

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**Desenvolvimento de Microdispositivo Analítico Baseado em Papel (μ PAD)
para a Detecção e Quantificação Colorimétrica de L-Tirosina**

ELVIS MAX XAVIER DE LIMA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970 - Maceió - AL

Desenvolvimento de Dispositivo Analítico Baseado em Papel (μ PAD) para a
Detecção e Quantificação Colorimétrica de L-Tirosina

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito para obtenção do grau de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos

**Catálogo na Fonte Universidade
Federal de Alagoas Biblioteca
Central Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

L732d Lima, Elvis Max Xavier de.
Desenvolvimento de microdispositivo analítico baseado em papel
(μ PAD) para a detecção e quantificação calorimétrica de L-tirosina / Elvis
Max Xavier de Lima. – 2021.
51 f. : il color.

Orientador: Diógenes Menezes dos Santos.
Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 49-51.

1. Calorimetria. 2. μ PAD. 3. L-Tirosina. 4. Suplementos
nutricionais. I. Título.

CDU: 606:547.587.4

Dedico este trabalho aos meus pais por serem exemplos de vida. Por todo amor e carinho passados para mim e por todo o incentivo nesse caminho que eu resolvi trilhar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por me proporcionar sabedoria, foco, fé, proteção e determinação para vencer os obstáculos da vida e assim conseguir realizar aos poucos um dos sonhos da minha vida.

À minha FAMÍLIA, por todo apoio, compreensão nas escolhas da vida e ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Ernande Bonifacio de Lima e Maria Neide Xavier de Lima, por toda educação ensinada, pelo apoio, dedicação, carinho e amor. Enfim, por serem exemplos de pessoas humildes, nos quais me espelho a cada dia, meu muito obrigado. Te amo pai e mãe.

Aos meus amigos e parceiros na Exile, Everaldo, Artur, Fernando, Sara, Alan, Palmeira, Kristhofee, Kristian, Yuri, Rodson e João Victor. Meu muito obrigado!

À todos os meus amigos de graduação e de mestrado que me agradeceram com diversas discussões extremamente importantes para a minha formação. Em especial ao meu amigo Ivis de Melo Agra por todo apoio. Obrigado amigos!

Ao meu amigo Nicholas por toda ajuda nos obstáculos acadêmicos e fora da academia

À professora Fabiane Caxico e ao professor Diógenes Meneses, por assumirem esse trabalho com muita dedicação, por compartilharem suas experiências e seus conhecimentos, pela paciência e compreensão. Para além das inspirações acadêmicas, me chamam atenção pela forma humana e sensível que trabalham em um ambiente que costuma ser tão robótico. humanos que são. Muito obrigado!

A todos os meus amigos de curso e do laboratório (LEMAN) que de alguma forma me ajudaram no processo de formação. Especialmente nas pessoas de Leyllanne, Angladis, Allysson, Sara, Samaysa e Guimarães.

A todos os meus amigos do GEM por me acolherem e por compartilharem seus conhecimentos e experiências no período que estive com eles. Ao professor Alberto Fracassi pela oportunidade e pela inspiração. Meu muito obrigado!

“Chorar por uma pessoa que está morta não é tão triste quanto chorar por uma pessoa que ainda vive, mas que a perdemos para sempre.”

Senhor dos Anéis

RESUMO

A L-Tirosina é um aminoácido essencial, precursor para a formação de neurotransmissores como a dopamina e a norepinefrina. Sua ingestão é essencial para a manutenção desses neurotransmissores e até mesmo para a diminuição da fadiga muscular e estresse, por isso várias empresas vêm desenvolvendo suplementos alimentares para auxiliar na dieta de L-Tirosina. Atualmente o controle de qualidade desse tipo de suplemento é feito através de técnicas robustas como HPLC e isso acaba tornando o processo de análise mais caro e que necessita de mão de obra especializada. Pensando em tornar esse processo mais barato e de fácil execução, esse trabalho busca o desenvolvimento de um dispositivo microfluídico baseado em papel (μ PAD) de baixo custo que consiga realizar a determinação de L-Tirosina em amostras de suplementos alimentares. Os μ PADs foram acoplados a detecção colorimétrica. Foi observado que o sistema se comporta melhor em $\text{pH} = 10$. Dos três tipos de layout abordados nesse trabalho o que se sobressaiu foi o que apresentava zonas de detecção circulares e barreiras hidrofóbicas de 2 mm de espessura ao redor delas. Também foi estudado nesse trabalho a influência dos canais de cor das escalas RGB e CYMK e observou-se que para o método proposto neste trabalho o canal azul foi o que teve o melhor resultado. Na avaliação da linearidade, os valores do canal azul tiveram correlação superior a 0,996. O limite de detecção determinado foi $2,79 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para L-Tirosina, com faixa linear de $12 - 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Palavras-Chaves: Colorimetria; μ PAD; L-Tirosina; Suplementos alimentares;

ABSTRACT

L-Tyrosine is an essential amino acid, a precursor for the formation of neurotransmitters such as dopamine and norepinephrine. Its intake is essential for the maintenance of these neurotransmitters and reduction of muscle fatigue and stress. So, several companies have been developing food supplements to assist in the L-Tyrosine diet. Currently, the quality control of this type of supplement is done through robust techniques such as HPLC and this ends up making the analysis process more expensive and requiring specialized labor. To achieve this process cheaper and easier to perform, this work aims the development of a low-cost paper-based microfluidic device (μ PAD) that can perform the determination of L-Tyrosine in samples of dietary supplements. The μ PADs were coupled to fluorescence and colorimetric detection. It was observed that the system has better analytical signal at pH = 10. Among the three types of layout covered in this work, the one with circular detection zones and 2 mm thick hydrophobic barriers around them obtained the best response. The influence of the color channels of the RGB and CYMK scales was also studied in this work, and it was observed that for the method proposed in this work, the blue channel had the best result. In the evaluation of linearity, the values of the blue channel had a correlation greater than 0.996. The detection limit determined was $2.79 \mu\text{mol.L}^{-1}$ and the quantification limit was $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ for L-Tyrosine, with a linear range of $12 - 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Keywords: Colorimetry; μ PAD; L-Tyrosine; Food supplements;

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Estrutura química da L-tirosina. | 13 |
| Figura 2 - Ilustração do primeiro dispositivo analítico miniaturizado. | 15 |
| Figura 3 - Dispositivo de micro análise total tridimensional (μ TAS 3D)..... | 16 |
| Figura 4 - Dispositivos de Martinez para determinação de proteínas e glicose (μ PAD). | 17 |
| Figura 5 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do: (a) papel original; (b) papel modificado com amina; e (c) papel modificado com metacrilato..... | 18 |
| Figura 6 - Imagens óticas dos dispositivos com as respostas colorimétricas para lactato (a e b), glicose (c e d) e glutamato (e e f) com e sem SiO ₂ NP..... | 19 |
| Figura 7 - μ PAD de Noor e Krull com detecção por fluorescência com aquisição de imagem via smartfone. | 21 |
| Figura 8 - Estrutura química da sonda NBD-Cl. | 22 |
| Figura 9 - A via de reação de L-Tirosina com NBD-Cl. | 22 |
| Figura 10 - Esquema do processo de fabricação dos dispositivos de papel. | 25 |
| Figura 11 - Layout dos μ PADs utilizados nesse trabalho. a) Possui zonas de detecção de 4 mm de diâmetro e uma barreira hidrofóbica de 2 mm de espessura (dispositivo 01); b) Possui zonas de detecção de 4 mm, porém as zonas hidrofóbicas são de formato retangular ao | 26 |
| Figura 12 - Interface do software Adobe Photoshop 2020 e sua ferramenta de hitograma | 27 |
| Figura 13 - Espectro de emissão do produto formado (pH = 10, tampão fosfato 0,2M). | 31 |
| Figura 14 - Curva analítica referente ao espectro de emissão do produto formado. . | 32 |
| Figura 15 - Curva que correlaciona concentração de L-tirosina e IPC na Colorimetria, para a escala CYMK. 80°C, 15 min, 0,2 M tampão fosfato, pH 10..... | 33 |
| Figura 16 - Comparação entre as escalas de cor CYMK e RGB. a) Curva que correlaciona concentração de L-tirosina e IPC na colorimétrica para a escala de cor CMYK e b) RGB. (80°C, 15 min, 0,2 M tampão fosfato, pH 10)..... | 33 |
| Figura 17 - Curva que correlaciona concentração de L-tirosina e IPC na fluorescência, 80°C, 15 min, 0,2 M tampão fosfato, pH 10. | 35 |
| Figura 18 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina para os a canais: a) RGB; b) R; c) G; d) B; (pH = 10, 25 °C, florescência). | 37 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 19 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina para o estudo de pH para o canal azul. (Colorimetria, Tampão Britton-Robinson, 0,04M, 25°C) | 38 |
| Figura 20 -Imagem do dispositivo 03 pelo método colorimétrico..... | 39 |
| Figura 21 - Imagem do dispositivo 01 pelo método colorimétrico..... | 39 |
| Figura 22 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina para os dispositivos 01, 02 e 03 (pH 12, Tampão Britton-Robinson, 0,04M, 25°C)..... | 40 |
| Figura 23 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina dos uPADs (colorimétrica). a) dispositivo 01; b) dispositivo 02; c) dispositivo 03; (pH 10, Tampão Britton-Robinson 0,2 mol.L-1, 25°C)..... | 40 |
| Figura 24 - Fotografia do μ PAD utilizando papel sulfite como substrato. | 41 |
| Figura 25 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina para as concentrações de 5; 10; 20 mmol.L-1 de NBD-Cl (pH 12, Tampão fosfato, 0,2M, 25°C). | 42 |
| Figura 26 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina para os volumes dos reagentes de 0,5 e 1,0 μ L (pH 12, Tampão fosfato, 0,2M, 25°C). | 43 |
| Figura 27 - Gráfico da média de IP para o estudo de interferentes (pH 12, Tampão fosfato, 0,2M, 25°C). | 44 |
| Figura 28 - Curva analítica para L-Tirosina com os parâmetros otimizados (pH 10, Tampão fosfato, 0,2M, 25°C). | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Concentração das soluções de L-Tirosina | 28 |
| Tabela 2 - Comparação entre os coeficientes de correlação de Pearson e inclinação da reta para os canais de cor da escala CYMK. | 34 |
| Tabela 3 - Comparação entre os coeficientes de correlação de Pearson e inclinação da reta para os canais de cor da escala RGB. | 34 |
| Tabela 4 - Valores de IP (triplicata) e concentração de L-tirosina para os estudos do método por fluorescência. | 35 |
| Tabela 5 - Comparação entre os coeficientes de correlação de Pearson e inclinação da reta para as concentrações de 5; 10; 20 mmol.L-1 de NBD-Cl. | 42 |
| Tabela 6 - Comparação entre os coeficientes de correlação de Pearson e inclinação da reta para os volumes de reagentes 0,5 e 1,0 µL. | 43 |
| Tabela 7 - Valores referentes ao ensaio de recuperação de L-tirosina. | 45 |
| Tabela 8 Informações sobre trabalhos que visam a determinação de L-tirosina..... | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|-----------------------------------------------|
| L-Tyr | L-Tirosina |
| DA | Dopamina |
| NE | Norepinefrina |
| HPLC | cromatografia líquida de alto desempenho |
| LC- MS | cromatografia líquida-espectrometria de massa |
| LOC | <i>Lab-on-Chip</i> |
| μTAS | Microssistema de análise total |
| μTAS 3D | Microssistema de análise total tridimensional |
| CYMK | <i>Cyan, Magenta, Yellow e Black</i> |
| RGB | <i>Red, Green e Blue</i> |
| NBD-CL | <i>4-Chloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole</i> |
| IP | Intensidade de média pixel |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|-------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | L-Tirosina | 13 |
| 1.2 | Miniaturização de sistemas analíticos | 14 |
| 1.3 | Sistemas Microfluídicos..... | 16 |
| 1.4 | Dispositivos analíticos baseados em papel | 17 |
| 1.4.1 | Métodos de detecção | 18 |
| 1.4.1.1 | Detecção colorimétrica | 18 |
| 1.4.1.2 | Detecção por fluorescência | 20 |
| 2 | Objetivos | 23 |
| 2.1 | Objetivo geral | 23 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 23 |
| 3 | METODOLOGIA | 24 |
| 3.1 | Estudo preliminar | 24 |
| 3.2 | Fabricação dos μ PADs..... | 25 |
| 3.3 | Funcionamento do dispositivo | 26 |
| 3.4 | Aquisição das imagens e tratamento:..... | 26 |
| 3.4.1 | Colorimetria. | 26 |
| 3.4.2 | Florescência..... | 26 |
| 3.5 | Tratamento dos dados..... | 27 |
| 3.6 | Ensaio de determinação de L-Tirosina | 27 |
| 3.7 | Estudo de pH..... | 28 |
| 3.8 | Avaliação dos Canais de cor | 29 |
| 3.9 | Avaliação da concentração de NBD-Cl | 29 |
| 3.10 | Avaliação do volume de reagentes | 29 |
| 3.11 | Tempo de reação | 29 |
| 3.12 | Estudo de interferentes | 30 |

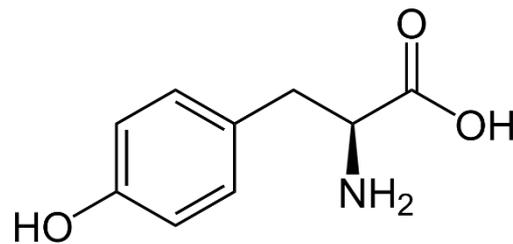
| | | |
|------|----------------------------------------------------------------|----|
| 3.13 | Limite de detecção e limite de quantificação..... | 30 |
| 3.14 | Ensaio de Recuperação..... | 30 |
| 4 | Resultados e discussão..... | 31 |
| 4.1 | ESTUDO PRELIMINAR..... | 31 |
| 4.2 | Escolha da escala de cor e método de detecção..... | 32 |
| 4.3 | Detecção por Fluorescência..... | 34 |
| 4.4 | Avaliação do pH do meio..... | 37 |
| 4.5 | Avaliação do layout dos dispositivos..... | 38 |
| 4.6 | Avaliação do papel sulfite na fabricação dos dispositivos..... | 41 |
| 4.7 | Avaliação da concentração de NBD-Cl..... | 42 |
| 4.8 | Volume dos reagentes adicionados no dispositivo..... | 43 |
| 4.9 | Limite de detecção e limite de quantificação..... | 44 |
| 4.10 | Ensaio de recuperação..... | 45 |
| 5 | Conclusão..... | 48 |
| 6 | Referências..... | 49 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 L-Tirosina

A L-tirosina (L-Tyr) é um aminoácido essencial do grupo dos aromáticos (Figura 1), normalmente presente em alimentos proteicos, soja, ovos, leite e banana e frutos do mar (ZHU et al., 2019). Participa na construção de proteínas essenciais e no fornecimento de energia (LI et al., 2020). A L-Tirosina é um precursor de compostos valiosos nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, químicas e cosméticas. Pode ser produzida por três métodos: síntese enzimática por tirosina fenol liase (PARA; LUCCIARDI; BARATTI, 1985), fermentação usando cepas microbianas de alto desempenho (GOSSET, 2009), e a extração de proteínas hidrolisadas (LEUCHTENBERGER; HUTHMACHER; DRAUZ, 2005).

