



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO EM PAPEL PARA A QUANTIFICAÇÃO DE COBRE SALIVAR

por

Mafalda Teixeira dos Santos e Silva

Novembro 2019



CATÓLICA

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

DESENVOLVIMENTO DE UM DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO EM PAPEL PARA A QUANTIFICAÇÃO DE COBRE SALIVAR

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

por

Mafalda Teixeira dos Santos e Silva

Local: Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa

Orientação: Prof. Dr^a. Raquel Mesquita e Prof. Dr. António Rangel

Novembro 2019

Resumo

A determinação da concentração de cobre salivar é importante no diagnóstico clínico, como oligoelemento necessário ao funcionamento fisiológico, e no diagnóstico precoce, tratamento e progresso de doenças pré-malignas e malignas como o cancro da cavidade oral.

Neste trabalho é proposto o desenvolvimento de um dispositivo descartável de utilização no local baseado em papel (μ PAD) que tem por base conceitos de microfluxo para quantificação imediata de cobre como um potencial biomarcador na saliva humana. Para tal, foram realizados diversos testes no que diz respeito ao estudo da reação do cobre com a batocuproína e à configuração do μ PAD com o intuito de obter a melhor sensibilidade. Para além disso, foram efetuados estudos de estabilidade, quer do produto colorido formado, quer do dispositivo em si.

O dispositivo desenvolvido apresenta um intervalo de concentrações de 0,080 – 0,500 mg/L, uma curva de calibração de $A=0,0705(\pm 3 \times 10^{-4}) \times [\text{Cu}^{2+}] + 8,20 \times 10^{-4} (\pm 4,79 \times 10^{-4})$, um limite de deteção de 0,032 mg/L e um limite de quantificação de 0,080 mg/L. No que diz respeito à estabilidade, o μ PAD mostrou-se estável quando armazenado em vácuo por um período de pelo menos duas semanas e, após a colocação da amostra, a leitura do produto colorido formado pode ser feita entre os 20 e os 90 minutos sem que a sensibilidade do método seja afetada.

O dispositivo desenvolvido é descartável, económico (0,32€/ μ PAD), rápido e simples. Além disso, sendo o cancro oral a neoplasia mais comum nos países em desenvolvimento, a portabilidade do μ PAD é ideal.

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada com amostras de águas certificadas uma vez que não se conseguiu avaliar com amostras de saliva, possivelmente devido ao facto de a saliva ser um fluido biológico que tem na sua constituição proteínas que podem interferir. Logo, é necessário realizar mais estudos para otimizar o método e permitir a sua utilização com saliva de pacientes.

Palavras-chave: cancro oral; cobre; saliva; μ PAD; batocuproína

Abstract

The determination of salivary copper concentration is important in clinical diagnosis, trace element necessary for physiological functioning, and early diagnosis, treatment and progress of premalignant and malignant diseases such as oral cavity cancer.

In this work, the development of a disposable paper-based device (μ PAD) for on-site use based on microflow concepts for immediate copper quantification as a potential biomarker in human saliva is proposed. For this purpose, several tests were carried out regarding the study of the reaction of copper with bathocuproine and the design of μ PAD in order to obtain the best sensitivity. In addition, stability studies were performed on both, the colored product formed and the device itself.

For the concentration range of 0.080 – 0.500 mg/L, the developed device presents the following characteristics: a calibration curve of $A=0.0705(\pm 3 \times 10^{-4}) \times [\text{Cu}^{2+}] + 8.20 \times 10^{-4} (\pm 4.79 \times 10^{-4})$, a detection limit of 0.032 mg/L and a quantification limit of 0.080 mg/L. Regarding stability, μ PAD was stable when stored under vacuum for a period of at least two weeks and, after sample placement, the color product formed could be read from 20 to 90 minutes, without the sensitivity of the method being affected.

The developed μ PAD device is disposable, economical (0.32€/ μ PAD), quick and simple. In addition, μ PAD portability is ideal because oral cancer is the most common cancer in developing countries.

The accuracy of the developed method was evaluated with certified water samples as it could not be evaluated with saliva samples, possibly due to the fact that saliva is a biological fluid that has interfering proteins in its constitution. Thus, further studies are needed to optimize the method and allow its use with patient saliva.

Keywords: oral cancer; copper; saliva; μ PAD; bathocuproine

Agradecimentos

Uma tese de mestrado é o final de um percurso académico com uma trajetória construída por inúmeros desafios, conquistas, incertezas e alegrias pelo caminho, mas que com as pessoas certas e o seus contributos indispensáveis ajudam a encontrar o rumo certo. Por isso, todo o sucesso deste percurso só foi possível com o apoio, força e disponibilidade de vários intervenientes a quem dedico a minha tese e agradeço a todos que contribuíram para a sua realização e cuja participação foi essencial.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Raquel Mesquita e Professor Doutor António Rangel, por terem aceite o desafio de me orientar a tese e por confiarem em mim tal como em todos os projetos até à data realizados sob sua orientação. Agradeço a orientação que me foi dada, o acompanhamento, todos os contributos prestados e até mesmo as críticas construtivas e sugestões que conduziram e enriqueceram todas as etapas do meu trabalho. Pelas oportunidades de apresentar trabalhos em conferências que contribuíram tanto para o meu desenvolvimento pessoal como profissional.

Também agradeço ao coordenador de curso – Professor João Paulo Ferreira – por toda a ajuda prestada durante o curso e o desenvolvimento deste e outros projetos.

Aos meus pais e irmã, agradeço-lhes por serem o meu pilar e por todo o apoio incondicional e disponibilidade com que sempre me acompanharam em todos os momentos do meu percurso escolar e pessoal. Sempre estiveram disponíveis para me ajudar quer nos momentos bons como nos menos bons e sempre me ouviram e aconselharam da melhor maneira. Sem eles nada disto seria possível. Obrigada.

Ao meu namorado, pela partilha, companheirismo e apoio incondicional. Agradeço toda a compreensão com que sempre me acompanhou mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada pela alegria e orgulho com que me viu chegar ao fim deste percurso académico. Também gostaria de agradecer a toda a equipa do laboratório onde estive ao longo dos últimos 5 anos que sempre me auxiliaram e apoiaram em tudo que precisei. Obrigada pelo convívio que proporcionaram durante esta jornada.

Gostaria de agradecer ainda à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa por todas as ferramentas e bases fornecidas que contribuíram para a minha vida escolar e desenvolvimento da minha tese.

Por fim, mas não menos importante, um obrigada a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação de forma mais ou menos extensiva. Obrigada.

Índice

| | |
|--|-----|
| Resumo | III |
| Abstract..... | V |
| Agradecimentos | VII |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 O cobre no corpo humano..... | 2 |
| 1.2 O cobre na saliva..... | 3 |
| 1.2.1 A saliva como matriz biológica..... | 3 |
| 1.2.2 Patologias associadas ao cobre salivar | 5 |
| 1.3 Análises em papel | 7 |
| 1.4 Reação colorimétrica | 10 |
| 1.5 Objetivo | 12 |
| 2. Material e Métodos | 13 |
| 2.1 Reagentes e soluções | 13 |
| 2.2 Design e montagem do μ PAD | 14 |
| 2.3 μ PAD para determinação de cobre | 15 |
| 2.4 Avaliação da exatidão | 16 |
| 2.5 Amostragem..... | 16 |
| 3. Resultados e discussão | 17 |
| 3.1 Estudo de seleção do reagente | 17 |
| 3.1.1 Estudos preliminares - “In vitro” | 17 |
| 3.1.2 Estudos preliminares - μ PAD..... | 19 |
| 3.2 Design do μ PAD – características físicas | 19 |
| 3.2.1 Tempo de secagem/reação | 20 |
| 3.2.2 Diâmetro das camadas hidrofílicas | 21 |
| 3.2.3 Tipo de papel de filtro da camada de reagente..... | 23 |
| 3.3 Design do μ PAD – características químicas..... | 24 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.3.1 | Estudo da influência da concentração de batocuproína | 24 |
| 3.3.2 | Volume de reagente de cor..... | 25 |
| 3.3.3 | Volume de amostra..... | 26 |
| 3.3.4 | Concentração de hidroxilamina..... | 28 |
| 3.4 | Influência da matriz | 29 |
| 3.5 | Estudos de estabilidade | 30 |
| 3.5.1 | Estabilidade do produto de reação | 31 |
| 3.5.2 | Estabilidade do μ PAD..... | 32 |
| 3.6 | Características do μ PAD para a determinação de cobre..... | 33 |
| 3.6.1 | Avaliação da precisão..... | 33 |
| 3.6.2 | Área de análise selecionada no ImageJ | 35 |
| 3.7 | Avaliação da exatidão | 37 |
| 3.7.1 | Amostras certificadas – água..... | 37 |
| 3.7.2 | Amostras de saliva | 37 |
| 4. | Análise de custo | 40 |
| 5. | Conclusões | 41 |
| 6. | Sugestões para trabalho futuro..... | 42 |
| | Anexos..... | 43 |
| | Bibliografia..... | 46 |

1. Introdução

A palavra cancro é um termo utilizado para um grupo de doenças, que se caracteriza pelo crescimento anómalo de células que afeta partes do corpo humano e que posteriormente se pode espalhar para outros órgãos. O cancro, também denominado de tumor maligno ou neoplasia, é a segunda principal causa de morte em todo o mundo e que segundo estimativas de 2018 foi responsável por 9,6 milhões de mortes. De outra forma, uma em cada seis mortes são provocadas por tumores malignos [1].

Outro facto inerente a esta doença é que 70% das mortes por cancro dizem respeito a países em desenvolvimento. Este facto deve-se a maior parte destes países não terem disponíveis os serviços necessários no setor público para que o cancro seja detetado ainda num estágio inicial, uma vez que o impacto económico que esta doença implica é significativo e cada vez maior [1].

São muitos os tipos de cancro existentes e entre eles está o cancro da cavidade oral em que a taxa de mortalidade em geral é maior nos países em desenvolvimento (figura 1). Esta é das neoplasias mais comuns em países em desenvolvimento, como por exemplo, na Índia. Este país do sul da Ásia, tem uma elevada incidência de cancro oral bem como de lesões pré-malignas. Segundo Ayinampudi, B. *et al.*, isso deve-se a diversos fatores, como por exemplo, o consumo de certos alimentos, infeções virais e o tabagismo, uma vez que este é o fator de risco responsável por 22% das mortes por cancro [1,2].

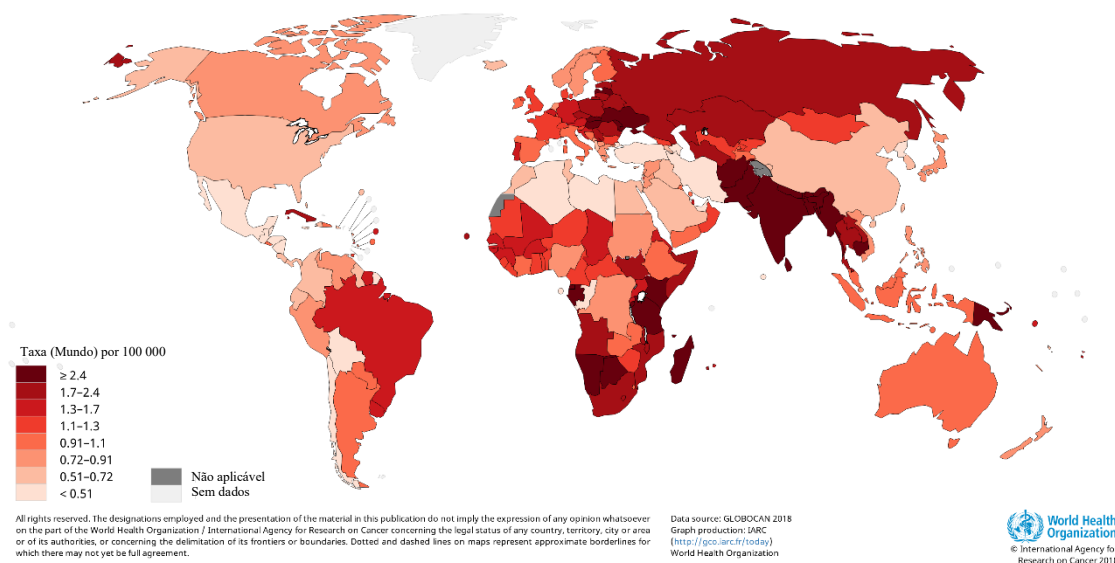


Figura 1 - Taxa de mortalidade padronizada para a idade em 2018 relativamente ao cancro da cavidade oral/lábio (ambos os sexos e todas as idades) [3].

Devido às percentagens alarmantes existe um interesse crescente em identificar biomarcadores que possam auxiliar na compreensão de certas doenças e que possibilitem a realização de estudos populacionais de maneira mais simples e econômica. Em 2002, o “National Institute of Dental and Craniofacial Research” financiou um programa em que o objetivo era o desenvolvimento de técnicas que fossem portáteis para detetar e analisar biomarcadores orais através do fluido salivar de uma forma rápida em que se combinassem técnicas de nanotecnologia e microfluxo [4].

Uma das missões no controlo da “doença da moda” que faz parte da Organização Mundial de Saúde (OMS) é o desenvolvimento de programas de prevenção, diagnóstico precoce, triagem e tratamento. Segundo o diretor-geral desta organização “Ninguém deveria sofrer ou morrer por falta de serviços de diagnóstico, ou porque os testes corretos não se encontravam disponíveis”. Com isto, os testes de diagnóstico tornaram-se indispensáveis para diagnosticar e monitorar doenças, fornecer prognósticos e antecipar respostas ao tratamento [1].

1.1 O cobre no corpo humano

O cobre é um mineral essencial para o organismo responsável pela produção de energia, cofator de diversas enzimas, importante para determinadas proteínas bem como essencial no equilíbrio de outros metais. É um oligoelemento e, como tal, apesar de ser encontrado em concentrações baixas no corpo humano, este tem uma importância significativa em vários processos metabólicos e fisiológicos no ser humano [2,5].

Este mineral é encontrado em concentrações mais altas no fígado e no cérebro e, em concentrações mais baixas, nos rins, coração e pâncreas. A dose média diária recomendada é de 0,6 a 1,6 mg para um adulto e entre 0,26 a 0,68 mg para as crianças conforme a idade [5,6].

Em sistemas biológicos, geralmente este metal de transição é encontrado sob a forma de íão cúprico (Cu^{2+}) e cerca de 90% do cobre no corpo humano é encontrado ligado a uma glicoproteína sérica, a ceruloplasmina (proteína transportadora de cobre), que é sintetizada e secretada pelo fígado [5].

O cobre é absorvido principalmente no duodeno e uma pequena parte no estômago e na porção distal do intestino delgado. Depois deste ser absorvido pelas células do intestino (enterócitos), é transportado por proteínas até ao fígado onde é depois incorporado na ceruloplasmina. Quando a ceruloplasmina se liga aos recetores na superfície das células

o cobre é libertado e entra nas células. A maior parte da eliminação do cobre ocorre através da biliar, e uma pequena parte é excretada pela urina, suor e menstruação [5].

Conforme já foi referido, o cobre é um oligoelemento importante que faz parte de uma variedade de processos biológicos indispensáveis de oxidação-redução. É ainda um cofator importante de proteínas, por exemplo, da ceruloplasmina (Cp). Esta proteína contém na sua estrutura sete iões de cobre o que representa mais de 70% do cobre total que circula no sangue. Para além da função de fornecer o cobre às células esta proteína também é responsável por catalisar o Fe^{2+} para o Fe^{3+} (forma como se liga à proteína transportadora de ferro) [6].

Embora o cobre seja essencial para a vida humana, quando se encontra em quantidades muito elevadas torna-se tóxico, provocando reações de oxidação-redução do tipo Reação de Fenton, provocando danos nas células [7].

A deficiência e o excesso de cobre encontram-se geralmente associadas a duas patologias genéticas raras: síndrome de Menkes e a doença de Wilson. Para além destas duas patologias, a aceruloplasminemia (mutação no gene da ceruloplasmina), a doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares e o cancro são exemplos de patologias que se encontram associadas também ao metabolismo do cobre no corpo humano [6].

1.2 O cobre na saliva

1.2.1 A saliva como matriz biológica

A saliva é um fluido transparente, aquoso e exócrino com pH a variar entre 6 a 7, constituído por 99% de água. A restante percentagem encontra-se distribuída por diversos eletrólitos, sendo os mais abundantes, o sódio, potássio, cloreto e bicarbonato, por proteínas (enzimas e imunoglobulinas) e outros componentes que são importantes para a saúde oral. Entre eles a glicose e alguns produtos metabólicos nitrogenados, como a ureia e amônia. Este fluido é segregado principalmente pelas três glândulas salivares principais: parótida, submandibular e sublingual. A saliva pode ainda ser dividida em saliva estimulada e não estimulada. A primeira contribui para 80 a 90% da produção diária de saliva e diz respeito à que é produzida devido a estímulos gustativos, mecânicos e olfativos. Por outro lado, a saliva não estimulada corresponde à pequena percentagem que continua a ser produzida sem estimulação externa e que hidrata e lubrifica os tecidos orais [8,9].

O fluido salivar tem um papel importante na manutenção da saúde oral e desempenha várias funções. Por exemplo, a proteção e lubrificação dos tecidos orais que ocorre devido à mucina (proteína da saliva), a ação antibacteriana, diluição, digestão, reparação de tecidos e a manutenção da integridade dentária (remineralização e a desmineralização) [8].

