamine, achieving a detection limit of 5 ppm. Such system was also tested in real meat samples contaminated with individual amines obtained a good discrimination of samples with and without studied compounds. Biogenic amines (cadaverine, tyramine and putrescine) were also tested and discriminated. In a second step, the device was also evaluated to discriminate four bacteria species (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*) incubated at 37 ° C and 25 ° C. In both cases, a smartphone was used as detector to extract RGB values of the samples. From extracted information (RGB values), the chemometric tools PCA (Principal Component Analysis) and HCA (Hierarchical Cluster Analysis) were used to discriminate samples and k-NN (k^{th} Nearest Neighbor) was evaluated to validate the method. In a third stage, a voltammetric electronic tongue was developed to discriminate adulterated milk samples with melamine, urea and formaldehyde. This voltammetric electronic tongue was fabricated using three working electrodes: platinum, gold and copper and the voltammetric data was used as input data for chemometric tools (PCA and HCA). Three types of milk (whole, skimmed and semi-skimmed) from three different brands were tested and all of them could be successfully discriminated.

Keywords: Quality control, Chemical analysis, Colorimetry, Chemometric, Electronic device, Food contamination, Bacteria, Molecularly Imprinted Polymer.

Sumário

Cap. 1 – Introdução

1. Doenças transmitidas por alimentos 13
2. Dispositivos inteligentes 16
   2.1. Línguas e narizes eletrônicos 16
   2.2. Dispositivos colorimétricos 21
      2.2.1. Sistema de cores RGB 24
3. Ferramentas quimiométricas (figuras para PCA e HCA) 27
   3.1. Análise de Componentes Principais 28
   3.2. Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) 31
   3.3. Métodos os *k*-ésimos vizinhos mais próximos (*k*-NN) 33

Cap. 2 – Objetivos

1. Objetivos gerais 36
2. Objetivos específicos 36

Cap. 3 – Contaminação biológica

1. Compostos orgânicos voláteis 37
2. Procedimentos experimentais 39
   2.1. Língua eletrônica voltamétrica 39
   2.2. Formação do filme condutor (estudos em fase gasosa) 39
      2.2.1. Medidas de resistência 40
3. Resultados e discussão 48
4. Conclusões 103

Cap. 4 – Contaminação química

1. Contaminação química e adulteração de leite 105
2. Procedimentos experimentais 107
   2.1. Discriminação de amostras de leite adulteradas com formol, melamina e ureia 108
      2.1.1. Medidas eletroquímicas 108
      2.1.2. Análises quimiométricas 109
      2.1.3. Medidas eletroquímicas com a microbalança a cristal de quartzo (EQCM) 109
3. Resultados e discussão 109

4. Conclusões 121

Cap. 5 – Perspectivas: discriminação de alimentos

MIP: uma alternativa interessante 123

2. Procedimentos experimentais 124

2.1. Estudo eletroquímico utilizando MIPs para fabricação de línguas eletrônicas 124

2.2. Análises eletroquímicas 125

2.3. Análises quimiométricas 126

3. Resultados e discussão 126

Cap. 6 – Considerações finais

Considerações finais 134

Índice de ilustrações

Figura 1.1: Esquema de funcionamento do sistema de olfato e sua conexão com o paladar..... **17**

Figura 1.2 : Mapa da língua tido como modelo para a localização das papilas gustativas..... **18**

Figura 1.3: Refutação do mapa da língua proposto por Chandrashekar e colaboradores, onde as papilas estão presentes em toda a língua, sem a existência de um mapa. *Adaptado de J. Chandrashekar, M. A. Hoon, N. J. P. Ryba, and C. S. Zuker, "The receptors and cells for mammalian taste.," Nature, vol. 444, no. 7117, pp. 288–294, 2006* **18**

Figura 1.4: Comparação do funcionamento dos dispositivos eletrônicos (língua e nariz) com os respectivos sentidos humanos. **20**

Figura 1.5: O diagrama de cromaticidade CIE (1931) de espaço de cores com comprimentos de onda em nanômetros. As cores descritas dependem do espaço de cor do dispositivo no qual a imagem é vista.....**25**

Figura 1.6: Demonstração de cálculo de componentes principais. Adaptado de M. O. Salles and T. R. L. C. Paixão, "Application of Pattern Recognition Techniques in the Development of Electronic Tongues," in *Advanced Synthetic Materials in Detection Science*, S. M. Reddy, Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2014, pp. 197–229.....**30**

Figura 3.1: Câmara fechada de polimetacrilato de metila que permite uma distância focal fixa e iluminação homogênea através do uso de leds. **42**

Figura 3.2: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de platina em eletrólito suporte com adições de etanol 20 (linha magenta), 50 (linha vermelha), 100 (linha verde) e 200 mmol L^{-1} (linha azul) e branco (linha preta). Eletrólito de suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} + HNO_3 10 mmol L^{-1}, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}. **50**

Figura 3.3: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de platina em eletrólito suporte com adições de metanol de 20 (linha magenta), 50 (linha vermelha), 100 (linha verde) e 200 mmol L^{-1} (linha azul) e branco (linha preta). Eletrólito de suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} + HNO_3 10 mmol L^{-1}, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}..... **53**

Figura 3.4: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de platina em eletrólito suporte com adições de isobutanol de 20 (linha magenta), 50 (linha vermelha), 100 (linha verde) e 200 mmol L^{-1} (linha azul) e branco (linha preta). Eletrólito de suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} + HNO_3 10 mmol L^{-1}, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}..... **55**

Figura 3.5: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de platina em eletrólito suporte com adições de acetaldeído 20 (linha magenta), 50 (linha vermelha), 100 (linha verde) e 200 mmol L^{-1} (linha azul) e branco (linha preta). Eletrólito de suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} + HNO_3 10^{-3} mol L^{-1}, velocidade de varredura: 50 mVs^{-1}..... **57**

Figura 3.6: Gráfico de escores obtido a partir dos voltamogramas registrados com soluções 200 mmol L^{-1} de etanol (triângulo para cima azul), metanol (círculo vermelho), isobutanol (triângulo ciano para baixo) e acetaldeído (quadrado preto) em solução 10 mmol L^{-1} de HNO_3 + 0,5 mol L^{-1} KNO_3 utilizando eletrodo de platina. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.....**59**

Figura 3.7: Medidas de resistência obtidas com a utilização de um filme de polianilina sobre um eletrodo disco-anel de platina em uma câmara na presença e ausência de etanol. **61**

Figura 3.8: Gráfico de escores (PCA) obtido a partir dos valores de RGB extraídos do dispositivo em papel de filtro modificado com 5 indicadores de pH (vermelho de metila, alizarina, azul de bromofenol, azul de timol, vermelho de clorofenol)..... **63**

Figura 3.9: Gráfico de escores (PCA) obtido a partir dos valores de RGB extraídos dos papeis de filtro coloridos com 5 indicadores de pH (vermelho de metila, alizarina, azul de bromofenol, azul de timol, vermelho de clorofenol) em contato com as aminas em concentração de 5 ppm (■ – isobutilamina; ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina)..... **65**

Figura 3.10: Representação esquemática de cada indicador de pH no dispositivo e os perfis de mudança de coloração do arranjo de sensores em função da amina exposta: (A) isobutilamina, (B) trietilamina e (C) isopentilamina, bem como os mapas de diferenciação obtidos pela subtração dos valores de RGB antes e depois exposição de 10 minutos do dispositivo na presença da amina. Concentração de amina = 5 ppm.. **69**

Figura 3.11: Gráfico de escores obtido a partir dos valores de RGB extraídos das membranas coloridas com 5 indicadores de pH em contato com 3 diferentes aminas (■ – isobutilamina; ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina) na concentração de 5 ppm. (B) Gráfico de HCA. (C) Gráfico de loadings..... **71**

Figura 3.12: Gráfico de escores obtido a partir dos valores de RGB extraídos das membranas coloridas com 5 indicadores de pH em contato com 3 diferentes aminas: (■) isobutilamina; (●) trietilamina e (▲) isopentilamina) na concentração de 2,5 ppm. (B) Gráfico de HCA..... **73**

Figura 3.13: Gráfico de escores obtido a partir dos valores de RGB extraídos das membranas coloridas com 5 indicadores de pH em contato com 3 diferentes aminas (■ – isobutilamina; ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina) na concentração de 1 ppm. (B) Gráfico de HCA..... **74**

Figura 3.14: Curvas de calibração obtidas para as aminas usando distância euclidiana (DE) dos valores de RGB em função da concentração. Legenda: (■ – isobutilamina ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina). Regressão linear: DE = 1,47 + 0,19 $C_{isobutilamina}$, R^2 = 0,99995; DE = 0,051 + 0,34 $C_{trietilamina}$, R^2 = 0,98092 e DE = 1,47 + 0,19 $C_{isopentilamina}$, R^2 = 0,99995. ..... **76**

Figura 3.15: Monitoramento dos parâmetros R, G e B de membranas: imagens obtidas para cada tempo de experimento (A) e valores de R, G e B para o spot colorido com vermelho de clorofenol. **78**

Figura 3.16: Gráfico de escores obtido a partir de valores RGB extraídos das membranas de acetato de celulose modificadas com 5 indicadores de pH em contato com a fase vapor coletada em uma câmara contendo carne moída contaminada com (■ – isobutilamina; ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina). As imagens mostram as fotografias reais dos experimentos antes e após a contaminação da carne com cada amina e o respectivo mapa de diferenciação de cada experimento. **80**

Figura 3.17: Gráfico de escores obtido a partir de valores RGB extraídos das membranas de acetato de celulose modificadas com 5 indicadores de pH em contato com três diferentes aminas biogênicas (■ – tiramina; ● – putrescina e ▲ – cadaverina)..... **81**

Figura 3.18: Gráfico de escores obtido a partir de valores RGB extraídos das membranas de acetato de celulose modificadas com 5 indicadores de pH em contato todas as aminas estudadas até aqui (♦ – tiramina; ★ – putrescina, ⬟ – cadaverina, ■ – isobutilamina; ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina) na concentração de 5 ppm for the isobutilamina, trietilamina and isopentilamina e 65 µg tiramina, 3,6 mg de putrescina e 87 µg cadaverina..... **82**

Figura 3.19: Representação esquemática de cada indicador de pH no dispositivo e os perfis de mudança de coloração do arranjo de sensores em função da espécie de bacteria: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli*, bem como os mapas de diferenciação obtidos pela subtração dos valores de RGB antes e depois do período de incubação a 37ºC..... **85**

Figura 3.20: Gráfico de escores obtido a partir de valores de RGB extraídos do arranjo de 5 sensores coloridos com indicadores de pH em contato com as bacterias: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli* a 37ºC. **87**

Figura 3.21: Gráfico de HCA obtido a partir de valores de RGB extraídos do arranjo de 5 sensores coloridos com indicadores de pH em contato com as bacterias: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli* a 37ºC. **88**

Figura 3.22: Gráfico de pesos obtido a partir de valores de RGB extraídos do arranjo de 5 sensores coloridos com indicadores de pH em contato com as bacterias: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli* a 37ºC. **88**

Figura 3.23: Gráfico de escores obtido a partir de valores de RGB extraídos do arranjo de 5 sensores coloridos com indicadores de pH em contato com as bacterias: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli* a 25ºC. **90**

Figura 3.24: Gráfico de HCA obtido a partir de valores de RGB extraídos do arranjo de 5 sensores coloridos com indicadores de pH em contato com as bacterias: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli* a 25ºC. **91**

Figura 3.25: Gráfico de precisão da validação cruzada mostrando o número de *k*-vizinhos mais próximos que produzem a mais alta porcentagem de precisão do método. **92**

Figura 3.26: Gráfico de frequência versus tempo registrado para isobutilamina com membrana de alizarina como modificante para o eletrodo de ouro na microbalança de cristal de quartzo..... **95**

Figura 3.27: Gráfico de escores (PCA) obtidos a partir da extração dos valores de frequência e tempo das injeções de 50 µL das aminas: (■) isobutilamina (●) trietilamina e (▲) isopentilamina..... ..... **96**

Figura 3.28: Valores de frequência em função do tempo obtidos com cristais de quartzo recobertos com ouro na ausência (linha sólida) e na presença de um filme de acetato de celulose (linha pontilhada) modificando a superfície do cristal de ouro. Concentração da amina utilizada (isobutilamina): 10 ppm. .. **98**

Figura 3.29: Gráfico de escores obtido a partir dados de frequência em função do tempo utilizando o filme de acetato de celulose para recobrir o cristal piezoelétrico de ouro. **99**

Figura 3.30: Valores de frequência em função do tempo obtidos com cristais de quartzo recobertos com ouro na ausência de filme (linha sólida) e na presença de um filme de PVC (linha pontilhada) modificando a superfície do cristal de ouro. Concentração da amina utilizada (isobutilamina): 10 ppm.....**100**

Figura 3.31: Gráfico de escores obtido a partir dados de frequência em função do tempo utilizando o filme de PVC para recobrir o cristal piezoelétrico de ouro.....**101**

Figura 3.32: Valores de frequência em função do tempo obtidos com cristais de quartzo recobertos com ouro na ausência de filme (linha tracejada) e na presença de um filme de acetato de celulose (linha sólida) e também de PVC (linha pontilhada) modificando a superfície do cristal de ouro. Concentração da amina utilizada (isobutilamina): 10 ppm.....**102**

Figura 3.33: Gráfico de escores obtido a partir dados de frequência em função do tempo utilizando cristal piezoelétrico de ouro sem recobrimento (limpo).....**103**

Figura 4.1: Voltamogramas cíclicos registrados usando eletrodo de trabalho de ouro, na ausência (linha tracejada) e presença (linha sólida) de formaldeído 10,0 mmol L^{-1} (A), melamina 0,95 mmol L^{-1} (B) e ureia 4,16 mmol L^{-1} (C). v = 100 mV s^{-1}. **110**

Figura 4.2: Voltamogramas cíclicos (A) registrados em tampão acetato 0,10 mol L^{-1} (pH 4,6) (linha sólida); adição de formaldeído (linha tracejada), melamina (linha pontilhada) e ureia (linha pontilhada e tracejada), todos em uma concentração final de 9,5 mmol L^{-1}. V = 50 mV s^{-1} (A). Gráfico de frequência (B) em função do potencial registrado utilizando cristal de ouro monitorada em tempo real à aquisição dos voltamogramas. **112**

Figura 4.3: Voltamogramas cíclicos registrados usando eletrodo de trabalho de platina, na ausência (linha tracejada) e presença (linha sólida) de formaldeído 10,0 mmol L^{-1} (A), melamina 0,95 mmol L^{-1} (B) e ureia 4,16 mmol L^{-1} (C). V = 100 mV s^{-1}. **113**

Figura 4.4: Voltamogramas cíclicos registrados usando eletrodo de trabalho de cobre, na ausência (linha tracejada) e presença (linha sólida) de formaldeído 10,0 mmol L^{-1} (A), melamina 0,95 mmol L^{-1} (B) e ureia 4,16 mmol L^{-1} (C). V = 100 mV s^{-1}. **114**

Figura 4.5: Gráfico de escores de amostras comerciais de leite não adulteradas (quadrados pretos) e adulteradas com 10,0 mmol L^{-1} formaldeído (círculos vermelhos), 0,95 mmol L^{-1} melamina (triângulos azuis), e 4,16 mmol L^{-1} ureia (triângulos verdes) usando valores de corrente registrados com os eletrodos de trabalho de ouro (A), cobre (B), platina (C) e arranjo de três eletrodos de trabalho (Au, Pt e Cu) (D). Número de replicatas: 3. ..... **116**

Figura 4.6: Gráfico de HCA de amostras comerciais de leite integral não adulteradas e adulteradas com 10,0 mmol L^{-1} formaldeído (círculos vermelhos), 0,95 mmol L^{-1} melamina, e 4,16 mmol L^{-1} ureia usando valores de corrente registrados com arranjo de três eletrodos de trabalho (Au, Pt e Cu). **117**

Figura 4.7: Gráficos de PCA de amostras de leite da marca Elegê dos tipos: integral (A), desnatado (B) e semidesnatado (C). **120**

Figura 5.1: Polimerização e formação da cavidade específica do monômero. **124**

Figura 5.2: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo em tampão PBS (pH 7,4), SDS 5% (m/v), na presença da solução proteica (15,4 µmol L^{-1}) (Cyt C (a), BSA (b), EMb (c) e BHb (d)). v = 100 mV s^{-1}..... **128**

Figura 5.3: Gráfico de escores obtido em solução de PBS (pH 7.4), SDS 5% (m/v) usando os dados de densidade de corrente na presença de cada proteína (15,4 µmol L^{-1}). E_i=0,0 V, E_{V1}=-0,9 V, E_f = 0,0 V= 100 mV s^{-1}..... **129**

Figura 5.4: Gráfico de escores obtido em solução de PBS (pH 7.4), SDS 5% (m/v), com um eletrodo de carbono vítreo modificado com polímero de BHb MIP usando os dados de densidade de corrente na presença de cada proteína (15,4 µmol L^{-1}). E_i=0,0 V, E_{V1}=-0,9 V, E_f = 0,0 V= 100 mV s^{-1}. Medidas realizadas após 0 min de exposição à proteína..... **130**

Figura 5.5: Gráfico de escores obtido em solução de PBS (pH 7,4), SDS 5% (m/v), com um eletrodo de carbono vítreo modificado com polímero de BHb MIP usando os dados de densidade de corrente na presença de cada proteína (15,4 µmol L^{-1}). E_i=0,0 V, E_{V1}=-0,9 V, E_f = 0,0 V= 100 mV s^{-1}. Medidas realizadas após 10 min de exposição à proteína..... **131**

Figura 5.6: Gráfico de HCA obtido em solução de PBS (pH 7,4), SDS 5% (m/v), com um eletrodo de carbono vítreo modificado com polímero de BSA MIP usando os dados de densidade de corrente na presença de cada proteína (15,4 µmol L^{-1}). E_i=0,0 V, E_{V1}=-0,9 V, E_f = 0,0 V= 100 mV s^{-1}. Medidas realizadas após 10 min de exposição à proteína..... **132**

Esquema 3.1: Descarboxilação da valina.....**38**

Esquema 3.2: Metodologia para obtenção dos padrões RGB utilizando um software de imagem. Mesma proposta foi realizada utilizando o software para iOS.....**45**

Esquema 3.3: Representação esquemática da câmara de gás utilizada nos experimentos utilizando medidas de frequência de oscilação do cristal de quartzo (do inglês QCM – Quartz Crystal Microbalance).....**47**

Esquema 3.4. Reações paralelas para o processo de oxidação do metanol.....**53**

Esquema 3.5: Descarboxição de alguns aminoácidos para produzir aminas.....**64**

Esquema 4.1: Formação e redução do par iônico de cloreto de cobre com melamina.....**115**

Esquema 5.1: Mecanismo da mudança de conformação ocorrida nas proteínas com centros de ferros expostos em contato com SDS.....**128**

Tabela 3.1: Matriz de confusão para os resultados da classificação *k-NN* para as amostras de bactérias....**93**

CAP. 1 – INTRODUÇÃO

1. Doenças transmitidas por alimentos

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) vem aumentando de modo significativo em nível mundial. Vários são os fatores que contribuem para a manifestação dessas doenças, entre os quais se destacam: o aumento das populações de forma crescente; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. A deficiência dos órgãos públicos e privados no controle e monitoramento desses produtos também contribui para a falta de qualidade dos alimentos ofertados às populações [1].

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), doenças transmitidas por alimentos são definidas como doenças de natureza infecciosa ou tóxica, causadas por agentes que chegam ao organismo através da ingestão de alimentos. A OMS estima que as DTAs levam à morte cerca de 2,2 milhões de pessoas por ano. Por apresentarem diferentes tipos, gravidade e impactos, as DTAs são uma preocupação para todas as comunidades e países [2]. Os centros americanos para controle e prevenção de doenças (*Centers for Disease Control and Prevention – CDC*) estimam que 48 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos ocorrem nos Estados Unidos a cada ano. Pelo menos 128 mil americanos são hospitalizados e 3.000 morrem depois de comer alimentos contaminados [3], [4].

São vários os perigos a serem controlados na ocorrência dessas DTAs, que vão desde a produção primária até o consumidor. Os perigos nos alimentos podem ser de natureza química, física e biológica. A contaminação física decorre da presença de corpos estranhos aos alimentos; são considerados corpos estranhos: pedras, madeira, cabelo, pregos, lâminas, fragmentos de insetos. A contaminação química é proveniente da presença de compostos químicos estranhos ou de toxinas produzidas devido ao metabolismo de micro-organismos presentes nos alimentos. São considerados compostos químicos estranhos os pesticidas, detergentes, metais tóxicos, medicamentos, corantes, aditivos não-autorizados, entre outras. A contaminação biológica é causada pela presença de micro-organismos patogênicos nos alimentos, como por exemplo, bactérias, parasitas, vírus (hepatite) e animais venenosos (moluscos, peixes, mexilhões) [1].

CAP. 1 – INTRODUÇÃO

Os alimentos de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, podem veicular diversos micro-organismos patogênicos como bactérias, bolores, protozoários e vírus, causadores de diversas perturbações fisiológicas entre aqueles que os consomem. As bactérias pela sua diversidade e patogenia, constituem, de longe, o grupo microbiano mais importante e mais comumente associado às doenças transmitidas pelos alimentos [5].

Os alimentos que eventualmente estejam contaminados, ao serem ingeridos, permitem que os patógenos ou os seus metabólitos invadam os fluidos ou os tecidos do hospedeiro, causando algumas doenças graves associadas a infecções, toxinfecções (causadas por micro-organismos toxigênicos) e intoxicações, que podem ser causadas por toxinas provenientes da proliferação de patógenos ou ainda as não bacterianas causadas por substâncias químicas nocivas. Essas doenças são caracterizadas por um conjunto de perturbações gástricas, envolvendo geralmente vômitos, diarreia, febre e dores abdominais, que podem ocorrer individualmente ou em combinação [5] [6]. Sintomas digestivos, no entanto, não são as únicas manifestações dessas doenças, podem ocorrer ainda afecções extraintestinais, em diferentes órgãos e sistemas como: meninges, rins, fígado, sistema nervoso central, terminações nervosas periféricas e outros, de acordo com o agente envolvido [1].

Alimentos são ambientes bastante propícios à proliferação de micro-organismos pois, na maioria das vezes, eles apresentam condições ótimas de pH, temperatura, quantidade de nutrientes (como por exemplo, água e açúcares), entre outros. Organismos como as bactérias, por exemplo, são capazes de se reproduzir rapidamente em amplas faixas de temperatura (entre 3 e 55 ºC) e pH (entre 4,4 e 9,0) [7], indicando também a possibilidade de proliferação desses organismos nos alimentos.

A contaminação dos alimentos por agentes químicos é um problema de saúde pública mundial e é uma das principais causas de problemas comerciais internacionalmente. A contaminação pode ocorrer através da poluição ambiental do ar, água e solo, como é o caso com metais tóxicos, PCB (bifenilo policlorado – do inglês, *polichlorinated biphenyl*) e dioxinas, ou até mesmo através do uso intencional de vários produtos químicos, como pesticidas e outros agroquímicos. Os aditivos alimentares e contaminantes resultantes da fabricação e processamento de alimentos também podem prejudicar a saúde. Uma avaliação científica de risco é importante para definir os níveis de exposição a produtos químicos que não causem preocupação de saúde com o intuito de gerar normas nacionais e internacionais de segurança alimentar.

CAP. 1 – INTRODUÇÃO

Identificação e diferenciação corretas de organismos que contaminam alimentos são aspectos importantes em muitas aplicações práticas. Um indivíduo pode apresentar ao médico os sintomas consistentes com uma infecção bacteriana, mas o médico pode ser incapaz de resolver a infecção com o antibiótico apropriado até que a identidade ou susceptibilidade a antibióticos da bactéria seja determinada [8]. Na indústria, muitos produtos devem ser examinados após a fabricação devido ao risco de contaminação bacteriana antes de serem liberados. A indústria de alimentos deve ser particularmente rigorosa para evitar problemas que possam atingir a saúde e também para respeitar legislações e regulamentações. Métodos existentes de identificação de bactérias patogênicas são severamente limitados devido à necessidade de longos períodos de análise, ao tempo de cultivo dos micro-organismos, à necessidade de pessoal altamente treinado, à obrigação de laboratórios bem equipados e com equipamentos de alto custo.

O controle e detecção de substâncias químicas é ainda mais complexo. Em alguns casos, produtores e fabricantes adicionam intencionalmente substâncias químicas em doses excessivas. Estes agentes químicos modificam propriedades físico-químicas dos alimentos com o objetivo de "conservação" ou ainda para mascarar o teor de nutrientes. Esta prática visa ao lucro na produção ou venda de alimentos e é "estimulada" pela deficiência ou inexistência de testes para identificação dos contaminantes.

As contaminações biológicas são as mais comuns em se tratando de erros de manipulação como, por exemplo, na fase de empacotamento, ou ainda falta de higiene em ambientes. Práticas errôneas permitem a entrada, contaminação e deterioração dos alimentos por causa da colonização dos micro-organismos. Durante o processo de colonização dos alimentos, as bactérias, assim como outros organismos, têm a capacidade de produzir alguns compostos voláteis que são liberados para o ambiente. Estes compostos (ou conjunto deles) são únicos de cada gênero ou espécie de micro-organismos, fazendo com que cada um desses micro-organismos apresente uma "impressão digital química". A produção e os tipos de compostos emitidos por micro-organismos serão vistos com mais detalhes no Capítulo 3, que trata de contaminação biológica.

Na busca pela identificação de contaminação dos alimentos por agentes químicos e biológicos, uma vez que a detecção de agentes físicos se dá de forma mais simplificada, é interessante que sejam desenvolvidos métodos capazes de detectar estes tipos de contaminação ou

evitar o consumo do alimento contaminado, impedindo que os consumidores desenvolvam doenças de origem alimentar.

Diante do exposto anteriormente, a necessidade de um método qualitativo, rápido e confiável para a identificação precoce e adequada de contaminantes biológicos ou químicos é imprescindível, devido principalmente aos efeitos nocivos causados aos seres humanos. Os métodos convencionais para identificação bacteriana são baseados nas características bioquímicas de cada micro-organismo, tal como definido por respostas binárias (sim/não) a uma série de testes bioquímicos/biológicos. Estes testes diferenciam e identificam bactérias em função dos metabólitos específicos gerados a partir do nutriente a que estão em contato [8]. Mas a literatura mostra que diferentes metabólitos podem ser gerados por bactérias que consumiram os mesmos nutrientes. Também podemos encontrar que diferentes espécies liberam diferentes compostos como produto de reações enzimáticas, tais como aminas, sulfetos, e ácidos graxos [9]–[12]. Já a detecção da contaminação química pode não ser alcançada, uma vez que os testes podem ser caros, dispendiosos ou até mesmo ineficazes para determinados contaminantes em amostras complexas.

2. Dispositivos inteligentes

2.1. Línguas e narizes eletrônicos

Os sentidos humanos, principalmente olfato e paladar, são muito importantes no processo de prevenção e detecção de contaminação de alimentos; a visão, em muitos casos, é essencial mas atua em momentos em que a contaminação já foi efetivada. Os sistemas humanos de reconhecimentos de odor, sabor e imagens são potentes, porém limitados, o que abre caminho e cria necessidade de dispositivos “mais eficazes”.

Na natureza, provavelmente o sentido mais sensível é o olfato. Odores são reconhecidos pelas combinações de padrões que são captadas por células olfativas (que são milhões), estes padrões são levados ao cérebro e as informações olfativas são decodificadas. Em humanos, na região superior das cavidades nasais encontra-se o epitélio olfativo, que é formado por células

especializadas, chamadas quimiorreceptoras do olfato, que são dotadas de prolongamentos muito sensíveis, os cílios olfatórios. Esses cílios são encontrados mergulhados na camada de muco que reveste as cavidades nasais. Ao respirarmos, compostos voláteis são levados até nossas cavidades, lá eles se difundem no muco e atingem prolongamentos sensoriais. Ao atingirem esses prolongamentos, impulsos nervosos são gerados e transmitidos até o corpo celular da célula olfativa, onde são transmitidos aos nossos axônios, estes se comunicam com o bulbo olfatório, fazendo com que nosso cérebro os interprete e nos forneça a informação sobre o cheiro ou o padrão do cheiro, Figura 1.1.

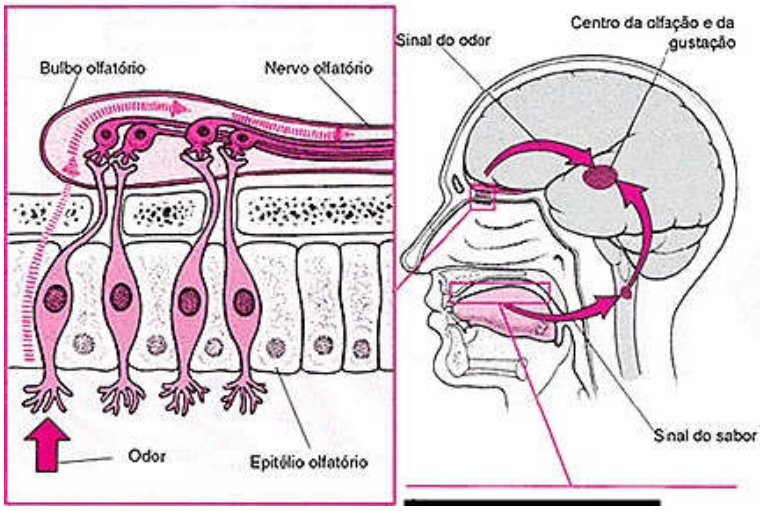


Figura 1.1: Esquema de funcionamento do sistema de olfato e sua conexão com o paladar.

O paladar, sentido extremamente importante, está diretamente ligado ao olfato na percepção de sabores, mas a combinação com a visão é também importante como mecanismo de defesa do organismo na escolha por alimentos aparentemente saudáveis, agradáveis, apropriados ao consumo [13]. O paladar é nosso "sentido químico", pois depende fortemente de substâncias químicas que vão interagir com os receptores (células) presentes nas papilas gustativas, localizadas na língua.

Os receptores presentes nas papilas linguais são capazes de detectar cinco gostos principais: doce, salgado, azedo, amargo e umami. As células receptoras responsáveis por cada

gosto não estão concentradas em áreas específicas da língua como se pensou por muitos anos, Figura 1.2, (na ponta para o doce, nas laterais da frente para salgado, logo atrás para azedo e no fundo para amargo), mas estão espalhados por toda nossa língua, Figura 1.3, além de palato mole, e até garganta [14], [15]. A percepção dos sabores é feita de forma similar ao dos odores, uma vez que partes neuronais são acionadas ao receber as informações para que o cérebro possa decodificar.

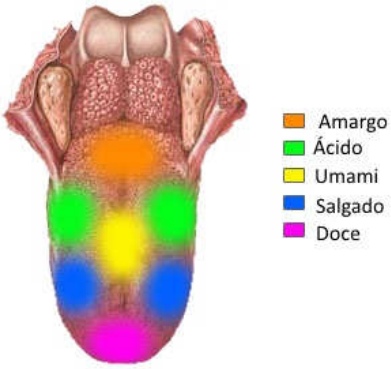


Figura 1.2 : Mapa da língua tido como modelo para a localização das papilas gustativas

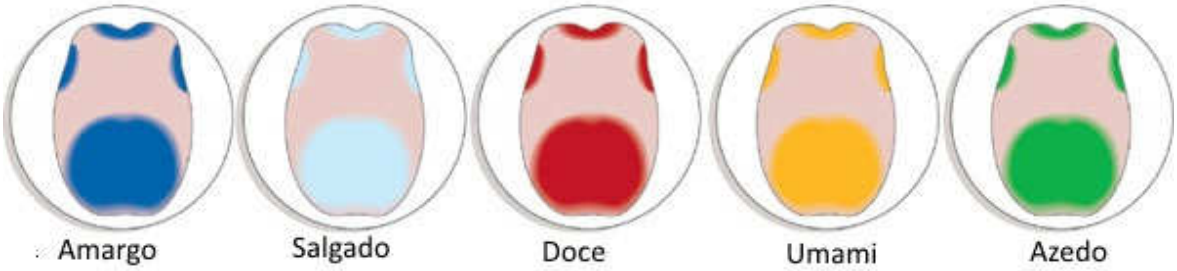


Figura 1.3: Refutação do mapa da língua proposto por Chandrashekar e colaboradores, onde as papilas estão presentes em toda a língua, sem a existência de localizações específicas. *Adaptado de J. Chandrashekar, M. A. Hoon, N. J. P. Ryba, and C. S. Zuker, "The receptors and cells for mammalian taste.," Nature, vol. 444, no. 7117, pp. 288–294, 2006.*

Para que haja interpretação dos sabores, é preciso ocorrer antes uma combinação do olfato com o paladar, as centenas de receptores gustativos trabalham conjuntamente com os milhões de receptores olfativos no processo de gustação e o cérebro nos revela, mesmo sem a ajuda da visão, qual o alimento estamos comendo. As moléculas de odor usam a parte de trás da boca para entrar no nariz, a garganta é ligada à cavidade nasal (interior do nariz) na parte superior e na parte

inferior se liga a laringe, traqueia e pulmões, bem como moléculas do esôfago. O odor viaja da boca para o nariz, alcançam os receptores olfativos e a combinação de aroma e gosto leva a uma percepção de sabor pelo cérebro, representado na Figura 1.1. Tal fato pode ser constatado quando estamos gripados ou resfriados e não conseguimos sentir o sabor correto dos alimentos, podemos sentir a diferença entre os gostos azedo e doce, por exemplo, mas muitas vezes não somos capazes de diferenciar duas frutas.

Os sistemas de reconhecimento (receptor/transdutor) já foram mimetizados sinteticamente e reportados na literatura como nariz e língua eletrônicos [16], [17]. Línguas e narizes eletrônicos, empregados em fase líquida e gasosa respectivamente, trabalham da mesma forma que os análogos humanos, captando informações por padrões, utilizando o conceito de seletividade global, que é o sistema que não identifica substâncias em particular mas extrai as informações em padrões para que possam ser decodificadas pelo cérebro. Este cérebro, no caso dos dispositivos sintéticos, é uma ferramenta de reconhecimento de padrões não supervisionada, que é capaz de transformar esses conjuntos de sinais em informações úteis de reconhecimento [18]. Trabalhos anteriores reportam revisões sobre ambos [19]–[22].

Línguas e narizes eletrônicos têm sido aplicados em diversos contextos na área de alimentos, tais como: monitoramento de processos, avaliação do frescor, investigação do tempo de prateleira, determinação de autenticidade, rastreabilidade do produto. Essas aplicações têm sido extensivamente reportadas na literatura [23]–[25]. Alguns trabalhos recentes têm evidenciado que narizes eletrônicos podem ser utilizados no controle de micro-organismos nos alimentos, analisando o padrão de compostos voláteis produzidos pelo metabolismo microbiano fornecendo a mesma resposta binária dos testes bioquímicos, mas de uma maneira muito mais rápida. Estas características mostram a existência de "impressões digitais" (compostos produzidos) de cada espécie de micro-organismo estudado [26].

Detecção de contaminação dos alimentos usando método padrão de contagem de placas microbianas envolve grande tempo e preparação de amostras muitas vezes intensa. Além disso, a amostragem inadequada do produto alimentar pode levar a resultados enganosos, pois os métodos baseados em cultura contam com o local de amostragem. O uso de sensores ópticos *("optoeletrônicos")* ou eletroquímicos pode fornecer meios rápidos e precisos de detecção da incidência de bactérias em alimentos com pouca ou nenhuma preparação da amostra.

Os narizes eletrônicos foram os primeiros dispositivos a serem utilizados para a obtenção de informação qualitativa em vários campos da química analítica, sendo muitos deles utilizados como dispositivos comerciais. Vale salientar, que muitos desses dispositivos trabalham somente com o reconhecimento qualitativo de misturas de gases, raramente com o intuito quantitativo.

Como já mencionado, o funcionamento destes dispositivos eletrônicos utiliza o conceito dos órgãos humanos, conhecido como seletividade global [27], ou seja, o sistema biológico não identifica uma substância específica, mas agrupa toda a informação em padrões que o cérebro decodifica, o que também pode ser visto como "impressão digital molecular". Assim, o ser humano reconhece o sabor do café, mas não compreende que ele é composto por mais de mil moléculas diferentes. O sensor eletrônico trabalha da mesma forma, fornecendo uma resposta global, impressão digital, para caracterizar e reconhecer determinada substância, como mostrado na Figura 1.4. Uma vez que não existe a necessidade de identificação seletiva de uma dada substância, para fins de reconhecimento, a seletividade deixa de ser um requisito fundamental, o que não impede o dispositivo de diferenciar sabores abaixo do limite de detecção humano, e diferenciar entre duas amostras, como por exemplo, tipos de vinhos [28], qualidade da água [29] e refrigerantes [30].

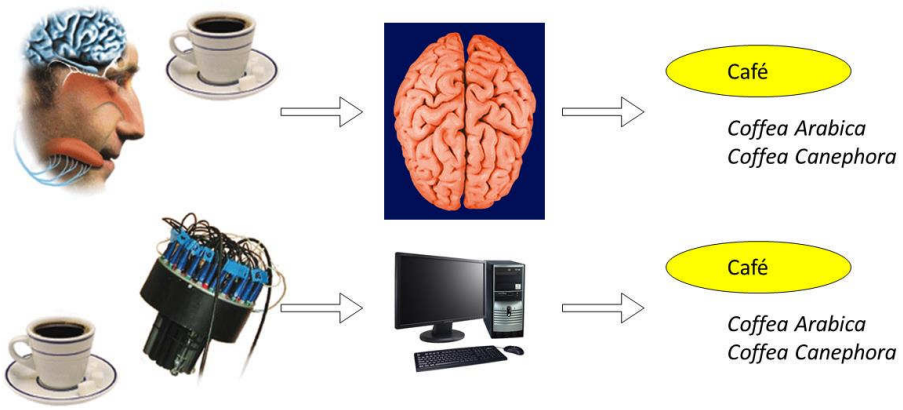


Figura 1.4: Comparação do funcionamento dos dispositivos eletrônicos (língua e nariz) com os respectivos sentidos humanos.

As ferramentas quimiométricas acopladas às técnicas de extração de informações ajudam significativamente no processo de classificação de amostras. Nos últimos anos, esse atrelamento

tem aumentado muito, mostrando assim que a quimiometria pode abrir novos campos de aplicação para técnicas eletroanalíticas [31][32], colorimétricas [33][34] entre outras [35], [36].

Uma alternativa interessante para a aplicação no controle microbiológico alimentar seria a utilização de um nariz eletrônico colorimétrico. Esses dispositivos ópticos são baseados em análises colorimétricas [28][37], normalmente apresentam baixo custo e são de fácil operação; alguns trabalhos foram reportados na literatura para serem utilizados na detecção e diferenciação de micro-organismos [38]–[40].

2.2. Dispositivos colorimétricos

Línguas e narizes colorimétricos foram introduzidos pouco tempo atrás (início dos anos 2000) pelo Professor Dr. Kenneth Suslick e seus colaboradores [41]–[43]. Nos dispositivos (arranjo de sensores colorimétricos), faz-se a impressão de diferentes reagentes químicos capazes de interagir com a amostra gasosa e alterar a sua coloração. Previamente à exposição do teste colorimétrico, e após a exposição, adquirem-se imagens do dispositivo utilizando um scanner de bancada para a determinação dos valores de coloração RGB (*sigla do inglês para red = vermelho, green= verde e blue = azul*), um dos sistemas de cores utilizado para expressar numericamente as cores em imagens digitais. Em geral, esses dados são utilizados como entrada para ferramentas quimiométricas para gerar uma resposta gráfica (visual) dos resultados do sistema proposto.

Colorimetria é parte da ciência das cores com o propósito de especificar numericamente a cor de um determinado estímulo visual. A colorimetria também se preocupa em especificar pequenas diferenças de cor que um observador pode perceber. A noção de cor está fortemente relacionada com o sistema visual humano. A ciência das cores tem como propósito o estudo de como os seres humanos percebem as cores. Este estudo envolve também áreas como a Física e a Medicina para entender como, por exemplo, as fontes de luz e a estrutura do olho ajudam no processamento da informação de cor através do cérebro [44].

A colorimetria é bastante útil para a Química Analítica, uma vez que permite a “medição de cores” em análises qualitativas rápidas, onde não é possível a utilização de instrumentação sofisticada ou o uso de métodos laboriosos, porém a decisão a ser tomada é séria e rápida. Ela permite o desenvolvimento de sensores colorimétricos (algumas vezes chamados *“spot tests*

colorimétricos") em solução, na forma sólida ou gasosa dos analitos a partir da utilização de agentes colorimétricos que interagem com as amostras analisadas.

Há dois requisitos fundamentais para a confecção de um arranjo de sensores colorimétricos: em primeiro lugar o corante "quimiossensível" deve conter um centro para interagir fortemente com os analitos e também este centro de interação deve ser fortemente ligado a um cromóforo intenso. O primeiro requerimento implica que a interação não deve ser só adsorção física, mas também deve envolver outras interações químicas. Corantes "quimiossensíveis" são aqueles corantes que mudam de cor, em luz refletida ou absorvida, após seus ambientes químicos sofrerem mudanças. Os corantes podem ser classificados como corantes ácidos/bases de Lewis (corantes íons metálicos); corantes ácidos/bases de Bronsted (indicadores de pH); e corantes com grandes dipolos permanentes (corantes solvatocrômicos)[45].

Os testes colorimétricos podem ser desenvolvidos em diversas matrizes, porém, em sua maioria, são encontrados trabalhos realizados em papel e polímeros. Outros diferentes substratos têm sido propostos para testes colorimétricos de compostos voláteis em solução e em fase gasosa [46], [47]. Eles têm se tornado comuns para uma série de amostras como alimentos [48], [49], bebidas [33], explosivos [18][41], bactérias [38], [39], entre outras.

Detecção colorimétrica tem sido largamente utilizada em dispositivos de papel quando uma resposta binária (sim/não) ou semi quantitativa é suficiente para a análise. A colorimetria é uma técnica bastante simples, uma vez que a mudança de coloração pode ser visualizada a olho nu devido a uma reação enzimática ou química [50]. O primeiro dispositivo em papel microfluídico foi introduzido por Martinez e colaboradores [51] e demonstrou a detecção de glicose e proteína. A investigação foi baseada na mudança de coloração na zona de reação, quando a coloração mudou de incolor para marrom devido à oxidação enzimática do iodo a iodeto com a introdução da glicose; no caso da proteína, um resultado positivo foi garantido com a mudança de coloração do tetrabromofenol de amarelo para azul. Desde então, outros pesquisadores e grupos têm investido neste substrato para a obtenção de resultados rápidos em dispositivos baratos, portáteis e de fácil aplicação. As amostras analisadas com estes dispositivos têm sido as mais diversas: alimentos [52], combustíveis [53], explosivos [18], água [43], bactérias [54], metais [55], entre outras.

Membranas poliméricas sintéticas têm sido usadas em sensores para uma variedade de aplicações como eletrodos íon seletivos [56][57] e sensores amperométricos [58][59] para alcançar a permeabilidade seletiva de íons e pequenas moléculas. Elas são fáceis de preparar a partir da

solubilidade de seus respectivos sólidos em solventes específicos; a solubilidade e seletividade de permeação são tipicamente conferidas pela inclusão de um plastificante (agente modificante) e tornam os polímeros compatíveis com materiais de embalagens, incluindo as alimentícias, uma vez que estas seguem uma série de normas específicas [60]. Os polímeros são interessantes para a determinação de compostos na fase gasosa, visto que podem garantir, em alguns casos, a permeabilidade favorável, o que facilita a interação entre o analito e o agente colorante necessário aos testes colorimétricos. Diversos polímeros têm sido apresentados na literatura para a determinação de compostos na forma de vapor em testes colorimétricos [39], [61], [62].

Tradicionalmente, as informações a respeito de cor em experimentos, principalmente em soluções, eram extraídas com equipamentos destinados a este fim, como os espectrofotômetros e têm como princípio a Lei de Lambert-Beer, onde a concentração do analito é avaliada segundo sua capacidade de absorbância (ou transmitância) de radiação deste num comprimento de onda específico. Contudo, estes equipamentos apresentavam alto custo, não podiam ser levados a campo, além de só permitirem as medidas em meio líquido. Mesmo com o desenvolvimento de espectrofotômetros portáteis e mais baratos [63], a busca por formas alternativas para desenvolver medidas analíticas baseadas em informações colorimétricas continuou. Recentemente, vários grupos de pesquisa têm usado scanners portáteis ou de mesa [64], câmeras fotográficas digitais, webcams [65], celulares e smartphones [66] para adquirir informação analítica baseada na medida de cor. Nestes métodos, são usadas propriedades de refletância do sistema, ao invés da forma tradicional baseada em transmitância/absorbância. Então, isto é uma vantagem, uma vez que é possível analisar também amostras turvas [67].

O uso de smartphones (e telefones celulares simples) para análises químicas se mostra interessante, uma vez que estes equipamentos são portáteis, de fácil manuseio, relativamente fáceis de serem encontrados em diversas comunidades, podem ser conectados remotamente a outros dispositivos, mesmo a grandes distâncias, além de apresentarem uma melhora significativa na qualidade de imagens em suas capturas (fotografias) com o passar dos anos. Eles podem ser incorporados a dispositivos médicos *"point-of-care"* e permitir diagnósticos em tempo real [68][69], detecção da adulteração de bebidas, alimentos e quem sabe até combustíveis. Alguns trabalhos interessantes são reportados na literatura, entre eles uma revisão que mostra o uso de celulares usados como detectores para métodos analíticos e como eles podem ajudar na aquisição

de imagens, de sinais analíticos e até em diagnósticos rápidos [70]. Alguns pesquisadores fazem uso desse sistema para monitorar espécies de interesse em água [71], detectar explosivos [72] e ainda análise de alimentos [48].

Alguns dos problemas enfrentados por dispositivos que utilizam celulares como detectores pode ser a diferença de luminosidade ao adquirir as imagens, o que pode ser corrigido com uma simples estratégia que é o uso de uma câmara fechada com luz permanente [18], [73]. Outra questão a ser pensada nesses dispositivos é a forma de "mensurar" as cores, uma vez que a visão humana é relativa. Diversos sistemas de cores têm sido usados para analisar as imagens digitais geradas pelos dispositivos colorimétricos, entretanto o sistema de cores RGB é o mais aplicado para este fim.