Figura 1 - Estrutura química da L-tirosina.



Fonte: (autor, 2021)

Níveis elevados de L-Tirosina têm sido relacionados à doença da tirosinemia, que é uma doença autossômica recessiva rara do metabolismo da própria L-Tirosina e que pode causar danos irreversíveis, principalmente no caso de recém-nascidos, como insuficiência hepática, crises neurológicas dolorosas, raquitismo, danos neurológicos e hepatocarcinoma (Scott, 2006).

A L-tirosina também é precursora de neurotransmissores catecolamínicos como a dopamina (DA) e neuroepinefrina (NE) e ajuda as pessoas a responderem com eficácia ao estresse agudo e manter a homeostase (LI et al., 2020). Esses neurotransmissores suportam diversas funções cognitivas indispensáveis atuando no sistema nervoso central (SNC) e periférico. No SNC, a dopamina opera como um neurotransmissor e sinaliza através de várias vias distintas para regular a locomoção, cognição, emoção e secreção neuroendócrina (BELKACEMI; DARMANI, 2020). A suplementação de tirosina pode aumentar a síntese de ambas as catecolaminas (DA

e NE) (LI et al., 2020). Surgem então no mercado diversos suplementos a fim de suprir essa necessidade de ingestão de L-Tirosina. Portanto, é muito importante desenvolver um método rápido e simples para a determinação de L-Tirosina no controle da qualidade desses suplementos que usem L-Tirosina.

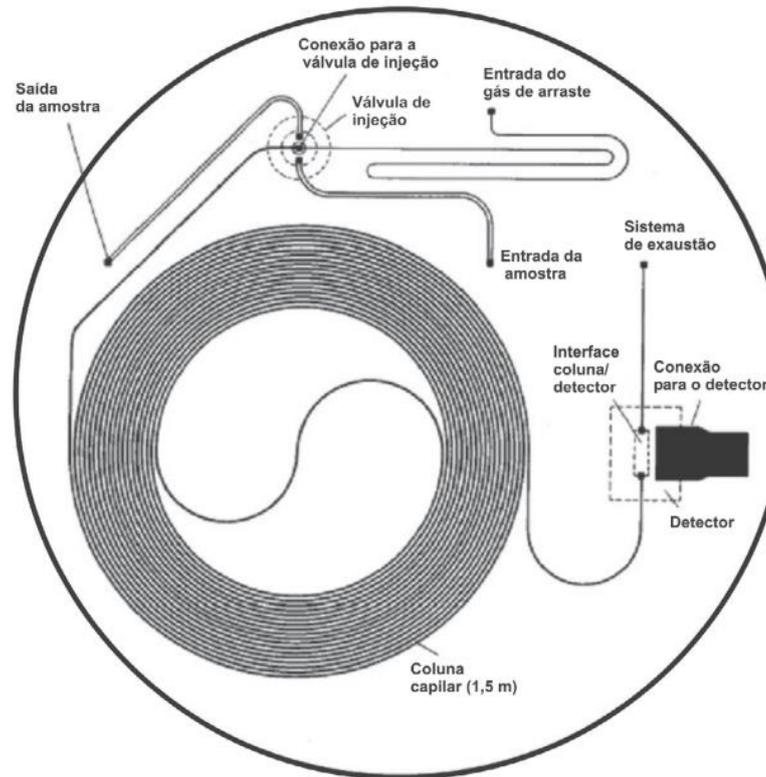
No momento, vários métodos têm sido usados para a determinação de L-Tirosina incluindo espectrofotometria (HASANI; MOLOUDI; EMAMI, 2007), cromatografia de troca iônica (ALLARD et al., 2004), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (SA et al., 2012), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC- MS) (CHAKI et al., 2018), eletroforese capilar (BAYLE et al., 2003) e espectroscopia de fluorescência (LI et al., 2016). No entanto, esses métodos são caros e complicados de se operar, por isso, esse trabalho propõe uma forma alternativa para realização de análises para a determinação de L-Tirosina.

1.2 Miniaturização de sistemas analíticos

Como é possível ser observado na maioria das tecnologias atuais, a miniaturização é um fenômeno que traz consigo certas características muito valorosas. Computadores que antes ocupavam salas inteiras, hoje passam a ser pequenos objetos de bolso, se tornando mais cômodos e práticos (COLTRO et al., 2007). Em relação aos sistemas analíticos esse fenômeno foi abordado por Manz et al. onde eles lançam a proposta de construir dispositivos, de tamanho reduzido, que pudessem realizar várias etapas analíticas, a qual chamaram de μ TAS micro sistemas de análise total (do inglês *micro-total analysis systems*) – e que na década de 90 também passaram a ser conhecidos como *Lab-on-Chip* (LOC) (MANZ; GRABER; WIDMER, 1990).

Um dos primeiros dispositivos analíticos miniaturizados, proposto por Terry et al., na década de 80, era um sistema de cromatografia gasosa confeccionado em uma lâmina de silício com cerca de 5 cm de diâmetro, contendo uma válvula de injeção, uma coluna de separação de 1,5 metros de comprimento e um detector de condutividade térmica como mostra a Figura 2 (TERRY; HERMAN; ANGELL, 1979) trazendo uma amostra do que poderia ser feito usando essa perspectiva.

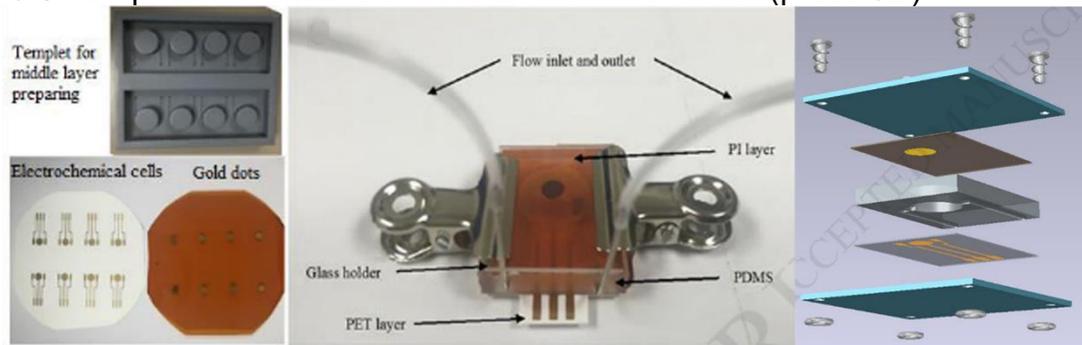
Figura 2 - Ilustração do primeiro dispositivo analítico miniaturizado.



Fonte: (COLTRO et al., 2007)

Com a redução das dimensões dos sistemas analíticos e o desenvolvimento de dispositivos com o conceito de μ TAS é possível agregar à eles vantagens que tornam esses dispositivos tão atrativos, como a minimização do volume de reagentes e até mesmo da amostra, uma menor geração de resíduos, tornar possível sua portabilidade e, em muitas situações, um barateamento no custo final da análise (ARORA et al., 2010; NEUŽIL et al., 2014; XIE et al., 2019). A perspectiva de utilização desses dispositivos visando essas vantagens e outras como fácil manuseio, materiais simples utilizados na fabricação são motivações para a realização de trabalhos como o de Ilkhani et al. onde eles propõem um microsistema de análise total tridimensional (μ TAS 3D) para a detecção de *Cryptosporidium*, um patógeno mortal de veiculação hídrica. A Figura 3 ilustra esse dispositivo (ILKHANI; ZHANG; ZHOU, 2019).

Figura 3 - Dispositivo de micro análise total tridimensional (μ TAS 3D)



Fonte: (ILKHANI; ZHANG; ZHOU, 2019)

1.3 Sistemas Microfluídicos

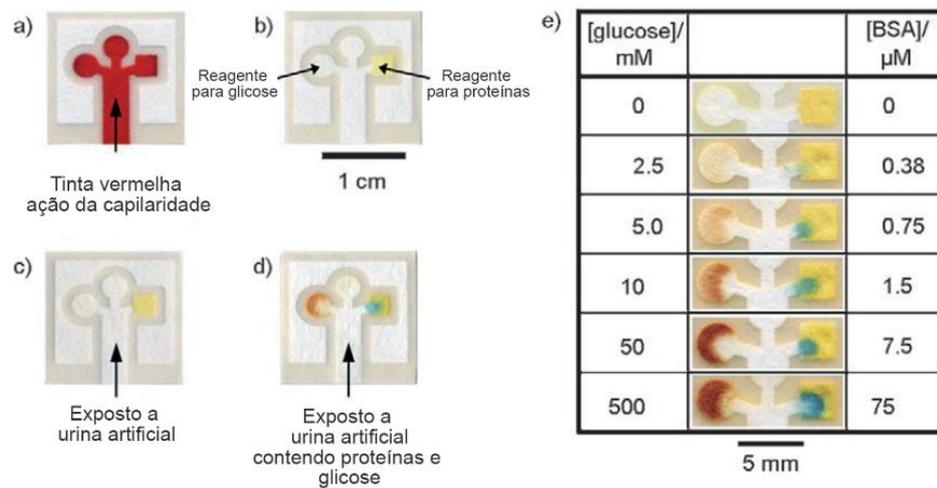
Segundo Lo (2013) a microfluídica é definida como a ciência e tecnologia que envolve o estudo do comportamento dos fluidos, manipulação controlada de fluidos e o *design* de dispositivos ou sistemas que possam executar de forma confiável tarefas em micro canais com dimensões muito reduzidas (LO, 2013). O termo microfluídica foi primeiro usado por Whitesides e ele fala a quanto promissora é essa área em seu trabalho *The origins and the future of microfluidics* de 2006. Neste trabalho ele aborda diferentes materiais utilizados na construção desses dispositivos microfluídicos e como esses dispositivos poderiam ser usados, de forma alternativa, em análises químicas, comumente, feitas por equipamentos robustos e de grande porte, que geralmente possuem valores elevados. Portanto, a vantagem de se trabalhar com escalas reduzidas e uso de materiais mais baratos é, conseqüentemente, o barateamento do custo final dessas análises (WHITESIDES, 2006).

É possível perceber o quão versátil a microfluídica é, tendo em vista que diversas áreas como medicina, biologia, química e engenharia a utilizam para resolver alguns problemas (AMATATONGCHAI et al., 2019; LIU et al., 2019; LOBO-JÚNIOR et al., 2017; LUO et al., 2019; XIE et al., 2019). Essa versatilidade também possibilita o uso de diferentes materiais como substrato para a construção desses dispositivos, sejam eles polímeros como Dimetil Polissiloxano (PDMS) (LOBO-JÚNIOR et al., 2017; SANTOS, 2014), o poliácido láctico (PLA) ou Acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS), geralmente usados em impressões 3D (HAMPSON et al., 2018) ou seja com um tipo de material que tem chamado bastante atenção por seu simples manuseio e baixo-custo, o papel (DE TARSO GARCIA et al., 2014; LIU et al., 2019; XIE et al., 2019).

1.4 Dispositivos analíticos baseados em papel

Do inglês, *microfluidic paper-based analytical devices* (μ PADs) os dispositivos analíticos baseados em papel tiveram sua primeira aparição no trabalho de Martinez et al. onde eles desenvolvem um dispositivo (Figura 4) capaz de realizar determinações quantitativas de glicose e da proteína albumina em amostras de urina artificial. Visando aumentar a velocidade de análise, portabilidade (*point of care*) e reduzir o custo final comparado às técnicas convencionais, eles optaram por utilizar um dispositivo microfluídico cujo substrato era o papel (MARTINEZ et al., 2007).

Figura 4 - Dispositivos de Martinez para determinação de proteínas e glicose (μ PAD).



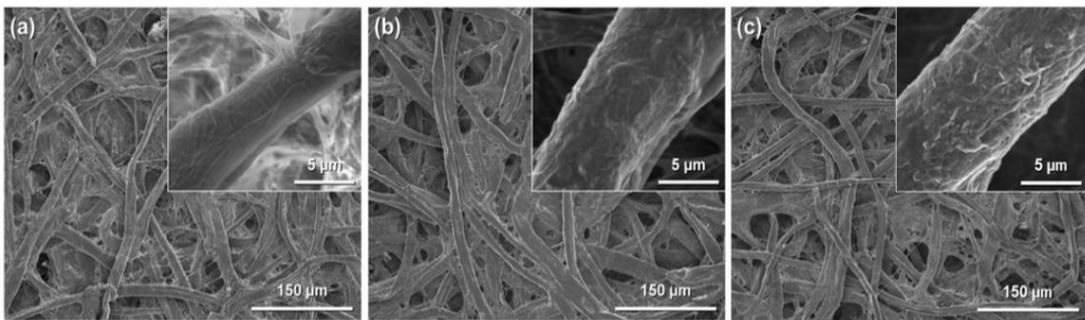
Fonte: Adaptado de (MARTINEZ et al., 2007)

Os μ PADs utilizam vários materiais baseados em papel como: filtro de papel, papel grafite e até mesmo papel cromatográfico. Geralmente, esses materiais são compostos de celulose pura e por não possuírem aditivos tornam mais fáceis o controle nos ensaios analíticos. Além disso os papéis cromatográficos e filtro de papel possuem uma etapa de branqueamento na sua fabricação que acaba removendo impurezas do próprio papel (FU; WANG, 2018). A estrutura de celulose do substrato do μ PAD pode ser funcionalizada servindo como um canal e suporte ideal para o transporte e imobilização de várias substâncias (sejam elas, amostras ou reagentes) usadas em ensaios analíticos (SWERIN; MIRA, 2014).