A composição e o fluxo salivar podem ser alterados por diversos fatores e variam de indivíduo para indivíduo. Para além disso, pode ainda variar para o mesmo indivíduo em diferentes situações e alturas do dia. No entanto, um adulto saudável produz cerca de 500 a 1500 mL de saliva por dia a uma taxa de 0,5 mL/min [10]. Como exemplo dos fatores que são responsáveis por essas variações, tanto quantitativas como qualitativas, é de destacar os hábitos alimentares, tabagismo, medicação, exercício físico, patologias, febre, gravidez, stress, estimulação visual conforme já foi referido, uso de pastilhas elásticas, entre outros [8,10].

Tem havido um aumento crescente no interesse na saliva como ferramenta de diagnóstico clínico por ser uma matriz biológica de recolha não invasiva, que fornece um meio adequado para triagem de muitas patologias. No entanto, é importante estabelecer uma padronização para a recolha tendo em conta todos os fatores que podem fazer variar esta matriz. Esta é uma alternativa a outros fluidos por possuir uma recolha e manuseamento fácil, rápido, simples, seguro para o paciente e operador, de baixo custo e não requer experiência profissional específica. Para além disso, a amostragem é não invasiva ao contrário da recolha de sangue. Estas vantagens permitem que a monitorização seja feita de uma forma mais simples e agradável em pacientes mais complicados de lidar e em idosos e crianças nas quais as amostras de sangue ou urina são mais difíceis de obter. Esta alternativa traz também claras vantagens em locais onde os cuidados de saúde são limitados [4].

No entanto, como desvantagem, durante a recolha deste fluido biológico a quantidade disponível para colheita por vezes é reduzida e geralmente os biomarcadores presentes encontram-se em concentrações muito baixas. É ainda necessário ter atenção à integridade da amostra devido à sua vulnerabilidade, uma vez que esta pode ser alterada, por exemplo, devido às técnicas de amostragem uma vez que estas geralmente não são estéreis. Para além disso, pode haver interferência causada pelos constituintes do material usado para a recolha [9,10].

O diagnóstico através da saliva é uma área que cada vez mais está a ser considerada como parte do diagnóstico de uma doença, acompanhamento clínico e tomada de decisões

importantes para o atendimento ao paciente. A saliva tem sido utilizada principalmente para fins de pesquisa e diagnóstico de doenças orais e sistêmicas que envolvem as glândulas salivares e a cavidade oral, como por exemplo, tumores orais benignos e malignos. Isto deve-se ao facto de que seria desnecessária a recolha de sangue caso seja possível obter os mesmos resultados ou idênticos, sem a necessidade de recorrer a métodos mais invasivos. Este tipo de avaliação também possibilita a realização de pesquisas em populações de uma maneira mais simples e económica [4,10].

1.2.2 Patologias associadas ao cobre salivar

O cobre faz parte do grupo de oligoelementos que têm sido mais estudados em pacientes com tumores pré-malignos e malignos da cavidade oral uma vez que têm um papel importante na carcinogénese. Para além disso, estas patologias geralmente são acompanhadas por alterações nas concentrações de um ou mais oligoelementos em alguns fluidos corporais, como o soro ou plasma sanguíneo [11].

Com isto, se for possível fazer o diagnóstico precoce de lesões pré-malignas com base nos valores destes elementos, há uma elevada probabilidade de diminuir a passagem de lesões pré-malignas a malignas [12].

São vários os estudos que analisam os níveis de cobre e outros elementos no sangue e em tecidos pré-malignos e malignos da cavidade oral. No entanto, na saliva os estudos ainda são muito escassos apesar de haver uma proximidade anatómica entre esta e as estruturas onde ocorrem as lesões [2]. As zonas da cavidade oral que são geralmente mais afetadas são o pavimento da boca (mucosa abaixo da língua), o bordo lateral da língua e o palato mole. O aparecimento do cancro oral geralmente tem origem numa lesão pré-existente potencialmente maligna [11,12].

O cancro da cavidade oral é a sexta causa de morte no mundo em que 50% dos pacientes que são diagnosticados anualmente com este tumor não sobrevivem. Esta neoplasia tem uma prevalência muito acentuada em países do sul e sudoeste da Ásia, como por exemplo, na Índia e Sri Lanka, facto que pode ser explicado pelos escassos recursos para diagnóstico precoce, mas também como resultado do crescimento e envelhecimento da população [11]. Para além disso, na Índia existe uma forte incidência de lesões pré-malignas com elevada taxa de transformação maligna, como é o exemplo da fibrose da submucosa oral. Um dos fatores que contribui para tal condição é o hábito da população que ali reside de mastigar noz de areca (fruto da palmeira areca) ou de misturar a folha da

planta da noz de areca no tabaco. Isto provoca um fluxo abundante de saliva vermelha que mancha os lábios e os dentes e tem um efeito semelhante ao da nicotina. A noz de areca contém um alto nível de cobre (302 nmol/g) quando comparado com as nozes mais conhecidas (22 a 173 nmol/g). Quem é consumidor habitual deste tipo de alimento consome mais de 5 mg de cobre por dia [2,13].

O cobre desempenha um papel importante no crescimento e progressão da neoplasia em causa, principalmente em estágios iniciais, uma vez que os iões geram radicais livres, que podem ativar as vias de sinalização para a proliferação celular. Quando ocorre a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) no local do tumor, isto permite que as células cancerígenas saiam do local de origem e passem para outros locais através da corrente sanguínea. Logo, este é um processo complexo e essencial para o crescimento, invasão e metástase do tumor em que o cobre atua como estimulador da angiogênese [6]. O nível de ceruloplasmina aumenta de quatro a oito vezes durante a progressão maligna [2].

O cobre está presente na saliva aproximadamente entre 6 a 180 µg/L dependendo se é um indivíduo saudável, se tem uma lesão pré-maligna ou cancro da cavidade oral (tabela 1).

Tabela 1 - Valores de cobre esperados na saliva.

| Ayinampudi, B. et al. (2012) | | |
|--|----------------------------------|------------------------------|
| Grupo | Intervalo de concentração | Média da concentração |
| Indivíduo saudável | 5,83 a 12,78 µg/L | 9,08 µg/L |
| <u>Lesões pré-malignas:</u> Fibrose da submucosa oral Leucoplasia Líquen plano oral | 40,38 a 213,50 µg/L | 77,22 µg/L |
| Cancro da cavidade oral | 50,12 a 179,9 µg/L | 86,93 µg/L |
| Mohammed, F. et al. (2015) | | |
| Grupo | Média da concentração | |
| Indivíduo saudável | 8,393 µg/L | |
| Fibrose da submucosa oral | Grau 1 | 19,640 µg/L |
| | Grau 2 | 23,950 µg/L |
| | Grau 3 | 41,378 µg/L |

Como acontece com outros fluidos biológicos, a concentração iónica salivar é geralmente medida por elétrodos seletivos de iões (ISE) [10], espectrofotometria de absorção atômica

(EAA) [2], métodos colorimétricos [14], espectrofotometria de raios gama [2], métodos espectrofotométricos tradicionais [10], NAA (Thermal Neutron Activation Analysis) [2] e por ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) [2,7].

No entanto, apesar de todas as técnicas mencionadas anteriormente terem sensibilidade relativamente alta, envolvem infraestruturas laboratoriais complexas e têm de ser operadas por pessoal de laboratório com formação específica. Para além disso, acarretam elevados custos económicos o que por si só é suficiente para não estarem disponíveis em países em desenvolvimento. Nestes locais, os testes de diagnóstico rápido e no local são preferíveis. Sendo assim, há um elevado interesse no desenvolvimento de novas metodologias com potencial para diagnóstico rápido de biomarcadores de forma a melhorar a eficiência na utilização de fluidos biológicos como a saliva e a relação custo-benefício. Para este fim, os métodos de análise em papel têm ganho um interesse crescente.

1.3 Análises em papel

A área do microfluxo e da análise em papel encontra-se cada vez mais a ganhar um papel importante na investigação e na indústria no desenvolvimento de novos métodos e dispositivos para diversas áreas devido às suas vantagens e por estar dentro dos parâmetros estabelecidos para um mundo mais ecológico.

O conceito de análise em papel já vem de meados do século XVII quando Boyle introduziu o papel nos indicadores de ácido-base. Mas foi em 2007 que este método analítico cresceu de forma exponencial pelas mãos de George Whitesides e a sua equipa para a deteção simultânea de glicose e proteína na urina [15,16].

Os dispositivos analíticos microfluídicos em papel (μ PADs) são dispositivos compostos por duas zonas: a zona hidrofílica e a zona hidrofóbica. A zona hidrofílica geralmente é constituída por papel uma vez que este apresenta claras vantagens para fins analíticos. É um material económico, disponível em diversos tamanhos, espessuras e porosidades, é leve, fácil de transportar/armazenar, descartável e biodegradável. Além disso, este conjunto de características são importantes para a imobilização de reagentes [15,17,18]. Sendo o papel constituído por fibras de celulose, devido ao seu processo de produção, estas possibilitam o transporte de líquidos sem necessidade de forças externas ao contrário de outros métodos de microfluxo. Com a adição de soluções aquosas (reagentes e amostras) na zona hidrofílica estas penetram o papel por fenómenos de capilaridade

horizontal ou vertical. Como tem a capacidade de absorver soluções, este material possibilita o armazenamento dos reagentes no interior do papel e também pode servir para filtrar as amostras [17,19].

No processo de fabricação dos dispositivos são diversos os métodos utilizados para criar as duas zonas distintas. Geralmente, criam-se as zonas hidrofílicas que ficam separadas entre si por barreiras hidrofóbicas ou físicas dependendo do método utilizado de forma a limitar e direcionar o fluxo a um local específico. Os mais comuns são a impressão a cera ou o corte do papel uma vez que estas técnicas apresentam um balanço equilibrado entre custo-benefício bem como simplicidade quando comparadas com outras técnicas existentes. Para além disso, é ainda possível conceber sistemas de fluxo lateral a duas dimensões (2D) ou fluxo lateral ou vertical a três dimensões (3D). Os μ PADs 3D podem ser fabricados de diversas maneiras. Uma das formas é através do método origami, que consiste em dobrar o papel de filtro ficando assim com o número de camadas pretendidas conforme o número de vezes que este é dobrado (figura 2) [15,17].

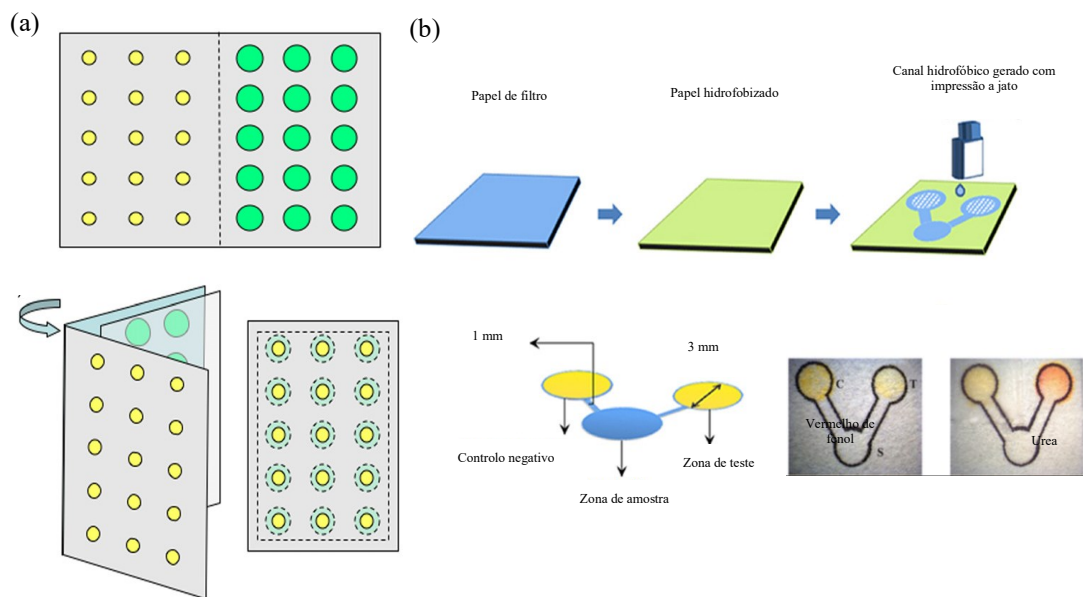


Figura 2 - Exemplo de μ PADs presentes na literatura. (a) μ PAD para determinação de fosfato em águas com utilização de impressão a jato de tinta e o método origami [15]. (b) Imagem adaptada de [15] para teste de urease com utilização de impressão a jato de tinta com fluxo horizontal.

Quanto aos métodos de deteção disponíveis para utilizar nos μ PADs existem vários. Na literatura são mencionados nomeadamente a colorimetria, a fluorescência, a eletroquímica e a fotoeletroquímica. No entanto, sendo o μ PAD um dispositivo de fácil utilização e portátil o método de deteção é um desafio, uma vez que no momento da

escolha deve-se ter em conta que este inclua a minimização do equipamento necessário, do pessoal especializado e dos custos de forma a fazer prevalecer as vantagens associadas ao μ PAD [15,17].

A colorimetria é um dos métodos utilizados mais frequentemente e que pode ser utilizada quer por comparação visual (olho nu) para uma análise qualitativa quer por digitalização/fotografia do dispositivo após ocorrer a reação colorimétrica entre as soluções que geram um produto colorido [15,17].

O produto colorido formado depois pode ser detetado/quantificado através da informação obtida pelos dispositivos de captura de imagem através de programas de análise de cores (por exemplo: ImageJ e Adobe Photoshop). Posteriormente, os valores de intensidade de cor, dependendo do objetivo, podem ser transformados em absorvância através da lei de Beer-Lambert (equação 1.3.1) e de seguida colocados em gráficos de regressão linear que relacionam a concentração do analito e a absorvância [15,20].

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (1.3.1)$$

Na equação, A é a absorvância, I_0 é a intensidade média da cor medida do branco e I é a intensidade de cor média medida do branco/padrão/amostra. A absorvância é o logaritmo da razão entre as intensidades.

Estes testes de diagnóstico estão cada vez mais a ser estudados com o intuito de serem aplicados em países em desenvolvimento. Nestes locais o acesso às tecnologias para prevenção e tratamento de doenças é muito escasso devido aos custos económicos inerentes [18,19,21].

Este método analítico possui uma tecnologia inovadora que apresenta diversas vantagens, tais como, fabricação simples, utilização de uma quantidade muito reduzida de amostra e reagentes, capacidade de armazenar/misturar reagentes, ser descartável por incineração e baixo custo de produção. Para além disso, a sua utilização não requer manipulação de reagentes, infraestruturas laboratoriais complexas nem profissionais com formação específica. Estes dispositivos também tem a clara vantagem de serem portáteis o que é útil para utilizar em países em desenvolvimento, bem como permitem eliminar a necessidade de armazenar amostras em laboratório diminuindo o risco de contaminação e degradação de amostras [17,18,21].

As análises com estes dispositivos são mais rápidas, económicas e fornecem a possibilidade de analisar várias amostras em simultâneo num só dispositivo ou então realizar análises multiparamétricas [17,21].

Todas estas vantagens cumprem as diretrizes definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para testes de diagnóstico para os países em desenvolvimento: “ASSURED” (affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid and robust, equipment-free and delivered to those in need) [19].

São várias as áreas onde os dispositivos microfluídicos em papel já foram e continuam a ser aplicados. Desde a área ambiental e alimentar, mas mais particularmente a nível de diagnóstico clínico (supervisionamento e controlo de doenças) [17,19].

Conforme já foi referido, na área do diagnóstico clínico são várias as aplicações e algumas delas já se encontram comercializadas (testes de gravidez). Os μ PADs também já foram aplicados com sucesso em várias análises salivares (diagnosticar doenças como os diabetes), em análises urinárias e sanguíneas para detetar imunoglobulinas específicas da dengue no fluido salivar [15] e em aplicações dentárias [16,18]. Ainda na saliva foi testado o potencial do μ PAD para avaliar o risco dos pacientes desenvolverem cancro oral através dos aldeídos salivares [16]. Nos países em desenvolvimento os μ PADs são bastantes úteis pelo facto de que poderão auxiliar no plano de tratamento de doenças que têm associadas elevadas taxas de mortalidade, como por exemplo, infeções respiratórias, malária e HIV/AIDS [17].

No entanto, o potencial dos μ PADs não está apenas na área médica, mas também na segurança alimentar e ambiental. Por exemplo, para deteção de contaminação de águas, solos ou ar bem como no controlo de alimentos e bebidas. Mais uma vez os dispositivos analíticos são muito úteis para os países com recursos limitados em qualquer uma das áreas para avaliar por exemplo, a qualidade da água potável após um desastre natural [17]. Apesar da potencialidade dos μ PADs para o diagnóstico em países em desenvolvimento, estes também têm potencial como ensaios de diagnóstico a ser usados por socorristas e militares em operações que ocorrem em ambientes adversos, na assistência médica ao domicílio e/ou em laboratórios clínicos para triagem [21].

1.4 Reação colorimétrica

Na escolha do reagente colorimétrico para a determinação de analitos, a necessidade de seletividade e sensibilidade adequada são dois pontos importantes a ter em conta.

Segundo a literatura, no caso do cobre os métodos mais promissores para a determinação deste na ordem dos micromolar é através da utilização de reagentes colorimétricos seletivos como a cuproína, neocuproína ou batocuproína que reagem com o cobre (I) e formam complexos catiónicos coloridos [22].

