

JOSIANE LOPES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS
MICROFLUÍDICOS BASEADOS EM FIO DE ALGODÃO COM DETECÇÃO
COLORIMÉTRICA E ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Doutor Willian Toito Suarez

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2024

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

O48d
2024

Oliveira, Josiane Lopes de, 1992-

Desenvolvimento e validação de dispositivos analíticos microfluídicos baseados em fio de algodão com detecção colorimétrica e análise de imagem digital / Josiane Lopes de Oliveira. – Viçosa, MG, 2024.

1 tese eletrônica (112 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Willian Toito Suarez.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, 2024.

Referências bibliográficas: f. 92-112.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.671>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Colorimetria. 2. Fios de algodão. 3. Íons. 4. Cobre. 5. Vitamina C. I. Suarez, Willian Toito, 1976-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 543.55


JOSIANE LOPES DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE DISPOSITIVOS ANALÍTICOS
MICROFLUÍDICOS BASEADOS EM FIO DE ALGODÃO COM DETECÇÃO
COLORIMÉTRICA E ANÁLISE DE IMAGEM DIGITAL**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 04 de julho de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **JOSIANE LOPES DE OLIVEIRA**
Data: 11/10/2024 21:25:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Josiane Lopes de Oliveira
Autor

Documento assinado digitalmente
 **WILLIAN TOITO SUAREZ**
Data: 14/10/2024 11:06:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Willian Toito Suarez
Orientador

*Aos meus pais, Aparecida e Geraldo e
irmãos, Tequinho e Lê.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Em primeiro lugar, sou grata a Deus, por ser minha fonte inesgotável de força em momentos de vulnerabilidade e, o mais importante, por trazer para minha vida pessoas maravilhosas que proporcionaram conforto nos dias mais difíceis e tornaram essa jornada um pouco mais tranquila.

Expresso minha profunda gratidão ao meu orientador Willian, por sua infinita paciência, apoio constante e preocupação com o bem-estar de seus orientandos. Além da sua generosidade e disponibilidade em partilhar os seus conhecimentos e ideias, cruciais para a conclusão desta tese.

Aos meus amados pais, Aparecida e Geraldo, agradeço pela dedicação incansável, compreensão, apoio incondicional e por serem meus maiores modelos de força, coragem e perseverança. Por não terem medido esforços para que eu pudesse chegar até aqui. E jamais deixaram de acreditar na minha capacidade, quando nem eu mesma acreditava. Aos meus queridos irmãos, Tequinho e Lê, pelo amor, compreensão e apoio inabalável que sempre me ofereceram. Eu amo vocês!

Ao meu Noivo, Rafael, pelo amor, carinho, paciência, companheirismo e cuidado constante. Seu suporte ao longo dessa jornada foi essencial, sendo meu verdadeiro porto seguro em todos os momentos.

Ao Davi, codinome eficiência, pessoa exemplar, sempre pronto para ajudar e auxiliar com dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Além de me oferecer um papo agradável sobre os assuntos mais aleatórios possíveis. Você se tornou um grande amigo.

À Néinha, minha amiga querida desde os tempos de graduação, por termos construído uma amizade sólida, por compartilharmos momentos de diversão e também de desafios. Por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

À Jéssiquita, por todos os momentos de lidezas compartilhadas. Sua genuinidade, leveza, simplicidade e a luz que você emana me fizeram esquecer as dificuldades do dia a dia e no laboratório e me inspiraram a seguir a vida de forma mais leve.

À Luiza, presente que o doutorado me deu, pela constante companhia em Viçosa, adoráveis cafezinhos no laboratório, pelas incontáveis tentativas em ser

fitness, pelos momentos de pescas, pelos momentos de jogos de truco e imagem e ação, e pelas inesquecíveis viagens. Sua amizade trouxe cor para meus dias.

À Aline, pela amizade e apoio emocional desde a monografia na graduação até a minha tese de doutorado. Sua presença e suporte foram essenciais. Sou muito grata por ter você ao meu lado.

À Geovana e à Maíra, por tornarem meus dias no apartamento mais agradáveis, com conversas descontraídas, momentos de relaxamento e apoio mútuo. Vocês trouxeram alegria e conforto aos meus dias.

Aos meus queridos amigos do Laboratório 328, em especial à Gabriga, Marcovncov, lare lare e Edileuza, quero expressar minha gratidão a todas as divertidas idas ao Supermercado Escola, pelo apoio diário e pela incrível troca de experiências dentro e fora do laboratório. Vocês fizeram essa jornada mais divertida e única.

Ao pessoal do Vôlei Café com Leite, por me proporcionarem momentos de descontração e tornarem minhas quintas-feiras tão mais divertidas.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, expresso a minha mais profunda e sincera gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (Universidade Federal de Viçosa, Brasil) pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de pós-graduação em Agroquímica, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). APQ-01889-21.

“Não importa o que aconteça, continue a nadar.”
(DORY, Procurando Nemo, 2003.)

RESUMO

DE OLIVEIRA, Josiane Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2024. **Desenvolvimento e validação de dispositivos analíticos microfluídicos baseados em fio de algodão com detecção colorimétrica e análise de imagem digital.** Orientador: Willian Toito Suarez

Esta tese traz uma nova estratégia analítica, baseada na produção de dispositivos colorimétricos construídos a partir de fios de algodão, utilizando tecnologia microfluídica e metodologia de análise de imagens digitais, empregando smartphone como detector. Estes dispositivos são portáteis, de baixo custo, capazes de realizar testes confiáveis com consumo mínimo de amostra e reagentes, sendo altamente adequado para determinação analítica, mesmo em amostras reais complexas, proporcionando respostas rápidas e *in situ*. A fibra de algodão, devido à sua ampla disponibilidade, alta flexibilidade e conveniência, sem a necessidade de bombas adicionais, demonstra-se ideal para a fabricação de microssistemas de análises totais (μ TADs). No Capítulo 1 é apresentada uma visão geral teórica das informações relevantes desse contexto. No Capítulo 2, é descrito o desenvolvimento, otimização e validação de um dispositivo eficiente para quantificar com precisão e rapidez os íons cúpricos em amostras de água e cachaça, com base na reação de complexação que ocorre quando a cuprizona entra em contato com íons cúpricos, formando um complexo azul de coloração intensa. O Capítulo 3 expõe o desenvolvimento, otimização e validação de um sensor adequado para quantificar ácido ascórbico (vitamina C) em polpa de frutas, suplementos vitamínicos e sucos de frutas frescas. Este método baseia-se na reação redox do hexacianoferrato férrico, de maneira que, na presença de ácido ascórbico, o pigmento azul da Prússia é reduzido a Branco da Prússia. E a concentração de ácido ascórbico é diretamente proporcional a esse desbotamento.

Palavras-chave: Fio de algodão; Microfluídica; Detecção colorimétrica; Imagem digital; Cobre (II); Vitamina C.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Josiane Lopes, D.Sc., Federal University of Viçosa, June 2024. **Development and validation of microfluidic analytical devices based on cotton thread with colorimetric detection and digital image analysis.** Advisor: Willian Toito Suarez

This thesis presents a new analytical strategy based on the production of colorimetric devices made from cotton threads, using microfluidic technology and digital image analysis methodology, employing a smartphone as a detector. These devices are portable, low-cost, capable of performing reliable tests with minimal sample and reagent consumption, making them highly suitable for analytical determination, even in complex real samples, providing rapid and in situ responses. Cotton fiber, due to its wide availability, high flexibility, and convenience, without the need for additional pumps, proves to be ideal for the manufacture of total analysis microsystems (μ TADs). Chapter 1 provides a theoretical overview of the relevant information in this context. Chapter 2 describes the development, optimization, and validation of an efficient device to accurately and quickly quantify cupric ions in water and cachaça samples, based on the complexation reaction that occurs when cuprizone comes into contact with cupric ions, forming a blue complex with intense coloration. Chapter 3 presents the development, optimization, and validation of a suitable sensor for quantifying ascorbic acid (vitamin C) in fruit pulp, vitamin supplements, and fresh fruit juices. This method is based on the redox reaction of ferric hexacyanoferrate, so that in the presence of ascorbic acid, the blue pigment of Prussian blue is reduced to white Prussian. The concentration of ascorbic acid is directly proportional to this fading.

Keywords: Cotton thread; Microfluidics; Colorimetric detection; Digital image; Copper (II); Vitamin C.

SUMÁRIO

<u>CAPÍTULO 1:</u>	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Microfluídica: Propriedades e aplicações em dispositivos de análise.....	16
2.2 A problemática do cobre: Um elemento inorgânico essencial, mas potencialmente tóxico para os seres vivos.....	26
2.3 Ácido Ascórbico: um componente dietético essencial para a saúde humana e no controle de qualidade de alimentos.....	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
<u>CAPÍTULO 2:</u>	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	39
2.1 Reagentes e equipamentos.....	39
2.2 Obtenção e limpeza das fibras de algodão.....	39
2.3 Caracterização dos μ TADs desenvolvidos em fibra de algodão.....	40
2.4 Desenvolvimento da plataforma microfluídica de fio de algodão integrando a técnica de pré-concentração.....	41
2.5 Detecção de íons cúpricos utilizando o μ TAD, obtenção das imagens digitais e padrões de cores como resposta analítica.....	42
2.6 Otimização dos parâmetros experimentais.....	43
2.7 Parâmetros analíticos de qualidade do μ TAD desenvolvido para detecção de íons cúpricos.....	44
2.8 Comparação dos resultados de concentração de íons cúpricos obtidas entre os métodos.....	46

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1	Escolha da fibra de algodão	48
3.2	Desenvolvimento da plataforma microfluídica baseada em fio de algodão empregando pré-concentração para detecção de íons cúpricos.....	49
3.3	Otimização do μ TAD colorimétrico baseado em fio de algodão e pré-concentração.....	50
3.4	Caracterização do μ TAD: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) ...	55
3.5	Parâmetros analíticos.....	59
3.6	Análise comparativa do método proposto e do método de referência.....	66
3.7	Avaliação do custo relacionado à fabricação do μ TAD	67
3.8	Comparação do μ TAD proposto com outros dispositivos microfluídicos para detecção de íons cúpricos, relatados na literatura.	68
4	CONCLUSÃO DO CAPÍTULO.....	69
	<u>CAPÍTULO 3:</u>.....	70
1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	73
2.1	Materiais e preparo de soluções:.....	73
2.2	Confecção do μ TAD funcionalizado com azul da Prússia	73
2.3	Quantificação de L-AA empregando o desenvolvido a partir de DIB, capturadas com smartphone.....	74
2.4	Otimização das condições para confecção do μ TAD	75
2.5	Otimização univariada: Tempo de reação	76
2.6	Caracterização do sensor.....	77
2.7	Recuperação	77
2.8	Método de comparação	77
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78

3.1	Otimização multivariada para confecção do μ TAD para determinação de L-AA	78
3.2	Otimização univariada: tempo de reação	81
3.3	Caracterização do μ TAD	81
3.4	Parâmetros analíticos	84
3.5	Análise comparativa do método proposto e do método de referência	87
3.6	Comparação do método desenvolvido (μ TAD + DIB) com outros métodos relatados na literatura.....	89
4	CONCLUSÃO DO CAPÍTULO.....	90
5	CONCLUSÃO GERAL.....	91
6	REFERÊNCIAS.....	92

CAPÍTULO 1:

ASPECTOS TEÓRICOS RELEVANTES E OBJETIVO

1 INTRODUÇÃO GERAL

As metodologias tradicionais de análise químicas frequentemente requerem procedimentos de pré-tratamento que na maioria das vezes são demorados, além de trabalhosos [1]. Dessa forma, tem-se observado uma crescente necessidade de métodos analíticos que permitam a realização de análises sem depender de equipamentos laboratoriais complexos e que tenham interfaces intuitivas. Estes Dispositivos de fácil utilização e baixo custo têm sido altamente valorizados durante a era da sustentabilidade e acessibilidade, em especial devido à sua adequação de uso em situações de emergência ou em áreas com recursos limitados [2]. Esses dispositivos são fundamentais em uma ampla gama de aplicações, como monitoramento ambiental, análise de alimentos e diagnóstico clínico [3].

Um avanço na miniaturização de sistemas analíticos utilizando tecnologia microfluídica tem se mostrado vantajoso com a possibilidade de produção de dispositivos portáteis, capazes de realizar análises mais ágeis, com uso econômico de amostras e reagentes, com detecção de alta resolução e sensibilidade, apropriado para obtenção de diagnósticos rápidos no ponto de atendimento [4,5], sem que haja necessidade de laboratórios com equipamentos mais sofisticados ou profissionais especializados.

No entanto, os materiais comumente utilizados para fabricação de tais dispositivos geralmente não são acessíveis e/ou outras vezes necessitam de bombas ou válvulas para seu funcionamento, o que contribui para um aumento do custo e, conseqüentemente, restringem seu uso na sociedade.

Nessa perspectiva, alguns pesquisadores apontam materiais à base de papel como uma alternativa interessante para a fabricação desses dispositivos microfluídicos portáteis [5–9], já que o papel, feito de fibras de celulose, é abundante, barato, sustentável, descartável, fácil de armazenar e transportar e dispensa a utilização de bombas e válvulas, devido à sua ação capilar [10]. Entretanto, há algumas limitações relacionadas ao uso desse substrato, por exemplo, baixa eficiência no arraste da amostra, baixa resistência mecânica quando molhado e vazamento das amostras que possuem baixa tensão superficial [11]. Além disso, na maioria das vezes, esse material necessita da construção de barreiras hidrofóbicas, o que resulta na necessidade de um processo extra de fabricação [11,12].

Nesse cenário, apesar de ainda pouco explorado, estudos têm mostrado o fio de algodão como um excelente substrato para fabricação de dispositivos microfluídicos de análise, denominados μ TAD (do inglês, *Microfluidic Thread-based Analytical Device*), mais funcionais para a detecção de amostras químicas, bioquímicas, ambientais e biológicas [13] com potencial de suplantarem as tecnologias convencionais [14]. Isso porque, além desse material possuir todos os benefícios que são atribuídos ao papel, o algodão ainda possui propriedades como alta flexibilidade e pode ser facilmente costurado de várias formas, possibilitando inúmeras estratégias para construção de um caminho para o fluxo do fluido e, além do mais, possuem maior resistência, não sendo fáceis de rasgar ou quebrar, mesmo quando molhado.

É importante levar em conta que, além de baixo custo e de procedimento de fabricação mais simples, os dispositivos analíticos microfluídicos também requerem modo de detecção sensível e rápido [15]. Dentre as técnicas geralmente empregadas nesses dispositivos à base de fios, a colorimetria tem benefícios significativos, uma vez que a cor e a espessura do fio permitem fácil visualização do transporte de fluidos e com obtenção de imagem utilizando instrumentos simples [16], como câmeras, webcams, scanners e smartphones. Estes dispositivos são capazes de capturar reações colorimétricas, em que a intensidade da cor resultante seja diretamente [17] ou inversamente relacionada à concentração do analito de interesse.

A luz disso, esta tese apresenta uma nova estratégia analítica de baixo custo para determinação analítica em amostras reais complexas, empregando dispositivos microfluídicos de análises totais (μ TAD) portáteis baseado em fio de algodão, com um smartphone como detector para análise de imagens digitais, adequados para utilização no local de atendimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microfluídica: Propriedades e aplicações em dispositivos de análise

Microfluídica é uma área da ciência e tecnologia baseada em sistemas capazes de processar e/ou manipular mínimas quantidades de fluidos. Em geral, essas operações ocorrem em canais capilares cujas dimensões estão no intervalo de 10-100 μm [4]. Essa tecnologia oferece muitas vantagens e é uma escolha interessante na realização de ensaios analíticos com rápida detecção, alta resolução e alta sensibilidade, com redução no volume de amostra/reagente necessário para análise, o que influencia diretamente em uma diminuição na quantidade de resíduos gerados [15,18,19].

Além do mais, a tecnologia microfluídica apresenta outras grandes vantagens, como miniaturização e portabilidade, possibilitando a confecção de dispositivos portáteis de análise que podem ser utilizados em análise de campo (do inglês, *point-of-care* ou PoC), sem necessidade de um espaço laboratorial, trazendo uma série de benefícios para ensaios analíticos, como a redução no risco de contaminação, possibilidade de realizar separações com alta resolução, com baixo consumo de energia e uma diminuição no custo por análise [20,21].

Por esses motivos, a funcionalidade dos dispositivos microfluídicos tem despertado interesse entre os pesquisadores de diversas áreas [4]. Na Química Analítica, a miniaturização de sistemas de análises surgiu com a criação dos microsistemas de análises totais (μTAS , do inglês Micro Total Analysis Systems) [22], também conhecido como Lab-on-a-chip (LOC) [23], que são dispositivos capazes de realizar todas as etapas analíticas em um chip de alguns centímetros quadrados, desde a introdução da amostra até a detecção, desenvolvidos em um laboratório de maneira integrada [22,24]. Apesar disso, o elevado custo na produção desses instrumentos ainda impossibilita a utilização massiva desses dispositivos em todo o mundo [15], posto que, o baixo custo é sem dúvida um atributo indispensável quando se pretende aumentar o acesso ao diagnóstico não só nos países em desenvolvimento, como também é um fator cada vez mais relevante no mundo desenvolvido [23].

Apesar disso, como já mencionado, inúmeros são os benefícios da tecnologia microfluídica, e características como controle preciso de fluidos em ensaios com

processamento rápido de amostras os tornaram candidatos promissores para substituir as abordagens experimentais convencionais [23].

2.1.1 Substratos utilizados para confecção dos μ TAD

O μ TAD, a depender de sua aplicação, geralmente são confeccionados a partir de polímeros, vidro, silício, papel, entre outros, ou mesmo pela combinação destes materiais [10,25]. Para a escolha do material a ser utilizado na fabricação desse dispositivo, é importante levar em conta várias características, como a superfície química e propriedades ópticas e elétricas desse material, além do custo, da facilidade de fabricação e a viabilidade de produção em massa [10].

Apesar das várias vantagens apresentadas por esses sistemas miniaturizados, um fator que tem limitado o amplo uso de tecnologias microfluídicas é que as técnicas de fabricação convencionais geralmente são complexas e de custo elevado para produção, onde poucas são economicamente viáveis para produção massiva [14,26]. A partir disso, alguns dos dispositivos microfluídicos classificados como “primeira geração” mais sofisticados ainda não atingiram utilidade comercial [14].

Materiais como vidro e silício são quebradiços, possuem protocolos de ligação complexos para o fechamento dos microcanais e, em geral, demandam procedimentos de fabricação de custo elevado e inacessível. Por muito tempo, esses materiais foram considerados adequados para a fabricação desses microdispositivos, mas acabavam insuficientes em seu potencial de desenvolvimento acessível [23].

Além da complexidade na tecnologia de produção, os sistemas microfluídicos produzidos a partir dos materiais mencionados acima, em regra, necessitam de equipamentos externos para mover com precisão pequenos volumes das soluções [14], o que tem provocado a utilização de elementos alternativos para a construção destes sistemas microfluídicos [26].

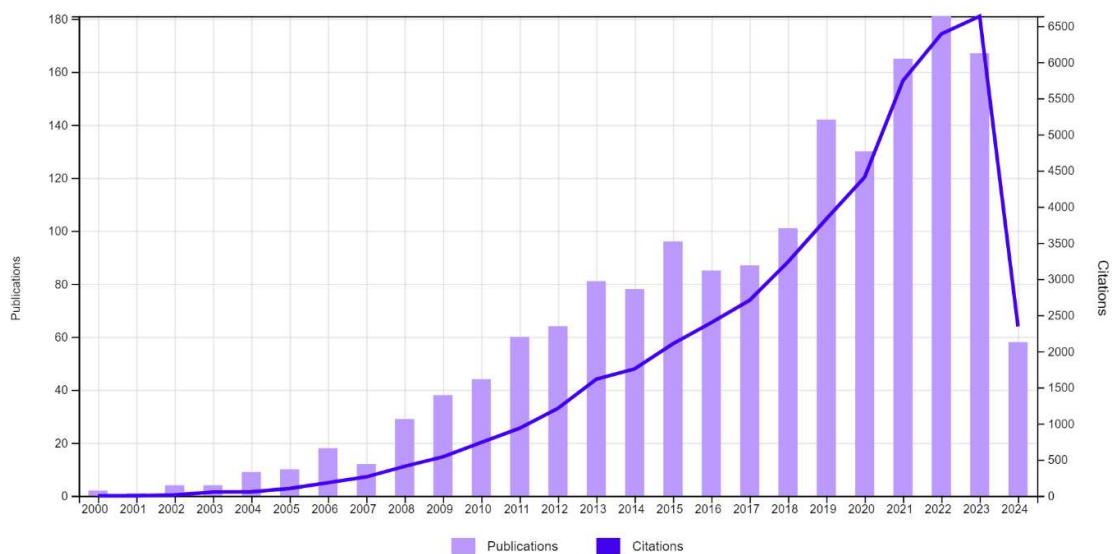
Dentre esses elementos alternativos, os pesquisadores apontam substratos, como o papel, como meio para fabricação de sistemas microfluídicos para diagnóstico de baixo custo, que possam ser utilizados de forma econômica em regiões onde não há tantos recursos [11], uma vez que, o papel (feito de fibras de celulose) é abundante, barato, sustentável, descartável, fácil de usar, armazenar e transportar [10,27], sendo

disponível em diferentes formas e propriedades, em várias espessuras e compatível com amostras biológicas e tecnologias de impressão existentes, além de ser inflamável, o que facilita a incineração do mesmo após o uso [16].

Além disso, ensaios realizados em dispositivos à base de papel não necessitam de bombas e válvulas, devido ao fato do líquido aquoso se mover por capilaridade [10,27]. Entretanto, há algumas limitações relacionadas ao uso desse material, como a baixa eficiência no arraste de amostra, possibilidade de vazamento de amostras com baixa tensão superficial pelos canais microfluídicos e, sobretudo, baixa resistência mecânica quando utilizado molhado [11]. Além do mais, o papel como suporte exige padronização para definir os canais do dispositivo [12]. Por esse motivo, faz-se extremamente necessário a busca por novas opções de substratos que tenham uma maior viabilidade para a produção desses dispositivos.

Atualmente, a utilização de linha/fio têxtil tem despertado interesse para fabricação de dispositivos microfluídicos, devido ao seu enorme potencial de aplicação nas mais diversas áreas. Segundo dados da plataforma periódica Web of Science (**Figura 1**), desde 2010, quando Li e colaboradores [28] publicaram o primeiro trabalho, tem-se observado uma tendência crescente na produção científica relacionada ao tema, assim como o número de citações.

Figura 1- Produção científica relacionada a dispositivos microfluídico baseados em fio



Fonte: Plataforma: Web of Science, TOPIC: (“Thread-based” and “microfluidics”).

A utilização de linha/fio têxtil tem despertado interesse para a fabricação de dispositivos microfluídicos de diagnóstico PoC, por possuir diversas características como: ser um material simples que é amplamente utilizado, ser barato, prontamente disponível, leve e, geralmente, hidrofílico, ou mesmo, se hidrofóbico, este pode facilmente se tornar hidrofílico utilizando-se de inúmeras técnicas simples. O fio têxtil também pode ser facilmente manuseado, tecido, tricotado de diversas formas ou torcido dois ou mais fios. Onde as lacunas existentes nas fibras do fio proporcionam um bom alinhamento que ajuda no transporte e manipulação de mistura de diferentes líquidos. Além de tudo, são obtidos resultados convenientes em relação ao tempo de análise, já que o transporte de líquido nas fibras dos fios acontece em um período mínimo de tempo [16].

Outra grande conveniência na utilização de fio têxtil em relação ao uso do papel é que os fios podem ser encontrados em mais opções de materiais que o papel. Pois, ainda que o papel tenha possibilidade de ser desenvolvido usando diferentes fibras de celulose, o custo envolvido nesse processo de fabricação seria muito maior e com maior complexidade com a atual tecnologia existente para a fabricação de papel. Sendo assim, para a produção de sensores microfluídicos de baixo custo, o fio é um valioso material alternativo a ser utilizado [29].

Sendo assim, no geral, a proposta de utilização de materiais têxteis (como algodão) como matéria-prima para a fabricação de dispositivos microfluídicos de baixo custo para diagnóstico no local de atendimento é mais adequada em comparação à utilização do papel, pois enquanto o papel é facilmente rasgado quando molhado ou dobrado, o tecido é mecanicamente mais forte e mais durável [30] e possui uma flexibilidade [31,32] que os papéis não possuem.

2.1.1.1 Fio de algodão e suas propriedades na fabricação de μ TAD

Os produtos têxteis têm sido amplamente utilizados não só em vestuários, como também em diferentes campos como proteção e segurança sanitária, na medicina e higiene, em construções, na agricultura, no transporte, em eletrônicos, embalagens e em contenção [33].

O algodão é composto principalmente por cadeias poliméricas de celulose natural [34,35] com grupos hidroxila em suas superfícies, possuindo propriedades

hidrofílicas, liofílicas e anfifílicas a esse material [35]. No entanto, as fibras naturais de algodão também possuem alguns componentes não celulósicos, encontrados principalmente na parede primária e na camada cutânea, que são as camadas mais externas da fibra de algodão. Esses componentes não celulósicos são ceras, pectina e algumas proteínas, que são impurezas (em especial a cera de algodão) com propriedades hidrofóbicas [34]. A presença dessas impurezas torna esse fio não molhável por líquidos aquosos. Para remover essas impurezas da superfície do algodão, permitindo que líquidos aquosos sejam absorvidos por esses fios, torna-se necessário um tratamento do mesmo [29]. Muitas são as metodologias simples e eficazes já utilizadas nesse processo de alteração química da superfície do algodão sem modificar a parte interna da fibra [36], como, por exemplo, por processo seco, pela oxidação por plasma do fio utilizando um reator de plasma a vácuo [28,29,36,37], ou por processos úmidos, como mercerização do fio em solução de hidróxido de sódio, seguido de sua neutralização em um banho de ácido [38] ou ainda, pela fervura do fio em solução salina de carbonato de sódio, seguida de lavagem com água em abundância até obter pH desejável [12].

Após tais procedimentos, esse material se torna altamente capaz de deslocar líquidos hidrofílicos ao longo do fio, sem que haja necessidade de uma bomba externa responsável [28], isso porque, no fio de algodão, há vários intervalos entre as fibras que o constituem e também lacunas entre esses fios que fornecem canais capilares responsáveis por esse transporte [12,28].

Portanto, são diversas as características que tornam o fio de algodão um material favorável para a fabricação de dispositivos analíticos, pois, como já mencionado, esse material possui baixo valor e ampla disponibilidade no mercado, é flexível, leve e difícil de rasgar acidentalmente. Ainda, se desejável, o fio pode ser funcionalizado de várias formas químicas e pode ser manipulado facilmente por processos como costura, tricô e tecelagem. E no caso de utilização desse produto para fluidos biológicos, como os materiais dos fios são combustíveis, estes podem ser descartados por queima [39], o que torna esse material altamente sustentável e ecológico [30].

Sendo assim, o fio de algodão é um candidato promissor para a criação de sistemas microfluídicos de baixo custo [28,32] que necessitam de baixo volume de amostras. Várias são as técnicas de detecção que podem ser acopladas ao μ TAD

para análises quantitativas, pois este pode ser empregado em ensaios colorimétricos, eletroquímicos, de quimiluminescência, de eletroquimioluminescência e de eletroforese [28].

2.1.2 Métodos de análise convencionais

Diversas opções de métodos analíticos em laboratórios de última geração estão disponíveis para controle de qualidade de alimentos, fármacos e amostra ambientais, incluindo espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES), espectrometria de massa ICP (ICP-MS), espectroscopia de fluorescência de raios X (XRF), eletroforese capilar (CE) e cromatografia de íons visível no ultravioleta a espectroscopia (IC-UV-vis), que são métodos padrão de detecção utilizado em laboratórios de última geração [40].

Entretanto, mesmo que esses métodos sejam capazes de detectar, identificar e quantificar analitos com alta sensibilidade e seletividade, sempre será necessário o suporte de laboratórios bem equipados com instrumentos caros [6,40,41], além de na maioria das vezes requerer trabalhosa preparação de amostras [40], o que pode ser caro [41] e inadequados para o monitoramento em campo [6].

Em média, a quantificação analítica pelas técnicas convencionais custa mais de US\$ 100 por amostra, o que torna o monitoramento de rotina economicamente inviável para pequenas empresas. Sendo assim, mesmo que já existam técnicas eficientes de detecção, ainda permanece uma grande demanda pelo desenvolvimento de abordagens de detecção mais simples, de baixo custo [8].