A utilização do papel como substrato também pode ser justificada pela facilidade de padronização. A confecção de zonas hidrofóbicas e hidrofílicas no papel pode ser feita maneira eficiente e simples (sejam elas por tecnologias de impressão ou corte), o papel também apresenta uma boa capilaridade, seu potencial de descarte

é convidativo por ser biodegradável (ALMEIDA et al., 2018). Pela sua estrutura celulósica é possível também realizar modificações químicas, principalmente por apresentar grupos hidroxílicos de fácil acesso como pode ser visto no trabalho de Koga e seus colaboradores onde eles modificam o papel a fim de promover um reator catalítico micro estruturado para a produção de produtos químicos (Figura 5) (KOGA; KITAOKA; ISOGAI, 2015).

Figura 5 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo do: (a) papel original; (b) papel modificado com amina; e (c) papel modificado com metacrilato.



Fonte: (KOGA; KITAOKA; ISOGAI, 2015)

1.4.1 Métodos de detecção

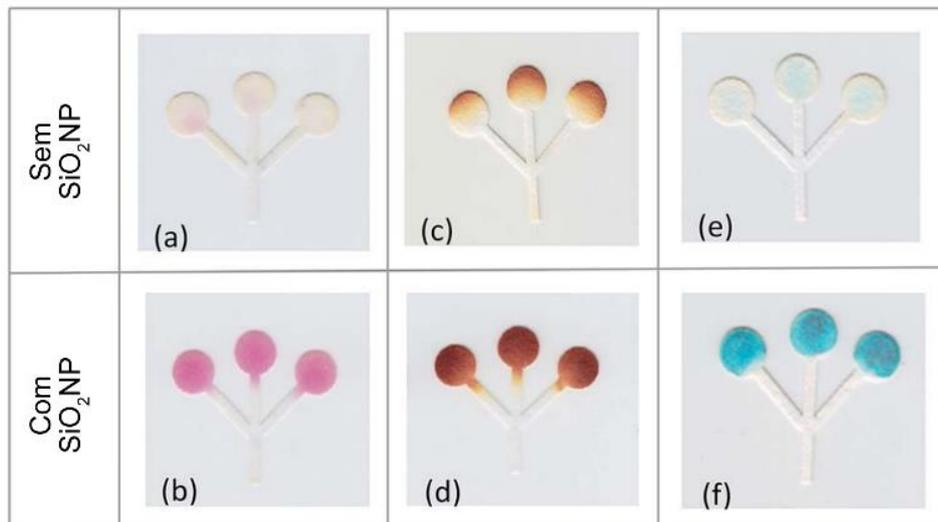
Dentre mecanismos de detecção já consolidados podem ser vistos alguns sendo utilizados em plataformas de papel. Dentre eles os que se destacam com uma boa aplicabilidade em μ PADs são: detecção colorimétrica, detecção fluorescente, detecção eletroquímica e detecção fotoeletroquímica, detecção quimioluminescente, detecção eletroquimioluminescente e detecção de espectroscopia de massa / Raman (FU; WANG, 2018). Esse trabalho terá como foco as detecções colorimétrica e fluorescente.

1.4.1.1 Detecção colorimétrica

Por ser um método de detecção geralmente mais barato, quando se fala de μ PADs, a detecção colorimétrica é a mais utilizada. Esse método funciona de maneira que seja perceptível a mudança de coloração proporcionada por uma reação entre uma substância de interesse (analito) e um reagente colorimétrico (agente cromógeno). (GARCIA, 2017; LIU et al., 2019; MARTINEZ et al., 2007; SWERIN; MIRA, 2014; XIE et al., 2019). Portanto é necessário a adição de um agente

cromógeno nos μ PADs para promover essa mudança de coloração nas zonas de detecção. Dessa forma, pode ocorrer determinações tanto qualitativas, como respostas como sim ou não (verdadeiro ou falso) ou até mesmo determinações quantitativas como a concentração de um analito de interesse (DE TARSO GARCIA et al., 2014; POLLOCK et al., 2012). Existem também trabalhos, como o de Evans et al. que mostra a possibilidade de imobilização de SiO_2 no substrato (papel) para promover uma resposta melhor. A Figura 6 mostra o efeito da adição de SiO_2NP (sílica com nano partículas de prata) em dispositivos de detecção de lactato, glicose e glutamato e glicose (EVANS et al., 2014).

Figura 6 - Imagens óticas dos dispositivos com as respostas colorimétricas para lactato (a e b), glicose (c e d) e glutamato (e e f) com e sem SiO_2NP .



Fonte: adaptado de (EVANS et al., 2014).

Geralmente a obtenção das imagens são realizadas por um dispositivo de captura (scanners, câmeras fotográficas, smartphones e etc.) e a intensidade de cor, em termos de pixels (menor elemento que constitui uma imagem digital), é obtida por um software gráfico, essa intensidade é correlacionada à concentração do analito através das curvas analíticas já construídas previamente (GARCIA, 2017; MARTINEZ et al., 2007). Existem alguns sistemas de cores: RGB (*Red, Green e Blue*) ou CMYK (*Cyan, Magenta, Yellow e Black*) porém o mais utilizado para avaliação nos μ PADs é o RGB. O sistema RGB funciona que as cores possuem uma representação numérica. Onde esse sistema usa uma arquitetura 8 bits (1 byte) para cada 28 componente (R, G e B), podendo assumir 256 níveis de intensidades de cor. Logo, cada componente

pode assumir valores de 0 a 255), gerando cerca de 16 milhões de combinações de cores. A cor de um pixel é a combinação das três componentes(SANTOS; 2013).

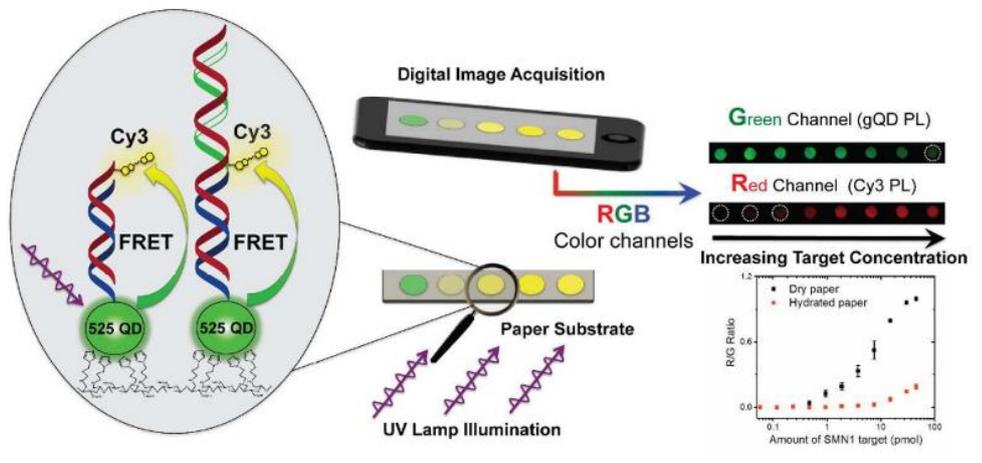
Podendo apresentar respostas diferentes quando os canais são avaliados juntos ou cada canal de cor individualmente, isso pode ser visto no trabalho de Huy, Nghia e Lee, onde eles estudam a diferença de sensibilidade no seu método perante os resultados desses canais de cor (HUY; NGHIA; LEE, 2020). Visando a praticidade e principalmente a portabilidade, muitos trabalhos utilizam a câmera de smartphones como método de captura de imagens (DA SILVA et al., 2020; HUY; NGHIA; LEE, 2020; KIM et al., 2020; LIU et al., 2019; XIE et al., 2019). Partindo da possibilidade da correlação entre a média da intensidade de pixels, no sistema de cor RGB, e a concentração de uma molécula de interesse. Neste trabalho foi aplicado esse método para a determinação de L-Tirosina.

1.4.1.2 Detecção por fluorescência

Os μ PADs com detecção por fluorescência usam da interação entre moléculas alvo e compostos fluorescentes (fluoróforos) com a intensão de gerar uma resposta satisfatória que possibilite a elucidação qualitativa ou quantitativa daquele determinado caso (BOONSRI et al., 2017). Esse fenômeno pode ser dividido em três etapas principais, sendo elas: excitação (onde é necessário a emissão de uma luz no comprimento de onda específico capaz de promover a elevação do nível de energia do composto fluorescente), estado excitado (onde a energia é absorvida promovendo um deslocamento energético nível acima) e emissão (a energia é então liberada em forma de luz em um comprimento de onda característico). Baseando-se nisso, essa energia emitida é mensurada e pode ser correlacionada a concentração ou outro fator de interesse (FU; WANG, 2018).

De maneira semelhante a detecção colorimétrica, a detecção por fluorescência pode ser realizada em μ PADs, também através da aquisição de imagens via dispositivos de captura (AMATATONGCHAI et al., 2019). Também tornando possível a realização de análises POC (Point of care) onde seriam análises em situ e isso seria possível através da utilização de smartphones. Análises que utilizam esse tipo de detecção possuem a capacidade de quantificações baixíssimas, na ordem de femton mol, um exemplo disso pode ser visto no trabalho de Noor e Krull, onde eles conseguem um LOD (limite de detecção na ordem de 30 fmol. A Figura 7 mostra o processo de análise desse dispositivo (NOOR; KRULL, 2014).

Figura 7 - μ PAD de Noor e Krull com detecção por fluorescência com aquisição de imagem via smartfone.

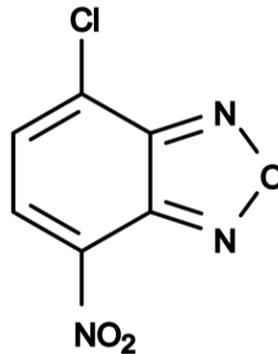


Fonte: (NOOR; KRULL, 2014)

Na Figura 7 vemos que a substância de interesse (ácido nucleico) é colocada no μ PADs, que por sua vez apresenta uma imobilização com pontos quânticos (*quantum dots*), em seguida é exposto a uma luz ultravioleta, promovendo o fenômeno da fluorescência. Então é utilizado um *iPad* para capturar as imagens que, posteriormente, são tratadas através de um software gráfico e as intensidades de cor (em pixels) são obtidas e então correlacionadas a concentração do analito.

Recentemente pesquisadores vêm utilizando sondas fluorescentes para promover a detecção de substâncias de seu interesse, como no trabalho de Zhang et al. (2016), onde eles utilizam um novo tipo de sonda fluorescente baseada em flavona para detectar cisteína e homocisteína com alta seletividade perante outros aminoácidos (ZHANG et al., 2016; ZHONG et al., 2020). A 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) é também uma sonda fluorescente que apresenta resposta ao interagir com compostos que apresentam aminas primárias e secundárias em sua estrutura (WANG et al., 2018; ZHONG et al., 2020). Por sua vez o NBD-Cl (4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) é uma sonda derivada do NBD com um cloro na posição 4 em sua estrutura como pode ser visto na Figura 8.

Figura 8 - Estrutura química da sonda NBD-Cl.

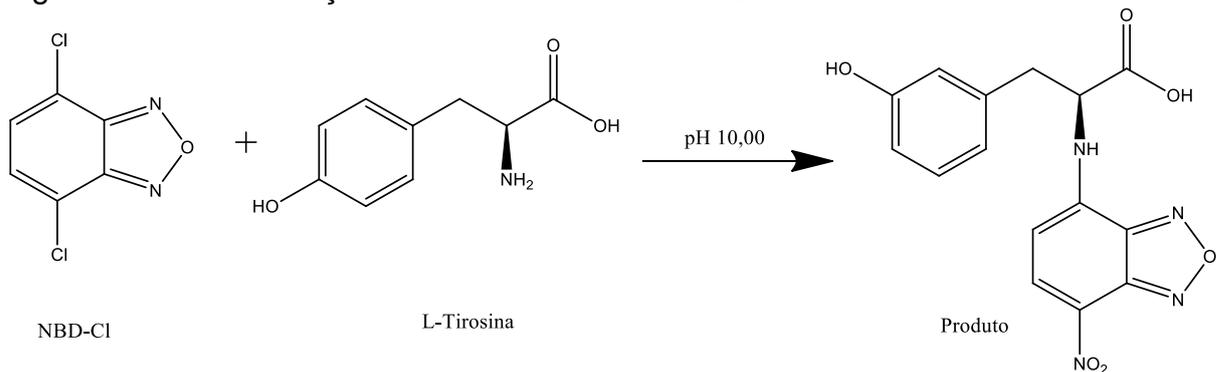


Fonte: (autor, 2021).

Em comparação a outras sondas no mercado a NBD-CL é uma escolha mais barata (ZACHARIS et al., 2011). A proposta desse trabalho é utilizar a NBD-Cl para promover uma resposta fluorescente para a L-Tirosina.

O NBD-Cl também ao interagir com a L-tirosina apresenta uma resposta na região do espectro visível como pode ser visto do trabalho de Basheir e Elbashir onde eles desenvolvem uma metodologia espectrofotométrica para a determinação da L-tirosina através de uma reação de derivatização com o NBD-Cl (BASHEIR, ELSHIEKH, 2015). A Figura 9 mostra essa reação.

Figura 9 - A via de reação de L-Tirosina com NBD-Cl.