A batocuproína (2,9-Dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina) tem como vantagem o facto de o produto da reação ter uma absorvidade molar alta. É um reagente comum, altamente seletivo e sensível para a determinação espectrofotométrica de cobre que forma um complexo estável cor-de-laranja com comprimento de onda por volta dos 479 nm [23,24]. Este reagente forma um complexo catiónico com o cobre (I) que, por sua vez, reage com duas moléculas de batocuproína (estequiometria 1:2) no intervalo de pH entre 4 a 8 (figura 3) [20,25].

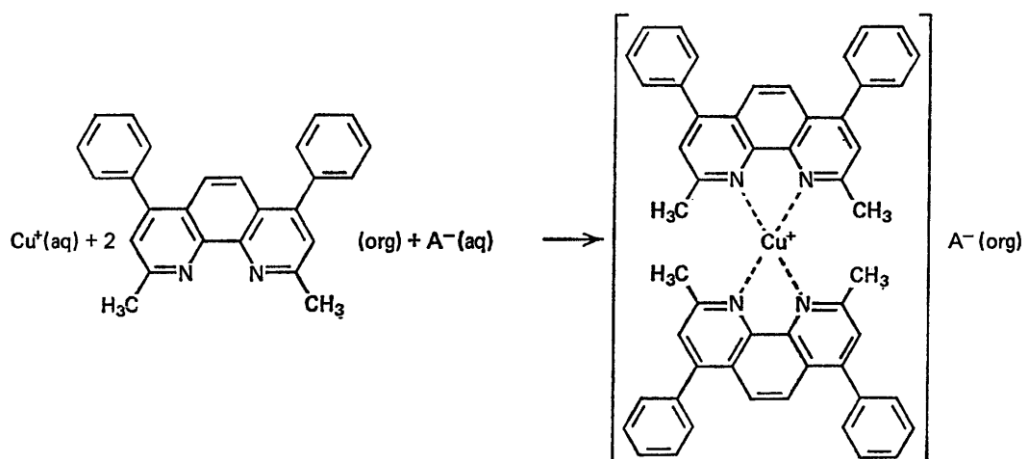


Figura 3 - Reação colorimétrica que descreve a formação do complexo como resultado da reação entre o cobre (I) e 2 moléculas de batocuproína [26].

Como o estado de oxidação do cobre no complexo é Cu (I) e na saliva humana para detecção de lesões pré-malignas e malignas é Cu (II), é necessário reduzir o cobre antes da formação do complexo. Para realizar esse processo, pode-se recorrer à hidroxilamina que é frequentemente utilizada em laboratório como um forte agente redutor para reduzir o Cu (II) → Cu (I) (figura 4) que é utilizado por diversos autores para a determinação de cobre, como por exemplo, Horstkotte, B. *et al.*, Capitán-Vallvey, L. *et al.*, Carter, M. and Small, R. e Toral, I. *et al.* [23,25,27,28].

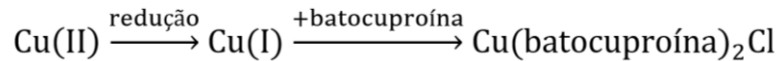


Figura 4 - Reação de redução do cobre (II) para cobre (I) pela hidroxilamina e posterior reação deste último com a batocuproína. Adaptado de [26].

O complexo formado entre a batocuproína e o cobre é utilizado na área ambiental, alimentar e/ou clínica. Por exemplo, na determinação de cobre em águas (área ambiental) [22], em amostras de comida (área alimentar) [29], e em plasma sanguíneo (área clínica) [25,30]. Com isto, a batocuproína pode ser utilizada como reagente para determinação de Cu^{2+} na presença de um agente redutor (hidroxilamina), tal como já foi realizado em diversos estudos.

1.5 Objetivo

O objetivo deste projeto foi o de desenvolver um dispositivo analítico em papel para a determinação/quantificação de cobre em amostras de saliva humana. Pretendia-se que este dispositivo fosse descartável, portátil e de aplicação *in loco* permitindo uma quantificação rápida e eficaz em locais com recursos limitados. A escolha de um dispositivo com base na análise em microfluxo no papel (μPADs) permite tornar todo o processo mais económico.

2. Material e Métodos

2.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas a partir de reagentes de elevado grau de pureza e água Milli-Q (resistividade > 18 MΩ cm, Millipore, Bedford, MA, EUA).

A solução de batocuproína foi obtida pela dissolução de 36 mg de sólido (2,9-Dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina) (Sigma-Aldrich, Alemanha) em 50,0 mL de etanol correspondendo a uma concentração de 2,0 mM.

O agente redutor, hidroxilamina (NH₂OH·HCl), foi preparado como descrito por Santos *et al.* (2015), ou seja, dissolvendo 2,1 g do sólido (Sigma-Aldrich, Alemanha) em 0,6 mL de ácido clorídrico 6 M e diluindo até 10,0 mL com água. O ácido clorídrico 6 M foi diluído a partir do concentrado (37% e d=1,19) (José M. Vaz Pereira, Lisboa, Portugal). Obteve-se uma concentração final de 215 g/L de hidroxilamina e 0,36 M de HCl [31].

A solução tampão de carbonato de 0,60 M foi preparada dissolvendo 2,5 g de hidrogeno carbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 50,0 mL. O pH foi ajustado para 6,99 com ácido clorídrico 1 M.

Para preparar o reagente de cor, misturou-se 1125 μL da solução de batocuproína, 150 μL da solução do agente redutor, 150 μL da solução tampão e adicionou-se o restante com água.

A saliva sintética (SS) foi preparada baseado no descrito em Batista *et al.* (2016) [32]: para 100 mL de SS pesou-se 224,1 mg de KCl (Merck, Darmstadt, Alemanha), 55,3 mg de KH₂PO₄ (Panreac química, Barcelona, Espanha), 8,4 mg de CaCl₂·2H₂O (Merck, Darmstadt, Alemanha), 4,2 mg de MgCl₂·6H₂O (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 480,4 mg de HEPES (Sigma-Aldrich, Alemanha). Preparou-se também uma saliva sintética com proteína (SSP) onde se adicionou à receita anterior 275 mg de Albumina de Soro Bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, Alemanha).

A solução-mãe de cobre (II) de 50 mg/L foi obtida por diluição rigorosa da solução comercial (padrão de absorção atômica) de 1000 mg/L (Sigma-Aldrich, Alemanha). Uma solução intermédia de 1 mg/L foi obtida por diluição da solução stock de 50 mg/L e usada para preparar as soluções padrão de Cu (II) no intervalo de 25 a 500 μg/L.

2.2 Design e montagem do μ PAD

Para a montagem do μ PAD utilizaram-se discos de papel de filtro alinhados em bolsas de plastificar (Staples, tamanho 75x105 mm, 125 μ m). A combinação destes dois materiais após o processo de plastificação permitiu a conjugação de duas zonas distintas: a zona hidrofóbica e a zona hidrofílica. A zona hidrofílica é constituída pelos discos de papel de filtro que ficam separados e delimitados fisicamente pela zona hidrofóbica que é criada pela plastificação. O dispositivo desenvolvido é constituído por 4 linhas e 6 colunas de zonas hidrofóbicas possibilitando assim 24 locais de aplicação de amostra. Para tal, as bolsas de plastificar são previamente furadas com um furador de metal (Amazon) com furos de diâmetro 3,175 mm (figura 5).

O μ PAD é constituído por duas camadas com papéis de filtro distintos alinhados um com o outro (figura 5). A camada B é constituída por discos de papel de filtro Whatman[®] 42 (“Ashless Quantitative”) de 6,35 mm de diâmetro e a camada C é constituída por papel de filtro Whatman[®] 3 (“Qualitative”) de 12,7 mm de diâmetro. Posteriormente, adicionou-se à camada B o reagente de cor e à camada C não foi feita adição nenhuma. Após isto, fez-se o alinhamento dos discos de papel nas bolsas de plastificar (A e D) e procedeu-se ao processo de plastificação (Fellowes, L125-A4). Por fim, foi introduzida a amostra pelos furos feitos inicialmente (camada A) nas bolsas de plastificar que servem como local de aplicação da amostra.

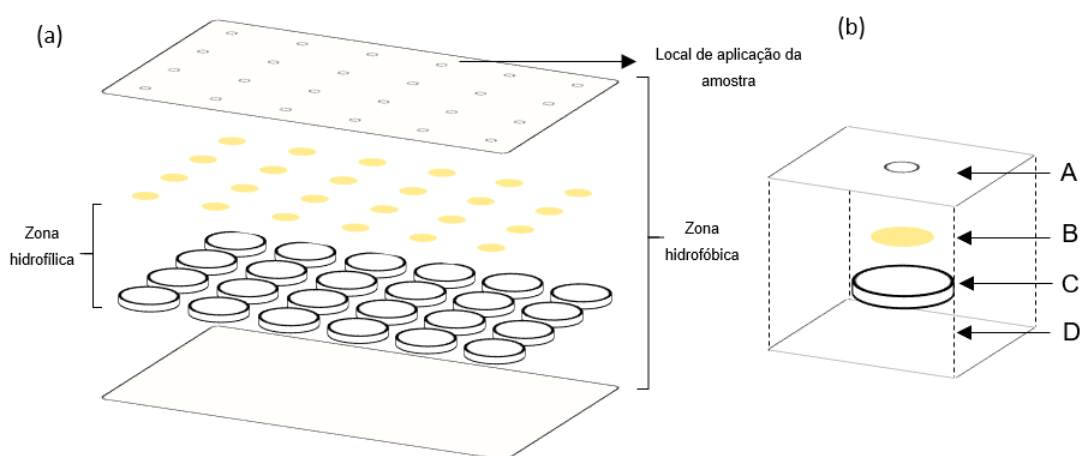


Figura 5 – Diagrama esquemático do μ PAD desenvolvido para determinação de cobre salivar: (a) Projeto 3D do μ PAD final; (b) Projeto 3D do μ PAD com indicação das diferentes camadas da montagem.

2.3 μ PAD para determinação de cobre

Aos discos de papel de filtro da camada B adicionou-se 4 μ L de reagente que de seguida foram colocados a secar na estufa a 50°C durante 10 minutos. Depois o μ PAD foi montado como descrito acima e, por fim, foram adicionados 25 μ L de solução padrão/amostra em cada um dos orifícios das bolsas de plastificar, esperou-se 20 minutos e colocou-se fita-cola na zona de aplicação da amostra. Após os 20 minutos, tempo para promover a reação e garantir que o μ PAD não se encontrava húmido antes da digitalização, faz-se a aquisição da imagem (Canon, CanoScan LiDE 120).

Para a determinação, os μ PADs foram digitalizados no lado da camada A e as imagens obtidas, em formato JPG, foram convertidas em formato RGB stack através de um software de processamento de imagens, ImageJ, que transforma a imagem numa pilha de 3 fatias (vermelho, verde e azul). Após isto, é seleccionada a camada RGB adequada que neste caso é o azul, uma vez que esta é a cor complementar que o produto colorido da reação em estudo (amarelo/alaranjado) absorve, isto é, o comprimento de onda que o complexo absorve é o da cor complementar. Esta complementaridade de cores pode ser observada na figura 6.

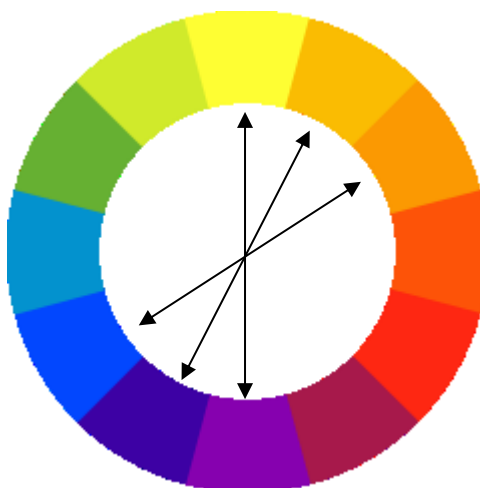


Figura 6 - Círculo cromático.

A medição da intensidade de cor em cada disco foi efetuada com a ferramenta de seleção circular de 80x80 pixels em que a área abrangida é a zona de aplicação da amostra. O resultado que o programa apresenta é a média da intensidade de cor da zona seleccionada

que posteriormente em Excel é convertida em dados de absorvância através da lei de Beer-Lambert (Equação 1.3.1).

A forma escolhida para utilizar o μ PAD permite que seja o mais preciso possível e ao recorrer à lei de Beer-Lambert como esta implica ter um I_0 e um I faz com que a análise tenha mais precisão. Para além disso, como para cada solução padrão/amostra existem seis locais de aplicação, no momento de análise dos dados recolhidos isso permite a eliminação dos “outliers” o que faz com que a análise seja mais refinada e precisa.

2.4 Avaliação da exatidão

Usando o método desenvolvido, foram analisadas duas amostras de água certificadas, a ERM[®]-CA011c (LGC Hard Drinking Water UK) e a ERM[®]-CA021a (LGC 80ft Drinking Water UK).

Adicionalmente, amostras de saliva foram analisadas pelo método desenvolvido e os resultados obtidos foram comparados com os obtidos pelo método comparativo, espectrofotometria de absorção atômica (EAA).

2.5 Amostragem

As amostras de saliva utilizadas neste trabalho foram recolhidas com o consentimento informado de voluntários saudáveis numa ampla faixa etária (18 a 50 anos). Para a recolha das amostras foi solicitado aos voluntários que colocassem uma gaze esterilizada 5x5 cm (Wells) na cavidade oral durante cerca de 2 minutos e posteriormente estas foram espremidas através de uma seringa de 5 mL para um tubo de plástico de 5 mL. As amostras foram usadas no próprio dia com e sem adição de padrão.

3. Resultados e discussão

3.1 Estudo de seleção do reagente

Antes de se desenvolver o dispositivo, foi realizado um estudo no que diz respeito ao reagente de cor a ser utilizado para a determinação de cobre (II) de forma a compreender qual o que fornecia melhor sensibilidade tendo em conta as condições de trabalho. Para tal, foram testadas cinco soluções de reagente que se encontram na bibliografia como reagentes utilizados na determinação de cobre: 1-(2-Piridilazo)-2-naftol (PAN), Ditizona (DTZ), Neocuproína (NC) e Batocuproína (BC).

O PAN e a DTZ reagem com o cobre (II) enquanto que a NC e a BC reagem com cobre (I). Uma vez que a determinação pretendida é do cobre (II), no caso destes dois últimos reagentes houve a necessidade de adicionar um agente redutor.

3.1.1 Estudos preliminares - “In vitro”

O estudo destes reagentes primeiramente foi realizado in vitro e para as determinações espectrofotométricas foi utilizado um espectrofotómetro USB-ISS-VIS com USB2000 (Ocean Optics), com uma cuvete de quartz de 1,0 cm de percurso ótico e 3,0 mL de volume interno em que foi medida a intensidade de cor ao comprimento de onda respetivo de cada reação. Os resultados foram tratados no software “SpectraSuite”.

O intervalo de concentrações em que este estudo foi realizado foi de 25 a 1000 µg/L.

Foram realizadas várias curvas de calibração com diferentes condições, nomeadamente de pH, para as diferentes reações. No caso da batocuproína, por exemplo, testou-se duas soluções tampão a pH diferentes na reação uma vez que segundo a literatura o pH ótimo desta reação está no intervalo de 4-8. Para tal, testou-se o citrato de sódio a pH 4 e a solução tampão de carbonato a pH 7. Verificou-se que apenas para a solução tampão a pH 7 (solução tampão de carbonato) a reação tinha um comportamento linear.

Na tabela 2 encontram-se descritas as condições em que foram feitas as curvas de calibração.

Tabela 2 - Condições de análise e respetivos volumes utilizados em cada uma das reações.

| Estudo | Condições de reação: Volume Padrão + Volume reagente 1 + Volume reagente 2 |
|--------|--|
| 1 | 2 mL de solução padrão + 0,500 mL de solução de PAN + 100 µL de HCO ₃ ⁻ 0,6 M (pH = 11) |
| 2 | 2 mL de solução padrão + 0,500 mL de solução de DTZ + 100 µL de citrato de sódio 0,1 M (pH = 3) |
| 3 | 2 mL de solução padrão + 0,500 mL de solução de NC + 50 µL de citrato de sódio 0,1 M (pH = 3) + 50 µL de agente redutor |
| 4 | 2 mL de solução padrão + 0,500 mL de solução de BC + 50 µL de HCO ₃ ⁻ 0,6 M (pH = 7) + 50 µL de agente redutor |

Na figura 7 encontram-se os resultados obtidos no que diz respeito aos declives registados de cada uma das curvas de calibração resultantes das quatro reações.

Por análise do declive das retas dos gráficos de absorvância em função da concentração do catião cobre optou-se por testar três dos reagentes (PAN, DTZ e BC) em µPAD.

