



UnB

**Universidade de Brasília
Instituto de Química**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**SISTEMA CONTROLADO POR SMARTPHONE PARA DETECÇÃO DE
FLUORESCÊNCIA EM DISPOSITIVO DE PAPEL BASEADA EM IMAGENS DIGITAIS**

DÊNIS OMAEL SILVA PEREIRA

Orientador
Prof. Dr. Alexandre Fonseca

BRASÍLIA, DF.
2021



UnB

**Universidade de Brasília
Instituto de Química**

DÊNIS OMAEL SILVA PEREIRA

**SISTEMA CONTROLADO POR SMARTPHONE PARA DETECÇÃO DE
FLUORESCÊNCIA EM DISPOSITIVO DE PAPEL BASEADA EM IMAGENS
DIGITAIS**

Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado em Química apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Química.

Orientador

Prof. Dr. Alexandre Fonseca

BRASÍLIA, DF.
2021

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	4
LISTA DE TABELAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
1. Introdução	7
2. Objetivos do trabalho	13
3. Parte Experimental	14
3.1 - Preparação do dispositivo de papel	14
3.2 - Hardware - Sistema para a realização das medidas	15
3.3 - Software	18
3.4 - Determinação dos analitos	21
3.4.1 - Determinação de quinina	21
3.4.2 - Determinação de alumínio	21
3.5 - Preparo das soluções	21
3.5.1 - Preparo para a quinina	21
3.5.2 - Preparo para o alumínio	22
3.6 - Procedimentos de aplicação	23
4. Resultados e Discussão	24
4.1. - Estudos para a determinação de Quinina	24
4.1.1 - Precisão e linearidade da curva analítica	24
4.1.2 - Exatidão: determinação de quinina em água tônica	27
4.2. - Estudos para a determinação de Alumínio com 8-hidroxiquinolina	29
4.2.1 - Precisão e linearidade da curva analítica	29
4.2.2 - Exatidão: determinação de alumínio em medicamentos antiácidos	32
5. Conclusões	35
6. Referências Bibliográficas	36

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

μPAD	Micropaper-based analytical device
HSV	Hue, saturation e brightness
CMYK	Cyan, magenta, yellow, black
RGB	Red, green, blue
LED	Light-emitting diode
NEMA	National Electrical Manufacturers Association
API	Application Programming Interface
L.D.	Limite de detecção
L.Q.	Limite de quantificação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos para a determinação de quinina em amostras de água tônica. 29

Tabela 2: Resultados para a determinação de hidróxido de alumínio em antiácidos. Comparação entre o instrumento e alternativa comercial. 33

Tabela 3: Resultados para a determinação de hidróxido alumínio em antiácidos. Comparação entre o instrumento e o rótulo do medicamento. 34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de fabricação ampliado em um corte transversal	8
Figura 2: Resultado após a penetração da cera.....	9
Figura 3: Números de artigos usando imagens digitais publicados de 1960 até 2015.....	11
Figura 4: Frente e verso do dispositivo μ PAD com escala em cm.....	14
Figura 5: Esquema do instrumento	16
Figura 6: Exterior da caixa com suporte para o celular	17
Figura 7: Interior da caixa	17
Figura 8: Modo de calibração com curva de padrões.....	19
Figura 9: Resultado do botão CURVA.....	20
Figura 10: Modo de aquisição da amostra	20
Figura 11: Modo de aplicação da amostra no papel.....	23
Figura 12: Teste de repetibilidade. 10 medidas consecutivas de um padrão 30 mg L ⁻¹ de quinina	25
Figura 13: Curva analítica para padrões de quinina realizando triplicatas das medidas e fotografias dos spots medidos.....	26
Figura 14: Curvas usadas no teste de exatidão para estimativa de um padrão com 30 mg L ⁻¹	28
Figura 15: Teste de repetibilidade. 10 medidas consecutivas de um padrão 30 mg L ⁻¹ de alumínio complexado com 8-hidroquinolina.....	30
Figura 16: Construção de curva analítica para padrões de alumínio realizando triplicatas das medidas e fotografias dos spots medidos.....	31

1. Introdução

Os chamados micro dispositivos fluídicos à base de papel (μ PAD do inglês *microfluidic paper-based analytical device*) são ferramentas analíticas relativamente novas que podem ser utilizadas para analisar pequenos volumes de amostra (10^{-9} a 10^{-18} L) e que possuem propriedades desejáveis para realização de procedimentos microfluídicos, como portabilidade, baixo custo e possibilidade de uso por pessoas pouco treinadas (CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009; MARTINEZ *et al.*, 2007).

A composição e estrutura do papel confere características hidrofílicas aos dispositivos que favorecem a sua utilização com soluções aquosas, amplamente empregadas em métodos de análises químicas (AKYAZI; BASABE-DESMONTS; BENITO-LOPEZ, 2018). O transporte dos líquidos também é mais fácil se comparado com técnicas microfluídicas tradicionais, pois a capilaridade promove o movimento dos fluidos ao longo dos dispositivos sem exigir o uso de dispositivos extras como bombas eletro/eletrônicas que diminuem a portabilidade, devido ao aumento do sistema como um todo e à necessidade de fontes de energia para o controle (OSBORN *et al.*, 2010).

Além dessas vantagens os μ PAD podem ser construídos facilmente limitando-se canais hidrofílicos no papel por meio de barreiras hidrofóbicas, resultando em uma fabricação fácil e de baixo custo. As análises também costumam ser mais rápidas do que aquelas realizadas por procedimentos convencionais devido à alta proporção superfície volume, a estrutura porosa e os volumes reduzidos, o que possibilita análises onde o volume da amostra é limitado (AKYAZI; BASABE-DESMONTS; BENITO-LOPEZ, 2018). Por fim, o papel gera uma quantidade menor de resíduos se comparado com análises tradicionais devido a sua simplicidade (HUANGFU *et al.*, 2019).

A fabricação desses dispositivos pode ser realizada por diversos métodos, cada um possuindo suas vantagens e desvantagens. Por exemplo, Chitnis (2011) usou um laser de CO_2 para subtrair as partes hidrofóbicas de um papel recoberto com cera para formar os seu canais para análise de detecção de hemoglobina por luminol, um método de fabricação limitado pelo alto custo dos equipamentos necessários para produção (CHITNIS *et al.*, 2011). Em outro

exemplo, se utilizou um processo de carimbagem para aplicação da tinta hidrofóbica, de forma a se desenvolver uma técnica rápida e de baixo custo. Porém esse processo se mostrou inconsistente e apresentou uma baixa resolução nas possibilidades de *design* do dispositivo (CURTO *et al.*, 2013).

Um método que se destaca é a impressão por cera, se mostrando rápida, eficiente e relativamente barata na fabricação de μ PADs, onde se emprega uma impressora de cera comercial, um papel adequado e uma forma de aquecimento para iniciar a deposição da cera. As modificações na etapa de protótipo podem ser realizadas rapidamente e a expansão da cera no papel pode ser facilmente prevista. A técnica se mostra adequada para produção em grande escala, podendo ser facilmente adaptada a uma linha de produção para escalar a produção. O processo de fabricação envolve duas operações principais: a impressão dos padrões de cera na superfície do papel e o derretimento da cera, que devido a um aumento de temperatura penetra o papel e forma as barreiras hidrofóbicas conforme ilustram a Figura 1 e 2 (CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009).

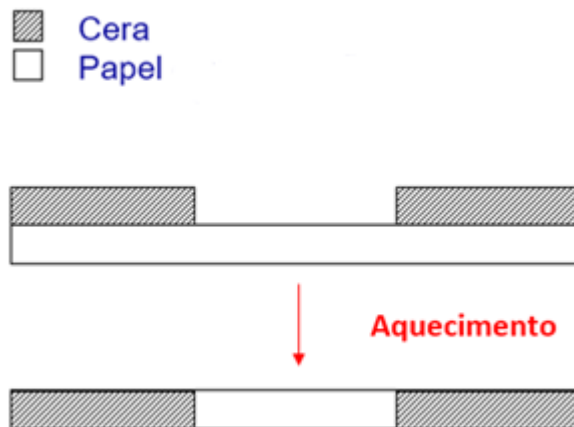


Figura 1: Processo de fabricação ampliado em um corte transversal.

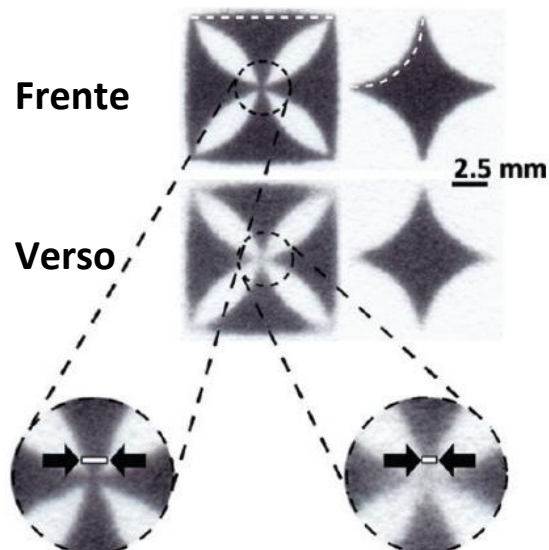


Figura 2: Resultado após a penetração da cera. Parte escura indica a região hidrofóbica (cera) e a parte branca indica a região hidrofílica (papel). Adaptado com permissão de CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009. Copyright 2009 American Chemical Society.