Fonte: (adaptado de BASHEIR, ELSHIEKH, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

O objetivo geral deste trabalho visa o desenvolvimento de μ PADs como plataforma alternativa de baixo custo, para estimar a quantidade L-Tirosina de maneira simples e rápida.

2.2 *Objetivos específicos*

- I. avaliar tipo de *layouts* diferentes usados na confecção dos μ PADS.
- II. Avaliar a adequação dos μ PADs em proposta qualitativa para detectar L-Tirosina Experimental
- III. Estudar as condições de aplicação da amostra nos μ PADs. Envolvendo parâmetros como: volume dos reagentes, pH; e sistema de cor, canais de cor e concentração de NBD-Cl.
- IV. Avaliar algumas figuras de mérito do método de quantificação de L-tirosina em μ PAD a partir dos parâmetros: linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.

3 METODOLOGIA

Hidróxido de sódio, ácido clorídrico, etanol, ácido acético, acetato de sódio, fosfato de sódio, ácido nítrico, ácido fluorídrico, NBD-CL e a L-Tirosina foram adquiridos junto a Sigma Aldrich Co. Papel ofício tamanho A4. Papel de filtro (modelo qualitativo, JP 40 e JP 42) foram adquiridos da JProLab (São José dos Pinhais, PR, Brasil). Uma lanterna de luz ultravioleta (365nm). Os dispositivos foram escaneados em uma impressora Samsung M2070W. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e utilizados como recebidos. Todas as soluções foram preparadas diariamente em água ultrapura (resistividade de 18 MΩ cm).

A solução estoque de L-Tyr (50 mmol L^{-1}) foi preparada com a dissolução de 0,14 g de L-Tirosina (Sigma) em tampão para um volume final de 15 mL. Esta solução estoque foi diluída para preparo das soluções analíticas de calibração. Para o ajuste do pH, a solução de ácido clorídrico (1 mol L^{-1}) foi preparada com a adição de 4,4 mL de HCl 37% (m/m) em 45,6 mL em água deionizada. A solução de hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) foi preparada dissolvendo-se 2 g de hidróxido de sódio (Merck) em água deionizada para um volume final de 50 mL. Para o ajuste da força iônica, solução de cloreto de sódio (1 mol L^{-1}) foi preparada dissolvendo-se 2,92 g de cloreto de sódio (Vetec) em água deionizada também para um volume final de 50 mL.

3.1 Estudo preliminar

Foi realizada uma análise no espectrômetro de fluorescência a fim de elucidar o comportamento do produto formado. A solução estoque de L-Tirosina foi preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 10,00) com uma concentração de 50 mmol L^{-1} . Com a solução estoque foram realizadas as diluições, também com tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 10,00). A solução de NBD-Cl foi preparada com a dissolução de 0,02 g do reagente NBD-Cl ($199,55 \text{ g mol}^{-1}$) em 5 mL de etanol ($46,07 \text{ g mol}^{-1}$), resultando em uma concentração de 20 mmol L^{-1} . Foi utilizada uma proporção de 1:1 dos dois reagentes. Alguns dos parâmetros foram escolhidos com base em estudos anteriores realizados por pesquisadores do laboratório Leman.

As soluções foram preparadas e levadas para avaliação por meio da técnica de fluorescência molecular, onde foi utilizado um espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) equipado com lâmpada de xenônio de 150 W de potência e

cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm. Eventuais medidas espectrofotométricas foram realizadas com um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

3.2 Fabricação dos μ PADs

Os dispositivos de papel foram fabricados segundo a metodologia de Carrilho et al., por impressão a cera, a qual foi proposta em 2009 (CARRILHO et al., 2009). O *layout* dos dispositivos foi desenhado no software gráfico Adobe Illustrator 2020® (licença gratuita de teste) e, posteriormente, foram impressos em uma impressora a cera (Xerox ColorQube 8570). Depois da impressão, os dispositivos foram levados à estufa por 2 minutos a uma temperatura de 90°C. Em seguida, para evitar vazamento de solução, foi colocada uma fita adesiva dupla face na parte inferior do dispositivo, que depois é aplicado a uma placa de vidro (previamente limpa) para facilitar o manuseio, como pode ser visto na Figura 10.

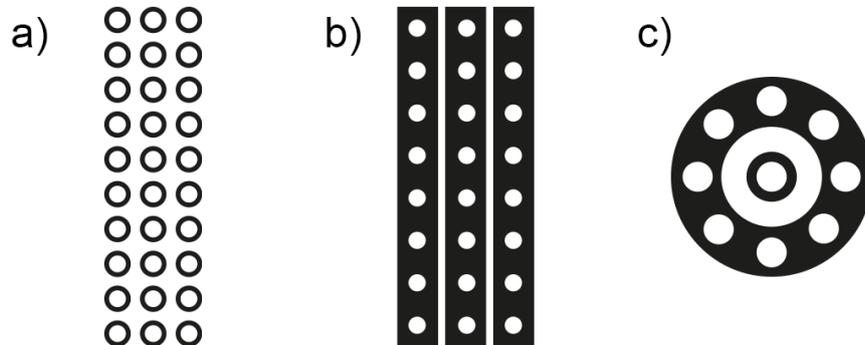
Figura 10 - Esquema do processo de fabricação dos dispositivos de papel.



Fonte: (Autor, 2021).

Nesse trabalho foram utilizados três *layouts* de dispositivos diferentes, mostrados na figura Figura 11. O Primeiro (dispositivo 01) consiste em um dispositivo que apresenta 3 linhas com dez zonas circulares de detecção (4 mm de diâmetro e uma barreira de cera de 2 mm). O segundo (dispositivo 02) possui 3 linhas com oito zonas de detecção (4 mm de diâmetro) e a barreira hidrofóbica, que forma um retângulo ao redor das zonas de detecção. O terceiro (dispositivo 03) consiste em um dispositivo circular no qual as zonas de detecção possuem 3 mm de diâmetro e essas zonas foram postas de forma circular e foi introduzido uma zona de detecção no centro do dispositivo.

Figura 11 - Layout dos μ PADs utilizados nesse trabalho. a) Possui zonas de detecção de 4 mm de diâmetro e uma barreira hidrofóbica de 2 mm de espessura (dispositivo 01); b) Possui zonas de detecção de 4 mm, porém as zonas hidrofóbicas são de formato retangular ao



Fonte: (autor, 2021).

3.3 Funcionamento do dispositivo

Com os μ PADs prontos, é adicionado um volume determinado da solução de NBD-Cl em cada uma das zonas de detecção dos dispositivos. Espera-se, à temperatura ambiente, cerca de 2 minutos até acontecer a secagem do dispositivo. Em seguida, são adicionadas as soluções de L-tirosina com diferentes concentrações. Os dispositivos são então levados à estufa por 15 minutos à 80°C e então as imagens são capturadas para a análise.

3.4 Aquisição das imagens e tratamento:

3.4.1 Colorimetria.

Depois do procedimento especificado no item 3.2, os μ PADs são levados a uma impressora Samsung modelo M2070W e são digitalizados com 300 DPIs e convertidos para o padrão de cor RGB.

3.4.2 Fluorescência

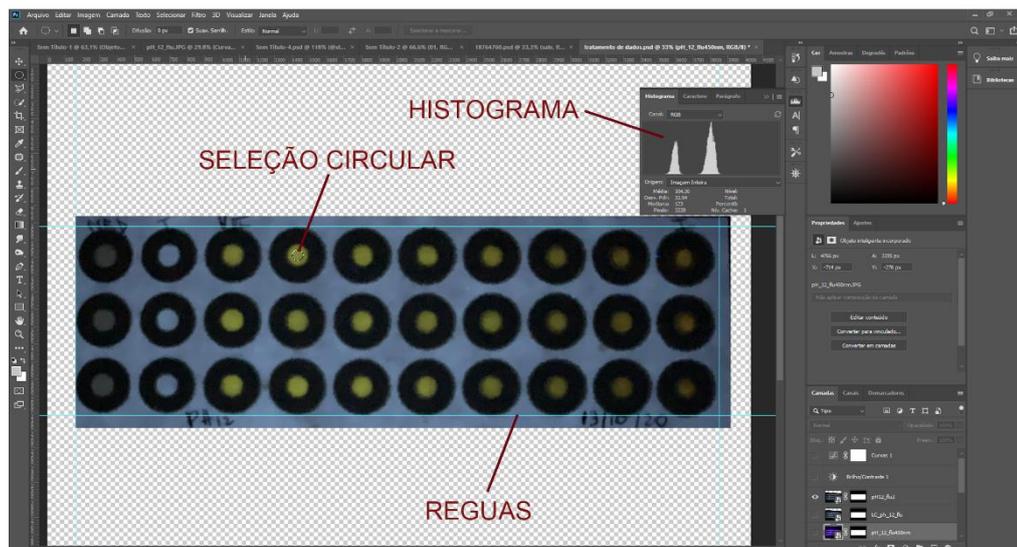
Depois do procedimento citado no item 3.4.1, os μ PADs são levados a um quarto escuro, onde são introduzidos à caixa que possui um suporte contendo uma lanterna de luz ultravioleta (365 nm) acoplada a uma distância fixa de 5 cm do dispositivo. É acoplado, em conjunto, um smartphone Iphone XR, que possui uma lente grande angular de 12 MP com abertura focal $f/1.8$, também a uma distância fixa

do dispositivo. São realizadas as fotografias dos μ PADs. As imagens foram tratadas e os dados coletados da mesma maneira conforme descrito no item a seguir.

3.5 Tratamento dos dados

As imagens são então tratadas no software Adobe Photoshop 2020. Um padrão de régua foi determinado para que houvesse uma padronização das imagens dentro do *software*, evitando a diferença de tamanho da avaliação de um dispositivo para o outro. Também foi padronizada uma área de seleção circular de 64 px (pixels) de diâmetro para capturar as informações das zonas de detecção através da ferramenta de histograma. Foram coletadas, através dessa ferramenta, a média de intensidade de cor (em pixels) e esse valor foi correlacionado com a concentração, como pode ser visto na Figura 12. Foram coletados os dados de intensidade de cor para o canal RGB e para cada outro canal individual R (Red), G (Green) e B (Blue).

Figura 12 - Interface do software Adobe Photoshop 2020 e sua ferramenta de histograma



Fonte: (autor, 2021).

3.6 Ensaio de determinação de L-Tirosina

Para a realização dos testes de determinação de L-Tirosina nos dispositivos de papel, foi preparada uma solução estoque de L-Tirosina cuja concentração era 50 mmol L⁻¹. Foram feitas sete diluições da solução estoque, como pode ser visto na Tabela 1. Os μ PADs foram preparados conforme especificado no item 3.3. Foram adicionados 1 μ L de NBD-Cl (20 mmol L⁻¹) a cada zona de detecção com o auxílio de

uma pipeta automática. Em seguida, foram adicionados 1 μ L das soluções de L-Tirosina de I a VIII também com o auxílio de uma pipeta automática. Os μ PADs foram levados à estufa, onde permaneceram por 10 minutos à temperatura de 80 °C. Espera-se 10 minutos e em seguida é efetuada a aquisição das imagens.

Tabela 1 - Concentração das soluções de L-Tirosina

| Solução | Concentração (mmol L ⁻¹) |
|---------|-----------------------------------------|
| I | 6,250 |
| II | 3,125 |
| III | 1,563 |
| IV | 0,781 |
| V | 0,391 |
| VI | 0,195 |
| VII | 0,098 |
| VII | 0,049 |

Fonte: (autor, 2021).

3.7 Estudo de pH

Para a maioria dos estudos neste trabalho, ambos os métodos de aquisição de imagem foram realizados. Alguns parâmetros foram fixados com base em estudos anteriores do grupo de pesquisa LEMAN.

Para a preparação do sistema tampão Britton-Robinson, foram adicionados 3,1 g de HBO₃ (Merck), 2,6 mL de CH₃CO₂H (Sigma) e 3,4 mL de H₃PO₄ (Sigma), perfazendo concentração de 0,04 mol L⁻¹ em balão volumétrico com volume final de 250 mL. Ajustou-se o pH para os valores de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 e foram preparadas soluções de L-Tirosina com as concentrações de acordo com a tabela 1 para valor de pH. Em todos os sistemas, utilizou-se HCl ou NaOH para ajuste do pH final. Foram preparados os μ PADs de acordo com o item 3.4. e as imagens foram obtidas conforme o item 3.4.2, 10 minutos após a retirada da estufa.

3.8 Avaliação dos Canais de cor

Soluções de L-tirosina foram preparadas nas concentrações 12; 24; 50; 100; 200; 400; 800; 1200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ através da diluição da solução estoque de concentração 2 mmol. L^{-1} , em solução de tampão fosfato 0,2 mol. L^{-1} , pH 10,00. As soluções de NBD-Cl foram preparadas nas concentrações de 5 e 10 mmol. L^{-1} , diluídas de uma solução de 20 mmol. L^{-1} em álcool etílico.

Adicionou-se 1 μL de solução de NBD-Cl (20 mmol. L^{-1}) no centro das zonas de reação em 3 replicatas no μPAD , seguindo-se de secagem à temperatura ambiente. Depois é adicionado 1 μL de soluções de concentrações conhecidas de L-Tirosina, seguindo-se novamente de secagem à temperatura ambiente. O μPAD então é levado a aquecimento em uma estufa a 80°C. Como branco, utilizaram-se os valores das componentes R, G ou B das imagens dos μPAD impregnados apenas com solução de NBD-Cl (20 mmol. L^{-1}) em tampão fosfato 0,2 mol. L^{-1} , pH 10,00. Finalmente, os μPADs eram posicionados no centro da placa do scanner e digitalizados com qualidade de 300 DPI (*dots per inch*, pontos por polegadas) para a avaliação colorimétrica e levados à caixa escura para a obtenção das imagens para a avaliação fluorimétrica.