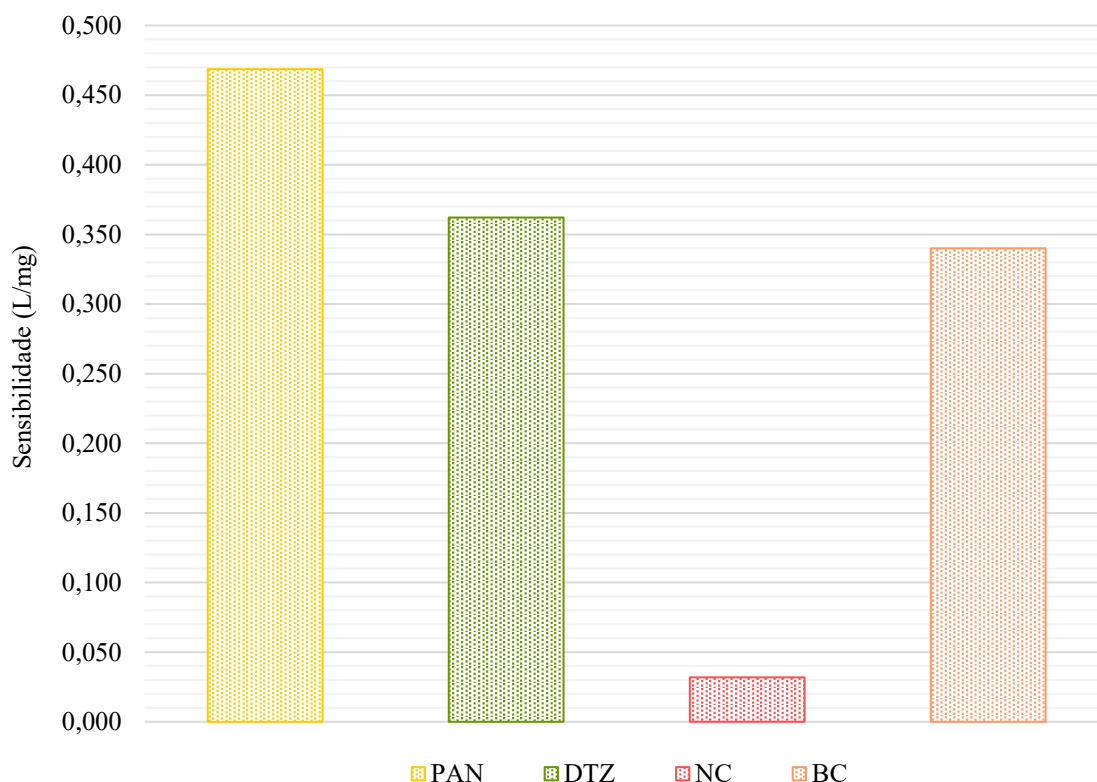


Figura 7 - Variação da sensibilidade do método para o estudo da influência do reagente "in vitro" consoante o reagente colorimétrico utilizado.

3.1.2 Estudos preliminares - μ PAD

Em μ PAD, testou-se a reação do cobre com o PAN, DTZ e BC. Para tal, foram preparados μ PADs logo de início com duas camadas para permitir a colocação de um volume maior de amostra com menor tempo de absorção do que iria acontecer apenas com uma camada. As leituras deste dispositivo foram efetuadas após a sua montagem e após a adição de padrões e/ou amostras.

No caso da solução de DTZ, quando esta estava em contacto com os discos de papel de filtro (independentemente do suporte onde estavam, isto é, papel, folha de alumínio ou placas de Petri) ocorria reação imediata. Também se verificou que, independentemente da forma como se manuseavam os discos de papel de filtro (com luvas de latex, vinil, nitrilo ou contacto com a pele), a reação ocorria na mesma. Numa última tentativa, de forma a testar a sensibilidade à luz, foi testado fazer a impregnação dos discos no escuro, mas não se verificou diferença. Tendo em conta estas observações, a DTZ não foi possível de ser utilizada em μ PAD, testando-se apenas o PAN e a BC.

Para tal, foram montados dois conjuntos de μ PADs para realizar as curvas de calibração. Para a montagem optou-se pela utilização de discos de papel de filtro de 9,5 mm para ambas as camadas. Na camada B utilizou-se Whatman[®] 50 e na camada C Whatman[®] 1. A camada B foi impregnada com 5 μ L de reagente de cor. Os furos nas bolsas de plastificar foram de 3,175 mm e o volume de solução padrão foi de 20 μ L. O intervalo de concentrações das soluções padrão utilizadas foi de 50 μ g/L a 750 μ g/L. No caso do PAN os 5 μ L de reagente de cor foram de um mix de 500 μ L de PAN 0,48 mM com 100 μ L de HCO_3^- 0,6 M (pH = 11). No caso da BC o mix foi de 500 μ L BC 0,89 mM, 50 μ L de HCO_3^- 0,6 M (pH = 7) e 50 μ L de hidroxilamina.

Após 40 minutos a secar, a sensibilidade obtida com a BC foi cerca de 10 vezes superior à sensibilidade obtida com o PAN. Isto permitiu concluir que apenas a BC funcionou em μ PAD e uma vez que esta apresentava uma sensibilidade mais alta optou-se por escolher este reagente de cor para a continuação dos testes de desenvolvimento do dispositivo.

3.2 Design do μ PAD – características físicas

Após a escolha do reagente a utilizar, procedeu-se ao desenvolvimento do μ PAD.



Foi realizada uma otimização univariável (estudada 1 variável de cada vez) e para tal foram feitas curvas de calibração e as sensibilidades (declive da regressão linear) foram

comparadas. Segundo a lei de Beer-Lambert prevê-se uma relação linear entre a absorvância e a concentração de analito. O declive ser maior é um indicativo de melhor sensibilidade. O intervalo de concentrações que se utilizou para os estudos que se seguem foi de 50 µg/L a 750 µg/L.

3.2.1 Tempo de secagem/reacção

Usando os primeiros dispositivos que foram utilizados para a escolha do reagente, verificou-se que eram necessários 40 minutos para que a solução padrão fosse absorvida por completo antes de proceder à digitalização. Logo, com o intuito de diminuir o tempo de secagem da amostra testou-se um papel de filtro diferente (Whatman® 3) do inicialmente optado (Whatman® 1). Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 3. A comparação de sensibilidades foi feita aos 40 minutos uma vez que quando se utilizou na camada C o papel de filtro Whatman® 1 foi necessário esse tempo para realizar a digitalização.

Tabela 3 - Estudo da influência do tempo de secagem na sensibilidade: sensibilidade obtida aos 40 minutos e tempo de secagem para cada uma das opções testadas.

| Tipo de papel de filtro | Sensibilidade aos 40 minutos | Tempo secagem |
|---|------------------------------|---------------|
| Whatman® 1  | 0,0342 L/mg | 40 minutos |
| Whatman® 3  | 0,0379 L/mg | 20 minutos |

Após análise dos resultados, conclui-se que o Whatman® 3 é melhor opção uma vez que permite fazer as digitalizações com menos tempo de secagem. Estes resultados devem-se ao facto de o papel de filtro Whatman® 3 apesar de ter características muito semelhantes ao Whatman® 1 tem uma espessura superior. Enquanto que o Whatman® 1 tem uma espessura de 180 µm, o Whatman® 3 tem uma espessura de 390 µm permitindo assim absorver mais rapidamente a mesma quantidade de amostra.

Com este estudo também foi possível retirar conclusões no que diz respeito à influência do tempo de reação e para tal foram feitas as digitalizações dos dispositivos com Whatman® 3 na camada C aos 20, 30 e 40 minutos. Verificou-se que não há um aumento significativo da extensão da reação passados os 20 minutos e que nos limites considerados a reação linear (figura 8).

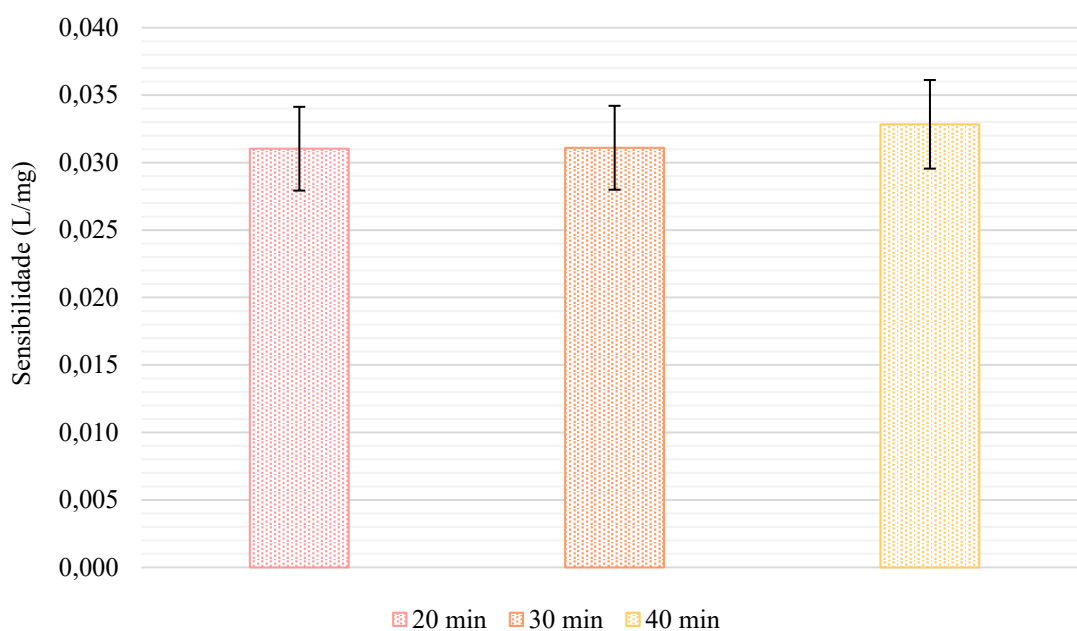


Figura 8 - Influência do tempo de reação na sensibilidade para a condição em que o Whatman® 3 é o papel de filtro da camada C. As barras de erro a preto representam uma variação de 10%.

3.2.2 Diâmetro das camadas hidrofílicas

No que diz respeito ao diâmetro das camadas hidrofílicas, primeiramente estudou-se o diâmetro da camada B com o intuito de diminuir a dispersão do complexo formado nos discos e aumentar o número de moles/cm.

No entanto, quando se diminuiu o diâmetro da camada B de 9,5 mm para 6,35 mm, apesar de não haver diferenças significativas na sensibilidade o tempo de secagem aumentou para os 40 minutos novamente. Com isto, o próximo passo passou por aumentar o diâmetro da camada C para os 12,7 mm ou 12,0 mm de forma a diminuir o tempo de secagem sem afetar a sensibilidade de forma significativa.

Conforme se pode observar no gráfico de barras (figura 9) apesar de não haver diferenças significativas na sensibilidade aos 40 minutos entre as diferentes opções testadas optou-se pela combinação entre os 6,35 mm para a camada B e os 12,7 mm para a camada C

uma vez se consegue combinar um menor tempo de secagem, elevada sensibilidade e facilidade de alinhamento dos discos.

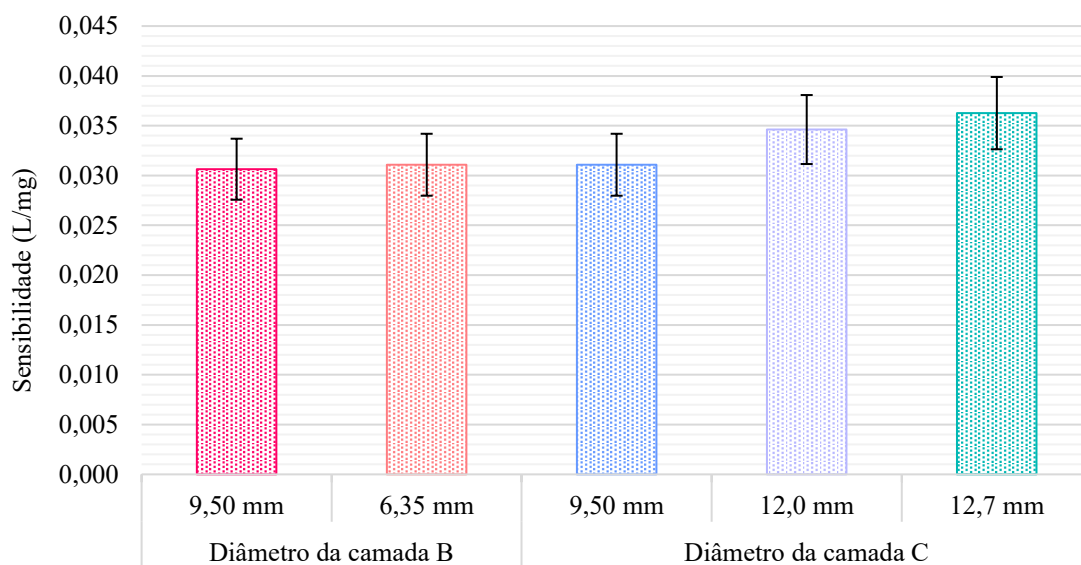


Figura 9 - Influência do diâmetro das camadas B e C na sensibilidade do método. As barras de erro a preto representam uma variação de 10%.

Neste mesmo estudo, e uma vez que para a condição escolhida (6,35 mm para a camada B e 12,7 mm para a camada C) foram feitas digitalizações ao longo do tempo, também foi possível fazer uma análise da sensibilidade ao longo do tempo (figura 10). Dado que não existem diferenças significativas entre as sensibilidades, optou-se pelos 10 minutos tendo em conta que para além desse período de tempo não possibilita uma sensibilidade mais alta de forma significativa e por isso não há a necessidade de aguardar mais tempo para a digitalização.

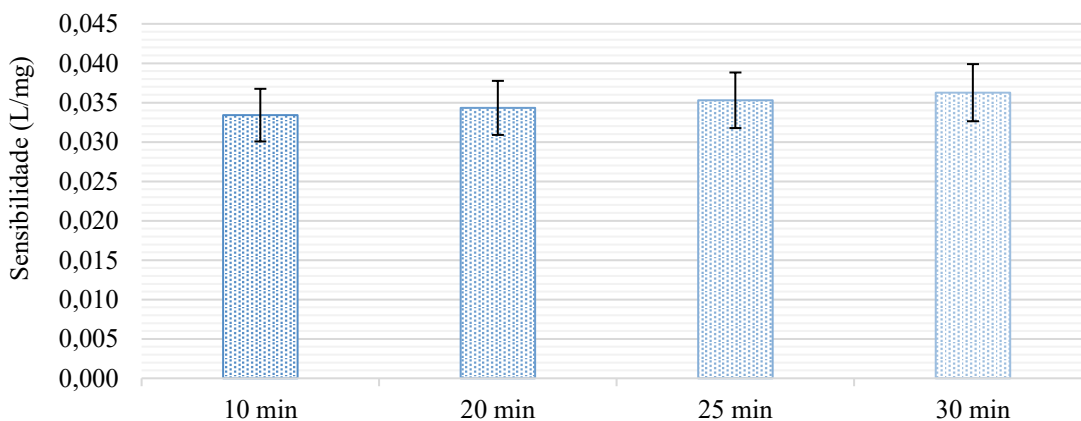


Figura 10 - Influência do tempo de reação na sensibilidade do método para um diâmetro de 6,35 mm (camada B) e 12,7 mm (camada C). As barras de erro a preto representam uma variação de 10%.

3.2.3 Tipo de papel de filtro da camada de reagente

A Whatman[®] oferece uma gama extensa de papéis de filtro (Anexo I). Estes filtros de celulose são divididos em 5 grandes categorias: “Qualitative (Q)”, “General Purpose and Wet Strengthened Qualitative (GPWSQ)”, “Ashless Quantitative (AQ)”, “Hardened Low Ash Quantitative (HLAQ)” e “Hardened Ashless Quantitative (HAQ)”. Dentro de cada uma das categorias são várias as classes de papel com características diferentes, como por exemplo, a porosidade (μm). Com isto, os papéis de filtro utilizados para estudar a camada B, tendo em conta o que estava disponível em laboratório, foram os mencionados na tabela 4.

Tabela 4 - Quadro resumo das características dos papéis de filtro em estudo.

| Classe | Categoria | Porosidade (μm) |
|--------|--------------------------------------|------------------------------|
| 1 | Qualitative (Q) | 11 |
| 4 | Qualitative (Q) | 20-25 |
| 5 | Qualitative (Q) | 2,5 |
| 42 | Ashless Quantitative (AQ) | 2,5 |
| 50 | Hardened Low Ash Quantitative (HLAQ) | 2,7 |
| 541 | Hardened Ashless Quantitative (HAQ) | 20-25 |

Após a realização do estudo, a análise deste foi dividida em duas fases. Primeiramente fez-se uma comparação entre as diferentes porosidades e posteriormente entre as diferentes categorias.

Inicialmente comparou-se o Whatman[®] 1, 4 e 5 uma vez que têm diferentes porosidades, mas pertencem à mesma categoria. Concluiu-se que uma menor porosidade se traduzia numa maior sensibilidade para as medições efetuadas, logo a escolha de um papel com uma porosidade de 2,5 μm era o mais adequado. Seguidamente fez-se a comparação no que diz respeito às diferentes categorias, mas mantendo a porosidade dentro dos valores que antes se traduziram numa maior sensibilidade (2,5 μm). Com isto, utilizou-se o Whatman[®] 5, 42 e 50. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na figura 11.