2.2.1. Sistema de cores RGB

Assim como tratado em relação ao olfato e paladar, a visão é formada por sensores presentes na retina que permitem a percepção de cores (os cones) e os tons de cinza (através dos bastonetes). Porém, a visão humana é tricromática e por isso é formada por apenas vermelho, verde e azul. Estes sensores podem emitir diferentes impulsos elétricos ao cérebro variando de acordo com o comprimento de onda de cada cor primária. O cérebro recebe e processa esses sinais resultando na sensação da visão das cores.

Todas as cores que o ser humano consegue visualizar podem ser geradas por combinações variáveis das três cores chamadas primárias: vermelho, verde e azul. A Comissão Internacional sobre Iluminação (CIE – Comission Internationale del'Eclairage) padronizou que os comprimentos de onda das cores primárias são: azul = 435,8 nm, verde = 546,1 nm, e vermelho = 700 nm [74]. A Figura 1.5 traz um mapa mostrando esta combinação.

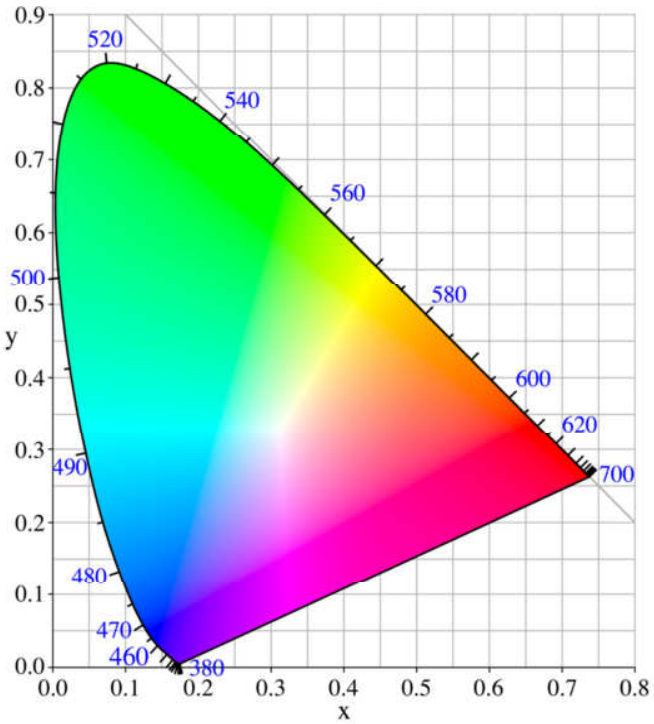


Figura 1.5: O diagrama de cromaticidade CIE (1931) de espaço de cores com comprimentos de onda em nanômetros. As cores descritas dependem do espaço de cor do dispositivo no qual a imagem é vista.

Os dispositivos que reproduzem ou capturam imagens coloridas disponíveis no mercado utilizam o mesmo princípio de percepção visual humana. O método de interpretação da cor é baseado exatamente na resposta humana aos estímulos luminosos das cores primárias.

O modelo de cores RGB, por si só, não define o que significa "vermelho", "verde" ou "azul" (espectroscopicamente), e então os resultados de misturá-los não são tão exatos (e sim relativos, na média da percepção do olho humano). Estas três cores não devem ser confundidas com os pigmentos primários Ciano, Magenta e Amarelo, conhecidos no mundo das artes como "cores primárias", compondo o sistema CMY é conhecido o sistema de Cor Pigmento, e trabalha por subtração, ou seja, se somarmos as três cores nas proporções corretas obteremos preto (desde que se use pigmentos apropriados e de boa qualidade). A "versão" industrial do CMY é o CMYK, no qual o Preto é adicionado e não obtido por meio de mistura. Assim, o CMYK é baseado em quatro cores e foi criado como uma opção mais barata, pois não necessita de pigmentos puros e mais caros, sendo usado para impressões em larga escala. A letra K, do CMYK, tanto significa

preto (*Black*), como chave (*Key*), pois a cor preta é usada para interferir nos detalhes na impressão [75].

O sistema RGB regula as cores dos corpos que emitem luz, visto que depende da emissão de fótons de um componente excitado a um estado de energia mais elevado (fonte emissora, por exemplo, o tubo de raios catódicos). Já o sistema CMY regula as cores de corpos opacos, uma vez que são baseadas na reflexão e absorção de fótons.

Uma cor no modelo de cores RGB pode ser descrita pela indicação da quantidade de vermelho, verde e azul que contém. Cada uma pode variar entre o mínimo (completamente escuro) e máximo (completamente intenso). Quando todas as cores estão no mínimo, o resultado é preto. Se todas estão no máximo, o resultado é branco. Uma das representações mais usuais para as cores é a utilização da escala de 0 a 255, bastante encontrada na computação pela conveniência de se guardar cada valor de cor em 1 byte (8 bits). Cada um destes três canais (R,G e B) são representados por um número inteiro que varia de 0 a 255 e cada uma das combinações representam uma cor particular e, portanto, é possível obter mais de 16 milhões de combinações (256^3 = 16.777.216). Assim, o vermelho completamente intenso é representado por 255,0,0; o verde por 0,255,0; azul por 0,0,255; branco por 255,255,255 e preto por 0,0,0.

Os dispositivos colorimétricos baseiam-se na diferença de coloração nos índices RGB antes e após a exposição do dispositivo à amostra. O índice RGB de cada poro também pode ser utilizado para a construção de uma matriz contendo os dados de entrada ferramenta quimiométrica.

A extração de dados de RGB e dos demais sistemas de cores é feita com a ajuda de software desenvolvido para este fim. Estes podem ser softwares computacionais comerciais ou desenvolvidos especialmente para smartphones [18], [76], [77]. Quando se trata de um dispositivo inteligente como línguas e narizes eletrônicos, a utilização de uma ferramenta quimiométrica faz-se necessária, para a interpretação desses dados, , atuando como “o cérebro” do método proposto. Com isso, a literatura apresenta trabalhos utilizando ferramentas quimiométricas como PCA (Análise de Componentes Principais – do inglês, *Principal Component Analysis*,), *k*-NN (k-vizinhos mais próximos – do inglês, k^{th} *Nearest Neighbors*,), PLS (Método dos Mínimos Quadrados Parciais – do inglês, Partial Least Squares,), redes neurais, LDA (Análise Discriminante Linear – do inglês *Linear Discriminant Analysis*,) entre outras. Neste trabalho trataremos de três dessas ferramentas: PCA, HCA e *k*-NN.

3. Ferramentas quimiométricas

Como dito anteriormente, os dispositivos inteligentes (nariz e língua eletrônicos e/ou colorimétricos) atuam similarmente aos análogos orgãos humanos, e por isso, precisam de que o cérebro faça a decodificação dos sinais que recebem das células receptoras. Nestes casos, o decodificador pode ser uma ferramenta quimiométrica que permite a discriminação dos analitos desejados.

A Quimiometria é a área da Química que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos, assim como aqueles baseados em lógica matemática, para resolução de problemas químicos. Esta disciplina também desenvolve ferramentas computacionais que permitem explorar os resultados obtidos por meio de análises químicas, a fim de verificar a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição química. O reconhecimento de padrões, uma técnica de análises multivariadas, viabiliza a obtenção de mais informações quando comparado com os procedimentos univariados que são usualmente adotados.

Os métodos quimiométricos utilizados para identificar as diferenças em vários tipos de amostras, agrupá-las e classificá-las estão divididos em dois grupos em dois grupos: os métodos supervisionados e os não-supervisionados de reconhecimento de padrões. Ambos pressupõem que: as amostras do mesmo tipo são semelhantes; existem diferenças significativas entre diferentes tipos de amostras e também que o conjunto disponível de medidas é capaz de detectar suas semelhanças e diferenças [78].

Nos métodos supervisionados, é necessário haver conhecimento prévio de dados das amostras, elas fazem parte de uma classe preestabelecida, há um treinamento do algoritmo. Nos métodos não-supervisionados acontece o oposto, as amostras são agrupadas naturalmente com base em características dos dados experimentais, como por exemplo variância.

O número de parâmetros analisados (variáveis) nos estudos de reconhecimento de padrões normalmente é alto e complexo, e a apresentação gráfica de todo o conjunto de dados facilita a interpretação dos resultados. Alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos. Entre eles, destacam-se a Análise de Componentes Principais e a Análise por Agrupamentos Hierárquicos [79], que são métodos não supervisionados e foram utilizadas neste trabalho. Além delas, também será abordado um método supervisionado, o *k*-NN.

3.1. Análise de Componentes Principais

A Análise de componentes principais, PCA (do inglês, Principal Component Analysis) é um método para projetar dados multivariados em um espaço de dimensão menor, reduzindo assim a dimensionalidade do espaço original do conjunto de dados, sem que as relações entre as amostras sejam afetadas. Consequentemente, as informações serão separadas e se tornarão visualmente mais evidentes. Utilizando esse método, é possível descobrir, visualizar, e interpretar as diferenças existentes entre as variáveis e examinar as relações que podem existir entre as amostras. Essa análise também permite detectar amostras que apresentem um comportamento distinto (*"outlier"*), pois com a projeção dos dados, elas tendem a se tornar evidentes [78].

Num gráfico cartesiano, a apresentação de um ponto corresponde aos valores das coordenadas x, y e z, traduzindo isto para o mundo das amostras e das variáveis, o ponto é uma amostra e os valores em cada uma das coordenadas correspondem aos valores das variáveis medidas. As componentes principais (PCs) são as novas variáveis geradas através de uma transformação matemática especial realizada sobre as variáveis originais. Uma propriedade muito importante das componentes principais é que elas não são correlacionadas entre si, isto é, a informação contida em uma delas não está presente na outra. A outra propriedade importante é com respeito à quantidade de informação dos dados originais de cada uma dessas novas variáveis é capaz de descrever. A primeira delas, PC1, é definida pela direção que descreve a máxima variância dos dados originais. A segunda componente principal (PC2) está na direção de máxima variância dos dados no subespaço ortogonal a PC1, de maneira que descrevam, uma a uma, a máxima variância restante. Dessa forma, conjunto de dados obtido pode ser interpretado graficamente de forma multivariada, através de gráficos bi ou tri dimensionais.

Havendo correlações significativas entre as variáveis do conjunto de dados, é possível encontrar um menor número de variáveis que sejam ainda capazes de descrever aproximadamente toda a informação contida nos dados originais, de maneira a agrupar aquelas que fornecem informações semelhantes. Como resultado, um novo conjunto de variáveis com propriedades desejáveis, e específicas, é definido. Essas novas variáveis (eixos) são as componentes principais, também conhecidas na literatura por fatores ou autovetores.

A Figura 1.6 se utiliza de um exemplo genérico para explicar a obtenção das componentes principais. A imagem foi adaptada da referência [80] e demonstra que a ideia literal da PCA é examinar os dados a partir de um ponto de vista diferente. O primeiro passo é calcular a primeira componente principal, que explica a grande variância nos dados de uma determinada direção. Neste exemplo, a primeira componente principal descreve 60,87 % da variância total. Sucessivas componentes principais que descrevem o restante da variância podem ser estimadas, e o segunda componente contém 39,13 %. Cada nova componente subsequente é ortogonal a componente anterior, e de novo, a direção da componente conter a maior quantidade de variância restante dos dados. O total de informação neste caso é de 100% [60,87% (PC 1) + 39,13% (PC 2)] para duas componentes, que é esperado uma vez que temos duas medidas originais, duas dimensões, e duas novas variáveis após a PCA.

Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de escores e pesos (do inglês, *scores e loading graphics)* cujos eixos são as PCs nos quais os dados são projetados.

Os escores representam as coordenadas das amostras no sistema de eixos formados pelas componentes principais. Cada componente principal é constituída pela combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação são denominados pesos. Matematicamente, os pesos são os cossenos dos ângulos entre os vetores cartesianos das variáveis originais e o vetor das componentes principais, representando, portanto, o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC. A avaliação dos pesos permite entender quais variáveis mais contribuem para os agrupamentos observados no gráfico dos escores. Através da análise conjunta do gráfico de escores e pesos, é possível verificar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras. O número de componentes principais a ser utilizado no modelo PCA é determinado pela porcentagem de variância explicada. Assim, seleciona-se um número de componentes de tal maneira que a maior porcentagem da variância presente no conjunto de dados originais seja capturada ou extraída [81].

A PCA é a ferramenta quimiométrica mais utilizada no processo de construção de dispositivos inteligentes, é provavelmente a técnica estatística multivariada mais popular e mais velha, é usada em praticamente todas as disciplinas científicas [82]. Diferentes algoritmos e

softwares podem ser usados para calcular PCA, além de seus pesos e escores: Statisticas, Pirouettes, Mathlabs, Unscramble, Origin Professional (versão 8.6 ou superior) [35], [83]–[86].

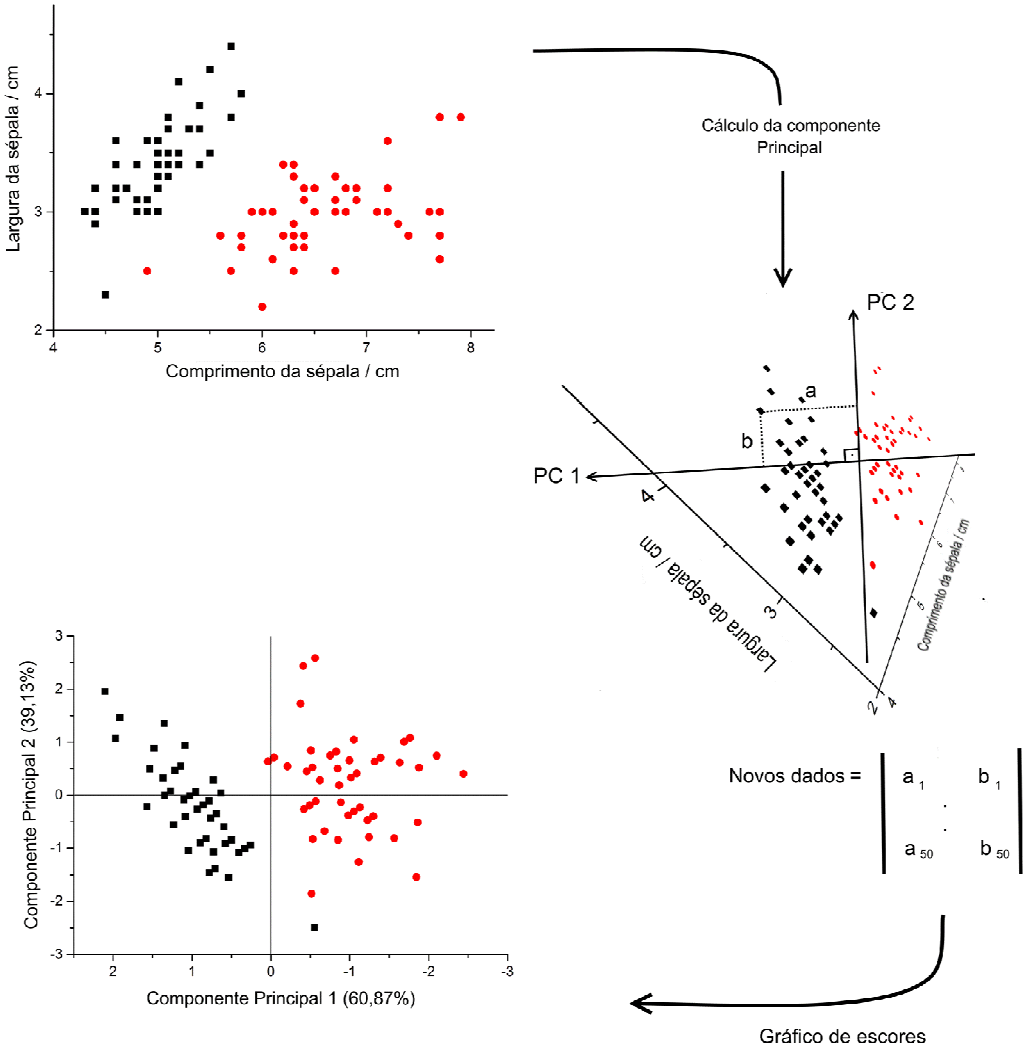


Figura 1.6: Demonstração de cálculo de componentes principais. Adaptado de M. O. Salles and T. R. L. C. Paixão, "Application of Pattern Recognition Techniques in the Development of Electronic Tongues," in *Advanced Synthetic Materials in Detection Science*, S. M. Reddy, Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2014, pp. 197–229.

3.2.Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA)

Análise de Agrupamentos Hierárquicos agrupa objetos semelhantes em categorias sem reduzir a dimensionalidade dos dados, isto é, os dados de entrada são usados nas *n* dimensões da matrix de entrada de dados. A dificuldade que enfrentam os pesquisadores em muitas áreas de investigação é a forma de organizar dados observados em estruturas significativas, isto é, desenvolver taxonomias. Em outras palavras a análise de agrupamentos é uma ferramenta de análise exploratória de dados, que visa ordenar os diversos objetos em grupos de forma a maximizar a homogeneidade interna, dentro dos grupos e maximizar a heterogeneidade entre os grupos. Sendo assim, a análise de agrupamentos pode ser usada para descobrir as estruturas de dados sem fornecer uma explicação/interpretação. Em outras palavras, análise de agrupamentos simplesmente descobre estruturas de dados sem explicar o padrão de agrupamento existe[87], diferentemente da PCA, onde é possível analisar o gráfico de pesos.

A HCA consiste no tratamento matemático de cada amostra como um ponto no espaço multidimensional (*n* dimensões dos dados de entrada) descrito pelas variáveis escolhidas [88]. Também é possível, nesta técnica, tratar cada variável como um ponto no espaço multidimensional descrito pelas amostras, ou seja, podemos ter agrupamento de amostras ou de variáveis de acordo com o interesse em cada situação. Quando uma determinada amostra é tomada como um ponto no espaço das variáveis, é possível calcular a distância deste ponto a todos os outros pontos, constituindo-se assim uma matriz que descreve a proximidade entre todas as amostras estudadas. O algoritmo faz uso de similaridades ou distâncias entre os objetos para formar os agrupamentos.

Similaridades são um conjunto de regras que servem como critérios para agrupar ou separar itens. Estas distâncias (similaridades) podem ser baseadas em uma única dimensão ou dimensões múltiplas, com cada dimensão representando uma regra ou condição para agrupar objetos. A maneira mais simples de computação das distâncias entre os objetos em um espaço multidimensional é calcular a distância euclidiana, mas existem outras formas de cálculo como a distância euclidiana quadrada, distância Chebychev, distância por porcentagem de dissimilaridade (Percent disagreement), entre outras e, por isso, cabe ao pesquisador selecionar o método correto para a sua aplicação específica [19].

Na distância euclidiana, para duas variáveis, o cálculo corresponde à aplicação do teorema de Pitágoras ($a^2=b^2 + c^2$): O comprimento da hipotenusa (a) é igual à raiz quadrada da soma dos quadrados dos comprimentos dos catetos (b e c). Baseada nesta matriz de proximidade entre as amostras, se constrói um diagrama de similaridade denominado dendrograma (dendr(o) = árvore e grama = representação) que nada mais é do que um gráfico que representa a estrutura hierárquica dos dados, em que os comprimentos dos ramos da árvore representam o grau de similaridade entre os objetos. Existem várias maneiras de aglomerar matematicamente estes pontos no espaço multidimensional para formar os agrupamentos hierárquicos. Cada um corresponde a um algoritmo específico (ou seja, o modo particular como os cálculos serão feitos pelo computador), que usa as informações da matriz de proximidade para criar um dendrograma de similaridade. Como uma técnica aglomerativa, HCA considera cada objeto como um grupo de um único elemento e segue agrupando-os sistematicamente, por ordem de similaridade, em um processo interativo, até que todos eles formem um único grupo grande. Assim, é muito razoável admitir que a amostras próximas entre si no espaço multidimensional sejam semelhantes em relação às variáveis consideradas. Isto quer dizer que uma maneira de determinar o quanto um objeto é semelhante a outro é através do cálculo da distância entre eles.

Alguns dos algoritmos mais populares de cálculo de HCA são: *single linkage* (método do vizinho mais próximo), *complete linkage* (vizinho mais distante) e método de *average-linkage* (distância média).

No método *"single linkage"* a distância entre dois agrupamentos é definida como o mínimo das distâncias entre todos os possíveis pares de objetos em dois agrupamentos. No método *"complete linkage"* a distância entre dois agrupamentos é representada pelo máximo da distância entre todos os pares de objetos nos *agrupamentos*. O *average-linkage* usa a distância média de todos os objetos de um agrupamento para todos os objetos no outro; dois agrupamentos com a menor distância média são então mesclados para formar um novo agrupamento [43].

A interpretação de um dendrograma de similaridade entre amostras fundamenta-se na intuição: duas amostras próximas devem ter também valores semelhantes para as variáveis medidas. Ou seja, elas devem ser próximas matematicamente no espaço multidimensional. Portanto, quanto maior a proximidade entre as medidas relativas às amostras, maior a similaridade

entre elas. O dendrograma hierarquiza esta similaridade de modo que podemos ter uma visão bidimensional da similaridade ou dissimilaridade de todo o conjunto de amostras utilizado no estudo. Quando o dendrograma construído é das variáveis, a similaridade entre duas variáveis aponta forte correlação entre estas variáveis do conjunto de dados estudado. Os dendrogramas de amostras são mais comuns.

3.3. Métodos os *k*-ésimos vizinhos mais próximos (*k*-NN)

Nos estudos de classificação, cada uma das amostras é descrita por um conjunto de medidas experimentais, chamado "padrão" e são classificadas de acordo com uma propriedade de interesse. A determinação da propriedade de interesse ao atribuir uma amostra a sua respectiva classe é o que chamamos de "reconhecimento".

Na análise supervisionada, seleciona-se uma série de amostras representativas de cada classe e para as quais as medidas experimentais são coletadas e o padrão de cada uma delas é definido. Esse conjunto de amostras, cuja propriedade de interesse, isto é, a classe a cada uma delas pertence, é conhecida previamente, constitui o conjunto de treinamento. A seguir, utilizando as informações do conjunto de treinamento para construímos uma regra de classificação, um modelo empírico. Por esta razão, estes métodos de análise são denominados supervisionados, pois as informações a respeito das classes é que supervisionam o desenvolvimento dos critérios de discriminação para serem utilizados posteriormente para fazer o reconhecimento de novas amostras. Os métodos mais utilizados são *k*-NN, SIMCA (Soft Independente Modelling of Classes Analogies), PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) e LDA (Linear Discriminant Analysis).

De acordo com as suposições usadas para a construção do modelo, os métodos de classificação podem ser: paramétricos (probabilístico) ou não paramétricos (não probabilístico).

O método do vizinho mais próximo, *k*-NN (do inglês K^{th} Nearest Neighbor), é um dos métodos supervisionados utilizados na literatura para validar dados encontrados experimentalmente. Os métodos supervisionados são aqueles usados para prever se uma amostra

futura pertence a uma classe; por meio da formação de conjuntos de dados para calibração, validação e predição.

Este método classifica um novo objeto (composto) de acordo com sua distância a um objeto do conjunto de treinamento. Os vizinhos mais próximos do conjunto de treinamento são encontrados e o objeto será atribuído à classe que tem a maioria dos seus vizinhos mais próximos. Este é um método de auto-validação, porque no conjunto de treinamento cada amostra (objeto) é comparada com todos os objetos no conjunto, mas não com ela mesma. O melhor valor de *k* pode ser escolhido com base nos resultados do conjunto de treino sozinho. Em sua abordagem clássica, o *k*-NN não tem capacidade de detectar amostras de comportamento distinto (*"outliers"*) [89]. Essa desvantagem pode ser compensada com a utilização, em conjunto, de um método não supervisionado que permita a verificação do comportamento geral das amostras. Assim, durante a construção do modelo, cada amostra do conjunto de treinamento é excluída uma única vez e então classificada, usando-se para isso as amostras restantes.

As distâncias entre as amostras do conjunto de treinamento e a amostras excluída são calculadas; para isso, podem ser usadas a distância Euclidiana, a distância de Mahalanobis, por exemplo. As distâncias de todas as amostras à amostra em questão são colocadas em ordem crescente para facilitar a identificação de seus k vizinhos mais próximos. Essa amostra que havia sido excluída é então classificada de acordo com a maioria dos votos de seus vizinhos mais próximos. Os *k* vizinhos mais próximos votam por sua classe e a amostra é atribuída a classe mais votada; em caso de empate quem ganha é a classe com a menor distância. Por esta razão, a escolha do vizinho mais próximo é crucial para o sucesso do método. A escolha errada por gerar erros de classificação e essa escolha é feita pelo número de vizinhos que gerarão a melhor exatidão baseado no conjunto de calibração.

Uma vez que o método foi validado, ele pode ser utilizado para estimar as classes de amostras de um conjunto de previsão. Uma das vantagens do método, é que ele pode ser utilizado em conjuntos de amostras grandes ou pequenos, porém ele não apresenta estes dados graficamente.

O método supervisionado k-NN é muito utilizado em trabalhos de todas as áreas para a confirmação das classificações obtidas em métodos não supervisionados como PCA, PLS, HCA, entre outras [90]–[92].

1. Objetivos gerais

Identificação e discriminação de alimentos contaminados biologicamente e quimicamente através da utilização de dispositivos inteligentes (línguas e narizes eletrônicos).

2. Objetivos específicos

I. Desenvolver um nariz "optoeletrônico" para identificar e discriminar a contaminação de alimentos por micro-organismos patogênicos através dos compostos voláteis produzidos por eles no processo de colonização.

II. Desenvolver uma língua eletrônica voltamétrica (arranjo de três eletrododos metálicos) para a discriminação de amostras de leite adulteradas com formaldeído, ureia e melamina.

III. Demonstrar a possibilidade da utilização de MIPs (polímeros molecularmente impressos) para o processo de discriminação de alimentos contaminados biologicamente e/ou adulterados quimicamente.

CAP. 3 – CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA

1. Compostos orgânicos voláteis

Durante o processo de colonização de seus substratos (crescimento), fungos e bactérias produzem compostos orgânicos voláteis, que são produtos metabólicos secundários para proteção contra antagonistas e competidores ou como moléculas sinalizadoras na comunicação celular [93]. Sua produção depende de fatores como temperatura, pH, luz, quantidade de CO_2 e O_2 disponível no meio, além do substrato e nutrientes nele presentes [94]. Em geral, os alimentos são meios ricos em nutrientes (muitas vezes também de água) e, por isso, produzem grandes quantidades de metabólitos.

Os micro-organismos podem produzir álcoois, cetonas, ésteres aminas, aldeídos, entre outros. Entretanto, o conjunto de compostos emitidos é característico de cada espécie ou gênero de micro-organismo e podem ser vistos como uma "impressão digital" química deste organismo, sendo útil para sua detecção. A detecção e identificação de bactérias são problemas sérios em medicina e na indústria. Um paciente pode apresentar sintomas físicos consistentes com uma infecção bacteriana, mas esses sintomas podem ser insuficientes para a certeza de qual a bactéria correta e consequentemente qual o melhor antibiótico para combatê-la, o que pode levar à sepse e até à morte [8]. A identificação rápida das bactérias é essencial para um tratamento efetivo em ambientes clínicos, além de determinar a fonte de contaminação em amostras de alimentos [95].

Diversos patógenos ainda representam um grande problema de saúde pública, uma vez que podem causar as chamadas doenças transmitidas por alimentos (DTA). Os sintomas comuns das DTAs incluem diarreia, náuseas, cólicas abdominais, dor de cabeça, tontura e febre. Nos países desenvolvidos ou em desenvolvimento, a vigilância dessas doenças é um componente fundamental de sistemas de segurança alimentar [96].

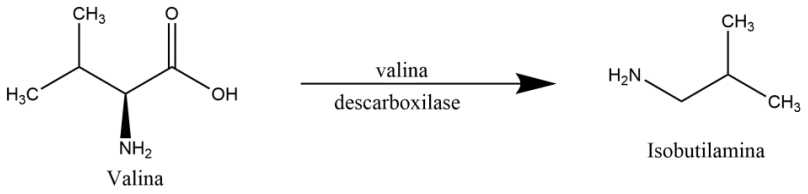
Diretamente relacionados a este problema, está a preocupação com o frescor dos alimentos, seu estado de conservação, além do prazo de validade e tempo de prateleira. A deterioração de alimentos é um processo metabólico que faz com que os produtos se tornem indesejáveis ou inaceitáveis ao consumo humano devido às alterações das características sensoriais, que são causadas por micro-organismos resultado da negligência no manuseio e armazenamento desses

alimentos. O odor é parâmetro importante na avaliação do frescor de alimentos, uma vez que pode sinalizar para o tipo de micro-organismo causador da deterioração num dado alimento [97].

A detecção de vapor através de dispositivos colorimétricos surgiu como uma abordagem poderosa para a detecção de VOC (compostos orgânicos voláteis – do inglês, *volatile organic compounds*). A partir de elementos (colorantes) com sensibilidade cruzada, em vez de receptores específicos, eles geram respostas compostas únicas a VOCs específicos, de um modo semelhante ao sistema olfativo dos mamíferos [98]. Métodos tradicionais de identificação de bactérias como sorológicos, genéticos e cultura são dispendiosos (levam de horas a dias) e podem requerer técnicas agressivas, no caso da medicina, ou mesmo técnicas sofisticadas equipamentos de alto custo (como cromatografia gasosa como método de separação acoplada a detectores espectrométricos e de massas), além de pessoal bem treinado em casos de análises alimentícias. Entretanto, um teste *in-situ* é desejável, uma vez que é não-invasivo, rápido, sensível e que pode facilitar a tomada de decisões corretas em um tempo bastante reduzido [99] [100], [101].

Enterobacteriaceae é uma grande família de bactérias frequentemente responsáveis por casos esporádicos e epidêmicos humanos associados a matrizes alimentícias [102]. A contaminação de alimentos pode ser natural, no caso dos vegetais, ou ocasionada por erros de manipulação e armazenamento. No caso de alimentos ricos em proteínas, como carnes e peixe, essa contaminação pode ser identificada pela presença de aminas, como por exemplo, a isobutilamina que é formada pela descarboxilação da valina por micro-organismos como *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas cocovenans* [103], Esquema 3.1.

Esquema 3.1: Descarboxilação da valina.



2. Procedimentos experimentais

2.1. Língua eletrônica voltamétrica

Os reagentes utilizados durante essa etapa foram etanol, metanol, acetaldeído, isobutanol, nitrato de potássio, ácido nítrico, ácido clorídrico, ácido canfosulfônico e persulfato de amônio, todos de grau analítico (Merck Darmstadt, Alemanha), sem prévia purificação. Foram preparadas soluções de 2 mol L^{-1} dos reagentes citados em água desionizada, além de uma solução 10 mmol L^{-1} de ácido nítrico com nitrato de potássio 0,5 mol L^{-1}, que foi utilizada como eletrólito suporte.

Para as medidas eletroquímicas foi utilizado um arranjo de três eletrodos, sendo a platina o material do eletrodo de trabalho; eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl_{sat}) e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Antes dos experimentos, o eletrodo de trabalho foi polido com óxido de alumínio com partículas de1 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha), deixado em solução piranha (3:1 peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico concentrado) por 2 minutos e lavado com água desionizada. Após essa etapa o eletrodo foi deixado em de banho de ultrassom (Ciencor, Limp Sonic) por 3 minutos em água.

Os voltamogramas cíclicos foram registrados em solução de ácido nítrico 10 mmol L^{-1} contendo nitrato de potássio 0,5 mol L^{-1} como eletrólito suporte. Foram feitas adições dos analitos estudados na faixa de concentração de 20 a 200 mmol L^{-1}. A janela de potencial dos estudos voltamétricos form de -0,4 a 1,6 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}).

2.2. Formação do filme condutor (estudos em fase gasosa)

Para a modificação da superfície de um eletrodo disco-anel (Pine Instrument Company, Analytical rotator), foi utilizado procedimento descrito na literatura por Verma e Dutta [104][7]. O primeiro passo foi a oxidação da anilina, que foi dissolvida (0,22 mol L^{-1}) em HCl (1 mol L^{-1}) e essa mistura foi resfriada a 0°C. A esta solução foi adicionado persulfato de amônio (0,8 mol L^{-1}), com adição de HCl (1 mol L^{-1}). Esse procedimento resultou na formação de um precipitado, que foi lavado várias vezes com HCl e seco a vácuo. A polianilina (PANI) formada foi dissolvida em

cresol juntamente com ácido canforsulfônico, solução que ficou alguns dias em agitação para se tornar homogênea. O filme foi depositado pela técnica de spin-coating a uma velocidade de 800 rpm sobre a superfície do eletrodo de platina.

2.2.1. Medidas de resistência

As medidas de resistência entre os eletrodos de disco-anel modificados com filme de PANI foram realizadas com um multímetro digital, modelo ip-370TR true RMS com termômetro e RS-232, da Impac Comercial e Tecnologia Ltda. Esse sistema foi colocado dentro de uma câmara para gases desenvolvida no laboratório e fabricada em vidro. Nesta câmara estavam contidos os compostos voláteis a serem analisados (um de cada vez) que eram bombeados a partir de suas soluções aquosas com o auxílio de uma bomba de aquário. Os testes foram realizados com a passagem de 60 segundos de ar alternando a passagem dos compostos, também por 60 segundos.

2.3. Testes colorimétricos com papel (fases líquida e gasosa)

Todos os reagentes empregados nessa fase foram adquiridos na Sigma (Poole, UK) e utilizados sem tratamento prévio. Foram eles: trietilamina, isobutilamina, isopentilamina, etanol, metanol, acetona, formaldeído, ácido acético, 2-propanol, vermelho de metila, alizarina, azul de bromofenol, azul de timol, vermelho de clorofenol, dimetil sulfóxido, acetato de celulose, Tween® 20. Foram utilizados também filtros de papel qualitativo n° 3 Whatman®, cortadores de papel, furadores de rolha, Scanner HP Scanjet G3010.

Inicialmente, pensou-se em utilizar o papel de filtro como suporte para os dispositivos colorimétricos e captura dos compostos voláteis. Com isso, os filtros de papel foram cortados com furador de papel de 15 mm de diâmetro e impregnados com soluções individuais dos corantes (vermelho de metila, alizarina, azul de bromofenol, azul de timol, vermelho de clorofenol). As soluções dos corantes foram preparadas com a diluição de 1 mg do corante por ml de dimetil sulfóxido. Primeiramente, foram realizados testes com soluções dos analitos também solubilizados em dimetil sulfóxido: foram colocados sobre o papel 15 µl de solução de corantes citados

separadamente, estes foram escaneados e, em seguida, 15 µl dos analitos puros (isobutilamina, trietilamina, etanol, metanol, ácido acético, isopentilamina, 2-propanol, acetona, formaldeído) eram colocados também sobre o papel antes de serem escaneados novamente. Num segundo momento, foram utilizadas apenas aminas, em sua forma gasosa. Nos experimentos utilizando a fase vapor 10 µl de solução de corante foram colocadas sobre os pedaços cortados de papel visando à modificação do substrato e, em seguida, esses substratos foram escaneados. Após isso, os substratos modificados foram colocados em um dessecador que atuou como câmara e que continha uma atmosfera rica em aminas. Vale destacar que essa atmosfera continha somente um único tipo de amina por experimento. Essa atmosfera foi criada deixando 10 µl de amina dentro do dessecador. Ao fim deste tempo, os papéis modificados com os reagentes eram escaneados novamente para posterior extração dos dados de RGB utilizando o software GNU Image Manipulation Program (GIMP). Esses valores foram então usados para cálculo de um mapa de diferenciação. O mapa de diferenciação será descrito no item 2.4.4. Estes mapas de diferenciação foram usados como dados de entrada para as ferramentas não supervisionadas PCA e HCA. Como dados de entrada para a ferramenta quimiométrica de Análise de Componentes Principal (PCA). As PCAs foram realizadas utilizando o software Statistica 12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

2.4. Discriminação de aminas utilizando membranas poliméricas

Membranas de acetato de celulose foram obtidas após a dissolução do polímero com acetona (0,1 g por ml) em frascos de vidro. Para colori-las foram utilizados os seguintes corantes separadamente: vermelho de metila (pKa 5,0, faixa pH 4,8 a 6,0, vermelho para amarelo), alizarina (pKa 6,77, faixa 1 pH: 5,5 a 6,8, amarelo para vermelho; faixa 2 pH: 10,1 a 12, 1, de vermelho para roxo), azul de bromofenol (pKa 4,10, faixa pH: 3,0 a 4,6, de amarelo para azul), azul de timol (pKa 1,65, faixa 1 pH: 1,2 a 2,8,vermelho para amarelo; pKa 9,20, faixa 2 pH: 8,0 a 9,6 de amarelo para azul), vermelho de clorofenol (pKa 6,25, faixa pH: 5,2 a 6,8, amarelo para vermelho) em 1 mg por ml de solução de acetato de celulose em acetona. Após completa solubilização dos corantes, foi adicionado 150 µl do plastificante Tween® 20 e executado um novo processo de agitação. A mistura foi colocada em uma placa de Petri e deixada na capela à temperatura ambiente por uma noite até completa evaporação do solvente e formação da estrutura polimérica. As membranas prontas foram cortadas com furador de rolha e colocadas sobre uma placa de Petri,

estas eram escaneadas, nos estudos iniciais, antes e após o contato com o vapor das aminas (trietilamina, isobutilamina e isopentilamina) separadamente, por dez minutos em um dessecador de vidro. Ambas as imagens eram adquiridas para a comprovação da mudança de coloração e extração dos parâmetros RGB. Após os primeiros testes, as imagens foram registradas com uma câmera de celular (iPhone® 4S), Figura 3.1, e os dados de RGB eram extraídos com o auxílio de um aplicativo desenvolvido no laboratório [18][9]. As imagens foram registradas com um celular e para controlar a luminosidade ambiente, elas foram registradas utilizando uma câmara construída com um plástico (polimetilmetacrilato) preto e LEDs para que a iluminação fosse sempre a mesma. Os valores de RGB foram utilizados como dados de entrada para as ferramentas quimiométricas PCA e HCA, utilizando também um mapa de diferenciação. Ambos os tratamentos quimiométricos foram realizados no software Statistica 12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Figura 3.1: Câmara fechada de polimetacrilato de metila que permite uma distância focal fixa e iluminação homogênea através do uso de leds.

Discriminação de aminas em amostras de carne

Para avaliar a aplicação do método em uma amostra real foram utilizadas amostras de carne bovina moída contaminadas com as aminas isobutilamina, isopentilamina e trietilamina. Para isso, 2 g de carne foram contaminados com vapores contendo cada uma das aminas individualmente. No experimento, 10 µl de cada amina foram colocados em uma pré-câmara para que sua fase gasosa estivesse em contato com a amostra de carne não contaminada em uma segunda câmara. Após este processo, a carne contaminada foi colocada na câmara (dessecador de 400 ml) com o conjunto de membranas responsável pela discriminação (sensor colorimétrico feito em uma matriz polimérica). Um experimento sem a contaminação da carne também foi realizado, a fim de permitir a comparação dos resultados.

2.4.1. Detecção de aminas biogênicas

Desejando avaliar o desempenho do método para a detecção de outras aminas, três aminas biogênicas foram testadas: tiramina, putrescina e cadaverina. Por se tratar de compostos na forma sólida e altas temperaturas de vaporização, as substâncias tiveram que ser usadas na forma líquida, após uma etapa de solubilização desses compostos em água desionizada. Para os experimentos foram utilizadas também o sensor colorimétrico feito em uma matriz polimérica contendo indicadores de ácido-base. Seguindo o mesmo procedimento para os testes em fase gasosa, as membranas foram fotografadas antes e após entrarem em contato com os analitos para o cálculo do mapa de diferenciação.

2.4.2. Discriminação de micro-organismos patogênicos

Com o objetivo de discriminar micro-organismos reais e os compostos voláteis por eles produzidos durante o processo de colonização, quatro espécies de micro-organismos (*Klebsiella pneumoniae*, *Esherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris*) foram avaliadas usando corantes incorporados às membranas e um smartphone como detector. As quatro espécies foram escolhidas por estarem relacionadas a casos de contaminação de alimentos e por apresentarem altos graus de patogenicidade. Os experimentos foram realizados em um laboratório de

microbiologia, sob a supervisão da microbiologista Alison Cottell, da Universidade de Surrey, com os devidos cuidados de segurança.

Para isso, as membranas de acetato de celulose foram fabricadas como citado no item 2.4., utilizando os mesmos corantes, e essas membranas foram colocadas em contato com as culturas dos quatro micro-organismos supracitados. Entretanto, antes desse contato, as espécies foram subcultivadas durante 24 horas a 37ºC em nutriente ágar. As suspensões de células das bactérias foram preparadas em solução bacteriológica salina (PBS) e ajustadas para uma densidade celular de 3 a 12,5 x 10^8 CFU (*do inglês Colony forming unit – unidade de formação de colônias*) utilizando espectrofotometria, e confirmado com a técnica de diluição em série Miles-Misra [105].

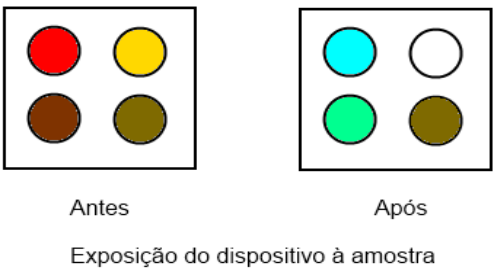
Alíquotas de cada uma das suspensões de células foram espalhadas sobre a superfície de placas de Petri de 4,5 mm de diâmetro que já continham o arranjo de sensores na tampa, e incubou-se a 25ºC e 37ºC. Placas preparadas apenas com nutriente ágar (sem bactéria) foram incubadas de forma idêntica para serem utilizadas como controle. Fotos das membranas foram registradas antes e depois do período de incubação para o cálculo do mapa de diferenciação, e esses valores de ΔRGB foram analisados com as ferramentas quimiométrica (item 2.4.4).

2.4.3. Análises quimiométricas dos testes colorimétricos

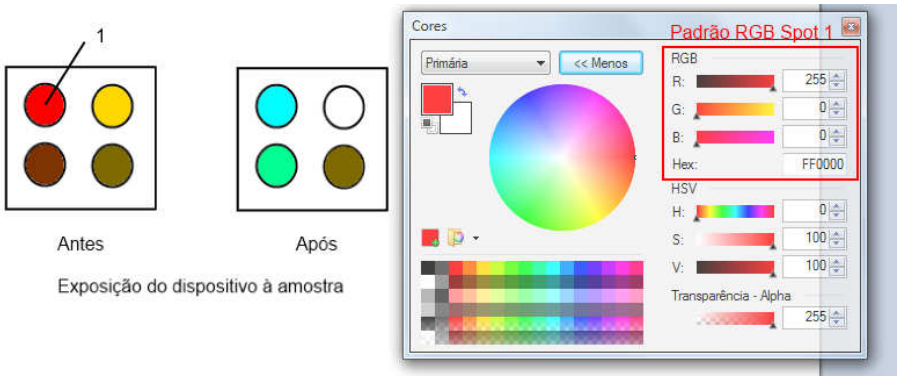
Os valores de RGB foram extraídos usando um aplicativo iOS desenvolvido com o propósito de medir os valores de RGB de cada membrana colorida ou um scanner, nos experimentos iniciais. Um mapa de diferenciação foi obtido a partir da diferença entre os valores de RGB após a exposição ao analito menos os valores de RGB extraídos antes da exposição, como mostrado no Esquema 3.2. Cada mapa é representado por 15 valores de R, G e B (cada mapa contem 5 corantes e cada corante fornece 3 valores de R, G e B). Estes mapas de diferenciação foram usados como dados de entrada para as ferramentas não supervisionadas PCA e HCA. Para avaliar o desempenho quantitativo das membranas poliméricas, foi utilizada uma abordagem baseada na resposta colorimétrica dos spots poliméricos usando a distância euclidiana (DE) versus a concentração de cada amina usada, que pode ser expressa pela equação (1).

$$DE = \sqrt{\begin{array}{c}(\Delta R)^2_{\text{spot vermelho de metila}} + (\Delta G)^2_{\text{spot vermelho de metila}} + (\Delta B)^2_{\text{spot vermelho de metila}} + \\ (\Delta R)^2_{\text{alizarina}} + (\Delta G)^2_{\text{alizarina}} + (\Delta B)^2_{\text{alizarina}} + \\ (\Delta R)^2_{\text{azul de bromofenol}} + (\Delta G)^2_{\text{azul de bromofenol}} + (\Delta B)^2_{\text{azul de bromofenol}} + \\ (\Delta R)^2_{\text{azul de timol}} + (\Delta G)^2_{\text{azul de timol}} + (\Delta B)^2_{\text{azul de timol}} + \\ (\Delta R)^2_{\text{vermelho de clorofenol}} + (\Delta G)^2_{\text{vermelho de clorofenol}} + (\Delta B)^2_{\text{vermelho de clorofenol}}\end{array}} \quad (1)$$

Esquema 3.2: Metodologia para obtenção dos padrões RGB utilizando um software de imagem. Mesma proposta foi realizada utilizando o software para iOS.



Passo 1 – Imagem digitalizada dos dispositivos antes e após exposição à amostra



Passo 2 – Imagem da tela do software e extração da informação RGB. Essa informação foi feita no centro do dispositivo (com um raio definido previamente) para evitar efeitos de borda. Exemplo, para o spot 1

	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4
	R G B	R G B	R G B	R G B
Amostra 1	[255 0 0	255 216 0	127 51 0	127 106 0]

Passo 3 – Matriz para o dispositivo antes de ser exposto antes de ser exposto à amostra.

	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4
	R G B	R G B	R G B	R G B
Amostra 1	[0 255 255	255 255 255	0 255 144	127 106 0]

Passo 4 – Matriz para o dispositivo após ser exposto antes de ser exposto à amostra.

	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4
	R G B	R G B	R G B	R G B
Amostra 1	[255 0 0	255 216 0	127 51 0	127 106 0]

	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4
	R G B	R G B	R G B	R G B
Amostra 1	[0 255 255	255 255 255	0 255 144	127 106 0]

Amostra 1	[-255 255 255	0 39 255	-127 204 144	0 0 0]

Passo 5 – Subtração dos valores RGB após e antes da exposição dos dispositivos a amostra, para obtenção do dado de entrada do algoritmo quimiométrico. Vale salientar que o mesmo será feito para padrões de diferentes concentrações.

