



Universidade de Brasília

Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química
Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento e Avaliação de Duas Estratégias de Baixo-Custo para detecção de
Quimiluminescência em Dispositivos Analíticos de Papel**

Eloíza Cristiny Azevedo dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Brasília, Distrito Federal

Janeiro 2025



Universidade de Brasília

Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química
Dissertação de Mestrado

Eloíza Cristiny Azevedo dos Santos

Desenvolvimento e Avaliação de Duas Estratégias de Baixo-Custo para detecção de Quimiluminescência em Dispositivos Analíticos de Papel

Dissertação de mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química no Programa de Pós - Graduação em Química, Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca.

Brasília, Distrito Federal

Janeiro 2025

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, saúde e por iluminar meus caminhos nesta jornada, permitindo que eu chegasse até aqui com o dever cumprido.

Aos meus pais, Marco Antônio e Maria Aparecida, e às minhas irmãs, por serem meu porto seguro. Pelo apoio e incentivo fundamentais. Vocês são a base de todas as minhas conquistas.

Obrigada por acreditarem nos meus sonhos tanto quanto eu.

Ao meu orientador, Alexandre Fonseca, pela excelência profissional e pelo exemplo a ser seguido. Agradeço por ter acreditado nos meus projetos, pelo apoio constante e por não medir esforços para contribuir com o meu crescimento acadêmico. Sua orientação foi peça-chave para o sucesso deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por suas valiosas contribuições, sugestões e correções.

Suas observações foram essenciais para o rigor e amadurecimento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório (Leticia, Maria Vitória, Isaura, Bruna, Juliana, Almir e Guilherme), que tornaram a rotina de experimentos e análises mais leve. Agradeço pelas trocas de conhecimento, auxílio técnico e, principalmente, pelos momentos de descontração que tornaram os dias de pesquisa mais felizes.

RESUMO

No presente trabalho foram desenvolvidos dois sistemas automatizados para a detecção quimiluminométrica em dispositivos de papel (PADs): um sistema que realiza o contato de oito zonas de detecção circulares ($\varnothing = 7$ mm) com gotas suspensas dos reagentes e outro sistema no qual oito zonas de detecção retangulares (5 mm x 10 mm) são imersas, de forma controlada, em pequenos vials contendo os reagentes. Para o primeiro arranjo, os PADs foram confeccionados com uma plotter de recorte e, para a segunda estratégia, as zonas de detecção foram fixadas diretamente em um suporte rígido de poli(ácido láctico) (PLA) em formato de pente. A aquisição dos sinais colorimétricos baseados no sistema RGB assim como o controle dos instrumentos foram realizadas por meio de um smartphone e de um aplicativo desenvolvido para sistema android, monitorando as reações quimiluminométricas em tempo real e produzindo os registros para análise. A eficiência dos sistemas propostos foi avaliada por meio da determinação de vitamina B₁₂ em soluções injetáveis e de captopril em comprimidos. A vitamina B₁₂ foi determinada de forma indireta, a partir da quantificação do íon cobalto(II) presente em sua estrutura e o qual atua como catalisador na reação quimiluminescente entre peróxido de hidrogênio e luminol. Para o captopril, o método baseou-se no efeito supressor desse fármaco sobre a reação quimiluminescente entre luminol e hipoclorito de cálcio. No sistema de elevação com gotas suspensas, a determinação de vitamina B₁₂ apresentou resposta linear ($R = 0,999$) na faixa de 0,1 a 0,5 mg/L em Co(II), com limite de detecção de 0,018 mg/L, limite de quantificação de 0,062 mg/L e erros relativos inferiores a 15% em relação aos valores declarados nos rótulos dos medicamentos. Para o captopril, obteve-se resposta linear ($R = 0,999$) na faixa de 3 a 15 mg/L. No sistema de imersão, observou-se resposta linear ($R = 0,998$) para a determinação de vitamina B₁₂ na faixa de 0,05 a 0,25 mg/L em Co(II), com limite de detecção de 0,03 mg/L e limite de quantificação de 0,1 mg/L. Para o captopril, obteve-se resposta linear ($R = 0,994$) na faixa de 10,5 a 15 mg/L, com limite de detecção de 1,14 mg/L, limite de quantificação de 3,8 mg/L e erros relativos inferiores a 5% quando comparados ao método de titulação coulométrica. De modo geral, os dispositivos desenvolvidos apresentaram potencial de aplicabilidade para a determinação de vitamina B₁₂ e captopril em formulações farmacêuticas.

Palavras chave: Dispositivos analíticos baseados em papel, Quimiluminescência, Detecção colorimétrica, Imagens digitais, Luminol. Análise farmacêutica, Sensores de baixo custo, Captopril, Vitamina B₁₂.

ABSTRACT

In the present work, two automated systems were developed for chemiluminometric detection in paper-based analytical devices (PADs): one system in which eight circular detection zones ($\varnothing = 7$ mm) come into contact with suspended reagent droplets, and another system in which eight rectangular detection zones (5 mm \times 10 mm) are immersed, in a controlled manner, in small vials containing the reagents. For the first configuration, the PADs were fabricated using a cutting plotter, whereas for the second strategy the detection zones were directly fixed onto a rigid poly(lactic acid) (PLA) comb-shaped support. Acquisition of RGB-based colorimetric signals, as well as instrument control, was performed using a smartphone and an application developed for the Android operating system, enabling real-time monitoring of the chemiluminometric reactions and generation of data records for analysis. The efficiency of the proposed systems was evaluated through the determination of vitamin B₁₂ in injectable solutions and captopril in tablet formulations. Vitamin B₁₂ was determined indirectly by quantifying the cobalt(II) ion present in its structure, which acts as a catalyst in the chemiluminescent reaction between hydrogen peroxide and luminol. For captopril, the method was based on the suppressive effect of this drug on the chemiluminescent reaction between luminol and calcium hypochlorite. In the suspended-droplet elevation system, vitamin B₁₂ determination showed a linear response ($R = 0.999$) over the range of 0.1 to 0.5 mg/L as Co(II), with a limit of detection of 0.018 mg/L, a limit of quantification of 0.062 mg/L, and relative errors below 15% compared to the values declared on the pharmaceutical labels. For captopril, a linear response ($R = 0.999$) was obtained in the range of 3 to 15 mg/L. In the immersion system, a linear response ($R = 0.998$) was observed for vitamin B₁₂ determination over the range of 0.05 to 0.25 mg/L as Co(II), with a limit of detection of 0.03 mg/L and a limit of quantification of 0.1 mg/L. For captopril, a linear response ($R = 0.994$) was obtained in the range of 10.5 to 15 mg/L, with a limit of detection of 1.14 mg/L, a limit of quantification of 3.8 mg/L, and relative errors below 5% when compared to the coulometric titration method. Overall, the developed devices demonstrated strong potential applicability for the determination of vitamin B₁₂ and captopril in pharmaceutical formulations.

Keywords: Paper-based analytical devices, Chemiluminescence, Colorimetric detection, Digital images, Luminol, Pharmaceutical analysis, Low-cost sensors, Captopril, Vitamin B₁₂.

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
SUMÁRIO.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS.....	10
1. Introdução e Objetivos.....	11
2. Referencial Teórico.....	14
2.1 Dispositivos Baseados em Papel (PADs).....	14
2.1.1 Histórico e evolução dos sensores em papel.....	14
2.1.2 Materiais e métodos de fabricação.....	15
2.1.3 Funcionalização da superfície para aprimoramento da detecção.....	17
2.1.4 Métodos de detecção aplicados aos dispositivos baseados em papel (PADs).....	18
2.2 Quimiluminescência: Mecanismos e Abordagens Analíticas.....	19
2.2.1 Mecanismos da reação Quimiluminescente.....	19
2.2.2 A Quimiluminescência do Luminol: Mecanismo e Aplicações.....	21
2.2.3 Quimiluminescência Aplicada a Dispositivos em Papel.....	23
2.3 Detecção Baseada em Imagens Digitais.....	24
2.3.1 Fundamentos da Detecção por Imagem Digital.....	24
2.3.2 Detecção Quimiluminescente baseada em Imagens Digitais.....	25
2.4 Vitamina B12.....	27
2.5 Captopril.....	29
3. Materiais e Métodos.....	30
3.1 Desenvolvimento dos Sistemas Analíticos.....	30
3.1.1 Confeção dos PADs por Recorte Automatizado com Plotter.....	30
3.1.1.1 PAD para uso com Sistema de Gotas Suspensas.....	30
3.1.1.2 PAD para Sistema de Imersão Automatizada.....	31
3.1.2 Desenvolvimento dos sistemas automatizados de análise.....	32
3.1.2.1 Sistema de Gotas Suspensas.....	33
3.1.2.2 Sistema de Imersão Automatizada.....	35
3.1.3 Circuitos Eletrônicos.....	37
3.1.3.1 Sistema Sistema de Gotas Suspensas.....	37
3.1.3.2 Sistema de Imersão Automatizada.....	38
3.1.4 Aplicativo Móvel para Aquisição de Dados.....	39
3.2 Validação dos Sistemas Analíticos.....	41
3.2.1 Prova conceito na determinação Vitamina B12.....	41
3.2.2 Prova conceito na determinação Captopril.....	41
3.3 Reagentes e Soluções.....	42
3.3.1 Determinação de Vitamina B12.....	42
3.3.1.1 Soluções Estoque.....	42

3.3.1.2	Preparo da Amostra.....	43
3.3.2	Determinação de Captopril.....	44
3.3.2.1	Soluções Estoque.....	44
3.3.2.2	Preparo da Amostra.....	45
3.3.2.3	Processo de Revestimento do Papel com Sílica e Luminol.....	46
3.3.2.4	Processo de Oxidação das Fibras de Celulose e Revestimento com Luminol.....	46
3.4	Procedimento de Leitura.....	46
3.4.1	Sistema de Gotas Suspensas.....	46
3.4.2	Sistema de Imersão Automatizada.....	49
4.	Resultados e Discussão.....	50
4.1	Otimização dos Parâmetros de Imagem.....	51
4.2	Determinação de Vitamina B ₁₂	52
4.2.1	Sistema de Gotas Suspensas.....	52
4.2.1.1	Planejamento e Otimização Experimental.....	52
4.2.1.2	Efeito de adições sucessivas de analito nas zonas de detecção (estratégia de pré-concentração).....	55
4.2.1.3	Desempenho Analítico.....	57
4.2.2	Sistema de Imersão Automatizado.....	62
4.2.2.1	Desempenho Analítico.....	62
4.3	Determinação de Captopril.....	65
4.3.1	Sistema de Gotas Suspensas.....	65
4.3.1.1	Influência da Modificação da Superfície com Sílica sobre a Intensidade do Sinal.....	65
4.3.1.2	Influência da Massa de Sílica Depositada nas Zonas de Detecção.....	66
4.3.1.3	Desempenho Analítico.....	68
4.3.2	Sistema de Imersão Automatizada.....	71
4.3.2.1	Influência da Oxidação das Fibras de Celulose com peróxido de hidrogênio..	71
4.3.2.2	Influência do Substrato de Papel no Desempenho Analítico do Dispositivo....	72
4.3.2.3	Influência da Velocidade de Imersão no Desempenho Analítico do Dispositivo.	73
4.3.2.4	Avaliação da linearidade do sistema luminol/Ca(OCl) ₂ sob condições otimizadas.....	74
4.3.3	Desempenho Analítico.....	75
5.	Conclusão e Perspectivas.....	79
	Referências Bibliográficas.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Progresso do número de publicações relacionadas aos microdispositivos baseados em papel entre 2012 e 2025, fornecido pela “ <i>Web of Science</i> ”	15
Figura 2. Esquema simplificado sobre quimiluminescência direta e indireta	20
Figura 3. Mecanismo simplificado da oxidação do luminol	22
Figura 4. Diagrama de cores do sistema RGB	25
Figura 5. Estruturas químicas da cobalamina	28
Figura 6. Esquema representativo das etapas de confecção do dispositivo	31
Figura 7. Dispositivo a base de papel (PAD) para o sistema de imersão automatizado.....	32
Figura 8. Projeto 3D do sistema de gota suspensa.....	33
Figura 9. Representação tridimensional do sistema de gota suspensa em condição operacional.....	35
Figura 10. Projeto 3D do sistema de imersão automatizada. (a) Lado frontal; (b) Lado posterior.....	36
Figura 11. Diagrama de controle do servo motor via ESP-32 utilizando sinal PWM.....	38
Figura 12. Interfaces do aplicativo móvel. (a) interface de pareamento via Bluetooth; (b) interface principal contendo: (1) região de aquisição dos dados em tempo real com os amostradores; (2) região de ajuste dos parâmetros de imagem, (3) região de ajuste dos parâmetros de leitura e por fim, (c) interface exibida após a medida, onde (4) é o gráfico de resposta gerado a partir dos dados adquiridos em tempo real.....	41
Figura 13 – Interface do aplicativo após a modificação do formato dos amostradores de RGB. (a) interface principal; (b) monitoramento do máximo da resposta quimiluminescente do analito ao longo do tempo, evidenciando a maior área efetiva de coleta do sinal; e (c) interface final da medida, contendo o gráfico da resposta analítica obtido a partir dos dados adquiridos em tempo real.....	42
Figura 14. Mecanismo para a reação quimiluminescente do luminol.....	43
Figura 15. Mecanismo de oxidação do captopril pelo hipoclorito (1) e mecanismo de quimiluminescência do luminol na presença de hipoclorito (2).....	44
Figura 16. Amostra de vitamina B12: (a) antes da acidificação, (b) durante o processo de digestão ácida e (c) após a digestão finalizada.....	45
Figura 17. Aplicação da solução de Co^{2+} no dispositivo de papel com o auxílio de uma micropipeta.....	48

Figura 18. (a) Suporte com PAD encaixado na base com dobradiças. (b) Interface do app com os amostradores posicionados sobre os spots do PAD.....	49
Figura 19. Montagem do sistema analítico.....	50
Figura 20. (a) Suporte removível contendo o PAD previamente tratado acoplado ao atuador linear. (b) Reservatórios de amostra e padrão posicionados no interior do sistema após a adição das soluções.....	51
Figura 21. Montagem do sistema analítico de Imersão Automatizada.....	52
Figura 22. Interpretação geométrica dos efeitos em um planejamento fatorial 2 ³ , cujas esferas indicam os valores médios das respostas nos diferentes ensaios avaliados.....	57
Figura 23. Efeito do volume total da solução padrão de cobalto(II) (0,1 mg/L) sobre a intensidade do sinal quimiluminescente.....	58
Figura 24. Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s). A altura máxima é usada como sinal analítico.....	59
Figura 25. Curva analítica antes (a) e após (b) o ajuste matemático para determinação de íon cobalto (II).....	60
Figura 26. Ensaio de repetibilidade da resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s) para uma solução padrão de Co(II) a 0,3 mg/L.....	62
Figura 27. Faixa linear da resposta analítica da componente B (u.a.) em função do tempo (s), empregada na etapa de quantificação.....	64
Figura 28. Curva analítica após o ajuste matemático para determinação de íon Co(II).....	65
Figura 29. Ensaio de repetibilidade da resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s) para as soluções padrões de 0,075 e 0,25 mg/L de Co(II).....	66
Figura 30. Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s) no dispositivo de Papel sem adição de sílica.....	67
Figura 31. Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s) no dispositivo de papel com adição de sílica.....	68
Figura 32. Efeito da massa de sílica adicionada na intensidade do sinal quimiluminescente.....	69
Figura 33. Imagens da superfície do papel funcionalizado com sílica onde: (a) corresponde ao papel sem adição de sílica, (b) à adição de 0,2 mg, (c) a 0,4 mg e (d) a 0,8 mg.....	70

Figura 34. Faixa linear da resposta analítica da componente B (u.a.) em função do tempo (s), empregada na etapa de quantificação de captopril.....	72
Figura 35. Curva analítica para a determinação de captopril, baseada na resposta da componente B (u.a.), com comportamento linear na faixa de 3 a 15 mg/L e coeficiente de determinação (R^2) de 0,999.....	72
Figura 36. Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s), obtida no ensaio sobre a influência do tratamento pré-oxidativo do dispositivo analítico de papel.....	73
Figura 37. Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s), obtida no ensaio sobre a influência do substrato de papel no desempenho analítico.....	74
Figura 38. Influência da velocidade de imersão (mm/s) sobre a intensidade do sinal quimiluminescente.....	75
Figura 39. Relação entre a intensidade do sinal quimiluminescente e a concentração de hipoclorito de cálcio no sistema luminol/ $\text{Ca}(\text{OCl})_2$	76
Figura 40. Faixa linear da resposta analítica da componente B (u.a.) em função do tempo (s), empregada na etapa de quantificação de captopril.....	77
Figura 41. Curva analítica para a determinação de captopril, baseada na resposta da componente B (u.a.), com comportamento linear na faixa de 12 a 19,5 mg/L e coeficiente de determinação (R^2) de 0,994.....	78
Figura 42. Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s) para diferentes concentrações de captopril (mg/L).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos componentes do dispositivo	34
Tabela 2 – Descrição dos componentes do dispositivo.....	37
Tabela 3 – Volumes das soluções estoque de hipoclorito de cálcio (500 mg/L) e de captopril (500 mg/L) adicionados a balões volumétricos de 5,0 mL para o preparo das soluções de análise	46
Tabela 4 – Fatores avaliados e Definição dos níveis utilizados no planejamento experimental.....	54
Tabela 5 – Resultados do planejamento fatorial 2^3 . R_n representam as respostas da n ésima repetição; L, P e K correspondem às concentrações de luminol, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidróxido de potássio (KOH), respectivamente. Apresentam-se também os valores da média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) para cada ensaio	55
Tabela 6 – Efeitos principais e interações estimados no planejamento fatorial 2^3 , com intervalos de confiança a 95% calculados usando erro padrão de 3,16% e $t_{crítico}$ de 2,004....	55
Tabela 7 – Valores da concentração de vitamina B ₁₂ nas amostras comerciais e obtidas pelo instrumento proposto	61
Tabela 8 - Valores da concentração de vitamina B ₁₂ nas amostras comerciais e obtidas pelo instrumento proposto.....	63
Tabela 9 - Valores da massa de Captopril nas amostras comerciais e obtidas pelo instrumento proposto e de referência.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

PADs - Dispositivos analíticos baseados em papel

SERS - Espectroscopia Raman intensificada por superfície

CL-PADs - Dispositivos analíticos baseados em papel com detecção por quimioluminescência

cPED - Dispositivo eletroquímico baseado em papel cromatográfico

LIAMA - Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica

RGB - Sistema de coordenadas cujas cores correspondem a vermelho (red, R), verde (green, G) e azul (blue, B).

ISO - Sensibilidade do sensor à luz

FOCUS - Foco da imagem

EXP - Exposição

SIZE - Tamanho dos amostradores

1. Introdução e Objetivos

Dispositivos baseados em papel (PADs) têm se mostrado soluções práticas e acessíveis para a realização de análises químicas, especialmente em contextos que exigem simplicidade, baixo custo e portabilidade^[1]. Eles funcionam utilizando o papel como suporte para reações químicas, possibilitando respostas tanto qualitativas quanto quantitativas no processo de detecção de diferentes analitos. Devido às propriedades capilares desse substrato, é possível realizar o transporte do fluido de interesse, sem a necessidade de elementos de propulsão externos. A combinação dessas características os torna promissores para aplicações em diagnóstico clínico, controle ambiental e análise de alimentos e fármacos^[2-5].

Esses dispositivos têm suas origens baseadas no trabalho desenvolvido por Yagoda^[6], em 1937. Nesse estudo, foi proposto um método simples e eficaz para a fabricação de zonas hidrofóbicas em papéis de filtro por meio da deposição de parafina através de contato térmico. O trabalho demonstrou a possibilidade da detecção e quantificação de íons metálicos como cobre e níquel, com base na intensidade da coloração gerada em áreas confinadas.

Entretanto, a sua aplicação moderna na área de química analítica, foi impulsionada apenas em 2007, a partir do trabalho desenvolvido por Whitesides et al.^[7], que apresentaram um sistema baseado em papel para a detecção colorimétrica de glicose e proteínas na urina. O dispositivo proposto foi fabricado a partir da técnica de fotolitografia com resina, que possibilita a criação de micro canais hidrofílicos bem definidos, permitindo o transporte capilar de fluidos sem a necessidade de componentes externos, como bombas.

Na literatura, existem diversos trabalhos que utilizam métodos colorimétricos, fluorescentes e eletroquímicos como estratégia de detecção em dispositivos analíticos de papel. Entre as alternativas disponíveis, a detecção por luminescência química, tem se destacado como uma abordagem promissora devido ao alto desempenho, baixo fundo de interferência, análise rápida, simplicidade instrumental, além de não requerer fontes externas de excitação óptica^[8].

Apesar dessas vantagens, essa estratégia ainda é pouco explorada em trabalhos descritos na literatura, e isso se deve à necessidade de softwares específicos capazes de monitorar, em tempo real e em um curto intervalo de tempo (milissegundos), a variação da intensidade luminosa emitida durante a reação.

A detecção quimiluminométrica faz uso de estratégias ópticas que, muitas vezes, exigem elementos de detecção com dimensões superiores às do próprio dispositivo analítico, o que pode comprometer a portabilidade do sistema. Uma alternativa viável para superar essa

limitação é a utilização de imagens digitais obtidas em tempo real por meio de equipamentos acessíveis, como *smartphones*, câmeras digitais ou *webcams*.

O emprego de imagens digitais obtidas em tempo real possibilita a realização de medidas do sinal analítico a partir de diferentes sistemas de cores. No entanto, o sistema de cores RGB é o mais empregado, quantificando as intensidades relativas das componentes vermelha (R), verde (G) e azul (B) dos pixels que compõem a imagem, possibilitando tanto análises qualitativas quanto quantitativas^[9,10]. Essa abordagem é eficaz especialmente em reações que envolvem fenômenos de absorção, reflexão ou emissão no espectro eletromagnético da região do visível, oferecendo simplicidade e acessibilidade sem comprometer o desempenho analítico.

Dentro desse cenário, o objetivo geral do trabalho foi desenvolver e avaliar duas estratégias automatizadas e portáteis para a detecção quimiluminométrica em papel baseada em imagens digitais adquiridas em tempo real.

Para isso, os objetivos específicos foram:

- Fabricar dispositivos baseados em papel cromatográfico e adesivos;
- Construir equipamentos de baixo custo para realização das reações analíticas de quimiluminescência de forma controlada.
- Otimizar o aplicativo desenvolvido para controle dos equipamentos e aquisição do sinal analítico (RGB);
- Avaliar o desempenho dos dispositivos de papel e dos equipamentos na determinação de vitamina B₁₂ em soluções injetáveis e de captopril em comprimidos.

2. Referencial Teórico

2.1 Dispositivos Baseados em Papel (PADs)

2.1.1 Histórico e evolução dos sensores em papel

Dispositivos analíticos baseados em papel (PADs) são plataformas projetadas para realizar análises químicas e bioquímicas por meio de reações que ocorrem em substratos porosos, geralmente constituídos de papel cromatográfico ou de filtro^[11,12]. Esses materiais destacam-se por seu baixo custo, ampla disponibilidade comercial e por apresentarem propriedades físicas ajustáveis como, por exemplo, espessura, composição, porosidade e área superficial^[13] que influenciam diretamente em processos como absorção e adsorção de reagentes e controle de fluxo^[14].

O uso do papel como substrato analítico antecede em décadas o conceito moderno dos PADs. O trabalho de Yagoda em 1937, foi um dos primeiros a registrar a utilização de testes confinados em papel para detecção de metais, empregando zonas delimitadas por barreiras hidrofóbicas^[6]. A partir desse trabalho, anos depois, Muller e Clegg em 1949, desenvolveram um sistema automático de cromatografia em papel, onde conseguiram registrar automaticamente os perfis de eluição de diferentes substâncias por meio da variação da transmitância de luz monocromática detectada por um tubo fotomultiplicador^[15].

Outro marco importante que consolidou a aplicação de substratos de papel em análises químicas ocorreu a partir da década de 1950, com a introdução de papéis indicadores e fitas reagentes destinadas à detecção de compostos em fluidos biológicos. Um exemplo notável foi o desenvolvimento das tradicionais tiras para detecção de glicose na urina por Free et al., que propuseram um teste baseado em uma tira de papel impregnada com glicose oxidase, peroxidase e ortotoluidina, a qual na presença de glicose apresenta coloração azul^[16].

Décadas mais tarde, em 2007, o conceito desses dispositivos foi formalmente introduzido pelo grupo de pesquisa de Whitesides, onde, o papel deixa de atuar como um substrato passivo de separação e passa a funcionar como um sistema analítico integrado, composto por canais microfluídicos que direcionam o fluxo capilar, permitindo que reações químicas e detecções ocorram de forma ativa e integrada, sem a necessidade de instrumentação externa^[7].

Atualmente, esses dispositivos vêm sendo amplamente explorados em diversas áreas da química analítica, com aplicações voltadas à detecção de analitos em amostras biológicas, alimentos, águas e medicamentos. No âmbito clínico, por exemplo, aplicações em amostras

como lágrimas^[17], sangue^[18], saliva^[19] e urina^[20] têm sido amplamente reportadas, empregando reações enzimáticas, detecção colorimétrica ou eletroquímica. No setor ambiental e industrial, destacam-se estudos voltados à detecção de metais pesados em águas^[21] e ao monitoramento de compostos bioativos em formulações farmacêuticas^[22], evidenciando a versatilidade e aplicabilidade dos PADs em diferentes contextos analíticos.

A Figura 1 apresenta o aumento no número de publicações relacionadas ao uso de dispositivos analíticos baseados em papel no período de 2012 a 2025, conforme dados extraídos da base “*Web of Science*”, utilizando as palavras-chave “*Paper-based analytical device*”, “*Microfluidic paper-based analytical device*” e “*Paper-based devices*”.

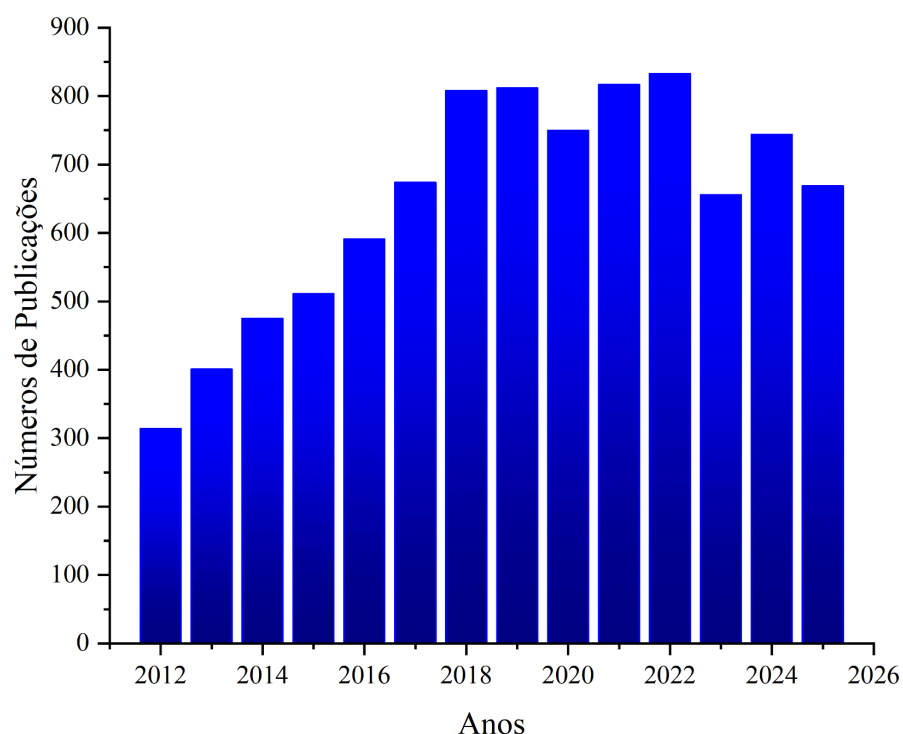


Figura 1 – Progresso do número de publicações relacionadas aos microdispositivos baseados em papel entre 2012 e 2025, obtidos da “*Web of Science*”.

2.1.2 Materiais e métodos de fabricação

Devido à grande aplicabilidade desses dispositivos, é importante destacar a influência das propriedades físico-químicas do papel no processo de análise química. Características como grau de absorção, porosidade, espessura, capacidade de adsorção e controle de fluxo, podem influenciar a interação com o analito e a sensibilidade do método, sendo, portanto, essenciais para o desempenho final do dispositivo^[23]. Há diversos estudos na literatura, que

empregam diferentes composições dos substratos de papel em suas análises químicas, de modo que a escolha depende do ensaio a ser realizado.

Um exemplo é o trabalho desenvolvido por Pholsiri et al. (2022), no qual foi proposto um dispositivo eletroquímico baseado em papel cromatográfico (cPED) para a determinação simultânea de Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD) em óleo de cannabis. Nesse estudo, o papel cromatográfico atuou como fase estacionária, permitindo a separação dos analitos, além de funcionar como meio de transporte para a eluição até a zona de detecção. O dispositivo apresentou resposta linear entre 10 e 500 $\mu\text{g/mL}$, com limites de detecção de 3,27 $\mu\text{g/mL}$ para THC e 2,85 $\mu\text{g/mL}$ para CBD, demonstrando sua eficácia para análise simultânea desses compostos em amostras de cannabis^[24].

O trabalho de da Silva et al. (2018) é um exemplo do emprego de papel sulfite como substrato em PADs, aplicado à detecção colorimétrica de fenacetina em amostras de cocaína apreendidas. Nesse dispositivo, o papel sulfite foi utilizado como plataforma analítica em substituição ao papel cromatográfico convencional, no qual a detecção foi realizada por meio da reação entre a fenacetina e a 1,2-naftoquinona-4-sulfonato de sódio (NQS) em meio alcalino. A intensidade da reação foi avaliada por análise de imagens digitais. O dispositivo demonstrou faixa linear de resposta entre 0 e 64,52 $\mu\text{g/mL}$ e limite de detecção de 3,5 $\mu\text{g/mL}$, evidenciando a viabilidade do papel sulfite em aplicações analíticas, especialmente em contextos forenses^[25].

Por último, o estudo de Tang et al. (2020) exemplifica o uso de membranas de nitrocelulose como plataforma analítica para testes point-of-care, nos quais a superfície do papel foi modificada com quitosana para aumentar a capacidade de imobilização de biomoléculas. A modificação foi avaliada em ensaios de fluxo lateral para ácidos nucleicos (NALFAs), nos quais a nitrocelulose atuou como suporte para imobilização das moléculas e meio de transporte capilar. O trabalho demonstrou um aumento significativo na sensibilidade de detecção do vírus da hepatite B (HBV), com a redução do limite de detecção de 0,5 nmol/L para 0,05 nmol/L, mostrando o potencial da modificação com quitosana para aprimorar dispositivos analíticos em papel^[26].

Além da escolha do tipo de papel, diversos métodos de confecção podem ser explorados durante o processo de fabricação dos PADs, cujo objetivo principal é o desenvolvimento de zonas hidrofóbicas ou regiões fisicamente delimitadas que atuem como barreiras, definindo áreas específicas de análise e permitindo o direcionamento controlado do fluxo da amostra, por ação das forças capilares, até a zona de detecção^[27,28]. Dentre os métodos disponíveis para a criação dessas barreiras hidrofóbicas, destacam-se técnicas como

impressão em cera^[29], fotolitografia^[30], impressão a jato de tinta^[31], impressão flexográfica^[32], impressão 3D em cera^[33], tratamento a laser^[34], recorte à laser ou com plotter^[35,36] e serigrafia^[37].