À vista disso, faz-se indispensável o desenvolvimento de sistemas quantitativos simples e de baixo custo para detecção seletiva e sensível de espécies químicas de interesse, permitindo testes confiáveis e no ponto de atendimento [6,40,42].

2.1.3 Métodos de detecção em μ TAD

A escolha do método de detecção a ser empregado é de suma importância para que seja mantida a portabilidade e acessibilidade oferecida pela aplicação dos μ TADs. Dentre os métodos comumente utilizados, tais como a detecção eletroquímica, quimiluminescência, eletroquimioluminescência e fluorescência [43], as

detecções colorimétricas se sobressaem, sendo o método mais utilizado, sobretudo pela facilidade de operar e a possibilidade de análises sem que haja necessidade do uso de instrumentos complexos e caros, atendendo às necessidades básicas da detecção no local [7]. Os μ TAD podem proporcionar metodologias simples de detecção de espécies químicas, sobretudo se a transdução for cromogênica e/ou a detecção puder ser analisada visualmente [44].

Nesse cenário, métodos baseados em imagem digital, especificamente colorimetria de imagem digital, podem ser considerados como um novo tipo de método para análise de campo. Ele emprega imagens digitais facilmente capturadas com ampla variedade de dispositivos com recursos ópticos, incluindo câmeras, webcams, scanners, smartphones, tablets, entre outros prontamente disponíveis. Esses dispositivos são equipados com semicondutores de óxido de metal complementar (CMOS) ou detectores de acoplamento de carga (CCD) que podem fornecer cores básicas rápidas vermelho, verde e azul usadas para análises quantitativas [45].

Análise colorimétrica é uma ferramenta importante para obtenção de resposta mais rápida que possa ser empregada em situações de maior urgência, onde não é possível a utilização de métodos mais demorados e/ou instrumentação analítica mais sofisticada [9].

2.1.3.1 Detecção colorimétrica por imagens digitais e padrão de cor como resposta analítica

Nos últimos anos, o uso de imagens digitais tem sido amplamente empregado como ferramenta para análise química, proporcionando análises com boa exatidão, precisão [46,47] em curto intervalo de tempo [45].

Nos μ TADs, as análises baseadas em imagens digitais estão relacionadas com as cores da imagem, a utilização de medidas colorimétricas advém da mudança de coloração que ocorre pela reação entre um analito e um agente cromógeno [48]. De forma que, para determinações quantitativas, após essa reação, um produto com determinada intensidade de cor é formado e, em seguida, é feita a captura da imagem utilizando um dispositivo de fotografia [49].

Os métodos atuais de detecção colorimétrica utilizando μ TADs medem essa intensidade da cor utilizando uma câmera fotográfica, *scanner* ou *webcams* [13,50].

No entanto, alternativamente, devido à sua portabilidade, disponibilidade onipresente, além de ser equipado com câmera de alta resolução [49], o *smartphone* está se tornando um instrumento cada vez mais atraente para quantificação de analitos em ensaios colorimétricos [51].

Além disso, é importante ressaltar que, a grande maioria da população mundial sabe como operar um *smartphone*, facilitando o treinamento daqueles que usarão o método desenvolvido [9]. Além de que, para determinar quantitativamente certo analito em uma determinada amostra, o aplicativo baseado em *smartphone* é usado para converter a intensidade da cor da área reacional na imagem em valor numérico [52], permitindo a obtenção de resposta instantaneamente, em tempo real [53].

Uma imagem digital é formada pelo conjunto de pequenos quadrados, denominado pixel. E quanto maior o número de pixels por área da imagem, maior é a resolução e maior será o tamanho do arquivo (em *bytes*) de imagem.

A disposição dos pixels tem relação direta com a forma como as imagens digitais são formadas. Estes podem resultar em arranjos bi ou tridimensionais, de forma que os arranjos bidimensionais são caracterizados por coordenadas espaciais que formam imagens monocromáticas, como as imagens em escala em tons de cinza, classificadas como imagens univariadas [54].

Por sua vez, as imagens coloridas possuem arranjos tridimensionais e são construídas a partir da combinação de imagens monocromáticas. As imagens coloridas são classificadas como imagens multivariadas e suas informações dependem da cor do objeto [54].

Para que haja uma especificação das cores em um formato padronizado, as imagens digitais coloridas podem ser representadas por diferentes modelos de cores já criados, tais como, HLS (do inglês *hue, lightness e saturation*), HSV (do inglês *hue, saturation, value*) e RGB (do inglês *red, green e blue*) [54]. Este último se assemelha às características de detecção de cores do olho humano, que possuem sensores sintonizados em vermelho, verde e azul, e tem sido utilizado em uma ampla gama de aplicações em métodos analíticos baseados em imagem digital [45].

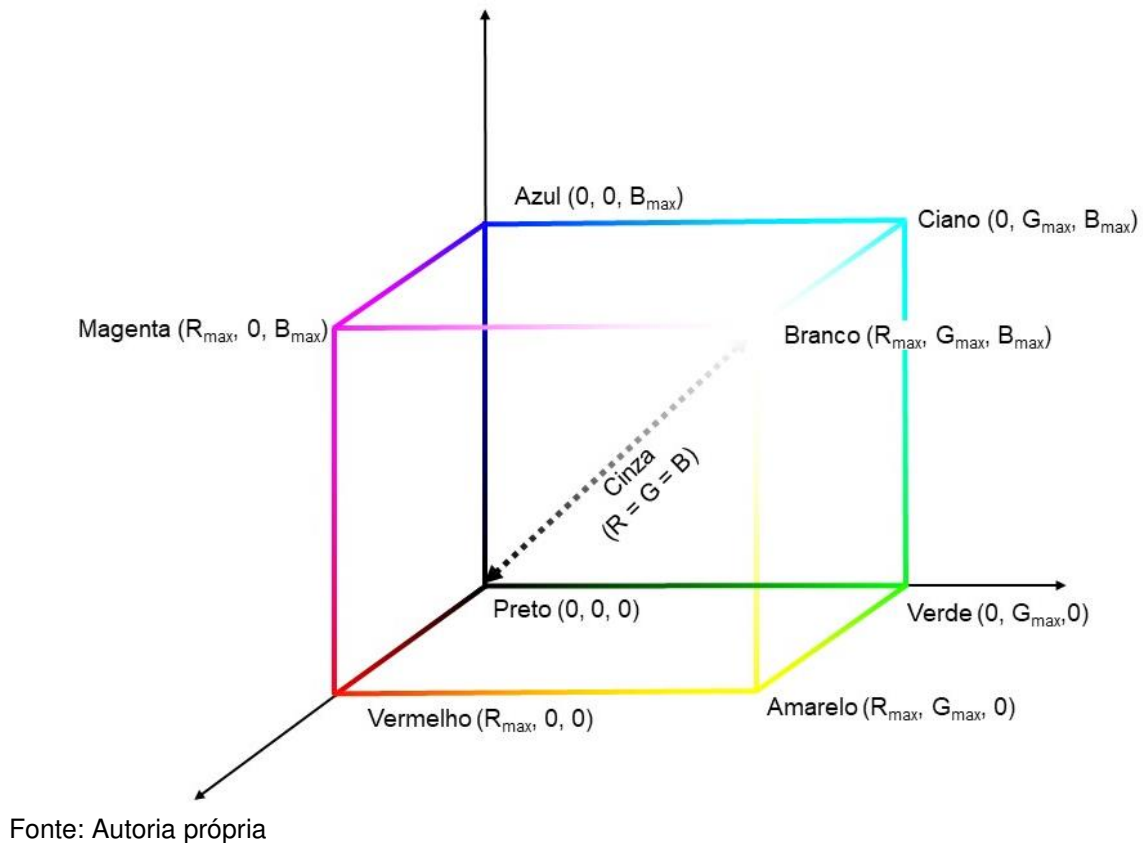
O modelo de cores RGB é baseado nas cores primárias vermelho, verde e azul e na ideia de que todas as outras cores são combinações dessas três em um

sistema aditivo. Esse modelo é chamado de aditivo porque usa a luz transmitida para exibir as cores. A combinação linear dessas três cores primárias produz todo o espectro visível [55].

O sistema de cores RGB usa uma representação de 8 bits (1 byte) para cada componente de cor, dando a cada pixel um total de 24 bits. Este sistema combina valores das cores vermelho, verde e azul que variam de 0 a 255, ou seja, um total de 256 variações de cores em cada canal, totalizando mais de 16 milhões de combinações únicas de cores (256^3) e uma ampla gama de cores diferentes [56].

O modelo RGB emprega um sistema de coordenadas cartesianas R, G, B, cujo subespaço de interesse é o cubo unitário, como demonstrado na **Figura 2**.

Figura 2 - Representação das cores no espaço RGB



O espectro de cores do espaço RGB, criado pela combinação das coordenadas dos três canais monocromáticos (R, G e B), é representado por um ponto que se encontra na superfície ou no interior do cubo (**Figura 2**). Na diagonal principal deste cubo, que vai do preto ($R = G = B = 0$) ao branco ($R = G = B = \max$), são relacionadas apenas as cores de cinzas, formadas pela adição das três cores nas

mesmas proporções ($R = G = B$) [57]. Dessa forma, das mais de 16 milhões de cores existentes, as cores cinza são quantizadas em 256 níveis.

Capturar uma imagem requer converter a luz que atinge o detector do dispositivo em uma corrente elétrica. Nesse caso, normalmente sensores fotossensíveis como CCD (do inglês, *coupled charge devices*) e CMOS (*Complementary metal-oxide-semiconductor*) são usados.

Os sensores CCD são dispositivos multifuncionais que podem coletar dados, transportar dados e transformar a intensidade de luz que incidente em corrente elétrica [50]. Esse sensor é formado por uma grade de pixels que transferem sequencialmente a luz incidente para um circuito de amplificação. Após a amplificação do sinal, este é enviado ao processador, onde o sinal de intensidade luminosa é transformado em corrente elétrica [58], que por sua vez é convertida em imagem digital.

Os sensores CMOS, por sua vez, possuem as mesmas funções atribuídas aos sensores CCD, com exceção da conversão de luz em eletricidade e da amplificação do sinal, que nesse caso, ocorre em cada pixel, de maneira que o conjunto desses pixels forma uma imagem. De tal forma que não há necessidade de um dispositivo separado para alterar e amplificar o sinal. Em consequência, os sensores CMOS ocupam menos espaço e são comumente usados em smartphones [59].

Tanto o sensor CMOS quanto o CCD podem medir apenas a intensidade da luz em cada pixel, não seu comprimento. Cada pixel CCD/CMOS possui um filtro Bayer para criar uma imagem digital colorida. Este filtro usa o espaço de cores RGB (vermelho, azul e verde) para gerar imagens coloridas [59].

Por fim, segundo Franco e colaboradores (2021), a utilização de instrumentos de captura de imagem acoplados a CCD ou CMOS proporciona uma coleta rápida de sinal e linearidade. Tais propriedades demonstram sua adequação para aplicação na química analítica, com o intuito de obter métodos altamente sensíveis e robustos que possam ser aplicados de forma rápida e barata [60]. Uma vez que a intensidade da cor obtida nessa imagem pode ser proporcional à concentração de um determinado analito presente na amostra, a quantificação de tal espécie pode ser obtida pela correlação dos valores das componentes do sistema de cores RGB da imagem associada com essa espécie e sua concentração.

2.2 A problemática do cobre: Um elemento inorgânico essencial, mas potencialmente tóxico para os seres vivos

O cobre (Cu), um metal de transição, é um oligoelemento essencial para inúmeras funções biológicas vitais para o funcionamento normal dos organismos [61], como cofator de enzimas de eliminação oxidativa, como componentes reguladores redox e na transferência de elétrons na respiração celular [62]. A deficiência desse micronutriente no corpo pode causar inúmeros prejuízos à saúde humana, causando doenças como anemia e doença de Menkes [63].

Por outro lado, a ingestão excessiva de cobre pode causar vômito, náusea, diarreia [64], irritação estomacal e intestinal, doenças hepáticas e renais e está associado com a ocorrência e desenvolvimento de vários distúrbios neurodegenerativos, incluindo doença de Wilson [65], Alzheimer [66] e doença de Parkinson [67].

Segundo o Instituto de medicina dos Estados Unidos é recomendado a ingestão de uma dose diária de 1,5 a 3,0 mg de cobre para adultos, 1,5 a 2,5 mg para crianças e 0,4 a 0,6 mg para bebês. E uma ingestão dietética máxima de 10 mg/dia [62].

O excesso de exposição ao cobre no organismo advém de diversas fontes, como contaminação por ingestão de água, alimentos e até mesmo bebidas alcoólicas destiladas, como a cachaça. Isso porque, o cobre é amplamente empregado na indústria e mineração, na fabricação de produtos fungicidas e herbicidas, empregados em plantações, e na produção de ligas metálicas e latões, bem como na produção de encanamento e tubulações e de equipamentos utilizados na produção e armazenamento de bebidas alcoólicas, que acabam elevando o teor de cobre desses produtos consumíveis.

Em condições normais, a concentração de cobre na água potável pode variar de 0,005 a 30 mg L⁻¹ [68]. O sistema de distribuição de água construídos a partir de canos e/ou conexões de cobre pode aumentar significativamente a exposição diária ao cobre [69].

Além de causar danos à saúde da população, elevadas quantidades de cobre na água de abastecimento doméstico podem trazer consequências indesejáveis para fins residenciais. Uma vez que, quando se faz uso de águas contendo concentração de

cobre superior a 1 mg L^{-1} , pode ocasionar formação de manchas em roupas e tecidos. Além disso, em altos níveis de concentração (acima de 5 mg L^{-1}), o cobre é capaz de dar cor à água e ocasionar sabor amargo desagradável [69].

A cachaça, segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil e terceira mais consumida no mundo [70], é uma bebida brasileira obtida a partir do caldo de cana-de-açúcar fermentado e destilado [71]. Portanto, a cachaça é produto nacional de grande importância econômica, social e cultural.

No processo de fabricação da cachaça, o processo de destilação é conduzido em recipientes de cobre, com a finalidade de melhorar a qualidade sensorial dessa bebida, já que o cobre que reveste esse recipiente, quando em contato com a cachaça, tem a capacidade única de reduzir a acidez, os níveis de aldeídos e compostos à base de enxofre, que possuem alto potencial de comprometer a qualidade organoléptica dessa bebida [72].

Sob tais circunstâncias, para evitar efeitos adversos à saúde resultantes da alta ingestão de cobre, em todo o mundo, diversas organizações de saúde, agências de vigilância sanitária e de proteção ambiental estabelecem padrões máximos permitidos para esse contaminante. Os níveis máximos permitidos são mostrados na **Tabela 1**.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes no Brasil, onde o valor máximo de cobre estabelecido para lançamento de efluentes em corpos de água é de 1 mg L^{-1} [73]. A Organização Mundial de Saúde (OMS) e governos de diversos países estabelecem um limite máximo de cobre na água potável para consumo humano, variando de 1 a 2 mg L^{-1} . E de acordo com a legislação nacional, estabelecida pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) [74], é permitido uma quantidade máxima de 5 mg L^{-1} de cobre na cachaça. Por outro lado, legislações internacionais permitem o nível máximo de 2 mg L^{-1} de cobre em destilados alcoólicos [72].

Tabela 1 - Padrão de cobre estabelecido por diferentes legislações para água e cachaça

Amostra	País	VMP*/ mg L ⁻¹	Referência
Água potável (consumo humano)	OMS	2	[69]
	Estados Unidos	1,3	[75,76]
	Canadá	1	[77]
	China	1	[78]
	Brasil	2	[79]
Efluentes	CONAMA – Brasil	1	[73]
Cachaça	MAPA – Brasil	5	[74]

Fonte: Autoria própria

*Valor máximo permitido

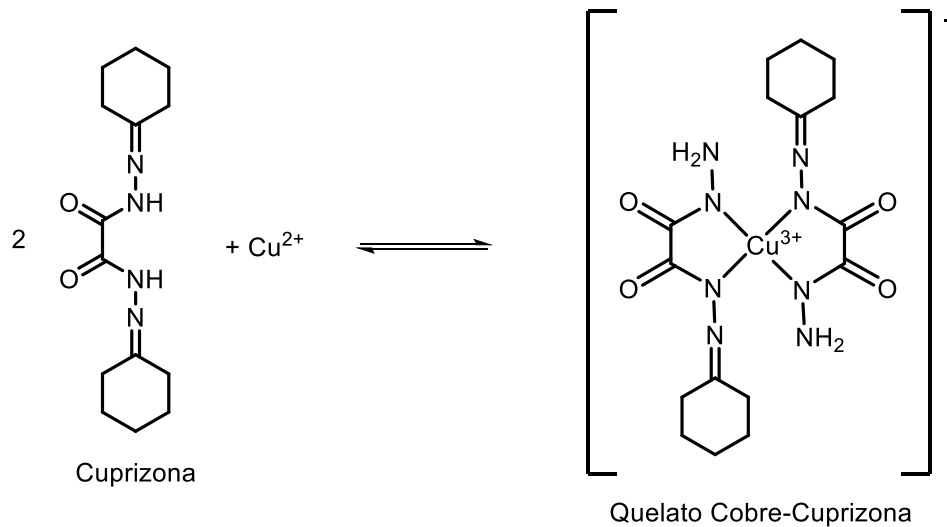
Sendo assim, é fundamental o monitoramento periódico da presença desse contaminante potencialmente tóxico em recursos hídricos [41], assim como em bebidas destiladas. Uma vez que, tomada essa medida, pode ser dimensionada a magnitude de tal contaminação, assim como avaliada a eficiência de eventuais medidas preventivas que possam ser adotadas imediatamente [80].

2.2.1 Detecção colorimétrica de íons cúpricos utilizando cuprizona

Há mais de 70 anos, foi relatada na literatura a coordenação do íon cúprico com o composto bis (ciclohexanona)oxalildihidrazona (também conhecida como cuprizona), resultante na formação de um complexo de cor azul intensa, que apresenta baixa solubilidade em água. E, desde então, a ação desse quelante tem sido utilizada em ensaios colorimétricos para detectar a presença de traços de cobre [81], proporcionando uma determinação seletiva desses íons cúpricos [71] nas mais diversas matrizes.

A cuprizona (CPZ) é um reagente orgânico bidentado que forma complexo de coloração azul com o íon cúprico na proporção 2:1 de CPZ: cobre [82], conforme ilustrado na **Figura 3**. A intensidade da cor azul formada é proporcional à concentração de íons cúpricos no meio reacional.

Figura 3 - Esquema da reação de complexação entre a CPZ e o íon cúprico, em uma relação 2:1.



Fonte: Autoria própria

2.2.2 Pré-concentração em μ TAD baseado em fio de algodão

As reações colorimétricas são as mais comumente usadas para quantificação de íons de metais potencialmente tóxicos. No entanto, as espécies de interesse frequentemente estão presentes em matrizes complexas e/ou em concentrações abaixo do limite de detecção, o que inviabiliza a determinação desse analito. Este problema pode ser evitado usando a etapa de pré-concentração. Esses procedimentos envolvem várias técnicas analíticas, como extração em fase sólida (SPE), coprecipitação e extração líquido-líquido (LLE), bem como microextração em fase líquida (LPME) e microextração em fase sólida (SPME) [12].

As microtécnicas de extração e de pré-concentração (SPME e LPME) da espécie de interesse em nível micro, que se baseiam no princípio de adsorção e/ou absorção do analito [83], são amplamente empregadas nas mais diversas aplicações, incluindo análises ambientais, biológicas, clínicas, farmacêuticas [84], alimentícias e de bebidas [85], assim como forense [83].

Em 2020, uma nova abordagem de SPME baseado em μ TAD foi demonstrada por Suarez e colaboradores [12], que utilizaram a técnica de pré-concentração em sensores baseados em fio de algodão. No referido estudo, foi desenvolvido e validado um μ TAD baseado em fio de algodão com detecção colorimétrica sensível para cobalto (II), em amostras de água a partir da reação de complexação desse ion

metálico por 4-(2-piridilazo) resorcinol. No fio de algodão, foi adicionado quitosana que funcionou como uma espécie de barreira para imobilizar o complexo colorido formado, que possui caráter catiônico. Esse estudo comparou a sensibilidade do método com e sem a etapa de pré-concentração, alcançando um fator de incremento da sensibilidade de 11 vezes.

No atual trabalho, a utilização combinada das tecnologias pré-concentração e μ TAD também se mostra propícia, uma vez que, ao utilizar a cuprizona como reagente quelante para íons cúpricos, o complexo CPZ-Cu formado (**Figura 3**) é facilmente movido ao longo do fio, diminuindo o sinal analítico, comprometendo a sensibilidade do método. Portanto, a utilização de técnicas de pré-concentração empregando um polímero com características espessantes para imobilizar o analito pode ser vantajosa e adequada.

Nessa situação, é adequado destacar a carboximetilcelulose sódica (CMC), um polímero orgânico não tóxico, com custo relativamente baixo e amplamente disponível na natureza [86]. Esse polímero é solúvel em água, formando uma solução transparente e viscosa, muito utilizada como estabilizante e espessante em indústrias têxteis, de adesivos e papel, assim como de alimentos, particularmente em sorvetes e sucos vegetais em pó concentrado [87,88].

2.3 Ácido Ascórbico: um componente dietético essencial para a saúde humana e no controle de qualidade de alimentos

Vitaminas são compostos orgânicos de baixo peso molecular que atuam em pequenas quantidades, sem fornecer energia para o corpo, mas que são essenciais para o promover o desenvolvimento, reprodução e a saúde geral dos humanos [89].

A vitamina C (designada pela Comissão IUPAC-IUB como ácido ascórbico ou L-ácido ascórbico [89]), por exemplo, é essencial para o funcionamento do corpo humano, No entanto, mas nosso organismo não é capaz de produzi-las [90]. Isso porque os humanos e outros primatas têm deficiência da enzima L-gulonolactona oxidase, responsável por converter L-gulonolactona em L-AA [91].

Desde a sua descoberta na década de 1930, a vitamina C tem sido reconhecida como um componente vital que contribui para a saúde humana. O L-AA é uma biomolécula solúvel responsável por diversas funções biológicas necessárias para a

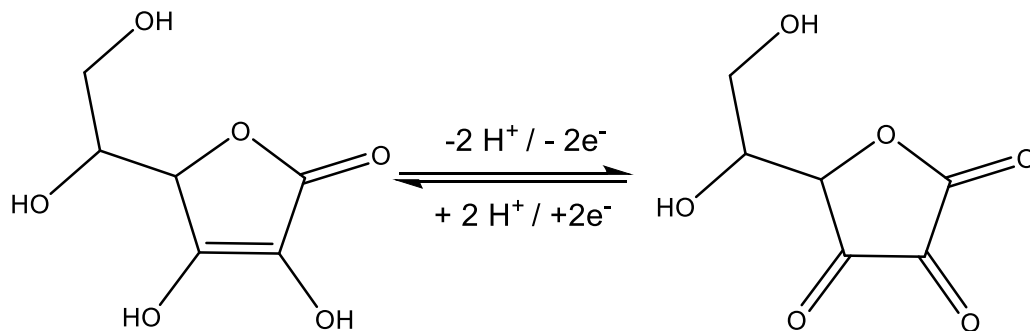
sobrevivência de todos os organismos vivos [92]. Essa vitamina desempenha um papel crucial no funcionamento de numerosas enzimas, atuando como cosubstrato e facilitando a redução de íons metálicos em suas formas mais absorventes [93], de tal forma que uma deficiência de AA pode resultar em anemia férica [94]. Esta vitamina é crucial para regular uma ampla gama de funções corporais, com papel fundamental no sistema imunológico e na manutenção do tecido conjuntivo [95]. Além disso, essa vitamina é um poderoso antioxidante que pode regenerar outros antioxidantes lipídicos essenciais, como a vitamina E e a glutatona [93].

Estudos têm mostrado que essa biomolécula desempenha um papel significativo no tratamento de vários problemas de saúde, incluindo resfriado comum, doenças mentais, escorbuto, câncer e catarata [94]. Por outro lado, o consumo excessivo de L-AA pode causar efeitos adversos à saúde, incluindo diarreia [96], irritações gástricas, problemas renais e doenças hepáticas [94,97].

Sendo assim, os humanos dependem de uma dieta adequada para obter vitamina C e manter a saúde [91]. Nesse caso, para homens adultos é recomendado uma dose diária de 90 mg, enquanto para mulheres adultas é indicado 75 mg. E a ingestão máxima aconselhada para adultos é de 2 g por dia [96].

O L-AA quando exposto a altas temperaturas, pH, luz, oxigênio e outros oxidantes é rapidamente oxidado em ácido desidroascórbico (DHAA) (conforme ilustrado na **Figura 4**). Devido a isto, essa quantidade dessa biomolécula serve não só como um marcador do conteúdo nutricional dos alimentos, mas também como um marcador crítico da qualidade dos produtos alimentícios. Dessa forma, as preocupações sobre o teor de L-AA nos alimentos é tanto dos consumidores, quanto dos fabricantes devido à possibilidade de perda dessa vitamina durante o processamento e armazenamento. Para reverter este problema, durante a fabricação de produtos consumíveis, frequentemente é adotado a adição de quantidades de vitamina C nesses produtos [89].

Figura 4 - Esquema da reação de oxirredução do ácido ascórbico



Fonte: Autoria própria

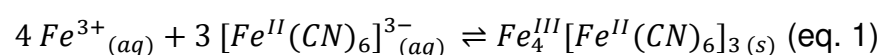
Esses fatos demonstram que a detecção precisa do conteúdo de L-AA em produtos farmacêuticos e alimentares torna-se essencial e vital para promover uma saúde ideal e garantir o consumo adequado de tal vitamina.

Para fins de quantificação da quantidade de ácido ascórbico em produtos alimentícios, comumente técnicas cromatográficas [90,98], espectroscópicas [1] ou mesmo eletroquímicas [94,99,100] são utilizadas. No entanto, oficialmente estabelecido pela Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 1990), o método comumente utilizado é a titulação de amostras com 2,6-diclorofenolindofenol, também conhecida como titulação de Tillman. Este método baseia-se na redução do 2,6-diclorofenolindofenol, um indicador colorido, pelo ácido ascórbico presente na amostra.

2.3.1 Detecção colorimétrica de L-AA: redução de Azul da Prússia (AP) a Branco da Prússia (BP)

O ferrocianeto férrico ou hexacianoferrato (II) de ferro (III) (conhecido como Azul da Prússia) [101], descoberto acidentalmente por Diesbach e Dippel no século XVIII, é o composto de coordenação mais antigo relatado na literatura [102].

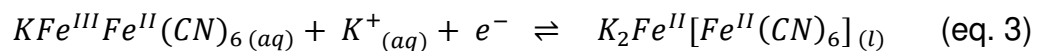
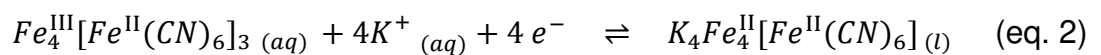
O Azul da Prússia (AP) pode ser produzido facilmente pela combinação de hexacianoferrato (III) de potássio com ferro (III), como demonstrado na equação 1.



A denominação "Azul da Prússia" foi dada devido a esse pigmento ser utilizado nos uniformes dos militares prussianos. O AP existe em duas formas, dependendo da ausência ou presença de cátions em sua estrutura: a produzida na **equação 1**, referida como "AP insolúvel" ($Fe_4^{III}[Fe^{II}(CN)_6]_3$), e outra que é formada em um sistema quando há um excesso de hexacianoferrato (III) de potássio, conhecida como "AP solúvel" ($KFe^{III}Fe^{II}(CN)_6$) [103,104]. Apesar das dominações solúveis e insolúveis, ambas as formas são altamente insolúveis, e essa denominação está relacionada apenas com a capacidade de dispersão desse sólido em água na forma de nanopartículas [89].

O AP é eletroquimicamente ativo, podendo atingir vários estados de oxidação, como $Fe^{II}-CN-Fe^{II}$ (Branco da Prússia) ou $Fe^{III}-CN-Fe^{III}$ (Verde de Berlim). Devido a isso, esse composto de coordenação é amplamente utilizado em dispositivos eletrônicos [105]. Além disso, a mudança de cor que ocorre devido à redução e oxidação do AP é bastante atraente para aplicações em sensores colorimétricos.

O Branco da Prússia (ferrocianeto ferroso ou hexacianoferrato de ferro (II)), também conhecido como Branco de Berlim, Sal de Williamsons e Sal de Everitt, é a forma totalmente reduzida de AP e que pode ser obtido a partir de processos eletroquímicos ou quando em contato com um agente redutor [101,103], como ácido ascórbico, por exemplo. A reação de redução do AP insolúvel e AP solúvel a BP são demonstradas nas equações 1 e equação 2, respectivamente.