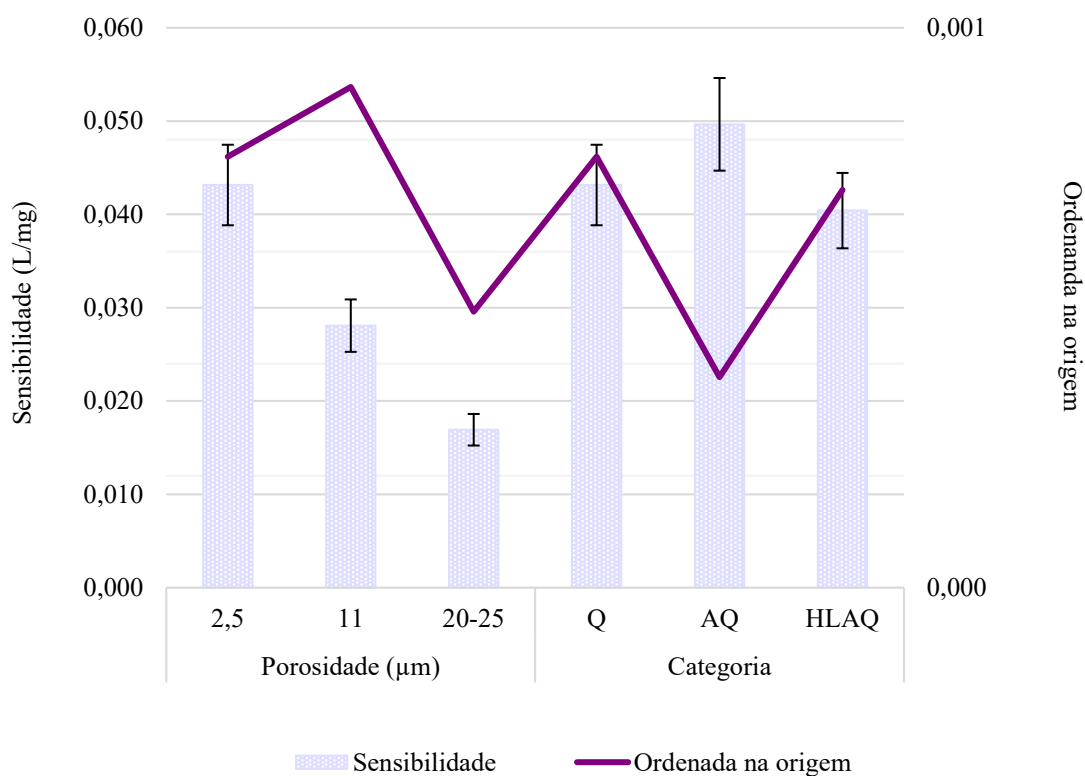


Figura 11 – Influência do tipo de papel de filtro da camada de reagente na sensibilidade do método. As barras a lilás representam a sensibilidade obtida em cada uma das curvas de calibração das condições testadas. As barras de erro a preto representam uma variação de 10% da sensibilidade. A linha a cheio lilás representa a ordenada na origem obtida em cada uma das curvas de calibração.

Após analisar os resultados, o Whatman[®] 42 foi a opção escolhida para os discos de papel da camada B do µPAD. É a melhor combinação em termos de porosidade e categoria que se traduz numa curva de calibração com maior sensibilidade e ordenada na origem mais próxima de zero. Sendo assim, o Whatman[®] 42 foi escolhido como o papel de filtro mais adequado para a camada B do µPAD, quando combinado com o Whatman[®] 3 para a camada de reagente que já tinha sido estudado anteriormente.

3.3 Design do µPAD – características químicas

3.3.1 Estudo da influência da concentração de batocuproína

Foram testadas diferentes concentrações de batocuproína e concluiu-se que, à medida que a concentração aumentava, a sensibilidade (declive), também aumentava (figura 12).

Relativamente às sensibilidades obtidas verificou-se que tendo por base para comparação a sensibilidade obtida para a concentração de 1,67 mM obteve-se um desvio relativo de 42% para a concentração de 0,417 mM, 12% relativamente à de 0,833 mM e 6% para a de 1,25 mM. Logo, uma concentração de 1,25 mM proporciona uma maior sensibilidade relativamente às concentrações mais baixas e não é significativamente diferente quando comparada com uma concentração de 1,67 mM. Logo, com o intuito de manter uma relação de compromisso entre a sensibilidade e o consumo optou-se pela sensibilidade de 1,25 mM.

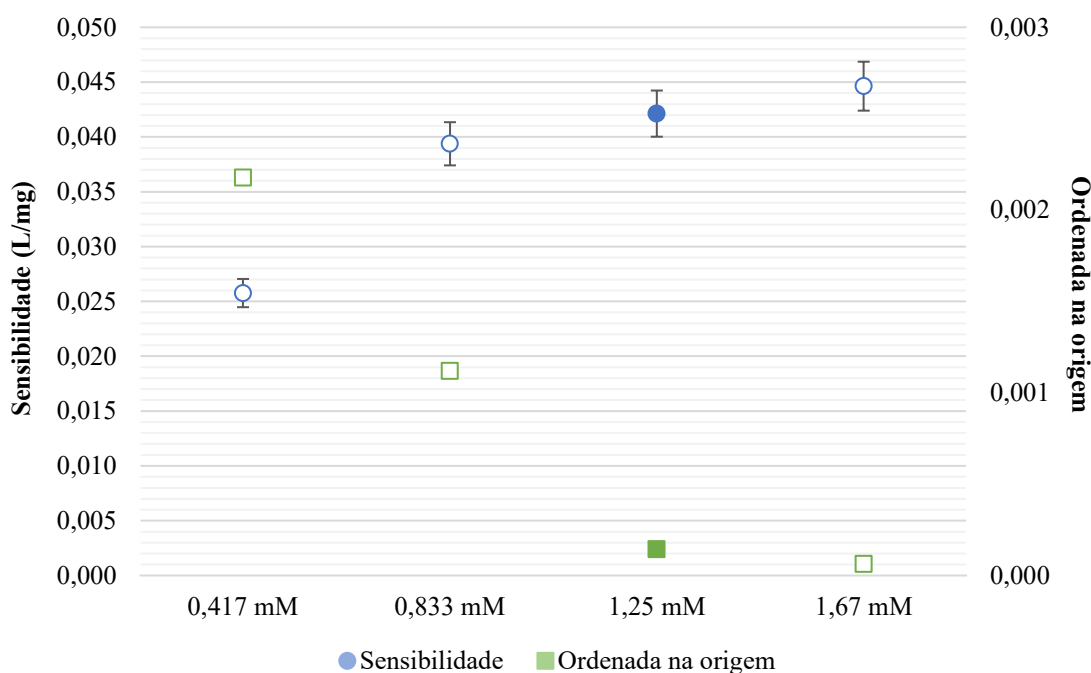


Figura 12 - Efeito da concentração de reagente na sensibilidade do método. Os círculos azuis representam a sensibilidade e os quadrados verdes a ordenada na origem obtidas para cada condição. O círculo e o quadrado a cheio a azul e a verde respectivamente indicam a opção escolhida. As barras de erro a preto representam uma variação de 5%.

3.3.2 Volume de reagente de cor

O próximo passo na otimização do μ PAD para a determinação de cobre (II) foi estudar o volume ideal de reagente a ser colocado na camada B. Após um teste preliminar da capacidade de absorção mínima e máxima dos discos de papel de filtro (6,35 mm de diâmetro, Whatman[®] 42), observou-se que, para obter uma distribuição uniforme do

reagente nos discos de papel, o volume tinha que ser superior a 1 μL por disco mas inferior a 6 μL . Logo, os volumes de reagentes estudados foram 2, 3, 4 e 5 μL (figura 13).

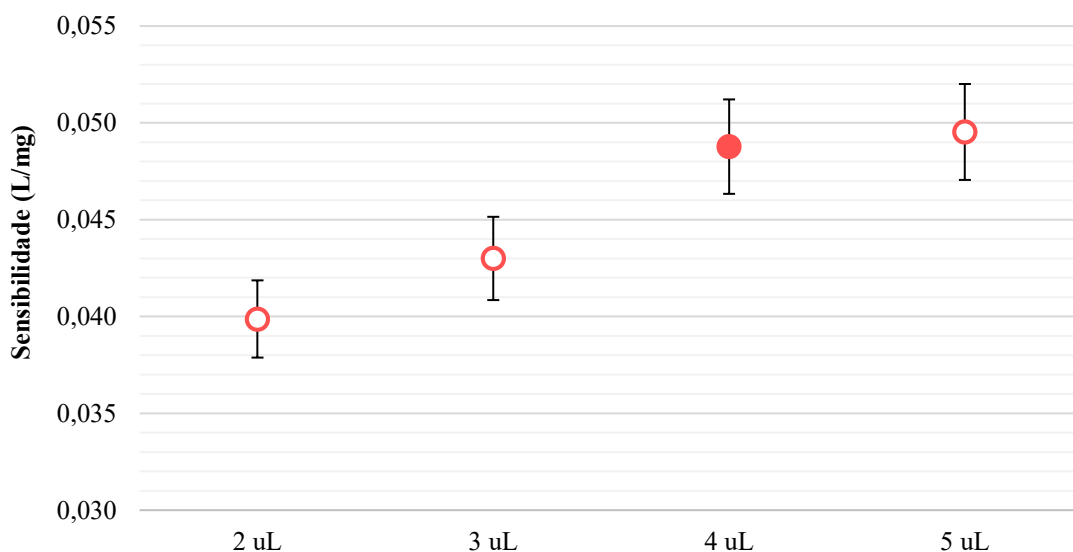


Figura 13 – Efeito do volume de reagente na sensibilidade da curva de calibração. A sensibilidade está representada pelos círculos vermelhos e a opção escolhida pelo círculo vermelho a cheio. As barras de erro a preto representam uma variação de 5%.

Comparando os resultados dos volumes estudados com o volume máximo que os discos absorvem, foi possível afirmar que há diferenças significativas ($>5\%$) quando se utiliza 2 e 3 μL mas não há diferenças significativas ($<5\%$) quando se compara as sensibilidades dos 4 e 5 μL . Sendo assim, optou-se pela solução de compromisso entre consumo e sensibilidade, isto é, com o intuito de evitar o consumo desnecessário de reagentes, foram escolhidos os 4 μL de reagente sem que a sensibilidade ficasse comprometida.

3.3.3 Volume de amostra

Estudou-se também a influência do volume de amostra no μPAD . Para tal, foram preparadas quatro curvas de calibração em que se adicionaram 4 volumes diferentes de amostra/solução padrão: 15, 20, 25 e 30 μL . Após o tempo de secagem de 5, 10, 20 e 40 minutos respetivamente foram efetuadas as digitalizações dos dispositivos. Os resultados de 30 μL não foram considerados uma vez que na digitalização verificou-se que aos 40 minutos os 30 μL de volume ainda não tinha sido totalmente absorvidos o que leva a considerar que poderia ser necessário mais tempo de secagem ou que se atingiu o limite

máximo de absorção pelas duas camadas. Como 40 minutos não traz vantagem à utilização do dispositivo, a opção de 30 μL foi excluída. Na figura 14 encontram-se resumidos os resultados deste estudo. Tendo em conta que a utilização dos 25 μL de amostra implicou mais tempo de secagem, a comparação dos resultados do efeito do volume de amostra foi realizada com as sensibilidades das curvas de calibração aos 20 minutos para todas as opções testadas.

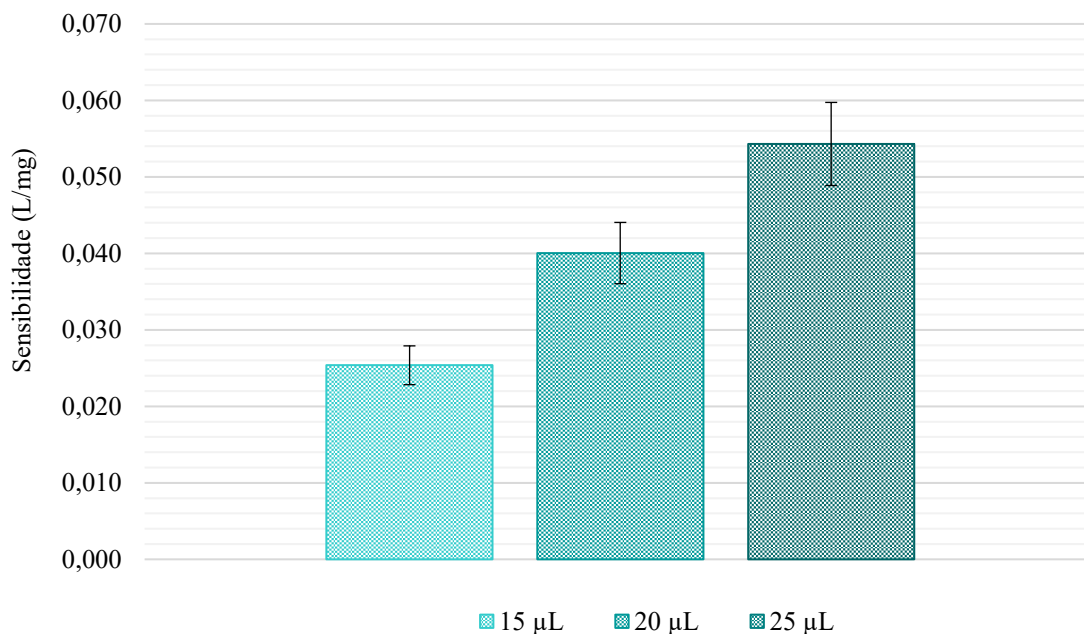


Figura 14 - Estudo da influência do volume de solução padrão/amostra na sensibilidade das regressões lineares. As barras de erro a preto representam uma variação de 10%.

Conforme mostra a figura 14, ao analisar o declive das curvas de calibração, concluiu-se que havia diferenças significativas entre os volumes testados. O volume de amostra de 25 μL foi o que correspondeu a uma curva de calibração com maior sensibilidade comparativamente aos restantes para o intervalo de concentrações considerado (25 a 500 $\mu\text{g/L}$). Com elevada sensibilidade aliada a um tempo para digitalização dentro de limites aceitáveis, os 25 μL foram a opção escolhida como o volume de amostra ideal e por isso o tempo da digitalização passou a ser aos 20 minutos após colocação da solução padrão/amostra.

3.3.4 Concentração de hidroxilamina

De forma a avaliar a influência da concentração de hidroxilamina o que se fez foi colocar diferentes volumes de hidroxilamina no reagente de cor. Este estudo foi realizado de forma isolada e apenas foram utilizadas as soluções padrão de concentração de 250, 500 e 700 $\mu\text{g/L}$.

Os volumes testados foram 30, 40 e 50 μL num volume final de reagente de cor de 600 μL o que se traduz em concentrações de 11, 14 e 18 g/L de hidroxilamina.

Conforme se pode observar na figura 15, não existe diferenças significativas entre as condições testadas ($<10\%$) no entanto optou-se pelos 50 μL para garantir o excesso e por estar aliado a uma ordenada na origem mais próxima de zero.

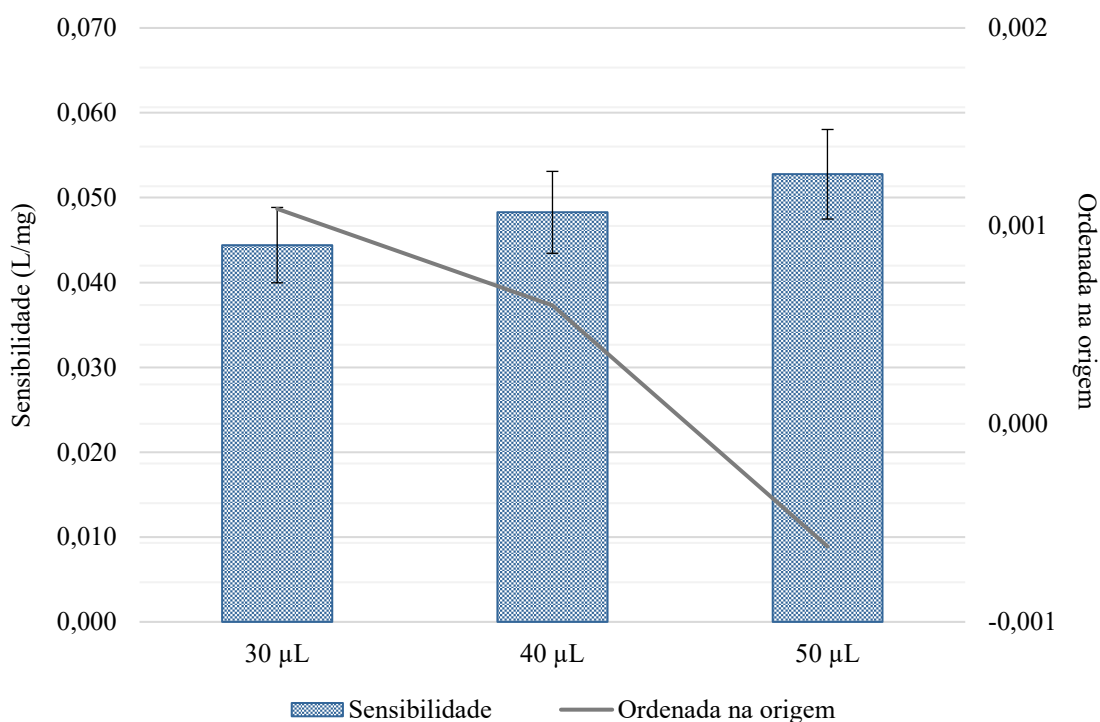


Figura 15 - Estudo da influência do volume de hidroxilamina na sensibilidade e na ordenada na origem. As barras a azul representam a sensibilidade para cada condição testada. As barras de erro a preto representam uma variação de 10%. A linha a cheio cinzenta indica a ordenada na origem obtida em cada um dos volumes de hidroxilamina testados.

3.4 Influência da matriz

Até esta fase de desenvolvimento do dispositivo, as soluções-padrão eram preparadas em água. No entanto, a fim de verificar se havia diferenças significativas entre usar água ou uma matriz mais próxima da matriz objetivo, testou-se o método utilizando, para além da matriz água, uma saliva sintética (SS), uma saliva sintética com proteína (SSP) e uma saliva comercial (SC) (“Pickering laboratories”).

Deste modo, realizaram-se curvas de calibração com soluções padrão de cobre (II) de 25 a 500 µg/L utilizando a solução de SS, SSP e SC.

