



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL  
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**ANTHONY CESAR SOARES CASTANHA**

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO DE BAIXO CUSTO PARA DETECÇÃO  
POR IMAGEM DIGITAL DE BRODIFACOUM USANDO CARBON DOTS  
FUNCIONALIZADOS COM FENILALANINA**

**RECIFE**

**2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL  
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**ANTHONY CESAR SOARES CASTANHA**

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO DE BAIXO CUSTO PARA DETECÇÃO  
POR IMAGEM DIGITAL DE BRODIFACOUM USANDO CARBON DOTS  
FUNCIONALIZADOS COM FENILALANINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de bacharel em química.

**Orientadora:** Ana Paula Silveira Paim

**RECIFE**

**2025**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Castanha, Anthony Cesar Soares.

Desenvolvimento de dispositivo de baixo custo para detecção por imagem digital de brodifacoum usando carbon dots funcionalizados com fenilalanina / Anthony Cesar Soares Castanha. - Recife, 2025.

52 : il., tab.

Orientador(a): Ana Paula Silveira Paim

(Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Química - Bacharelado, 2025.

Inclui referências.

1. Nanopartículas de carbono. 2. Análise por imagem digital . 3. Raticidas anticoagulantes. I. Paim, Ana Paula Silveira. (Orientação). II. Título.

540 CDD (22.ed.)

**ANTHONY CESAR SOARES CASTANHA**

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO DE BAIXO CUSTO PARA DETECÇÃO  
POR IMAGEM DIGITAL DE BRODIFACOUM USANDO CARBON DOTS  
FUNCIONALIZADOS COM FENILALANINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Química.

Aprovado em: 05/08/2025.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Silveira Paim(Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nattany Tayany Gomes de Paula (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

Prof<sup>º</sup>. Dr. André Fernando Lavorante (Examinador Externo)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à UFPE e DQF pela estrutura e pelo ambiente acadêmico proporcionado. À agência de fomento CNPQ, pela bolsa de Iniciação Científica que viabilizou a dedicação a este projeto.

Expresso minha mais profunda gratidão à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Silveira Paim, por sua orientação exemplar, paciência, confiança e por todos os ensinamentos que foram muito além da química. Sua paixão pela ciência foi uma inspiração constante.

Aos meus pais, Luciana Oliveira Soares e Arthur Ribeiro Castanha, e a toda a minha família, pelo amor, apoio incondicional, incentivo e por compreenderem as horas de ausência. Esta conquista também é de vocês.

Aos meus amigos, e colegas de curso e laboratório, por todos os momentos de apoio, pelas conversas que aliviaram a pressão e por tornarem a jornada universitária mais leve e memorável.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação, o meu muito obrigado.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de um método analítico baseado em imagem digital fluorescente (FDIB) para a determinação do raticida anticoagulante *brodifacoum*, utilizando um dispositivo portátil de baixo custo. Para isso, foram sintetizados *carbon dots* (CD) por via hidrotermal e funcionalizadas com fenilalanina, resultando numa nanopartícula que exibe aumento de fluorescência na presença do analito. O dispositivo de análise foi construído com tecnologia de impressão 3D e componentes eletrônicos acessíveis. Os parâmetros operacionais do dispositivo foram avaliados para garantir a máxima sensibilidade. A validação do método foi realizada em um espectrofluorímetro convencional, usado como referência, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos no dispositivo portátil. Os resultados demonstraram linearidade até  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de *brodifacoum*, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,99 em ambos os métodos investigados. O limite de detecção obtido com o dispositivo foi de  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ , o método apresentou boa exatidão, com recuperações entre 80 e 120% para amostras de água mineral e água tônica. O efeito de matriz observado em refrigerante de limão foi mitigado através da diluição da amostra. Conclui-se que a plataforma desenvolvida é uma alternativa robusta, portátil e de baixo custo aos métodos tradicionais, com grande potencial para o monitoramento de raticidas em contextos forenses e de segurança alimentar.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de Carbono; Análise por Imagem Digital; Raticidas Anticoagulantes.

## ABSTRACT

The present work aimed to develop and validate an analytical method based on fluorescent digital image (FDIB) for the determination of the anticoagulant rodenticide *brodifacoum*, using a low-cost portable device. For this, *carbon dots* (CD) were synthesized via the hydrothermal route and functionalized with phenylalanine, resulting in a nanoparticle that exhibits increased fluorescence in the presence of the analyte. The analysis device was constructed with 3D printing technology and accessible electronic components. The operational parameters of the device were optimized to ensure maximum sensitivity. The validation of the method was performed on a conventional spectrofluorometer, used as a reference, and the results were compared with those obtained on the portable device. The results demonstrated linearity up to 25 mg L<sup>-1</sup> of *brodifacoum*, with correlation coefficients (R<sup>2</sup>) greater than 0.99 in both investigated methods. The limit of detection obtained with the device was 0.15 mg L<sup>-1</sup>, the method showed good accuracy, with recoveries between 80 and 120% for mineral water and tonic water samples. The matrix effect observed in lemon-lime soda was mitigated by diluting the sample. It is concluded that the developed platform is a robust, portable, and low-cost alternative to traditional methods, with great potential for monitoring rodenticides in forensic and food safety contexts.

**Keywords:** *Carbon dots*; Digital Image Analysis; Anticoagulant Rodenticides.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular de (a) 4-Hidroxycumarina e (b) <i>Brodifacoum</i> .....	15
Figura 2 - Mecanismo de atuação do RA no ciclo da vitamina K .....	16
Figura 3 - Representação esquemática dos modelos de cores RGB (cubo) e HSV (cilindro)	23
Figura 4 - Solução do carbon dot (a) antes da diluição e (b) após diluição .....	26
Figura 5 - Reação de conjugação da fenilalanina com o carbon dot .....	27
Figura 6 – Análise por FDIB .....	28
Figura 7 - Componentes de <i>hardware</i> e <i>software</i> utilizados na construção do dispositivo ..	31
Figura 8 - Esquema do circuito eletrônico do dispositivo .....	32
Figura 9 - Espectro de radiância absoluta versus comprimento de onda para o LED WS2812B .....	33
Figura 10 - Comparativo entre a primeira versão do dispositivo (esquerda) e a versão otimizada (direita) .....	34
Figura 11 – Interface do <i>software</i> WLED .....	34
Figura 12 - Avaliação da radiação espúria (sinal do canal azul na ausência de amostra) em função da intensidade do LED. a) 100%, b) 50% e c) 30%.....	35
Figura 13 - Espectro de FTIR dos <i>carbon dots</i> antes (CD-H) e após a bioconjugação com fenilalanina (CD-F). .....	36
Figura 14 - Espectros de excitação, emissão e absorção dos CD-F, e espectros de absorção e emissão do <i>Brodifacoum</i> .....	36
Figura 15 - Espectros de fluorescência para determinação de <i>brodifacoum</i> , soluções de referência contendo, 0; 8; 10; 15; 20; 25 e 30 mg L <sup>-1</sup> , em destaque a curva analítica obtida a partir dos espectros de fluorescência.....	37
Figura 16 - Avaliação do volume do carbon dot: a) CD-F diluída 25 vezes b) CD-F diluído 2000 vezes, c) e d) comparativo visual das duas soluções a) e b), respectivamente, obtidos por imagem digitais .....	38
Figura 17 - Espectros de emissão de fluorescência dos CD-H-F ( $\lambda_{ex} = 470$ nm) na presença de diferentes concentrações de <i>brodifacoum</i> (0 a 25 mg L <sup>-1</sup> ).....	39
Figura 18 -Curva analítica para a determinação de <i>brodifacoum</i> obtida em espectrofluorímetro convencional .....	40
Figura 19 - Imagens digitais obtidas no dispositivo portátil para a curva analítica preliminar na faixa de: a)0, b)15 ,c)35, d)50, e)65, f) 80 mg L <sup>-1</sup> de <i>brodifacoum</i> .....	41
Figura 20 - Curva analítica obtida a partir do canal azul (B) para a faixa de 0-80 mg L <sup>-1</sup> de <i>brodifacoum</i> .....	42
Figura 21 (a-f) Imagens digitais para a curva analítica de a) 0, b) 5, c) 10, d) 15, e) 20 e f)25 mg L <sup>-1</sup> de <i>brodifacoum</i> e (g) escala de cores HSV demonstrando o deslocamento do matiz com o aumento da concentração de <i>brodifacoum</i> .....	43

Figura 22 - Histograma de cores comparando a intensidade dos canais RGB para o branco (R,G,B) e para a amostra de 25 mg L <sup>-1</sup> de <i>brodifacoum</i> (R',G',B').....	43
Figura 23 - Curvas analíticas para a determinação de <i>brodifacoum</i> (0 a 25 mg L <sup>-1</sup> ) obtidas a partir dos canais R, G, B e do vetor RGB .....	44
Figura 24 - Imagens digitais do ensaio de recuperação em diferentes matrizes comerciais, diluídas 1:2: (a-i) Água Mineral; (j-r) Água Tônica; e (s-aa) Refrigerante de Limão; .....	45
Figura 25 - Estruturas do ácido cítrico e benzoato de sódio .....	46
Figura 26 - Imagens digitais do ensaio de recuperação em refrigerante de limão em diluição 1:10.....	47
Figura 27 - Comparativo do percentual de recuperação de <i>brodifacoum</i> em diferentes matrizes e condições de diluição .....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volumes e concentrações finais para o preparo dos padrões da curva analítica (0-25 mg L <sup>-1</sup> ) utilizada nas análises por espectrofluorimetria e no dispositivo portátil .....	39
Tabela 2 - Figuras de mérito para a determinação de <i>brodifacoum</i> em espectrofluorímetro convencional .....	40
Tabela 3 - Volumes e concentrações finais para o preparo dos padrões da curva analítica de ampla faixa (0-80 mg L <sup>-1</sup> ) para os testes preliminares com o dispositivo portátil .....	41
Tabela 4 - Figuras de mérito para o ensaio preliminar usando imagem digital e faixa de concentração de 0 a 80 mg L <sup>-1</sup> de <i>brodifacoum</i> .....	42
Tabela 5 - Figuras de mérito para os diferentes canais de análise na faixa linear de 0 a 25 mg L <sup>-1</sup> de <i>brodifacoum</i> .....	44
Tabela 6 - Resultados do ensaio de recuperação em amostras de água mineral, água tônica e refrigerante de limão (diluição 1:2) para adição de 10, 15 e 20 mg L <sup>-1</sup> de <i>brodifacoum</i> .....	45

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1. Impacto dos Roedores na Saúde Pública</b> .....	<b>14</b>
2.1.1. <i>Contexto Histórico e Sanitário</i> .....	14
2.1.2. <i>Raticidas Anticoagulantes</i> .....	14
<b>2.2. Métodos Analíticos para Detecção de RAs</b> .....	<b>17</b>
2.2.1. <i>Técnicas de Fluorescência na Química Analítica</i> .....	19
<b>2.3. Nanopartículas de Carbono Fluorescentes (<i>Carbon dots</i>)</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4. Técnica de Imagem Digital Fluorescente (FDIB)</b> .....	<b>23</b>
2.4.1. <i>Fundamentos da Técnica</i> .....	23
2.4.2. <i>Aplicações e Vantagens</i> .....	24
2.4.3. <i>Comparação com Técnicas Tradicionais</i> .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
3.1. <b>Objetivo Geral</b> .....	<b>25</b>
3.2. <b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
4.1. <b>Preparo de soluções</b> .....	<b>26</b>
4.2. <b>Síntese dos <i>Carbon dots</i></b> .....	<b>26</b>
4.3. <b>Conjugação dos CD com Fenilalanina</b> .....	<b>27</b>
4.4. <b>Desenvolvimento do Dispositivo</b> .....	<b>28</b>
4.5. <b>Medidas de Fluorescência por FDIB</b> .....	<b>28</b>
4.6. <b>Medidas de Fluorescência por Espectrofluorímetro</b> .....	<b>29</b>
4.7. <b>Detecção do <i>Brodifacoum</i> usando o método FDIB</b> .....	<b>29</b>
4.8. <b>Estudo de Seletividade em Diferentes Matrizes</b> .....	<b>30</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1. <b>Desenvolvimento do Dispositivo Portátil</b> .....	<b>31</b>
5.2. <b>Avaliação dos Parâmetros do Dispositivo Portátil</b> .....	<b>33</b>
5.3. <b>Avaliação da Nanopartícula</b> .....	<b>35</b>
4.1. <b>Validação do Método com Espectrofluorímetro Convencional</b> .....	<b>38</b>
4.2. <b>Validação do Método com o Dispositivo Portátil</b> .....	<b>40</b>
4.3. <b>Avaliação de Efeito de Matriz e Aplicação do Método em Amostras Comerciais</b> ..	<b>45</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento demográfico e a expansão dos centros urbanos, observados ao longo dos anos, têm contribuído para o agravamento de diversos problemas relacionados à saúde pública. A carência de saneamento básico em inúmeras regiões, cria condições propícias à proliferação de animais sinantrópicos, dentre os quais se destacam os roedores, reconhecidos como importantes vetores de diversas doenças (Zeppelini, 2025).