3 OBJETIVOS

3.1 objetivo geral

Desenvolver e implementar métodos colorimétricos portáteis baseados em fibras de algodão que sejam eficientes, de baixo custo e para determinação *in-situ* e em tempo real, sem diferenças significativas em relação aos métodos convencionais.

3.2 Objetivos específicos

Para que o objetivo geral seja alcançado, serão delimitados alguns objetivos específicos:

- Investigar o fio de algodão ideal a ser utilizado na fabricação do dispositivo microfluídico;
- Modificar quimicamente a superfície do fio de algodão para remover quaisquer componentes hidrofóbicos presentes;
- Desenvolver o μ TAD;
- Avaliar a influência de variáveis que possam afetar a resposta analítica e otimizar estes parâmetros experimentais;
- Caracterizar o μ TAD desenvolvido;
- Validar o método desenvolvido;
- Aplicar o μ TAD otimizado e validado na determinação quantitativa de analito em amostras reais.

CAPÍTULO 2:

Utilização de um sensor colorimétrico baseado em fio de algodão modificado por carboximetilcelulose e cuprizona com detecção por smartphone para quantificação de íons cúpricos



1 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um micronutriente vital essencial para a saúde humana e desempenha um papel não negligenciável em uma ampla gama de processos fisiológicos essenciais [61,106]. No entanto, é importante observar que a regulação inadequada da homeostase do cobre pode causar toxicidade e provocar uma ampla gama de efeitos patológicos, incluindo irritação estomacal e intestinal, doenças hepáticas e renais, além de estar associado a doenças como Wilson, Alzheimer e Parkinson [65–67]. Em vista disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma ingestão dietética máxima de 10 mg/dia [62].

De acordo com a Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças dos Estados Unidos [64], o acúmulo excessivo de cobre no organismo pode ocorrer pela exposição a diferentes fontes de fornecimento de cobre, incluindo a ingestão de alimentos e água contaminados, como bebidas alcoólicas destiladas como a cachaça [107]. Tendo isso em mente, é crucial monitorar a presença de cobre nesses produtos consumíveis para garantir uma ingestão segura e adequada desse elemento nutricional.

Uma ampla gama de técnicas analíticas sofisticadas, com alta sensibilidade e seletividade, têm sido empregadas para a determinação do cobre; entre essas técnicas estão a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-Vis [108], espectrometria de absorção atômica em chama e forno de grafite, espectrofotometria de absorção molecular e técnicas de fluorescência de raios-x [109]. Notavelmente, o uso da tecnologia microfluídica tem sido encontrado com vantagens únicas sobre as outras técnicas, principalmente porque permite a miniaturização de sistemas analíticos; essa abordagem permite a produção de dispositivos portáteis capazes de realizar análises rápidas a baixo custo e com alta sensibilidade para diagnósticos em campo [4,5].

Dispositivos microfluídicos baseados em fios têm vantagens únicas no sentido de permitir a realização de múltiplos procedimentos analíticos em um único dispositivo, incluindo a introdução e o pré-tratamento de amostras, reação química e identificação de analitos [22,23], com o uso de baixas quantidades de amostras e reagentes, e resposta rápida [28,110]. Essas propriedades tornam os μ TADs adequados para a realização de análises, principalmente em situações de emergência

ou em áreas remotas e menos desenvolvidas que possuem recursos financeiros limitados e instalações laboratoriais precárias [11]. Comparados a outros sistemas microfluídicos, construídos a partir de substratos como silício, vidro ou polímeros, os μ TADs apresentam algumas vantagens-chave, incluindo baixo custo, facilidade de fabricação e uso, além de serem ecologicamente corretos [26]. Além disso, o material de fio empregado nos μ TADs possui funcionalização versátil devido à sua alta flexibilidade, e isso ajuda a personalizá-lo em diferentes formas e tamanhos, permitindo mudanças em sua capilaridade [28,110]. Essas propriedades tornam os μ TADs facilmente adaptáveis a uma ampla gama de aplicações analíticas, incluindo monitoramento ambiental [12,111], análises biológicas e diagnósticos médicos [110,112–117], bem como análises forenses [118].

A técnica colorimétrica é amplamente empregada em dispositivos baseados em fios porque oferece diversas vantagens relevantes, incluindo a identificação de analitos de forma rápida e a olho nu. Quando se trata da quantificação de analitos em concentrações muito baixas, não é necessário exagerar na importância de empregar técnicas analíticas caracterizadas por alta sensibilidade e precisão. Atualmente, métodos analíticos que envolvem a aplicação de imagens digitais podem ser muito úteis para a quantificação de analitos em concentrações muito baixas. Sob essa abordagem de imagem digital, a imagem de alta resolução dos capilares preenchidos com um reagente colorimétrico seletivo pode ser facilmente digitalizada usando um scanner, uma câmera digital ou um Smartphone com câmera digital [16,119] e empregada para a quantificação eficaz de analitos sem a necessidade de aplicar equipamentos altamente caros [16]. Na busca por uma técnica adequada, altamente eficiente e acessível para a determinação *in situ* de analitos de baixa concentração, a incorporação de Smartphones para impulsionar a capacidade de detecção da técnica nessas análises é consideravelmente útil.

É necessário implementar medidas adequadas para obter imagens com boa precisão e exatidão [120,121]. Utilizar uma câmera para obter uma iluminação uniforme do fio de algodão é geralmente importante, pois ajuda a gerar uma quantidade de radiação suficientemente intensa para promover uma imagem uniformemente iluminada, sem excesso de brilho ou sombras [120–122]. Quando se trata de técnicas de detecção analítica baseadas em imagens, há uma ampla gama de materiais que podem ser usados como plataformas de suporte; entre esses

materiais estão cerâmicas [123], vidro [124], polímeros [120], papel [125,126], fio de algodão [12], entre outros. Para fins quantitativos, comumente são utilizadas ferramentas de *software* como *Image J*, *Photometrix* e *Color Grab* para decompor as imagens em dados, como o sistema vermelho, verde, azul (RGB) [127]. Considerando que a técnica de detecção é baseada em sinais de refletância, a mudança de cor no fio de algodão está correlacionada com a concentração do analito. Embora outros modelos de cores, como ciano, magenta, amarelo e chave (preto) - CMYK, e matiz, saturação, valor - HSV, também tenham sido empregados em estudos relatados na literatura, o modelo RGB é considerado o mais simples de todos os modelos e, como tal, o mais amplamente aplicado [128–130].

Dessa forma, neste capítulo, foi propomos o desenvolvimento de um μ TAD usando fio de algodão funcionalizado com carboximetilcelulose e cuprizona para aplicação na detecção quantitativa de íons cúpricos em amostras de água e cachaça com o auxílio de um *smartphone* como detector.

2 MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.1 Reagentes e equipamentos

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico, sem qualquer purificação adicional. As soluções foram preparadas utilizando água ultrapura obtida do sistema Millipore Milli-Q (EUA) com resistividade superior a 18,0 MΩ cm. As soluções de íons metálicos foram preparadas utilizando os correspondentes sais de nitrato ou de cloreto, adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A solução estoque de íons cúpricos foi preparada pela dissolução 0,1960 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 100 mililitros de água. Soluções subsequentes de íons cúpricos foram obtidas por diluição da solução estoque. A solução de cuprizona (bis(ciclohexanona)oxaldi-hidrazona, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo, EUA) na concentração de 2 g L⁻¹ foi preparada em solução de etanol a 60% (v/v) (Dinâmica, São Paulo, SP, Brasil). Para preparar a solução de carboximetilcelulose de sódio (CMC) (Sigma®), uma massa específica (30, 60 ou 90 mg) de carboximetilcelulose de sódio foi adicionada a um recipiente selado contendo 3 mililitros de água Milli-Q. Esta mistura foi agitada a uma velocidade de 5000 rpm e mantida a uma temperatura de 60 °C por 20 minutos usando um agitador magnético com aquecimento C-MAG HS 7 (IKA, Alemanha). A solução foi deixada em repouso por 24 horas antes do uso.

As amostras de cachaça e água mineral foram adquiridas em uma loja local em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As amostras de água da torneira e de lago foram coletadas na Universidade Federal de Viçosa (20°45'37.4"S 42°52'16.6"W).

Os fios de algodão utilizados como substrato para a construção do μTAD foram adquiridos no mercado local da cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2.2 Obtenção e limpeza das fibras de algodão

Dois tipos de fibras 100% algodão (fibras cirúrgica e de crochê), na cor branca, foram testados em relação a características como: melhor fluidez dos líquidos e melhor visualização da mudança colorimétrica.

Como já mencionado, os fios de algodão são parcialmente hidrofóbicos devido a algumas substâncias hidrofóbicas naturais presentes em suas fibras. Assim, para

serem empregados na fabricação dos dispositivos, esses fios foram modificados quimicamente.

Especificamente, a remoção de qualquer cera ou outro contaminante hidrofóbico no material foi conduzida fervendo o fio em solução 10 g L^{-1} de carbonato de sódio (Na_2CO_3) durante 10 minutos. Em seguida, as fibras de algodão foram lavadas com água MilliQ em abundância até pH neutro. As fibras limpas foram secas à temperatura ambiente ($\pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$) e armazenadas em um recipiente fechado até uso posterior.

2.3 Caracterização dos μTADs desenvolvidos em fibra de algodão

A morfologia das fibras de algodão foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para isso, empregou-se um microscópio eletrônico Tescan/Oxford Instruments modelo Vega3 SB com filamento de tungstênio, que opera com voltagem de aceleração de 20 kV e detector de elétrons secundário e retroespalhamento de elétrons. As amostras foram depositadas em uma fita dupla-face de carbono, as quais foram fixadas em um porta-amostra de alumínio, em seguida cobertas com ouro utilizando um equipamento de revestimento modular de alto vácuo (Quorum Technologies, modelo Q150RES).

A espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR) foi realizada em um espectrômetro Varian 660-IR da PIKE (EUA) na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

A análise térmica do μTAD foi realizada entre 30°C e 900°C , com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, em atmosfera de N_2 com fluxo de 50 mililitros por minuto em equipamento de análise térmica PerkinElmer STA 6000.

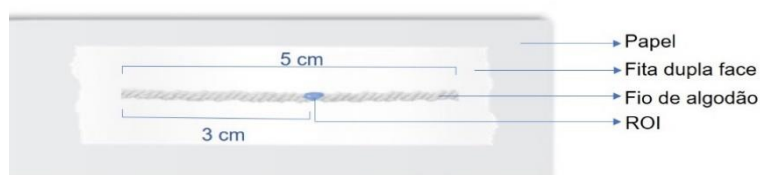
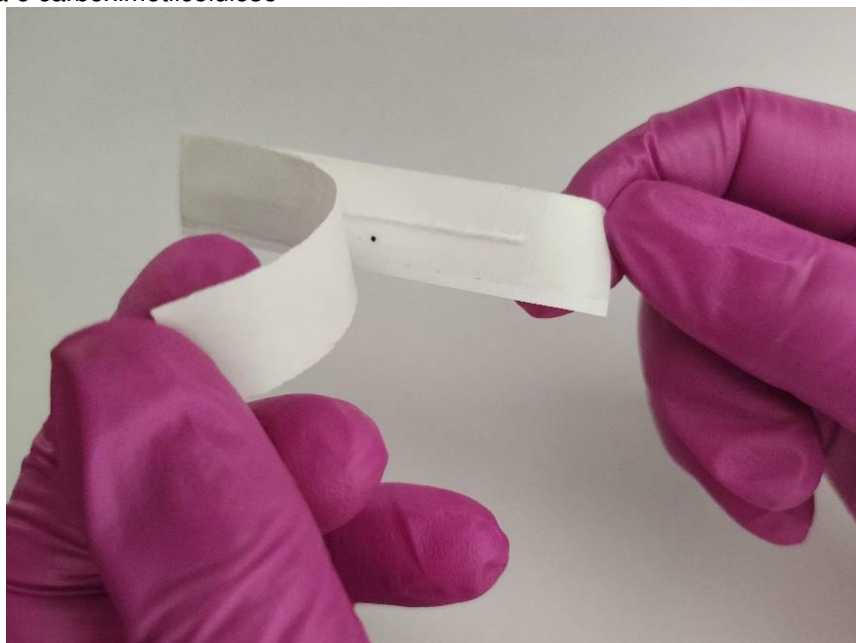
Para fins de comparação do método desenvolvido, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica Agilent Technologies, modelo 240 FS AA. Os dados obtidos foram submetidos ao teste *t* pareado com um nível de confiança de 95%. Para realização das análises, foi utilizado o software GraphPad Prisma, versão 9.0.

2.4 Desenvolvimento da plataforma microfluídica de fio de algodão integrando a técnica de pré-concentração

Na maior parte dos casos, a preparação do canal microfluídico utilizando fios têxteis se baseia na adição dos fios já tratados e na fixação de suas extremidades por meio de nós ou ainda pela incorporação direta em materiais hidrofóbicos, tais como tecidos, filmes poliméricos ou fitas adesivas [38].

No atual trabalho, para a confecção do dispositivo de análise colorimétrica, não foi utilizado nenhum equipamento caro ou sofisticado. Os materiais utilizados foram: régua, tesoura, pipeta volumétrica, caneta permanente, papel sulfite comum, fio 100% algodão e fita adesiva dupla face. Uma fotografia, juntamente com a identificação de cada parte desse dispositivo, pode ser encontrada na **Figura 5**.

Figura 5 - Fotografia e arranjo estrutural detalhado do μ TAD para detecção de íons cúpricos. Parâmetros Experimentais para Operação do Dispositivo: 0,1 μ L de CPZ ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), 15 μ L de CMC (1%), 5 μ L de tampão pH 8, 20 μ L de solução de íons cúpricos. ROI: região de interesse contendo cuprizona e carboximetilcelulose



Fonte: Autoria própria

Para construção do μ TAD, uma fita dupla face (mais ou menos 6 cm de comprimento), utilizada como área hidrofóbica, foi fixada em um papel sulfite branco, posteriormente um fio de algodão, previamente tratado e cortado em 5 cm de comprimento, foi fixado ao centro da fita dupla face de forma esticada. Com o auxílio de uma régua, um ponto fixo foi desenhado com um marcador permanente a 3 cm de uma das extremidades do fio. Esse ponto foi utilizado como referência para a região de interesse (ROI).

Na ROI, primeiramente, com auxílio de uma pipeta, foi depositado 0,1 microlitros do reagente cromógeno (solução de CPZ 2 g L^{-1} , 60% v/v etanol/água), após esperou-se 2 min para secagem em temperatura ambiente.

Posteriormente, a fim de alcançar maior sensibilidade no dispositivo, com auxílio de uma pipeta, foram adicionados 15 microlitros de suspensão de carboximetilcelulose com concentração de 1% (m/v), sobre a superfície do fio na ROI e deixado secar (15 minutos) à temperatura ambiente. A CMC funciona como uma espécie de barreira adsorvente para a complexo colorido que será formado (CPZ-Cu), proporcionando a pré-concentração do mesmo na ROI, uma maior homogeneidade da cor nessa área e maior intensidade de sinal analítico obtido.

Por fim, 5 microlitros de uma solução tampão (pH 8) foram adicionados à porta amostra, novamente esperou-se 20 min para secagem. Depois dessa etapa, o dispositivo microfluídico analítico está pronto para receber a solução da amostra.

2.5 Detecção de íons cúpricos utilizando o μ TAD, obtenção das imagens digitais e padrões de cores como resposta analítica

Para calibrar o μ TAD e realizar os testes de determinação de íons cúpricos, com o auxílio de uma pipeta, 20 microlitros de solução padrão/ amostra são adicionados no porta-amostra do dispositivo. Devido à capilaridade do fio, a solução fluí pelo fio e, quase que instantaneamente, perceptível a olho nu, começa a aparição de cor azul na região de interesse (ROI, do inglês Region of Interest), quando há presença de íons cúpricos na amostra.

Para uma análise quantitativa de tal espécie química, imagens digitais do μ TAD foram obtidas com um smartphone (Xiami Redmi 9), com flash da câmera ligado, colocado em posição fixa sobre o μ TAD dentro de uma caixa ($14 \times 15 \times 17 \text{ cm}$)

com bloqueio de luz, pintada internamente de preto, para minimizar os efeitos de sombra ou reflexo causados pela luz externa, já que os componentes RGB de uma imagem são proporcionais à quantidade de luz incidente [57]. Uma região uniforme da imagem ROI com 10 x 50 pixels foi decomposta para obtenção dos valores RGB utilizando o aplicativo gratuito Color Grab instalado no aparelho. Considerando a complexação do íon cúprico com CPZ, CPZ-Cu exibiu uma cor azul. Após a captura de imagem do μ TAD, os valores de R, G e B foram extraídos da ROI para correlacionar intensidades de cor no sistema RGB com a presença de cobre.

2.6 Otimização dos parâmetros experimentais

Para atingir a sensibilidade máxima do método, realizou-se a otimização de alguns parâmetros que possivelmente podem influenciar na resposta colorimétrica. Os parâmetros estudados foram: concentração de CMC, volume de CMC, tempo para captura da imagem digital, concentração do reagente cromógeno, volume da amostra e pH da solução tampão. Os parâmetros utilizados e as faixas estudadas encontram-se na **Tabela 2**. Para tais estudos, o experimento foi realizado triplicata para estimativa do desvio padrão.

Tabela 2 - Parâmetros experimentais otimizados

Parâmetro	Faixa estudada
Concentração CMC	0,5 – 3 % m/V
Volume CMC	10 – 25 μ L
Tempo de reação	0 – 30 min
Volume de amostra	10 – 50 μ L
pH do tampão	4 – 10

Fonte: Autoria própria

O efeito da concentração da carboximetilcelulose foi estudado na faixa de 0,5 – 3% (m/v). Após escolha da melhor concentração da suspensão de CMC, foi investigado o volume de CMC necessário para reter o complexo CMC-Cu azul formado para alcançar o maior sinal analítico.

O efeito do volume da amostra sobre o sinal analítico desenvolvido foi estudado na faixa de 10 a 50 μL em um intervalo de tempo de 0 a 30 min.

Foram testados 7 diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10). Para realizar os experimentos, foi utilizado um volume de 5 μL de soluções tampão de fosfato, com seus pHs devidamente ajustados.

2.7 Parâmetros analíticos de qualidade do μTAD desenvolvido para detecção de íons cúpricos

2.7.1 Avaliação da Interferência

Para garantir que o sinal analítico seja unicamente atribuída ao analito em questão, é necessário avaliar a influência da presença de interferentes na solução/amostra [131]. Uma vez que, a presença de interferentes pode ocasionar aumento ou diminuição na detecção do analito de interesse [132].

Por isso, após investigar as principais variáveis que poderiam afetar o sinal analítico obtido na determinação de íons cúpricos, foram avaliados os níveis de influência relacionados à presença de algumas espécies potencialmente interferentes, incluindo Cu(I), Cd(II), Co(II), Ag(I), Cr(II), Fe(II), Al(III), Hg(II), Mg(II), Pb(II) e Fe(III). Para isso, foi utilizada solução padrão contendo íons cúpricos em concentração de 5,0 mg L^{-1} na ausência e na presença das espécies potencialmente interferentes na proporção de 1:1.

O erro relativo percentual (E%) sobre o sinal analítico dos íons cúpricos foi calculado utilizando a equação 1:

$$E\% = \frac{S_{\text{Cu+interferente}} - S_{\text{Cu}}}{S_{\text{Cu}}} \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

2.7.2 Faixa linear

A linearidade de um método é demonstrada pela capacidade de obter sinais analíticos diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra [131]. A linearidade do método μTAD com e sem pré-concentração foi avaliada por curvas analíticas utilizando o canal R do sistema RGB de cores.

Como sinal analítico, utilizou a conversão dos valores de RGB via escala logarítmica, utilizando a **Equação 2**. Essa estratégia é utilizada com o intuito de reduzir

erros decorrentes da aquisição de imagens quando há pequenas variações de brilho [133].

$$I = -\log \frac{I_m}{I_0} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde I_m é o valor médio da intensidade de cor do canal R, G ou B da amostra e I_0 é o valor médio da intensidade de cor do branco.

2.7.3 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade de analito numa solução de amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais específicas. O limite de quantificação (LQ) é a quantidade mínima de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob condições experimentais estabelecidas [131]. O LD e o LQ do método desenvolvido foram calculados com base na curva de calibração obtida pelos ensaios de detecção ($n=3$) para concentrações de íons cúpricos em série. O LD (equação 3) e o LQ (equação 4) de íons cúpricos foram determinados pelas seguintes equações:

$$LD = \frac{3 \times SD}{s} \quad (\text{Equação 3})$$

$$LQ = \frac{10 \times SD}{s} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde SD é a estimativa do desvio padrão da resposta para o branco e s é o coeficiente angular da curva analítica.

2.7.4 Precisão

A precisão do método otimizado foi avaliada para solução padrão 5 mg L^{-1} de íons cúpricos. Esse requisito foi estimado em termos de desvio padrão (s) e coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (RSD), calculados conforme a equação 5 e a equação 6, respectivamente.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Equação 5})$$

$$CV(\%) \text{ ou } RSD(\%) = \frac{s}{x} \times 100\% \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: n é o número de amostra, s é o desvio padrão das concentrações de íons cúpricos, x_i é a concentração de Cu(II) medida e x é a média das concentrações de íons cúpricos obtida.

2.7.5 Recuperação

A exatidão do método é dada pela concordância entre o resultado obtido experimentalmente e um valor de referência aceito como verdadeiro [131]. A recuperação do analito pode ser estimada por análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas. As amostras devem ser fortificadas com o analito em pelo menos três concentrações diferentes (baixa, média e alta) dentro da curva de calibração do método [132].

Para investigar a exatidão do método colorimétrico estabelecido, o dispositivo μ TAD desenvolvido foi empregado na determinação de íons cúpricos em três diferentes matrizes de água (água de torneira, água mineral e água de uma lagoa) e três diferentes tipos de cachaças comerciais. A água de torneira e a água da lagoa foram obtidas na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, enquanto a água mineral e as cachaças foram adquiridas no mercado local da mesma cidade. Tais amostras foram enriquecidas com 3 níveis de concentração de íons cúpricos, e analisadas utilizando o procedimento analítico proposto. A recuperação percentual de íons cúpricos foi determinada pela **Equação 7**:

$$\%R = \frac{C_E - C_0}{C_F} \times 100\% \quad (\text{Equação 7})$$

Onde C_E é a média das concentrações obtidas na amostra fortificada, C_0 média da concentração obtida na amostra não fortificada e C_F é a concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

2.8 Comparação dos resultados de concentração de íons cúpricos obtidas entre os métodos

A determinação de íons cúpricos também foi feita utilizando a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS - do inglês *Flame Atomic*

Absorption Spectrometry) a fim de comparar os resultados obtidos utilizando o μ TADs. As amostras de água foram enriquecidas com 2 mg L^{-1} , enquanto as amostras de cachaça foram analisadas sem nenhuma adição prévia. O erro relativo em percentagem (E%) foi calculado conforme a Equação 8.

$$E(\%) = \frac{\text{Concentração Cu(II)}(\mu\text{TAD}) - \text{Concentração Cu(II)}(\text{FASS})}{\text{Concentração Cu(II)}(\text{FASS})} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Os dados obtidos pelos dois métodos foram comparados estatisticamente utilizando teste t, com um nível de confiança de 95%.

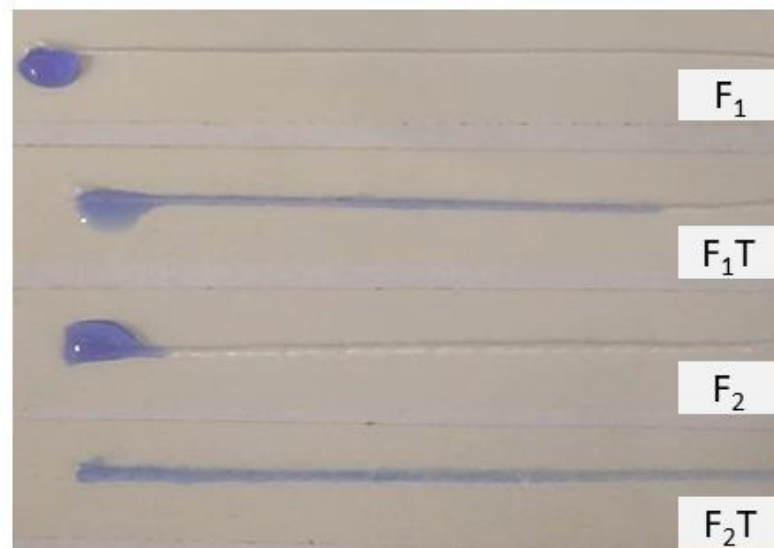
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Escolha da fibra de algodão

A seleção do material de substrato é um fator crítico que afeta tanto a resposta analítica do sensor quanto o custo de produção do microdispositivo de análise de fluidos (μ TAD). Neste estudo, o fio de algodão foi escolhido como o material de substrato para o μ TAD, devido às suas propriedades altamente desejáveis para a construção, incluindo alta hidrofobicidade e capilaridade pelo lúmen da fibra de algodão [12].

Inicialmente, dois tipos de fibras de algodão disponíveis no mercado foram testados com e sem pré-tratamento com solução salina de carbonato de sódio à quente: o tipo cirúrgico (F_1) e o tipo crochê (F_2), ambos também com a versão tratada (F_1T e F_2T , respectivamente) (**Figura 6**). O objetivo foi avaliar qual fio de algodão apresenta melhor capilaridade ao mesmo tempo que proporciona a maior intensidade de cor para o complexo CPZ-Cu.

Figura 6 - Fotografia de dois tipos de fios de algodão (tratados e não tratados) quando adicionado solução de CPZ-Cu



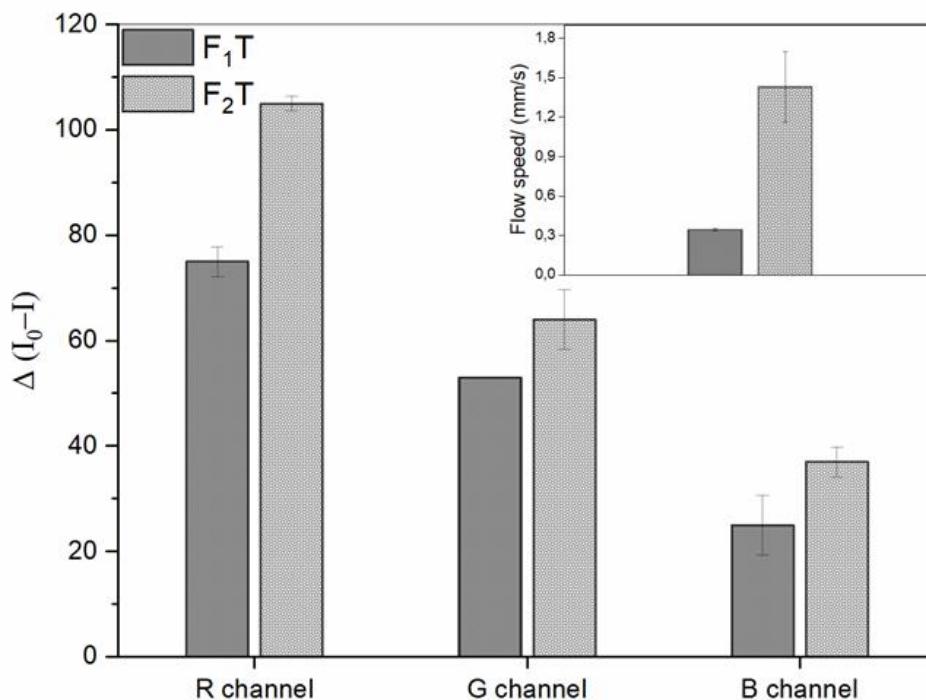
Fonte: Autoria própria

Os resultados obtidos da análise mostraram que o pré-tratamento do fio de algodão com solução salina à quente melhorou a hidrofobicidade do material, permitindo uma melhor penetração da amostra ao longo das fibras de algodão e maior

velocidade de deslocamento da solução colorida ao longo do fio de algodão. O fio de algodão F₂T exibiu capilaridade relativamente maior e maior variação de cor em comparação com o F₁T (**Figura 7**). Diante disso, o F₂T foi escolhido como o material mais adequado para a construção do μ TAD proposto.

Além disso, como ilustrado na **Figura 7**, os resultados obtidos da análise dos canais RGB relacionados à cor do produto do complexo CPZ-Cu mostraram que o canal R exibiu maior sinal analítico quando comparado aos canais G e B. Assim, o canal R foi escolhido para análise dos experimentos seguidos.

