



Instituto de Química

Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Química
Tecnológica

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DISPOSITIVOS À
BASE DE PAPEL PARA A DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B₁₂ POR
QUIMILUMINESCÊNCIA**

Aluna: Eloíza Cristiny Azevedo dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília – DF

2021



Universidade de Brasília

Instituto de Química

Eloíza Cristiny Azevedo dos Santos

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DISPOSITIVOS À
BASE DE PAPEL PARA A DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B₁₂ POR
QUIMILUMINESCÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial para a obtenção do título de Bacharela
em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília – DF

2021

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DISPOSITIVOS À BASE DE
PAPEL PARA A DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B₁₂ POR
QUIMILUMINESCÊNCIA**

Eloíza Cristiny Azevedo dos Santos

Professor orientador: Dr. Alexandre Fonseca

Professor: Dr. Fábio Moreira da Silva

Professor: Dr. Jez Willian Batista Braga

Brasília, outubro de 2021

“Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

(Josué 1:9)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Marco Antônio G. dos Santos e Maria Aparecida D. de Azevedo por sempre acreditarem em mim e não medirem esforços para me ajudar a conquistar meus objetivos. Sei o quanto essa etapa é significativa para a nossa família, já que vocês batalharam bastante para que tivesse essa oportunidade e fico muito feliz e grata por conquistá-la.

Às minhas irmãs Larissa e Letícia Azevedo por sempre estarem ao meu lado e por não me deixarem desanimar.

Aos meus amigos Sarah, Beatriz, Mariana, Isabella, Letícia, Rafael e Caio por todo o companheirismo e por todo o apoio e carinho nos momentos bons, mas principalmente nos momentos difíceis ao longo desses anos.

Em especial ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Fonseca um exemplo de pessoa e profissional e por toda sua dedicação e paciência durante esse trabalho e na iniciação científica.

Ao órgão de fomento que permitiu a realização dessa pesquisa: CNPq.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar dispositivos a base de papel para medidas de quimiluminescência. Foram desenvolvidos dois modelos de dispositivos microfluídicos em papel (μ PAD) para análise, sendo utilizadas para a sua confecção as técnicas de recorte a laser e impressão com cera. O primeiro modelo consiste em um arranjo de oito spots adjacentes destinados para a deposição do analito e que são interligados através de canais (3 x 2 mm) a um spot central onde ocorre a adição do solvente. O segundo modelo é constituído por nove canais (10 x 2 mm) paralelos que estão conectados a dois spots cada, sendo que em um spot ocorre a deposição do analito e no outro a adição do reagente. Um suporte plástico foi desenvolvido para fixar o μ PAD e facilitar a transferência das soluções de trabalho. Para a aquisição do sinal analítico se utilizou um software lab-made, capaz de produzir respostas quantitativas através da leitura de uma imagem em tempo real captada por um webcam. Para comprovar a eficiência do dispositivo proposto foram realizadas medidas com o objetivo de quantificar vitamina B₁₂ em soluções injetáveis. Essa determinação foi possível através da extração por digestão ácida do íon cobalto (II) presente nesse composto e posterior atuação deste íon como agente catalisador na reação quimiluminescente entre o luminol e peróxido de hidrogênio. A avaliação do dispositivo foi realizada a partir da comparação entre os valores de concentração da vitamina B₁₂ obtidos pelo instrumento proposto e os valores descritos nos rótulos das amostras comerciais. Os resultados obtidos através desse procedimento proporcionaram uma resposta linear ($R^2 = 0,992$) na faixa de 0,2 a 1,8 mg L⁻¹ em Co²⁺, com um limite de detecção de 0,051 mg.L⁻¹, um limite de quantificação de 0,153 mg.L⁻¹ e erros relativos menores que 4%. O dispositivo apresentou potencial aplicabilidade para a determinação de vitamina B₁₂ e se mostrou promissor para determinações por quimiluminescência.

Palavras chave: Sistema microfluídico em papel. μ PAD. Imagens digitais. Vitamina B₁₂.

ABSTRACT

The present work aimed to develop and evaluate paper-based devices for chemiluminescence measurements. Two models of paper-based microfluidic devices (μ PAD) were developed for analysis, using laser cutting and wax printing techniques. The first model consists of an arrangement of eight adjacent spots destined for the deposition of the analyte and that are interconnected through channels (3 x 2 mm) to a central spot where the addition of the solvent occurs. The second model is composed of nine parallel channels (10 x 2 mm) that are connected to two spots each, where in one spot occurs the deposition of the analyte and in the other the addition of the reagent. A plastic support was developed to fix the μ PAD and facilitate the transfer of the working solutions. For the acquisition of the analytical signal, a lab-made software was used, capable of producing quantitative responses by reading a real-time image captured by a webcam. To prove the efficiency of the proposed device, measurements were made with the objective of quantifying vitamin B₁₂ in injectable solutions. This determination was possible through the extraction by acid digestion of the cobalt (II) ion present in this compound and the subsequent action of this ion as a catalyzing agent in the chemiluminescent reaction between luminol and hydrogen peroxide. The evaluation of the device was carried out by comparing the values of vitamin B₁₂ concentration obtained by the proposed instrument and the values described on the labels of commercial samples. The results obtained through this procedure provided a linear response ($R^2 = 0.992$) in the range of 0.2 to 1.8 mg L⁻¹ in Co²⁺, with a detection limit of 0.051 mg.L⁻¹, a quantification limit of 0.153 mg.L⁻¹ and relative errors lower than 4%. The device showed potential applicability for the determination of vitamin B₁₂ and showed promise for chemiluminescence determinations.

Keywords: Paper microfluidic system. μ PAD. Digital image. Vitamin B₁₂.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRONIMOS	ix
LISTA DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	1
1.1 Microdispositivos em papel (μ PAD).....	1
1.2 Luminescência em papel.....	3
1.3 Uso de imagens digitais como estratégia de detecção	4
1.4 Vitamina B ₁₂	6
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 Construção do dispositivo por recorte a Laser	10
3.2 Construção do dispositivo por impressão com Cera	10
3.3 Aparato de leitura	12
3.4 Programa de Computador	13
3.5 Reagentes e Soluções	14
3.6 Preparo de amostra.....	15
3.7 Procedimento para leitura	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Mecanismo de reação	18
4.2 Resposta a luminescência.....	19
4.3 Desempenho analítico.....	20
5. CONCLUSÃO E FUTURAS PESPECTIVAS.....	24
6. REFERÊNCIAS.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

μ PADs - Dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel

CL – Quimiluminescência

RGB – red, green, blue

CMY – cyan, magenta, yellow

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

RSD – Desvio padrão residual

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores da concentração de vitamina B12 nas amostras comerciais e obtidas pelo instrumento proposto.....	23
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Progresso do número de publicações e citações relacionadas aos microdispositivos baseados em papel entre 2013 e 2021, fornecido pela “Web of Science”	2
Figura 2. Esquema sobre quimiluminescência direta e indireta.....	3
Figura 3. Estruturas químicas da cobalamina, adaptado de Kumar et al. (KUMAR; CHOUHAN; THAKUR, 2010).	7
Figura 4. Representação esquemática do processo de fabricação de μ PADs por recorte a laser.	10
Figura 5. Frente e verso do dispositivo μ PAD.	11
Figura 6. Representação esquemática do processo de fabricação de μ PADs por impressão a cera.....	11
Figura 7. Aparato utilizado.....	12
Figura 8. (a) Dimensões do suporte para o μ PAD. (b) Suporte com o μ PAD.....	13
Figura 9. Interface do software utilizado. Onde (a) indica a região em que se obtêm a imagem em tempo real juntamente com os amostradores, (b) indica as configurações dos amostradores que podem ser ajustadas, (c) indica a região de ajuste para os parâmetros gráficos, (d) parâmetros de leitura e por fim, (e) indica a região gráfica onde são plotados os dados resultantes da leitura em tempo real.....	14
Figura 10. Amostra de vitamina B12 (a) antes do processo de acidificação, (b) durante o processo de acidificação e (c) após o processo de digestão no micro-ondas.....	15
Figura 11. Modo de aplicação da solução no papel.	16
Figura 12. Montagem do aparato.	17
Figura 13. Mecanismo proposto por Albertin e colaboradores para a reação quimiluminescente do luminol Adaptado de: MOREIRA, 2008.....	18
Figura 14. Microdispositivos em papel fabricados (a) modelo com canais adjacentes e (b) modelo com canais paralelos.....	19
Figura 15. Resposta a intensidade do sinal dos modelos um e dois, respectivamente.	20
Figura 16. Gráfico de Resposta do componente B (u.a) vs. tempo (s).	21
Figura 17. Curva analítica para determinação de íon cobalto (II).	21
Figura 18. Gráfico de intensidade do sinal (B) vs. Número de Leituras para uma solução padrão de 1 mg/L de cobalto (II).	22

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Microdispositivos em papel (μ PADs)

Devido a propriedades físicas como biodegradabilidade, biocompatibilidade e facilidade de produção/manuseio (CARRELL et al., 2019) o papel se tornou um dos substratos essenciais para a atividade humana. Ele é constituído principalmente por fibras de celulose que podem sofrer modificações através do emprego de reações químicas simples alterando propriedades como hidrofobicidade, permeabilidade e reatividade (BRACHER; GUPTA; WHITESIDES, 2010). Por apresentar essas características, o papel se tornou objeto de estudo cuja finalidade seria analisar a sua capacidade de efetuar medições químicas. O primeiro avanço significativo ocorreu há 76 anos quando West desenvolveu um teste pontual para a determinação de cobre (WEST, 1945), no qual adicionava-se a uma tira de papel ligantes que, ao entrar em contato com a solução teste de cobre, obtinham a coloração verde, confirmando a sua presença.