A curva de calibração efetuada com a SC não foi analisada uma vez que ao fim de 1 hora a amostra ainda não tinha sido absorvida pelo µPAD. Com as outras três matrizes as digitalizações foram feitas aos 20 minutos.

Ao analisar os dados em Excel concluiu-se que com a SSP não foi possível obter uma curva de calibração uma vez que não se verificaram diferenças de absorvância entre o branco do µPAD e as soluções padrão inseridas.

Para tal, a comparação dos declives das curvas de calibração só foi possível entre a SS e a água. Com esses declives, que são representativos da sensibilidade do método, foi possível concluir que não existem diferenças significativas entre a sensibilidade de cada uma das condições testadas (figura 16). Deste modo, optou-se por utilizar a água como matriz das soluções padrão.

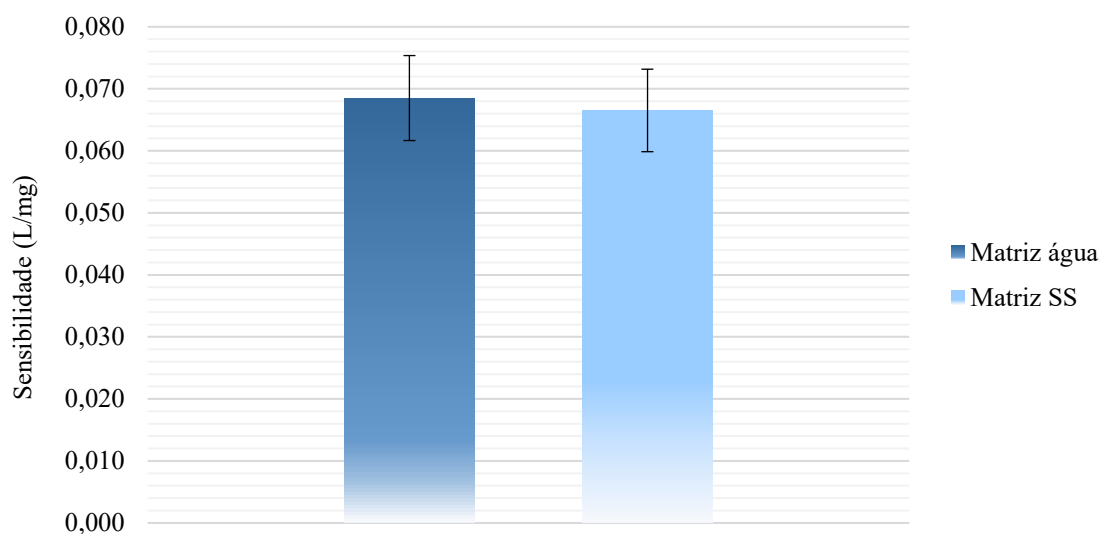


Figura 16 - Estudo do efeito da matriz na sensibilidade das curvas de calibração para as diferentes matrizes. As barras de erro a preto representam uma variação de 10%.

Com o objetivo de verificar se há diferenças significativas na sensibilidade quando se cobre o local de aplicação da amostra foi utilizada fita-cola. Este fator tem bastante relevância uma vez que é importante evitar o contacto direto com o local da amostra uma vez que o objetivo do dispositivo será utilizar com amostras biológicas. Para tal comparou-se o declive (sensibilidade) de duas curvas de calibração: uma em que se tapou o local da amostra e outra em que não se tapou.

Pela figura 17 verifica-se que não há diferenças significativas (<10%) entre as duas curvas de calibração. Sendo assim e devido aos motivos já mencionados optou-se por utilizar a fita-cola para os próximos estudos.

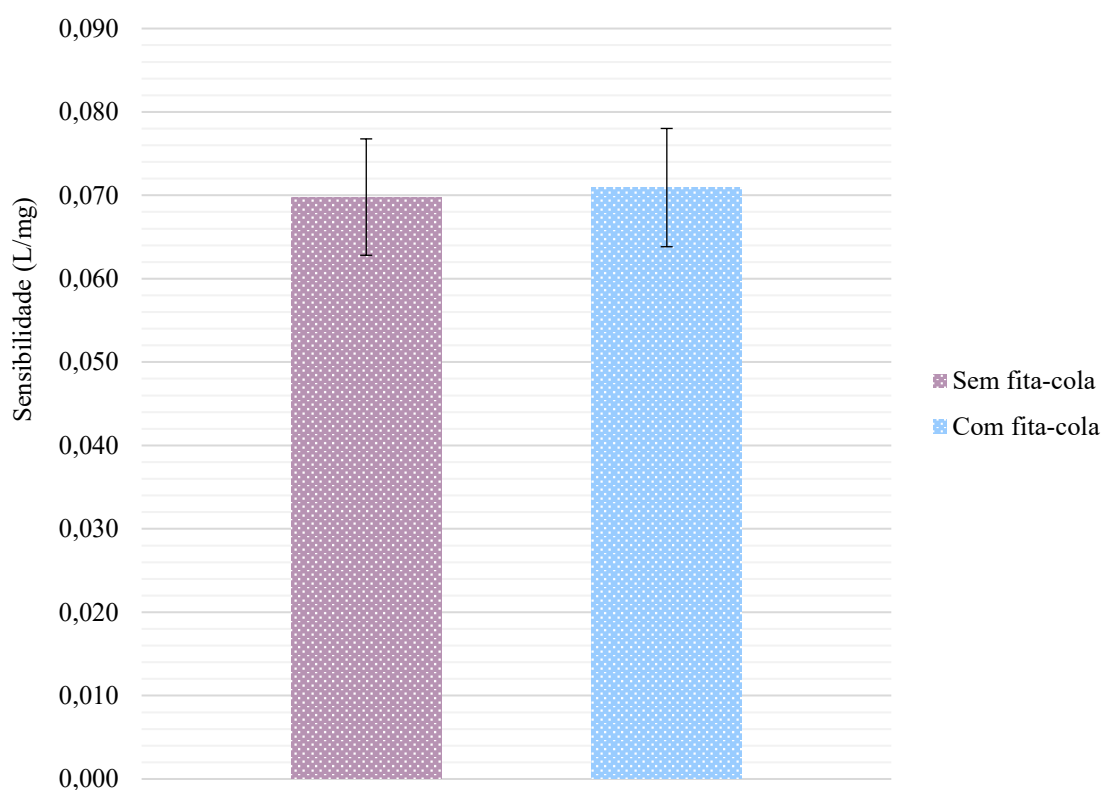


Figura 17 - Estudo do efeito de colocar fita-cola sobre a zona de amostragem na sensibilidade da determinação. As barras de erro a preto representam uma variação de 10%.

3.5 Estudos de estabilidade

De forma a avaliar a robustez dos μ PADs desenvolvidos, realizaram-se estudos de estabilidade. Estes estudos foram realizados para testar a estabilidade dos dispositivos quando armazenados (validade) e também para avaliar a estabilidade do produto colorido formado após inserir a amostra.

3.5.1 Estabilidade do produto de reação

Para o estudo da estabilidade do produto de reação colorido, procedeu-se à montagem de dois μ PADs para a realização de uma curva de calibração. Adicionaram-se as soluções padrão de cobre no intervalo de concentrações de 0,025 – 0,500 mg/L, e de seguida, os dispositivos foram digitalizados a diferentes tempos até ao fim de 7 horas.

As sensibilidades obtidas em cada uma das curvas de calibração digitalizadas durante as 7 horas estão representadas na figura 18. Nesta encontra-se representada uma faixa de 10% da sensibilidade da curva de calibração dos 20 minutos.

Conforme se pode observar, a sensibilidade da curva de calibração manteve-se relativamente constante durante os primeiros 90 minutos o que considerando uma variação de 10% não há diferenças significativas entre os 20 minutos e os 90 minutos após a aplicação das soluções padrão. A partir das 2 horas, verificou-se um decréscimo da sensibilidade até às 7 horas. Deste modo, foi possível concluir que a sensibilidade da determinação é máxima e estável se a leitura for realizada até aos 90 minutos após a adição das amostras. Após este período, verifica-se um decréscimo significativo pelo que se torna imprescindível, a partir das 2 horas, registar o tempo a que a leitura é realizada para se poder ajustar a influência da sensibilidade.

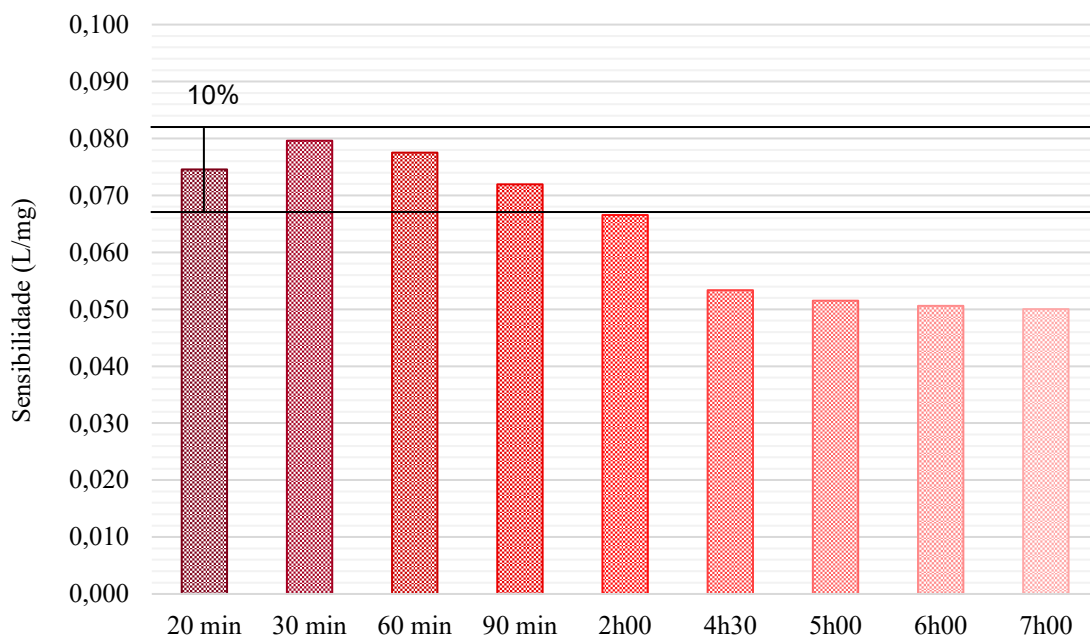


Figura 18 - Estabilidade do produto de reação no μ PAD ao longo de 7 horas considerando uma variação de $\pm 10\%$ da sensibilidade da curva de calibração dos 20 minutos (retas a preto).

3.5.2 Estabilidade do μ PAD

Por fim, foram realizados estudos de estabilidade do dispositivo. Para tal, a estabilidade do μ PAD foi testada a diferentes condições de armazenamento e diferentes períodos de tempo. Os dispositivos foram preparados e armazenados em duas condições atmosféricas distintas: ar e vácuo. Os μ PADs testados ao ar foram armazenados numa bolsa fechada enquanto que os μ PADs testados a vácuo foram armazenados numa bolsa fechada em que se removeu o ar com uma bomba de vácuo. Para além disso, todos os μ PADs foram armazenados e protegidos da luz em ambas as condições. A condição de armazenamento ao ar foi testada por 24 horas, 48 horas, 1 semana e 2 semanas e a condição a vácuo foi testada nos períodos de tempo já mencionados à exceção das 24 horas. Ao fim de cada período de tempo, adicionaram-se aos μ PADs as soluções padrão do intervalo de concentração de 25 a 500 $\mu\text{g/L}$ e os dispositivos foram digitalizados ao fim dos 20 minutos após colocar a fita-cola. No dia em que se avaliou cada período de tempo foi preparada uma curva de calibração do próprio dia para servir de comparação usando as soluções padrão preparadas nesse mesmo dia. Todas as curvas de calibração preparadas aquando um período de tempo serviu para calcular uma média de sensibilidade (MCC) e servir de comparação aos diferentes períodos e condições de armazenamento. No gráfico da figura 19, a primeira barra representa essa mesma média. De forma a facilitar a análise dos resultados, foi considerando uma variação de 10% da sensibilidade da MCC.

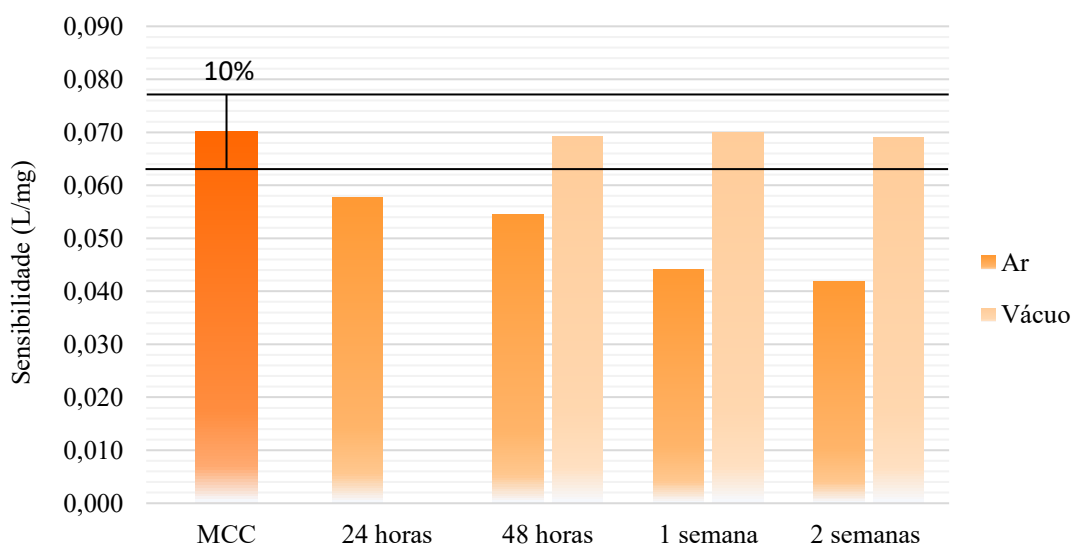


Figura 19 - Estabilidade do μ PAD a diferentes períodos de tempo e diferentes modos de armazenamento considerando uma variação de $\pm 10\%$ da sensibilidade da MCC (retas a preto).

Como se pode observar na figura 19, após as 24 horas de armazenamento, o μ PAD projetado para a determinação de cobre quando se encontra armazenado ao ar não foi capaz de preservar adequadamente o μ PAD o que é justificado pela diminuição da sensibilidade da curva de calibração abaixo da faixa aceitável (10%), isto é, verificaram-se diferenças significativas para o tipo de armazenamento testado (ar), quando comparado com as curvas de calibração do próprio dia. O mesmo aconteceu com os restantes períodos de armazenamento para a condição de armazenamento ao ar. Quanto aos resultados para a condição a vácuo, todos os períodos de tempo em que esta condição foi testada, estes apresentam valores de sensibilidade dentro dos limites, ou seja, não têm sensibilidades significativamente diferentes da sensibilidade média das curvas de calibração.

Deste modo, tendo em consideração os resultados obtidos, para o μ PAD projetado a condição a vácuo parecer ser a mais promissora, pois apresenta um tempo de utilização de pelo menos 2 semanas, embora mais testes sejam necessários para analisar a estabilidade por um período de tempo mais alargado. Tendo em conta o que foi estudado, o μ PAD deve ser armazenado no vácuo por um período máximo de 2 semanas para que a confiança no dados seja a mesma que se tem num μ PAD preparado e utilizado no momento.

3.6 Características do μ PAD para a determinação de cobre

3.6.1 Avaliação da precisão

Para os estudos da repetibilidade foram preparados num dia μ PADs para 5 curvas de calibração com as condições já definidas. Após a colocação das soluções padrão preparadas neste mesmo dia, foram realizadas as digitalizações dos dispositivos. Após os dados serem tratados obtiveram-se as sensibilidades para as cinco curvas de calibração (CC1, CC2, CC3, CC4 e CC5) que se encontram apresentadas no gráfico da figura 20. A primeira barra (MCC) representa a média da sensibilidade das curvas de calibração e nas barras a preto está representado uma variação de 5% relativamente à sensibilidade média das curvas de calibração.

Ao analisar os dados da figura 20, concluiu-se que o método desenvolvido é repetível uma vez que entre as cinco curvas de calibração realizadas não há diferenças significativas uma vez que todas se encontram dentro da faixa dos 5%.