Figura 7 - Variação na intensidade do canal RGB observada para a solução do complexo CPZ-Cu nos casos de F₁T e F₂T. Inserção: velocidade do fluxo devido à ação capilar, quantificada como o tempo médio necessário para a solução percorrer um comprimento de 50 mm de fio de algodão tratado. Condições experimentais aplicadas: 30 μ L da solução do complexo CPZ-Cu com um pH 8



Fonte: Autoria própria

3.2 Desenvolvimento da plataforma microfluídica baseada em fio de algodão empregando pré-concentração para detecção de íons cúpricos.

Para construir o μ TAD, uma fita adesiva dupla face, usada como área hidrofóbica, foi fixada em uma folha de papel. Em seguida, pedaços de fio de algodão, previamente tratados e cortados com 5 cm de comprimento, foram fixados linearmente no centro da fita adesiva dupla face. Com o auxílio de uma régua, um ponto fixo foi

desenhado a 3 cm de uma extremidade do fio de algodão, que foi usado como referência para a região de interesse (ROI).

O μ TAD foi construído através da coordenação do íon cúprico com o CPZ - um reagente orgânico bidentado que forma um complexo de coloração azul intensa com íons cúpricos na proporção de 2:1 para CPZ e cobre, respectivamente, com base na desprotonação completa dos nitrogênios amidícos e na hidrólise parcial do CPZ. [81] A intensidade da cor azul gerada é proporcional à concentração de íons cúpricos na amostra, tornando-se um parâmetro analítico relevante para a quantificação desses íons metálicos.

No entanto, é importante notar que o uso apenas de cuprizona como reagente quelante para o cobre (II) no μ TAD tende a comprometer o desempenho analítico, uma vez que o complexo CPZ-Cu formado se move facilmente pelo fio de algodão. Para ajudar a superar essa restrição analítica, as técnicas de pré-concentração que envolvem o uso de polímeros espessantes são úteis para imobilizar o complexo colorido formado na região de interesse, reduzindo seu lixiviamento. [12] Entre os polímeros espessantes disponíveis, a CMC é considerada um polímero adequado devido ao seu baixo custo, abundância na natureza e não toxicidade. [86]

3.3 Otimização do μ TAD colorimétrico baseado em fio de algodão e pré-concentração

Para investigar as condições em que o μ TAD colorimétrico baseado em fio de algodão e pré-concentração pode efetivamente detectar íons cúpricos, condições como concentração do CMC, volume do CMC, tempo de reação, volume de amostra e pH do sistema de reação foram otimizadas empregando o método univariado.

3.3.1 Influência da concentração de carboximetilcelulose

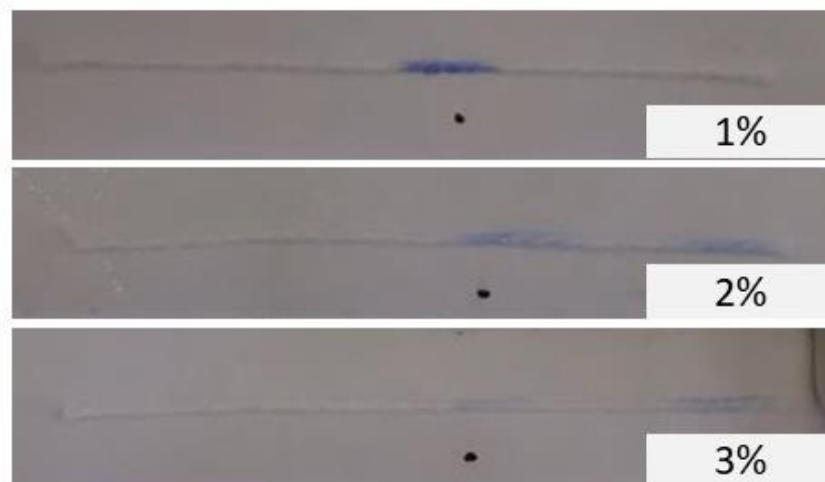
O efeito da concentração de CMC na pré-concentração do complexo CPZ-Cu foi avaliado utilizando concentrações variadas de CMC na faixa de 0,5 a 3% m/v. No entanto, concentrações abaixo de 1%, especialmente em 0,5%, não demonstraram eficácia em reter o complexo colorido formado dentro da ROI.

Conforme pode ser observado na **Figura 8**, o uso de soluções de CMC mais concentrada (2 e 3%) foi observado um efeito antagônico para a formação do

complexo. Como hipótese, tem-se que o CMC está interagindo com a CPZ em um filme rígido, impedindo assim que os íons cúpricos presentes na amostra interajam com esse agente cromógeno, além de que também ocorreu um deslocamento do complexo formado. Além disso, as soluções de CMC 2 e 3% são mais viscosas, verifica-se que para tais soluções a gota de CMC consegue aderir apenas parcialmente às fibras de algodão, cobrindo superficialmente a região de interesse e permitindo o arraste do complexo azul formado, o que também diminui a intensidade da cor azul alcançada.

Por outro lado, quando uma solução contendo 1% de CMC foi empregada, foi possível obter a fixação do complexo colorido formado na ROI, proporcionando maior intensidade de cor.

Figura 8 - Impacto da concentração de CMC na pré-concentração do complexo CPZ-Cu. Parâmetros experimentais: 0,5 μL de CPZ ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), 15 μL de CMC, 5 μL de tampão pH 9, 15 μL de solução de íons cúpricos (30 mg L^{-1}).



Fonte: Autoria própria

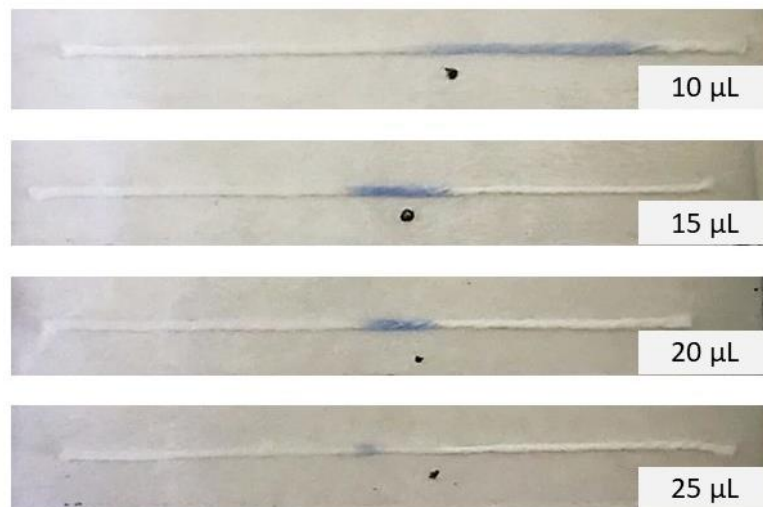
3.3.2 Influência do volume de carboximetilcelulose

O efeito do volume de CMC na pré-concentração do complexo CPZ-Cu na ROI foi avaliado utilizando volumes de solução de CMC a 1% (m/V) variando de 10 a 25 μL (**Figura 9**).

Como observado na **Figura 9**, os resultados obtidos desta análise mostraram que a aplicação de apenas 10 μL de solução de CMC a 1% levou à difusão do complexo azul ao longo das fibras de algodão. Por outro lado, a aplicação de volumes de 15 e 20 μL foi suficiente para promover a concentração do complexo CPZ-Cu formado nas redes de hidrogel de CMC, enquanto a aplicação de 15 μL de solução de CMC a 1% promoveu uma intensidade maior da cor azul no sistema. A aplicação de volumes acima de 25 μL levou ao bloqueio da solução na ROI, inibindo a complexação dos íons de cobre.

Com base nesse resultado, o volume de 15 μL foi escolhido para a fabricação do μTAD , uma vez que a aplicação deste volume foi suficiente para promover a concentração do complexo CPZ-Cu na ROI.

Figura 9 - Efeito do volume de CMC na pré-concentração do complexo CPZ-Cu na ROI. Condições experimentais: 0,5 μL de CPZ ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), 5 μL de solução tampão pH 9, 15 μL de solução de íons cúpricos (20 mg L^{-1}).



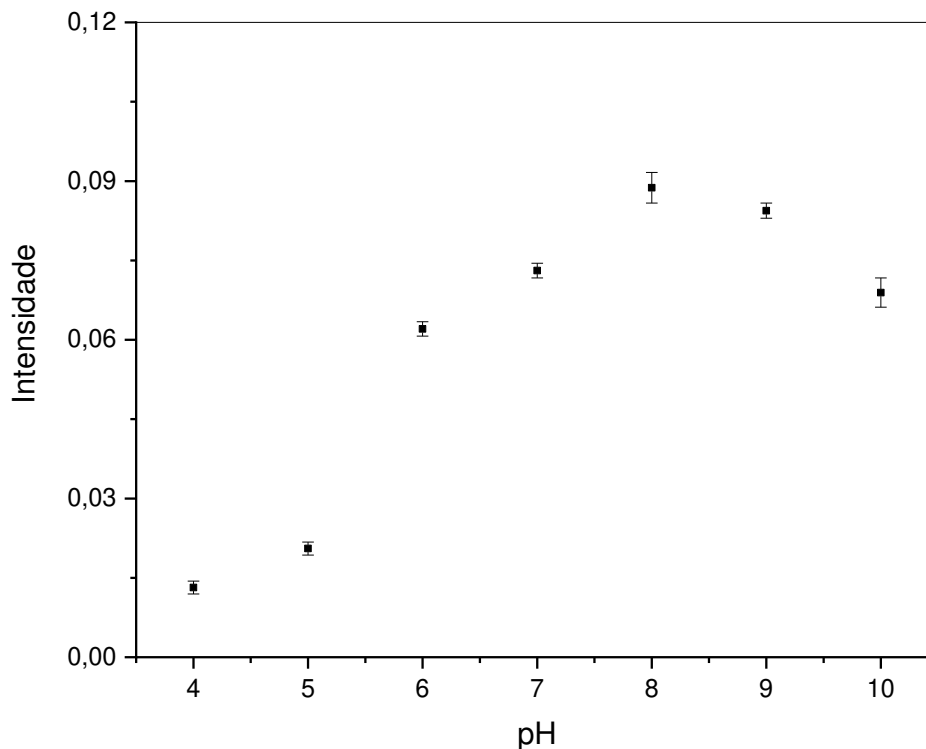
Fonte: Autoria própria

3.3.3 Influência do pH

Um estudo foi realizado para avaliar o pH ideal para a reação de complexação dos íons cúpricos com a CPZ; essa análise foi conduzida utilizando valores de pH variando entre 4 e 10. É bem conhecido na literatura que o estado de protonação dos átomos de nitrogênio presentes na estrutura do CPZ torna a reação seletiva para a detecção do íon cúprico em uma determinada solução. [82]. A **Figura 10** apresenta

os resultados obtidos a partir da análise da relação entre a intensidade da cor e o pH da solução.

Figura 10 - Influência do pH na detecção colorimétrica de íons cúpricos. Condições experimentais: 0,1 μL de CPZ ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), 15 μL de CMC (1%), 5 μL de tampão, 15 μL de solução de íons cúpricos ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$).



Fonte: Autoria própria

Em pH abaixo de 6,0, ocorre uma diminuição no sinal analítico, como esperado, já que, em valores de pH mais baixos, os átomos de nitrogênio são encontrados em sua forma protonada, o que leva a uma diminuição na capacidade de ligação do complexo. Além disso, conforme o pH da solução aumenta de 5 para 8, observa-se um aumento no sinal analítico, e a intensidade máxima da cor é obtida em $\text{pH} = 8$. No entanto, quando o pH da solução é aumentado de 8 para 10, observa-se uma diminuição no sinal analítico; isso ocorre devido à formação de hidróxidos complexos de cobre [134], o que reduz a quantidade de íons cúpricos livres disponíveis para complexação.

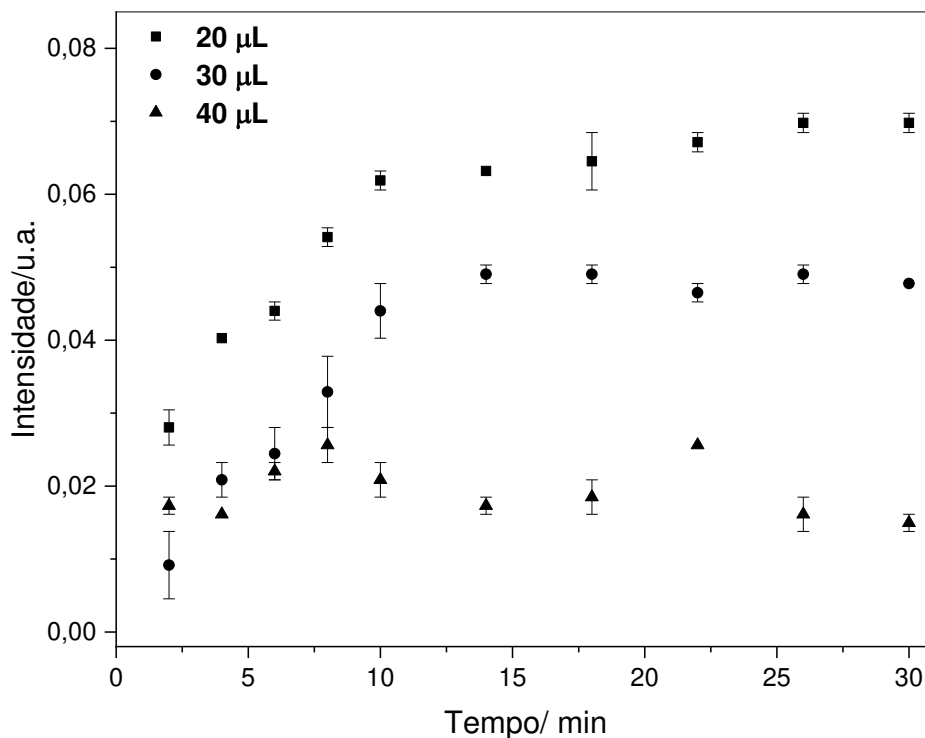
Com base no resultado obtido desta análise, o pH da solução de 8 foi escolhido como o pH ideal para a condução de experimentos adicionais e para o desenvolvimento do sensor colorimétrico proposto.

3.3.4 Influência do volume de solução e tempo de reação

O volume da amostra também está entre os parâmetros importantes que precisam ser considerados ao desenvolver um método de pré-concentração; isso porque esse parâmetro exerce uma influência direta sobre a sensibilidade do método. [135]. Levando isso em consideração, um estudo foi realizado para avaliar o efeito do volume da solução padrão/amostra no μ TAD proposto - ver **Figura 11**. A análise foi conduzida adicionando volumes de 10 a 50 μ L de solução padrão de íons cúpricos no μ TAD.

Quando utilizado o volume de 10 μ L, a amostra não foi suficiente para interagir efetivamente como a ROI, uma vez que a adição do CMC faz com que a vazão da amostra no μ TAD diminua. Por outro lado, quando utilizado volume de 50 μ L, ocorreu um acúmulo de solução na fibra e o rompimento da barreira de CMC na ROI, acarretando arraste do complexo CPZ-Cu através do fio de algodão.

Figura 11 - Efeito do volume da amostra e do tempo no desempenho do μ TAD para a detecção de íons cúpricos. Parâmetros experimentais: 0,1 μ L de CPZ ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), 15 μ L de CMC (1%), 5 μ L de solução tampão pH 8, solução de íons cúpricos ($3,5 \text{ mg L}^{-1}$).



Fonte: Autoria própria

Em contrapartida, a diminuição no volume de solução de amostra no μ TAD parece ser vantajosa para o processo de pré-concentração. Pois, para uma mesma concentração de íons cúpricos, à medida que se aumenta o volume de amostra de 20 – 40 μ L, ocorre uma diminuição no sinal analítico obtido. Isso se deve ao fato de que aumentar o volume da amostra também aumenta a velocidade com que a amostra passa pela ROI. Como resultado, há uma diminuição na interação dos íons cúpricos com o agente complexante. Assim, o volume de 20 μ L de amostra foi escolhido como valor ótimo de trabalho e usado para experimentos posteriores.

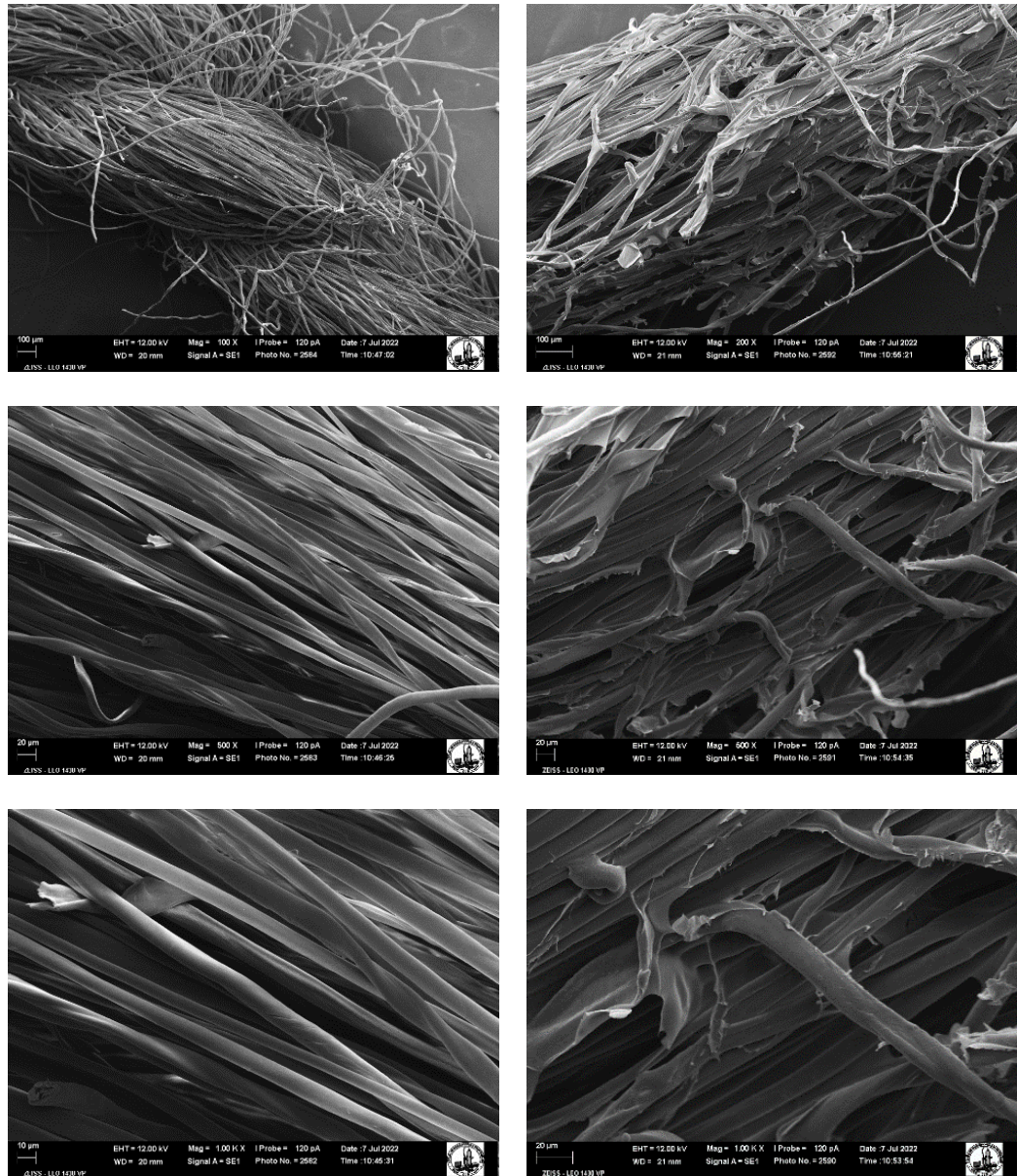
Além do mais, ainda **na Figura 11**, é possível notar que após 10 minutos a cor azul no ROI parece estabilizar, onde o sinal analítico não apresenta variações expressivas. Com base nesse resultado, o tempo ótimo de reação escolhido foi 10 minutos.

3.4 Caracterização do μ TAD: Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para compreender melhor a superfície da fibra de algodão no μ TAD, a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada. A análise foi realizada em duas regiões: F_{1T} (apenas a fibra após limpeza) e F_{1T} -CPZ-CMC (ROI, F_{1T} com adição de CPZ e CMC). A **Figura 12** apresenta as micrografias obtidas a partir da análise MEV.

Os resultados obtidos mostraram que a adição de CPZ e CMC promoveu um aumento na união entre as fibras de algodão, o que levou à formação de uma rede de hidrogel que aumentou a compactação das fibras. Tal revestimento promoveu uma redução da velocidade de fluxo da amostra nessa região, funcionando como uma barreira capaz de imobilizar o complexo CPZ-Cu formado, permitindo a obtenção de maior sinal analítico para detecção de íons cúpricos.

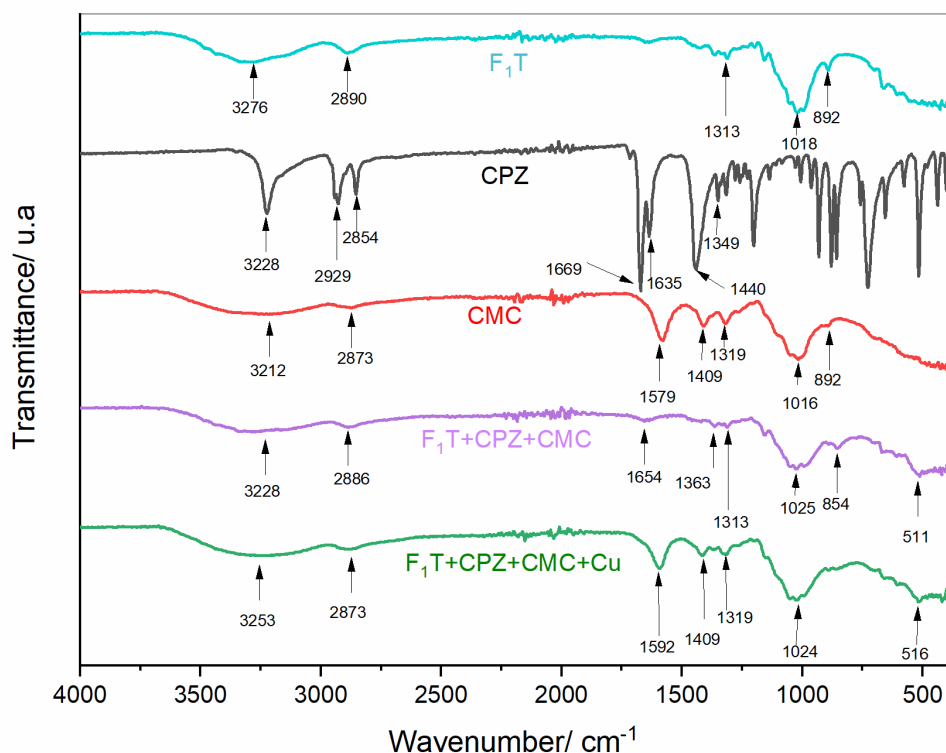
Figura 12. Micrografia do (a₁) F₁T (100x); (a₂) F₁T (1000x); (b₁) F₁T-CPZ-CMC (200x) e (b₂) F₁T-CPZ-CMC (1000X). (0,1 μ L de CPZ (2 g L⁻¹), 15 μ L de CMC (1%)).



Fonte: Autoria própria

A caracterização química do fio de algodão modificado foi avaliada usando FTIR. A **Figura 13** mostra os espectros dos materiais utilizados para a construção do sensor (F₁T, CPZ e CMC) e o sensor desenvolvido antes (F₁T-CPZ-CMC) e após (F₁T-CPZ-CMC-Cu) a aplicação para a detecção de íons cúpricos.

Figura 13 - Espectros de FTIR de F₁T, CPZ, CMC, F₁T-CPZ-CMC e F₁T-CPZ-CMC-Cu. (0,1 μL de CPZ (2,0 g L⁻¹), 15 μL de CMC (1%), 5 μL de tampão pH 8, 20 μL de solução de íons cúpricos (10 mg L⁻¹)).



Fonte: Autoria própria

Os espectros infravermelhos de F₁T e CMC mostram padrões de comportamento semelhantes, que incluem o seguinte: o modo de vibração de estiramento da ligação OH nas bandas em torno de 3660 - 2990 cm⁻¹; os modos de vibração de estiramento e deformação fora do plano de C-H em 2890 e 1313 cm⁻¹ para F₁T e em 2873 e 1319 cm⁻¹ para CMC. Além disso, pode-se observar o modo de vibração de estiramento das ligações C-O-C a 1018 cm⁻¹ para F₁T e a 1016 cm⁻¹ para CMC [136]. Além disso, tanto os espectros de F₁T quanto de CMC apresentam uma banda em 892 cm⁻¹, correspondente à ligação glicosídica. No entanto, observou-se a presença dos grupos COO⁻ no espectro de CMC; esses grupos são detectados por meio de vibrações de estiramento assimétricas e simétricas em 1579 e 1409 cm⁻¹, respectivamente [137].

O espectro infravermelho de CPZ exibe bandas de absorção em 3228 e 1349 cm⁻¹, relacionadas às vibrações de estiramento N-H e CN, respectivamente, e podem ser encontradas no grupo amida. As bandas em 2929 e 2854 cm⁻¹ estão associadas às vibrações de estiramento de CH. Além disso, pode-se observar o pico da vibração de estiramento de C=O e C=N em 1669 cm⁻¹ e 1635 cm⁻¹, respectivamente. A forte

banda em 1440 cm^{-1} está associada às vibrações de deformação angular da ligação N-H em grupos amida [82]. O pico em 511 cm^{-1} corresponde ao ciclohexano.

O espectro F_1T -CPZ-CMC mostra claramente a presença de bandas típicas das moléculas que constituem esse material. Pode-se observar a sobreposição da banda de estiramento O-H dos materiais celulósicos (F_1T e CMC) e a banda de estiramento N-H do CPZ; essa sobreposição leva a uma banda combinada de modos de vibração de estiramento correspondentes às ligações O-H e N-H em 3228 cm^{-1} . Os picos em 1654 e 511 cm^{-1} estão associados ao estiramento da ligação C=O dos grupos amida e ao ciclo-hexano do CPZ, respectivamente. Por outro lado, os picos associados ao CPZ (1635 , 2929 , 2854 e 1440 cm^{-1}) e os picos relacionados à CMC (1579 e 1409 cm^{-1}) não estão presentes no espectro F_1T -CPZ-CMC; isso indica a interação entre o CPZ e o hidrogel de CMC ao longo da fibra de algodão.

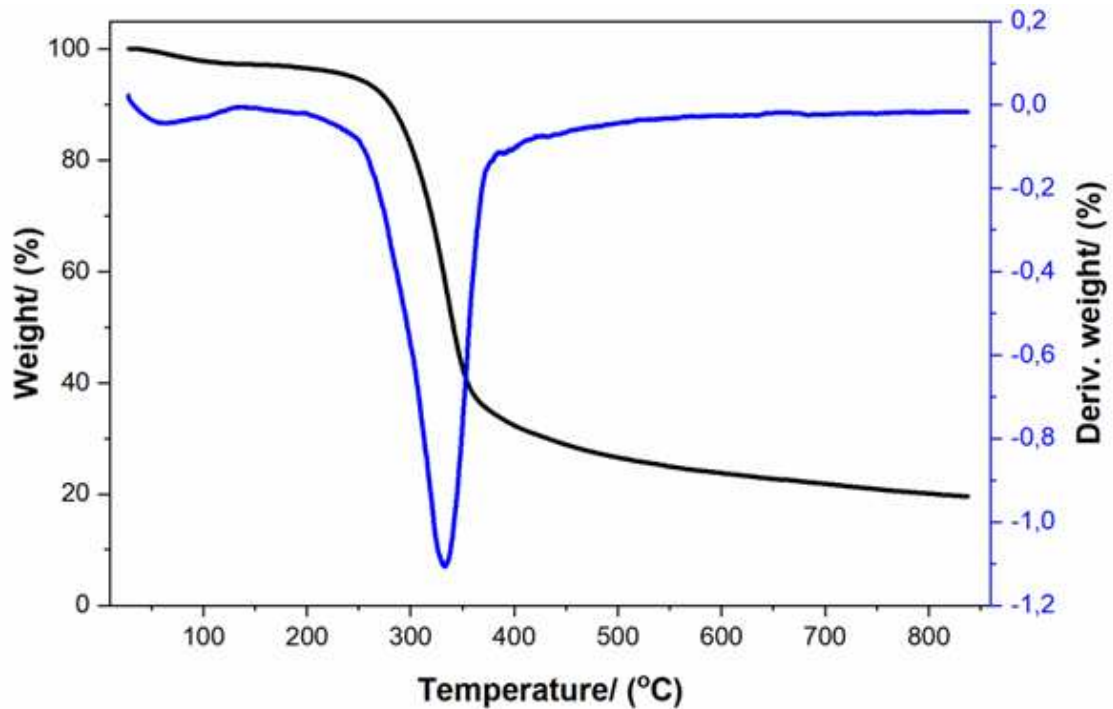
Após a aplicação de cobre sobre a F_1T -CPZ-CMC, observou-se um deslocamento na banda de absorção de 3228 para 3253 cm^{-1} ; esse resultado aponta para o envolvimento de átomos de nitrogênio na complexação do metal. Além disso, foram encontradas novas bandas de absorção em 1592 e 1409 cm^{-1} . O aparecimento dessas novas bandas aponta para uma possível reorganização molecular na ROI; essencialmente, isso mostra que os grupos funcionais do CPZ, que haviam sido anteriormente integrados ao filme de CMC, estavam agora envolvidos na complexação do cobre. Outra explicação plausível é que os modos de estiramento de C=O foram deslocados para um número de onda menor (de 1654 cm^{-1} para 1592 cm^{-1}) devido à diminuição da densidade eletrônica dos átomos ligados a C-O-N-N, causada pelo íon metálico [82].