O trabalho de West juntamente com o processo de miniaturização dos sistemas de análise, que tiveram seu início a partir da fabricação de um microsistema de cromatografia em fase gasosa desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Prof. Terry e colaboradores (TERRY, S. C., JERMAN, J. H., & ANGELL, 1979), serviu como base para o desenvolvimento de dispositivos que revolucionaram a área de química analítica, dentre eles se destacam os dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (*microfluidic paper - based devices*, μ PADs). Seu desenvolvimento teve início a partir do bioensaio realizado por Martinez e colaboradores (2007) para a determinação de glicose e proteínas na urina empregando o método de detecção colorimétrica. Nesse trabalho, Martinez desenvolveu um dispositivo de análise química cujo componente principal é o papel e um método de padronização simples que possibilitava a criação de microcanais bem definidos que permitiam o transporte do fluido de interesse, sem o auxílio de componentes externos como bombas, por exemplo.

O transporte do fluido de interesse é gerado através da pressão capilar das fibras de celulose e seu direcionamento ocorre a partir da confecção/padronização do

dispositivo (CARREL et al., 2019). Em virtude do processo de miniaturização e das propriedades particulares do papel, foram atribuídas a esse dispositivo analítico características como o consumo de pequenas quantidades de amostras e reagentes, baixo custo, simplicidade, facilidade de manuseio, portabilidade e descartabilidade.

Considerando esses aspectos, o campo de pesquisa expandiu-se rapidamente e foram desenvolvidos novos métodos para a confecção dos arranjos de canais que compõem esses dispositivos, dentre os quais se destacam: fotolitografia (DUNGCHAI, et al. (2019), serigrafia (LI et al , 2012), impressão a cera (ANDINI et al., 2019) e tratamento com laser (COSTA, 2009). A Figura 1, apresenta o aumento no número de publicações e citações, relacionados ao uso de dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel, no período de 2013 a 2021, conforme a base de dados “*Web of Science*”.

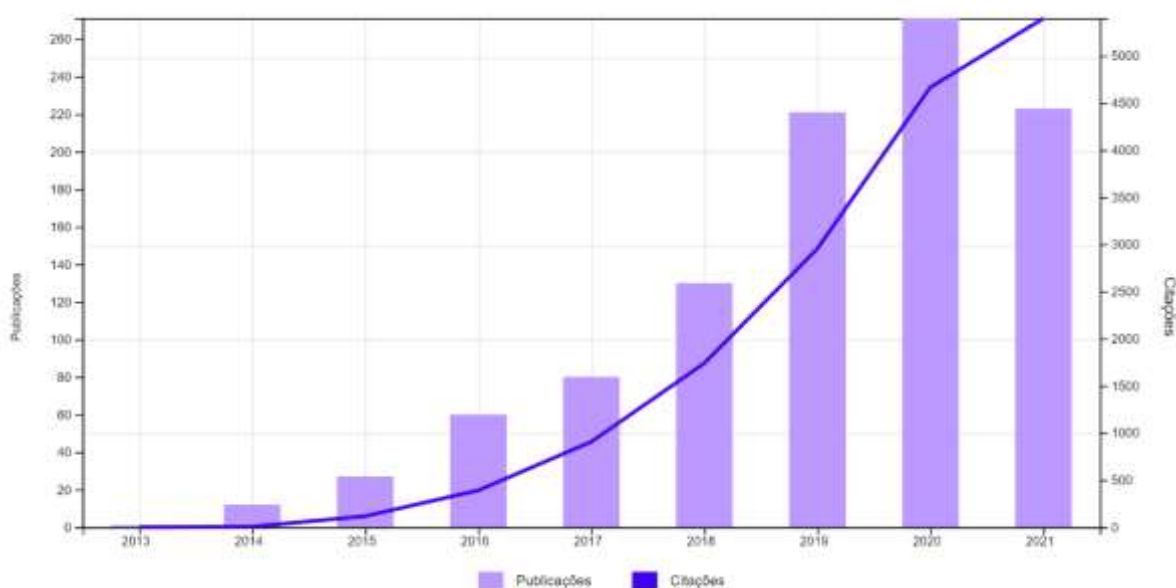


Figura 1. Progresso do número de publicações e citações relacionadas aos microdispositivos baseados em papel entre 2013 e 2021, fornecido pela “*Web of Science*”

Posteriormente foram desenvolvidos novos métodos de detecção para os analitos de interesse sendo os métodos eletroquímicos, colorimétricos e fluorescentes os mais empregados. Esses métodos de detecção apresentaram como vantagem portabilidade, baixo custo, alta seletividade e sensibilidade (DORNELAS, 2013). Por apresentarem características promissoras os microdispositivos em papel foram utilizados em abordagens como monitoramento ambiental em análises de

contaminantes de rios/solos ou poluição do ar como também na detecção de contaminantes de origem alimentar (CATE et al., 2015).

1.2 Luminescência em papel

Na literatura, os métodos de detecção mais comumente utilizados nos dispositivos microfluídicos baseados em papel são os métodos colorimétricos, eletroquímicos e fluorescentes (TONG et al., 2021). Os métodos de detecção ópticos baseados em luminescência Química estão se tornando particularmente mais atraentes devido ao seu alto desempenho, baixo fundo de interferência, análise rápida e a simplicidade do equipamento de medição necessário.

Basicamente, o que ocorre é uma reação exotérmica que forma um produto em estado excitado (P^*) que ao retornar ao seu estado fundamental, libera grande parte dessa energia como radiação eletromagnética (MOREIRA, 2009). O processo de relaxamento pode ocorrer de duas maneiras: diretamente e indiretamente. No primeiro caso, o produto da reação (P^*) se encontra em um estado eletronicamente excitado e é o responsável pela emissão de luz ($h\nu$). No segundo caso, a excitação ocorre via transferência de energia intermolecular entre o produto excitado (P^*) e a molécula aceptora (A^*) e essa molécula libera a energia na forma de luz, conforme mostrado na Figura 2. A medida do sinal quantitativo é realizada através da medição da intensidade da radiação emitida por uma reação quimiluminescente (RODA et al., 2016).

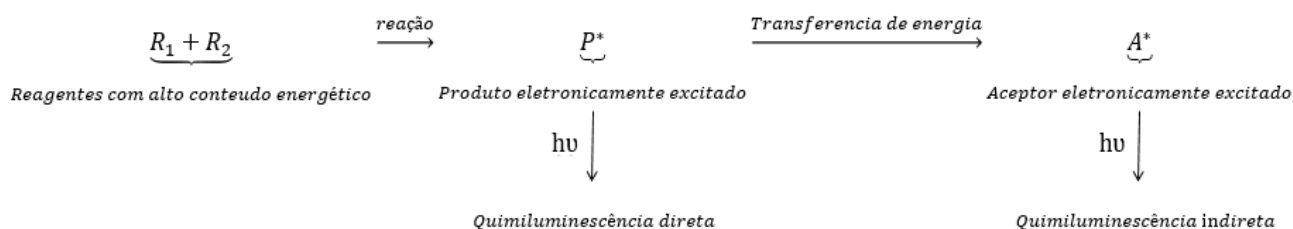


Figura 2. Esquema sobre quimiluminescência direta e indireta.

CHEN et al. (2018) desenvolveu um imunodispositivo baseado em papel para a determinação de um antígeno carcinoembrionário (CEA) utilizando o método de detecção quimiluminescente. O método foi baseado em um imunoenensaio tipo sanduiche cuja area de detecção recebe um tratamento de plasma de oxigênio em sua superfície para posterior captura do antígeno. Para o aprimoramento do sinal, os autores adotaram o uso de nanoesferas altamente carbonizadas (Highly carbonized nanospheres, HCS) que ao serem combinadas com o imunoenensaio quimiluminescente obtiveram um limite de detecção menor que $3 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Liu et al. (2015) desenvolveram um microdispositivo impresso com cera e combinado com nanopartículas de prata (AgNPs) para a determinação de ofloxacina (OFLX) em amostras de colírios. Para a construção da curva de calibração adicionou-se ao dispositivo uma mistura entre as nanopartículas de prata e diferentes concentrações de OFLX na zona de detecção, as AgNPs são usadas como catalisadores e tem como função ampliar a sensibilidade no sistema CL. A medida é determinada com base no aumento da intensidade quimiluminescente do sistema luminol- H_2O_2 -OFLX alcançando um limite de detecção de $3\cdot 10^{-10} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Outra aplicação é o trabalho proposto por Ujiie et al. (2018) no qual, desenvolveu-se um ensaio bioquímico utilizando uma plataforma em papel para a determinação de sulfonamidas. A reação entre a enzima dihidropteroato sintase e o reagente de detecção pirofosfato luminescente desencadeiam reações biomoleculares que promovem a luminescência das sulfonamidas. O dispositivo em papel foi submetido a um pré-tratamento onde uma solução sensor foi inserida nas regiões de detecção e em seguida liofilizado. Esse bioensaio determinou seis diferentes formas de sulfonamidas com um limite de detecção abaixo de $2,5\cdot 10^{-2} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, destacando-se também por sua simplicidade e baixo custo diferente dos métodos já empregados como cromatografia e biosensores.

1.3 Uso de Imagens Digitais como Estratégia de Detecção

Uma imagem digital é composta por milhares de pixels que por sua vez estão relacionados aos valores numéricos dos sistemas de coordenadas de cores. Os sistemas de cores mais utilizados são o RGB e o CMY. O sistema RGB é composto

pelas cores primarias vermelho (*red*, R), verde (*green*, G) e azul (*blue*, B) e é conhecido por ser um sistema aditivo, ou seja, a soma/combinção de todas as cores primarias em igual proporção resulta na cor branca (ROCHA, 2010). Já o sistema CMY é composto pelas cores ciano (*cyan*, C), magenta (*magenta*, M) e amarelo (*yellow*, Y) e é conhecido por ser um sistema redutor, ou seja, a subtração das três cores em proporções adequadas resulta na cor preta. A distinção das cores presentes nesses sistemas ocorre a partir da variação dos níveis de intensidade de suas componentes, que podem assumir valores que vão de 0 a 255 níveis de tonalidades em uma resolução de 8 *bits* (NETO, 2019).