Uma das estratégias mais comuns para o controle dessas populações é o emprego de raticidas, configurando o denominado controle químico. Os raticidas anticoagulantes (RAs), introduzidos ao final da década de 1940, atuam por meio da inibição do ciclo da vitamina K e ficaram conhecidos como RAs de primeira geração. Contudo, o uso contínuo desses compostos resultou no desenvolvimento de resistência por parte de algumas espécies de roedores, o que impulsionou, na década de 1980, a criação de uma nova classe de raticidas, mais potentes e persistentes: os RAs de segunda geração (Murphy, 2012; Lefebvre *et al.*, 2017).

No Brasil, os RAs com uso permitido são derivados da hidroxycumarina, cujas estruturas químicas variam apenas em um substituinte. Tais compostos são de fácil obtenção e, nas concentrações regulamentadas, apresentam baixa toxicidade para mamíferos não-alvo. Para substâncias como o *brodifacoum*, um dos raticidas derivados da hidroxycumarina, a concentração máxima permitida em formulações comerciais é de 0,005% p/p (ANVISA, 2019). Apesar dessa regulamentação, casos de intoxicação em seres humanos e animais domésticos têm se tornado progressivamente mais frequentes, representando uma preocupação crescente no âmbito da saúde pública (Yan *et al.*, 2018). Nesse contexto, evidencia-se a necessidade de desenvolver métodos analíticos capazes de detectar e quantificar com precisão esses compostos em diferentes matrizes.

Diversos métodos para a determinação de RAs de segunda geração são reportados na literatura científica, sendo a maioria fundamentada em técnicas cromatográficas (Imran *et al.*, 2015). Em contrapartida, métodos baseados na espectrometria de fluorescência vêm ganhando destaque, devido à sua simplicidade operacional, menor consumo de reagentes e elevada sensibilidade (Liu *et al.*, 2015). Quando associados ao emprego de nanopartículas de carbono com propriedades fluorescentes — os denominados *carbon dots* (CD) —, esses métodos tornam-se ainda mais promissores por apresentarem vantagens adicionais como baixo custo,

alta estabilidade físico-química, facilidade de síntese, extensa área superficial, além de baixa toxicidade e boa biocompatibilidade (Gaviria-Arroyave; Cano; Peñuela, 2020; Zhu *et al.*, 2015).

A funcionalização da superfície dos CD, por meio da conjugação com biomoléculas, permite a obtenção de sistemas híbridos que reúnem propriedades combinadas: as características espectroscópicas intrínsecas dos CD e a capacidade de reconhecimento molecular conferida pela biomolécula empregada (Medintz *et al.*, 2005). Essa estratégia amplia consideravelmente as possibilidades de aplicação analítica, agregando seletividade ao sistema sensor.

Paralelamente, o método analítico baseado em imagens digitais fluorescentes (*Fluorescence Digital Image-Based*, FDIB) tem se consolidado como uma abordagem promissora no campo da química analítica. Trata-se de uma técnica de baixo custo, portátil, de fácil execução e com significativo potencial para aplicações *in situ*. Nessa metodologia, imagens ou vídeos capturados de reações que geram um sinal fluorescente são processados com base nos canais de cores RGB (vermelho, verde e azul), os quais variam em uma escala de intensidade de 0 a 255. A partir desses valores, é possível estabelecer uma correlação quantitativa com a concentração do analito. Alternativamente, também podem ser utilizados os parâmetros do espaço de cores HSV (matiz, saturação e valor de brilho), obtidos por conversão do sistema RGB. Dispositivos de fácil acesso, como câmeras digitais, scanners de mesa e smartphones, são amplamente utilizados para a aquisição das imagens (Da Silva *et al.*, 2020)

Considerando as propriedades vantajosas dos CD e da metodologia FDIB, a utilização de CD funcionalizados com fenilalanina, apresenta-se como uma abordagem analítica promissora. Essa estratégia permite o desenvolvimento de métodos sensíveis, seletivos e de baixo custo para a determinação de *brodifacoum* em raticidas coagulantes em diferentes matrizes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Impacto dos Roedores na Saúde Pública

#### 2.1.1. Contexto Histórico e Sanitário

Os roedores representam um desafio persistente à saúde pública, sobretudo em áreas marcadas por crescimento acelerado e infraestrutura limitada. A convivência com esses animais não é recente pois há evidências de práticas de controle desde a Idade do Bronze, o que reforça a longa e constante preocupação com os riscos que representam (Zeppelini, 2025). Atualmente, esse problema é agravado por condições que ainda afetam muitas cidades: descarte inadequado de resíduos, sistemas de esgoto deficientes e ausência de políticas eficazes de manejo ambiental. Essas falhas estruturais criam um ambiente propício à proliferação de roedores, especialmente em comunidades vulneráveis, onde a exposição a riscos biológicos é uma realidade cotidiana (Silva; Nascimento; Oliveira, 2022).

Esses animais são reconhecidos como vetores de diversas doenças, entre elas leptospirose, toxoplasmose e salmonelose (Zeppelini, 2025; Silva; Nascimento; Oliveira, 2022). No entanto, os impactos não se limitam à saúde física, o convívio frequente com infestações de roedores também compromete o bem-estar emocional da população, gerando sentimentos de medo, insegurança e insalubridade no próprio espaço doméstico (Murray *et al.*, 2024). Dados oficiais, como os do Centro de Informação Toxicológica do Distrito Federal (CIT-DF) e do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), apontam que a maioria dos casos de intoxicação por substâncias como raticidas ocorre de forma acidental, muitas vezes envolvendo crianças, o que evidencia a urgência de ações preventivas, educativas e estruturantes (Magalhães; Caldas, 2018).

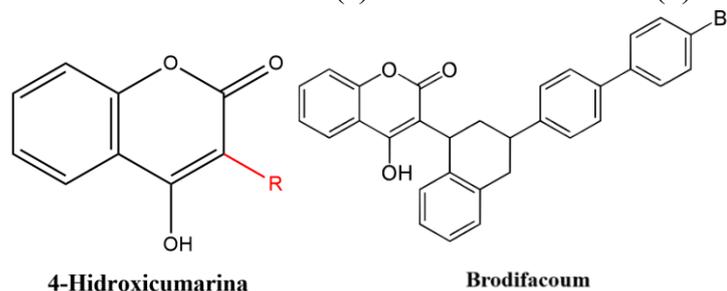
#### 2.1.2. Raticidas Anticoagulantes

O controle químico de roedores consolidou-se como prática disseminada a partir da década de 1940, com a introdução dos raticidas anticoagulantes (RAs). O primeiro composto a ser empregado com essa finalidade foi o dicumarol, cuja atividade hemorrágica foi inicialmente observada em bovinos que ingeriram trevo fermentado. Posteriormente, sua estrutura química foi modificada para uso como raticida, culminando na síntese da warfarina, que obteve ampla difusão no período pós-guerra (Murphy, 2012; Lefebvre *et al.*, 2017). Esses compostos, classificados como anticoagulantes de primeira geração (FGARs, do inglês *First-*

*Generation Anticoagulant Rodenticides*), demonstraram eficácia inicial, porém seu uso contínuo e extensivo levou ao surgimento de populações de roedores resistentes (Aleksandrov *et al.*, 2024; Murphy, 2012).

Diante da crescente resistência aos FGARs, compostos de maior potência foram desenvolvidos a partir da década de 1970, originando os raticidas anticoagulantes de segunda geração (SGARs, do inglês *Second-Generation Anticoagulant Rodenticides*), também conhecidos como “superwarfarinas”. Estes apresentam toxicidade superior, mesmo em doses subterapêuticas, e são eficazes em dose única contra diversas espécies de roedores, incluindo aquelas resistentes à warfarina (Murphy, 2012; Lefebvre *et al.*, 2017). A maioria dos SGARs é derivada da estrutura de 4-hidroxycumarina, Figura 1, como o *brodifacoum*, que contém cadeias laterais volumosas, as quais aumentam a lipossolubilidade do composto, prolongando sua persistência nos tecidos biológicos e elevando seu potencial de bioacumulação (Lefebvre *et al.*, 2017).

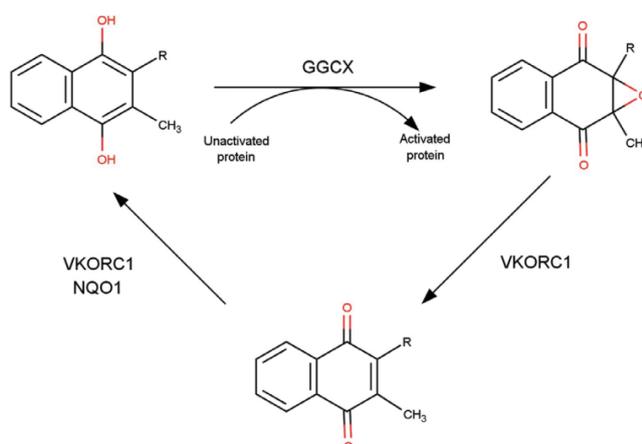
Figura 1 - Estrutura molecular de (a) 4-Hidroxycumarina e (b) *Brodifacoum*



Fonte: Elaborado pelo Autor.

O mecanismo de ação dos RAs fundamenta-se na interrupção do ciclo redox da vitamina K, um cofator essencial para a ativação de proteínas dependentes dessa vitamina, notadamente os fatores da cascata de coagulação sanguínea. Conforme ilustrado na Figura 2, o ciclo inicia-se com a vitamina K na forma de hidroquinona (reduzida), representada na estrutura superior esquerda, que atua como cofator para a enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilase (GGCX). Esta enzima catalisa a carboxilação de resíduos de ácido glutâmico em proteínas precursoras, convertendo-as em suas formas biologicamente ativas (proteínas ativadas), ao mesmo tempo em que oxida a vitamina K hidroquinona à sua forma epóxido (estrutura superior direita) (Aleksandrov *et al.*, 2024).

Figura 2 -Ciclo da vitamina K



Fonte: Adaptado de Lefebvre et al. (2017).

A regeneração da forma ativa da vitamina K (hidroquinona) ocorre pela ação da enzima vitamina K epóxido redutase (VKORC1), que reduz a vitamina K epóxido a vitamina K quinona (estrutura inferior). Subsequentemente, a vitamina K quinona é reduzida à forma hidroquinona pela enzima NQO1 (NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1). A manutenção da integridade desse ciclo é crucial para assegurar níveis adequados de fatores de coagulação funcionalmente ativos (Aleksandrov *et al.*, 2024).

Os raticidas anticoagulantes, especialmente os compostos de segunda geração, exercem seu efeito tóxico ao inibir a enzima VKORC1, bloqueando assim a reciclagem da vitamina K. Como consequência, ocorre uma depleção progressiva da forma ativa da vitamina K, o que impede a carboxilação dos fatores de coagulação. Essa deficiência funcional leva à ocorrência de hemorragias internas nos roedores, que podem culminar em óbito. A interrupção do ciclo da vitamina K é particularmente eficaz com compostos de longa meia-vida e elevada lipofilicidade, como o *brodifacoum* (Aleksandrov *et al.*, 2024).

Apesar da eficácia dos RAs no controle populacional de roedores, sua toxicidade prolongada e o risco de exposição secundária têm suscitado preocupações de ordem ambiental e de saúde pública. Espécies não-alvo, como aves de rapina, mamíferos carnívoros e até mesmo seres humanos, podem ser intoxicadas de forma direta (pela ingestão acidental ou intencional do produto formulado) ou indireta (pelo consumo de presas contaminadas) (Aleksandrov *et al.*, 2024). No contexto clínico, existem relatos de ingestão intencional de *brodifacoum* por humanos, casos que exigem tratamento prolongado com altas doses de vitamina K1, devido à longa meia-vida biológica e à acentuada lipossolubilidade do composto.

Um estudo de caso descreveu a situação de uma paciente que, após intoxicação intencional por *brodifacoum*, necessitou de um total de 88 gramas de vitamina K1 administradas por via oral ao longo de sete meses para a estabilização do tempo de protrombina (TP) e da Razão Normalizada Internacional (INR). O INR é uma medida padronizada da capacidade de coagulação do sangue, enquanto o TP corresponde ao tempo necessário para a formação do coágulo sanguíneo; ambos são parâmetros cruciais na monitorização de distúrbios hemorrágicos. No caso reportado, a paciente apresentava um INR extremamente elevado (17,9), indicativo de um risco severo de sangramentos espontâneos, o que reforça a gravidade da intoxicação por *brodifacoum* e a complexidade do manejo terapêutico (Anderson *et al.*, 2017).

Portanto, embora os RAs permaneçam como uma estratégia amplamente empregada no controle de roedores, os riscos toxicológicos e ambientais a eles associados demandam vigilância constante e justificam o desenvolvimento e a aplicação de métodos analíticos sensíveis e específicos para sua detecção e monitoramento.

## 2.2. Métodos Analíticos para Detecção de RAs

A identificação e quantificação de RAs em amostras biológicas e ambientais representa um desafio analítico contínuo nas áreas de toxicologia forense, ecotoxicologia e vigilância em saúde pública. A extensa aplicação desses compostos no controle de pragas, aliada à sua persistência nos tecidos biológicos e ao risco de intoxicação de espécies não-alvo, impõe a necessidade de métodos analíticos que sejam sensíveis, específicos e rigorosamente validados (Valverde *et al.*, 2021).