Com base nesses resultados, pode-se concluir que o sensor colorimétrico desenvolvido foi funcionalizado e que houve um movimento coordenado entre cobre e CPZ por meio dos nitrogênios amida do CPZ no μ TAD.

A estabilidade térmica do μ TAD desenvolvido foi avaliada usando curvas de termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG) (**Figura 14**), onde as curvas mostraram uma decomposição em dois passos distintos. O primeiro passo ocorre abaixo de 130°C , com perda de massa de 3% devido à evaporação de moléculas de água livre e porções ligadas por ligações de hidrogênio. O segundo passo ocorre em níveis de temperatura entre 250°C e 382°C , com uma perda significativa de massa a $333,6^\circ\text{C}$, correspondente à decomposição do material orgânico dos substratos que

constituem o μ TAD, seguida pela geração de CO_2 e CO [138], representando aproximadamente 65% da perda total de massa.

Figura 14 - Curvas TG e DTG relacionadas à decomposição térmica do μ TAD proposto. Condições aplicadas: 0,1 μL de CPZ ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), 15 μL de CMC (1%), e 5 μL de solução tampão com pH 8



Fonte: Autoria própria

3.5 Parâmetros analíticos

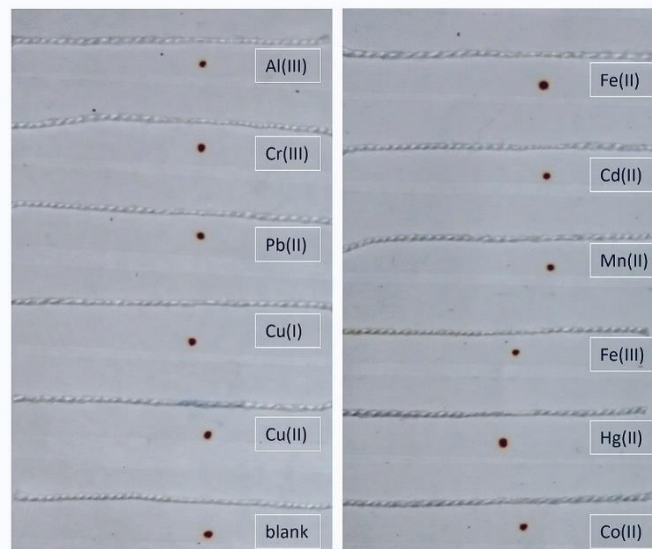
Uma vez que o μ TAD proposto foi otimizado, parâmetros analíticos como faixa linear, sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão, exatidão e seletividade foram avaliados.

3.5.1 Análise da seletividade e interferência

O desempenho do μ TAD foi avaliado em sistemas contendo espécies potenciais interferentes que podem estar presentes em amostras de água e bebidas alcoólicas. A seletividade do μ TAD foi avaliada, com o sensor exposto individualmente a cada íon, incluindo o íon alvo. Isso permitiu uma análise da resposta do sensor para cada íon em condições isoladas. O estudo da seletividade do método (**Figura 15**) demonstrou a especificidade da resposta do sensor aos íons cúpricos, pois confirmou

que a cor do sensor permaneceu inalterada na presença de todos os íons avaliados, exceto para o íon cúprico.

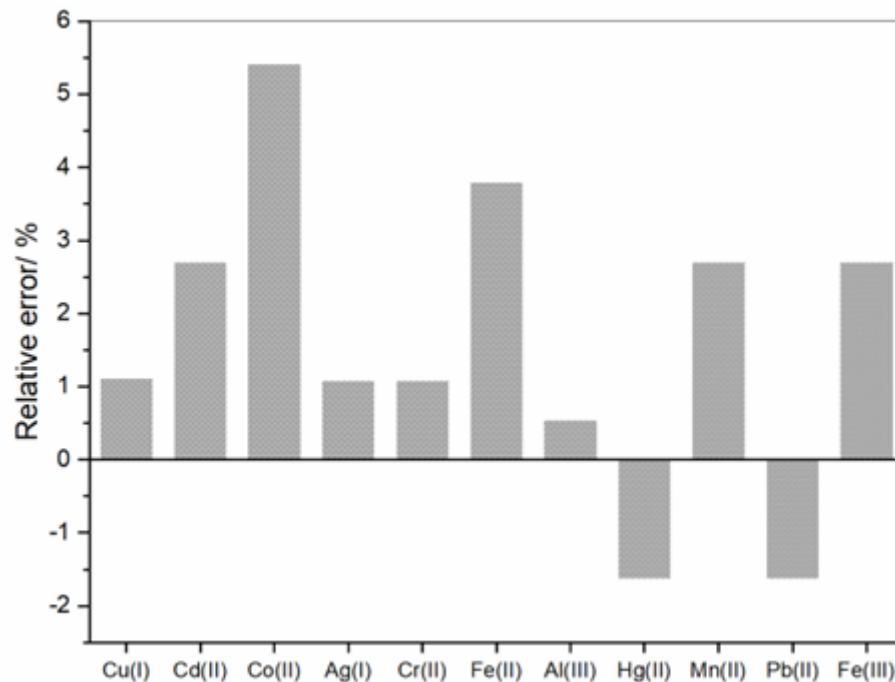
Figura 15 - Avaliação da seletividade do sistema sensor para análise de íons metálicos. Condições experimentais: 0,1 μL de CPZ (2,0 g L⁻¹), 15 μL de CMC (1%), 5 μL de solução tampão com pH 8, 20 μL de solução de íons metálicos (5,0 mg L⁻¹) e tempo = 10 min



Fonte: Autoria própria

Além disso, para avaliar se esses íons poderiam causar interferência no sinal analítico, o sensor desenvolvido foi exposto a soluções padrão contendo íons cúpricos juntamente com íons potencialmente interferentes. Para conduzir essa análise, a concentração de íons cúpricos e espécies interferentes (ambos a 5 mg L⁻¹) foi mantida constante na solução utilizada. Conforme mostrado na **Figura 16**, a presença de outros íons de metais em solução proporcionou um erro relativo inferior a 6%. Esse resultado é aceitável dentro das normas estabelecidas pela Associação de comunidades analíticas, (AOAC Internacional) [139].

Figura 16 - Erro relativo percentual obtido para o sinal analítico utilizando o método proposto para detecção de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de íons cúpricos na presença de íons metálicos potencialmente interferentes em uma proporção de 1:1. Condições aplicadas: $0,1 \text{ } \mu\text{L}$ de CPZ ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), $15 \text{ } \mu\text{L}$ de CMC (1%), $5 \text{ } \mu\text{L}$ de solução tampão com pH 8, $20 \text{ } \mu\text{L}$ de amostra, 10 min



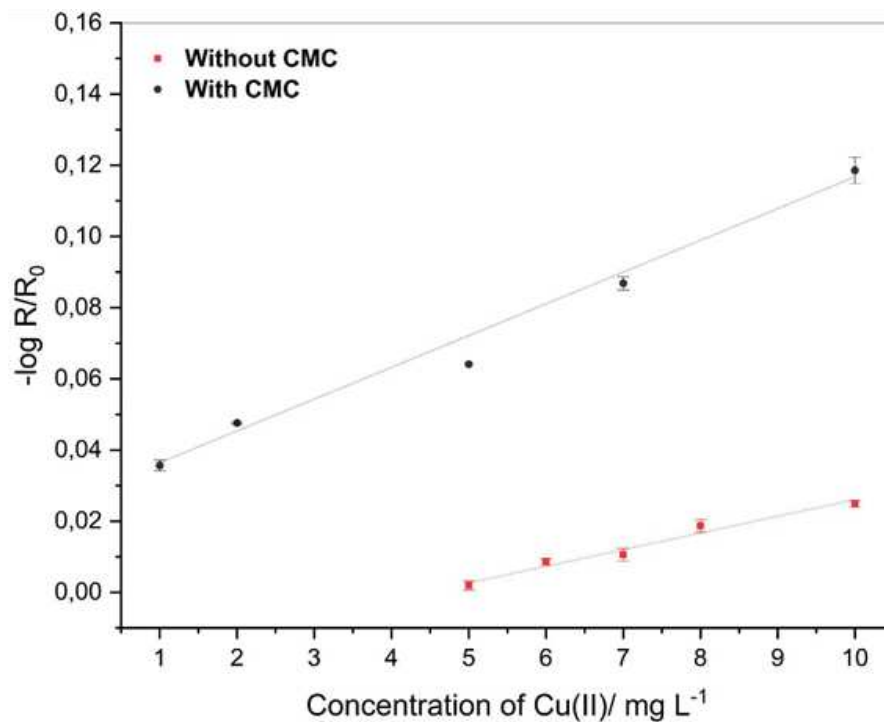
Fonte: Autoria própria

3.5.2 Sensibilidade e linearidade de resposta: Sem pré-concentração versus com pré-concentração

A pré-concentração do analito é uma estratégia atraente, a fim de melhorar o limite de detecção do método, proporcionando uma detecção mais sensível [140]. Por isso, o desempenho do sensor desenvolvido para determinação de íons cúpricos foi investigado com e sem a adição da carboximetilcelulose para uma etapa de pré-concentração no μTAD . As curvas analíticas obtidas para esse estudo estão na **Figura 17** e indicam a relação linear entre $-\log R/R_0$ e a concentração de íons cúpricos (mg L^{-1}).

A equação obtida para o μTAD na presença de pré-concentração (com CMC) foi $-\log R/R_0 = 0,0084 (\pm 0,0005) [\text{Cu(II)}] + 0,0306 (\pm 0,001)$, com coeficiente de determinação ajustado (R^2) de 0,987. Para o μTAD na ausência de pré-concentração (sem CMC), a equação obtida foi $-\log R/R_0 = 0,0043 (\pm 0,0003) [\text{Cu(II)}] + 0,018 (\pm 0,002)$, com $R^2 = 0,977$.

Figura 17 - Curvas analíticas para a determinação de íons cúpricos em amostras de água com base na aplicação do μ TAD proposto com e sem pré-concentração ($n=3$). Condições aplicadas: 0,1 μ L de CPZ ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), 15 μ L de CMC (1%), 5 μ L de solução tampão com pH 8, e 20 μ L de solução de íons cúpricos



Fonte: Autoria própria

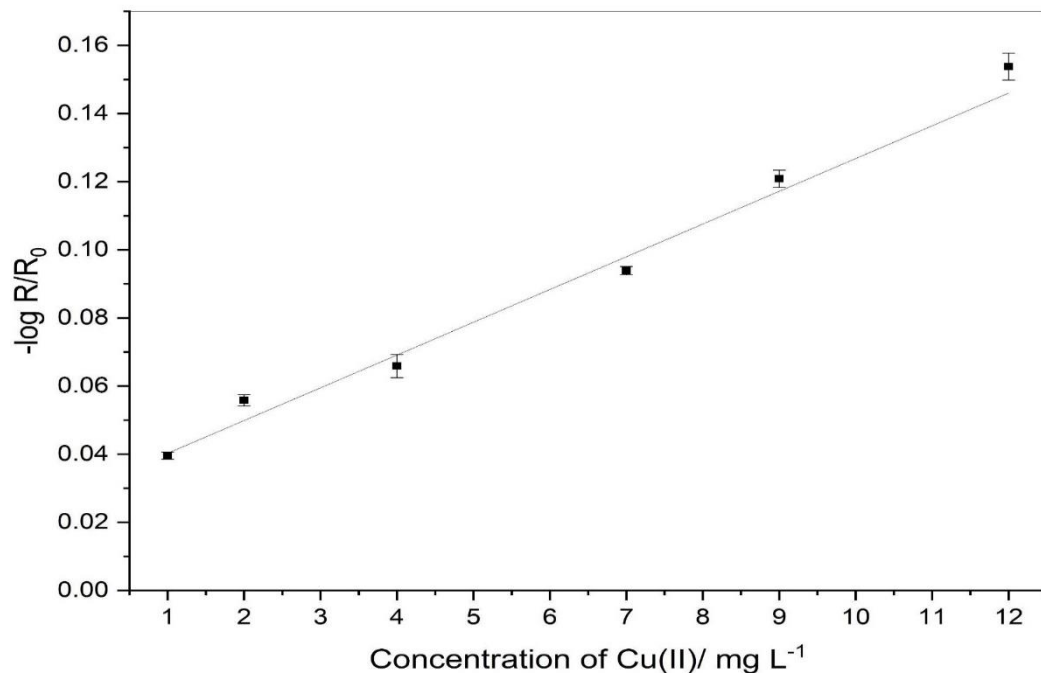
Visivelmente, a adição de CMC ao sensor proporcionou uma melhora no r^2 , além de um aumento expressivo na sensibilidade do dispositivo quando utilizado o CMC. A melhoria considerável observada na sensibilidade do sensor proposto é atribuída à interação entre CPZ-Cu e CMC na ROI, que promove a imobilização do agente quelante na ROI, aumentando a intensidade e homogeneidade da cor azul no fio de algodão obtida para a mesma concentração de íons cúpricos. No caso do μ TAD sem CMC, o complexo de coloração azul sofre dispersão ao longo do fio de algodão e na zona da amostra; isso promove uma menor intensidade da cor azul no μ TAD.

Além disso, a aplicação do procedimento de pré-concentração (μ TAD com CMC) permitiu obter uma curva analítica com uma faixa de concentração mais ampla ($1\text{-}10 \text{ mg L}^{-1}$).

Para a quantificação de íons cúpricos na bebida alcoólica (cachaça), uma curva analítica foi construída utilizando soluções padrão de íons cúpricos preparadas em solução alcoólica a 40% (v/v) (etanol:água) - veja a **Figura 18**. A equação obtida para o μ TAD com pré-concentração para solução alcoólica foi $-\log R/R_0 = 0,0096 (\pm 0,0006) [\text{Cu(II)}] + 0,0307 (\pm 0,003)$, com $R^2 = 0,986$. Os parâmetros obtidos para o

ajuste linear dessa curva analítica são comparáveis aos adquiridos quando utilizado a matriz água.

Figura 18 - Curva analítica para a determinação de íons cúpricos em bebida alcoólica (cachaça) com base na aplicação do μ TAD proposto com pré-concentração (n=3). Condições aplicadas: 0,1 μ L de CPZ (2,0 g L⁻¹), 15 μ L de CMC (1%), 5 μ L de solução tampão com pH 8, 20 μ L de solução de íons cúpricos, e tempo = 10 min



Fonte: Autoria própria

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do μ TAD com pré-concentração foram calculados de acordo com a curva analítica obtida em água (1 – 10 mg L⁻¹) e na matriz alcoólica (1 – 12 mg L⁻¹).

Para a determinação de cobre (II) em água, os LD e LQ obtidos foram 0,23 mg L⁻¹ e 0,78 mg L⁻¹, respectivamente. Para a matriz alcoólica, os LD e LQ obtidos foram 0,21 mg L⁻¹ e 0,69 mg L⁻¹, respectivamente. Esses valores podem ser comparados aos limites máximos de cobre, estabelecidos pelas legislações nacionais e internacionais para amostras de água e cachaça (**Tabela 1**). Indicando que o método proposto é adequado para determinação de cobre (II) nessas matrizes.

3.5.3 Precisão

A precisão do método proposto foi avaliada por meio da aplicação de ensaios de repetibilidade, nos quais foram realizadas nove determinações consecutivas usando uma solução contendo íons cúpricos ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$). Os valores de desvio padrão relativo obtidos para as amostras de água e de bebida alcoólica foram de 4,56% e 5,49%, respectivamente, esse resultado demonstram a concordância entre os sinais analíticos obtidos, podendo inferir que o método proposto possui precisão adequada.

3.5.4 Recuperação

A exatidão do método proposto foi avaliada por meio de testes de recuperação em três diferentes amostras de água e três amostras de cachaça enriquecidas com íons cúpricos em três níveis de concentração. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, como mostrado na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Resultados obtidos dos experimentos de recuperação conduzidos usando amostras de água e amostras de cachaça, ambas enriquecidas com íons cúpricos, com base na aplicação do sensor colorimétrico baseado em imagens digitais proposto (μ TAD + DIB) ($n = 3$).

Amostra	Adicionado^a	Recuperado^a	Recuperação/ %
Água Torneira	1,00	1,07 \pm 0,13	107
	2,00	1,94 \pm 0,08	96,5
	4,00	4,09 \pm 0,13	102
Água Mineral	1,00	0,97 \pm 0,19	97,5
	2,00	1,97 \pm 0,02	98,5
	4,00	3,40 \pm 0,14	84,9
Água Lagoa	1,00	0,88 \pm 0,31	88,1
	2,00	1,83 \pm 0,03	91,5
	4,00	3,80 \pm 0,53	95,0
Cachaça 1	2,00	2,06 \pm 0,19	103
	5,00	4,58 \pm 0,48	91,7
	7,00	6,81 \pm 0,29	97,3
Cachaça 2	2,00	2,09 \pm 0,32	105
	5,00	4,69 \pm 0,21	93,8
	7,00	6,79 \pm 0,14	97,0
Cachaça 3	2,00	2,10 \pm 0,19	105
	5,00	4,42 \pm 0,34	88,5
	7,00	6,88 \pm 0,37	98,2

^a mg L⁻¹

Fonte: Autoria própria

Utilizando o μ TAD proposto, foram alcançados percentuais de recuperação satisfatórios para todas as amostras avaliadas. Os percentuais de recuperação obtidos para as amostras de água e as amostras de cachaça estiveram na faixa de 84,9% - 107% (água) e 88,5% - 105% (cachaça), respectivamente. O método apresentou uma recuperação dentro do limite aceitável para garantia de qualidade analítica (entre 80 a 110%) [139,141].

Este resultado demonstra que não há interferência da matriz de amostra na determinação dos íons cúpricos e comprova sua eficiência como plataforma confiável, até mesmo em amostras complexas, como água, cachaça ou similares.

3.6 Análise comparativa do método proposto e do método de referência

Para avaliar a aplicabilidade do dispositivo proposto, amostras de água de torneira, água mineral e água de lagoa, enriquecidas com 2 mg L^{-1} de íons cúpricos, e em três amostras diferentes de cachaça, foram analisados. Os resultados obtidos foram comparados com os do FAAS, que foi usado como método de referência. A **Tabela 4** apresenta uma análise comparativa dos dois métodos.

Tabela 4 - Análise comparativa da determinação de cobre utilizando μ TAD como sensor colorimétrico (μ TAD + DIB) e o método de referência em amostras de cachaça comercial e água

Amostra ^a	Adicionado ^b	Método ^b		E / %
		FAAS	μ TAD	
Água de torneira	2,00	2,05 \pm 0,04	1,94 \pm 0,08	5,3
Água mineral	2,00	2,08 \pm 0,01	1,97 \pm 0,02	5,1
Água de lagoa	2,00	1,96 \pm 0,02	1,83 \pm 0,03	6,5
Cachaça 1	-	3,93 \pm 0,02	4,09 \pm 0,06	4,2
Cachaça 2	-	4,23 \pm 0,04	4,39 \pm 0,05	3,8
Cachaça 3	-	5,05 \pm 0,02	4,98 \pm 0,08	1,5

^a n = 3; ^b em mg L^{-1} ; E: | Erro relativo |

Fonte: Autoria própria

Os erros relativos obtidos nesta análise foram inferiores a 6,5%. O teste t de Student pareado realizado com um nível de confiança de 95% também mostrou que os resultados obtidos a partir da aplicação do método proposto estão em boa concordância com os do método de FAAS (utilizado como método de referência) (t calculado = 0,480; p = 0,637; t crítico = 2,57); esse resultado ainda indica a aplicabilidade e confiabilidade do método proposto neste estudo para a detecção de íons cúpricos em amostras reais.

3.7 Avaliação do custo relacionado à fabricação do μ TAD

Como o objetivo principal desse trabalho é desenvolver um dispositivo para determinação de íons cúpricos que seja eficiente, seletivo e acessível, mesmo para usuários de regiões onde não há tanto recurso financeiro, após a fabricação e a avaliação da viabilidade de uso, foi feito um levantamento do valor necessário para a construção do μ TAD. Na **Tabela 5** estão listados os materiais utilizados e seus respectivos custos.

Tabela 5 - Custo dos materiais para fabricação da plataforma sensor

Material	Custo estimado/	Custo de fabricação por μ TAD/
	R\$	Centavos de R\$
Fio 100% algodão (65 m)	5,00	0,05
CMC (250 g)	158,00	1,90
Fita dupla face (10 m)	4,00	2,40
Papel sulfite (500 unidades)	24,00	0,08
Custo total por μTAD		R\$ 4,43

Fonte: Autoria própria

A cotação estimada para a fabricação do dispositivo sensor à base de fio de algodão é mostrada na **Tabela 5**. Como se pode constatar, o custo associado à confecção destes μ TADs é irrisório (< 5 centavos), na ordem de alguns centavos por dispositivo, demonstrando que a sua implementação é viável, sobretudo em zonas onde os recursos são escassos.

3.8 Comparação do μ TAD proposto com outros dispositivos microfluídicos para detecção de íons cúpricos, relatados na literatura.

A determinação de íons cobre (II) utilizando o μ TAD baseado em fio de algodão e pré-concentração foi comparada com outros procedimentos, que também utilizam materiais celulósicos, recentemente relatados na literatura, conforme apresentado na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Comparação do desempenho analítico do sensor colorimétrico com detecção baseada em imagem digital (μ TAD + DIB) e outras metodologias colorimétricas aplicadas na detecção de íons cúpricos.

Substrato	Faixa linear	R ²	Detector	LD	Referência
μ PAD	2,0 – 7,22	0,9993	Câmera/celular	0,2	[71]
μ PAD	2 – 13	0,997	Câmera/celular	0,03	[107]
μ PAD	3 – 25	0,99	Scanner	1,6	[142]
μ PAD	1 – 6	0,9913	Comprimento/Régua	-	[143]
Fio de algodão	1 – 10	0,987	Câmera/celular	0,2	Este trabalho

^a em mg L⁻¹; μ PAD: dispositivo analítico em papel microfluídico; R²: coeficiente de regressão; LD: limite de detecção.

Fonte: Autoria própria

Os resultados mostram que os valores dos parâmetros, como limite de detecção, linearidade e faixa de concentração, obtidos a partir da aplicação do método proposto, foram comparáveis com aqueles dos métodos anteriormente relatados na literatura.

4 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Um sensor colorimétrico, a base de fio de algodão e pré-concentração utilizando carboximetilcelulose como barreira, foi fabricado com sucesso para detecção eficiente de íons cúpricos. A incorporação de CMC ao μ TAD proposto mostrou-se uma estratégia simples e fundamental, que proporciona a imobilização do complexo colorido formado na ROI, proporcionando um melhorar o desempenho analítico do sensor.

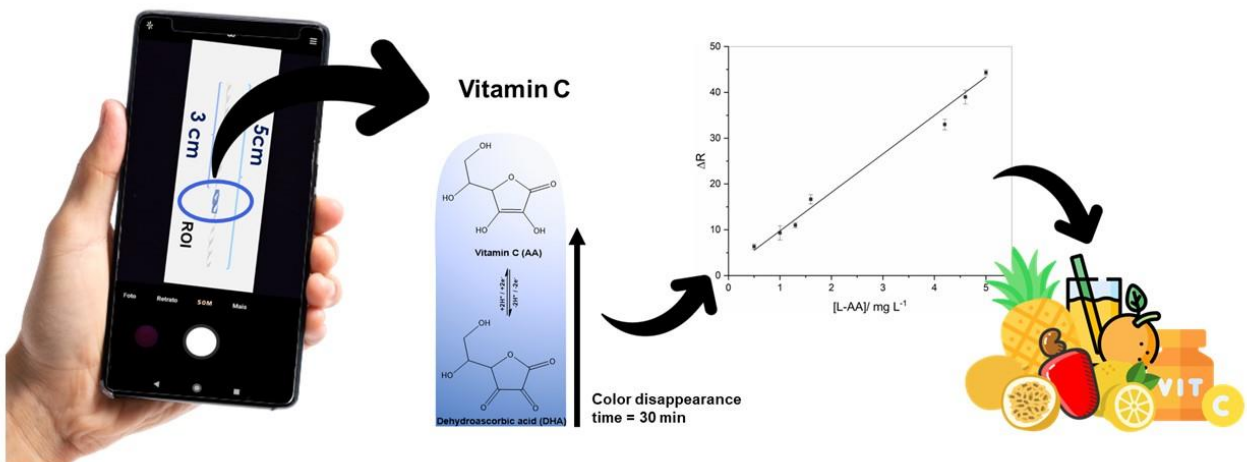
Em condições otimizadas, μ TAD proposto mostrou-se adequado para determinação de íons cúpricos em amostras de cachaça e água, proporcionando análise rápida (10 min) com baixo consumo de amostra (20 μ L), com boa precisão e exatidão, sem necessidade de instrumentos caros e sofisticados que são de alto custo de aquisição e manutenção.

Além disso, uma análise comparativa da determinação de íons cúpricos empregando o μ TAD com pré-concentração e o método FAAS, como método de referência, não mostrou diferença significativa entre os dois métodos.

Esses resultados apontam o uso bem-sucedido de um μ TAD na determinação de íons cúpricos, que proporciona resultados confiáveis, com baixo custo de produção e análise, baixa geração de resíduo e alta portabilidade, adequado para análises *in-situ*.

CAPÍTULO 3:

Sensor colorimétrico baseado em fio de algodão para quantificação de L-AA através da redução do azul da Prússia ao branco da Prússia com detecção por imagens digitais.



1 INTRODUÇÃO

A vitamina C, que ocorre principalmente como ácido L-ascórbico (L-AA) [144], desempenha um papel essencial na saúde humana, fortalecendo o sistema imunológico e agindo como antioxidante e anti-inflamatório [145]. Sendo crucial na prevenção do escorbuto [146], no alívio aos sintomas de COVID-19 [145], resfriados e pneumonias [147] e na prevenção de problemas cardiovasculares [148], doença de Parkinson e câncer [149]. Além disso, o L-AA é um importante aditivo antioxidante amplamente usado na indústria alimentícia a fim de prolongar a vida útil dos alimentos [150]. Devido à incapacidade do organismo humano em sintetizar essa vitamina [146,151], a ingestão diária de fontes naturais ricas em vitamina C, como frutas e vegetais [144,149,151] ou de suplementos dietéticos é essencial. Tais aspectos ressaltam a necessidade de monitorar regularmente os níveis de L-AA para garantir o controle de qualidade e promover escolhas alimentares saudáveis.

Até hoje, diversas metodologias têm sido empregadas na determinação de L-AA, abrangendo técnicas analíticas como cromatografia líquida de alta eficiência [152] acoplada à espectrometria de massas [153,154] ou com detector ultravioleta-visível (UV-Vis) [155], eletroquímica [156,157] e titulação [158]. No entanto, o emprego de sensores colorimétricos baseados em imagem digital (DIB) acoplados a smartphones tem se destacado na detecção de analitos, devido à sua facilidade de produção, manuseio, portabilidade e rapidez, apresentando uma alternativa eficaz em relação aos demais métodos analíticos [159,160]. Além disso, o contínuo avanço tecnológico de câmeras digitais e smartphones, juntamente com sua redução de custo, tem impulsionado, cada vez mais, seu uso como detectores na química analítica [161].

Santos e colaboradores propuseram uma abordagem econômica, ecológica e portátil, baseada em análise de imagem digital utilizando um smartphone como detector para a quantificação de L-AA em frutas nativas e exóticas da Amazônia brasileira. Este estudo se destaca por ser o pioneiro na investigação da quantidade de vitamina C em frutas como Bacuri, Murici. O método em questão utiliza apenas 600 microlitros de amostra por análise e se mostrou altamente adequado e eficiente, com limite de detecção de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ e porcentagem de recuperação variando de 87,1 - 116% [162].