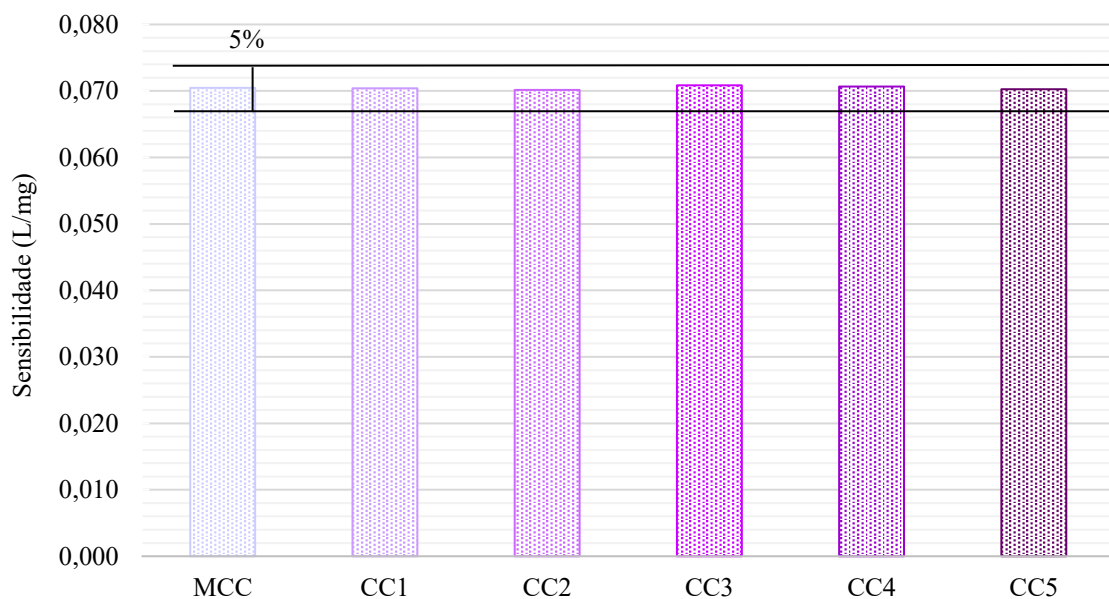


Figura 20 – Sensibilidades obtidas em cada uma das curvas de calibração preparadas num dia considerando uma variação de $\pm 5\%$ da sensibilidade da MCC (retas a preto).

Para além da repetibilidade, a reprodutibilidade também foi analisada e para tal foram preparados μ PADs durante uma semana (5 dias úteis consecutivos). Por dia foi preparada uma curva de calibração e soluções-padrão para inserir nesse mesmo μ PAD que depois de seco e com fita-cola foi digitalizado e analisado obtendo-se os resultados resumidos na figura 21. Tal como se verificou no teste da repetibilidade, para a reprodutibilidade também não se verificaram diferenças significativas o que indica que o método desenvolvido é reprodutível.

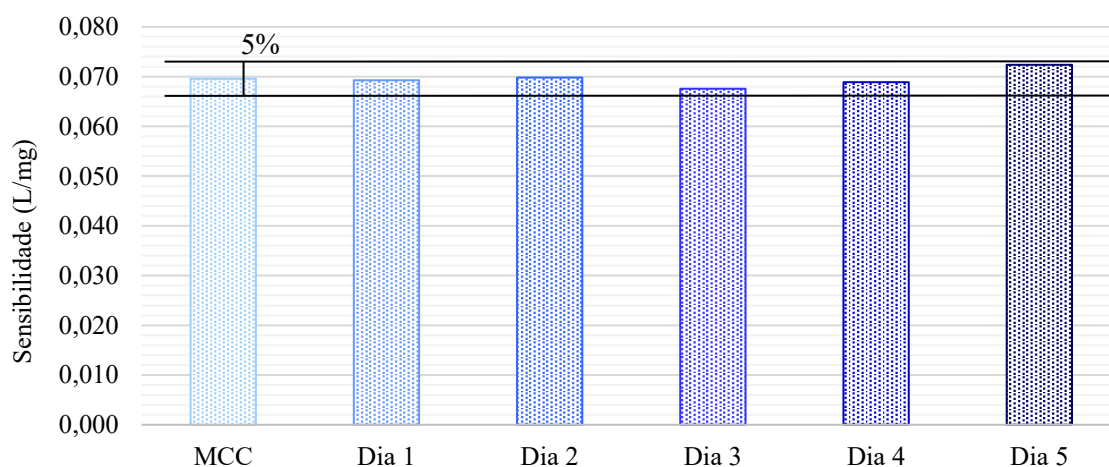


Figura 21 – Avaliação da reprodutibilidade do método desenvolvido através da análise da sensibilidade obtida em cada uma das curvas de calibração ao longo de cinco dias úteis considerando uma variação de $\pm 5\%$ da sensibilidade da MCC (retas a preto).

3.6.2 Área de análise selecionada no ImageJ

Quando os μ PADs são analisados no software ImageJ, é necessário selecionar a área de interesse para medição da intensidade. Por esse motivo, um dos estudos que foi feito foi relativo à área selecionada, isto é, se a área selecionada abrangia toda a área do disco de papel de filtro da camada B (6,35 mm de diâmetro) ou apenas a área de aplicação da amostra (3,175 mm). O motivo que levou a realizar este teste foi o facto de visualmente se verificar que o complexo se concentrava mais no centro do disco.

Na figura 22 encontram-se os histogramas realizados no ImageJ para cada uma das áreas selecionadas. O eixo x representa os possíveis valores de cinza e o eixo do y mostra o número de pixels encontrado para cada valor de cinza

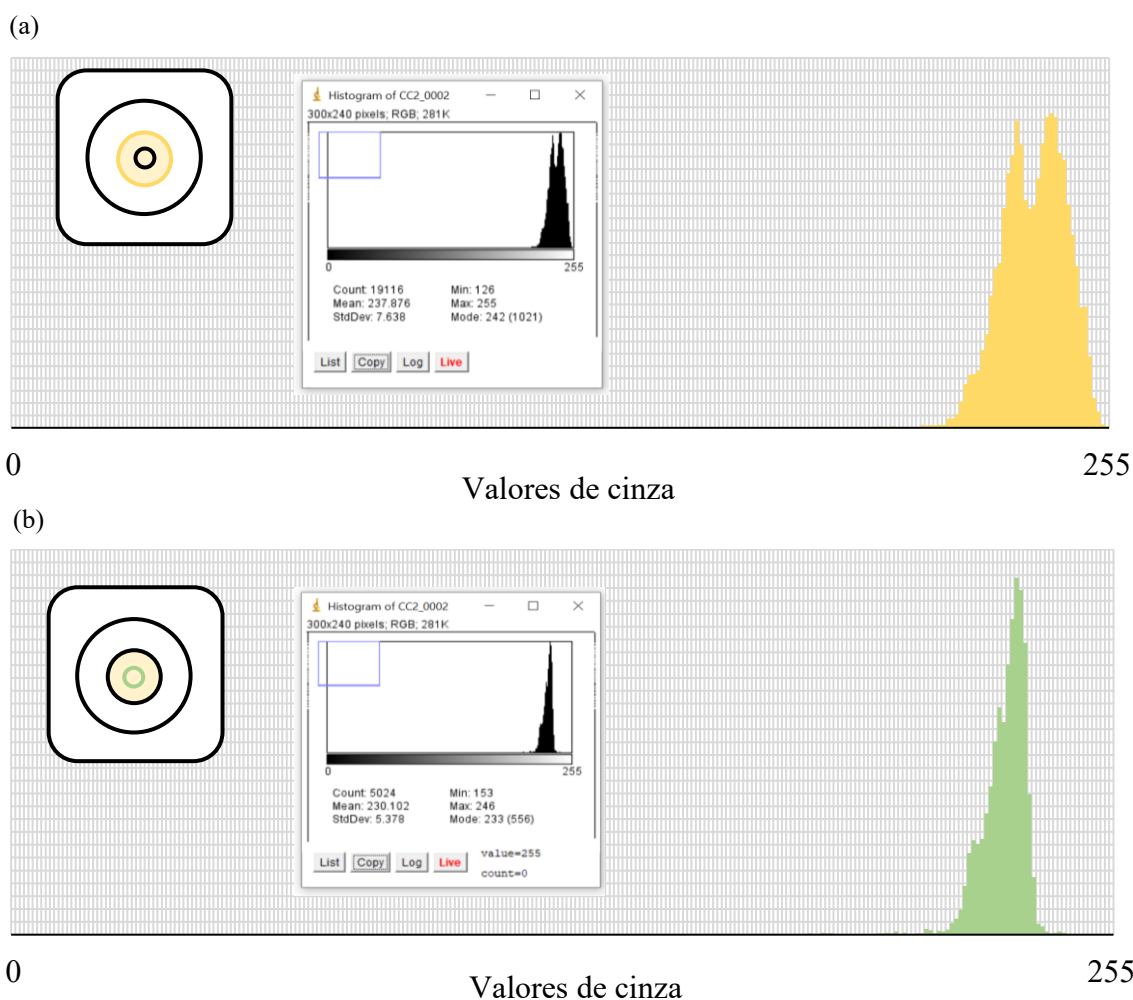


Figura 22 - Histogramas obtido no ImageJ conforme a área de interesse selecionada. (a) Histograma quando a área selecionada é o disco da camada B (6,35 mm de diâmetro). (b) Histograma quando a área selecionada é a área de aplicação da amostra (3,175 mm de diâmetro).

Conforme se pode observar na figura anterior a dispersão é maior quando se analisa os 6,35 mm de disco de papel de filtro comparativamente quando se analisa apenas o local de aplicação de amostra. Na primeira situação a média de intensidade é de 238 com desvio padrão de 7,638 e na segunda a média é de 230 com desvio padrão de 5,378.

As características do μ PAD desenvolvido, tais como intervalo de concentrações, curva de calibração média, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), consumos, tempo para a digitalização, estabilidades e desvio padrão relativos estão resumidas na tabela 5.

Tabela 5 - Características do método desenvolvido para determinação de cobre (μ PAD): Intervalo de concentrações, curva de calibração média, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), desvio padrão relativo (DPR), consumos, tempo para a digitalização, estabilidade do dispositivo e do produto de reação colorido e área de análise.

| | |
|--|--|
| Intervalo de concentrações | 0,080 – 0,500 mg/L |
| Curva de calibração * $A = S \times [Cu^{2+}] + b$ | $y=0,0705(\pm 3 \times 10^{-4}) \times [Cu^{2+}] + 8,20 \times 10^{-4}(\pm 4,79 \times 10^{-4})$ $R^2=0,9996$ |
| LD* | 0,032 mg/L |
| LQ* | 0,080 mg/L |
| Repetibilidade, DPR* | 0,4% |
| Reprodutibilidade, DPR* | 3% |
| Consumos/μPAD | massa de BC = 0,225 mg massa de hidroxilamina = 0,900 mg massa de HCO_3^- = 0,210 mg Volume de amostra = 25 μ L |
| Tempo para a digitalização | 20 – 90 min |
| Estabilidade do μPAD | 2 semanas a vácuo |
| Estabilidade do produto de reação | 90 minutos |
| Área de análise no ImageJ | Área de aplicação da amostra |

* n = 5, sendo n o número de curvas de calibração usadas para os cálculos

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC como valores de concentração correspondente a três ou dez vezes, respetivamente, o desvio padrão da ordenada na origem [33].

3.7 Avaliação da exatidão

3.7.1 Amostras certificadas – água

Com o intuito de validar o método desenvolvido para medição de cobre utilizaram-se amostras de água certificadas. Para tal, foram analisadas duas amostras de água certificadas e os resultados obtidos foram comparados com o valor certificado. Para tal, foram preparados μ PADs conforme já mencionado anteriormente para uma curva de calibração e para a introdução das amostras. Depois de as amostras e soluções padrão estarem nos dispositivos e após 20 minutos os μ PADs foram digitalizados e analisados. O valor certificado de ambas as amostras estava fora do intervalo de concentrações para a qual o dispositivo está otimizado e por isso houve a necessidade de diluir as amostras. A amostra certificada ERM[®] CA021a, uma água potável, com valores certificados em teor de cobre de 1975 $\mu\text{g/L}$, que com uma diluição de 1:12 ficou com 165 $\mu\text{g/L}$ de cobre, foi analisada pelo método desenvolvido e a concentração obtida foi de 155 $\mu\text{g/L}$, correspondendo a um desvio relativo de 6%. A outra amostra certificada analisada foi a ERM[®] CA011c, com valor certificado de 1963 $\mu\text{g/L}$. Tal como a amostra anterior, esta amostra também foi diluída com um fator de diluição de 1:10,2 ficando com 192 $\mu\text{g/L}$ de cobre. A concentração obtida através do método desenvolvido foi de 177 $\mu\text{g/L}$, resultando num desvio relativo de 8%.

3.7.2 Amostras de saliva

Para a avaliação da precisão do método para a matriz biológica (saliva) foram analisadas 10 amostras de saliva em que a recolha destas foi conforme mencionado em 2.5. As amostras foram preparadas com uma diluição de 1:3 para serem analisadas em dois métodos. Adicionalmente preparou-se amostras com adição padrão também na proporção 1:3 com solução padrão de 0,100 e 0,250 mg/L de cobre (II).

Estas amostras foram analisadas com o método desenvolvido (μ PAD) e os resultados foram comparados com o obtido através do método comparativo, espectrometria de

absorção atômica (EAA) como se pode ver na figura 23. Através dos valores de absorvância obtidos e por interpolação às curvas de calibração de cada método, foi possível obter os valores de concentração de cobre para cada uma das amostras.

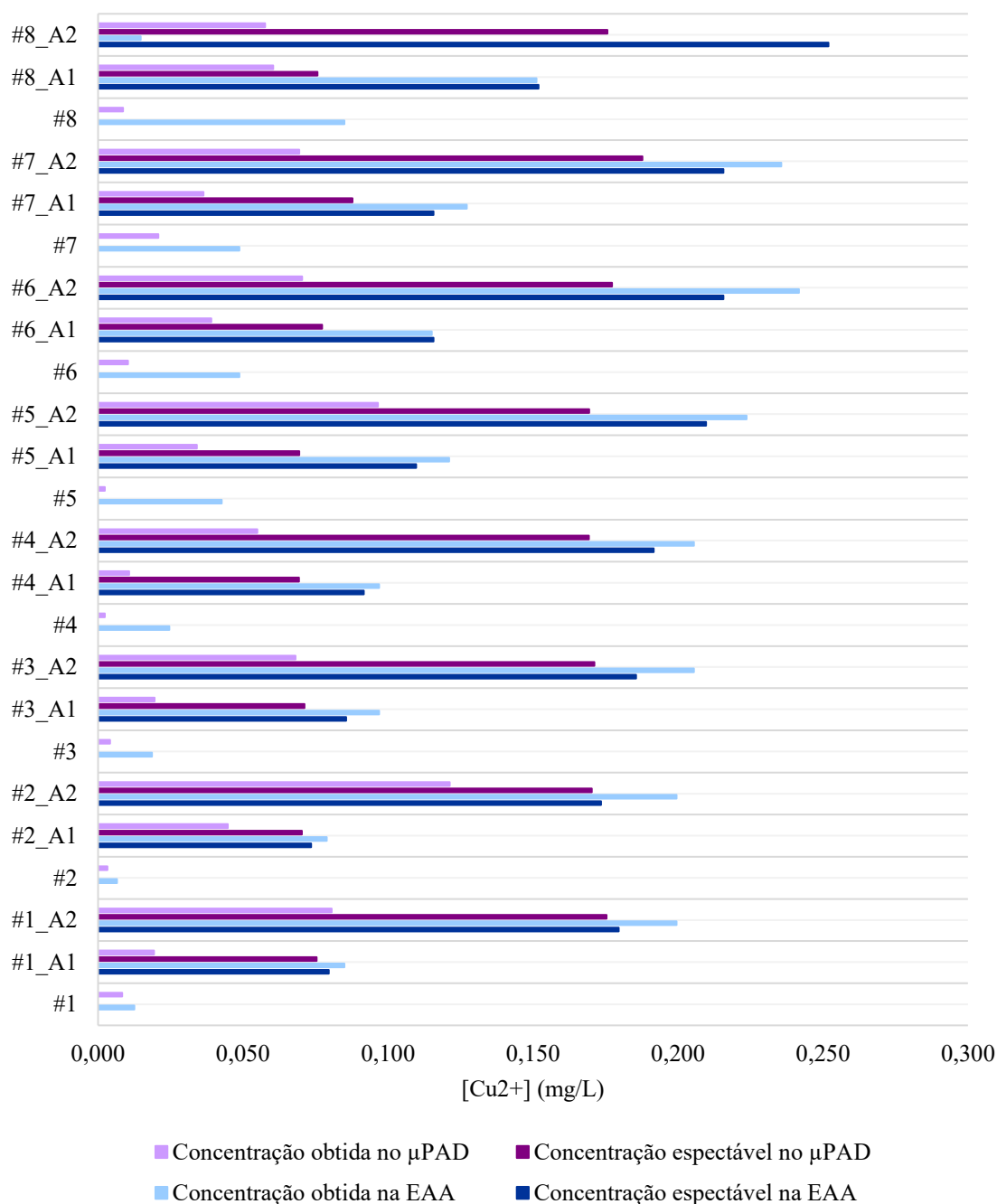


Figura 23 - Concentrações obtidas pelos dois métodos para as 10 amostras de saliva analisadas bem como o valor que seria espectável de se obter por ambos os métodos. Na barras a azul estão os valores de concentração relativos à EAA e nas barras roxas estão os valores de concentração relativos ao método desenvolvido. #n° corresponde à amostra com a diluição de 1:3, #n°_A1 corresponde à amostra com a adição padrão na proporção 1:3 da solução de 0,100 mg/L de Cu (II) e #n°_A2 corresponde à amostra com a adição padrão na proporção 1:3 da solução de 0,250 mg/L de Cu (II).

Através do apresentado na figura 23, verifica-se que tanto no μ PAD como na EAA os valores de concentração obtidos para cada uma das amostras encontram-se abaixo ou acima do espectável, respetivamente. Na EAA pode ser devido a não ser um método de referência para determinação de cobre na saliva, mas sim uma adaptação de um protocolo de método de referência utilizado para determinação de metais em águas. O valor espectável para cada amostra ($\#n^\circ_{A1}$ e $\#n^\circ_{A2}$) foi calculado adicionando ao valor obtido para as amostras ($\#n^\circ$) a adição efetuada. Estes cálculos por si só já contêm erros associados. Para além disto, verificou-se que os valores de absorvância obtidos pelos dois métodos eram bastante distintos.