O emprego de imagens digitais como ferramenta analítica vem se expandindo nos últimos anos devido ao seu desempenho em determinações qualitativas e quantitativas de reações que envolvem os fenômenos de absorção, reflexão e emissão de radiação eletromagnética na região visível do espectro. Por apresentarem vantagens como baixo custo, portabilidade e a capacidade de realizar medidas em tempo real (CHOODUM et al., 2014) equipamentos como câmeras fotográficas, *webcams* e *smartphones* estão substituindo instrumentos de detecção como fotômetros, espectrofotômetros e espectrofluorímetros (GERSON F. SILVA NETO; ALEXANDRE FONSECA; JEZ W. B. BRAGA, 2016). Devido as vantagens apresentadas, o uso de imagens digitais como método de detecção pode ser aplicado em diversas áreas, tais como: na detecção de drogas como a metanfetamina (CHOODUM et al., 2014), no monitoramento da qualidade do ar (CERRATO-ALVAREZ, MARIA, et al., 2021), no monitoramento de bebidas (OLIVEIRA et al., 2021), na detecção de contaminantes em afluentes (POORNIMA et al., 2018) entre outros.

Um exemplo é o trabalho de Ballesteros e colaboradores (2021) onde realizaram a determinação de ferro (III) em suplementos dietéticos utilizando extrato de chá verde (*Comellia sinensis*) como reagente colorimétrico natural, utilizou-se uma câmera fotográfica como detector e o *software ImageJ* para análise das imagens obtidas. Esse software calculou a média dos valores de R, G e B do complexo violeta formado pela reação entre o íon ferro (III) e os polifenóis presentes no extrato de chá verde. Após a análise foram obtidos um limite de detecção (LD) de 0,9 mg.L⁻¹ e um limite de quantificação (LQ) de 1,6 mg.L⁻¹ indicando um ótimo desempenho analítico e um método promissor para a detecção de ferro.

A análise por imagem digital também foi empregada no trabalho de Jing e colaboradores (2021) no qual o sistema de leitura RGB foi usado na quantificação de carbaril, um inseticida utilizado no controle de pragas com alto teor de carbamato, em amostras de alimentos. A captura da mudança de coloração da reação colorimétrica foi realizada por um *smartphone*. O método de detecção utilizado apresentou resultados satisfatórios em comparação aos instrumentos analíticos convencionais (HPLC e CG).

Wei e colaboradores (2020) desenvolveram um biosensor óptico de silício poroso (PSi) para a detecção de DNA utilizando um microscópio digital para a medida da intensidade de fluorescência. Como resultado foi obtido um limite de detecção ligeiramente menor em comparação aos instrumentos tradicionais, como o espectrofluorímetros. Entretanto, esse método de detecção apresentou como vantagens baixo custo, alto rendimento e alta sensibilidade.

A partir dos trabalhos citados, nota-se que o campo de aplicação para as determinações por imagens digitais apresenta um grande potencial de expansão, contudo, poucos trabalhos empregam o uso dessa ferramenta analítica em medidas quimiluminescentes. Isso ocorre porque em determinações que utilizam o método de detecção quimiluminescente se faz necessário o uso de *softwares* específicos especializados em monitorar a mudança de intensidade da emissão de radiação eletromagnética (luz) em tempo real e em intervalos menores que um segundo.

1.4 Vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂, também conhecida como cobalamina (C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P) é um complexo orgânico de tetrapirrol de cobalto (II) na qual, sua síntese é realizada apenas por bactérias, fungos e algas. Ela está ausente em todos os vegetais e é somente encontrada em alimentos de origem animal, principalmente no fígado (BRAYNES, 2019), sendo essencial para a função neurológica, formação de eritrócitos (glóbulos vermelhos) e na síntese de DNA. Sua carência no organismo ocasiona uma anemia megaloblástica, acometendo principalmente idosos a partir dos 60 anos.

A vitamina B₁₂ pode apresentar diferentes formas moleculares e sua classificação depende do radical substituinte, a forma mais estável e comercializada é a cianocobalamina onde um grupo cianeto (-CN) está ligado ao cobalto (KUMAR; CHOUHAN; THAKUR, 2010), as demais formas moleculares pertencentes a este grupo estão descritas na Figura 3.

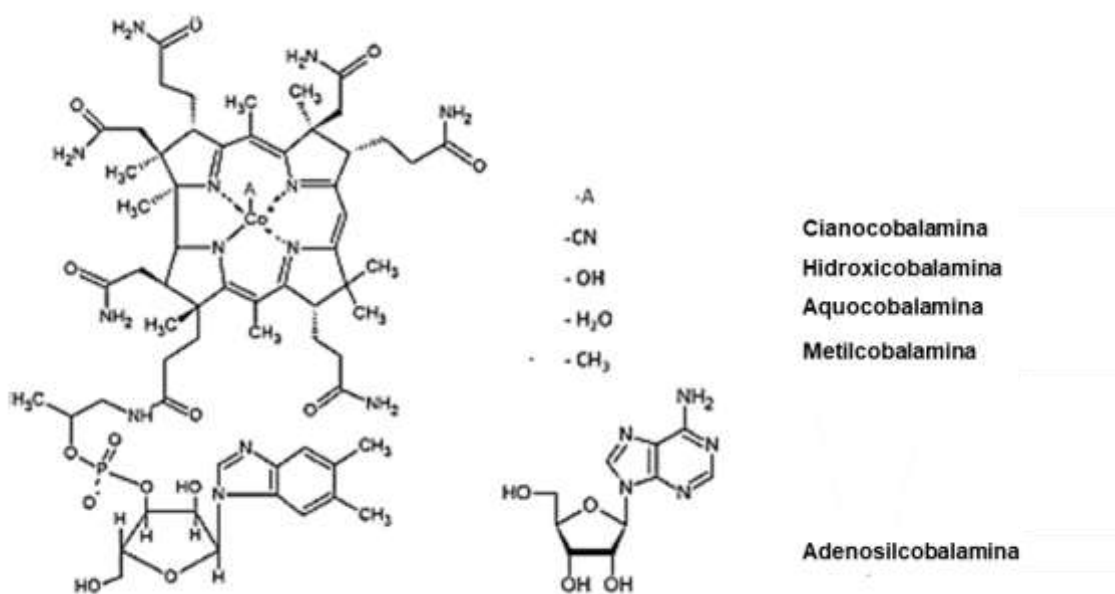


Figura 3. Estruturas químicas da cobalamina, adaptado de Kumar et al. (KUMAR; CHOUHAN; THAKUR, 2010).

Uma variedade de métodos analíticos tem sido propostos para a determinação da Vitamina B₁₂, dentre eles se destacam análise por sistema fluxo batelada (MOREIRA, 2009), cromatografia líquida (OKBAMICHAEL; SAÑUDO-WILHELMY, 2004), quimiluminescência (SONG; HOU, 2003), fluorescência (AHMAD et al., 2018) entre outros. Dentre os métodos citados, a determinação de Vitamina B₁₂ por quimiluminescência demonstrou ser uma alternativa atraente devido a propriedades como alta sensibilidade e instrumentação simples.

Kumar e colaboradores (2009) demonstram a aplicação desse método na determinação de Vitamina B₁₂ em fármacos. Essas determinações foram realizadas utilizando um luminômetro de microplacas e alcançaram um limite de detecção de $5 \cdot 10^{-6}$ mg L⁻¹. Essa mesma determinação pode ser aplicada para alimentos, sendo o trabalho desenvolvido por Song (2003) um exemplo. Neste trabalho, a Vitamina B₁₂ é determinada em amostras de gema do ovo e no tecido de peixe. As amostras foram submetidas a um pré tratamento com ácido clorídrico (HCl), em seguida foram homogeneizadas ultrassonicamente, centrifugadas e por fim filtradas. As

determinações foram feitas utilizando um sistema de injeção em fluxo (FI), obtendo um limite de detecção de $5 \cdot 10^{-8}$ mg/L para a Vitamina B₁₂ e um desvio padrão relativo (RSD) menor que 3%. Com base nos exemplos descritos, nota-se que as determinações de Vitamina B₁₂ que utilizam medidas quimiluminescentes ainda estão sendo conciliadas com técnicas analíticas convencionais, ou seja, ainda fazem uso de dispositivos que podem ter custos elevados e/ou dispõem de uma instrumentação complexa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O trabalho em questão apresenta como objetivo a construção, avaliação e aplicação de sistemas analíticos microfluídicos baseados em papel na determinação quimiluminométrica de espécies, utilizando imagens digitais em tempo real como estratégia de detecção.

2.2 Objetivos Específicos

São objetivos específicos desse trabalho:

- Construir e avaliar sistemas microfluídicos a base de papel empregando as técnicas de recorte com laser e impressão a cera para a confecção dos canais;
- Avaliar programa de computador para captação de imagens digitais de quimiluminescência em papel e detecção do sinal obtido com o sistema RGB;
- Avaliar o sistema proposto na determinação de Vitamina B₁₂ em medicamentos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construção do dispositivo por recorte a Laser

O uso da técnica de recorte a laser permite ao dispositivo um recorte realizado de forma precisa que é responsável pela delimitação do fluxo das soluções empregadas. O layout desse dispositivo foi desenvolvido por um software gráfico e consistia em um spot central para adição do reagente e 8 spots ($\varnothing=7$ mm) para a deposição do analito que são ligados ao spot central por 8 canais (3×2 mm). A Figura 4, apresenta o esquema do processo de fabricação desse dispositivo.