Entre as técnicas descritas, algumas têm sido mais amplamente empregadas em função da simplicidade operacional, do menor custo e da viabilidade para produção em maior escala. Nesse contexto, o recorte com plotter tem sido amplamente utilizado devido à sua capacidade de produzir geometrias bem definidas e reduzir o tempo de fabricação^[38]. Esse método baseia-se na delimitação física das regiões de análise por meio do corte preciso do papel, dispensando o uso de agentes hidrofobizantes ou etapas térmicas adicionais. Dessa forma, o controle do fluxo do fluido ocorre predominantemente pela geometria do dispositivo, eliminando a necessidade de modificações químicas na superfície do papel.

2.1.3 Funcionalização da superfície para aprimoramento da detecção

Além das propriedades físico-químicas intrínsecas do papel, diversos estudos têm investigado estratégias de funcionalização da superfície com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a seletividade analítica dos dispositivos de papel. Essas abordagens exploram características como a porosidade e a capacidade de adsorção do papel, permitindo o aumento da área superficial disponível para interação com o analito e a imobilização de reagentes ou biomoléculas.

Um exemplo foi o trabalho desenvolvido por Massumoto et al. (2022), no qual a superfície do substrato de papel foi funcionalizada com hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH), um polímero catiônico, em um ensaio colorimétrico bienzimático voltado para a detecção de sarcosina, biomarcador urinário associado ao câncer de próstata. Essa modificação restringiu a reação enzimática à uma área delimitada, promovendo maior intensidade na formação da coloração azul do indicador TMB. Como resultado, o limite de detecção foi reduzido de 12,6 $\mu\text{mol/L}$ para 0,6 $\mu\text{mol/L}$, representando uma melhora significativa na sensibilidade analítica^[39].

Outro exemplo foi o estudo de Manbohi e Ahmadi, em 2019, que desenvolveram um dispositivo eletroquímico microfluídico de papel (E μ PAN) funcionalizado para a detecção sensível e seletiva de dopamina. A zona de detecção foi modificada com uma mistura condutora à base de grafite, quitosana e polietilenoglicol (PEG), formando o eletrodo de trabalho. Com o intuito de otimizar a resposta eletroquímica, diferentes nanomateriais foram testados, onde a combinação de grafeno com o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) apresentou o melhor desempenho, apresentando uma redução significativa no limite de

detecção para 0,01 $\mu\text{mol/L}$ e ampla faixa linear de 0,5–120 $\mu\text{mol/L}$, possibilitando a análise de dopamina em amostras biológicas como sangue e urina^[40].

De forma geral, os trabalhos citados demonstram que a modificação da superfície dos PADs por meio do uso de polímeros sintéticos e naturais, biomoléculas e nanomateriais constitui uma estratégia eficaz para o aprimoramento do desempenho analítico. Essas modificações promovem o aumento da área superficial, a melhoria da transferência de elétrons, o confinamento das reações químicas e maior eficiência na imobilização das espécies ativas, resultando na redução dos limites de detecção, no aumento da sensibilidade e na ampliação da faixa linear de resposta, contribuindo para o melhor desempenho analítico desses dispositivos.

2.1.4 Métodos de detecção aplicados aos dispositivos baseados em papel (PADs)

Dentre os métodos de detecção empregados em PADs, destacam-se os colorimétricos, eletroquímicos e luminescentes, devido à sua simplicidade e baixo custo. Além disso, estudos mais recentes vêm integrando esses dispositivos a sistemas analíticos mais robustos, como espectrometria de massas e espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS), com o objetivo de ampliar a sensibilidade e a aplicabilidade em análises mais complexas^[41,42].

Dentre os métodos mencionados, o colorimétrico é o mais utilizado em determinações com PADs, principalmente devido à sua simplicidade instrumental, baixo custo, facilidade de interpretação dos resultados e compatibilidade com equipamentos acessíveis, como câmeras de *smartphones* e *scanners*. Existem diversos trabalhos, que empregam esse tipo de detecção em áreas variadas, como por exemplo, em segurança alimentar^[43], determinações de pesticidas^[44], análises clínicas^[45] e entre outros. No entanto, apesar das vantagens, os PADs colorimétricos ainda apresentam limitações em termos de sensibilidade^[46]. Essas limitações estão, em grande parte, associadas à baixa intensidade do sinal gerado e à falta de uniformidade na coloração, aspectos que podem ser influenciados tanto pelas propriedades do papel quanto por processos de migração ou separação do complexo analito-indicador^[47].

A detecção eletroquímica em dispositivos baseados em papel surgiu como uma alternativa ao método mencionado anteriormente, sendo introduzida em 2009 por Dungchai et al.^[48] O objetivo foi superar as limitações da detecção colorimétrica, oferecendo medições rápidas, com alta sensibilidade, seletividade, portabilidade e permitindo a análise de uma ampla variedade de analitos^[49-53]. Apesar das vantagens mencionadas, esse método de detecção ainda apresenta algumas limitações. Um dos principais desafios é o uso de

equipamentos de bancada caros, o que impacta negativamente o custo-benefício do dispositivo.

Também temos diversos métodos de detecção baseados em luminescência química que podem ser aplicados aos dispositivos analíticos em papel, sendo a fluorescência, eletroquimioluminescência e a quimioluminescência os mais comuns. Esses métodos se destacam por oferecerem alta sensibilidade, baixo limite de detecção, análise rápida e facilidade de miniaturização^[54]. Alguns estudos já demonstraram a viabilidade desses métodos, como na detecção de metais potencialmente tóxicos, fármacos ou biomarcadores específicos^[55-58]. No entanto, esse método também apresenta algumas limitações, como a necessidade de uma fonte de luz externa no caso da fluorescência, o uso de equipamentos ópticos sensíveis, a necessidade de monitoramento em tempo real, a baixa estabilidade de alguns reagentes e a falta de protocolos padronizados, o qual dificulta a aplicação prática^[59].

Por último, temos aplicações onde os PADs são acoplados a métodos de detecção mais robustos como espectrometria de massas e espectroscopia Raman de superfície aprimorada (SERS), essa integração visa adaptar essas técnicas a sistemas miniaturizados de baixo custo e fácil fabricação, atendendo à demanda por soluções descartáveis, estáveis e acessíveis^[60-62]. A integração dos dispositivos à base de papel a esses métodos, têm ampliado a sensibilidade e a aplicabilidade desses dispositivos em análises complexas. No entanto, essas abordagens ainda enfrentam desafios como o alto custo dos equipamentos e a necessidade de operadores qualificados.

2.2 Quimioluminescência: Mecanismos e Abordagens Analíticas

2.2.1 Mecanismos da reação Quimioluminescente

A luminescência é um fenômeno óptico classificado de acordo com o mecanismo responsável pela excitação das espécies emissoras, as quais emitem radiação eletromagnética ao retornarem ao estado fundamental. Quando esse processo ocorre por meio da absorção de radiação eletromagnética, o fenômeno é denominado fotoluminescência. Em outras situações, a excitação pode ser promovida por estímulos distintos, como reações eletroquímicas (eletroquimioluminescência), aquecimento (termoluminescência) ou reações químicas exotérmicas, caracterizando a quimioluminescência. Dentre essas modalidades, a quimioluminescência destaca-se por não requerer uma fonte externa de radiação para a

excitação, uma vez que a energia necessária à emissão é fornecida diretamente pela reação química^[63,64].

Segundo Roda et al. (2011), para que uma reação química resulte na emissão de radiação eletromagnética, determinados critérios devem ser atendidos. Além de a reação ser exotérmica, o estado eletrônico excitado deve ser acessível ao longo da coordenada da reação, e a liberação dessa energia por meio da emissão de fótons deve representar uma via energeticamente favorável. Dessa forma, o produto formado no estado excitado deve apresentar características que permitam a emissão da radiação eletromagnética ou, alternativamente, possibilitar a transferência dessa energia para outra espécie capaz de emitir luz^[65].

No contexto da quimiluminescência, a excitação eletrônica pode ocorrer de duas formas: direta, quando a energia liberada pela reação química gera diretamente um produto no estado eletronicamente excitado (P*), o qual emite radiação eletromagnética ao retornar ao estado fundamental; ou indireta, quando a energia da reação é transferida por ressonância para uma molécula aceptora (fluoróforo adjacente, Q*), que, uma vez excitada, também emite radiação eletromagnética ao relaxar para o estado fundamental, conforme ilustrado na Figura 2. Dessa forma, a quantificação do analito é realizada a partir da intensidade da radiação eletromagnética emitida na reação quimiluminescente, a qual varia proporcionalmente com a concentração da espécie analisada^[66].

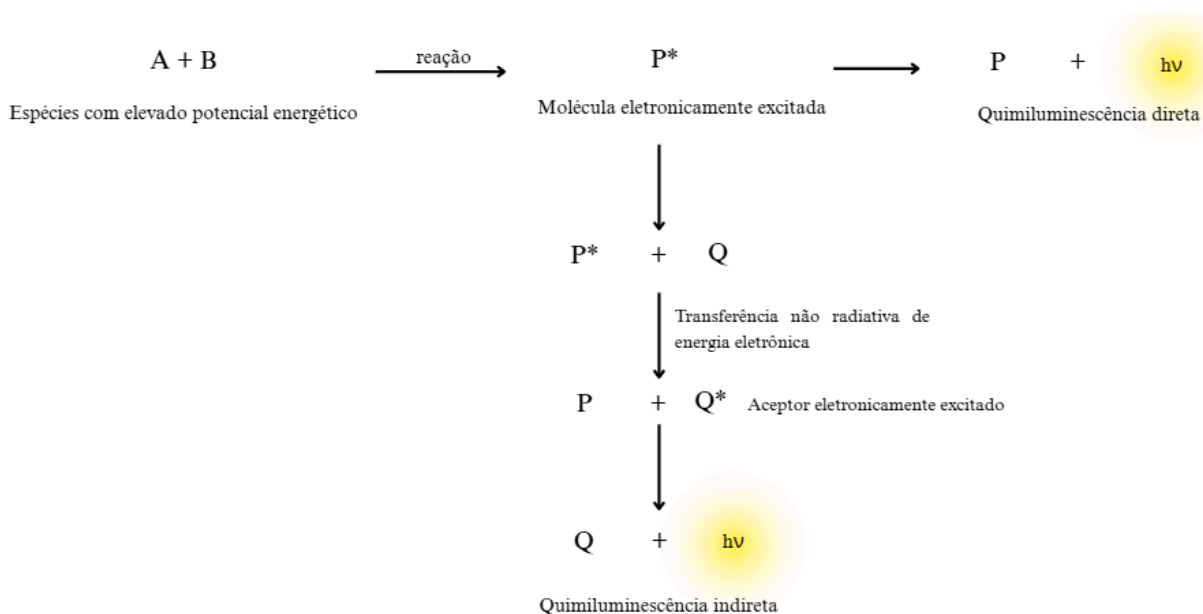


Figura 2 – Esquema simplificado sobre quimiluminescência direta e indireta.

A intensidade da radiação eletromagnética emitida em reações quimiluminescentes pode ser influenciada por diferentes parâmetros experimentais como pH, temperatura,

velocidade da reação e concentração dos reagentes, além de fatores como a polaridade do meio e o rendimento quântico do sistema. Vale destacar que, essas reações podem ocorrer em diferentes fases, mas é no meio líquido que se concentram as principais aplicações analíticas, conforme discutido por Ferreira e Rossi (2002)^[67].

Como citado anteriormente, o método de detecção por quimioluminescência apresenta elevada sensibilidade, em grande parte por dispensar fontes externas de excitação, o que favorece uma razão sinal-ruído mais elevada. Além disso, dependendo da reação envolvida, o próprio analito pode atuar como catalisador, aumentando a eficiência do sistema. Outra vantagem é a versatilidade do método, que pode ser facilmente acoplado a diversas técnicas analíticas^[68].

Um exemplo de aplicação analítica da detecção por quimioluminescência foi apresentado por Pulgarín et al. (2018), que desenvolveram um método para determinar carbamatos em amostras de solo utilizando um sistema HPLC-PCL. O sistema cromatográfico separou tiodicarbe, bendiocarbe e carbaril em extratos de solo, cujos eluatos foram posteriormente misturados a uma solução alcalina de Co(II) complexado com EDTA e irradiados com luz UV. Essa etapa promoveu a fotólise dos carbamatos, gerando radicais livres e outras espécies reativas capazes de oxidar o luminol e gerar emissão luminosa. Os limites de detecção alcançados foram de 0,05 mg/L para tiodicarbe, 0,09 mg/L para bendiocarbe e 0,17 mg/L para carbaril^[69].

O trabalho desenvolvido por Li et al. (2022), demonstra o uso desse método de detecção em sistemas de análise em fluxo (*flow injection analysis*, FIA), com o intuito de quantificar ácido ascórbico em refrigerantes. Nesse sistema, o ácido ascórbico atua como correagente na reação com luminol sob condições alcalinas, e a introdução de íons cobalto(II) promove um aumento significativo na intensidade do sinal luminoso. O método apresentou bom desempenho analítico, com faixa linear de 5,0 a 1000,0 ng/mL, limite de detecção de 1,3 ng/mL e adequada precisão e seletividade, sendo eficaz mesmo em matrizes complexas como bebidas^[70].

2.2.2 A Quimioluminescência do Luminol: Mecanismo e Aplicações

O luminol (5-amino-2,3-di-hidro-1,4-ftalazinediona) é um dos reagentes mais utilizados em reações de quimioluminescência direta. Sua oxidação leva à formação de um íon 3-aminoftalato eletronicamente excitado, que emite radiação eletromagnética ao retornar ao estado fundamental ($\lambda_{\text{máx}} = 425 \text{ nm}$)^[71]. Esse reagente se destaca por sua capacidade de

interagir com diversas substâncias químicas. Essas interações podem modificar o mecanismo e a velocidade da reação, permitindo que o analito atue como intensificador, inibidor ou catalisador. Com isso, a variação na intensidade da radiação eletromagnética emitida pode ser relacionada diretamente à sua concentração^[72]. O mecanismo da reação simplificada do luminol é apresentado na Figura 3.

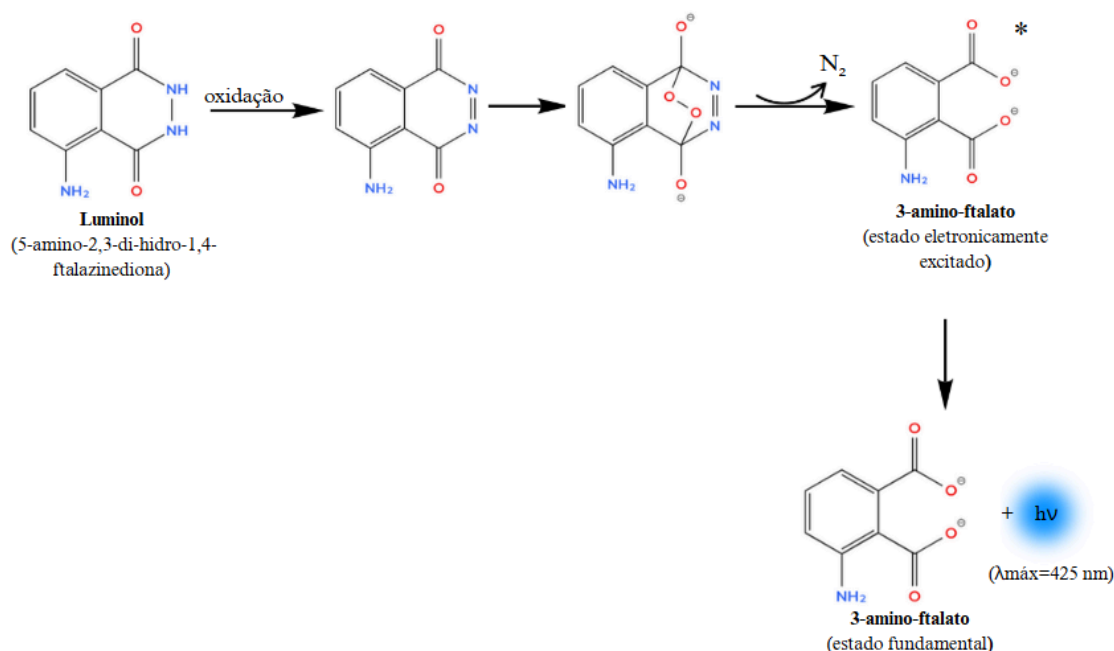


Figura 3 – Mecanismo simplificado da oxidação do luminol, adaptado de Andrade (2014)^[73].

Diversos oxidantes, como peróxido de hidrogênio, hipoclorito e permanganato, podem ser utilizados em reações de quimiluminescência com luminol, especialmente quando catalisadas por íons metálicos ou enzimas, possibilitando a detecção sensível de uma ampla gama de analitos, demonstrando sua grande aplicabilidade^[74].

Há também compostos que atuam como interferentes na reação quimiluminescente com luminol, provocando um processo conhecido como supressão, que resulta na diminuição do sinal de emissão. De acordo com Khan et al. (2014), isso ocorre porque essas substâncias podem alterar a ação catalítica, modificar as reações de oxirredução ou interagir diretamente com os reagentes presentes. Exemplos incluem o ácido ascórbico, fenóis, anilinas e compostos contendo grupos tiol, que reduzem significativamente a emissão de radiação eletromagnética^[75].

2.2.3 Quimiluminescência Aplicada a Dispositivos em Papel

Já foram destacadas as vantagens dos dispositivos de papel em análises químicas, assim como os benefícios da detecção por quimiluminescência. Ambas as abordagens compartilham características importantes, como baixo custo, simplicidade, versatilidade e portabilidade. A partir dessas características, surgiu o interesse em combiná-las, resultando no desenvolvimento dos dispositivos CL-PADs, que reúnem os benefícios dos PADs com a eficiência da quimiluminescência.

O estudo realizado por Yahyai et al. (2021) é um exemplo do uso de CL-PADs na área de controle ambiental. Os autores propuseram um método para detectar bendiocarbe, um pesticida usado no combate a pragas. A detecção baseou-se na intensificação da quimiluminescência gerada pela oxidação simultânea de pontos quânticos de carbono dopados com enxofre e nitrogênio (S,N-CQDs) e de bissulfito (SO_3^{2-}) por KMnO_4 em meio ácido. O método apresentou resposta linear na faixa de 0,1 a 10 $\mu\text{g/mL}$, com limite de detecção de 0,02 $\mu\text{g/mL}$, e demonstrou boa aplicabilidade na análise de amostras de água e suco, com altas taxas de recuperação, evidenciando sua precisão e confiabilidade analítica^[76].

No campo das análises clínicas, Liu et al. (2020) desenvolveram um dispositivo em papel com detecção baseada em quimiluminescência, empregando uma nanoenzima (Co-Fe@hemina) para a detecção do antígeno spike do SARS-CoV-2. O método apresentou um limite de detecção de 0,1 ng/mL, com uma faixa linear de 0,2-100 ng/mL, seletividade para o antígeno SARS-CoV-2 e com tempo total de análise de apenas 16 minutos, sendo compatível com a captura de sinal por câmera de celular, o que o torna uma alternativa promissora para triagens clínicas rápidas e de baixo custo durante pandemias^[77].

Por último, no campo de análise de alimentos temos o trabalho desenvolvido por Lawati et al. (2021). Neste trabalho foi desenvolvido um dispositivo em papel para determinação de compostos fenólicos em alimentos, a superfície do papel foi funcionalizada com uma estrutura metal-orgânica de cobalto-imidazol (CoMOF) que atuou como um intensificador da reação quimiluminescente entre o peróxido de hidrogênio e o luminol. A resposta do sistema foi proporcional à concentração de fenóis, apresentando limites de detecção na faixa de 0,12 a 1,23 $\mu\text{g/mL}$ para diferentes compostos fenólicos, como ácido gálico e ácido cafeico^[78].

Usualmente, análises quimiluminescentes dependem de luminômetros comerciais e tubos fotomultiplicadores (PMTs). Entretanto, com o desenvolvimento de novas tecnologias, detectores pixelados que utilizam matrizes de fotodiodos para captar luz e produzir imagens

de alta resolução, como sensores CCD, câmeras digitais e smartphones, têm se destacado como alternativas viáveis, acessíveis e eficientes para a detecção de sinais quimiluminescentes por meio de imagens digitais^[79].

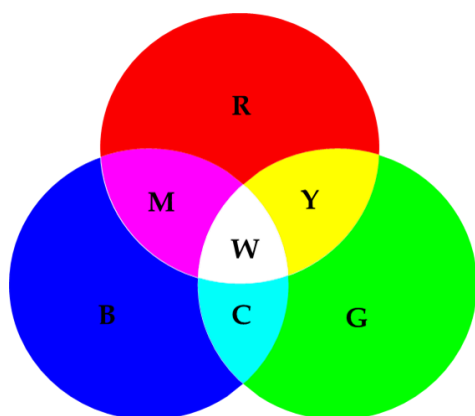
2.3 Detecção Baseada em Imagens Digitais

2.3.1 Fundamentos da Detecção por Imagem Digital

A detecção baseada em imagens digitais tem se destacado como uma ferramenta útil em análises químicas que envolvem variações ópticas, seja por mudanças de cor ou na intensidade de sinais luminescentes. Essa abordagem oferece vantagens significativas, como a simplicidade de uso, a fácil integração com dispositivos de imagem portáteis, como câmeras, *smartphones* e *webcams*, permitindo análises *in situ*.

Imagens digitais são representações numéricas bidimensionais formadas por uma matriz de elementos denominados pixels. Cada pixel representa uma pequena unidade da imagem e armazena informações específicas de uma determinada região de interesse (ROI). Com o uso de softwares de análise de cor, esses dados podem ser processados computacionalmente, permitindo sua conversão em informações quantitativas por meio de algoritmos e transformações matemáticas^[80].

Atualmente há uma diversidade de softwares de análises de cores que podem ser empregados em análises químicas e que se baseiam em diferentes sistemas de coordenadas de cores, como por exemplo, RGB, CMYK, HSV, CIELab ou XYZ^[80]. Dentre esses, o sistema de coordenadas RGB é o mais empregado, sendo composto pelas cores primárias vermelho (*red*, R), verde (*green*, G) e azul (*blue*, B). Cada cor no modelo RGB é codificada por 8 bits, totalizando 24 bits por pixel, o que permite representar 256 níveis de intensidade por canal. Os valores variam de 0 a 255, sendo 0 a ausência total da cor e 255 a intensidade máxima. O sistema RGB é classificado como aditivo, pois a combinação dos três canais em intensidades máximas resulta na cor branca^[82,83]. A Figura 4 apresenta o diagrama de cores do sistema RGB, incluindo suas cores secundárias e o sistema de coordenadas correspondente.



Pontos	Cores	Coordenadas
R	<i>Red</i> (vermelho)	255,0,0
G	<i>Green</i> (verde)	0,255,0
B	<i>Blue</i> (azul)	0,0,255
Y	<i>Yellow</i> (amarelo)	255,255,0
M	Magenta	255,0,255
C	<i>Cyan</i> (ciano)	0,255,255
W	<i>White</i> (branco)	255,255,255

Figura 4 – Diagrama de cores do sistema RGB

É importante destacar que, ao utilizar imagens digitais como estratégia de detecção, diversos parâmetros relacionados à captura da imagem devem ser cuidadosamente controlados, já que podem influenciar diretamente os resultados obtidos. De acordo com o estudo de Soares et al. (2023), fatores como distância de captura da câmera, condições de iluminação, abertura da lente, foco, tempo de exposição entre outros, podem influenciar na sensibilidade e precisão das medições^[84].

Como mencionado anteriormente, o uso de imagens digitais como ferramenta de detecção apresenta grande potencial para diversas aplicações analíticas, devido ao seu bom desempenho em análises qualitativas e quantitativas. Essa abordagem se destaca em várias áreas, como análises clínicas, por exemplo, na determinação de metadona (MET) em testes rápidos^[85]; análises de alimentos, como a quantificação de capsaicínides em extratos de pimenta^[86]; análises farmacêuticas, para a determinação de isoniazida em medicamentos^[87]; e análises ambientais, na detecção de cloreto para avaliação da salinidade do solo^[88].

2.3.2 Detecção Quimiluminescente baseada em Imagens Digitais

Dentre as aplicações analíticas das imagens digitais, destaca-se seu uso em determinações quimiluminescentes, pela capacidade de registrar com precisão variações na intensidade luminosa geradas por reações químicas. A integração de detectores de imagem à quimiluminescência combina a sensibilidade da técnica com a praticidade e eficiência das imagens digitais, resultando em uma plataforma analítica acessível e econômica.

Um dos trabalhos pioneiros nesse campo foi desenvolvido por Roda et al. (2014), que propuseram um método para a determinação de lactato em fluido oral e suor, baseado na

oxidação enzimática do analito catalisada pela L-lactato oxidase, com geração de peróxido de hidrogênio, o qual é posteriormente detectado por meio do sistema quimiluminescente luminol/H₂O₂/HRP, em que a HRP (peroxidase de raiz-forte) atua como catalisador da reação. A emissão de luz foi captada por uma câmera de smartphone, e as imagens geradas foram analisadas quantitativamente com o software de código aberto ImageJ. O método permitiu a quantificação em menos de cinco minutos, alcançando limites de detecção de 0,5 mmol/L para fluido oral e 0,1 mmol/L para suor, demonstrando desempenho analítico satisfatório^[89].

Outra aplicação foi o estudo conduzido por Xing et al. (2020) no qual desenvolveram um sensor baseado em dupla detecção para detecção colorimétrica e quimiluminescente, mas não simultânea, para mapear a concentração de flúor em águas superficiais em Suzhou, China. Nesse caso, foi desenvolvido um aplicativo próprio pelo grupo de pesquisa, capaz de realizar as análises químicas em campo e mapear a região de interesse. A detecção quimiluminescente foi baseada na reação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com o sistema formado por BPEA (9,10-bis(feniletinil)antraceno, atuando como fluoróforo), imidazol (como catalisador) e CCPO (oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila), como reagente oxalato), resultando na emissão de luz. O sistema apresentou desempenho analítico promissor, com limite de detecção de 98,32 nmol/L e faixa linear entre 0,1 e 20 µmol/L ($R^2 = 0,9854$), evidenciando seu potencial para aplicações ambientais baseadas em dispositivos portáteis e detecção por imagens digitais^[90].

O método de detecção quimiluminescente por imagens digitais também tem sido aplicado em dispositivos de papel. Um exemplo é o estudo desenvolvido por Kumar et al. (2021), baseado na reação entre luminol/Co²⁺-H₂O₂, cuja eficiência foi avaliada na detecção de peróxido de hidrogênio no leite. A captura do sinal foi realizada por meio de um smartphone, e a análise da intensidade foi feita com o software ImageJ. Essa abordagem, apresentou ampla faixa linear (50 nmol/L a 1 µmol/L) e baixo limite de detecção (35 nmol/L), além de reduzir o consumo de amostras e reagentes^[91].

Outra aplicação, foi o estudo desenvolvido por Sun et al. (2025) no qual desenvolveram um dispositivo microfluídico de papel, cujo sistema integra a captura de imagem via smartphone, o controle automatizado do processo de reação e análise de dados por aplicativo. Utilizando imunoglobulina G (IgG) de coelho como modelo, a plataforma alcançou limite de detecção de 62,4 pg/mL, superando métodos tradicionais como ELISA colorimétrico. Além disso, a detecção da proteína tau, biomarcador da doença de Alzheimer, apresentou limite de detecção de 26,1 pg/mL, abaixo do valor clínico de corte. Essa tecnologia representa um avanço significativo para diagnósticos no local de atendimento, combinando alta sensibilidade, baixo custo e facilidade de uso^[92].

A partir dos trabalhos apresentados, podemos notar a ampla aplicação da detecção quimiluminescente utilizando imagens digitais como ferramenta analítica, oferecendo vantagens importantes, como alta sensibilidade, seletividade e acessibilidade.

Contudo, é importante destacar que, na maioria dos estudos, a detecção não ocorre em tempo real. Como a intensidade da quimiluminescência diminui com o avanço da reação, é necessário que a coleta de imagens seja feita em diferentes períodos de tempo a fim de melhorar a precisão da análise, o que torna o processo mais complexo. Diante disso, nota-se a necessidade do desenvolvimento de softwares específicos capazes de monitorar, em tempo real e em intervalos curtos (milissegundos), a variação da intensidade luminosa emitida durante a reação.

2.4 Vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂, também conhecida como cobalamina (C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P), é um composto de coordenação que atua como micronutriente essencial ao organismo humano. É encontrada predominantemente em alimentos de origem animal e frequentemente incluída em suplementos alimentares ou formulações farmacêuticas. A vitamina B₁₂ é amplamente utilizada no tratamento de anemia perniciosa e está associada à redução do risco de doenças cardiovasculares, uma vez que participa do metabolismo da homocisteína, contribuindo para a diminuição de seus níveis circulantes^[93].

Esse composto de coordenação possui um núcleo de corrina formado por quatro anéis pirrólicos reduzidos que coordenam um átomo central de cobalto. Esse átomo metálico encontra-se ligado axialmente a dois ligantes: na posição α , o grupo 5,6-dimetilbenzimidazol, coordenado ao cobalto por meio de um átomo de nitrogênio, e na posição β , um ligante variável (R), que pode ser CH₃, H₂O, CN⁻ ou OH⁻, originando as diferentes formas da vitamina B₁₂. Dentre essas, a cianocobalamina (R = CN⁻) destaca-se por sua maior estabilidade química e ampla disponibilidade comercial^[94,95]. A Figura 5 representa as variações estruturais da cobalamina.

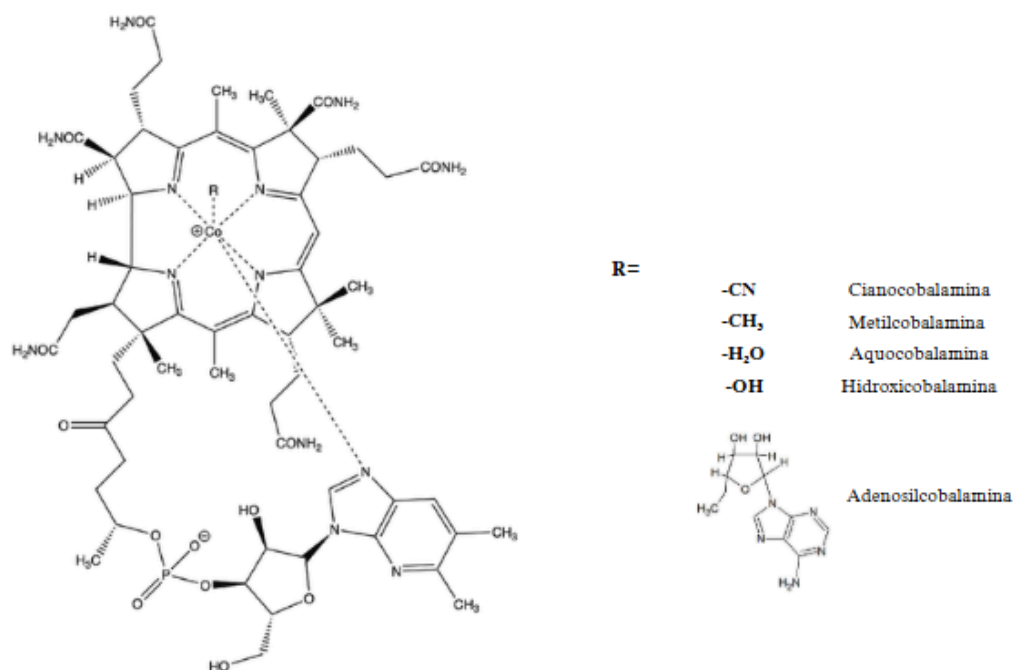


Figura 5 – Estruturas químicas da cobalamina, adaptado de Santos et al. (2023)^[96]

A determinação de vitamina B₁₂ tem sido amplamente investigada na literatura, envolvendo a aplicação de diversas técnicas analíticas em diferentes matrizes. Entre os métodos mais empregados, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), frequentemente acoplada a detectores como espectrometria de massas, fluorescência, absorção atômica e detector de arranjo de diodos (DAD)^[97-99]. No entanto, essas técnicas geralmente requerem instrumentação complexa, alto custo operacional e etapas extensas de preparo de amostras. Nesse contexto, os métodos baseados em quimiluminescência têm se destacado como alternativas analíticas atrativas, uma vez que oferecem alta sensibilidade, baixo sinal de fundo e simplicidade instrumental, além de serem particularmente adequados para aplicações em sistemas miniaturizados e dispositivos analíticos portáteis.