Diversas técnicas instrumentais têm sido desenvolvidas e otimizadas para a detecção de RAs em matrizes biológicas como sangue e fígado, que são frequentemente selecionadas devido ao perfil farmacocinético desses compostos. O fígado, por ser o principal órgão de metabolização e acúmulo dos RAs, é a amostra mais utilizada em análises *post-mortem*. Por outro lado, o sangue (ou plasma/soro) é mais adequado para o monitoramento clínico de exposições ou para diagnósticos *ante-mortem* (Valverde *et al.*, 2021; Imran *et al.*, 2015).

Entre os métodos mais amplamente empregados, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), frequentemente acoplada a detectores de fluorescência (FLD) ou ultravioleta (UV), e técnicas mais avançadas, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Estas últimas são particularmente

valorizadas por sua elevada sensibilidade, capacidade de análise multirresíduo e por atingirem limites de quantificação compatíveis com as exigências regulatórias e forenses (Imran *et al.*, 2015). Além das técnicas de separação e detecção, etapas de preparo de amostra, como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), bem como suas variações, têm sido cruciais para otimizar a recuperação dos analitos e a pureza dos extratos. Estratégias como o método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) e a extração com solvente acelerado (ASE) também foram aplicadas com sucesso, especialmente na análise de RAs em tecidos hepáticos (Imran *et al.*, 2015).

Adicionalmente às abordagens clássicas, técnicas de microextração, como a extração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME, do inglês *Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), vêm sendo exploradas por requererem volumes reduzidos de solventes orgânicos e apresentarem boa eficiência de recuperação. No entanto, tais técnicas ainda demandam uma certa habilidade do pesquisador para sua consolidação no monitoramento rotineiro de diferentes RAs (Imran *et al.*, 2015).

Apesar dos avanços notáveis, ainda existem limitações significativas. O custo elevado dos equipamentos, o tempo prolongado das análises, a necessidade de operadores especializados e a complexidade instrumental inerente a muitas dessas técnicas dificultam sua adoção em laboratórios com infraestrutura limitada ou em contextos que exigem triagem rápida (Valverde *et al.*, 2021).

Nesse cenário, observa-se um interesse crescente por métodos analíticos alternativos que consigam conciliar sensibilidade, seletividade e simplicidade operacional. Valverde *et al.* (2021) propuseram um sistema de pontuação para comparar diferentes técnicas analíticas com base em critérios como percentual de recuperação, limite de quantificação (LOQ), volume de amostra requerido e número de compostos detectados simultaneamente, destacando o bom desempenho de métodos baseados em LC-MS/MS com etapas de extração em fase sólida (SPE) ou extração fase sólida dispersiva (dSPE). Ainda assim, tais métodos permanecem, em grande parte, restritos ao ambiente laboratorial especializado.

Apesar da elevada sensibilidade dos métodos cromatográficos, suas aplicações se limitam a análises em laboratório, e de alto custo. Diante disso, a busca por alternativas portáteis, de baixo custo, sustentáveis e acessíveis tem fomentado o desenvolvimento de abordagens baseadas em fluorescência. Essa técnica se destaca por reduzir custos e consumo

de reagentes, além de viabilizar a criação de dispositivos portáteis para análises *in situ*. A combinação da fluorescência com nanomateriais funcionais, em particular, tem se mostrado promissora para a detecção de RAs. Fica evidente, portanto, a lacuna existente entre a precisão dos métodos convencionais e a demanda por plataformas analíticas que conciliem sensibilidade, portabilidade e baixo custo, justificando o desenvolvimento do dispositivo proposto neste trabalho.

### 2.2.1. *Técnicas de Fluorescência na Química Analítica*

A fluorescência, enquanto fenômeno de emissão de luz por substâncias excitadas por radiação eletromagnética, tem se consolidado como uma ferramenta analítica promissora em diversas áreas, inclusive no monitoramento ambiental, na segurança alimentar e na detecção de poluentes emergentes. Por sua elevada sensibilidade, seletividade e simplicidade operacional, técnicas baseadas em fluorescência têm sido amplamente aplicadas para análises qualitativas e quantitativas, em diferentes tipos de amostras (Gu *et al.*, 2024; Morgana *et al.*, 2024).

Do ponto de vista espectroscópico, a fluorescência ocorre quando uma molécula fluorófora absorve radiação de um determinado comprimento de onda e, após um curto intervalo de tempo (da ordem de nanossegundos), retorna ao estado fundamental emitindo luz de menor energia. Essa emissão é diretamente proporcional à concentração do analito e pode ser modulada por interações físico-químicas específicas, o que permite a construção de sensores seletivos (Gu *et al.*, 2024). A facilidade de integração dessas técnicas com dispositivos ópticos miniaturizados tem impulsionado seu uso em sensores portáteis, abrindo novas possibilidades para análises rápidas e *in situ*.

Entre as abordagens, destacam-se os sensores baseados em pontos quânticos de carbono (*carbon dots*, CD), nanopartículas fluorescentes de dimensões inferiores a 10 nm que apresentam propriedades ópticas notáveis, como emissão de fluorescência intensa, estabilidade fototérmica e baixa toxicidade. Devido à presença de grupos funcionais, como carboxila e hidroxila, em sua superfície, os CD são altamente solúveis em água e podem ser facilmente funcionalizados para reconhecimento seletivo de analitos (Ghanbarlou *et al.*, 2025). Métodos de síntese *bottom-up*, a partir de precursores naturais como cascas de frutas ou biomoléculas simples, têm sido explorados como rotas sustentáveis e econômicas de produção.

Além dos CD, os *quantum dots* metálicos, como CdTe ou PbS, também têm sido estudados. Embora apresentem forte luminescência, possuem restrições quanto ao uso em sistemas biológicos devido à toxicidade de seus constituintes. Em resposta a essa limitação, surgiram os pontos quânticos dopados ou alternativos, como os baseados em AgInS<sub>2</sub>, que oferecem desempenho fotoluminescente similar com menor impacto ambiental (Ghanbarlou *et al.*, 2025). Também os *graphene quantum dots* (GQDs) têm atraído interesse devido à sua biocompatibilidade, excelente fotoestabilidade e capacidade de funcionalização, o que os tornam versáteis para aplicações em biossensores e bioimagem (Ghanbarlou *et al.*, 2025).

No contexto de detecção, os sensores fluorescentes baseiam-se em mecanismos como *quenching*, efeito de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) e efeito de filtro interno (IFE). Tais mecanismos permitem a construção de sensores do tipo “*turn-off*” ou “*turn-on*”, nos quais a intensidade da fluorescência é modulada em função da presença do analito alvo. Sistemas radiométricos, que utilizam mais de um sinal de emissão para correção de desvios experimentais, também vêm sendo desenvolvidos como forma de aumentar a precisão analítica (Morgana *et al.*, 2024; Gu *et al.*, 2024).

Apesar das vantagens, algumas limitações persistem nas medidas de fluorescência, como o fenômeno de autoextinção (*self-quenching*), a dependência de protocolos de funcionalização específicos e desafios relacionados à estabilidade em diferentes matrizes. Ainda assim, as aplicações em sistemas ambientais, alimentares e biomédicos têm se multiplicado. No setor de alimentos, por exemplo, técnicas como matrizes de excitação-emissão (EEM) e espectroscopia de fluorescência síncrona (SFS) vêm sendo utilizadas para avaliação de frescor, detecção de resíduos de pesticidas e verificação de autenticidade, com grande potencial para integração com algoritmos de inteligência artificial e dispositivos portáteis (Gu *et al.*, 2024).

Essas evidências indicam que os sensores fluorescentes, particularmente aqueles baseados em nanomateriais como os CD, representam uma alternativa viável e estratégica aos métodos convencionais, com potencial para aplicações em diversas frentes analíticas, inclusive na detecção de raticidas anticoagulantes. Nesse contexto, nanomateriais como os *carbon dots* surgem como uma plataforma promissora para o desenvolvimento de sensores fluorescentes, conforme detalhado a seguir.

### 2.3. Nanopartículas de Carbono Fluorescentes (*Carbon dots*)

As nanopartículas de carbono, conhecidas como *carbon dots* (CD), formam uma classe de nanomateriais com propriedades ópticas singulares, destacando-se pela fluorescência intensa, alta solubilidade em água e biocompatibilidade. Estruturalmente, os CD apresentam tamanhos inferiores a 10 nm e contêm núcleos de carbono  $sp^2/sp^3$ , funcionalizados com grupos químicos como  $-OH$ ,  $-COOH$  e  $-NH_2$ , que influenciam diretamente seu comportamento fotoluminescente (Zhu *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2016).

Os mecanismos de emissão de fluorescência nos CD ainda são objeto de debate, mas geralmente envolvem efeitos de confinamento quântico, estados de superfície, emissões de moléculas fluorescentes adsorvidas e o fenômeno conhecido como emissão intensificada por reticulação (*crosslink-enhanced emission*) (Zhu *et al.*, 2015). Tal diversidade de mecanismos reflete-se na dependência da fluorescência em relação ao comprimento de onda de excitação e às condições da superfície dos CD (Gao *et al.*, 2025).

A síntese dos CD pode seguir rotas do tipo *top-down*, a partir da fragmentação de materiais carbonáceos como grafite, ou *bottom-up*, por carbonização de precursores orgânicos simples. Entre os métodos mais utilizados estão a síntese hidrotermal, a irradiação por micro-ondas e a decomposição térmica, geralmente empregando precursores como ácido cítrico, uréia, ou materiais vegetais (Gao *et al.*, 2025; Schneider *et al.*, 2016).

Os CD têm se destacado em aplicações analíticas, especialmente em sensores fluorescentes para detecção de íons metálicos, pesticidas, fármacos e biomoléculas (Almeida *et al.*, 2022.; Maia *et al.*, 2022) Essa versatilidade decorre de sua sensibilidade óptica, estabilidade química e possibilidade de funcionalização seletiva (Ghanbarlou *et al.*, 2025; Gaviria-Arroyave *et al.*, 2020). Além disso, os CD têm sido explorados em bioimagem celular, monitoramento ambiental e diagnóstico clínico devido à sua baixa toxicidade e intensa emissão de fluorescência mesmo em meios biológicos complexos (Morgana *et al.*, 2024).

Recentemente, tem-se observado um crescimento no desenvolvimento de sensores fluorescentes baseados em CD para detecção de contaminantes emergentes e outros compostos tóxicos ao meio ambiente, com vantagens como rapidez na resposta analítica, portabilidade e baixo custo operacional (Gu *et al.*, 2024).

As principais vantagens do emprego dos CD incluem baixo custo de produção, facilidade de obtenção a partir de fontes renováveis, estabilidade fotoquímica e baixa

toxicidade, especialmente quando comparados aos pontos quânticos tradicionais baseados em metais potencialmente tóxicos como cádmio ou chumbo (Gao *et al.*, 2025; Ghanbarlou *et al.*, 2025).

Apesar dessas vantagens, alguns desafios ainda precisam ser superados. Entre eles, destacam-se a dificuldade de padronização dos métodos de síntese, o controle preciso do tamanho e dos grupos funcionais e a necessidade de compreensão mais profunda dos mecanismos de emissão. A emissão em comprimentos de onda mais longos, desejável para bioimagem *in vivo*, ainda é limitada em muitos CD disponíveis. Para superar essa limitação, uma estratégia amplamente adotada consiste na modificação superficial dos CD por meio da conjugação com biomoléculas que funcionem como elementos de reconhecimento. Essa abordagem, conhecida como bioconjugação, amplia consideravelmente o desempenho analítico dos sensores baseados em CD, sobretudo em matrizes complexas (Schneider *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2015).

A bioconjugação dos CD pode ser realizada com diferentes biomoléculas, como aminoácidos, peptídeos, enzimas ou anticorpos, visando aumentar a seletividade na detecção de analitos específicos. Essa funcionalização pode ocorrer por meio de ligações covalentes, adsorção física ou interações eletrostáticas, dependendo dos grupos funcionais presentes (Foubert *et al.*, 2016).

A presença de grupos funcionais como carboxilas ou aminas nos CD permite sua conjugação com biomoléculas por meio de agentes de acoplamento, como o 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e o N -hidroxissuccinimida (NHS). A fenilalanina, por exemplo, tem sido utilizada como biomolécula conjugada por sua afinidade com compostos aromáticos, como os raticidas anticoagulantes, conferindo ao sensor propriedades de reconhecimento seletivo (Gaviria-Arroyave *et al.*, 2020).

Essa estratégia tem se mostrado eficaz na construção de sensores fluorescentes altamente seletivos e sensíveis, com aplicações promissoras na detecção de contaminantes em matrizes ambientais e alimentícias complexas (Ghanbarlou *et al.*, 2025; Foubert *et al.*, 2016).

O nanosensor fluorescente empregado neste trabalho, que consiste em *carbon dots* sintetizados por via hidrotermal e funcionalizados com a fenilalanina (CD-F), teve seu desenvolvimento e caracterização inicial realizados em estudo prévio por Paula (2022).