3.9 Avaliação da concentração de NBD-Cl

Foram avaliadas as concentrações de 5, 10 e 20 mmol. L^{-1} das soluções de NBD-Cl. Preparou-se dispositivos para cada uma das concentrações determinadas anteriormente e o procedimento se fez análogo ao item 3.2. Adicionou-se as soluções de L-tirosina a cada dispositivo nas concentrações 12; 24; 50; 100; 200; 400; 800; 1200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

3.10 Avaliação do volume de reagentes

Neste item variou-se o volume adicionado de ambos os reagentes. Em uma situação, foi adicionado 0,5 μL de NBD-Cl (20 mmol. L^{-1}) e 0,5 μL das soluções de L-tirosina (12; 24; 50; 100; 200; 400; 800; 1200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Na outra situação, adicionou-se 1,0 μL dessas soluções nas zonas de reação dos dispositivos (80°C, 15min).

3.11 Tempo de reação

Como no item anterior, manteve-se fixa a concentração de 20 mmol.L⁻¹ para a solução de NBD-Cl. Foi adicionado no dispositivo 1µL dessa solução a cada zona de reação. Depois que o dispositivo secou, adicionou-se as soluções de L-tirosina nas concentrações de 12; 24; 50; 100; 200; 400; 800; 1200 µmol.L⁻¹. Foram obtidas as imagens dos dispositivos nos tempos de 0, 5, 10 e 15 minutos de reação à temperatura fixa de 80°C.

3.12 Estudo de interferentes

Para esse estudo dos possíveis interferentes ao método proposto foi levado em consideração as espécies comumente utilizadas como excipientes para suplementos. Também foi levado em consideração os próprios excipientes citados na embalagem do suplemento utilizado na verificação desse método.

Os interferentes foram avaliados tanto na ausência quanto na presença de L-tirosina, sendo utilizada uma concentração 10 vezes maior que a concentração de L-tirosina. Para esse teste essa concentração foi de 200 µmol.L⁻¹ para os excipientes.

3.13 Limite de detecção e limite de quantificação

Todas as curvas analíticas com pelo menos cinco pontos ($n = 5$) com medidas em triplicata ($n = 3$). Sob as condições otimizadas, o limite de detecção (LOD) foi calculado segundo a equação utilizada por Amidou Tall (TALL et al., 2021). A equação consiste em: $x_b - 3s_b$, onde s_b é o desvio padrão de dez ($n = 10$) medições independentes do sinal em branco e x_b (sinal de referencia). Para o limite de quantificação utilizou-se o primeiro ponto da curva analítica gerada sob condições otimizadas.

3.14 Ensaio de Recuperação

Cinco cápsulas de L-tirosina da marca NOW foram abertas e lavadas para a pesagem. Uma porção do pó pesada com precisão, equivalente a uma cápsula, foi dissolvida no volume mínimo de água desionizada bidestilada e filtrada para um frasco calibrado de 50 mL. O frasco foi avolumado até a marca com uma solução de tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹ pH 10,0. Foi realizada a adição de 12 µmol.L⁻¹ no dispositivo e posteriormente foram adicionadas os volumes de 2, 4 e 6 µL da solução de L-tirosina preparada a partir das capsulas do suplemento da NOW.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

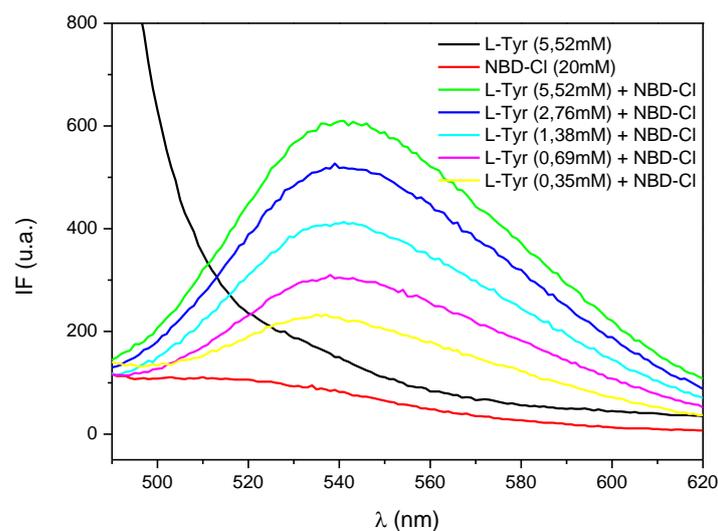
4.1 ESTUDO PRELIMINAR

O produto da reação entre a L-Tirosina e o NBD-Cl apresenta sinal de absorvância na região do visível, cerca de 388 nm como pode ser observado no trabalho de Basheir e Elbashir, 2015 (BASHEIR et al., 2015). Este trabalho estuda a possibilidade de aplicação desse sistema em uma plataforma microfluídica baseada em papel.

O NBD-Cl também é uma sonda que também promove produtos com comportamento fluororimetrico. como pode ser visto no trabalho de Pérez e seus colaboradores (PÉREZ et al., 2019).

Como já visto anteriormente, esperava-se que tivesse um melhor comportamento da reação em valores de pH acima de 10. A fim de elucidar o comportamento do produto formado, diante da perspectiva da fluorescência, com o sistema apresentado nesse trabalho foi realizada uma análise no espectrofotômetro de fluorescência. Logo podemos observar no espectro de emissão (Figura 13) um comportamento progressivo da intensidade do sinal de fluorescência à medida que a concentração de L-Tirosina aumenta em torno de 540nm.

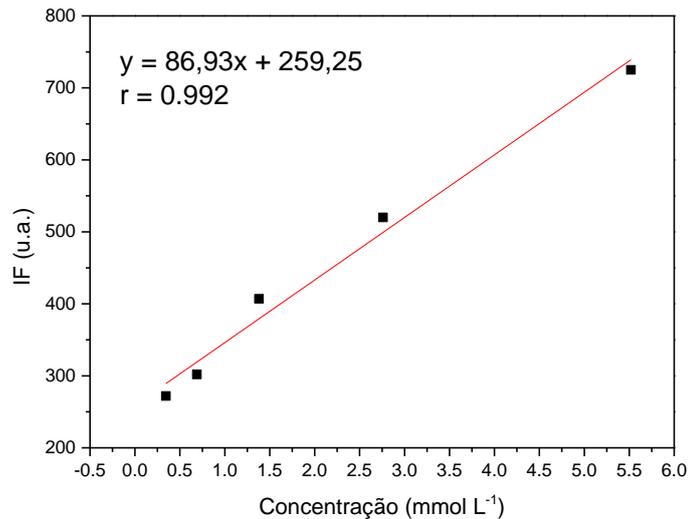
Figura 13 - Espectro de emissão do produto formado (pH = 10, tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹).



Fonte: (autor, 2021).

Comparando a concentração da L-Tirosina com o sinal de intensidade de fluorescência foi possível gerar uma curva cujo o coeficiente de correlação de Pearson de 0,992 implicando que existe uma correlação linear entre a concentração do analito e a intensidade de fluorescência, podendo ser visto na Figura 14.

Figura 14 - Curva analítica referente ao espectro de emissão do produto formado.



Fonte: (autor, 2021).

4.2 Escolha da escala de cor e método de detecção

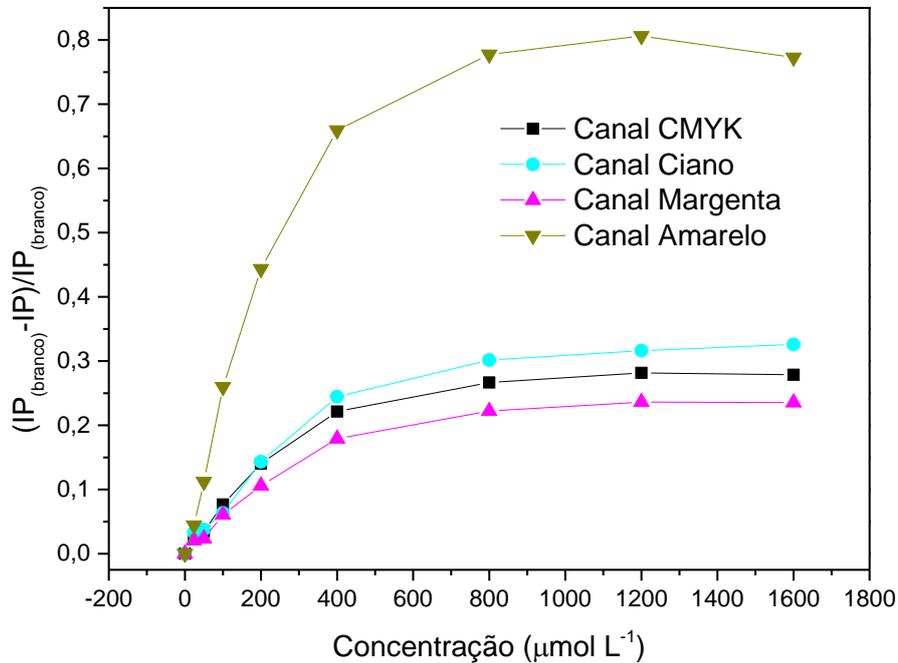
Foram avaliados dois métodos de detecção para o dispositivo. Através da colorimetria e da fluorescência, como descrito na metodologia deste trabalho. A correlação avaliada foi entre o valor de média de intensidade de pixel corrigido (IPC), obtida através de um tratamento matemático a fim de convencioná-los a um comportamento ascendente (equação 01).

$$\frac{IP(\text{branco}) - IP}{IP(\text{branco})} \quad (\text{equação 01})$$

Visando um sistema de cor que pudesse descrever melhor a variação de IPC, foi avaliado os resultados para a escala CMYK. Os Canais CMYK, ciano, magenta e amarelo foram estudados separadamente pelo método colorimétrico. Como pode ser visto na

Figura 15.

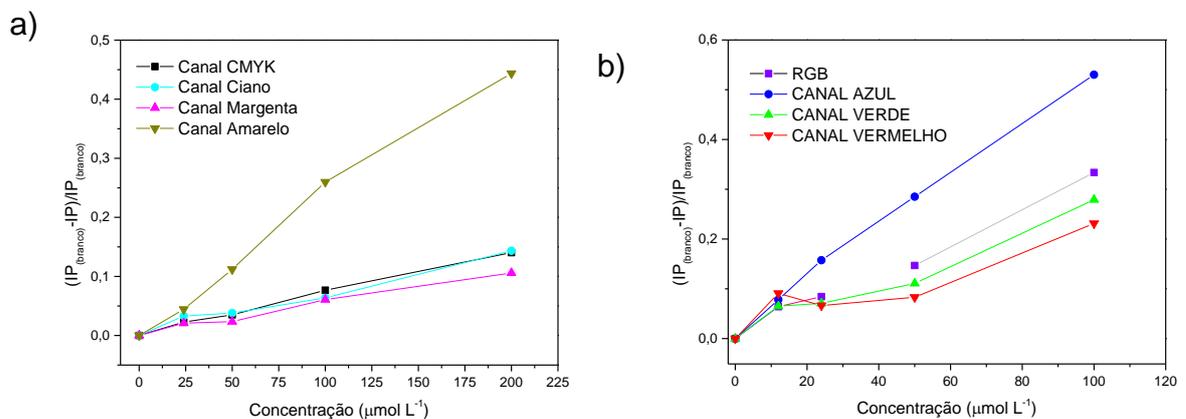
Figura 15 - Curva que correlaciona concentração de L-tirosina e IPC na Colorimetria, para a escala CYMK. 80°C, 15 min, 0,2 mol.L⁻¹ tampão fosfato, pH 10.



Fonte: (autor, 2021).

Foi selecionado a região que apresentava uma maior linearidade e comparou-se com a mesma região da curva obtida com os dados da metodologia colorimétrica. obteve-se uma curva cuja inclinação dessa reta apresentava um valor de 1296,27 e um coeficiente de correção de Pearson de 0,95. A Figura 16 ilustra o comportamento das duas escalas de cor perante o método colorimétrico abordado neste trabalho.

Figura 16 - Comparação entre as escalas de cor CYMK e RGB. a) Curva que correlaciona concentração de L-tirosina e IPC na colorimétrica para a escala de cor CMYK e b) RGB. (80°C, 15 min, 0,2 mol.L⁻¹ tampão fosfato, pH 10).



Fonte: (autor, 2021).

O comportamento na escala de cor CYMK pode ser melhor avaliado pelos valores da Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação entre os coeficientes de correlação de Pearson e inclinação da reta para os canais de cor da escala CYMK.

| CANAIS | CYMK | Ciano | Amarelo | Magenta |
|---------------------------|-------------|--------------|----------------|----------------|
| <i>R</i> | 0,99486 | 0,97117 | 0,98709 | 0,98045 |
| <i>Inclinação da reta</i> | 696,29769 | 674,96856 | 2272,94142 | 523,48041 |

Fonte: (autor, 2021).

Na Tabela 3 encontra-se os valores de inclinação da reta para e coeficiente de correlação de Pearson para os canais RGB, vermelho, verde e azul. Com um valor de $R = 0,99$ e inclinação da reta de o canal azul do método colorimétrico foi escolhido como o mais satisfatório.

Tabela 3 - Comparação entre os coeficientes de correlação de Pearson e inclinação da reta para os canais de cor da escala RGB.

| CANAIS | RGB | Vermelho | Verde | Azul |
|---------------------------|------------|-----------------|--------------|-------------|
| <i>R</i> | 0,98265 | 0,80925 | 0,95171 | 0,99506 |
| <i>Inclinação da reta</i> | 3190,76406 | 1971,21692 | 2596,13923 | 5221,78038 |

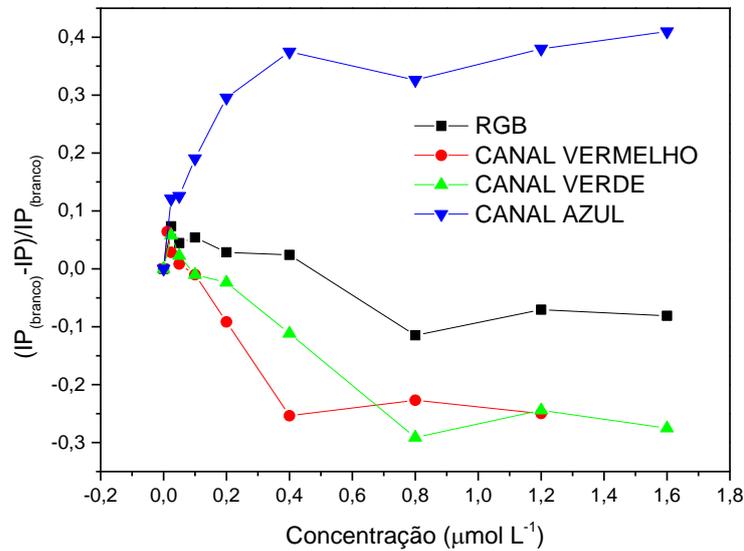
Fonte: (autor, 2021).