Um exemplo foi o estudo desenvolvido por Domínguez-Romero et al. (2018) no qual propuseram um sensor de fluxo quimiluminescente com superfície renovável, utilizando esferas com luminol imobilizado e um sistema multicomutado automatizado. Como prova de conceito, a metodologia foi aplicada à determinação de vitamina B₁₂ em amostras farmacêuticas, alcançando um limite de detecção de 0,5 µg/L e faixa linear de 1,7 a 50 µg/L, além de apresentar concordância com métodos de referência, como o ICP-MS^[100].

Já Lok et al. (2015) desenvolveram um sistema *lab-on-chip* baseado na reação luminol-peróxido, catalisado pelos íons Co(II) liberados da molécula de vitamina B₁₂. O dispositivo microfluídico opera em dois modos distintos: com ou sem pré-tratamento externo

da amostra. Em ambos os modos, foram obtidas amplas faixas lineares (de 0,10 ng/mL a 10 µg/mL), baixos limites de detecção (até 0,368 pg/mL) e tempos analíticos reduzidos (3,6 a 6 s). O sistema foi aplicado com sucesso à análise de comprimidos nutricionais e gemas de ovo, demonstrando sensibilidade, rapidez e baixo consumo de amostra^[101].

2.5 Captopril

O captopril, 1-[(2S)-3-mercaptopropionil]-L-prolina, é um fármaco que atua como inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA). Seu uso é amplamente difundido no tratamento da hipertensão arterial e da insuficiência cardíaca congestiva, uma vez que promove a redução da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, a diminuição da pressão arterial^[102].

Entre os métodos disponíveis para a determinação desse fármaco, destacam-se a titulação^[103], fluorescência^[104], espectrofotometria UV-Vis^[105], métodos colorimétricos^[106] e quimiluminescentes^[107]. Dentre essas abordagens, a determinação de captopril por quimiluminescência tem se mostrado particularmente atrativa, em razão de características como alta sensibilidade, baixos limites de detecção, ampla faixa linear, tempo de resposta reduzido e a simplicidade instrumental envolvida.

O método desenvolvido por Rodrigues e Santos (2012) demonstra a aplicação da quimiluminescência na determinação de captopril em formulações farmacêuticas. Para isso, foi implementado um sistema de fluxo com multibombeamento (MPFS) totalmente automatizado. A reação baseia-se no aumento da emissão quimiluminescente do complexo $Ru(bpy)_3^{2+}$, que é inicialmente oxidado por Ce(IV) a $Ru(bpy)_3^{3+}$ em meio ácido, sendo posteriormente reduzido pelo captopril. O método proposto apresentou faixa linear de concentração entre 2×10^{-3} e $1,5 \times 10^{-1}$ mmol/L ($R = 0,9996$, $n = 6$), com uma frequência analítica de aproximadamente 58 determinações por hora e geração de 620 µL de resíduos por análise^[108].

O mesmo princípio de detecção também pode ser aplicado à análise de captopril em fluidos biológicos, como a urina. Um exemplo disso é o estudo realizado por Fu et al. (2017), que utilizou um sistema de injeção em fluxo com detecção por quimiluminescência (FI-CL). A técnica se baseia na reação entre o sistema diperiodatoargentato(III) e ácido sulfúrico, cuja emissão de luz é significativamente aumentada na presença de captopril. Apresentou boa seletividade, sensibilidade (limite de detecção de 0,05 µg/mL) e reprodutibilidade (RSD de 2,0% para 5 µg/mL), com resposta linear entre 0,3 e 15 µg/mL. Na análise de comprimidos e

amostras de urina humana, apresentou recuperações entre 83,1% e 112,5%, e resultados comparáveis aos obtidos por HPLC^[109].

Por último, tem-se o estudo desenvolvido por Lima et al. (2015), no qual foi proposto um sistema de análise quimiluminescente em fluxo multicomutado para a determinação de captopril em formulações farmacêuticas. A técnica baseia-se na reação entre o captopril e o hipoclorito. O hipoclorito excedente atua como oxidante do luminol, promovendo a emissão de luz, como o captopril consome parte do hipoclorito, há uma supressão do sinal quimiluminescente proporcional à sua concentração. O sistema demonstrou alta sensibilidade e precisão, com limite de detecção de 2,0 µmol/L, boa linearidade ($R = 0,997$) e rendimento analítico de 164 determinações por hora^[110].

3. Materiais e Métodos

Esta seção descreve, de forma detalhada, os procedimentos utilizados para a confecção dos dispositivos analíticos em papel, dos sistemas automatizados para controle das reações quimiluminescentes, dos aplicativos criados para a detecção colorimétrica por imagens digitais, bem como os reagentes e soluções preparadas para cada etapa dos ensaios analíticos.

3.1 Desenvolvimento dos Sistemas Analíticos

3.1.1 Confecção dos PADs por Recorte Automatizado com Plotter

A confecção dos dispositivos analíticos baseados em papel (PADs) foi projetada para atender às especificidades mecânicas de cada um dos dois equipamentos automatizados desenvolvidos neste trabalho. Dessa forma, a geometria dos dispositivos foi adaptada para permitir o acoplamento eficiente aos sistemas de gota suspensa e de imersão, respectivamente.

3.1.1.1 PAD para uso com Sistema de Gotas Suspensas

Inicialmente, para o processo de confecção do PAD, foi realizada a montagem de uma estrutura composta por três camadas: uma folha de papel cromatográfico (Whatman nº 1), um adesivo dupla face e uma lâmina de poliéster (transparência para impressoras a laser). Para isso, uma camada de adesivo dupla face foi aplicada à superfície inferior do papel, sobre a qual foi fixada a lâmina de poliéster, conferindo maior rigidez e suporte físico ao dispositivo.

Essa etapa possibilitou a obtenção de uma estrutura mais estável, além de facilitar o manuseio durante os procedimentos analíticos.

O dispositivo analítico foi confeccionado a partir de recortes realizados com o auxílio de uma plotter de corte (Silhouette®), o que permitiu elevada precisão na definição das zonas de trabalho, sendo esta etapa essencial para a delimitação das regiões de detecção sobre o papel. O layout do dispositivo foi elaborado no software gráfico Silhouette Studio®, consistindo em oito zonas de aplicação independentes ($\varnothing = 7\text{ mm}$), destinadas à deposição do analito ou do reagente. Com esse design, é possível confeccionar até trinta dispositivos individuais a partir de uma única folha de papel cromatográfico (20x20 cm), otimizando o uso dos materiais e aumentando a produtividade do processo. A Figura 6 apresenta um esquema representativo das etapas de confecção do dispositivo, desde a montagem das camadas até o recorte final. É importante ressaltar que, após a etapa de recorte (Figura 6(c)), é necessário remover o excesso de papel. Essa remoção é feita de forma simples e manual, destacando-se o material excedente do dispositivo, de modo que restam apenas as zonas de detecção circulares, conforme ilustrado na Figura 6(d).

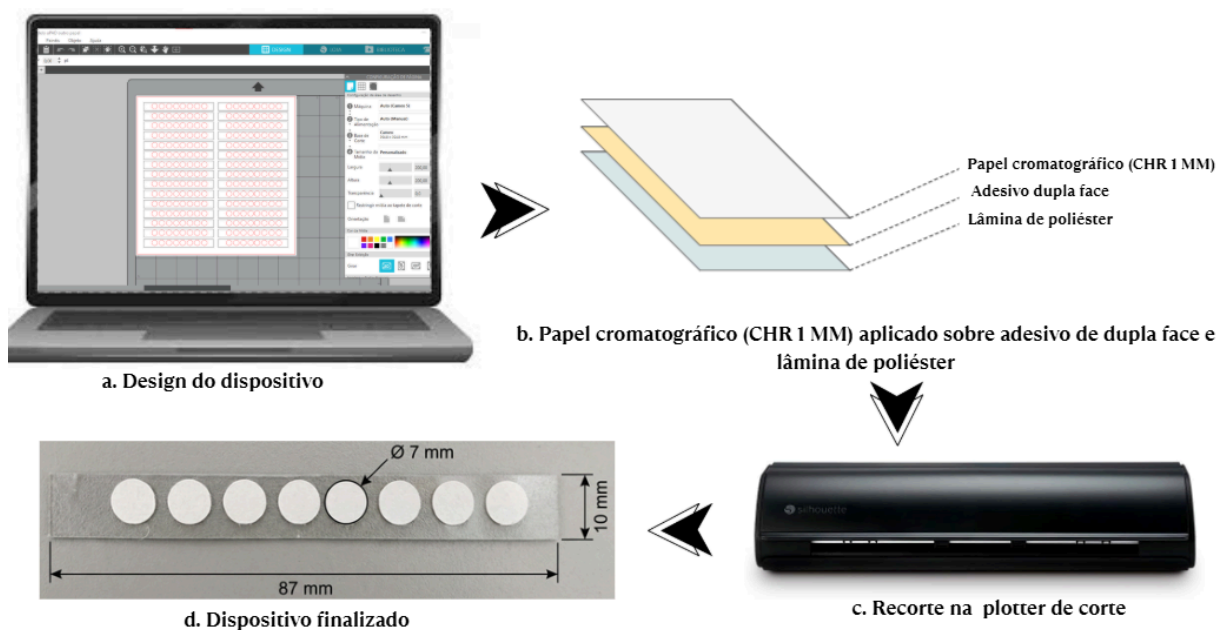


Figura 6 – Esquema representativo das etapas de confecção do dispositivo contendo oito zonas de detecção circulares ($\varnothing = 7\text{ mm}$).

3.1.1.2 PAD para Sistema de Imersão Automatizada

Para o segundo equipamento, que opera através da imersão automatizada do dispositivo na solução, foi desenvolvido um layout distinto. Foram avaliados dois tipos de

papel: o papel cromatográfico (Whatman nº 1) e o papel com adesivo acrílico aquoso (PIMACO).

A confecção dos dispositivos em papel cromatográfico seguiu o protocolo de recorte automatizado descrito anteriormente, dispensando o uso da lâmina de poliéster, uma vez que a estrutura foi fixada diretamente em um suporte rígido de poli(ácido lático) (PLA) confeccionado a partir de uma impressora 3D. De modo análogo, os dispositivos utilizando papel adesivo também foram submetidos ao mesmo protocolo; contudo, devido às propriedades adesivas agregadas a este substrato, o processo foi otimizado pela eliminação da etapa de montagem da estrutura em três camadas.

O layout de ambos os dispositivos foi elaborado no software gráfico *Silhouette Studio*®, consistindo em tiras de papel (75 x 13 mm) que posteriormente, foram fixadas ao suporte rígido de PLA. Na sequência, realizou-se a remoção manual do excesso de papel com o auxílio de um bisturi, mantendo-se sobre o suporte apenas às zonas de detecção. A Figura 7 apresenta o dispositivo analítico de papel (PAD) desenvolvido para o sistema de imersão automatizado.

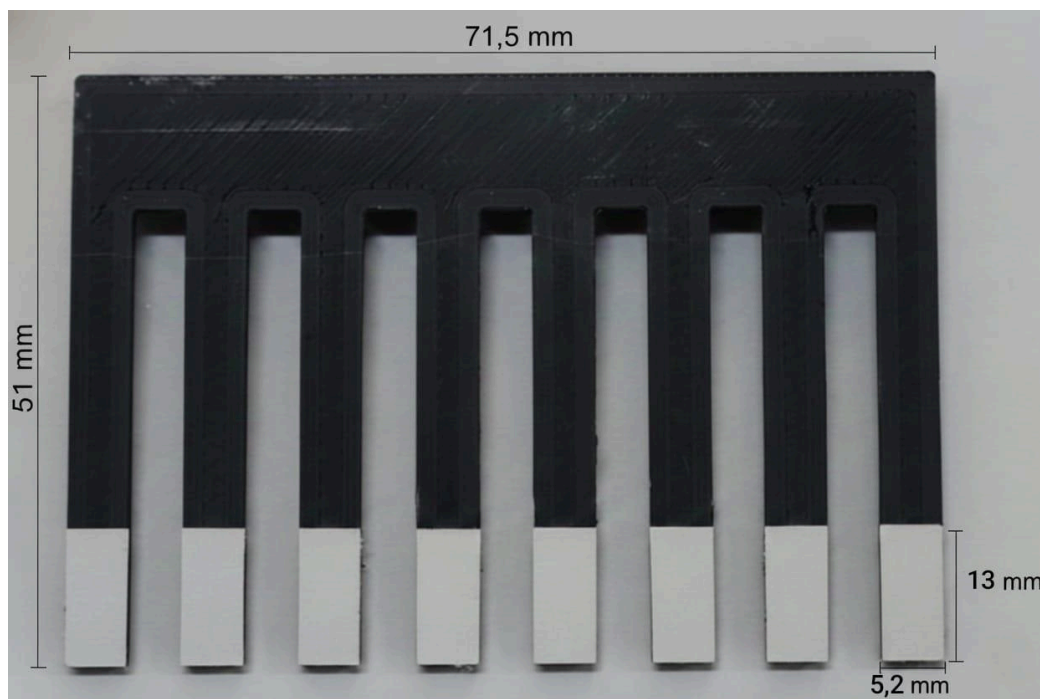


Figura 7 – Dispositivo a base de papel (PAD) para o sistema de imersão automatizado.

3.1.2 Desenvolvimento dos sistemas automatizados de análise

Ambos os sistemas foram desenvolvidos com o objetivo de eliminar a interferência da radiação externa e garantir condições controladas durante a captura das imagens

quimiluminescentes. Elas foram confeccionadas a partir de uma impressora 3D (Creality K1), utilizando filamento de PLA. Para isso, as estruturas foram previamente projetadas no software *open source* Blender, de modo a integrar o dispositivo analítico à base de papel (PAD) ao sistema de detecção por imagem digital via *smartphone*, garantindo o alinhamento preciso e reproduzível entre os componentes. Apesar da base construtiva comum, o design interno de cada cabine foi customizado para atender à mecânica de cada sistema, como descrito detalhadamente nos itens 3.1.2.1 e 3.1.2.2.

3.1.2.1 Sistema de Gotas Suspensas

Neste sistema, o design interno da cabine foi dimensionado para acomodar uma base com dobradiças para suporte do dispositivo PAD. O design priorizou o alinhamento entre a zona de detecção do papel e o ponto de formação da gota suspensa, permitindo que o dispositivo se mova sem obstruções até o contato com o reagente e, ao mesmo tempo, posicione-se frente à câmera do *smartphone*. A Figura 8 ilustra o modelo tridimensional do projeto, com dimensões externas de $100 \times 70,2 \times 115$ mm, sendo constituído por oito elementos principais, conforme detalhado na Tabela 1.

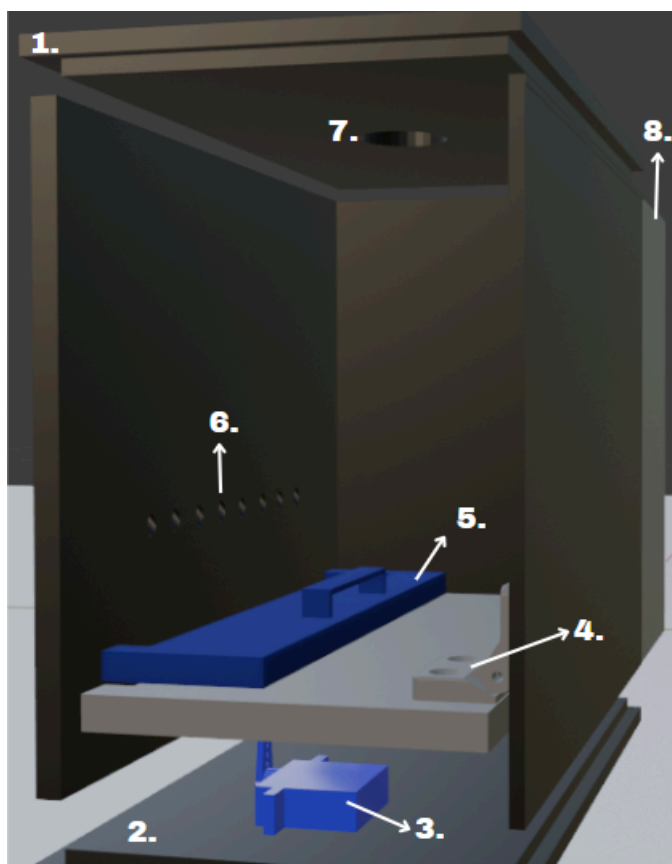


Figura 8 – Projeto 3D do sistema de gota suspensa.

Tabela 1 – Descrição dos componentes do dispositivo

Número do item	Componente	Descrição funcional
1.	Tampa Superior	Estrutura destinada à fixação do smartphone, contendo abertura circular de 10 mm de diâmetro para alinhamento da câmera e aquisição das imagens digitais.
2.	Base Inferior	Estrutura de sustentação da cabine, garantindo estabilidade mecânica e suporte a todos os componentes do sistema.
3.	Servo Motor	Atuador linear integrado ao sistema, utilizado para promover a movimentação automatizada de componentes externos, como o suporte do dispositivo analítico.
4.	Base Articulada com Dobradiças	Mecanismo de articulação mecânica que possibilita o ajuste angular e posicional do suporte do dispositivo analítico, assegurando o contato adequado durante a interação entre o dispositivo de papel e os reagentes.
5.	Suporte para Posicionamento do Dispositivo Analítico (PAD)	Responsável pela fixação e alinhamento precisos do dispositivo analítico de papel no interior da cabine, contribuindo para a reprodutibilidade na aquisição das imagens.
6.	Entrada para as ponteiras da micropipeta eletrônica multicanal.	Conjunto de oito aberturas laterais com diâmetro interno de 3 mm, destinadas à inserção das ponteiras de uma micropipeta eletrônica multicanal para adição simultânea das soluções.
7.	Abertura Superior para Câmera do <i>Smartphone</i>	Abertura destinada ao enquadramento da câmera do smartphone, permitindo a captura adequada das imagens geradas durante o ensaio quimiluminescente.
8.	Módulo de circuito eletrônico	Módulo responsável pelo controle do servo motor e pelo gerenciamento dos demais componentes eletrônicos do sistema.

A Figura 9 ilustra o sistema em condição operacional, com o PAD já inserido no suporte interno e a aplicação simultânea dos reagentes sendo realizada pela micropipeta eletrônica multicanal. A partir dessa imagem é possível visualizar de forma integrada o funcionamento do sistema durante a etapa de detecção. O dispositivo foi desenvolvido visando simplicidade, portabilidade e eficiência na aquisição dos sinais de emissão quimiluminescente, viabilizando análises laboratoriais de baixo custo e boa precisão.

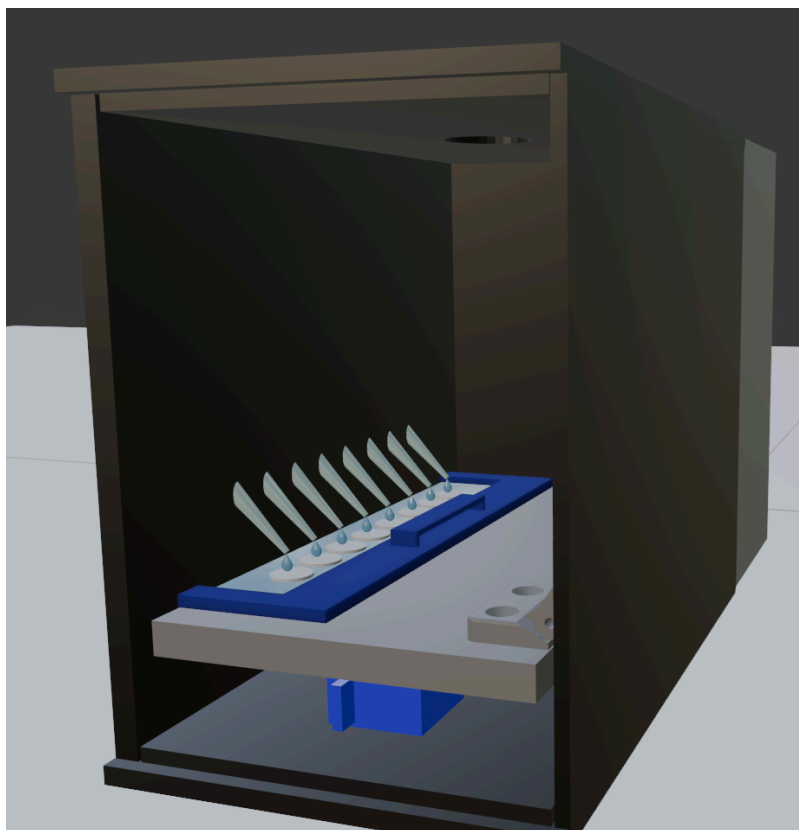


Figura 9 – Representação tridimensional do sistema de gota suspensa em condição operacional.

3.1.2.2 Sistema de Imersão Automatizada

Para este sistema, o design da cabine foi adaptado para comportar o reservatório de amostras/reagentes na região interna. A estrutura foi modelada de forma a permitir o curso completo do módulo de movimento linear durante os ciclos de imersão e elevação do PAD, garantindo tanto o contato direto das zonas de detecção com a solução de interesse quanto o posicionamento preciso necessário para a aquisição dos resultados ao longo do procedimento de análise. A Figura 10 apresenta o modelo tridimensional do projeto, com dimensões externas de $300 \times 108 \times 105$ mm e é constituída por sete elementos estruturais e funcionais, descritos na Tabela 2.

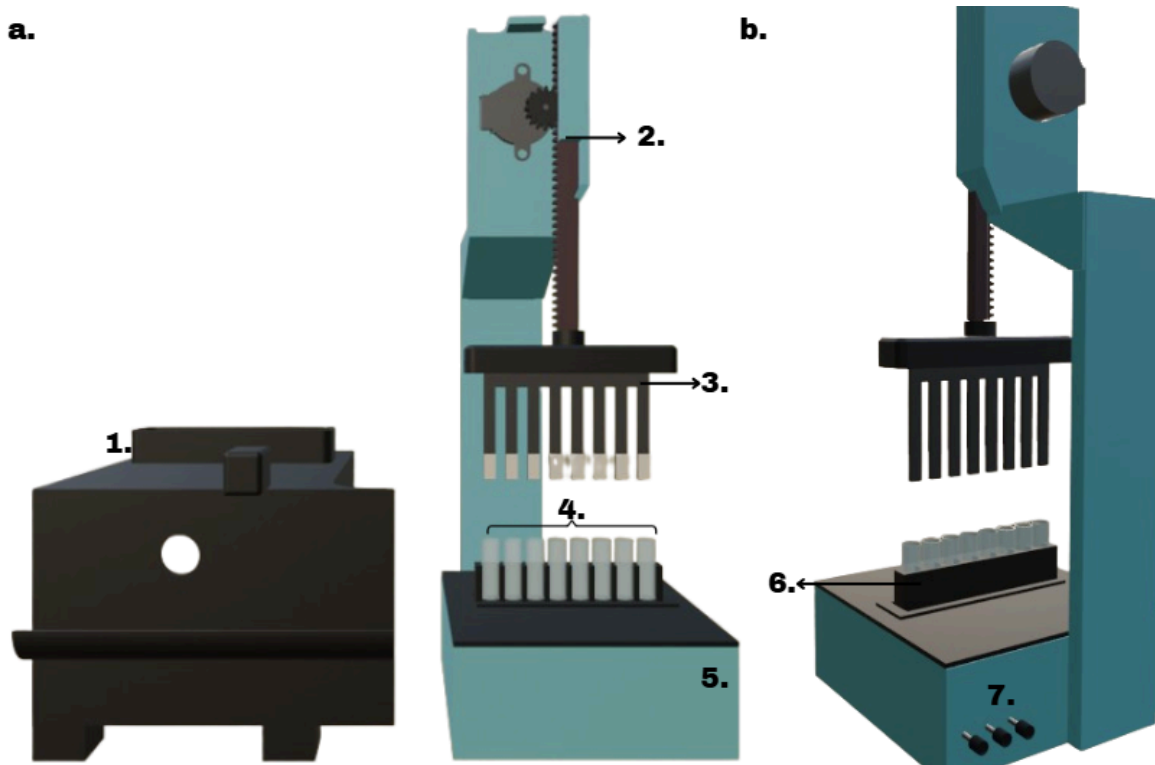


Figura 10 – Projeto 3D do sistema de imersão automatizada. (a) Lado frontal; (b) Lado posterior.

Tabela 2 – Descrição dos componentes do dispositivo

Número do item	Componente	Descrição funcional
1.	Cabine de Análise	Estrutura responsável pelo isolamento da área de trabalho e pela criação de um ambiente controlado para os ensaios. Possui abertura circular superior de 10 mm de diâmetro destinada ao posicionamento e alinhamento da câmera para aquisição das imagens.
2.	Mecanismo de Atuador Linear	Sistema destinado à conversão do movimento rotacional do mini motor de passos em deslocamento vertical controlado. É constituído por mini motor de passos, engrenagem dentada (pinhão), cremalheira e guia linear, assegurando posicionamento preciso do dispositivo analítico de papel (PAD) durante as etapas de imersão e elevação.
3.	Suporte Removível para os Dispositivos Analíticos (PADs)	Componente acoplado à extremidade móvel do mecanismo de atuador linear, responsável pela fixação, alinhamento e manutenção da posição do PAD ao longo de todo o ciclo de movimentação vertical.
4.	Reservatórios de Amostras/Reagentes	Conjunto de oito reservatórios cilíndricos, cada um com 8 mm de diâmetro, 39 mm de altura e capacidade volumétrica individual de 1 mL, destinados ao acondicionamento das soluções de amostra e reagentes.
5.	Módulo de circuito eletrônico	Unidade eletrônica responsável pelo acionamento e controle do motor de passos, bem como pela integração e gerenciamento dos demais componentes eletrônicos do sistema.
6.	Suporte Removível dos Reservatórios de Amostra/Reagente	Estrutura de apoio projetada para acomodar e posicionar de forma precisa os reservatórios de amostra/reagente no interior da cabine, facilitando as operações de carregamento e descarregamento das soluções.
7.	Botões de Ajustes Manuais de Imersão e Elevação do PAD	Dispositivos de interface manual conectados ao módulo de circuitos eletrônicos, destinados ao ajuste fino e ao controle manual da posição vertical do PAD.

3.1.3 Circuitos Eletrônicos

3.1.3.1 Sistema de Gotas Suspensas

O módulo de circuito eletrônico desse sistema é composto por um microcontrolador denominado ESP-32, que possui conectividade Wi-Fi e Bluetooth integrada, permitindo a comunicação sem fio com outros dispositivos. A escolha da ESP-32 se deve à sua capacidade de processamento eficiente, versatilidade e baixo custo, características ideais para aplicações em sistemas analíticos portáteis. No sistema desenvolvido, o microcontrolador é responsável por enviar sinais do tipo PWM (modulação por largura de pulso) ao servo motor, controlando a movimentação angular do suporte onde o dispositivo analítico à base de papel está localizado.

De forma geral, o microcontrolador recebe os comandos enviados via Bluetooth por meio do aplicativo desenvolvido pelo grupo de pesquisa e, em seguida, transmite esses sinais ao servo motor. Quando a posição desejada é atingida, o motor trava automaticamente, garantindo que o suporte permaneça estável durante o processo de leitura quimiluminescente. Essa automação permite maior reprodutibilidade e padronização das análises, além de reduzir a interferência manual no processo. A Figura 11 apresenta um diagrama representativo do sistema de controle.

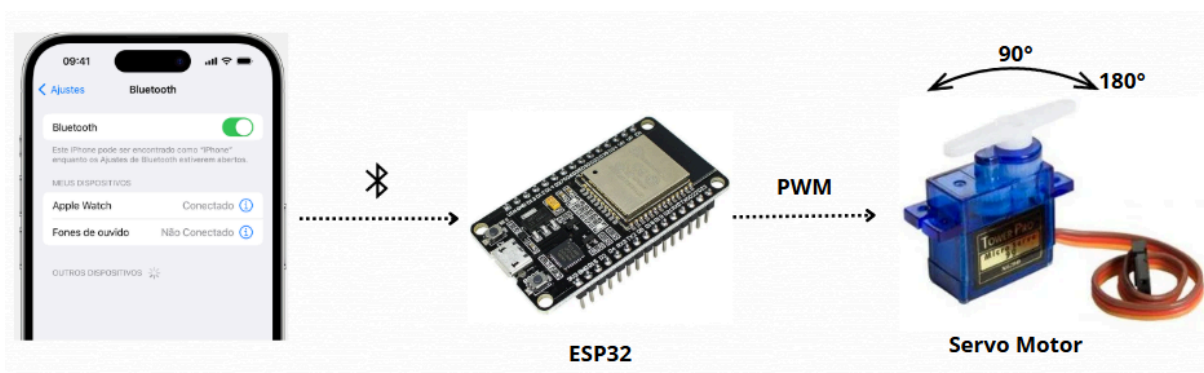


Figura 11 – Diagrama de controle do servo motor via ESP-32 utilizando sinal PWM

3.1.2.2 Sistema de Imersão Automatizada

O módulo de circuito eletrônico desse sistema foi desenvolvido com base no microcontrolador Arduino Uno, selecionado devido à sua robustez e facilidade de integração. Esse microcontrolador é responsável pelo gerenciamento do mini motor de passos unipolar

28BYJ-48 (5V), bem como pelo processamento dos comandos recebidos tanto do aplicativo móvel quanto dos botões de operação manual incorporados ao equipamento.

Para o acionamento do motor de passos, foi empregado um driver baseado no circuito integrado ULN2003, conectado ao Arduino Uno. Esse driver é responsável por converter os sinais elétricos sequenciais gerados pelo microcontrolador nos pulsos necessários para definir a velocidade, o sentido de rotação e o número de passos executados pelo motor. Esse arranjo garante o controle preciso do posicionamento do suporte do PAD durante as etapas de imersão nos reservatórios de amostra.

Além do controle automatizado, o sistema conta com botões de ajuste manual, os quais possibilitam ao operador realizar correções finas na posição vertical do suporte. Essa funcionalidade é particularmente útil durante o alinhamento inicial do dispositivo, possibilitando movimentos controlados de imersão e elevação.

Para viabilizar o controle remoto via aplicativo, o sistema incorpora um módulo Bluetooth HC-05, conectado ao Arduino Uno. Esse módulo recebe os comandos enviados pelo aplicativo desenvolvido pelo grupo de pesquisa e os transmite ao microcontrolador, que os converte nos sinais necessários para o acionamento do motor de passos. Essa comunicação sem fio possibilita o acionamento, a parada e o deslocamento programado do suporte, promovendo maior automação e padronização do procedimento analítico.