O emprego do método baseado em imagem digital (DIB) para propósitos analíticos é notavelmente simples: imagens ou vídeos são capturadas, armazenadas e decompostas em softwares apropriados para gerenciar cores primárias. Subsequentemente, os dados são processados por algoritmos matemáticos, os quais se fundamentam em sistemas de cores, tais como o RGB (Red, Green, Blue) [162] e HSV (Hue, Saturation, Value). Essa abordagem permite a especificação uniformizada das cores, proporcionando uma metodologia adequada para análise e interpretação de dados analíticos [12].

A utilização de DIB em conjunto com microdispositivos construídos a partir de fibras de algodão tem se tornado cada vez mais relatada na literatura. As longas fibras de algodão dispostas em uma configuração helicoidal compõem o fio multifilamentar, o qual demonstra a habilidade de conduzir líquidos nos canais capilares formados entre as fibras, eliminando a necessidade de bombas externas [12,28,161]. Tornando o método ainda mais acessível.

Dessa forma, neste capítulo é descrito um μ TAD de baixo custo produzido a partir de fio de algodão dopados com Azul da Prússia, para detecção colorimétrica baseada na diminuição da coloração Azul da Prússia, causado pela presença de ácido ascórbico em amostra, para uma detecção eficiente desse analito. O método foi aplicado para a determinação de L-AA em sucos fresco de frutas, polpas de frutas comerciais e formulações farmacêuticas.

2 2 MATERIAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e preparo de soluções:

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada com uma resistividade superior a 18,0 MΩ cm a 20° C (Millipore Milli-Q, EUA). As massas foram medidas com precisão de ± 0,1 mg, utilizando uma balança analítica UniBloc, modelo AUX320, Shimadzu.

Para a solução padrão de íons férricos, foram adicionados 0,1000 g de nitrato de ferro (III) nonohidratado da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ) e 1 mL de HNO₃ concentrado da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) a um balão volumétrico de 25 mL, o volume foi completado com água deionizada. Um volume de 800 µL desta solução foi pipetado em um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado.

Para preparo da solução de hexacianoferrato de potássio K₃[Fe(CN)₆] com concentração de 0,001 mol L⁻¹, 0,0082 g de K₃[Fe(CN)₆] para preparação um volume de 25 mL, utilizando água deionizada.

Na preparação da solução padrão de ácido ascórbico, para evitar a rápida decomposição do L-AA, está foi preparada em ácido metafosfórico a 10% [163]. Para isso, utilizou-se uma massa de 0,0250 g de ácido L (+) ascórbico (L-AA), da Isofar (Duque de Caxias, RJ), para o preparo de 25 mL de solução.

Como método de referência, foi utilizada a titulação iodométrica. Nesse procedimento, as amostras reais foram tituladas com uma solução de iodato de potássio (KIO₃ - Dinâmica, São Paulo, SP, Brasil) de concentração 0,01 mol L⁻¹ em meio ácido (10 mL de ácido sulfúrico a 20%) e com excesso de iodeto (1 mL de KI (10% m/v)) utilizando amido como indicador (1 mL de solução de amido 1% m/v). As amostras foram tituladas até coloração azul.

As amostras de frutas frescas, polpa de frutas e suplemento vitamínico do tipo comprimido efervescente foram adquiridas no comércio local da cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

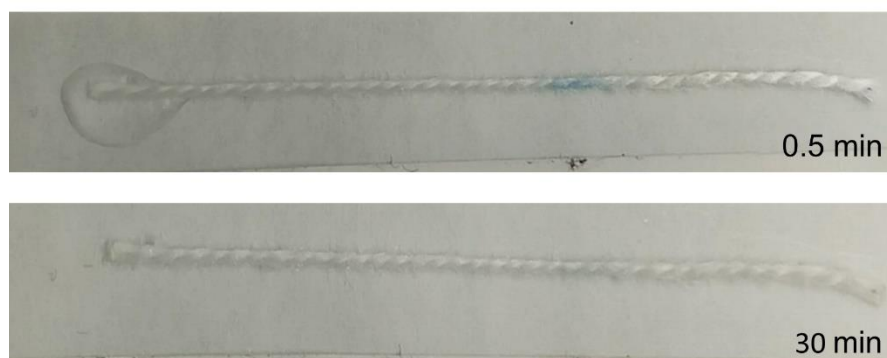
2.2 Confeção do µTAD funcionalizado com azul da Prússia

A produção do µTAD foi feita seguindo metodologia anterior com algumas modificações [12,164]. Resumidamente, fios de algodão 100% foram submetidos a

uma lavagem em solução salina de carbonato de sódio 10 g L^{-1} , fervido por 30 minutos, para eliminação de possíveis contaminantes. Após a lavagem, os fios foram secos à temperatura ambiente e cortados em segmentos de 5 centímetros. Cada segmento foi fixado em fitas adesivas de dupla face da marca Adelbras $12 \text{ mm} \times 10 \text{ m}$ (fita dupla face de papel branco 410), já previamente coladas a uma folha branca.

Abaixo de cada segmento de fio, uma marcação foi feita a 3 cm da extremidade esquerda para demarcar região de interesse (ROI). Na ROI, foi pipetada solução de $[[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3]$, e, após secagem, solução de íons férricos foi pipetada em cima. Após tal procedimento, uma cor azul, denominada Azul da Prússia, pode ser observada. Após secagem, o sensor está pronto para receber a amostra contendo ácido ascórbico, que deve ser pipetada à extremidade esquerda do fio. A **Figura 19** apresenta uma fotografia do sensor utilizado para a detecção de 5 mg L^{-1} , mostrando o estado da ROI no tempo 0,5 e 30 minutos, evidenciando o descoloramento da região de interesse.

Figura 19 - Fotografia do sensor desenvolvido para detecção de L-AA no tempo de 0 e 30 min. Condições: Fibra de algodão modificada com $0,7 \mu\text{L}$ de $\text{k}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), $0,6 \mu\text{L}$ de $\text{Fe}(\text{III})$ ($0,8 \text{ mmol L}^{-1}$).



2.3 Quantificação de L-AA empregando o desenvolvido a partir de DIB, capturadas com smartphone

O L-AA desencadeia seletivamente uma reação redox, fazendo com que o Azul da Prússia (AP) se reduza a Branco da Prússia (BP), resultando em uma mudança significativa da coloração. O ácido ascórbico sofre oxidação formando o ácido desidroascórbico. Dessa forma, à medida que a quantidade de L-AA aumenta,

o desbotamento da amostra também aumenta, garantindo assim que a detecção colorimétrica de L-AA seja alcançada através do desbotamento da cor azul.

A quantificação de L-AA no sensor desenvolvido foi realizada utilizando um *Smartphone* para captura de imagens digitais. Para proporcionar iluminação adequada, foi utilizado uma câmara com iluminação LED. As imagens capturadas foram processadas utilizando o sistema de cores RGB no programa *ImageJ*. O sinal médio da zona colorida foi obtido selecionando uma linha reta com área de 53 pixels.

2.4 Otimização das condições para confecção do μ TAD

Um design de experimentos envolvendo um planejamento fatorial completo do tipo 2^3 e delineamento do composto central (DCC) foi utilizado a fim de atingir a condição ótima para produção do μ TAD para quantificação de L-AA. Os fatores investigados foram: volume de $K_3[Fe(CN)_6]$ e volume de Fe(III), adicionados ao sensor, assim como o volume de amostra de L-AA empregado para análise no μ TAD.

Na **Tabela 7** estão indicados os níveis descodificados das variáveis independentes, juntamente com a matriz do planejamento fatorial gerada pelo *software Statistics® 7*. Optou-se por adotar o valor da variação no canal vermelho (ΔR) como sinal de resposta, considerando sua maior sensibilidade ao L-AA. As condições ideais para a obtenção do μ TAD mais sensível para a detecção de L-AA foram determinadas a partir dos resultados obtidos.

Tabela 7 - Níveis descodificados das variáveis de análise e matriz para o planejamento fatorial completo 2^3 e o delineamento do composto central para otimização dos parâmetros utilizados para confecção do μ TAD para detecção de L-AA

Variáveis	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
Volume de Hexacianoferrato ^a	0,3	0,6	0,9
Volume de Fe(III) ^a	0,3	0,6	0,9
Volume de amostra ^b	15	28	40

Corrida	Fatores descodificado		
	Hexacianoferrato ^a	Amostra ^b	Fe(III) ^a
12	0,6	49	0,6
14	0,6	28	1,1
5	0,9	15	0,3
6	0,9	15	0,9
2	0,3	15	0,9
7	0,9	40	0,3
11	0,6	07	0,6
15 (C)	0,6	28	0,6
13	0,6	28	0,1
10	1,1	28	0,6
3	0,3	40	0,3
9	0,1	28	0,6
8	0,9	40	0,9
4	0,3	40	0,9
16 (C)	0,6	28	0,6
1	0,3	15	0,3

^a em μ L; ^b em mL; (C) ponto central

Fonte: Autoria própria

2.5 Otimização univariada: Tempo de reação

Após estabelecer as condições ótimas dos parâmetros mencionados na **Tabela 7**. O tempo ideal para a captura da imagem do sensor foi investigado. Para tanto, foi feito o monitoramento do sinal analítico para uma solução padrão de L-AA com concentração de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$, em um período de 35 minutos.

2.6 Caracterização do sensor

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR) foi realizada em um espectrômetro SHIMADZU IRSpirit QATR-S, na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

A estabilidade térmica do μTAD foi avaliada entre as temperaturas de 30 e 900°C utilizando um analisador termogravimétrico PerkinElmer STA 6000, com uma taxa de aquecimento de 10°C min^{-1} em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} .

2.7 Recuperação

Foi realizada análise de recuperação utilizando o μTAD para quantificar L-AA. Para tanto, amostras de polpas comerciais de caju (*Anacardium occidentale L.*) e maracujá (*Passiflora spp.*), assim como sucos de laranja (*Citrus sinensis (L.) Osbeck*) e limão (*Citrus latifolia*) *in natura*, bem como suplemento vitamínico, foram enriquecidas com L-AA em três diferentes níveis de concentrações (0,5; 1,2 e 3,0 mg L^{-1}).

2.8 Método de comparação

Para fins de comparação do μTAD desenvolvido para análise de L-AA com um método de referência, foi empregada a titulação iodométrica. Os dados obtidos foram submetidos ao teste *t* pareado com um nível de confiança de 95%. Para esta análises, foi utilizado o software GraphPad Prisma, versão 9.0.

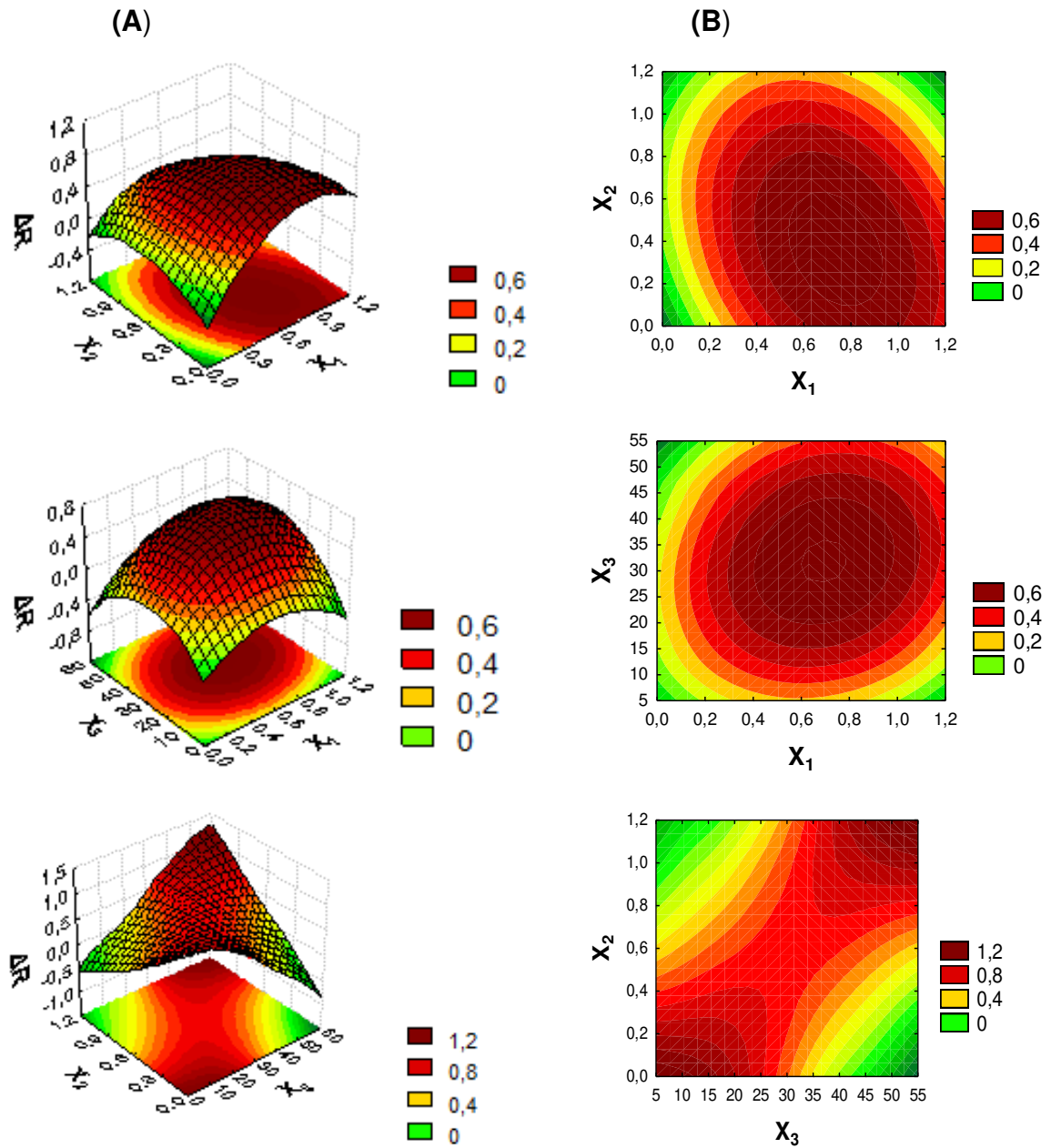
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização multivariada para confecção do μ TAD para determinação de L-AA

Um planejamento fatorial completo 2^3 e o delineamento do composto central foram empregados para atingir a condição ideal para a produção do μ TAD. A Representação gráfica tridimensional das Superfícies de Resposta e seus respectivos gráficos de contorno para ΔR são exibidos na **Figura 20**.

As condições ideais obtidas para a produção do μ TAD incluíram o emprego de 0,7 μ L de hexacianoferrato, 0,6 μ L de Fe(III), volume de amostra 33 μ L de amostra. Os resultados estatísticos, após análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% (apresentados na **Tabela 8**), destacaram que a falta de ajuste não foi significativa, com *p* - *valor* igual a 0,0656, garantindo que o modelo está bem ajustado para o planejamento proposto. Além disso, o coeficiente de regressão (R^2) de 0,874 sugere um bom ajuste ao modelo e previsão concisa dos dados.

Figura – 20 (A) Representação gráfica tridimensional das Superfícies de Resposta e seus respectivos gráficos de contorno (B) para ΔR , mostrando os efeitos combinados dos parâmetros investigados na produção do μTAD .



X_1 : Volume de Hexacianoferrato em μL ; X_2 : Volume de Fe(III) em μL ; X_3 : Volume de amostra/padrão em mL.

Fonte: Autoria própria

Tabela 8 – Tabela ANOVA obtida através do planejamento composto central para otimização das condições experimentais para construção de μ TAD para detecção de L-AA.

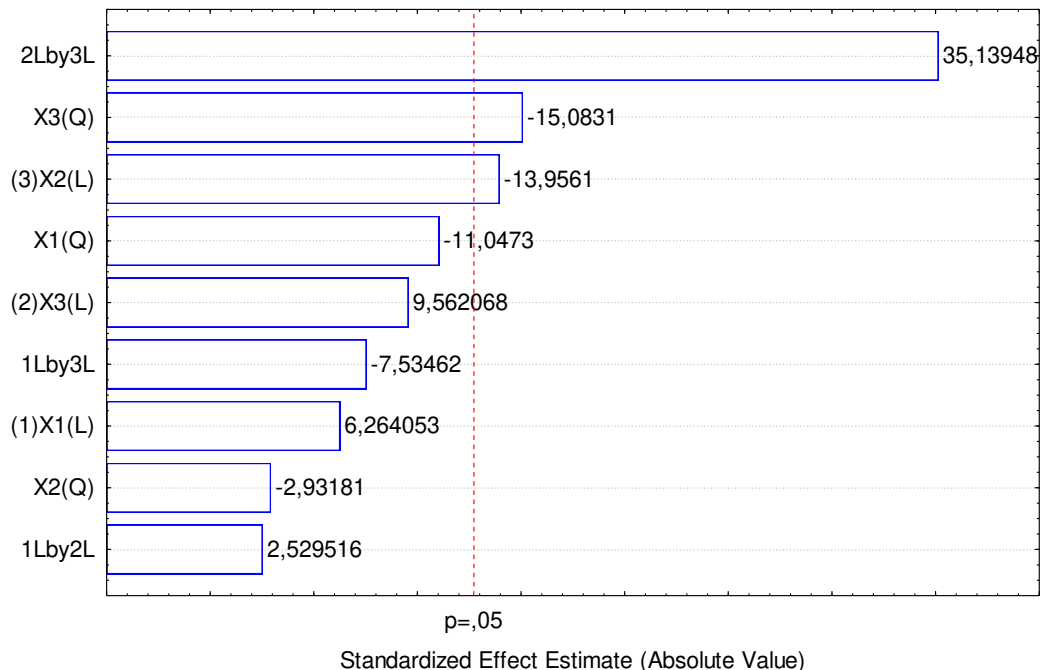
Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc} *	p-valor
Falta de ajuste	140,9960	5	28,1992	133,49	0,0656
Erro puro	0,2113	1	0,2113		
Resíduo total	538,2993	15			

* 95% de confiança; $R^2 = 0,874$

Fonte: Autoria própria

No gráfico de Pareto (**Figura 21**), que ilustra a importância dos fatores e suas consequências no processo, fica evidente que a maior influência no valor de ΔR é a interação linear entre o volume da amostra e o volume de ferro (III) (2Lby3L), em uma tendência positiva. Além disso, tanto o fator quadrático do volume de íons férricos (X3(Q)) quanto o fator linear do volume da amostra (X2(L)) exercem influência negativa significativa no sinal analítico, indicando que, até certo ponto, o valor de ΔR obtido aumenta à medida que os valores dessas variáveis diminuem.

Figura 21 - Gráfico de Pareto de efeitos principais padronizados para experimento composto central. A linha vertical vermelha no gráfico representa um nível de confiança de 95%.

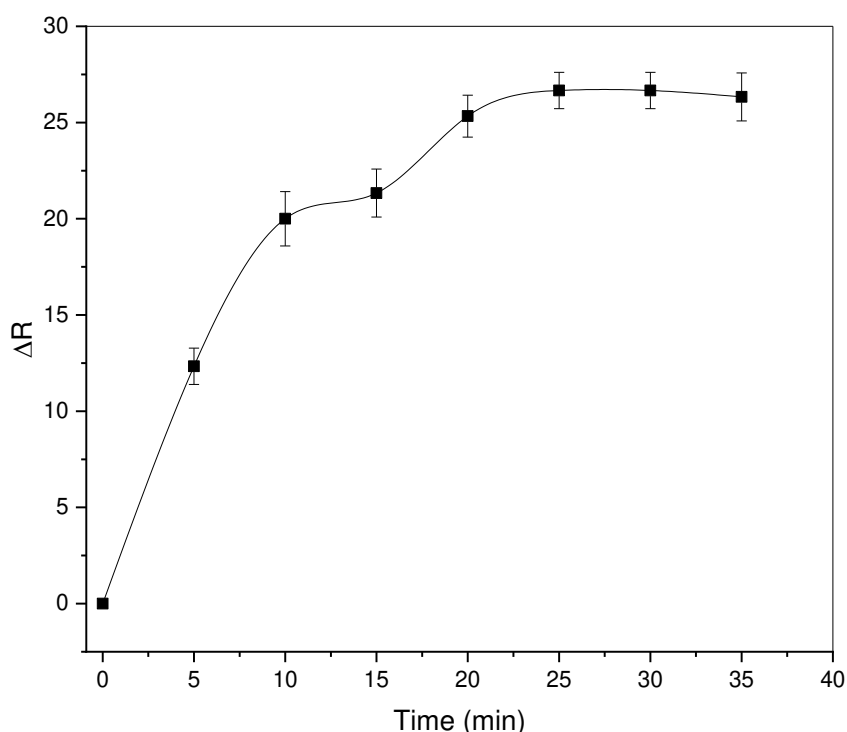


Fonte: Autoria própria

3.2 Otimização univariada: tempo de reação

Ao empregar o monitoramento do sinal analítico obtido para detecção de L-AA, conforme mostrado na **Figura 22**, observou-se que o equilíbrio de reação é atingido entre 20 e 35 minutos. Onde o sinal analítico não apresenta variações expressivas. Com base nesse resultado, o tempo para captura das imagens digitais para os ensaios seguidos foi fixado em 25 minutos.

Figura 22 - Influência do tempo de reação na detecção de L-AA (3 mg L^{-1}). Condições: Fibra de algodão modificada com $0,7 \text{ } \mu\text{L}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), $0,6 \text{ } \mu\text{L}$ de $\text{Fe}(\text{III})$ ($0,8 \text{ mmol L}^{-1}$).



Fonte: Autoria própria

3.3 Caracterização do μTAD

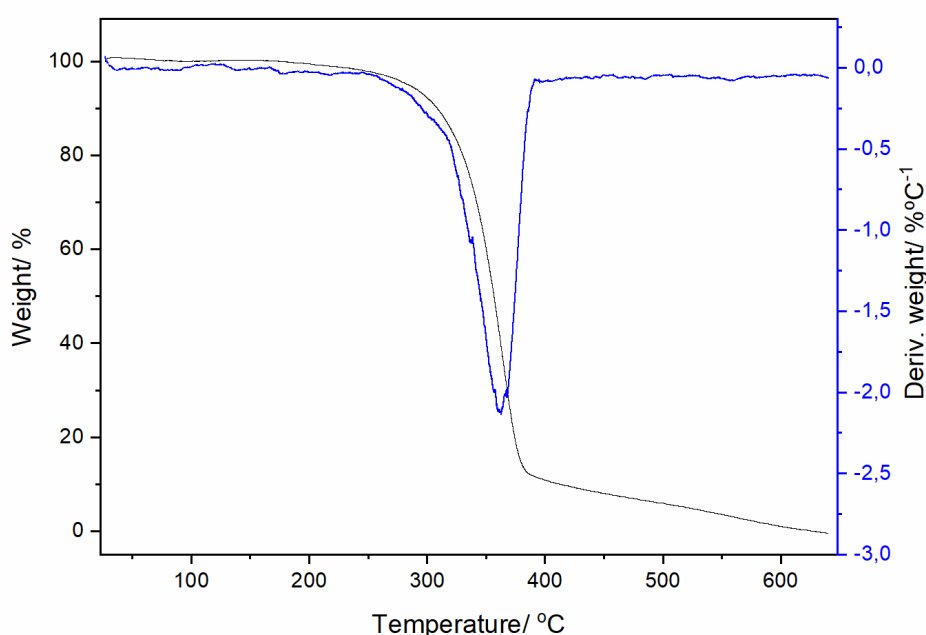
3.3.1 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica do sensor foi avaliada através das curvas TG (preto) e DTG (azul), ilustrada na **Figura 23**.

Conforme evidenciado, a análise térmica do sensor desenvolvido, conduzida sob atmosfera inerte, destaca sua notável estabilidade térmica até a temperatura de $270 \text{ } ^\circ\text{C}$. No primeiro estágio, a perda de massa de aproximadamente 5% é atribuída à

volatilização das moléculas de água adsorvidas na fibra. Em um segundo estágio (270 – 390 °C), ocorre a decomposição do material orgânico dos substratos que constituem o μ TAD, com conseqüente liberação de compostos voláteis, resultando na máxima perda de massa (83%) [138,161]. Este resultado demonstra a boa estabilidade térmica desse sensor.

Figura 23 - Curvas TG/DTG relacionadas à decomposição térmica do μ TAD proposto para detecção de ácido ascórbico. Condições: Fibra de algodão modificada com 0,7 μ L de $K_3[Fe(CN)_6]$ (1,0 mmol L⁻¹), 0,6 μ L de Fe(III) (0,8 mmol L⁻¹)



Fonte: Autoria própria

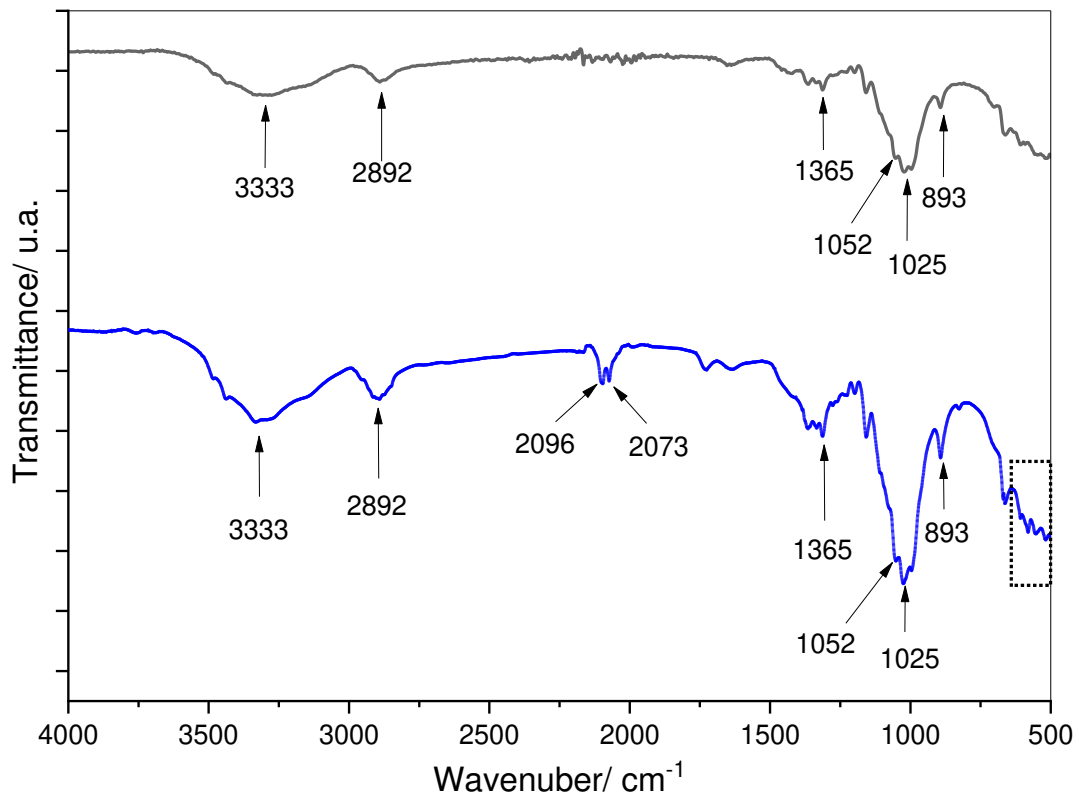
3.3.2 Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR da fibra de algodão e da fibra de algodão modificada com azul da Prússia (**Figura 24**) exibem um pico intenso a 3333 cm⁻¹ referente ao estiramento de O-H. O comprimento de onda 2892 cm⁻¹ é característico do estiramento de C-H dos materiais orgânicos, e o pico 1365 cm⁻¹ deriva dos modos de vibração de C-H de estiramento e deformação fora do plano. Dois picos intensos em 1052 e 1025 cm⁻¹ são atribuídos às vibrações de estiramentos da ligação C-O da hidroxila e —O— dos éteres, respectivamente [165]. No comprimento de onda 893 cm⁻¹ é observado um pico de média intensidade correspondente à ligação glicosídica.

Todos esses picos estão diretamente relacionados à estrutura de celulose presente nas fibras de algodão.