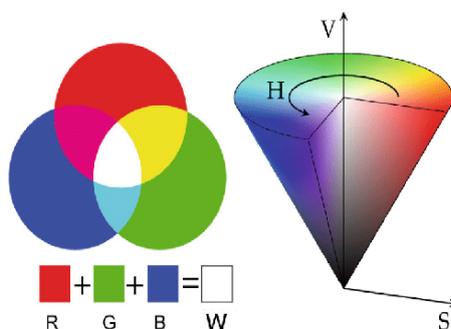
## 2.4. Técnica de Imagem Digital Fluorescente (FDIB)

### 2.4.1. Fundamentos da Técnica

A técnica de imagem digital baseada em fluorescência (*Fluorescence Digital Image-Based*, FDIB) consiste na captura e análise de sinais fluorescentes emitidos por analitos ou nanomateriais, utilizando dispositivos ópticos acessíveis como smartphones, webcams ou câmeras digitais. Esses sinais são coletados após a excitação da amostra por fontes de luz apropriadas, geralmente LEDs emissores de radiação UV, e registrados por sensores fotossensíveis do tipo CCD ou CMOS, presentes nas câmeras e webcams (Da Silva *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2024).

O modelo RGB, visualizado como um cubo tridimensional mostrado na Figura 3 decompõe cada pixel em três componentes de cor primária — vermelho, verde e azul. A intensidade de cada componente varia em uma escala de 0 (ausência de cor) a 255 (intensidade máxima), permitindo que a fluorescência capturada seja expressa como uma combinação numérica (R, G, B) para correlação com a concentração do analito.

Figura 3 - Representação esquemática dos modelos de cores RGB (cubo) e HSV (cilindro)



Fonte: Adaptado de Rosero *et al.* (2017).

Por sua vez, o modelo HSV oferece uma representação mais próxima da percepção humana, sendo visualizado como um cilindro exibido na Figura 3. Ele é composto por três parâmetros: *Hue* (Matiz), que representa a cor em um círculo cromático de 0 a 360 graus; *Saturation* (Saturação), que indica a pureza da cor, variando do centro do cilindro (tons de cinza) para a borda (cor pura); e *Value* (Valor ou Brilho), que representa a intensidade luminosa ao longo do eixo vertical do cilindro. A conversão entre os modelos RGB e HSV é amplamente utilizada em FDIB para facilitar o processamento dos dados, uma vez que permite isolar características específicas do sinal fluorescente, como alterações de matiz ou

intensidade, de forma mais sensível e intuitiva (Almeida et al., 2022; Oliveira et al., 2024). Essa abordagem digital proporciona uma forma acessível, objetiva e não destrutiva de quantificar a fluorescência em diferentes sistemas analíticos, com potencial para aplicação em campo, especialmente quando associada a dispositivos portáteis e plataformas sustentáveis.

#### 2.4.2. Aplicações e Vantagens

A metodologia FDIB tem sido aplicada com sucesso em diversas áreas, como segurança alimentar, controle ambiental, ensino de química e análise forense. Exemplos incluem a determinação de  $\text{Cu}^{2+}$  em bebidas alcoólicas (Maia *et al.*, 2022), hipoclorito em saneantes (Almeida *et al.*, 2022) e aminas biogênicas em laticínios (Santos *et al.*, 2023), demonstrando sua adaptabilidade a diferentes tipos de analitos e matrizes.

Entre suas principais vantagens, destacam-se a portabilidade, o baixo custo de instrumentação, a rapidez nas análises, a possibilidade de aplicações *in situ* e a significativa redução no uso de reagentes e geração de resíduos, conferindo à FDIB um caráter sustentável e atrativo para análises em locais com recursos laboratoriais limitados (Da Silva *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2023)

Além disso, dispositivos analíticos baseados em papel (PADs) ou plataformas em 3D impressas com materiais biodegradáveis, como ácido polilático (PLA), vêm sendo integrados à FDIB, favorecendo sua miniaturização e aplicabilidade em campo com elevada precisão e reprodutibilidade (Maia *et al.*, 2022; Da Silva *et al.*, 2020).

#### 2.4.3. Comparação com Técnicas Tradicionais

Em comparação com métodos analíticos clássicos, como espectrofluorimetria e HPLC, a técnica FDIB se destaca pela acessibilidade e simplicidade operacional. Enquanto os métodos convencionais requerem infraestrutura laboratorial robusta, treinamento técnico especializado e etapas analíticas mais complexas, a FDIB oferece uma alternativa mais econômica, rápida e ecológica, mantendo bons níveis de sensibilidade e precisão (Almeida *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2024).

Além disso, a técnica FDIB se alinha às diretrizes da química verde ao reduzir significativamente o consumo de reagentes e energia, sendo considerada uma metodologia promissora para monitoramentos em tempo real e análises descentralizadas (Santos *et al.*, 2023).

### 3.OBJETIVOS

#### 3.1.Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método analítico baseado em *carbon dots* funcionalizados para a detecção de raticidas derivados do *brodifacoum*, utilizando um dispositivo portátil e análise de imagem digital.

#### 3.2.Objetivos Específicos

- Sintetizar os *carbon dots*;
- Realizar a conjugação da fenilalanina na superfície dos *carbon dots*;
- Realizar a modelagem 3D do dispositivo;
- Projetar e testar o circuito de alimentação do dispositivo;
- Avaliar *design* e tamanho, baseado na radiação emitida pela fonte;
- Realizar as medidas de fluorescência utilizando o método baseado em FDIB;
- Realizar medidas de fluorescência empregando um espectrofluorímetro convencional;
- Comparar com os resultados obtidos pela análise com o dispositivo;
- Testar a seletividade do método em diferentes matrizes.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Preparo de soluções

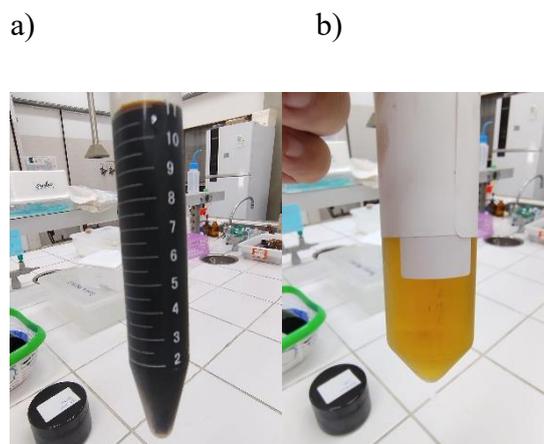
As soluções padrão do analito foram preparadas a partir de adequada diluição da solução padrão estoque de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de *brodifacoum*, preparada em acetona, a fim de obter as concentrações de 5 a  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Adicionalmente, foi preparada uma solução tampão de carbonato/bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), com concentração de  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e pH 10, que foi utilizada nas medidas por fluorescência.

### 4.2. Síntese dos *Carbon dots*

A síntese dos *carbon dots* foi realizada pelo método hidrotermal, utilizando ácido cítrico e amina como reagentes precursores conforme proposto por Schneider e colaboradores, com modificações (Schneider *et al.*, 2017). Esse método é amplamente utilizado na literatura devido à sua simplicidade, baixo custo e caráter ambientalmente amigável, uma vez que emprega água como solvente (De Paula *et al.*, 2022; Nadimpalli; Bandyopadhyaya; Runkana, 2018).

Para o preparo, foram pesados 1,05 g de ácido cítrico (5,5 mmol) e 331,65  $\mu\text{L}$  de etilenodiamina (5 mmol), dissolvidos em 10 mL de água deionizada. A mistura foi transferida para um reator de Teflon®, acondicionado em cápsula de aço inox e submetido a aquecimento em forno programado a  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 horas, com rampa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob pressão. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o produto foi filtrado em filtro Millipore (porosidade de  $0,22 \mu\text{m}$ ) e centrifugado por 10 minutos. A solução obtida, Figura 4, foi diluída e armazenada sob refrigeração até seu uso.

Figura 4 - Solução do *carbon dot* (a) antes da diluição e (b) após diluição



Fonte: O Autor.

### 4.3. Conjugação dos CD com Fenilalanina

A conjugação foi realizada utilizando um método adaptado de Song e colaboradores (Song et al., 2015). Para isto, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  dos CD sintetizados foi colocada em um balão de reação, neste mesmo balão, foram adicionados 7,5 mL de solução tampão PBS (pH 7,2) contendo 0,5 mg de Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 7,5 mg de *N*-hidroxissuccinimida (NHS), deixando a reação sob agitação a 37 °C por 1h. Em seguida, foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de uma solução de fenilalanina em solução tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) de pH=7,2 e a reação foi deixada a 37 °C durante a noite (*overnight*), como mostrado na Figura 5. No dia seguinte os CD conjugados foram armazenados sob refrigeração para desativar as carbonilas remanescentes.

Figura 5 - Reação de conjugação da fenilalanina com o *carbon dot*



Fonte: O Autor.

#### 4.4. Desenvolvimento do Dispositivo

O dispositivo portátil foi modelado no *software* gratuito TinkerCAD. O projeto 3D incluiu a estrutura da caixa e o suporte do tripé, com base em arquivos disponibilizados na própria plataforma e posteriormente adaptados às necessidades do sistema óptico e da câmera.

A montagem do sistema eletrônico foi realizada com o microcontrolador ESP-32-CAM, que possui conectividade Wi-Fi integrada e uma câmera embutida, o que viabiliza a aquisição remota de imagens e o controle do sistema sem a necessidade de computadores externos. Para a iluminação da amostra, utilizou-se uma matriz de LEDs endereçáveis 5x5 WS2812B, conectada ao microcontrolador por meio de um módulo conversor RS232-TTL, o qual garante compatibilidade de sinal entre os dispositivos.

O controle da matriz de LEDs foi feito através do aplicativo gratuito WLED, que permite ajustar parâmetros como intensidade luminosa e padrão de emissão diretamente pelo smartphone, otimizando a excitação da fluorescência e oferecendo praticidade na operação do dispositivo.

#### 4.5. Medidas de Fluorescência por FDIB

As medidas de fluorescência foram realizadas através do método baseado em imagens digitais fluorescentes (FDIB, do inglês Fluorescence Digital Image Based) que é uma nova ferramenta de análise por imagens digitais empregado na detecção fluorimétrica e registra a cor e intensidade da fluorescência em valores dos canais RGB, com o modelo de cores vermelho (*Red*) verde (*Green*) e azul (*Blue*) (Da Silva et al., 2020).

Para realizar a análise, a amostra é transferida para um frasco *vial* de 2 mL e então colocada no equipamento por um orifício localizado na parte superior. A câmera do smartphone utilizado (Moto G84) foi posicionada centralmente no focalizador, que proporciona estabilização e distância fixa entre a lente e a amostra.

A amostra, uma vez irradiada pela fonte de excitação do equipamento, era fotografada mantendo-se constantes os parâmetros de foco e luminosidade, de forma a garantir a reprodutibilidade dos dados. As imagens registradas foram analisadas no *software* ImageJ<sup>®</sup>, onde foram extraídos os valores dos canais RGB, utilizados para construção das curvas analíticas. A Figura 6 representa a configuração utilizada para a realização das análises por FDIB.

Figura 6 – Análise por FDIB



Fonte: O Autor.

#### 4.6. Medidas de Fluorescência por Espectrofluorímetro

As medidas de fluorescência por espectrofluorimetria convencional foram realizadas em um espectrofluorímetro da marca HORIBA JOBIN YVON, modelo NanoLog UV-VIS-NIR, instalado no Laboratório de Terras Raras do Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE. Para essa etapa, foram utilizadas as soluções padrão de 5 a 25 mg·L<sup>-1</sup> de *brodifacoum* para construção da curva analítica.

As medições foram realizadas com excitação a 470 nm e emissão monitorada a 530 nm, correspondendo aos máximos observados de emissão para os CD conjugados com fenilalanina.

Durante as análises, os volumes do carbon dot funcionalizado e da solução tampão foram mantidos constantes, conforme previamente estabelecido na otimização dos parâmetros experimentais utilizados no método FDIB. Essa padronização visou garantir as mesmas condições entre os dois métodos analíticos para ser possível comparar os resultados.

#### 4.7. Detecção do *Brodifacoum* usando o método FDIB

Para a detecção do *brodifacoum* utilizando o método FDIB, foi preparada uma solução padrão do analito com concentração de 100 mg·L<sup>-1</sup>. A proporção de diluição da solução do CD funcionalizado com fenilalanina também foi otimizada para a construção da curva analítica. Cada ponto da curva foi obtido em triplicata, e foram utilizados brancos constituídos por soluções de CD-F em tampão carbonato/bicarbonato de pH 10.

A otimização do método envolveu a variação de parâmetros como intensidade da fonte de excitação e volume dos CD utilizados, a fim de identificar as condições ideais para maximizar a interação entre os CD funcionalizados e o *brodifacoum*.

Os dados obtidos foram tratados por regressão linear, com cálculo do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Além disso, os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados conforme as normas metrológicas vigentes da ANVISA.

#### **4.8. Estudo de Seletividade em Diferentes Matrizes**

Para avaliar a seletividade do método desenvolvido frente a possíveis compostos interferentes, foram realizados testes de adição e recuperação em três matrizes comerciais representativas: água tônica, água mineral e refrigerante de limão.

As adições foram realizadas nos níveis de 10, 15 e 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de *brodifacoum*, previamente diluídos na proporção 1:2, nos respectivos produtos, que foram sonicados para remoção de gases dissolvidos. Cada ponto da curva foi preparado em triplicata, totalizando nove análises por amostras. Os resultados foram utilizados para o cálculo das taxas de recuperação (%).

Adicionalmente, para avaliar a precisão intra ensaio, foram realizadas 10 réplicas consecutivas do ponto de 15  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  em cada matriz, permitindo a estimativa do RSD com maior robustez estatística.