3.1.4 Aplicativo Móvel para Aquisição de Dados

O grupo de pesquisa LIAMA desenvolveu um aplicativo em linguagem Java, compatível com o sistema Android®, com a finalidade de controlar os instrumentos e permitir a aquisição dos sinais emitidos pelo analito por meio da detecção baseada em imagens digitais. Os dados são coletados em tempo real por um smartphone (Samsung Galaxy J2), plotados, armazenados e disponibilizados para análises posteriores.

Além da aquisição dos sinais, o aplicativo é responsável pelo controle dos sistemas de acionamento dos dois equipamentos desenvolvidos. A comunicação é realizada via Bluetooth, estabelecendo interface direta com o microcontrolador ESP-32 e, no caso do sistema baseado em Arduino Uno, com o módulo Bluetooth HC-05 acoplado ao microcontrolador. Esse arranjo permite o acionamento e a desativação do servo motor ou do motor de passos, assegurando o funcionamento adequado de ambos os dispositivos a partir de uma única plataforma de software.

A interface do aplicativo é ilustrada na Figura 12. Na interface inicial (Figura 12a), é solicitada a conexão via Bluetooth com o sistema analítico. Após o estabelecimento da conexão, a interface de aquisição (Figura 12b) exibe a imagem do dispositivo em tempo real, acompanhada de oito amostradores circulares, permitindo a extração dos valores das componentes R (vermelho), G (verde) e B (azul) para cada zona de detecção.

Nessa mesma interface, o usuário pode configurar parâmetros como a posição e o tamanho dos amostradores (SSZ), o número de leituras (MEAS) e ajustes relacionados à captura de imagem, incluindo balanço de branco (AWB), tempo de exposição (EXP) e sensibilidade à luz (ISO). Esses recursos proporcionam uma melhor adaptação das imagens às características do dispositivo analítico, garantindo maior controle na aquisição dos sinais.

Após o posicionamento dos amostradores RGB, a definição dos parâmetros de leitura e o ajuste das configurações de imagem, o analista pode iniciar a análise. Ao iniciar a análise, a terceira interface do aplicativo é ativada (Figura 12c) e um comando é transmitido via Bluetooth ao microcontrolador responsável pelo acionamento mecânico de cada equipamento.

No sistema baseado em gotas suspensas, o comando é enviado ao ESP-32, que aciona o servo motor responsável pelo deslocamento do suporte contendo o PAD, permitindo o contato com os reagentes suspensos sob a forma de gotas nas ponteiros de uma micropipeta eletrônica multicanal.

No sistema de imersão automatizado, o comando é transmitido ao módulo HC-05 conectado ao Arduino Uno, que aciona o motor de passos responsável pela movimentação do PAD nos reservatórios de amostras. Em ambos os sistemas, ao término da aquisição, os dados são automaticamente registrados e armazenados em arquivos de texto (.txt).

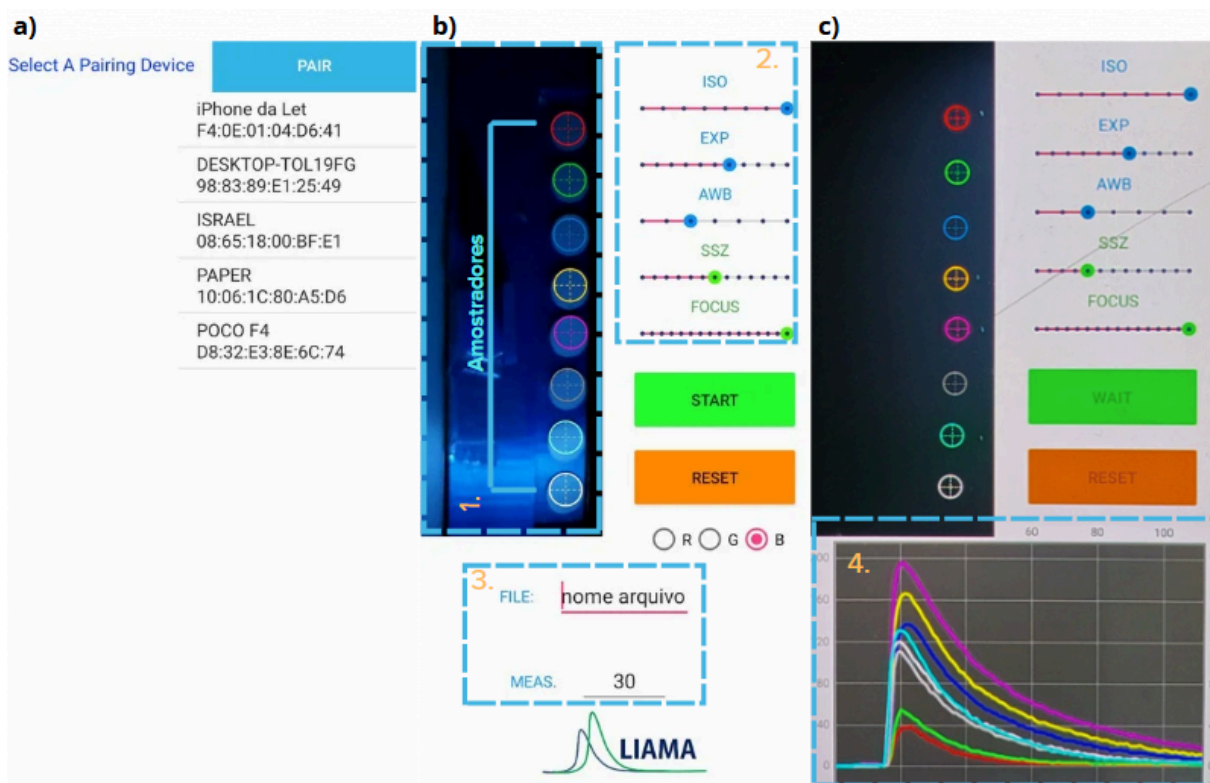


Figura 12 – Interfaces do aplicativo móvel para o sistema de gotas suspensas. (a) interface de pareamento via Bluetooth; (b) interface principal contendo: (1) região de aquisição dos dados em tempo real com os amostradores; (2) região de ajuste dos parâmetros de imagem, (3) região de ajuste dos parâmetros de leitura e por fim, (c) interface exibida após a medida, onde (4) é o gráfico de resposta gerado a partir dos dados adquiridos em tempo real.

Para o sistema de imersão automatizado, foi realizada uma modificação no formato dos amostradores de RGB. Diferentemente do sistema de elevação por gotas suspensas, no qual foram empregados amostradores circulares, o novo arranjo passou a utilizar amostradores retangulares, em função da mudança na geometria dos dispositivos analíticos em papel e do modo de operação baseado em imersão. A interface do aplicativo após essa modificação é apresentada na Figura 13.

O formato retangular foi adotado visando otimizar a captura do sinal luminoso, proporcionando maior área efetiva de coleta e melhor alinhamento com o campo de visão da câmera, o que resultou na melhoria da reprodutibilidade do sinal quimiluminescente no sistema de imersão automatizado.

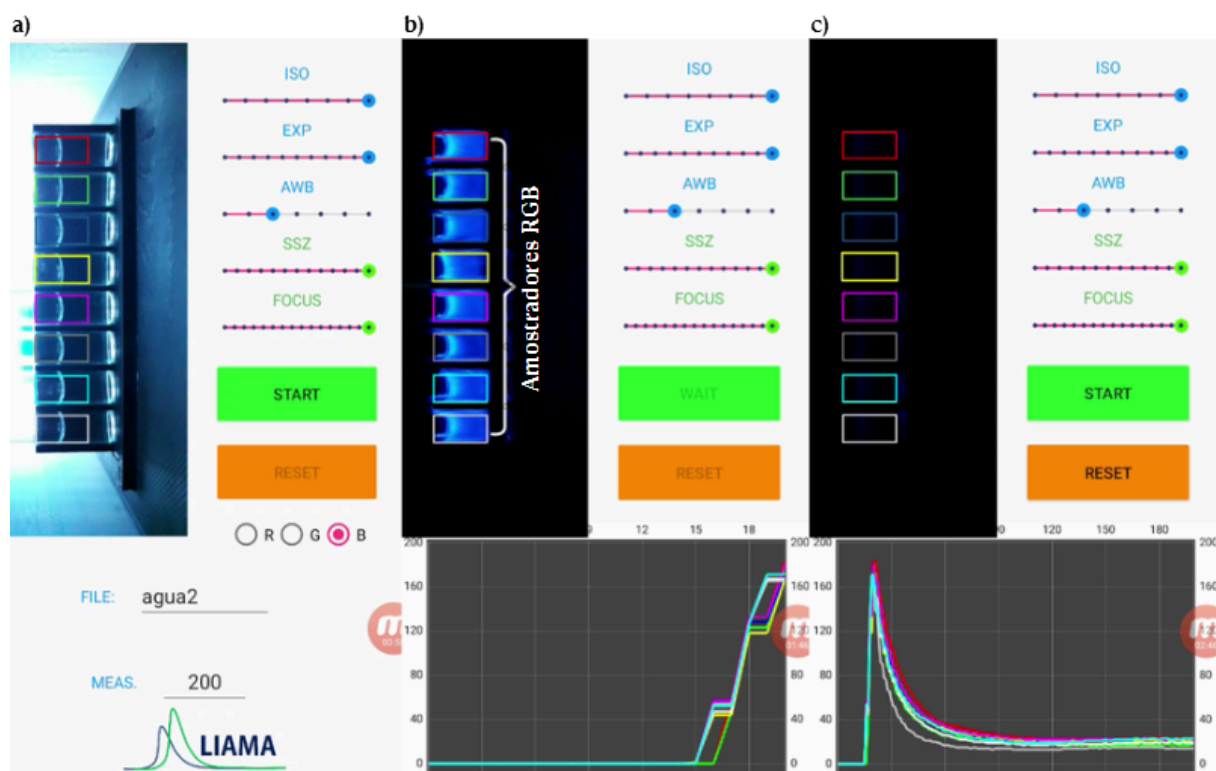


Figura 13 – Interface do aplicativo após a modificação do formato dos amostradores de RGB. (a) interface principal; (b) monitoramento do máximo da resposta quimiluminescente do analito ao longo do tempo, evidenciando a maior área efetiva de coleta do sinal; e (c) interface final da medida, contendo o gráfico da resposta analítica obtido a partir dos dados adquiridos em tempo real.

3.2 Validação dos Sistemas Analíticos

Para avaliar a eficiência dos sistemas analíticos desenvolvidos, foram realizadas determinações de vitamina B₁₂ em soluções injetáveis e de captopril em comprimidos.

3.2.1 Prova conceito na determinação Vitamina B₁₂

Para a vitamina B₁₂, a estratégia baseou-se em uma reação quimiluminescente entre peróxido de hidrogênio e luminol em meio básico, que resulta na formação de 3-aminofalato em estado excitado, responsável pela emissão de luz. Nessa reação, o íon Co(II) presente na estrutura da vitamina B₁₂ atua como catalisador. De modo que, quanto maior a concentração do íon Co(II) nessa reação, maior é a intensidade do sinal quimiluminescente gerado, estando diretamente relacionada à concentração de vitamina B₁₂^[110]. Esse princípio possibilita a determinação indireta da vitamina B₁₂ por meio da intensidade da emissão luminosa

registrada. O mecanismo da reação quimiluminescente do luminol pelo peróxido catalisado por íon metálico foi descrito por Sulaiman e colaboradores e está representado na Figura 14.

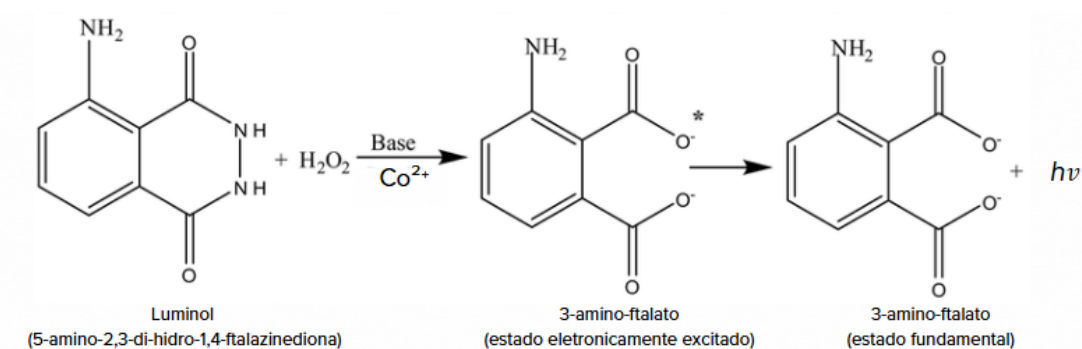


Figura 14 – Mecanismo para a reação quimiluminescente do luminol. Adaptado de: Sulaiman, 2019^[111].

3.2.2 Prova conceito na determinação Captopril

Já a determinação de captopril em comprimidos baseou-se no efeito de supressão do sinal de luminescência da reação entre luminol e hipoclorito de cálcio em meio básico. Esse processo ocorre em duas etapas: na primeira, o captopril, que contém um grupo tiol (-SH), reage com o hipoclorito, reduzindo a concentração do oxidante disponível no meio.

Na etapa seguinte, o hipoclorito remanescente oxida o luminol, gerando uma espécie excitada que, ao retornar ao estado fundamental, emite radiação visível. No entanto, como parte do oxidante foi consumido pelo captopril, o sinal luminoso gerado é suprimido^[113]. Assim, o captopril atua como um “analito interferente”, provocando uma redução da intensidade de emissão luminosa proporcional ao aumento de sua concentração. O mecanismo da reação quimiluminescente está representado na Figura 15.

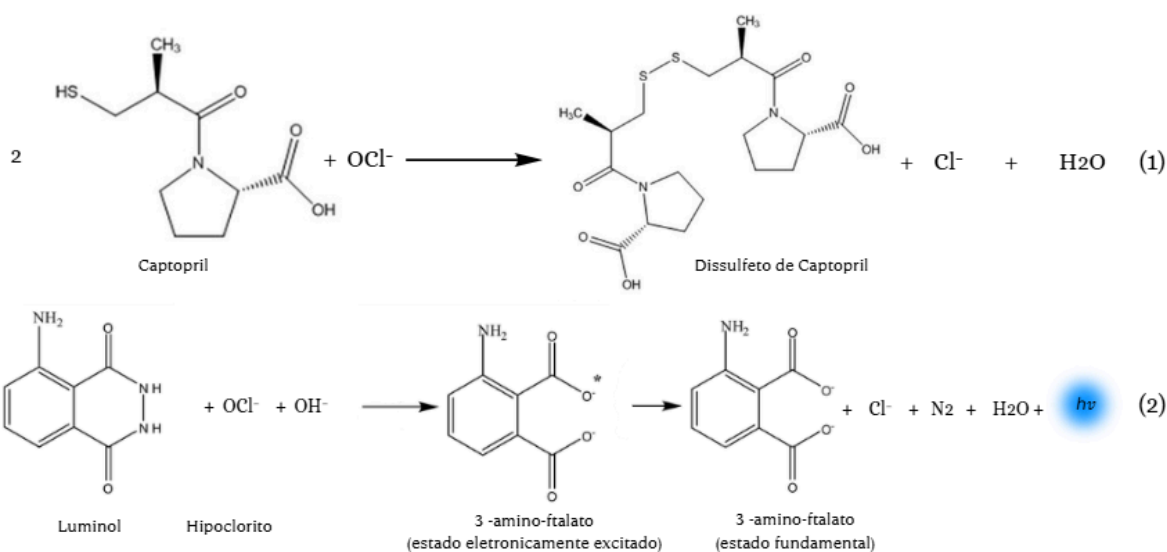


Figura 15 – Mecanismo de oxidação do captopril pelo hipoclorito (1) e mecanismo de quimiluminescência do luminol na presença de hipoclorito (2).

3.3 Reagentes e Soluções

3.3.1 Determinação de Vitamina B₁₂

3.3.1.1 Soluções Estoque

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

Para a determinação de Vitamina B₁₂, preparou-se uma solução de Luminol 0,3% (m/v) (Aldrich, 99%) dissolvendo-se 0,03 g do reagente em 10 mL de hidróxido de potássio 0,4 mol/L (KOH) (Vetec, 98%). À mistura foi adicionada uma alíquota de 80 µL de peróxido de hidrogênio a 35% (m/v) para atuar como agente oxidante.

As soluções padrão de Co(II) (Dinâmica, 1000 mg L⁻¹), com concentrações variando entre 0,1 e 0,5 mg/L, foram obtidas por diluição adequada da solução estoque em tampão acetato 0,1 mol/L (pH 5,0). Para o preparo do tampão acetato, dissolveram-se 0,86 g de acetato de sódio trihidratado (Vetec, 99%) em 80 mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 5,0 por adição gradual de ácido acético glacial (37%) (Synth, 99,7%), sob monitoramento com pHmetro. A solução foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e teve seu volume completado com água.

3.3.1.2 Preparo da Amostra

No sistema proposto, a extração do íon Co(II) presente na vitamina B_{12} ocorreu por meio do processo de digestão ácida realizada em frascos Savillex, os quais oferecem elevada resistência a ácidos fortes e a altas temperaturas, além de minimizarem o risco de contaminação da amostra. Nesse processo, adicionam-se inicialmente 1 mL das soluções concentradas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 35% m/v) e ácido nítrico (HNO_3 , Synth, 65% m/v) a aproximadamente 0,8 mL da solução injetável comercial de vitamina B_{12} . Em seguida, a mistura é aquecida em chapa aquecedora a $150\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas, promovendo a decomposição da matriz orgânica e a liberação do íon Co^{2+} . A Figura 16 ilustra a mudança de coloração da amostra ao longo do processo; a completa ausência de cor ao final indica a digestão total do conteúdo orgânico, marcando a finalização da extração do íon Co(II) .

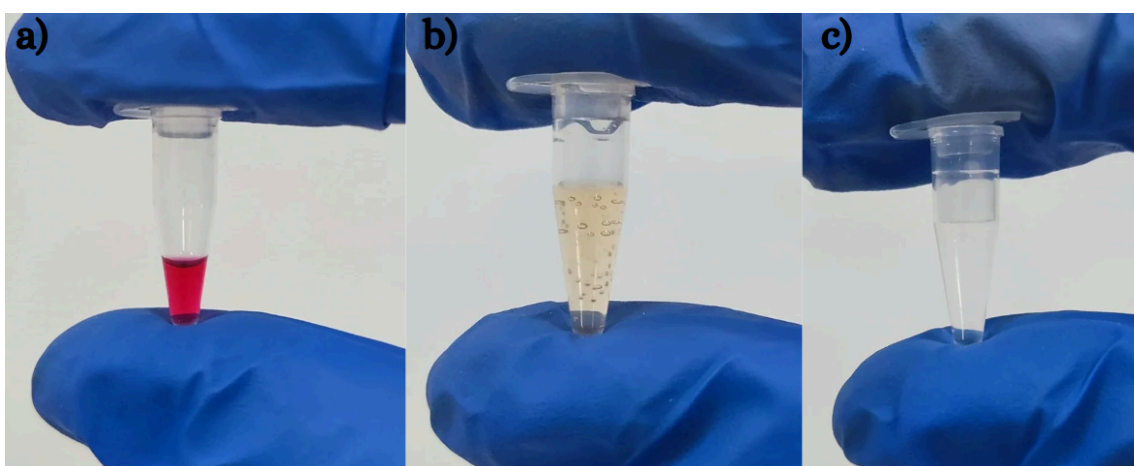


Figura 16 – Amostra de vitamina B_{12} : (a) antes da acidificação, (b) durante o processo de digestão ácida e (c) após a digestão finalizada.

3.3.2 Determinação de Captopril

3.3.2.1 Soluções Estoque

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

Para a determinação de Captopril, preparou-se uma solução de Luminol 0,3% (m/v) (Aldrich, 99%) dissolvendo-se 0,03 g do reagente em 10 mL de tampão carbonato/bicarbonato 0,1 mol/L (pH 11). Para o preparo do tampão carbonato/bicarbonato 0,1 mol/L (pH 11), pesaram-se 6,9 g de carbonato de potássio (Carlo Erba, 99%), os quais foram dissolvidos em 400 mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 11,00

com adição controlada de ácido clorídrico concentrado (Synth – solução 37% m/m), utilizando-se um pHmetro. A solução foi transferida para balão volumétrico de 500,0 mL e completou-se o volume com água.

Para o sistema de gota suspensa assistido por elevação, a solução estoque de hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) de 500 mg/L foi preparada dissolvendo-se 0,025 g do reagente (Synth, 40% m/m) em 50 mL de tampão carbonato (pH 11,00). A partir dessa solução, obteve-se uma concentração final de 35 mg/L de hipoclorito de cálcio por diluição adequada em balões volumétricos de 5 mL. Para o sistema de imersão automatizado, o preparo da solução-estoque foi idêntico; contudo, a concentração final empregada foi de 30 mg/L, obtida igualmente por diluição adequada em balões volumétricos de 5 mL.

Paralelamente, a solução estoque de captopril (500 mg/L) foi preparada pela dissolução da massa adequada do padrão do analito (Sigma, 98%) em uma solução obtida pela adição gradual de HCl à água desmineralizada por osmose reversa, procedendo-se ao ajuste do pH para 5,0 mediante monitoramento contínuo com um pHmetro.

As soluções utilizadas na análise foram preparadas com base na reação de oxidação entre o hipoclorito e o captopril. Para isso, a concentração de captopril foi ajustada entre 0,0 e 16,5 mg/L pela adição de volumes variados da solução estoque de captopril a cada balão, completando-se o volume com tampão carbonato (pH 11), conforme descrito na Tabela 3 para os sistemas desenvolvidos. Destaca-se, que tanto as soluções estoque de hipoclorito de cálcio quanto as soluções empregadas na análise foram preparadas diariamente devido à rápida decomposição dos reagentes. Além disso, a reação prévia entre o captopril e o hipoclorito foi realizada diretamente nos balões volumétricos.

Tabela 3 - Volumes das soluções estoque de hipoclorito de cálcio (500 mg/L) e de captopril (500 mg/L) adicionados a balões volumétricos de 5,0 mL para o preparo das soluções de análise para os sistemas desenvolvidos.

Concentração de Captopril (mg/L)	0	3	6	9	10,5	12	13,5	15	16,5
Ca(OCl)₂ (35 mg/L)	350 μL	350 μL	350 μL	350 μL	350 μL	350 μL	350 μL	350 μL	350 μL
Solução Estoque de Captopril (500 mg/L)	0	30 μL	60 μL	90 μL	105 μL	120 μL	135 μL	150 μL	165 μL

3.3.2.2 Preparo da Amostra

Para o preparo das amostras farmacêuticas nos sistemas propostos, vinte comprimidos para cada uma das marcas avaliadas foram inicialmente pesados e pulverizados. Em seguida, uma porção do pó correspondente à massa média dos comprimidos foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL, ao qual se adicionaram 25 mL da solução ácida ajustada com HCl a pH 5,00. A mistura foi submetida à sonicação por 15 minutos. Posteriormente, a solução resultante foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e avolumada até a marca com a mesma solução ácida.

De acordo com o método de referência descrito na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição, a determinação de captopril baseia-se em uma titulação iodimétrica. No presente trabalho, esse procedimento foi adaptado para uma titulação coulométrica a corrente constante, na qual o iodo é gerado eletroquimicamente. Para o preparo da amostra, aproximadamente vinte comprimidos foram pesados e pulverizados, sendo então transferida uma massa equivalente à massa média dos comprimidos. A dissolução desse material foi realizada de modo a obter, ao final, uma solução-estoque de captopril com concentração de 1.000 mg/L. A partir dessa solução estoque, alíquotas de 5 mL foram transferidas para um mini béquer (10 mL), às quais foram adicionados 5 mL de solução de iodeto de potássio 1 mol/L. A mistura resultante foi então submetida ao procedimento coulométrico, no qual a geração eletrolítica de iodo e seu consumo pela oxidação do captopril foram monitorados até o ponto final da reação^[114].

3.3.2.3 Processo de Revestimento do Papel com Sílica e Luminol

Para o procedimento de determinação de captopril no sistema de gotas suspensas, foi avaliado um processo de revestimento da superfície do dispositivo de papel. Em cada zona de detecção do dispositivo, foram aplicados 10 µL de uma suspensão contendo 20% (m/v) de sílica (Macherey-Nagel, 98%) e 0,3% (m/v) de luminol (Aldrich, 99%). Os reagentes foram previamente adicionados ao tampão carbonato 0,1 mol/L (pH 11), completando-se o volume final para 10 mL. Em seguida, os dispositivos foram secos em estufa a 60 °C por 10 minutos.

3.3.2.4 Processo de Oxidação das Fibras de Celulose e Revestimento com Luminol

Para o procedimento de determinação de captopril no sistema de imersão automatizada, tornou-se necessário oxidar previamente as fibras de celulose do substrato, uma vez que sua reatividade com o hipoclorito de cálcio competia com o analito, resultando na

redução do sinal quimiluminescente. Inicialmente, os PADs foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes (30 mg/mL) por 5 minutos, sendo posteriormente secos em estufa a 45 °C por 10 minutos. Em seguida, os dispositivos foram imersos em solução de luminol a 0,3% (m/v) por 5 minutos e novamente submetidos à secagem em estufa a 45 °C. Após essas etapas de oxidação e revestimento, os PADs encontram-se prontos para uso nas análises.

3.4 Procedimento de Leitura

3.4.1 Sistema de Gotas Suspensas

Para a determinação de vitamina B₁₂, as soluções das amostras e dos padrões foram aplicadas nas zonas de detecção dos dispositivos de papel com o auxílio de uma micropipeta, sendo transferidos 4,0 µL da solução de Co(II) para cada spot. Após a aplicação, a secagem das soluções foi realizada com o auxílio de um secador de cabelo. Em seguida, o dispositivo foi fixado no suporte para a realização das leituras (Figura 17).

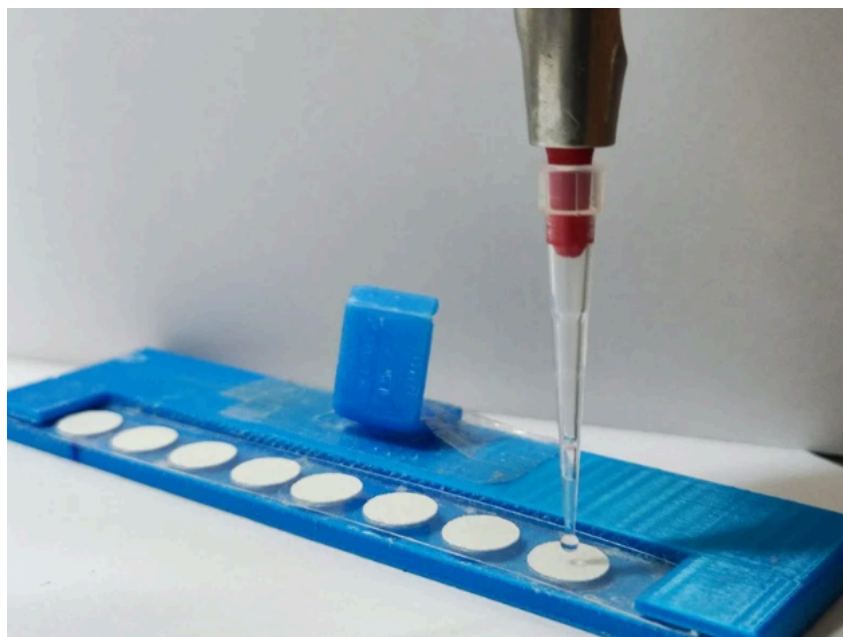


Figura 17 – Aplicação da solução de Co(II) no dispositivo de papel com o auxílio de uma micropipeta.

Finalizada esta etapa, o suporte é devidamente encaixado à base com dobradiças (Figura 18(a)) e os parâmetros de imagem são devidamente configurados no aplicativo para a realização das leituras. Após a configuração dos parâmetros de imagem, os amostradores de

cor do aplicativo são posicionados manualmente sobre cada zona de detecção contendo a amostra ou o padrão para que a coleta de dados possa ser iniciada (Figura 18(b)). Finalizado os ajustes, 10 μL da solução de luminol 0,3% (m/v) é aspirada para cada uma das ponteiros de uma micropipeta multicanal automática (Kasvi) e suspensas no interior do sistema analítico para posterior transferência para as zonas de detecção do PAD, quando a quimiluminescência é monitorada (Figura 19).

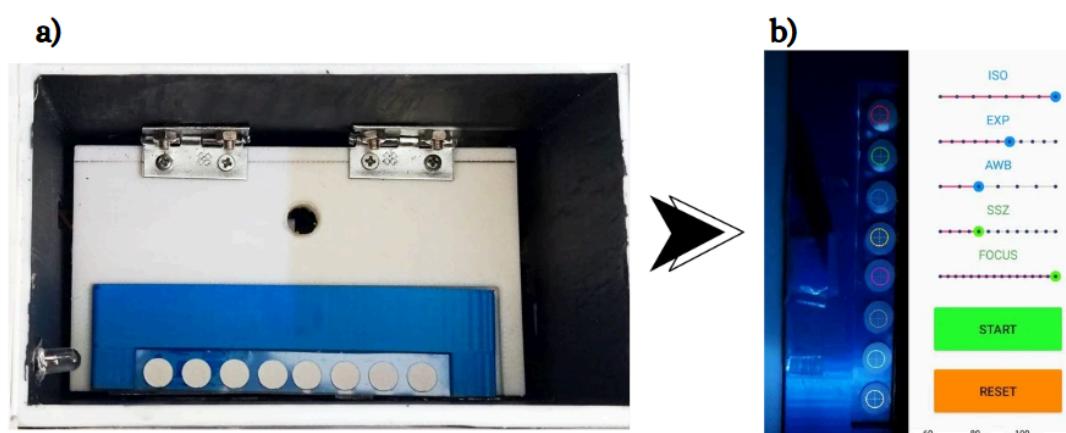


Figura 18 – (a) Suporte com PAD encaixado na base com dobradiças. (b) Interface do app com os amostradores posicionados sobre os spots do PAD.