Apresentando valores mais satisfatórios de coeficiente de correlação de Pearson e de inclinação da reta foi escolhido para este trabalho o sistema de cor RGB.

4.3 Detecção por Fluorescência

Dentre os valores obtidos do método por fluorescência na escala RGB, nota-se um comportamento que não estabelece uma boa correlação para os dados extraído dos canais RGB, Vermelho e verde. Apresentando valores negativos. Isso acaba comprometendo a análise pois o sinal se apresenta abaixo do valor do branco. Para o canal azul, os valores extraídos, são satisfatórios para as próximas avaliações. O comportamento pode ser observado na Figura 17.

Figura 17 - Curva que correlaciona concentração de L-tirosina e IPC na fluorescência, 80°C, 15 min, 0,2 mol.L⁻¹ tampão fosfato, pH 10.



Fonte: (autor, 2021).

Analisando os valores de cada canal de cor individualmente, na escala RGB, observou-se que apenas o canal azul apresentou todos os valores positivos, como pode ser visto na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de IP (triplicata) e concentração de L-tirosina para os estudos do método por fluorescência.

| Photoshop (RGB) | | | | | | |
|------------------------|--------|--------|--------|------------|---------------------------------------------------|-----------|
| pH = 12 | | | | | | |
| | IP1 | IP2 | IP3 | IP (média) | Concetração de L-Tirosina (mmol.L ⁻¹) | Corrigido |
| VIII | 133,29 | 107,94 | 116,69 | 119,31 | 0,38 | -0,57 |
| VII | 121,93 | 105,95 | 99,85 | 109,24 | 0,75 | -0,44 |
| VI | 88,72 | 93,27 | 86,01 | 89,33 | 1,50 | -0,18 |
| V | 86,97 | 80,7 | 76,13 | 81,27 | 3,13 | -0,07 |
| IV | 69,82 | 68,24 | 68,05 | 68,70 | 6,25 | 0,09 |
| III | 55,39 | 52,21 | 53,52 | 53,71 | 12,50 | 0,29 |
| II | 43,23 | 44,69 | 42,77 | 43,56 | 25,00 | 0,43 |
| I | 45,25 | 37,97 | 38,1 | 40,44 | 50,00 | 0,47 |
| IP (BRANCO) | 75,79 | 75,85 | 75,8 | 75,81 | | |
| Photoshop (R) | | | | | | |
| pH = 12 | | | | | | |
| | IP1 | IP2 | IP3 | IP (média) | Concetração de L-Tirosina (mmol.L ⁻¹) | Corrigido |

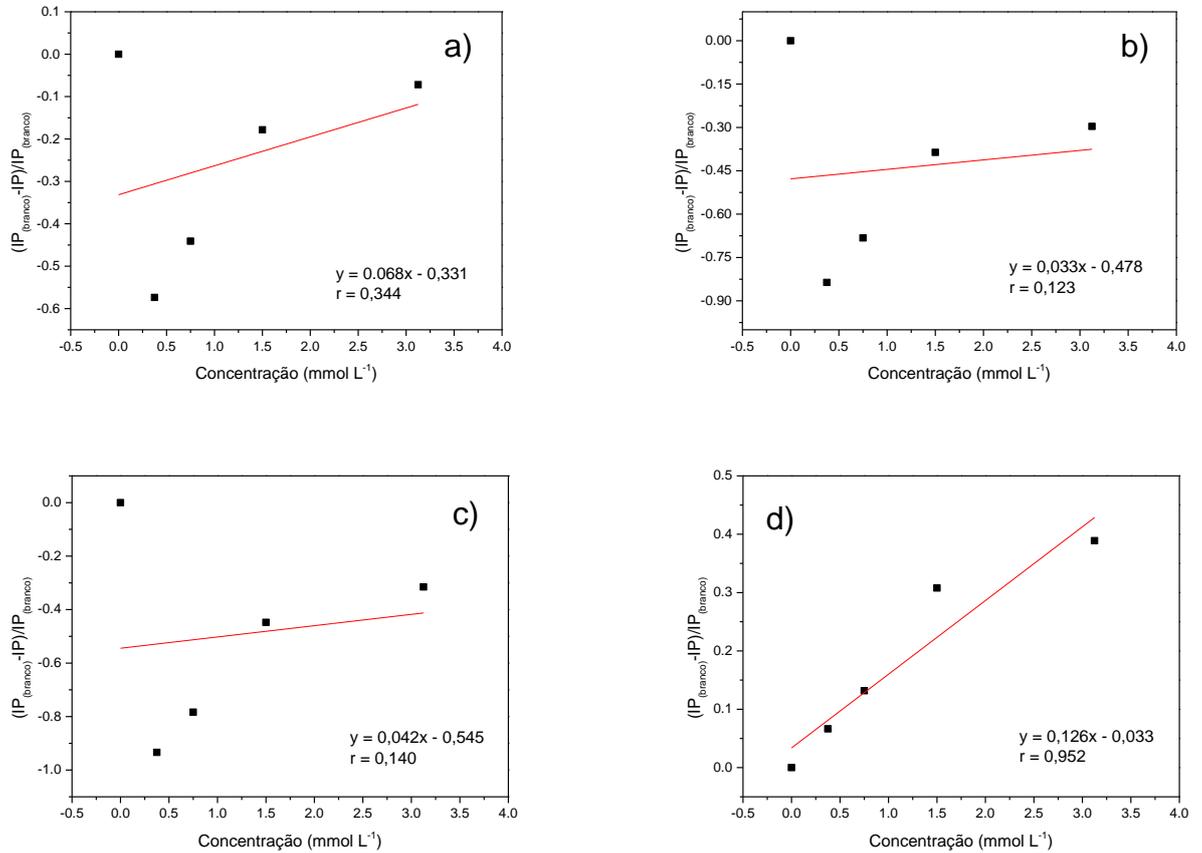
| | | | | | | |
|----------------------|------------|------------|------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------|
| VIII | 153,56 | 126,43 | 137,64 | 139,21 | 0,38 | -0,84 |
| VII | 142,55 | 122,83 | 117,25 | 127,54 | 0,75 | -0,68 |
| VI | 104,36 | 109,75 | 101,18 | 105,10 | 1,50 | -0,39 |
| V | 105,44 | 98,11 | 91,3 | 98,28 | 3,13 | -0,30 |
| IV | 84,29 | 81,31 | 84,35 | 83,32 | 6,25 | -0,10 |
| III | 68,37 | 65,45 | 66,76 | 66,86 | 12,50 | 0,12 |
| II | 57,36 | 58,19 | 55,67 | 57,07 | 25,00 | 0,25 |
| I | 62,77 | 52,21 | 53,96 | 56,31 | 50,00 | 0,26 |
| IP | 73,47 | 75,27 | 72,4 | 73,71 | | |
| (BRANCO) | | | | | | |
| Photoshop (G) | | | | | | |
| pH = 12 | | | | | | |
| | IP1 | IP2 | IP3 | IP (média) | Concetração de L-Tirosina (mmol.L⁻¹) | Corrigido |
| VIII | 162,78 | 132,57 | 144,44 | 146,60 | 0,38 | -0,93 |
| VII | 150,02 | 130,55 | 125,03 | 135,20 | 0,75 | -0,78 |
| VI | 108,18 | 115,74 | 105,33 | 109,75 | 1,50 | -0,45 |
| V | 107,04 | 98,44 | 93,63 | 99,70 | 3,13 | -0,32 |
| IV | 86,08 | 82,29 | 83,12 | 83,83 | 6,25 | -0,11 |
| III | 68,39 | 64,94 | 65,57 | 66,30 | 12,50 | 0,13 |
| II | 53,39 | 53,25 | 51,26 | 52,63 | 25,00 | 0,31 |
| I | 49,4 | 45,01 | 44,49 | 46,30 | 50,00 | 0,39 |
| IP | 78,92 | 77,9 | 77,34 | 78,05 | | |
| (BRANCO) | | | | | | |
| Photoshop (B) | | | | | | |
| pH = 12 | | | | | | |
| | IP1 | IP2 | IP3 | IP (média) | Concetração de L-Tirosina (mmol.L⁻¹) | Corrigido |
| VIII | 82,13 | 63,67 | 66,5 | 70,77 | 0,38 | 0,07 |
| VII | 76,26 | 63,23 | 57,96 | 65,82 | 0,75 | 0,13 |
| VI | 54,16 | 54,31 | 48,94 | 52,47 | 1,50 | 0,31 |
| V | 48,65 | 46,28 | 44,06 | 46,33 | 3,13 | 0,39 |
| IV | 36,81 | 42,24 | 39,33 | 39,46 | 6,25 | 0,48 |
| III | 28,98 | 26,64 | 28,68 | 28,10 | 12,50 | 0,63 |
| II | 20,24 | 23,13 | 20,14 | 21,17 | 25,00 | 0,72 |
| I | 21,31 | 16,64 | 16,07 | 18,01 | 50,00 | 0,76 |
| IP | 74,91 | 70,68 | 76,49 | 74,03 | | |
| (BRANCO) | | | | | | |

Fonte: (autor, 2021).

Analisando graficamente, observa-se na Figura 18 que a correlação da intensidade do sinal com a concentração nos dados provenientes dos canais RGB, vermelho e verde são insatisfatórios, principalmente pelo fato desses canais apresentarem valores negativos e positivos podendo ser observado uma alta

dispersão dos pontos do gráfico, enquanto o canal azul apresenta uma boa correlação.

Figura 18 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina para os a canais: a) RGB; b) R; c) G; d) B; (pH = 10, 25 °C, fluorescência).



Fonte: (autor, 2021).

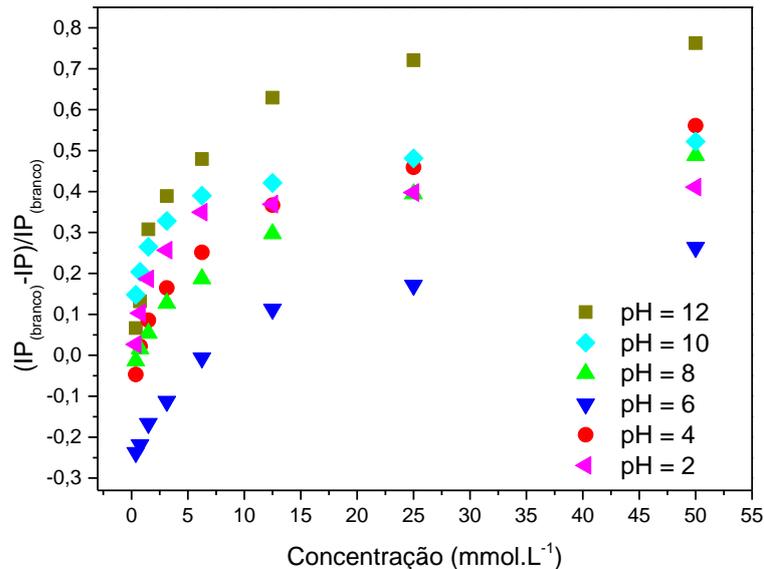
Ao comparar os resultados dos testes entre a metodologia que utilizava a detecção colorimétrica e entre a metodologia que utilizava a detecção por fluorescência, foi escolhida a detecção colorimétrica pois apresentou os valores mais satisfatórios. A dificuldade em obter resultados melhores com o método fluorimétrico está, provavelmente, no uso da lâmpada UV em um comprimento de onda (365nm) abaixo do comprimento de onda necessário para a excitação do produto final da reação com NBD-Cl e L-tirosina (540nm).

4.4 Avaliação do pH do meio

Tendo em vista que a L-tirosina é um aminoácido e o pka da amina em sua estrutura é de 9,11 (GOLDBERG et al., 1991) espera-se que haja uma melhor disponibilidade da espécie que possui a amina protonada em valores de pH acima

desse pka, como pode ser visto também no trabalho de Santos (SANTOS, 2014). Foram então avaliados outros valores de pH a fim de comprovar se, de fato, o sistema se comportaria de forma satisfatória para o método proposto. A Figura 19 contém a informação dos resultados para os valores de pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12.

Figura 19 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina para o estudo de pH para o canal azul. (Colorimetria, Tampão Britton-Robinson, 0,04 mol.L⁻¹, 25°C)



Fonte: (autor, 2021).

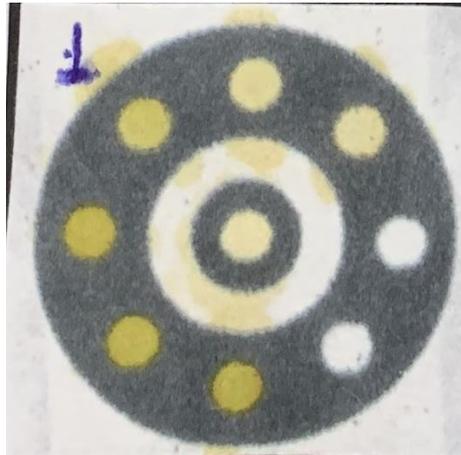
Foi observado que mesmo utilizando o canal de cor azul os resultados para o pH 6 apresentaram valores negativos. Os resultados para os outros valores de pHs se mantêm acima do zero como pode ser visto na **Erro! Fonte de referência não encontrada..** Porém apesar da curva referente ao pH 12 apresentar uma inclinação superior foi escolhido o pH de 10, que por sua vez já apresenta uma correlação muito boa e é menos agressivo a plataforma de papel.