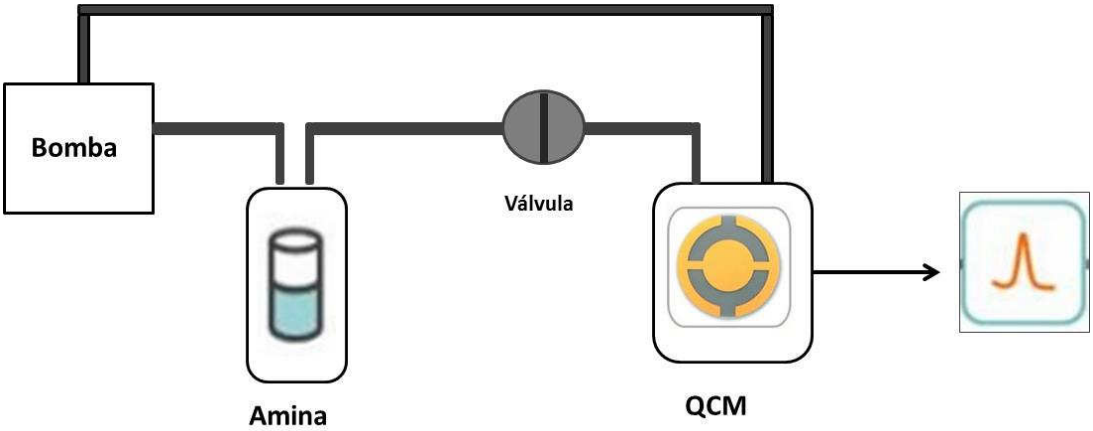
Passo 6 – Entrada dos dados no algoritmo quimiométrico para tratamento dos dados.

2.5. Discriminação de aminas utilizando sensor piezoelétrico (fase vapor)

Verificada a possibilidade de discriminar as aminas utilizando dados extraídos dos sensores colorimétricos, iniciaram-se testes para utilizar as membranas fabricadas como materiais para modificação de sensores de piezoelétricos. Para isso, foram realizados testes com membranas de celulose modificando a superfície do ouro dos cristais de quartzo da microbalança. Os filmes foram feitos com acetato de celulose solubilizado em acetona (20 mg mL^{-1}) e após a adição de 30 µl do plastificante Tween® 20 para cada ml de solução. Utilizou-se um módulo de microbalança

de cristal de quartzo da Metrohm (Utrecht, Netherlands), cristais de quartzo (6 MHz) recobertos com ouro (Piezo Parts Co. Ltd., Japão). Para cada medida realizada, foram utilizadas 10 μL de solução de acetato de celulose com plastificante modificado, ou não, com os indicadores utilizados anteriormente sobre a superfície de ouro do cristal de quartzo. Após a modificação da superfície esperou-se 15 minutos para a completa secagem da membrana sobre o eletrodo e as medidas de frequência foram adquiridas. Diferentes volumes (20, 30, 50 e 100 μL) das aminas trietilamina, isobutilamina e isopentilamina foram adicionados a uma câmara fechada de arraste de gás descrita no Esquema 3.3. Dados de frequência e tempo foram utilizados como dados de entrada para a ferramenta quimiométrica PCA.

Esquema 3.3: Representação esquemática da câmara de gás utilizada nos experimentos utilizando medidas de frequência de oscilação do cristal de quartzo (do inglês QCM – Quartz Crystal Microbalance)



Em uma segunda configuração, a bomba foi removida do sistema com o intuito de deixar o sistema mais simples, com um menor volume morto e sem a necessidade de diluição dos analitos com o ar atmosférico. Para cada experimento, 5 μl da solução do polímero (acetato de celulose) foram colocados sobre os eletrodos e eles foram secos por 15 minutos em sistema fechado, à temperatura ambiente para formação da membrana. Foram registrados gráficos de frequência em função do tempo para a exposição do sensor modificado na fase gasosa contendo as aminas isopentil, isobutil e trietilamina. Os dados de frequência máxima, inclinação até atingir a

frequência máxima e tempo de estabilização do sinal de frequência para cada tipo de membrana e composto analisado no sistema foram utilizados como dados de entrada para a ferramenta quimiométrica PCA (Análise de Componentes Principais).

A fim de comparar o comportamento do polímero PVC (policloreto de vinila) também foi testado e, para isso, uma solução 12 mg L^{-1} foi preparada em THF (tetraidrofurano), utilizando BEP (dioctil ftalato – do inglês, *bis(2-ethylhexyl) phthalate*) como agente plastificante. A membrana de PVC foi utilizada da mesma maneira que a membrana de acetato de celulose, isto é, 5 µl dessa solução foram colocados sobre o eletrodo e após um tempo de secagem de 15 minutos em sistema fechado e temperatura ambiente as medidas de frequência foram realizadas com as três aminas estudadas. Os mesmos dados (frequência máxima, inclinação até atingir a frequência máxima e tempo de estabilização do sinal de frequência) foram utilizados como dados de entrada para a PCA.

2.5.1. Análises quimiométricas dos dados de QCM

No caso dos experimentos utilizando os cristais piezoelétricos e os filmes de polímeros, os dados utilizados como entrada para a ferramenta quimiométrica foram: frequência máxima, inclinação até atingir a frequência máxima e tempo de estabilização do sinal de frequência dos compostos no sistema para as diferentes membranas poliméricas que modificaram a superfície do cristal de quartzo. Com estes dados, no software Statistica (Statsoft, USA), foram realizados gráficos de escores que discriminaram as três aminas com eletrodo limpo, recoberto com acetato de celulose e PVC.

3. Resultados e discussão

O desenvolvimento de método analítico barato que permita em tempo real detecção entre diferentes tipos de contaminação e de maneira não-destrutiva evitando o consumo de alimentos contaminados é de grande interesse para consumidores e varejistas. Uma grande vantagem desse tipo de dispositivo é a proteção dos consumidores contra doenças transmitidas por alimentos, além

da proteção da reputação dos varejistas. Uma solução que atenda a esses requisitos é o desenvolvimento de dispositivos colorimétricos incorporados à embalagem dos alimentos, como uma forma de tecnologia de embalagem inteligente [106]. As mudanças de cor ocorreriam em tempo real na presença de VOCs (e/ou subprodutos de interesse) ou outros responsáveis pelo crescimento microbiano, o que seria de interesse de todos na cadeia de alimentos. Diamond e colaboradores [107] propuseram o uso de uma matriz polimérica usando um único corante sensível ao pH que mudava de cor na presença de compostos voláteis liberados por alimentos para monitorar a deterioração de peixes. Vale destacar que a utilização de uma matriz de indicadores colorimétricos poderia levar a uma melhor discriminação de diferentes micro-organismo responsáveis pela deterioração de diferentes alimentos, ao invés de um sensor colorimétrico singular.

Parte I: Dispositivos colorimétricos

Estudos preliminares (língua eletrônica voltamétrica)

Como nosso objetivo inicial era desenvolver e estudar o funcionamento de um dispositivo híbrido (língua e nariz eletrônicos) que possibilitasse a discriminação de micro-organismos através de compostos voláteis liberados por organismos durante o processo de colonização nos alimentos, tentamos desenvolver uma língua eletrônica voltamétrica que possibilitasse a discriminação de compostos voláteis produzidos pelos micro-organismos em solução aquosa. Para tanto, houve uma busca na literatura a respeito e foram escolhidos alguns compostos simples, porém que apresentassem eletroatividade e que pudessem nos proporcionar algum sinal analítico que pudesse ser extraído pela língua eletrônica voltamétrica.

Sendo assim, foram utilizadas soluções aquosas de três álcoois (etanol, metanol e isobutanol) e um aldeído (acetaldeído), que são alguns dos compostos liberados por micro-organismos patogênicos. Às soluções ácidas foram adicionadas alíquotas dos compostos citados anteriormente até que eles atingissem concentrações de 20, 50, 100 e 200 mmol L^{-1} e voltamogramas cíclicos foram registrados. Os resultados das adições sucessivas podem ser observados nos gráficos a seguir (Figuras 3.2 a 3.5).

Etanol

O etanol é o mais comum dos álcoois, obtido a partir da fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução do acetaldeído. Muito utilizado na fabricação de bebidas e como combustível automotivo. Este álcool também é um dos compostos produzidos por micro-organismos e que pode ajudar na identificação de espécies de bactérias patogênicas bastante importantes como Salmonella e Shigella [93]. Seu processo de oxidação sobre diferentes superfícies eletródicas foi bastante estudado na literatura [108]–[110]. O perfil observado na Figura 3.1 mostra a oxidação de etanol na superfície do eletrodo de platina gerando como produtos ácido acético, acetaldeído, além de uma pequena quantidade de dióxido de carbono.

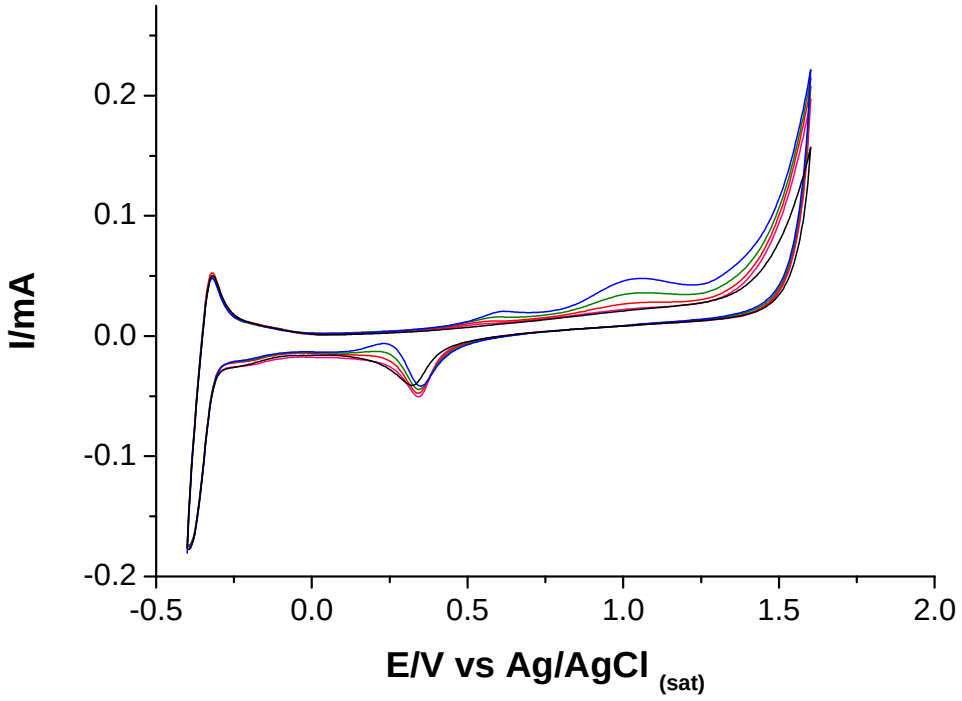


Figura 3.2: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de platina em eletrólito suporte com adições de etanol 20 (linha magenta), 50 (linha vermelha), 100 (linha verde) e 200 mmol L^{-1} (linha azul) e branco (linha preta). Eletrólito de suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} + HNO_3 10 mmol L^{-1}, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.

Em meio ácido, a concentração de etanol influencia na quantidade de produtos formados [111]; com o aumento da concentração de etanol, o produto majoritário passa de ácido acético para acetaldeído. Pois a água, que é essencial para o fornecer oxigênio para a formação de espécies como dióxido de carbono e ácido acético, não consegue se adsorver na superfície da platina, que tem os sítios ativos ocupados pelo álcool. A água passa pelo seguinte processo na superfície do eletrodo em meio não tão ácido, equação 2:

$$Pt + H_2O \rightarrow Pt - H_2O_{ads} \rightarrow Pt - OH_{ads} + H^+ + e^- \qquad (2)$$

Nos voltamogramas, podem ser observados perfis concordantes com a literatura [112]. Na varredura positiva é possível observar dois picos em aproximadamente 0,6 e 1,05 V, sendo o primeiro pico correspondente ao processo de formação de uma camada de óxido sobre a superfície do eletrodo de platina (2), além da adsorção de etanol, equação (3).

$$Pt + H_3CCH_2OH_{sol} \rightarrow Pt - H_3CCH_2OH_{ads} \qquad (3)$$

A reação representada em (2) fornece o segundo oxigênio necessário para conversão aos produtos dioxigenados, como dióxido de carbono e ácido acético. O segundo pico (1,05 V) refere-se ao processo de oxidação do etanol, gerando os produtos CO_2 e ácido acético. Os mecanismos propostos são a adsorção de etanol no eletrodo (3), oxidação dele a acetaldeído (4) e em seguida a ácido acético (5).

$$Pt - H_3CCH_2OH_{ads} \rightarrow Pt - H_3CCHO_{ads} + 2H^+ + e^- \qquad (4)$$

$$Pt - H_3CCHO_{ads} + Pt - OH_{ads} \rightarrow 2Pt + Pt - H_3CCOOH_{sol} + H^+ + e^- \qquad (5)$$

O pico existente em aproximadamente 0,3 V na varredura reversa mostra a redução da camada de óxido formada na varredura positiva. Pela Figura 3.2 é possível observar que quanto maior a concentração de álcool menor o pico, o que sugere o envenenamento da superfície do metal com um dos produtos da oxidação do etanol, diminuindo assim, os sítios ativos na superfície do eletrodo.

Metanol

Diferente de outras moléculas orgânicas pequenas, o metanol tem sido assunto de muitos estudos, uma vez que é interessante para a utilização em células a combustível [113], [114]. Poucos são os materiais sobre os quais o metanol se adsorve. Em solução ácida só platina e ligas de platina apresentam eletroatividade para a oxidação do metanol e estabilidade em condições operacionais. Sendo esta a razão principal para que quase todos os estudos mecanísticos a literatura estejam concentrados sobre estes materiais [115]. A existência de vários intermediários na oxidação do metanol é de consenso de diversos pesquisadores, entretanto, ainda não está completamente esclarecido o mecanismo pelo qual esse processo de oxidação ocorre na superfície desses eletrodos.

Este álcool também pode ser produzido por alguns micro-organismos patogênicos, mas quando aparece juntamente com etanol em uma colônia pode significar que aquela é uma colônia de Salmonella, um patógeno comum em derivados de aves [93].

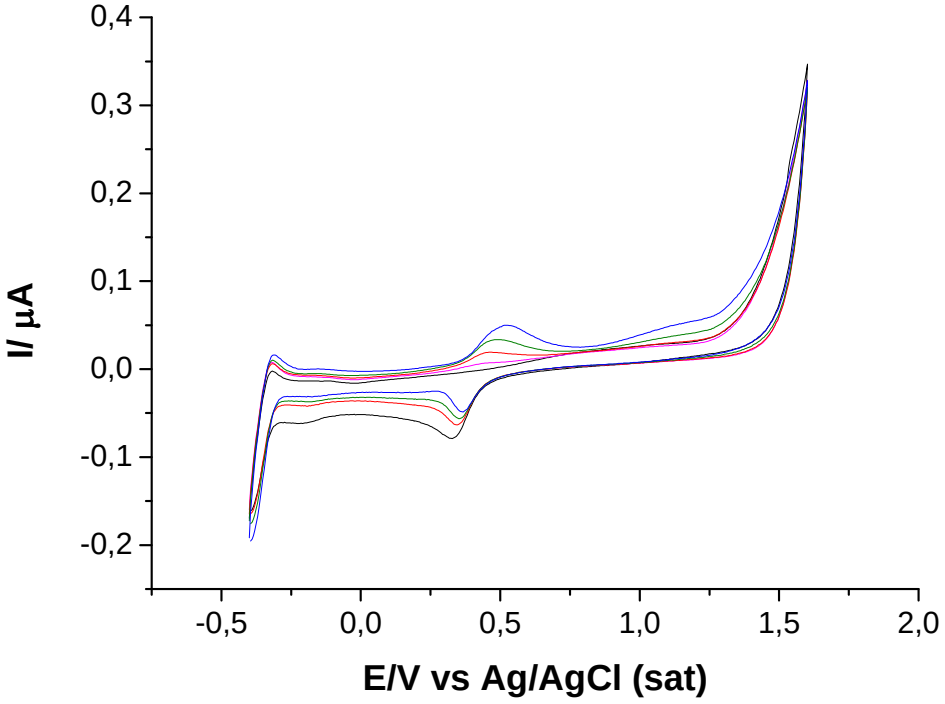
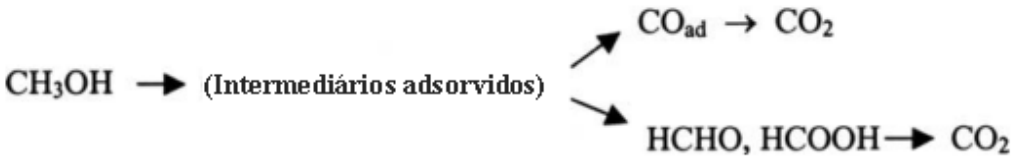


Figura 3.3: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de platina em eletrólito suporte com adições de metanol 20 (linha magenta), 50 (linha vermelha), 100 (linha verde) e 200 mmol L^{-1} (linha azul) e branco (linha preta). Eletrólito de suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} + HNO_3 10 mmol L^{-1}, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.

A Figura 3.3 mostra o processo de oxidação do metanol que, como sugerido por Breiter [116], consiste de reações paralelas, que podem ser formuladas como:

Esquema 3.4. Reações paralelas para o processo de oxidação do metanol.



Ambos os caminhos requerem um catalisador, que deve ser capaz de dissociar a ligação C – H e facilitar a reação que gera produtos que contenham oxigênio para formar dióxido de carbono (ou ácido metanoico). A platina, que é o melhor catalisador conhecido para a quebra de ligação C – H, tem a oxidação ocorrendo via dois diferentes processos [117]: o primeiro envolve adsorção das moléculas de metanol, o que requer diversos sítios ativos na superfície. Uma vez que o metanol não é capaz de deslocar átomos de hidrogênio anteriormente adsorvidos na superfície metálica, a adsorção de metanol só começa em potenciais onde há sítios suficientes de platina livres de átomos de H. O segundo processo, formação de espécies dioxigenadas, como CO_2 e ácido metanoico, requer a dissociação da água, que é a doadora de oxigênio para a reação.

A desidrogenação do metanol ocorre em várias etapas, sugerindo a presença de diversos adsorbatos. O CO, um deles, atua como um veneno, especialmente em baixos potenciais e também como um intermediário da reação que gera CO_2. O OH gerado da molécula de água ou mesmo uma molécula de água adsorvida na superfície da platina são vistos como participantes da reação necessária para oxidação do CO_{ads} [118].

Os picos de redução mostrados na Figura 3.3 sugerem que a superfície da platina é envenenada por algum adsorbato, pois esses sinais de corrente são menores quanto maior a concentração de metanol adicionada à solução, o que se opõe aos picos de oxidação vistos na varredura positiva, por volta de 0,5 V, que aumentam com a concentração do álcool.

Isobutanol

O isobutanol é um álcool produzido naturalmente durante a fermentação de carboidratos, mas pode também ser um subproduto do processo de decomposição de matéria orgânica. Além disso, pode ser encontrado em processos de deterioração de alimentos por colonização de bactérias que pode ser detectado por técnicas analíticas [119]. Até o momento, não foram encontrados relatos de seu mecanismo de oxidação em superfície de platina na literatura.

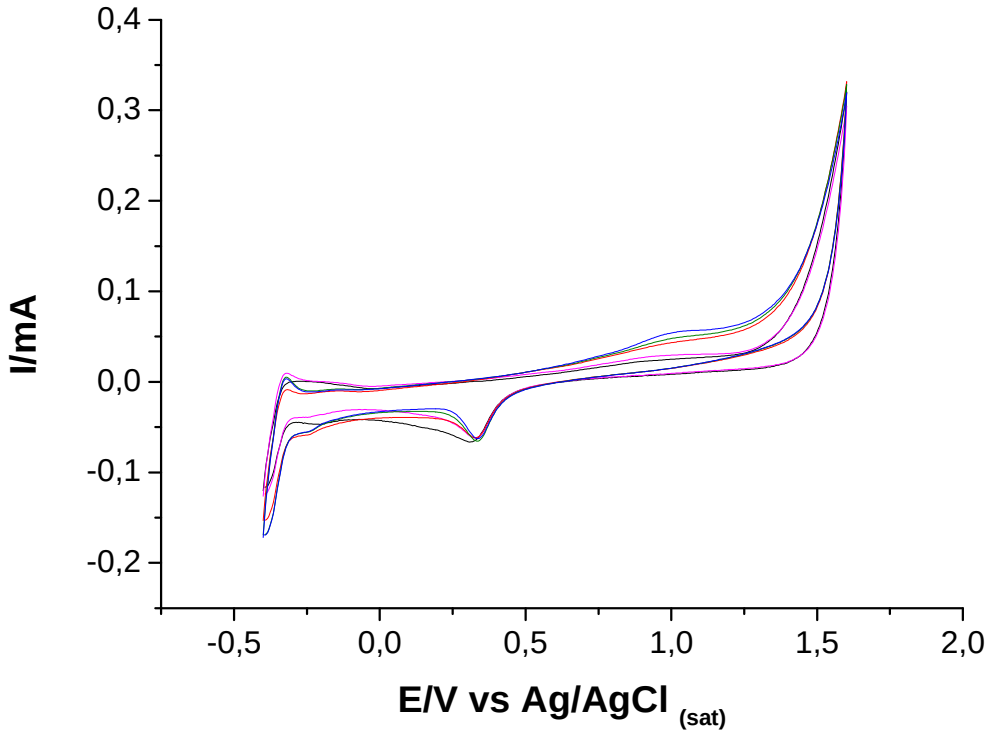


Figura 3.4: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de platina em eletrólito suporte com adições de isobutanol 20 (linha magenta), 50 (linha vermelha), 100 (linha verde) e 200 mmol L^{-1} (linha azul) e branco (linha preta). Eletrólito de suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} + HNO_3 10 mmol L^{-1}, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.

Acredita-se que a oxidação deste álcool leva à formação de dióxido de carbono e intermediários como 2-metil propanal, propeno, acetona e isobuteno [120]. A Figura 3.4 apresenta um pico de oxidação por volta de 1,05 V que representa provavelmente a formação de CO_2 no processo completo de oxidação, pois o mesmo aumenta com o aumento da concentração da espécie estudada. É possível ver também um pico de redução em aproximadamente 0,35 V na varredura negativa que diminui com o aumento da concentração de álcool adicionada. Tal comportamento é creditado à adsorção de intermediários da reação de oxidação completa a dióxido de carbono na superfície metálica, uma vez que, parte da área eletroativa da superfície eletródica está bloqueada. Comportamento similar foi observado para o etanol.

Acetaldeído

O acetaldeído é um dos compostos liberados por alguns gêneros de bactérias e que pode ser utilizado no processo de discriminação de bactérias patogênicas em colonização de alimentos ou mesmo em sistemas fisiológicos humanos, podendo causar doenças graves, como por exemplo, a pneumonia. Ele também é um intermediário da eletro-oxidação do etanol a ácido acético e compete com a oxidação completa do álcool a CO_2, diminuindo a eficiência deste processo.

Rasch [121] mostrou que em soluções mais diluídas de acetaldeído (0,01 mol L^{-1}), o CO_2 é o único produto da oxidação do aldeído em superfície de platina, enquanto ambos CO_2 e ácido acético foram obtidos em soluções mais concentradas (0,1 e 1 mol L^{-1}). Mello et. al [122] avaliaram diversos caminhos de eletro-oxidação e as equações (6) e (7) mostram alguns resultados.

$$CH_3CHO + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H^+ + 2e^- \quad (6)$$

$$CH_3CHO + 3H_2O \rightarrow 2CO_2 + 10H^+ + 10e^- \quad (7)$$

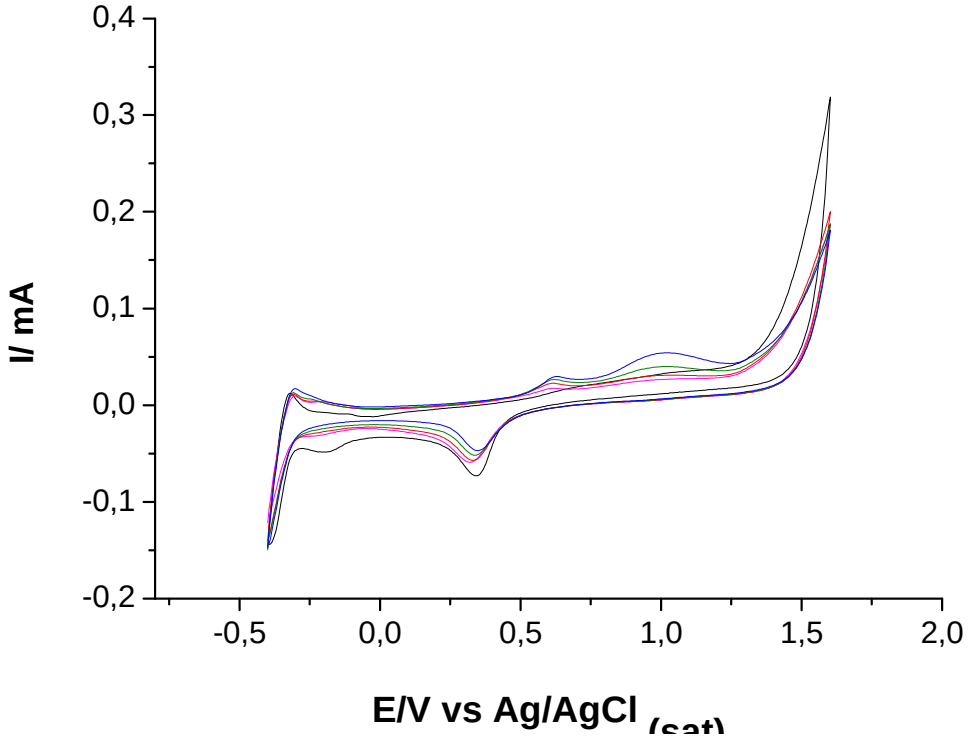


Figura 3.5: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de platina em eletrólito suporte com adições de acetaldeído de 20 (linha magenta), 50 (linha vermelha), 100 (linha verde) e 200 mmol L^{-1} (linha azul) e branco (linha preta). Eletrólito de suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} + HNO_3 10^{-3} mol L^{-1}, velocidade de varredura: 50 mVs^{-1}.

Na Figura 3.5, é possível observar dois picos na varredura positiva e um pico predominante na varredura negativa, que representa a redução da camada de óxido formada na superfície da platina na varredura positiva. Dióxido de carbono e ácido acético são os prováveis produtos da oxidação do acetaldeído [121][123]. O pico existente por volta de 0,6 V pode corresponder à formação de CO_2, como foi sugerido na literatura [123]. Contudo, há outro pico por volta de 1,0 V que não corresponde a produção de CO_2. De acordo com este resultado, ácido acético parece ser formado nesta região de potencial; no trabalho relatado pelo autor, ele não pôde ser detectado, provavelmente por causa de sua relativamente baixa volatilidade além de seu equilíbrio com a forma aniônica em solução. O aumento de ambos os picos com a concentração mostra que o rendimento dos produtos está relacionado com a concentração do acetaldeído em solução.

Discriminação qualitativa das espécies voláteis analisadas

Os resultados obtidos pelos experimentos voltamétricos mostram que as substâncias analisadas apresentam sinais analíticos concordantes com a literatura e que podem ser utilizados para discriminação entre os compostos e consequente identificação de algumas espécies de bactérias. Em todos os compostos analisados foi possível ver a dependência da concentração dos álcoois e aldeído com os picos observados, mostrando que o método é sensível à detecção dessas substâncias, o que seria útil no processo de discriminação de bactérias. Além disso, cada voltamograma apresenta um comportamento único, uma "impressão digital eletroquímica", que pode ser correlacionada com o composto estudado.

Os sinais analíticos gerados, neste caso os valores de corrente referente a cada potencial estudado, foram utilizados como dados de entrada para a ferramenta quimiométrica PCA e com isso foi possível obter a discriminação reportada pelo gráfico de escores na Figura 3.6. NA Figura 3.5 é possível ver uma clara discriminação entre os quatro compostos na concentração de 200 mmol L^{-1}, o que nos deu indícios de que o método proposto era promissor.

Haja vista que a quantidade de compostos emitida pelos micro-organismos é relativamente pequena, nossa ideia era pré-concentrar os compostos voláteis provenientes da colonização de micro-organismos patogênicos em alimentos em uma câmara fechada para posterior coleta e detecção com um sensor eletroquímico descartável.

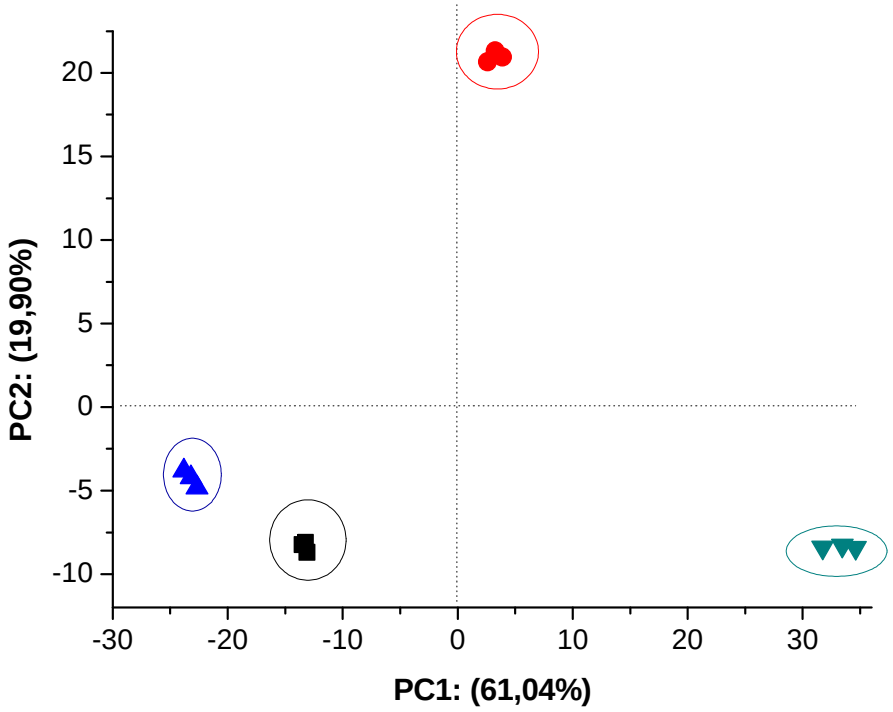


Figura 3.6: Gráfico de escores obtido a partir dos voltamogramas registrados com soluções de 200 mmol L^{-1} de etanol (triângulo para cima azul), metanol (círculo vermelho), isobutanol (triângulo ciano para baixo) e acetaldeído (quadrado preto) em solução 10 mmol L^{-1} de HNO_3 + 0,5 mol L^{-1} KNO_3 utilizando eletrodo de platina. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.

Esta primeira etapa foi concluída com sucesso, mas nosso objetivo era obter registros de concentrações ainda mais baixas e ainda testar outras substâncias neste sistema. Entretanto, novos testes foram realizados e não foi possível diminuir muito a concentração dos compostos analisados e ainda permitir a discriminação deles utilizando este sistema. Então a partir daí passamos a pensar em outras maneiras de fazer a detecção dos compostos voláteis.

Outra abordagem para a discriminação dos micro-organismos poderia ser a medição dos compostos voláteis diretamente sobre a superfície do sensor, na forma gasosa, a partir de medidas de resistência. Isto seria importante para que não houvesse diluição dos compostos em solução, o que resultaria em uma melhora no limite de detecção. A etapa de pré-concentração destes

compostos voláteis após a colonização de bactérias ainda seria importante e nesse momento não havia sido descartada.

Os primeiros ensaios que visavam obter sinais analíticos, medidas de resistência, diretamente com os compostos gasosos foram realizados utilizando um conjunto de dois eletrodos separados por 10 µm recoberto com filme de um polímero condutor. O filme foi produzido com anilina, como citado na seção 2.2. O filme foi colocado sobre um eletrodo rotatório disco-anel de platina, que foi colocado dentro de uma câmara fechada para a qual foram bombeados os compostos a serem estudados, um de cada vez. A inserção dos compostos voláteis na câmara foi realizada com uma bomba de aquário juntamente com um comutador, onde foi possível fazer a passagem de ar e do composto volátil, 30 segundos cada. Os primeiros dispositivos inteligentes utilizaram esse tipo de medida para extrair informação da solução e são utilizadas até hoje por grupos da Embrapa [124]e que desenvolvem narizes eletrônicos. O princípio fundamental desse dispositivo é a alteração da condutividade ou resistência medida devido à interação química existente entre o gás e o polímero condutor.

Assim, o perfil obtido para esse dispositivo fabricado pode ser visto na Figura 3.76, onde fica claro que durante a passagem do composto estudado, neste caso etanol, o sinal de resistência aumentou, enquanto que durante a passagem de ar, o valor de resistência diminuía retornando para o valor inicial.

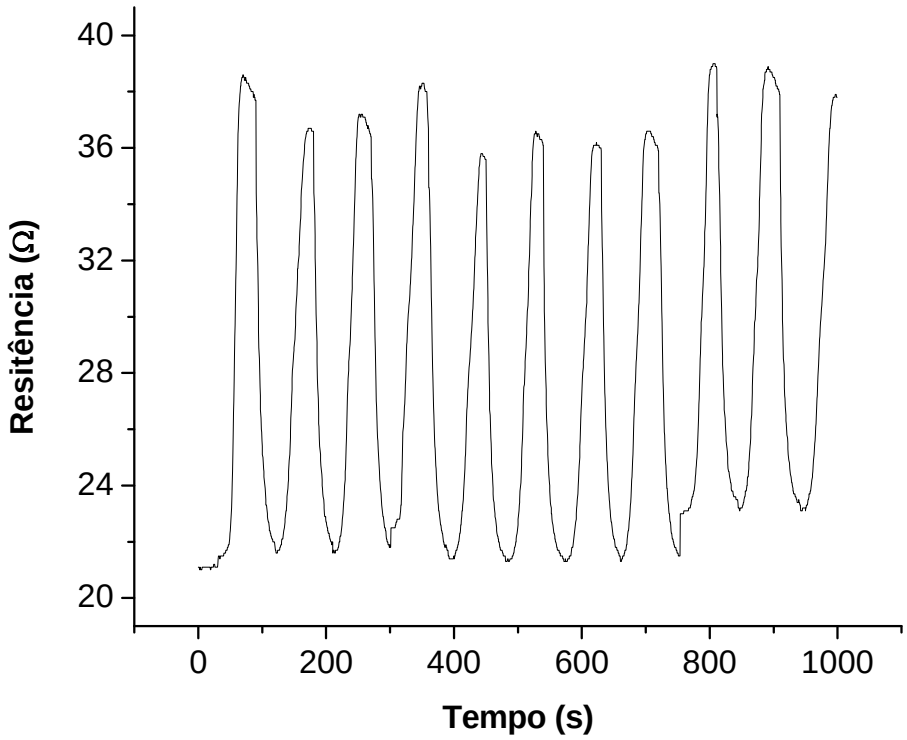


Figura 3.7: Medidas de resistência obtidas com a utilização de um filme de polianilina sobre um eletrodo disco-anel de platina em uma câmara na presença e ausência de etanol.

Como os resultados apresentados por este sistema se mostravam promissores, a próxima etapa do trabalho seria discriminar esses compostos, bem como outros voláteis utilizando uma célula em fluxo com sensores para gases fabricada no laboratório utilizando eletrodos interdigitados modificados com polímeros condutores capazes de detectar e discriminar os compostos com a ajuda de ferramentas quimiométrica. Porém não foi possível obter resultados satisfatórios ao avaliarmos diferentes concentrações ou até mesmo compostos distintos. Neste momento, decidimos repensar a forma de interação com os compostos e na possibilidade de obter sinais analíticos de uma outra maneira. Como dispositivos colorimétricos estavam sendo utilizados no laboratório [18], resolvemos testar alguns compostos utilizando um sistema colorimétrico tendo o papel como substrato. A parte interessante desse ponto é que esse substrato poderia pré-concentrar o analito da fase vapor resolvendo uma limitação dos dispositivos voltamétricos utilizados anteriormente.

Testes com dispositivos colorimétricos

O papel é um material de baixo custo, fácil de encontrar e trabalhar, sendo essas as razões para uma primeira abordagem visando ao desenvolvimento do dispositivo colorimétrico para detecção dos VOCs, além da possibilidade de pré-concentração destacada anteriormente.

Primeiramente foram realizados testes com soluções dos analitos anteriormente mencionados, e novas aminas responsáveis pela discriminação de micro-organismos, solubilizados em dimetil sulfóxido nas concentrações, em mmol L^{-1}: 5,03 (isobutilamina), 3,59 (trietilamina), 8,56 (etanol), 12,36 (metanol), 8,74 (ácido acético), 4,30 (isopentilamina), 6,54 (2-propanol), 6,81 (acetona) e 5,02 (formaldeído). Cada sensor continha 9 spots (referente a cada analito citado) onde os corantes, em solução,(vermelho de metila, alizarina, azul de bromofenol, azul de timol, vermelho de clorofenol) eram impregnados; eles eram escaneados e, após isso, as soluções dos analitos eram adicionadas a estes spots; uma nova imagem era registrada após esta etapa. As informações obtidas foram os valores de RGB de cada spot utilizado. Assim como descrito na seção 2.4.4., um mapa de diferenciação foi calculado usando os valores da diferença de RGB da imagem antes e após a adição dos analitos. Os valores da diferença de R, G e B em cada spot foram utilizados como dados de entrada para as ferramentas quimiométricas.

Com o tratamento estatístico dos dados foi possível observar uma boa discriminação entre os grupos funcionais dos analitos estudados (Figura 3.8) sendo possível verificar uma boa separação das aminas dos demais compostos analisados. A discriminação de compostos voláteis de diferentes grupos funcionais é importante, uma vez que estes podem ser produtos de degradação lançados por micro-organismos patogênicos ao colonizar alimentos, como dito anteriormente. Estes micro-organismos podem ser causadores de doenças de origem alimentar, sendo que algumas delas podem acarretar graves consequências.

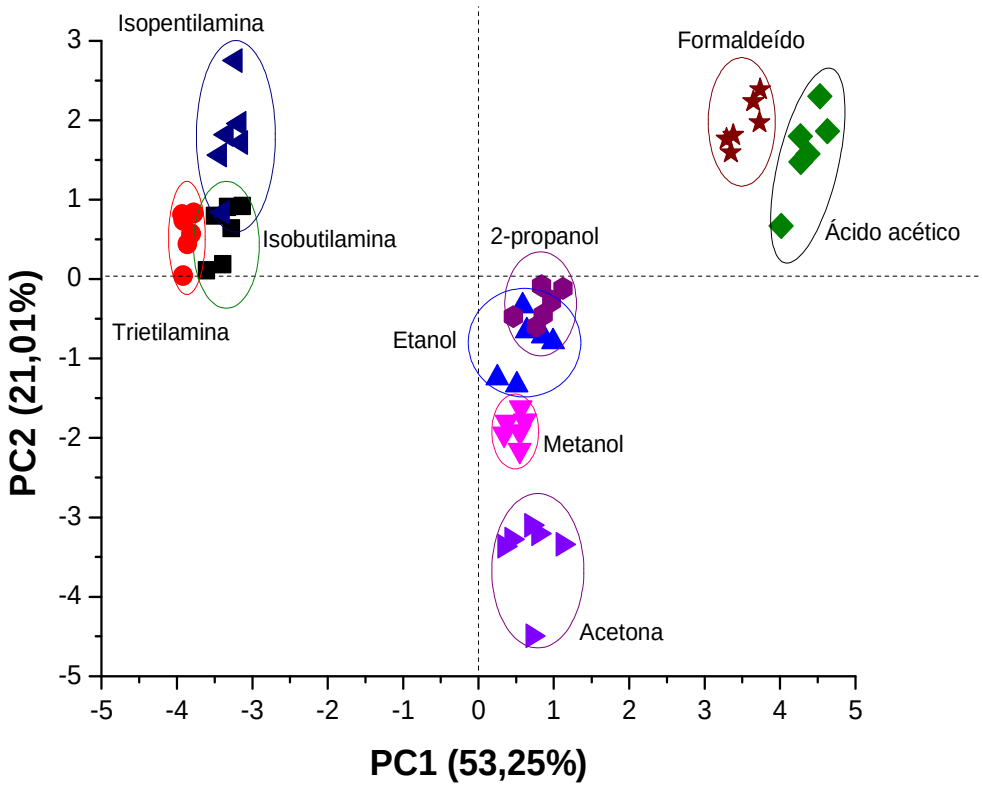


Figura 3.8: Gráfico de escores (PCA) obtido a partir dos valores de RGB extraídos do dispositivo em papel de filtro modificado com 5 indicadores de pH (vermelho de metila, alizarina, azul de bromofenol, azul de timol, vermelho de clorofenol).

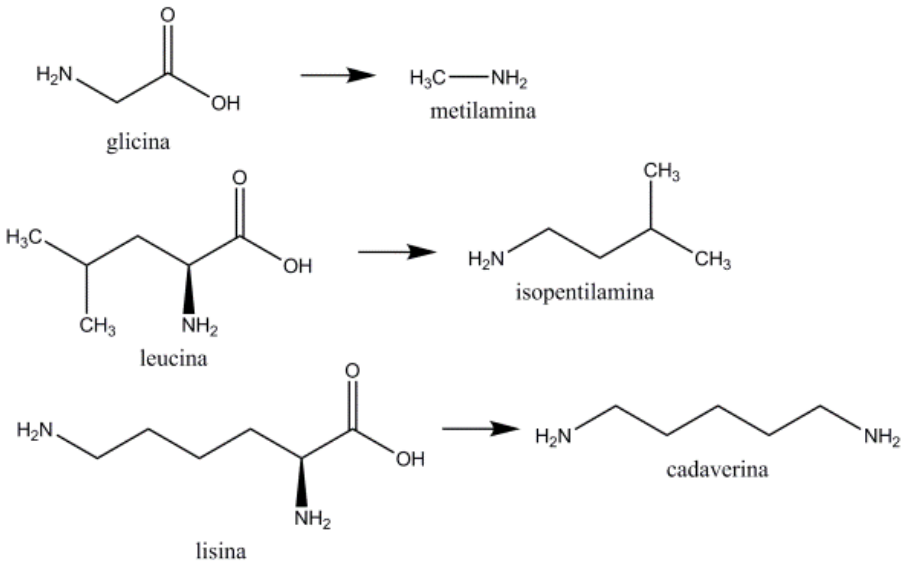
Ao analisarmos a Figura 3.8, pode-se perceber que mesmo que haja uma separação entre os grupos funcionais dos analitos, a separação entre elementos da mesma classe funcional não é muito clara. No grupo dos álcoois podemos ver o grupo das amostras de etanol e 2-propanol se misturam enquanto isobutilamina e isopentilamina seguem o mesmo comportamento do grupo das aminas. Na tentativa de se obter uma separação não só entre grupos funcionais mas entre todas as substâncias analisadas, novos testes foram realizados, mantendo as condições iniciais.

Os resultados destes experimentos (não mostrados) reafirmam o problema de discriminação entre os álcoois, enquanto as aminas conseguem ser discriminadas entre si. Os álcoois são os

analitos que apresentam as menores diferenças entre os valores de RGB em contato com os corantes, o que mostra que a interação não é muito significativa. Tais resultados se devem à diferença de pH entre os analitos, as aminas apresentam maior basicidade que os álcoois estudados e por essa razão a interação com estes corantes é facilitada.

Tendo em vista a basicidade dessas aminas e sua grande participação em processos de deterioração, elas foram utilizadas como moléculas modelo para o desenvolvimento do método proposto. As aminas utilizadas foram as mesmas (trietilamina, isobutilamina e isopentilamina) e elas foram escolhidas pois participam do processo de deterioração de muitos alimentos, como produtos de degradação de proteínas, que produzem aminas na descarboxilação dos aminoácidos. Como exemplos, podemos apontar as reações do Esquema 3.5 [125]:

Esquema 3.5: Descarboxição de alguns aminoácidos para produzir aminas.



Isopentilamina e isobutilamina, por exemplo, são encontradas em micro-organismos da família das enterobactérias [126][94], a maior causadora de sintomas de doenças de origem alimentar entre as bactérias, além de causar 95% das infecções e 35% das septicemias, infecções gastrointestinais e até meningite. Entre os micro-organismos em que podemos encontrar estas aminas está o gênero *Klebsiella*, responsável por causar pneumonia e está envolvida em casos de contaminação por alimentos [127]. Adicionalmente, isopentilamina é um produto da

descarboxilação da leucina [128], isobutilamina é produzida a partir da degradação de L-valina em bactérias *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas cocovenans* [129]. Trietilamina está presente em diversos tipos de alimentos, é um poluente ambiental e pode causar intoxicação em pessoas que ingerem alimentos com esta amina [130].

O procedimento realizado para a detecção das aminas na forma de vapor foi como reportado na seção 2.4. A amina foi colocada na forma líquida concentrada (10 µl) dentro de câmara e seu vapor pôde interagir com o papel já impregnado com a solução do corante (também com 10 µl). Da mesma maneira, foram extraídos valores de RGB do papel das imagens registradas com uma scanner de mesa antes e depois do contato com as aminas. O resultado do tratamento estatístico tendo os valores de RGB dos cinco corantes utilizados pode ser visto na Figura 3.9.