Antes do avanço e popularização dos métodos analíticos instrumentais, muitos ensaios químicos eram realizados por meio de métodos colorimétricos cujos procedimentos levavam a mudanças de cor que podiam ser relacionadas à identificação ou quantificação do analito. Como um exemplo quantitativo, em uma titulação se observa a mudança de cor para determinar uma concentração. Em um caso qualitativo, uma reação com mudança de cor pode indicar resultados positivos ou negativos. Atualmente, esses testes quantitativos tem sido substituídos pelas suas alternativas instrumentais, relegando à colorimetria os testes qualitativos e métodos de triagem devido à sua facilidade de uso e baixo custo. Esses métodos sempre apresentaram desvantagens inerentes a percepção da cor: estimativas sobre cor são subjetivas e variam de pessoa para pessoa, há influência da luz de fundo, existência de perturbações da percepção visual em parte da população (por exemplo, daltonismo) e limitações em análises quantitativas (BYRNE *et al.*, 2000).

Devido ao advento e avanço de sensores de imagens e detectores de cor foram abertas novas possibilidades para utilização desses métodos com uma melhor aplicabilidade e precisão, uma vez que é possível tratar a cor como uma propriedade óptica da matéria, que contém informação química e que pode ser medida objetivamente.

O método de detecção a ser usado em associação com o μ PAD é outra parte que requer atenção, com diversos métodos combinando diferentes sensores e adequações às peculiaridades de se realizar essas análises em papel. O uso de uma avaliação colorimétrica para obter resultados é uma das alternativas mais populares, com os resultados de análises qualitativas podendo ser avaliados a olho nu (spot testes, testes falso/positivo) (XU; BUNES; ZANG, 2011). Por outro lado, para a quantificação de analitos, a colorimetria requer o uso de calibração com soluções padrão e de obtenção de imagens digitais a partir de algum dispositivo de imagem, como a câmera de um smartphone (CATE *et al.*, 2015). O uso de μ PAD combinado com sensores eletroquímicos é outra alternativa bastante estudada, sendo possível realizar análises quantitativas de uma gama de substâncias relevantes a saúde humana usando detecção amperométrica (NIE *et al.*, 2010).

Na última década, a popularização de dispositivos para captura de imagens digitais gerou um salto exponencial na quantidade de publicações científicas que exploram suas novas possibilidades de uso em medidas analíticas, conforme ilustrado na Figura 3 (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2015). Os usos desses novos sensores possibilitaram substituir instrumentações de custo elevado por alternativas de fácil acesso e maior portabilidade, que apresentam um desempenho analítico adequado para realizar medidas abrangentes, minimizando as desvantagens inerentes a essa técnica.

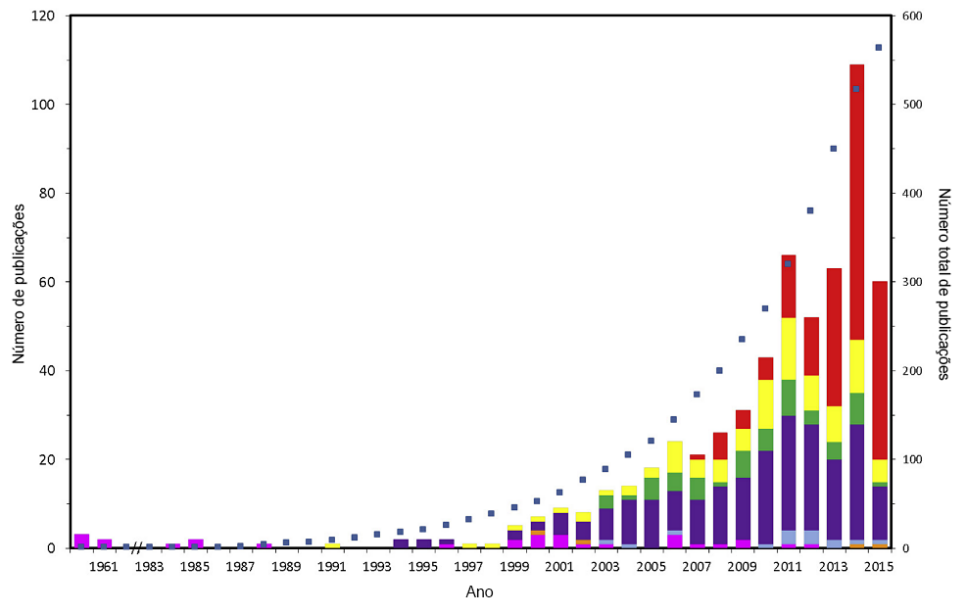


Figura 3: Números de artigos usando imagens digitais publicados de 1960 até 2015. Distribuição por ano dos dispositivos de imagem: magenta: instrumentação convencional; laranja: colorímetros; azul: scanners; amarelo: câmeras digitais; vermelho: smartphones; verde: webcams; ciano: instrumentação *homemade*. Linha exponencial: número acumulado de publicações. Adaptado com permissão de CAPITÁN-VALLVEY et al., 2015. Copyright 2015 Elsevier B.V.

Para realizar essas análises se faz necessário o uso de um método para quantificar as cores a serem medidas. Para isso, os espaços de cor derivados da teoria das três cores primárias que simulam a percepção humana são comumente utilizados. Entre os diferentes modos de se expressar cores no meio digital destacam-se o HSV (do inglês *hue, saturation e value*), CMYK (do inglês *cyan, magenta, yellow e key*) e principalmente o RGB (do inglês *red, green e blue*). Para o sistema RGB uma dada cor pode ser representada por três valores correspondentes as cores da sigla (vermelho, verde e azul respectivamente), com a intensidade variando de 0 a 255. Sendo o branco representado por (255,255,255) e o preto por (0,0,0) (GRUDPAN *et al.*, 2015).

A obtenção de imagens digitais para posterior avaliação dos valores de cor podem ter diversas origens, como câmeras digitais, *smartphones*, *webcams* e *scanners* (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2015). Após obtidas, essas imagens são geralmente tratadas em um software capaz de atribuir valores as cores, o que pode ser feito por uma análise da cor de um pixel (menor unidade de uma imagem digital) ou pela média dos valores de múltiplos pixels de uma área da imagem (FENG *et al.*, 2012). A partir desses valores é possível, então, se

encontrar relações entre a variação das cores e suas intensidades com propriedades de interesse para as análises.

Em um exemplo da combinação de uma análise de uma propriedade química específica (fluorescência) e o uso de um *smartphone* para promover a excitação e obter as imagens digitais, Mccracken (2017) construiu um dispositivo para avaliar a concentração de *Bisfenol A* em amostras de água. Para isso foi usado ácido 1-hidroxipireno-3,6,8-trissulfônico (HPTS) que tem sua fluorescência inibida pela concentração do analito em solução. A técnica mostrou um limite de detecção de 4,4 μM , se mostrando promissora em detectar o *Bisfenol* como contaminante em lixiviados de resíduos e amostra industriais. Porém a técnica requer o uso de um software externo ao *smartphone* para tratar a imagem e realizar a análise por RGB, além de usar uma cubeta com caminho óptico de 1 cm para as análises (MCCRACKEN *et al.*, 2017).

Recentemente se tem explorado o potencial das técnicas de fluorescência e quimiluminescência para realizar análises em dispositivos de papel, com alguns métodos obtendo baixos limites de detecção e resultados precisos em análises ultrasensíveis (WANG *et al.*, 2014). Apesar disso, esses métodos apresentam algumas dificuldades: alguns papéis apresentam a capacidade de autofluorescência e acrescentam ruído de fundo as medidas. Além disso sensores para luminescência, como fotomultiplicadoras, podem ter custo relativamente alto e a necessidade de se realizar as medidas em ambiente escuro, podem dificultar a construção do aparato de detecção como um todo (NERY; KUBOTA, 2013).

Aplicações com dispositivos de papel (μPAD) são realizadas usualmente empregando-se medidas colorimétricas usando um reagente seletivo ao analito, sendo medidas de fluorescência pouco praticadas em μPAD , pois esse tipo de análise envolve certos fatores que necessitam instrumentação um pouco mais elaborada que aquela necessária para as medidas de colorimetria usuais. Em medidas de fluorescência molecular há necessidade de excitação com uma radiação específica a substância de interesse, assim como a leitura da intensidade da radiação de emissão que ocorre em uma faixa de comprimento de onda também específica. Dessa forma, é usualmente necessário utilizar filtros

para a seleção dos comprimentos de onda de excitação e emissão, tal como empregar uma fonte de radiação para a realização das medidas.

Levando em conta esses fatores, a medida de fluorescência em papel exige que a superfície onde se realiza as medidas seja irradiada de uma forma uniforme e reproduzível, afim de proporcionar uma medida com boa exatidão e precisão. Até o momento não há um instrumento dedicado que combine μ PADs e detecção por fluorescência, controlado por *smartphone* e que permita realizar medidas de maneira automatizada.

2. Objetivos do trabalho

Com o objetivo de tornar medidas de fluorescência viáveis em dispositivos de papel, o presente trabalho visa o desenvolvimento e a avaliação de um sistema de medida automático, controlado por *smartphone* e microcontrolador Arduino que possibilite a realização de determinações fluorimétricas de maneira exata e reproduzível. Compõe também os objetivos demonstrar a aplicação do dispositivo para determinações fluorimétricas ordinárias como a quantificação de quinina em água tônica e alumínio em medicamentos.