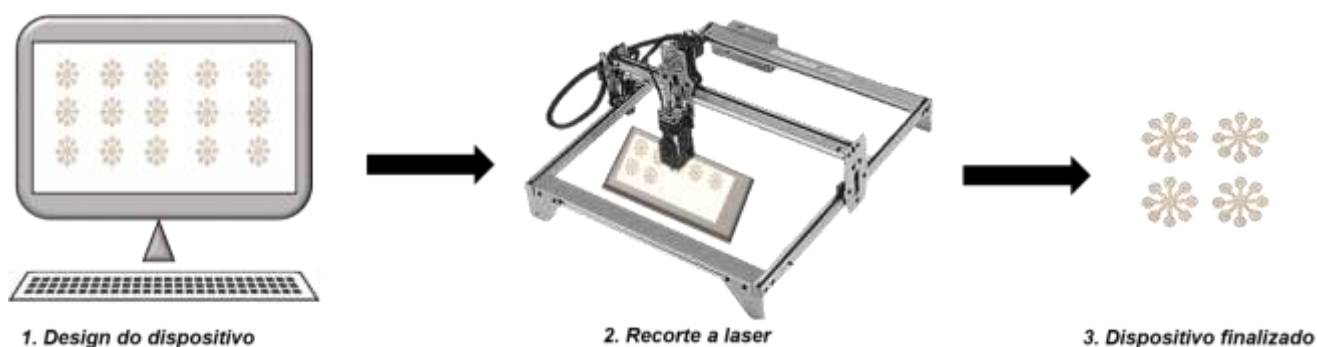


Figura 4. Representação esquemática do processo de fabricação de μ PADs por recorte a laser.

3.2 Construção do dispositivo por impressão com Cera

Para a construção do microdispositivo por impressão com cera foi utilizado o método proposto por, Carrilho et al. (2009). O design foi desenvolvido no programa computacional Corel Draw e consiste em uma sequência de 9 canais (10×2 mm) com espaçamento de aproximadamente 10 mm entre si que são ligados a dois “spots” cada ($\varnothing=7$ mm). Nesse modelo, em um dos spots ocorre a entrada do reagente quimiluminescente e no outro a deposição do analito. A Figura 5, apresenta o design frente e verso do dispositivo.

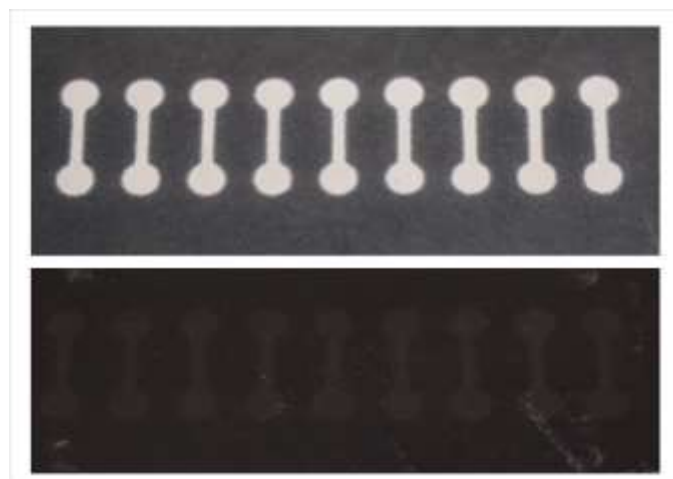


Figura 5. Frente e verso do dispositivo μ PAD.

Nessa metodologia, o dispositivo é impresso em papel cromatográfico (Whatman 1 CHR) pela impressora a cera (Xerox – ColorQube 8580) e, em seguida é levado para uma estufa durante 5 minutos à uma temperatura de 90 °C. A estufa é utilizada para que a cera impressa penetre nos poros do papel, formando barreiras hidrofóbicas e definindo os canais hidrofílicos, de modo que, o fluxo das soluções utilizadas fique delimitado pela cera da impressora (barreira hidrofóbica). Por último, para que não ocorra vazamentos no verso do dispositivo, é necessário o “selamento” dessa região e isso é feito por uma camada de cera impressa do lado oposto a impressão anterior. O processo é demonstrado na Figura 6.

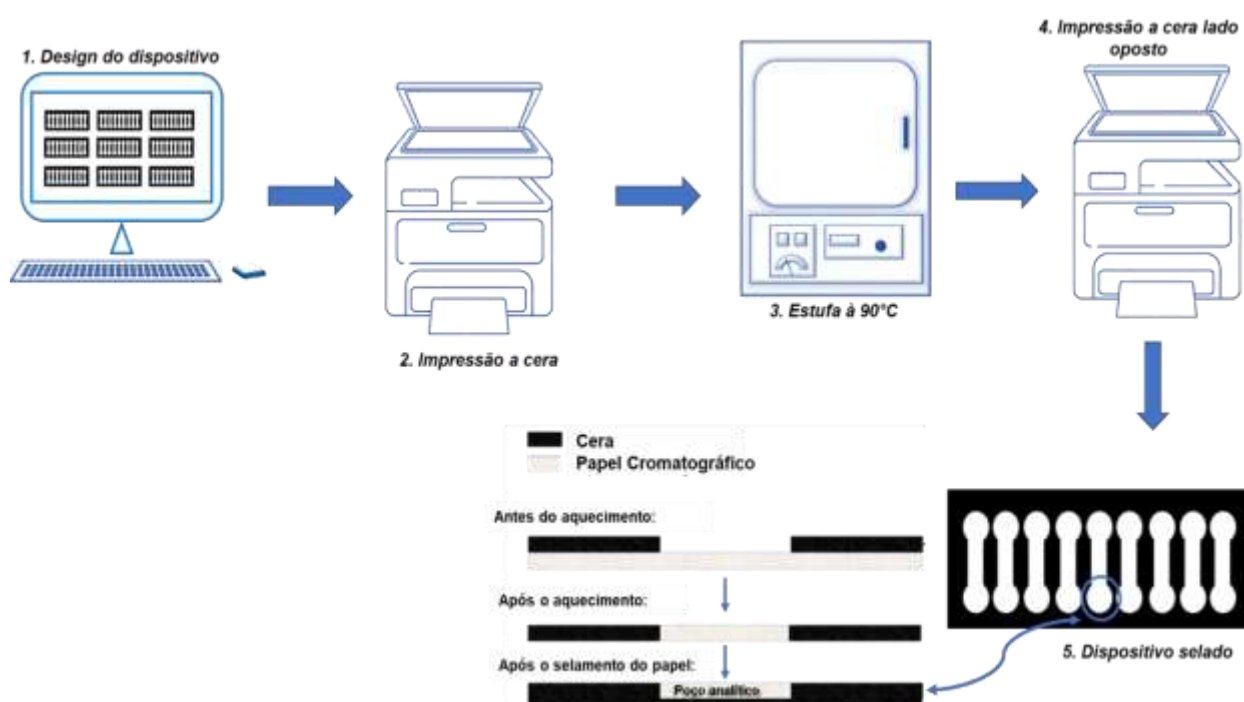


Figura 6. Representação esquemática do processo de fabricação de μ PADs por impressão a cera.

3.3 Aparato de leitura

O aparato, apresentado na Figura 7, foi desenvolvido com o objetivo de eliminar a influência da radiação externa durante as medidas e para permitir o correto alinhamento entre a webcam, utilizada para a detecção por imagens digitais, e o μ PAD. As estruturas foram projetadas a partir do programa gráfico SketchUp e sua fabricação ocorreu com o uso de uma impressora 3D (Cliever Black) e filamento de ácido polilático. A detecção por imagem digital é realizada em tempo real por um webcam comercial (Logitech, 1080p) acoplada ao suporte, que fica localizado no topo do aparato.

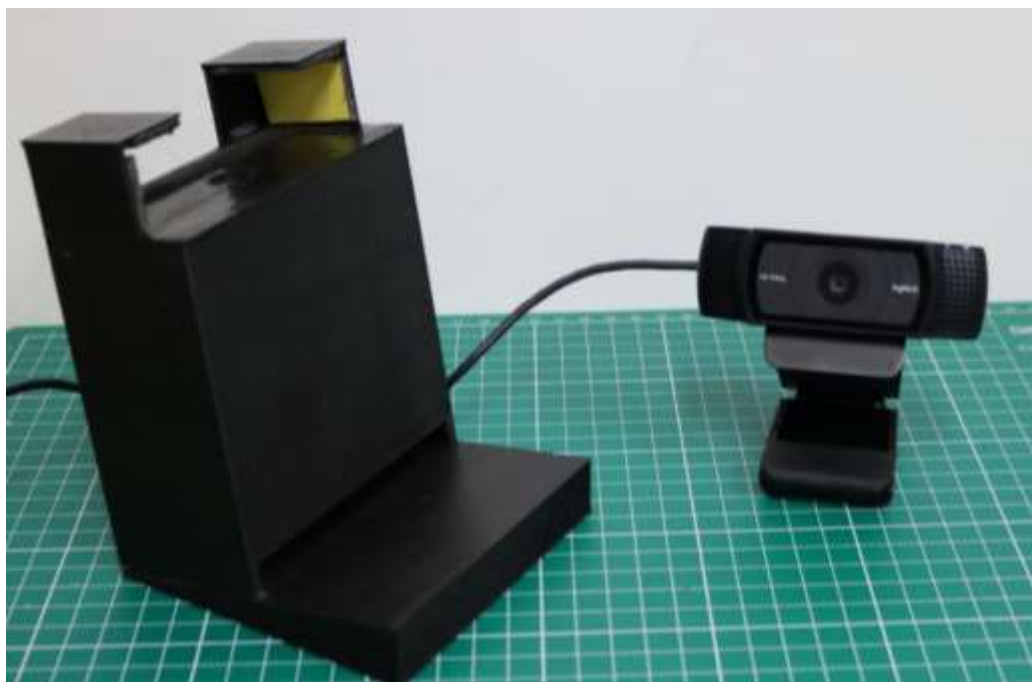


Figura 7. Aparato utilizado.