4.5 Avaliação do layout dos dispositivos

Foram estudados alguns *layouts* de dispositivos que foram chamados de dispositivos 01, 02 e 03. O dispositivo 01 apresentava uma forma mais econômica de impressão onde era impresso apenas uma borda que isolava a zona de detecção. Para o dispositivo 02, o qual já havia sendo utilizado em outros trabalhos realizados pelo grupo, apresentava uma zona hidrofóbica mais espessa. O dispositivo 03 foi feito pensando na detecção através de *smartphones* (Figura 20). Esperava-se que o design

circular facilitasse na realização da fotografia. De fato, isso aconteceu. Porém o dispositivo 03 apresentou um problema de vazamento. Isso pode ser explicado pelo seu tamanho reduzido diante do volume mínimo utilizado (0,5 μ L).

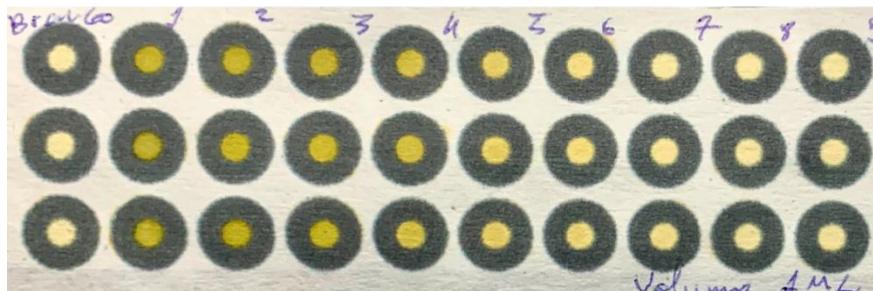
Figura 20 -Imagem do dispositivo 03 pelo método colorimétrico.



Fonte: (autor, 2021).

Para o dispositivo 01 não se notou esse tipo de vazamento e foi observado também uma boa homogeneidade na dispersão dos reagentes nas zonas de reação. Esse desempenho do dispositivo 01 pode ser visto na Figura 21

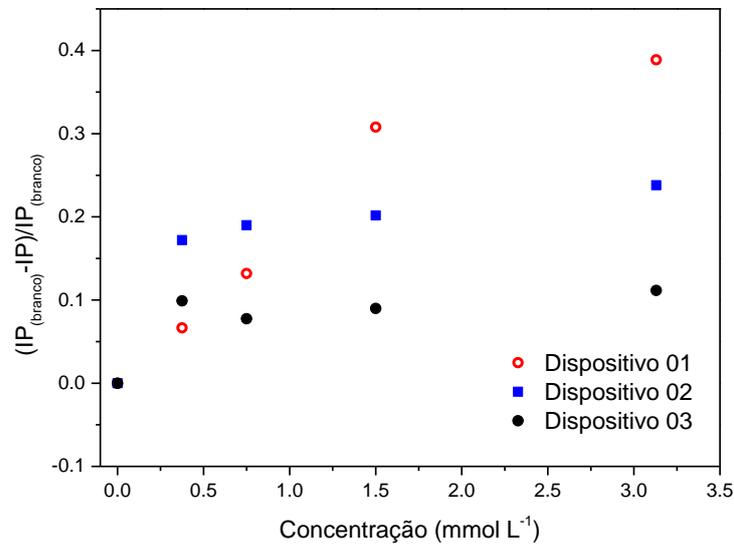
Figura 21 - Imagem do dispositivo 01 pelo método colorimétrico.



Fonte: (autor, 2021).

Para esses dispositivos também foi escolhido os parâmetros avaliados anteriormente como o pH 10 e utilização do canal azul na escala de cor RGB e o sistema de detecção colorimétrico. Foi observado uma correlação boa, porém a sensibilidade do dispositivo 01 se saiu melhor que os outros dois dispositivos como pode ser visto na Figura 22.

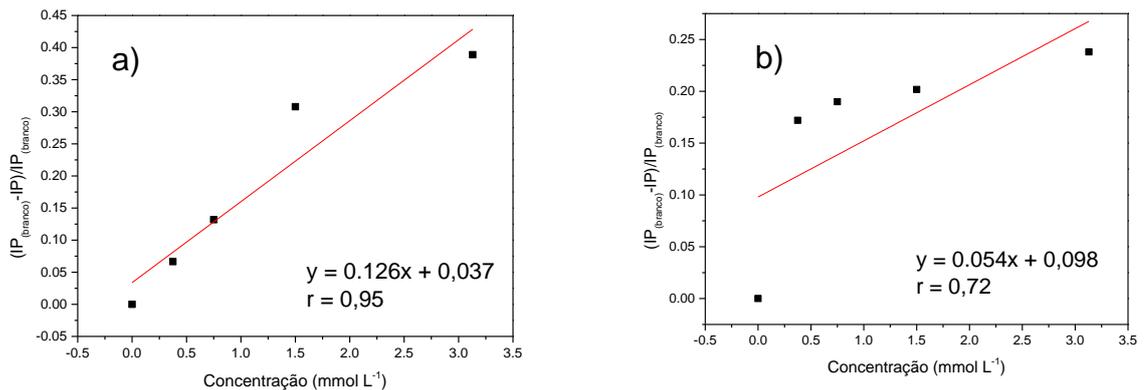
Figura 22 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina para os dispositivos 01, 02 e 03 (pH 12, Tampão Britton-Robinson, 0,04 mol.L⁻¹, 25°C).

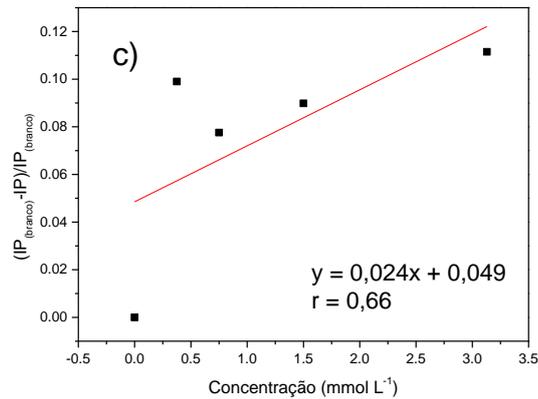


Fonte: (autor, 2021).

É possível perceber na Figura 23, de fato, as diferenças de correlação entre cada dispositivo. Tendo em vista que o dispositivo 01 obteve melhor comportamento dentre os parâmetros avaliados.

Figura 23 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina dos uPADs (colorimétrica). a) dispositivo 01; b) dispositivo 02; c) dispositivo 03; (pH 10, Tampão Britton-Robinson 0,2 mol.L⁻¹, 25°C).





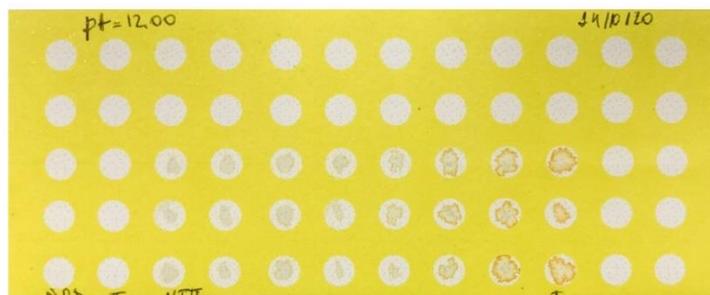
Fonte: (Autor, 2021).

Essa baixa correlação apresentada pelo dispositivo 02, persiste mesmo na execução de vários ensaios e pode estar relacionada com a quantidade de cera empregada na fabricação. Foi observada uma redução na área de reação, o grande volume de cera pode estar encurtando essa área durante a etapa de aquecimento do dispositivo, e isso provavelmente está prejudicando a análise. Já para o dispositivo 03 aumentar o seu tamanho poderá melhorar a qualidade de análise desse dispositivo. Portanto foi escolhido o dispositivo 01 como melhor situação para este trabalho.

4.6 Avaliação do papel sulfite na fabricação dos dispositivos

Também foram realizados testes com um dispositivo baseado em outro tipo de papel (sulfite) como substrato base. Porém por esse tipo de papel não apresentar uma boa capilaridade comparado, ao outro apresentado neste trabalho, não houve uma homogeneidade dos reagentes na zona de reação como pode ser visto na Figura 24 por isso foi descartada a possibilidade de utilizar esse tipo de papel na fabricação dos dispositivos desse trabalho.

Figura 24 - Fotografia do μ PAD utilizando papel sulfite como substrato.

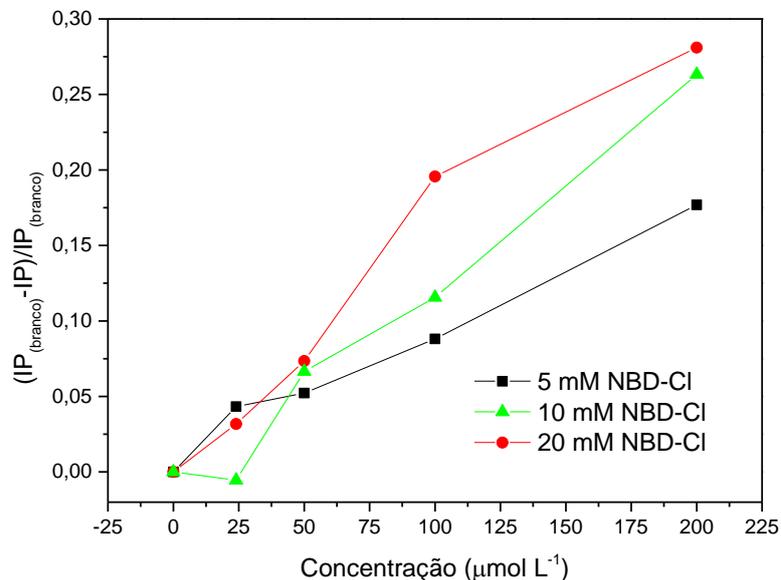


Fonte: (Autor, 2021).

4.7 Avaliação da concentração de NBD-Cl

Neste trabalho, foram avaliadas três concentrações para o reagente derivatizante NBD-Cl (5; 10; 20 mM). Com base na Figura 25 pode ser observado um comportamento parecido entre essas concentrações.

Figura 25 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina para as concentrações de 5; 10; 20 mmol.L⁻¹ de NBD-Cl (pH 12, Tampão fosfato, 0,2 mol.L⁻¹, 25°C).



Fonte: (Autor, 2021).

Foi escolhida a concentração de 20 mmol.L⁻¹ pois foi a que apresentou melhor coeficiente de correlação de Pearson como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação entre os coeficientes de correlação de Pearson e inclinação da reta para as concentrações de 5; 10; 20 mmol.L⁻¹ de NBD-Cl.

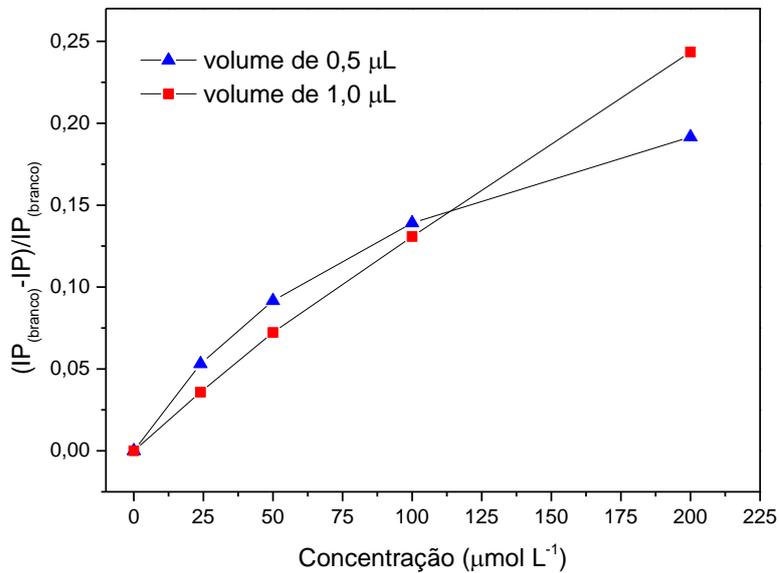
| Concentração de NBD-Cl (mM) | 05 | 10 | 20 |
|-----------------------------|-----------|------------|------------|
| <i>R</i> | 0,97716 | 0,97259 | 0,99621 |
| <i>Inclinação da reta</i> | 831,54694 | 1374,44403 | 5221,78038 |

Fonte: (Autor, 2021).

4.8 Volume dos reagentes adicionados no dispositivo

Foram avaliados os volumes de adição de 0,5 μL e de 1,0 μL e ambos apresentaram resultados satisfatórios. A Figura 26 mostra a comparação entre a adição desses volumes. Os volumes foram testados afim de encontrar uma melhor homogeneidade na zona de reação.

Figura 26 - Gráfico da média de IP por concentração de L-Tirosina para os volumes dos reagentes de 0,5 e 1,0 μL (pH 12, Tampão fosfato, 0,2 mol.L⁻¹, 25°C).



Fonte: (Autor, 2021).

Foi escolhido o volume de 1 μL para o uso no dispositivo. O volume de 0,5 μL apresentou uma correlação inferior ao valor de de 1,0 μL isso pode ser visto na Tabela 6.

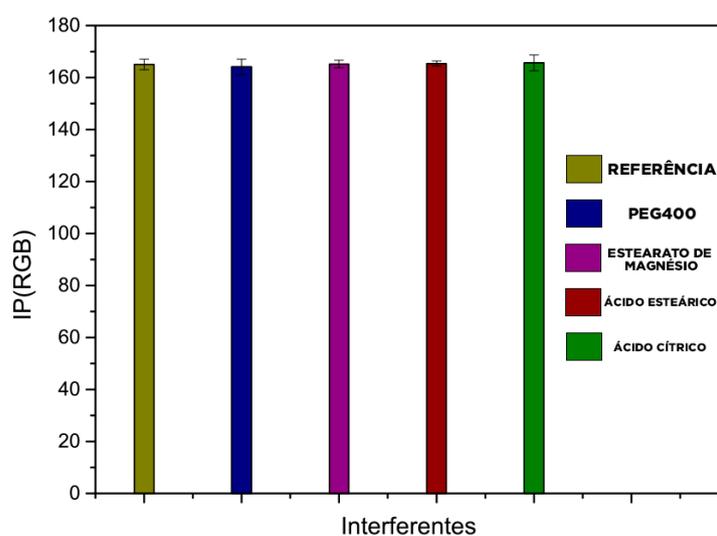
Tabela 6 - Comparação entre os coeficientes de correlação de Pearson e inclinação da reta para os volumes de reagentes 0,5 e 1,0 μL .

| Volume de adição dos reagentes (μL) | 0,5 | 1,0 |
|------------------------------------------------------------------|------------|------------|
| <i>R</i> | 0,88774 | 0,99621 |
| <i>Inclinação da reta</i> | 897,43763 | 5221,78038 |

Fonte: (Autor, 2021).