Tendo em vista os objetivos apresentados, por meio do cumprimento das seguintes metas se planeja desenvolver e avaliar o instrumento:

- *Design* e construção de um dispositivo de papel capaz de acomodar as necessidades de um sistema automático;
- Construção de um aparato automático que leve em consideração adequações específicas para medidas de fluorescência;
- Desenvolvimento de um aplicativo de celular para controle do instrumento e a detecção por imagens digitais;
- Avaliar o uso do instrumento na determinação de quinina em refrigerantes de água tônica;
- Avaliar o uso do instrumento na determinação de alumínio em medicamentos.

3. Parte Experimental

3.1 - Preparação do dispositivo de papel

Para a construção do dispositivo μ PAD empregou-se a técnica de impressão com cera (CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009), no qual o objetivo é construir um poço hidrofílico em papel cromatográfico rodeado por material hidrofóbico (cera da impressora). O layout apresentado na Figura 4 foi desenvolvido no programa Microsoft Powerpoint e consiste em um círculo com diâmetro de 8 cm, contendo 24 “spots” com 5 mm de diâmetro cada, posicionados em ângulo de 15° entre eles.

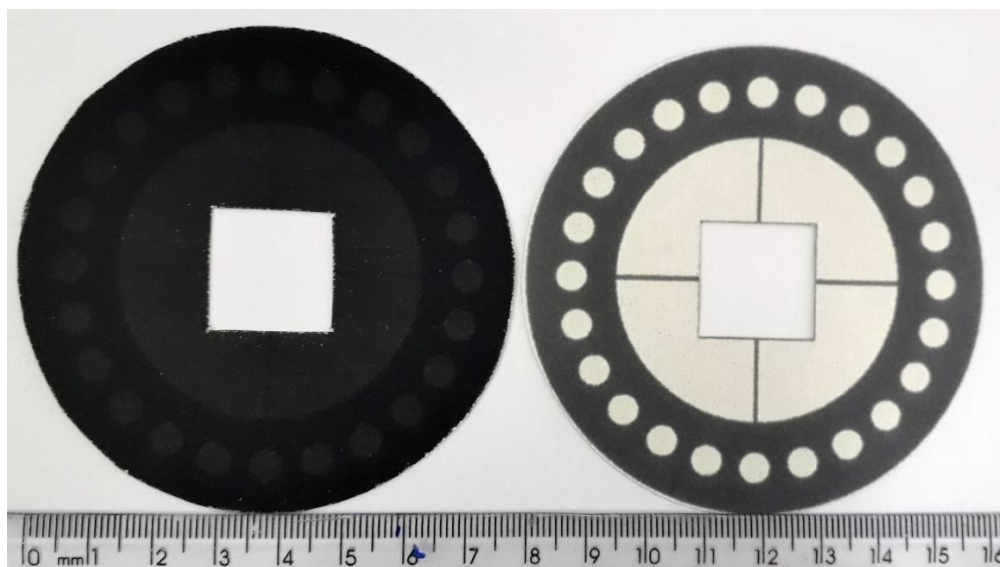


Figura 4: Frente e verso do dispositivo μ PAD com escala em cm.

Para fabricação do dispositivo se utilizou como substrato o papel cromatográfico CHR 4 da Whatman® e uma impressora a base de cera (Xerox ColorQube 8570). Primeiramente, o papel foi recortado no formato adequado para impressora, em seguida, se imprimiu os discos de forma a preencher eficientemente o espaço disponível. Na segunda etapa, o papel é levado à estufa por 5 minutos a 80°C de modo a promover a entrada da cera na fibra do papel. Finalmente o dispositivo é “selado” para criar os poços do analito, o que se faz imprimindo uma camada de cera do lado oposto a impressão anterior. Vale destacar também que após estes procedimentos, o dispositivo foi recortado em seu formato circular empregando-se uma tesoura ou uma cortadora a laser (LaserLine NX-01).

3.2 - Hardware - Sistema para a realização das medidas

Conforme ilustra a Figura 5, o dispositivo circular de papel é colocado de forma alinhada sobre um disco rotativo que é movimentado por um motor de passos, permitindo que cada um dos spots sejam irradiados separadamente por um LED UV (380 nm). Para o controle fino do motor foi empregado um microcontrolador Arduino que realiza a comunicação entre o módulo Bluetooth, que recebe os comandos enviados pelo aplicativo instalado em um smartphone Android, e o driver do tipo microstep que realiza a alimentação e controle do motor de um motor de passos genérico do tipo NEMA 17.

Acoplado ao motor se encontra a base na qual o dispositivo μ PAD é posicionado. Acima da base, posicionado no limite externo da base circular, se encontra o LED que fornece a radiação de excitação para o analito. Conforme as medidas são realizadas o aplicativo controla a rotação do dispositivo em passos com ângulo correto e assim se seleciona qual será o spot a ser medido.

A alimentação elétrica do LED e do driver provém de uma fonte DC/AC de 12 V e 5 A que por sua vez é conectada à rede elétrica. O Arduino utilizado foi do modelo UNO e sua alimentação ainda depende de uma conexão USB com um computador. Porém, o sistema pode ser adaptado para se tornar totalmente portátil com o uso de uma bateria para alimentação de todas as partes.

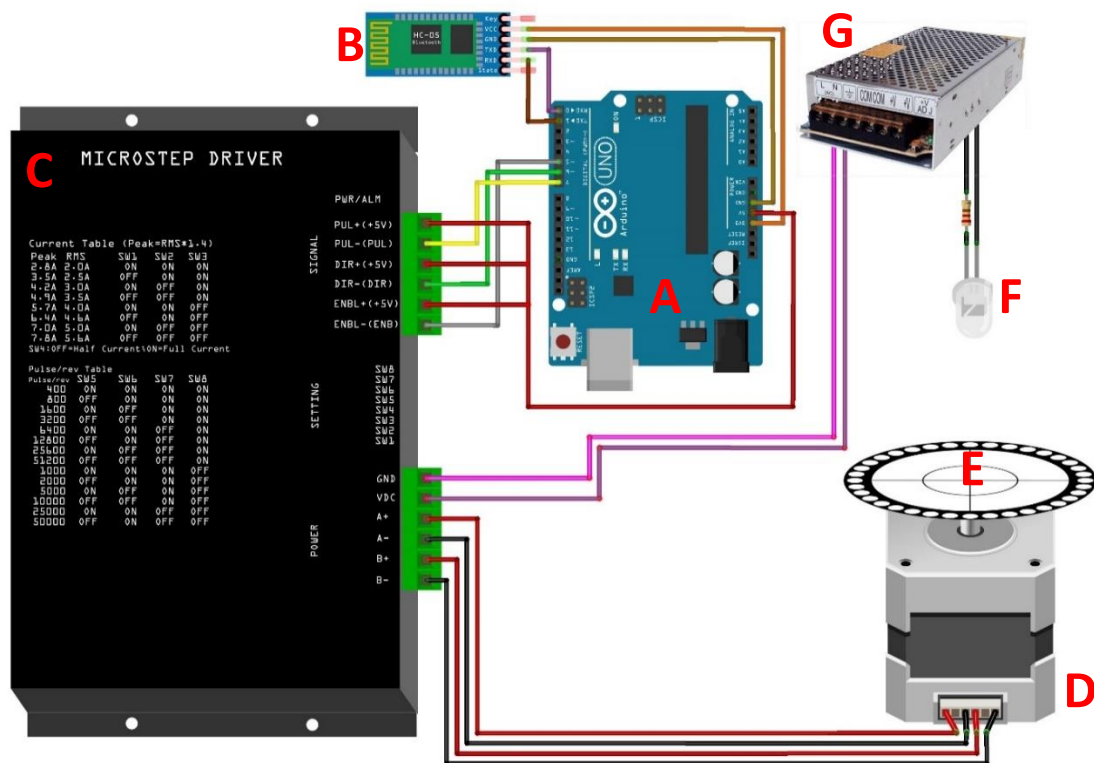


Figura 5: Esquema do instrumento. Arduino UNO (A), módulo Bluetooth HC-05 (B), driver para o motor de passos (C), motor de passos NEMA (D), base circular para dispositivo μ PAD (E), LED acoplado com resistor (F), fonte de alimentação 12 V (G).

O conjunto da Figura 5 foi alojado em uma caixa de madeira fechada com dimensões de 15 cm x 20 cm x 20 cm de modo a eliminar a interferência de radiação externa, uma necessidade proveniente do fato de se tratar de uma medida de fluorescência. Fotografias com o dispositivo proposto são mostradas nas Figuras 6 e 7.

Para realizar as medidas o usuário deve acoplar o celular com o aplicativo instalado a um suporte no topo da caixa, alinhando a câmera com um orifício perpendicular ao spot sendo iluminado pelo LED. De modo a filtrar a radiação extra do LED, foi empregado um filtro de absorção (transmitância máxima 480 nm para a determinação de quinina), enquanto para a determinação de alumínio com hidroxiquinolina utilizou-se apenas a correção de cores com o aplicativo do celular como filtro digital. Outros analitos podem necessitar de uma mudança nas configurações do LED ou filtro, dependendo das características de excitação e emissão das substâncias.

O celular a ser usado requer um sistema Android, uma câmera digital de boa resolução, capacidade de realizar conexões Bluetooth e possuir memória interna suficiente para armazenar as fotos.



Figura 6: Exterior da caixa com suporte para o celular.