Posteriormente, foram calculadas as percentagens de recuperação. No entanto, o que se verificou foi que os valores para as percentagens de recuperação no μ PAD rondavam cerca de 50%.

4. Análise de custo

Quanto à análise de custo de produção de um μ PAD, este envolve um investimento inicial na ordem dos 491 € (tabela 6). Relativamente ao custo de produção individual teve-se em conta todos os consumíveis necessários à montagem do dispositivo e por isso o preço por μ PAD ronda os 0,32 cêntimos (tabela 7). Tendo em conta que cada dispositivo pode ser utilizado para duas análises o custo por análise é de 0,16€. No anexo II encontram-se de forma mais detalhada os cálculos realizados.

Tabela 6 - Preços dos recursos materiais necessários para o investimento inicial para a montagem dos μ PADs. Os preços foram consultados a 14 de outubro de 2019.

| Recurso Material | Preço |
|--|-----------------|
| Canon CanoScan LiDE 120 | 110,20 € |
| Plastificadora Fellowes, L125-A4 | 38,90 € |
| Furador de metal 3,175 mm | 5,15 € |
| Furador de 6,35 mm de diâmetro | 11,73 € |
| Furador de 6,35 mm de diâmetro | 6,03 € |
| Papel de filtro Whatman® 3 | 39,00 € |
| Papel de filtro Whatman® 42 | 51,90 € |
| Bolsas de plastificar | 4,18 € |
| Batocuproína | 60,20 € |
| Etanol | 5,90 € |
| Hidroxilamina (NH ₂ OH·HCl) | 73,70 € |
| Ácido clorídrico | 53,90 € |
| Hidrogeno carbonato de sódio | 30,10 € |
| Total | 490,89 € |

Tabela 7 - Custo dos consumíveis para cada μ PAD e custo total de um μ PAD. O custo total por μ PAD não contempla custos de mão de obra.

| Recurso Material | Preço | |
|--|---------------|--------|
| Papel de filtro | Whatman® 3 | 0,10 € |
| | Whatman® 42 | 0,05 € |
| Bolsa de plastificar | 0,17 € | |
| Reagente de cor | 0,01 € | |
| Custo total por μPAD | 0,32 € | |

5. Conclusões

Neste trabalho foi possível efetuar o desenvolvimento de um dispositivo descartável de utilização no local baseado em papel (μ PAD) que tem por base conceitos de microfluxo para quantificação imediata de cobre. A sua utilização em amostras de água foi concretizada. Contudo, a ideia seria que esse dispositivo permitisse a determinação de cobre em saliva humana, mas tal não foi ainda possível devido à ocorrência de interferências.

O método em papel desenvolvido é bastante económico (0,32€/ μ PAD), especialmente quando comparado com os métodos convencionais, visto que o investimento inicial é relativamente acessível e permite o desenvolvimento de inúmeros μ PADs. O custo de produção individual é reduzido o que faz com que o custo de análise também não seja dispar comparativamente aos exames clínicos já existentes. Este possui um alto grau de portabilidade e utilização bastante simples e rápida. Todas estas características torna-o uma alternativa atraente aos métodos convencionais conforme o previsto e é uma ferramenta que depois de otimizada poderá ter potencial para auxiliar no cancro da cavidade oral. Este tipo de testes é essencial em países em que os recursos são muito escassos quer em áreas clínicas quer em ambientais/alimentares. Cada vez mais num mundo em que a tecnologia ocupa um lugar de topo, onde tudo tem tendência para ser miniaturizado e automatizado estes dispositivos são uma excelente opção principalmente quando associados a smartphones. Conseguir que uma aplicação combine quer a parte da deteção (imagem) quer a parte do processamento, isto é, fornecerem as medições e gerar os resultados em tempo real seria mais um ponto a favor neste tipo de análise.

Como balanço final, o objetivo proposto inicialmente não foi cumprido na sua totalidade uma vez que com o dispositivo desenvolvido não foi possível dosear este ião em amostras de saliva sintética. Por este motivo, o dispositivo está apenas validado para determinar cobre em águas. Quando foram realizados os estudos de interferência da matriz verificou-se que quando se utilizava a saliva sintética como matriz não se verificavam diferenças significativas comparativamente à água. No entanto, quando se utilizava a saliva sintética com proteína não foi possível obter resultados o que leva a ponderar que há influência da matriz mais precisamente da proteína.

6. Sugestões para trabalho futuro

Atualmente, são vários os testes de diagnóstico que existem e cada vez mais a tendência é que esta ideia seja concebida para as diversas áreas existentes. Por exemplo, os testes de gravidez utilizam um dispositivo microfluídico em papel combinado com a técnica de detecção colorimétrica de uma forma simples, rápida, estável, reproduzível e econômica. A necessidade deste tipo de teste e outros do mesmo gênero bem como o impacto social gerado após a comercialização bem-sucedida dos testes de gravidez tornam esta tecnologia o rumo a seguir.

Sendo assim, o dispositivo microfluídico em papel desenvolvido apresenta potencial para futura aplicação. No entanto, no caso do dispositivo desenvolvido é importante ter em atenção que o desenvolvimento deste dispositivo ainda não está finalizado. Sendo necessário efetuar diversos outros estudos para otimizar por completo o método com o intuito de que o objetivo inicial seja cumprido. Como sugestão de trabalhos futuros seria importante analisar a possibilidade de trocar a ordem das camadas para testar uma possível filtração da amostra de forma a reter a proteína, avaliar a estabilidade do μ PAD por períodos de tempo mais longos e possivelmente, caso seja justificativo, avaliar simultaneamente em diferentes tipos de armazenamento (por exemplo, a diferentes temperaturas). Ainda em título de proposta para próximos estudos poderia ser interessante realizar estudos de interferências a nível de outros íons, otimizar o processo de amostragem e testá-lo clinicamente. Para além disso, deve-se repetir os testes efetuados com mais réplicas de modo a garantir a reprodutibilidade/repetibilidade do método.

Por fim, o dispositivo deverá ser disponibilizado para a utilização com saliva de pacientes portadores de patologia, de modo a testar o dispositivo como um teste rápido de despiste de valores anormais de cobre salivar, o que permitirá antecipar potenciais problemas ou direcionar melhor as análises sanguíneas e/ou terapias.

Anexos

Anexo I: Lista dos papéis de filtro de celulose e respetiva características

| Typical Properties - Cellulose Filters | | | | | | | | |
|---|---------------------------------|---|---------|------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| Grade | Particle Retention* Liquid (µm) | Air Flow Rate (s/100 mL/in ²) | Ash (%) | Typical Thickness (µm) | Basis Weight (g/m ²) | Wet Burst (psi) | Dry Burst (psi) | Tensile M/D Dry (N/15 mm) |
| Qualitative | | | | | | | | |
| 1 | 11 | 10.5 | 0.06 | 180 | 88 | 0.3 | 16 | 39.1 |
| 2 | 8 | 21 | 0.06 | 190 | 103 | 0.7 | 16 | 44.6 |
| 3 | 6 | 26 | 0.06 | 390 | 187 | 0.5 | 28 | 72 |
| 4 | 20-25 | 3.7 | 0.06 | 205 | 96 | 0.7 | 10 | 28.4 |
| 5 | 2.5 | 94 | 0.06 | 200 | 98 | 0.4 | 21 | 55.6 |
| 6 | 3 | 35 | 0.2 | 180 | 105 | 0.3 | 15 | 39.1 contd > |
| General Purpose and Wet Strengthened Qualitative | | | | | | | | |
| 91 | 10 | 6.2 | N/A | 205 | 71 | 2 | 18 | 28 |
| 93 | 10 | 7 | N/A | 145 | 67 | 2.6 | 12 | 38 |
| 113 | 30 | 1.3 | N/A | 420 | 131 | 8 | 24 | 38.6 |
| 114 | 23 | 5.3 | N/A | 190 | 77 | 8.9 | 15 | 42.1 |
| Ashless Quantitative | | | | | | | | |
| 40 | 8 | 19.3 | 0.007 | 210 | 92 | 0.5 | 16 | 46.7 |
| 41 | 20-25 | 3.4 | 0.007 | 215 | 84 | 0.3 | 10 | 27.2 |
| 42 | 2.5 | 107 | 0.007 | 200 | 100 | 0.7 | 25 | 55.8 |
| 43 | 16 | 8.9 | 0.007 | 220 | 96 | 0.6 | 12 | 38.2 |
| 44 | 3 | 57 | 0.007 | 176 | 77 | 0.4 | 44 | 39.4 |
| Hardened Low Ash Quantitative | | | | | | | | |
| 50 | 2.7 | 96 | 0.015 | 115 | 97 | 9.1 | 33 | 84 |
| 52 | 7 | 11.4 | 0.015 | 175 | 101 | 8.3 | 24 | 71.5 |
| 54 | 20-25 | 4.2 | 0.015 | 185 | 92 | 9.4 | 18 | 57.6 |
| Hardened Ashless Quantitative | | | | | | | | |
| 540 | 8 | 13.2 | 0.006 | 160 | 88 | 9 | 20 | 63 |
| 541 | 20-25 | 3.8 | 0.006 | 155 | 82 | 5.3 | 14 | 43.4 |
| 542 | 2.7 | 69 | 0.006 | 150 | 93 | 9.2 | 28 | 82.6 |

Anexo II: Cálculos/valores auxiliares necessários para a análise de custo.

| | Papel de filtro | |
|--|------------------------|---------------|
| | Whatman® 3 | Whatman® 42 |
| Diâmetro da folha de papel de filtro | 150 mm | 150 mm |
| Preço por embalagem | 39,00 € | 51,90 € |
| Número de folhas por embalagem | 100 | 100 |
| Preço por cada folha de papel de filtro | 0,39 € | 0,52 € |
| Diâmetro dos discos utilizados | 12,7 mm | 6,35 mm |
| Número de discos cortados em cada folha | 98 | 230 |
| Preço por cada disco de papel de filtro | 0,004 € | 0,002 € |
| Número de discos por μ PAD | 24 | 24 |
| Custo total de papel de filtro/μPAD | 0,10 € | 0,05 € |
| Bolsa de plastificar | | |
| Preço por embalagem | 4,18 € | |
| Número de unidades por embalagem | 25 | |
| Preço de cada unidade | 0,17 € | |
| Número de unidades por μ PAD | 1 | |
| Custo da bolsa de plastificar/μPAD | 0,17 € | |
| Batocuproína | | |
| Volume de solução no reagente de cor | 1125 μ L | |
| Massa de batocuproína | 0,81 mg | |
| Quantidade de reagente no frasco | 500 mg | |
| Preço de cada frasco | 60,20 € | |
| Preço por cada mg | 0,12 €/mg | |
| Preço da massa de batocuproína necessária para o reagente de cor | 0,10 € | |
| Preço de embalagem de etanol | 5,90 € | |
| Quantidade de etanol por embalagem | 250 mL | |
| Preço de cada mL de etanol | 0,02 €/mL | |
| Preço do volume de etanol necessário para o reagente de cor | 0,03 € | |

| | |
|--|-----------------|
| Custo total de batocuproína por cada 1125 µL | 0,12 € |
| Agente redutor | |
| Volume de solução no reagente de cor | 150 µL |
| Massa de agente redutor | 32,25 mg |
| Quantidade de reagente no frasco | 500 g |
| Preço de cada frasco | 73,70 € |
| Preço por cada g | 0,15 €/g |
| Preço da massa de agente redutor necessária para o reagente de cor | 0,005 € |
| Preço de embalagem de HCl | 53,90 € |
| Quantidade de HCl por embalagem | 500 mL |
| Preço de cada mL de HCl | 0,11 €/mL |
| Volume de HCl necessário para 150 µL de agente redutor | 9 µL |
| Preço do volume de etanol necessário para o reagente de cor | 0,001 € |
| Custo total de agente redutor por cada 150 µL | 0,01 € |
| Solução tampão | |
| Volume de solução no reagente de cor | 150 µL |
| Massa de agente redutor | 7,56 mg |
| Quantidade de reagente no frasco | 1000 g |
| Preço de cada frasco | 30,10 € |
| Preço por cada g | 0,03 €/g |
| Custo total da solução tampão por cada 150 µL | 0,0002 € |
| Reagente de cor | |
| Volume de reagente de cor em cada disco | 4 µL |
| Número de discos de papel de filtro por µPAD | 24 |
| Volume total de reagente de cor por µPAD | 96 µL |
| Preço por 1800 µL de reagente de cor | 0,13 € |
| Preço por cada µL de reagente de cor | 0,0001 € |
| Custo total do reagente de cor/µPAD | 0,01 € |

Bibliografia

- [1] World Health Organization. 2019. "Health topics: Cancer." Disponível: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 [data da consulta: 08/10/2019].
- [2] Ayinampudi, B. and Narsimhan, M. (2012) Salivary copper and zinc levels in oral pre-malignant and malignant lesions. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, **16**: 178-182.
- [3] World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. 2018. "Cancer today: data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2018" Disponível: <http://gco.iarc.fr/today/home> [data da consulta: 08/10/2019].
- [4] Malamud, D. and Rodriguez-Chavez, I. (2011) Saliva as a diagnostic fluid. *Dental Clinics of North America*, **55**: 159-178.
- [5] Shike, M. (2009) Copper in Parenteral Nutrition. *Gastroenterology*, **137**: S13-S17.
- [6] Hordyjewska, A. et al. (2014) The many "faces" of copper in medicine and treatment. *Biometals*, **27**: 611-621.
- [7] Park, J. et al. (2014) Elevated serum copper and ceruloplasmin levels in Alzheimer's disease. *Asia-Pacific Psychiatry*, **6**: 38-45.
- [8] Almeida, P. et al. (2008) Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, volume 9, número 3.
- [9] Elmongy, H. and Abdel-Rehim, M. (2016) Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis. *Trends in Analytical Chemistry*, **83**: 70-79.
- [10] Chiappin, S. et al. (2007) Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, **383**:30-40.
- [11] Keerthika et al. (2016) Estimation of Serum Copper, Zinc and Iron in Patients with Oral Cancer. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **39**: 251-254.
- [12] Baharvand, M. et al. (2014) Serum Levels of Ferritin, Copper, and Zinc in Patients with Oral Cancer. *Biomedical Journal*, **37**: 331-336.
- [13] Trivedy, C. et al. (2000) Raised tissue copper levels in oral submucous fibrosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **29**: 241-248.
- [14] Mohammed, F. et al. (2015) Estimation of copper in saliva and areca nut products and its correlation with histological grades of oral submucous fibrosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **44**: 208-213.

- [15] Almeida, M. et al. (2018) Developments of microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) for water analysis: A review. *Talanta*, **177**: 176-190.
- [16] Ramdzan, A. et al. (2016) Development of a microfluidic paper-based analytical device for the determination of salivary aldehydes. *Analytica Chimica Acta*, **919**: 47-54.
- [17] Akyazi, T. et al. (2018) Review on microfluidic paper-based analytical devices towards commercialisation. *Analytica Chimica Acta*, **1001**: 1-17.
- [18] Oliveira, R. et al. (2017) A simple method to produce 2D and 3D microfluidic paper-based analytical devices for clinical analysis. *Analytica Chimica Acta*, **957**: 40-46.
- [19] Liu, S. et al. (2016) A Review on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Glucose Detection. *Sensors*, doi:10.3390/s16122086
- [20] Marczenko, Z. and Balcerzak, M. 2000. Copper. In: Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis. Elsevier, Poland. pp. 177-188.
- [21] Martinez, A. et al. (2010) Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, **82**:3-10.
- [22] Peixoto, P. and Tóth, I. (2013) Increased sensitivity spectrophotometric flow analysis method for copper determination in water samples. *Analytical Letters*, **46**: 2899-2911.
- [23] Horstkotte, B. et al (2012) Automatic determination of copper by in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction of its bathocuproine-complex using long path-length spectrophotometric detection. *Talanta*, **99**: 349-356.
- [24] Comber, S. and Gardner, M. (2000) A field method for the determination of copper in estuarine waters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **77**: 177-183.
- [25] Capitán-Vallvey, L. et al (2002) A multilayer optical test strip for copper determination in human plasma. *Analytical Letters*, **35**: 615-633.
- [26] Hulthe, P. (1970) A bathocuproine reagent-paper for the rapid semi-quantitative determination of copper in the 1 to 70 p.p.m. range. *Analyst*, **95**: 351-355.
- [27] Carter, M. and Small, R. (2003) Radical Formation in Hydroxylamine-Copper Chemical Mechanical Planarization Processes. *Journal of The Electrochemical Society*, **150**: G107-G111.
- [28] Toral, I. et al (1997) Simultaneous determination of copper and iron by second derivative spectrophotometry using mixtures of ligands. *Talanta*, **45**: 147-153.
- [29] Teodoto, M. et al (2017) Determination of copper total and speciation in food samples by flame atomic absorption spectrometry in association with solid-phase

extraction with bamboo (*Bambusa vulgaris*) fiber loaded with bathocuproine. *Microchemical Journal*, **132**: 351–357.

[30] Wróbel, K. et al (1999) Application of internal standard for micro extraction-spectrophotometric determination of copper in serum and in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, **387**: 217-224.

[31] Santos, I. et al. (2015) Iodine speciation in coastal and inland bathing waters and seaweeds extracts using a sequential injection standard addition flow-batch method. *Talanta*, **133**: 7-14.

[32] Batista, G. et al (2016) Artificial saliva formulations versus human saliva pretreatment in dental erosion experiments. *Caries Research*, **50**:78-86.

[33] Currie, L. et al. (1995) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure and Applied Chemistry*, **57**: 1699-1723.