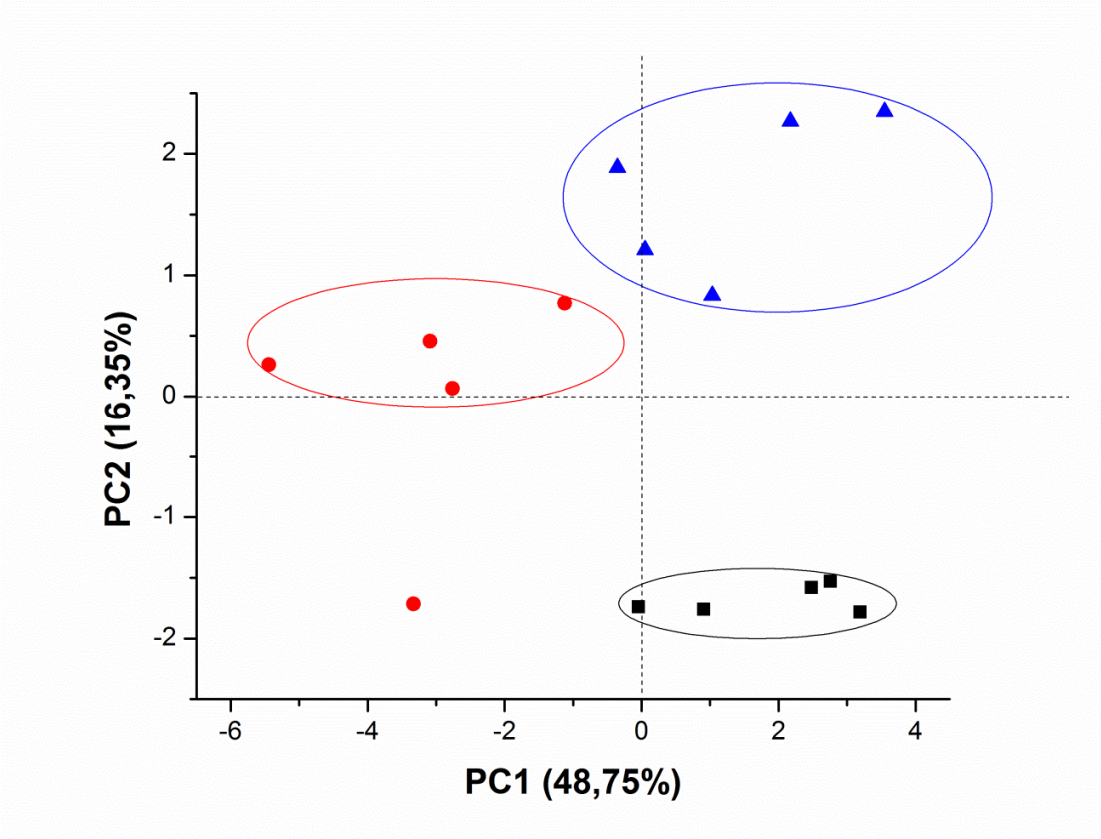


Figura 3.9: Gráfico de escores (PCA) obtido a partir dos valores de RGB extraídos dos papeis de filtro coloridos com 5 indicadores de pH (vermelho de metila, alizarina, azul de bromofenol, azul de timol, vermelho de clorofenol) em contato com as aminas em concentração de 5 ppm (■ – isobutilamina; ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina).

CAP. 3 – CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA

Neste ponto do trabalho, nós já tínhamos em mente como poderia se dar a discriminação dos compostos voláteis em matrizes alimentícias. Nossa ideia era desenvolver uma embalagem que, além de recobrir o alimento, pudesse detectar uma adulteração (natural ou induzida) dele através dos compostos voláteis que os micro-organismos presentes emitissem na fase de decomposição. Sendo assim, o papel poderia não ser a melhor opção para este protótipo. E então mesmo tendo apresentado uma boa discriminação entre as aminas, como pode ser visto na Figura 3.9, começamos a pensar em outra matriz para a aplicação em amostras alimentícias e que pudesse apresentar uma maior pré-concentração dos analitos estudados.

Na busca por novas formas de discriminação dos micro-organismos patogênicos, um estágio de seis meses na Universidade de Surrey, Inglaterra, sob a supervisão do Dr. Subrayal M. Reddy (com bolsa do programa Ciências sem Fronteiras, CsF) foi realizado. Entre as abordagens que pude conhecer, a utilização de membranas poliméricas à base de acetato de celulose se mostrou vantajosa para o emprego em nossos testes colorimétricos. O polímero é de fácil fabricação (sintetização), o material apresenta baixa toxicidade (o que o faz compatível com amostras de alimentos), é de baixo custo e de fonte natural.

Discriminação de aminas com membranas modificadas com indicadores de pH

Na tentativa de discriminação das aminas, novos experimentos começaram a ser realizados com as membranas de acetato de celulose empregando Tween® 20 como plastificante e os corantes vermelho de metila, alizarina, azul de bromofenol, azul de timol, vermelho de clorofenol para discriminar três aminas alifáticas: trietilamina, isobutilamina e isopentilamina, como descrito na seção 2.4.

O acetato de celulose é um polímero natural modificado e um bioplástico com uma gama de propriedades entre eles a biodegrabilidade. Bioplástico é um termo usado para materiais de embalagem provenientes de recursos renováveis, e que são considerados seguros para serem utilizados em aplicações alimentares. Devido ao crescente problema de eliminação de resíduos, e ao petróleo ser um recurso não renovável com quantidades finitas, o interesse por embalagens renováveis tem aumentado. Adicionalmente, esses materiais podem ser personalizados e

modificados em suas propriedades a fim de adquirir o produto desejado para a finalidade esperada. A mudança nessas propriedades pode ser obtida com a utilização de plastificantes, que são agentes modificantes que podem resultar em maior rigidez, estabilidade, alto brilho, entre outras. O polímero também apresenta baixo custo de fabricação e pode, muitas vezes, ser reciclados, reduzindo os impactos de seu uso [131], [132].

Quinze corantes de diferentes tipos foram testados, mas após diversos experimentos , cinco corantes foram utilizados. Todos são indicadores de pH, que são ácidos ou bases de Brønsted e Lowry que, por este motivo, apresentam cores diferentes nas suas formas protonada *(HInd)* e desprotonada *(Ind^-)*, ou seja, mudam de cor com a mudança de pH. A mudança de cor, resultante da conversão entre a forma ácida e a forma básica, ocorre devido à alteração da estrutura molecular do indicador, que é provocada pela entrada ou saída do próton (H^+). Consequentemente, a modificação da estrutura do indicador leva a luz a ser absorvida em diferentes comprimentos de onda, o que origina cores distintas para cada uma das formas. O equilíbrio entre a forma ácida (*HInd*) e a sua base conjugada (Ind^-) é determinado pelo pK_a e o equilíbrio entre a forma protonada e desprotonada é representado pela equação (10):

$$HInd \leftrightarrows H^+ + Ind^- \qquad (10)$$

onde, *HInd* e Ind^- representam as formas ácida e a base conjugada do indicador. Com base na proporção entre as espécies a cor da solução mudará tornando-se uma ferramenta útil para estimar o pH do meio e possibilitando a discriminação das aminas.

Assim, para cada valor de pH há um valor para a razão Ind^-/ *HInd* que determina a cor da solução. Logo, a cor da solução dependerá da concentração relativa de Ind^- e *HInd*.

Baseado nisto, foi fabricado um dispositivo colorimétrico à base de polímero de acetato de celulose contendo um arranjo de cinco membranas individualmente modificadas com cinco indicadores de pH diferentes (alizarina, azul de bromofenol, vermelho de clorofenol, vermelho de metila e azul de timol), conforme ilustrado na Figura 3.10. Após a fabricação, o dispositivo contendo 5 membranas com cada um dos indicadores reportados anteriormente, foi exposto a uma única amina, a fim de avaliar as alterações no padrão de cor de cada membrana modificado com os indicadores (Figuras 3.10 A, B, C).

As imagens foram registradas dentro de uma câmara fechada preta feita de polimetilmetacrilato usada para controlar a luminosidade do sistema durante a aquisição de

imagens e para fixar a distância focal, como descrito na parte experimental. A câmera utilizada nessa etapa foi a do smartphone iPhone 4® (com sistema iOS), e um aplicativo desenvolvido exclusivamente para este fim promoveu a extração dos valores de RGB das imagens registradas antes e depois das membranas entrarem em contato com as aminas. O aplicativo extrai os valores de RGB de uma área determinada pelo usuário, em média (neste trabalho) de uma região contendo 260 x 260 pixels, no centro do spot, além do desvio padrão de cada um dos três componentes. Cada mapa de diferenciação é representado por 15 valores, uma vez que cada mapa contém 5 corantes e cada corante dá origem a três valores: R, G e B. Uma matriz é montada com os valores dos mapas de diferenciação, que servem de dados de entrada da ferramenta quimiométrica resultando nos gráficos de escores.

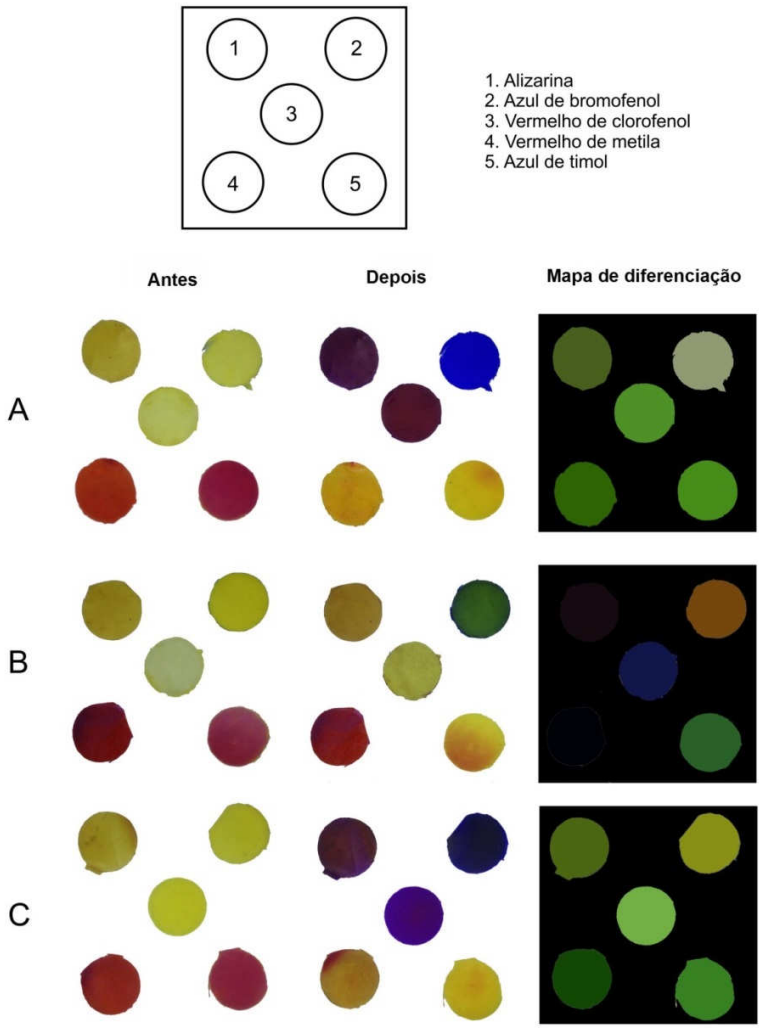


Figura 3.10: Representação esquemática de cada indicador de pH no dispositivo e os perfis de mudança de coloração do arranjo de sensores em função da amina exposta: (A) isobutilamina, (B) trietilamina e (C) isopentilamina, bem como os mapas de diferenciação obtidos pela subtração dos valores de RGB antes e depois exposição de 10 minutos do dispositivo na presença da amina. Concentração de amina = 5 ppm.

Na Figura 3.10, a distinção entre os perfis de cada substância em relação ao arranjo pode ser observada pelas mudanças nos mapas de diferenciação. Embora existam semelhanças entre as espécies quimicamente parecidas, duas aminas primárias (por exemplo isopentilamina e isobutilamina) podem ser discriminadas. A explicação para esta discriminação baseia-se no fato de

que as aminas são fracas doadores de prótons e, consequentemente, as mudanças de cor na presença dos indicadores de pH é, por vezes, mais sútil, não atingindo a coloração mais extrema para as formas ácidas e básicas e, por conseguinte, exibindo uma mistura de cores entre essas formas. Além disso, as mudanças de cor seriam possíveis pois as aminas apresentam polaridades distintas, uma vez que, foram usadas aminas primárias e terciárias e este fato também ajudaria a justificar a solubilização maior ou menor no interior da membrana. De acordo com a literatura [133], a permeabilidade da membrana pode ser aumentada com adição de agente tensoativo como Tween® 20, e esta incorporação pode alterar as propriedades físico-químicas da membrana em solubilizar as aminas. Com isso, pode-se dizer que dois fatores seriam importantes para a mudança de cor na membrana, a solubilização da amina na membrana e o equilíbrio ácido-base do indicador.

A partir dos mapas de diferença obtidos na Figura 3.10, a discriminação entre os mapas de diferenciação das Figuras 3.10A e 3.10C não é facilmente alcançado a olho nu e pode ser um problema para os usuários com dificuldade visual em diferenciar cores. As mudanças nos valores RGB dos pontos 1, 3, 4 e 5 são sutis em alguns casos. No entanto, é possível contornar esta limitação extraindo os valores RGB, antes e depois, e calcular os mapas de diferenciação. A Figura 3.11 mostram gráficos de escores e pesos (PCA) obtidos a partir dos valores RGB dos mapas de diferenciação para cinco replicatas, além do gráfico de HCA.

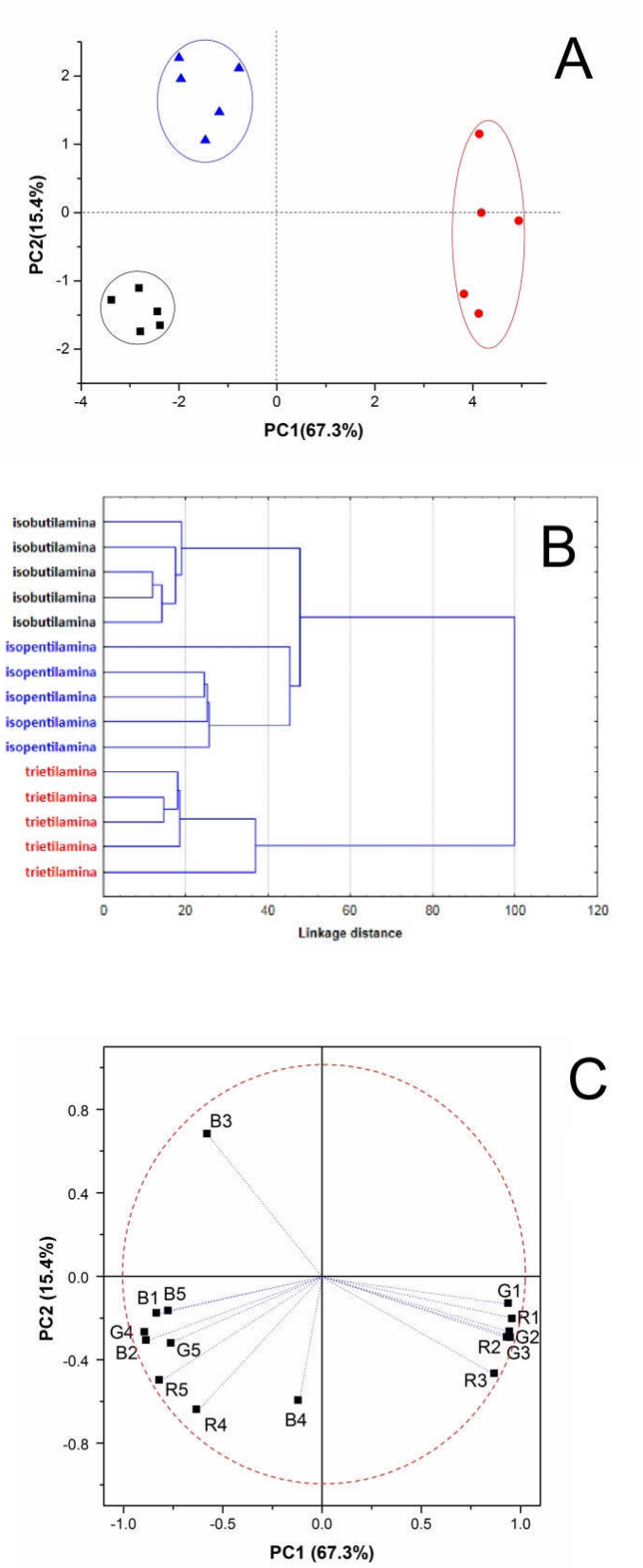


Figura 3.11: (A) Gráfico de escores obtido a partir dos valores de RGB extraídos das membranas coloridas com 5 indicadores de pH em contato com 3 diferentes aminas (■ – isobutilamina; ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina) na concentração de 5 ppm.

(B) Gráfico de HCA.

(C) Gráfico de loadings.

Ao analisar os dados apresentados na Figura 3.10A, pode ser feita uma distinção clara entre as três aminas estudadas usando apenas as duas primeiras componentes principais, com 82,7% do total da informação coletada pelos valores RGB extraídos. Portanto, essa abordagem contorna qualquer necessidade de intervenção ou de interpretação humana de discriminar entre as cores dos mapas de diferenciação. Essa discriminação pode ser confirmada pelo dendrograma, Figura 3.11B, onde três grupos de compostos diferentes são vistos sem qualquer erro de discriminação. O gráfico de pesos (Figura 3.11C) foi feito para entender quais variáveis foram responsáveis pela discriminação relatada na Figura 3.11A. Este gráfico mostra que o componente azul da membrana modificada com o corante vermelho de clorofenol é a variável mais importante para manter as amostras isopentilamina no primeiro quadrante. Os corantes alizarina e azul de bromofenol (componentes vermelho e verde) prevalecem na discriminação de trietilamina. No processo de discriminação da isobutilamina, as variáveis responsáveis pela discriminação são os valores de R, G e B da membrana modificada com vermelho de metila e azul de timol. Esta primeira etapa das discriminações foi realizada utilizando uma concentração de aminas igual a 5 ppm. A quantidade de amina detectada já é baixa quando comparada com aquelas encontradas na literatura [134], [135], que podem exceder 250 ppm. No entanto, novos experimentos foram realizados a fim de avaliar a concentração mínima que o método proposto poderia ser útil para discriminação as três aminas estudadas. O arranjo de sensores, que compreende as cinco membranas com diferentes corantes, foi testado em momentos diferentes, seguindo o mesmo procedimento. Depois de atingir uma boa discriminação de aminas para uma concentração de 5 ppm, decidimos reduzir essa concentração para 2,5 e 1 ppm (Figuras 3.12 e 3.13).

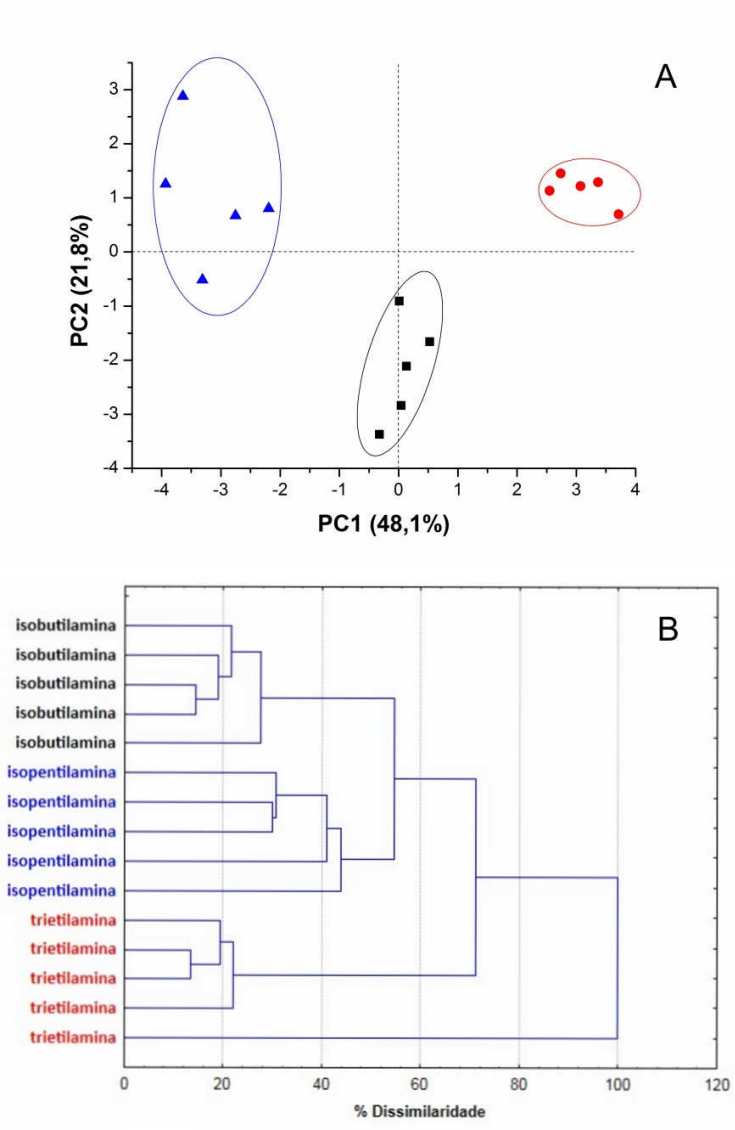


Figura 3.12: Gráfico de escores obtido a partir dos valores de RGB extraídos das membranas coloridas com 5 indicadores de pH em contato com 3 diferentes aminas: (■) isobutilamina; (●) trietilamina e (▲) isopentilamina) na concentração de 2,5 ppm. (B) Gráfico de HCA.

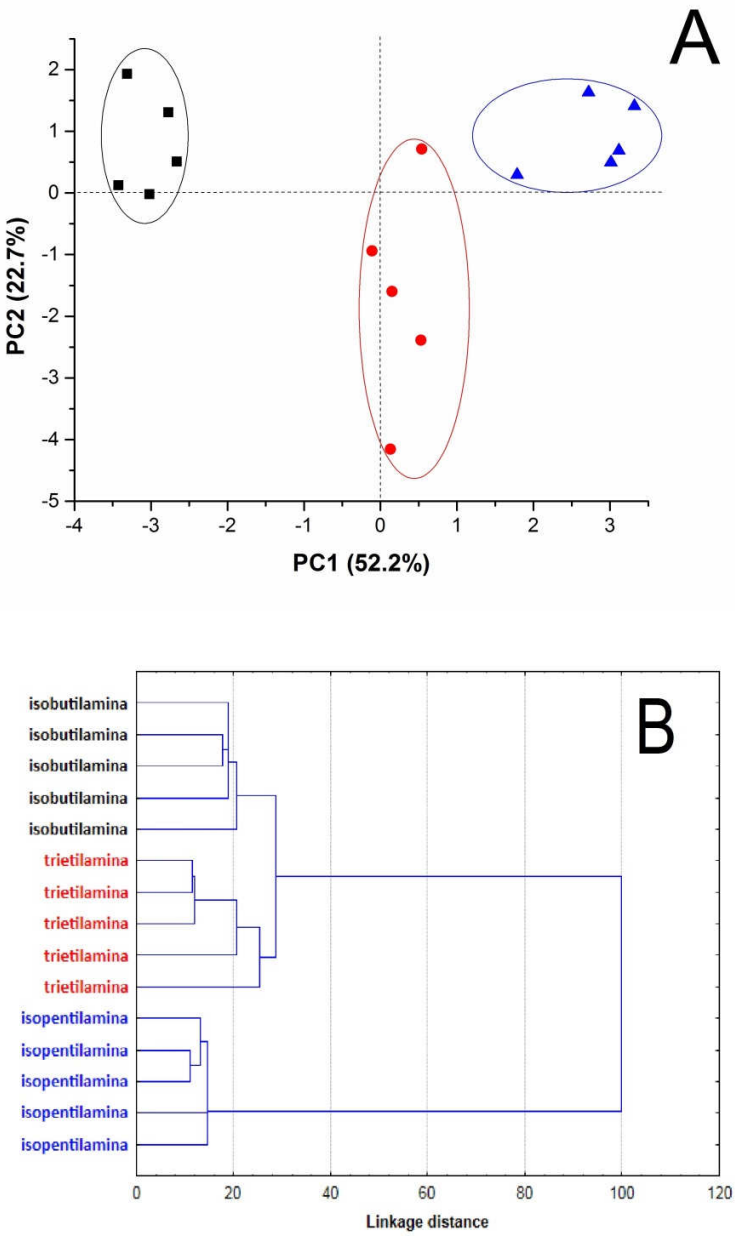


Figura 3.13: Gráfico de escores obtido a partir dos valores de RGB extraídos das membranas coloridas com 5 indicadores de pH em contato com 3 diferentes aminas (■ – isobutilamina; ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina) na concentração de 1 ppm. (B) Gráfico de HCA.

Nas Figuras 3.12A e 3.13A, podemos observar boas discriminações entre as aminas, o que pode ser confirmado, não só pela PCA, possuindo cerca de 70% da informação original, nos

primeiros dois componentes, mas também pelos dados de HCA (Figuras. 3.12B e 3.13B), já que não há erros de discriminação. O HCA na Figura 3.13B mostra que concentrações mais baixas, neste caso 2,5 e 1 ppm, proporcionam melhores relações são entre as amostras do mesmo grupo, uma vez que os conjuntos de amostras são muito mais claramente definidos e sem acarretar em qualquer erro de discriminação das amostras analisadas. Em todos os casos, as membranas responderam aos vapores em menos de cinco minutos com alguns dos corantes. O tempo ótimo de exposição foi encontrado como sendo de 10 minutos, a fim de ter um padrão detectável e também para assegurar que a membrana tenha tempo suficiente para interagir com o volátil exposto. Para tempos de exposição superiores a 10 minutos, não há mais alterações perceptíveis na PCA. É interessante destacar que a discriminação de três aminas na concentração inferior a 5 ppm só foram alcançadas usando todos os cinco corantes. Para a concentração mais elevada do que 5 ppm, foi possível discriminar as aminas utilizando um sistema contendo quatro corantes (alizarina, azul de clorofenol, vermelho de metila e azul de timol) (dados não mostrados). No entanto, a maior distância entre os agrupamentos de aminas no gráfico de escores foram sempre melhor observados utilizando-se os cinco corantes.

As membranas foram testadas também na ausência do plastificante (resultados não mostrados). Na ausência do agente plastificante, nem todas as membranas mostraram uma mudança de cor, uma vez que, o polímero formou uma película densa, com mobilidade reduzida, resultando em uma baixa permeabilidade para os compostos voláteis e água. No entanto, o objetivo principal é o de criar uma membrana permeável capaz de absorver as espécies tais como as aminas, que têm a capacidade de mudar individualmente a cor do corante presente no arranjo, criando, assim, uma “impressão digital química” para cada espécie testada, permitindo assim, a discriminação em amostras de alimentos. Assim, membranas feitas de acetato de celulose e utilizando o agente tensoativo Tween® 20 são mais flexíveis e estáveis com porosidade homogênea que permite a entrada, solubilização e reação dos compostos voláteis.

No caso de amostras de alimentos, o sistema pode ser útil para controlar, da mesma forma, micro-organismos patogênicos ou não patogénicos, uma vez que, eles liberam produtos voláteis durante a colonização em alimentos. Estes compostos podem formar padrões para cada grupo de micro-organismos e, assim, podem ser considerados como formadores das “impressões digitais químicas” desses micro-organismos. O sistema proposto pode ser aplicado em amostras reais, tais como peixe e carne, já que, a comparação com o que é reportado na literatura mostra que os nossos

limites de discriminação são mais baixos (1-5 ppm), do que para aminas biogênicas produzidos tais como a histamina, putrescina, cadaverina, entre outros, para os quais os valores podem chegar a 600 ppm [136]. Ele também pode ser utilizado em alimentos onde seja interessante a presença de organismos probióticos, que podem trazer benefícios aos consumidores como alguns tipos de queijos, iogurtes e molhos, uma vez que ele pode confirmar a presença dos "organismos do bem" ou não. Ambas as abordagens são interessantes para consumidores, que podem se certificar do estado de seus alimentos; bem como para fabricantes e comerciantes, que podem atestar a qualidade e procedência de seu produto.

Desejando mostrar que o método é semi-quantitativo, curvas de calibração foram construídas usando a distância euclidiana, como proposto na literatura [18], [137]. A Figura 3.14 mostra a curva de calibração obtida para cada amina, indicando que algumas informações quantitativas podem ser extraídas usando o dispositivo proposto em uma pequena faixa linear (de 2 a 10 ppm para trietilamina, de 2 a 8 ppm para isobutilamina e de 1 a 4 para isopentilamina).

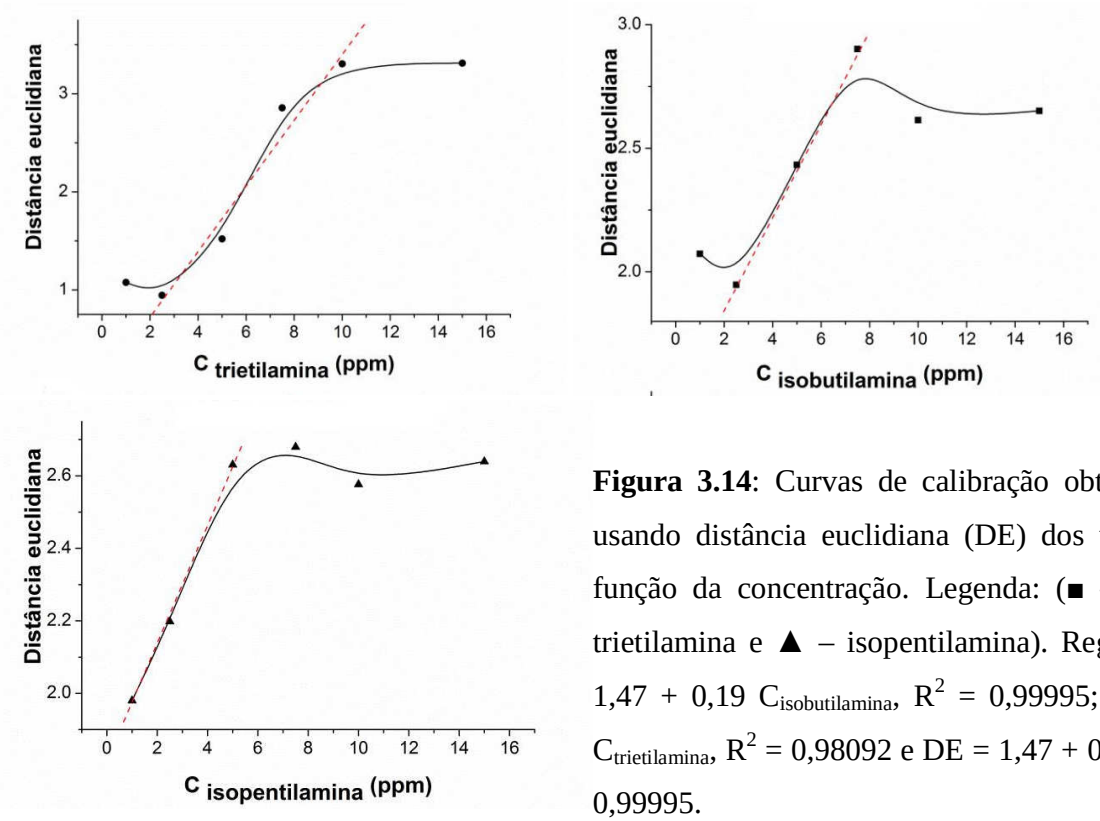


Figura 3.14: Curvas de calibração obtidas para as aminas usando distância euclidiana (DE) dos valores de RGB em função da concentração. Legenda: (■ – isobutilamina ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina). Regressão linear: DE = 1,47 + 0,19 $C_{isobutilamina}$, R^2 = 0,99995; DE = 0,051 + 0,34 $C_{trietilamina}$, R^2 = 0,98092 e DE = 1,47 + 0,19 $C_{isopentilamina}$, R^2 = 0,99995.

Regeneração e reutilização das membranas

Experimentos foram realizados para mostrar a capacidade das membranas de serem regeneradas após o tempo de exposição às aminas. Depois da exposição das membranas por 10 minutos a uma concentração de amina de 5 ppm, as membranas foram deixadas na capela por algumas horas para garantir a completa remoção dos voláteis do interior das matrizes poliméricas. Aproximadamente seis horas após a exposição, as membranas de alizarina e vermelho de clorofenol retornaram completamente as suas cores originais (a olho nu). A membrana modificada com vermelho de metila exigiu mais tempo para retornar à cor original (cerca de 20 horas). Foram determinados os valores de R, G e B do spot de alizarina com o tempo. Além dos testes de reutilização, o processo de regeneração foi monitorado através de fotos registradas em diferentes tempos (Figura 3.15A). A partir da Figura 3.15 é possível verificar que todos os valores de R, G e B retornaram aos valores originais após 365 minutos (6 horas). As membranas de azul de bromofenol e azul de timol não retornam ao estado original e precisam ser substituídas por novas para a replicata dos experimentos. Também foi avaliado o número de ciclos de regeneração que uma única membrana poderia alcançar sem afetar os valores de RGB antes da exposição das membranas aos analitos. Obteve-se um valor de 14 ciclos de uso sem mudanças significativas destes valores considerando um limite de confiança de 95% segundo o teste *t-Student*. A irreversibilidade de algumas destas membranas pode ter algumas aplicações interessantes e não inviabiliza a aplicação do dispositivo. Por exemplo, o uso em embalagens descartáveis de alimentos seria à prova de adulteração, uma vez que a embalagem mudaria de cor uma única vez, mostrando que o alimento está adulterado, não permitindo que as datas de validade fossem alteradas seja por vendedores ou produtores. Além do que, a ideia do dispositivo é ser utilizado de forma descartável.

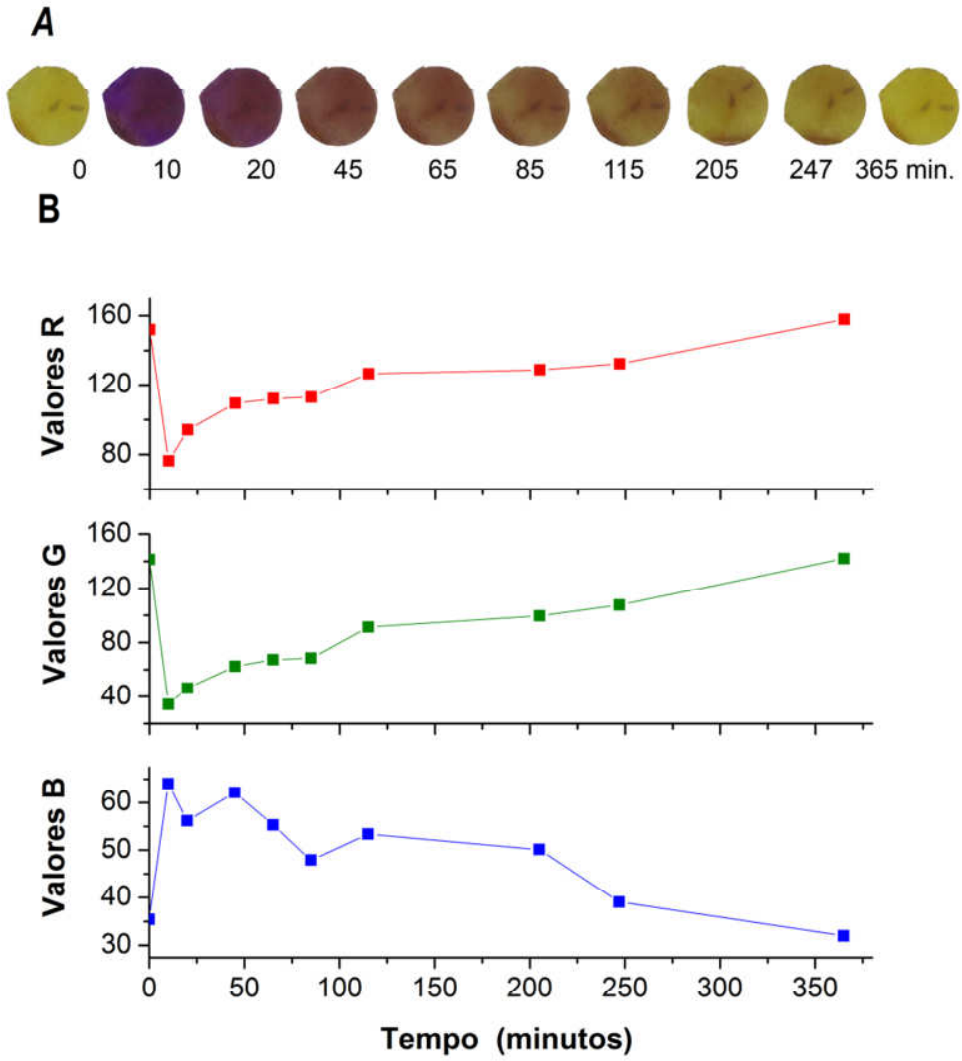


Figura 3.15: Monitoramento dos parâmetros R, G e B de membranas: imagens obtidas para cada tempo de experimento (A) e valores de R, G e B para o spot colorido com vermelho de clorofenol.

Discriminação de aminas em amostras de carne

Métodos atuais de análise para determinar o período de maturação de carnes incluem a utilização de técnicas microbiológicas, painéis sensoriais, microscopia, a detecção de concentrações dos metabolitos (isto é, o ATP, glucose e compostos derivados ou aminas biogênicas), espectrometria de mobilidade de íons (IMS), NIR e espectroscopia de fluorescência. Apesar da precisão e exatidão de alguns destes métodos, eles são geralmente destrutivos,

demorados, caros e empregam instrumentação e pessoal qualificado ou não pode ser utilizado para determinações *in situ*. Estes procedimentos são geralmente adequados para agências de segurança alimentar, mas não para uso em supermercados, nas casas dos consumidores ou em cada pedaço de carne. Apesar de um prazo de validade ser incorporado no pacote, esta é uma abordagem genérica que não informa sobre o estado particular de cada pacote, e não é suficiente para provar que a carne foi manipulada de forma incorreta e portanto está contaminada e imprópria para o consumo [138]. Tendo isto em mente, o desenvolvimento de sistemas descartáveis capazes de serem incorporados às embalagens pode oferecer aos consumidores uma maneira fácil de interpretar informação relativa ao frescor dos alimentos.

A carne é um dos alimentos mais perecíveis, e sua composição é ideal para o crescimento de uma gama de bactérias de deterioração. A preocupação pública tem aumentado em vários países devido à vários escândalos alimentares tais como aqueles a respeito das epidemias de febre aftosa e encefalopatia espongiforme bovina. As doenças de origem alimentar são ainda uma grande preocupação. Nós podemos atender a esses desafios com uma melhora do sistema global de controle e segurança alimentar e, por isso, um método analítico rápido e preciso de detecção para a deterioração microbiana seria muito útil. Além disso, esse método idealmente deve também ser não destrutivo e dar resultados em tempo real para aplicação em ambientes de processamento de alimentos altamente automatizados [139].

Assim, a fim de demonstrar a possibilidade de aplicação do método proposto em amostras reais, foram utilizadas amostras de carne bovina contaminadas com as aminas estudadas. Para isso, amostras de carne bovina moída foram contaminadas individualmente com as aminas trietilamina, isobutilamina e isopentilamina. Estas aminas simulam os compostos produzidos pelos micro-organismos patogênicos que podem contaminar amostras com alto teor proteico.

Na Figura 3.16, é possível observar a discriminação de amostras de carne contaminadas com cada uma das aminas individualmente. Claramente podem ser vistos 3 diferentes grupos, o que já havia sido observado ao se analisar as aminas individualmente na ausência da amostra real. Vale a pena ressaltar que o arranjo dos sensores não muda de cor na presença de amostras de carne não contaminadas, com isso, esses dados não foram reportados na Figura 3.16.

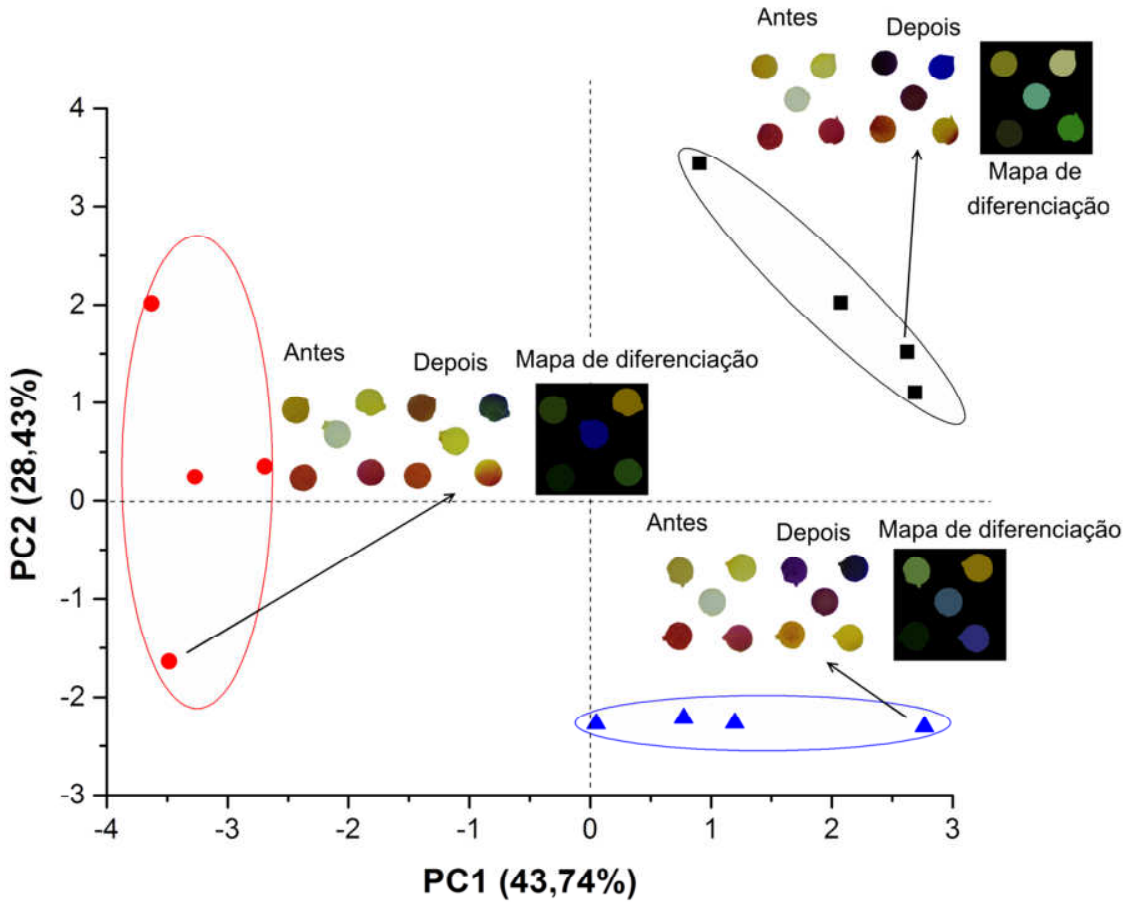


Figura 3.16: Gráfico de escores obtido a partir de valores RGB extraídos das membranas de acetato de celulose modificadas com 5 indicadores de pH em contato com a fase vapor coletada em uma câmara contendo carne moída contaminada com (■ – isobutilamina; ● – trietilamina e ▲ – isopentilamina). As imagens mostram as fotografias reais dos experimentos antes e após a contaminação da carne com cada amina e o respectivo mapa de diferenciação de cada experimento.

Detecção de aminas biogênicas

Aminas biogênicas também são de grande importância no estudo de deterioração de alimentos, uma vez que, estão naturalmente presentes em qualquer sistema onde haja a atuação de micro-organismos e aminoácidos naturais. Algumas delas apresentam funções neurotransmissoras e tendem a ser fisiologicamente importantes. A fim de demonstrar a possibilidade de aplicação do método a outras aminas, três aminas biogênicas (tiramina, putrescina e cadaverina) foram

avaliadas. Por apresentarem altos pontos de vaporização e estarem em forma sólida, uma etapa de solubilização em água foi necessária. Assim, as aminas foram utilizadas na forma líquida sobre as membranas, após registro de um "branco" (água desionizada). Foram usados 65 µg de tiramina, 3,6 mg de putrescina e 87 µg de cadaverina, quantidades mínimas detectáveis para cada amina biogênica neste sistema. Os resultados deste experimento podem ser vistos na Figura 3.17, onde cada amina está representada em um quadrante diferente no gráfico, indicando que o dispositivo proposto pode ser útil também na discriminação de aminas biogênicas.

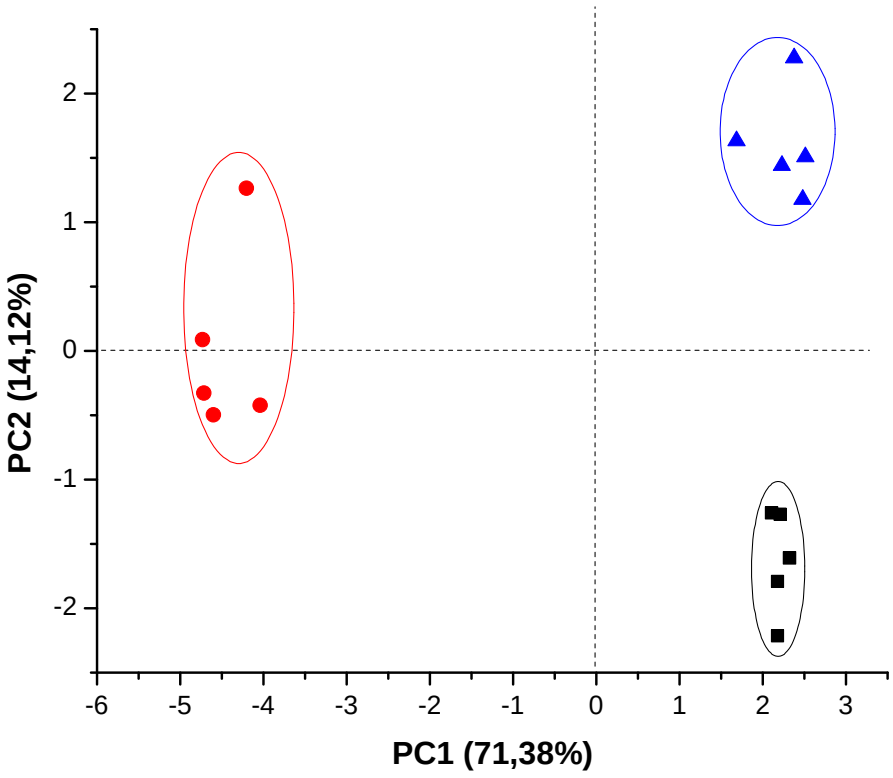


Figura 3.17: Gráfico de escores obtido a partir de valores RGB extraídos das membranas de acetato de celulose modificadas com 5 indicadores de pH em contato com três diferentes aminas biogênicas (■ – tiramina; ● – putrescina e ▲ – cadaverina).