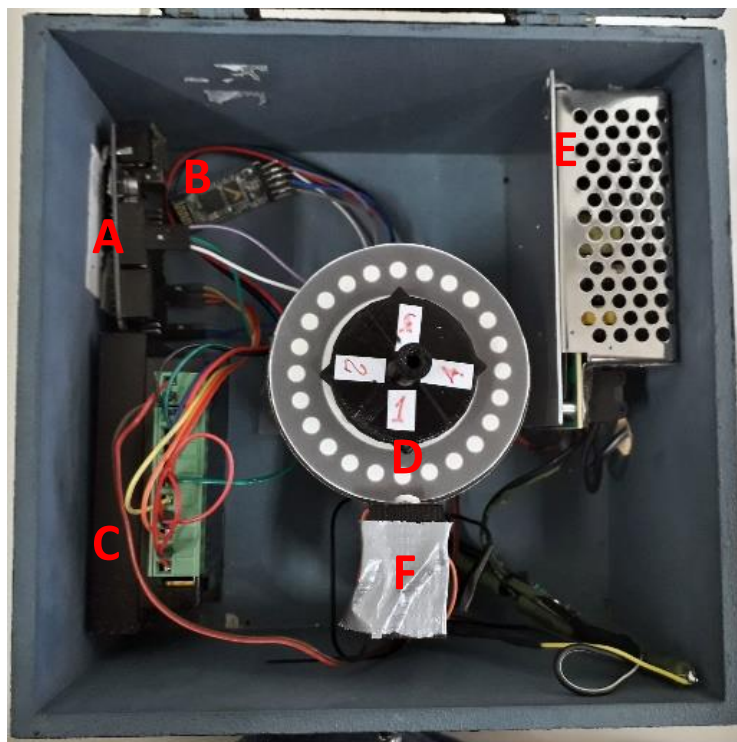


Figura 7: Interior da caixa. Arduino UNO (A), módulo Bluetooth HC-05 (B), driver para o motor de passos (C), motor de passos NEMA acoplado a base e dispositivo (D), fonte de alimentação (E), suporte para o LED (F).

3.3 - Software

O aplicativo para uso em sistema operacional Android® foi totalmente desenvolvido pelo autor do presente trabalho com uso da API 24 (*Android Nougat*) e da interface de desenvolvimento Android Studio. Para facilitar o entendimento do leitor, não serão abordadas aqui as sub-rotinas de programação criadas para o funcionamento do aplicativo, sendo descritos apenas os passos que devem ser seguidos pelo usuário a fim de se realizar as medidas.

Após carregar o aplicativo o usuário se depara com a sua interface inicial conforme ilustra a Figura 8, onde são definidos 3 parâmetros: a cor principal da emissão (conforme o padrão RGB de cor digital) (A), o incremento da concentração dos padrões (B) e o número de pontos para construção da curva analítica (C).

Em seguida, deve-se tocar sobre o botão MEDIR (D) onde automaticamente se inicia um aplicativo controlador de câmera externo, preferencialmente configurado previamente, onde será capturada a foto a ser analisada pelo aplicativo e calculado o resultado com os valores médios de RGB referentes apenas à região do spot. Os valores da componente escolhida (R, G ou B) são então exibidos na caixa de texto (E), sendo os valores de múltiplas medidas armazenados na memória para uso posterior. Vale reforçar que a câmera deve ser previamente ajustada no que se refere à parâmetros como equilíbrio de branco, tempo de exposição e sensibilidade (ISO) de forma a se obter os melhores resultados, o que deve ser avaliado empiricamente, caso a caso.

Para a construção da curva analítica, o processo se repete até se obter as medidas especificadas pelo número de pontos. A fim de verificar a qualidade das medidas e fazer uma decisão sobre prosseguir ou refazer as medidas, se pressiona o botão CURVA (F), onde automaticamente se exibe a curva analítica (concentração *versus* sinal), o resultado da regressão linear e o coeficiente de determinação em outra tela do aplicativo (Figura 9).

Estando de acordo com as medidas obtidas, se pressiona o botão “voltar” para retornar para tela inicial (Figura 8). Com os dados da curva salvos na memória, o usuário pressiona o botão CALIBRAÇÃO para iniciar o modo de aquisição do valor para a amostra (Figura 10). Vale notar que o botão CALIBRAÇÃO altera o seu texto para AMOSTRA, de modo que o botão MEDIR é usado novamente para capturar uma nova foto, mas referente ao spot com a amostra. Após realizada a medida para o spot da amostra, a caixa de texto mostra o valor da cor RGB juntamente com o valor da concentração estimada pela curva analítica.

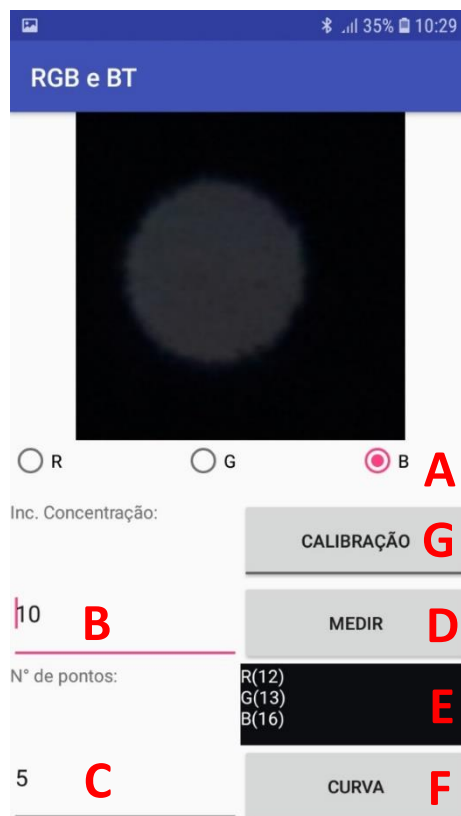


Figura 8: Modo de calibração com curva de padrões. Seleção da componente RGB (A), incremento da concentração (B), números de ponto da curva (C), botão MEDIR (D), valor das componentes RGB (E), botão CURVA (F), botão CALIBRAÇÃO (G).

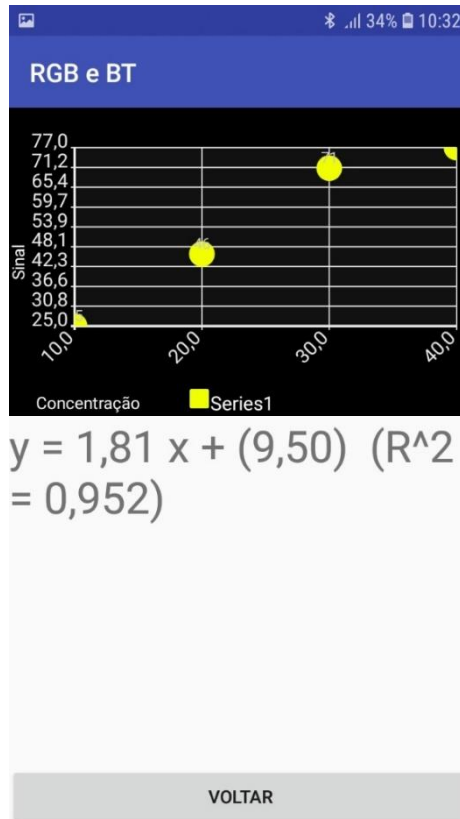


Figura 9: Resultado do botão CURVA.

RGB e BT

R G B

Inc. Concentração:

10

N° de pontos:

5

AMOSTRA

MEDIR

CURVA

B(42)
Amostra:
(17.955801104972377)

Figura 10: Modo de aquisição da amostra.

3.4 - Determinação dos analitos

3.4.1 - Determinação de quinina

A quinina é um composto fluorescente que em pH ácido absorve radiação numa faixa de comprimentos de onda com máximo em 350 nm e emite com máximo em 450 nm (azul) (O'REILLY, 1975). Desse modo um LED que emite numa faixa com o pico em 380 nm foi escolhido para promover a excitação, e para reduzir a interferência do LED nas medidas foi necessário utilizar um filtro de absorção com transmitância máxima em 480 nm.

3.4.2 - Determinação de alumínio

Para realizar a determinação do alumínio foi necessário o uso de um agente complexante que ao se ligar ao analito emitisse radiação em um comprimento de onda na região do visível. A 8-hidroxiquinolina foi escolhida para essa função, pois quando complexada com o alumínio absorve radiação na faixa de 365 nm e emite na faixa de 520 nm (verde) (PETERSON, 1996). Devido à proximidade dos comprimentos de onda de excitação da quinina e do complexo alumínio-hidroxiquinolina não houve necessidade de se trocar o LED, pois a faixa de emissão dessa fonte foi adequada para ambos. Além disso, a maior diferença no comprimento de emissão em relação ao de excitação, possibilitou a remoção do filtro de absorção, sendo possível minimizar a reflexão do LED no papel apenas com um ajuste digital da imagem.

3.5 - Preparo das soluções

3.5.1 - Preparo para a quinina

Uma solução estoque de quinina 1000 mg L^{-1} foi preparada dissolvendo-se 50,0 mg de quinina (Sigma Aldrich) em 25 mL de água purificada por osmose reversa. Em seguida, a solução resultante foi acidificada pela adição de 5,0 mL de uma solução de ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, previamente preparada e o volume foi completado para 50,00 mL com água purificada por osmose reversa. Soluções padrão de quinina ($10\text{-}50 \text{ mg L}^{-1}$) foram preparadas pela diluição adequada da solução estoque em água purificada.