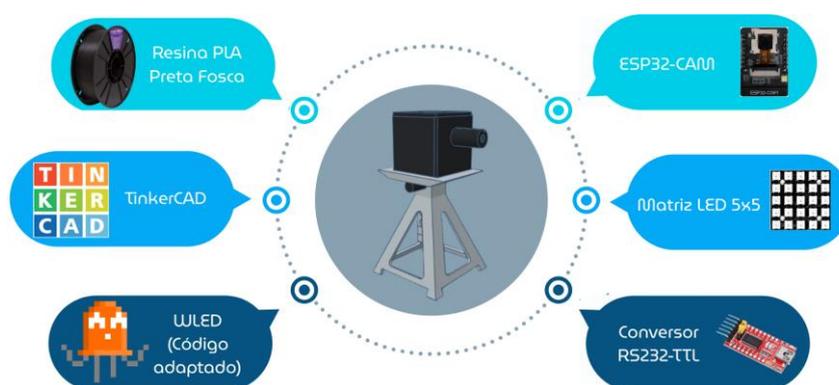
## 5.RESULTADOS

O desenvolvimento de um sistema de análise portátil, de baixo custo e de fácil montagem foi um dos pilares deste trabalho. A seção abaixo detalha os componentes de *hardware* e *software* selecionados, a montagem do circuito eletrônico e a caracterização da fonte de excitação, que juntos constituem o dispositivo de análise por imagem digital.

### 5.1.Desenvolvimento do Dispositivo Portátil

Para a construção do dispositivo, foram selecionados componentes de baixo custo e amplamente acessíveis, conforme ilustrado na Figura 7. A estrutura física do dispositivo foi modelada na plataforma de design 3D TinkerCAD e impressa utilizando resina de ácido polilático (PLA) na cor preta fosca, escolhida especificamente para minimizar reflexões internas de luz. O controle do sistema e a captura de imagens foram centralizados no microcontrolador ESP32-CAM, que possui câmera e conectividade Wi-Fi integradas visando facilitar a conectividade. A fonte de excitação utilizada foi uma matriz de LEDs 5x5 do tipo WS2812B, e para o controle da intensidade e cor destes LEDs, foi empregado o *software* de código aberto WLED.

Figura 7 - Componentes de *hardware* e *software* utilizados na construção do dispositivo

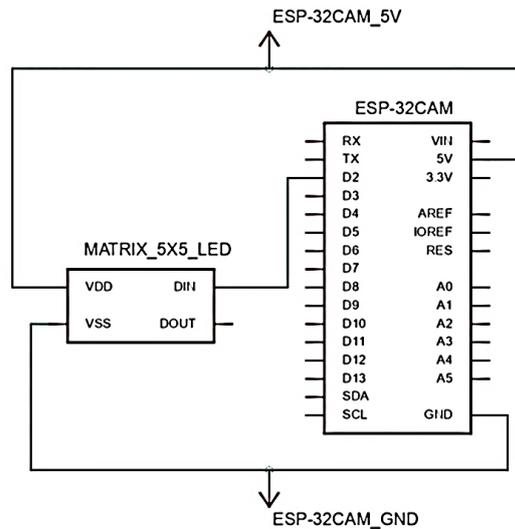


Fonte: O Autor.

A montagem eletrônica do sistema, cujo esquema é apresentado na Figura 8, consistiu na conexão entre o microcontrolador ESP32-CAM e a matriz de LEDs. A ligação foi realizada conectando-se o pino de dados (DATA) da matriz de LEDs a um dos pinos GPIO (*General Purpose Input/Output*) do ESP32, e alimentando o sistema com uma tensão de 5V, que era

fornecido através da conexão USB do conversor RS232-TTL, alimentado por uma bateria portátil. Esta configuração simples garante a comunicação e o controle eficiente da fonte de excitação a partir do microcontrolador, e a entrada USB aliada à bateria portátil permite a utilização do dispositivo também para análises *in situ*.

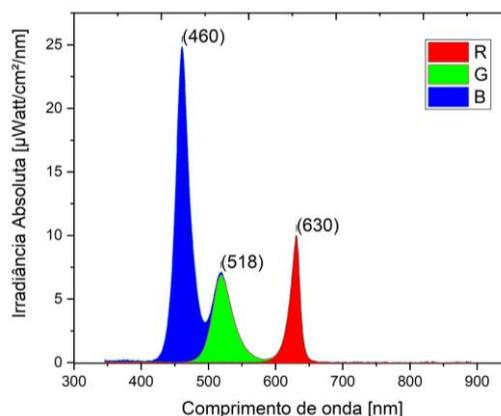
Figura 8 - Esquema do circuito eletrônico do dispositivo



Fonte: O Autor

A caracterização da fonte de excitação é uma etapa fundamental para compreender o perfil da radiação que incide sobre a amostra. A Figura 9 apresenta o espectro de radiância absoluta do LED WS2812B, fornecido pelo fabricante. O espectro exibe uma emissão de banda larga, com um pico principal em aproximadamente 460 nm (região do azul), o que é compatível com o comprimento de onda de excitação ótimo dos *carbon dots* (470 nm), garantindo uma excitação eficiente do sistema e, conseqüentemente, uma maior intensidade de fluorescência. Além disso, a presença de picos em 518 nm (região do verde) e 630 nm (do vermelho) indica a possibilidade de aplicação do dispositivo para espécies com comprimentos de onda de excitação nessas regiões.

Figura 9 - Espectro de radiância absoluta versus comprimento de onda para o LED WS2812B



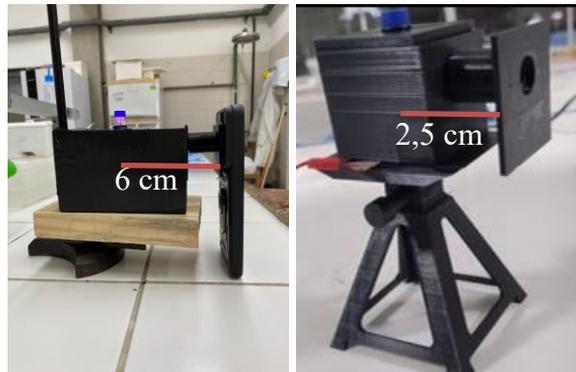
Fonte: Adaptado de Worldsemi Co. (2016).

## 5.2. Avaliação dos Parâmetros do Dispositivo Portátil

Após a montagem do dispositivo, a etapa subsequente consistiu na avaliação de seus parâmetros operacionais. O objetivo foi determinar as condições que proporcionassem a maior sensibilidade e a melhor relação sinal-ruído para as análises, focando-se no design estrutural e na fonte de excitação, conforme detalhado a seguir.

Um dos fatores críticos para a sensibilidade de um sistema óptico é a distância entre a amostra e o detector. Um caminho óptico longo pode resultar na perda de sinal e no aumento da captação de radiação espúria. Com o intuito de melhorar este parâmetro, foram construídas e avaliadas duas versões do dispositivo. A primeira versão possuía um caminho óptico de 6 cm, enquanto a segunda, apresentou um caminho óptico reduzido para 2,5 cm como mostrado na Figura 10. A versão de 2,5 cm apresentou maior captação do sinal de fluorescência e foi a escolhida para a realização de todos os experimentos subsequentes.

Figura 10 - Comparativo entre a primeira versão do dispositivo (esquerda) e a versão otimizada (direita)



Fonte: O Autor

A intensidade da fonte de excitação (LED) foi outro parâmetro avaliado. O objetivo foi encontrar um equilíbrio entre excitação da amostra, e baixo ruído de fundo gerado por radiação espúria. Para isso, foram testadas as intensidades de 100%, 50% e 30%, medindo-se o sinal do canal azul do detector na ausência de amostra. A intensidade do LED foi controlada através do *software* WLED, utilizando o *slider* de intensidade localizado acima da seleção de cores. A interface do *software* é mostrada na Figura 11.

Figura 11 – Interface do *software* WLED



Fonte: O Autor

O resultado, apresentado na Figura 12, demonstra que a radiação espúria diminuiu significativamente com a redução da potência do LED. Embora intensidades abaixo de 30% tenham sido testadas, elas não promoveram uma excitação significativa da amostra fluorescente. Portanto, a intensidade de 30% foi selecionada como a condição ótima de trabalho, por oferecer a melhor relação entre o sinal analítico e o ruído instrumental.

Figura 12 - Avaliação da radiação espúria (sinal do canal azul na ausência de amostra) em função da intensidade do LED. a) 100%, b) 50% e c) 30%

a)



b)



c)



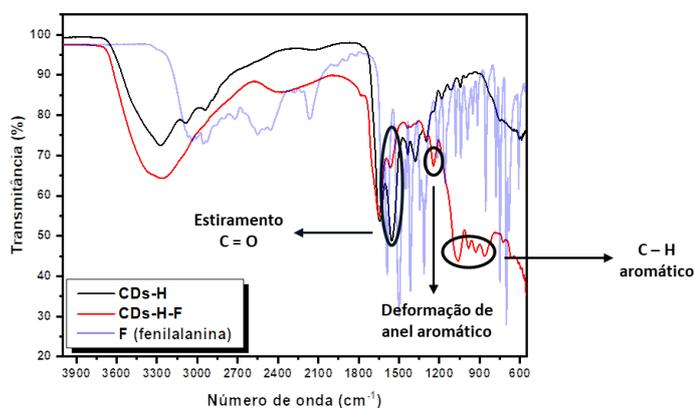
Fonte: O Autor

### 5.3. Avaliação da Nanopartícula

O nanosensor fluorescente empregado neste trabalho, que consiste em *carbon dots* sintetizados por via hidrotermal e funcionalizados com a fenilalanina (CD-F), teve seu desenvolvimento e caracterização inicial realizados em estudo prévio por Paula (2022).

A confirmação da bioconjugação foi obtida por meio de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Conforme apresentado na Figura 13, a análise do material antes da conjugação revelou bandas características de grupos hidroxila (-OH) e amina (-NH<sub>2</sub>) entre 3000 e 3300 cm<sup>-1</sup>, além de vibrações de estiramento C=O de grupos carbonila e carboxila (1500-1700 cm<sup>-1</sup>), que são essenciais para a reação subsequente. Após a reação com fenilalanina, observou-se um leve deslocamento do pico em 1553 cm<sup>-1</sup> para 1563 cm<sup>-1</sup>, indicativo da formação de uma ligação amida secundária, o que indica o sucesso da funcionalização da superfície dos *carbon dots*.

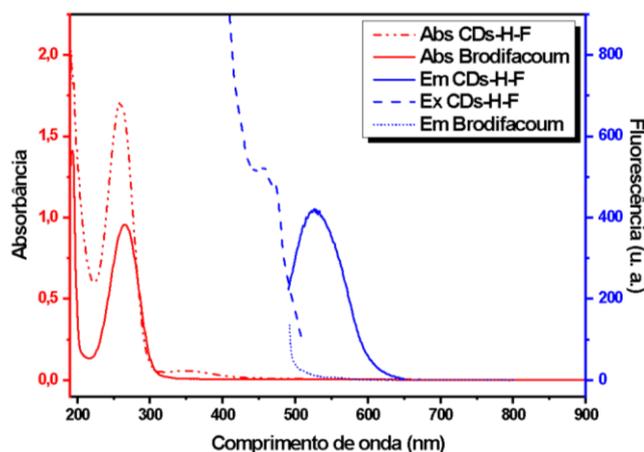
Figura 13 - Espectro de FTIR dos *carbon dots* antes (CD) e após a bioconjugação com fenilalanina (CD-F).



Fonte: Paula (2022).

As propriedades ópticas do sistema também foram investigadas para estabelecer as melhores condições de análise. O espectro de emissão dos CD-F, mostrado na Figura 14, apresentou um máximo em 528 nm quando excitado em 470 nm. Esta faixa de trabalho foi considerada ideal, uma vez que o analito de interesse, *brodifacoum*, não exibe fluorescência significativa nesta região, minimizando assim o risco de sobreposição espectral e de interferências.

Figura 14 - Espectros de excitação, emissão e absorção dos CD-F e espectros de absorção e emissão do *Brodifacoum*



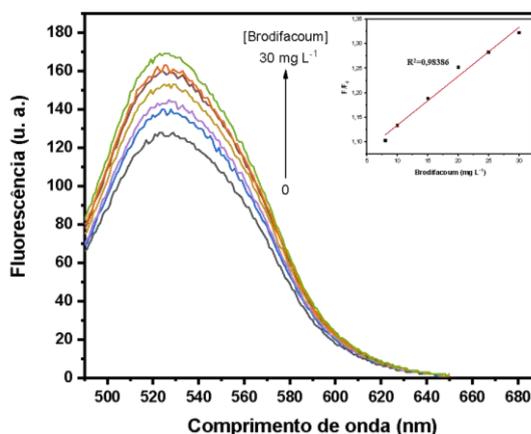
Fonte: Adaptado de Paula (2022).

Portanto, com as propriedades estruturais e ópticas do sistema de CD-F devidamente estabelecidas, o presente trabalho focou na otimização de seu uso em um dispositivo portátil

e na validação de um método de análise por imagem digital para a determinação de *brodifacoum* em amostras de interesse.