Adicionalmente, como pode ser visto na Figura 3.18, o método também se mostrou capaz de discriminar todas as aminas estudadas até aqui em uma mesma representação gráfica. O gráfico de escores em três dimensões foi utilizado para uma melhor visualização do conjunto de dados.

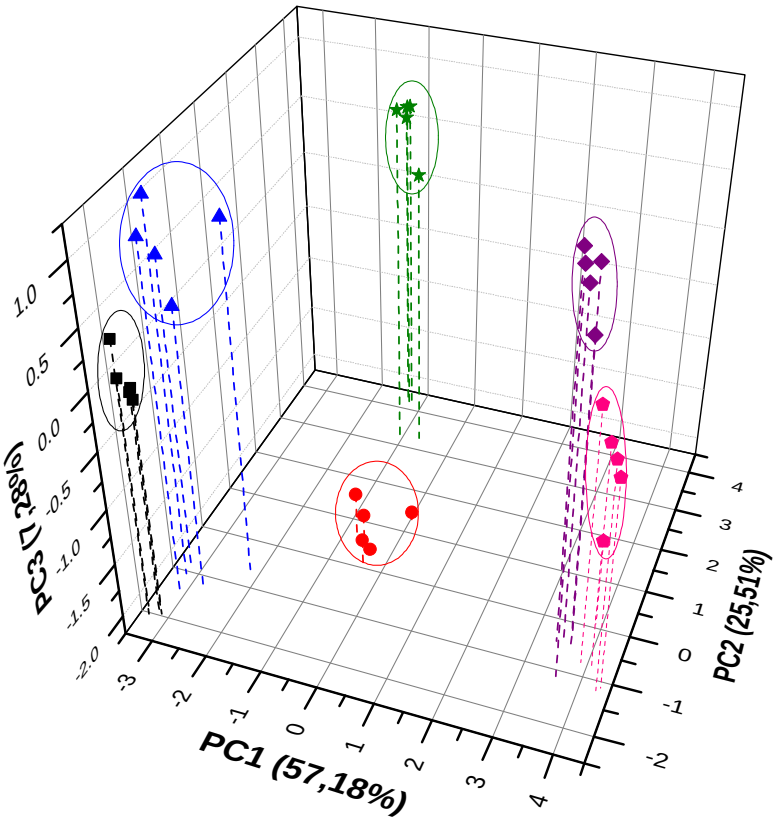


Figura 3.18: Gráfico de escores obtido a partir de valores RGB extraídos das membranas de acetato de celulose modificadas com 5 indicadores de pH em contato todas as aminas estudadas até aqui (♦ – tiramina; ★ – putrescina, ⬟ – cadaverina, ■ – isobutilamina; ● – trietilamina e ▲ – isopentylamina) na concentração de 5 ppm for the isobutilamina, trietilamina and isopentilamina e 65 μg tiramina, 3,6 mg de putrescina e 87 μg cadaverina.

Discriminação de bactérias patogênicas

Após termos obtidos resultados satisfatórios das membranas com os compostos voláteis, inclusive em amostras alimentícias contaminadas, nosso desejo era aplicar o método para a

discriminação de micro-organismos patogênicos, simulando um sistema real. Para isso, quatro espécies da família Enterobacteriaceae foram utilizadas: *Klebsiella pneumonia* (KP), *Proteus vulgaris* (PV), *Proteus mirabilis* (PM) e *Escherichia coli* (EC). *Proteus mirabilis* tem sido relatada em alguns casos de intoxicação alimentar com carne de porco. *Klebsiella pneumoniae* pode ser destrutivo para os pulmões humanos através de inflamação ou hemorragia mas também tem sido identificada com casos de intoxicação alimentar [127]. Escherichia coli é uma das bactérias mais conhecidas e naturalmente encontrada em vegetais e água e também pode induzir a deterioração de alguns alimentos, posteriormente, causando doenças; é organismos mais comum isolado em laboratório clínico, é um importante patógeno entérico, especialmente em países e desenvolvimento.

Gêneros como *Proteus, Klebsiella, Escherichia* e *Enterobacter* estão entre os organismos mais frequentemente envolvidos em infecções do trato urinário, incluindo prostatite e pielonefrite. *Proteus sp*, particularmente *P. mirabilis*, acredita-se ser a causa mais comum de cálculos renais relacionados com a infecção. *Klebsiella pneumoniae* provoca uma pneumonia grave. A epidemiologia de infecções por Proteus envolve muitos reservatórios e modos de transmissão, o organismo infectante pode ser endógena ou exógena, a transmissão pode ser direta ou indireta; veículos incluem comida de hospital e equipamentos, além de soluções intravenosas. Porque *Proteus sp.* podem causar muitos tipos de infecção, os sintomas clínicos raramente permitem um diagnóstico; cultura e identificação em laboratório são geralmente necessários. A prevenção de infecções por coliformes e *Proteus sp*., particularmente aqueles que são adquiridas em hospitais, é difícil. Tratamento de esgotos, purificação de água, higiene adequada, e outros métodos de controle de patógenos entéricos irá reduzir a incidência de enteropatógenos, no entanto, estas medidas de controle raramente estão disponíveis nas regiões menos desenvolvidas do mundo [140].

Na literatura, existem diferentes tipos de arranjos de sensores para gases, os chamados narizes optoeletrônicos ou narizes eletrônicos, que utilizam esta abordagem para traduzir uma “impressão digital química” em um sinal analítico útil para discriminar diferentes amostras. Atualmente, a maioria dos narizes eletrônicos que pode discriminar compostos gasosos não pode ser incorporado ou não são compatíveis com processos de empacotamento de alimentos [40], [141][21]. Como dito anteriormente, nossa proposta é desenvolver um dispositivo colorimétrico à base de acetato de celulose, que acoplado a uma embalagem, é capaz de responder aos compostos

voláteis produzidos por micro-organismos em seu processo de colonização daquele substrato. Com base em nosso conhecimento, este é a primeira vez que um procedimento simples *in situ* é utilizado para discriminar estes quatro microrganismos utilizando um dispositivo colorimétrico e um smartphone. Este tipo de detector está recebendo ampla atenção pela comunidade científica devido às suas características de praticidade, portabilidade e baixo custo. É bastante comum, pelo menos em nosso país, a posse e o uso frequente de um smartphone em todas as classes sociais.

O arranjo de sensores proposto foi confeccionado como relatado na seção 2.4 e as medidas foram realizadas como consta em 2.4.3. Antes do início dos experimentos com as bactérias, foi necessário criar uma colônia para cada espécie e, portanto, as quatro espécies foram subcultivadas durante 24 horas a 37ºC em nutriente ágar. Após essa etapa, suspensões de células das bactérias foram preparadas em solução bacteriológica salina (neste caso usou-se PBS) a fim de que suas densidades celulares fossem ajustadas para valores próximos e por isso foram mantidos entre 3 e 12,5 x 10^8 CFU utilizando espectrofotometria, e confirmado com a técnica de diluição em série Miles-Misra. Os valores de unidades de formação de colônias foram mantidos próximos para que tivéssemos um padrão de crescimento bacteriano similar entre uma espécie e outra e consequentemente pudéssemos alcançar uma quantidade de VOCs (compostos orgânicos voláteis – do inglês, *volatile organic compunds*) parecida para os quatro organismos estudados.

Para iniciar a simulação de um sistema real, alíquotas de cada uma das suspensões de células foram espalhadas sobre a superfície de placas de Petri de 4,5 cm de diâmetro que já continham o arranjo de sensores na tampa, e incubou-se 37ºC, que é a temperatura ideal para estudar o desenvolvimento de bactérias. Placas preparadas apenas com nutriente ágar, sem a presença de bactérias, foram incubadas de forma idêntica para serem utilizadas como controle (branco).

A metodologia para a aquisição de dados analíticos foi a mesma relatada para as membranas apenas com aminas e assim fotos das membranas foram registradas com um smartphone antes e depois do processo de incubação das bactérias. Os dados de RGB foram extraídos e mapas de diferenciação foram construídos para todas as replicatas de cada uma das quatro espécies analisadas. Mapas de diferenciação, com uma das replicatas para cada espécie pode ser visto na Figura 3.19. Os dados dos mapas também foram usados com dados de entrada para as ferramentas quimiométricas.

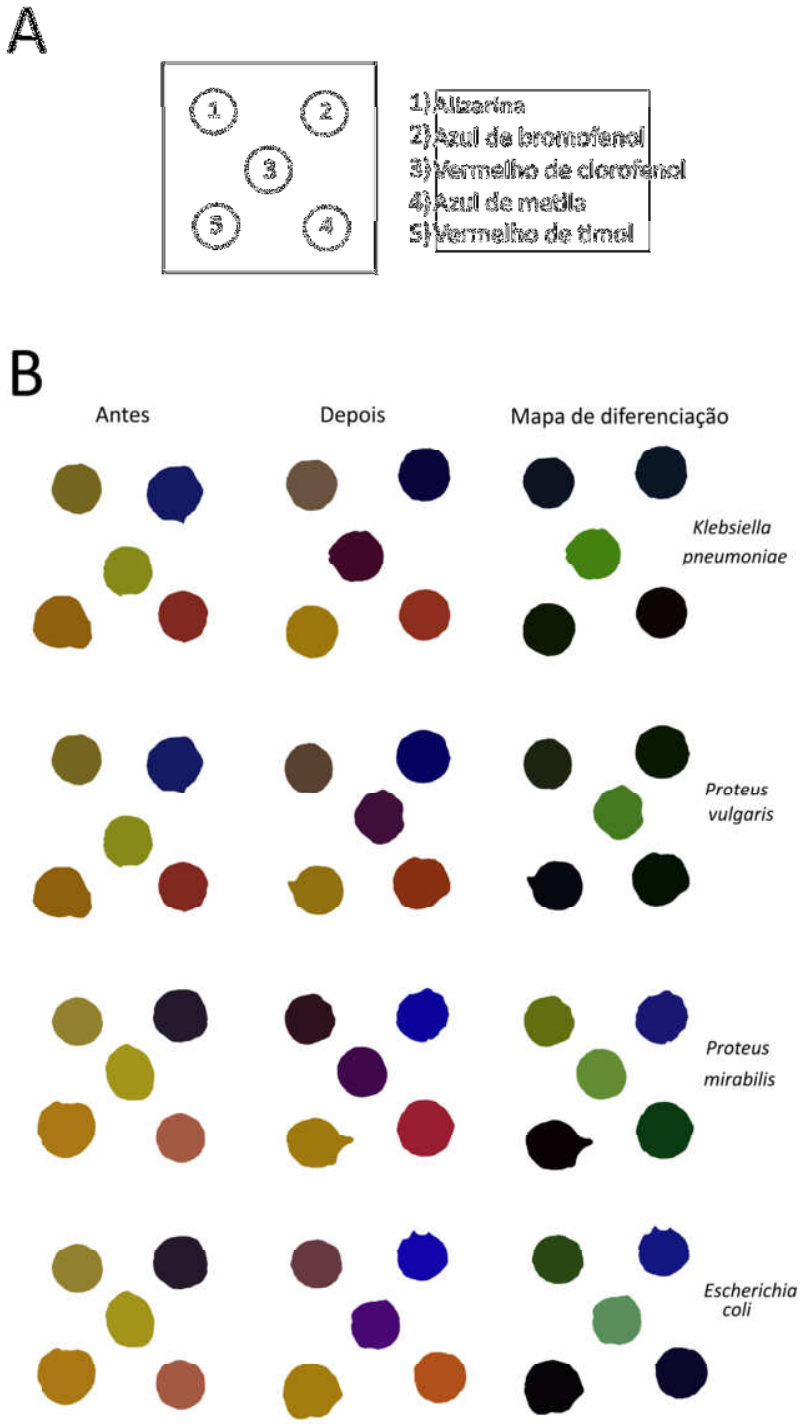


Figura 3.19: Representação esquemática de cada indicador de pH no dispositivo e os perfis de mudança de coloração do arranjo de sensores em função da espécie de bactéria, bem como os mapas de diferenciação obtidos pela subtração dos valores de RGB antes e depois do período de incubação (24h) a 37ºC.

Os diferentes padrões de cores obtidos na Figura 3.19 estão relacionados com os diferentes compostos orgânicos voláteis liberados por uma determinada bactéria durante suas etapas de crescimento e colonização, e diretamente relacionados com diferentes aminas liberados durante estas fases. Rosová e colaboradores [142] têm mostrado que os ácidos graxos voláteis emitidos por bactérias podem ser úteis para discriminar bactérias. Em seu trabalho, eles demonstraram que a PM emite ácido acético; EC produz ácidos acético e propiônico e KP libera ácido acético, propiônico e isovalérico. Aminas voláteis também podem ser detectadas, como mostramos anteriormente. Por conseguinte, uma mistura de produtos voláteis ou mesmo uma única molécula de composto expelido irá resultar em uma alteração de cor do dispositivo de plástico, resultando em um padrão de reconhecimento bacteriano único. Com isso, pode-se postular que mais compostos além das aminas estarão envolvidos na discriminação dos micro-organismos.

Figura 3.20 apresenta uma clara discriminação entre todas as quatro bactérias estudadas usando apenas as duas primeiras componentes principais, com mais de 90% do total das informações recolhidas a partir de valores RGB extraídos. É interessante notar pelas imagens reais das bactérias presentes nesse gráfico, a similaridade entre as formas das espécies estudadas, o que não resultaria em uma discriminação visual dos micro-organismos. Tal discriminação foi confirmada quantitativamente usando um gráfico de HCA (Figura 3.21) feita com os mesmos dados usadas para obter o gráfico de escores relatado na Figura 3.20. O dendrograma mostra que cada uma das espécies está localizada em um grupo diferente e não há erros de discriminação.

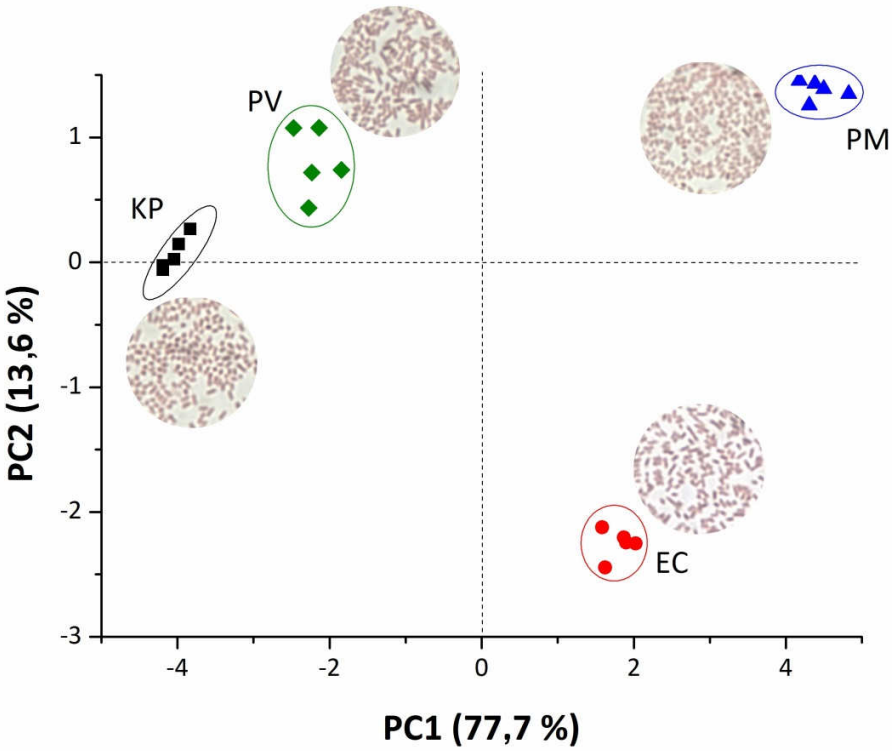


Figura 3.20: Gráfico de escores obtido a partir de valores de RGB extraídos do arranjo de 5 sensores coloridos com indicadores de pH em contato com as bacterias: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli* a 37ºC.

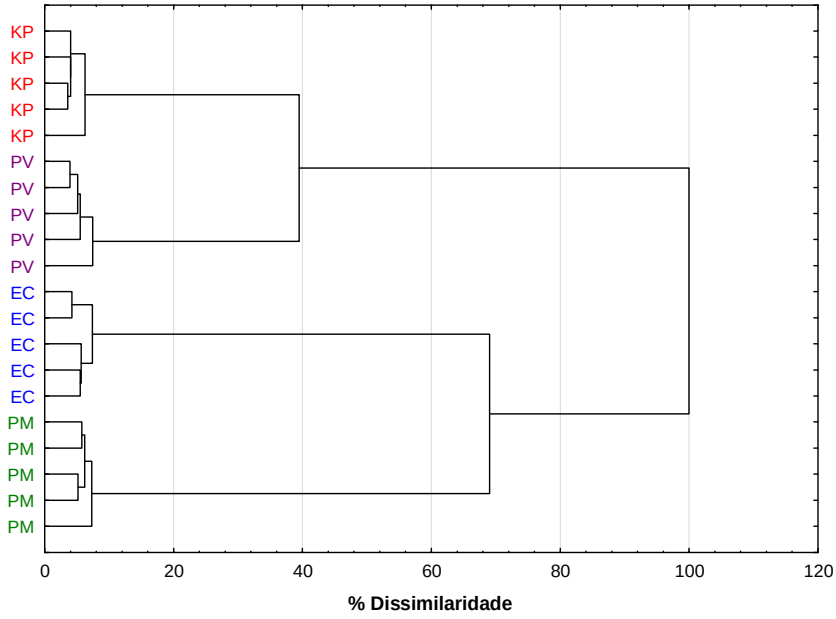


Figura 3.21: Gráfico de HCA obtido a partir de valores de RGB extraídos do arranjo de 5 sensores coloridos com indicadores de pH em contato com as bacterias: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli* a 37ºC.

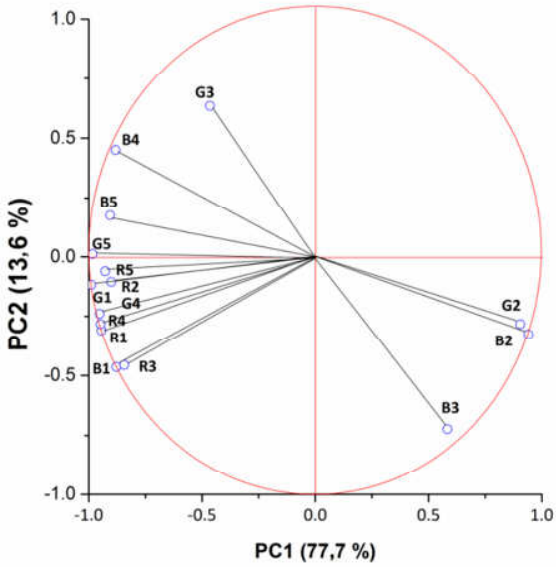


Figura 3.22: Gráfico de pesos obtido a partir de valores de RGB extraídos do arranjo de 5 sensores coloridos com indicadores de pH em contato com as bacterias: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli* a 37ºC.

Um gráfico de pesos, Figura 3.22, foi feito a fim de compreender quais as variáveis que são responsáveis pela discriminação obtida na Figura 3.20. Ela mostra que as componentes azuis do vermelho de clorofenol e do azul de bromofenol, bem como, o componente verde no azul de bromofenol são as variáveis mais importantes para manter as espécies de EC no segundo quadrante. Anteriormente, mostramos que a componente azul do vermelho de clorofenol é importante para discriminar isopentilamina, sendo ela um indicativo da colonização de EC a 37ºC. Os corantes alizarina, vermelho de timol e azul de bromofenol são responsáveis pela discriminação KP e PV. Anteriormente foi mostrado que a liberação de isobutilamina poderia ser detectada pelos corantes vermelho de timol e azul de metileno, que está de acordo com a literatura para a descarboxilação anaeróbia de L-valina por PV produzindo isobutilamina [103]. Não obstante, a discriminação da PM, os parâmetros de cor extraídos dos corantes azul de bromofenol e vermelho de clorofenol são importantes, concluindo que todas as variáveis usadas são importantes para o processo de discriminação do micro-organismos estudados.

Objetivando desenvolver embalagens de alimentos integradas a indicadores inteligentes para detectar a deterioração dos alimentos e pensando que diferentes alimentos podem ser armazenados em condições distintas, como à temperatura ambiente, experimentos foram conduzidas a 25ºC para simular o crescimento bacteriano e avaliar a possibilidade de discriminar micro-organismos sob as condições ambientes. Lembrando que o processo de subcultura foi o mesmo realizado no teste anterior (a 37ºC), porém a etapa de incubação foi realizada a 25ºC, também por 24 horas. A Figura 3.23 apresenta uma boa discriminação entre todas as bactérias consideradas, onde cada uma foi colocada em um quadrante diferente, mesmo usando cerca de 60% da informação total. É de nosso conhecimento que esta temperatura não é considerada ideal para a avaliação de crescimento microbiano em condições laboratoriais, principalmente quando se deseja analisar as etapas de desenvolvimento desses organismos. Entretanto, nesta temperatura é possível haver crescimento de micro-organismos, principalmente em alimentos onde a quantidade de nutrientes, água e valores de pH são favoráveis. Os resultados provam que o dispositivo proposto é capaz de discriminar micro-organismos e, tal como aconteceu com os experimentos a 37ºC, um gráfico de HCA (Figura 3.24) foi obtido para confirmar o comportamento da PCA nos testes a 25ºC e, neste caso, não tivemos qualquer erro de discriminação, e cada espécie avaliada pôde ser corretamente alocada num quadrante do gráfico.

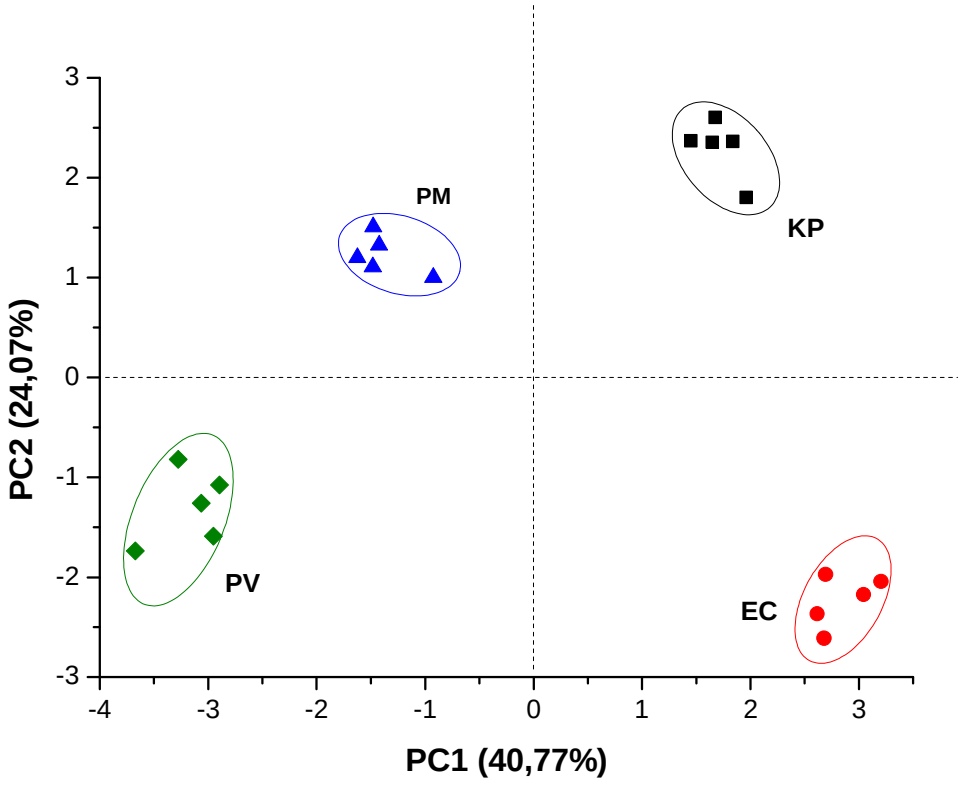


Figura 3.23: Gráfico de escores obtido a partir de valores de RGB extraídos do arranjo de 5 sensores coloridos com indicadores de pH em contato com as bacterias: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli* a 25ºC.

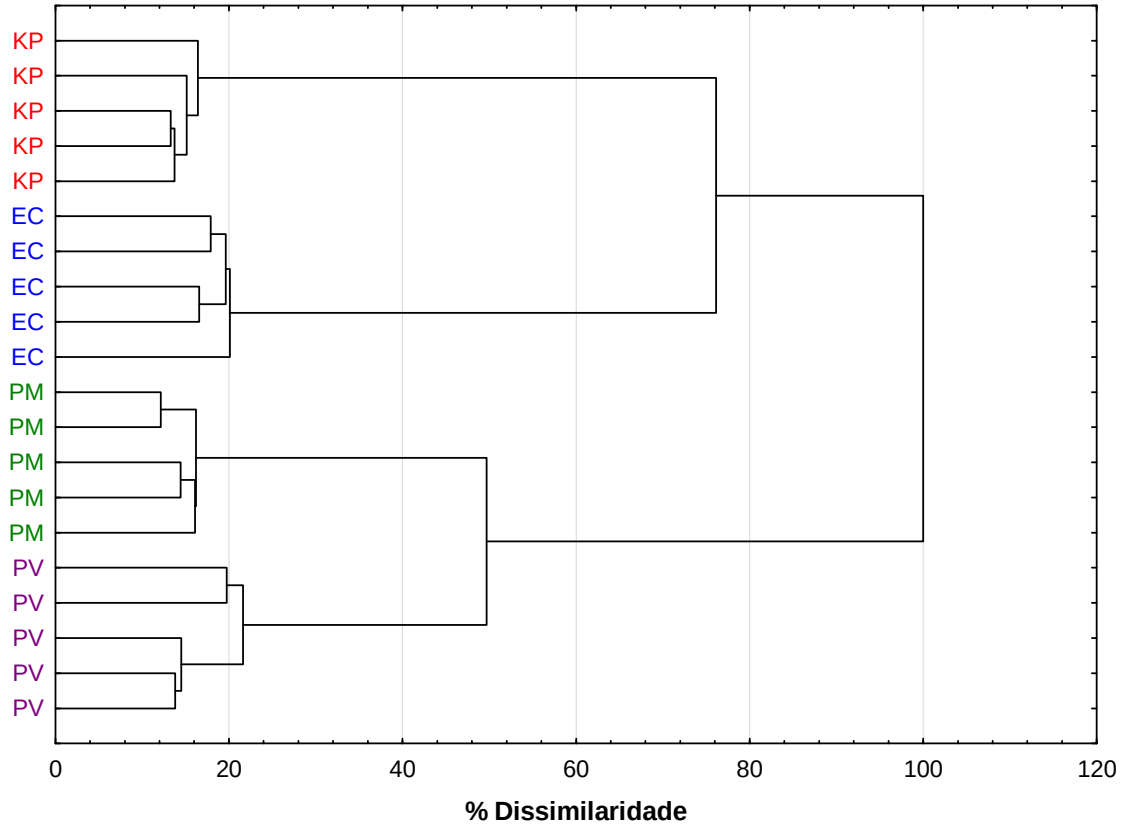


Figura 3.24: Gráfico de HCA obtido a partir de valores de RGB extraídos do arranjo de 5 sensores coloridos com indicadores de pH em contato com as bacterias: (KP) *Klebsiella pneumoniae*, (PV) *Proteus vulgaris*, (PM) *Proteus mirabilis* e (EC) *Escherichia coli* a 25ºC.

Para testar a capacidade do método proposto em classificar os quatro bactérias discriminadas no presente estudo, uma classificação supervisionada usando *k*-NN foi realizado. O algoritmo *k*-NN classifica padrões baseado apenas na distância calculada entre os pontos usando o espaço padrão n-dimensional. Neste método, uma amostra desconhecida é classificada de acordo com o voto da maioria dos seus *k* vizinhos mais próximos no conjunto de treinamento ou calibração. Por isso, o *k*-NN modelo foi treinado usando os dados de 16 amostras (4 de cada bactéria). Em primeiro lugar, a escolha de *k* vizinhos mais próximos de ser utilizado foi avaliada usando um método de validação cruzada, i.e., em que uma amostra do conjunto de calibração é deixada fora desse. Nesta abordagem, o modelo é repetidamente ajustado deixando uma das 16

amostras de fora, como uma simples observação, e em seguida, essa observação é utilizada para obter uma previsão usando o resto das amostras (15) como um conjunto de treinamento. A precisão das previsões feitas através de observações de uma amostra retirada de cada vez é estimada para cada possível valor de *k* vizinhos. Figura 3.25 mostra a precisão da validação cruzada do modelo *k*-NN para diferentes valores de *k* no conjunto de treinamento. Como pode ser visto, a melhor precisão de validação cruzada foi conseguida quando *k* = 1.

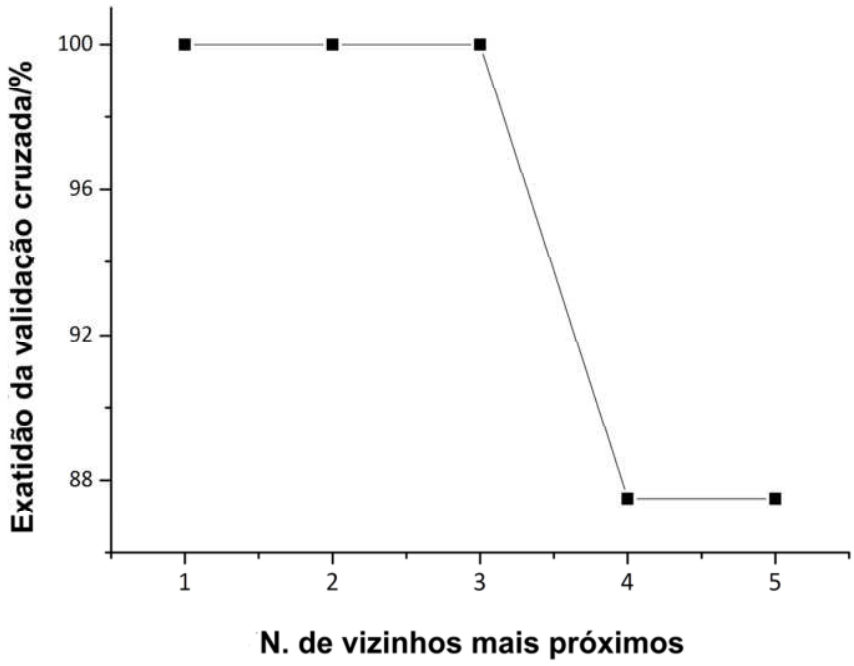


Figura 3.25: Gráfico de precisão da validação cruzada mostrando o número de *k*-vizinhos mais próximos que produzem a mais alta porcentagem de precisão do método.

Para verificar a exatidão do modelo proposto e o melhor valor de *k*, quatro novas amostras de cada bactéria aqui estudada foram preparadas e o poder preditivo do modelo foi testado. Tabela 1 descreve uma matriz de confusão (contingência), o valor verdadeiro da classe pelo valor da classe previsto pelo modelo *k*-NN usando valores RGB extraídos das cinco membranas. Como mostrado na Tabela 3.1, para as quatro amostras analisadas, a percentagem de predição correta das amostras desconhecidas foi de 100%, indicando uma excelente exatidão do método proposto para classificar as bactérias.

Tabela 3.1: Matriz de confusão para os resultados da classificação *k-NN* para as amostras de bactérias

Amostras	Predição			
	KP	EC	PM	PV
KP	100%			
EC		100%		
PM			100%	
PV				100%

Parte II - Discriminação de aminas com membranas e QCM

Obtidos resultados satisfatórios para o desenvolvimento de um arranjo de sensores poliméricos à base de acetato de celulose modificado com indicadores de pH na captação de aminas voláteis relacionadas aos processos microbiológicos, decidimos avaliar as propriedades de absorção das aminas pela matriz polimérica com o intuito de elucidar o fenômeno de resposta do arranjo de sensores fabricado. Adicionalmente, a ideia é que um sensor piezoelétrico modificado com polímero também possa se tornar um sensor para a discriminação de compostos voláteis como, por exemplo, na utilização em ambientes de produção e armazenamento dos alimentos, como um dispositivo para monitoramento em tempo real.

Na indústria, muitos produtos precisam ser examinados após a fabricação em busca de contaminação bacteriana antes que eles possam ser liberados para o mercado, e, como consequência, a regulação da indústria de alimentos deve ser particularmente rigorosa. Os métodos existentes para a identificação de bactérias patogênicas são severamente limitados pela necessidade de longos tempos de cultura, a necessidade de pessoal de laboratório altamente treinado, e a exigência de equipamentos caros e sofisticados [8].

Apesar da crescente utilização de polímeros como sensores químicos para constatar a presença de compostos voláteis (tais como nas indústrias de alimentos e bebidas e na monitorização ambiental), os detalhes completos da interação do composto volátil com os polímeros não são

completamente compreendidos. Dois principais tipos de interações entre o analito e o sensor podem ser reconhecidos: uma primeira interação limita-se principalmente à região da superfície onde as espécies voláteis são adsorvidas, e a segunda, na maior parte do sensor (bulk), onde a espécie química é finalmente absorvida. Uma vez que o primeiro processo necessariamente precede o segundo, o estudo de fenômenos interfaciais é de importância muito especial para o desenvolvimento de sensores químicos [143].

Compostos voláteis, especialmente as aminas, são bastante encontrados em amostras alimentícias e a análise destes compostos tem sido realizada utilizando diversas técnicas, tais como cromatografia [144], eletroforese capilar [145], potenciometria [146], injeção em fluxo [147], porém muitas destas técnicas se mostram complicadas, de alto custo, dispendiosas, necessitam de tratamento prévio. Como outros autores fizeram anteriormente para a análise de compostos voláteis, nós apresentamos a utilização de um sensor piezoelétrico, neste caso a microbalança de cristal de quartzo, para a discriminação de aminas, que podem ser produtos de colonização de micro-organismos em alimentos. Esta é a uma técnica que, muitas vezes, é mais rápida e mais barata em relação às demais citadas pensando em um monitoramento fixo e remoto [148].

A microbalança de cristal de quartzo, sendo um sensor piezoelétrico, está baseada nas características piezoelétricas do quartzo que, conectado a um circuito elétrico apropriado, oscila a uma frequência constante e característica da sua massa ou forma, o chamado *efeito piezoelétrico*. Quando uma pequena massa de material é depositada sobre uma superfície de um cristal de quartzo oscilante, a sua frequência de vibração diminui, sendo essa variação de frequência relacionada linearmente com a massa, de acordo com a equação de Sauerbrey:

$$\Delta f = -Cf \,.\, \Delta m \qquad (11)$$

onde, Δf é a mudança de frequência observada (em Hz), Δm é a mudança em massa por unidade de área (em g/cm^2) e Cf e o fator de sensibilidade para o cristal usado.

Como citado na seção 2.5., membranas modificadas com indicadores ácido-base foram utilizadas para recobrir o eletrodo de ouro da microbalança de cristal de quartzo (10 µL de solução foram utilizadas para a confecção de cada membrana, que foi seca por 15 minutos em temperatura ambiente antes do início das medidas). Foram realizadas injeções de quatro diferentes concentrações das aminas em quadruplicata em um sistema fechado, e em fluxo, em que as aminas

líquidas foram volatilizadas e transportadas com o gás de arraste (ar atmosférico) com o auxílio de uma bomba de aquário. A passagem das injeções de "pacotes" de amostra contendo aminas com gás de arraste eram intercaladas pela passagem de gás puro (livre de contaminantes e analitos) e a variação de frequência foi monitorada pela modificação da oscilação do cristal.

Com esta membrana foram registrados os valores de frequência em função do tempo das aminas, como mostrado na Figura 3.26 para a membrana colorida com alizarina que registrava a interação de isobutilamina.

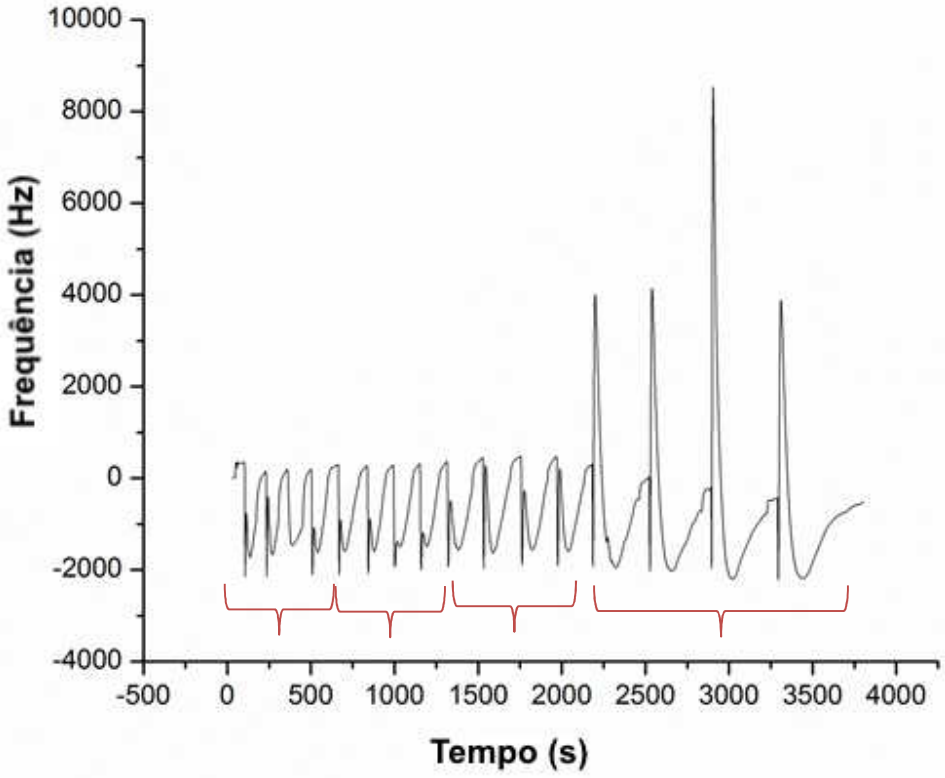


Figura 3.26: Gráfico de frequência versus tempo registrado para isobutilamina com membrana de alizarina como modificante para o eletrodo de ouro na microbalança de cristal de quartzo.

Os perfis dos gráficos de frequência *versus* tempo sugerem que os processos de adsorção e dessorção das aminas nas membranas é diferente para membranas distintas e também entre as três aminas. Pensando nisso, os dados usados como entrada para a ferramenta quimiométrica foram o

tempo em que o sinal de frequência das aminas levava para retornar à linha base e a altura do pico. Um dos gráficos obtidos com essas informações está reportado na Figura 3.27.

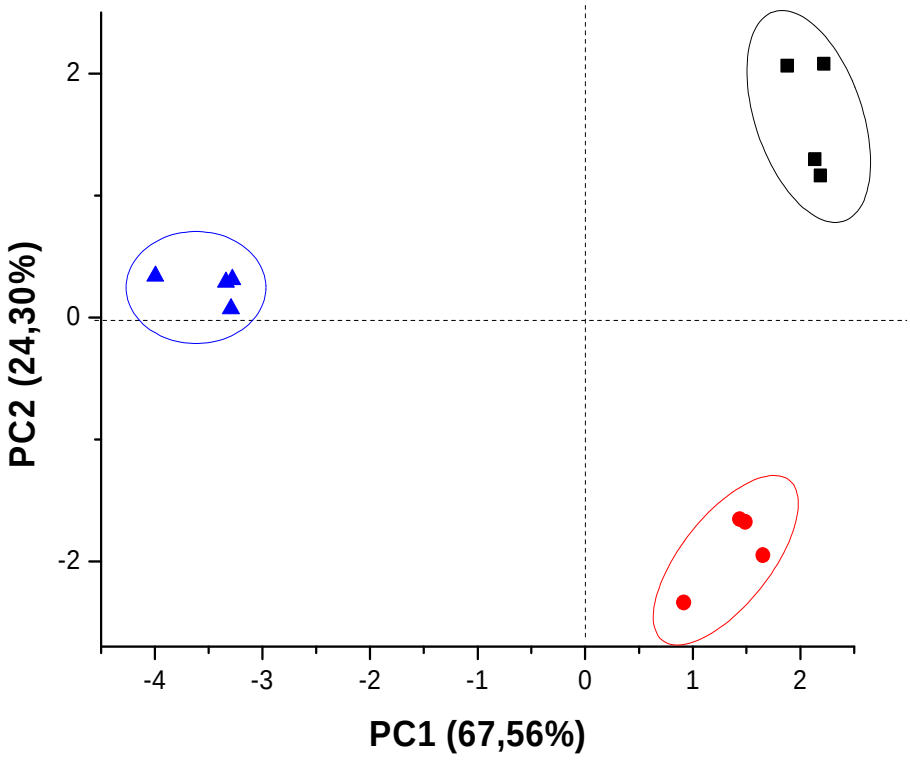


Figura 3.27: Gráfico de escores (PCA) obtidos a partir da extração dos valores de frequência e tempo das injeções de 50 µL das aminas: (■) isobutilamina (●) trietilamina e (▲) isopentilamina.

Na Figura 3.27, a discriminação entre as aminas com injeção de 50 µL (cada uma) foi possível, uma vez que, a utilização de diferentes corantes em combinação com a solução de acetato de celulose resultou em distintas interações entre a mistura e as aminas analisadas. Também foi possível ver boas discriminações com outros volumes de aminas testados (20, 30 e 100 µL). Por se tratar de um teste preliminar, as concentrações das aminas não foram calculadas e por isso todo o tratamento está sendo dado em relação ao volume utilizado em cada conjunto de medidas.

As membranas puras (sem corante) apresentaram as menores quedas de frequência para os mesmos tempos de exposição dos analitos. As membranas coloridas em contato com as aminas

apresentaram mudanças de frequência variadas, mas em ambas as situações, seja com as membranas coloridas ou com elas puras, as interações foram reversíveis, mostrando que os analitos se ligam aos filmes, mas são dessorvidos com a passagem do gás de arraste (ar puro), permitindo assim medidas sucessivas. Esses processos de dessorção foram mais rápidas ou lentas dependendo da combinação entre corante – membrana – amina.

O método apresentado se mostrou promissor à análise de aminas em amostras alimentícias, uma vez que, as medidas podem ser realizadas num curto espaço de tempo e em baixas concentrações. Além disso, esse dispositivo pode ser utilizado para medições remotas de aminas voláteis, uma vez que, pode ser fixado em locais de liberação de compostos voláteis e os dados armazenados em um banco de dados.

Como continuávamos em busca de um aperfeiçoamento do método, após diversos testes, conseguimos simular um meio real de medição, uma “atmosfera” de aminas sem a presença de gás de arraste para fazer com que as mesmas alcançassem o sensor.

Neste novo sistema, cristais piezoelétricos recobertos com ouro foram modificados com filmes de acetato de celulose + plastificante Tween® 20 foram testados com e sem a adição de corantes nas membranas. Estes foram colocados em contato com a “atmosfera” de vapores de aminas, uma a uma. Dados de frequência foram obtidos em função do tempo de exposição à atmosfera contendo os vapores das aminas isobutilamina, isopentilamina e trietilamina isoladamente.

Os resultados encontrados nessa fase do trabalho mostraram que a utilização de corantes não era necessária, uma vez que a discriminação das aminas era possível com as membranas puras e com uma qualidade ainda maior. Tendo isso, a avaliação passou a ser feita sob o prisma de haver ou não um recobrimento sobre o eletrodo de ouro.

A Figura 3.28 mostra os dados de frequência em função do tempo de exposição obtidos para um cristal de ouro não modificado e um modificado com acetato de celulose + plastificante Tween® 20 na presença de isobutilamina.

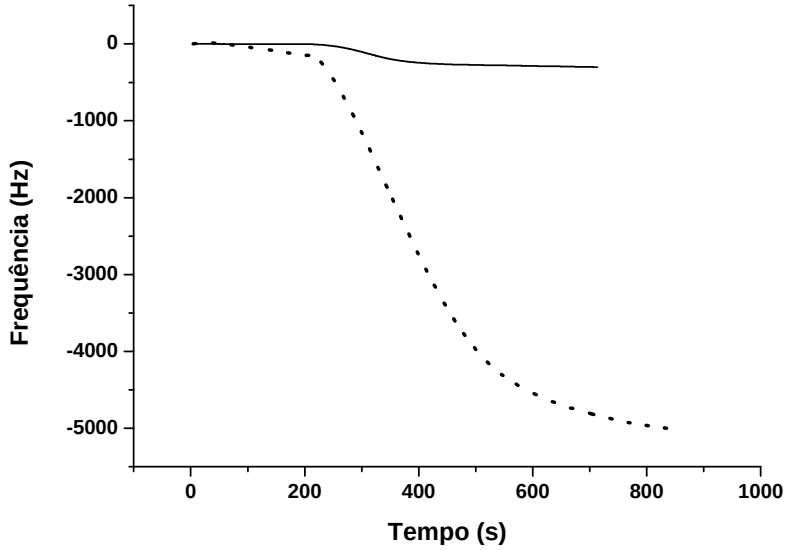


Figura 3.28: Valores de frequência em função do tempo obtidos com cristais de quartzo recobertos com ouro na ausência (linha sólida) e na presença de um filme de acetato de celulose (linha pontilhada) modificando a superfície do cristal de ouro. Concentração da amina utilizada (isobutilamina): 10 ppm.

Nota-se na Figura 3.28 que a frequência diminui com a adição da amina estudada ao sistema tanto para o eletrodo modificado quanto para o não modificado com a membrana de acetato de celulose. Contudo, o aumento é muito mais significativo no eletrodo modificado com a membrana polimérica, indicando assim, uma maior quantidade de amina adsorvida/absorvida no sensor modificado com a membrana polimérica que o cristal não modificado, considerando a equação de Saurbrey válida para esse sistema. Vale destacar que o mesmo perfil é observado para as outras aminas, mas o tempo para atingir o valor de frequência máxima, a frequência máxima e o "*slope*" de diminuição da frequência são diferentes para cada amina analisada isoladamente, elucidando assim, o motivo de aminas com pKas muito próximo apresentarem cores diferentes no sensor colorimétrico, isto é, uma maior quantidade da amina resultará em uma maior alteração de pH original dentro da membrana. A adição dos corantes na matriz polimérica não altera a quantidade de amina absorvida/adsorvida na matriz polimérica, sendo essas somente válidas para o sistema colorimétrico utilizado na etapa anterior, demonstrando novamente que a quantidade de

amina "capturada" pela matriz polimérica só depende da natureza do polímero e do composto estudado.