Para preparação das amostras foi necessário o uso de um banho ultrassônico de forma a eliminar completamente os gases do refrigerante de água tônica. Em seguida foi transferido 30,0 mL da amostra para um balão volumétrico de 50,0 mL, acidificando-se até pH 1 e completando-se o volume com água purificada.

3.5.2 - Preparo para o alumínio

Primeiramente foi preparada uma solução 0,07 mol L⁻¹ de hidroxiquinolina. Para isso dissolveu-se cerca de 0,1 g de hidroxiquinolina (Neon) em 5 mL de etanol comercial 46°INPM e em seguida, se adicionou 5 mL de uma solução tampão de acetato de amônio 0,05 M (pH 5), a solução foi então transferida para um frasco âmbar fechado para evitar a degradação por radiação UV e oxigênio.

Para preparar os padrões de alumínio foi usado uma solução estoque para espectroscopia atômica de 1000 mg L⁻¹ (SpecSol). A solução foi diluída com água purificada por osmose reversa em 5 padrões na faixa de 5 a 40 mg L⁻¹.

A determinação do teor de alumínio foi realizada para uma formulação farmacêutica comercializada como comprimido antiácido e para três suspensões antiácidas de hidróxido de alumínio e associações.

Para a amostra sólida de medicamento (comprimidos da amostra 5) três comprimidos foram macerados e a massa média para um único comprimido, foi pesada e utilizada para o preparo da solução de amostra. Para as quatro amostras líquidas (1, 2, 3 e 4) uma alíquota adequada da amostra (entre 1,7 e 2,7 mL) foi coletada e utilizada no preparo da solução. Ambos tipos de amostras foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, seguido da adição de 80 mL de água purificada por osmose reversa. Essa mistura foi então acidificada até pH 1 com ácido sulfúrico concentrado (18 M) e o balão foi então completado com água e agitado. Para remover os excipientes insolúveis no meio ácido, o conteúdo foi filtrado antes que uma alíquota fosse usada para realizar uma diluição final para uma concentração adequada à faixa de concentração dos padrões.

3.6 - Procedimentos de aplicação

Para quinina, a aplicação das soluções das amostras/padrão nos dispositivos de papel foi realizada com o auxílio de uma micropipeta (HTL LM10), transferindo-se 3,0 μL da solução para cada spot. Os brancos utilizados na análise consistiam de apenas água purificada por osmose reversa. Como mostra a Figura 11, durante a aplicação, o papel é apoiado sobre um béquer para evitar o contato do mesmo com a bancada, o que poderia levar a perda da solução por meio do contato do fundo do spot com a superfície da bancada. Após a aplicação, aguardou-se cerca de 10 minutos para a secagem de toda a solução no papel.

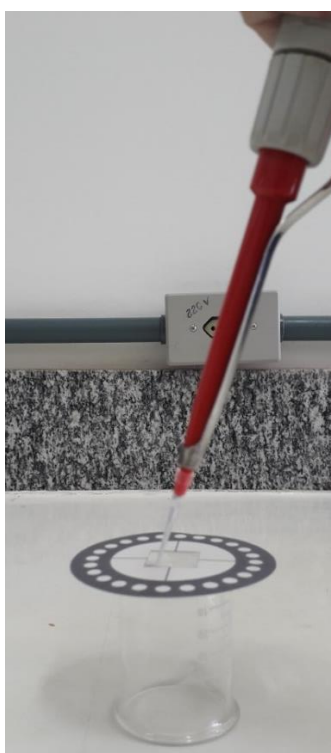


Figura 11: Modo de aplicação da amostra no papel.

O mesmo modo de aplicação foi usado para análise do alumínio. Primeiramente se aplicou 2,0 μL da solução de hidroxiquinolina seguida pela aplicação de 2,0 μL das soluções contendo alumínio (padrões e amostras). Para a aplicação dos brancos foram usados os mesmos volumes, porém somente água purificada no lugar das soluções de analito.

4. Resultados e Discussão

4.1. - Estudos para a determinação de Quinina

4.1.1 - Precisão e linearidade da curva analítica

Conforme esperado, a componente B de RGB apresentou a melhor razão sinal/ruído para a detecção de quinina através do método proposto, uma vez que a emissão fluorescente dessa substância ocorre com máximo em 450 nm (região azul do espectro) (O'REILLY, 1975). Dessa forma, todos os estudos com quinina foram realizados com essa componente de RGB.

De modo a avaliar a repetibilidade do método, dez spots de um único dispositivo foram preenchidos com 3 μL de uma solução padrão de quinina a 30 mg L^{-1} e realizou-se a leitura do sinal B para estes spots. Conforme mostra o gráfico da Figura 12, o sinal de emissão variou entre 93 e 105 unidades sendo o sinal médio estimado em 100 unidades e o desvio padrão em 5 unidades, o que leva à um desvio padrão relativo de 5 %. De maneira geral, esse desempenho demonstra uma boa precisão para as medidas se consideradas o grande número de variáveis que podem afetar o sinal analítico. Assim, possíveis fatores que impactaram a precisão do método estão relacionados com a reprodutibilidade na fabricação do dispositivo, visto que por mais meticulosa que seja a fabricação há fatores de difícil controle como a falta de uniformidade do papel, possíveis falhas na impressão em cera e diferenças de temperatura no momento da fabricação. Além disso, como a aplicação da amostra é manual, requerendo múltiplas pipetagens, podem ocorrer pequenas variações nos volumes aplicados aos spots, o que é agravado pelo uso de pequenos volumes da solução do analito (apenas 3 μL). Por último, apesar do motor de passos ser de alta precisão, é possível que ocorram variações na rotação e por consequência mudanças no alinhamento das fotos resultando em uma flutuação das medidas.

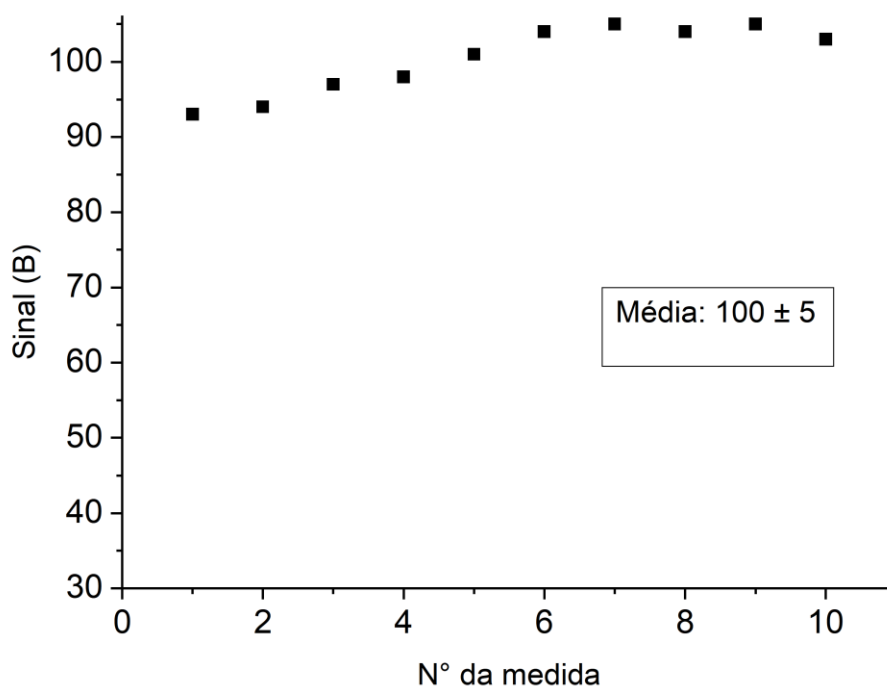


Figura 12: Teste de repetibilidade. 10 medidas consecutivas de um padrão 30 mg L⁻¹ de quinina.

A região linear de calibração para o método foi avaliada inicialmente com padrões na faixa de concentração de 5 a 60 mg L⁻¹ em quinina. Foi observado que com a inclusão de padrões com concentrações acima de 50 mg L⁻¹ ou abaixo de 10 mg L⁻¹, as curvas analíticas apresentavam coeficientes de correlação linear (R) abaixo de 0,9 sendo consideradas insatisfatórias para o uso quantitativo. Assim, a faixa selecionada para os demais estudos foi de 10 a 50 mg L⁻¹ em quinina.

Para uma melhor avaliação da linearidade e precisão do método foi realizado a aplicação dos padrões de 10 a 50 mg L⁻¹, em triplicata, intercalados por uma aplicação da solução do “branco”. Com isso, se construiu a curva analítica da Figura 13 empregando-se o sinal médio para as medidas em triplicata previamente subtraídas do valor do branco.

Como indicado na Figura 13, o coeficiente de determinação (R²) foi estimado em 0,996, o qual demonstra um comportamento linear adequado para a faixa de concentração estudada. Vale destacar que esse resultado foi obtido através de um instrumento simples, totalmente fabricado no laboratório, e com

um dispositivo de papel, o que poderia limitar negativamente o comportamento linear.

Além do comportamento linear, é possível se observar também que a variação das leituras em triplicata foram aceitáveis com barras de erros relativamente pequenas para todos os padrões estudados.