Adicionalmente, a caracterização da resposta do *carbon dot* ao analito foi investigada em estudos prévios, conforme ilustrado na Figura 15. O espectro de emissão dos CD-F exibe um pico máximo em, aproximadamente, 530 nm, comprimento de onda este que foi utilizado para monitorar a variação da fluorescência na presença de *brodifacoum* (Paula, 2022). No detalhe (*inset*), é apresentada a curva analítica obtida em um espectrofluorímetro convencional, a qual demonstra linearidade ( $R^2 = 0,9839$ ) na faixa de concentração de 0 a 30  $\text{mg L}^{-1}$  de *brodifacoum*, com o aumento da intensidade da razão de fluorescência ( $F/F_0$ ) sendo proporcional ao aumento da concentração do analito (Paula, 2022). O desempenho e as figuras de mérito obtidos nesta curva foram utilizados como base para comparar com o dispositivo portátil desenvolvido no presente trabalho.

Figura 15 - Espectros de fluorescência para determinação de *brodifacoum*, soluções de referência contendo, 0; 8; 10; 15; 20; 25 e 30  $\text{mg L}^{-1}$ , em destaque a curva analítica obtida a partir dos espectros de fluorescência



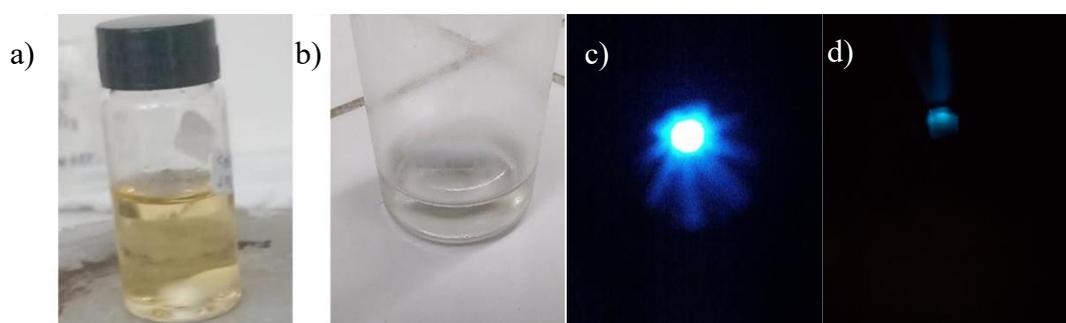
Fonte: Adaptado de Paula (2022).

A concentração do *carbon dot* é um parâmetro crítico que afeta diretamente a resposta analítica em ensaios baseados em variação de fluorescência. Uma concentração excessivamente alta pode levar a efeitos de filtro interno ou à saturação do detector, enquanto uma concentração muito baixa pode fazer com que a interação entre a nanopartícula e o analito não aconteça em maiores concentrações. Portanto, realizou-se a avaliação do fator de diluição da solução estoque de *carbon dots* conjugados com fenilalanina (CD-F) para estabelecer a melhor condição de trabalho.

A Figura 16 apresenta o comparativo visual entre a solução de CD-F após a síntese com diluição de 25 vezes (Fig. 16 a) e com a diluição de 2000 vezes (Fig. 16 b). A solução mais

concentrada, mostrada na Figura 16 a, exibe um aspecto amarelado devido à grande concentração das espécies. Essa solução apresentou um sinal do branco com intensa radiação espúria e a saturação dos canais de cor (RGB), como pode ser observado pela imagem predominantemente branca na Figura 16 c. Um sinal saturado, com valores de intensidade próximos a 255, impede a quantificação da variação de fluorescência proveniente da emissão do analito, tornando a análise inviável.

Figura 16 – Avaliação do volume do *carbon dot*: a) CD-F diluída 25 vezes b) CD-F diluído 2000 vezes, c) e d) comparativo visual das duas soluções a) e b), respectivamente, obtidos por imagem digitais



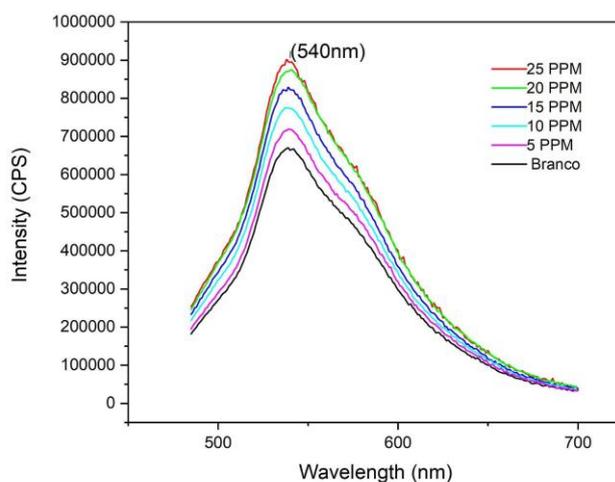
Fonte: O Autor

Em contrapartida, a solução com fator de diluição de 2000 vezes, mostrada na Figura 16 d mostrou-se límpida e visualmente transparente. Esta condição produziu um sinal de branco com a fluorescência azul, ausência de radiação espúria e, crucialmente, com os canais de cor bem abaixo do limite de saturação. Esta condição proporciona uma ampla faixa dinâmica para a detecção da supressão da fluorescência causada pelo *brodifacoum*. Desta forma, o fator de diluição de 2000 vezes foi o selecionado para a realização de todos os ensaios de validação subsequentes.

#### 4.1. Validação do Método com Espectrofluorímetro Convencional

A interação entre os CD-F e o *brodifacoum* foi monitorada através dos espectros de emissão de fluorescência, obtidos na presença de concentrações crescentes do analito (0 a 25 mg L<sup>-1</sup>). Conforme apresentado na Figura 17, observa-se um pico de emissão característico do sistema em, aproximadamente, 540 nm. A intensidade deste pico aumenta progressivamente com o aumento da concentração de *brodifacoum*, um comportamento que confirma a ocorrência de um processo de *enhancement* que foi a base para a quantificação.

Figura 17 - Espectros de emissão de fluorescência dos CD-F ( $\lambda_{exc} = 470 \text{ nm}$ ) na presença de diferentes concentrações de *brodifacoum* (0 a  $25 \text{ mg L}^{-1}$ )



Fonte: O Autor.

A curva analítica foi traçada plotando-se a razão entre a intensidade de fluorescência na presença (F) e na ausência ( $F_0$ ) do analito, em função da concentração de *brodifacoum*. Os volumes de CD-F, amostra, solução tampão e água para esta curva encontram-se na Tabela 1.

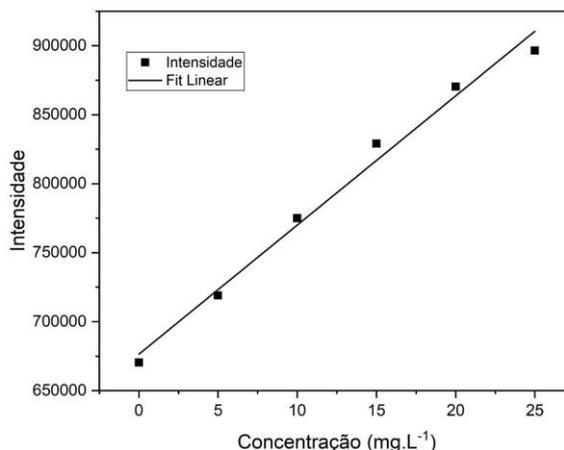
Tabela 1 - Volumes e concentrações finais para o preparo dos padrões da curva analítica (0-25  $\text{mg L}^{-1}$ ) utilizada nas análises por espectrofluorimetria e no dispositivo portátil

Parâmetros	Branco	1	2	3	4	5
<b>Volume CD (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	100	100	100	100	100	100
<b>Volume Tampão 10 (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	100	100	100	100	100	100
<b>Volume de Água (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	800	750	650	600	550	500
<b>Volume de <i>Brodifacoum</i> (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	0	50	100	150	200	250
<b>Concentração (<math>\text{mg.L}^{-1}</math>)</b>	0	5	10	15	20	25

Fonte: O Autor.

A curva analítica (Figura 18) apresentou linearidade até  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de *brodifacoum* com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9879.

Figura 18 - Curva analítica para a determinação de *brodifacoum* obtida em espectrofluorímetro convencional



Fonte: O Autor.

As figuras de mérito do método, estão resumidas na Tabela 2. Os resultados demonstram a alta sensibilidade e precisão para esse sistema, e estes valores servirão para a avaliação de desempenho do dispositivo portátil.

Tabela 2 - Figuras de mérito para a determinação de *brodifacoum* em espectrofluorímetro convencional

Figuras de mérito	Valor
Faixa Linear	até 25 mg.L <sup>-1</sup>
Equação da Reta	$F/F_0 = 9362,7 \times [Brod]^* + 676365,4$
Coefficiente de Determinação (R <sup>2</sup> )	0,98789
Limite de Detecção (mg.L <sup>-1</sup> )	0,15
Limite de Quantificação (mg.L <sup>-1</sup> )	0,45

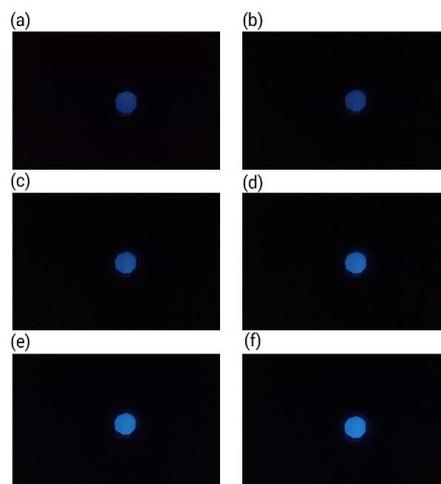
\*[Brod]: Concentração de Brodifacoum em mg.L<sup>-1</sup>.

Fonte: O Autor

#### 4.2. Validação do Método com o Dispositivo Portátil

Inicialmente, um ensaio foi conduzido em uma ampla faixa de concentração (0 a 80 mg L<sup>-1</sup>) para avaliar a capacidade de resposta do sistema. As imagens digitais obtidas para cada ponto da curva são apresentadas na Figura 19. Observa-se qualitativamente um aumento progressivo na intensidade da emissão de fluorescência com o aumento da concentração de *brodifacoum*, desde o branco (a) até a maior concentração testada (f), o que confirma o mecanismo de *enhancement* do sinal.

Figura 19 - Imagens digitais obtidas no dispositivo portátil para a curva analítica preliminar na faixa de: a) 0, b) 15, c) 35, d) 50, e) 65, f) 80 mg L<sup>-1</sup> de *brodifacoum*



Fonte: O Autor.

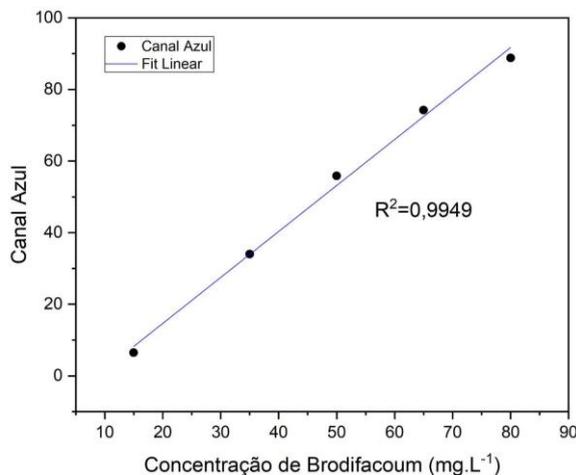
A partir da análise do canal azul (B) destas imagens, foi construída a curva analítica apresentada na Figura 20. Os volumes de CD-F, amostra, solução tampão e água para esta curva preliminar de ampla faixa de concentração do analito, está descrito na Tabela 3. O gráfico demonstrou uma linearidade melhor em comparação com os resultados obtidos com o espectrofluorímetro, com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9949. O bom desempenho nesta ampla faixa de concentração indicou a viabilidade do método e motivou a investigação de uma faixa de trabalho mais baixa e sensível, mais adequada para aplicações práticas. As figuras de mérito para este ensaio preliminar estão resumidas na Tabela 4.

Tabela 3 - Volumes e concentrações finais para o preparo dos padrões da curva analítica de ampla faixa (0-80 mg L<sup>-1</sup>) para os testes preliminares com o dispositivo portátil

Parâmetros	Branco	1	2	3	4	5
Volume do CD-F ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100	100	100	100
Volume do Tampão ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100	100	100	100
Volume da Água ( $\mu\text{L}$ )	800	650	450	300	150	0
Volume do <i>Brodifacoum</i> ( $\mu\text{L}$ )	0	150	350	500	650	800
Volume Total ( $\mu\text{L}$ )	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	0	15	35	50	65	80

Fonte: O Autor.

Figura 20 - Curva analítica obtida a partir do canal azul (B) para a faixa de 0-80 mg L<sup>-1</sup> de *brodifacoum*



Fonte: O Autor.

Tabela 4 - Figuras de mérito para o ensaio preliminar usando imagem digital e faixa de concentração de 0 a 80 mg L<sup>-1</sup> de *brodifacoum*.