O método de fabricação citado anteriormente também foi utilizado para confeccionar o suporte para o μ PAD, mostrado na Figura 8. Esse suporte tem como função manter o papel esticado e evitar regiões de contato com o aparato, que possam interferir nas medições. Para garantir um melhor desempenho o dispositivo de papel é preso ao suporte com o auxílio de imãs ($\varnothing= 7$ mm) que foram previamente fixados ao suporte.

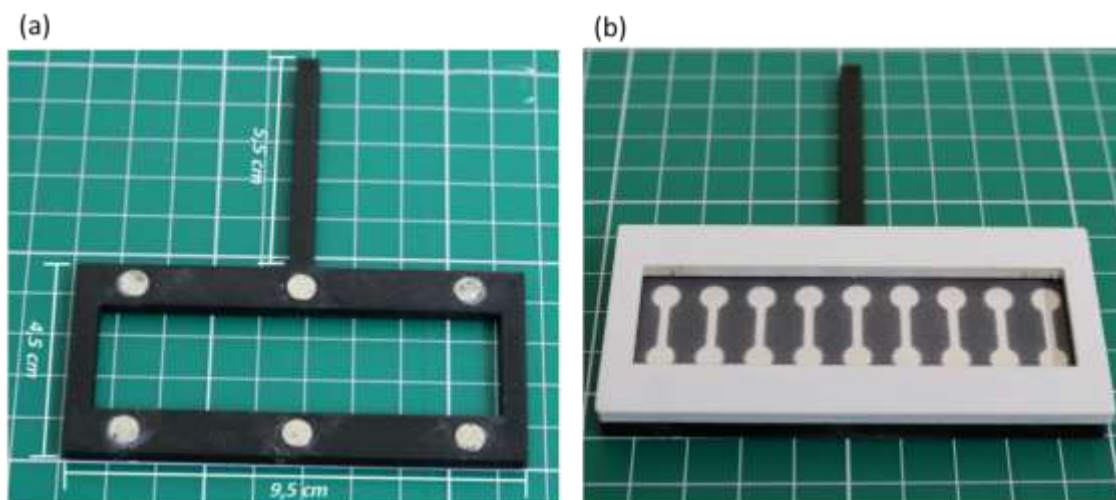


Figura 8. (a) Dimensões do suporte para o μ PAD. (b) Suporte com o μ PAD.

3.4 Programa de computador

Um programa em linguagem *Visual Studio 2013* foi desenvolvido pelo grupo de pesquisas para permitir a aquisição dos sinais emitidos pelo analito através do método de detecção por imagens digitais. Os dados são coletados em tempo real por um webcam (C-920 Logitech), plotados e gravados para posterior análise.

A interface do programa é apresentada na Figura 9, a qual fornece a imagem em tempo real do dispositivo juntamente com 9 amostradores retangulares que permitem a aquisição dos valores de R, G e B para cada um dos spots de forma independente. O programa permite que o usuário determine e altere parâmetros, tais como: posição e tamanho dos amostradores, número de leituras a ser realizado, número de replicatas de medidas e ajuste dos parâmetros de imagem como brilho contraste, exposição, ganho, etc, proporcionando uma melhor adequação ao dispositivo analítico durante a leitura.

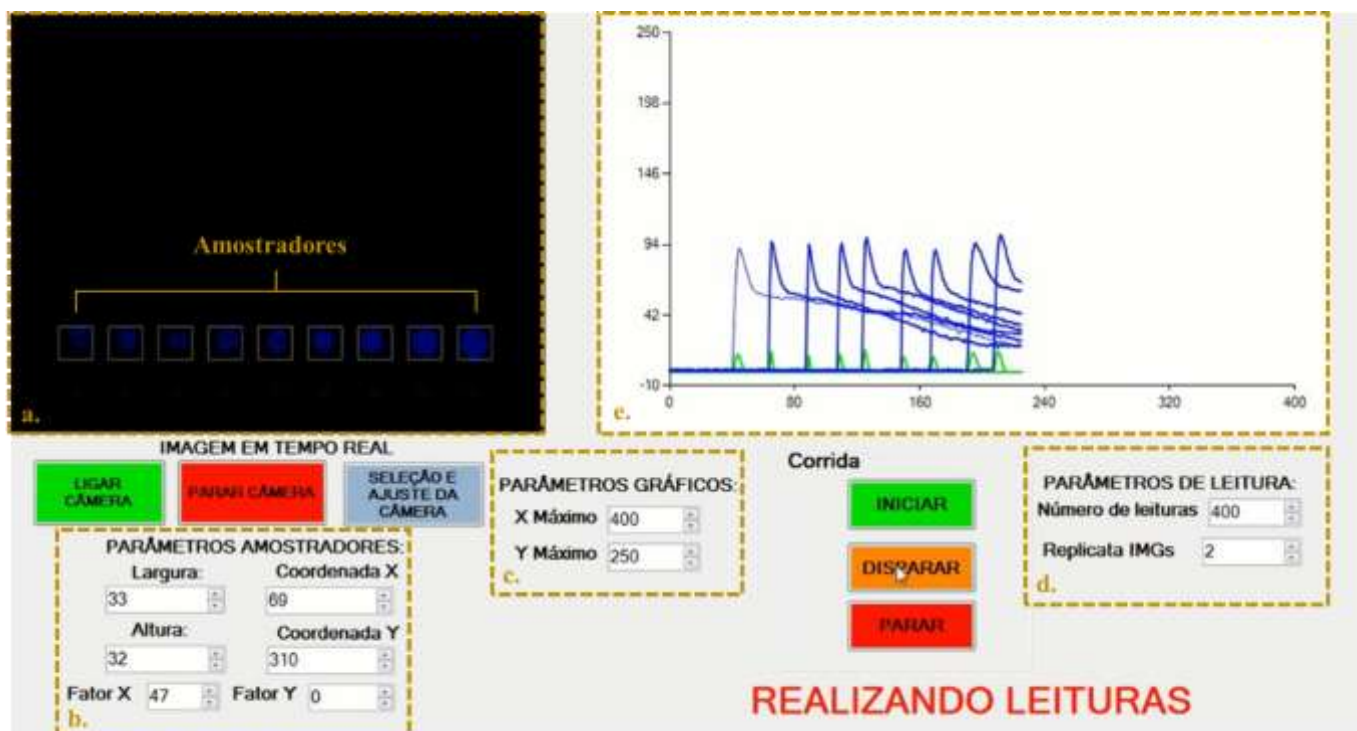


Figura 9. Interface do software utilizado. Onde (a) indica a região em que se obtêm a imagem em tempo real juntamente com os amostradores, (b) indica as configurações dos amostradores que podem ser ajustadas, (c) indica a região de ajuste para os parâmetros gráficos, (d) parâmetros de leitura e por fim, (e) indica a região gráfica onde são plotados os dados resultantes da leitura em tempo real.

3.5 Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água desmineralizada por osmose reversa e reagentes de grau analítico com as concentrações e/ou pureza indicados abaixo:

- Luminol (Aldrich – Pureza >99%)
- Hidróxido de potássio (KOH) (Vetec 98%)
- Triton X 100 (Vetec 98 %)
- Peroxido de Hidrogênio (Dinâmica, 35% m/v)
- Ácido Nítrico (Synth, 65% m/v)
- Solução estoque de Co^{2+} para absorção atômica (Dinâmica, 1000 mg L⁻¹)

Uma solução de Luminol 0,3 % (m/v) foi preparada em meio básico pela dissolução de 0,03 g do reagente em 10 mL de hidróxido de potássio 0,4 mol.L⁻¹. Em seguida, foi adicionado à mistura, 50 µL do surfactante (Triton X 100) e cerca de 70 µL de peróxido de hidrogênio 35% (m/v).

Soluções padrão de Co^{2+} com concentrações entre 0,2 e 1,8 mg L^{-1} foram preparadas pela diluição adequada de alíquotas da solução estoque de cobalto (II) em água.

3.6 Preparo da amostra

O íon cobalto (II) foi extraído da Vitamina B_{12} por um processo de digestão em meio ácido no micro-ondas. Embora seja caracterizado como um processo simples e rápido sua eficácia é fortemente dependente de parâmetros, tais como: o tipo de reagente empregado, suas concentrações e o tempo de exposição no forno micro-ondas. Em seu trabalho, Murillo Pulgarín et al. (2011), investigou todos os parâmetros que influenciam esse processo e a partir dessa investigação desenvolveu um método que permitiu a total liberação do íon cobalto (II) da cianocobalamina.

Empregando o método proposto por Murillo Pulgarín et al. (2001), são adicionados inicialmente 1 mL das soluções concentradas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 35% m/v) e ácido nítrico (HNO_3 , 65% m/v) à cerca de 0,046 mL da solução de vitamina B_{12} (solução injetável comercial). Em seguida, a solução é exposta ao micro-ondas durante 30 segundos para que a digestão ocorra e o íon Co^{2+} seja liberado. A Figura 10, apresenta a mudança de coloração da amostra de vitamina B_{12} durante esse processo, a ausência de cor indica a total digestão do conteúdo orgânico da amostra, ou seja, o processo de extração do íon cobalto (II) foi finalizado.