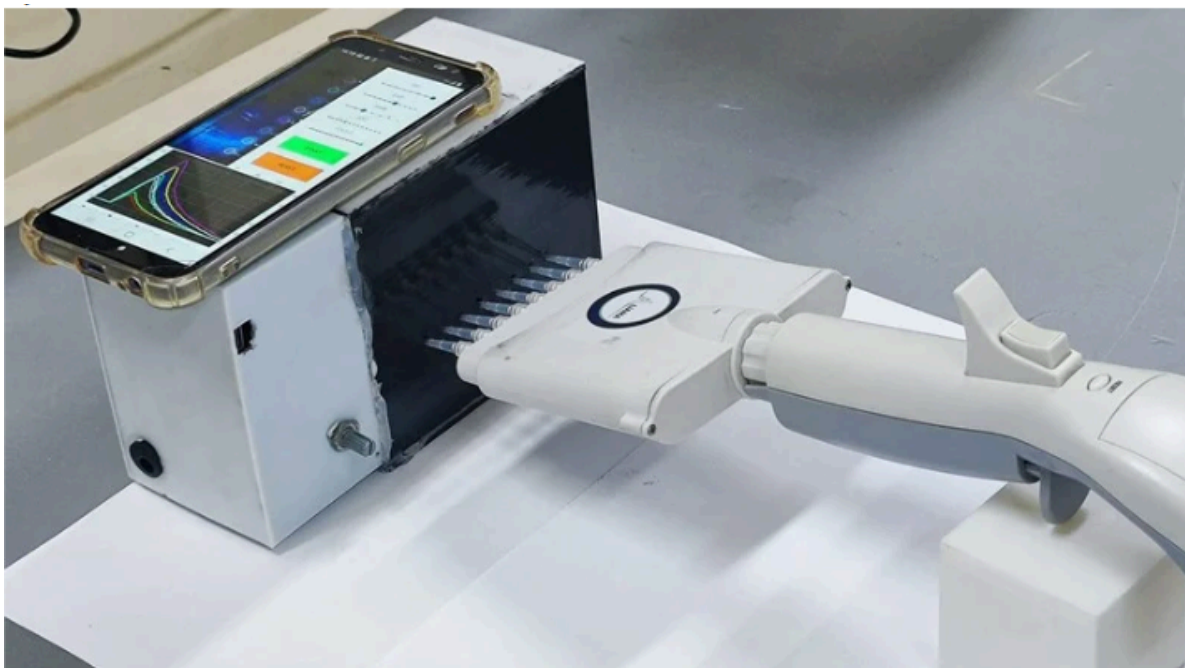


Figura 19 – Montagem do sistema analítico

Para a determinação de captopril, o procedimento de análise é similar ao empregado na quantificação da vitamina B₁₂. Entretanto, nesse caso, o dispositivo de papel, previamente revestido com a solução de luminol e sílica, foi fixado no suporte, o qual se encaixa à base por meio de dobradiças. Em seguida, os parâmetros de imagem foram configurados e os amostradores posicionados sobre as respectivas zonas de detecção. Após os ajustes, cerca de 10 μ L das soluções contendo hipoclorito de cálcio (35 mg/L) e captopril foram aplicados às zonas de detecção, promovendo a reação quimiluminescente. A emissão gerada foi monitorada em tempo real por meio de um smartphone, sendo o sinal analítico registrado automaticamente na interface do aplicativo desenvolvido, permitindo a visualização imediata dos dados pelo analista.

3.4.2 Sistema de Imersão Automatizada

Para a determinação de captopril, o suporte removível contendo os PADs previamente tratados com peróxido de hidrogênio foi inicialmente acoplado ao atuador linear, conforme ilustrado na Figura 20(a). Em seguida, aproximadamente 450 μ L das soluções de amostras e dos padrões foram transferidos para os respectivos reservatórios de análise (vials), os quais foram posicionados no interior do sistema (Figura 20(b)). Após o carregamento dos

reservatórios, a cabine de análise foi inserida de modo a isolar completamente a região interna, garantindo condições controladas para a detecção quimiluminescente.

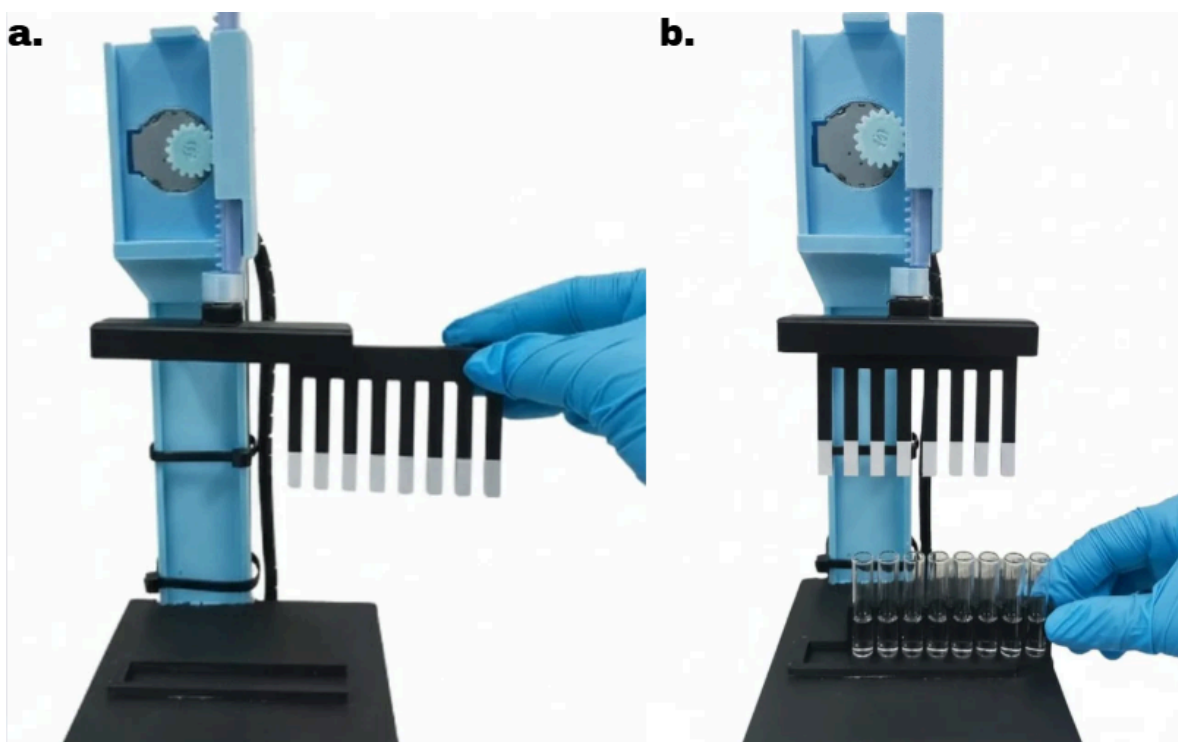


Figura 20 – (a) Suporte removível contendo o PAD previamente tratado acoplado ao atuador linear. (b) Reservatórios de amostra e padrão posicionados no interior do sistema após a adição das soluções.

Na sequência, os parâmetros de aquisição de imagem foram configurados no aplicativo desenvolvido, e os amostradores de cor foram posicionados sobre as regiões de detecção para permitir a coleta contínua dos dados (Figura 21). Finalizado o ajuste das configurações, iniciou-se o procedimento analítico, onde os PADs foram imersos simultaneamente nas soluções de padrão e de amostra pelo mecanismo de imersão automatizado, enquanto a emissão quimiluminescente resultante foi monitorada em tempo real pelo sistema de captura de imagens.

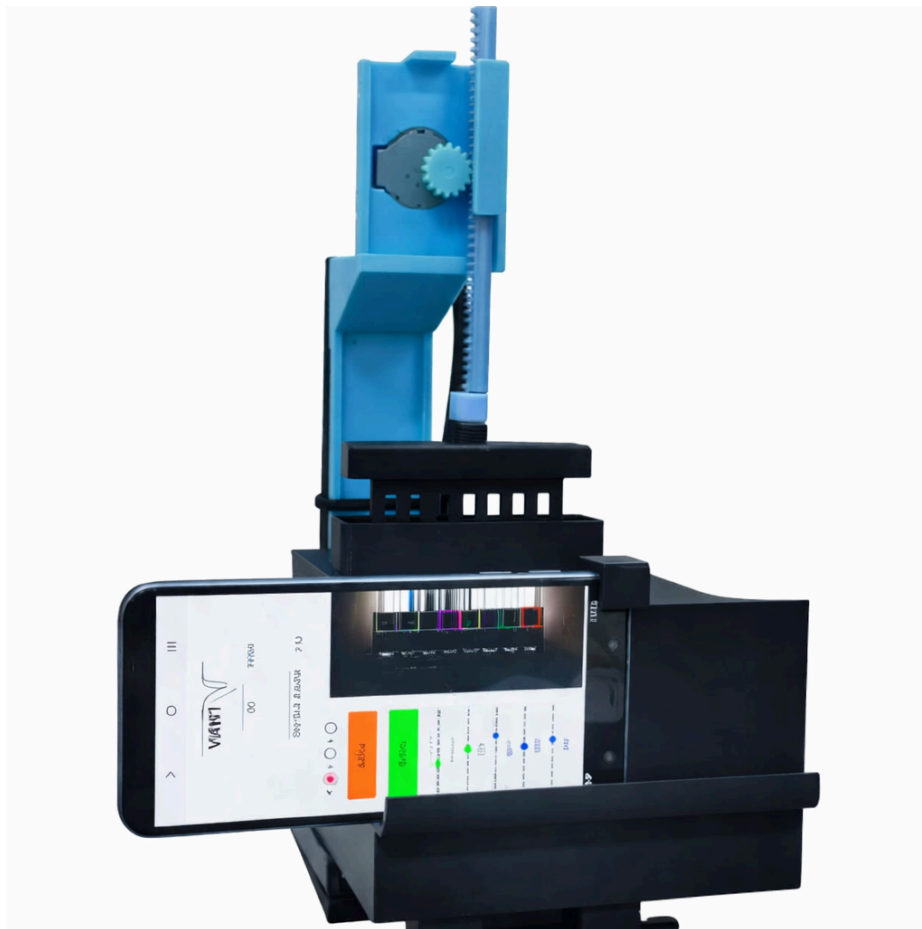


Figura 21 – Montagem do sistema analítico de Imersão Automatizada

4. Resultados e Discussão

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos para a determinação de vitamina B₁₂ e captopril empregando dois sistemas analíticos desenvolvidos neste trabalho, com foco na avaliação da aplicabilidade dessas plataformas como prova de conceito para determinações analíticas.

O sistema de gotas suspensas apresentou desempenho adequado para a determinação de vitamina B₁₂, permitindo a obtenção de parâmetros analíticos satisfatórios. Entretanto, sua aplicação à determinação de captopril exigiu o recobrimento da superfície do papel com uma suspensão de sílica/luminol, o que resultou em baixa reprodutibilidade. Mesmo após a aplicação da técnica de *dip coating*, essa limitação inviabilizou a validação do método para esse analito.

Em função dessas limitações, o sistema foi reformulado, resultando no desenvolvimento de um sistema de imersão automatizado, projetado especificamente para a

determinação de captopril. Esse novo arranjo possibilitou o estabelecimento de uma metodologia reprodutível, permitindo a validação completa do método.

O sistema de imersão automatizado também foi avaliado de forma preliminar para a determinação de vitamina B₁₂, sendo realizados ensaios de linearidade e precisão. Esses resultados devem ser considerados como avaliações iniciais, uma vez que a validação completa para esse analito não foi conduzida no escopo deste estudo.

4.1 Otimização dos Parâmetros de Imagem

Considerando que a radiação emitida na reação quimiluminescente do luminol ocorre predominantemente na região azul do espectro visível ($\lambda = 425$ nm), a componente B (*blue*) do sistema RGB foi selecionada para a aquisição dos sinais analíticos. A resposta registrada pelo aplicativo baseia-se na variação da altura do pico de emissão ao longo do tempo, diretamente relacionada à concentração do analito.

Para otimizar a sensibilidade do sinal monitorado pela câmera do smartphone durante a determinação da vitamina B₁₂ e do captopril, os parâmetros de imagem foram ajustados da seguinte forma: ISO (sensibilidade do sensor à luz) e focus (foco da imagem) foram configurados no valor máximo permitido pelo sistema, com o objetivo de maximizar a detecção da emissão luminosa; a exposição (EXP) foi ajustada para 64% do valor máximo, equilibrando intensidade do sinal e minimização de ruídos; e o size (tamanho dos amostradores (SSZ)) foi definido em 40% do valor máximo, visando otimizar a taxa de processamento dos dados sem comprometer a qualidade da detecção.

É importante destacar que, ao se tratar de sistemas que utilizam a detecção baseada em imagens digitais para captação de radiação visível em um fundo escuro, como ocorre na quimiluminescência, o ideal seria utilizar o tempo de exposição em sua capacidade máxima permitida pelo sistema. No entanto, isso não é empregado porque a taxa de processamento de dados pode ser comprometida, prejudicando a eficiência da detecção. Neste caso, o intervalo entre uma leitura de RGB e outra aumenta significativamente de modo que o registro de um pico passa a ser composto por um número menor de pontos, não acompanhando a variação da emissão luminosa com o tempo.

A partir das configurações de imagem previamente estabelecidas, foram realizados ensaios preliminares com o objetivo de definir a faixa de concentração adequada para os analitos. Para isso, determinou-se a concentração máxima de Co(II) (relacionado à determinação de vitamina B₁₂) e de hipoclorito de cálcio (utilizado na determinação de captopril) que poderia ser detectada pelo aplicativo sem causar saturação do sinal analítico.

Considerando que, em sistemas de aquisição baseados em imagens digitais, o valor máximo da escala RGB é de 255 unidades arbitrárias, foram selecionadas concentrações que gerassem respostas abaixo de 200 unidades, evitando distorções decorrentes de saturação do sinal. Para a vitamina B₁₂, observou-se saturação do sinal analítico a partir de 1,6 mg/L de Co(II), enquanto para o hipoclorito de cálcio a saturação foi identificada a partir de 50 mg/L.

4.2 Determinação de Vitamina B₁₂

4.2.1 Sistema de Gotas Suspensas

4.2.1.1 Planejamento e Otimização Experimental

Para avaliar a influência de variáveis na intensidade da emissão quimiluminescente do luminol, foi adotado um planejamento fatorial do tipo 2³, o que possibilitou a obtenção de melhores figuras de mérito além de evitar gastos excessivos de reagentes. Na determinação de vitamina B₁₂, foram selecionados três fatores principais com potencial impacto na intensidade do sinal quimiluminescente, cada um avaliado em dois níveis (superior e inferior), totalizando 8 combinações experimentais. Cada condição experimental foi repetida 8 vezes, resultando em um total de 64 resultados individuais.

A matriz do planejamento seguiu o modelo clássico de planejamentos 2^k, no qual os níveis dos fatores são representados por sinais algébricos (+) para o nível superior e (-) para o nível inferior. A Tabela 4 apresenta os fatores avaliados, bem como a definição dos níveis utilizados no planejamento experimental.

Tabela 4 - Fatores avaliados e Definição dos níveis utilizados no planejamento experimental.

[Luminol] (% m/v)		[H ₂ O ₂] (% m/v)		[KOH] (mol/L)	
0,1	-	0,18	-	0,2	-
0,3	+	0,28	+	0,4	+

A avaliação dos fatores pré-selecionados foi realizada utilizando uma solução padrão de 0,3 mg/L de Co(II), de modo que a intensidade do sinal quimiluminescente foi adotada como sendo a resposta do planejamento proposto. Todas as soluções empregadas foram preparadas no mesmo dia da execução dos ensaios. Os experimentos foram realizados de forma aleatória, a uma temperatura de 24°C, no intervalo de 30 minutos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados do planejamento fatorial 2³. R_n representam as respostas da enésima repetição; L, P e K correspondem às concentrações de luminol, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidróxido de potássio (KOH), respectivamente. Apresentam-se também os valores da média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) para cada ensaio.

Ensaio	Ordem	L	P	K	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆	R₇	R₈	Média (M)	Desvio Padrão (S)	CV (%)
1	4°	-	-	-	39,0	36,31	36,31	34,74	34,09	27,83	23,91	22,49	31,84	6,22	19,55
2	7°	+	-	-	46,49	52,26	45,09	59,66	54,74	56,74	58,43	59,94	54,17	5,78	10,67
3	1°	-	+	-	17,57	25,51	25,63	22,17	27,91	18,34	8,77	12,26	19,77	6,80	34,39
4	6°	+	+	-	35,23	42,51	43,43	41,94	43,71	43,60	36,51	42,86	41,23	3,37	8,18
5	3°	-	-	+	56,91	56,74	61,69	57,46	59,00	59,43	60,06	65,69	59,62	2,97	4,99
6	2°	+	-	+	58,60	61,31	60,60	58,09	54,69	72,37	58,69	58,54	60,36	5,23	8,67
7	8°	-	+	+	41,26	59,77	53,51	51,74	44,51	40,23	41,00	43,74	46,97	7,17	15,26
8	5°	+	+	+	67,09	81,43	49,51	80,20	72,66	66,60	64,74	64,86	68,39	10,10	14,78

A partir dos dados experimentais da Tabela 5, foram determinados os efeitos principais e as interações entre os fatores avaliados. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeitos principais e interações estimados no planejamento fatorial 2^3 , com intervalos de confiança a 95% calculados usando erro padrão de 3,16% e $t_{\text{crítico}}$ de 2,004.

	Valor	Erro Padrão (%)	Intervalo de Confiança (95%)
Média	47,79	$\pm 0,79$	$47,79 \pm 6,33$
Efeitos Principais:			
L (Luminol)	22,08	$\pm 3,16$	$22,08 \pm 6,33$
P (H₂O₂)	-7,41	$\pm 3,16$	$-7,41 \pm 6,33$
K (KOH)	16,48	$\pm 3,16$	$16,48 \pm 6,33$
Interações de dois fatores:			
LP	5,10	$\pm 3,16$	$5,10 \pm 6,33$
LK	-5,41	$\pm 3,16$	$-5,41 \pm 6,33$
PK	4,95	$\pm 3,16$	$4,95 \pm 6,33$
Interações de três fatores:			
LPK	5,39	$\pm 3,16$	$5,39 \pm 6,33$

A análise dos efeitos estimados no planejamento fatorial, revelou que os fatores principais L, P e K (concentrações de luminol, peróxido e hidróxido de potássio, respectivamente) influenciam significativamente a resposta do sistema, o que está de acordo com os intervalos de confiança a 95%, que não incluem o zero para esses três efeitos, indicando sua relevância estatística.

Por outro lado, as interações entre dois e três fatores não mostraram significância estatística a 95% de confiança. Dessa forma, dentro das condições avaliadas, os efeitos principais são os que mais impactam a resposta do sistema, enquanto as interações possuem influência menos relevante.

Portanto, com base nesses efeitos e visando a maximização da resposta, foi selecionado o ensaio 8 (contendo 0,28% m/v de peróxido de hidrogênio, 0,4 mol/L de KOH e

0,3% m/v de luminol) para dar prosseguimento aos estudos, pois essa combinação apresentou a maior média de resposta (68,39 u.a) entre os ensaios avaliados, como apresentado pela Figura 22.

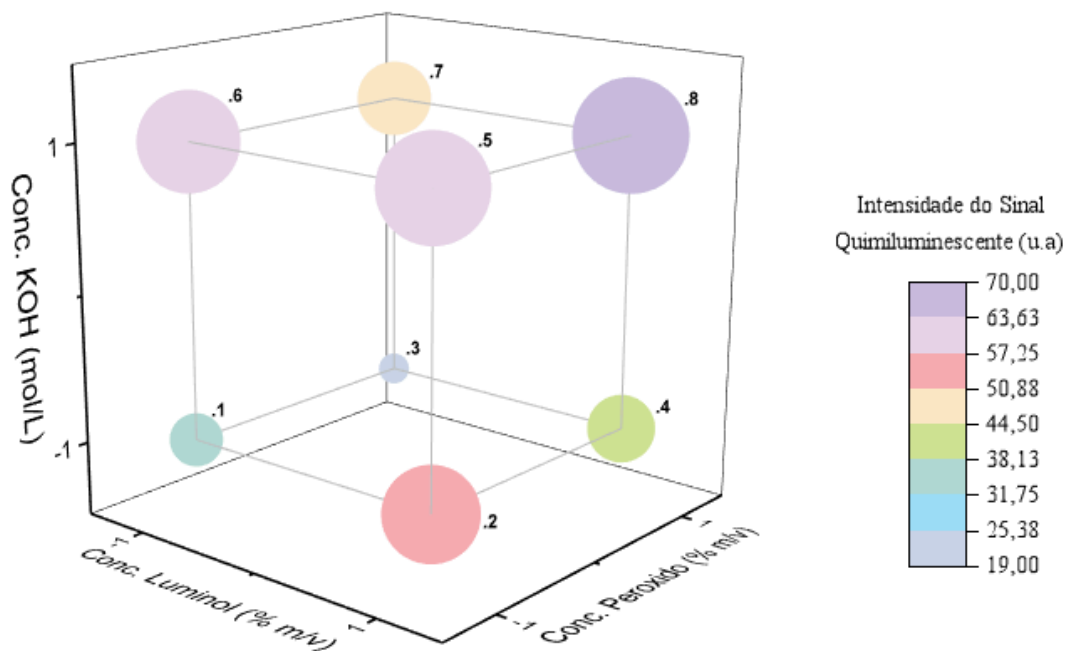


Figura 22 – Interpretação geométrica dos efeitos em um planejamento fatorial 2^3 , cujas esferas indicam os valores médios das respostas nos diferentes ensaios avaliados.

4.2.1.2 Efeito de adições sucessivas de analito nas zonas de detecção (estratégia de pré-concentração)

Realizou-se um ensaio para avaliar o volume de solução de analito (Co(II)) a ser adicionado às zonas de detecção do dispositivo à base de papel, com o objetivo de verificar sua influência na intensidade da emissão luminescente. Para isso, realizou-se aplicações sucessivas de 4,0 μL de uma solução padrão de Co(II) com concentração de 0,1 mg/L em cada uma das 8 zonas de detecção, seguidos da secagem com o auxílio de um secador e reaplicação do volume de solução. Em outras palavras, efetuou-se um acúmulo crescente de Co(II) em cada zona, no qual a primeira zona recebeu uma única aplicação de 4,0 μL e a oitava recebeu oito aplicações de 4,0 μL totalizando 32 μL .

A Figura 23 apresenta os dados obtidos, onde relacionou-se a intensidade do sinal quimiluminescente com o volume acumulado da solução de cobalto aplicado em cada zona de detecção.

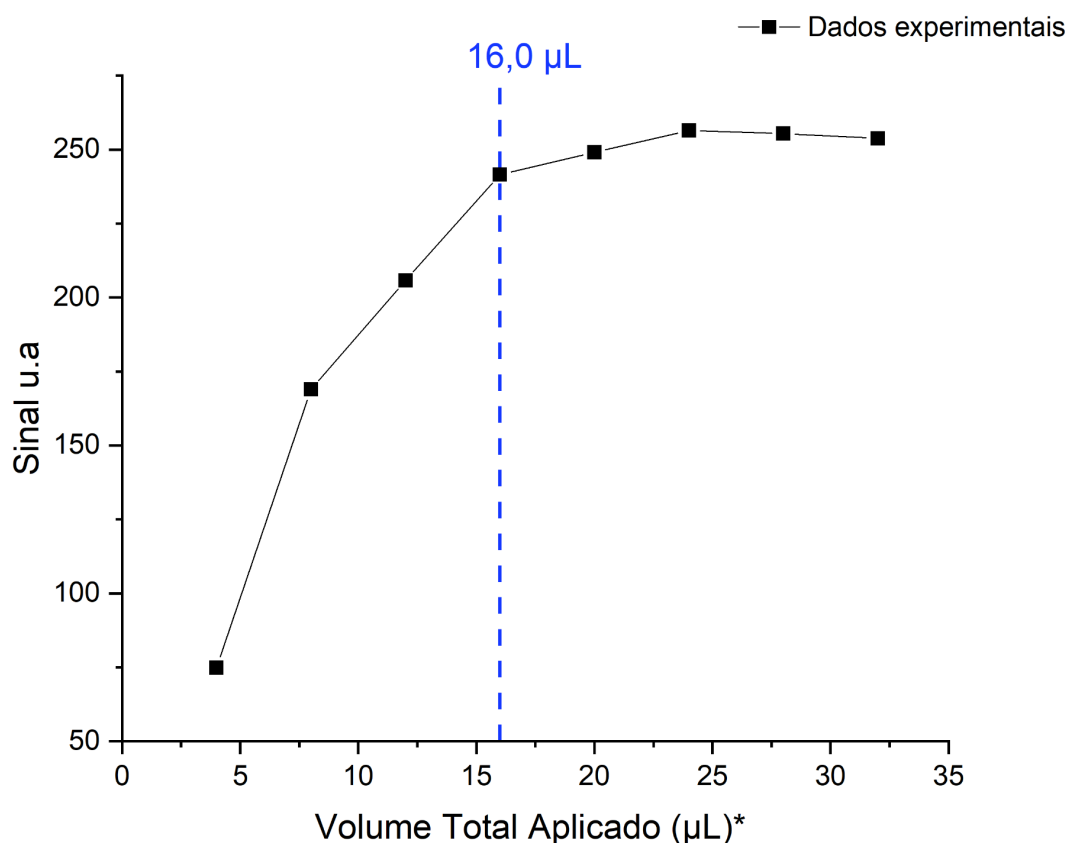


Figura 23 – Efeito do volume total da solução padrão de Co(II) (0,1 mg/L) sobre a intensidade do sinal quimiluminescente. *Adicionado em incrementos de 4 µL.

Os resultados demonstraram que houve um aumento progressivo da intensidade do sinal de acordo com o aumento do volume de cobalto, até o ponto onde se foi observado um patamar de saturação a partir de aproximadamente 16 µL o que indica que os incrementos adicionais dessa solução não resultaram em aumentos significativos da intensidade do sinal quimiluminescente e que o sistema atingiu o limite máximo de resposta sob as condições avaliadas. Esse estudo também demonstrou a viabilidade de se realizar etapas de pré - concentração no dispositivo baseado em papel (PAD), o que é vantajoso quando se tem como objetivo determinar baixas concentrações do analito.

4.2.1.3 Desempenho Analítico

A Figura 24 apresenta os picos correspondentes às concentrações dos padrões de Co(II) utilizados na construção da curva analítica e que foram obtidos simultaneamente em um mesmo PAD. Como mencionado anteriormente, as alturas dos picos referentes a

componente B do sistema RGB foram empregadas para a construção das curvas analíticas devido à maior sensibilidade para essa componente.

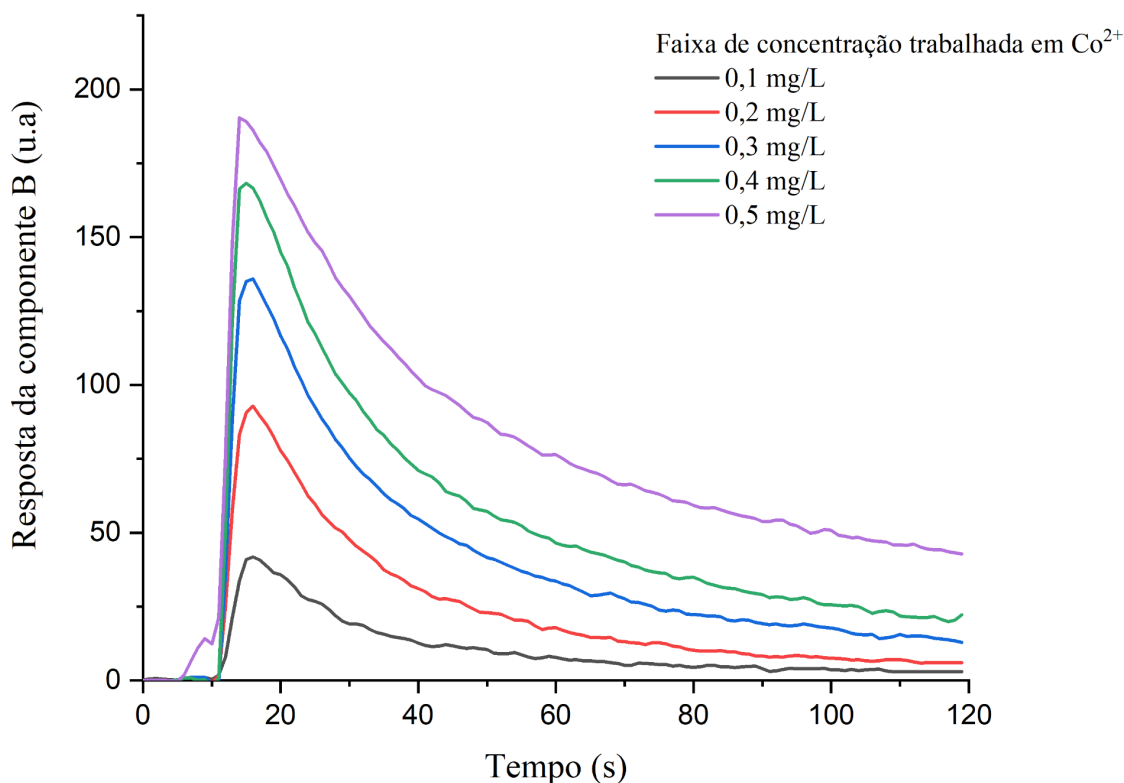
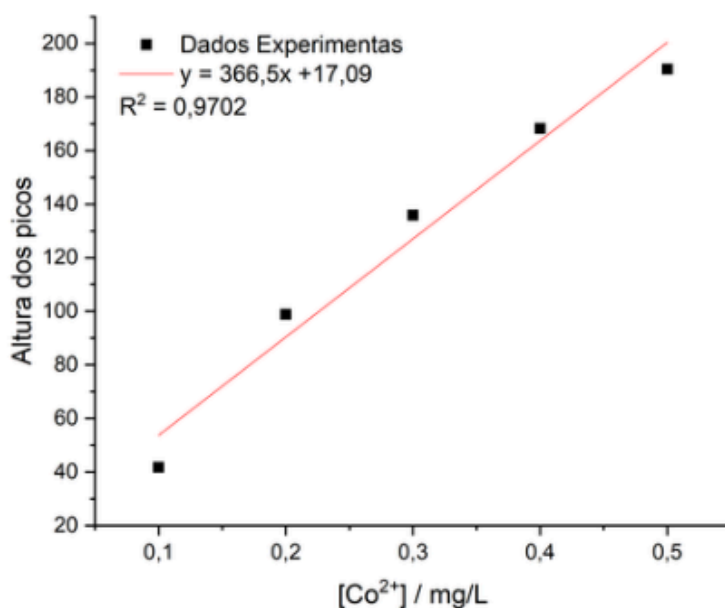


Figura 24 - Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s). A altura máxima é usada como sinal analítico.

A linearidade do método foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente de determinação (R^2), obtido a partir da curva analítica construída na faixa de concentração de 0,1 a 0,5 mg/L. O valor obtido para o coeficiente de determinação foi de $R^2 = 0,9702$, indicando que há uma resposta linear, mesmo com padrões em baixas concentrações (< 0,5 mg/L).

Com o objetivo de melhorar a linearidade da curva, foi realizada uma transformação matemática dos dados experimentais, no qual os valores das alturas dos picos foram elevados ao quadrado (S^2). Essa transformação resultou em uma melhora no coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9989$), mostrando-se vantajoso para compensar pequenas variações instrumentais e aprimorar a robustez estatística da calibração. A Figura 25 apresenta a curva analítica antes e após o ajuste matemático, referente à determinação do íon Co(II) .

a)



b)

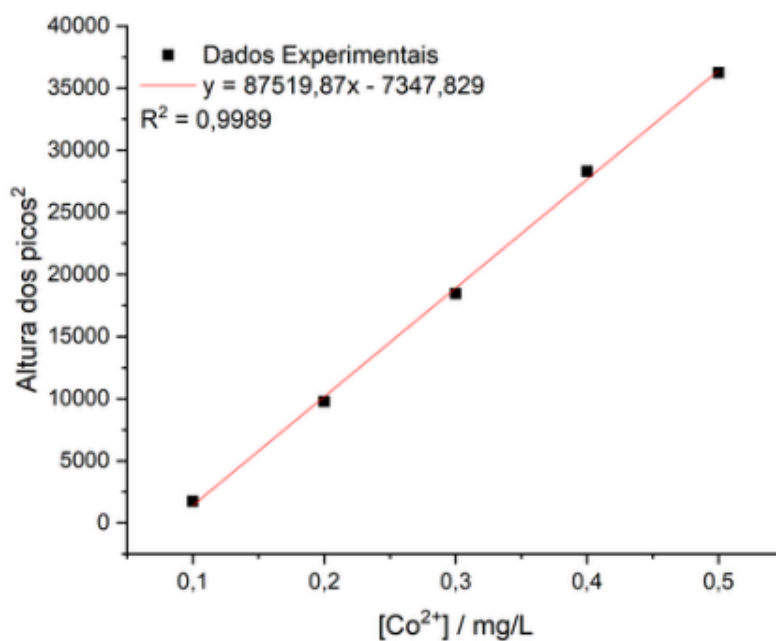


Figura 25 - Curva analítica antes (a) e após (b) o ajuste matemático para determinação de íon Co (II).