Verificada essas alterações observadas nos tempos para atingir os valores de frequência máxima, as frequências máximas e o "slopes" de diminuição da frequência para cada amina, pensou-se em desenvolver um sensor piezoelétrico que possa também ser usado na detecção de aminas em locais onde os alimentos são produzidos ou armazenados o que evitaria que o alimento chegasse contaminado às mãos do consumidor. Com esse intuito, os dados de frequência máxima, inclinação até atingir a frequência máxima e tempo para estabilização do sinal de frequência dos compostos no sistema foram utilizados como dados de entrada para a ferramenta quimiométrica PCA (Análise de Componentes Principais). A Figura 3.29 mostra o gráfico de escores onde é possível observar uma boa discriminação entre os três diferentes grupos (trietilamina, isobutilamina e isopentilamina) em uma concentração de 10 ppm. A discriminação reportada na Figura 3.28 foi obtida usando mais de 90% dos dados originais e utilizando somente as duas primeiras componentes principais.

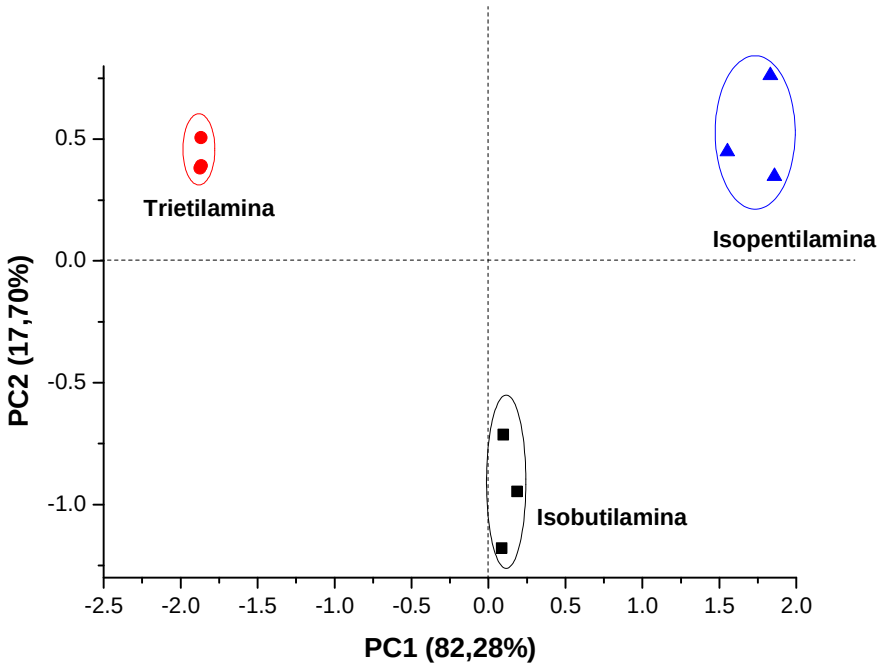


Figura 3.29: Gráfico de escores obtido a partir dados de frequência em função do tempo utilizando o filme de acetato de celulose para recobrir o cristal piezoelétrico de ouro.

Pelo bom desempenho para discriminação das aminas usando essa membrana, resolvemos testar outro polímero, neste caso o PVC, a fim de que um melhor material seja escolhido para a produção de outras embalagens para alimentos.

Os experimentos foram realizados da mesma maneira em que foram apresentados em relação ao acetato de celulose. O filme sobre o eletrodo foi montado como descrito na seção 2.5. Após serem medidos os tempos para atingir a frequência máxima do eletrodo recoberto com PVC utilizando BEP (dioctil ftalato – do inglês, bis(2-ethylhexyl) phthalate) como agente plastificante para cada uma das três aminas. A Figura 3.30 apresenta os perfis das curvas de frequência versus tempo de uma das aminas (isobutilamina) para os eletrodos recobertos com PVC e também do eletrodo limpo. Nessa figura, é possível ver que há uma diferença no valor de frequência máxima e até mesmo no tempo de estabilização desta frequência para o eletrodo recoberto com PVC e com o eletrodo limpo, como também se evidenciava com a utilização de acetato de celulose.

Para o tratamento matemático, os mesmos dados (tempo para atingir a frequência máxima, as frequências máximas e o *"slopes"*) foram utilizados como dados de entrada para a Análise de Componentes Principais, Figura 3.31.

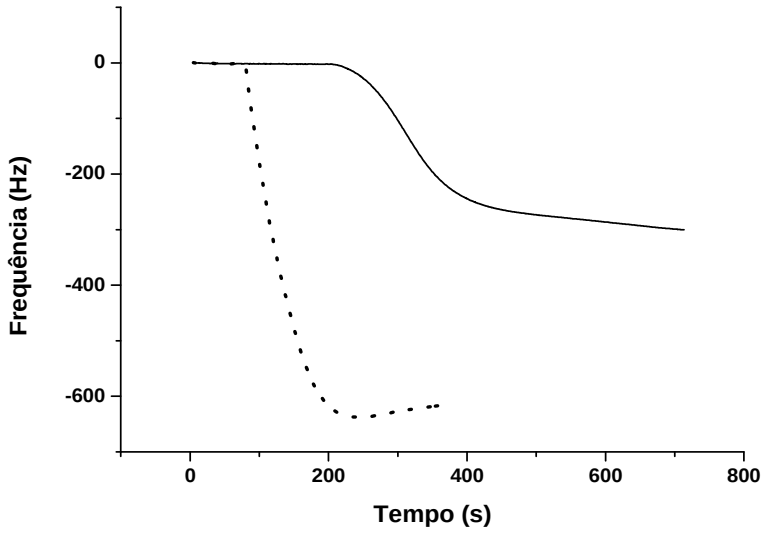


Figura 3.30: Valores de frequência em função do tempo obtidos com cristais de quartzo recobertos com ouro na ausência de filme (linha sólida) e na presença de um filme de PVC (linha pontilhada)

modificando a superfície do cristal de ouro. Concentração da amina utilizada (isobutilamina): 10 ppm.

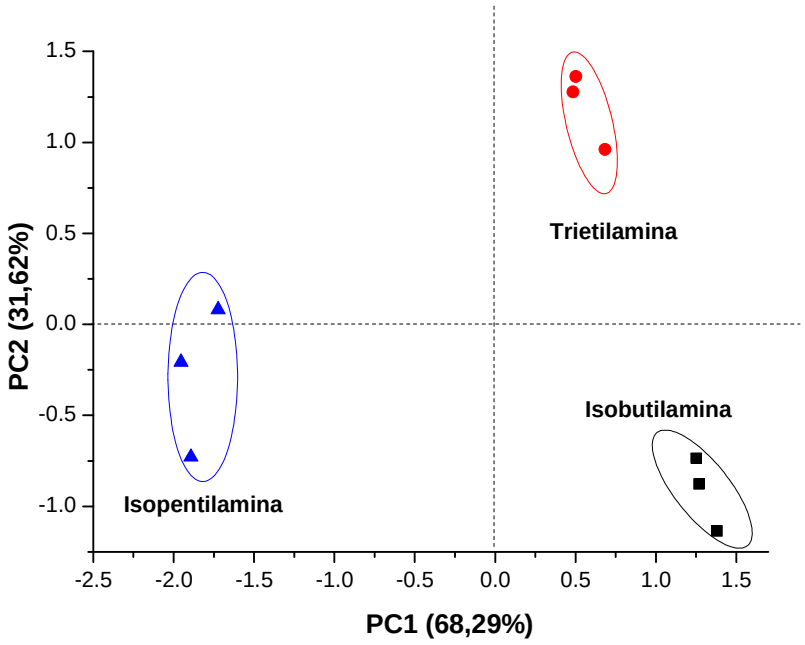


Figura 3.31: Gráfico de escores obtido a partir dados de frequência em função do tempo utilizando o filme de PVC para recobrir o cristal piezoelétrico de ouro.

Fazendo uma comparação entre os dados obtidos com as duas membranas estudadas, além do eletrodo limpo, é possível perceber que há uma maior diferença de frequência entre o acetato de celulose e o eletrodo limpo do que entre o PVC com eletrodo limpo (Figura 3.32). Isto nos leva a pensar que o acetato de celulose é o material que proporciona uma maior permeação de material proveniente dos compostos voláteis avaliados e por isso ele seria o melhor material para recobrir o eletrodo de ouro presente na microbalança de cristal de quartzo, e novamente, justifica a sua utilização como um agente de pré-concentração para os dispositivos colorimétricos.

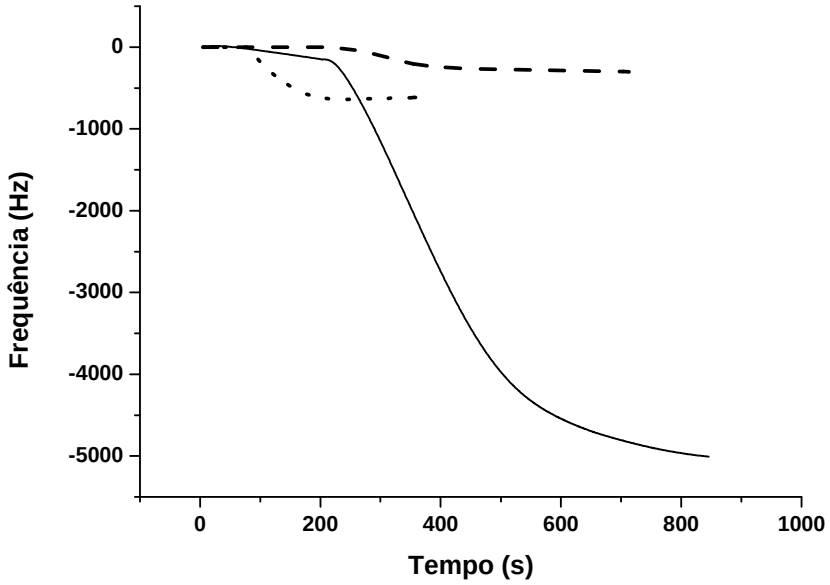


Figura 3.32: Valores de frequência em função do tempo obtidos com cristais de quartzo recobertos com ouro na ausência de filme (linha tracejada) e na presença de um filme de acetato de celulose (linha sólida) e também de PVC (linha pontilhada) modificando a superfície do cristal de ouro. Concentração da amina utilizada (isobutilamina): 10 ppm.

Um gráfico de PCA também foi construído com os dados do eletrodo limpo, para uma comparação entre a aquisição de informações originais obtidas com o eletrodo limpo e as membranas de recobrimento do eletrodo. A partir da componente principal 1 é possível ver que há uma dispersão muito maior das amostras no caso do eletrodo limpo (58% da informação original) do que no caso do eletrodo recoberto com a membrana de acetato de celulose (82%), caso em que encontramos a menor dispersão dos dados.

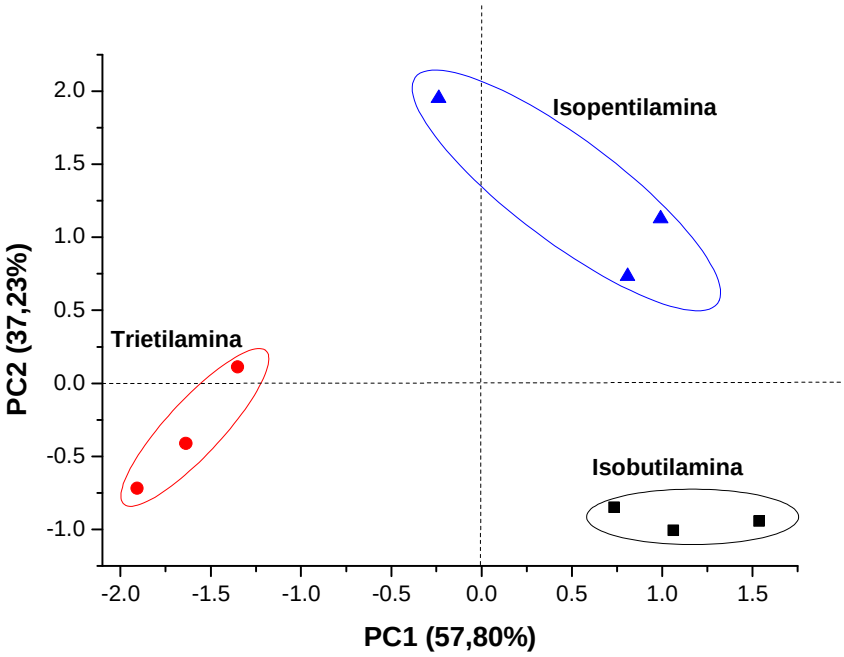


Figura 3.33: Gráfico de escores obtido a partir dados de frequência em função do tempo utilizando cristal piezoelétrico de ouro sem recobrimento (limpo).

A partir dos resultados obtidos, podemos ver que o melhor dispositivo seria aquele que em que o eletrodo de ouro estaria recoberto com acetato de celulose, utilizando Tween® 20 como plastificante. Esta informação vem de encontro a dados anteriores que mostram que este polímero apresenta baixa toxicidade, é natural, compatível com alimentos e de fácil manuseio.

4. Conclusões

A combinação entre um polímero biodegradável natural e compatível com alimentos, a incorporação de corantes e a utilização de um smartphone para a detecção das mudanças de coloração das membranas na embalagem dos alimentos faz do dispositivo proposto um método rápido, barato e de fácil utilização para todos os consumidores, uma vez que, a simples mudança no padrão de cores das membranas é capaz de dizer o nível de contaminação e quais os micro-

organismos responsáveis por ela. A ideia da inovação proposta é a incorporação à embalagem dos alimentos destas cinco membranas coloridas na forma de uma etiqueta que mudará de cor com a interação dos compostos voláteis que serão produzidos pelos micro-organismos que estarão colonizando os alimentos no processo de contaminação deles. Esta mudança na coloração seria analisada por um aplicativo instalado no smartphone do consumidor (ou vendedor), que daria como resposta o grau de contaminação e quais os organismos responsáveis por ela.

A vantagem deste sistema de detecção de adulteração é que ele é barato, o material utilizado na fabricação da etiqueta é o mesmo usado na fabricação da embalagem, ocorre uma mudança de coloração visualmente perceptível e faz uso de uma tecnologia que está ao alcance de todos, um smartphone, que é utilizado para fornecer a resposta para o usuário final.

Além do dispositivo colorimétrico para uso em embalagens, uma alternativa de análise para uso em ambientes de produção e armazenamento dos alimentos, como um dispositivo para monitoramento em tempo real foi proposto e obtido com sucesso. Aminas foram discriminadas com um sistema que conta com cristais de quartzo recobertos com polímeros na medição da frequência dos compostos voláteis.

1. Contaminação química e adulteração de leite

A contaminação química dos alimentos pode ocorrer em qualquer momento da sua fabricação: desde a produção de matéria-prima, até o consumo do produto final. Ela está sempre relacionada aos perigos químicos: contaminantes de natureza química, resíduos de produtos químicos ou produtos de sua degradação, toxinas produzidas por micro-organismos ou algum componente tóxico ou alergênico natural do alimento, presentes em níveis inaceitáveis nos alimentos. Esses níveis inaceitáveis estão vinculados ao risco. O perigo pode estar presente mas se não houver condições de causar um dano ou uma doença então consideramos que se encontra em "níveis aceitáveis" [149].

Os efeitos dos contaminantes químicos no consumidor podem acontecer em longo prazo (doenças crônicas), como os causados por produtos químicos com potencial para causar câncer e que são cumulativos (como por exemplo as micotoxinas e alguns agrotóxicos) ou podem acontecer a curto prazo (doenças agudas), como os produzidos por alergênicos que afetam as pessoas alérgicas causando reações que podem até ser fatais em questão de poucos minutos.

Quando agentes químicos são adicionados propositalmente, este processo é caracterizado por adulteração alimentícia, o que pode ser considerada uma prática criminosa, passível de pena de reclusão e que, no Brasil, varia entre 4 e 8 anos além de multa. Um tipo de adulteração que tem sido bastante recorrente no Brasil é a adição de substâncias ao leite; entre estas substâncias estão água, hidróxido de sódio, formol, ureia, entre outros.

O leite é considerado um alimento completo, contendo elevadas quantidades de proteínas, vitaminas e minerais. Como a maioria dos alimentos de origem animal, o leite natural, sem qualquer conservante é perecível e tem um tempo de vida relativamente curto. Ele também oferece um ambiente ideal para o crescimento de micro-organismos, e pode ser um veículo eficaz para propagação de doenças transmitidas por alimentos, como a salmonelose, brucelose, listeriose e tuberculose [150]. Ao contrário de alguns outros alimentos e bebidas, a adição de conservantes para aumentar a vida de prateleira do leite é proibida [151]. Por esta razão, conservantes presentes no leite são designados como contaminantes. Muitos produtores adicionam produtos que, em teoria, ajudam na conservação do leite, porém são, na maioria das vezes, tóxicos e causam danos

aos consumidores. Ao mesmo tempo, alguns produtores desejam aumentar sua margem de lucro com a venda dos produtos e, para isso, adicionam água ao alimento, o que dilui o leite e leva a perdas nutricionais. Estas perdas têm sido mascaradas pela adição de substâncias com alto teor de nitrogênio, como a ureia.

A ureia é produto de degradação proteica, naturalmente presente no metabolismo dos mamíferos e que contém mais de 40% de nitrogênio. Como avalição do teor proteico é feito baseado na quantidade de nitrogênio total (método de Kjeldahl), torna-se fácil adulterar o resultado final. O problema é que o consumo de ureia pode levar ao mau funcionamento dos rins, em quantidades acima de 700 mg L^{-1} (~11 mmol L^{-1}) [152], [153]. A ureia pode ser adicionada ao leite na forma de urina ou em forma de composto agrícola e estes compostos também contêm formaldeído, que é um composto cancerígeno, utilizado principalmente para a conservação de cadáveres.

O formaldeído é usado na produção de resinas (tais como agentes de esterilização e conservantes), como um componente encontrado em produtos de limpeza e cosméticos, e para embalsamar "peças" anatômicas. Formaldeído representa um grande risco de saúde para aqueles que lidam ou o ingerem porque ataca o sistema respiratório, olhos e pele. Pesquisas recentes têm mostrado que o formol é responsável por um aumento de até 34% na possibilidade de uma pessoa normal desenvolver esclerose múltipla; indivíduos que tenham sido expostos ao formaldeído durante pelo menos 10 anos são quatro vezes mais propensos a desenvolver esta doença, quando comparado a uma pessoa comum. O formaldeído pode ser encontrado naturalmente nos leites frescos e comerciais em quantidades de 0,027 e 0,164 mg kg^{-1}, respectivamente [154]. A adição de 1 ml deste composto a um galão de leite, para dar uma concentração final de 7,2 mmol L^{-1}, pode preservar o leite por uma semana [155].

Mas não foi só no Brasil que casos de adulteração foram noticiados. No ano de 2007, o caso de adulteração de leite ocorreu na China, quando milhares de quilos de leite em pó e fórmulas infantis foram adulterados com melamina [156]–[158]. A melamina (1,3,5-triazina-2,4,6-triamina, $C_3H_6N_6$) é uma substância orgânica utilizada juntamente com formaldeído, para a fabricação de resinas, polímeros altamente resistentes e tolerantes ao calor; é também um composto químico com alto teor de nitrogênio, mais de 66%, contudo apresenta alta toxicidade, podendo levar à perda de funções vitais do organismo e até à morte, como aconteceu com algumas pessoas no caso relatado.

A melamina é utilizada pelo mesmo motivo que a ureia, para mascarar o teor proteico, além de aparentemente manter as propriedades físico-químicas do leite [92]. Contudo, o composto pode formar complexos insolúveis com cianúrico ácido nos rins, o que pode levar à cristalização e insuficiência renal subsequente e até mesmo causar litíase urinária e câncer de bexiga [159]. Atualmente os principais métodos para a detecção de melamina em leite são cromatografia líquida de alta performance (HPLC), acoplada a espectroscopia de massas ou não e também eletroforese capilar de zona. Outros métodos estão sendo desenvolvidos para monitoramento como Espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS), absorção espectrofotométrica, fluorescência e quimiluminescência. Entretanto, um de nossos objetivos é desenvolver um método de detecção de adulteração de alimentos que possa ser miniaturizado, utilizado em qualquer lugar, não somente em locais de fabricação ou armazenamento, mas sim na casa dos consumidores principalmente, diretamente nas amostras. Sendo assim, os métodos anteriormente citados não são as melhores opções, uma vez que normalmente apresentam alto custo, necessitam de operadores bem treinados, são laboriosos e precisam de tratamento da amostra. A eletroquímica, entre outras vantagens, compreende técnicas de fácil operação, permite o uso de materiais de baixo custo para o fabrico de sensores, e possibilita a quantificação e a discriminação entre amostras num curto período de tempo [160].

Com a crescente procura de produtos lácteos e da necessidade de reduzir as perdas na produção industrial devido aos materiais de má qualidade, a exigência de leite de alta qualidade aumentou. Um dos principais problemas associados com a obtenção de produtos de alta qualidade é a adulteração de leite [161]. Esse problema afeta tanto a indústria quanto os consumidores em termos de qualidade do produto e segurança alimentar. Portanto, a autenticação da qualidade dos alimentos tornou-se um grande desafio a ser superado [162]. Por ambos os motivos econômicos e de saúde pública, é importante identificar os casos de rotulagem fraudulenta, o que pode indicar se um produto (alimento) está sendo apresentado como tendo uma qualidade maior do que realmente ele possui [163].

2. Procedimentos experimentais

2.1. Discriminação de amostras de leite adulteradas com formol, melamina e ureia

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico sem qualquer purificação. Ácido acético, formaldeído e acetato de sódio foram comprados da Merck (Darmstadt, Germany). Melamina e ureia foram obtidas da Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) e Fluka Chemika (Switzerland), respectivamente. Tampão acetato (pH 4,5) foi preparado em água desionizada, que foi processada através de um sistema de purificação de água (Direct-Q®, sistema de água ultrapura, Millipore, MA, EUA). Amostras de leite de três diferentes marcas (Parmalat®, Elegê®, and Qualitá®) foram obtidas em mercados locais. A adulteração das amostras de leite foi realizada através da mistura de quantidades apropriadas dos reagentes sólidos (melamina e ureia) ou solução padrão de formaldeído até as amostras obterem concentrações finais de 0,95; 4,16 e 10,0 mmol L^{-1}, respectivamente, melamina, ureia e formaldeído. A concentração de cada adulterante adicionado foi escolhida baseada na capacidade da língua eletrônica discriminar individualmente cada adulterante após os dados serem analisados com a ferramenta quimiométrica. Dessa forma, com valores de concentração abaixo desses limites não se obteve uma discriminação satisfatória dos agentes adulterantes.

2.1.1. Medidas eletroquímicas

Um potenciostato da PalmSens (Palm Instruments BV, The Netherlands) com módulo multiplex e um software para a aquisição de dados fornecido pelo fabricante (PSTrace versão 2.4) foi usado para as medidas eletroquímicas, além de eletrodos comerciais de ouro, platina e cobre. Para completar o arranjo de eletrodos foram utilizados um eletrodo referência $Ag/AgCl_{(KCl\ sat)}$ fabricado no laboratório [164] e fios de platina como eletrodos auxiliares. Todos os eletrodos de trabalho foram polidos em uma suspensão de alumina (1 µm, Alfa Aesar, MA, USA) utilizando um feltro de polimento. Esse procedimento foi utilizado entre cada medida eletroquímica. Após cada etapa de polimento os eletrodos foram lavados com água desionizada.

Todas as medidas voltamétricas foram obtidas diretamente nas amostras de leite, em temperatura ambiente (25°C) sem tratamento prévio . Antes de cada medida, todas as superfícies dos eletrodos de trabalho foram polidas e limpas como citado anteriormente. Os eletrodos de

referência e auxiliar foram também limpos e colocados em contato com as amostras adulteradas ou não adulteradas. Subsequentemente, três voltamogramas cíclicos foram registrados com o auxílio de um potenciostato PalmSens com um módulo multiplex, usando o seguinte programa de potencial: -0,5 a 1,6 V para os eletrodos de ouro e platina e -0,8 a 0,1 V para o eletrodo de cobre. Todos os voltamogramas foram obtidos com uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}.

2.1.2. Análises quimiométricas

Análise de componentes principais (PCA) e Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) foram desenvolvidas utilizando o software Statistica 11.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Os valores de corrente de todos os voltamogramas obtidos foram utilizados como dados de entrada para as análises quimiométricas. É importante ressaltar que os dados de entrada não sofreram qualquer manipulação matemática como pré-processamento ou escalonamento.

2.1.3. Medidas eletroquímicas com a microbalança a cristal de quartzo (EQCM)

As medidas com a microbalança a cristal de quartzo (EQCM, do inglês electrochemical quartz crystal microbalance) foram obtidas usando um módulo de EQCM acoplado a um potenciostato da AUTOLAB PGSTAT 128N (Eco Chemie, The Netherlands) com um software para aquisição de dados fornecido pelo fabricante (NOVA versão 1.9). Todos os experimentos foram obtidos com um sistema de três eletrodos, onde o eletrodo de trabalho foi um microcristal de ouro, eletrodo de referência $Ag/AgCl_{(KCl\ sat)}$ e um fio de ouro como eletrodo auxiliar. Todos os voltamogramas, bem como as medidas de frequência foram obtidos em um tampão acetato (pH 4,5), com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} e temperatura ambiente (25°C).

3. Resultados e discussão

Todos os anos, no Brasil, nós assistimos a reportagens [165][166] que mostram novos (ou velhos) casos de adulteração de leite com substâncias diversas como hidróxido de sódio, peróxido

de hidrogênio e formol. Há ainda aqueles que são mais difíceis de detectar como água, ureia e quem sabe outros mais, por falta de testes mais específicos para este tipo de alimento.

Nesta etapa do trabalho o objetivo foi desenvolver um dispositivo que fosse capaz de detectar a adulteração de amostras de leite com formaldeído, melamina e ureia, nas concentrações de 10,0, 0,95 e 4,16 mmol L^{-1}, respectivamente. Para isso, voltamogramas cíclicos foram registrados usando uma língua eletrônica composta por três eletrodos de trabalho (Pt, Au e Cu) em amostras de leite adulteradas e não adulteradas com os compostos relatados anteriormente. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos utilizando a janela de potencial: de -0,5 a 1,6 V para os eletrodos de trabalho Pt e Au e de -0,8 a 0,1 V para o eletrodo de Cu.

Os voltamogramas referentes ao eletrodo de ouro (Figura 4.1) exibem um pico em aproximadamente 1,2 V, que é devido à formação de óxidos de ouro, com a redução destes compostos durante a varredura reversa, em aproximadamente 0,5 V. Ambos os picos são diminuídos na presença dos três adulterantes, com efeito mais pronunciado para o caso de melamina e ureia, o que indica um bloqueio por adsorção da superfície dos eletrodos pelos adulterantes.

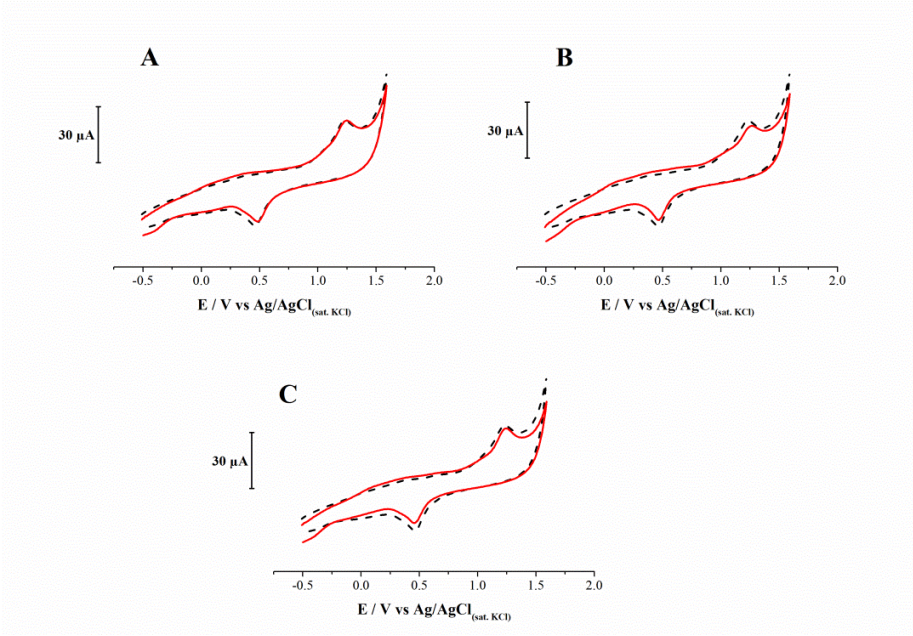


Figura 4.1: Voltamogramas cíclicos registrados em leite integral usando eletrodo de trabalho de ouro, na ausência (linha tracejada) e presença (linha sólida) de formaldeído 10,0 mmol L^{-1} (A), melamina 0,95 mmol L^{-1} (B) e ureia 4,16 mmol L^{-1} (C). v = 100 mV s^{-1}.

A fim de se entender o efeito de cada adulterante no comportamento voltamétrico registrado, experimentos com a microbalança de cristal de quartzo foram realizados em tampão acetato pH 4,5. A solução eletrolítica foi escolhida para evitar os efeitos de adsorção de outras espécies presentes no leite, como gordura e proteínas, que poderiam adsorver na superfície eletródica e resultar em uma não elucidação do efeito a ser verificado. A variação de frequência foi registrada juntamente com os voltamogramas na presença e na ausência de formaldeído, melamina e ureia em uma concentração final de 9,5 mmol L^{-1}. Na Figura 4.2A podem ser vistos dois picos bem definidos, um pico de oxidação em 1,3 V e um de redução em 0,6 V. Estes picos são provavelmente devido à formação e subsequente redução dos óxidos de ouro, como reportado na literatura [167]. Os dois picos citados na presença do adulterante apresentam uma queda nos valores de corrente, com efeito mais pronunciado no processo de oxidação.

A Figura 4.2B mostra que a frequência do cristal altera na mesma região onde os processos eletroquímicos ocorrem demonstrando uma correlação entre os efeitos de alteração de frequência e os processos eletroquímicos. A queda na frequência (aumento de massa) pode ser observada no mesmo potencial em que os picos de oxidação ocorrem nos voltamogramas (potenciais mais positivos que 1,0 V). Este efeito é mais evidente para a amostra não adulterada, enquanto na presença dos adulterantes a queda na frequência é mais discreta. Da mesma maneira, na região onde aparece o pico de redução há um ganho de frequência (perda de massa) perto de 0,6 V na varredura catódica, onde pode ser observada para cada amostra adulterada. Este ganho em frequência ocorreu em uma maior extensão também para a amostra não adulterada. Como o pico de oxidação foi atribuído à formação de óxidos de ouro, a menor queda em frequência (menor ganho de massa), deve-se a uma menor área da superfície do eletrodo disponível para formar o óxido de ouro, indicando assim, que a superfície do ouro foi bloqueada pelos adulterantes. É possível ver claramente na Figura 4.2B que os adulterantes têm efeitos diferentes na superfície do eletrodo, com a melamina sendo a que mais adsorve sobre a superfície do eletrodo de ouro.

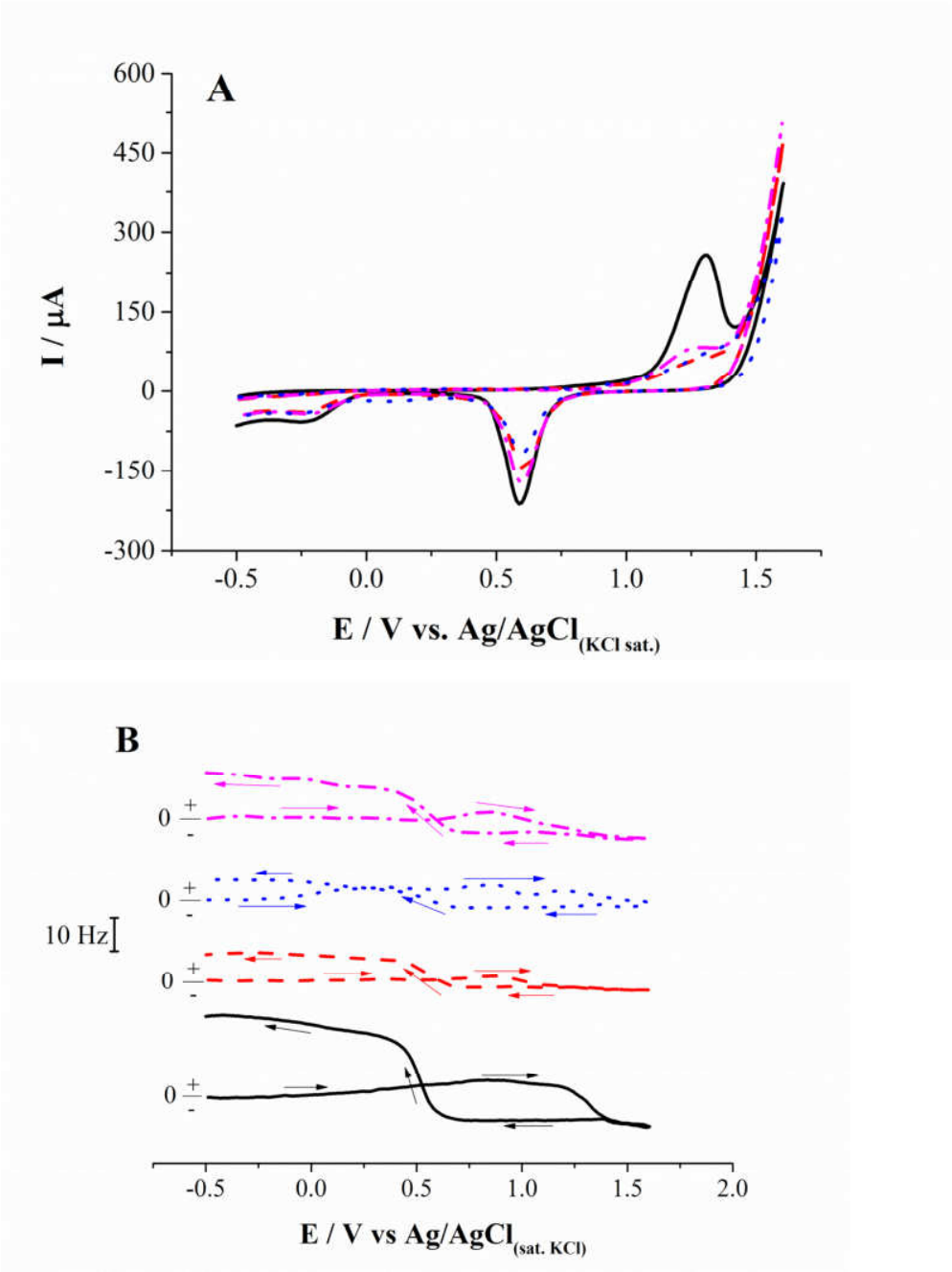


Figura 4.2: Voltamogramas cíclicos (A) registrados em tampão acetato 0,10 mol L^{-1} (pH 4,6) (linha sólida); adição de formaldeído (linha tracejada), melamina (linha pontilhada) e ureia (linha pontilhada e tracejada), todos em uma concentração final de 9,5 mmol L^{-1}. V = 50 mV s^{-1} (A). Gráfico de frequência (B) em função do potencial registrado utilizando cristal de ouro monitorada em tempo real à aquisição dos voltamogramas.

Esta explicação pode ser estendida ao eletrodo de platina, onde a formação do respectivo óxido pode ser vista em aproximadamente 0,8 V, Figura 4.3. Neste eletrodo, os perfis das amostras não adulteradas e adulteradas são bastante similares, mas na presença de formaldeído (Figura 4.3A), a formação de óxido foi mais pronunciada que na presença de melamina (Figura 4.3B) e ureia (Figura 4.3C).

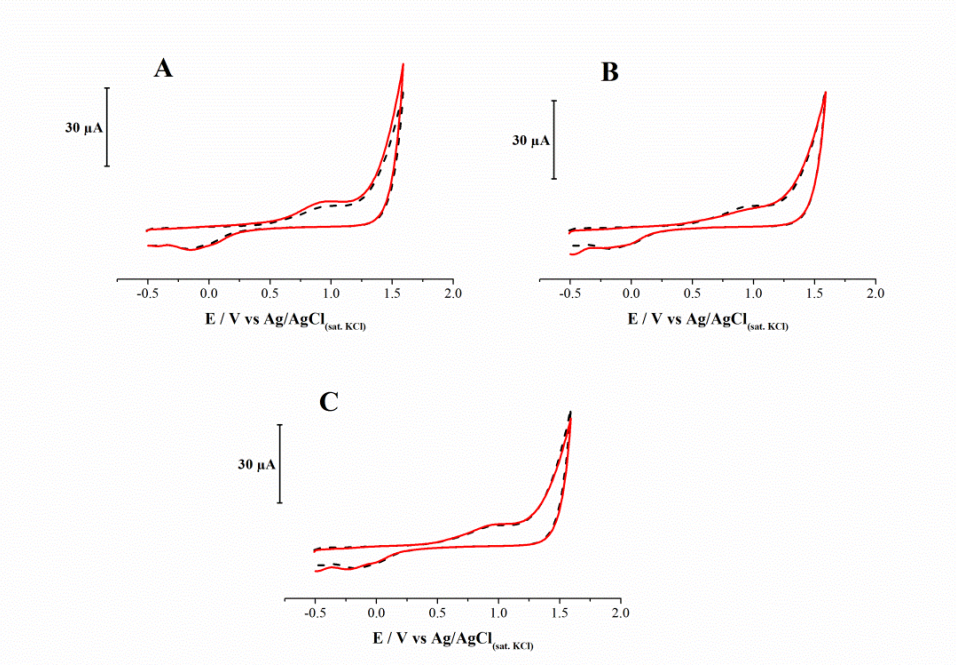


Figura 4.3: Voltamogramas cíclicos registrados em leite integral usando eletrodo de trabalho de platina, na ausência (linha tracejada) e presença (linha sólida) de formaldeído 10,0 mmol L^{-1} (A), melamina 0,95 mmol L^{-1} (B) e ureia 4,16 mmol L^{-1} (C). V = 100 mV s^{-1}.

Já com os ensaios realizados com o eletrodo de cobre (Figura 4.4), os voltamogramas demonstram a oxidação do metal no potencial perto de 0,0 V, formando íons cobre em solução que são reduzidos na superfície do eletrodo, em -0,2 V. A formação de íons cobre ocorre em uma maior extensão e em um potencial menos positivo na presença de ureia (Figura 4.4C). Além disso, a redução pode ser observada a partir de 0,2 V até aproximadamente -0,8 V para as amostras contaminadas com melamina (Figura 4.4B).

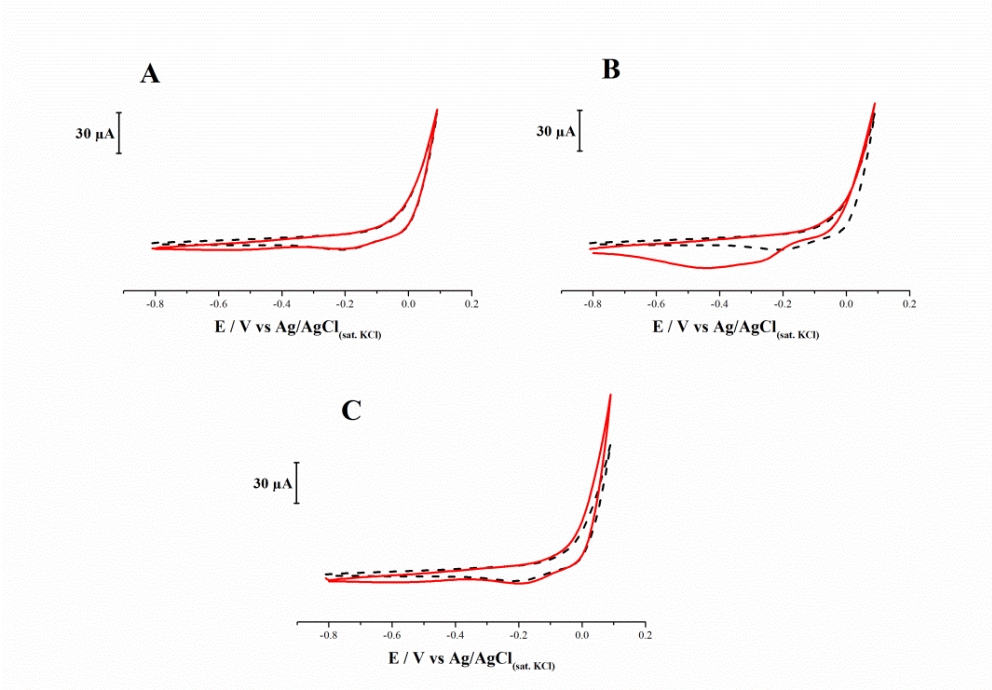
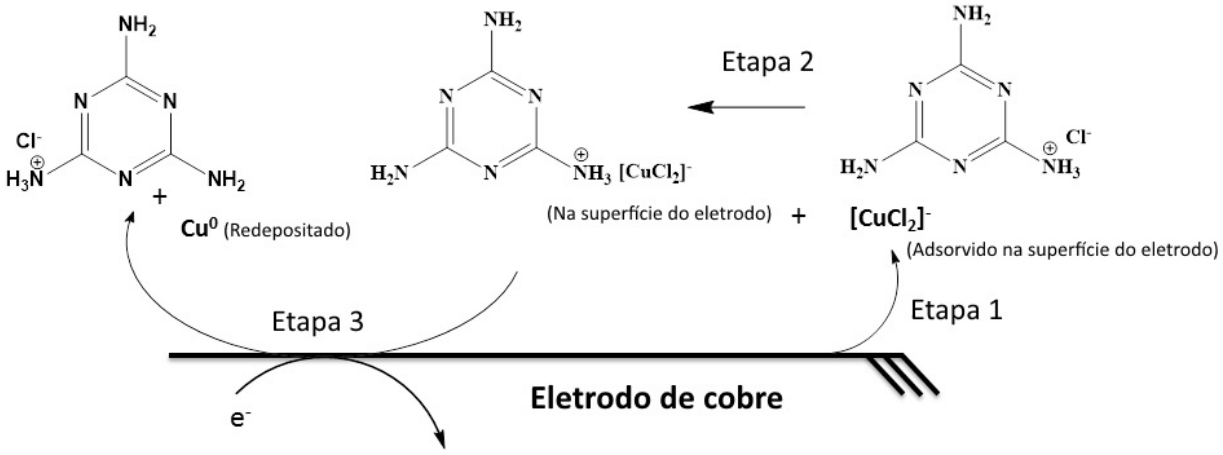


Figura 4.4: Voltamogramas cíclicos registrados em leite integral usando eletrodo de trabalho de cobre, na ausência (linha tracejada) e presença (linha sólida) de formaldeído 10,0 mmol L^{-1} (A), melamina 0,95 mmol L^{-1} (B) e ureia 4,16 mmol L^{-1} (C). V = 100 mV s^{-1}.

Este comportamento eletroquímico diferenciado para a melamina é devido à redução do par iônico formado entre melamina e os íons cobre [168], como mostrado no Esquema 4.1. Durante a varredura positiva (E > 0), íons cobre são formados em um potencial próximo de 0,0 V formando um par iônico in situ entre íons cobre e melamina. Na varredura negativa, este sinal faradaico mais largo, devido à redução das espécies formadas, está associado com a etapa lenta de adsorção do par iônico. Este mecanismo foi previamente mostrado em detalhes na literatura por Araujo e Paixão [168]. O mecanismo proposto envolve a oxidação anódica de Cu no primeiro passo (Etapa 1), seguido pela formação do par iônico de cloreto de cobre com melamina (passo 2), e a redução eletroquímica do par iônico de cloreto de cobre com melamina (passo 3).

Esquema 4.1: Formação e redução do par iônico de cloreto de cobre com melamina.



Os efeitos da contaminação com formaldeído, melamina e ureia nos voltamogramas foram avaliados para amostras de leite desnatado e semidesnatado, onde foram obtidos resultados similares, sendo as pequenas diferenças atribuídas principalmente aos diferentes conteúdos de gordura de cada tipo de leite [85].

Todos os valores de corrente obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos até este ponto registrados (exceto os da microbalança) foram usados como dados de entrada dos métodos de reconhecimento de padrão não supervisionado PCA e HCA. Os gráficos obtidos com cada eletrodo estão apresentados na Figura 4.5, onde é possível observar também aquele referente ao arranjo de eletrodos (Au, Cu e Pt). A partir dessa informação e dos gráficos de HCA (Figura 4.6) é possível verificar que o arranjo de eletrodos é a melhor opção no processo de discriminação dos adulterantes. O arranjo de eletrodos juntamente com a PCA permitiu discriminar entre as amostras adulteradas e não-adulteradas, sem qualquer erro de discriminação, demonstrando que dispositivo poderia ser aplicado como um método econômico e rápido para a discriminação das amostras de leite adulteradas com formaldeído, melamina e ureia.

Para o eletrodo de ouro, várias das amostras adulteradas não foram agrupadas corretamente, o que torna impossível separar claramente os adulterantes, em especial, a ureia e a melamina. Esse fato se deve aos voltamogramas cíclicos registrados na presença de melamina e de ureia serem

semelhantes (Figura 4.1B e 4.1C, respectivamente), de modo que a ferramenta quimiométrica não consegue distinguir uma da outra.

Quando se utiliza o eletrodo de cobre, as amostras adulteradas com melamina (Figura 4.4) podem ser claramente diferenciadas das demais amostras de leite. Este comportamento pode ser explicado pela formação do par iônico entre melamina e cobre que é reduzido entre -0,2 V e 0,8 V, como explicado anteriormente. Contudo, não é possível distinguir entre algumas amostras adulteradas com formaldeído daquelas contendo ureia, demonstrando que este eletrodo sozinho não é suficiente para discriminar entre as amostras contaminadas.