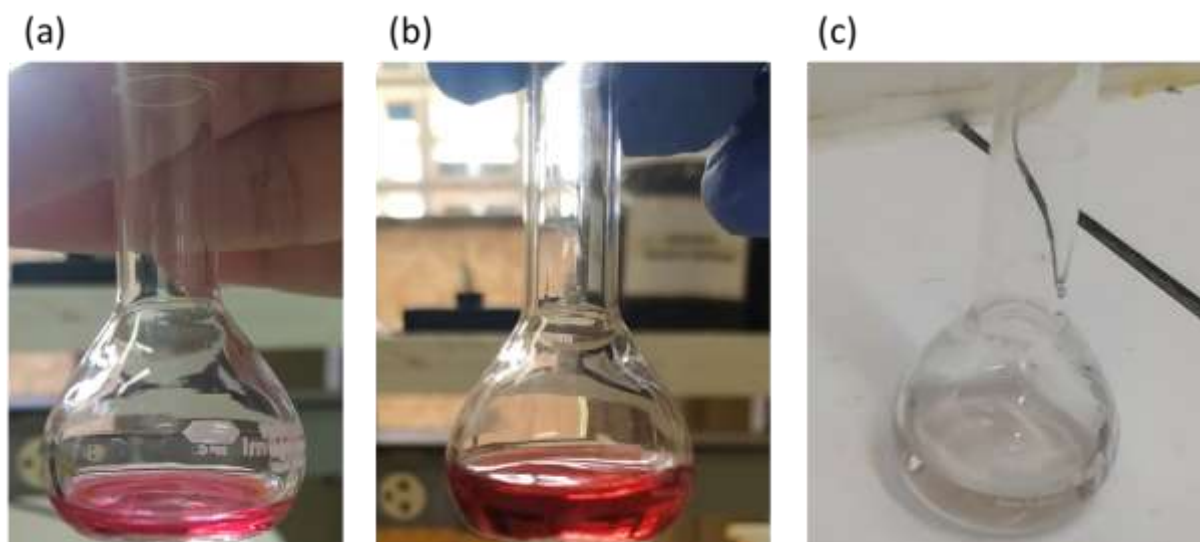


Figura 10. Amostra de vitamina B_{12} (a) antes do processo de acidificação, (b) durante o processo de acidificação e (c) após o processo de digestão no micro-ondas.

3.7 Procedimento para leitura

As soluções das amostras/padrões foram aplicadas aos dispositivos de papel com o auxílio de uma micropipeta, transferindo-se 3,0 μL da solução para cada spot localizado na região superior do papel. Após a aplicação, a secagem das soluções aplicadas foi conduzida com o auxílio de um secador de cabelos e o dispositivo foi, então, fixado ao suporte para as leituras (Figura 11).



Figura 11. Modo de aplicação da solução no papel.

Em seguida, o suporte é devidamente encaixado ao aparato com a webcam (Figura 12) e os parâmetros de imagem são devidamente configurados no software para a realização das leituras. Após a configuração dos parâmetros de imagem os amostradores são posicionados no spot onde foi realizada a deposição do analito para que a coleta de dados possa ser iniciada. Finalizado os ajustes, cerca de 20 μL da solução de luminol é adicionada aos spots que não contém padrão/amostra e, por capilaridade/gravidade atingem o spot na outra extremidade onde a quimiluminescência é monitorada.



Figura 12. Montagem do aparato.

Os estudos de linearidade e precisão do método foram realizados com base na aplicação dos padrões de 0,3 a 1,8 mg.L⁻¹ de Co²⁺. As Curvas de calibração para determinação de vitamina B₁₂ foram construídas com padrões contendo de 0,3 a 1,2 mg.L⁻¹ em cobalto e as amostras digeridas de vitamina B₁₂ foram devidamente diluídas para que a concentração resultante de Co²⁺ não ultrapasse os limites de concentração da curva analítica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Mecanismo de reação

A reação entre um metal de transição, como por exemplo o íon cobalto (II) presente na vitamina B₁₂, e o luminol em meio básico promove a formação da 3-aminodiazóquinona que em seguida, reage com o peróxido de hidrogênio em sua forma iônica gerando o intermediário luminol endoperóxido que se decompõem formando o 3-aminofalato em seu estado excitado, promovendo a emissão de luz (MOREIRA, 2008). O mecanismo dessa reação quimiluminescente do luminol foi descrito por Albertin e colaboradores e é apresentada na Figura 13.

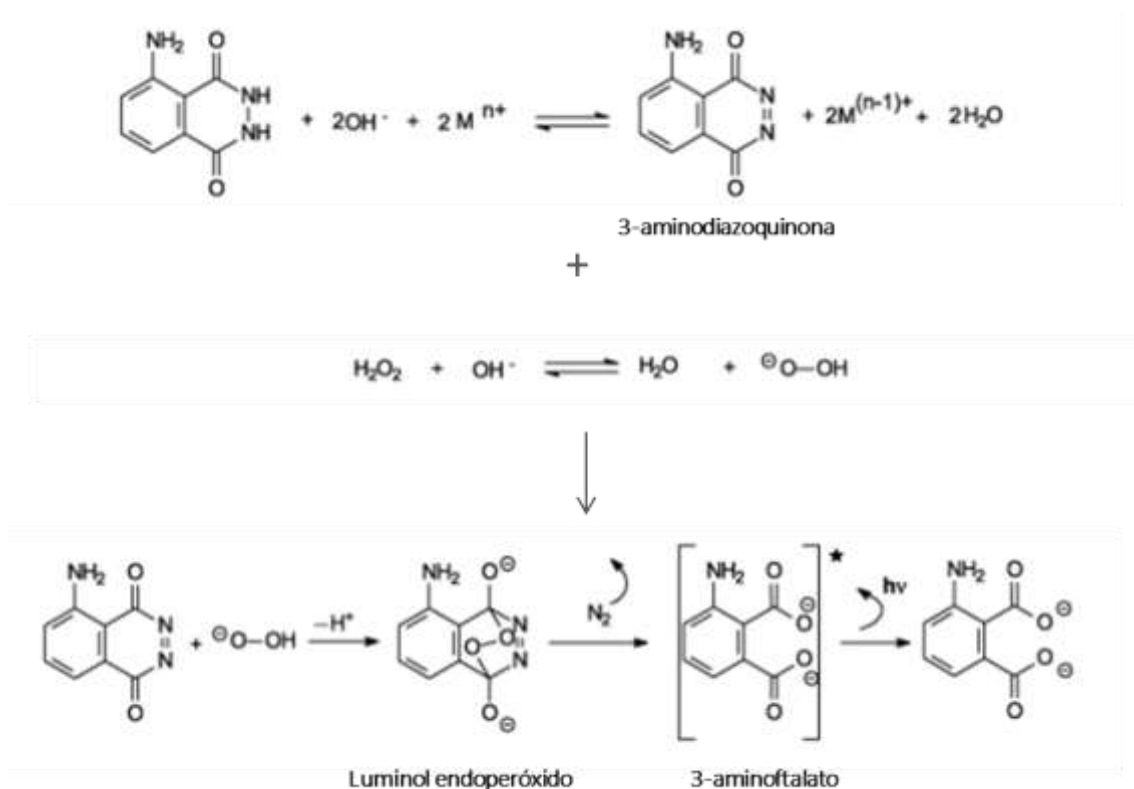


Figura 13. Mecanismo proposto por Albertin e colaboradores para a reação quimiluminescente do luminol Adaptado de: MOREIRA, 2008.

4.2 Resposta para luminescência

Conforme citado anteriormente foram construídos dois microdispositivos de análise baseados em papel. Para a construção do primeiro modelo, utilizou-se a técnica de recorte a laser e para o modelo de canais paralelos utilizou-se a técnica de impressão a cera. A delimitação do fluxo das soluções utilizadas para o primeiro modelo é obtida pelo recorte feito no papel cromatográfico com o uso da cortadora/gravadora a laser (Figura 14 (a)). Já para o segundo modelo esse direcionamento é delimitado pela barreira hidrofóbica (cera da impressora na Figura 14 (b)).

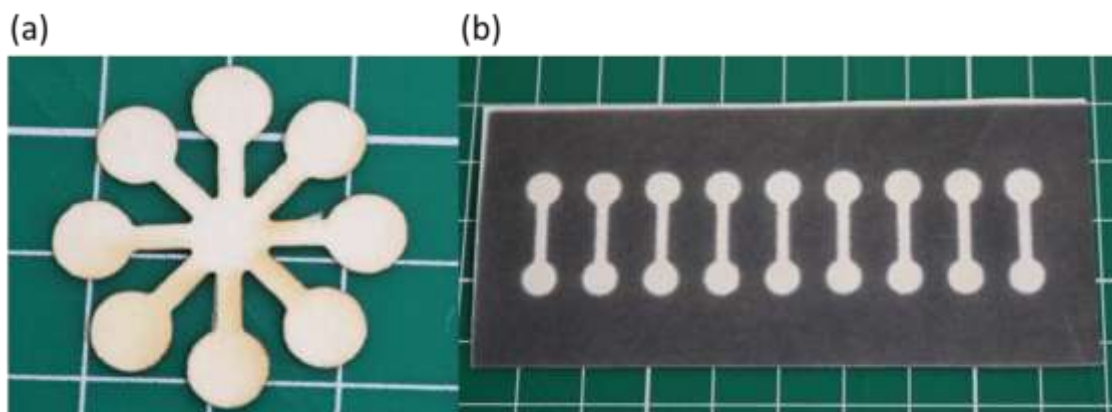


Figura 14. Microdispositivos em papel fabricados (a) modelo com canais adjacentes e (b) modelo com canais paralelos.