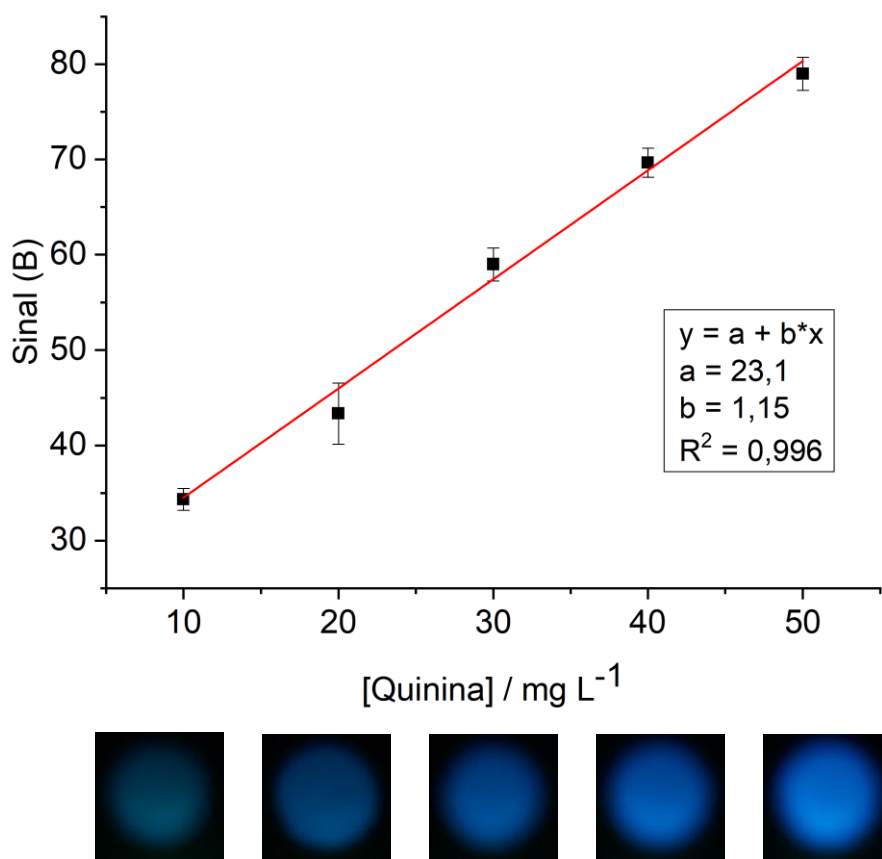


Figura 13: Curva analítica para padrões de quinina realizando triplicatas das medidas e fotografias dos spots medidos.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma_i}{b} = \frac{3,3 \times 1,5}{1,15} = 3,7 \text{ mg L}^{-1}$$

Equação 1

$$LQ = \frac{10 \times \sigma_{dp}}{b} = \frac{10 \times 1,15}{1,15} = 10 \text{ mg L}^{-1}$$

Equação 2

O limite de detecção foi estimado pela equação 1 (SKOOG *et al.*, 2015) em 3,7 mg L⁻¹, utilizando-se o valor da inclinação (b) e valor da incerteza padrão (σ_i) no cálculo do intercepto. O limite de quantificação foi estimado em 10 mg L⁻¹

¹ através da equação 2 (INMETRO, 2016), usando o valor da inclinação (b) e o valor do desvio padrão da menor concentração da curva (σ_{dp}). Esses valores podem ser considerados satisfatórios para a determinação do analito em refrigerantes tipo água tônica e em medicamentos para o tratamento de malária em que a concentração pode chegar a 300 mg de sulfato de quinina por comprimido (QUININE SULFATE TABLETS 300MG SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS, 2019).

É importante perceber também que o limite de detecção é influenciado diretamente pelo volume de amostra aplicado, de forma que a aplicação de 3,0 μL de uma solução padrão de 10 mg L^{-1} sobre o papel, transfere apenas 30 ng de quinina, o que pode ser considerada uma massa bastante baixa do analito. Em outras palavras, um aumento no volume aplicado poderá diminuir o L.D., porém um papel de maior gramatura deve ser utilizado para se evitar transbordamento dos spots. Uma outra alternativa, que ainda carece de estudos, é realizar múltiplas deposições das soluções, intercalando-as com uma secagem ao ambiente para realizar a pré-concentração do analito no papel, o que permitiria se atingir limites de detecção e quantificação mais baixos.

A estimativa do limite de quantificação se encontra no primeiro ponto da curva, verificando a adequação do método para avaliar as concentrações propostas com exatidão e precisão aceitáveis, dado que a amostra possua uma concentração adequada a curva analítica.

4.1.2 - Exatidão: determinação de quinina em água tônica

Em um primeiro momento, a exatidão do método proposto com o aplicativo de celular foi avaliada na estimativa da concentração de uma solução padrão de quinina com concentração conhecida de 30 mg L^{-1} . Em único dispositivo foram aplicadas, na ordem, a solução do branco, os cinco padrões de calibração com concentração crescente e, por último, a solução do padrão de 30 mg L^{-1} . Essa disposição foi repetida mais três vezes no mesmo dispositivo de papel, permitindo a obtenção de quatro curvas analíticas e quatro medidas para o padrão.

Construiu-se as curvas analíticas das quatro medidas independentes (curva e amostra) obtendo-se os gráficos da Figura 14. Calculando o valor de concentração médio obtido com cada curva obteve-se o resultado de $31,5 \pm 5,8$ mg L⁻¹, ou seja, um erro relativo de + 5 % e a não constatação de diferenças significativas ao nível de 95 % de confiança ao se aplicar o teste t para comparação do valor obtido com o instrumento e o valor conhecido para o padrão.

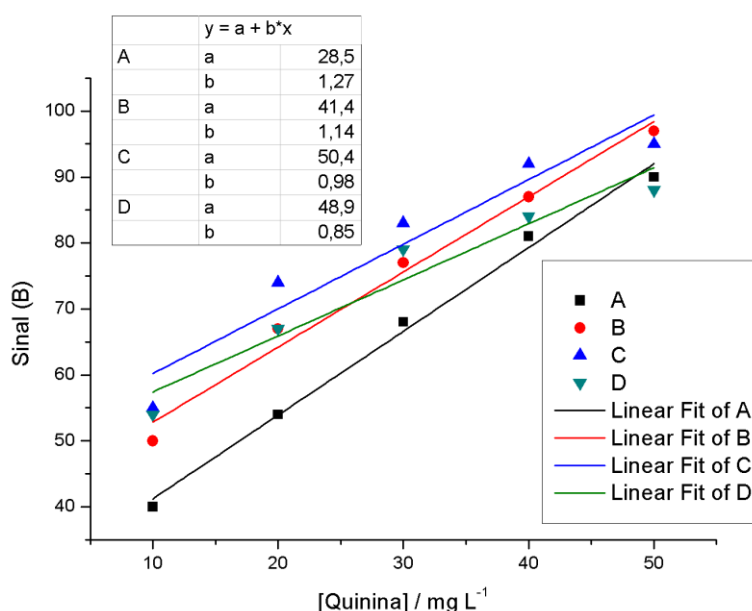


Figura 14: Curvas usadas no teste de exatidão para estimativa de um padrão com 30 mg L⁻¹.

De forma semelhante à utilizada no estudo anterior, o método baseado nas medidas com o sistema proposto foi avaliado também na determinação de quinina em duas amostras de água tônica encontradas no mercado local. Para isso, as amostras de refrigerante foram analisadas usando um espectrofluorímetro comercial com medidas em batelada e o instrumento proposto com o μ PAD, obtendo-se os dados apresentados na Tabela 1.

Como pode ser constatado, apesar do erro relativo na amostra 2 ter sido superior a 5%, pode-se considerar a exatidão do método satisfatória tendo em vista as características do instrumento e a quantidade muito reduzida de amostras e soluções padrão utilizadas. Realizando um teste t-Student verificou-se que não existem diferenças significativas ao nível de 95% de confiança entre os resultados, demonstrando uma exatidão plenamente aceitável para o método proposto.

Tabela 1: Resultados obtidos para a determinação de quinina em amostras de água tônica.

Amostra	[Quinina] / mg L ⁻¹		Erro Relativo (%)
	Instrumento	Instrumento	
	Proposto	Comercial	
A1	37,1 ± 4,0	36,2	+2,6
A2	36,0 ± 3,0	38,3	-6,2

4.2. - Estudos para a determinação de Alumínio com 8-hidroxiquinolina

4.2.1 - Precisão e linearidade da curva analítica

A componente G de RGB foi a que proporcionou os melhores resultados em termos de razão sinal/ruído para a detecção do complexo de alumínio com 8-hidroxiquinolina, sendo então utilizada para todos os estudos realizados para a determinação do metal. De fato, esse resultado já era esperado uma vez que o complexo apresenta espectro de emissão de fluorescência com máximo em 520 nm (verde) (PETERSON, 1996).

De forma similar à utilizada para a determinação de quinina, dez leituras sequenciais foram realizadas para uma solução de alumínio com concentração de 30 mg L⁻¹ com o objetivo de se avaliar a repetibilidade das medidas. Conforme mostra o gráfico representado pela Figura 15, o sinal analítico variou entre 88 e 106, sendo o sinal médio estimado em 95 unidades com desvio padrão de 6 unidades. Com isso, obteve-se um coeficiente de variação do sinal de 6,0%, de modo que a precisão do método se assemelha à obtida para a determinação da quinina devido aos fatores já discutidos. Vale destacar, entretanto, que o sinal de fluorescência para esse complexo metálico sofre maior influência a exposição dos spots à radiação da fonte de excitação e ao ar, sendo observada uma diminuição considerável da luminescência em menos de uma hora após a aplicação das soluções no papel, o que tornou necessário manter o dispositivo em ambiente protegido antes da realização das medidas e realizar o acionamento do LED apenas no momento da leitura.