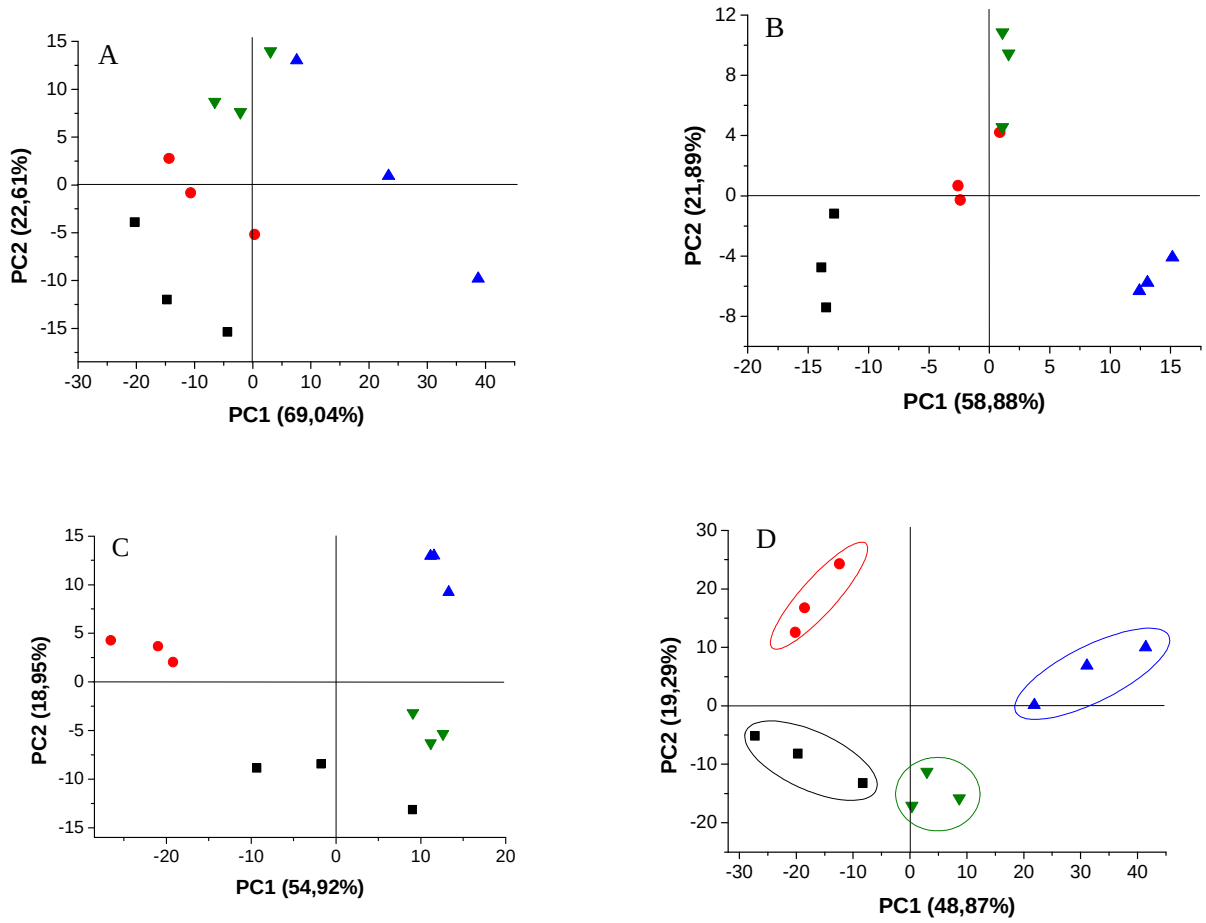


Figura 4.5: Gráfico de escores de amostras comerciais de leite não adulteradas (quadrados pretos) e adulteradas com 10,0 mmol L^{-1} formaldeído (círculos vermelhos), 0,95 mmol L^{-1} melamina (triângulos azuis), e 4,16 mmol L^{-1} ureia (triângulos verdes) usando valores de corrente registrados

com os eletrodos de trabalho de ouro (A), cobre (B), platina (C) e arranjo de três eletrodos de trabalho (Au, Pt e Cu) (D). Número de replicatas: 3

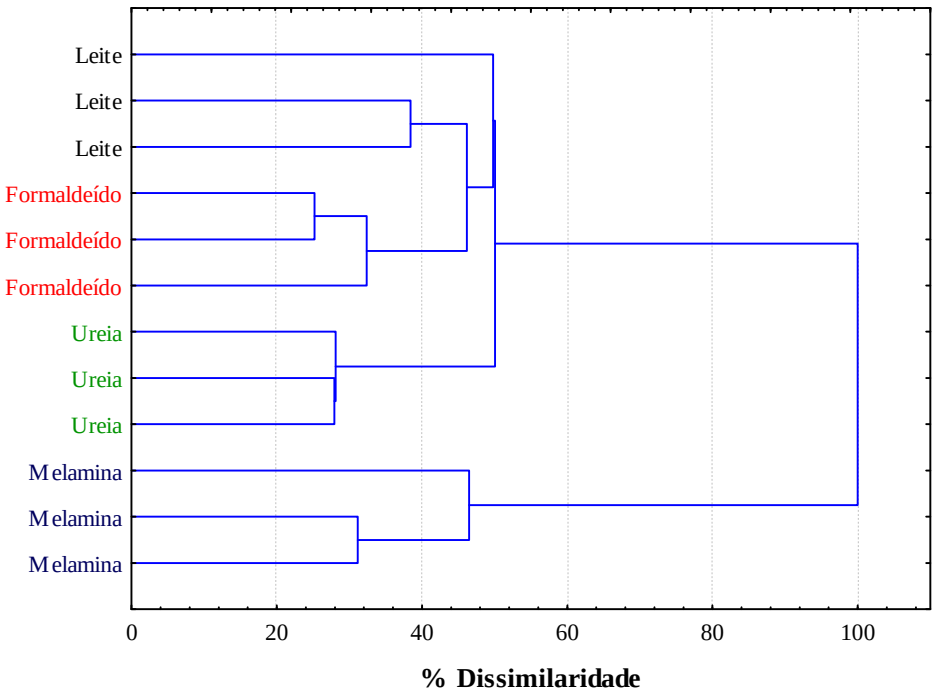


Figura 4.6: Gráfico de HCA de amostras comerciais de leite integral não adulteradas e adulteradas com 10,0 mmol L^{-1} formaldeído (círculos vermelhos), 0,95 mmol L^{-1} melamina, e 4,16 mmol L^{-1} ureia usando valores de corrente registrados com arranjo de três eletrodos de trabalho (Au, Pt e Cu)

Os resultados obtidos utilizando-se o eletrodo de platina (Figura 4.5) mostram a diferenciação com sucesso entre todas as amostras na PCA. Apesar desta aparente boa discriminação, quando a HCA foi realizada, o resultado demonstra que as três amostras do leite não adulterado foram erroneamente discriminadas pela PCA, o que significa que o método apresenta um erro de 25 % (3 amostras de 12 amostras). Para os eletrodos de ouro e cobre os erros foram, respectivamente, 8,3 % (uma de 12 amostras), ou seja, uma amostra do leite adulterado com melamina e 16,7% (2 amostras de 12 amostras), ou seja, uma amostra de leite puro e outra adulterada com formaldeído.

Uma vez que não foi possível diferenciar entre as amostras utilizando os valores de corrente extraídos dos voltamogramas cíclicos obtidos a partir dos eletrodos individuais, a utilização de uma combinação de sinais foi proposta a fim de conseguir uma boa separação entre as amostras adulteradas e não adulteradas, além de distinguir entre os três contaminantes. Figura 4.5D mostra o gráfico de PCA obtido usando os valores de corrente dos eletrodos de ouro, platina e cobre, com e sem adulterantes. A separação clara entre as amostras não adulterados e cada adulterante pode ser observada. Este resultado foi verificado pelo gráfico de HCA (Figura 4.6), onde não há amostras erroneamente agrupadas, demonstrando que a combinação das informações extraídas através dos três eletrodos pode ser utilizada para discriminar entre amostras de leite não adulteradas e aquelas adulteradas com formaldeído, melamina ou ureia.

Um gráfico de pesos (não mostrado) foi construído com o intuito de determinar qual variável extraída por cada eletrodo foi responsável pela discriminação entre os adulterantes. Como esperado a partir da análise dos perfis de voltametria, as variáveis responsáveis pela identificação de melamina foram relacionadas com o eletrodo de trabalho de cobre, que forma um par iônico com este contaminante, juntamente com o eletrodo de ouro, o qual teve a sua superfície altamente bloqueada por esse analito. A variável extraída com o uso do eletrodo de trabalho de ouro foi também responsável pela separação de amostras adulteradas com ureia a partir dos outros contaminantes, ao passo que as variáveis extraídas com o eletrodo de platina foram identificadas como sendo responsáveis pela discriminação das amostras adulteradas com formaldeído. Ao comparar os resultados dos gráficos de pesos com os de PCA e HCA de cada eletrodo individualmente, amostras adulteradas com ureia e melamina foram correlacionadas com o eletrodo de ouro (Figura 4.5A), o que o motivo dos dados deste eletrodo serem os responsáveis pela discriminação entre essas amostras. Tal como anteriormente mencionado, na PCA do eletrodo de cobre (Figura 4.5B), as amostras de melamina estão localizados distante dos demais adulterantes, o que indica que o eletrodo de cobre provavelmente desempenha um papel importante na discriminação da melamina, tal como confirmado pelo gráfico de pesos. Na Figura 4.5C, pode ser visto que, para o eletrodo de platina, as amostras de formaldeído foram todas agrupadas distantes das outras amostras, demonstrando novamente concordância entre os resultados obtidos a partir das PCA dos eletrodos individuais e os obtidos pela combinação da informação extraída a partir de todos os eletrodos de trabalho.

Experimentos também foram realizados em amostras de leite desnatado e semi- desnatado contaminados com os mesmos três adulterantes. A Figura 4.7 mostra os gráficos tridimensionais destas amostras de leite, todos resultados obtidos para uma mesma marca (Elegê®). Um gráfico 3D, Figura 4.7, foi usado em vez de um 2D, a fim de incluir uma maior quantidade de informação total (85,42 % , gráfico 3D; 68,16 %, gráfico 2D), o que resultou em uma melhor discriminação entre as amostras. Os gráficos de PCA para cada tipo de leite indicaram que as amostras não adulteradas podem ser discriminadas das adulteradas, e também podem ser separados por adulterantes. As amostras contendo os mesmos adulterantes podem ser vistas localizadas em regiões distintas dos gráficos para cada tipo de leite, no entanto, a variável extraída responsável pela identificação de cada adulterante foi tida como a mesma, mas com uma maior ou menor significância. Estas diferenças podem ser atribuídas às diferentes porcentagens de gordura em cada tipo de leite, o que leva a diversas interações entre as amostras e os eletrodos do arranjo [85].

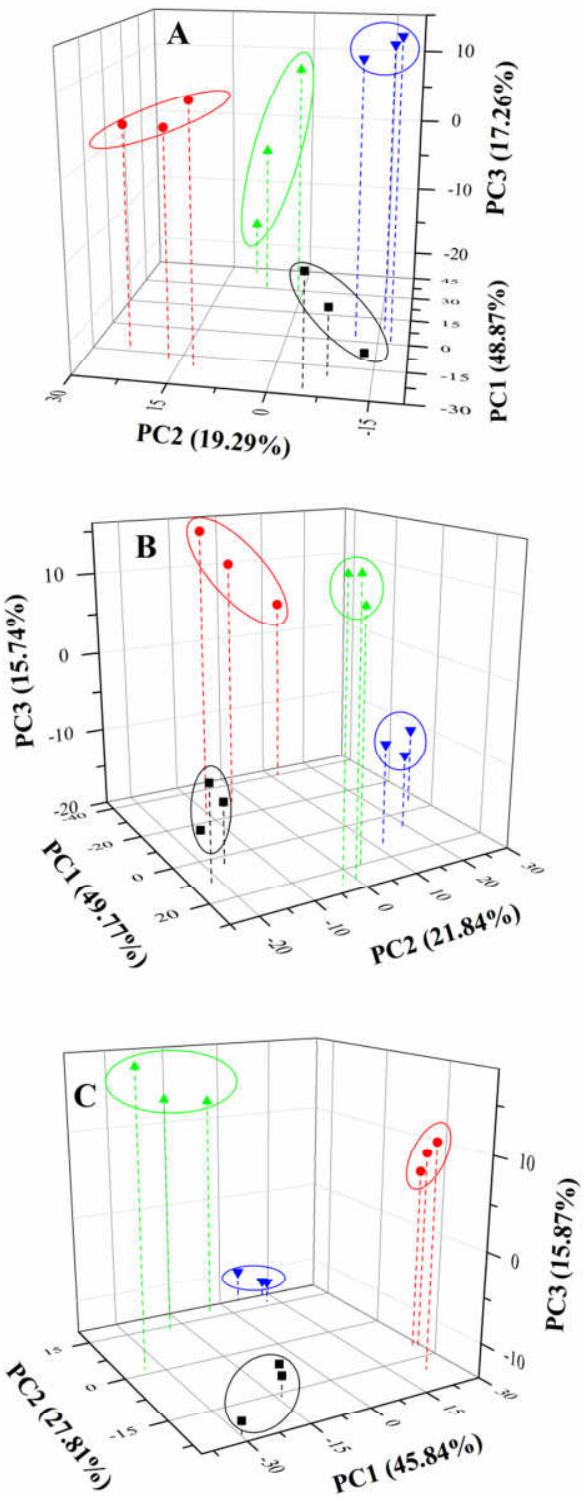


Figura 4.7: Gráficos de PCA de amostras de leite da marca Elegê dos tipos: integral (A), desnatado (B) e semidesnatado (C). Amostras comerciais de leite não adulteradas (quadrados pretos) e adulteradas com formaldeído (círculos vermelhos), melamina (triângulos para baixo azuis), ureia (triângulos para cima verdes)

Outras duas marcas foram testadas, Qualitá e Parmalat, com amostras também de leite integral, desnatado e semi-desnatado. Os resultados obtidos seguiram os mesmos padrões de discriminação obtidos com a marca Elegê, indicando que o método proposto não se limita a uma única marca ou tipo de leite.

Com isso, o método proposto, língua eletrônica composta por três eletrodos de trabalho (Au, Cu e Pt) pode ser usada com o intuito de discriminar rapidamente amostras de leite adulterado com ureia, melamina e formaldeído. Além disso, a concentração de melamina detectada é menor que a metade daquela utilizada no caso de adulteração na China, onde milhares de pessoas sofreram com esse processo de adulteração.

4. Conclusões

Demonstrou-se a possibilidade de fabricação de uma língua eletrônica para uma rápida e eficiente detecção de adulteração de leite com ureia, formaldeído e melamina, onde os sinais voltamétricos registrados com diferentes eletrodos de trabalho foram usados como dados de entrada para os métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados (PCA e HCA). A língua eletrônica voltamétrica proposta utilizou eletrodos metálicos e foi capaz de discriminar entre os três contaminantes anteriormente mencionados em concentrações acima de 10,0, 4,16, e 0,95 mmol L^{-1} para o formaldeído, ureia e melamina, respectivamente. Os limites de discriminação alcançados são superiores aos relatados na literatura, incluindo a quantificação de um único adulterante e técnicas eletroquímicas relatado por Cao et al. [169] e Trivedi et al. [170], que relataram limites de detecção de $9,6 \times 10^{-9}$ mol L^{-1} para a melamina e $2,5 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} para a ureia. Nãoé do nosso conhecimento qualquer estudo analisando o teor de formaldeído em amostras de leite utilizando sensores eletroquímicos. Em contraste, o método proposto foi desenvolvido sem uma etapa de pré-tratamento e os três adulterantes foram analisados em conjunto e não individualmente. Semelhante a nossa abordagem, Corton et al. [92] propuseram uma discriminação quimiométrica simultânea utilizando sinais voltamétricos para a ureia e melamina atingindo os limites de discriminação de 121,4 g L^{-1} (2 mol L^{-1}) e 85 mg L^{-1} (0,7 mmol L^{-1}) para ureia e melamina, respectivamente. É importante destacar que o limite de discriminação para a ureia é maior do que o proposto neste trabalho e semelhante para a discriminação de melamina. Além

disso,é possível detectar simultaneamente pelo método proposto estes três processos de adulteração com limites de discriminação abaixo das doses de ingestão toleráveis recomendadas pelas organizações de saúde e os encontrados em casos reais, em que os fraudadores utilizam grandes quantidades de adulterantes, como na China [171]. Diferentes marcas de leite foram analisadas utilizando esse método, demonstrando assim que a língua eletrônica proposta tem grande potencial para diferenciação entre adulterações em uma ampla variedade de marcas de leite.

CAP.5 – PERSPECTIVAS: DISCRIMINAÇÃO DE ALIMENTOS

MIP: uma alternativa interessante

Na tentativa de detecção da contaminação de alimentos por agentes químicos ou biológicos, bem como na discriminação dessas contaminações, alguns caminhos podem ser seguidos, como aqueles que foram apresentados neste trabalho. Para a contaminação biológica, nossa proposta foi o desenvolvimento de uma embalagem que tivesse como segunda função atuar como um detector da presença de organismos patogênicos e, consequentemente, potencial causador de doenças de origem alimentar. No caso das contaminações químicas, em uma amostra específica aqui, a proposta foi usar um dispositivo que pode ser miniaturizado e utilizado diretamente em amostras nas casas dos consumidores ou ainda na fase de produção. Entretanto há outras maneiras de se detectar a presença de micro-organismos e a de substâncias químicas também de uma forma rápida e específica, a utilização de polímeros molecularmente impressos.

Os polímeros molecularmente impressos – *do inglês molecularly imprinted polymers (MIPs)* – estão sendo largamente utilizados como receptores sintéticos à base de polímeros ou como anticorpos artificiais por sua habilidade em mimetizar sistemas naturais. Entretanto, quando comparados aos produtos naturais de reconhecimento, eles oferecem diversas vantagens como robustez, especificidade, baixo custo e possibilidade de reutilização [172].

Uma vantagem inerente da impressão molecular, que tem sido comprovado por muitos exemplos, é a possibilidade de sintetizar adsorventes com seletividade pré-determinada para um analitos em particular. A etapa chave da técnica é a polimerização dos monômeros funcionais na presença das espécies a serem impressas (analitos alvo); a subsequente remoção das moléculas impressas deixa para trás cavidades específicas. Os monômeros funcionais se tornam espacialmente fixos no polímero via interações com as espécies impressas durante a reação de polimerização. O resultado é a formação de marcas (cavidades) no polímero que são complementares estérica e quimicamente ao ligante da modelagem. Estas modelagens possibilitam ao polímero religar seletivamente a molécula impressa mesmo em uma mistura de compostos [173] .

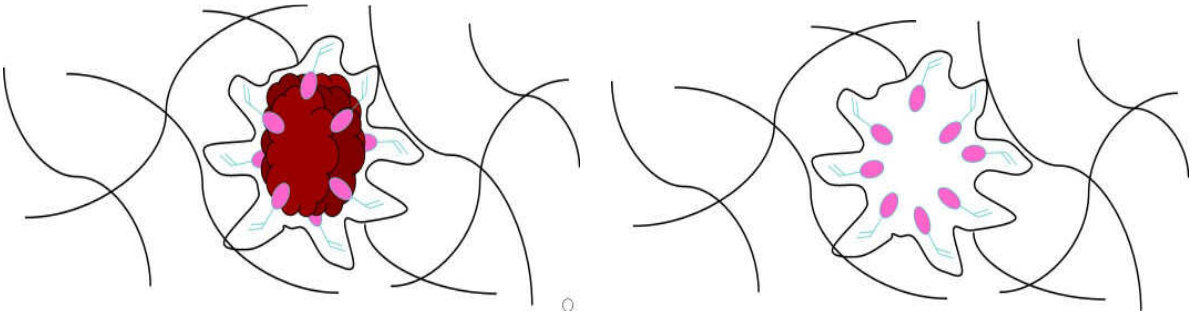


Figura 5.1: Polimerização e formação da cavidade específica do monômero.

Os MIPs aqui demonstrados são parte da linha de pesquisa do Dr. Subrayal M. Reddy, da Universidade de Surrey, no Reino Unido, com o qual tivemos o prazer de trabalhar e sermos apresentados a este assunto. Eles são testes preliminares para o desenvolvimento de biomarcadores de doenças como, por exemplo, o câncer. Aparentemente estes testes e amostras não estão relacionados ao nosso trabalho, entretanto eles serviram de modelo para a demonstração da técnica, que pode ser aplicada a qualquer molécula (inicialmente).

O principal objetivo do trabalho foi demonstrar o uso de técnicas de reconhecimento de padrões para identificar os perfis das impressões digitais das proteínas acopladas com caracterização eletroquímica, o que nos levou a uma interação entre MIPs e língua eletrônica, uma relação nova mas com muito potencial [174]. Para isso, utilizamos MIPs de quatro diferentes proteínas modificando eletrodos de carbono vítreo para posteriores registros de voltamogramas cíclicos e discriminação com ferramentas quimiométricas.

2. Procedimentos experimentais

2.1. Estudo eletroquímico utilizando MIPs para fabricação de línguas eletrônicas

Acrilamida (AA), N,N-metilenebisacrilamida (bis-AA), persulfato de amônio (APS), N,N,N,N-tetrametiletildiamina (TEMED), duodecil sulfato de sódio (SDS), ácido acético glacial (AcOH), tampão fosfato salino (PBS) em pastilhas (137 mmol L^{-1} NaCl; 27 mmol L^{-1} KCl; 10 mmol L^{-1}

Na_2HPO_4; 1,76 mmol L^{-1} KH_2PO_4), dicloreto de metilviologênio hidratado, hemoglobina bovina, albumina sérica bovina, citocromo C, e mioglobina de coração equina foram todas compradas da Sigma-Aldrich (Poole, UK). Peneiras (75 µm) foram compradas da Inoxia Ltd. (Guildford, UK). Membranas de policarbonato de 25 mm de diâmetro, com tamanhos de poro de 0,8 µm foram compradas de Osmonic Inc., Minnetonka, USA.

Hidrogéis para hemoglobina bovina (haemoglobin bovine (BHb)), albumina sérica bovina (bovine serum albumin (BSA)), citocromo C (cytochrome C (Cyt C)), e mioglobina de coração equino (equine heart myoglobin (EMb)) foram sintetizados individualmente por dissolução AA (54 mg) e bis-AA como agente de reticulação (6 mg), juntamente com a proteína a ser analisada (12 mg) em 1 ml de água desionizada. As soluções foram purgadas com nitrogênio durante 5 minutos, seguido por uma adição de 20 mL de uma solução de APS 10% (m / v) e 20 mL de uma solução de 5% (v / v) de TEMED. A polimerização ocorreu à temperatura ambiente, resultando em densidades de reticulação finais de 10%. Para cada MIP criado, um polímero controle não-impresso (NIP, do inglês, *non-imprinted polymer*) foi preparado de um modo idêntico, mas na ausência de proteína.

Depois da polimerização, os géis foram granulados separadamente, utilizando uma peneira de 75 µm. Dos géis resultantes, 0,5 ml foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL de centrífuga (Hamburgo, Alemanha) e condicionado por lavagem com cinco volumes de 1 mL de de tampão PBS 150 mmol L^{-1} (pH 7,4). Isto foi seguido por cinco volumes de 1 mL solução do eluente 10% de AcOH/SDS (pH 2,8). Um período adicional de cinco lavagens de 1 mL de de tampão PBS 150 mmol L^{-1} (pH 7,4) foram realizados para remover qualquer resíduo do eluente AcOH: SDS e equilibrar o gel. Cada passo do condicionamento foi seguido por uma etapa de centrifugação usando uma mini centrífuga Eppendorf (Hamburgo, Alemanha) durante 3 minutos a 6000 rpm (RCF: 2419 xg).

2.2. Análises eletroquímicas

As superfícies dos eletrodos de carbono vítreo foram modificadas individualmente com 20 mg de MIP Cyt c, BHb, EMb e BSA. A camada de MIP foi mantida no eletrodo com a utilização

de membrana de policarbonato, com poros de 0,8 mm, juntamente com um o-ring para prender a membrana. A membrana de policarbonato foi escolhida porque os seus poros são suficientemente pequenas para reter o gel (75 mm de tamanho de partícula) e , ao mesmo tempo , suficientemente grandes para permitir que a proteína se difunda através da solução. A janela de potencial de todas as medições químicas foi de 0,0 a -0,9 V com uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}; um eletrodo de referência $Ag/AgCl_{KCl\ saturado}$ e um fio de platina como contraeletrodo, sistema ligado a um potenciostato / galvanostato Autolab II (Utrecht, Holanda) . Os eletrodos modificados foram colocados numa solução de PBS (pH 7,4) e SDS a 5 % (m / v) e analisadas após um período de equilíbrio de 20 minutos . Subsequentemente, as soluções de 15,4 mmol L^{-1} de proteína (BHb , BSA , EMb e Cyt c) dissolvido em tampão PBS (pH 7,4) e SDS a 5 % (m / v), foram colocadas de forma independente na célula e voltamogramas foram obtidos em intervalos de 10 minutos durante 60 minutos . Deve notar-se que as soluções de proteína foram agitadas entre medições, durante 3 minutos; eletrodos GC foram limpos, polidos e testados com metilviologênio entre cada novo experimento tanto de MIP, quanto de NIP.

2.3. Análises quimiométricas

Análise de componentes principais (PCA) e Análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) foram realizadas utilizando o software Statistica 11.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). As análises foram realizadas utilizando os valores de densidade de corrente voltamétricas sem previo pré-processamento ou escalonamento provenientes dos eletrodos de GC limpos ou modificados como dados de entrada para as ferramentas quimiométricas. Todas as curvas voltamétricas foram registradas três vezes para cada amostra em uma ordem aleatória usando um GC limpo ou um novo eletrodo de GC modificado.

3. Resultados e discussão

Com o intuito de permitir o reconhecimento de biomarcadores de doenças, algumas proteínas de grande importância biológica foram analisadas: hemoglobina (BHb – bovine

hemoglobin), mioglobina (EMb – equine mioglobin), citocromo c (Cyt C) e albumina (BSA – bovine serum albumin). Através do monitoramento delas, um rápido diagnóstico do tipo de câncer ou outra doença pode se tornar possível.

Três das quatro proteínas utilizadas nos ensaios são metaloproteinas e é de se esperar que elas apresentem sinal eletroquímico, por apresentarem um centro ativo (metal). Entretanto, suas estruturas tridimensionais não permitem a exposição desses centros e utilizando eletrodos convencionais não é possível que haja a transferência de elétrons e consequente sinal eletroquímico detectável. Então é preciso que as mesmas sofram mudanças de conformações permitindo a redução dos grupos heme na superfície do eletrodo de carbono vítreo e promovendo a eletrocatálise da redução do oxigênio [173].

A fim de confirmar esta afirmação foram registrados voltamogramas cíclicos com eletrodo de carbono vítreo limpo na presença do surfactante SDS nas soluções das proteínas. As concentrações das proteínas em solução foram 15,4 µmol L^{-1} (BHb - 1 mg mL^{-1}, BSA – 0,98 mg mL^{-1}, EMb – 0,26 mg mL^{-1}, and Cyt C – 0,185 mg mL^{-1}), em uma solução que continha tampão PBS (pH 7,4) e 5% SDS (m/v). Como pode ser visto na Figura 5.2, na presença de BSA e Cyt é possível ver um sinal de redução catódica do oxigênio dissolvido, o que foi confirmado com o borbulhamento de argônio na solução utilizada. Já para as proteínas BHb e EMb, um deslocamento do pico de redução pode ser observado para um potencial menos negativo, o que indica que o processo eletrocatalítico acontece na superfície do eletrodo.

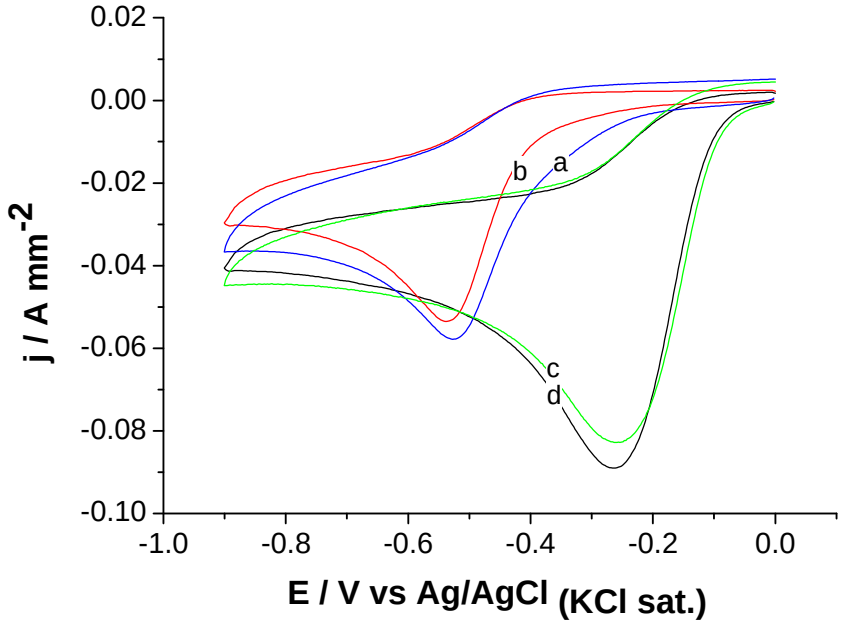
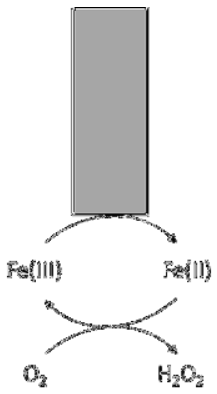


Figura 5.2: Voltamogramas cíclicos registrados com eletrodo de carbono vítreo em tampão PBS (pH 7,4), SDS 5% (m/v), na presença da solução proteica (15,4 µmol L^{-1}) (Cyt C (a), BSA (b), EMb (c) e BHb (d)). v = 100 mV s^{-1}.

Esta mudança ocorre provavelmente porque na mudança de conformação as proteínas BHb e EMb têm seus centros de ferro expostos e por isso a redução do Fe (III) a Fe (II) ocorre na superfície do eletrodo eletrocatalisando a redução do oxigênio, que não mais ocorre na superfície do eletrodo, ver esquema 5.1.



Esquema 5.1: Mecanismo da mudança de conformação ocorrida nas proteínas com centros de ferros expostos em contato com SDS.

Com o propósito de discriminar as proteínas, os dados de corrente dos voltamogramas foram utilizados como dados de entrada da ferramenta PCA e o gráfico obtido pode ser visto na Figura 5.3.

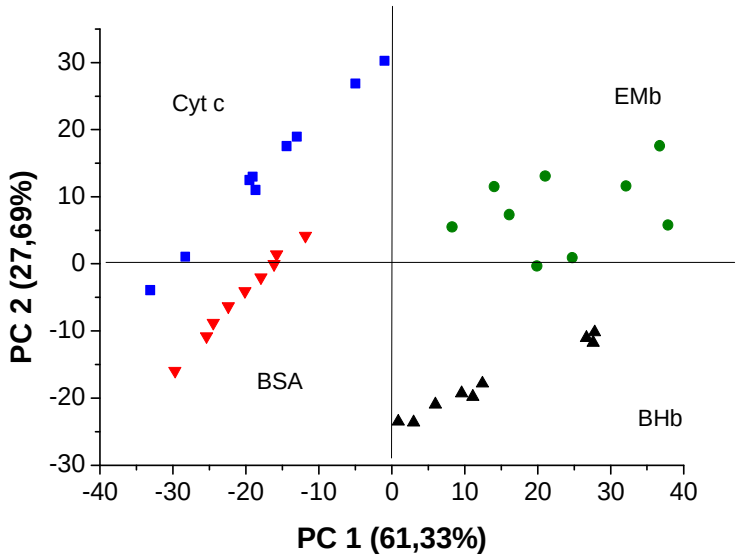


Figura 5.3: Gráfico de escores obtido em solução de PBS (pH 7.4), SDS 5% (m/v) usando os dados de densidade de corrente na presença de cada proteína (15,4 µmol L^{-1}). E_i=0,0 V, E_{V1}=-0,9 V, E_f = 0,0 V= 100 mV s^{-1}.

A Figura 5.3. mostra uma discriminação não muito clara, o que foi confirmado por erros de discriminação das amostras com a ferramenta HCA. Na PCA só é possível perceber com nitidez a separação entre as proteínas que apresentam exposição de seus centros de ferro (BHb, EMb) daquelas que não apresentam (Cyt e BSA). Desejando uma discriminação mais clara, tentou-se utilizar os MIPs das proteínas, a fim de que os mesmos se mostrassem seletivos e as discriminações fossem melhoradas.

Dessa forma, os eletrodos modificados com os MIPs foram utilizados em ensaios voltamétricos na presença das soluções destas proteínas bovinas e equinas na tentativa de se obter sinais analíticos capazes de diferenciar e também que demonstrassem a afinidade dos MIPs por

suas proteínas específicas. Os eletrodos foram recobertos com uma camada do polímero contendo as cavidades de uma das proteínas (BHb, Mb, Cyt C, BSA) (MIP) e com ele foram registrados voltamogramas em solução da proteína específica daquela cavidade e também nas demais proteínas, para que houvesse comparação entre os resultados. As soluções das proteínas foram preparadas em tampão PBS e a elas foram adicionadas SDS 5%. A Figura 5.4 mostra a discriminação obtida com os voltamogramas registrados no momento em que o eletrodo foi colocado em contato com a solução de proteína (tempo 0 minuto). Na Figura 5.4 é possível ver que não há grupamentos bem definidos.

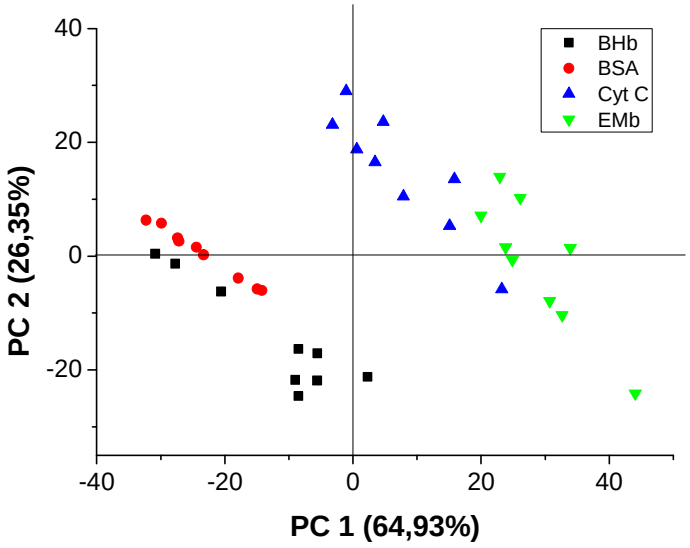


Figura 5.4: Gráfico de escores obtido em solução de PBS (pH 7.4), SDS 5% (m/v), com um eletrodo de carbono vítreo modificado com polímero de BHb MIP usando os dados de densidade de corrente na presença de cada proteína (15,4 µmol L^{-1}). E_i=0,0 V, E_{V1}=-0,9 V, E_f = 0,0 V= 100 mV s^{-1}. Medidas realizadas após 0 min de exposição à proteína.

Como era preciso conhecer o tempo de difusão da proteína através do polímero, registros foram feitos a cada 10 minutos, durante uma hora em cada solução de proteína. A Figura 5.5 mostra o gráfico de escores obtido após 10 minutos de exposição do MIP às soluções de todas as proteínas (realizadas separadamente, uma a uma). Com os dados de corrente dos voltamogramas foi possível discriminar as proteínas com o auxílio das ferramentas quimiométricas e elas

mostraram que não há erros de classificação entre os grupos, o que mostrou que o tempo necessário para a completa difusão das proteínas através do polímero é de apenas 10 minutos, pois após esse tempo, até o final (60 minutos) o perfil se manteve o mesmo (dados não mostrados).

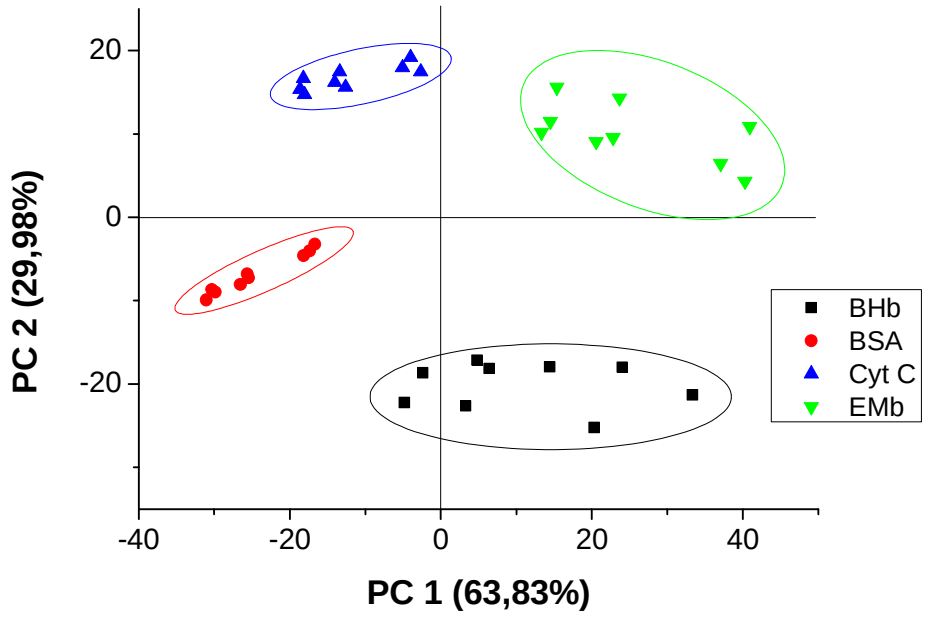


Figura 5.5: Gráfico de escores obtido em solução de PBS (pH 7,4), SDS 5% (m/v), com um eletrodo de carbono vítreo modificado com polímero de BHb MIP usando os dados de densidade de corrente na presença de cada proteína (15,4 µmol L^{-1}). E_i=0,0 V, E_{V1}=-0,9 V, E_f = 0,0 V= 100 mV s^{-1}. Medidas realizadas após 10 min de exposição à proteína.

Para confirmar os resultados obtidos com a PCA foram registrados também gráficos de HCA, sendo um deles mostrado na Figura 5.6, o que concordou com os dados de PCA, ilustrando a discriminação de cada proteína em um grupo distinto, sem erros de discriminação. Para cada MIP testado foi utilizado um controle, chamado NIP (*do inglês, non-molecular imprinted polymer*), um polímero que não continha a cavidade da proteína.

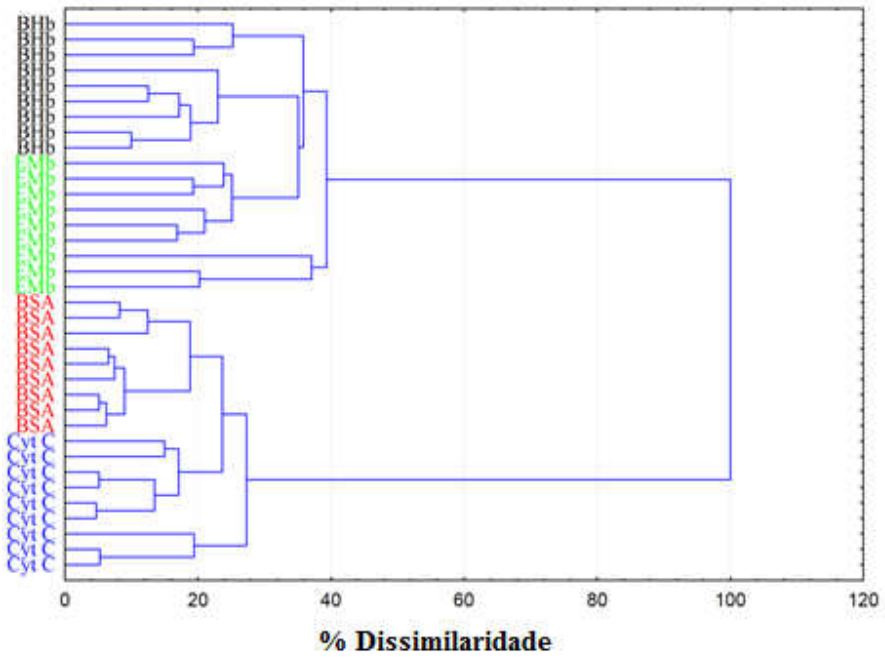


Figura 5.6: Gráfico de HCA obtido em solução de PBS (pH 7,4), SDS 5% (m/v), com um eletrodo de carbono vítreo modificado com polímero de BSA MIP usando os dados de densidade de corrente na presença de cada proteína (15,4 µmol L^{-1}). E_i=0,0 V, E_{V1}=-0,9 V, E_f = 0,0 V= 100 mV s^{-1}. Medidas realizadas após 10 min de exposição à proteína.

O método proposto se mostrou eficiente para discriminar as quatro proteínas testadas, indicando que os eletrodos de carbono vítreo modificados com MIPs podem ser usados como sensores para tal discriminação. Observou-se que é preciso atingir uma taxa de aglomeração crítica das moléculas para que as moléculas possam se religar eficientemente as suas cavidades presentes nos hidrogéis utilizados para modificar eletrodos. Os testes também sugerem que o uso das ferramentas quimiométricas torna as detecções mais rápidas. A detecção de diversas proteínas se faz necessária quando se deseja diagnosticar doenças, tais como problemas cardíacos ou câncer. O método sugere que diversos MIPs podem ser utilizados no processo de discriminação, além da possibilidade de acoplamento de outras técnicas, tais como microbalança de cristal de quartzo e sensores ópticos.

CAP.5 – PERSPECTIVAS: DISCRIMINAÇÃO DE ALIMENTOS

Como dito anteriormente, o acoplamento entre MIPs e dispositivos inteligentes ainda é algo muito recente, entretanto com grande potencial para o sucesso, uma vez que ambas as ideias são simples, de fácil aplicação e podem ser utilizadas com diferentes amostras e meios. No caso específico de nosso trabalho, os MIPs poderiam ser utilizados para a detecção de contaminação de alimentos com agentes biológicos tanto através de seus VOCs como por meio de proteínas específicas dos micro-organismos. No caso da adulteração com substâncias químicas, a detecção poderia ser feita através de uma cavidade específica no sensor para diferentes adulterantes presentes nos alimentos.

Além disso, a ideia dos marcadores de doenças pode ser uma das linhas de investigação do grupo de pesquisa do professor Thiago Paixão, uma vez que há um interesse por este tipo de amostras e trabalhos do grupo relacionados a este tema.

Considerações finais

O trabalho apresentou algumas alternativas para a identificação e discriminação de alimentos contaminados por micro-organismos patogênicos e adulterados quimicamente. O primeiro dispositivo apresentado foi um nariz "optoeletrônico" que combina a utilização de um polímero biodegradável natural e compatível com alimentos, a incorporação de corantes, o uso de ferramentas quimiométricas e a utilização de um smartphone para a detecção das mudanças de coloração das membranas na embalagem dos alimentos quando estes estão contaminados com micro-organismos. O dispositivo proposto é um método rápido, barato e de fácil utilização para todos os consumidores, uma vez que, a simples mudança no padrão de cores das membranas é capaz de dizer o nível de contaminação e quais os micro-organismos responsáveis por ela. A ideia da inovação proposta é a incorporação à embalagem dos alimentos destas cinco membranas coloridas na forma de uma etiqueta que mudará de cor com a interação dos compostos voláteis que serão produzidos pelos micro-organismos que estarão colonizando os alimentos no processo de contaminação deles. Esta mudança na coloração pode ser analisada por um aplicativo instalado no smartphone do consumidor (ou vendedor), que terá como resposta o grau de contaminação e quais os organismos responsáveis por ela. Foram testados quatro micro-organismos patogênicos que estão relacionados a casos de contaminação de alimentos: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vilgaris* e *Proteus mirabilis*. Eles foram analisados em colônias reais a 37°C e 25°C.

Além do dispositivo colorimétrico para uso em embalagens, uma alternativa de análise para uso em ambientes de produção e armazenamento dos alimentos, como um dispositivo para monitoramento em tempo real foi proposto e obtido com sucesso. Foram avaliados os polímeros acetato de celulose e policloreto de vinila (PVC) no recobrimento dos cristais de quartzo de ouro para a medição da frequência. Aminas foram discriminadas com a ambos os polímeros, porém o acetato de celulose apesentou uma maior permeação dos compostos voláteis e por isso foi eleito para compor este sistema de monitoramento de compostos voláteis.

O segundo método propôs a discriminação de substâncias químicas utilizadas para a adulteração de leite. Uma língua eletrônica voltamétrica foi desenvolvida para a uma rápida e eficiente detecção de adulteração de leite com ureia, formaldeído e melamina. Os sinais

voltamétricos foram registrados com eletrodos de trabalho de ouro, platina e cobre foram usados como dados de entrada para os métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados (PCA e HCA). A língua eletrônica voltamétrica proposta utilizou eletrodos metálicos simples e foi capaz de discriminar entre os três contaminantes em concentrações acima de 10,0, 4,16, e 0,95 mmol L^{-1} para o formaldeído, ureia e melamina, respectivamente. O método proposto foi desenvolvido sem uma etapa de pré-tratamento e os três adulterantes foram analisados em conjunto e não individualmente, com limites de discriminação abaixo das doses de ingestão toleráveis recomendadas pelas organizações de saúde e os encontrados em casos reais, em que os fraudadores utilizam grandes quantidades de adulterantes, como na China [171]. Não é de nosso conhecimento qualquer estudo analisando o teor de formaldeído em amostras de leite utilizando sensores eletroquímicos. Diferentes marcas de leite e aqueles com diferentes teores de gordura foram analisadas utilizando esse método, demonstrando que a língua eletrônica proposta tem grande potencial para diferenciação entre adulterações em uma ampla variedade de leite.