Com os dois dispositivos foram realizados testes preliminares para avaliar a possibilidade de uso analítico com base na observação em vídeo da luminescência produzida. Para avaliar a uniformidade e intensidade do sinal luminescente, foram aplicados nos spots de análise uma solução padrão de cobalto (II) com concentração de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

Conforme mostra a Figura 15 (a), o dispositivo recortado com laser não apresentou uma resposta uniforme para todos os spots, uma vez que a solução de luminol aplicada ao spot central não percorre todos os canais com a mesma velocidade de fluxo. Isto provavelmente ocorre devido à aplicação manual da solução de luminol que acaba favorecendo o deslocamento do fluxo para alguns canais em relação aos outros canais. Deve-se destacar também que o mesmo layout “em estrela”

foi utilizado para a fabricação de dispositivos por impressão com cera, sendo obtidos resultados muito semelhantes.

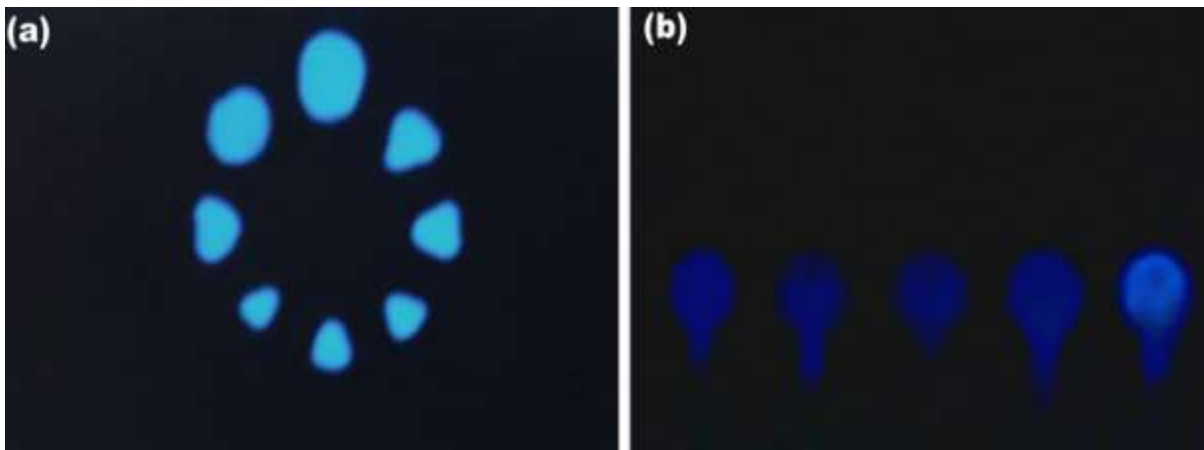


Figura 15. Resposta a intensidade do sinal dos modelos um e dois, respectivamente.

O dispositivo com canais paralelos (Figura 15 (b)), apresentou tanto uma uniformidade maior na emissão luminescente quanto no direcionamento do fluxo da solução de luminol, uma vez que essa solução é aplicada de forma independente para cada canal, sendo este dispositivo escolhido para a continuação dos estudos.

4.3 Desempenho analítico

A Figura 16, apresenta os picos correspondentes a concentração dos padrões utilizados para a construção da curva analítica. Nota-se que a altura dos picos indica o máximo de radiação eletromagnética emitida pelo analito em seu estado excitado e o decaimento indica o retorno ao seu estado fundamental. Como o analito emite radiação eletromagnética no comprimento de onda de 460 nm, na qual corresponde a cor azul no espectro eletromagnético visível, somente a componente B do sistema de leitura RGB é utilizado para análise dos dados obtidos.

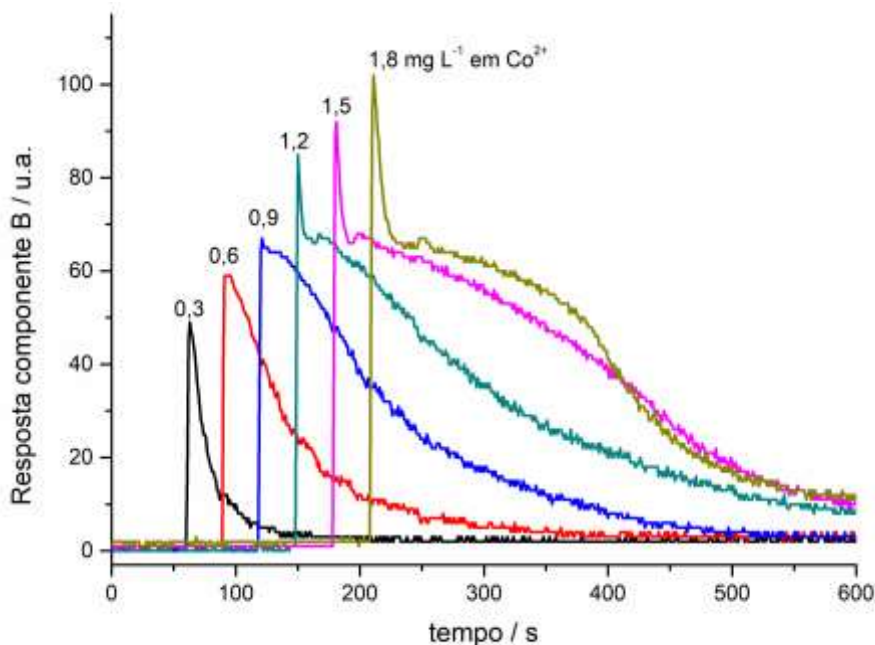


Figura 16. Gráfico de Resposta do componente B (u.a) vs. tempo (s).

A linearidade do método foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de correlação ($R = 0,992$) da curva analítica, indicando uma resposta linear para a faixa de concentração empregada ($0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ a $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$). É importante ressaltar que a curva analítica foi construída com base nas alturas dos picos obtidos por 6 padrões (6 pontos) empregando uma instrumentação simples e com alguns padrões de concentração abaixo de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, o que demonstrou a possibilidade de uso quantitativo da técnica proposta. A Figura 17, apresenta a curva analítica obtida para a determinação do íon cobalto (II).

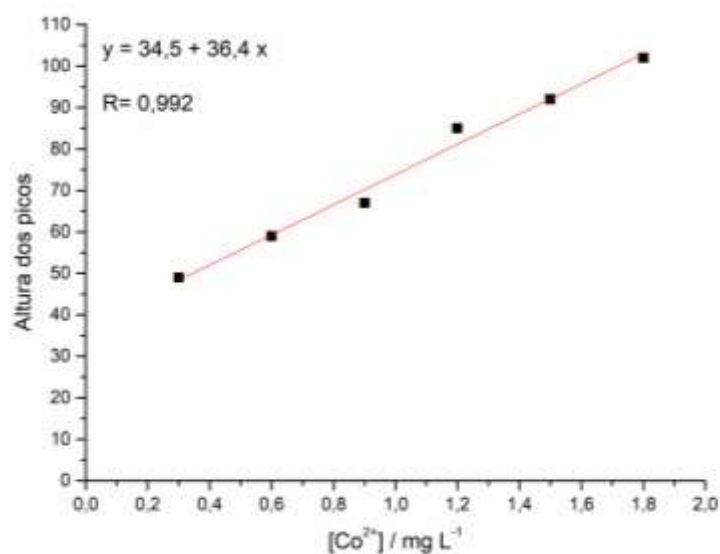


Figura 17. Curva analítica para determinação de íon cobalto (II).

O limite de detecção (LD) foi estimado em $0,051 \text{ mg.L}^{-1}$, cujo valor foi obtido através da multiplicação do desvio padrão para o branco pelo fator numérico 3,3 que é em seguida, dividido pelo valor da inclinação da reta ($b=36,4$). O limite de detecção é o teor mínimo de uma substancia que pode ser detectado e analisado com 95% de confiança.

O limite de quantificação (LQ) obtido foi de $0,153 \text{ mg.L}^{-1}$, o que significa que esse valor é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis.

Para avaliar a precisão do método proposto, realizou-se um ensaio de repetibilidade no qual foram aplicados cerca de $2 \mu\text{L}$ da solução padrão de cobalto (II) com concentração de 1 mg.L^{-1} nos oito spots do microdispositivo em papel (μPAD). Os picos obtidos estão apresentados na Figura 18, sendo que o desvio padrão relativo para as alturas, que determina a dispersão das medidas individuais em relação à média, foi de 5,7%. Esse valor indica que a precisão das medidas é satisfatória para uma determinação quantitativa e que fatores como a aplicação de volumes muito baixos de amostra ($2,0 \mu\text{L}$), uniformidade dos spots fabricados e repetibilidade na adição manual de luminol, contribuem para variações já esperadas.

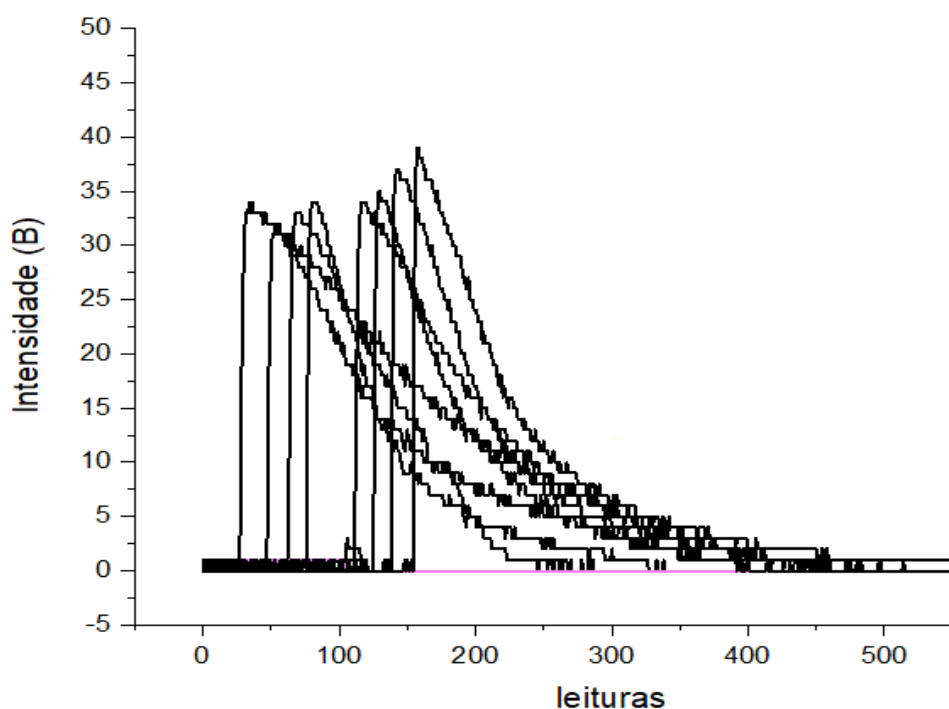


Figura 18. Gráfico de intensidade do sinal (B) vs. Número de Leituras para uma solução padrão de 1 mg/L de cobalto (II).