Figuras de mérito	Valor
Faixa Linear	0 a 80 mg.L <sup>-1</sup>
Equação da Reta	$B^{**} = 1,2844 \times [Brod]^{*} - 11,0486$
Coefficiente de Determinação (R <sup>2</sup> )	0,9949
Limite de Detecção (mg.L <sup>-1</sup> )	1,38
Limite de Quantificação (mg.L <sup>-1</sup> )	4,18

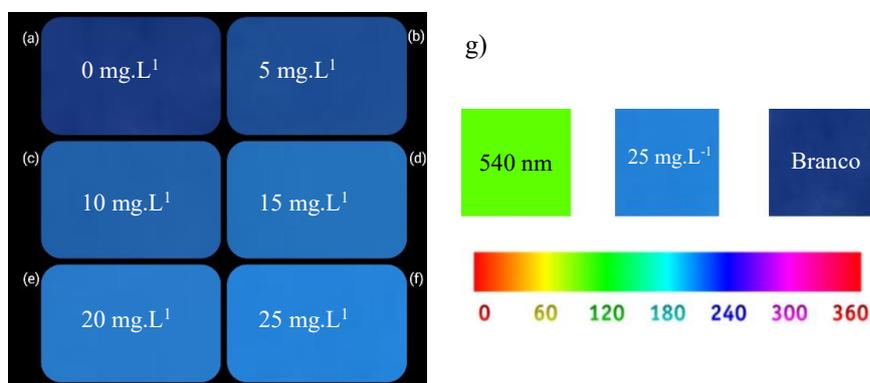
\*[Brod]: Concentração de Brodifacoum em mg.L<sup>-1</sup>.

\*\*B: Valor em RGB do canal azul.

Fonte: O Autor

Com base nos resultados do ensaio preliminar, um estudo mais detalhado foi realizado para a faixa de concentração até 25 mg L<sup>-1</sup> de *brodifacoum*, visando melhores sensibilidades e uma faixa de trabalho mais próxima das concentrações do analito encontradas nos raticidas comerciais. A Figura 21 apresenta as imagens digitais obtidas, onde novamente se observa o aumento da intensidade de fluorescência com a concentração do analito. Para compreender a natureza dessa mudança, foi analisada a variação da cor, com o auxílio da escala HSV representada na Figura 19g. A solução do branco (sem *brodifacoum*) apresenta uma coloração predominantemente azul, correspondente a um matiz (*hue*) em torno de 240°, com a adição de *brodifacoum*, a emissão do sistema em 540 nm (região do verde, matiz de 120°) é intensificada, causando um deslocamento da cor resultante para tons de ciano (matiz intermediário de ~180°), que é a cor observada nos pontos de maior concentração, indicando que de fato, o aumento da luminosidade é ocasionado pela emissão da interação CD-F com *brodifacoum*.

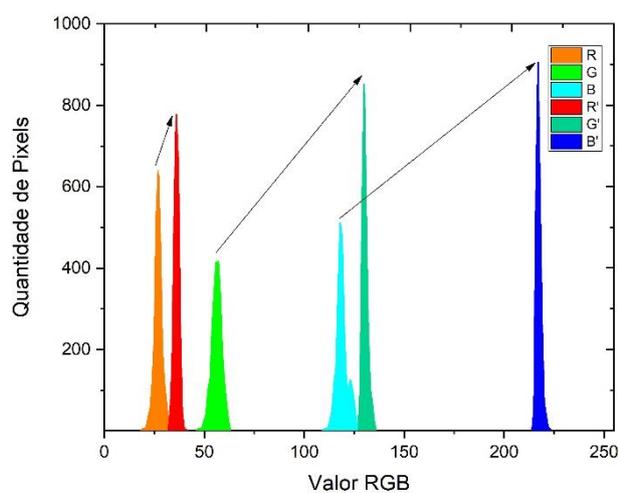
Figura 21 – (a-f) Imagens digitais para a curva analítica de a) 0, b) 5, c) 10, d) 15, e) 20 e f) 25 mg L<sup>-1</sup> de *brodifacoum* e (g) escala de cores HSV demonstrando o deslocamento do matiz com o aumento da concentração de *brodifacoum*



Fonte: O Autor.

Para comprovar quantitativamente que o aumento da luminosidade era devido à emissão do sistema, foi realizada a análise dos histogramas de cores do branco e do ponto de maior concentração (25 mg L<sup>-1</sup>), conforme mostra a Figura 20. O histograma revela um aumento considerável da quantidade de pixels, que é um indicativo de maior luminosidade, e da intensidade de todos os canais de cor, com destaque para os canais verde (G) e azul (B), mostrando uma maior presença dessas cores na imagem. Este aumento seletivo no canal verde confirma que a intensificação da luminescência é de fato ocasionada pela emissão do sistema CD-F com *brodifacoum* em ~540 nm.

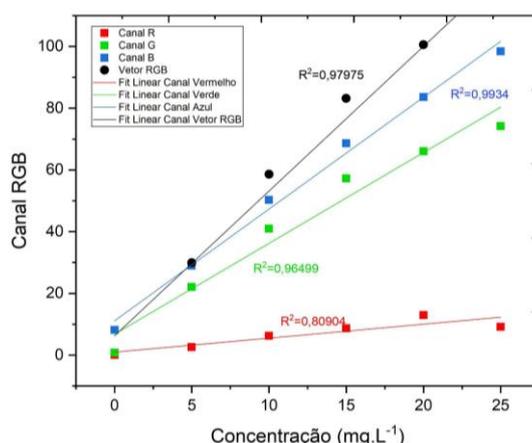
Figura 22 - Histograma de cores comparando a intensidade dos canais RGB para o branco (R,G,B) e para a amostra de 25 mg L<sup>-1</sup> de *brodifacoum* (R',G',B')



Fonte: O Autor.

Foram construídas curvas analíticas utilizando os sinais de cada canal individualmente (R, G e B) e um vetor RGB, calculado como a raiz da soma dos quadrados de cada canal ( $V_{rgb} = \sqrt{R^2 + G^2 + B^2}$ ). As quatro curvas são apresentadas na Figura 23.

Figura 23 - Curvas analíticas para a determinação de *brodifacoum* (0 a 25 mg L<sup>-1</sup>) obtidas a partir dos canais R, G, B e do vetor RGB



Fonte: O Autor.

A Tabela 5 resume as figuras de mérito calculadas para cada um dos três canais e o vetor RGB. Uma curva com maior inclinação (maior sensibilidade) indica que pequenas variações na concentração do analito produzirão grandes mudanças no sinal do instrumento, tornando o método mais sensível. A análise dos dados permite concluir que o vetor RGB apresenta maior sensibilidade, no entanto, a melhor linearidade (maior  $R^2$ ) e os menores LD e LQ foram obtidos no canal B. Portanto, fixou-se o canal B para as posteriores medidas.

Tabela 5 - Figuras de mérito para os diferentes canais de análise na faixa linear de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup> de *brodifacoum*

Figuras de mérito	R	G	B	V <sub>rgb</sub>
<b>Equação da Reta**</b>	$y = 0,975 \times [Brod]^* + 0,452$	$y = 2,943 \times [Brod]^* + 6,769$	$y = 3,622 \times [Brod]^* + 11,104$	$y = 4,687 \times [Brod]^* + 6,253$
<b>Coefficiente de Determinação (R<sup>2</sup>)</b>	0,8090	0,9649	0,9934	0,9798
<b>Limite de Detecção (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	1,01	0,27	0,22	0,57
<b>Limite de Quantificação (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	3,07	0,83	0,67	1,74

\*[Brod]: Concentração de Brodifacoum em mg.L<sup>-1</sup>.

\*\*Os eixos Y das curvas analíticas são seus respectivos valores RGB para cada componente.

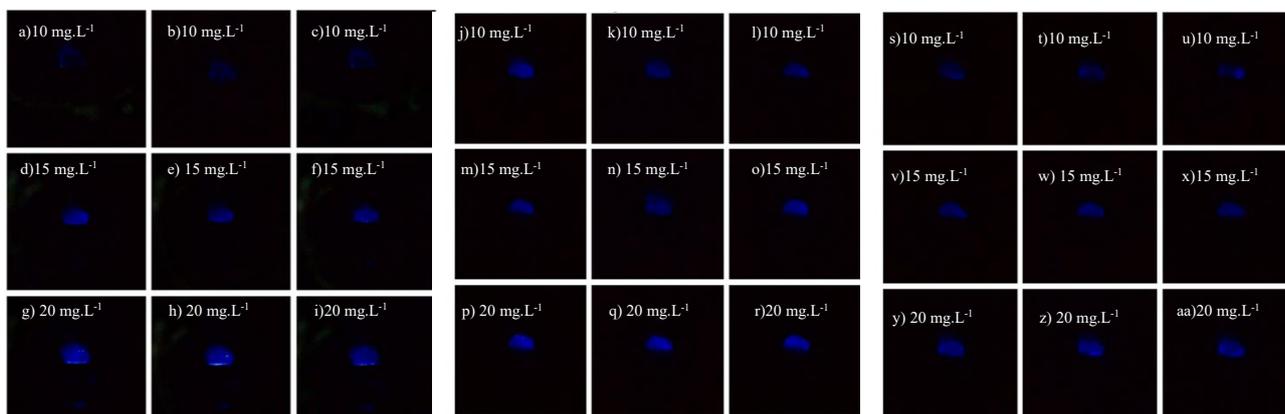
Fonte: O Autor

### 4.3. Avaliação de Efeito de Matriz e Aplicação do Método em Amostras Comerciais

#### 4.3.1. Estudo da Recuperação em Diferentes Matrizes

O estudo de recuperação foi inicialmente conduzido com as amostras diluídas na proporção 1:2. A Figura 24 apresenta as imagens digitais obtidas para as amostras de água mineral (Fig.24a a Fig.24i), água tônica (Fig.24j a Fig.24r) e refrigerante de limão (Fig.24s a Fig.24aa), em triplicata e nos níveis de 10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup> de *brodifacoum*. Em todas as matrizes, observa-se o aumento da intensidade da fluorescência com o aumento da concentração do analito.

Figura 24 - Imagens digitais do ensaio de recuperação em diferentes matrizes comerciais, diluídas 1:2: (a-i) Água Mineral; (j-r) Água Tônica; e (s-aa) Refrigerante de Limão;



Fonte: O Autor.

Os resultados quantitativos deste primeiro ensaio estão compilados na Tabela 6. Enquanto as amostras de água mineral e água tônica apresentaram valores de recuperação dentro da faixa aceitável (80-120%), a amostra de refrigerante de limão exibiu uma recuperação significativamente baixa, indicando a presença de um forte efeito de matriz supressor.

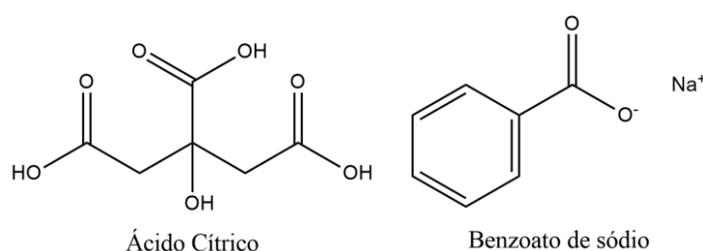
Tabela 6 - Resultados do ensaio de recuperação em amostras de água mineral, água tônica e refrigerante de limão (diluição 1:2) para adição de 10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup> de *brodifacoum*

RECUPERAÇÃO (%)	10 mg.L <sup>-1</sup>	15 mg.L <sup>-1</sup>	20 mg.L <sup>-1</sup>
Água Mineral	95,2	79,6	97,9
Água Tônica	79,6	103,9	94,5
Refrigerante de Limão	48,3	62,5	60,3

Fonte: O Autor.

A baixa recuperação observada para o refrigerante de limão sugere a presença de alguma espécie que está causando interferência. A formulação desta bebida contém diversas substâncias, como os ácidos cítrico, tartárico e outros derivados, e conservantes como o benzoato de sódio e sorbato de potássio. As estruturas do ácido cítrico e benzoato de sódio serão utilizadas como exemplo e são mostradas na Figura 25. Embora a alteração do pH seja uma possível via de interferência, a presença de um sistema tampão (pH 10) torna este efeito menos provável. A hipótese mais plausível é a de uma interferência por competição molecular. Moléculas pequenas e polares como os ácidos cítrico e tartárico podem adsorver na superfície do CD-F, devido às ligações de hidrogênio presentes nas hidroxilas, criando uma barreira física que bloqueia o acesso do *brodifacoum*. De forma mais específica, o anel aromático do benzoato de sódio, e de outras moléculas aromáticas presentes na composição, podem atuar como um inibidor competitivo, ocupando os mesmos sítios de interação  $\pi$ - $\pi$  que seriam utilizados pelo analito, impedindo assim o aumento da resposta fluorescente.

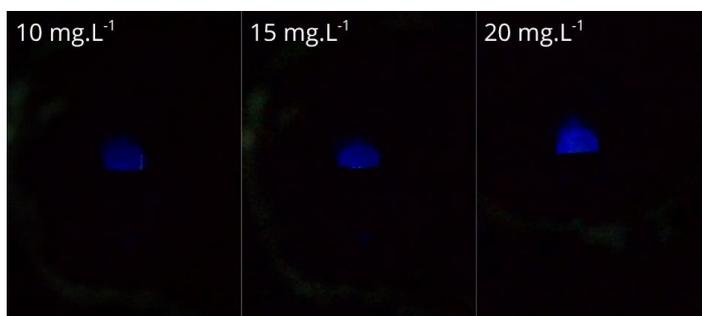
Figura 25 - Estruturas do ácido cítrico e benzoato de sódio



Fonte: O Autor.