Para estimar o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), foi adotado o procedimento recomendado por J.C. Miller e J. N. Miller (1993). Devido ao uso da detecção por imagens digitais para medidas quimiluminométricas, escolheu-se uma abordagem que

relaciona o desvio padrão dos resíduos do sinal analítico ($S_{\frac{x}{y}}$) com a concentração estimada para o limite de detecção (yLD). A Equação 1, apresenta a fórmula empregada para determinar o desvio padrão dos resíduos da curva analítica:

$$S_{\frac{x}{y}} = \sqrt{\frac{\Sigma(y_1 - \hat{y}_1)^2}{n-2}} \quad (1)$$

Onde y_1 , indica os sinais analíticos para cada padrão, \hat{y}_1 são os sinais estimados pela equação da regressão e n os números de pontos da curva. A Tabela 7, apresenta os valores de sinal obtidos e estimados pela equação de regressão apresentada na Figura 25b.

Tabela 7 - Valores de sinal obtidos e estimados pela equação de regressão apresentada na Figura 24b.

Concentração de Co^{2+} (mg/L)	Sinal Medido (u.a)	Sinal Estimado (u.a)
0,1	1747,24	1404,16
0,2	9781,21	10156,14
0,3	18468,81	18908,13
0,4	28291,24	27660,12
0,5	36252,16	36412,11

O valor obtido para o desvio padrão dos resíduos da curva analítica foi de 540,2 u.a. Substituindo esse valor na Equação 2, onde b é o intercepto da reta, obteve-se o sinal estimado para a concentração do LD, sendo o limite de detecção de 0,018 mg/L estimado pelo uso de yLD na equação da reta da Figura 24(b).

$$yLD = b + (3 \times S_{\frac{x}{y}}) \quad (2)$$

O limite de quantificação (LQ) foi obtido de maneira similar, através da Equação 3, cujo valor foi de 0,062 mg/L. Os resultados obtidos se mostraram compatíveis com a faixa

linear avaliada (0,1-0,5 mg/L), demonstrando que o sistema é capaz de identificar baixas concentrações do analito através de uma estratégia simples.

$$yLQ = b + (10 \times S_{\frac{x}{y}}) \quad (3)$$

Para avaliar a precisão do método proposto, foi realizado um ensaio de repetibilidade no qual 4,0 μL da solução padrão de Co(II), com concentração de 0,3 mg/L, foram aplicados nas oito zonas de detecção do dispositivo em papel (PAD), os resultados obtidos estão apresentados na Figura 26. O desvio padrão relativo (DPR) das alturas dos picos foi de 4,5%, indicando uma boa precisão do sistema. Esse valor demonstra que a precisão é adequada para fins de quantificação, considerando-se fatores como a aplicação manual dos reagentes em volumes reduzidos e a variabilidade na formação dos spots.

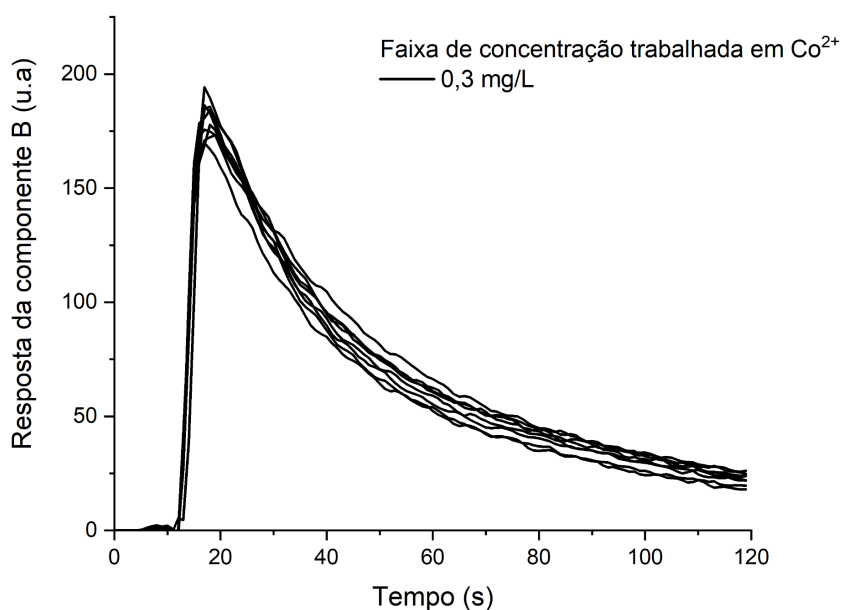


Figura 26 - Ensaio de repetibilidade da resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s) para uma solução padrão de Co(II) a 0,3 mg/L.

Para avaliar a exatidão do método, foram analisadas 5 formulações farmacêuticas comerciais de solução injetável de vitamina B₁₂, sendo os resultados comparados com os valores contidos na bula.

Conforme mencionado anteriormente, trata-se de um método de quantificação indireta, uma vez que a determinação é realizada com base no íon cobalto presente na molécula de vitamina B₁₂. Para que seja possível correlacionar os resultados obtidos para o Co(II) com a quantidade de vitamina B₁₂, utiliza-se um fator de conversão igual a $4,35 \times 10^{-2}$, derivado da razão entre as massas molares do cobalto (58,93 g/mol) e da vitamina B₁₂ (1355,37 g/mol).

As amostras A e B correspondem a medicamentos de uso veterinário, enquanto as amostras C, D e E são destinadas ao uso humano. Os valores das concentrações das amostras foram calculados a partir da equação da reta de suas respectivas curvas analíticas, os resultados para a concentração de vitamina B₁₂ nas amostras comerciais e as concentrações obtidas pelo instrumento proposto e o erro relativo são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores da concentração de vitamina B₁₂ nas amostras comerciais e obtidas pelo instrumento proposto.

Amostra	Concentração de vitamina B₁₂ no rótulo (mg/L)	Concentração de vitamina B₁₂ obtida pelo instrumento proposto (mg/L)	Erro relativo (Er)
A	750	862,29 ± 113,28	14,97%
B	1000	900,69 ± 92,60	-9,93%
C	2000	2025,46 ± 179,91	0,93%
D	5000	4196,33 ± 225,23	-16,07%
E	5000	4687,0 ± 1219,21	-6,26%

Conforme apresentado, erros relativos menores do que 15 % 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 para as amostras A, C e E, demonstrando uma exatidão satisfatória para o mesmo.

4.2.2 Sistema de Imersão Automatizado

4.2.2.1 Desempenho Analítico

Foi realizada uma avaliação preliminar de desempenho analítico desse sistema para a determinação de vitamina B₁₂, com o objetivo de investigar sua aplicabilidade a esse analito. Nessa etapa, o estudo foi conduzido com foco na avaliação da linearidade e da precisão, uma vez que a validação completa do método não pôde ser realizada no escopo do presente trabalho. A Figura 27 apresenta os picos correspondentes às concentrações dos padrões de Co(II) utilizados na construção da curva analítica.

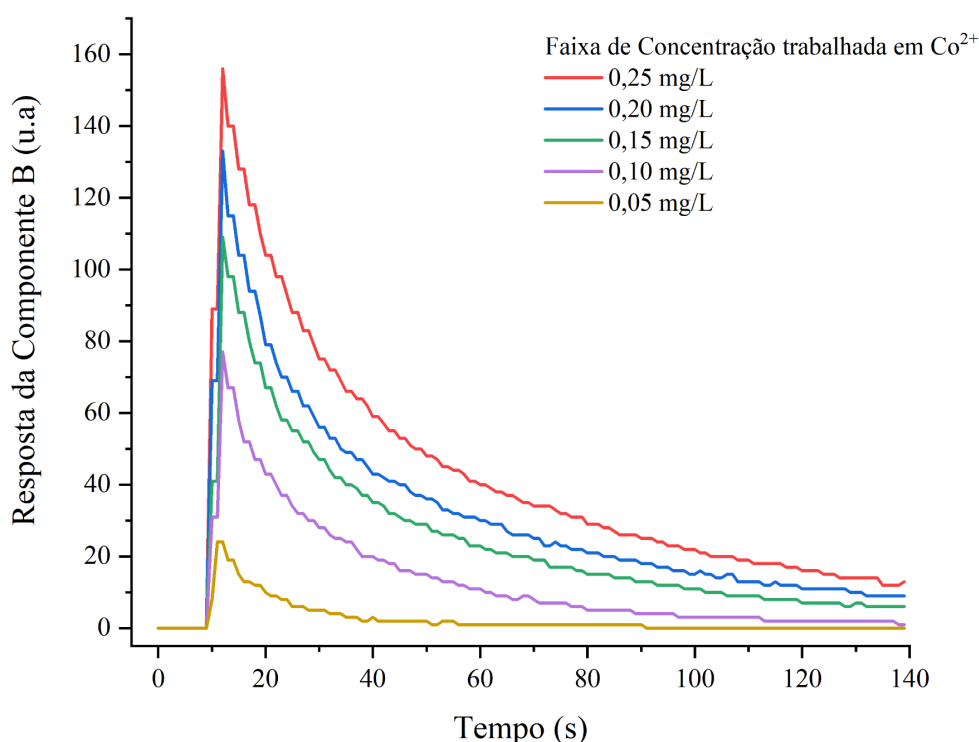


Figura 27 - Faixa linear da resposta analítica da componente B (u.a.) em função do tempo (s), empregada na etapa de quantificação.

A partir dos dados experimentais, foi construída a curva de calibração, a qual apresentou comportamento linear na faixa de concentração de 0,05 a 0,25 mg/L. A curva foi elaborada com base nas alturas dos picos de emissão luminosa, sendo aplicada uma transformação matemática aos dados experimentais, na qual os valores das alturas dos picos foram elevados ao quadrado (S^2). Essa transformação resultou em uma melhora significativa do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9982$), indicando a obtenção de uma resposta linear

mesmo para padrões em baixas concentrações (< 0,05 mg/L). A Figura 28 apresenta a curva analítica após o ajuste, referente à determinação do íon Co(II).

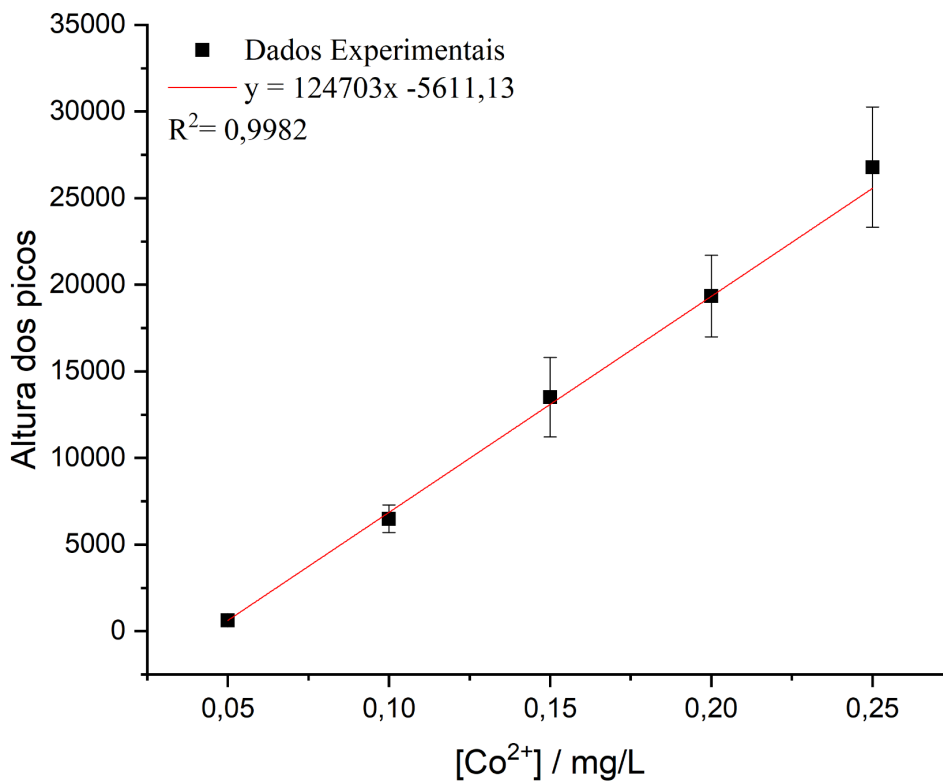


Figura 28 - Curva analítica após o ajuste matemático para determinação de íon Co(II).

A precisão do método foi avaliada por meio de ensaios de repetibilidade, realizados sob as mesmas condições experimentais. Foram analisadas soluções padrão de Co(II) nas concentrações de 0,075 e 0,25 mg/L, cujos resultados são apresentados na Figura 29. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) das alturas dos picos foram de 10,45% e 3,66%, respectivamente, indicando boa estabilidade do sinal e reprodutibilidade adequada do equipamento para a determinação de vitamina B₁₂.

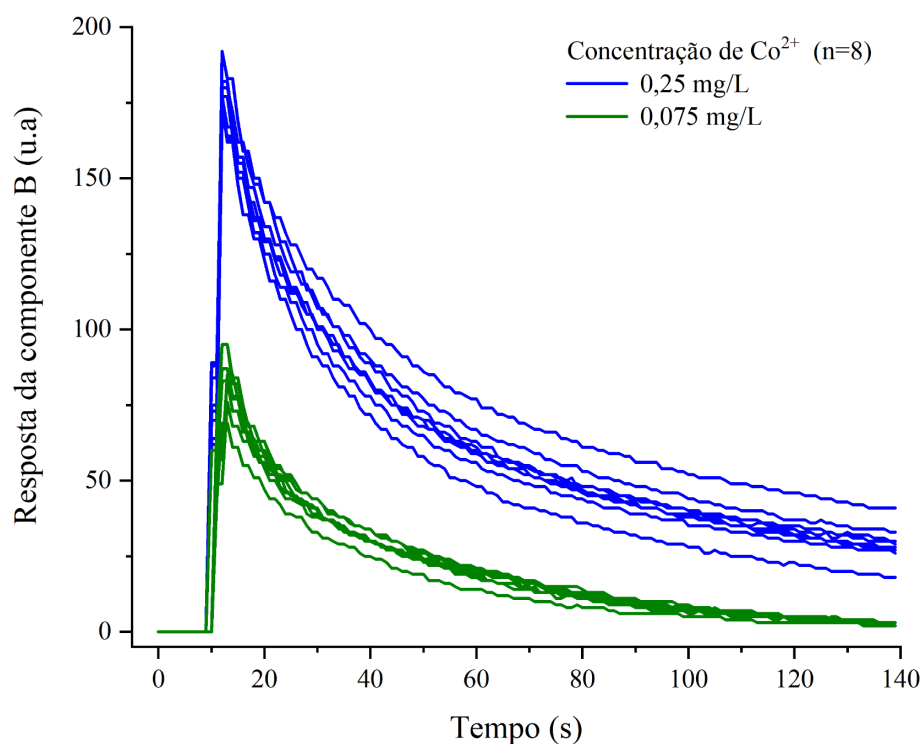


Figura 29 - Ensaio de repetibilidade da resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s) para as soluções padrões de 0,075 e 0,25 mg/L de Co(II).

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram estimados conforme o procedimento proposto por Miller e Miller (1993), utilizando o desvio padrão dos resíduos e o intercepto da curva de calibração. As equações empregadas encontram-se descritas na Seção 4.2.3. Os valores obtidos foram de 0,032 mg/L para o LD e 0,108 mg/L para o LQ, indicando que o sistema apresenta sensibilidade adequada para a análise de vitamina B₁₂ em formulações injetáveis.

Ressalta-se que, apesar dos resultados promissores obtidos para linearidade e precisão, a avaliação da exatidão não foi realizada, o que impede a validação completa do método para esse analito, no sistema de imersão. Dessa forma, os resultados apresentados são uma avaliação inicial do desempenho analítico, indicando o potencial desse sistema para a determinação de vitamina B₁₂.

4.3 Determinação de Captopril

4.3.1 Sistema de Gotas Suspensas

4.3.1.1 Influência da Modificação da Superfície com Sílica sobre a Intensidade do Sinal

Nessa etapa, observou-se que, para se obter um sinal quimiluminescente estável e detectável a partir da reação entre hipoclorito de cálcio e luminol diretamente no papel, era necessário empregar concentrações muito elevadas de hipoclorito. Consequentemente, também eram exigidas concentrações elevadas de captopril para suprimir o sinal emitido pelo branco, o que representa uma limitação para a sensibilidade do método. A Figura 30, apresenta as respostas às diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio aplicadas ao dispositivo de papel sem modificação.

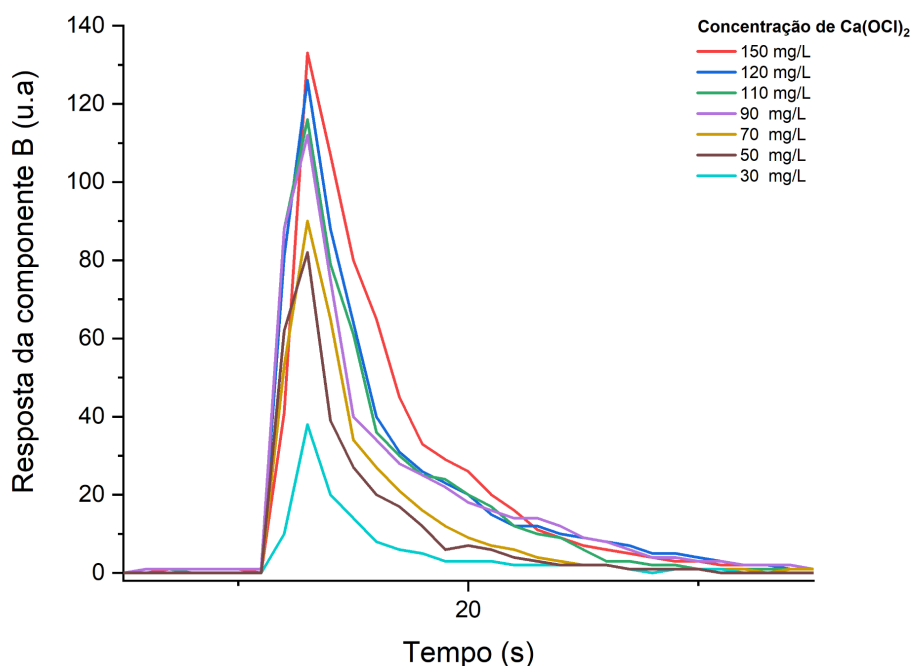


Figura 30 - Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s) no dispositivo de Papel sem adição de sílica.

Diante disso, investigou-se a possibilidade de revestir a superfície do dispositivo de papel com luminol e sílica, com o objetivo de melhorar a sensibilidade. Essa escolha baseou-se em estudos como os de Wang et al. (2015) e Zhang et al. (2012), que demonstraram ganhos expressivos em sensibilidade e limites de quantificação ao utilizarem papel revestido

com sílica para análise por espectrometria de massa por pulverização de papel (PS-MS), voltada à determinação de pesticidas em leite e de fármacos terapêuticos em gotas de sangue seco (DBS), respectivamente^[115,116].

Com base nesses estudos, aplicou-se essa estratégia ao contexto da quimiluminescência em papel, com o intuito de melhorar a retenção dos reagentes na superfície, aumentar a intensidade do sinal e aprimorar o desempenho analítico do dispositivo.

Por se tratar de um estudo preliminar, decidiu-se revestir a superfície do papel com sílica gel para cromatografia em camada delgada devido a sua ampla disponibilidade, baixo custo e facilidade de aplicação. A Figura 31 apresenta os resultados obtidos após a funcionalização da superfície do papel com luminol e sílica, confirmando que essa modificação promove um aumento significativo na detectabilidade do método, onde o sinal obtido para a detecção de 30 mg/L de hipoclorito (225 u.a. Figura 31) é cerca de 5,62 vezes maior que aquele obtido sem uso da sílica (40 u.a. Figura 30).

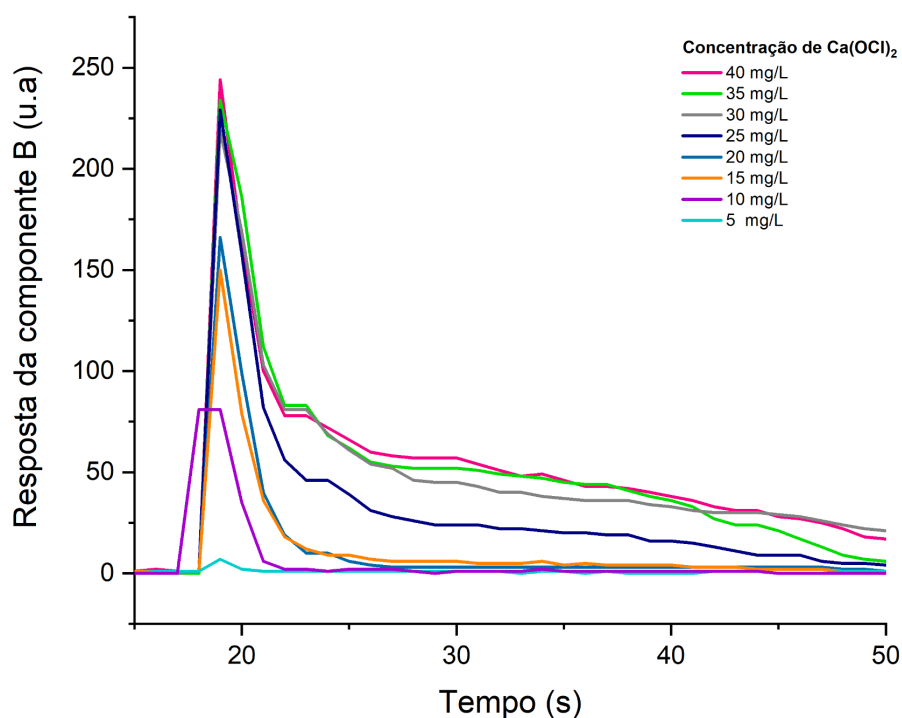


Figura 31 - Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s) no dispositivo de papel com adição de sílica.

4.3.1.2 Influência da Massa de Sílica Depositada nas Zonas de Detecção

Realizou-se um ensaio para avaliar a influência da massa de sílica a ser adicionada à zona de detecção do dispositivo à base de papel sobre a intensidade da emissão luminescente.

Utilizou-se uma suspensão de sílica com concentração de 20% (m/v), na qual foram realizadas aplicações sucessivas de 10 μL em cada uma das oito zonas de detecção. Após cada aplicação, o dispositivo foi levado à estufa por 10 minutos a 55 $^{\circ}\text{C}$ para secagem. Dessa forma, a massa total acumulada em cada zona variou de 0,2 a 1,6 mg, conforme o número de aplicações realizadas. Finalizada essa etapa, foram adicionados 10 μL de uma solução de luminol a 0,3% (m/v) em cada zona de detecção, seguida de nova secagem em estufa nas mesmas condições.

Para avaliar a influência da adição de sílica na intensidade do sinal quimiluminescente, uma solução de hipoclorito de cálcio (30 mg/L) foi aplicada sobre os dispositivos durante o procedimento analítico. A Figura 32 apresenta os dados obtidos, nos quais se relaciona a intensidade do sinal quimiluminescente com a massa de sílica acumulada em cada zona de detecção.

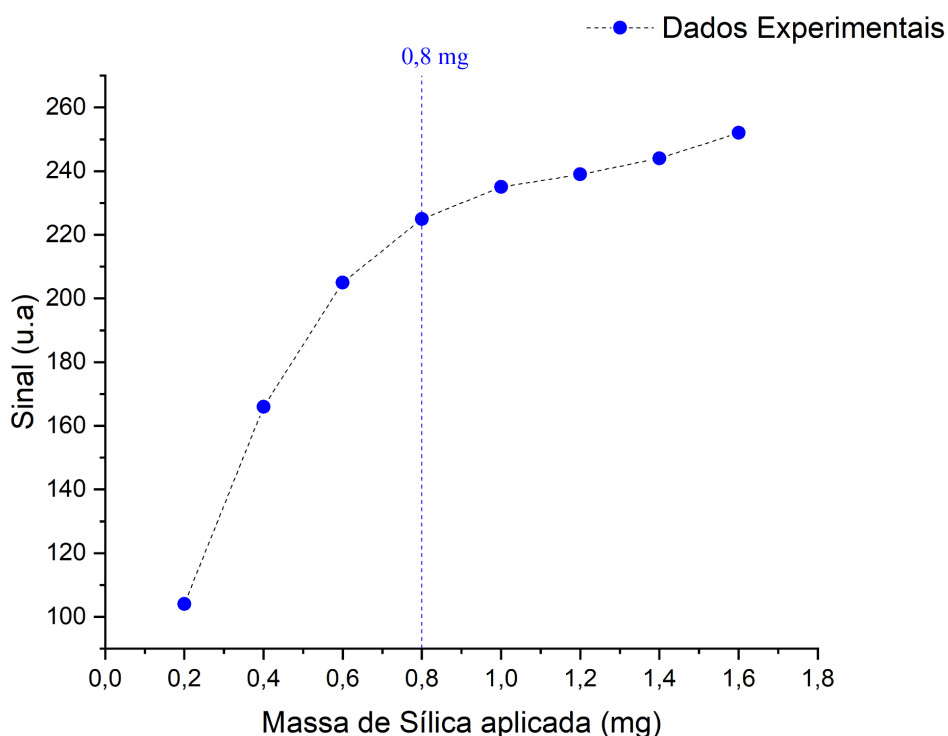


Figura 32 - Efeito da massa de sílica adicionada na intensidade do sinal quimiluminescente.

Observa-se que o aumento gradual da massa de sílica aplicada nas zonas de detecção promove um incremento na intensidade do sinal quimiluminescente. O recobrimento da superfície do papel com sílica promove alterações significativas nas propriedades físico-químicas da zona de detecção, principalmente devido ao aumento da área superficial específica, que favorece a interação e adsorção do analito, bem como dos reagentes

envolvidos na reação quimiluminescente. No entanto, a partir da adição de aproximadamente 0,8 mg de sílica, não se verifica um aumento significativo na resposta. Esse comportamento indica que incrementos adicionais da suspensão de sílica não resultam em ganhos relevantes na intensidade do sinal, sugerindo que o sistema atinge um limite máximo de resposta sob as condições avaliadas.

A fim de observar o efeito da quantidade de sílica aplicada na superfície do papel, foram obtidas imagens do dispositivo após a adição de 0,2; 0,4 e 0,8 mg de sílica com um microscópio óptico USB. Essas imagens estão representadas na Figura 33.

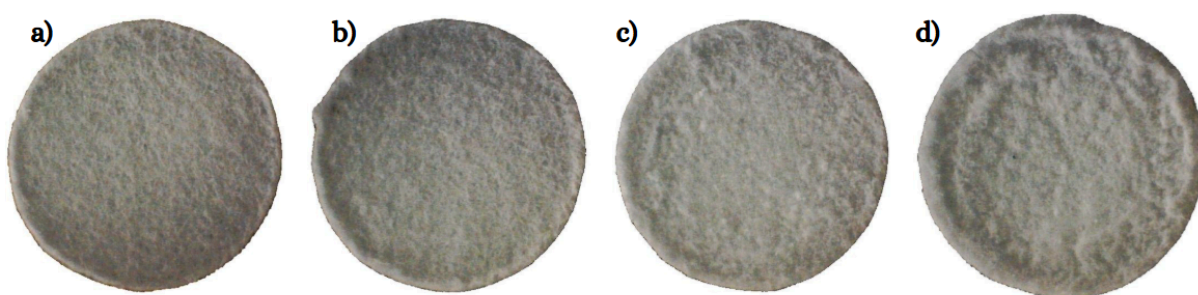


Figura 33 - Imagens da superfície do papel funcionalizado com sílica onde: (a) corresponde ao papel sem adição de sílica, (b) à adição de 0,2 mg, (c) a 0,4 mg e (d) a 0,8 mg.

Nota-se que o aumento da massa de sílica resulta em uma cobertura progressivamente mais espessa da superfície do papel. Entretanto, para quantidades mais elevadas, observa-se um acúmulo visível de material, principalmente nas bordas da zona de detecção, comportamento atribuído ao efeito *coffee-ring* durante o processo de secagem da suspensão. Esse fenômeno indica uma possível saturação da superfície, levando à formação de uma camada heterogênea. Tal heterogeneidade pode comprometer a uniformidade da reação quimiluminescente, afetando tanto a reprodutibilidade quanto a detectabilidade do sinal. Considerando esses aspectos, uma massa de 0,4 mg de sílica foi selecionada como condição ótima para a continuidade dos estudos, por proporcionar um recobrimento adequado da superfície sem prejuízo à homogeneidade do sistema.

4.3.1.3 Desempenho Analítico

A Figura 34 apresenta os sinais quimiluminescentes obtidos para as diferentes concentrações dos padrões de captopril utilizados na construção da curva analítica. Como mencionado anteriormente, essa curva foi baseada no efeito de supressão provocado pelo captopril na reação quimiluminescente entre o hipoclorito de cálcio e o luminol.

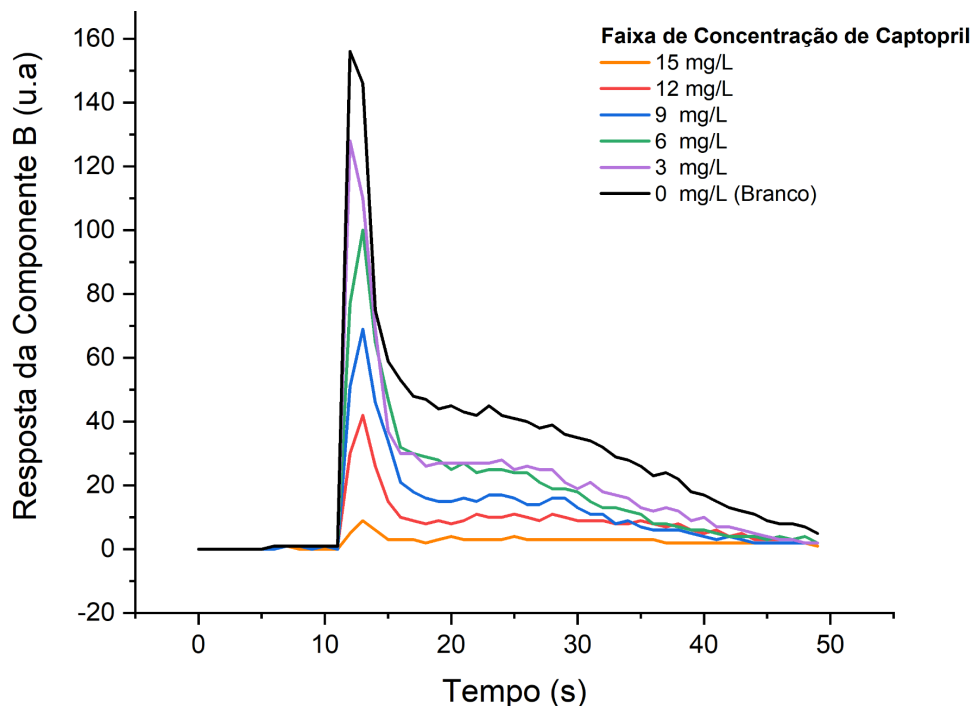


Figura 34 - Faixa linear da resposta analítica da componente B (u.a.) em função do tempo (s), empregada na etapa de quantificação de captopril.