Com base nos resultados, é visto que a interferência das espécies para o método proposto foi relativamente baixa, com valores de RGB na faixa de 99,09 – 102,00 % com relação aos valores da referência sem a presença da L-tirosina, podendo ser observado na Figura 27. Logo, pode-se aferir que a metodologia proposta apresenta baixa interferência com relação aos excipientes comumente utilizados em formulações de suplementos a base de L-tirosina.

Figura 27 - Gráfico da média de IP para o estudo de interferentes (pH 12, Tampão fosfato, 0,2 mol.L⁻¹, 25°C).



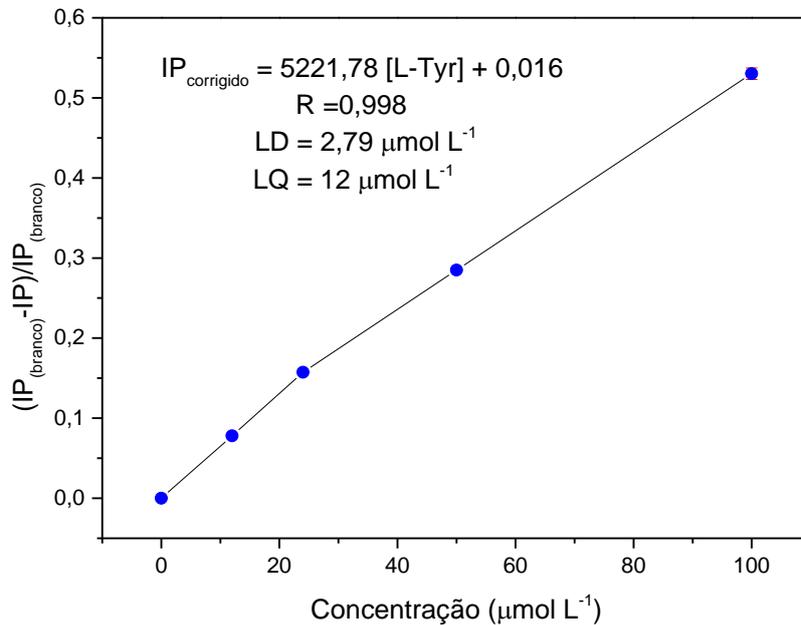
Fonte: (Autor, 2021).

4.9 Limite de detecção e limite de quantificação

Com os parâmetros otimizados, foi realizada uma curva padrão analítica, que pode ser vista na Figura 28. Como a concentração de L-Tirosina pode reduzir o sinal da média de intensidade de pixel com relação ao sinal de referência (branco, x_b) o limite de detecção foi calculado a partir de $x_b - 3s_b$, onde s_b é o desvio padrão de dez

(n = 10) medições independentes do sinal do valor de referência. Foi encontrado um valor de $2,79 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Para o limite de quantificação obteve-se um valor de $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A faixa linear para o método proposto neste trabalho é $12 - 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 28 - Curva analítica para L-Tirosina com os parâmetros otimizados (pH 10, Tampão fosfato, $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, 25°C).



Fonte: (Autor, 2021).

4.10 Ensaio de recuperação

A resposta de L-tirosina foi medida e comparada com a curva padrão (Figura 28). Os valores de recuperação em porcentagem obtidos se encontram entre $97,75 - 99,33$ podendo ser vistos na Tabela 7. Mostrando que não existe um efeito de matriz prejudicial para o método apresentado neste trabalho.

Tabela 7 - Valores referentes ao ensaio de recuperação de L-tirosina.

| Amostra de L-Tirosina | L-Tirosina ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | | Recuperado (%) |
|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------|----------------|
| | Adicionado | Recuperado | |
| L-Tirosina NOW (500 mg) | 0,0 | $12,00 \pm 0,0008$ | - |
| | 2,0 | $13,90 \pm 0,0043$ | 99,27 |
| | 4,0 | $15,64 \pm 0,0058$ | 97,75 |
| | 6,0 | $17,88 \pm 0,0101$ | 99,33 |

Fonte: (Autor, 2021).

O método proposto neste trabalho se situa equiparado a alguns métodos como o de Basheir e Elbashir (2014) que utilizam a espectroscopia de UV-Vis e o de Liu et al. (2019) que por sua vez utiliza Fluorescência. Porém há trabalhos como de Roy et al. (2020) que possui uma sensibilidade superior. Essas informações podem ser observadas na tabela.

Tabela 8 Informações sobre trabalhos que visam a determinação de L-tirosina.

| ARTIGO | TÉCNICA | LOD | FAIXA LINEAR | TIPO DE AMOSTRA | AUTORES |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| <i>PYRAZINYL-FUNCTIONALIZED ZR(IV)-MOF FOR ULTRASENSITIVE DETECTION OF TYROSINE/TNP AND EFFICIENT CO₂/N₂ SEPARATION</i> | Fluorescência | $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ | $1,0 - 160 \mu\text{mol.L}^{-1}$ | - | (BOONSRI et al., 2017) |
| <i>DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO ANALÍTICO BASEADO EM PAPEL (μPAD) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO COLORIMÉTRICA DE TIROSINA</i> | Colorimetria | $2,79 \mu\text{mol.L}^{-1}$ | $12 - 100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ | Suplementos alimentares | Este trabalho |
| <i>SPECTROPHOTOMETRIC METHODS FOR THE DETERMINATION OF L-TYROSINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS</i> | UV | $2,85 \mu\text{mol.L}^{-1}$ | $10-50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ | Farmácios | (BANAN ELSHIEKH ALSIED BASHEIR, 2015) |
| <i>ULTRA-SENSITIVE DETECTION OF L-</i> | Eletroquímica | $1,73 \text{pmol.L}^{-1}$ | $100 \text{fmol.L}^{-1} -$ | | (ROY et al., 2020) |

TYROSINE USING
MOLECULARLY
IMPRINTED
ELECTROCHEMICAL
SENSOR TOWARDS
DIABETIC FOOT ULCER
DETECTION

1 mmol.L⁻¹

1

Fonte: (Autor, 2021).

5 CONCLUSÃO

Neste presente estudo foi abordado o desenvolvimento de uma metodologia de determinação de L-Tirosina que utilizou dois tipos de técnicas de detecção, fluorescência e colorimetria.

Foram avaliados os dois tipos de detecção e observou-se que, para a metodologia deste trabalho, o sistema que utilizava fluorescência se mostrou inferior ao sistema que utilizava colorimetria.

Na obtenção dos dados a partir de diferentes canais de cor da escala RGB e CYMK obteve-se resultados diferentes para essas escalas de cor onde, para esta metodologia proposta, a escala RGG apresentou um comportamento mais satisfatório. Também ocorreu uma diferença entre os canais de cor na escala RGB, que vai influenciar diretamente na qualidade da análise. Na metodologia desenvolvida nesse trabalho, se sobressaiu o canal azul

Dos tipos de layout testados o que melhor se comportou foi aquele que apresentava barreiras hidrofóbicas de 2 mm de espessura ao redor da zona de detecção.

De modo geral, os μ PADs com detecção colorimétrica empregados, neste trabalho apresentaram potencialidade elevada para a análise de suplementos de L-tirosina, possibilitando análise rápida, simples e de baixo custo, quando comparada as técnicas comumente empregadas como por exemplo, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, que também implica em uma complexidade de execução.

6 REFERÊNCIAS

BANAN ELSHIEKH ALSIED BASHEIR, Abdalla A. Elbashi. Spectrophotometric methods for the determination of L-tyrosine in pharmaceutical formulations. **Analytical Letters**, [S. l.], v. 29, n. 10, p. 1763–1778, 2015. ISSN: 00032719. DOI: 10.1080/00032719608001522.

DA SILVA, Vinicius Aparecido Oliani Pedro; DE FREITAS, Rafaela Cristina; DE OLIVEIRA, Paulo Roberto; MOREIRA, Roger Cardoso; MARCOLINO-JÚNIOR, Luiz Humberto; BERGAMINI, Márcio Fernando; COLTRO, Wendell K. T.; JANEGITZ, Bruno Campos. Microfluidic paper-based device integrated with smartphone for point-of-use colorimetric monitoring of water quality index. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, [S. l.], v. 164, p. 108085, 2020. ISSN: 02632241. DOI: 10.1016/j.measurement.2020.108085. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108085>.

DE TARSO GARCIA, Paulo; GARCIA CARDOSO, Thiago Miguel; GARCIA, Carlos Diego; CARRILHO, Emanuel; TOMAZELLI COLTRO, Wendell Karlos. A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays. **RSC Advances**, [S. l.], v. 4, n. 71, p. 37637–37644, 2014. ISSN: 20462069. DOI: 10.1039/c4ra07112c.

EVANS, Elizabeth; MOREIRA GABRIEL, Ellen Flávia; BENAVIDEZ, Tomás E.; TOMAZELLI COLTRO, Wendell Karlos; GARCIA, Carlos D. Modification of microfluidic paper-based devices with silica nanoparticles. **Analyst**, [S. l.], v. 139, n. 21, p. 5560–5567, 2014. ISSN: 13645528. DOI: 10.1039/c4an01147c.

GARCIA, PAULO DE TARSO. Desenvolvimento de sensores colorimétricos e eletroquímicos para aplicações clínicas e forenses. [S. l.], p. 138, 2017.

GOLDBERG, Jonathan M.; SWANSON, Ronald V; GOODMAN, Harris S.; KIRSCH, Jack F. The Tyrosine-225 to Phenylalanine Mutation of Escherichia coli Aspartate.pdf. [S. l.], p. 305–312, 1991.

HUY, Bui The; NGHIA, Nguyen Ngoc; LEE, Yong Ill. Highly sensitive colorimetric paper-based analytical device for the determination of tetracycline using green fluorescent carbon nitride nanoparticles. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 158, p. 105151, 2020. ISSN: 0026265X. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105151. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105151>.

KIM, Dami; KIM, Se Jin; HA, Hyung Tae; KIM, Sanghyo. Smartphone-based

image analysis coupled to paper-based colorimetric devices. **Current Applied Physics**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 1013–1018, 2020. ISSN: 15671739. DOI: 10.1016/j.cap.2020.06.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cap.2020.06.021>.

LIU, Chunye; GOMEZ, Frank A.; MIAO, Yanqing; CUI, Ping; LEE, Wilson. A colorimetric assay system for dopamine using microfluidic paper-based analytical devices. **Talanta**, [S. l.], v. 194, n. October 2018, p. 171–176, 2019. ISSN: 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.10.039.

MARTINEZ, Andres W.; PHILLIPS, Scott T.; BUTTE, Manish J.; WHITESIDES, George M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie - International Edition**, [S. l.], v. 46, n. 8, p. 1318–1320, 2007. ISSN: 14337851. DOI: 10.1002/anie.200603817.

PÉREZ, Ana L.; TIBALDO, Giuliana; SÁNCHEZ, Germán H.; SIANO, Gabriel G.; MARSILI, Nilda R.; SCHENONE, Agustina V. A novel fluorimetric method for glyphosate and AMPA determination with NBD-Cl and MCR-ALS. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], v. 214, p. 119–128, 2019. ISSN: 13861425. DOI: 10.1016/j.saa.2019.01.078. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.01.078>.

POLLOCK, Nira R. et al. A paper-based multiplexed transaminase test for low-cost, point-of-care liver function testing. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 4, n. 152, 2012. ISSN: 19466234. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003981.

ROY, Souradeep; NAGABOOSHANAM, Shalini; WADHWA, Shikha; CHAUHAN, Nidhi; MATHUR, Ashish; KHAN, Saif A.; DAVIS, James. Ultra-sensitive detection of L-tyrosine using molecularly imprinted electrochemical sensor towards diabetic foot ulcer detection. **Electrochemistry Communications**, [S. l.], v. 117, n. June, p. 106782, 2020. ISSN: 13882481. DOI: 10.1016/j.elecom.2020.106782. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106782>.

SANTOS, DIÓGENES MENESES. MICROSSISTEMAS ELETROFORÉTICOS EM MATERIAIS POLIMÉRICOS DE DUPLO CANAL COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA. [S. l.], v. 11, n. c, p. 363–367, 2014.

SANTOS, JORGE LUÍS OLIVEIRA; ESTRATÉGIA. ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE NITRITO E NITRATO EM MATRIZES AMBIENTAIS E ALIMENTÍCIAS, EMPREGANDO ANÁLISE DE IMAGENS DIGITAIS. [S. l.], 2013.

SWERIN, Agne; MIRA, Isabel. Ink-jetable paper-based sensor for charged

macromolecules and surfactants. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 195, p. 389–395, 2014. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/j.snb.2014.01.064. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.064>.

TALL, Amidou; DA COSTA, Karolayne Rocha; DE OLIVEIRA, Maria Janaína; TAPSOBA, Issa; ROCHA, Uéslen; SALES, Tasso O.; GOULART, Marília Oliveira Fonseca; SANTOS, Josué Carinhanha Caldas. Photoluminescent nanoprobos based on thiols capped CdTe quantum dots for direct determination of thimerosal in vaccines. **Talanta**, [S. l.], v. 221, n. July 2020, 2021. ISSN: 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121545.

XIE, Liping; ZI, Xingyu; ZENG, Hedele; SUN, Jianjun; XU, Lisheng; CHEN, Shuo. Low-cost fabrication of a paper-based microfluidic using a folded pattern paper. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1053, p. 131–138, 2019. ISSN: 18734324. DOI: 10.1016/j.aca.2018.12.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.001>.