Para avaliar a exatidão do método, foram analisadas três formulações farmacêuticas comerciais (soluções injetáveis) contendo vitamina B₁₂, sendo que os resultados foram comparados com os valores contidos na bula. Como citado anteriormente, o cobalto compõe a vitamina B₁₂ e para encontrar a proporção do mesmo na amostra basta multiplicar a concentração de B₁₂ apresentada no rótulo pelo fator numérico, $4,35 \cdot 10^{-2}$, esse fator foi obtido através da divisão entre as massas molares do cobalto e da vitamina B₁₂. A Tabela 1 apresenta a concentração de vitamina B₁₂ nas amostras comerciais e as concentrações obtidas pelo instrumento proposto.

Tabela 1. Valores da concentração de vitamina B12 nas amostras comerciais e obtidas pelo instrumento proposto

Amostra	Concentração de vitamina B₁₂ no rótulo (µg.L⁻¹)	Concentração de B₁₂ (µg.L⁻¹) obtida pelo instrumento proposto	Erro relativo (E_r)
Citoneurin®	5000	5178,56 ± 194,68	3,57%
Cronobê®	5000	5020,56 ± 82,37	0,41%
Hipervit®	4000	4135,86 ± 68,93	3,40%

Os valores das concentrações das amostras foram calculados a partir da equação da reta de suas respectivas curvas analíticas, os resultados e o erro relativo são apresentados na Tabela 1. Conforme apresentado, erros relativos menores do que 4 % foram determinados para todas as amostras estudadas e um teste t ao nível de 95 % de confiança indicou não haver diferenças significativas entre os valores determinados pelo método proposto e o rótulo dos medicamentos, demonstrando uma exatidão satisfatória para o mesmo.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Várias propriedades fazem os microdispositivos em papel serem adequados para a realização de ensaios químicos e biológicos dentre elas se destacam a disponibilidade de realizar análises em um curto espaço de tempo utilizando pequenas quantidades de amostras e reagentes. Neste trabalho foi apresentado um método simples e de baixo custo para fabricação de μ PADs utilizando impressão com cera. Esse método utiliza materiais de fácil aquisição e baixo custo que permitem sua fácil reprodutibilidade, sem o emprego de equipamentos sofisticados.

Nas determinações de vitamina B₁₂ em formulações farmacêuticas o dispositivo apresentou um desempenho analítico plenamente adequado, boa portabilidade e um excelente custo benefício, além de se mostrar adequado para análises rápidas. Futuramente, planeja-se avaliar o instrumento com o uso de novos analitos e do mesmo modo, desenvolver um *aplicativo* para o uso em smartphones que possibilitará uma melhora na portabilidade do instrumento, capacitando-o para realizar medidas em campo

6. REFERÊNCIAS

AHMAD, M. et al. Live cell imaging of vitamin B12 dynamics by genetically encoded fluorescent nanosensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 257, p. 866–874, 2018.

ANDINI et al. Printed low-cost microfluidic paper-based analytical devices for quantitative detection of vitamin c in fruits. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 546, n. 3, 2019.

BALLESTEROS, J. I., CALEJA-BALLESTEROS, H. J. R., & VILLENA, M. C. Digital image-based method for iron detection using green tea (*Camellia sinensis*) extract as natural colorimetric reagent. **Microchemical Journal**, v. 160, n. PA, p. 105652, 2021.

BRACHER, P. J.; GUPTA, M.; WHITESIDES, G. M. Patterning precipitates of reactions in paper. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 24, p. 5117–5122, 2010.

CARRELL, C. et al. Beyond the lateral flow assay: A review of paper-based microfluidics. **Microelectronic Engineering**, v. 206, n. November 2018, p. 45–54, 2019.

CARRILHO, E. et al. Paper microzone plates. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 5990–5998, 2009.

CATE, D. M. et al. Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. 2015.

CHEN, Y. et al. Paper-based chemiluminescence immunodevice for the carcinoembryonic antigen by employing multi-enzyme carbon nanosphere signal enhancement. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 3, 2018.

CHOODUM, A. et al. Real time quantitative colourimetric test for methamphetamine detection using digital and mobile phone technology. **Forensic Science International**, v. 235, p. 8–13, 2014.

COSTA, E. T. DA. Processo de fabricação de mini e microdispositivos fluidicos por ablação a laser de dióxido de carbono. p. 114, 2009.

DORNELAS, K. L. Fabricação de dispositivos microfluídicos a base de papel utilizando materiais de baixo custo. **Universidade Federal do Triângulo Mineiro**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

DUNGCHAI, WIJITAR; CHAILAPAKUL, ORAWON; HENRY, C. S. Electrochemical detection for paper-based microfluidics. **Talanta**, v. 10, n. 3, p. 224–230, 2019.

GERSON F. SILVA NETO; ALEXANDRE FONSECA; JEZ W. B. BRAGA. Classificação de águas minerais baseada em imagens digitais obtidas por smartphones. **Química Nova**, v. 39, p. 876–881, 2016.

JING, X. et al. Digital image colorimetry detection of carbaryl in food samples based on liquid phase microextraction coupled with a microfluidic thread-based analytical device. **Food Chemistry**, v. 337, n. July 2020, p. 127971, 2021.

KUMAR, S. S.; CHOUHAN, R. S.; THAKUR, M. S. Enhancement of chemiluminescence for vitamin B12 analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 388, n. 2, p. 312–316, 2009.

KUMAR, S. S.; CHOUHAN, R. S.; THAKUR, M. S. Trends in analysis of vitamin B12. **Analytical Biochemistry**, v. 398, n. 2, p. 139–149, 2010.

LI, X.; BALLERINI, D. R.; SHEN, W. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. **Biomicrofluidics**, v. 6, n. 1, 2012.

LIU, W. et al. A paper-based chemiluminescence device for the determination of ofloxacin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 1298–1303, 2015.

MARIA CERRATO-ALVAREZ, SAMUEL FRUTOS-PUERTO, PATRICIA ARROYO, C. M.-; RODRÍGUEZ, E. P.-G. A portable , low-cost , smartphone assisted methodology for on-site measurement of NO₂ levels in ambient air by selective chemical reactivity and digital image analysis. v. 338, n. March, p. 1–9, 2021.

MARTINEZ, A. 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, 2007.

MOREIRA, P. N. T. Planejamento e Otimização de um Método Quimiluminescente para Determinação de Vitamina B12 Usando um Sistema Fluxo-Batelada. 2009.

MURILLO PULGARÍN, J. A.; GARCÍA BERMEJO, L. F.; SÁNCHEZ GARCÍA, M. N. Chemiluminescent Determination of Vitamin B 12 Using Charge Coupled Device (CCD). **Analytical Letters**, v. 44, n. 16, p. 2593–2605, 2011.

NETO, G. F. DA S. Avaliação do uso de imagens digitais para determinações quantitativas em eletroforese em gel. (Mestrado). **Sustainability (Switzerland)**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2019.

OKBAMICHAEL, M.; SAÑUDO-WILHELMY, S. A. A new method for the determination of Vitamin B 12 in seawater. v. 517, n. May, p. 33–38, 2004.

OLIVEIRA, M. DE et al. A color reaction for the determination of Cu 2 þ in distilled beverages employing digital imaging. **Analytica Chimica Acta**, v. 1177, p. 338844, 2021.

POORNIMA, V. et al. Chemical Digital image based simple scanometric device for the express detection of aqueous contamination of Hg 2 +. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 274, n. August, p. 472–480, 2018.

ROCHA, J. C. Cor luz, cor pigmento e os sistemas RGB e CMY. **Revista Belas Artes**, v. 3, n. 2, p. 107–128, 2010.

RODA, A. et al. Progress in chemical luminescence-based biosensors: A critical review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 164–179, 2016.

SONG, Z.; HOU, S. Sub-picogram determination of Vitamin B12 in pharmaceuticals and human serum using flow injection with chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 488, n. 1, p. 71–79, 2003.

TERRY, S. C., JERMAN, J. H., & ANGELL, J. B. A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated. n. 12, p. 1880–1886, 1979.

TONG, X. et al. Research progress on the applications of paper chips. **RSC Advances**, v. 11, n. 15, p. 8793–8820, 2021.

UJIIE, K. et al. Paper-based luminescence bioassay method embedding a

sequence of enzymatic reactions to detect sulfonamide groups. *Journal of Antibiotics*, Tokyo, v. 71, n. 12, p. 1044-1047, 12 2018.

WEI, H. et al. Chemical Detection using a quantum dots / porous silicon optical biosensor based on digital fluorescence images. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 315, n. April, p. 128108, 2020.

WEST, P. W. A Selective Spot Test for Copper. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 740–741, 1945.