Uma estratégia comum para mitigar efeitos de matriz severos é aumentar o fator de diluição da amostra. Desta forma, um novo ensaio foi realizado para o refrigerante de limão, agora com uma diluição de 1:10. As imagens digitais deste novo teste, mostrados na Figura 26, já indicam uma resposta fluorescente mais consistente e similar à das outras matrizes.

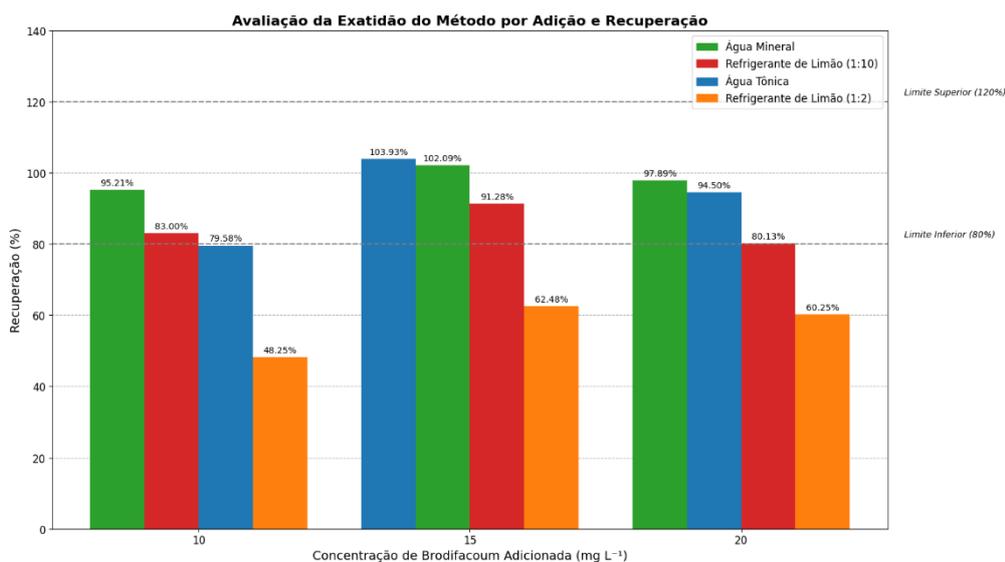
Figura 26 - Imagens digitais do ensaio de recuperação em refrigerante de limão em diluição 1:10



Fonte: O Autor.

O gráfico de barras mostrado na Figura 27 compara os percentuais de recuperação obtidos em todos os experimentos. Fica evidente que a diluição de 1:10 foi eficaz para mitigar o efeito de matriz no refrigerante de limão, elevando os valores de recuperação para dentro da faixa de 80-120% recomendada pela ANVISA. Este resultado mostra a exatidão e a robustez do método desenvolvido para todas as matrizes testadas, demonstrando seu potencial para aplicação em amostras comerciais, desde que o tratamento da amostra (i.e., fator de diluição) seja ajustado para matrizes complexas.

Figura 27 - Comparativo do percentual de recuperação de *brodifacoum* em diferentes matrizes e condições de diluição



Fonte: O Autor.

## 5. CONCLUSÃO

Os *carbon dots* foram sintetizados com sucesso pelo método hidrotermal e, funcionalizados por bioconjugação com a fenilalanina. A caracterização por espectroscopia de infravermelho foi fundamental para confirmar o êxito da conjugação, evidenciada pelo surgimento de uma banda de amida em  $\sim 1563 \text{ cm}^{-1}$ . As análises por espectroscopia de absorção UV-Vis e de fluorescência comprovaram as propriedades ópticas do sistema, obtendo-se um sistema com as características estruturais e ópticas desejadas, apto para a aplicação na detecção do *brodifacoum*.

O dispositivo portátil para análise por imagem digital foi desenvolvido e construído com sucesso utilizando componentes de baixo custo e tecnologia de impressão 3D. A otimização sistemática de seus parâmetros, foi fundamental para a obtenção de um sinal analítico estável, com mínima radiação espúria e livre de saturação. O dispositivo foi empregado para medidas de fluorescência da interação entre CD-F e *brodifacoum*. As curvas analíticas obtidas no dispositivo portátil apresentaram alta linearidade, superior ao encontrado no espectrofluorímetro convencional. O dispositivo se mostrou como uma plataforma alternativa, robusta e de baixo custo para a quantificação do *brodifacoum*.

A detecção baseada no FDIB demonstrou boa exatidão para matrizes como água mineral e água tônica, com recuperações dentro da faixa de 80-120%. Foi identificado um significativo efeito de matriz na amostra de refrigerante de limão, contudo, o aumento do fator de diluição foi eficaz em mitigar essa interferência, resultando em maior recuperação, evidenciando a aplicabilidade do método em amostras comerciais complexas mediante ajuste no preparo da amostra.

A principal contribuição deste trabalho é a criação de uma plataforma analítica de baixo custo, baseada em *carbon dots* funcionalizados e análise por imagem digital via smartphone, que se alinha aos princípios da Química Verde e abre novas possibilidades para o monitoramento de contaminantes em campo. Como perspectiva, o método pode ser expandido para outros raticidas e aplicado em matrizes biológicas mais complexas. A consolidação do sistema como uma ferramenta verdadeiramente acessível envolve a otimização da seletividade do sistema e o desenvolvimento de um aplicativo que automatize a análise, tornando-a ainda mais prática para usuários não especializados.

## 6.REFERÊNCIAS

- ANDERSON, Sarah L. *et al.* Intentional *Brodifacoum* Ingestion. **The American Journal of Medicine**, [S. l.], v. 130, n. 1, p. e27-e28, 2017. DOI: 10.1016/j.amjmed.2016.08.010.
- ALMEIDA, João Paulo Barbosa de *et al.* A fluorescence digital image-based method using carbon quantum dots to evaluate the compliance of a biocidal agent. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 14, n. 26, p. 2631-2641, 2022. DOI: 10.1039/D2AY00678B.
- ALEKSANDROV, M. *et al.* Toxicology of chemical biocides: Anticoagulant rodenticides – Beyond hemostasis disturbance. **Environmental Pollution**, v. 343, p. 123-163, 2024.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA **Monografias Autorizadas**. Brasília, DF: ANVISA, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/b/4185json-file-1>
- CALDAS, E. D. *et al.* Poisonings with pesticides in the Federal District of Brazil. **Clinical Toxicology**, [S. l.], v. 46, n. 10, p. 1058-1063, dez. 2008. DOI: 10.1080/15563650802530443.
- DA SILVA, Emelle K. N. *et al.* A fluorescence digital image-based method using a 3D-printed platform and a UV-LED chamber made of polyacid lactic for quinine quantification in beverages. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 157, p. 104986, 2020. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104986.
- FOUBERT, Astrid *et al.* Bioconjugation of quantum dots: Review & impact on future application. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 83, pt. B, p. 31-48, 2016. DOI: 10.1016/j.trac.2016.07.008.
- GAO, Yunfei *et al.* Carbon quantum dots in spectrofluorimetric analysis: A comprehensive review of synthesis, mechanisms and multifunctional applications. **Talanta**, [S. l.], v. 293, p. 128066, 2025. DOI: 10.1016/j.talanta.2025.128066.
- GAVIRIA-ARROYAVE, María Isabel; CANO, Juan B.; PEÑUELA, Gustavo A. Nanomaterial-based fluorescent biosensors for monitoring environmental pollutants: A critical review. **Talanta Open**, [S. l.], v. 2, p. 100006, 2020. DOI: 10.1016/j.talo.2020.100006.

GHANBARLOU, Samaneh *et al.* Advances in quantum dot-based fluorescence sensors for environmental and biomedical detection. **Talanta**, [S. l.], v. 294, p. 128176, 2025. DOI: 10.1016/j.talanta.2025.128176.

GU, Haiyang *et al.* Evolving trends in fluorescence spectroscopy techniques for food quality and safety: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S. l.], v. 131, p. 106212, 2024. DOI: 10.1016/j.jfca.2024.106212.

IMRAN, Muhammad *et al.* Analytical methods for determination of anticoagulant rodenticides in biological samples. **Forensic Science International**, [S. l.], v. 253, p. 94-102, 2015. DOI: 10.1016/j.forsciint.2015.06.008.

LEFEBVRE, S. *et al.* Poisoning by Anticoagulant Rodenticides in Humans and Animals: Causes and Consequences. In: MORAND, Serge; BORDES, Frédéric; KRASNOV, Boris R. (ed.). **Rodent-borne diseases**. [S. l.]: InTech, 2017. cap. 6, p. 89-112. DOI: 10.5772/intechopen.69955.

LIU, Lizhen *et al.* Sensitive determination of kaempferol using *carbon dots* as a fluorescence probe. **Talanta**, [S. l.], v. 144, p. 390-397, 2015. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.07.004.

MAIA, Matheus Valentin *et al.* *Carbon dots* on paper for determination of Cu<sup>2+</sup> in sugar cane spirits samples for fluorescence digital image-based method. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 179, p. 107500, 2022. DOI: 10.1016/j.microc.2022.107500.

MEDINTZ, I. L. *et al.* Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nature Materials**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 435-446, jun. 2005. DOI: 10.1038/nmat1390.

MORGANA, Silvia *et al.* Fluorescence-based detection: A review of current and emerging techniques to unveil micro/nanoplastics in environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 172, p. 117559, 2024. DOI: 10.1016/j.trac.2024.117559.

MURPHY, Michael J. Anticoagulant rodenticides. In: GUPTA, Ramesh C. (ed.). **Veterinary Toxicology**. 2. ed. [S. l.]: Academic Press, 2012. cap. 56, p. 673-697. DOI: 10.1016/B978-0-12-385926-6.00067-3.

MURRAY, M. H. *et al.* Associations between Rat Infestations and Mental Health Vary by Gender, Race, and Income in Chicago. **Journal of Urban Health**, [S. l.], v. 101, n. 2, p. 318-326, abr. 2024. DOI: 10.1007/s11524-024-00840-4.

NADIMPALLI, Nagaravi Kumar Varma; BANDYOPADHYAYA, Rajdip; RUNKANA, Venkataramana. Thermodynamic analysis of hydrothermal synthesis of nanoparticles. **Fluid Phase Equilibria**, [S. l.], v. 456, p. 33-45, 2018. DOI: 10.1016/j.fluid.2017.10.002.

OLIVEIRA, Claudinéia Rosa da Silva *et al.* Métodos Baseados em Imagem Digital: das Considerações Gerais ao Ensino de Química. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 1530-1555, 2023. DOI: 10.21577/1984-6835.20230060.

PAULA, Nattany Tayany Gomes de. **Desenvolvimento de um método analítico multiproduto para a determinação de *brodifacoum* e bromadiolone em formulações de raticidas anticoagulantes presentes em amostras forenses**. 2022. Relatório (Pós-Doutorado em Química) – Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ROSETO, Paul *et al.* Data Visualization Using Interactive Dimensionality Reduction and Improved Color-Based Interaction Model. **Lecture Notes in Computer Science**, [S. l.], v. 10338, p. 345-357, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-59773-7\_30.

SANTOS, Vagner Bezerra dos, *et al.* Fluorescence digital image-based method to measure biogenic amines in Buffalo Mozzarella and other cheeses produced in Brazil. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 189, p. 108508, 2023. DOI: 10.1016/j.microc.2023.108508.

SCHNEIDER, Julian *et al.* Molecular Fluorescence in Citric Acid-Based *Carbon dots*. **The Journal of Physical Chemistry C**, [S. l.], v. 121, n. 3, p. 2014-2022, 26 jan. 2017. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b12519.

SILVA, Adriano Lucena da; LACERDA, Elisângela Gonçalves. Saneamento básico e saúde no estado de Roraima. **ACTA Geográfica**, Boa Vista, v. 17, n. 45, p. 16-32, 2023. DOI: 10.18227/2177-4307.acta.v17i45.8383.

SONG, Jiangluqi *et al.* Facile Synthesis of Water-Soluble Zn-Doped AgIn<sub>5</sub>S<sub>8</sub>/ZnS Core/Shell Fluorescent Nanocrystals and Their Biological Application. **Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 1627-1633, 16 fev. 2015. DOI: 10.1021/ic502600u.

VALVERDE, I. *et al.* Wildlife poisoning: a novel scoring system and review of analytical methods for anticoagulant rodenticide determination. **Ecotoxicology**, [S. l.], v. 30, p. 767-782, 2021. DOI: 10.1007/s10646-021-02411-8.

YAN, Zhi *et al.* Simultaneous determination of nine anticoagulant rodenticides by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with ultrasound-assisted low–density solvent dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography B**, [S. 1.], v. 1092, p. 453–458, 2018. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.06.053.

ZEPPELINI, Caio Graco. Chemical-Based Rodent Control Programs as a Zoonosis Control Measure: Proposal of Guidelines for Empirical Proof Studies. **Zoonotic Diseases**, [S. 1.], v. 5, n. 2, p. 10, 2025. DOI: 10.3390/zoonoticdis5020010.

ZHU, S. *et al.* The photoluminescence mechanism in *carbon dots* (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. **Nano Research**, [S. 1.], v. 8, p. 355–381, 2015. DOI: 10.1007/s12274-014-0644-3.