A última parte do trabalho é uma alternativa para a discriminação de alimentos contaminados química e biologicamente através da utilização de MIPs (polímeros molecularmente impressos). De forma sucinta, a técnica cria cavidades que são estérica e quimicamente compatíveis com a molécula que se deseja analisar (analito). Aqui foi apresentado um experimento para mostrar a aplicação da técnica na área médica, porém ela pode ser aplicada a qualquer área. O método proposto se mostrou eficiente para discriminar quatro proteínas que estão relacionadas a disfunções fisiológicas (por isso podem ser consideradas como marcadores de doenças) e, para isso, eletrodos de carbono vítreo modificados com MIPs foram usados como sensores para tal discriminação em conjunto com as ferramentas quimiométricas PCA e HCA. A detecção de diversas proteínas se faz necessária quando se deseja diagnosticar doenças, tais como problemas cardíacos ou câncer. O método sugere que diversos MIPs podem ser utilizados no processo de discriminação, além da possibilidade de acoplamento de outras técnicas, tais como microbalança de cristal de quartzo e sensores ópticos.

Referências

[1] M. da saúde. BRASIL, *Doenças Transmitidas por Alimentos*. 2015.

[2] F. S. A. (FSA), "Foodborne Disease Strategy the Reduction of", *Scanning*, nº May, p. 1–24, 2011.

[3] CDC, "Estimates of Foodborne Illness in the United States", *CDC EStimates of Foodborn Illness in the United States*. 2011.

[4] J. Andrews, "The Prevalence of Foodborne Illness _ Food Safety News". Food Safety News, 2015.

[5] F. I. Brasil;, "Microorganismos causadores de doenças de origem alimentar", *Food ingredients Brasil*, vol. 19. p. 51 – 59, 2011.

[6] ANVISA, "Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação Resolução-RDC nº 216/2004", *Agência Nac. Vigilância Sanitária*, p. 1– 43, 2004.

[7] P. Baptista e A. Venâncio, *Infecções e Intoxicações Alimentares em Portugal*. 2003.

[8] J. R. Carey, K. S. Suslick, K. I. Hulkower, J. a. Imlay, K. R. C. Imlay, C. K. Ingison, J. B. Ponder, A. Sen, e A. E. Wittrig, "Rapid identification of bacteria with a disposable colorimetric sensing array", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, nº 19, p. 7571–7576, 2011.

[9] S.-K. Chou e M.-J. Syu, "Via zinc(II) protoporphyrin to the synthesis of poly(ZnPP-MAA-EGDMA) for the imprinting and selective binding of bilirubin", *Biomaterials*, vol. 30, nº 7, p. 1255–1262, 2009.

[10] M. Kai, M. Haustein, F. Molina, A. Petri, B. Scholz, e B. Piechulla, "Bacterial volatiles and their action potential", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 81, nº 6, p. 1001–1012, 2009.

[11] T. Wang, D. Smith, e P. Španěl, "Selected ion flow tube, SIFT, studies of the reactions of H3O+, NO+ and O2+ with compounds released by Pseudomonas and related bacteria", *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 233, nº 1–3, p. 245–251, abr. 2004.

[12] H. Elgaali, T. R. Hamilton-Kemp, M. C. Newman, R. W. Collins, K. Yu, e D. D. Archbold, "Comparison of long-chain alcohols and other volatile compounds emitted from food-borne and related Gram positive and Gram negative bacteria", *J. Basic Microbiol.*, vol. 42, nº 6, p. 373–380, 2002.

[13] R. C. Melo e R. M. B. Vidal, "A química dos sentidos - Uma proposta metodológica", *Rev. Química Nov. na Esc.*, vol. 35, nº 1, p. 182–188, 2013.

[14] J. Chandrashekar, M. a Hoon, N. J. P. Ryba, e C. S. Zuker, "The receptors and cells for mammalian taste.", *Nature*, vol. 444, nº 7117, p. 288–294, 2006.

[15] C. Wanjek, "The Tongue Map: Tasteless Myth Debunked | LiveScience". 2006.

[16] K. Persaud e G. Dodd, "Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose", *Nature*, vol. 299, nº 5881, p. 352–355, set. 1982.

[17] A. R. Yuri Vlasov, A. Legin e and A. D. C. Di Natale, "Nonspecific sensor arrays ('electronic

tongue') for chemical analysis of liquids (IUPAC Technical Report)", *Pure and Applied Chemistry*, vol. 77. p. 1965, 2005.

[18] M. O. Salles, G. N. Meloni, W. R. de Araujo, e T. R. L. C. Paixão, "Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach", *Anal. Methods*, vol. 6, nº 7, p. 2047, 2014.

[19] L. Bueno, "Desenvolvimento de línguas eletrônicas visando à aplicação em alimentos e combustíveis", Universidade Federal do ABC, 2012.

[20] J. W. Gardner e P. N. Bartlett, "A brief history of electronic noses", *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 18, nº 1–3, p. 210–211, 1994.

[21] F. Rock, N. Barsan, e U. Weimar, "Electronic nose: Current status and future trends", *Chem. Rev.*, vol. 108, nº 2, p. 705–725, 2008.

[22] Y. Tahara e K. Toko, "Electronic tongues-a review", *IEEE Sens. J.*, vol. 13, nº 8, p. 3001–3011, 2013.

[23] M. Scampicchio, S. Benedetti, B. Brunetti, e S. Mannino, "Amperometric electronic tongue for the evaluation of the tea astringency", *Electroanalysis*, vol. 18, nº 17, p. 1643–1648, 2006.

[24] E. Gobbi, M. Falasconi, I. Concina, G. Mantero, F. Bianchi, M. Mattarozzi, M. Musci, e G. Sberveglieri, "Electronic nose and Alicyclobacillus spp. spoilage of fruit juices: An emerging diagnostic tool", *Food Control*, vol. 21, nº 10, p. 1374–1382, 2010.

[25] G. Keshri, P. Voysey, e N. Magan, "Early detection of spoilage moulds in bread using volatile production patterns and quantitative enzyme assays", *J. Appl. Microbiol.*, vol. 92, nº 1, p. 165–172, 2002.

[26] S. H. Lim, L. Feng, J. W. Kemling, C. J. Musto, e K. S. Suslick, "An optoelectronic nose for the detection of toxic gases", *Nat. Chem.*, vol. 1, nº 7, p. 562–567, out. 2009.

[27] K. Toko, "Taste sensor with global selectivity", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 4, nº 2, p. 69–82, 1996.

[28] M. Gutiérrez, A. Llobera, J. Vila-Planas, F. Capdevila, S. Demming, S. Büttgenbach, S. Mínguez, e C. Jiménez-Jorquera, "Hybrid electronic tongue based on optical and electrochemical microsensors for quality control of wine.", *Analyst*, vol. 135, nº 7, p. 1718–25, 2010.

[29] D. Kirsanov, O. Zadorozhnaya, A. Krasheninnikov, N. Komarova, A. Popov, e A. Legin, "Water toxicity evaluation in terms of bioassay with an Electronic Tongue", *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 179, p. 282–286, 2013.

[30] L. Bueno e T. R. L. C. Paixão, "A Single Platinum Microelectrode for Identifying Soft Drink Samples", *Int. J. Electrochem.*, vol. 2012, p. 1–5, 2012.

[31] M. Valle, "Sensor Arrays and Electronic Tongue Systems", *Int. J. Electrochem.*, vol. 2012, p. 1–12, 2012.

[32] W. Novakowski, M. Bertotti, e T. R. L. C. Paix??o, "Use of copper and gold electrodes as sensitive elements for fabrication of an electronic tongue: Discrimination of wines and whiskies", *Microchem. J.*, vol. 99, nº 1, p. 145–151, 2011.

[33] C. Zhang e K. S. Suslick, "Colorimetric sensor array for soft drink analysis.", *J. Agric. Food Chem.*,

vol. 55, nº 2, p. 237–242, jan. 2007.

[34] Y. Wu, D. Huo, C. Hou, H. Fa, M. Yang, e X. Luo, “Colorimetric artificial nose for identification of breath volatile organic compounds of patients with lung cancer”, *Chem. Res. Chinese Univ.*, vol. 30, nº 4, p. 572–577, 2014.

[35] J. Gottfried, “Chemometric Analysis in LIBS”, *Handb. Laser- …*, p. 223–255, 2013.

[36] S. García-Martín, C. Herrero, R. M. Peña, e J. Barciela, “Solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) determination of volatile compounds in orujo spirits: Multivariate chemometric characterisation”, *Food Chem.*, vol. 118, nº 2, p. 456–461, 2010.

[37] J. R. Askim, M. Mahmoudi, e K. S. Suslick, “Optical sensor arrays for chemical sensing: the optoelectronic nose”, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, nº 22, p. 8649, 2013.

[38] L. Bueno, A. Cottell, S. M. Reddy, e T. R. L. C. Paixão, “Coupling dye-integrated polymeric membranes with smartphone detection to classify bacteria”, *RSC Adv.*, vol. 5, nº 119, p. 97962–97965, 2015.

[39] Y. Zhang, J. R. Askim, W. Zhong, P. Orlean, e K. S. Suslick, “Identification of pathogenic fungi with an optoelectronic nose.”, *Analyst*, vol. 139, nº 8, p. 1922–8, 2014.

[40] Q. Chen, H. Li, Q. Ouyang, e J. Zhao, “Identification of spoilage bacteria using a simple colorimetric sensor array”, *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 205, p. 1–8, 2014.

[41] H. L. and K. S. Suslick, “Colorimetric sensor array for Detection of Triacetone Triperoxide TATP vapor”, *Hengwei Lin Kenneth S. Suslick*, vol. 132, nº Figure 2, p. 15519, 2010.

[42] K. S. S. Benjamin A. Suslick, Liang Feng, “Discrimination of Complex Mixtures by a Colorimetric Sensor Array: Coffee Aromas”, *Anal. Chem.*, vol. 82, nº 5, p. 2067–2073, 2010.

[43] C. Zhang e K. S. Suslick, “A colorimetric sensor array for organics in water”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, nº 33, p. 11548–11549, 2005.

[44] ANEEL, “3 3.1.”, *Atlas Energ. Elétrica*, p. 16–32, 2005.

[45] K. S. Suslick, “An optoelectronic nose: ‘seeing’ smells by means of colorimetric sensor arrays.”, *MRS Bull.*, vol. 29, nº 10, p. 720–5, 2004.

[46] L. Feng, C. J. Musto, e K. S. Suslick, “A simple and highly sensitive colorimetric detection method for gaseous formaldehyde”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, p. 4046–4047, 2010.

[47] C. L. Lonsdale, B. Taba, N. Queralto, R. a. Lukaszewski, R. a. Martino, P. a. Rhodes, e S. H. Lim, “The Use of Colorimetric Sensor Arrays to Discriminate between Pathogenic Bacteria”, *PLoS One*, vol. 8, nº 5, 2013.

[48] B. Kuswandi, Jayus, A. Restyana, A. Abdullah, L. Y. Heng, e M. Ahmad, “A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film”, *Food Control*, vol. 25, nº 1, p. 18–189, 2012.

[49] Y. Salinas, J. V Ros-Lis, J.-L. Vivancos, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, S. Aucejo, N. Herranz, e I. Lorente, “Monitoring of chicken meat freshness by means of a colorimetric sensor array.”, *Analyst*, vol. 137, nº 16, p. 3635–3643, 2012.

[50] D. D. Liana, B. Raguse, J. Justin Gooding, e E. Chow, “Recent advances in paper-based sensors”, *Sensors (Switzerland)*, vol. 12, nº 9, p. 11505–11526, 2012.

[51] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, e G. M. Whitesides, “Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays”, *Angew. Chemie*, vol. 119, nº 8, p. 1340–1342, 2007.

[52] F. Dini, R. Paolesse, D. Filippini, A. D’Amico, I. Lundström, e C. Di Natale, “Fish freshness decay measurement with a colorimetric artificial olfactory system”, *Procedia Eng.*, vol. 5, p. 1228–1231, 2010.

[53] T. Eaidkong, R. Mungkarndee, C. Phollookin, G. Tumcharern, M. Sukwattanasinitt, e S. Wacharasindhu, “Polydiacetylene paper-based colorimetric sensor array for vapor phase detection and identification of volatile organic compounds”, *J. Mater. Chem.*, vol. 22, nº 13, p. 5970–5977, 2012.

[54] J. C. Jokerst, J. A. Adkins, B. Bisha, M. M. Mentele, L. D. Goodridge, e C. S. Henry, “a Paper-Based Analytical Device for the Colorimetric Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria”, p. 2116–2118, 2011.

[55] P. Rattanarat, W. Dungchai, D. Cate, J. Volckens, O. Chailapakul, e C. S. Henry, “Multilayer paper-based device for colorimetric and electrochemical quantification of metals”, *Anal. Chem.*, vol. 86, nº 7, p. 3555–3562, 2014.

[56] E. M. Zahran, A. New, V. Gavalas, e L. G. Bachas, “Polymeric plasticizer extends the lifetime of PVC-membrane ion-selective electrodes”, *Analyst*, vol. 139, nº 4, p. 757–763, 2014.

[57] R. Demir-Cakan, M. Morcrette, e J.-M. Tarascon, “Use of ion-selective polymer membranes for an aqueous electrolyte rechargeable Li-ion–polysulphide battery”, *J. Mater. Chem. A*, vol. 3, nº 6, p. 2869–2875, 2015.

[58] I. M. Christie, P. Treloar, S. Reddy, C. Hepburn, J. Hulme, e P. Vadgama, “Plasticized PVC as a high efficiency selective barrier for the amperometric detection of phenolics”, *Electroanalysis*, vol. 9, nº 14, p. 1078–1082, 1997.

[59] C.-Y. Chiou e T.-C. Chou, “Amperometric SO2 gas sensors based on solid polymer electrolytes”, *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 87, nº 1, p. 1–7, nov. 2002.

[60] R. Catalá, P. Hernández-Muñoz, e R. Gavara, *Environmentally Compatible Food Packaging*. Elsevier, 2008.

[61] L. Sutarlie e K.-L. Yang, “Colorimetric responses of transparent polymers doped with metal phthalocyanine for detecting vaporous amines”, *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 134, nº 2, p. 1000–1004, 2008.

[62] N. T. Greene e K. D. Shimizu, “Colorimetric molecularly imprinted polymer sensor array using dye displacement”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, nº 15, p. 5695–5700, 2005.

[63] M. De Lasarte, M. Vilaseca, J. Pujol, M. Arjona, E. Perales, e V. Viqueira, “Influence of technology, color architecture and bit-depth of optoelectronic imaging sensors used as color measurement instruments”, in *Congress of the International Colour Association*, 2005, p. 1203–1206.

[64] A. Abbaspour, E. TalebanpourBayat, e E. Mirahmadi, “A reliable and budget-friendly, solution-based analysis of multiple analytes of boiler water based on reflection scanometry”, *Anal. Methods*,

vol. 4, nº 7, p. 1968, 2012.

[65] M.-S. Steiner, R. J. Meier, A. Duerkop, e O. S. Wolfbeis, “Chromogenic Sensing of Biogenic Amines Using a Chameleon Probe and the Red−Green−Blue Readout of Digital Camera Images”, *Anal. Chem.*, vol. 82, nº 20, p. 8402–8405, 2010.

[66] R. Gupta, R. G. Reifenberger, e G. U. Kulkarni, “Cellphone camera imaging of a periodically patterned chip as a potential method for point-of-care diagnostics.”, *ACS Appl. Mater. {&} interfaces*, vol. 6, nº 6, p. 3923–3929, 2014.

[67] A. García, M. M. Erenas, E. D. Marinetto, C. A. Abad, I. de Orbe-Paya, A. J. Palma, e L. F. Capitán-Vallvey, “Mobile phone platform as portable chemical analyzer”, *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 156, nº 1, p. 350–359, 2011.

[68] J. Il Hong e B.-Y. Chang, “Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analyte sensing arrays”, *Lab Chip*, vol. 14, nº 10, p. 1725, 2014.

[69] L. Shen, J. a. Hagen, e I. Papautsky, “Point-of-care colorimetric detection with a smartphone”, *Lab Chip*, vol. 12, nº 21, p. 4240, 2012.

[70] J. C. Contreras-naranjo, Q. Wei, e A. Ozcan, “Mobile Phone-Based Microscopy , Sensing , and Diagnostics”, vol. 22, nº 3, 2016.

[71] N. S. Kumar Gunda, S. Naicker, S. Shinde, S. Kimbahune, S. Shrivastava, e S. Mitra, “Mobile Water Kit (MWK): a smartphone compatible low-cost water monitoring system for rapid detection of total coliform and E. coli”, *Anal. Methods*, vol. 6, nº 16, p. 6236, 2014.

[72] D. Zhang, J. Jiang, J. Chen, Q. Zhang, Y. Lu, Y. Yao, S. Li, G. Logan Liu, e Q. Liu, “Smartphone-based portable biosensing system using impedance measurement with printed electrodes for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) detection”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 70, p. 81–88, 2015.

[73] L. Bueno, G. N. Meloni, S. M. Reddy, e T. R. L. C. Paixão, “Use of plastic-based analytical device, smartphone and chemometric tools to discriminate amines”, *RSC Adv.*, vol. 5, nº 26, p. 20148–20154, 2015.

[74] R. W. G. Hunt, *The Reproduction of Colour*. 2005.

[75] J. C. Rocha, “Cor Luz, Cor Pigmento E Os Sistemas Rgb, Cmy, Cmyk E Ryb”, 2010.

[76] K. D. Long, H. Yu, e B. T. Cunningham, “Smartphone instrument for portable enzyme-linked immunosorbent assays.”, *Biomed. Opt. Express*, vol. 5, nº 11, p. 3792–3806, nov. 2014.

[77] M. Pohanka, “Photography by Cameras Integrated in Smartphones as a Tool for Analytical Chemistry Represented by an Butyrylcholinesterase Activity Assay.”, *Sensors (Basel).*, vol. 15, nº 6, p. 13752–13762, jan. 2015.

[78] Marcia Miguel Castro Ferreira, *Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações*. Campinas: Editora da Unicamp, 2015.

[79] P. R. M. Correia e M. M. C. Ferreira, “Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos”, *Quim. Nova*, vol. 30, nº 2, p. 481–487, 2007.

[80] M. O. Salles e T. R. L. C. Paixão, “Application of Pattern Recognition Techniques in the

Development of Electronic Tongues", in *Advanced Synthetic Materials in Detection Science*, S. M. Reddy, Org. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2014, p. 197–229.

[81] A. M. de Souza e Ronei Jesus Poppi, "Experimento didatico de quimiometria parte I", *Quim. Nova*, vol. 35, nº 1, p. 223–229, 2012.

[82] H. Abdi e L. J. Williams, "Principal Component Analysis", *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, vol. 2, nº 4, p. 433–459, 2010.

[83] R. Bataller, I. Campos, M. Alcañiz, L. Gil-Sánchez, E. García-Breijo, R. Martínez-Máñez, L. Pascual, J. Soto, e J. L. Vivancos, "A humid electronic nose based on pulse voltammetry: A proof-of-concept design", *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 186, p. 666–673, 2013.

[84] T. San Park, C. Baynes, S.-I. Cho, e J.-Y. Yoon, "Paper microfluidics for red wine tasting", *RSC Adv.*, vol. 4, nº 46, p. 24356–24362, 2014.

[85] T. R. L. C. Paixão e M. Bertotti, "Fabrication of disposable voltammetric electronic tongues by using Prussian Blue films electrodeposited onto CD-R gold surfaces and recognition of milk adulteration", *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 137, nº 1, p. 266–273, 2009.

[86] S. Vallejos, A. Muñoz, S. Ibeas, F. Serna, F. C. García, e J. M. García, "Solid sensory polymer substrates for the quantification of iron in blood, wine and water by a scalable RGB technique", *J. Mater. Chem. A*, vol. 1, nº 48, p. 15435, nov. 2013.

[87] Statsoft, "Case Study : Defining Clusters of".

[88] J. M. Moita Neto e G. C. Moita, "Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados", *Quim. Nova*, vol. 21, nº 4, p. 467–469, 1998.

[89] A. J. Camargo, K. M. Honório, R. Mercadante, F. a. Molfetta, C. N. Alves, e a. B. F. Da Silva, "A Study of Neolignan Compounds with Biological Activity Against Paracoccidioides brasiliensis by Using Quantum Chemical and Chemometric Methods", *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 14, nº 5, p. 809–814, 2003.

[90] O. Alpar, "Intelligent biometric pattern password authentication systems for touchscreens", *Expert Syst. Appl.*, vol. 42, nº 17–18, p. 6286–6294, out. 2015.

[91] Y. Salinas, J. V. Ros-Lis, J.-L. Vivancos, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, S. Aucejo, N. Herranz, I. Lorente, e E. Garcia, "A novel colorimetric sensor array for monitoring fresh pork sausages spoilage", *Food Control*, vol. 35, nº 1, p. 166–176, 2014.

[92] A. Hilding-Ohlsson, J. a. Fauerbach, N. J. Sacco, M. C. Bonetto, e E. Cortón, "Voltamperometric discrimination of urea and melamine adulterated skimmed milk powder", *Sensors (Switzerland)*, vol. 12, nº 9, p. 12220–12234, 2012.

[93] M. Bunge, N. Araghipour, T. Mikoviny, J. Dunkl, R. Schnitzhofer, A. Hansel, F. Schinner, A. Wisthaler, R. Margesin, e T. D. Märk, "On-Line Monitoring of Microbial Volatile Metabolites by Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry ", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, nº 7, p. 2179–2186, abr. 2008.

[94] N. S. No, P. Health, e C. Medicine, "Volatile organic compounds from microorganisms - identification and health effects Anna-Sara Claeson Umeå 2006", *Public Health*, nº 1052, 2006.

[95] E. Tait, S. P. Stanforth, S. Reed, J. D. Perry, e J. R. Dean, "Analysis of pathogenic bacteria using

exogenous volatile organic compound metabolites and optical sensor detection", *RSC Adv.*, vol. 5, nº 20, p. 15494–15499, 2015.

[96] J. Chin, "Control of Communicable Diseases Manual (17th ed.) (selected excerpts)", *Dis. Control*, vol. 17th, p. 30, 2000.

[97] M. K. Morsy, K. Zór, N. Kostesha, T. S. Alstrøm, A. Heiskanen, H. El-Tanahi, A. Sharoba, D. Papkovsky, J. Larsen, H. Khalaf, M. H. Jakobsen, e J. Emnéus, "Development and validation of a colorimetric sensor array for fish spoilage monitoring", *Food Control*, vol. 60, p. 346–352, 2016.

[98] J. Long, J. Xu, Y. Yang, J. Wen, e C. Jia, "A colorimetric array of metalloporphyrin derivatives for the detection of volatile organic compounds", *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 176, nº 16, p. 1271–1276, 2011.

[99] J. Zhu, H. D. Bean, Y. M. Kuo, e J. E. Hill, "Fast detection of volatile organic compounds from bacterial cultures by secondary electrospray ionization-mass spectrometry", *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, nº 12, p. 4426–4431, 2010.

[100] M. Ligor, T. Ligor, A. Bajtarevic, C. Ager, M. Pienz, M. Klieber, H. Denz, M. Fiegl, W. Hilbe, W. Weiss, P. Lukas, H. Jamnig, M. Hackl, B. Buszewski, W. Miekisch, J. Schubert, e A. Amann, "Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry", *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 47, nº 5, jan. 2009.

[101] E. Matisová e S. Škrabáková, "Carbon sorbents and their utilization for the preconcentration of organic pollutants in environmental samples", *J. Chromatogr. A*, vol. 707, nº 2, p. 145–179, jul. 1995.

[102] A. Miceli, A. Aleo, O. Corona, M. T. Sardina, C. Mammina, e L. Settanni, "Antibacterial activity of Borago officinalis and Brassica juncea aqueous extracts evaluated in vitro and in situ using different food model systems", *Food Control*, vol. 40, p. 157–164, 2014.

[103] N. A. M. Eskin, *Biochemistry of Foods*. Elsevier, 1990.

[104] D. Verma e V. Dutta, "Novel microstructure in spin coated polyaniline thin films.", *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 19, nº 18, p. 186212, 2007.

[105] A. J. Hedges, "Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts", *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 76, nº 3, p. 207–214, jun. 2002.

[106] P. Butler, "Smart Packaging in the Health, Beauty and Personal Care Sectors", in *Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008, p. 263–279.

[107] A. Pacquit, J. Frisby, D. Diamond, K. T. Lau, A. Farrell, B. Quilty, e D. Diamond, "Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage", *Food Chem.*, vol. 102, nº 2, p. 466–470, 2007.

[108] H. Humi, E. M. Belgsir, J. M. Leger, C. Lamy, e R. O. Lezna, "Kinetic analysis of the electro-oxidation of ethanol at a platinum electrode in acid medium", *Electrochim. Acta*, vol. 39, nº 3, p. 407–415, 1994.

[109] F. H. B. Lima e E. R. Gonzalez, "Ethanol electro-oxidation on carbon-supported Pt-Ru, Pt-Rh and Pt-Ru-Rh nanoparticles", *Electrochim. Acta*, vol. 53, nº 6, p. 2963–2971, 2008.

[110] G. Tremiliosi-Filho, E. R. Gonzalez, A. J. Motheo, E. M. Belgsir, J.-M. Le´ger, e C. Lamy, “Electro-oxidation of ethanol on gold: analysis of the reaction products and mechanism”, *J. Electroanal. Chem.*, vol. 444, p. 31–39, 1998.

[111] G. A. Camara e T. Iwasita, “Parallel pathways of ethanol oxidation: The effect of ethanol concentration”, *J. Electroanal. Chem.*, vol. 578, nº 2, p. 315–321, maio 2005.

[112] M. S. F. Santos e I. G. R. Gutz, “Derivatização Eletroquímica de Álcoois num Sistema em Fluxo para Determinação Quantitativa por Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica Sem Contato”, p. 88, 2012.

[113] A. R. Corpuz, T. S. Olson, P. Joghee, S. Pylypenko, A. A. Dameron, H. N. Dinh, K. J. O’Neill, K. E. Hurst, G. Bender, T. Gennett, B. S. Pivovar, R. M. Richards, e R. P. O’Hayre, “Effect of a nitrogen-doped PtRu/carbon anode catalyst on the durability of a direct methanol fuel cell”, *J. Power Sources*, vol. 217, p. 142–151, nov. 2012.

[114] D. C. Papageorgopoulos, F. Liu, e O. Conrad, “A study of RhxSy/C and RuSex/C as methanol-tolerant oxygen reduction catalysts for mixed-reactant fuel cell applications”, *Electrochim. Acta*, vol. 52, nº 15, p. 4982–4986, abr. 2007.

[115] T. Iwasita, “Electrocatalysis of methanol oxidation”, *Electrochim. Acta*, vol. 47, nº 22–23, p. 3663–3674, 2002.

[116] M. W. Breiter, “On the Nature of Reduced Carbon Dioxide”, *Electrochim. Acta*, vol. 12, p. 1213–1218, 1967.

[117] A. Sponring, W. Filipiak, T. Mikoviny, C. Ager, J. Schubert, W. Miekisch, A. Amann, e J. Troppmair, “Release of Volatile Organic Compounds from the Lung Cancer Cell Line NCI-H2087 In Vitro”, *Anticancer Res*, vol. 29, nº 1, p. 419–426, 2009.

[118] B.-I. C., de C. C. J., C. J.A., M. V., C. S. E., F. J., S. M., G. R. F., B. J., e G. B. M., “New screening method for lung cancer by detecting volatile organic compounds in breath”, *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 9, nº 6, p. 364–368, 2007.

[119] T. D. Gibson, O. Prosser, J. N. Hulbert, R. W. Marshall, P. Corcoran, P. Lowery, E. a. Ruck-Keene, e S. Heron, “Detection and simultaneous identification of microorganisms from headspace samples using an electronic nose.”, *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 44, p. 413–422, 1997.

[120] C. Togbé, A. Mzé-Ahmed, e P. Dagaut, “Kinetics of oxidation of 2-butanol and isobutanol in a jet-stirred reactor: Experimental study and modeling investigation”, *Energy and Fuels*, vol. 24, nº 9, p. 5244–5256, 2010.

[121] B. Rasch e T. Iwasita, “The electrochemical adsorption and oxidation of acetaldehyde on polycrystalline platinum in acidic solution—A sniftirs study”, *Electrochim. Acta*, vol. 35, nº 6, p. 989–993, 1990.

[122] G. A. B. Mello, M. Janete Giz, M. Chatenet, e G. A. Camara, “The electrooxidation of acetaldehyde on platinum–ruthenium–rhodium surfaces: A delicate balance between oxidation and carbon–carbon bond breaking”, *J. Electroanal. Chem.*, vol. 765, p. 73–78, 2016.

[123] J. Silva-Chong, E. Méndez, J. . Rodríguez, M. . Arévalo, e E. Pastor, “Reactivity of acetaldehyde at platinum and rhodium in acidic media. A DEMS study”, *Electrochim. Acta*, vol. 47, nº 9, p. 1441–1449, fev. 2002.

[124] C. Steffens, A. Manzoli, R. T. Paschoalin, F. C. Corraza, J. V. de Oliveira, e P. S. D. P. Herrmann, “Aplicação de sensores de gases de baixo custo recobertos com filmes de polianilina na observação do amadurecimento de banana prata.”, *Embrapa Instrumentação Agropecuária Doc.*, nº 1, p. 1–16, 2009.

[125] Y. K. Takahashi, “Detection and Masking of Spoiled Food Smells by Odor Maps in the Olfactory Bulb”, *J. Neurosci.*, vol. 24, nº 40, p. 8690–8694, 2004.

[126] Y. Wang, S. Zhang, J. Yu, H. Zhang, Z. Yuan, Y. Sun, L. Zhang, Y. Zhu, e H. Song, “An outbreak of Proteus mirabilis food poisoning associated with eating stewed pork balls in brown sauce, Beijing”, *Food Control*, vol. 21, nº 3, p. 302–305, 2010.

[127] J. M. Sabota, W. L. Hoppes, J. R. Ziegler, H. DuPont, J. Mathewson, e G. W. Rutecki, “A new variant of food poisoning: enteroinvasive Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli sepsis from a contaminated hamburger.”, *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 93, nº 1, p. 118–9, 1998.

[128] T. Robinson, *The Biochemistry of Alkaloids*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1968.

[129] N. A. M. Eskin, *Biochemistry of Foods*. Elsevier, 2012.

[130] United State Environmental Protection Agency, “Triethylamine”, 2015. [Online]. Available at: http://www3.epa.gov/airtoxics/hlthef/tri-lami.html.

[131] L. Liu, “Bioplastics in Food Packaging : Innovative Technologies for Biodegradable Packaging”, *Environ. Prot.*, nº February, p. 1–13, 2006.

[132] J. Puls, S. a. Wilson, e D. Hölter, “Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review”, *J. Polym. Environ.*, vol. 19, nº 1, p. 152–165, 2011.

[133] A. Maines, A. Cambiaso, L. Delfino, G. Verreschi, I. Christie, e P. Vadgama, “Use of surfactant-modified cellulose acetate for a high-linearity and pH-resistant glucose electrode”, *Anal. Commun.*, vol. 33, nº 1, p. 27, 1996.

[134] E. Parente, M. Martuscelli, F. Gardini, S. Grieco, M. A. Crudele, e G. Suzzi, “Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy”, *J. Appl. Microbiol.*, vol. 90, nº 6, p. 882–891, 2001.

[135] J. Coïsson, “Production of biogenic amines in ‘Salamini italiani alla cacciatora PDO’”, *Meat Sci.*, vol. 67, nº 2, p. 343–349, 2004.

[136] G. Suzzi, “Biogenic amines in dry fermented sausages: a review”, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 88, nº 1, p. 41–54, 2003.

[137] L. Feng, Y. Zhang, L. Wen, Z. Shen, e Y. Guan, “Colorimetric determination of copper(II) ions by filtration on sol-gel membrane doped with diphenylcarbazide.”, *Talanta*, vol. 84, nº 3, p. 913–7, 2011.

[138] Y. Salinas, J. V. Ros-Lis, J.-L. Vivancos, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, S. Aucejo, N. Herranz, e I. Lorente, “Monitoring of chicken meat freshness by means of a colorimetric sensor array”, *Analyst*, vol. 137, nº 16, p. 3635, 2012.

[139] D. Mayr, R. Margesin, E. Klingsbichel, E. Hartungen, D. Jenewein, F. Schinner, e T. D. Märk, “Rapid detection of meat spoilage by measuring volatile organic compounds by using proton transfer reaction mass spectrometry.”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, nº 8, p. 4697–705, 2003.

[140] M. N. Guentzel, *Medical Microbiology*, 4th editio. Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

[141] J. W. Grate, "Acoustic Wave Microsensor Arrays for Vapor Sensing", *Chem. Rev.*, vol. 100, nº 7, p. 2627–2648, jul. 2000.

[142] J. Julák, E. Procházková-Francisci, E. Stránská, e V. Rosová, "Evaluation of exudates by solid phase microextraction-gas chromatography", *J. Microbiol. Methods*, vol. 52, nº 1, p. 115–122, 2003.

[143] C. P. De Melo, B. B. Neto, L. F. B. Lira, e J. E. G. De Souza, "Influence of the nature of the surface of polypyrrole films upon their interaction with volatile organic compounds", *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 257–258, p. 99–103, 2005.

[144] J. Auger, I. Arnault, A. Legin, A. Rudnitskaya, B. Seleznev, G. Sparfel, e C. Doré, "Comparison of gas chromatography–mass spectrometry and electronic tongue analysis for the classification of onions and shallots", *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 85, nº 12–13, p. 971–980, 2005.

[145] Q. C. Chu, Y. Q. Guan, C. H. Geng, e J. N. Ye, "Miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection: Fast separation and detection of bioactive amines", *Anal. Lett.*, vol. 39, nº 4, p. 729–740, 2006.

[146] C. G. Amorim, R. C. Souza, a. N. Araújo, M. C. B. S. M. Montenegro, e V. L. Silva, "SI lab-on-valve analysis of histamine using potentiometric detection for food quality control", *Food Chem.*, vol. 122, nº 3, p. 871–876, 2010.

[147] J. R. M. Castro, D. L. Branco, V. R. Balbo, M. F. Oliveira, e J. F. Andrade, "Determinação de amônia no ar utilizando um sensor piezelétrico de quartzo", *Eclet. Quim.*, vol. 36, nº 2, p. 21–49, 2011.

[148] E. S. Mañoso, R. Herrera-Basurto, B. M. Simonet, e M. Valcárcel, "A quartz crystal microbalance modified with carbon nanotubes as a sensor for volatile organic compounds", *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 186, p. 811–816, 2013.

[149] M. C. P. Neves, "Como as Boas Práticas Agrícolas podem Contribuir para a Segurança dos Alimentos", *Documento 224*, vol. 91, nº 3. EMBRAPA, p. 826–836, 2009.

[150] R. A. WILBEY, "Milk Quality. Edited by Frank Harding", *Int. J. Dairy Technol.*, vol. 49, nº 1, p. 36, 1996.

[151] N. Fucà, C. Pasta, G. Impoco, M. Caccamo, e G. Licitra, "Microstructural properties of milk fat globules", *Int. Dairy J.*, vol. 31, nº 1, p. 44–50, 2013.

[152] R. Sharma, Y. S. Rajput, S. Kaur, e S. K. Tomar, "A method for estimation of urea using ammonia electrode and its applicability to milk samples", *J. Dairy Res.*, vol. 75, nº 04, p. 466, nov. 2008.

[153] U. B. Trivedi, D. Lakshminarayana, I. L. Kothari, N. G. Patel, H. N. Kapse, K. K. Makhija, P. B. Patel, e C. J. Panchal, "Potentiometric biosensor for urea determination in milk", *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 140, nº 1, p. 260–266, jun. 2009.

[154] J. Kaminski, A. S. Atwal, e S. Mahadevan, "Determination of formaldehyde in fresh and retail milk by liquid column chromatography", *J. AOAC Int.*, vol. 75, nº 5, 1993.

[155] D. T. TORELL, "Adding formalin to milk helps in raising orphan lambs", *Calif. Agric.*, p. 8–10, 1972.

[156] E. Wong, “Milk Scandal Pushes China to Set Limits on Melamine - The New York Times”. The New York Times, Beijing, 2008.

[157] L. Li, B. Li, D. Cheng, e L. Mao, “Visual detection of melamine in raw milk using gold nanoparticles as colorimetric probe”, *Food Chem.*, vol. 122, nº 3, p. 895–900, 2010.

[158] D. I. Ellis, V. L. Brewster, W. B. Dunn, J. W. Allwood, A. P. Golovanov, e R. Goodacre, “Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination”, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, nº 17, p. 5706, 2012.

[159] X. Wang, Q. Fang, S. Liu, e L. Chen, “The application of pseudo template molecularly imprinted polymer to the solid-phase extraction of cyromazine and its metabolic melamine from egg and milk”, *J. Sep. Sci.*, vol. 35, nº 12, p. 1432–1438, 2012.

[160] L. Bueno, W. de Araujo, M. Salles, M. Kussuda, e T. Paixão, “Voltammetric Electronic Tongue for Discrimination of Milk Adulterated with Urea, Formaldehyde and Melamine”, *Chemosensors*, vol. 2, nº 4, p. 251–266, 2014.

[161] J. Spink e D. C. Moyer, “Defining the Public Health Threat of Food Fraud”, *J. Food Sci.*, vol. 76, nº 9, 2011.

[162] G. Abernethy e K. Higgs, “Rapid detection of economic adulterants in fresh milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A*, vol. 1288, p. 10–20, 2013.

[163] A. C. Veloso, N. Teixeira, I. M. P. L. V. O. Ferreira, e M. Ferreira, “Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas”, *Quim. Nova*, vol. 25, nº 4, p. 609–615, 2002.

[164] J. J. Pedrotti, L. Angnes, e I. G. R. Gutz, “Miniaturized Reference Electrodes with Microporous Polymer Junctions”, nº I, p. 1995–1997, 1996.

[165] V. F. Prateano, “Uso de formol ainda é corrente”, *Gazeta do Povo*, 2013. [Online]. Available at: http://www.gazetadopovo.com.br/saude/uso-de-formol-ainda-e-corrente-0dt3s1envtzz1gpowophixyku. [Acessado: 01-jan-2016].

[166] Veja, “Leite com formol, soda cáustica e água oxigenada foi vendido em SP”, *Abril*, 2014. [Online]. Available at: http://veja.abril.com.br/noticia/economia/leite-com-formol-soda-caustica-e-agua-oxigenada-foi-vendido-em-sp. [Acessado: 01-jan-2015].

[167] K. Juodkazis, J. Juodkazytė, T. Juodienė, e A. Lukinskas, “Determination of Au(III) in the surface layers formed anodically on the gold electrode”, *J. Electroanal. Chem.*, vol. 441, nº 1–2, p. 19–24, jan. 1998.

[168] W. R. De Araujo e T. R. L. C. Paixão, “Use of copper electrode for melamine quantification in milk”, *Electrochim. Acta*, vol. 117, p. 379–384, 2014.

[169] Q. Cao, H. Zhao, L. Zeng, J. Wang, R. Wang, X. Qiu, e Y. He, “Electrochemical determination of melamine using oligonucleotides modified gold electrodes”, *Talanta*, vol. 80, nº 2, p. 484–488, 2009.

[170] U. B. Trivedi, D. Lakshminarayana, I. L. Kothari, N. G. Patel, H. N. Kapse, K. K. Makhija, P. B. Patel, e C. J. Panchal, “Potentiometric biosensor for urea determination in milk”, *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 140, nº 1, p. 260–266, 2009.

[171] H. Xin e R. Stone, “Tainted Milk Scandal: Chinese Probe Unmasks High-Tech Adulteration With Melamine”, *Science (80-.).*, vol. 322, n° 5906, p. 1310–1311, nov. 2008.

[172] Y. Hanai, K. Shimono, H. Oka, Y. Baba, K. Yamazaki, e G. K. Beauchamp, “Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice”, *Cancer Cell Int.*, vol. 12, n° 1, p. 7, 2012.

[173] S. M. Reddy, G. Sette, e Q. Phan, “Electrochemical probing of selective haemoglobin binding in hydrogel-based molecularly imprinted polymers”, *Electrochim. Acta*, vol. 56, n° 25, p. 9203–9208, 2011.

[174] T.-P. Huynh e W. Kutner, “Molecularly imprinted polymers as recognition materials for electronic tongues.”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 74, p. 856–64, 2015.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Lígia Bueno

Local e data de nascimento: São Paulo, 08 de Junho de 1986.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Ensino médio: E.E. “Prof. Santos Amaro da Cruz”, São Paulo (SP), 2003.

Superior: Licenciatura Plena em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Presidente Prudente (SP), 2009.

Mestrado em Química Analítica pelo Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia/Química da Universidade Federal do ABC. (Orientador: Dr. Thiago R. L. C. da Paixão), 2012.

Doutorado em Química pelo programa de Pós-graduação de Química da Universidade de São Paulo (Orientador: Dr. Thiago R. L. C. da Paixão), em andamento.

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Ensino Técnico: Nutrição e Dietética – ETEC Getúlio Vargas, São Paulo (SP), 2003.

4. ATIVIDADES ACADÊMICAS

Bolsista de Mestrado, UFABC, de 03/2010 a 07/2010

Bolsista de Mestrado, CAPES, de 08/2010 a 02/2012

Bolsista de Doutorado, FAPESP, de 03/2012 a 02/2016

4.1. Estágios

Estágio de 3 semanas na Universidade de Surrey sob a supervisão do Dr. Subrayal M. Reddy e da microbiologista Dr. Alison Cottell, em Julho de 2015.

Bolsista do Programa Ciências sem Fronteiras, CAPES, de 01 a 06 de 2014, na Universidade de Surrey, Reino Unido, sob a supervisão do Dr. Subrayal M. Reddy.

Estágio de 3 semanas na Universidade de Surrey sob a supervisão do Dr. Subrayal M. Reddy em Novembro de 2012.

5. PUBLICAÇÕES

Artigos em periódicos

1. Bueno, Lígia. ; Cottell, Alison ; Reddy, Subrayal M. ; Paixão, Thiago R. L. C.. Coupling dye-integrated polymeric membranes with smartphone detection to classify bacteria. RSC Advances. v. 5, p. 97962-97965, 2015.

2. Bueno, Lígia ; Meloni, Gabriel N. ; Reddy, Subrayal M. ; Paixão, Thiago R. L. C. . Use of plastic-based analytical device, smartphone and chemometric tools to discriminate amines. RSC Advances. v. 5, p. 20148-20154, 2015.

3. Bueno, Lígia ; El-Sharif, Hazim F. ; Salles, Maiara O. ; Boehm, Ryan D. ; Narayan, Roger J. ; Paixão, Thiago R. L. C.; Reddy, Subrayal M. MIP-based Electrochemical Protein Profiling. Sensors and Actuators. B, Chemical, v. 204, p. 88-95, 2014.

4. Bueno, Lígia ; De Araujo, William ; Salles, Maiara O.; Kussuda, Marcos ; Paixão, Thiago R. L. C.. Voltammetric Electronic Tongue for Discrimination of Milk Adulterated with Urea, Formaldehyde and Melamine. Chemosensors, v. 2, p. 251-266, 2014.

5. Bueno, Lígia ; Paixão, Thiago R. L. C. . A Single Platinum Microelectrode for Identifying Soft Drink Samples. International Journal of Electrochemistry (Print), v. 2012, p. 1-5, 2012.

6. Bueno, Lígia.; Paixão, Thiago R. L. C., A copper interdigitated electrode and chemometrical tools used for the discrimination of the adulteration of ethanol fuel with water, *Talanta*,87, 210-215, 2011.

Patente

1. Bueno, Lígia ; Paixão, Thiago R.L.C. . 'Dispositivo Eletrônico para a identificação de adulteração em combustíveis'. 2012, Brasil.
Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020120312026, data de depósito: 07/12/2012, título: "'Dispositivo Eletrônico para a identificação de adulteração em combustíveis'", Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Capítulos de livros

1. Bueno, Lígia; Araujo, William Reis; Paixão, Thiago R L C. Chapter 19 – POC medical biosensors for cancer detection. In Roger Narayan (editor). Medical biosensors for point of care. Elsevier. Aguardando publicação em Setembro de 2016, ISBN: 978-0-08-100072
2. Bueno, Lígia. In Marcelo Dias Pulido (editor). Conexões com a Química ; Editora Moderna (organizadora) ; 1ª ed. —São Paulo : Moderna, 2015 (vol. 1).
3. Bueno, Lígia. In Marcelo Dias Pulido (editor). Conexões com a Química ; Editora Moderna (organizadora) ; 1ª ed. —São Paulo : Moderna, 2015 (vol. 2).
4. Bueno, Lígia. In Marcelo Dias Pulido (editor). Conexões com a Química ; Editora Moderna (organizadora) ; 1ª ed. —São Paulo : Moderna, 2015 (vol. 3).

Trabalhos apresentados em congressos

1. A Cellulose Acetate Membrane-based Colorimetric Device to Discriminate Bacteria – 67th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy – Atlanta (USA), 2016.
2. Sensor piezoelétrico de quartzo modificado com membranas poliméricas para discriminação de aminas – XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – Uberlândia (MG), 2015.
3. Use of plastic-based analytical device, smartphone and chemometric tools to discriminate amines in meat – 16th International Symposium on Olfaction and Electronic Noses – Dijon (França), 2015 – Apresentação oral

4. Cellulose Acetate Membrane-based Colorimetric Device to Discriminate Amines – 66th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy – New Orleans (USA), 2015

5. Utilização de eletrodo de carbono vítreo modificado com polímero visando à discriminação de proteínas – XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – Campos do Jordão (SP), 2013.

6. Use of Voltammetric Disposable Sensor with Pattern Recognition Method for the Monitoring of Milk Adulteration with Melamine – 64th The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy – Philadelphia (USA), 2013

7. Língua eletrônica voltamétrica para classificação de refrigerantes a base de cola – 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Florianópolis (SC), 2011.

8. Eletrodo interdigitado de cobre como língua eletrônica para discriminação de amostras de etanol combustível adulteradas com água – XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – Bento Gonçalves (RS), 2011.

9. Desenvolvimento de método biamperométrico em fluxo para quantificação de glicerol em biodiesel – 16°Encontro Nacional de Química Analítica – Campos do Jordão (SP), 2011.

10. Desenvolvimento de língua eletrônica voltamétrica para a classificação de cachaças utilizando eletrodos descartáveis – 2° Encontro de Nacional Química Forense – Ribeirão Preto (SP), 2010.