No espectro FTIR do μ TAD (que consiste na fibra de algodão funcionalizada com ferrocianeto férrico), são observadas alterações significativas, incluindo um pico de alta intensidade em 2073 cm^{-1} , associado ao Fe(II), e um pico em 2096 cm^{-1} , referente ao Fe(III), relacionados às frequências de vibração de alongamento $\text{C}\equiv\text{N}$ na rede $\text{Fe(II)-C}\equiv\text{N-Fe(III)}$ [166]. Além disso, na região entre, 620 e 500 cm^{-1} , mais precisamente em 611 cm^{-1} e 518 cm^{-1} , há picos característicos dos modos de vibração de flexão e de estiramento $\text{Fe - C}\equiv\text{N}$, respectivamente [167,168]. Esses resultados evidenciam a funcionalização da fibra de algodão que compõe o sensor colorimétrico.

Figura 24 - Espectros de FTIR da fibra de algodão (em preto), e da fibra de algodão modificada com azul da Prússia (em azul). Condições: Fibra de algodão modificada com $0,7\ \mu\text{L}$ de $\text{k}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ($1,0\ \text{mmol L}^{-1}$), $0,6\ \mu\text{L}$ de Fe(III) ($0,8\ \text{mmol L}^{-1}$).



Fonte: Autoria própria

3.4 Parâmetros analíticos

Após otimização do sensor colorimétrico confeccionado com fio de algodão para determinação de L-AA, o desempenho e a confiabilidade do método foram avaliados de acordo com os procedimentos de validação de metodologias analíticas descritos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) [132] e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [131]. Para isso, foram avaliadas a seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e recuperação do método proposto.

3.4.1 Interferente

Para avaliar o efeito da presença de outras substâncias potencialmente interferentes no sinal analítico obtido na determinação de L-AA, o sensor desenvolvido foi exposto a soluções padrão contendo o L-AA, juntamente com algumas substâncias que podem ser potencialmente interferentes. Para realização desta análise, a concentração de L-AA e das espécies interferentes foram empregadas de forma equivalente. O erro relativo percentual do sinal analítico envolvido nesta análise é exposto na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Erro relativo percentual obtido para o sinal analítico utilizando o método proposto para detecção de L-AA na presença de algumas substâncias potencialmente interferentes (proporção molar de 1:1).

Interferente	Erro relativo (%)
Glicose	0,95254
D-frutose	3,60169
Ácido Cítrico	1,69492
NaCl	2,54237

Fonte: Autoria própria

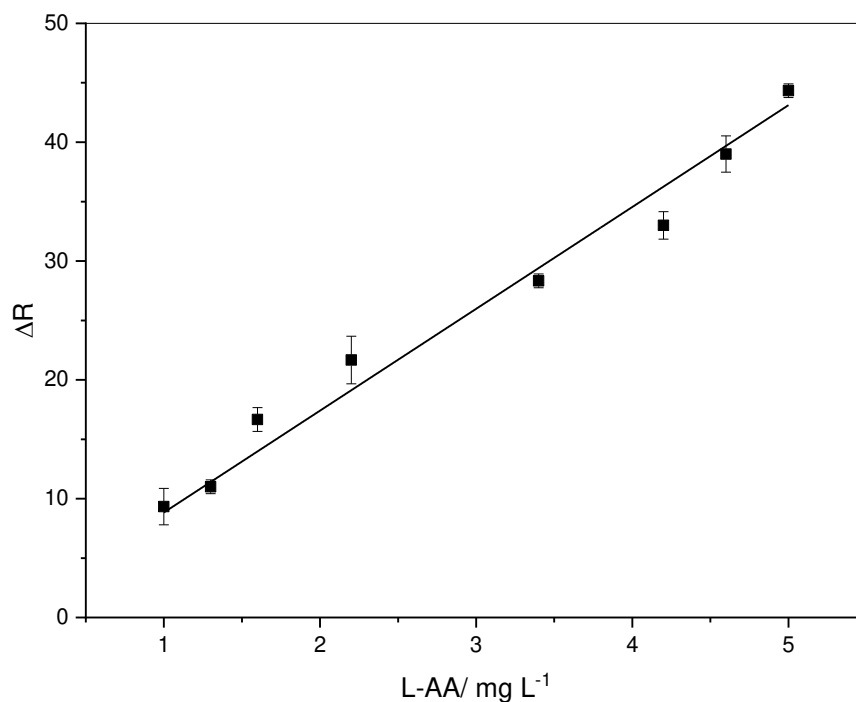
Como verificado, nos ensaios de interferência foi obtido erros relativos percentuais do sinal analítico de menos de 5%. Este resultado indica que as substâncias estudadas não podem interferir na determinação precisa de L-AA quando

empregado o método sugerido. Portanto, indicando sua adequação para a quantificação de L-AA em amostras reais complexas.

3.4.2 Linearidade

Como notado na **Figura 25**, a curva analítica do padrão externo que evidencia uma relação linear entre a variação de intensidade do canal R (ΔR) e a concentração de L-AA em mg L^{-1} . A equação matemática que descreve essa relação é $\Delta R = 8,56954 (\pm 0,1923) [\text{L-AA}] + 0,26892 (\pm 0,6638)$. Apresentando um coeficiente de determinação (R^2) de 0,993.

Figura 19. Curva de calibração obtida para o método desenvolvido para detecção de L-AA



Fonte: Autoria própria

3.4.3 O limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração de um analito que pode ser identificada, mas não necessariamente quantificada, enquanto o limite de quantificação (LQ) consiste na concentração mínima de um analito que pode ser medida como um resultado quantitativo [139]. Neste método, tais parâmetros analíticos foram calculados por meio das equações $\text{LD} = 3 \text{ DP/A}$ e $\text{LQ} = 10 \text{ DP/A}$. Onde DP é a desvio padrão da resposta analítica para a amostra em branco ($n = 15$),

e A é o coeficiente angular da curva analítica. O LD do método para determinação de L-AA foi de 0,18 mg L⁻¹, enquanto o LQ foi de 0,62 mg L⁻¹.

3.4.4 Precisão

A precisão de um método está relacionada à consistência dos resultados obtidos em experimentos independentes sob condições definidas [139]. Para avaliar a precisão do método proposto, foram realizados ensaios de repetibilidade, com onze determinações consecutivas utilizando soluções de L-AA em três níveis de concentrações diferentes: 1,0; 3,0 e 5,0 mg L⁻¹. Os desvios padrão relativos obtidos foram 6,51%; 3,51% e 3,44%, respectivamente.

3.4.5 Recuperação

A exatidão do método foi avaliada por meio de experimentos de recuperação em amostras reais, incluindo polpa de fruta, suco da fruta (*in natura*) e pastilhas de suplemento vitamínico. Na **Tabela 10** estão expressos os valores percentuais obtidos para esse ensaio.

Tabela 10 - Resultados obtidos na análise de recuperação para amostras reais enriquecidas com L-AA, obtidos através da utilização do sensor colorimétrico digital proposto (μ TAD + DIB), em triplicata

Amostra	Adicionado^a	Recuperado^a	Recuperação/%
Polpa de caju	0,5	0,44 ± 0,07	87,2
	1,2	1,19 ± 0,12	99,1
	3,0	3,09 ± 0,12	103
Polpa de maracujá	0,5	0,52 ± 0,25	103
	1,2	1,15 ± 0,18	95,8
	3,0	2,97 ± 0,12	99,1
Laranja <i>in natura</i>	0,5	0,52 ± 0,25	103
	1,2	1,31 ± 0,31	109
	3,0	2,93 ± 0,10	97,8
Limão <i>in natura</i>	0,5	0,48 ± 0,21	95,2
	1,2	1,23 ± 0,07	102
	3,0	3,09 ± 0,12	103
Vitamina C	0,5	0,52 ± 0,07	103
	1,2	1,27 ± 0,14	106
	3,0	3,05 ± 0,25	102

^a mg L⁻¹

É possível verificar que o método proposto alcançou boas taxas de recuperação para todas as amostras analisadas, com uma variação percentual de 87,2 a 109. Este resultado demonstra que a determinação de L-AA, empregando o método proposto, não é significativamente afetada pela matriz da amostra, confirmando sua adequação para tal objetivo, mesmo em amostras mais complexas.

3.5 Análise comparativa do método proposto e do método de referência

Para avaliar o desempenho analítico do dispositivo sensor proposto, seus resultados foram comparados com aqueles obtidos através da titulação, que foi utilizada como método de referência. Esta análise comparativa é apresentada na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Análise comparativa da determinação de L-AA utilizando μ TAD como sensor colorimétrico (μ TAD + DIB) e o método de referência

Amostra	Método		E %
	Titulação ^a	μ TAD+ DIB ^a	
Polpa de caju ^a	127,33 \pm 1,93	122,87 \pm 11,9	3,5
Polpa de maracujá ^a	12,75 \pm 0,77	11,89 \pm 1,82	6,7
Laranja in natura ^a	37,09 \pm 1,63	38,65 \pm 4,72	4,2
Limão in natura ^a	24,25 \pm 1,24	23,00 \pm 1,82	5,2
Suplemento ^c	0,892 \pm 0,03	0,912 \pm 0,06	2,1

^a em mg/ 100 g de polpa; ^b em mg/ 100 mL de suco; ^c em g/ comprimido. E: | Erro relativo |

Fonte: Autoria própria

Os erros relativos obtidos nesta comparação foram inferiores a 6,7 % (**Tabela 11**), validando a eficiência do procedimento sugerido para determinação de L-AA. Além disso, um teste-t pareado, ao nível de confiança de 95%, confirmou a concordância entre os resultados obtidos a partir do método de referência e do método proposto (p-valor = 0,5657), reforçando a confiabilidade da abordagem proposta neste estudo.

Os teores de L-AA encontrados na análise do comprimido de suplemento dietético de vitamina C, empregando ambas as metodologias, estão dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira (Resolução RDC ANVISA nº 360/2003), uma vez que é aceita uma tolerância de até (\pm) 20% em relação aos valores nutricionais declarados no rótulo [169].

No Brasil, conforme descrito no Anexo II da Instrução Normativa nº 37, de 1º de outubro de 2018, o MAPA [170] estabelece parâmetro para o teor de L-AA em polpas de frutas. Para a polpa de caju, não há valor máximo previsto para o conteúdo de L-AA, apenas valor mínimo de 80 mg/100g. Entretanto, para a polpa de maracujá, não há nenhum valor estipulado, nem máximo, nem mínimo. Dessa forma, como pode ser observado na **Tabela 11**, a polpa de caju analisada atende ao parâmetro de qualidade para o conteúdo de L-AA.

3.6 Comparação do método desenvolvido (μ TAD + DIB) com outros métodos para detecção de L-AA relatados na literatura

O método proposto para a determinação de L-AA utilizando o μ TAD baseado em fio de algodão e detecção por imagem digital foi comparado com outros métodos recentemente relatados na literatura. Os resultados indicam que parâmetros, como limite de detecção, linearidade e faixa de trabalho, alcançados pelo método proposto são comparáveis aos métodos anteriores, como mostra a **Tabela 12**.

Tabela 12 - Comparação entre o desempenho analítico do sensor colorimétrico com detecção por imagens digitais (μ TAD+ DIB) e outras metodologias relacionadas para detecção de L-AA.

Amostra	Faixa linear^a	R²	Método	LD^a	Referência
Frutas e formulações farmacêuticas	0,59 – 5,90	0,997	Smartphone	0,15	[162]
Frutas e vegetais	2,20 – 3,99	0,967	<i>Smartphone</i>	-	[171]
Suco de frutas	0,09 – 29,94	0,993	<i>Smartphone</i>	0,51	[172]
Frutas	176,12 – 1761,20	0,990	Câmera digital	22,02	[173]
Frutas	0,09 – 17,6	0,995	<i>Smartphone</i>	0,06	[174]
Frutas e formulações farmacêuticas	1,76 – 2,20	0,991	<i>Smartphone</i>	0,07	[175]
Suco de frutas e formulações farmacêuticas	20 – 80	0,998	<i>Smartphone</i>	5,0	[176]
Suco de frutas e formulações farmacêuticas	1 – 5	0,994	<i>Smartphone</i>	0,18	Este trabalho

^a em mg L⁻¹; R²: Coeficiente de regressão; LD: limite de detecção.

4 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo, foi descrito o desenvolvimento e a aplicação de um dispositivo microfluídico colorimétrico baseado em fibras de algodão para a detecção eficiente de L-AA através da análise de imagem digital. Nesse dispositivo, uma reação redox do Azul da Prússia (AP), que acarreta uma mudança de cor do meio reacional de azul para branco (Branco da Prússia, forma reduzida do AP), na presença de L-AA é utilizada para quantificação desse analito. O desempenho do sensor foi validado quanto à sua linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade, recuperação e precisão. Os resultados obtidos demonstram a confiabilidade do sensor proposto ao detectar com eficiência o L-AA em amostras de polpas de sucos, sucos de frutas *in natura* e suplemento vitamínico. Além disso, ao comparar a determinação de L-AA utilizando o μ TAD proposto com um método de referência, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos, com nível de confiança de 95%. Esses resultados validam esse μ TAD como uma ferramenta versátil, econômica, eficiente e adequada para uso *in-situ*.

5 CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, foi comprovado a eficiência de microdispositivos colorimétricos construídos com fibra de algodão e emprega análise de imagens digitais para quantificação de cobre e vitamina C, em amostras reais. Esta abordagem mostrou uma exatidão semelhantes aos métodos de referência, tornando essa proposta uma alternativa viável para monitoramento de compostos analíticos.

Os μ TAS's desenvolvidos são de baixo custo e operam com volumes reduzidos de amostras e reagentes (na faixa de microlitros). Além disso, esses dispositivos permitem análises em tempo hábil, proporcionando respostas analíticas precisas em questões de minutos, o que é altamente favorável em situações de emergências, onde respostas rápidas são imprescindíveis.

No entanto, este estudo não só demonstra o potencial dos microdispositivos analíticos colorimétricos baseados em fio de algodão e análise de imagens digitais, como também fornece uma base para futuras pesquisas voltadas para os mais diversos analitos, através de etapas simples de modificação químicas da superfície da fibra de algodão e adequação de parâmetros do sistema.

6 REFERÊNCIAS

- [1] H. Bi, A.C. Fernandes, S. Cardoso, P. Freitas, Interference-blind microfluidic sensor for ascorbic acid determination by UV/vis spectroscopy, *Sensors Actuators B Chem.* 224 (2016) 668–675. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.072>.
- [2] N. Bagheri, S. Cinti, V. Caratelli, R. Massoud, M. Saraji, D. Moscone, F. Arduini, A 96-well wax printed Prussian Blue paper for the visual determination of cholinesterase activity in human serum, *Biosens. Bioelectron.* 134 (2019) 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.037>.
- [3] R.F. Quero, L.P. Bressan, J.A.F. da Silva, D.P. de Jesus, A novel thread-based microfluidic device for capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Sensors Actuators B Chem.* 286 (2019) 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.168>.
- [4] G.M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature.* 442 (2006) 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- [5] L. Ge, J. Yan, X. Song, M. Yan, S. Ge, J. Yu, Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence immunodevice for multiplexed measurement of biomarkers and point-of-care testing, *Biomaterials.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.065>.
- [6] S. Chaiyo, W. Siangproh, A. Apilux, O. Chailapakul, Highly selective and sensitive paper-based colorimetric sensor using thiosulfate catalytic etching of silver nanoplates for trace determination of copper ions, *Anal. Chim. Acta.* 866 (2015) 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.042>.
- [7] Y. Guan, B. Sun, Detection and extraction of heavy metal ions using paper-based analytical devices fabricated via atom stamp printing, *Microsystems Nanoeng.* 6 (2020) 14. <https://doi.org/10.1038/s41378-019-0123-9>.
- [8] F. Li, Y. Hu, Z. Li, J. Liu, L. Guo, J. He, Three-dimensional microfluidic paper-based device for multiplexed colorimetric detection of six metal ions combined with use of a smartphone, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 6497–6508.

<https://doi.org/10.1007/s00216-019-02032-5>.

- [9] M.O. Salles, G.N. Meloni, W.R. De Araujo, T.R.L.C. Paixão, Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach, *Anal. Methods*. (2014). <https://doi.org/10.1039/c3ay41727a>.
- [10] M.L. Kovarik, P.C. Gach, D.M. Ornoff, Y. Wang, J. Balowski, L. Farrag, N.L. Allbritton, Micro Total Analysis Systems for Cell Biology and Biochemical Assays, *Anal. Chem.* 84 (2012) 516–540. <https://doi.org/10.1021/ac202611x>.
- [11] D.R. Ballerini, X. Li, W. Shen, Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics, *Microfluid. Nanofluidics*. (2012). <https://doi.org/10.1007/s10404-012-0999-2>.
- [12] W.T. Suarez, M.O.K. Franco, L.F. Capitán-Vallvey, M.M. Erenas, Chitosan-modified cotton thread for the preconcentration and colorimetric trace determination of Co(II), *Microchem. J.* 158 (2020) 105137. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105137>.
- [13] Y. Yan, B. Kou, L. Yan, Thread-based microfluidic three channel device in combination with thermal lens detection for the determination of copper and zinc, *Anal. Methods*. 7 (2015) 8757–8762. <https://doi.org/10.1039/c5ay01458a>.
- [14] J.L. Osborn, B. Lutz, E. Fu, P. Kauffman, D.Y. Stevens, P. Yager, Microfluidics without pumps: Reinventing the T-sensor and H-filter in paper networks, *Lab Chip*. (2010). <https://doi.org/10.1039/c004821f>.
- [15] D. Agustini, M.F. Bergamini, L.H. Marcolino-Junior, Low cost microfluidic device based on cotton threads for electroanalytical application, *Lab Chip*. 16 (2016) 345–352. <https://doi.org/10.1039/c5lc01348h>.
- [16] A. Gonzalez, L. Estala, M. Gaines, F.A. Gomez, Mixed thread/paper-based microfluidic chips as a platform for glucose assays, *Electrophoresis*. 37 (2016) 1685–1690. <https://doi.org/10.1002/elps.201600029>.
- [17] M. Coutinho, C. Morais, A. Neves, F. Menezes, K. Lima, Colorimetric Determination of Ascorbic Acid Based on Its Interfering Effect in the Enzymatic Analysis of Glucose: An Approach Using Smartphone Image Analysis, *J. Braz. Chem. Soc.* (2017). <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170086>.

- [18] D.R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz, *Micro Total Analysis Systems*. 1. Introduction, Theory, and Technology, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2623–2636. <https://doi.org/10.1021/ac0202435>.
- [19] C. Rivet, H. Lee, A. Hirsch, S. Hamilton, H. Lu, *Microfluidics for medical diagnostics and biosensors*, *Chem. Eng. Sci.* 66 (2011) 1490–1507. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.08.015>.
- [20] W.K.T. Coltro, E. Piccin, E. Carrilho, D.P. de Jesus, J.A.F. da Silva, H.D.T. da Silva, C.L. do Lago, *Microssistemas de análises químicas: introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações*, *Quim. Nova*. 30 (2007) 1986–2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000800034>.
- [21] Á. Ríos, M. Zougagh, M. Avila, *Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review*, *Anal. Chim. Acta.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.024>.
- [22] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, *Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing*, *Sensors Actuators B. Chem.* (1990). [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(90\)80209-I](https://doi.org/10.1016/0925-4005(90)80209-I).
- [23] E.K. Sackmann, A.L. Fulton, D.J. Beebe, *The present and future role of microfluidics in biomedical research*, *Nature.* (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13118>.
- [24] P. Abgrall, A.M. Gué, *Lab-on-chip technologies: Making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem - A review*, *J. Micromechanics Microengineering.* (2007). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/17/5/R01>.
- [25] C. Iliescu, H. Taylor, M. Avram, J. Miao, S. Franssila, *A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon*, *Biomicrofluidics.* (2012). <https://doi.org/10.1063/1.3689939>.
- [26] M.C. Oliveira, E.Y. Watanabe, D. Agustini, C.E. Banks, L.H. Marcolino-Júnior, M.F. Bergamini, *Nonenzymatic sensor for determination of glucose in blood plasma based on nickel oxyhydroxide in a microfluidic system of cotton thread*, *J. Electroanal. Chem.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.03.038>.
- [27] A.W. Martinez, S.T. Phillips, M.J. Butte, G.M. Whitesides, *Patterned Paper as a*

- Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays, *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (2007) 1318–1320. <https://doi.org/10.1002/anie.200603817>.
- [28] X. Li, J. Tian, W. Shen, Thread as a versatile material for low-cost microfluidic diagnostics, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2 (2010) 1–6. <https://doi.org/10.1021/am9006148>.
- [29] A. Nilghaz, D.R. Ballerini, X.Y. Fang, W. Shen, Semiquantitative analysis on microfluidic thread-based analytical devices by ruler, *Sensors Actuators, B Chem.* 191 (2014) 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.023>.
- [30] A. Nilghaz, S. Bagherbaigi, C.L. Lam, S.M. Mousavi, E.P. Córcoles, D.H.B. Wicaksono, Multiple semi-quantitative colorimetric assays in compact embeddable microfluidic cloth-based analytical device (μ CAD) for effective point-of-care diagnostic, *Microfluid. Nanofluidics.* 19 (2015) 317–333. <https://doi.org/10.1007/s10404-015-1545-9>.
- [31] A. Nilghaz, D.H.B. Wicaksono, D. Gustiono, F.A. Abdul Majid, E. Supriyanto, M.R. Abdul Kadir, Flexible microfluidic cloth-based analytical devices using a low-cost wax patterning technique, *Lab Chip.* (2012). <https://doi.org/10.1039/c1lc20764d>.
- [32] P. Mostafalu, M. Akbari, K.A. Alberti, Q. Xu, A. Khademhosseini, S.R. Sonkusale, A toolkit of thread-based microfluidics, sensors, and electronics for 3D tissue embedding for medical diagnostics, *Microsystems Nanoeng.* 2 (2016). <https://doi.org/10.1038/micronano.2016.39>.
- [33] A.R. Horrocks, S.C. Anand, *Handbook of technical textiles*, 2000. <https://doi.org/10.1533/9781855738966>.
- [34] S.R. Karmakar, *Chemical Technology in the Pretreatment Processes of Textiles*, 1st ed., Elsevier, 1999.
- [35] I. Ahmad, C. Kan, A Review on Development and Applications of Bio-Inspired Superhydrophobic Textiles, *Materials (Basel).* 9 (2016) 892. <https://doi.org/10.3390/ma9110892>.
- [36] H.A. Karahan, E. Özdoğan, Improvements of surface functionality of cotton fibers by atmospheric plasma treatment, *Fibers Polym.* 9 (2008) 21–26.

- <https://doi.org/10.1007/s12221-008-0004-6>.
- [37] R. Safavieh, G.Z. Zhou, D. Juncker, Microfluidics made of yarns and knots: from fundamental properties to simple networks and operations, *Lab Chip*. 11 (2011) 2618. <https://doi.org/10.1039/c1lc20336c>.
- [38] A. Nilghaz, D.R. Ballerini, W. Shen, Exploration of microfluidic devices based on multi-filament threads and textiles: A review, *Biomicrofluidics*. (2013). <https://doi.org/10.1063/1.4820413>.
- [39] M. Reches, K.A. Mirica, R. Dasgupta, M.D. Dickey, M.J. Butte, G.M. Whitesides, Thread as a Matrix for Biomedical Assays, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2 (2010) 1722–1728. <https://doi.org/10.1021/am1002266>.
- [40] Z. Xu, Z. Liu, M. Xiao, L. Jiang, C. Yi, A smartphone-based quantitative point-of-care testing (POCT) system for simultaneous detection of multiple heavy metal ions, *Chem. Eng. J.* 394 (2020) 124966. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124966>.
- [41] M. Li, R. Cao, A. Nilghaz, L. Guan, X. Zhang, W. Shen, “Periodic-Table-Style” Paper Device for Monitoring Heavy Metals in Water, *Anal. Chem.* 87 (2015) 2555–2559. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00040>.
- [42] X. Tang, R. Su, H. Luo, Y. Zhao, L. Feng, J. Chen, Colorimetric detection of Aflatoxin B1 by using smartphone-assisted microfluidic paper-based analytical devices, *Food Control*. 132 (2022) 108497. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108497>.
- [43] K.J. Land, *Paper-based Diagnostics: Current Status and Future Applications*, Springer International, 2018.
- [44] M. Trigo-López, A. Muñoz, S. Ibeas, F. Serna, F.C. García, J.M. García, Colorimetric detection and determination of Fe(III), Co(II), Cu(II) and Sn(II) in aqueous media by acrylic polymers with pendant terpyridine motifs, *Sensors Actuators B Chem.* 226 (2016) 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.11.116>.
- [45] A. Lopez-Molinero, D. Liñan, D. Sipiera, R. Falcon, Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics,

- Microchem. J. 96 (2010) 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.06.013>.
- [46] V. V. Apyari, M. V. Gorbunova, A.I. Isachenko, S.G. Dmitrienko, Y.A. Zolotov, Use of household color-recording devices in quantitative chemical analysis, *J. Anal. Chem.* (2017). <https://doi.org/10.1134/S106193481711003X>.
- [47] G.M. Fernandes, W.R. Silva, D.N. Barreto, R.S. Lamarca, P.C.F. Lima Gomes, J. Flávio da S Petrucci, A.D. Batista, Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review, *Anal. Chim. Acta.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.030>.
- [48] A.W. Martinez, S.T. Phillips, E. Carrilho, S.W. Thomas, H. Sindi, G.M. Whitesides, Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3699–3707. <https://doi.org/10.1021/ac800112r>.
- [49] D. Zhang, Q. Liu, Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection, *Biosens. Bioelectron.* 75 (2016) 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.037>.
- [50] L.F. Capitán-Vallvey, N. López-Ruiz, A. Martínez-Olmos, M.M. Erenas, A.J. Palma, Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review, *Anal. Chim. Acta.* 899 (2015) 23–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009>.
- [51] L. Hangqian, F. Tengyue, T. Qiao-Guo, J. Ma, Development of a versatile smartphone-based environmental analyzer (vSEA) and its application in on-site nutrient detection, *Science of The Total Environment*, *Sci. Total Environ.* 838 (2022) 156197. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156197>.
- [52] J. He, G. Xiao, X. Chen, Y. Qiao, D. Xu, Z. Lu, A thermoresponsive microfluidic system integrating a shape memory polymer-modified textile and a paper-based colorimetric sensor for the detection of glucose in human sweat, *RSC Adv.* 9 (2019) 23957–23963. <https://doi.org/10.1039/C9RA02831E>.
- [53] Y. Cao, Y. Liu, F. Li, S. Guo, Y. Shui, H. Xue, L. Wang, Portable colorimetric detection of copper ion in drinking water via red beet pigment and smartphone, *Microchem. J.* 150 (2019) 104176. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104176>.

- [54] R.C. Gonzales, R.E. Woods, S.L. Eddins, *Digital Image Processing Using MATLAB®*, 4th ed., Washington, 2009.
- [55] S. Paciornik, A. V. Yallouz, R.C. Campos, D. Gannerman, Scanner image analysis in the quantification of mercury using spot-tests, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 156–161. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000100022>.
- [56] H. Levkowitz, G.T. Herman, GLHS: A Generalized Lightness, Hue, and Saturation Color Model, *CVGIP Graph. Model. Image Process.* 55 (1993) 271–285. <https://doi.org/10.1006/cgip.1993.1019>.
- [57] H. Palus, Representations of colour images in different colour spaces, in: *Colour Image Process. Handb.*, Springer, 1998: pp. 67–90. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5779-1_4.
- [58] D. Litwiller, CCD vs. CMOS: Facts and fiction, *Photonics Spectra.* 35 (2001) 154–158.
- [59] V.H. Helmholtz, Zur Theorie der anomalen Dispersion, in: *Ann. Phys., Annalen der Physik*, 1874: pp. 582–596.
- [60] M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, V.B. dos Santos, I.S. Resque, A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone, *Food Chem.* 338 (2021) 127800. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127800>.
- [61] D.L. de Romaña, M. Olivares, R. Uauy, M. Araya, Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25 (2011) 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.11.004>.
- [62] D.R. Intakes, U. Vanadium, Z.R. Levels, D.R. Intakes, S. Committee, S. Evaluation, D. Reference, I. Isbn, T. Pdf, N.A. Press, N.A. Press, N. Academy, N. Academy, N.A. Press, Copper, in: *Diet. Ref. Intakes Vitam. A, Vitam. K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, Zinc*, Washington, 2002: p. 800.
- [63] E. Madsen, J.D. Gitlin, Copper deficiency, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23 (2007) 187–192. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32801421bb>.
- [64] ATSDR, Toxicological profile for copper, *Public Health.* (2022) 314.

<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>.