A linearidade desse sistema foi avaliada de forma preliminar por meio da construção de uma curva analítica na faixa de concentração de 3 a 15 mg/L de captopril. A curva, apresentada na Figura 35, foi obtida a partir da diferença entre as alturas dos picos de emissão quimiluminescente das soluções padrão e do branco, utilizando-se a componente B do sistema RGB.

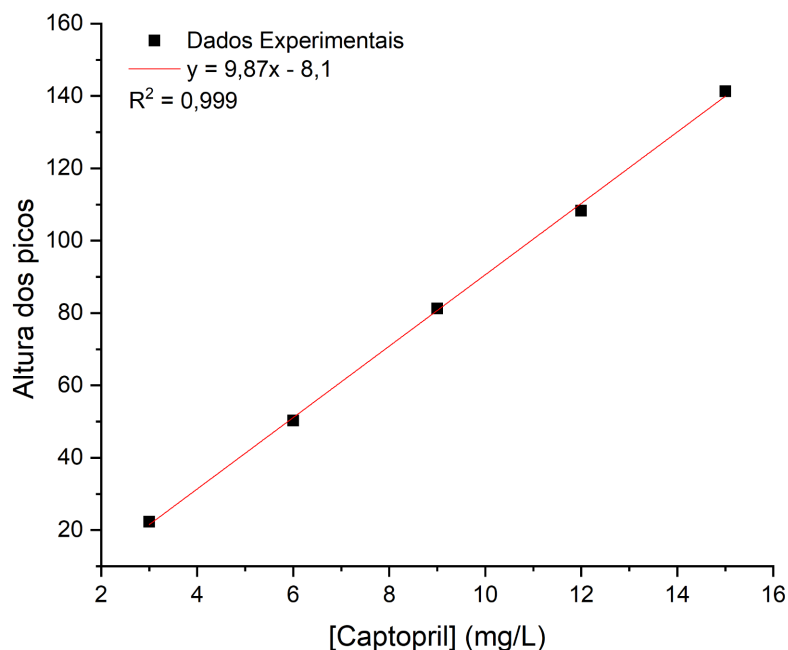


Figura 35 - Curva analítica para a determinação de captopril, baseada na resposta da componente B (u.a.), com comportamento linear na faixa de 3 a 15 mg/L e coeficiente de determinação $R^2 = 0,999$.

O coeficiente de determinação obtido ($R^2 = 0,999$) evidencia que, sob condições experimentais específicas, o sistema apresentou resposta linear ao analito. Entretanto, apesar do elevado ajuste linear observado, não foi possível reproduzir essa curva analítica de forma consistente. Mesmo após a realização de múltiplos ensaios independentes, a reprodutibilidade do sinal não foi alcançada em nível adequado para permitir a aplicação do método na análise de amostras. Diferentes estratégias foram avaliadas com o objetivo de melhorar a estabilidade e a reprodutibilidade do sistema, incluindo ajustes no protocolo experimental e a aplicação da técnica de *dip coating* para o recobrimento do substrato.

Adicionalmente, observou-se que o pré-tratamento do papel com peróxido de hidrogênio, em substituição à deposição de sílica, resultou em aumento da resposta quimiluminescente em baixas concentrações de hipoclorito. Apesar desse ganho de sinal, a reprodutibilidade necessária para a quantificação analítica não foi alcançada, inviabilizando a validação do método.

Dessa forma, embora o sistema de elevação por gotas suspensas tenha apresentado comportamento promissor em condições controladas, suas limitações operacionais impediram sua aplicação em análises quantitativas de captopril.

4.3.2 Sistema de Imersão Automatizada

4.3.2.1 Influência da Oxidação das Fibras de Celulose com peróxido de hidrogênio

Nessa etapa, avaliou-se como o pré-tratamento oxidativo das fibras de celulose influencia a intensidade do sinal quimiluminescente da reação entre luminol e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Em substratos não tratados, grupos hidroxila e outras espécies redutoras presentes na matriz do papel podem consumir parte do hipoclorito ou gerar intermediários reativos, reduzindo a eficiência da reação e, conseqüentemente, a sensibilidade do método^[117]. A Figura 36 mostra os resultados obtidos após mergulhar o papel apenas em água (controle) e após o tratamento oxidativo (mergulho em solução de peróxido de hidrogênio), evidenciando que a oxidação prévia da superfície promove um aumento significativo na detectabilidade do sinal analítico para uma mesma concentração de hipoclorito.

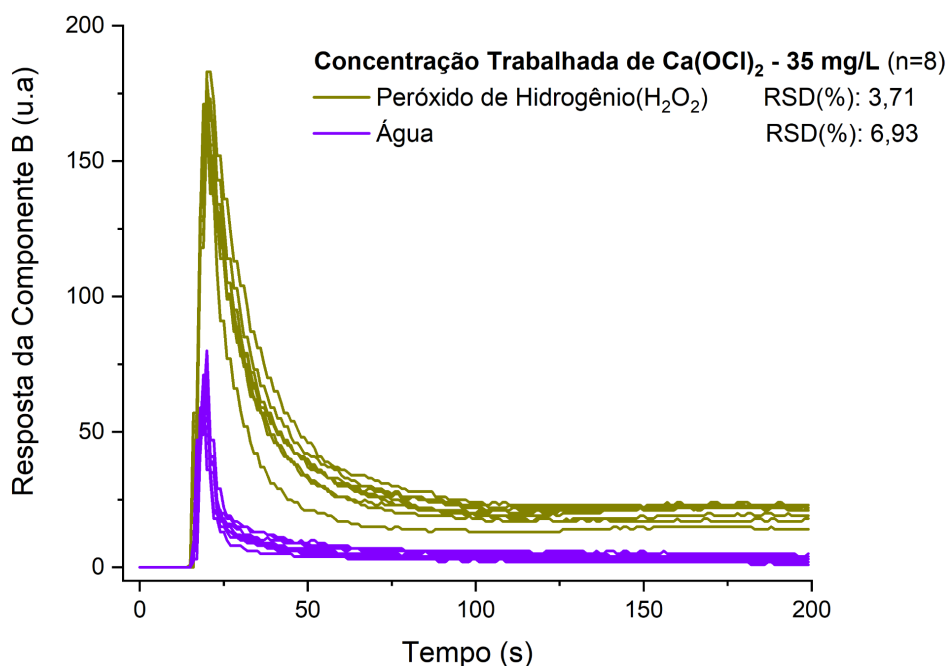


Figura 36 - Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s), obtida no ensaio sobre a influência do tratamento pré-oxidativo do dispositivo analítico de papel.

Apesar da redução observada no desvio padrão relativo (RSD) após o pré-tratamento oxidativo, a comparação isolada desse parâmetro pode ser influenciada pelo aumento do sinal analítico médio. Assim, a avaliação da precisão foi realizada por meio da comparação dos desvios padrão absolutos utilizando o teste F, ao nível de confiança de 95%. O valor de F

calculado (1,75) foi inferior ao valor crítico tabelado (3,79), indicando que não há diferença estatisticamente significativa entre as variâncias dos conjuntos de dados. Dessa forma, conclui-se que o pré-tratamento oxidativo promove aumento da resposta quimiluminescente, sem alterar significativamente a precisão do sistema analítico.

4.3.2.2 Influência do Substrato de Papel no Desempenho Analítico do Dispositivo

Nessa etapa, avaliou-se a influência do tipo de substrato na resposta analítica do dispositivo, comparando-se o desempenho do papel cromatográfico e do papel adesivo. A Figura 37 apresenta os resultados obtidos, evidenciando que ambos os materiais forneceram sinais quimiluminescentes próximos, considerando as alturas dos picos, mas com áreas maiores para os picos obtidos com o papel adesivo, mostrando que, de alguma maneira, esse suporte leva à uma luminescência mais duradoura que aquela obtida com o papel cromatográfico, o que pode ser considerado um fator positivo para a detecção do sinal.

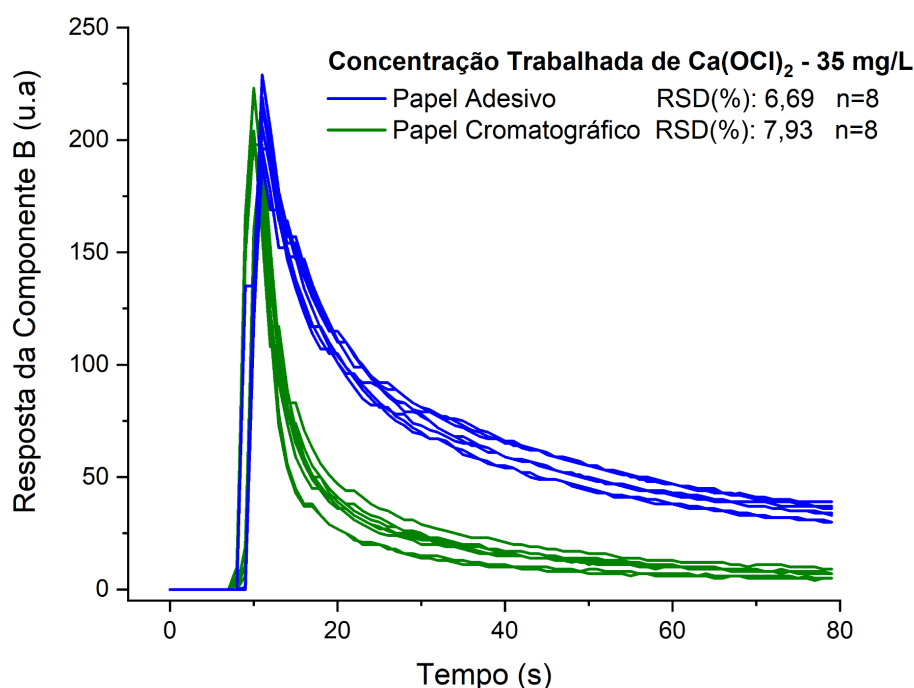


Figura 37 - Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s), obtida no ensaio sobre a influência do substrato de papel no desempenho analítico.

Em termos das alturas dos picos, o papel adesivo apresentou desempenho levemente superior, exibindo maior intensidade média (208,5 u.a.) em comparação ao papel cromatográfico (197,4 u.a.), o que sugere maior eficiência como suporte para a reação

quimiluminescente entre luminol e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Ao comparar as variâncias associadas aos dois conjuntos de dados por meio do teste F, ao nível de confiança de 95%, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as variâncias. Em seguida, aplicou-se o teste t de Student, também ao nível de confiança de 95%, o qual indicou que não há diferença estatisticamente significativa entre as respostas médias obtidas com os dois tipos de substrato. Esses resultados demonstram que, nas condições avaliadas, o tipo de papel não exerce influência significativa sobre a resposta analítica do dispositivo, permitindo a utilização de ambos os substratos sem prejuízo ao desempenho analítico.

Além do desempenho analítico comparável, o papel adesivo apresenta custo significativamente inferior ao do papel cromatográfico, contribuindo para a redução dos custos de fabricação dos dispositivos. Dessa forma, esse substrato foi selecionado para dar continuidade aos estudos de desempenho analítico do sistema proposto.

4.3.2.3 Influência da Velocidade de Imersão no Desempenho Analítico do Dispositivo

Nessa etapa, investigou-se a influência da velocidade de imersão do PAD sobre a resposta quimiluminescente. Diferentes velocidades de imersão, variando de 1 a 15 mm/s, foram investigadas, utilizando-se uma concentração de 35 mg/L de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, no qual todas as medidas foram realizadas em oito replicatas. A Figura 38 apresenta a relação entre a altura do pico do sinal quimiluminescente e a velocidade aplicada.

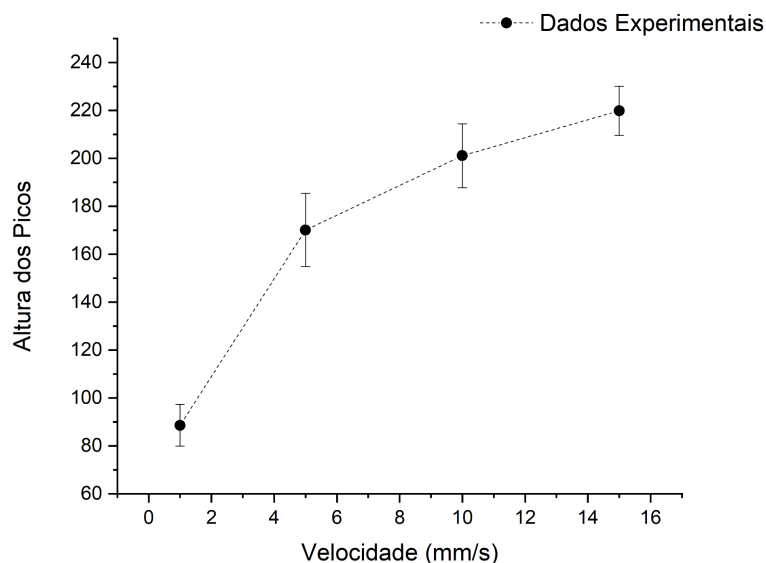


Figura 38 – Influência da velocidade de imersão (mm/s) sobre a intensidade do sinal quimiluminescente.

A partir do gráfico, observa-se que o aumento da velocidade de imersão do PAD promove um incremento na resposta quimiluminescente, especialmente no intervalo entre 1 e 5 mm/s, onde ocorre o maior ganho de sinal. Entretanto, acima dessa velocidade, a curva passa a apresentar tendência à saturação, com aumentos progressivamente menores na altura dos picos. Esse comportamento indica que, acima desse limite, o aumento da velocidade deixa de contribuir de forma significativa na eficiência da reação. Assim, velocidades próximas de 5 mm/s foram consideradas adequadas, sendo adotadas nas etapas subsequentes do estudo.

4.3.2.4 Avaliação da linearidade do sistema luminol/ $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ sob condições otimizadas

Após a definição das condições experimentais otimizadas, avaliou-se o comportamento da resposta quimiluminescente do sistema em função da concentração do agente oxidante. Essa etapa teve como objetivo caracterizar a sensibilidade e a linearidade do método sob as condições selecionadas. A Figura 39 apresenta a relação entre a altura dos picos quimiluminescentes e a concentração de hipoclorito na faixa de 10 a 35 mg/L, no qual todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

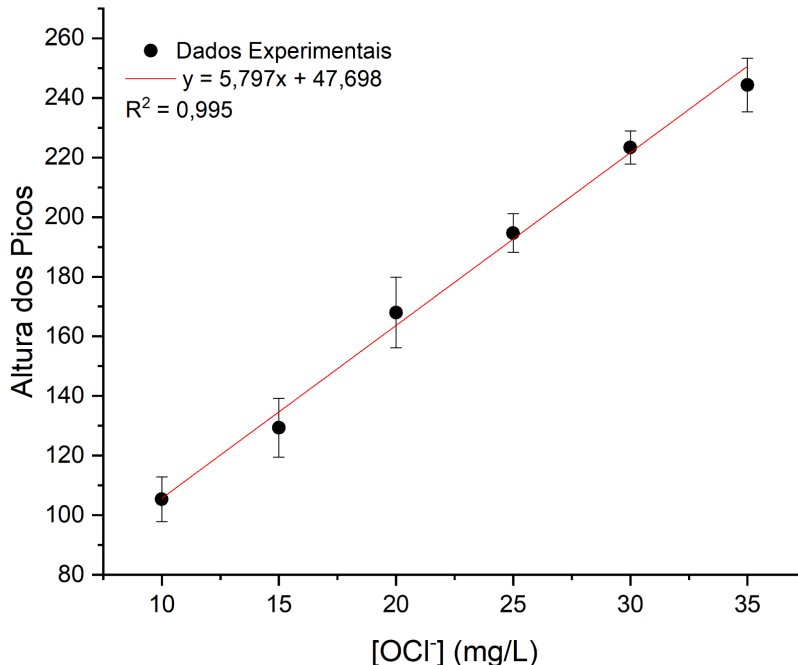


Figura 39 – Relação entre a intensidade do sinal quimiluminescente e a concentração de hipoclorito de cálcio no sistema luminol/ $\text{Ca}(\text{OCl})_2$.

Observa-se um comportamento linear bem definido, com coeficiente de determinação de $R^2 = 0,995$, evidenciando que, nas condições estudadas, o sistema responde de forma

proporcional ao aumento da concentração do oxidante. Esse resultado confirma que as otimizações previamente adotadas resultaram em um sistema sensível e reprodutível, sendo capaz de quantificar pequenas variações na concentração do reagente.

A partir dessa avaliação, definiu-se a concentração de hipoclorito de cálcio a ser empregada nos ensaios de supressão, sendo selecionada a concentração de 35 mg/L por apresentar elevada intensidade de sinal sem saturação, e situar-se na região linear de resposta do sistema.

Dessa forma, qualquer variação do sinal quimiluminescente observada posteriormente na presença do captopril pode ser atribuída, de maneira confiável, ao efeito de supressão da reação luminol/hipoclorito promovido pelo analito, e não a limitações do sistema reacional ou da plataforma de detecção. Portanto, a avaliação da resposta quimiluminescente em função da concentração do hipoclorito confirma a adequação do sistema desenvolvido e valida sua aplicação na determinação indireta de captopril.

4.3.3 Desempenho Analítico

A Figura 40 apresenta a curva analítica obtida para a determinação indireta de captopril, construída a partir da relação entre a altura dos picos quimiluminescentes e a concentração do analito na faixa de 12,0 a 19,5 mg/L.

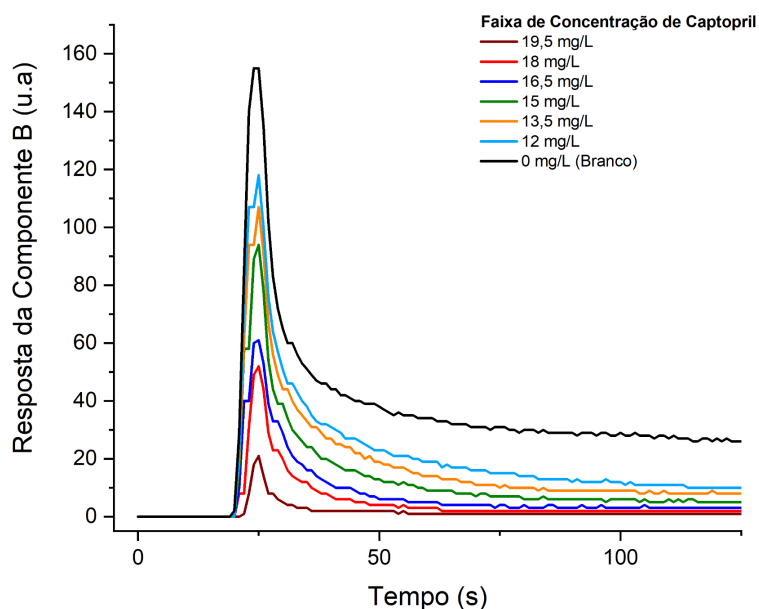


Figura 40 - Faixa linear da resposta analítica da componente B (u.a.) em função do tempo (s), empregada na etapa de quantificação de captopril.

A curva, apresentada na Figura 41, foi elaborada com base na diferença entre as alturas dos picos de emissão luminosa das amostras/padrões e do branco, extraídas da componente B do sistema RGB. O valor obtido para o coeficiente de determinação foi $R^2 = 0,994$, o que indica linearidade apropriada da resposta analítica, mesmo em concentrações relativamente baixas (< 20 mg/L), todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

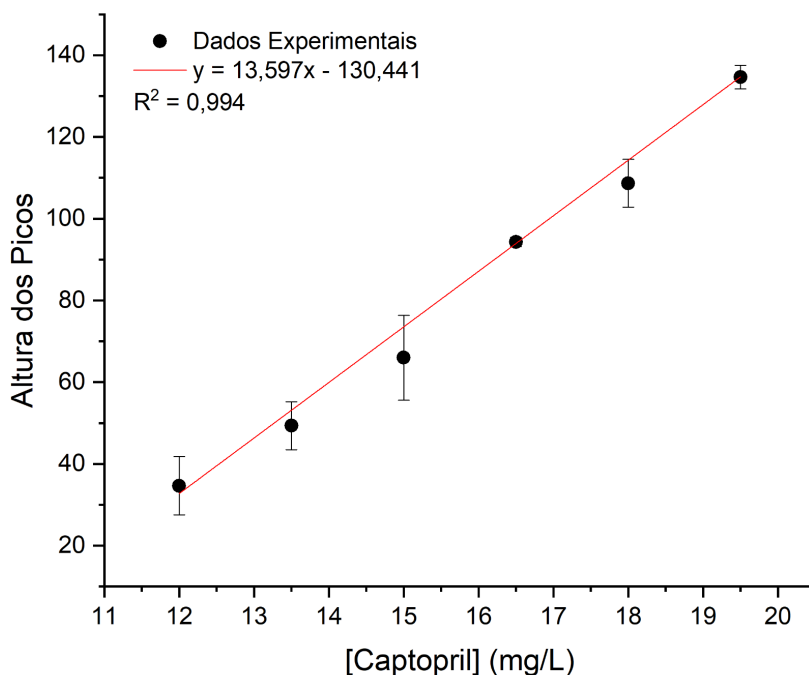


Figura 41 - Curva analítica para a determinação de captopril, baseada na resposta da componente B (u.a.), com comportamento linear na faixa de 12 a 19,5 mg/L e coeficiente de determinação (R^2) de 0,994.

Além disso, os desvios experimentais relativamente baixos, representados pelas barras de erro, indicam boa repetibilidade das medidas ao longo da faixa de concentração estudada. Assim, os resultados demonstram que o sistema desenvolvido apresenta desempenho analítico satisfatório, sendo adequado para a quantificação indireta de captopril em amostras, com sensibilidade e linearidade compatíveis com aplicações analíticas.

Para estimar o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), foi adotado o procedimento recomendado por J.C. Miller e J. N. Miller (1993). Com base nos valores obtidos para o desvio padrão dos resíduos ($S_{\frac{x}{y}} = 5,16$) e para o intercepto da curva de calibração ($b = -130,44$), aplicou-se a Equação 2, descrita na seção 4.2.3, obtendo-se um limite de detecção de 1,14 mg/L.

De forma análoga, por meio da Equação 3, também apresentada na mesma seção, determinou-se o limite de quantificação, cujo valor foi de 3,80 mg/L. A partir desses

resultados, conclui-se que o sistema é capaz de identificar baixas concentrações do analito que atendem a análise de comprimidos.

Entretanto, apesar dos valores calculados indicarem sensibilidade adequada do método, experimentalmente a menor concentração avaliada com resposta analítica confiável foi de 12 mg/L de captopril. Dessa forma, observa-se uma discrepância entre os limites teóricos estimados e o desempenho experimental do sistema, evidenciando que fatores associados às características intrínsecas da reação quimiluminescente envolvida, cuja eficiência depende fortemente das condições reacionais e apresenta elevada sensibilidade a pequenas variações experimentais limitam a aplicação prática do método em concentrações inferiores às experimentalmente observadas.

Para avaliar a precisão do método proposto, foram realizados ensaios de repetibilidade. Inicialmente, investigou-se a estabilidade do sistema analítico, isto é, a variação do sinal quimiluminescente na ausência do analito (captopril). Nesse ensaio, o dispositivo analítico em papel (PAD) foi imerso em soluções padrão de hipoclorito de cálcio a 35 mg/L (solução em branco), sendo obtido um desvio padrão relativo (DPR) de 6,69% para as alturas dos picos, indicando boa estabilidade do sistema nas condições experimentais adotadas.

Em seguida, avaliou-se a repetibilidade da resposta na presença do analito. Para isso, os PADs pré tratados com peróxido de hidrogênio foram imersos em soluções contendo 35 mg/L de hipoclorito de cálcio e diferentes concentrações de captopril (10,5; 15,0 e 16,5 mg/L), representativas das regiões baixa, intermediária e alta do intervalo linear do método. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 42, evidenciaram valores de DPR de 8,50%, 5,64% e 11,59%, respectivamente. Esses resultados demonstram uma repetibilidade satisfatória ao longo da faixa linear do método, confirmando a confiabilidade do sistema tanto na ausência quanto na presença do analito.

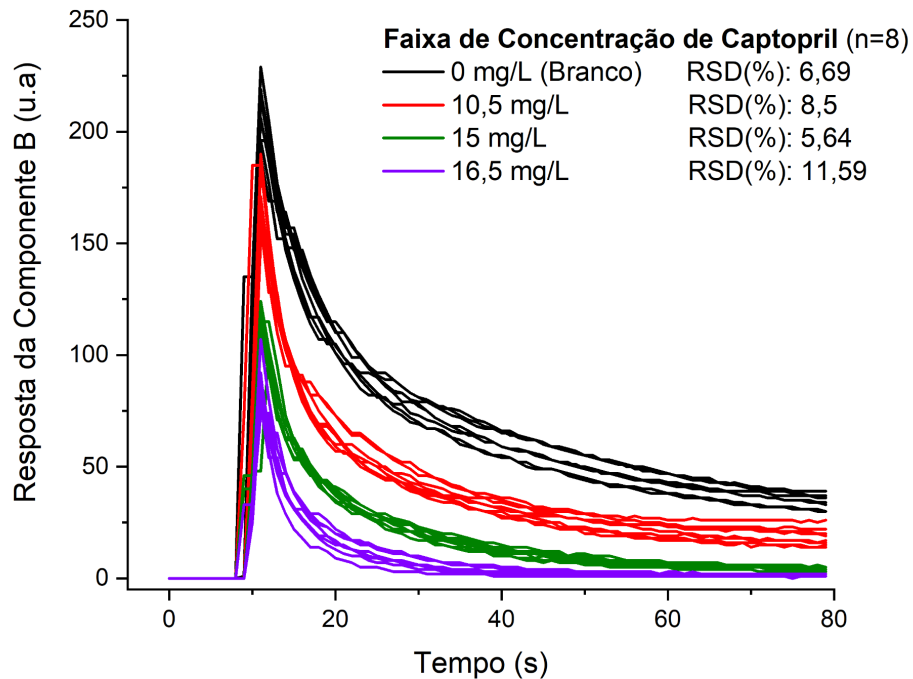


Figura 42 - Resposta da componente B (u.a.) em função do tempo (s) para diferentes concentrações de captopril (mg/L).

Para avaliar a exatidão do método, analisou-se sete formulações farmacêuticas comerciais de captopril em comprimidos, sendo cinco delas rotuladas com teor nominal de 25 mg por comprimido e duas com teor nominal de 50 mg por comprimido. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles fornecidos pelo método de titulação coulométrica de corrente constante.

O valor para a concentração da amostra foi calculado a partir da equação da reta de sua curva analítica, o resultado para a concentração de captopril na amostra comercial pelo instrumento proposto e pelo método de referência, com seus respectivos erros relativos, são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores da massa de Captopril nas amostras comerciais e obtidas pelo instrumento proposto e de referência.

Amostra	Massa de Captopril no rótulo (mg/comprimido)	Massa de Captopril obtida pelo instrumento proposto (mg/comprimido)	Massa de Captopril obtida pelo método de referência (mg/comprimido)	Erro relativo * (Er)
A	25	24,79 ± 1,14	25,23 ± 0,52	-1,75 %
B	25	25,43 ± 0,64	24,59 ± 4,06	3,42 %
C	25	26,93 ± 0,89	25,72 ± 0,21	4,72 %
D	25	24,99 ± 1,83	25,41 ± 2,35	-1,67 %
E	25	24,19 ± 0,92	25,41 ± 2,35	-4,81 %
F	50	48,46 ± 2,08	49,20 ± 1,84	-1,51 %
G	50	54,51 ± 10,53	52,31 ± 1,83	4,20%

*entre o método proposto e o método de referência.

Conforme apresentado, os teores de captopril determinados pelo instrumento proposto apresentaram boa concordância tanto com os valores declarados nos rótulos quanto com aqueles obtidos pelo método de referência, titulação coulométrica. Para todas as amostras analisadas, os erros relativos na comparação com o método de referência foram inferiores a 5%, indicando adequada exatidão do método desenvolvido. O teste t ao nível de 95 % de confiança indicou não haver diferenças significativas entre os valores determinados pelo método proposto e o método de referência, demonstrando uma exatidão satisfatória do método desenvolvido e sua aplicabilidade na análise de captopril em formulações farmacêuticas.

5. Conclusão e Perspectivas

Neste trabalho, foram desenvolvidos dois sistemas analíticos portáteis, simples e de baixo custo, voltados para a realização de análises quimiluminométricas rápidas com uso de dispositivos analíticos em papel (PADs). O método de fabricação dos PADs utilizou materiais acessíveis, assegurando boa reprodutibilidade e dispensando o uso de equipamentos sofisticados. O aplicativo desenvolvido para captação de imagens digitais via smartphone com sistema RGB demonstrou excelente desempenho, evidenciando o potencial da abordagem.

O Sistema de Gotas Suspensas apresentou desempenho adequado para a determinação de vitamina B₁₂, possibilitando a obtenção de parâmetros analíticos satisfatórios. Entretanto, sua aplicação à determinação de captopril mostrou-se limitada, uma vez que as estratégias de revestimento da superfície do papel necessárias para essa análise não apresentaram reprodutibilidade adequada. Essas limitações motivaram a reformulação do sistema analítico e o desenvolvimento do Sistema de Imersão Automatizado.

O Sistema de Imersão Automatizado, projetado especificamente para superar as dificuldades observadas, permitiu a validação completa do método para a determinação de captopril, incluindo estudos de linearidade, precisão e exatidão, evidenciando seu uso analítico. Para a determinação de vitamina B₁₂, esse equipamento foi avaliado de forma preliminar, com resultados promissores quanto à linearidade e à precisão, embora a validação completa não tenha sido realizada no escopo deste trabalho.

De maneira geral, os resultados obtidos evidenciam o caráter complementar dos dois equipamentos e reforçam o potencial dos dispositivos analíticos em papel para aplicações analíticas, destacando a possibilidade de explorar diferentes configurações de operação, como sistemas baseados em gota suspensa e imersão, aliados à análise por imagens digitais. Esses resultados confirmam a adequação dessas plataformas como ferramentas analíticas de baixo custo e abrem perspectivas para estudos futuros voltados à ampliação e validação de novas aplicações.