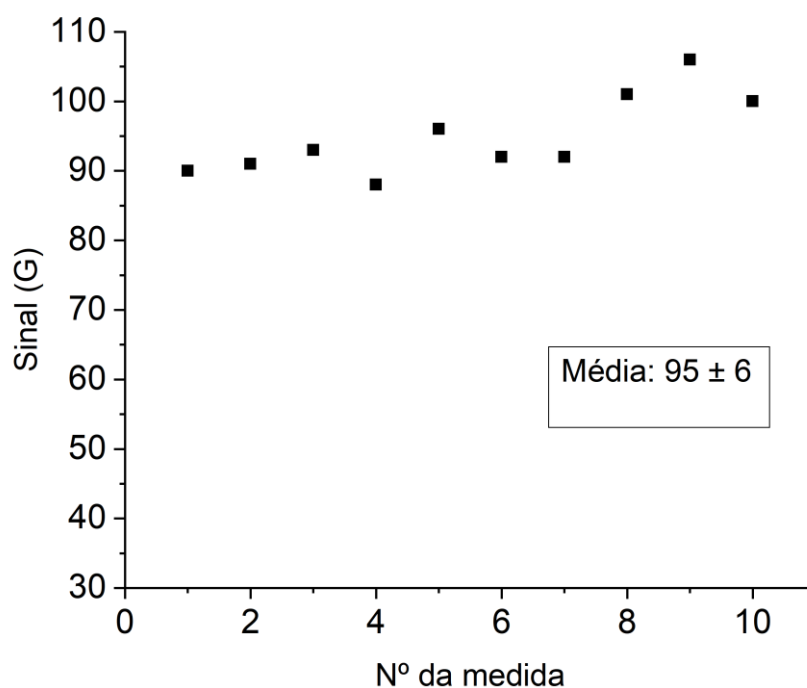


Figura 15: Teste de repetibilidade. 10 medidas consecutivas de um padrão 30 mg L^{-1} de alumínio complexado com 8-hidroquinolina.

A avaliação da faixa linear para medidas quantitativas foi inicialmente realizada com padrões de 5 a 60 mg L^{-1} em alumínio. Porém, acima de 40 mg L^{-1} o comportamento da curva deixa de ser linear e ocorre a saturação do sinal, com G atingindo valores próximos a 255 unidades. Com isso, optou-se pela continuidade dos estudos com padrões na faixa de 5 a 40 mg L^{-1} em alumínio.

Para avaliar a linearidade e precisão do método nessa faixa de concentração foi realizada a aplicação em triplicata dos padrões com concentrações crescentes intercaladas pela aplicação da solução do “branco”. O ponto inicial da curva foi para a concentração 5 mg L^{-1} , seguido por 10 mg L^{-1} e por incrementos de 10 mg L^{-1} até o padrão com 40 mg L^{-1} . O método apresentou um coeficiente de determinação (R^2) estimado em 0,999, demonstrando a capacidade de calibração linear para faixa proposta e a efetividade dos ajustes na faixa de concentração para utilizar o método na determinação de alumínio em diferentes amostras, como em medicamentos antiácidos.

Pode-se observar na Figura 16 também que as barras de erro para os sinais obtidos para as diferentes concentrações de padrão mantiveram-se em valores aceitáveis que permitem o uso quantitativo da estratégia para essa faixa

de concentração. Outro ponto importante a ser destacado aqui é que os sinais para a componente G obtidos para os padrões foram previamente descontados do valor para o branco, o qual apresentou um valor elevado (da ordem de 100 unidades) devido à reflexão da radiação da fonte no papel e à não utilização de um filtro óptico para a realização das medidas. De fato, foram testados vários filtros com diferentes faixas de corte, mas nenhum dos filtros disponíveis permitiram a eliminação da radiação de fundo, sem que houvesse comprometimento do sinal analítico.

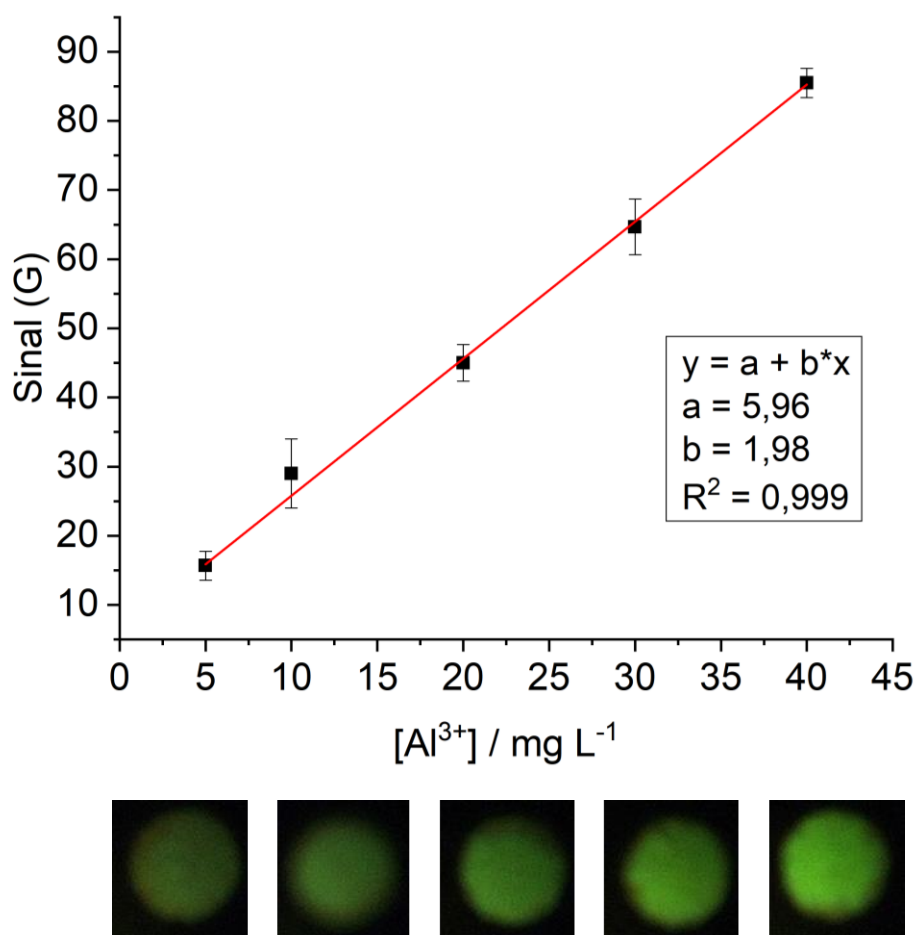


Figura 16: Construção de curva analítica para padrões de alumínio realizando triplicatas das medidas e fotografias dos spots medidos.

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma_i}{b} = \frac{3,3 \times 0,9}{1,98} = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$$

Equação 3

$$LQ = \frac{10 \times \sigma_{dp}}{b} = \frac{10 \times 2,1}{1,98} = 10,6 \text{ mg L}^{-1}$$

Equação 4

O limite de detecção foi estimado pela equação 3 (SKOOG *et al.*, 2015) em 1,5 mg L⁻¹, utilizando-se o valor da inclinação (b) e valor da incerteza padrão (σ_i) no cálculo do intercepto. O limite de quantificação foi estimado em 10,6 mg L⁻¹ através da equação 4 (INMETRO, 2016), usando o valor da inclinação (b) e o valor do desvio padrão da menor concentração da curva (σ_{dp}).

O limite de detecção menor para esse analito é uma consequência do ajuste da faixa de concentração, onde se obteve uma maior sensibilidade (valor da inclinação da curva) e um menor desvio padrão na medida. Comparando os valores do limite de quantificação entre os analitos, existe aproximadamente 6% de diferença, o que pode ser atribuído a diferente sensibilidade dos sensores da câmera a cor verde e azul e as diferentes características físico-químicas das moléculas estudadas. Esses valores ainda se mostram adequados para as análises propostas para esse instrumento como a determinação de alumínio em antiácidos discutida na próxima seção.

4.2.2 - Exatidão: determinação de alumínio em medicamentos antiácidos

De modo a avaliar a exatidão do método, os resultados obtidos com o instrumento proposto foram comparados com aqueles obtidos com um instrumento comercial de emissão atômica em plasma de micro-ondas (Agilent 4210 MP-AES) para a determinação de alumínio em antiácidos.

Tabela 2: Resultados para a determinação de hidróxido de alumínio em antiácidos. Comparação entre o instrumento e alternativa comercial.

Medicamento	Unidade	Instrumento proposto	MP-AES	Erro relativo (%)
1		62,1 ± 0,8	56,9 ± 0,3	+9,2
2	mg/mL	56,7 ± 3,6	50,8 ± 0,6	+11,7
3		41,3 ± 3,0	41,4 ± 0,4	-0,1
4		59,7 ± 1,0	56,9 ± 0,3	+4,9
5	mg/comp.	229,5 ± 4,8	216,7 ± 0,4	+5,9

Conforme indicado na Tabela 2, os erros relativos encontrados para duas das amostras (1 e 2) se encontram na faixa de +9% a +12%, o que pode ser considerado elevado para o nível alto de concentração de alumínio nestas amostras. De fato, um teste t ao nível de 95 % de confiança indicou diferenças significativas para três das cinco amostras analisadas (1, 4 e 5) sendo que a hipótese nula não foi rejeitada para a amostra 2, possivelmente devido a influência do maior desvio padrão obtido para essa amostra quando se utilizou o instrumento proposto.