- [65] United States Environmental Protection Agency, Lead and Copper Rule: A Quick Reference Guide for Schools and Child Care Facilities that are Regulated Under the Safe Drinking Water Act, (2005) 1–5. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockey=P10058C5.txt>.
- [66] K.P. Kepp, R. Squitti, Copper imbalance in Alzheimer's disease: Convergence of the chemistry and the clinic, *Coord. Chem. Rev.* 397 (2019) 168–187. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.06.018>.
- [67] M. Bisaglia, L. Bubacco, Copper Ions and Parkinson's Disease: Why Is Homeostasis So Relevant?, *Biomolecules.* 10 (2020) 195. <https://doi.org/10.3390/biom10020195>.
- [68] W.H.O. WHO, Guidelines for Drinking-water Quality, in: 4th ed., 2017: p. 541.
- [69] N. Anesthesia, S. Be, M.O. In, L. In, W. Appropriate, R. Equipment, D. Are, I. Available, T.O. Manage, G. li, I. By, A.P. With, A. Privileges, M. By, O.R. Under, T.H.E. Medical, G. Iii, P. Has, B. Examined, B.Y.A. Qualified, P. With, O. Privileges, T.O. Perform, V. Or, C. Delivery, W.H.O. Has, K. Of, F. Status, T.H.E. Progress, O.F. Labor, A. The, I. Of, L. Anesthesia, I.S.R. Available, T.O. Supervise, T.H.E. Labor, M. Any, O. Complications, Guidelines for, 2010.
- [70] A.D.J.B. Lima, M.D.G. Cardoso, L.G.D.L. Guimarães, J.M. De Lima, D.L. Nelson, Effect of copper removing substances on the amount of secondary compounds of sugar cane spirit, *Quim. Nova.* 32 (2009) 845–848. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000400004>.
- [71] M.V. Maia, W.T. Suarez, V.B. dos Santos, J.P.B. de Almeida, Carbon dots on paper for determination of Cu²⁺ in sugar cane spirits samples for fluorescence digital image-based method, *Microchem. J.* 179 (2022) 107500. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107500>.
- [72] R.A. Labanca, M.B.A. Glória, V.J.P. Gouveia, R.J. de C.F. Afonso, Determinação dos teores de cobre e grau alcoólico em aguardentes de cana produzidas no estado de Minas Gerais, *Quim. Nova.* 29 (2006) 1110–1113. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000500036>.

- [73] CONAMA, Resolução N 430, de 13 de maio de 2011, Diário Of. União. (2011) 8.
- [74] MAPA, Portaria N° 339, De 28 De Junho De 2021, Diário Of. Da União. 5665 (2021) 345000.
- [75] E.P.A. United States, Drinking Water Standards and Health Advisories, in: Environ. Prot., 2018.
- [76] United States Environmental Protection Agency, Lead and Copper Rule: A Quick Reference Guide, 85 (2008) 1–2. <http://water.epa.gov/drink>.
- [77] P. Toft, M. Malaiyandi, J.R. Hickman, Guidelines for Canadian Drinking Water Quality, in: Natl. Meet. - Am. Chem. Soc. Div. Environ. Chem., 2019: pp. 735–750. <https://doi.org/10.1021/ba-1987-0214.ch035>.
- [78] M. of H. of the P.R. of C. and C.N.S.M. Committee, National Standard of the People's Republic of China: Hygienic Standards for Drinking Water Quality, in: 2007. <http://tradechina.dairyaustralia.com.au/wp-content/uploads/2018/08/GB-5749-2006-Standards-for-Drinking-Water-Quality.pdf>.
- [79] BRASIL. Ministério da Saúde., PORTARIA GM_MS N° 888, DE 4 DE MAIO DE 2021 - PORTARIA GM_MS N° 888, DE 4 DE MAIO DE 2021 - DOU - Imprensa Nacional, Diário Of. Da União. (2021) 2001. <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-n-339-de-28-de-junho-de-2021-328538616>.
- [80] O.Y. Bitar, R. Ortega, Gestão Ambiental, Geologia de engenharia, São Paulo: ABGE, 1998.
- [81] M.J. Pushie, K.L. Summers, K.H. Nienaber, I.J. Pickering, G.N. George, Synthesis and structural characterization of copper–cuprizone complexes, *Dalt. Trans.* 51 (2022) 10361–10376. <https://doi.org/10.1039/D2DT01475K>.
- [82] L. Messori, A. Casini, C. Gabbiani, L. Sorace, M. Muniz-Miranda, P. Zatta, Unravelling the chemical nature of copper cuprizone, *Dalt. Trans.* (2007) 2112–2114. <https://doi.org/10.1039/b701896g>.
- [83] K.C. Titus, S.F. Gallegos, P.A. Prada-Tiedemann, Forensic Odor Analysis: Current Application in Postmortem Examinations, *Res. Reports Forensic Med. Sci.* Volume 12 (2022) 1–12. <https://doi.org/10.2147/RRFMS.S272225>.

- [84] J. Lee, H.K. Lee, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review, *Anal. Chim. Acta.* 624 (2008) 253–268. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.06.050>.
- [85] N. Xiao, H. Xu, X. Jiang, T. Sun, Y. Luo, W. Shi, Evaluation of aroma characteristics in grass carp mince as affected by different washing processes using an E-nose, HS-SPME-GC-MS, HS-GC-IMS, and sensory analysis, *Food Res. Int.* 158 (2022) 111584. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111584>.
- [86] W. Hittini, A.F. Abu-Hani, N. Reddy, S.T. Mahmoud, Cellulose-Copper Oxide hybrid nanocomposites membranes for H₂S gas detection at low temperatures, *Sci. Rep.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60069-4>.
- [87] J.V. Karabinos, M. Hindert, Carboxymethylcellulose, in: 1954: pp. 285–302. [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60378-1](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60378-1).
- [88] J.D. Keller, Sodium Carboxymethylcellulose(CMC), in: *Food Hydrocoll.*, 1986: p. 67.
- [89] M. Ware, *Cyanomicon. History, science and art of cyanotype: photographic printing in Prussian blue*, (2014) 1–298.
- [90] F. Wu, F. Xu, W. Liu, S. Chen, H. Luo, N. Cheng, H. Zhao, W. Cao, A High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection Method Developed for the Sensitive Determination of Ascorbic Acid: Validation, Application, and Comparison with Titration, Spectrophotometric, and High-Performance Liquid Chromatograp, *Foods.* 12 (2023) 3100. <https://doi.org/10.3390/foods12163100>.
- [91] M.G. Traber, J.F. Stevens, Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 1000–1013. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017>.
- [92] A. Arabia, S. Munné-Bosch, P. Muñoz, Ascorbic acid as a master redox regulator of fruit ripening, *Postharvest Biol. Technol.* 207 (2024) 112614. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112614>.
- [93] A.C. Carr, B. Frei, Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C

- based on antioxidant and health effects in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (1999) 1086–1107. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.6.1086>.
- [94] K. Prasad Aryal, H. Kyung Jeong, Electrochemical detection of ascorbic acid with chemically functionalized carbon nanofiber/ β -cyclodextrin composite, *Chem. Phys. Lett.* 757 (2020) 137881. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2020.137881>.
- [95] B.K. Sil, M.R. Jamiruddin, M.A. Haq, N. Aekwattanaphol, P.A. K, L. Salendra, H. Paliwal, P.K. Paul, W. Buatong, T. Srichana, Nanolevel of detection of ascorbic acid using horse-radish peroxidase inhibition assay, *Heliyon.* 10 (2024) e30715. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30715>.
- [96] Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, National Academies Press, Washington, D.C., 2000. <https://doi.org/10.17226/9810>.
- [97] I. of Medicine, Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, in: *Diet. Ref. Intakes Vitam. C, Vitam. E, Selenium, Carotenoids*, National Academies Press, Washington, D.C., 2000: p. 528. <https://doi.org/10.17226/9810>.
- [98] L. Nováková, D. Solichová, P. Solich, Hydrophilic interaction liquid chromatography – charged aerosol detection as a straightforward solution for simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4574–4581. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.060>.
- [99] C.-L. Sun, C.-T. Chang, H.-H. Lee, J. Zhou, J. Wang, T.-K. Sham, W.-F. Pong, Microwave-Assisted Synthesis of a Core–Shell MWCNT/GONR Heterostructure for the Electrochemical Detection of Ascorbic Acid, Dopamine, and Uric Acid, *ACS Nano.* 5 (2011) 7788–7795. <https://doi.org/10.1021/nn2015908>.
- [100] J. Yan, S. Liu, Z. Zhang, G. He, P. Zhou, H. Liang, L. Tian, X. Zhou, H. Jiang, Simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on graphene anchored with Pd–Pt nanoparticles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 111 (2013) 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.06.030>.
- [101] B. Alexander Kraft, Gesimat GmbH, on the Discovery and History of Prussian

- Blue, Bull. Hist. Chem. 33 (2008) 61–67. http://www.scs.illinois.edu/~mainzv/HIST/bulletin_open_access/v33-2/v33-2p61-67.pdf.
- [102] M. Ware, Prussian Blue: Artists' Pigment and Chemists' Sponge, *J. Chem. Educ.* 85 (2008) 612. <https://doi.org/10.1021/ed085p612>.
- [103] R.J. Mortimer, D.R. Rosseinsky, P.M.S. Monk, *Electrochromic Materials and Devices*, Wiley, 2013. <https://doi.org/10.1002/9783527679850>.
- [104] D. Davidson, L.A. Welo, The Nature of Prussian Blue., *J. Phys. Chem.* 32 (1928) 1191–1196. <https://doi.org/10.1021/j150290a007>.
- [105] M.C. Monteiro, K.C.F. Toledo, B.M. Pires, R. Wick, J.A. Bonacin, Improvement in Efficiency of the Electrocatalytic Reduction of Hydrogen Peroxide by Prussian Blue Produced from the [Fe(CN) 5 (mpz)] 2– Complex, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017 (2017) 1979–1988. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601540>.
- [106] M. Seeley, C.S. Wells, E.J. Wannamaker, R.L. Mattuck, S. Ren, B.D. Beck, Determining soil remedial action criteria for acute effects: The challenge of copper, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 65 (2013) 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.10.011>.
- [107] M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, V.B. dos Santos, I.S. Resque, M.H. dos Santos, L.F. Capitán-Vallvey, Microanalysis based on paper device functionalized with cuprizone to determine Cu²⁺ in sugar cane spirits using a smartphone, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 253 (2021) 119580. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119580>.
- [108] V. Kaur, A.K. Malik, Development of Solid Phase Microextraction-High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Copper(II) in Environmental Samples Using Morpholine-4-Carbodithioate, *Ann. Chim.* 97 (2007) 1279–1290. <https://doi.org/10.1002/adic.200790113>.
- [109] F.C. Böck, G.A. Helfer, A.B. da Costa, M.B. Dessuy, M.F. Ferrão, Low cost method for copper determination in sugarcane spirits using Photometrix UVC® embedded in smartphone, *Food Chem.* 367 (2022) 130669. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130669>.

- [110] M.J. Arroyo, M.M. Erenas, I. de Orbe-Payá, K. Cantrell, J.A. Dobado, P. Ballester, P. Blondeau, A. Salinas-Castillo, L.F. Capitán-Vallvey, Thread based microfluidic platform for urinary creatinine analysis, *Sensors Actuators B Chem.* 305 (2020) 127407. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127407>.
- [111] R.M. Carvalho, V.S. Ferreira, B.G. Lucca, A novel all-3D-printed thread-based microfluidic device with an embedded electrochemical detector: first application in environmental analysis of nitrite, *Anal. Methods.* 13 (2021) 1349–1357. <https://doi.org/10.1039/D1AY00070E>.
- [112] P. Punnoy, P. Preechakasedkit, C. Aumnate, N. Rodthongkum, P. Potiyaraj, N. Ruecha, Polyvinyl alcohol/starch modified cotton thread surface as a novel colorimetric glucose sensor, *Mater. Lett.* 299 (2021) 130076. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.130076>.
- [113] M.M. Erenas, B. Carrillo-Aguilera, K. Cantrell, S. Gonzalez-Chocano, I.M. Perez de Vargas-Sansalvador, I. de Orbe-Payá, L.F. Capitan-Vallvey, Real time monitoring of glucose in whole blood by smartphone, *Biosens. Bioelectron.* 136 (2019) 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.024>.
- [114] I. Lewińska, L.F. Capitán-Vallvey, M.M. Erenas, Thread-based microfluidic sensor for lithium monitoring in saliva, *Talanta.* 253 (2023) 124094. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124094>.
- [115] X. Mao, T.-E. Du, L. Meng, T. Song, Novel gold nanoparticle trimer reporter probe combined with dry-reagent cotton thread immunoassay device for rapid human ferritin test, *Anal. Chim. Acta.* 889 (2015) 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.031>.
- [116] A. Gonzalez, M. Gaines, F.A. Gomez, Thread-based microfluidic chips as a platform to assess acetylcholinesterase activity, *Electrophoresis.* 38 (2017) 996–1001. <https://doi.org/10.1002/elps.201600476>.
- [117] X. Jia, T. Song, Y. Liu, L. Meng, X. Mao, An immunochromatographic assay for carcinoembryonic antigen on cotton thread using a composite of carbon nanotubes and gold nanoparticles as reporters, *Anal. Chim. Acta.* 969 (2017) 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.040>.
- [118] R. Akemi Yamashita, R. Marcel Carvalho, J. Marques Petroni, E. Rodrigo Pedão,

- F. Mesquita Roesse Guerbis, M. Porto Tronchini, V. Souza Ferreira, E. Isaias de Melo, R. Amorim Bezerra da Silva, B. Gabriel Lucca, 3D-printed microfluidic thread device with integrated detector: A green and portable tool for amperometric detection of fungicide benzovindiflupyr in forensic samples, *Microchem. J.* 182 (2022) 107853. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107853>.
- [119] M.M. Erenas, I. de Orbe-Payá, L.F. Capitan-Vallvey, Surface Modified Thread-Based Microfluidic Analytical Device for Selective Potassium Analysis, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5331–5337. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00633>.
- [120] L.M.A. de Oliveira, V.B. dos Santos, E.K.N. da Silva, A.S. Lopes, H.A. Dantas-Filho, An environment-friendly spot test method with digital imaging for the microtitration of citric fruits, *Talanta.* 206 (2020) 120219. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120219>.
- [121] D.C. Christodouleas, A. Nemiroski, A.A. Kumar, G.M. Whitesides, Broadly Available Imaging Devices Enable High-Quality Low-Cost Photometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 9170–9178. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01612>.
- [122] S.M. Abdel Azeem, I.A. Al Mohesen, A.M.H. Ibrahim, Analysis of total phenolic compounds in tea and fruits using diazotized aminobenzenes colorimetric spots, *Food Chem.* 332 (2020) 127392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127392>.
- [123] I.S. Resque, V.B. dos Santos, W.T. Suarez, An environmentally friendly analytical approach based on spot test and digital image to evaluate the conformity of bleaching products, *Chem. Pap.* 73 (2019) 1659–1668. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00717-w>.
- [124] S. Sangsin, P. Srivilai, P. Tongraung, Colorimetric detection of Cr³⁺ in dietary supplements using a smartphone based on EDTA and tannic acid-modified silver nanoparticles, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 246 (2021) 119050. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119050>.
- [125] O. Mudanyali, S. Dimitrov, U. Sikora, S. Padmanabhan, I. Navruz, A. Ozcan, Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone, *Lab Chip.* 12 (2012) 2678. <https://doi.org/10.1039/c2lc40235a>.

- [126] M. Firdaus, A. Aprian, N. Meileza, M. Hitsmi, R. Elvia, L. Rahmidar, R. Khaydarov, Smartphone Coupled with a Paper-Based Colorimetric Device for Sensitive and Portable Mercury Ion Sensing, *Chemosensors*. 7 (2019) 25. <https://doi.org/10.3390/chemosensors7020025>.
- [127] E.K.N. da Silva, V.B. dos Santos, I.S. Resque, C.A. Neves, S.G.C. Moreira, M. de O.K. Franco, W.T. Suarez, A fluorescence digital image-based method using a 3D-printed platform and a UV-LED chamber made of polyacid lactic for quinine quantification in beverages, *Microchem. J.* 157 (2020) 104986. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104986>.
- [128] N. Phuangsaichai, J. Jakmunee, S. Kittiwachana, Investigation into the predictive performance of colorimetric sensor strips using RGB, CMYK, HSV, and CIELAB coupled with various data preprocessing methods: a case study on an analysis of water quality parameters, *J. Anal. Sci. Technol.* 12 (2021) 19. <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00271-9>.
- [129] J.P.B. de Almeida, V.B. dos Santos, G.A. do Nascimento, W.T. Suarez, W.M. de Azevedo, A.F. Ferreira, M.V. Maia, A fluorescence digital image-based method using carbon quantum dots to evaluate the compliance of a biocidal agent, *Anal. Methods*. 14 (2022) 2631–2641. <https://doi.org/10.1039/D2AY00678B>.
- [130] M.L. Firdaus, W. Alwi, F. Trinoveldi, I. Rahayu, L. Rahmidar, K. Warsito, Determination of Chromium and Iron Using Digital Image-based Colorimetry, *Procedia Environ. Sci.* 20 (2014) 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2014.03.037>.
- [131] BRASIL, Resolução RDC no 166, de 24 de julho de 2017, Dispõe Sobre a Validação Métodos Analíticos e Dá Outras Provid. 2017 (2017) 87.
- [132] Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), DOQ-CGCRE-008 Orientação sobre validação de métodos analíticos., *Inmetro*. (2020) 30. <https://www.gov.br/inmetro/pt-br/assuntos/acreditacao>.
- [133] A.F. João, A.L. Squissato, G.M. Fernandes, R.M. Cardoso, A.D. Batista, R.A.A. Muñoz, Iron (III) determination in bioethanol fuel using a smartphone-based device, *Microchem. J.* 146 (2019) 1134–1139. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.053>.

- [134] N. V. Plyasunova, M. Wang, Y. Zhang, M. Muhammed, Critical evaluation of thermodynamics of complex formation of metal ions in aqueous solutions II. Hydrolysis and hydroxo-complexes of Cu^{2+} at 298.15 K, *Hydrometallurgy*. 45 (1997) 37–51. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(96\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(96)00073-4).
- [135] Naeemullah, T.G. Kazi, F. Shah, H.I. Afridi, S. Khan, S.S. Arian, K.D. Brahman, A Green Preconcentration Method for Determination of Cobalt and Lead in Fresh Surface and Waste Water Samples Prior to Flame Atomic Absorption Spectrometry, *J. Anal. Methods Chem.* 2012 (2012) 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/713862>.
- [136] H. Wang, Z. Li, S. Yahyaoui, H. Hanafy, M.K. Seliem, A. Bonilla-Petriciolet, G. Luiz Dotto, L. Sellaoui, Q. Li, Effective adsorption of dyes on an activated carbon prepared from carboxymethyl cellulose: Experiments, characterization and advanced modelling, *Chem. Eng. J.* 417 (2021) 128116. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128116>.
- [137] P. Sirajudheen, P. Karthikeyan, S. Vigneshwaran, S. Meenakshi, Synthesis and characterization of La(III) supported carboxymethylcellulose-clay composite for toxic dyes removal: Evaluation of adsorption kinetics, isotherms and thermodynamics, *Int. J. Biol. Macromol.* 161 (2020) 1117–1126. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.103>.
- [138] L. Sun, H. Wang, W. Li, J. Zhang, Z. Zhang, Z. Lu, P. Zhu, C. Dong, Preparation, characterization and testing of flame retardant cotton cellulose material: flame retardancy, thermal stability and flame-retardant mechanism, *Cellulose*. 28 (2021) 3789–3805. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03632-6>.
- [139] AOAC International, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, in: *Guidel. Stand. Method Perform. Requir.*, 2016: pp. 1–18. https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf.
- [140] Y.D. Li, H.H. Chai, S.J. Zhang, Z.S. Lu, C.M. Li, L. Yu, Sensitive and portable colorimetric detection of copper in water by cotton thread based pre-concentration, *Microchem. J.* 148 (2019) 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.05.056>.
- [141] MAPA, Manual de Garantia da Qualidade Analítica, 2015.

file:///C:/Users/carol/Downloads/Manual-de-Garantia-Analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed (3).pdf.

- [142] G.M. Fernandes, J. de Sousa, J.F. da Silveira Petrucci, A.D. Batista, Paper-based analytical device for colorimetric detection of Cu²⁺ in Brazilian sugarcane spirits by digital image treatment, *Microchem. J.* 159 (2020) 105463. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105463>.
- [143] R. Pratiwi, M.P. Nguyen, S. Ibrahim, N. Yoshioka, C.S. Henry, D.H. Tjahjono, A selective distance-based paper analytical device for copper(II) determination using a porphyrin derivative, *Talanta.* 174 (2017) 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.041>.
- [144] A.W. Munyaka, E.E. Makule, I. Oey, A. Van Loey, M. Hendrickx, Thermal Stability of α -Ascorbic Acid and Ascorbic Acid Oxidase in Broccoli (*Brassica oleracea var. italica*), *J. Food Sci.* 75 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01573.x>.
- [145] H.M. Waqas Khan, N. Parikh, S.M. Megala, G.S. Predeteanu, Unusual Early Recovery of a Critical COVID-19 Patient After Administration of Intravenous Vitamin C, *Am. J. Case Rep.* 21 (2020). <https://doi.org/10.12659/AJCR.925521>.
- [146] C.L. Linster, E. Van Schaftingen, Vitamin C, *FEBS J.* 274 (2007) 1–22. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05607.x>.
- [147] H. Hemilä, Vitamin C and Infections, *Nutrients.* 9 (2017) 339. <https://doi.org/10.3390/nu9040339>.
- [148] A. Das, N. Dey, A. Ghosh, S. Das, D.J. Chattopadhyay, I.B. Chatterjee, Molecular and Cellular Mechanisms of Cigarette Smoke-Induced Myocardial Injury: Prevention by Vitamin C, *PLoS One.* 7 (2012) e44151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044151>.
- [149] B. Ngo, J.M. Van Riper, L.C. Cantley, J. Yun, Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C, *Nat. Rev. Cancer.* 19 (2019) 271–282. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0135-7>.
- [150] A. Kane, P.A. Diakhaté, S. Ndao, M. Dieng, M. Cisse, A. Diop, Identification of Antioxidant Additives in Food Products Sold in Dakar Markets, *Open J. Appl. Sci.*

- 14 (2024) 51–62. <https://doi.org/10.4236/ojapps.2024.141004>.
- [151] O. Pessoa-Neto, V. Santos, F. Vicentini, W. Suarez, J. Alonso-Chamarro, O. Fatibello-Filho, R. Faria, A low-cost automated flow analyzer based on low temperature co-fired ceramic and LED photometer for ascorbic acid determination, *Open Chem.* 12 (2014) 341–347. <https://doi.org/10.2478/s11532-013-0377-2>.
- [152] S.C. Moldoveanu, Comparison of several HPLC methods for the analysis of vitamin C, *Biomed. Chromatogr.* (2023). <https://doi.org/10.1002/bmc.5753>.
- [153] J. Fenoll, A. Martínez, P. Hellín, P. Flores, Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry, *Food Chem.* 127 (2011) 340–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.140>.
- [154] H. Zia, N. Fischbach, M. Hofsommer, A. Slatnar, Simultaneous analysis of ascorbic and dehydroascorbic acid in fruit juice using HILIC chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Food Compos. Anal.* 124 (2023) 105714. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105714>.
- [155] M. Adam, P. Pavlíková, A. Čížková, P. Bajerová, K. Ventura, Microextraction by packed sorbent (MEPS) as a suitable selective method for l-ascorbic acid determination in beverages, *Food Chem.* 135 (2012) 1613–1618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.039>.
- [156] S. Jiang, H. Zhang, Z. Li, L. Chen, X. Liu, High-sensitivity integrated detector with nanostructured hydrogel electrode for ascorbic acid determination, *Microchem. J.* 189 (2023) 108510. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108510>.
- [157] F. Mazzara, B. Patella, G. Aiello, A. O’Riordan, C. Torino, A. Vilasi, R. Inguanta, Electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid using r-GO/NPs based sensors, *Electrochim. Acta.* 388 (2021) 138652. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138652>.
- [158] AOAC 1990, No More Riffing With a, 75 Years Report. *Anal. Sci.* 1915-1990. 73 (1990) 1–192.

- [159] M.A. Tarighat, F.H. Ghorghosheh, G. Abdi, Fe₃O₄@SiO₂-Ag nanocomposite colorimetric sensor for determination of arginine and ascorbic acid based on synthesized small size AgNPs by cystoseria algae extract, *Mater. Sci. Eng. B.* 283 (2022) 115855. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2022.115855>.
- [160] D. Minh-Huy, L.-T. Anh-Dao, N. Thanh-Nho, L. Nhon-Duc, N. Cong-Hau, Smartphone-based digital images as a low-cost and simple colorimetric approach for the assessment of total phenolic contents in several specific Vietnamese dried tea products and their liquors, *Food Chem.* 401 (2023) 134147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134147>.
- [161] N. Abidi, L. Cabrales, E. Hequet, Thermogravimetric analysis of developing cotton fibers, *Thermochim. Acta.* 498 (2010) 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.09.007>.
- [162] V.B. dos Santos, E.K.N. da Silva, L.M.A. de Oliveira, W.T. Suarez, Low cost in situ digital image method, based on spot testing and smartphone images, for determination of ascorbic acid in Brazilian Amazon native and exotic fruits, *Food Chem.* 285 (2019) 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.167>.
- [163] I. Klimczak, A. Gliszczynska-Wiglo, Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C, *Food Chem.* 175 (2015) 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.104>.
- [164] J.L. de Oliveira, W. Toito Suarez, V.B. dos Santos, L.P. da Silva, L.F. Capitán-Vallvey, Using a cotton thread-based colorimetric sensor modified by carboxymethylcellulose and cuprizone with smartphone detection for quantification of copper, *Anal. Methods.* 15 (2023) 5683–5691. <https://doi.org/10.1039/D3AY01541F>.
- [165] M.M. Hartzell-Lawson, Y. Io Hsieh, Characterizing the Noncellulosics in Developing Cotton Fibers, *Text. Res. J.* 70 (2000) 810–819. <https://doi.org/10.1177/004051750007000909>.
- [166] M. Xia, X. Zhang, T. Liu, H. Yu, S. Chen, N. Peng, R. Zheng, J. Zhang, J. Shu, Commercially available Prussian blue get energetic in aqueous K-ion batteries, *Chem. Eng. J.* 394 (2020) 124923. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124923>.
- [167] S. Yang, G. Li, G. Wang, J. Zhao, M. Hu, L. Qu, A novel nonenzymatic H₂O₂

- sensor based on cobalt hexacyanoferrate nanoparticles and graphene composite modified electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 208 (2015) 593–599. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.055>.
- [168] S.N. Ghosh, Infrared spectra of the Prussian blue analogs, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 36 (1974) 2465–2466. [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(74\)80454-9](https://doi.org/10.1016/0022-1902(74)80454-9).
- [169] Brasil, Resolução RDC ANVISA nº 360/2003, *Diário Of. União.* 251 (2003).
- [170] Brasil, Instrução Normativa Nº 49 de 26 de setembro de 2018, Ministério Da Agric. Pecuária e Abast. (n.d.).
- [171] H. Zhao, Z. Zhang, Y. Han, W. Yang, W. Tang, T. Yue, Z. Li, Visual detection of vitamin C in fruits and vegetables using UiO-66 loaded Ce-MnO₂ mimetic oxidase, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 285 (2023) 121900. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121900>.
- [172] Y. Zhao, X. Jiang, K. Huang, X. Xiong, Q. Yang, A smartphone-integrated ratiometric fluorescent sensor for ascorbic acid determination using microplasma-enabled carbon dots and rhodamine B, *Food Chem.* 463 (2025) 141280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141280>.
- [173] X. Yin, C. Zhao, Y. Zhao, Y. Zhu, Parallel Monitoring of Glucose, Free Amino Acids, and Vitamin C in Fruits Using a High-Throughput Paper-Based Sensor Modified with Poly(carboxybetaine acrylamide), *Biosensors.* 13 (2023) 1001. <https://doi.org/10.3390/bios13121001>.
- [174] Y. Li, R. Javed, R. Li, Y. Zhang, Z. Lang, H. Zhao, X. Liu, H. Cao, D. Ye, A colorimetric smartphone-based sensor for on-site AA detection in tropical fruits using Fe-P/N C single-atom nanoenzyme, *Food Chem.* 406 (2023) 135017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135017>.
- [175] H. Guan, S. Du, B. Han, Q. Zhang, D. Wang, A rapid and sensitive smartphone colorimetric sensor for detection of ascorbic acid in food using the nanozyme paper-based microfluidic chip, *LWT.* 184 (2023) 115043. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115043>.
- [176] M.Á. Aguirre, K.D. Long, A. Canals, B.T. Cunningham, Point-of-use detection of ascorbic acid using a spectrometric smartphone-based system, *Food Chem.* 272

(2019) 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.002>.