Referências Bibliográficas

1. CARRELL, Cody et al. Beyond the lateral flow assay: A review of paper-based microfluidics. *Microelectronic Engineering*, v. 206, p. 45-54, 2019. DOI: [10.1016/j.mee.2018.12.002](https://doi.org/10.1016/j.mee.2018.12.002)
2. DE OLIVEIRA, Ricardo AG et al. A simple method to produce 2D and 3D microfluidic paper-based analytical devices for clinical analysis. *Analytica chimica acta*, v. 957, p. 40-46, 2017. DOI: [10.1016/j.aca.2017.01.002](https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.002)
3. TROFIMCHUK, Evan et al. Development of paper-based microfluidic device for the determination of nitrite in meat. *Food chemistry*, v. 316, p. 126396, 2020. DOI: [10.1016/j.foodchem.2020.126396](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126396)
4. YAKOH, Abdulhadee et al. Simple and selective paper-based colorimetric sensor for determination of chloride ion in environmental samples using label-free silver nanoprisms. *Talanta*, v. 178, p. 134-140, 2018. DOI: [10.1016/j.talanta.2017.09.013](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.013)
5. GUAN, Yanfang et al. An integrated platform for fibrinogen quantification on a microfluidic paper-based analytical device. *Lab on a Chip*, v. 20, n. 15, p. 2724-2734, 2020. DOI: [10.1039/D0LC00439A](https://doi.org/10.1039/D0LC00439A)
6. YAGODA, Herman. Applications of confined spot tests in analytical chemistry: preliminary paper. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, v. 9, n. 2, p. 79-82, 1937.
7. MARTINEZ, Andres W. et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie*, v. 119, n. 8, p. 1340-1342, 2007. DOI: [10.1002/anie.200603817](https://doi.org/10.1002/anie.200603817)
8. TONG, X. et al. Research progress on the applications of paper chips. *RSC Advances*, v. 11, n. 15, p. 8793–8820, 2021. DOI: [10.1039/D0RA10470A](https://doi.org/10.1039/D0RA10470A)
9. BALLESTEROS, Joel I.; CALEJA-BALLESTEROS, Harriet Jane R.; VILLENA, Marte C. Digital image-based method for iron detection using green tea (*Camellia sinensis*) extract as natural colorimetric reagent. *Microchemical Journal*, v. 160, p. 105652, 2021. DOI: [10.1016/j.microc.2020.105652](https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105652)
10. MOURA, Hadassa de Souza Ramos Pontes. Dissertação (mestrado) Uso de imagens digitais para detecção de luminescência em sistemas microfluídicos de análise. 2016.

11. HASHIMOTO, Yuki; KANETA, Takashi. Chromatographic paper-based analytical devices using an oxidized paper substrate. *Analytical Methods*, v. 11, n. 2, p. 179-184, 2019.
12. KUMAR, Sanjay; BHUSHAN, Pulak; BHATTACHARYA, Shantanu. Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of uric acid using gold nanoparticles–graphene oxide (AuNPs–GO) conjugates. *Analytical Methods*, v. 8, n. 38, p. 6965-6973, 2016. DOI: [10.1039/C6AY01926A](https://doi.org/10.1039/C6AY01926A)
13. PRADELA-FILHO, Lauro A. et al. based analytical devices for point-of-need applications. *Microchimica Acta*, v. 190, n. 5, p. 179, 2023. DOI: [10.1007/s00604-023-05764-5](https://doi.org/10.1007/s00604-023-05764-5)
14. AKYAZI, Tugce; BASABE-DESMONTS, Lourdes; BENITO-LOPEZ, Fernando. Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation. *Analytica chimica acta*, v. 1001, p. 1-17, 2018. DOI: [10.1016/j.aca.2017.11.010](https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.010)
15. MÜLLER, R. H.; CLEGG, D. L. Automatic paper chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 21, n. 9, p. 1123-1125, 1949.
16. FREE, Alfred H. et al. Simple specific test for urine glucose. *Clinical chemistry*, v. 3, n. 3, p. 163-168, 1957.
17. ALLAMEH, Samira; RABBANI, Mohsen. A distance-based microfluidic paper-based biosensor for glucose measurements in tear range. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 194, n. 5, p. 2077-2092, 2022. DOI: [10.1007/s12010-022-03817-8](https://doi.org/10.1007/s12010-022-03817-8)
18. CARATELLI, Veronica et al. Precision medicine in Alzheimer's disease: An origami paper-based electrochemical device for cholinesterase inhibitors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 165, p. 112411, 2020. DOI: [10.1016/j.bios.2020.112411](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112411)
19. BORDBAR, Mohammad Mahdi et al. A colorimetric electronic tongue for point-of-care detection of COVID-19 using salivary metabolites. *Talanta*, v. 246, p. 123537, 2022. DOI: [10.1016/j.talanta.2022.123537](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123537)
20. KAMEL, Ayman H.; ABD-RABBOH, Hisham SM; BAJABER, Majed A. Non-enzymatic paper-based analytical device for direct potentiometric detection of urine creatinine. *Microchimica Acta*, v. 191, n. 3, p. 128, 2024. DOI: [10.1007/s00604-024-06203-9](https://doi.org/10.1007/s00604-024-06203-9)
21. BONACCI, Mason E. et al. Speciation of inorganic arsenic in aqueous samples using a novel hydride generation microfluidic paper-based analytical device (μ PAD). *Microchimica Acta*, v. 189, n. 7, p. 243, 2022. DOI: [10.1007/s00604-022-05339-w](https://doi.org/10.1007/s00604-022-05339-w)

22. ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, L. Paper-based analytical device for sensitive colorimetric determination of sulfonamides in pharmaceutical samples. *Talanta*, v. 252, p. 123747, 2023. DOI: [10.1016/j.talanta.2022.123747](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123747).
23. ALAHMAD, Waleed et al. Electrochemical paper-based analytical devices for environmental analysis: Current trends and perspectives. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, v. 40, p. e00220, 2023. DOI: [10.1016/j.teac.2023.e00220](https://doi.org/10.1016/j.teac.2023.e00220)
24. PHOLSIRI, Tavechai et al. A chromatographic paper-based electrochemical device to determine Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in cannabis oil. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 355, p. 131353, 2022. DOI: [10.1016/j.snb.2021.131353](https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131353)
25. DA SILVA, Gabriela O.; DE ARAUJO, William R.; PAIXÃO, Thiago RLC. Portable and low-cost colorimetric office paper-based device for phenacetin detection in seized cocaine samples. *Talanta*, v. 176, p. 674-678, 2018. DOI: [10.1016/j.talanta.2017.08.082](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.082)
26. TANG, Rui Hua et al. Chitosan-modified nitrocellulose membrane for paper-based point-of-care testing. *Cellulose*, v. 27, p. 3835-3846, 2020. DOI: [10.1007/s10570-020-03031-x](https://doi.org/10.1007/s10570-020-03031-x)
27. HE, Yong et al. Fabrication of paper-based microfluidic analysis devices: A review. *Rsc Advances*, v. 5, n. 95, p. 78109-78127, 2015. DOI: [10.1039/c5ra09188h](https://doi.org/10.1039/c5ra09188h)
28. CATE, David M. et al. Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Analytical chemistry*, v. 87, n. 1, p. 19-41, 2015. DOI: [10.1021/ac503968p](https://doi.org/10.1021/ac503968p)
29. TRAN, Bao Thai et al. Wax gates in laminated microfluidic paper-based immunosensors. *Microchemical Journal*, v. 178, p. 107343, 2022. DOI: [10.1016/j.microc.2022.107343](https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107343)
30. ASANO, Hitoshi; SHIRAIISHI, Yukihide. Development of paper-based microfluidic analytical device for iron assay using photomask printed with 3D printer for fabrication of hydrophilic and hydrophobic zones on paper by photolithography. *Analytica Chimica Acta*, v. 883, p. 55-60, 2015. DOI: [10.1016/j.aca.2015.04.014](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.014)
31. SILVESTRI, Alessandro et al. An Electroactive and Self-Assembling Bio-Ink, based on Protein-Stabilized Nanoclusters and Graphene, for the Manufacture of Fully Inkjet-Printed Paper-Based Analytical Devices. *Small*, v. 19, n. 51, p. 2300163, 2023. DOI: [10.1002/smll.202300163](https://doi.org/10.1002/smll.202300163)
32. ASSAIFAN, Abdulaziz K. et al. Nanotextured surface on flexographic printed ZnO thin films for low-cost non-faradaic biosensors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 8, n. 49, p. 33802-33810, 2016. DOI: [10.1021/acsami.6b11640](https://doi.org/10.1021/acsami.6b11640)

33. ESPINOSA, Antonio et al. Fabrication of paper-based microfluidic devices using a 3D printer and a commercially-available wax filament. *Talanta open*, v. 6, p. 100142, 2022. DOI: [10.1016/j.aca.2015.04.014](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.014)
34. KAO, Peng-Kai; HSU, Cheng-Che. One-step rapid fabrication of paper-based microfluidic devices using fluorocarbon plasma polymerization. *Microfluidics and nanofluidics*, v. 16, p. 811-818, 2014. DOI: [10.1007/s10404-014-1347-5](https://doi.org/10.1007/s10404-014-1347-5)
35. DE OLIVEIRA, Tassia Regina et al. Fast and flexible strategy to produce electrochemical paper-based analytical devices using a craft cutter printer to create wax barrier and screen-printed electrodes. *Talanta*, v. 195, p. 480-489, 2019. DOI: [10.1016/j.talanta.2018.11.047](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.047)
36. NIE, Jinfang et al. Low-cost fabrication of paper-based microfluidic devices by one-step plotting. *Analytical chemistry*, v. 84, n. 15, p. 6331-6335, 2012. DOI: [10.1021/ac203496c](https://doi.org/10.1021/ac203496c)
37. SITANURAK, Jirayu et al. T-shirt ink for one-step screen-printing of hydrophobic barriers for 2D-and 3D-microfluidic paper-based analytical devices. *Talanta*, v. 205, p. 120113, 2019. DOI: [10.1016/j.talanta.2019.120113](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120113)
38. LIM, Hosub; JAFRY, Ali Turab; LEE, Jinkee. Fabrication, flow control, and applications of microfluidic paper-based analytical devices. *Molecules*, v. 24, n. 16, p. 2869, 2019. DOI: [10.3390/molecules24162869](https://doi.org/10.3390/molecules24162869)
39. MASUMOTO, Mayu et al. Colorimetric paper-based sarcosine assay with improved sensitivity. *Analytical and bioanalytical chemistry*, p. 1-11, 2022. DOI: [10.1007/s00216-021-03682-0](https://doi.org/10.1007/s00216-021-03682-0)
40. MANBOHI, Ahmad; AHMADI, Seyyed Hamid. Sensitive and selective detection of dopamine using electrochemical microfluidic paper-based analytical nanosensor. *Sensing and Bio-Sensing Research*, v. 23, p. 100270, 2019. DOI: [10.1016/j.sbsr.2019.100270](https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2019.100270)
41. NOVIANA, Eka et al. Microfluidic paper-based analytical devices: from design to applications. *Chemical reviews*, v. 121, n. 19, p. 11835-11885, 2021. DOI: [10.1021/acs.chemrev.0c01335](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01335)
42. CHEN, Suming; WAN, Qiongqiong; BADU-TAWIAH, Abraham K. Mass spectrometry for paper-based immunoassays: toward on-demand diagnosis. *Journal of the American Chemical Society*, v. 138, n. 20, p. 6356-6359, 2016. DOI: [10.1021/jacs.6b02232](https://doi.org/10.1021/jacs.6b02232)

43. LIU, Xiaofang et al. Pattern-recognizing-assisted detection of mildewed wheat by Dyes/Dyes-Cu-MOF paper-based colorimetric sensor array. *Food Chemistry*, v. 415, p. 135525, 2023. DOI: [10.1016/j.foodchem.2023.135525](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135525)
44. BORDBAR, Mohammad Mahdi et al. A paper-based colorimetric sensor array for discrimination and simultaneous determination of organophosphate and carbamate pesticides in tap water, apple juice, and rice. *Microchimica Acta*, v. 187, p. 1-13, 2020. DOI: [10.1007/s00604-020-04596-x](https://doi.org/10.1007/s00604-020-04596-x)
45. GONG, Fanwu et al. Pulling-force spinning top for serum separation combined with paper-based microfluidic devices in COVID-19 ELISA diagnosis. *ACS sensors*, v. 6, n. 7, p. 2709-2719, 2021. DOI: [10.1021/acssensors.1c00773](https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00773)
46. MEREDITH, Nathan A. et al. based analytical devices for environmental analysis. *Analyst*, v. 141, n. 6, p. 1874-1887, 2016. DOI: [10.1039/c5an02572a](https://doi.org/10.1039/c5an02572a)
47. EVANS, Elizabeth et al. Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices. *Analyst*, v. 139, n. 9, p. 2127-2132, 2014. DOI: [10.1039/C4AN00230J](https://doi.org/10.1039/C4AN00230J)
48. DUNGCHAI, Wijitar; CHAILAPAKUL, Orawon; HENRY, Charles S. Electrochemical detection for paper-based microfluidics. *Analytical chemistry*, v. 81, n. 14, p. 5821-5826, 2009. DOI: [10.1021/ac9007573](https://doi.org/10.1021/ac9007573)
49. DING, Ruiyu et al. Heavy metals detection with paper-based electrochemical sensors. 2021. DOI: [10.1021/acs.analchem.0c04247](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04247)
50. LIU, Xiaojuan et al. A universal paper-based electrochemical sensor for zero-background assay of diverse biomarkers. *ACS applied materials & interfaces*, v. 11, n. 17, p. 15381-15388, 2019. DOI: [10.1021/acsami.9b03860](https://doi.org/10.1021/acsami.9b03860)
51. TERZI, Fabio et al. Amperometric paper sensor based on Cu nanoparticles for the determination of carbohydrates. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 245, p. 352-358, 2017. DOI: [10.1016/j.snb.2017.01.064](https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.064)
52. CINCOTTO, Fernando H. et al. A new disposable microfluidic electrochemical paper-based device for the simultaneous determination of clinical biomarkers. *Talanta*, v. 195, p. 62-68, 2019. DOI: [10.1016/j.talanta.2018.11.022](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.022)
53. CINTI, Stefano et al. Electroanalysis moves towards paper-based printed electronics: Carbon black nanomodified inkjet-printed sensor for ascorbic acid detection as a case study. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 265, p. 155-160, 2018. DOI: [10.1016/j.snb.2018.03.006](https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.006)

54. MIRASOLI, Mara et al. Recent advancements in chemical luminescence-based lab-on-chip and microfluidic platforms for bioanalysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 87, p. 36-52, 2014. DOI: [10.1016/j.jpba.2013.07.008](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.008)
55. YANG, Rui et al. Chemiluminescence immunoassays for simultaneous detection of three heart disease biomarkers using magnetic carbon composites and three-dimensional microfluidic paper-based device. *Analytical Chemistry*, v. 91, n. 20, p. 13006-13013, 2019. DOI: [10.1021/acs.analchem.9b03066](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03066)
56. LUO, Zijie et al. Paper-based ratiometric fluorescence analytical devices towards point-of-care testing of human serum albumin. *Angewandte Chemie*, v. 132, n. 8, p. 3155-3160, 2020. DOI: [10.1002/ange.201915046](https://doi.org/10.1002/ange.201915046)
57. ZHOU, Ting et al. CRISPR/Cas13a powered portable electrochemiluminescence chip for ultrasensitive and specific MiRNA detection. *Advanced Science*, v. 7, n. 13, p. 1903661, 2020. DOI: [10.1002/advs.201903661](https://doi.org/10.1002/advs.201903661)
58. KOPPURAVURI, Naga Prashant et al. Paper based analytical platforms: A matrix adaptable approach to drug testing. *Talanta Open*, v. 10, p. 100338, 2024. DOI: [10.1016/j.talo.2024.100338](https://doi.org/10.1016/j.talo.2024.100338)
59. YU, Wei W.; WHITE, Ian M. Inkjet printed surface enhanced Raman spectroscopy array on cellulose paper. *Analytical chemistry*, v. 82, n. 23, p. 9626-9630, 2010. DOI: [10.1021/ac102475k](https://doi.org/10.1021/ac102475k)
60. TAY, Li-Lin et al. Paper-based surface-enhanced Raman spectroscopy sensors for field applications. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 52, n. 2, p. 563-572, 2021. DOI: [10.1002/jrs.6017](https://doi.org/10.1002/jrs.6017)
61. CHEN, Suming; WAN, Qiongqiong; BADU-TAWIAH, Abraham K. Mass spectrometry for paper-based immunoassays: toward on-demand diagnosis. *Journal of the American Chemical Society*, v. 138, n. 20, p. 6356-6359, 2016. DOI: [10.1021/jacs.6b02232](https://doi.org/10.1021/jacs.6b02232)
62. REOKRUNGRUANG, Pimporn et al. A simple paper-based surface enhanced Raman scattering (SERS) platform and magnetic separation for cancer screening. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 285, p. 462-469, 2019. DOI: [10.1016/j.snb.2019.01.090](https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.090)
63. GARCIA-CAMPANA, Ana M. *Chemiluminescence in analytical chemistry*. CRC press, 2001.
64. FERREJA, Tadesse Haile; HYMETE, Ariaya; GUNASEKARAN, Thirumurugan. A recent review on chemiluminescence reaction, principle and application on

- pharmaceutical analysis. *International Scholarly Research Notices*, v. 2013, n. 1, p. 230858, 2013. DOI: [10.1155/2013/230858](https://doi.org/10.1155/2013/230858)
65. RODA, Aldo (Ed.). *Chemiluminescence and bioluminescence: past, present and future*. Royal Society of Chemistry, 2011.
66. RODA, Aldo et al. Progress in chemical luminescence-based biosensors: A critical review. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 76, p. 164-179, 2016. DOI: [10.1016/j.bios.2015.06.017](https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.017)
67. FERREIRA, Ernesto Correa; ROSSI, Adriana Vitorino. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Química Nova*, v. 25, p. 1003-1011, 2002. DOI: [10.1590/S0100-40422002000600018](https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000600018)
68. YU, Wanchao; ZHAO, Lixia. Chemiluminescence detection of reactive oxygen species generation and potential environmental applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 136, p. 116197, 2021. DOI: [10.1016/j.trac.2021.116197](https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116197)
69. PULGARÍN, José A. Murillo; BERMEJO, Luisa F. García; DURÁN, Armando Carrasquero. Determination of carbamates in soils by liquid chromatography coupled with on-line postcolumn UV irradiation and chemiluminescence detection. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, n. 1, p. 2778-2784, 2020. DOI: [10.1016/j.arabjc.2018.07.008](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.07.008)
70. LI, Hong; ZHOU, Yang; DU, Jianxiu. Ascorbic acid as an alternative coreactant for luminol reaction and sensitive chemiluminescence determination of ascorbic acid in soft drinks. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 429, p. 113945, 2022. DOI: [10.1016/j.jphotochem.2022.113945](https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2022.113945)
71. KOLEV, Spas D.; MCKELVIE, Ian D. (Ed.). *Advances in flow injection analysis and related techniques*. 2008.
72. MERVARTOVÁ, Kateřina; POLÁŠEK, Miroslav; CALATAYUD, José Martínez. Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 45, n. 3, p. 367-381, 2007. DOI: [10.1016/j.jpba.2007.08.018](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.08.018)
73. ANDRADE, Marcelo Farias de. *Desenvolvimento de métodos espectroanalíticos para a determinação de polifenóis totais e elementos minerais em vinhos*. 2014.
74. FERREJA, Tadesse Haile; HYMETE, Ariaya; GUNASEKARAN, Thirumurugan. A recent review on chemiluminescence reaction, principle and application on

- pharmaceutical analysis. *International Scholarly Research Notices*, v. 2013, n. 1, p. 230858, 2013. DOI: [10.1155/2013/230858](https://doi.org/10.1155/2013/230858)
75. KHAN, Parvez et al. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 173, p. 333-355, 2014. DOI: [10.1007/s12010-014-0850-1](https://doi.org/10.1007/s12010-014-0850-1)
76. AL YAHYAI, Iman; AL-LAWATI, Haider AJ; HASSANZADEH, Javad. A paper-based chemiluminescence detection device based on S, N-doped carbon quantum dots for the selective and highly sensitive recognition of bendiocarb. *Analytical Methods*, v. 13, n. 31, p. 3461-3470, 2021. DOI: [10.1039/d1ay00728a](https://doi.org/10.1039/d1ay00728a)
77. LIU, Dan et al. Nanozyme chemiluminescence paper test for rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 173, p. 112817, 2021. DOI: [10.1016/j.bios.2020.112817](https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112817)
78. AL LAWATI, Haider AJ et al. On paper synthesis of metal-organic framework as a chemiluminescence enhancer for estimating the total phenolic content of food samples using a smartphone readout. *Talanta*, v. 234, p. 122648, 2021. DOI: [10.1016/j.talanta.2021.122648](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122648)
79. ABBASI, Reza et al. Optical Image Sensors for Smart Analytical Chemiluminescence Biosensors. *Bioengineering*, v. 11, n. 9, p. 912, 2024. DOI: [10.3390/bioengineering11090912](https://doi.org/10.3390/bioengineering11090912)
80. DE ARAÚJO GOMES, Adriano et al. Digital image-based chemometrics for food analysis: a practical tutorial and roadmap. *Food Chemistry*, p. 144531, 2025. DOI: [10.1016/j.foodchem.2025.144531](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144531)
81. TJANDRA, Angie Davina; HEYWOOD, Tristan; CHANDRAWATI, Rona. Trigit: A free web application for rapid colorimetric analysis of images. *Biosensors and Bioelectronics: X*, v. 14, p. 100361, 2023. DOI: [10.1016/j.biosx.2023.100361](https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100361)
82. CAPITÁN-VALLVEY, Luis Fermín et al. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Analytica chimica acta*, v. 899, p. 23-56, 2015. DOI: [10.1016/j.aca.2015.10.009](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009)
83. FAY, Cormac D.; WU, Liang. Critical importance of RGB color space specificity for colorimetric bio/chemical sensing: A comprehensive study. *Talanta*, v. 266, p. 124957, 2024. DOI: [10.1016/j.talanta.2023.124957](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124957)
84. SOARES, Samara; FERNANDES, Gabriel M.; ROCHA, Fábio RP. Smartphone-based digital images in analytical chemistry: Why, when, and how to use. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 168, p. 117284, 2023. DOI: [10.1016/j.trac.2023.117284](https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117284)

85. SEFID-SEFIDEHKHAN, Yasaman et al. Spot test with smartphone digital image analysis for determination of methadone in exhaled breath condensate. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 329, p. 125612, 2025. DOI: [10.1016/j.saa.2024.125612](https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.125612)
86. VAKH, Christina; MALLABAEVA, Zarina; TOBISZEWSKI, Marek. Smartphone-based digital image colorimetry for the determination of total capsaicinoid content in chili pepper extracts. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 315, p. 124238, 2024. DOI: [10.1016/j.saa.2024.124238](https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124238)
87. YENDURI, Suvarna; PRASHANT, K. Naga. Estimation of isoniazid by digital image colorimetry: an integration of green chemistry and smartphone technology. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 10, n. 1, p. 128, 2024. DOI: [10.1186/s43094-024-00703-4](https://doi.org/10.1186/s43094-024-00703-4)
88. MUIR, Michael R.; INNES, Andrew. Comparison of test strip, conductivity, and novel smartphone digital image colorimetry methods for field assessment of soil chloride and salinity. *Analytical Methods*, v. 16, n. 32, p. 5571-5583, 2024. DOI: [10.1039/D4AY00991F](https://doi.org/10.1039/D4AY00991F)
89. RODA, Aldo et al. A 3D-printed device for a smartphone-based chemiluminescence biosensor for lactate in oral fluid and sweat. *Analyst*, v. 139, n. 24, p. 6494-6501, 2014. DOI: [10.1039/c4an01612b](https://doi.org/10.1039/c4an01612b)
90. XING, Yunpeng et al. A dual-functional smartphone-based sensor for colorimetric and chemiluminescent detection: A case study for fluoride concentration mapping. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 319, p. 128254, 2020. DOI: [10.1016/j.snb.2020.128254](https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128254)
91. KUMAR, Pavar Sai et al. Microfluidic paper device with on-site heating to produce reactive peroxide species for enhanced smartphone enabled chemiluminescence signal. *Talanta*, v. 236, p. 122858, 2022. DOI: [10.1016/j.talanta.2021.122858](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122858)
92. SUN, Jihong et al. A fully automated paper-based smartphone-assisted microfluidic chemiluminescence sample to result immunoassay platform. *Analytica Chimica Acta*, v. 1358, p. 344013, 2025. DOI: [10.1016/j.aca.2025.344013](https://doi.org/10.1016/j.aca.2025.344013)
93. SANTOS, A. J. M. et al. The importance, prevalence and determination of vitamins B6 and B12 in food matrices: A review. *Food Chemistry*, v. 426, p. 136606, 2023. DOI: [10.1016/j.foodchem.2023.136606](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136606)
94. COMBS JR, Gerald F.; MCCLUNG, James P. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. Academic press, 2016.

95. TEMOVA RAKUŠA, Žane et al. Vitamin B12 in foods, food supplements, and medicines—a review of its role and properties with a focus on its stability. *Molecules*, v. 28, n. 1, p. 240, 2022. DOI: [10.3390/molecules28010240](https://doi.org/10.3390/molecules28010240)
96. LI, Yanan et al. A cyanide-free sample preparation methodology prior to determination of vitamin B12 in infant milk formula using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*, v. 282, p. 126970, 2025. DOI: [10.1016/j.talanta.2024.126970](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126970)
97. HOFMANN, Sabrina et al. Development and validation of a simple HPLC-MS/MS method for the quantification of methylmalonic acid in human serum without a derivatization step. *Biomedical Chromatography*, v. 37, n. 8, p. e5657, 2023. DOI: [10.1002/bmc.5657](https://doi.org/10.1002/bmc.5657)
98. ERARPAT, Sezin et al. Combination of high performance liquid chromatography and flame atomic absorption spectrophotometry using a novel nebulizer interface supported T shaped slotted quartz tube for the determination of Vitamin B12. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 217, p. 114855, 2022. DOI: [10.1016/j.jpba.2022.114855](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114855)
99. FAN, Dingyan; ZHANG, Yingzhou; WU, Haiping. Development of a simple and sensitive HPLC-DAD method for quantification of vitamin B12 fortified in infant food. *Analytical Methods*, v. 13, n. 41, p. 4920-4925, 2021. DOI: [10.1039/D1AY01118A](https://doi.org/10.1039/D1AY01118A)
100. DOMÍNGUEZ-ROMERO, Juan C. et al. Renewable chemiluminescence optosensors based on implementation of bead injection principle with multicommutation. *Talanta*, v. 182, p. 267-272, 2018. DOI: [10.1016/j.talanta.2018.01.091](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.091)
101. LOK, Khoi Seng et al. Rapid determination of vitamin B 12 concentration with a chemiluminescence lab on a chip. *Lab on a Chip*, v. 12, n. 13, p. 2353-2361, 2012. DOI: [10.1039/C2LC00037G](https://doi.org/10.1039/C2LC00037G)
102. DERAYEA, Sayed M. et al. Green innovative fluorescence approach for the feasible and reliable assay of thiol-containing drugs; captopril as a model. *RSC advances*, v. 12, n. 27, p. 17607-17616, 2022. DOI: [10.1039/d2ra02408j](https://doi.org/10.1039/d2ra02408j)
103. SCHMIDT JR, Erlando; MELCHERT, Wanessa R.; ROCHA, Fábio RP. Flow-injection iodimetric determination of captopril in pharmaceutical preparations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 236-242, 2009. DOI: [10.1590/S0103-50532009000200007](https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000200007)

104. HAN, Lixia et al. Quantitative detection of captopril in urine by smartphone-assisted ratiometric fluorescence sensing platform. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 280, p. 121562, 2022. DOI: [10.1016/j.saa.2022.121562](https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121562)
105. SABBAGHI, Najmeh et al. Synthesis of magnetic molecular imprinted polymer with a new functional monomer for dispersive micro solid phase extraction of captopril from wastewater and biological samples and determination by UV-Vis spectrophotometry. *Microchimica Acta*, v. 190, n. 4, p. 164, 2023. DOI: [10.1007/s00604-023-05746-7](https://doi.org/10.1007/s00604-023-05746-7)
106. NAZIFI, Mohammad et al. Introducing hierarchical hollow MnO₂ microspheres as nanozymes for colorimetric determination of captopril. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 413, p. 7063-7072, 2021. DOI: [10.1007/s00216-021-03672-2](https://doi.org/10.1007/s00216-021-03672-2)
107. LIMA, Manoel JA et al. Development of a new procedure for the determination of captopril in pharmaceutical formulations employing chemiluminescence and a multicommutated flow analysis approach. *Luminescence*, v. 31, n. 1, p. 288-294, 2016. DOI: [10.1002/bio.2960](https://doi.org/10.1002/bio.2960)
108. RODRIGUES, S. Sofia M.; SANTOS, João LM. Chemiluminometric determination of captopril in a multi-pumping flow system. *Talanta*, v. 96, p. 210-215, 2012. DOI: [10.1016/j.talanta.2012.02.016](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.016)
109. FU, Zhaofu et al. A chemiluminescence reagent free method for the determination of captopril in medicine and urine samples by using trivalent silver. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 7, n. 4, p. 252-257, 2017. DOI: [10.1016/j.jpha.2017.05.005](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.05.005)
110. LIMA, Manoel JA et al. Development of a new procedure for the determination of captopril in pharmaceutical formulations employing chemiluminescence and a multicommutated flow analysis approach. *Luminescence*, v. 31, n. 1, p. 288-294, 2016. DOI: [10.1002/bio.2960288](https://doi.org/10.1002/bio.2960288)
111. LOK, Khoi Seng et al. Rapid determination of vitamin B₁₂ concentration with a chemiluminescence lab on a chip. *Lab on a Chip*, v. 12, n. 13, p. 2353-2361, 2012. DOI: [10.1039/c2lc00037g](https://doi.org/10.1039/c2lc00037g)
112. SULAIMAN, Kazeem O. et al. Quantum chemical approach for chemiluminescence characteristics of di-substituted luminol derivatives in polar solvents. *Journal of Molecular Liquids*, v. 279, p. 146-153, 2019. DOI: [10.1016/j.molliq.2019.01.110](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.01.110)

113. LIMA, Manoel JA et al. Development of a new procedure for the determination of captopril in pharmaceutical formulations employing chemiluminescence and a multicommuted flow analysis approach. *Luminescence*, v. 31, n. 1, p. 288-294, 2016. DOI: [10.1002/bio.2960](https://doi.org/10.1002/bio.2960)
114. SOUZA, Marcela Luiza Costa de. (Mestrado) Desenvolvimento e avaliação de tituladores automáticos com detecção por imagens digitais controlados por smartphone. 2024. ID: [10482/51613](https://doi.org/10.482/51613)
115. WANG, Qian et al. A silica coated paper substrate: development and its application in paper spray mass spectrometry for rapid analysis of pesticides in milk. *Analyst*, v. 140, n. 23, p. 8048-8056, 2015. DOI: [10.1039/C5AN01823D](https://doi.org/10.1039/C5AN01823D)
116. ZHANG, Zhiping et al. Silica coated paper substrate for paper-spray analysis of therapeutic drugs in dried blood spots. *Analytical chemistry*, v. 84, n. 2, p. 931-938, 2012. DOI: [10.1021/ac202058w](https://doi.org/10.1021/ac202058w)
117. XU, Chunxiu et al. Modification of microfluidic paper-based devices with an oxidant layer for distance readout of reducing substances. *ACS omega*, v. 7, n. 23, p. 20383-20389, 2022. DOI: [10.1021/acsomega.2c02537](https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02537)

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE DOUTORADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 23 de Fevereiro de 2026

Nome completo do/a discente: Eloíza Cristiny Azevedo dos Santos

Programa: Programa de Pós – Graduação em Química

Título do Trabalho: Desenvolvimento e Avaliação de Duas Estratégias de Baixo-Custo para detecção de Quimiluminescência em Dispositivos Analíticos de Papel

Nível: () Mestrado () Doutorado

Orientador/a: Alexandre Fonseca

Assinatura do/a discente:



Documento assinado digitalmente

ELOIZA CRISTINY AZEVEDO DOS SANTOS

Data: 23/02/2026 16:19:21-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro - Gleba A, , Brasília/DF, CEP 70910-900

Telefone: e Fax: @fax_unidade@ - <http://www.unb.br>