Ao se realizar uma comparação entre os valores obtidos com o instrumento proposto e aqueles descritos no rótulo do medicamento (Tabela 3), notamos uma diminuição considerável do erro relativo, com valores semelhantes aos encontrados na determinação de quinina (erro relativo máximo em torno de 5-6%). Uma análise por teste t-Student entre os dados apresentados na Tabela 3 indicou que existe uma diferença significativa ao nível de 95% de confiança apenas entre os valores obtidos com o instrumento proposto e o rótulo para a amostra 1. Porém, o erro relativo para essa amostra é relativamente baixo (+3,5 %) de modo que a hipótese nula foi possivelmente rejeitada devido à influência do menor desvio padrão encontrado para o resultado dessa amostra (0,8), não indicando necessariamente falta de exatidão para as medidas.

Considerando esses resultados e o fato de que os valores obtidos com emissão atômica se encontram abaixo do valor indicado no rótulo para a grande maioria das amostras (4 em 5), surge a hipótese de que o método de referência

pode estar apresentando um viés para valores mais baixos que o esperado, o que ainda precisa ser confirmado. De fato, a detecção de alumínio pelo método de espectrometria atômica com plasma de microondas pode sofrer de uma maior interferência por efeitos de matriz (BALARAM, 2020).

Embora os valores rotulados não sejam indicados como referência para a avaliação da exatidão de um método analítico, a indústria farmacêutica costuma apresentar um controle de qualidade rígido para os teores dos princípios ativos em medicamentos fabricados em escala industrial, com teores muito próximos daqueles indicados nos rótulos. Dessa maneira, pode-se afirmar que o método proposto para a determinação de alumínio em antiácidos tende a apresentar uma boa exatidão, o que precisa ser confirmado com o uso de outro método de referência.

Tabela 3: Resultados para a determinação de hidróxido alumínio em antiácidos Comparação entre o instrumento e o rótulo do medicamento.

Medicamento	Unidade	Instrumento proposto	Rótulo	Erro relativo (%)
1		62,1 ± 0,8	60	+3,5
2	mg/mL	56,7 ± 3,6	60	-5,5
3		41,3 ± 3,0	40	+3,25
4		59,7 ± 1,0	60	-0,5
5	mg/comp.	229,5 ± 4,8	230	-0,2

Levando em consideração os dados apresentados, o instrumento apresentou um desempenho adequado para as análises propostas, com figuras de mérito satisfatórias, baixo consumo de reagentes e amostras e baixa geração de resíduos, o que colabora grandemente para o conceito de química analítica verde (LENARDÃO *et al.*, 2003).

Erros aleatórios decorrentes da aplicação manual das soluções no papel são ainda o principal fator que causa variação na exatidão e precisão do método, pois a quantidade pequena de analito transferida para os spots do μ PAD gera alterações caso haja uma variação no volume aplicado.

5. Conclusões

Os estudos demonstraram a possibilidade de uso analítico quantitativo de medidas de fluorescência em dispositivos de papel empregando-se detecção com imagens digitais. O instrumento proposto e o aplicativo desenvolvido para o seu controle permitiram a rápida obtenção de informações que podem ser relacionadas com as concentrações dos analitos nas amostras estudadas, diminuindo os custos das análises e simplificando a instrumentação e os procedimentos normalmente utilizados para esse propósito.

A estimativa do custo total do instrumento foi de aproximadamente R\$ 500,00 (U\$130) (sem incluir o preço do smartphone usado para as medidas), o que permite a sua construção ou aquisição por laboratórios de pequeno porte. O tamanho compacto e o peso de aproximadamente 500 g, poderão permitir ainda o uso do instrumento de maneira portátil para análises em campo. Adicionalmente, os estudos aqui realizados servirão de base para novas aplicações do instrumento em amostras e analitos diversos em que suas características mais importantes sejam requeridas.

6. Referências Bibliográficas

AKYAZI, Tugce; BASABE-DESMONTS, Lourdes; BENITO-LOPEZ, Fernando. Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation. **Analytica Chimica Acta**, v. 1001, p. 1–17, 25 fev. 2018. DOI 10.1016/j.aca.2017.11.010. .

BALARAM, V. Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) and its applications – A critical review. **Microchemical Journal**, v. 159, p. 105483, 1 dez. 2020. DOI 10.1016/j.microc.2020.105483. .

BYRNE, Liam *et al.* Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 517–522, 2000. DOI [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(00\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(00)00019-4). .

CAPITÁN-VALLVEY, Luis Fermín *et al.* Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. **Analytica Chimica Acta**, v. 899, p. 23–56, 29 out. 2015. DOI 10.1016/j.aca.2015.10.009. .

CARRILHO, Emanuel; MARTINEZ, Andres W.; WHITESIDES, George M. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091–7095, 15 ago. 2009. DOI 10.1021/ac901071p. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac901071p>. Acesso em: 27 out. 2020.

CATE, David M. *et al.* Recent developments in paper-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 19–41, 6 jan. 2015. DOI 10.1021/ac503968p. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac503968p>. Acesso em: 28 out. 2020.

CHITNIS, Girish *et al.* Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 6, p. 5, 2011. DOI 10.1039/c0lc00512f. Disponível em: www.rsc.org/loc.

CURTO, Vincenzo F. *et al.* Fast prototyping of paper-based microfluidic devices by contact stamping using indelible ink. **RSC Advances**, v. 3, n. 41, p. 18811–18816, 7 nov. 2013. DOI 10.1039/c3ra43825b. Disponível em: www.rsc.org/advances. Acesso em: 28 out. 2020.

FENG, Liang *et al.* Colorimetric sensing of anions in water using ratiometric indicator-displacement assay. **Analytica Chimica Acta**, v. 743, p. 1–8, 19 set. 2012. DOI 10.1016/j.aca.2012.06.041. .

GRUDPAN, Kate *et al.* Applications of everyday IT and communications devices in modern analytical chemistry: A review. **Talanta**, v. 136, p. 84–94, 1 maio 2015. DOI 10.1016/j.talanta.2014.12.042. .

HUANGFU, Changxin *et al.* A MPAD for simultaneous monitoring of Cu²⁺, Fe²⁺ and free chlorine in drinking water. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 293, p. 350–356, 15 ago. 2019. DOI 10.1016/j.snb.2019.02.092. .

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. . [s.l.: s.n.], ago. 2016.

LENARDÃO, Eder João *et al.* “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003. DOI 10.1590/S0100-40422003000100020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000100020&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 17 abr. 2021.

- MARTINEZ, Andres W. *et al.* Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1318–1320, 12 fev. 2007. DOI 10.1002/anie.200603817. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200603817>. Acesso em: 8 mar. 2021.
- MCCRACKEN, Katherine E. *et al.* Smartphone-based fluorescence detection of bisphenol A from water samples. **RSC Advances**, v. 7, n. 15, p. 9237–9243, 30 jan. 2017. DOI 10.1039/c6ra27726h. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/ra/c6ra27726h>. Acesso em: 5 out. 2020.
- NERY, Emilia W.; KUBOTA, Lauro T. Sensing approaches on paper-based devices: A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 24, p. 7573–7595, 23 set. 2013. DOI 10.1007/s00216-013-6911-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-013-6911-4>. Acesso em: 28 out. 2020.
- NIE, Zhihong *et al.* Integration of paper-based microfluidic devices with commercial electrochemical readers. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 22, p. 3163–3169, 21 nov. 2010. DOI 10.1039/c0lc00237b. Disponível em: www.rsc.org/loc. Acesso em: 28 out. 2020.
- O'REILLY, J. E. Fluorescence experiments with quinine. **Journal of chemical education**, v. 52, n. 9, p. 610–612, 1975. DOI 10.1021/ed052p610. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed052p610>. Acesso em: 23 mar. 2021.
- OSBORN, Jennifer L. *et al.* Microfluidics without pumps: Reinventing the T-sensor and H-filter in paper networks. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 20, p. 2659–2665, 21 out. 2010. DOI 10.1039/c004821f. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/lc/c004821f>. Acesso em: 29 mar. 2021.
- PETERSON, Jim. Fluorometric determination of aluminum: A quantitative experiment for the instrumental analysis laboratory. **Journal of Chemical Education**, v. 73, n. 3, p. 262–264, 1996. DOI 10.1021/ed073p262. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed073p262>. Acesso em: 23 mar. 2021.
- QUININE SULFATE TABLETS 300MG SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS. 17 out. 2019. Disponível em: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/4554/smpc>. Acesso em: 17 abr. 2021.
- SKOOG, Douglas A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica: Tradução da 9ª edição norte-americana**. 2ª ed. [s.l.]: Cengage Learning Brasil, 2015.
- WANG, Yanhu *et al.* Ultrasensitive chemiluminescence detection of DNA on a microfluidic paper-based analytical device. 145., 14 jan. 2014. **Anais [...]**. [s.l.]: Springer, 14 jan. 2014. p. 129–135. DOI 10.1007/s00706-013-0971-1. Disponível em: <https://link-springer-com.ez54.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s00706-013-0971-1>. Acesso em: 28 out. 2020.
- XU, Miao; BUNES, Benjamin R.; ZANG, Ling. Paper-based vapor detection of hydrogen peroxide: Colorimetric sensing with tunable interface. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 3, n. 3, p. 642–647, 23 mar. 2011. DOI 10.1021/am1012535. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/am1012535>. Acesso em: 28 out. 2020.